



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE  
PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B YOLAĞININ AKTİVASYONU İLE  
İNDÜKLENEN MİKRORNA'LARIN BİYOLOJİK  
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Şakir AKGÜN

Temmuz 2019  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE PI3K/AKT/NF-κB  
YOLAĞININ AKTİVASYONU İLE İNDÜKLENEN MİKRORNA'LARIN  
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

Şakir AKĐÜN

Tez DanıŐmanı: Prof. Dr. Hakan AKĐA

Denizli, 2019

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) “Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar” gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Metinleri ekte sunulmuştur):

Alacam H, **Akgun S**, Akca H, Ozturk O, Kabukcu B B, Herken H. miR-181b-5p, miR-195-5p and miR-301a-3p are related with treatment resistance in schizophrenia. *Psychiatry Res* 2016; 245: 200-206.

Kucuksayan H, **Akgun S**, Ozes O N, Alikanoglu A S, Yildiz M, Dal E, Akca H. TGF-beta-SMAD-miR-520e axis regulates NSCLC metastasis through a TGFBR2-mediated negative feedback loop. *Carcinogenesis* 2018.

**Akgun S**, Kucuksayan H, Ozes O N, Can O, Alikanoglu A S, Yildiz M, Akca H. NF-kappaB-Induced Upregulation of miR-548as-3p Increases Invasion of NSCLC by Targeting PTEN. *Anticancer Agents Med Chem* 2019.

Firat E, Aybek Z, **Akgun S**, Kucuker K, Akca H, Aybek H. Exploring biomarkers in the overactive bladder: Alterations in miRNA levels of a panel of genes in patients with OAB. *Neurourol Urodyn* 2019.

## DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Şakir AKGÜN tarafından Prof. Dr. Hakan AKÇA yönetiminde hazırlanan "Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseriinde PI3K/AKT/NF-κB Yolağının Aktivasyonu ile İndüklenen MikroRNA'ların Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ .....  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Hakan AKÇA .....  
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. A. Gaye TOMATIR .....  
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Bünyamin AKGÜL .....  
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

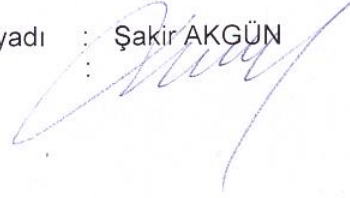
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Nedim KARAGENÇ .....  
Pamukkale Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
19/07/2019 tarih ve 22-24 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hakan AKÇA  
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Şakir AKGÜN  
İmza :



## ÖZET

### KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE PI3K/AKT/NF-κB YOLAĞININ AKTİVASYONU İLE İNDÜKLENEN MİKRORNA'LARIN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Şakir AKĐÜN  
Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji AD  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Hakan AKĐA

Temmuz 2019, 155 Sayfa

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) yüksek metastatik kapasitesinden dolayı agresif bir kanser tipidir. Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB), malign akciğer kanseri hücrelerinde sürekli aktif bir transkripsiyon faktörüdür ve KHDAK progresyonunda hayati öneme sahiptir. Aynı zamanda, tümör baskılayıcı ve onkogen olarak fonksiyon gösteren mikroRNA'lar (miRNA'lar) dahil olmak üzere birçok genin transkripsiyonel düzenlenmesinde yer almaktadır. Bazı miRNA'ların NF-κB tarafından indüklenen gen üyeleri olarak tanımlanmasının giderek arttığı bildirilmiştir. Bu çalışma NF-κB tarafından düzenlenen yeni miRNA'ları bulmayı amaçlamıştır.

NF-κB bağımlı miRNA'ların belirlenmesinde Kromatin İmmünopresipitasyon Sekans (ChIP-Seq) deneyi ve biyoenformatik analiz kullanılmıştır. Western blot analizi, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), lusiferaz reporter gen deneyleri miRNA'ların hedef genlerini araştırmak için gerçekleştirildi. Biyolojik aktiviteyi belirlemek için, H1299 ve A549 KHDAK hücre hatlarında transwell invazyon, migrasyon ve MTT testi yapılmıştır. miRNA ekspresyon düzeyi, metastatik tanı almış ve almamış olan KHDAK hastalarının primer tümör doku örneklerinde değerlendirildi.

ChIP-Seq ve qRT-PCR deneyleri miR-548as-3p, miR-8078, miR-1915-5p, miR-621, miR-1203 ve miR-3179'un tümör nekroz faktör-α (TNF-α) aracılı NF-κB tarafından transkripsiyonel olarak düzenlendiğini gösterdi. Sonra, tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homolog (PTEN)'un miR-548as-3p'nin doğrudan hedefi olduğunu bulduk. Üstelik miR-548as-3p, fosfatidilinositol-3-OH kinaz (PI3K)/AKT/NF-κB yolağını ve Slug, Zeb1 ve matriks metalloproteinaz 9 (MMP9)'un dahil olduğu NF-κB ilişkili genleri aktive etmektedir. Ayrıca, miR-8078'in C2 kalsiyum bağımlı domain içeren 2 (C2CD2)'yi hedefleyerek KHDAK hücrelerinin invazyon ve çoğalmasını arttırdığını tespit ettik. miR-548as-3p ve miR-8078'in KHDAK hücrelerinin invazyonunu arttırdığını ve metastatik tanı almamış olan KHDAK hastalarının tümör dokularında metastatik tanı almamışlara göre yüksek seviyede olduğunu gösterdik.

Tüm bu bulgular, miR-548as-3p ve miR-8078'in, akciğer kanserinin tedavisi için yeni bir aday hedef molekül olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** NF-kappa B, metastaz, invazyon, microRNA, karsinoma, küçük-hücreli-dışi-akciğer-kanseri

**Bu çalışma, TÜBİTAK (Proje No: 112S636) ve PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri**

**Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2018SABE012).**

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF MICRORNAS INDUCED VIA PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B PATHWAY ACTIVITY IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER.

AKGÜN, Şakir  
PhD Thesis in Medical Biology  
Supervisor: Prof. Dr. Hakan AKÇA (PhD)

July 2019, 155 Pages

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is an aggressive cancer type due to high metastatic capacity. Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) is a consistently active transcription factor in malignant lung cancer cells and has crucial significance in NSCLC progression. It is also implicated in the transcriptional regulation of many genes including microRNAs (miRNAs) that function as tumor suppressor or oncogene. It has been increasingly reported that several miRNAs defined as gene members are induced by NF- $\kappa$ B. The present study aimed to find novel miRNAs that are regulated by NF- $\kappa$ B.

Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq) experiment and bioinformatic analysis were used to determine NF- $\kappa$ B-dependent miRNAs. Western blot analysis, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), luciferase reporter gene assays were carried out to investigate the target genes of miRNAs. To determine biologic activity, transwell invasion, migration and MTT assay were carried out on H1299 and A549 NSCLC cell lines. miRNA expression level was evaluated in primer tumor tissue samples of NSCLC patients with or without metastatic diagnosis.

ChIP-Seq and qRT-PCR experiments showed that miR-548as-3p, miR-8078, miR-1915-5p, miR-621, miR-1203 and miR-3179 are transcriptionally regulated by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-mediated NF- $\kappa$ B. Then, we found that tumor suppressor phosphatase and tension homolog (PTEN) is a direct target of miR-548as-3p. Furthermore, miR-548as-3p activates phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)/AKT/NF- $\kappa$ B pathway and NF- $\kappa$ B-related genes including matrix metalloproteinase 9 (MMP9), Slug and Zeb1. Also, we determined that miR-8078 increases invasion and proliferation of NSCLC cells by targeting C2 calcium dependent domain containing 2 (C2CD2). We further showed that miR-548as-3p and miR-8078 increased invasiveness of NSCLC cells and was upregulated in tumor samples of NSCLC with metastatic diagnosis compared to without non-metastatic diagnosis.

All these findings provide that miR-548as-3p and miR-8078 could be a new candidate target molecule for the treatment of lung cancer.

**Keywords:** NF-kappa B, metastasis, invasion, microRNA, carcinoma, non-small-cell lung

**This study was supported by TUBITAK (Project numbers: 112S636) and Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project numbers: 2018SABE012).**

## TEŞEKKÜR

Beni öğrencisi olarak kabul ederek bu konuda çalışma olanağı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyip çalışmalarımız için tüm imkanlarını kullanan, bilimsel tecrübelerinden istifade ettiğim, eleştiri ve fikirleri ile tezimin bu aşamaya gelmesinde büyük emek veren, değerli hocam Prof. Dr. Hakan AKÇA'ya,

Tez çalışmam sırasında değerli zamanlarını ayırarak bilimsel katkı ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. A. Gaye TOMATIR, Dr. Öğr. Üyesi Nedim KARAGENÇ ve Doç. Dr. Bünyamin AKGÜL'e,

Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm saygıdeğer hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma,

Çalışma boyunca desteğini esirgemeyen Hakan KÜÇÜKSAYAN'a ve laboratuvar arkadaşlarıma,

Tez projemin maddi desteğini sağlayan TÜBİTAK ve Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Beni maddi-manevi karşılıksız olarak her koşulda destekleyen ve yanımda olan sevgili eşime ve aileme sonsuz teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
TABLolar DİZİNİ .....	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Amaç .....	2
2. Kuramsal Bilgiler ve Literatür Taraması .....	3
2.1. Akciğer Kanseri .....	3
2.2. PI3K/AKT yolağı .....	4
2.2.1. Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) .....	4
2.2.2. AKT/PKB .....	5
2.2.3. PTEN .....	6
2.2.4. PI3K/AKT yolağı aktivasyonu .....	7
2.2.4.1. TNF- $\alpha$ aracılı PI3K/AKT yolağı aktivasyonu .....	9
2.3. NF- $\kappa$ B .....	10
2.3.1. NF- $\kappa$ B aktivasyonu .....	11
2.3.2. NF- $\kappa$ B ve akciğer kanseri .....	12
2.3.2.1. İnflamasyon ile NF- $\kappa$ B aktivasyonu .....	13
2.3.2.2. Onkogen aracılı NF- $\kappa$ B aktivasyonu .....	13
2.3.2.3. Karsinojen indüklü NF- $\kappa$ B aktivasyonu .....	13
2.3.2.4. Diğer NF- $\kappa$ B aktivasyon mekanizmaları .....	14
2.3.3. Akciğer kanseri gelişiminde NF- $\kappa$ B hedef genleri .....	14
2.4. MikroRNA (miRNA) .....	15
2.4.1. miRNA genlerinin transkripsiyonu .....	16
2.4.2. miRNA biyogenezi .....	17
2.4.2.1. Kanonikal yolak .....	17
2.4.2.2. Kanonikal olmayan yolak .....	18
2.4.3. miRNA hedef tanıma .....	19
2.4.3.1. mRNA yıkımı .....	20
2.4.3.2. Translasyonel baskılama .....	21
2.4.4. miRNA ve akciğer kanser .....	22
2.4.5. NF- $\kappa$ B tarafından düzenlenen miRNA'lar .....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	26
3.1. Hücre Kültürü .....	26
3.2. Kullanılan Kimyasallar .....	26
3.3. miRNA, siRNA ve Plazmit DNA Transfeksiyonları .....	27
3.4. Western Blot .....	29
3.4.1. Protein miktarının belirlenmesi .....	30
3.4.2. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) .....	31
3.4.2.1. Örneklerin jelde yürütülmesi .....	31
3.4.3. PVDF membrana transferi ve işaretlenmesi .....	32
3.5. Elektroforetik Hareketlilik Kayma Yöntemi (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) .....	32
3.5.1. Jel hazırlanması, örneklerin hazırlanması ve yürütülmesi .....	33
3.5.2. Transfer ve görüntüleme .....	34
3.6. Dual Lusiferaz Deneyleri .....	34

3.6.1. NF- $\kappa$ B'nin transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi .....	34
3.6.2. miR-548as-3p ve miR-8078'in hedef genlerinin tespiti için lusiferaz reporter deneyleri .....	35
3.7. NF- $\kappa$ B (p65) Bağlanma Bölgelerinin Tespit Edilmesi .....	36
3.7.1. Kromatin immünpresipitasyon (ChIP) .....	36
3.7.2. Kromatin immünpresipitasyon sekans (ChIP-Seq).....	38
3.7.3. ChIP-Seq sonuçlarının biyoenformatik analizi.....	39
3.8. Hücre ve Dokudan Elde Edilen Örneklerin miRNA ve mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Real-Time PCR ile Ölçümü .....	39
3.8.1. RNA izolasyonları .....	39
3.8.1.1. Tümör doku örneklerinden RNA izolasyonu .....	41
3.8.2. cDNA sentez reaksiyonları .....	42
3.8.2.1. mRNA ekspresyon tayini için cDNA sentez reaksiyonu .....	42
3.8.2.2. miRNA ekspresyon tayini için cDNA sentez reaksiyonu .....	43
3.8.3. Real-Time PCR .....	43
3.8.3.1. mRNA ekspresyon seviyelerin real-time PCR ile ölçümü .....	43
3.8.3.2. miRNA ekspresyon seviyelerin real-time PCR ile ölçümü.....	44
3.9. miRNA'ların Hedef Genlerinin Belirlenmesi .....	44
3.9.1. Mikroarray analizi .....	44
3.10. Hedef Genlerin 3'UTR'lerinin psiCHECK-2 Lusiferaz Reporter Vektörüne Klonlanması .....	45
3.10.1. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme .....	45
3.10.2. Klonlanacak bölgenin PCR ile çoğaltılması .....	46
3.10.3. PCR ürünlerinin ve restriksiyon kesim ürünlerinin temizlenmesi .....	46
3.10.4. psiCHECK-2 lusiferaz reporter vektörünün ve PCR ürünlerinin XhoI ve PmeI restriksiyon enzimleri ile kesimi .....	47
3.10.5. psiCHECK-2 vektörünün alkalin fosfataz ile muamelesi.....	48
3.10.5.1. Alkalin fosfataz ile muamele edilen psiCHECK-2 'nin fenol kloroform ekstraksiyon yöntemi ile temizlenmesi .....	48
3.10.6. PTEN ve C2CD2 3'UTR'lerinin psiCHECK-2 vektörüne ligasyonu.....	49
3.10.7. Sıvı LB besiyeri hazırlanması .....	49
3.10.8. LB agar besiyeri hazırlanması .....	49
3.10.9. Ligasyon ürününün <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ suşuna transformasyonu.....	49
3.10.10. Kolonilerin çoğaltılması ve koloni PCR .....	50
3.10.11. Plazmit DNA izolasyonu .....	50
3.10.12. Yönlendirilmiş mutagenез (Site directed mutagenesis).....	51
3.11. Hücre İnvazyon ve Migrasyon Deneyi .....	53
3.12. Hücre Proliferasyon Deneyi.....	53
3.13. Sinyal Yolak Şekillerinin Oluşturulması .....	54
3.14. İstatistiksel Analiz.....	54
4. BULGULAR .....	55
4.1. TNF- $\alpha$ İndüklü AKT Aktivasyonu .....	55
4.2. TNF- $\alpha$ İndüklü NF- $\kappa$ B Aktivasyonu .....	55
4.2.1. TNF- $\alpha$ indüklü NF- $\kappa$ B (p65)'nin DNA'ya bağlanma kapasitesi .....	55
4.2.2. TNF- $\alpha$ indüklü NF- $\kappa$ B (p65) transkripsiyonel aktivitesi.....	56
4.3. Kromatin İmmünpresipitasyon-Sekans (ChIP-Seq) .....	57
4.4. ChIP-Seq Sonuçlarının Biyoenformatik Analizleri .....	59
4.5. NF- $\kappa$ B Tarafından Düzenlenen miRNA'lar .....	61
4.6. miR-548as-3p'nin Promotor Analizi .....	63
4.7. miR-548as-3p'nin Hedeflerinin Tespit Edilmesi .....	65
4.7.1. miR-548as-3p'nin PTEN ekspresyonu üzerine etkisi .....	66

4.7.2. PTEN 3'UTR'sinin psiCHECK-2 lusiferaz reporter vektörüne klonlanması .....	68
4.7.3. Klonlanan PTEN 3'UTR'nin yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ile mutantının oluşturulması .....	72
4.7.4. miR-548as-3p'nin lusiferaz aktivitesine olan etkisi .....	74
4.8. miR-548as-3p'nin H1299 ve A549 KHD AK Hücrelerinin İnvazyonu Üzerine Olan Etkisi .....	75
4.9. miR-548as-3p'nin H1299 ve A549 KHD AK Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Olan Etkisi .....	76
4.10. miR-548as-3p'nin KHD AK invazyon mekanizmasındaki rolü .....	77
4.10.1. NF- $\kappa$ B'nin PTEN ekspresyonuna etkisi .....	77
4.10.2. miR-548as-3p'nin NF- $\kappa$ B aktivasyonuna etkisi .....	78
4.10.3. miR-548as-3p'nin EMT mekanizmasına etkisi .....	79
4.11. miR-548as-3p ve PTEN'nin KHD AK Hastalarının Tümör Dokularındaki Ekspresyon Seviyeleri .....	81
4.12. miR-8078'in Promotor Analizi .....	83
4.13. miR-8078'in Hedeflerinin Tespit Edilmesi .....	83
4.13.1. miR-8078'in GREB1 ekspresyonu üzerine etkisi .....	84
4.13.2. Mikroarray .....	85
4.13.3. miR-8078'in C2CD2 ekspresyonu üzerine etkisi .....	88
4.13.4. C2CD2 3'UTR'sinin psiCHECK-2 lusiferaz reporter vektörüne klonlanması ...	89
4.13.5. Klonlanan PTEN 3'UTR'nin yönlendirilmiş mutagenез yönetmi ile mutantının oluşturulması .....	92
4.13.6. miR-8078'in lusiferaz aktivitesine olan etkisi .....	94
4.13.7. NF- $\kappa$ B'nin C2CD2 ekspresyonuna etkisi .....	95
4.14. miR-8078'in H1299 ve A549 KHD AK Hücrelerinin İnvazyon ve Migrasyonu Üzerine Olan Etkisi .....	96
4.15. miR-8078'in H1299 ve A549 KHD AK Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Olan Etkisi .....	98
4.16. miR-8078 ve C2CD2'nin KHD AK Hastalarının Tümör Dokularındaki Ekspresyon Seviyeleri .....	98
5. TARTIŞMA .....	100
6. SONUÇLAR .....	114
7. KAYNAKLAR .....	116
8. ÖZGEÇMİŞ .....	133
9. EKLER .....	134

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2-1.</b> 2018 yılı dünya genelinde, kadın ve erkeklerde tüm kanser vakalarının tahmini sayısı.....	4
<b>Şekil 2-2.</b> AKT ailesi üyelerinin domain yapıları ve fosforillene bölgeleri.....	6
<b>Şekil 2-3.</b> PI3K/AKT yolağının moleküler mekanizması.....	8
<b>Şekil 2-4.</b> AKT efektörleri ve fonksiyonları.....	9
<b>Şekil 2-5.</b> NF-κB aktivasyon yolları.....	12
<b>Şekil 2-6.</b> Genomdaki lokasyonuna göre miRNA genleri.....	16
<b>Şekil 2-7.</b> miRNA biyogenezi.....	19
<b>Şekil 2-8.</b> miRNA hedef bölgeleri.....	20
<b>Şekil 3-1.</b> psiCHECK-2 lusiferaz reporter vektörü haritası.....	47
<b>Şekil 3-2.</b> 3'UTR klonlanan vektörde mutasyon oluşturmak için kullanılan yönlendirilmiş mutagenез yöntemi.....	52
<b>Şekil 4-1.</b> H1299 hücrelerinin TNF-α muamelesi sonucu AKT aktivasyonunun western blot görüntüsü.....	55
<b>Şekil 4-2.</b> TNF-α indüklü p65 DNA bağlanma kapasitesi.....	56
<b>Şekil 4-3.</b> H1299 hücrelerinin TNF-α uyarımı sonucu p65 transkripsiyonel aktivitesinin ölçümü.....	56
<b>Şekil 4-4.</b> H1299 hücrelerinin p65 siRNA aracılığıyla NF-κB (p65)'in transkripsiyonel aktivitesinin azaltılması.....	57
<b>Şekil 4-5.</b> Sonikasyon öncesi ve sonikasyon sonrası H1299 genomik DNA'sının %0.8'lik agaroz jel görüntüsü.....	58
<b>Şekil 4-6.</b> <i>IKK</i> geninin promotorunda bulunan NF-κB (p65) bağlanma bölgesine spesifik primerler ile yapılan PCR sonucunun %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde görüntüsü.....	59
<b>Şekil 4-7.</b> NF-κB aktivasyonu ile transkripsiyonel olarak indüklenen miRNA'lar.....	62
<b>Şekil 4-8.</b> miR-548as-3p ve GPC5 geninin TNF-α ile muamele edilen H1299 hücrelerinde zamana bağlı ekspresyon değişimleri.....	63
<b>Şekil 4-9.</b> ChIP-Seq sonucu okunan bölge, miR-548as'nin lokasyonu ve EST'in başlangıç bölgesinin gösterildiği USCS browser görüntüsü.....	64
<b>Şekil 4-10.</b> miR-548as-3p'nin tahmini promotor analizinin şematik gösterimi.....	64
<b>Şekil 4-11.</b> miR-548as-3p'nin hedef gen tahmin sonuçları.....	65
<b>Şekil 4-12.</b> miR-548as-3p mimik ve inhibitör transfekte edilen H1299 hücrelerindeki miR-548as-3p'nin ekspresyon seviyesinin real-time PCR sonucu.....	66
<b>Şekil 4-13.</b> H1299 hücrelerinde miR-548as-3p'nin PTEN ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin real-time PCR sonucu.....	67
<b>Şekil 4-14.</b> H1299 ve A549 KHDAK hücrelerinde miR-548as-3p'nin PTEN ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin western blot analizi görüntüsü.....	68
<b>Şekil 4-15.</b> miR-548as-3p'nin bağlanma bölgesinin olduğu PTEN 3'UTR'sinin cDNA dizisi.....	68
<b>Şekil 4-16.</b> H1299 gDNA'sında PCR ile çoğaltılan PTEN 3'UTR bölgesinin %0.8 agaroz jelde görüntüsü.....	69
<b>Şekil 4-17.</b> Klonlanacak PTEN 3'UTR ve vektörün ligasyon için hazırlığı.....	70
<b>Şekil 4-18.</b> Transformasyon sonrası oluşan kolonilerden gerçekleştirilen PCR sonuçlarının %0.8'lik agaroz jel görüntüsü.....	70
<b>Şekil 4-19.</b> Koloni PCR sonucu amplifikasyon olan kolonilerden elde edilen plazmitlerin XhoI ve PmeI ile kesim sonucu %0.8'lik agaroz jel görüntüsü.....	71
<b>Şekil 4-20.</b> Klonlanan PTEN 3'UTR'sinin DNA dizi analizi sonucu kromatogram görüntüsü.....	72

<b>Şekil 4-21.</b> PTEN 3'UTR'sinde miR-548as-3p'nin tanıma bölgesinde oluşturulacak mutasyon için mutant primerler kullanılarak yapılan PCR'in %0.8'lik agaroz jel görüntüsü. ....	73
<b>Şekil 4-22.</b> Mutant PTEN 3'UTR'si için yapılan yönlendirilmiş mutagenез sonucunda oluşan kolonilerden gerçekleştirilen koloni PCR sonuçlarının %0.8'lik agaroz jelde görüntüsü. ....	73
<b>Şekil 4-23.</b> PTEN 3'UTR'sinde miR-548as-3p tanıma bölgesinde oluşturulan mutasyonun DNA dizi analizi sonucu. ....	74
<b>Şekil 4-24.</b> miR-548as-3p'nin Lusiferaz aktivitesi üzerine etkisi. ....	75
<b>Şekil 4-25.</b> miR-548as-3p'nin H1299 ve A549 KHDAK hücrelerinin invazyonu üzerine etkisi. ....	76
<b>Şekil 4-26.</b> miR-548as-3p'nin H1299 ve A549 KHDAK hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi. ....	77
<b>Şekil 4-27.</b> NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve downregülasyonu sonucunda, AKT aktivasyonu ve PTEN ekspresyonu üzerine etkisinin western blot görüntüsü. ....	78
<b>Şekil 4-28.</b> miR-548as-3p mimik ve inhibitörün NF- $\kappa$ B Lusiferaz aktivitesi üzerine etkisi. .	79
<b>Şekil 4-29.</b> NF- $\kappa$ B'nin Slug, Zeb1 ve MMP9 ekspresyon seviyeleri üzerine etkisinin western blot görüntüsü. ....	80
<b>Şekil 4-30.</b> miR-548-3p'nin Slug, Zeb1 ve MMP9 ekspresyon seviyelerine etkisinin western blot görüntüsü. ....	81
<b>Şekil 4-31.</b> KHDAK hastalarının parafine gömülü primer tümör dokularında miR-548as-3p ve PTEN'nin ekspresyon seviyelerinin real time PCR sonucu. ....	82
<b>Şekil 4-32.</b> KHDAK hastalarının tümör dokularında miR-548as-3p ve PTEN arasındaki korelasyon grafiği. ....	82
<b>Şekil 4-33.</b> ChIP-Seq sonucu okunan bölge, pre-miR-8078'in lokasyonu ve CpG adalarının gösterildiği USCS browser görüntüsü. ....	83
<b>Şekil 4-34.</b> miR-8078'in hedef gen tahmin sonuçları. ....	84
<b>Şekil 4-35.</b> H1299 hücrelerinde miR-8078'in GREB1 ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin real-time PCR sonucu. ....	85
<b>Şekil 4-36.</b> miR-8078'in hedef genlerini tespit etmek için gerçekleştirilen mikroarray analiz sonuçlarının heatmap görüntüsü. ....	86
<b>Şekil 4-37.</b> Mikroarray analizi sonucunda tespit edilen genlerin 3'UTR'lerinde miR-8078 tanıma bölgesinin tespit edildiği TargetScan programı analiz sonuçları. ....	86
<b>Şekil 4-38.</b> miR-8078'in aday hedef genleri CRCP ve C2CD2 genlerinin miR-8078 mimik transfeksiyonu sonucu ekspresyon seviyelerinin real-time PCR sonuçları. ....	87
<b>Şekil 4-39.</b> miR-8078'in aday hedef genleri CRCP ve C2CD2 genlerinin TNF- $\alpha$ muamelesi sonucu ekspresyon seviyelerinin real-time PCR sonuçları. ....	88
<b>Şekil 4-40.</b> H1299 ve A549 KHDAK hücrelerinde miR-8078'in C2CD2 ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin western blot analizi görüntüsü. ....	89
<b>Şekil 4-41.</b> miR-8078'in bağlanma bölgesinin olduğu C2CD2 3'UTR'sinin cDNA dizisi. ....	89
<b>Şekil 4-42.</b> H1299 gDNA'sında PCR ile çoğaltılan C2CD2 3'UTR bölgesinin %0.8 agaroz jelde görüntüsü. ....	90
<b>Şekil 4-43.</b> Klonlanacak PTEN 3'UTR ve vektörün ligasyon için hazırlığı. ....	91
<b>Şekil 4-44.</b> Transformasyon sonrası oluşan kolonilerden gerçekleştirilen PCR sonuçlarının %0.8'lik agaroz jel görüntüsü. ....	91
<b>Şekil 4-45.</b> Klonlanan C2CD2 3'UTR'sinin DNA dizi analizi sonucu kromatogram görüntüsü. ....	92
<b>Şekil 4-46.</b> C2CD2 3'UTR'sinde miR-8078'in tanıma bölgesinde oluşturulacak mutasyon için mutant primerler kullanılarak yapılan PCR'in %0.8'lik agaroz jel görüntüsü. ....	93

<b>Şekil 4-47.</b> Mutant C2CD2 3'UTR'si için yapılan yönlendirilmiş mutagenез sonucunda oluşan kolonilerden gerçekleştirilen koloni PCR sonuçlarının %0.8'lik agaroz jelde görüntüsü. ....	93
<b>Şekil 4-48.</b> C2CD2 3'UTR'sinde miR-8078 tanıma bölgesinde oluşturulan mutasyonun DNA dizi analizi sonucu. ....	94
<b>Şekil 4-49.</b> miR-8078'in lusiferaz aktivitesi üzerine etkisi. ....	95
<b>Şekil 4-50.</b> NF-κB'nin C2CD2'nin ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin western blot görüntüsü. ....	96
<b>Şekil 4-51.</b> miR-8078'in H1299 ve A549 KHDAK hücrelerinin invazyonu ve migrasyonu üzerine etkisi. ....	97
<b>Şekil 4-52.</b> miR-8078'in H1299 ve A549 KHDAK hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi. ....	98
<b>Şekil 4-53.</b> KHDAK hastalarının parafine gömülü tümör dokularında miR-8078 ve C2CD2'nin ekspresyon seviyelerinin real time PCR sonucu. ....	99
<b>Şekil 5-1.</b> miR-548as-3p ve miR-8078'in KHDAK progresyonunda rol aldığı mekanizmanın gösterimi. ....	113

**TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo 2-1.</b> NF- $\kappa$ B tarafından dÜzenlenen miRNA'lar.....	24
<b>Tablo 3-1.</b> miRNA ve siRNA transfeksiyon yöntemi.....	27
<b>Tablo 3-2.</b> Plazmit DNA transfeksiyon yöntemi.....	28
<b>Tablo 3-3.</b> 3'UTR klonlama, yönlendirilmiş mutagenез ve Real-Time PCR (qRT-PCR) için kullanılan primerlerin listesi.....	29
<b>Tablo 3-4.</b> Western blot deneyinde kullanılan tamponlar .....	29
<b>Tablo 3-5.</b> SDS-Poliakrilamid jel bileşenleri ve miktarları.....	31
<b>Tablo 3-6.</b> EMSA için poliakrilamid jel'in hazırlanma şartları.....	33
<b>Tablo 3-7.</b> EMSA için hazırlanan poliakrilamid jel'e yüklenecek örneklerin hazırlanma şartları. ....	33
<b>Tablo 4-1.</b> Chip Sekans için gönderilen örneklerin miktar ve absorbans değerleri. ....	59
<b>Tablo 4-2.</b> CHIP-seq sonuçlarının biyoenformatik analizleri sonucunda potansiyel p65 bağlanma bölgeleri ve düzenlediği miRNA genleri. ....	60

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

A20.....	TNF Alpha Induced Protein 3
ADAM19....	ADAM Metallopeptidase Domain 19
Bcl-XL.....	BCL2 Apoptoz düzenleyici gen ailesi üyesi
BTG2.....	NGF-Inducible Anti-Proliferative Protein PC3
C2CD2.....	C2 Calcium Dependent Domain Containing 2
c-FLIP.....	Caspase-Like Apoptosis Regulatory Protein
clAP1.....	Cellular Inhibitor of Apoptosis 1
clAP2.....	Cellular Inhibitor of Apoptosis 2
CRCP.....	Calcitonin Gene-Related Peptide-Receptor Component Protein
CXCL1.....	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1
CXCL8.....	C-X-C Motif Chemokine Ligand 8
CXCR4.....	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
ECL.....	Enhanced Chemiluminescence
EGF.....	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
EGFR.....	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor)
EMT.....	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (Epithelial-Mesenchymal Transition)
EST.....	Expressed Sequence Tags
FoxO3a.....	Forkhead Box O3
GPC5.....	Glypican Proteoglycan 5
ICAM-1.....	Intercellular Adhesion Molecule 1
IGF2BP1....	Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 1
IL-8.....	Interleukin 8
LATS2.....	Large Tumor Suppressor Kinase 2
LZTS1.....	Leucine Zipper Tumor Suppressor 1
MMP19.....	Matrix Metallopeptidase 19
MMP2.....	Matrix Metallopeptidase 2
MMP9.....	Matrix Metallopeptidase 9
MTT.....	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MYO10.....	Myosin X



NEMO.....NF- $\kappa$ B Esansiyel Modölatör (IKK $\gamma$ )  
 NIK.....NF- $\kappa$ B İndükleyici Kinaz  
 P21.....Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A (CDKN1)  
 PDCD4.....Programmed Cell Death 4  
 PHLPP2.....PH Domain And Leucine Rich Repeat Protein Phosphatase 2  
 PI3K.....Fosfotidilinozitol 3 Kinaz  
 PKB.....Protein Kinaz B  
 PPP2R2.....Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit Bbeta  
 PTEN.....Phosphatase And Tensin Homolog  
 SLUG.....Snail Family Transcriptional Repressor 2 (SNAIL2)  
 SPRY1.....Sprouty RTK Signaling Antagonist 1  
 TELO2.....Telomere Maintenance 2  
 TIMP3.....Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 3  
 TNFR1.....Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü 1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1)  
 TNF- $\alpha$ .....Tümör Nekroz Faktörü-Alfa (Tumor Necrosis Factor-Alpha)  
 TRAF2.....TNF Receptor Associated Factor 2  
 TRAF7.....TNF Receptor Associated Factor 7  
 TRAIL.....TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand  
 uPA.....Serine Protease Urokinase-Type Plasminogen Activator  
 UTR.....Translasyon olmayan bölge (Untranslated Region)  
 VCAM.....Vasküler-Selüler Adezyon Molekülü (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)  
 VEGF.....Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör (Vascular Endothelial Growth Factor)  
 WASH1.....WAS Protein Family Homolog 1  
 XIAP.....X-ilişkili Apoptoz İnhibitörü (X-linked Inhibitor of Apoptosis)  
 Zeb1.....Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1  
 Zeb2.....Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2

## 1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, kanser ilişkili ölümler arasında önde gelmektedir. Dünya genelinde akciğer kanserinde görülen sağ kalım oranı %10-15'tir. Bunun sebebi; akciğer kanseri tümörüne sahip hastalarda metastaz ve lezyonların teşhisinin geç olmasıdır. Güncel Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasına göre; akciğer kanserinin bir alt türü olan küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK), akciğer kanseri vakalarının yaklaşık olarak %90'ını oluşturduğu belirtilmektedir. Akciğer kanseri ilişkili ölümlerin başta gelmesinin başlıca sebebi; KHDAK'nin yüksek invazyon ve metastaz yapma kapasitesidir.

Hücrel invazyon, apoptozdan kaçış, çoğalma ve sağ kalım gibi birçok aktivitede rol oynayan PI3K (Fosfatidilinositol-3-OH kinaz)/AKT yolağı, KHDAK'nin dahil olduğu çoğu kanserde sıklıkla aktiftir. Bu yolağın aktivasyonu ile STAT3, Ap-1 ve Nükleer faktör kappa B (NF-κB) gibi bazı transkripsiyon faktörleri aktive olmaktadır. Çok fonksiyonlu transkripsiyon faktörü NF-κB apoptozdan kaçış, sağkalım, çoğalma, farklılaşma, inflamasyon, invazyon ve metastaz gibi hücrel proseslerin indükleyicisidir. NF-κB, KHDAK dahil birçok kanserde sürekli aktiftir. NF-κB, heterodimer ve homodimerlerden meydana gelen ve durağan hücrelerde inhibitör kappa B ailesi proteinleri tarafından sitoplazmada tutulan kompleks bir proteindir. NF-κB, epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin, tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) ve interlökin-1β (IL-1β) gibi sitokin ve büyüme faktörleri tarafından uyarılabilmektedir. NF-κB aktive olduktan sonra nükleusa transloke olmaktadır. Transloke olan alt birimlerden p65, kB DNA motiflerine bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir. NF-κB 500'den fazla protein kodlayan genin ekspresyonunu kontrol etmektedir.

Küçük kodlamayan RNA sınıfına giren 20-22 nükleotit uzunluğunda olan mikroRNA'lar (miRNA), mRNA'ların 3'UTR'lerine bağlanarak negatif yönde düzenlemektedirler. miRNA'lar, hücre farklılaşmasından, apoptoz, proliferasyon, invazyon ve metastaz gibi hücrel proseslerde rol alan önemli düzenleyicilerdir. Akciğer kanseri dahil birçok kanser türünde anormal düzeyde eksprese olmaktadır. miRNA genlerinin transkripsiyonları NF-κB gibi transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Akciğer kanserinde NF-κB sinyal yolağında rol oynayan birçok miRNA tanımlanmış olmasına rağmen, NF-κB tarafından düzenlendiği bilinen miRNA genleri oldukça sınırlıdır.

KHDAK'nde sürekli aktif olan PI3K/AKT/NF-κB yolağının kanserin oluşumu, gelişimi ve ilerlemesinde rol oynadığı ve bu süreçlerde aktifleşen NF-κB'nin nükleusa göç ederek

miRNA genlerinin promotorlarına bağlanıp transkripsiyonlarını regüle ettiğini öngörmekteyiz.

### **1.1. Amaç**

Bu tezde, KHDAK'nde PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının sürekli aktivasyonu sonucu NF- $\kappa$ B transkripsiyon faktörü tarafından promotorlarına bağlanarak transkripsiyonel olarak regüle ettiği miRNA'ları ve hedef genlerini tespit etmeyi ve bu miRNA'ların KHDAK progresyonundaki rollerini araştırmayı amaçladık.



## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

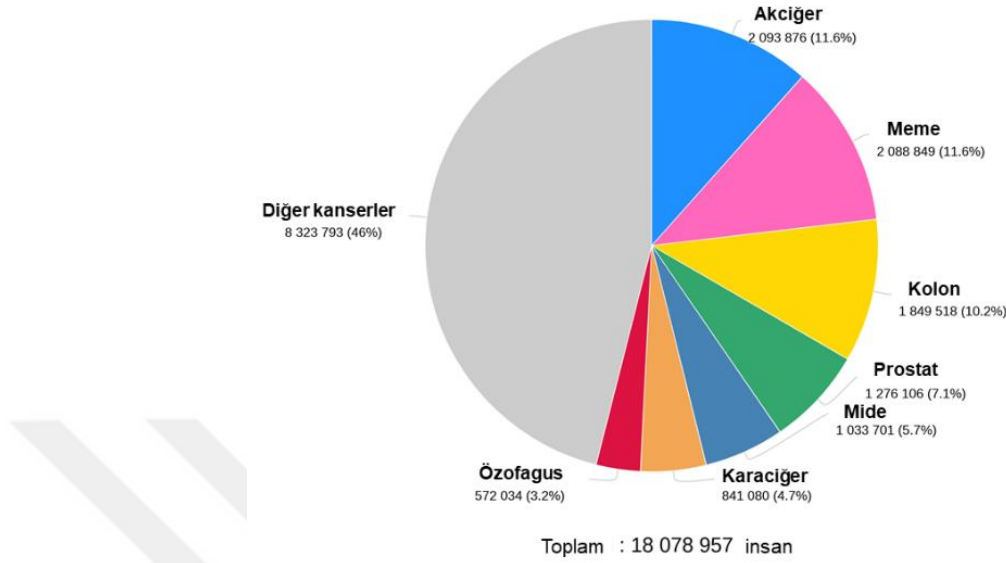
### 2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, akciğerde epitel hücrelerin kontrolsüz çoğalması olarak karakterizedir. Akciğer kanseri dünya genelinde en sık görülen kanser çeşididir. 2018 yılında 2.1 milyon insana akciğer kanseri teşhisi koyulacağı ve bunların 1.8 milyonunun öleceği tahmin ediliyor (Şekil 2.1). Akciğer kanserli hastaların 5-yıllık sağ kalım oranları %15'ten daha azdır. Akciğer kanseri, hem dünya genelinde hem de Türkiye'de erkek ve kadınlar arasında kanser ilişkili ölümlerde birinci sırada gelmektedir (Bray vd. 2018).

Akciğer kanseri genel olarak ileri evrede (evre IIIB-IV) teşhis edildiğinden dolayı tümör uzak metastaz yapmış durumdadır. Böylece kanser, en etkili tedavi yöntemi olan cerrahi müdahale için uygun evreyi geçmiştir (Herbst vd. 2008). Neticede, hastaların büyük çoğunluğu teşhis koyulduktan sonra 18 ay içerisinde ölür (Langer vd. 2010). Akciğer kanseri kaynaklı ölümlerin %70'ten fazlası metastazdan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle uzmanlar tarama amaçlı yıllık akciğer filmi ya da düşük doz bilgisayarlı tomografi önermektedir (Siegel vd. 2012). Akciğer kanser tedavisinde klinik gelişmeler olmasına rağmen akciğer kanseri hala kanser ilişkili ölümlerde birinci sırada yer almaktadır.

Primer akciğer kanseri histolojik olarak iki ana gruba ayrılır: Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK, tüm akciğer kanserlerinin %15'ini oluşturmaktadır), küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK, tüm akciğer kanserlerinin %85'ini oluşturmaktadır). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri genel olarak adeno karsinom (%40), skuamoz hücreli karsinom (%30) ve büyük hücreli karsinom (%15) olarak alt kategoriye ayrılır. Bu sınıflama Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınlamış olduğu son kriterlere göre birçok sınıfa ayrılmaktadır (Travis vd. 2015).

Akciğer kanserinin gelişmesi ve ilerlemesi ile alakalı moleküler mekanizmalar oldukça komplekstir. Oksidatif strese bağlı DNA hasarı nedeniyle, onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu dahil kronik iltihaplanma ve sigara dumanına maruz kalmanın neticesinde genetik ve epigenetik değişiklikler meydana gelir. Bu genetik değişiklikler, hücrel aktiviterin gerçekleşmesinden sorumlu olan sinyal yollarının düzensizliğine neden olmaktadır. EGF/RAS/RAF/MEK/ERK ve PI3K/Akt gibi sinyal yollarının düzensizlikleri onkogeneze ve kanserin ilerlemesinde kritik rol oynar (Mommott vd. 2010).



**Şekil 2-1.** 2018 yılı dünya genelinde, kadın ve erkeklerde tüm kanser vakalarının tahmini sayısı (WEB\_1).

## 2.2. PI3K/AKT yolağı

Fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K) / Akt sinyal yolağı, tümörleşmede anahtar rol oynayan hücre büyümesi, farklılaşma, çoğalma, sağ kalım, migrasyon ve invazyon gibi birçok hücre fonksiyonların düzenleyicisidir (Hennessy vd. 2005). PI3K/AKT yolağı somatik mutasyonlar, kopya sayısı değişimleri, anormal epigenetik düzenlemeler ve gen amplifikasyonları gibi nedenler ile kanser türlerinin tamamında en düzensiz olan yollardan biridir. Programlı hücre ölümü ile hücre bölünmesi ve büyümesi arasında homeostatik dengenin bozulması tümör oluşumunda bozulduğu iyi bilinir. PI3K/AKT yolağının downstream etkileyicileri bu bozulmada önemli rol oynarlar.

### 2.2.1. Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K)

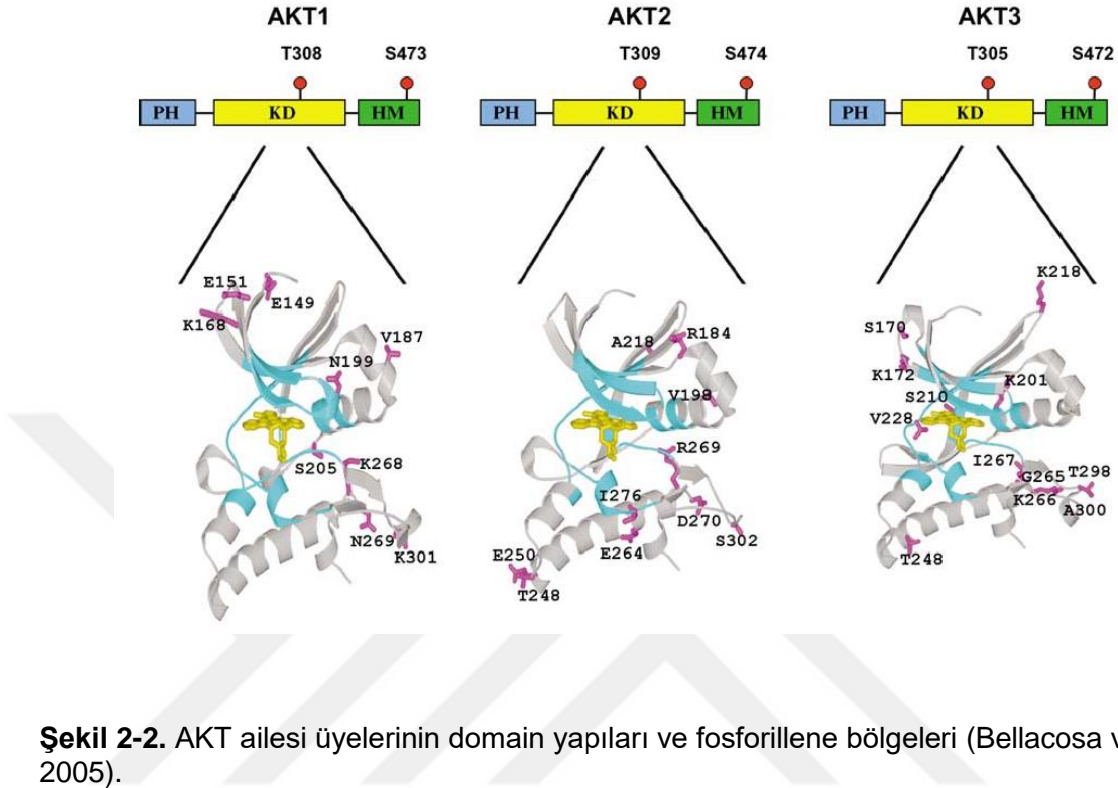
PI3K'lar, birçok sinyal yolağını düzenlemek için sitokinler veya büyüme faktörleri aracılığıyla gelen hücre dışı sinyali hücre içi sinyale dönüştüren anahtar moleküllerdir. PI3Klar yapısına ve fonksiyonuna göre 3 gruba ayrılan lipid kinazlardır. Kansere en yakın ilişkisi olan sınıf IA PI3K'lardır. Sınıf 1A PI3K'lar, p85 regülatör alt ünite ve p110 katalitik alt

üniteden meydana gelen heterodimer proteinlerdir. *PIK3CA*, *PIK3CB* ve *PIK3CD* sırasıyla p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  alt ünitelerini kodlayan homolog genlerdir. Regülatör alt ünite, p85 $\alpha$  (p50 $\alpha$  ve p55 $\alpha$  splaysing varyantları), p85 $\beta$ , p55 $\gamma$ , sırasıyla *PIK3R1*, *PIK3R2*, *PIK3R3* tarafından kodlanan 5 adet izoformdan meydana gelir (Liu vd. 2009). Sınıf IB PI3K'lar p87 regülatör alt birim ile p110 $\gamma$  katalitik alt birimden meydana gelir. p110 $\gamma$ 'un ekspresyonu genel olarak lökositlerle sınırlıdır (Okkenhaug vd. 2003). Sınıf II PI3K'ların regülatör alt birimleri yoktur. Tek bir katalitik alt birimden meydana gelirler. Fizyolojik fonksiyonu tam olarak anlaşılmamıştır. Sınıf III PI3K'lar da sınıf II'ler gibi sadece katalitik alt birimden meydana gelirler. Sınıf III'ler otofaji ve hücre içi trafikte önemli rol oynamaktadırlar (Backer 2008).

### 2.2.2. AKT/PKB

AKT, farede bir lösemi tipinden sorumlu olduğu bilinen viral onkoprotein v-AKT'nin insan homoloğu bir serin/treonin kinazdır (Staal 1987). Protein Kinaz B (PKB) olarak da bilinir. Memeli genomunda *PKB $\alpha$* , *PKB $\beta$*  ve *PKB $\gamma$*  genleri tarafından kodlanan AKT1, AKT2 ve AKT3 olarak 3 adet izoformu bulunur (Datta vd. 1999). Bu üç AKT kinaz hücre çoğalması, büyüme, sağ kalım, glukoz metabolizması, neo-vaskularizasyon, genom kararlılığı gibi birçok hücrel prosesi düzenleyen çeşitli sinyal kaskadlarında merkezi bir düğüm noktası oluşturmaktadır (Balsara vd. 2004). AKT2 ve AKT3'ün amino asit dizileri sırasıyla %81 ve %83 oranında AKT1'in amino asit dizisine homoloji gösterir. Üç izoform da bir amino terminal plekstrin homolog (PH) domain, bir merkezi serin/treonin katalitik domain ve küçük bir karboksi terminal düzenleyici domain içeren aynı yapıya sahiptir (Feng vd. 2004). PH domaini membran lipidlerinden fosfatidilinositoller ile etkileşmektedir. AKT'nin katalitik bölgesi, AGC kinaz ailesine (Protein kinaz G, Protein kinaz C (PKC), cAMP-bağımlı protein kinaz, protein kinaz (PKA)) benzemektedir. AGC kinazlar, Ca<sup>2+</sup>, fosfotidilinositol gibi ikincil mesajcılar ile düzenlenmektedirler. Tüm dokularda bir yada daha fazla AKT izoformu ifade etmektedir. AKT1 en geniş ifade edilen izoformdur. Erken ve ilerlemiş evre kanserlerin genel özelliklerinden biri anormal AKT aktivitesidir (Manning vd. 2007). AKT kanserin dışında, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve kas hipotrofisi gibi birçok hastalıkta da düzensiz aktiviteye sahiptir (Liao vd. 2010).

AKT1'in aktivasyonu için iki anahtar rezidünün fosforillenmesi gerekir: Treonin 308 (Thr308) ve Serin 473 (Ser473)'tür (Alessi vd. 1996). Maksimum kinaz aktivitesi için her iki rezidünün de fosforillenmesi gerekir. Aynı durum AKT2 (Thr309 ve Ser474) ve AKT3 (Thr305 ve Ser472) için de geçerlidir (Şekil 2.2).



AKT proteinleri, metabolizmasının düzenlenmesinden, anjiyogenez, çoğalma, sağ kalım, migrasyon ve invazyon gibi oldukça geniş hücresel proses spektrumuna sahiptir. Bu faaliyetleri gerçekleştirmek için AKT'nin substratları oldukça geniş bir yelpaze oluşturmaktadır. Literatürde günümüze kadar tespit edilen AKT hedefleri 100'ün üzerindedir. Fakat bu substratların birkaçı hariç çoğunun ortak özelliği RxRxxS/T konsensus dizisini bulundurmalarıdır (Manning vd. 2007).

### 2.2.3. PTEN

Fosfataz ve tensin homolog (PTEN), ilk olarak çeşitli kanserlerde kayıp ya da mutant bir tümör baskılayıcı adayı olarak keşfedilmiştir (Steck vd. 1997). Sonraki çalışmalar, iki ayrı araştırma grubu tarafından PTEN'in hem fokal adezyon kinaz (FAK)'ı defosforile eden protein fosfataz hem de fosfotidilinositollerin 3.pozisyonundaki fosfatı hidrolize eden bir lipid fosfataz olduğunu ortaya koymuştur (Maehama vd. 1998, Tamura vd. 1998). PTEN'in tümör baskılayıcı etkisi lipid fosfataz etkisinden kaynaklanmaktadır. 403 amino asitten oluşan PTEN'in N-terminal bölgesinde, fosfataz aktivitesi gösteren katalitik bağlanma domaini ve

PIP<sub>2</sub> bağlanma domaini bulunur. C-terminal bölgesinde ise, membranda etkili yerleşim göstermesini sağlayan fosfolipidleri bağlayan C2 domaini ile protein-protein etkileşimi için PDZ domain bulunur (Carracedo vd. 2008). PTEN'in inaktivasyonu C-terminal kuyruk bölgesinde bulunan Ser380, Thr382 ve Thr383'ün fosforlanması ile sağlanır. C-terminal kuyruk domaininin defosforilasyonu konformasyonel değişimi sonucunda katalitik bölgesinin açılmasına neden olarak aktif duruma geçmesini sağlamaktadır.

Özelleşmiş plazma membran lipitleri PIP<sub>2</sub> ve PIP<sub>3</sub>, PTEN'in başlıca hedeflerindedir. PTEN, spesifik olarak PIP<sub>3</sub>'ün 3' fosfatını hidrolizleyerek PIP<sub>2</sub> oluşumunu sağlar. Böylece PI3K/AKT yolağının negatif düzenlenmesini sağlayarak homeostazın korunmasına yardımcı olur (Salmena vd. 2008). Bundan dolayı PTEN, PI3K yolağının negatif yönde düzenlenmesinde başrol oynar.

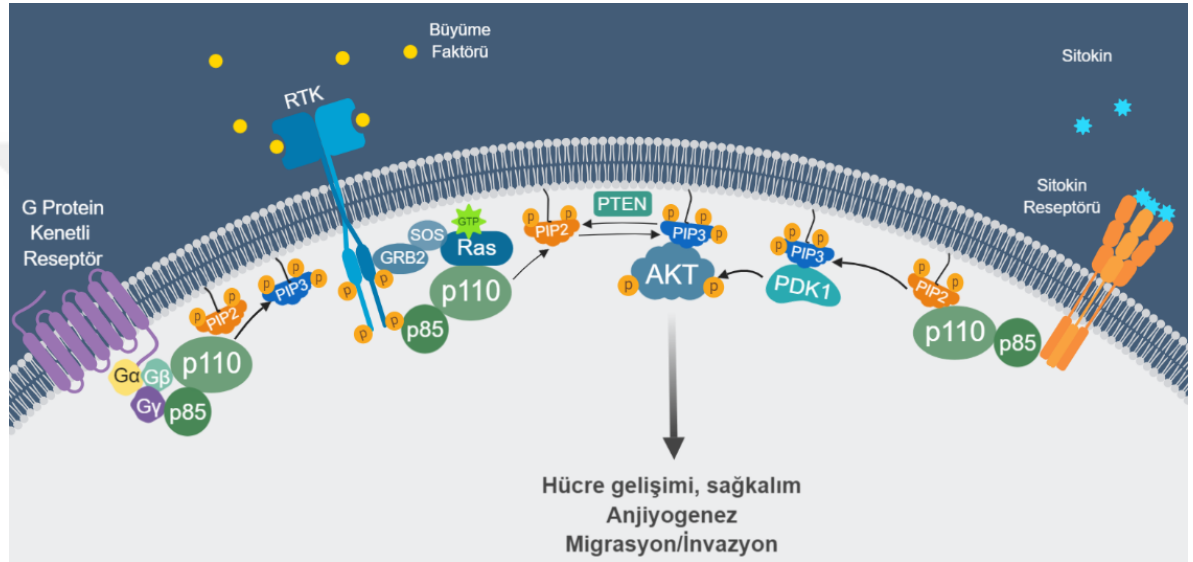
Akciğer kanseri dahil birçok kanserde, PTEN'in fonksiyonu ya da ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. KHDAK'inde PTEN'in inaktivasyon mekanizmaları; germline ya da somatik mutasyonlar, promotör hipermetilasyonu ya da fosforilasyonu ile kodlamayan RNA'lardır (MikroRNA'lar, Uzun kodlamayan RNA'lar). KHDAK tümörlerinde PTEN ekspresyonu %70'e kadar azalmıştır (Perez-Ramirez vd. 2015).

#### **2.2.4. PI3K/AKT yolağı aktivasyonu**

PI3K/AKT yolağı kanserde en sıklıkla aktif olan sinyal yollarından biridir. Yolak çeşitli sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri ve membran reseptörleri aracılığıyla uyarılmaktadır. Sınıf IA PI3K'lar, diğer sınıflara nazaran büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin büyüme faktörü (IGF-1) ve sitokinlere (Tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-6 (IL-6)), G-protein kenetli reseptörlere (GPCR) ve RAS gibi hücre içi küçük GTPaz'lara yanıt vermede primer sorumludurlar (Henson vd. 2006, Madge vd. 2000, Nidai Ozes vd. 1999, Wegiel vd. 2008, Zha vd. 2010). p85 düzenleyici alt ünite, durağan hücrelerde p110 katalitik alt üniteyi 'düşük aktivite durumunda' tutar. Hücre yüzey reseptörleri uyarıldığında (büyüme faktörleri, adaptör proteinler vs.) aktive olan reseptör tirozin kinazlar, tirozin rezidülerini fosfatlayarak Src homolog 2 (SH2) domaini taşıyan p85 alt biriminin bağlanmasını sağlar ve p110 katalitik alt biriminin aktivasyonunu gerçekleştirirler. P110 katalitik alt birim büyüme faktörleri tarafından aktive edilen Ras onkogen proteini tarafından da aktive edilebilmektedir. Aktive edilen PI3K alt birimi p110 plazma membran lipidi fosfotidilinositol-4,5-bisfosfat'ın (PI(4,5)P<sub>2</sub>) inositol halkasının 3. pozisyonunu fosfatlayarak fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfat'ın (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) oluşumunu sağlar.

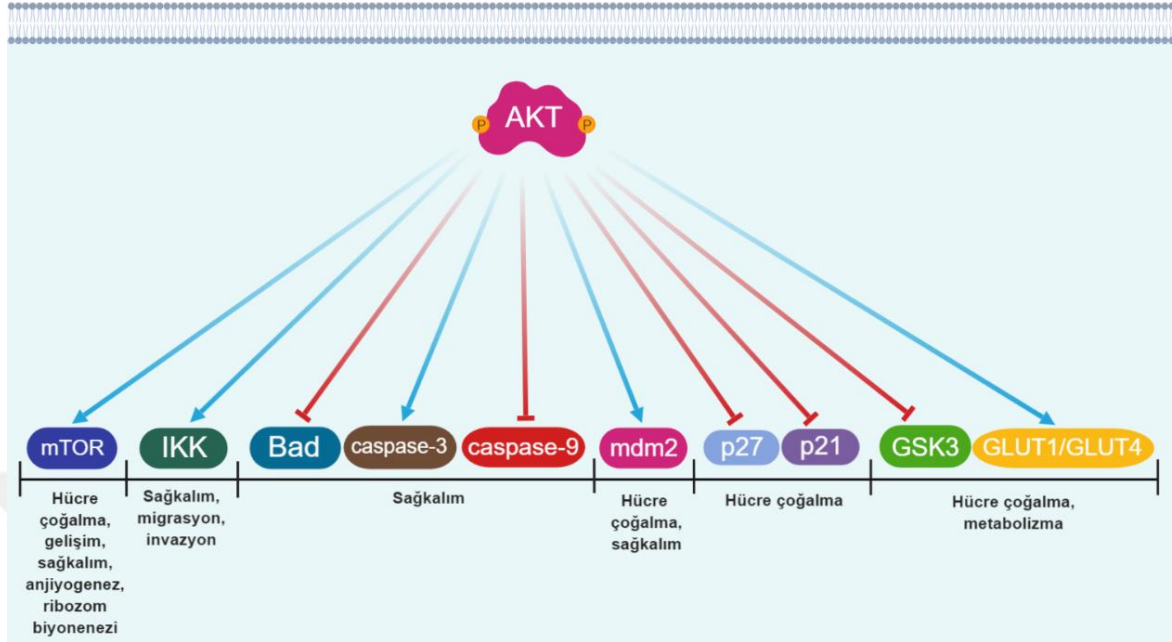


Bu fosfolipid (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) ikincil mesajcı olarak rol oynayarak AKT ve PDK1 gibi plekstrin homolog (PH) domaine sahip sitoplazmik proteinleri plazma membranına toplar. Sürekli aktif durumda olan PDK1 ile AKT'nin membrana birlikte lokalize olmalarıyla AKT'nin PDK1 tarafından fosforillenmesi, böylece AKT'nin katalitik alt ünitesinin aktive edilmesi sağlanır (Şekil 2-3).



**Şekil 2-3.** PI3K/AKT yolağının moleküler mekanizması.

AKT, protein ve lipid kinazlar, transkripsiyon faktörleri, küçük G proteinleri düzenleyicileri, hücre vesikül taşıyıcıları, metabolik enzimler, E3 ubiquitin ligazlar, hücre döngüsü düzenleyicileri ve birçok farklı fonksiyona sahip proteinleri direkt olarak fosforillemektedir. AKT bu hedeflerini Ser ve Thr rezidülerinden fosforiller (Şekil 2-4).



**Şekil 2-4.** AKT efektörleri ve fonksiyonları.

#### 2.2.4.1. TNF- $\alpha$ aracılı PI3K/AKT yolağı aktivasyonu

PI3K/AKT yolağı, TNF- $\alpha$ 'nın bilinen iki reseptöründen biri olan ve tüm hücrelerde eksprese edilen tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR1) tarafından aktive edilmektedir. PI3K alt birimi p85 TNFR1'in sitoplazmik kısmına bağlanmaktadır (Guo vd. 1996). TNF- $\alpha$  indüklenmesiyle p85 aktive olmakta ve NF- $\kappa$ B yolağının aktivasyonunu sağlamaktadır (Pincheira vd. 2008). NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile apoptoz baskılanması (Takahashi vd. 2007), epitel-mezenkimal geçiş (EMT) (Wang vd. 2013) veya hücre adhezyonu gerçekleşebilmektedir (Bieler vd. 2007).

PI3K/AKT yolağının KHDAK dahil birçok solid tümör ve hematolojik malignitelerde hiperaktivasyonu bazı genetik değişimler sonucu gerçekleşmektedir. Bunlar; EGFR, HER2 gibi reseptör tirozin kinazlarda (RTK) veya PDK1 ve PI3K'da meydana gelen onkogenik somatik mutasyonlar ile gen amplifikasyonlarıdır. Buna benzer olarak PTEN gibi tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen heterozigosite kaybı, inaktive edici mutasyonlar bu yolağın hiperaktivasyonu için yeterlidir. Bunlara ek olarak, kanserde olduğu gibi diğer hastalıklarda meydana gelen genetik değişimler sonucunda kodlamayan RNA'lardaki defektler de hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu veya inaktivasyonunda büyük rol oynadığını son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir (Dong vd. 2014, Josse vd. 2014, Xue vd. 2018).

### 2.3. NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B proliferasyon, invazyon, migrasyon, inflamasyon, apoptoz ve farklılaşma gibi çeşitli proseslerde anahtar rol oynayan 200'de fazla geni düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Aggarwal 2004). On baz çiftinden oluşan kB motifin olduğu genlerin promotor veya enhansırına bağlanarak transkripsiyonel aktivasyonu sağlarlar. NF- $\kappa$ B ilk olarak B hücrelerinde immünglobin kappa hafif zincirin transkripsiyonu için gerekli transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır (Sen vd. 1986). İnflamasyon ve immün yanıtın düzenlenmesinde fonksiyonu iyi bilinen NF- $\kappa$ B'nin, ilerleyen çalışmalar neticesinde başlıca rolünün onkogeneze'de olduğu gösterilmiştir. NF- $\kappa$ B, KHDAAK dahil birçok kanserde sürekli aktif durumdadır ve PI3K/AKT yolağı dahil kanser ile ilişkili birçok yolda NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonundan söz edilmektedir (Fong vd. 2009, Karin vd. 2005). NF- $\kappa$ B'nin kanser ile ilişkisi olduğuna dair ilk ipucu, alt birimi olan p65'in (RelA) klonlanması ile ortaya çıkmıştır (Gilmore 2003). Tüm memeli hücrelerinde bulunan NF- $\kappa$ B tek bir gen değil, birbiriyle yakın ilişkili 5 üyeden oluşan bir ailedir: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- $\kappa$ B1) ve p52/p100 (NF- $\kappa$ B2). Rel proteinleri kendi arasında RelA, RelB, c-Rel ve p50, p52 olarak iki sınıfa ayrılır. Rel proteinlerinin p50 ve p52 sınıfı, sırasıyla p105 ve p100 prekürsörlerin C-terminal domainlerinin ubiquitin bağımlı proteolizisi sonucu oluşurlar ve bu üyeler DNA'ya bağlanma domainlerine sahipken transkripsiyon başlatma domainlerinden yoksundurlar (Ghosh vd. 1998). Tüm üyeler korunmuş Rel homoloji domain (RHD) taşırlar. RHD domaini, DNA'ya bağlanmayı, heterodimer ya da homodimer oluşturmayı ve spesifik inhibitörleri ile etkileşmeyi sağlar (Chen vd. 2011). 5 adet Rel monomeri 15 potansiyel dimer oluşturabilir. NF- $\kappa$ B dimerik komplekslerin çoğu hücre tipine ve uyarın spesifikliğine göre eksprese olurken p65/p50, c-Rel/p50, p65/p65 ve p65/c-Rel homodimer ve heterodimerleri fizyolojik olarak en önemlileridir (Shih vd. 2011). Diğer dimer komplekslerinden farklı olarak p50/p50 ve p52/p52 homodimerleri hedef genlerinin transkripsiyonunu baskılamaktadırlar (Zhong vd. 2002). NF- $\kappa$ B'nin ilk tanımlanan ve en yaygın formu p65/p50 heterodimeridir (Verma vd. 1995).

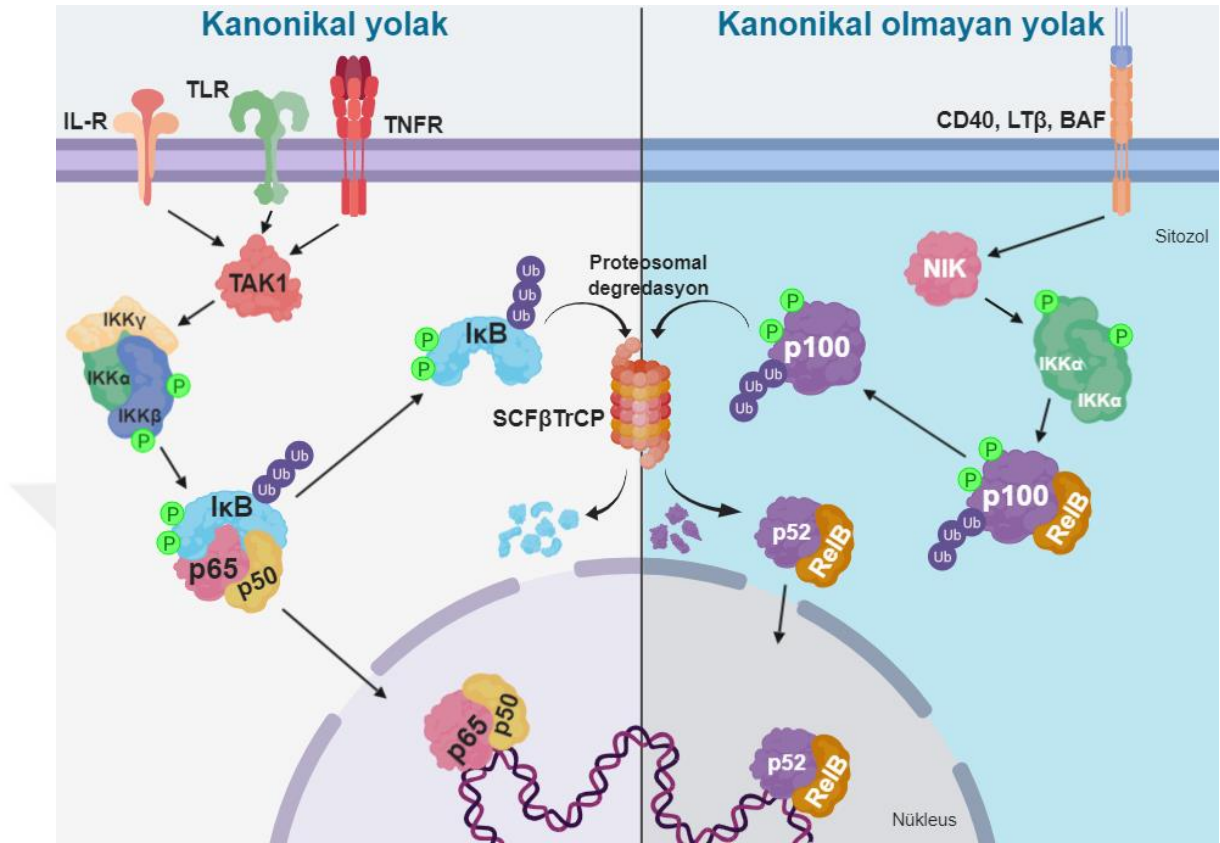
NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonunun düzenlenmesinde sitoplazmik inhibitörü olan I $\kappa$ B'ler görev alır. I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$  ve BCL-3'ten oluşan I $\kappa$ B ailesi NF- $\kappa$ B'nin nükleusa translokasyonu için gereken nükleer lokalizasyon dizisini (NLS) maskeleyerek inhibisyon görevi görürler. I $\kappa$ B'lerin yapılarında ankyrin tekrar motifleri bulunur. Bu motifler protein-protein etkileşimini sağlarlar. Ankyrin tekrarları ve Rel homoloji domainleri arasındaki spesifik etkileşim korunmuştur ve NF- $\kappa$ B'nin düzenlenmesi için kritik öneme sahiptir. Ayrıca,

p100 ve p105 altbirimleri NF- $\kappa$ B homodimerleride ankyrin tekrar motiflerine sahip olduklarından bazen I $\kappa$ B ailesine dahil olmaktadır. Dinlenme durumunda ki hücrelerde, NF- $\kappa$ B dimerlerinin çoğu sitoplazmada I $\kappa$ B'ler ile bağlı durumdadırlar.

### 2.3.1. NF- $\kappa$ B aktivasyonu

NF- $\kappa$ B sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL-1 vb.), büyüme faktörleri (EGF, insülin vb.), tirozin kinazlar, bakteriyel/viral enfeksiyon, stress (UV ışığı, serbest radikaller) gibi dış uyarılar tarafından aktive edilebilmektedir. Tüm bu uyarılar NF- $\kappa$ B'nin farklı yollardan aktivasyonunu sağlarlar. Bu yollar kanonik ve kanonik olmayan olarak ikiye ayrılırlar (Lin vd. 2010). İster kanonik ister kanonik olmayan yoldan olsun tüm uyarılar sonucunda I $\kappa$ B Kinazlar (IKK) aktive olmaktadır (Shih vd. 2011). Kanonik yolak birçok hücre tipinde başlıca NF- $\kappa$ B aktivasyon yolağıdır ve mikrobiyal/viral enfeksiyonlar, sitokinler, büyüme faktörleri tarafından uyarılabilir. Kanonik yolak IKK, I $\kappa$ B ve NF- $\kappa$ B dimerlerinden meydana gelir. IKK, iki katalitik ünite (IKK $\alpha$  ve IKK $\beta$ ) ve bir düzenleyici (NEMO olarak ta bilinen IKK $\gamma$ , NF- $\kappa$ B'nin başlıca modülatörüdür) olarak üç protein kompleksinden meydana gelir. Aktif IKK, I $\kappa$ B'yi Ser32 ve Ser36'dan fosforilleyerek E3 ligaz SCF- $\beta$ TrCP kompleksi tarafından K-48 ubikütinasyonu gerçekleşmesine öncülük eder ve I $\kappa$ B proteosomal degradasyona uğrar. Serbest kalan NF- $\kappa$ B heterodimeri (genellikle p65/p50) IKK tarafından fosforillenerek nükleusa translokasyonu gerçekleşir ve hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonu için promotor bölgelerindeki  $\kappa$ B motiflerine bağlanır (Şekil 2-4) (Karin vd. 2000).

Kanonik olmayan yolak TNF ailesi, limfotoksin beta (LT $\beta$ ), CD40, B-hücre aktivasyon faktörü (BAF) ve bazı viral proteinler tarafından aktive edilmektedir. Bu yolağın aktivasyonunda başlıca rolü NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinaz) alır. NIK aracılı IKK $\alpha$  aktivasyonu p100'ün kırılarak p52 olgun formun oluşmasını sağlar. p52, RelB ile kompleks oluşturarak nükleusa transloke olarak hedef gen ekspresyonu arttırır (Şekil 2-5) (Hayden vd. 2004). Nükleusta, NF- $\kappa$ B dimerlerinin transkripsiyonel fonksiyonu fosforilasyon ile kontrol edilir (Ghosh vd. 2002).



**Şekil 2-5.** NF-κB aktivasyon yolları.

### 2.3.2. NF-κB ve akciğer kanseri

NF-κB'nin sürekli aktivasyonu, başlangıçta lenfoid kanserlerde bulunmuş olmasına rağmen akciğer kanseri dahil, meme, prostat, pankreas gibi katı tümörlerde sürekli aktif olduğuna dair oldukça fazla kanıt bulunmuştur (Karin vd. 2005, Li vd. 2009). Akciğer tümörleri histolojik olarak oldukça heterojenik bir yapıda olmasına rağmen, elde edilen veriler akciğer tümürlü hastalarda NF-κB aktivitesinin yüksek seviyede olduğunu göstermektedir. Üstelik bu durum, akciğer kanserlerinin her iki sınıfını oluşturan küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) içinde geçerlidir. Ayrıca bu hastaların tümör evresi ve kötü prognozu NF-κB aktivitesi ile doğru orantılı olduğu rapor edilmiştir (Jin vd. 2008). Akciğer tümör oluşumu ve gelişiminde NF-κB oldukça önemli bir yere sahiptir. Akciğer kanserinde NF-κB aktivasyonu çeşitli şekillerde gerçekleşebilir.

### **2.3.2.1. İnflamasyon ile NF-κB aktivasyonu**

İnsan kanserlerinin yaklaşık %15-20'sinin inflamasyon ile güçlü bir ilişkisi olduğu tahmin ediliyor. Akciğer kanseri gelişiminde de inflamasyon önemli rol oynamaktadır (Smith vd. 2006). Akciğer enfeksiyonu ve alerjilere ek olarak sigara dumanı ve asbestos gibi kimyasal maruziyetleri, kronik akciğer inflamasyonunun en önemli sebeplerinden biridir (Emmendoerffer vd. 2000). Miyeloid hücreler (başlıca makrofajlar) inflamasyonu uyaran sitokinlerin ana kaynağıdır. Böylelikle, sitokinler aracılığıyla kanonikal yoldan NF-κB'nin aktivasyonu gerçekleşmektedir. Sonuçta miyeloid hücreler inflamasyon sitokinlerini salgılayarak kansere eğilimli bir inflamatuvar mikroçevre oluşturarak akciğer kanserini destekler (Wong vd. 2010). Ayrıca akciğer kanseri epitel hücrelerindeki NF-κB aktivasyonu akciğer kanserinin gelişiminde önemli rol oynar (Takahashi vd. 2010).

### **2.3.2.2. Onkogen aracılı NF-κB aktivasyonu**

Akciğer kanser gelişimine NF-κB'nin katkısı oldukça komplekstir ve altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılmış değildir. NF-κB aktivasyonunun K-Ras mutasyonu ile ilişkisi olduğu bulguları, NF-κB'nin aktivasyonunun onkogen aktivasyonun sonucu olduğunu ortaya atmaktadır (Barbie vd. 2009, Basseres vd. 2010). Akciğer kanserinde Ras mutasyonlarının %90'ını K-Ras oluşturur. p53 fonksiyon kaybı ve sürekli aktif K-Ras birlikte NF-κB'nin kanonikal yoldan sürekli aktivasyonuna sebep olmaktadır (Meylan vd. 2009). K-Ras mutasyonları aynı zamanda kanonikal olmayan NF-κB aktivasyonuna da neden olmaktadır.

### **2.3.2.3. Karsinojen indüklü NF-κB aktivasyonu**

NF-κB aktivasyonu sigara dumanı ve onun bileşeni olan nikotin ile aktive olmaktadır. NF-κB, tümör oluşmadan çok önce akciğer epitel hücrelerinde sigara dumanından dolayı sürekli aktiftir. Bu NF-κB aracılı hücre sağ kalım sinyali, muhtemelen kanser gelişiminin erken evresinde apoptozdan kaçma ve çoğalmayı teşvik etmek içindir (Janssens vd. 2006).

#### 2.3.2.4. Diğer NF-κB aktivasyon mekanizmaları

PI3K/AKT yolağı NF-κB'nin sürekli aktivasyonunu sağlayarak akciğer kanseri sağ kalımı, proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonuna katkıda bulunmaktadır (Bai vd. 2009, Tsurutani vd. 2005). PI3K/AKT yolağı, NF-κB'yi IKK bağımlı şekilde aktive etmektedir (Gustin vd. 2004). Fas-ilişkili ölüm domain proteini (FADD)'in fosforilasyonu, kötü prognoz gösteren akciğer adenokarsinomlu hastalarda çoğalmayı ve IKK-aracılı NF-κB aktivasyonunu indüklemektedir (Chen vd. 2005).

#### 2.3.3. Akciğer kanseri gelişiminde NF-κB hedef genleri

Fiziksel, mekanik, kimyasal ve fizyolojik şekillere aktive olabilen NF-κB inflamasyon, hücre farklılaşması, hücre sağkalım, proliferasyon, invazyon, anjiyogenez ve metastaz gibi süreçlerden sorumlu 500'den fazla farklı genin ekspresyonunu kontrol etmektedir (Li vd. 2010).

NF-κB, Siklin D ve E hücre döngüsü proteinlerin ekspresyonlarını arttırarak hücre büyümesi ve çoğalmasını pozitif yönde düzenlemektedir. Siklin D1'in NF-κB tarafından upregülasyonu G1/S geçişini indüklemektedir (Hinz vd. 1999). Ayrıca, hücreyi G2/M hücre döngüsü kontrol noktasında tutan *growth arrest and DNA damage-inducible protein 45* (GADD45)'in ekspresyonunu baskılayarak da hücre büyümesi ve çoğalmasını arttırmaktadır (Chen vd. 2001).

NF-κB, hücrelerin apoptozdan kaçmasını sağlayarak, kanser tedavisinde önemli bir handikap olan ilaca direnç gelişmesine neden olmaktadır. Bu mekanizma çeşitli şekillerde olmaktadır. Bcl-XL, cIAP1, cIAP2, XIAP, A20, TRAF-2 ve c-FLIP anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarını indükleyerek hücreyi sağ kalıma yönlendirmektedir (Karin vd. 2002). Diğer bir mekanizma; NF-κB tarafından indüklenen manganese superoxide dismutase (MnSOD), reactive oxygen species (ROS)'u ortadan kaldırarak hücresel stres sonucu indüklenen apoptozu baskılamaktadır (Ju vd. 2007).

NF-κB, gelişen tümörlerin ihtiyacı olan tümör kanlanması sağlamak için gerçekleşen anjiyogenezden sorumlu olan pro-anjiyogenik faktörlerden VEGF, CXCL1, CXCL8 ve IL-8'in transkripsiyonunu indüklemektedir (Grivennikov vd. 2010).

Kanser hücre metastazını indükleyen NF-κB, bu süreci hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM), hücreiçi adhezyon molekülü-1 (ICAM-1), kemokin reseptör (CXCR4), serine protease urokinase-type plasminogen activator (uPA), matriks metallo proteinazlar

(MMP2, MMP9)'in ekspresyonunu indükleyerek gerçekleştirmektedir (Lin vd. 2010). NF- $\kappa$ B aynı zamanda, kanser hücre invazyon ve metastazının kritik adımı olan epitel-mezenkimal geçiş (EMT)'in de indüklenmesinde sorumlu faktörlerin transkripsiyonel aktivatörüdür. Zeb-1 ve Zeb2, indüklemektedir. NF- $\kappa$ B, hücre-hücre adhezyon molekülü E-kaderini baskılayarak EMT'yi indükleyen Zeb1 ve Zeb2 promotoruna bağlanarak transkripsiyonlarını indüklemektedir (Chua vd. 2006). Yine EMT'nin bir başka indükleyicisi Twist1, NF- $\kappa$ B tarafından transkripsiyonel olarak upregüle olmaktadır (Li vd. 2012).

NF- $\kappa$ B aynı zamanda inflamasyondaki rolünden dolayı *positive feedback* mekanizması oluşturarak kendi aktivasyonunu sağlayan TNF- $\alpha$ , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu indüklemektedir (Karin vd. 2005).

Malign tümörlerin ilerlemesi ve gelişmesinde önemli rol oynayan NF- $\kappa$ B ailesi yalnızca protein kodlayan genlerin değil aynı zaman mikroRNA (miRNA) ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA)'ları içeren kodlamayan RNA'ların da transkripsiyonel regülasyonlarına dahildir.

#### 2.4. MikroRNA (miRNA)

MikroRNA'lar 19-25 nükleotit uzunluğunda, iç kaynaklı küçük RNA moleküllerinin geniş bir sınıfını oluştururlar. İlk olarak *C.elegans*'ın gelişimi üzerine yapılan çalışmalarda keşfedilmişlerdir. Bu çalışmada; iç kaynaklı (endojen) küçük bir RNA parçasının (lin-4); post-embriyonik gelişme için gerekli bir proteini kodlayan lin-14' geninin translasyonunu 3' bölgesinde bulunan ve translasyona uğramayan bölgesiyle (3'-UTR) etkileşime girerek baskıladığı gösterilmiştir (Lee vd. 1993). Daha sonra bu çalışmayı destekler nitelikte olan ve yine *C. elegans* üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise let-7 genini baskılayan küçük kodlanmayan RNA parçalarının varlığı gösterilmiştir. Endojen küçük RNA'ların, haberci RNA'ların (mRNA) translasyonunu baskıladığı hipotezi yapılan araştırmalarla desteklenmiş ve "miRNA" terimi Science dergisinde yayınlanan bir dizi makalede önerilmiş ve kabul görmüştür (Lagos-Quintana vd. 2001, Lee vd. 2001).

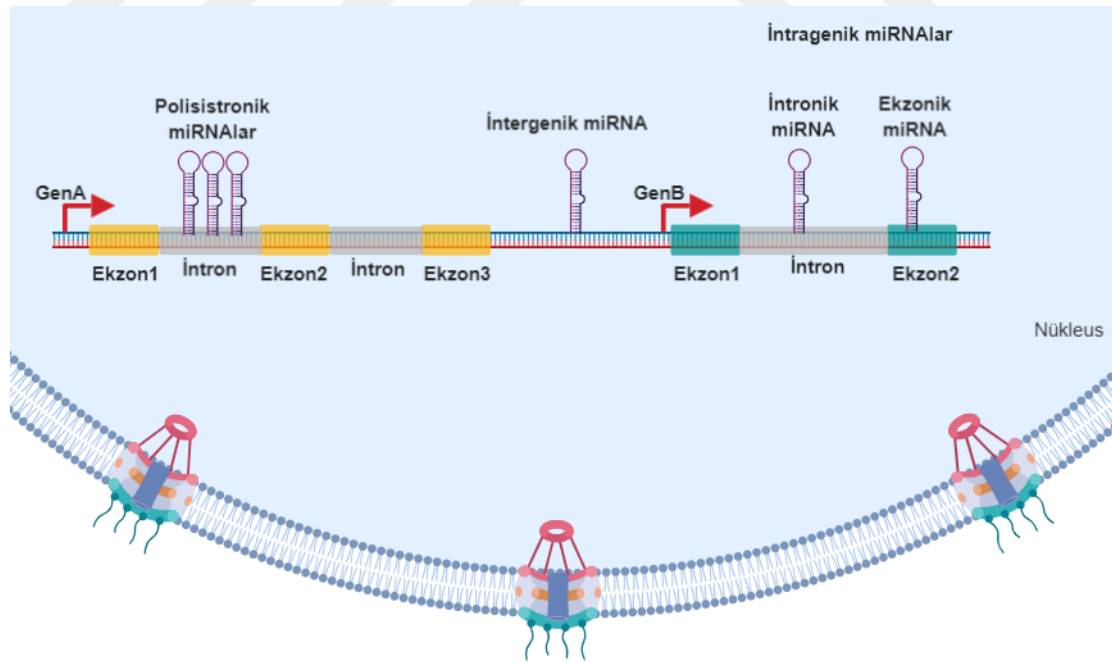
Küçük kodlamayan RNA'lar sınıfına giren miRNA'lar, genellikle mRNA'ların 3' translasyona olmayan bölgelerine (3'-UTR) komplementer olarak bağlanıp mRNA'nın translasyonunu engelleyerek ya da mRNA'nın degradasyonunu hızlandırarak gen ifadesini sustururlar (Fabian vd. 2012, Huntzinger vd. 2011). Bir miRNA yüzlerce mRNA'yı hedef alarak translasyonu engellediği gibi bir mRNA'da yüzlerce miRNA tarafından hedef alınarak translasyonu baskılanabilmektedir (Lin vd. 2015). miRNA'lar birçok organizmada keşfedilmiştir ve çoğunda korunmuşlardır (Bartel 2004). Birçok gelişimsel ve fizyolojik süreci



düzenlerler ve kanser dahil normal ve patolojik hücrel süreçlerin önemli rol oynamaktadırlar.

#### 2.4.1. miRNA genlerinin transkripsiyonu

miRNA genleri Y kromozomu hariç bütün genoma dağılmıştır (Kozomara vd. 2011). Genomdaki lokasyonlarına göre miRNA'lar, intergenik (genler arası) ve intragenik (gen içi) olarak ikiye ayrılır. İntrogenik olanlarda intronik ve ekzonik miRNA olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2-6). Memeli miRNA genlerinin yaklaşık %50'si birbirine yakın bölgelerde bulunmuştur. Polisistronik miRNA'lar olarak adlandırılan bunlar tek bir transkriptten işlenerek olgunlaşırlar (Lee vd. 2004). Bazı miRNA'lar kodlamayan gen transkriptlerinden, bazıları kodlayan genlerin transkriptlerinden meydana gelmektedir. miRNA'ların yaklaşık %40'ı kodlamayan genlerin intron bölgelerinde yer alırken, %10'u kodlamayan genlerin ekzonik bölgelerinde yer almaktadır. miRNA'ların yaklaşık %40'ı protein kodlayan genlerin intronlarından sentezlenmektedir. İntergenik miRNA genleri kendilerine ait gen bölgelerine sahiptirler (Lin vd. 2015).



**Şekil 2-6.** Genomdaki lokasyonuna göre miRNA genleri.

19-25 nükleotit uzunluğunda olgun miRNA, birincil mikroRNA (primary microRNA, pri-miRNA) olarak bilinen uzun bir transkriptten işlenerek elde edilmektedir (Chang vd. 2007).

İntragenik miRNA genlerinin kendi promotor bölgeleri olduğu için monosistronik pri-miRNA olarak transkribe olmaktadır (Cai vd. 2004). İntergenik miRNA'lar (ekzonik ve intronik) konağı olan gen ile aynı promotor bölgesini paylaştıkları için birlikte transkribe olmaktadır. Ancak, 3 farklı kanser hücre hattında yapılan bir çalışmada seçilen 87 intronik miRNA'nın 32 tanesinin kendine özgü promotora sahip oldukları bulunmuştur (Ozsolak vd. 2008). miRNA genlerinin çoğu RNA Polimeraz II (Pol II) tarafından transkribe edilerek 5'cap, sprints ve poliadenilasyon modifikasyonları geçirmektedirler (Lee vd. 2004). Fakat, Alu tekrarlarıyla bağlantılı küçük bir grup miRNA geni RNA Polimeraz III (Pol III) tarafından transkribe olmaktadır (Borchert vd. 2006). Dolayısı ile, konak gen ile aynı promotoru paylaşan intragenik miRNA genleri Pol II, kendi promotor bölgesine sahip intragenik miRNA genleri Pol II veya Pol III tarafından transkribe olmaktadır (Schanen vd. 2011). Pol II bağımlı miRNA gen ekspresyonu geçici kontrolü mümkün kıldığı için miRNA'lar hücre tipi ve özel koşullara bağlı olarak sentezlenebilmektedirler. Pol II tarafından transkribe olan miRNA'lar birkaç saatten bir güne kadar etkin olabilmektedirler.

#### **2.4.2. miRNA biyogenezi**

miRNA'ların genomdaki lokasyonlarına göre biyogenezleri iki farklı yoldan gerçekleşmektedir.

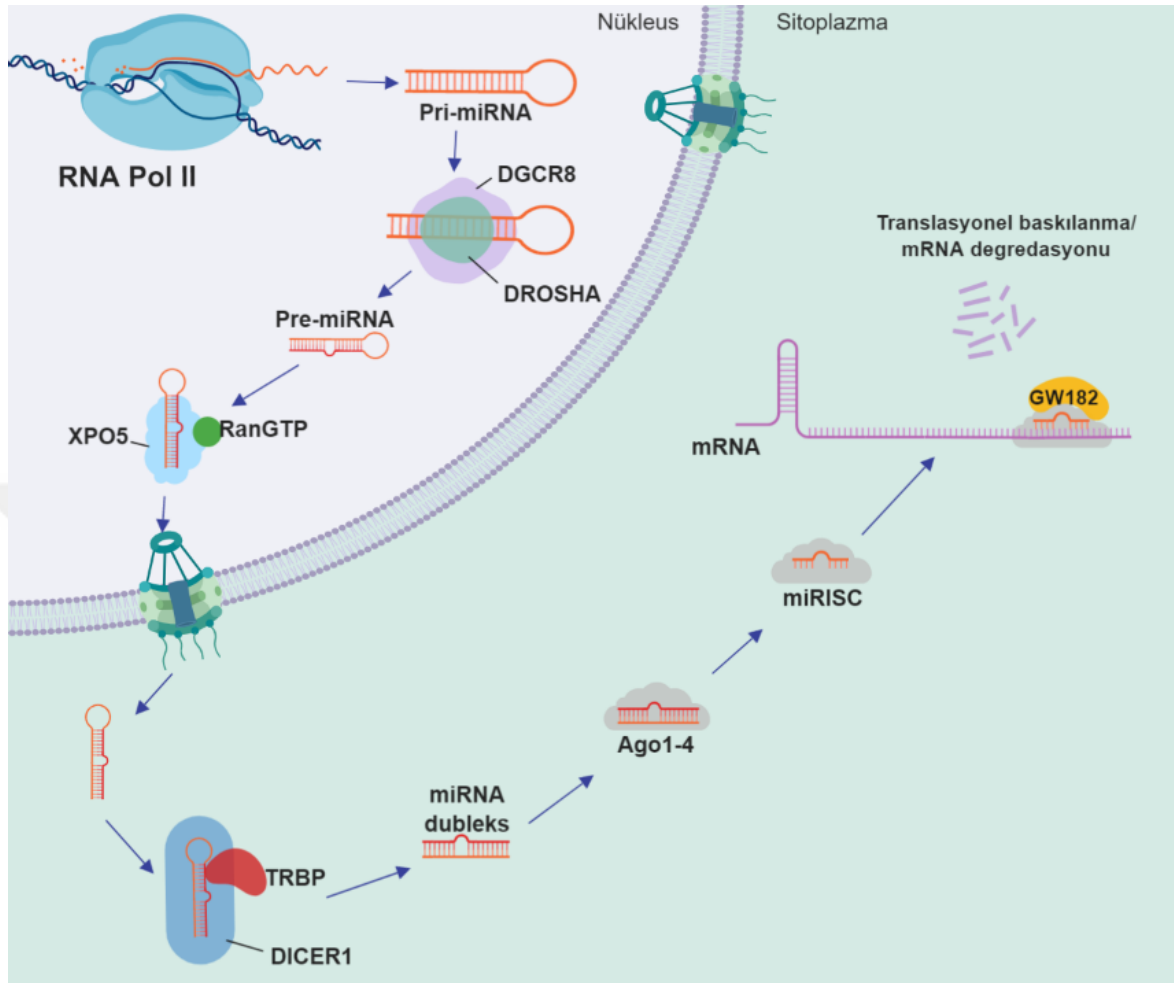
##### **2.4.2.1. Kanonikal yolak**

Tüm kanonikal miRNA'lar RNA polimeraz II (Pol II) tarafından transkribe olurlar. miRNA biyosentezi pri-miRNA transkripsiyonu ile başlar. Her pri-miRNA birkaç kilobaz uzunluğundan 20 kilobaz uzunluğuna kadar olabilen en az bir sap-ilmek yapısından meydana gelmektedir (Lee vd. 2002). Bu yapı mikroişlemci için bir substrat oluşturur. Mikroişlemci, iki adet RNaz III domaini içeren DROSHA denilen bir endonükleaz ve çift zincir RNA'ya bağlanan DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8)'den meydana gelen heterotrimerik bir komplekstir. DROSHA'daki iki adet RNaz III'ten her biri sap-ilmek yapısındaki pri-miRNA'nın sap kısmından 2 baz kalacak şekilde her bir RNaz III ayrı zinciri keser (Gregory vd. 2004). DROSHA ve DGCR8 proses aşaması sap-ilmik yapısındaki pri-miRNA kırılınca yaklaşık 60-70 nükleotitlik saç tokası yapısında pre-miRNA oluşur (Gregory vd. 2004). Oluşan yaklaşık 70 nükleotitlik helikal yapıdaki pre-miRNA, nükleustan sitoplazmaya nakilden sorumlu olan exportin 5 tarafından tanınmayı sağlar (Lund vd. 2004)

ve sitoplazmaya aktarılır (Yi vd. 2003). Sitoplazmada diğer bir RNaz III aktivitesine sahip DICER1 tarafından tanınır ve çift zincir pre-miRNA asimetrik olarak kırılır. DICER1'in pre-miRNA'yı etkin şekilde kırması için çift zincir RNA'ya bağlanan TRBP (transactivation-responsive RNA-binding protein) ile birleşik durumdadır. Pre-miRNA kırıldıktan sonra her iki zincirin 3' ucunda 2 nükleotitlik fazlalıklı yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda çift zincir miRNA ortaya çıkar (Bernstein vd. 2001). Kesilen çift zincir miRNA Argonat proteinine (AGO1, AGO2, AGO3 veya AGO4) yüklenir. TRBP aynı zamanda Argonat ve DICER1 arasından fiziksel bir köprü vazifesi görür. (Chendrimada vd. 2005). Argonat miRNA dubleksinin bağlanması için uygun yüksek enerjili konformasyona dönüşmek için ATP'yi kullanan şaperon proteinleri (HSC70/HSP90)'nden yardım alır. miRNA dubleksi yüklendiğinde Argonat eski konformasyonuna geri döner ve olgun susturma kompleksini oluşturmak için miRNA zincirinin birini uzaklaştırır (Kawamata vd. 2010). Hangi zincirin uzaklaştırılıp degrades olacağı miRNA dubleksinin Argonat'a bağlanma uyumluluğuna bağlıdır. Bu da Argonat içerisindeki pakete yüklenen dubleksin 5' ucundaki nükleozit monofosfata bağlıdır. Bu paket, dublexteki zincirlerin 5' ucunda Urasil ya da Adenin olanı tercih eder (Suzuki vd. 2015). Rehber miRNA zinciri tercih edildikten sonra uyarılmış susturma kompleksi (RNA Induced Silencing Complex-RISC) oluşur (Chendrimada vd. 2005). Tek zincir olgun miRNA, komplementer hedef mRNA'lara bağlanarak susturmak için GW182 ailesi proteinleri ile birlikte RISC'ine rehberlik yapar. Oluşan miRISC translasyonun durmasını veya mRNA'nın parçalanmasını sağlar (Chendrimada vd. 2005). Bu işlem sitoplazmada P cismi denilen yerde gerçekleşir (Şekil 2-7).

#### **2.4.2.2. Kanonikal olmayan yolak**

Bazı miRNA genleri pri-miRNA'lardan elde edilirken, bazıları doğrudan DICER kesimine giren pre-miRNA'lardan elde edilmektedir. Mirtron'lar olarak adlandırılan bu miRNA'lar, gen transkriptlerinin splayı sonucu çıkarılan intronik miRNA'lardır. Diğer intronik miRNA'lardan farkı splay sonrası kesilen intronun tamamı bir pre-miRNA'dır ve Drosha prosesine gerek duymaksızın doğrudan sitoplazmada DICER kesimiyle işlenerek alternatif miRNA olgunlaşma yolağını oluşturmaktadırlar (Okamura vd. 2007).

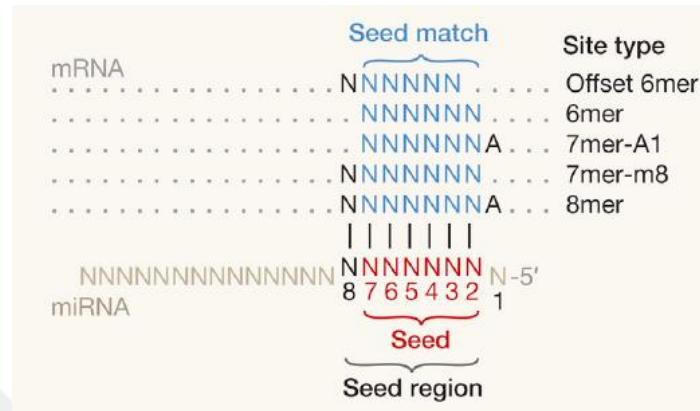


**Şekil 2-7.** miRNA biyogenezi

### 2.4.3. miRNA hedef tanıma

miRNA aracılı gen susturulması, miRNA'ların çekirdek bölgeleri ve hedef mRNA'nın 3'UTR'ındaki bölgelerin arasındaki Watson-Crick eşleşmesi yoluyla gerçekleşmektedir. *Seed region* olarak adlandırılan çekirdek bölge, miRNA'nın 5' ucundan başlayan 8 nükleotitten meydana gelen ardışık dizidir. Çekirdek bölge diğer canlılarda korunmuş bölgedir ve mRNA'da komplementer olduğu nükleotit sayısına göre farklı tanımlanmaktadır: 6-mer (2-7 bazları), 7-mer-A1 (1-7 bazları), 7-mer-m8 (2-8 bazları) ve 8-mer (1-8 bazları) (Şekil 2-7) (Bartel 2009). 7-mer-A1 ve 8-mer çekirdek bölgeleri ilk nükleotit olarak adenin 'A' gerektirmektedir (Hausser vd. 2014). miRNA kök bölgesi ile en iyi uyuşan ve en etkili bölge 7-8 nükleotit bölgeleridir. 6 nükleotit bölgeleri translasyonun baskılanmasında en az etkili

olan bölgelerdir. Buna rağmen, 6 nükleotitik uyuşan bölgelerin etkisi az olsa da bazen translasyonu baskılayabilmektedir (Kim vd. 2016).



**Şekil 2-8.** miRNA hedef bölgeleri (Bartel 2018).

miRNA'ların Ago proteinleri ile oluşturdukları RISC'inin hedef genleri susturmada iki yol izler: mRNA yıkımı ve translasyonel baskılanma. mRNA yıkımı RISC tarafından uyarılabilmektedir. Çünkü Ago proteinleri RNaz H ile homolog domaine sahiptirler ve küçük RNA'lar hedef RNA ile tam olarak eşleştiğinde hedef RNA, miRNA'nın bağlı olduğu 10-11. pozisyondan RISC tarafından kesilir (Ameres vd. 2013). RISC'in bu özelliği daha çok bitkilerde görülmektedir. Hayvanlarda miRNA'lar 2-7, 2-8 şeklinde mRNA'lar ile parçalı olarak baz eşleşmesi yaptıkları için RISC bu şekilde kesim özelliği göstermez (Ipsaro vd. 2015). Bunun için ek proteinler ile etkileşime girerek hedef genlerin susturulmasını gerçekleştirir.

#### 2.4.3.1. mRNA yıkımı

miRNA tarafından gerçekleşen mRNA yıkımı 3 aşamalı bir yolaktır: i) Deadenilasyon (Poli A'ların çıkarılması), ii) Decapping (5' cap çıkarılması), iii) 5'-3' ekzonükleolitik yıkım. İlk zamanlar, hayvanlarda miRNA'ların hedef mRNA'ların translasyonel baskılanması sonucu mRNA'nın birikiminde az ya da hiç etkisi olmadığı düşünülüyordu. Ancak, ilerleyen zamanlarda miRNA'ların GW182 proteinleri aracılığıyla hedef mRNA'lara deadenilazları topladığı ve bunun sonucu mRNA stabilizasyonunu bozarak yıkımına neden olduğu bulunmuştur (Fabian vd. 2011, Giraldez vd. 2006). Ago ile etkileşimde olan GW182, hedef mRNA'ya poli(A) bağlayan proteinleri (PABP) ve 2 deadenilaz kompleksini (CCR4-NOT ve PAN2-PAN3) toplayan bir merkez görevi görür (Chekulaeva vd. 2011). GW182 aracılığıyla

CCR4-NOT kompleksinin hedef mRNA'ya toplanması sonucu PABP salınımı başlayarak deadenilasyon gerçekleşir (Zekri vd. 2013). Deadenilasyondan sonra RISC direkt olarak hedef mRNA'lara decapping faktörleri toplar (Braun vd. 2013). Memeli hücrelerinde, decapping kompleksin katalitik alt ünitesi (DCP2) ve decapping aktivatörler (DCP1, DDX6) CCR4-NOT kompleksine toplanırlar. Decapping kompleksi ile 5'm<sup>7</sup>G cap yapısı ökaryotik uzama faktörü 4E (eukaryotic elongation factor 4E, eIF4E) aracılığı ile birbirine bağlanır. Bunun için eIF4E bağlama proteini (4E-T), DDX6'nın ve eIF4E'nin birbirine bağlanmasını sağlayarak mRNA'nın 3'ucu ile 5'ucunu birbirine bağlanmasında köprü görevi görmektedir (Nishimura vd. 2015). Böylece decapping enzim DCP2 tarafından 5'm<sup>7</sup>G cap çıkarılarak mRNA 5'-3' yönünde ekzonükleazlarca yıkıma uğrar.

#### 2.4.3.2. Translasyonel baskılama

Şimdiye kadar farklı organizmalarda gerçekleştirilen çalışmalar doğrultusunda önerilen; miRNA'nın translasyonun başlangıç adımını inhibe ettiği yönündeydi (Huntzinger vd. 2011). miRNA'ların translasyonu nasıl baskıladığı hala açık olmamakla birlikte, bunun için 3 mekanizma önerilmektedir;

1) GW182 aracılı PABP ayrılması: GW182 sadece deadenilasyon ve mRNA yıkımını değil aynı zamanda translasyonel baskıyı da indüklemektedir (Behm-Ansmant vd. 2006). Translasyonun başlangıç aşamasında, mRNA'nın poli A kuyruğuna bağlı olan PABP ve 5' Cap'a bağlı olan ökaryotik uzaman faktörü 4G (eIF4G) arasında bir bağlantı olduğundan mRNA kapalı halkasal bir yapıdadır. GW182 aracılığı ile PABP'nin poli A kuyruğundan ayrılması sonucu bu halkasal yapı kırılarak translasyonun başlaması engellenmektedir.

2) GW182 yoluyla translasyonel represörlerin toplanması: Poli A kuyruğu taşıyan mRNA'ların aksine, poli A kuyruğu taşımayan dolayısı ile PABP'nin bağlanmadığı mRNA'larda da miRNA aracılığıyla translasyonel baskılamanın gerçekleşmesi söz konusudur (Iwasaki vd. 2009). Poli A taşımadığı için deadenilasyonun olmalı olduğu mRNA'larda gerçekleşen bu baskılama mekanizmasında yine GW182 anahtar rol oynamaktadır. GW182'nin etkileşimde olduğu ve decapping işlemini gerçekleştiren DDX6 yalnızca 5' Cap'in çıkarılmasını sağlamaz aynı zamanda translasyonun başlamasını ve/veya uzamasını inhibe etmektedir (Su vd. 2011).

3) miRNA aracılığıyla eIF4A'nın ayrılması: Translasyonel baskılamanın bir diğer mekanizması GW182 bağımsız şekilde gerçekleşmektedir. Memeli hücreleri ile yapılan mRNA-protein komplekslerinin pull-down edildiği araştırmalarda, miRNA'ların varlığında

eIF4A 5'cap bağlayıcı kompleks eIF4F'den ayrıldığı bulunmuştur (Fukao vd. 2014). Hedef mRNA'dan eIF4A'nın ayrılmasıyla ribozom bağlanması ve taraması inhibe olmakta ve translasyonel baskılama gerçekleşmektedir.

miR-124'ün hedefleri üzerine yapılan araştırmalar; miRNA'ların hedefi olan mRNA'ların hem translasyonunun hem de varlığının azaldığını, translasyonun başlangıç aşamasında sonlandırıldığını veya translasyonun olduğu bölgede ribozom sayısının azaldığını göstermiştir (Hendrickson vd. 2009). Bu yüzden hedef mRNA'ların çoğu aynı anda hem translasyonel olarak baskılanmaya hem de yıkıma maruz kalırlar.

miRNA işlevi mRNA'nın tek bir belirli bölgesine bağlanmaya endeksli değildir. Çalışmalarda miRNA-ribonükleoprotein birleşmesinin, hedef mRNA'nın herhangi bir bölgesine bağlanarak başlamış olan translasyonu mekanik olarak engelleyebildiği gösterilmiştir (Lytle vd. 2007). miRNA'lar, mRNA'ların 3'UTR bölgelerinde oldukça iyi korunmuş bağlanma bölgeleriyle etkileşime girmektedirler. Genom ölçekli yapılan çalışmalarda, miRNA'ların korunmuş bağlanma bölgelerinin yalnızca mRNA'ların 3'UTR'lerinde değil aynı zamanda 5'UTR ve kodlayan bölgelerinde de olduğunu göstermiştir (Miranda vd. 2006). Pankreas hücrelerinde miR-103a-3p *GPRC5A*'in 5'UTR'sine bağlanarak genin translasyonunu inhibe etmektedir (Zhou vd. 2014). Ayrıca, miR-10a, ribozomal proteinleri kodlayan mRNA'ların 5'UTR'lerine bağlanarak translasyonlarını arttırmaktadır (Ørom vd. 2008).

miRNA'lar, genleri yalnızca postranskripsiyonel seviyede değil, aynı zamanda genleri susturma fonksiyonuna zıt yönde, transkripsiyon öncesinde de düzenlemektedirler. miR-373 PC-3 pankreas kanseri hücrelerinde E-kaderin ve CSDC2 genlerinin promotor bölgelerine bağlanarak transkripsiyonel aktivasyonlarını indüklemektedir (Place vd. 2008).

#### **2.4.4. miRNA ve akciğer kanser**

Birçok kanser tipinde miRNA ekspresyon değişimleri önemli rol oynamaktadır. Başlangıçta, miR-15 ve miR-16'nın ekspresyon seviyelerinin B hücreli kronik lenfositik lösemi'de (B-KLL) çoğunlukla düşük seviyede oldukları bulunduktan sonra birçok kanserde miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Calin vd. 2002). miRNA'lar normal dokulara göre karşılaştırıldığında malign tümörlerde yüksek ya da düşük seviyede eksprese olma durumuna göre onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak sınıflandırılmaktadırlar. miRNA'lar çok sıkı bir doku spesifik ekspresyona sahiptirler. Bundan dolayı kanser tipine hatta kanser hücresi tipine göre, farklı hatta zıt fonksiyon

gösterebilmektedirler. Örneğin; miR-182-5p meme, yumurtalık ve mesane de onkogen olarak davranış gösterirken, akciğer kanserinde tümör baskılayıcıdır (Sun vd. 2010). MiR-17-5p kolon ve karaciğer kanserinde onkogenik iken rahim kanserinde tümör baskılayıcı olarak davranır (Wei vd. 2012). Akciğer adenokarsinomunda miR-200, hücre modeline bağlı olarak metastazı inhibe etmekte (Gibbons vd. 2009) ya da indüklemektedir (Korpal vd. 2011). KHDAK'ın histolojik olarak başlıca alt tipleri olan akciğer skuamoz hücre kanseri ve adenokarsinomunun moleküler ve klinik farklılıkları miRNA ekspresyon profilleri ile ayırt edilmektedir (Zhang vd. 2012). miRNA'lar, Akciğer kanserinde miRNA'lar ile yapılan çalışmalar daha çok biyobelirteç olarak kullanımı üzerinedir. Akciğer kanseri hatta KHDAK alt tiplerinde miRNA'ların biyolojik fonksiyonları ile ilgili henüz çalışılmayı bekleyen birçok miRNA adayı mevcuttur. Literatürde akciğer kanserinde rol alan bazı miRNA'lar tespit edilmiştir. KHDAK'inde sıklıkla aşırı eksprese olan miR-21, SPRY1-2, BTG2 ve PDCD4 genlerini hedef alarak tümörleşmeyi arttırmaktadır (Hatley vd. 2010). Normal akciğer dokusunda yüksek ekspresyon seviyesine sahip olan let-7 miRNA'nın inhibisyonu, A549 KHDAK hücrelerinde hücre döngüsünü arttırmıştır (Johnson vd. 2007). Akciğer kanseri skuamoz hücre karsinomu tümörlerinde komşu dokulara göre yüksek seviyede eksprese olan miR-31, tümör baskılayıcı genler LATS2 ve PPP2R2'yi hedef alarak hücre bölünmesini arttırmaktadır (Liu vd. 2010). Tümör baskılayıcı genler, PTEN ve TIMP3'ü hedefleyen miR-221 ve miR-222, KHDAK'ta aşırı ifade edilmektedir (Garofalo vd. 2009). Hem KHAK hem de KHDAK'inde aşırı ifade edilen miR-149, direkt olarak E-Kaderin ekspresyonunu baskılayarak EMT'yi indüklemektedir (Du vd. 2010). KHDAK'inde miR-494 IGF2BP1'i hedef alarak hücre proliferasyonunu inhibe ederek anjiyogenezi indüklemektedir (Mao vd. 2015). Apaf-1'i hedef alan miR-155'in inhibisyonu A549 KHDAK hücrelerinde apoptozu düzenleyerek cisplatin tedavisinde hassasiyeti arttırmaktadır (Zang vd. 2012). Beyin metastazlı akciğer adenokarsinumlu hastalarda MMP19 ve P21'i hedef alan miR-4270 ve mir-423-3p'nin beyin metastazı patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Sun vd. 2019). KHDAK'inde düşük seviyede eksprese olan miR-101, hedef geni MCL-1'in ekspresyonunu arttırarak apoptozun inhibisyonu sağlamaktadır (Luo vd. 2012). MiR-153, ADAM19 ve AKT'yi hedef alarak KHDAK migrasyon ve invazyonunu inhibe etmektedir (Shan vd. 2015, Yuan vd. 2015). MiR-218, Slug/Zeb2'yi downregüle ederek KHDAK'inde EMT'yi inhibe etmektedir (Shi vd. 2017).



#### 2.4.5. NF- $\kappa$ B tarafından düzenlenen miRNA'lar

Birçok fizyolojik süreçte görev alan ve akciğer kanserinde sürekli aktif olan NF- $\kappa$ B'yi hedef alan birçok miRNA tespit edilmiş olmasına rağmen, 500'den fazla genin transkripsiyonunu indükleyen NF- $\kappa$ B tarafından transkripsiyonlarının düzenlendiği tespit edilen miRNA sayısı oldukça sınırlıdır. Tablo 2-1'de, akciğer kanserinde çeşitli biyolojik süreçlerde NF- $\kappa$ B'nin doğrudan promotorlarına bağlanarak transkripsiyonel olarak indüklediği ya da baskıladığı miRNA'lar verilmiştir.

**Tablo 2-1.** NF- $\kappa$ B tarafından düzenlenen miRNA'lar.

miRNA	NF- $\kappa$ B'nin miRNA'ya etkisi	Hedef Gen/Genler	Biyolojik Etki
miR-21	Upregülasyon	Caspase-8	Akciğer kanseri hücre hatlarında apoptozu inhibe ederek TRAIL'e direnç kazandırmaktadır (Jeon vd. 2015).
miR-30		Caspase-3 ve FoxO3a	
miR-100		TRAF7	
miR-125a-5p	Downregülasyon	Erk2	KHDAK'inde tünörleşmeyi baskılamaktadır (Naidu vd. 2017).
miR-23b		-	
miR-27b		-	
miR-24-1		AKT2	
miR-135b	Upregülasyon	LZTS1	Akciğer kanserinde <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> tümör gelişimi ve metastazı arttırmaktadır (Lin vd. 2013).
miR-205	Upregülasyon	PTEN ve PHLPP2	KHDAK'inin birçok alt tipinde aşırı ifade edilmektedir. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> anjiyogenez ve proliferasyonu arttırmaktadır (Cai vd. 2013).
miR-124	Downregülasyon	MYO10	KHDAK'inde metastazı baskılamaktadır (Sun vd. 2015).

**Hipotez:** Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomunda TNF- $\alpha$  ile indüklenen PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının aktivasyonu sonucu NF- $\kappa$ B'nin, miRNA'ların promotorlarına bağlanarak bu miRNA'ların transkripsiyonlarını düzenleyerek bu miRNA'ların, KHDAK progresyonu ve gelişiminde rol aldığını düşünmekteyiz.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada H1299, A549 küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre hatları ve insan embriyonik böbrek hücre (HEK293T) hattı kullanıldı. H1299 hücreleri %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Kat. No:10500064, Gibco) içeren RPMI 1640 (Kat. No:52400-025, Gibco), A549 ve HEK293T hücre hatları %10 FBS içerek DMEM (Kat. No:41965-039, Gibco) besi ortamında %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem ortamında 37°C'de monolayer olarak kültüre edildi.

#### 3.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamı boyunca kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir. TNF- $\alpha$  (Kat. No:1050, BioVision Inc.), miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control (Kat. No:CN-001000-01-05, Dharmacon), miRIDIAN microRNA hsa-miR-548as-3p mimic (Kat. No:C-302535-00-0005, Dharmacon), miRIDIAN microRNA Human hsa-miR-8078 mimic (Kat. No:C-303090-00-0005, Dharmacon), miRIDIAN microRNA hsa-miR-548as-3p inhibitor (Kat. No:IH-302535-01-0005, Dharmacon). NF- $\kappa$ B p65 siRNA (Kat. No:6261, Cell Signaling Technology), Control siRNA (Kat. No:6568, Cell Signaling Technology). p-AKT (Kat. No:12694), AKT (Kat. No:9272), Zeb1 (Kat. No:3396) ve GAPDH (Kat. No:5174) antikorları Cell Signaling Technology'den temin edildi. p65 (Kat. No:sc-372), Slug (Kat. No: sc-166476), MMP9 (Kat. No:sc-21733), PTEN (Kat. No:sc-7974) antikorları SantaCruz Biotechnology'den temin edildi. miRNA mimik/inhibitörler ve siRNA transfeksiyonları için DharmaFECT 1 Transfection Reagent (Kat. No:T-2001-02, Dharmacon) ve DharmaFECT 2 Transfection Reagent (Kat. No:T-2002-02, Dharmacon) kullanıldı. Plazmit vektör transfeksiyonları için Lipofectamin 2000 (Kat. No:11668019, Thermo Fisher Scientific) kullanıldı. Opti-MEM besiyeri (Kat. No:31985062, Thermo Fisher Scientific). miRNA real-time PCR için kullanılan primerler hsa-miR-548as-3p (Kat. No:MS00038437), hsa-miR-8078 (Kat. No:MS00048804) ve Snord61 (Kat. No:MS00033705) Qiagen (Almanya)'den, hsa-miR-4276, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-4651, hsa-miR-5692c-2, hsa-miR-548v, hsa-miR-548h-5p, hsa-miR-548q, hsa-miR-1915-5p, hsa-miR-4682, hsa-miR-3161, hsa-miR-621, hsa-miR-548as-3p, hsa-miR-3179-1, hsa-miR-4721, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-1203, hsa-miR-8078, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-6814-3p ABM (Kanada)'den temin edildi.

### 3.3. miRNA, siRNA ve Plazmit DNA Transfeksiyonları

Tez çalışması boyunca bazı aşamalarda miRNA'ların overekspresyonu için miRNA mimikler, downregülasyonu için inhibitörler, bazı genlerin downregülasyonu için siRNA'lar, overekspresyonu ve lusiferaz reporter deneyleri için plazmit DNA'lar hücrelere transfekte edildi. Kullanılan hücre kültürü kabı ve yöntemine göre uygulanan yöntem tablo 3-1 ve 3-2'de gösterilmiştir.

**Tablo 3-1.** miRNA ve siRNA transfeksiyon yöntemi.

miRNA ve siRNA transfeksiyonları				
		6 kuyulu hücre kültürü kabı için	12 kuyulu hücre kültürü kabı için	96 kuyulu hücre kültürü kabı için
Ekilen hücre miktarı	H1299 hücre hattı	2x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>4</sup>
	A549 hücre hattı	3x10 <sup>5</sup>	1.5x10 <sup>5</sup>	1.5x10 <sup>4</sup>
	HEK293T hücre hattı	2x10 <sup>5</sup>	-	1x10 <sup>4</sup>
A	miRNA mimik/inhibitör (100 µM)	1 µl / 2 µl	0.5 µl / 1 µl	0.05 µl / 0.1 µl
	siRNA (10 µM)	4 µl	2 µl	0.2 µl
	Opti-MEM (miRNA için)	199 µl / 198 µl	99.5 µl / 99 µl	9.9 µl / 9.8 µl
	Opti-MEM (siRNA için)	196 µl	98 µl	9.8 µl
		A tüpü toplamda 200 µl oldu	A tüpü toplamda 100 µl oldu	A tüpü toplamda 10 µl oldu
B	Dharmafect 1*-2	4 µl	2 µl	0.2 µl
	Opti-MEM	196 µl	98 µl	9.8 µl
		B tüpü toplamda 200 µl oldu	B tüpü toplamda 100 µl oldu	B tüpü toplamda 10 µl oldu
A tüpü B tüpüne aktarılarak pipetle karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.				
	Karıştırılan tüplere serumlu besiyeri eklendi	1600 µl	800 µl	80 µl
Hücrelerin bulunduğu kuyulardan besiyerleri çektilirip hazırlanan karışımın tamamı eklendi.				

\*A549 ve HEK293T hücre hattı için Dharmafect 1 kullanıldı.

**Tablo 3-2.** Plazmit DNA transfeksiyon yöntemi.

<b>Plazmit DNA transfeksiyonları</b>			
		6 kuyulu hücre kültürü kabı için	96 kuyulu hücre kültürü kabı için
Kültür kabı farketmeksizin %80 yoğunluğa ulaşan hücrelere plazmit DNA transfeksiyonu yapıldı.			
A	pGL3-NF-κB-promoter-Luc/pRL- <i>Renilla</i> vektörü (NF-κB lusiferaz aktivitesi deneyleri için kullanıldı)	2500 ng / 250 ng	100 ng / 10 ng
	Plazmit DNA (PTEN, p65 overekspresyon vektörleri, psiCHEKC-2 lusiferaz vektörleri)	2500 ng	100 ng
	Opti-MEM	~125 µl	~5 µl
		A tüpü toplamda 125 µl oldu	A tüpü toplamda 5 µl oldu
B	Lipofectamin 2000	5 µl	0.3 µl
	Opti-MEM	120 µl	4.7 µl
		B tüpü toplamda 125 µl oldu	B tüpü toplamda 5 µl oldu
A tüpü B tüpüne aktarılarak pipetle karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.			
	Kuyulara eklenen serumlu besiyeri miktarları	1500 µl	90 µl
Hazırlanan karışımın tamamı kuyuların üzerine pipet yardımıyla kuyunun tamamına damlatılarak bırakıldı.			

**Tablo 3-3.** 3'UTR klonlama, yönlendirilmiş mutagenез ve Real-Time PCR (qRT-PCR) için kullanılan primerlerin listesi.

qRT-PCR	İleri primer (5'-3')	Geri primer (5'-3')
PTEN	CTGCAGAAAGACTTGAAGGCG	TCTGCAATTAATTTGGCGGTGT
GPC5	TCTGCAGGCACTCAATCTGG	TCGCATGACATTGAGGCAGT
GREB1	GACTCCTGCGTGATGTGGAA	AGACACGTTCCCTTTCCGACC
C2CD2	GTTCCGATCCAGTGGCTGAA	GCGTCGTGGTCCTGAGATAG
CRCP	CGCTTCTCAGTAACTACGAGGTAT	GTTGCCAGAGCTGTGTTTATT
ACTB	GAAGGTGACAGCAGTCGGTT	ACGCATCTCATATTTGGAATGACTA

#### Klonlama primerleri

PTEN 3'UTR Klonlama primerleri*	ATCTAA <b>CTCGAG</b> ACACCCTGACT CTGATCCA	GATTCAG <b>TTTAAAC</b> CCCTCCATTCCCCTAA CCCGA
C2CD2 3'UTR Klonlama primerleri*	AGTG <b>CTCGAG</b> ATGACCAACTGCT ACTCGACC	<b>AGTTTAAAC</b> GGGCTGTCTTCGGCGTTTA

\*Koyu yazılı bölgeler; restriksiyon enzimi kesim bölgeleridir (CTCGAG: XhoI kesim bölgesi, GTTTAAAC: PmlI kesim bölgesi).

#### Yönlendirilmiş mutagenез primerleri

PTEN 3'UTR Mutant primerleri**	CCCTATACATCCACAC <b>ATCGAC</b> GA CACTTGTTGTCCA	TGGACAACAAGTGT <b>CTCGAT</b> GTGTGGAT GTATAGGG
C2CD2 3'UTR Mutant primerleri**	ACTGCCCCAAACCGGT <b>ACTAG</b> TA CGAAGACCAAAGCA	TGCTTTGGTCTTCGT <b>ACTAG</b> TACCGGTTT GGGGCAGT

\*\*Koyu yazılı bölgeler mutasyon bölgesidir.

### 3.4. Western Blot

**Tablo 3-4.** Western blot deneyinde kullanılan tamponlar

Fosfatla tamponlanmış tuzlu su (Phosphate-buffered saline, PBS)	0.1 M Fosfat, 0.15 M NaCl, pH: 7.2).
4X Yükleme tamponu	900 µl Laemli Buffer (Kat.No:1610747, BioRad), 100 µl β-merkaptoetanol (Kat. No:805740, MerckMillipore)

Yürüme (Runing) tamponu	25 mM Tris, 190 mM Glisin (Kat. No:GLN002, BioShop), %0.1 SDS'den 2 jeli yürütmek için 750 ml hazırlandı.
Transfer tamponu:	Tris (25 mM), Glisin (190 mM), SDS (%0.1) 800 ml hazırlanarak üzerine 200 ml Metanol (Kat. No:1006009, Merck) eklendi. Kullanılana kadar 4°C'de soğutuldu.
TBS-T	20mM Tris, 150mM NaCl (Kat. No:SOD001, BioShop) pH: 7.5 olacak şekilde 1 L hazırlandı. Çözeltinin üzerine 1 ml Tween-20 (Kat. No:1706531, BioRad) eklenerek karıştırıldı.

Western blot ile protein ekspresyonu deneylerinin tamamında lizat eldesi 6-kuyulu kaplara ekilmiş olan hücrelerden elde edildi. Kuyulardan besiyeri uzaklaştırılıp buz soğukluğunda PBS ile yıkandı ve her kuyu için 1x Fosfataz (EzBlock™, Kat. No:K282 Biovision) ve 1x proteaz (Kat. No:5871, Cell Signaling Technology) inhibitör kokteyli içeren 250 µl RIPA tamponu (Kat. No:9806, Cell Signaling Technology) eklenip 5 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından hücre kazıyıcı yardımıyla hücreler toplanarak steril bir ependorf tüpüne aktarıldı. Tüpler 30 dakika buzda bekletildikten sonra 1 dakika kuvvetli şekilde vorteksenerek kullanılana kadar -80°C'de muhafaza edildi.

#### 3.4.1. Protein miktarının belirlenmesi

Elde edilen hücre lizatlarının protein miktarını belirlemek için Bradford yöntemi kullanıldı. Bunun için örnekler 1/1000 sulandırılarak Bradford reaktifi (Kat. No:500-0006, BioRad) eklendi. Her bir örnekten 96 kuyulu kaplara 3 tekrar olacak şekilde aktarıldı. Örneklerin protein miktarı BSA standartına karşı belirlendi. Stok BSA sırasıyla, 25, 12.5, 5, 2.5 ve 1 µg/ml olacak şekilde sulandırıldı ve her bir konsantrasyondan 3 tekrar olacak şekilde 96 kuyulu kaplara aktarıldı. 96 kuyulu kabın ölçümü 595 nm dalga boyunda Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı kullanılarak yapıldı.

### 3.4.2. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-poliakrilamid jel hazırlamak için gerekli kimyasallar ve miktarları tablo 3-3'te verilmiştir. Jel'in döküleceği camlar güzelce temizlendikten sonra standlarına yerleştirildi. Önce Ayırıştırma jeli döküldü ve camın üst noktasına kadar kalan boş kısım izopropanol veya %0.005 SDS ile dolduruldu. En az 1 saat jel oluşumu beklendi. Jelin oluştuğu en üst noktada faz farkı gözlemlendikten sonra boş kısma doldurulan izopropanol veya SDS çözeltisi döküldü ve yığma jeli hazırlandı. Kalan boşluğa pipet yardımıyla yığma jeli döküldü ve jelin tarafları takılarak en az 1 saat polimerleşmesi için bekletildi.

**Tablo 3-5.** SDS-Poliakrilamid jel bileşenleri ve miktarları.

	Ayırıştırma (Resolving) Jeli %15	Yığma (Stacking) Jeli %5
ddH <sub>2</sub> O	6.15 ml	3.05 ml
%30 Akrilamid/bis-akrilamid (29:1, Kat. No: 1610156, BioRad)	5 ml	850 µl
1.5 M Tris (Kat. No:TRS001, BioShop) pH: 8.8	3.75 ml	-
0.5 M Tris pH: 6.8	-	1.25 ml
%10 SDS (Kat. No:SDS001, BioShop)	150 µl	50 µl
%10 Amonyum persülfat (APS, Kat. No:1610700, BioRad)	75 µl	25 µl
TEMED (Kat. No:1610800, BioRad)	7.5 µl	5 µl

#### 3.4.2.1. Örneklerin jelde yürütülmesi

Protein miktarı ölçülen örneklerden 50 µg olacak şekilde 4x yükleme tamponu ile karıştırılarak 95°C'de 5 dakika kaynatıldı. Kaynamadan sonra tüpler kısaca santrifüj edildi. Jelin yüklendiği sisteme yürüme tamponu eklendikten jelin kuyuları 200 µl pipet ucu ile yıkandı. Örnekler 10 µl'lik pipet ucu kullanılarak SDS-PAGE kuyularına yüklenerek 100 V'ta 90 dakika ayrışması sağlandı.



### 3.4.3. PVDF membrana transferi ve işaretleme

Proteinlerin ayrıştığı jel transfer tamponunda 15 dakika bekletilerek eşitlendi. Aynı zamanda PVDF (Polyvinylidene flüoride, Kat. No:IPVH00010, Merck Millipore) membranı metanolde 5 dakika bekletildi. Proteinler ıslak transfer yöntemi ile 4°C'de 100 mA'de 16 saat sürede PVDF membrana aktarıldı. Proteinlerin membrana aktarılıp aktarılmadığı Ponceau S boyası ile 5 dakika inkübe edilerek tespit edildi. Jel'den proteinlerin verimli olarak membrana aktarılıp aktarılmadığı commassie blue boyası ile jelin 30 dakika inkübasyonu ile tespit edildi.

Ayrışan proteinlerin aktarıldığı membran blotlama işlemlerinin tamamı oda sıcaklığında yapıldı. Membran %5 yağsız süt tozu (Kat. No:170-6404, BioRad) içeren TBS-T tamponu içerisinde 1 saat çalkalanarak bloklandı. Ardından primer antikor ile 2 saat çalkalanarak işaretleme yapıldı. Ardından 10'ar dakika 3 kez TBS-T kullanarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. 1 saat sekonder antikor ile çalkalanarak yıkama işlemi tekrar edildi. Yıkamanın ardından membranın yüzeyini kaplayacak ölçüde ECL (Enhanced Chemiluminescence, Kat. No:WBLUF0500, Millipore) ilave edildi. Görüntüleme için Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) kullanıldı. Elde edilen görüntülerdeki bant yoğunlukları Image Studio Lite Ver 4.0 programıyla ölçüldü ve GAPDH bant yoğunlukları kullanılarak normalize edildi.

### 3.5. Elektroforetik Hareketlilik Kayma Yöntemi (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

EMSA yönteminde kullanılacak olan nükleer lizat Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kiti (Kat. No:78833, NE-PER, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak elde edildi. Deney kitin protokolünde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Tüm santrifüj aşamaları 4°C'de, hücreler ve lizatlar buz içerisinde çalışıldı. 6 kuyulu hücre kültür kaplarında kültüre edilen hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp kuyular PBS ile yıkandı. Tripsin-EDTA (Kat. No:25200056, Gibco) ile hücreler toplanarak 5 dakika 500 x g'de santrifüj edildi. Hücre pelleti PBS ile süspansiyon edilerek yıkandı ve tekrar 500 x g'de 2-3 dakika santrifüj edildi. Pellete buzda bekletilmiş 100 µl CER I eklenerek kuvvetli şekilde vorteks yapılarak hücreler süspansiyon edildi ve 10 dakika buzda bekletildi. Süspansiyonun üzerine buzda bekletilmiş 5 µl CER II eklenerek kuvvetlice vorteks yapıldı. 1 dakika buzda inkübe edildikten sonra 16000 x g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Sitoplazmik ekstraktın olduğu üst sıvı kısım temiz bir tüpe alındı. Nükleusun olduğu pellet 50 µl NER ile kuvvetli şekilde vorteks yardımıyla süspansiyon edildi.

Örnek 10 dakikada bir vorteks yapılarak 40 dakika buz içerisinde inkübe edildi. 16000 x g'de 10 dakika santrifüj yapılarak sıvı kısım pellete dokunmadan alınarak kullanılıncaya kadar - 80°C'de muhafaza edildi.

### 3.5.1. Jel hazırlanması, örneklerin hazırlanması ve yürütülmesi

EMSA için poliakrilamid jel %6.5'lik hazırlandı. Hazırlanma şartları tablo 3-4'teki gibidir.

**Tablo 3-6.** EMSA için poliakrilamid jel'in hazırlanma şartları.

%30 Akrilamid/bis-akrilamid (29:1, BioRad)	1300 µl
5x TBE (0.45 M Tris, 0.45 M Borik Asit (Kat. No:A2940, Applichem) ve 0.5 M EDTA pH: 8.0 (Kat. No:A5097, Applichem))	500 µl
%50 Gliserol (Kat. No:GLY001, BioShop)	250 µl
%10 Amonyum persülfat (Kat. No:1610700, BioRad)	75 µl
TEMED (Kat. No:1610800, BioRad)	5 µl
ddH <sub>2</sub> O	3870 µl

Hazırlanan poliakrilamid jele yüklenecek örnekler LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit (Kat. No:20148, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak hazırlandı. Biotin işaretli NF-κB (p65) DNA probu (5' biotin - AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') Viagene Biotech Inc. (Florida, Amerika) firmasından temin edildi. Bağlanma (binding) reaksiyon şartları tablo 3-5'teki gibidir.

**Tablo 3-7.** EMSA için hazırlanan poliakrilamid jel'e yüklenecek örneklerin hazırlanma şartları.

10x Binding Buffer	2 µl
DTT (20 mM)	1 µl
%50 Gliserol	1 µl
KCl (100 mM)	1 µl
Poly (dl:dC)	1 µl
Total Protein (6 µg)	X µl
ddH <sub>2</sub> O (Ekle 20 dakika bekle)	19,5-(6+X) µl

Biotin Prob (Ekle 20 dakika bekle)	0,5 µl
Toplam	20 µl

Örnekler 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu sürede jel soğuk 0.5x TBE içerisinde 30 dakika 120 V'ta çalıştırıldı. Örnekler 5x yükleme tamponundan 5 µl eklenerek kuyulara yükleme yapıldı. 180 V'ta yükleme boyası jelin 3/4 seviyesine gelene kadar oda ısısında yürütüldü.

### 3.5.2. Transfer ve görüntüleme

Örneklerin transferi nitroselüloz membrana (Kat. No: 77010, Pierce Biotechnology) 0.5x TBE içerisinde 0.5 A ve 30 dakika olarak yapıldı. Transfer sonrası membran kıvrılana kadar UV (Dalga boyu 254 nm) ışığı altında her iki yüzü kurutularak çapraz bağ (crosslink) oluşturuldu. Blotlama için Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit (Kat. No:89880, Thermo Fisher Scientific) kullanıldı. Blotlama kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Kit ile temin edilen bloklama solüsyonu ile membran 15 dakika oda sıcaklığında çalkalandı. Ardından yine kit ile temin edilen 1:300 oranında Streptavidin-HRP antikorunu eklenerek 15 dakika çalkalandı. Kit'ten temin edilen 20 ml 1x yıkama solüsyonu yıkama solüsyonu ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapıldı. Sonrasında membran, 5 dakika boyunca 30 ml eşitleme (equilibration) solüsyonu ile çalkalandı. Membranın üzerine ECL ilave edilerek 5 dakika bekletildi. Western blot'ta yapıldığı gibi membran Odyssey Fc Imaging System'inde görüntülendi. Elde edilen görüntülerdeki bant yoğunlukları Image Studio Lite Ver 4.0 programıyla ölçülerek değerlendirildi.

## 3.6. Dual Lusiferaz Deneyleri

### 3.6.1. NF-κB'nin transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi

NF-κB'nin transkripsiyonel aktivitesini belirlemek için lusiferaz reporter deneyi gerçekleştirildi. Lusiferaz reporter deneyleri Dual-Luciferase Reporter Assay System Kiti (Kat. No:E1910, Promega) kullanılarak gerçekleştirildi. Lusiferaz aktivitesi NF-κB ekspresyonunun siRNA aracılı susturulduğu hücrelerde de tespit edileceği için hem plazmit DNA hem de siRNA transfeksiyonlarının gerçekleştirileceği bir deney kuruldu. Öncelikle, tablo 3-1'de anlatıldığı şekilde NF-κB (p65) siRNA ve kontrol siRNA 96 kuyulu kaplara ekilen

H1299 hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra pGL3-NF- $\kappa$ B-promoter-Luc vektörü ve pRL-*Renilla* vektörü (Vektörler Prof. Dr. Osman Nidai Özeş'ten temin edilmiştir) tablo 3-2'de anlatıldığı şekilde NF- $\kappa$ B (p65) siRNA ve kontrol siRNA transfekte edilen hücrelere transfekte edildi. 48 saat sonra besiyeri çekilerek kuyular steril PBS ile yıkandı ve hücreler 20  $\mu$ l 1x Pasif Lizis Buffer (kit ile temin edildi) ile toplandı. Lusiferaz aktiviteleri ölçülene kadar -20°C'de saklandı.

TNF- $\alpha$  indüklü NF- $\kappa$ B transkripsiyonel aktivitesini ölçmek için 96 kuyulu hücre kültür kaplarına H1299 hücreleri tablo 3-2'de anlatıldığı şekilde ekildi. pGL3-NF- $\kappa$ B-promoter-Luc vektörü ve pRL-*Renilla* vektörü ile transfekte edildikten 48 saat sonra besiyeri tazelenen hücrelere 30 ng/ml TNF- $\alpha$  uygulandı. Kontrol gruplarına yalnızca TNF- $\alpha$  hacmi kadar PBS uygulandı. 8 saat sonra besiyerleri atılarak kuyular PBS ile yıkandı ve hücreler 20  $\mu$ l 1x Pasif Lizis ile toplandı. Lusiferaz aktiviteleri ölçülene kadar -20°C'de saklandı.

### **3.6.2. miR-548as-3p ve miR-8078'in hedef genlerinin tespiti için lusiferaz reporter deneyleri**

miR-548as-3p ve miR-8078'in doğrudan hedeflerini tespit etmek için lusiferaz reporter deneylerinde HEK293T hücre hattı kullanıldı. Tablo 3-2'de anlatıldığı şekilde %80 yoğunlukta HEK293T hücrelerine 100 ng psiCHECK-2 (boş vektör), psiCHECK-2 PTEN 3'UTR wt ve psiCHECK-2 PTEN 3'UTR mut lusiferaz vektörleri transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra tablo 3-1'de anlatıldığı gibi her bir vektör ile transfekte edilen hücrelere ayrı ayrı 50 nM negatif kontrol mimik ve miRNA mimik transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra besiyerleri çektilerilerek hücreler 20  $\mu$ l 1x Pasif Lizis Buffer ile toplandı. Lusiferaz aktiviteleri ölçülene kadar -20°C'de saklandı.

Tüm dual lusiferaz aktivitesi ölçüm deneyleri şu şekilde gerçekleştirildi; pasif lizis tamponu ile toplanan 20  $\mu$ l örneklerin üzerine yine kiten temin edilen 100  $\mu$ l LAR II ve 100  $\mu$ l Stop & Glo solüsyonları eklenerek GloMax®-Multi Detection System Promega (Promega) cihazı kullanılarak *Firefly* ve *Renilla* lusiferaz aktivitesi luminometrik olarak ölçüldü. Normalizatör olarak *Firefly* lusiferaz kullanıldı.

### 3.7. NF- $\kappa$ B (p65) Bağlanma Bölgelerinin Tespit Edilmesi

#### 3.7.1. Kromatin immünpresipitasyon (ChIP)

ChIP yöntemi Magna ChIP™ A/G Chromatin Immunoprecipitation Kiti (Kat No:17-10085, Merck Millipore) ve ChIPAb+ NF $\kappa$ B p65 (RelA) - ChIP Validated Antibody and Primer Set (Kat No:17-10060, Merck Millipore) kullanıldı. Deneyler kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

##### *%18,5 lik Formaldehit hazırlanması:*

- 50 ml'lik falkona 4.8 ml ddH<sub>2</sub>O koyuldu.
  - 0.925 g *p*-formaldehit (Kat. No:104005, Merck) tartılarak eklendi.
  - 0.1 N KOH (Kat. No:105544, Merck) zeltisinden 350  $\mu$ l eklenerek falkonun kapağı sıkıca kapandı.
  - Karışım, içerisinde 200 ml saf su bulunan 500 ml'lik beher içerisine süngerle sabitlendi.
  - Beher mikrodalga fırına koyularak içerisindeki su kaynamaya başlayana kadar bekletildi. Kaynamaya başlayınca durduruldu ve falkon vorteks yapılarak *p*-formaldehitin iyice çözülmesi sağlandı. zlene kadar kaynatma ve vortex tekrar edildi.
  - Bir süre buzda bekletilir. Hemen kullanıldı.
1. 10 cm'lik petri kaplarında %80-90 yoğunluğa ulaşan H1299 hücrelerine 8 saat için TNF- $\alpha$  (30ng/ml) uygulandı.
  2. 8 saat sonunda petri kaplarına 550  $\mu$ L %18,5'lik Formaldehit eklendi.
  3. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
  4. Kaplara 10x Glisin eklendi.
  5. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
  6. Petriler buza alındı ve 1x PBS ile iki kez yıkama yapıldı.
  7. Önceden hazırlanmış olan PBS + Proteaz inhibitör kokteyl solüsyonundan her bir kaba 1.25 ml eklenerek hücreler 2 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpünde toplandı.
  8. +4°C de 800 x g de 5 dakika santrifüj edildi.
  9. Süpernatant atıldı. Pellet sıvı azota daldırılıp çözülerek Proteaz inhibitör kokteyl içeren Hücre Lizis tamponu ile süspanse edildi. Buzda bekletildi.

10. +4°C de 800 x g de 5 dakika santrifüj edildi.
11. Supernatant atıldı ve pellet Proteaz inhibitör kokteyl içeren Nükleer Lizis tamponu ile süspanse edildi.
12. DNA fragmentleri oluşturmak için sonikatör (Serie 2000.2, Bandelin Sonoplus) kullanıldı. Tüpte bulunan nükleer fraksiyonun tamamı buzlu su içerisinde olacak şekilde sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Sonikasyon, 30 saniye açık, 15 saniye kapalı, 1 saniye döngüde %95 güçte 7 dakika boyunca yapıldı.
13. 10000 x g de +4°C de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı (DNA fragment boyunu tespit edebilmek için temiz bir tüpe 10 µL örnek alındı).
14. Ayrılan 10 µL'lik örneklerin DNA fragment boyunun 250 – 500 nükleotit aralığında olup olmadığı tespit edildi. Sonikasyon öncesi ve sonrası örnekler agaroz jelde görüntülendi.
15. Elde edilen süpernatantların konsantrasyonları bir sonraki basamaklar için ölçüldü.
16. TNF-α (30 ng/ml) ile 8 saat muamele edilen H1299 hücrelerinden izole edilen genomik DNA'sından 500 µl hacimde 25 µg DNA olacak şekilde Proteaz inhibitör kokteyl içeren CHIP Dilüsyon tamponu eklendi.
17. Protein A/G magnetik boncukların spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için;
  - Öncelikle 500 µl total örneğe 10 µl manyetik boncuk eklendi ve 140 rpm'de 30 dakika çalkalandı.
  - Manyetik ayırıcı kullanılarak manyetik boncuklar uzaklaştırılıp sıvı kısım temiz bir tüpe aktarıldı.
18. Her bir örneğe 6 µl ChIPAb + NFκB p65 Antikoru eklenerek 15 dakika 140 rpm'de çalkalandı.
19. Ardından tüplere 20 µl manyetik boncuklar eklenerek gece boyu 4°C'de 120 rpm'de çalkalandı.
20. Gece boyu çalkalanan örnekler manyetik ayırıcı kullanılarak süpernatantları tamamen uzaklaştırıldı.
21. Protein A/G boncuğu-antikor/Kromatin kompleksleri aşağıdaki sırayla verilen yıkama tamponlarından 500 µl kullanılarak tüpler altüst yapılarak 5 dakika çalkalayıcıda (140 rpm) sırası ile yıkama yapıldı.
  - Low Salt yıkama tamponu
  - High Salt yıkama tamponu
  - LiCl yıkama tamponu
  - TE tamponu

22. Her yıkama sonunda örnekler manyetik ayırıcıya konularak süpernatant atıldı.
23. TE tamponu ile yıkamanın ardından süpernatant atılarak pellet üzerine Proteinaz K içeren CHIP Elüsyon tamponu eklendi.
24. Örnekler 62°C'de 2 saat 1400 rpm'de çalkalandı. Ardından 95°C'de 10 dakika inkübe edildi.
25. Oda sıcaklığına gelen örnekler manyetik ayırıcı yardımıyla süpernatantları yeni bir tüpe aktarıldı.
26. 100 µl'lik örneklere 500 µl Bind Reagent A eklenerek iyice karıştırılıp filtreli kolona aktarıldı.
27. Yıkama basamaklarının ardından 10000 x g'de 30 saniye sonrası DNA fragmentleri izole edildi.

TNF- $\alpha$  uygulanmasından sonra CHIP valide NF- $\kappa$ B antikoruna ile izole edilen genomik DNA fragmentlerinin, gerçekten NF- $\kappa$ B'nin spesifik olarak hedef DNA bağlanma bölgelerine bağlandığını doğrulamak için elde edilen örneklerin DNA'ları ile NF- $\kappa$ B'nin bağlandığı bilinen *IKK* geninin promotor bölgesine spesifik primerler (17-10060 Katalog No'lu ChIPAb + NF $\kappa$ B p65 (RelA) - CHIP Validated Antibody and Primer Set kit içeriğinden temin edildi) kullanılarak standart PCR yöntemi gerçekleştirildi. PCR MyCycler (BioRad) cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları; 10 µl CHIP DNA, 0.5 µl Taq DNA polimeraz (Kat. No:10966026, Thermo Fisher Scientific), 5 µl 1x Tampon, 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µl Primer, 1 µl dNTP (10 mM) ve 30 µl ddH<sub>2</sub>O şeklinde gerçekleştirildi. Cihaz koşulları; 95°C 30 saniye ön denatürasyon, (95°C 15 saniye, 59°C 30 saniye, 72°C 30 saniye) 32 döngü, son uzatma 72°C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi olacak şekilde gerçekleştirildi. PCR sonuçları agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

### 3.7.2. Kromatin immünpresipitasyon sekans (ChIP-Seq)

PCR reaksiyonu sonucu CHIP deneyini doğrularak, NanoDrop (MaestroGen) cihazı kullanılarak H1299 genomik DNA örneğinin kalite ve miktarı ölçüldü (Tablo 3-6). Miktarlar sekanslama için uygun olduğu tespit edildikten sonra ChIP-Seq için hizmet alımının yapıldığı TÜBİTAK BİLGEM İleri Genom ve Biyoenformatik Araştırma Merkezi'ne gönderildi.

### 3.7.3. ChIP-Seq sonuçlarının biyoenformatik analizi

TÜBİTAK'tan gelen ChIP-Seq sonuçlarında sekanslanan bölgeler hg38 (Genome Reference Consortium tarafından en son yayınlanan insan genomunun birleştirilmiş yeni versiyonu)'e göre hizalanmıştır (alignment). H1299'un kromozomunda okunan bölgelerin fold enrichment değeri (FE)  $\geq 10$  olanlar değerlendirildi. Okunan bölgelerin değerlendirilmesi Integrative Genomics Viewer (IGV) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Programda H1299 ChIP-seq sonuçlarında okunan bölgelerin tamamı ve miRBase (WEB\_2)'de insan genomunda bilinen tüm miRNA genlerinin kromozom lokasyonları birlikte görüntülendi. miRNA geninin 20 kilo baz 5' (upstream) yönünde bir bölge bulunduğu tespit edildiğinde o miRNA, tespit edilen o bölge tarafından düzenleniyor kabul edildi. Bu şekilde okunan bölgeleri ve miRNA'lar filtrelenmiş oldu. Ayrıca ChIP deneyi sırasında NF- $\kappa$ B (p65) antikorumun spesifik olmayan bağlanması sonucu yanlış pozitif okumalar söz konusu olduğundan dolayı filtrelenen kromozom bölgelerinde NF- $\kappa$ B (p65) bağlanma motifi olup olmadığı araştırıldı. Bu analiz JASPAR (WEB\_3) ve TRANSFAC analizi (WEB\_4) kullanılarak gerçekleştirildi. miRNA'ları düzenliyor kabul ettiğimiz filtrelenmiş bölgeler'de NF- $\kappa$ B (p65) bağlanma motifi araştırıldı. Motif olan bölgeler ve düzenliyor olarak kabul edilen miRNA'lar seçilerek bir filtreleme daha yapıldı.

## 3.8. Hücre ve Dokudan Elde Edilen Örneklerin miRNA ve mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Real-Time PCR ile Ölçümü

### 3.8.1. RNA izolasyonları

*Hücreden toplam RNA izolasyonu:*

1. Hücre kültür kabından besiyeri çektirilerek PBS ile yıkandı.
2. Petri kabında kültüre edilen hücreler için 2 ml, 6 kuyulu kaplarda kültüre edilen hücreler için 700  $\mu$ l Qiazol Lysis Reagent (Kat. No:79306, Qiagen) ile hücreler steril mikrosantrifüj tüpüne toplandı.
3. 1 dakika vorteks yapılarak homojenize edildi. 5 dakika oda sıcaklığında nükleoprotein komplekslerinin ayrışması sağlandı.
4. Kullanılan Qiazolun 5:1 oranında kloroform (Kat. No:288306, Sigma-Aldrich) eklendi.



5. Tüpün kapağı iyice kapatılarak 15 saniye şiddetli şekilde çalkalandı. 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. 4°C'de 12000 x g'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Üstteki şeffaf sıvı faz yeni bir tüpe aktarıldı.
7. Üzerine, kullanılan Qiazol'un yarı miktarı izopropanol (Kat. No:109634, Merck) eklenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
8. 4°C'de 12000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Pellete dokunmadan sıvı kısım atıldı.
9. Pellet %75'lik etanol (Kat. No:100983, Merck) (kullanılan Qiazol ile aynı miktar) ile yıkandı. Vorteks ile karıştırıldı.
10. 4°C'de 7500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellete dokunmadan etanol uzaklaştırıldı ve 5-10 dakika kurumaya bırakıldı.
11. Pellet 30 µl RNaz içermeyen steril su ile çözülerek 60°C'de 10 dakika bekletildi. Örneğinin kalite ve miktarı nanodrop kullanılarak ölçüldü. Kullanılincaya kadar -80°C'de saklandı.

#### *Hücreden miRNA izolasyonu:*

Tez çalışması boyunca miRNA izolasyonları miRNeasy Micro Kit (Kat. No:217084, Qiagen) ile gerçekleştirildi.

1. 6 kuyulu kaplarda kültüre edilen hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile kuyular yıkandı.
2. 700 µl Qiazol Lysis Reagent ile hücreler kuyulardan toplandı.
3. 1 dakika vorteks yapılarak homojenize edildi. 5 dakika oda sıcaklığında nükleoprotein komplekslerinin ayrışması sağlandı.
4. 140 µl kloroform eklendi.
5. Tüpün kapağı iyice kapatılarak 15 saniye şiddetli şekilde çalkalandı. 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. 4°C'de 12000 x g'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Üstteki şeffaf sıvı faz yeni bir tüpe aktarıldı.
7. Üzerine 1.5 katı kadar %100 etanol eklenerek pipetle karıştırıldı.
8. Karışımın 700 µl'si RNeasy MinElute spin kolon'a aktarıldı.

9. Oda sıcaklığında 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolondan geçen örnek atıldı.
10. 7. adımdan kalan örnek varsa 8. adımdan itibaren karışımın tamamı geçirilene kadar tekrarlandı.
11. Kolon'a 700 µl RWT tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolondan geçen örnek atıldı.
12. Kolon'a 500 µl RPE tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolondan geçen örnek atıldı.
13. Kolon'a 500 µl %80 etanol eklendi. Oda sıcaklığında 8000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolondan geçen örnek atıldı.
14. Boş kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne koyularak oda sıcaklığında 16000 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek kurutuldu.
15. Kolon temiz mikrosantrifüj tüpüne alındı. İçerisine 14 µl RNaz içermeyen steril su eklenerek oda sıcaklığında 16000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Örneğinin kalite ve miktarı nanodrop kullanılarak ölçüldü. Kullanılincaya kadar -80°C'de saklandı.

#### 3.8.1.1. Tümör doku örneklerinden RNA izolasyonu

Çalışmaya dahil edilen hastaların doku örnekleri Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji bölümünden temin edildi. Hastalar daha önceden KHDAK teşhisi konmuş ve metastatik durumu var veya yok olarak tespit edilmiş olanlardan seçildi. Çalışma için 2016/23-19'nolu etik kurul izin belgesi Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu tarafından verilmiştir. Hastaların parafine gömülü tümör dokularından 10 µm'lik 4-5 adet kesit alınarak steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve izole edileceği güne kadar muhafaza edildi.

*miRNA içeren toplam RNA izolasyonu:*

1. Steril tüplerdeki doku kesitlerinin üzerine 1 ml ksilen (Kat. No:108661, Merck) eklenerek şiddetli şekilde 10 saniye vorteks yapıldı.
2. 16000 x g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Pellete dokunmadan süpernatant atıldı.
3. Üzerine 1 ml %100 etanol eklenerek vorteksle karıştırıldı ve 16000 x g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Pellete dokunmadan pipet yardımıyla süpernatant uzaklaştırıldı.

4. Atık etanolün buharlaşması için örneğin kapağı açılarak 37°C'de 10 dakika bekletildi.
5. 240 µl Buffer PKD eklendi ve vorteks ile karıştırıldı.
6. 10 µl Proteinaz K ( ) pipet ile yavaşça karıştırılarak eklendi
7. 56°C'de 15 dakika ardından 80°C'de 15 dakika inkübe edildi.
8. Temiz ve alttaki faz yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
9. Buzda 3 dakika bekletildi. Ardından 20000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Pellete dokunmadan süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
10. 25 µl DNase Booster Buffer ile 10 µl DNase I eklenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
11. 500 µl Buffer RBC eklenerek örnek santrifüj tüpüne aktarıldı.
12. 1750 µl %100 etanol eklendi ve pipetle karıştırıldı.
13. Karışımın 700 µl'si RNeasy MinElute spin kolona aktarıldı.
14. Oda sıcaklığında 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolondan geçen örnek atıldı.
15. 12. adımdan kalan örnek varsa 13. adımdan itibaren karışımın tamamı geçirilene kadar tekrarlandı.
16. Kolon'a 500 µl RPE tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolondan geçen örnek atıldı.
17. Kolon'a 500 µl RPE tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 8000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolondan geçen örnek atıldı.
18. Boş kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne koyularak oda sıcaklığında 16000 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek kurutuldu.
19. Kolon temiz mikrosantrifüj tüpüne alındı. İçerisine 20 µl RNaz içermeyen steril su eklenerek oda sıcaklığında 16000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Örneğinin kalite ve miktarı nanodrop kullanılarak ölçüldü. Kullanılincaya kadar -80°C'de saklandı.

### **3.8.2. cDNA sentez reaksiyonları**

#### **3.8.2.1. mRNA ekspresyon tayini için cDNA sentez reaksiyonu**

Hem hücreden hem de parafine gömülü tümör dokularından elde edilen RNA örneklerin ekspresyon seviyelerini ölçmek için cDNA reaksiyonları RT2 First Strand Kit (Kat. No:330404, Qiagen) kullanılarak gerçekleştirildi. Sentez kitin protokolüne uygun olarak

yapıldı. Her bir reaksiyon için; kalıp toplam RNA 100 ng - 1 µg, 2 µl Buffer GE eklenerek ddH<sub>2</sub>O ile 10 µl'ye tamamlandı. 42°C'de 5 dakika inkübe edilerek genomik DNA elimine edildi. Ardından 1 dakika buzda bekletilerek sentez basamağına geçildi. 4 µl 5x Buffer BC3, 1 µl Control P2, 2 µl RE3 Reverse Transcriptase Mix ve 3 µl Nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O eklendi. Reaksiyon koşulları 37°C'de 60 dakika, 95°C'de 5 dakika olarak uygulandı. Kullanılincaya kadar -20°C'de saklandı.

### **3.8.2.2. miRNA ekspresyon tayini için cDNA sentez reaksiyonu**

Hem hücreden hem de parafine gömülü tümör dokularından elde edilen miRNA'ların ekspresyon seviyelerini ölçmek için cDNA reaksiyonları miScript II RT Kit (Kat. No:218161, Qiagen) kullanılarak gerçekleştirildi. Sentez kitin protokolüne uygun olarak yapıldı. Her bir reaksiyon için; kalıp RNA 10 ng - 2 µg, 4 µl 5x HiSpec Buffer, 2 µl 10x Nucleics Mix, 2 µl Reverse Transcriptase Mix ve toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde Nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O eklendi. Reaksiyon koşulları 37°C'de 60 dakika, 95°C'de 5 dakika olarak uygulandı. Kullanılincaya kadar -20°C'de saklandı.

### **3.8.3. Real-Time PCR**

miRNA ve hedef mRNA'larının ekspresyon seviyelerini belirlemek için yapılan Real Time PCR tekniği için 72'lik rotor disk ile Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) cihazı kullanıldı.

#### **3.8.3.1. mRNA ekspresyon seviyelerin real-time PCR ile ölçümü**

Genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyelerini belirlemek RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix (Kat. No:330500, Qiagen) kullanıldı. Reaksiyona girilecek olan tüm cDNA'lar 5 kat sulandırıldı. Reaksiyon koşulları; 2.5 µl cDNA, 6.25 µl 2x RT2 SYBR Green Mastermix, 0.25 µl ileri primer (10 µM), 0.25 µl geri primer (10 µM), 3.25 µl Nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O eklendi. Cihaz şartları; 95°C'de 10 dakika 1 döngü, (95°C 15 saniye, 60°C 60 saniye) 40 döngü olarak gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda 55°C - 90°C arası 0,1°C hassasiyette erime eğrisi (melting curve) programı eklendi. Primerlerin spesifikliği analiz edildi. Normalizasyon için β-Aktin kullanıldı. Sonuçların  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  metodu kullanılarak analiz edildi.

mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primerler tablo 3-3'te gösterilmiştir.

### 3.8.3.2. miRNA ekspresyon seviyelerin real-time PCR ile ölçümü

miRNA genlerinin ekspresyon seviyelerini belirlemek için QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Kat. No:204143, Qiagen) kullanıldı. Reaksiyona girilecek olan tüm cDNA'lar 5 kat sulandırıldı. Reaksiyon koşulları; 2.5 µl cDNA, 6.25 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 0.5 µl miScript Primer Assays, 0.5 µl Universal Primer, 2.75 µl Nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O eklendi. PCR şartları; 95°C 15 dakika 1 döngü, (95°C 15 saniye, 55°C 30 saniye, 72°C 10 saniye) 40 döngü olarak gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda 55°C - 90°C arası 0.1°C hassasiyette erime eğrisi (melting curve) programı eklendi. Primerlerin spesifikliği analiz edildi. Normalizasyon için Snord61 kullanıldı. Sonuçlar 2<sup>-ΔΔC<sub>q</sub></sup> metodu kullanılarak analiz edildi.

## 3.9. miRNA'ların Hedef Genlerinin Belirlenmesi

mir548as-3p/miR-8078'in hedef genlerini tespit edebilmek için iki yaklaşım kullanıldı:

1. *Mikroarray analizi*: miRNA'nın transfekte edildiği H1299 hücrelerinde kontrole oranla azalan genler filtrelendi.

2. *Biyoenformatik yaklaşım*: TargetScan (WEB\_5), miRWalk (WEB\_6), miRTarBase (WEB\_7), miRDB (WEB\_8) database'leri kullanılarak miRNA'ların hedefleri belirlendi ve databaselerde ortak olanlar filtrelendi.

Mikroarray analizleri sonucunda filtrelenen genler ile biyoenformatik analizlerde filtrelenen gen/genler seçildi. Seçilen bu genler hem miR-548as-3p ve miR-8078'nin mimiklerinin transfekte edildiği H1299 hücrelerinde hem de TNF-α uygulanan H1299 hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri mRNA düzeyinde ölçüldü. Her iki durumda da azalanların 3'UTR'leri lusiferaz reporter vektörüne klonlandı.

### 3.9.1. Mikroarray analizi

6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekilen H1299 hücrelerine tablo 3-1'de anlatıldığı gibi miR-8078 mimik ve negatif kontrol mimik transfekte edildi. Başlık 3.8.1'de anlatıldığı şekliyle toplam RNA izole edilen örneklerin kalite ve miktarları nanodrop ile ölçüldü. Örneklerin

kalitelerinin istenilen değerlerde olduğu tespit edildikten sonra mikroarray analizi Macrogen Inc. (GüneyKore) firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Mikroarray analizi sonuçları heatmap ile gösterildi. Heatmap, Python 2.7 programının seaborn paketi kullanılarak çizildi.

### **3.10. Hedef Genlerin 3'UTR'lerinin psiCHECK-2 Lusiferaz Reporter Vektörüne Klonlanması**

H1299 hücrelerinden gDNA izolasyonu DNeasy Blood & Tissue Kit (Kat. No:69504, Qiagen) kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

1. 10 cm'lik petri kabında kültüre edilen H1299 hücreleri tripsin edildi ve 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
2. Pellet 200 µl PBS ile süspanse edilerek 20 µl proteinaz K (Kit'ten temin edildi) eklendi.
3. Üzerine 200 µl Buffer AL eklenip vortekslendi ve 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. Karışımın üzerine 200 µl 100% etanol eklenerek vorteks ile karışıtırıldı.
5. Karışımın sıvı kısmı DNeay Mini spin kolona aktararak 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan geçen kısım atıldı.
6. Kolona 500 µl Buffer AW1 eklendi ve 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan geçen kısım atıldı.
7. Kolona 500 µl Buffer AW2 eklendi ve 16000 x g'de 3 dakika santrifüj edildi.
8. Kolon steril bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek 200 µl Buffer AE eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika beklendikten sonra 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA tüpe akıtıldı. Örneğinin kalite ve miktarı nanodrop kullanılarak ölçüldü. Kullanılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

#### **3.10.1. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme**

%0.8'lik agaroz jel hazırlamak için; 0.4 gram agaroz (Kat. No:A9539, Sigma-Aldrich) tartılarak 50 ml 0.5x TBE'de 250 ml'lik erlen içerisinde çözüldü. Homojenize olana kadar mikrodalga fırında kaynayana kadar ısıtıldı (3 kez tekrarlandı). Yaklaşık 50°C'ye gelene kadar soğuması için bekletildi. Soğuduktan sonra 2 µl etidyum bromür (Kat. No:ETB444, BioShop) eklendi. Elektroforez küvetine taraklar yerleştirilerek sıvı agaroz döküldü. Oda

sıcaklığında 30-45 dakika polimerleşmesi beklendi. Polimerleşen jel 0.5x TBE ile dolu elektroforez tankına (Kat. No:E0145A, Gel XL Ultra V-2, Labnet International) aktarıldı ve örnekler 30 dakika 100 V'da koşuruldu. Süre sonunda jelin görüntüsü Odyssey Fc Imaging System'de görüntülendi.

### 3.10.2. Klonlanacak bölgenin PCR ile çoğaltılması

PTEN ve C2CD2 3'UTR'lerini klonlamak için primerler (Tablo 3-3) NCBI Primer Blast (WEB\_9) kullanılarak tasarlandı. Sentezi için Sentegen Biyotek (Ankara)'ten hizmet alımı yapıldı. Klonlanacak bölgeleri H1299 gDNA'sından çoğaltmak için Platinum Taq DNA Polymerase (Kat. No:10966026, Thermo Fisher Scientific) ve MyCycler (BioRad) cihazı kullanıldı. Reaksiyon şartları şu şekildedir: 30 ng H1299 gDNA, 2.5 µl 10x PCR Buffer, 0.75 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.6 µl dNTP (10 mM), 0.5 µl ileri primer (10 µM), 0.5 µl geri primer (10 µM), 0.25 µl Taq DNA polimeraz eklenerek 25 µl'ye nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. Cihaz koşulları şu şekildedir: 95°C 30 saniye ön denatürasyon, (95°C 15 saniye, 58°C (PTEN 3'UTR klonlama primerleri için) / 60°C (C2CD2 3'UTR klonlama primerleri için) 30 saniye, 72°C 45 saniye) 35 döngü, son uzatma 72°C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi. PCR sonuçları agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. PCR ürünleri başlık 3.10.3'te anlatıldığı gibi saflaştırıldı.

### 3.10.3. PCR ürünlerinin ve restriksiyon kesim ürünlerinin temizlenmesi

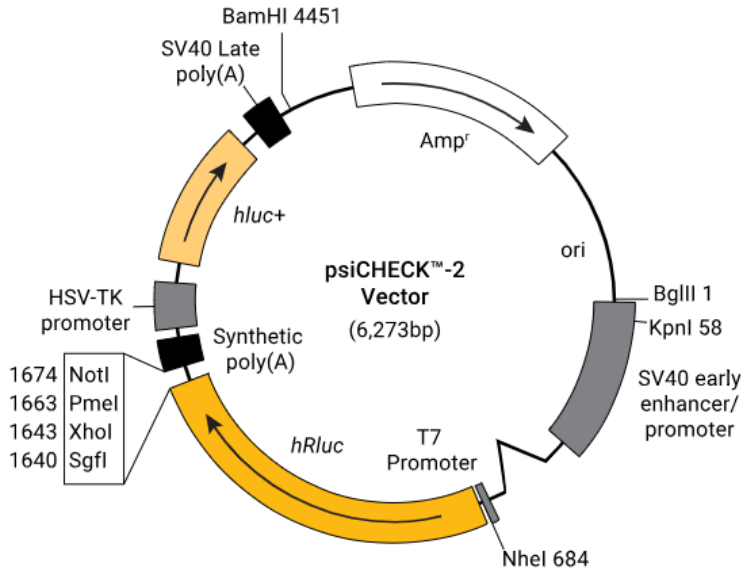
Klonlama işlemleri boyunca hem PCR hem de restriksiyon enzimi ile kesilen DNA ürünlerinin temizliği için NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kiti (Kat. No:740609, MN) kullanıldı. Deney kitin protokolüne göre yapıldı.

1. Temizlenen DNA örneğinin hacmi 100 µl'ye nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.
2. Örnek 200 µl Buffer NT1 ile karıştırılarak NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kolon'a aktarıldı. 11000 x g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Geçen sıvı atıldı.
3. Kolona 700 µl Buffer NT3 eklendi. 11000 x g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Geçen sıvı atıldı.
4. 3. adım tekrarlandı.
5. Kolon boş olarak 11000 x g'de 1 dakika kuruması için santrifüj edildi.

6. Kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 20 µl nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O koyularak 1 dakika inkübe edildi. 11000 x g'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA akıtıldı.
7. Temizlenen DNA örneklerinin kalite ve miktarları nanodrop kullanılarak ölçüldü.

### 3.10.4. psiCHECK-2 lusiferaz reporter vektörünün ve PCR ürünlerinin XhoI ve PmeI restriksiyon enzimleri ile kesimi

psiCHECK-2 vektörü (Kat. No:C8021, Promega) Dr. Özgür Şahin'den temin edilmiştir. psiCHECK-2 ve PCR ile çoğaltılan PTEN/C2CD2 3'UTR'leri XhoI (Kat. No:R0146, NEB) ve PmeI (Kat. No:R0560, NEB) restriksiyon enzimleri ile sırayla kesildi.



**Şekil 3-1.** psiCHECK-2 lusiferaz reporter vektörü haritası (WEB\_10).

XhoI restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu şartları aşağıdaki gibidir:

5 µg Vektör/PCR ürünü, 5 µl 1x CutSmart Buffer, 5 µl XhoI restriksiyon enzimi, 50 µl'ye nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanıp karıştırıldı. 37°C'de bir gece kesim işlemi için, 65°C'de 20 dakika enzimin inaktivasyonu için inkübe edildi. Başlık 3.10.3'teki gibi DNA temizleme basamakları uygulandı. Bir sonraki restriksiyon kesim enzimi PmeI ile kesildi. Reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir:



2 µg Vektör/PCR ürünü, 5 µl 1x CutSmart Buffer, 2 µl PmeI restriksiyon enzimi, 50 µl'ye nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanıp karıştırıldı. 37°C'de bir gece kesim işlemi için, 65°C'de 20 dakika enzimin inaktivasyonu için inkübe edildi. Başlık 3.10.3'teki gibi DNA temizleme basamakları uygulandı.

### **3.10.5. psiCHECK-2 vektörünün alkalen fosfataz ile muamelesi**

XhoI ve PmeI ile kesilerek saflaştırılan vektör DNA'sının 5' uçlarından fosfat gruplarını çıkarmak için FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Kat. No: EF0651, Thermo Fisher Scientific) enzimi kullanıldı. Reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir:

1 µg Vektör, 2 µl 10x FastDigest Buffer, 1 µl FastAP Alkalın Fosfataz enzimi, 20 µl'ye nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanıp karıştırıldı. 37°C'de 4 saat enzim aktivitesi için, 80°C'de 20 dakika enzimin inaktivasyonu için inkübe edildi.

#### **3.10.5.1. Alkalen fosfataz ile muamele edilen psiCHECK-2 'nin fenol kloroform ekstraksiyon yöntemi ile temizlenmesi**

Diğer enzim muamelelerinden farklı olarak vektör DNA'sının alkalen fosfatazdan arındırmak için fenol kloroform ekstraksiyon yöntemi aşağıdaki şekliyle uygulandı.

1. Son hacim 20 µl olan örneğin üzerine 180 µl nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O eklendi
2. Üzerine 200 µl (Örnek miktarı kadar) fenol:kloroform:isoamilalkol (Kat. No:P2069, Sigma-Aldrich) eklenerek 15 saniye şiddetli şekilde vortekslendi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
3. 4°C'de 12000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Şeffaf sıvı kısım steril bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
4. 2. ve 3. adım tekrarlandı.
5. Alınan sıvı kısım kadar (1:1) %100 soğuk etanol eklendi ve 1 saat -80°C'de bekletildi.
6. 4°C'de 12000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Pellete dokunmadan süpernatantın tamamı atıldı.
7. Herhangi etanol kalıntısı kalmaması için pellet 10 dakika kurutuldu.
8. Pellet 30 µl nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü.
9. Nanodrop kullanarak DNA'nın miktar ve kalitesi ölçüldü. Kullanılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### 3.10.6. PTEN ve C2CD2 3'UTR'lerinin psiCHECK-2 vektörüne ligasyonu

Klonlamak için hazırlanan psiCHECK-2 vektörü ve PTEN, C2CD2 3'UTR'lerinin (insert DNA) klonlanması için Ligasyon için T4 DNA Ligase (Kat. No:EL0014, Thermo Fisher Scientific) kullanıldı. Reaksiyon için eklenecek vektör ve PCR ürünlerinin miktarı oran olarak 1:5 olarak belirlendi. Reaksiyon şartları şu şekildedir:

85 ng Vektör, 60 ng insert DNA, 2 µl 10x T4 DNA Ligase buffer, 2 µl %50 PEG 4000 solüsyon, 1 µl T4 DNA Ligaz, 20 µl'ye nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. 22°C'de 1 saat inkübe edildi.

### 3.10.7. Sıvı LB besiyeri hazırlanması

Sıvı LB (Luria-Bertani Broth) besiyeri 500 ml'lik erlenlerin içerisine 250 ml hazırlandı. Bunun için; 6.25 g LB Broth (Kat. No:110285, Merck) tartılıp 250 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. 121°C'de 15 dakika otoklav ile sterilize edilerek. Kullanılincaya kadar 4°C'de muhafaza edildi.

### 3.10.8. LB agar besiyeri hazırlanması

Katı LB besiyeri hazırlamak için 250 ml'lik erlene 100 ml hazırlandı. Bunun için; 2.5 g LB Broth ve 1.5 g Agar (Kat. No:05039, Sigma-Aldrich) tartılıp 100 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. 121°C'de 15 dakika otoklav ile sterilize edildi. Besiyerinin yaklaşık 50°C'ye gelmesi beklendi. 100 µg/ml amfisilin (Kat. No:BP1760, Fisher Scientific) eklenerek sıcaklığı düşmeden her bir petriye bek alevi altında yaklaşık 10 ml olacak şekilde döküm yapıldı. Soğuması beklenecek katılaşması sağlandı. Petrilerin çevresi parafin ile etrafı sarılarak kullanılincaya kadar 4°C'de ışık görmeyecek şekilde 1 ay'a kadar muhafaza edildi.

### 3.10.9. Ligasyon ürününün *E.coli* DH5α suşuna transformasyonu

Transformasyon için 5-alpha Competent *E.coli* (Kat. No:C2987H, NEB) kullanıldı. Tüm işlemler esnasında aseptik şartlara uyularak bek alevi altında çalışıldı.

1. 5 µl ligasyon ürünü, 50 µl kompetent hücre olan tüpün içerisine bırakılarak yavaşça birkaç kez pipetle karıştırıldı.
2. Karışım 30 dakika buz içerisinde inkübe edildi.

3. Ardından 42°C'de 35 saniye bekletildi. Hemen buza alınıp 5 dakika inkübe edildi.
4. Kit ile temin edilen SOC medium'dan 950 µl eklenerek 37°C'de 45 dakika boyunca çalkalandı.
5. Çalkalanan hücrelerden 100 µl alınarak amfisilin içeren LB agarın olduğu petriye yayma ekim yapıldı. 37°C'de 1 gece çoğalması için bekletildi.

### 3.10.10. Kolonilerin çoğaltılması ve koloni PCR

LB agarda çoğalan kolonilerden rastgele 10 tanesi seçildi ve santrifüj tüplerinde 50 µg/ml amfisilin içeren 3 ml sıvı LB besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de 4 saat 250 rpm'de çalkalandı. Sıvı besiyerinde çoğaltılan bakteri kültüründen 2 µl alındı ve tablo 3-3'te gösterilen klonlama primerleri kullanılarak başlık 3.10.2'de anlatıldığı şekilde PCR kuruldu. PCR ürünleri %0.8'lik agaroz jelde koşturularak görüntülendi. Çoğalan PCR örneklerinden 3 tane seçilerek DNA dizilemesi için Sentegen Biotech (Ankara)'e gönderildi. PCR ürünün çoğalma gösterdiği bakteri kültürüleri 37°C'de 1 gece 250 rpm'de çalkalandı. Bir gece sonra bakteri kültüründen 500 µl alınarak 500 µl %50 steril gliserol ile karıştırılarak -80°C'de daha sonra kullanılmak üzere saklandı.

### 3.10.11. Plazmit DNA izolasyonu

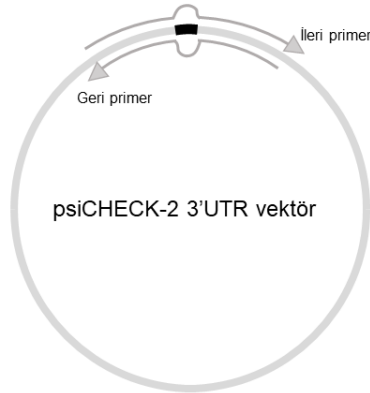
Ökaryotik hücrelere transfekte edilecek olan plazmitlerin izolasyonu için HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Kat. No:12663, Qiagen) kullanıldı. Deney kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

1. Plazmiti izole edilecek olan bakteri stoğu 50 µg/ml amfisilin içeren 250 ml'lik sıvı LB içeren erlene ekim yapıldı. 37°C'de 1 gece 250 rpm'de çalkalandı.
2. Ertesi gün bakteri içeren 250 ml'lik besiyeri 50 ml'lik falkon tüplere dağıtılarak 4°C'de 6000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Pellete dokunmadan süpernatantın tamamı atıldı. (Buffer P3 kullanılmadan 30 dakika önce buza koyuldu).
3. Falkonlardaki pelletler 10 ml Buffer P1'de çözülerek tek tüpte birleştirildi.
4. 10 ml Buffer P2 eklenerek 4-6 kez ters yüz edildi.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi (Bekleme süresinde QIAfilter Maxi Cartridge'in çıkış yeri vidalanarak uygun bir spora yerleştirilerek hazırlandı).
6. 10 ml Buffer P3 eklenerek 4-6 kez ters yüz edildi.

7. Falkondaki lizat daha önceden hazırlanmış olan QIAfilter Cartridge'nin içerisine döküldü. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
8. HiSpeed Maxi Tip'in dengelenmesi için 10 ml Buffer QBT yerçekiminin etkisiyle kolondan geçirilerek hazırlandı.
9. QIAfilter Cartridge'nin çıkış yerindeki vida çıkarılarak, pistonu yerleştirilip nazikçe sabit bir kuvvet uygulanarak daha önce dengelenmiş olan HiSpeed Tip'in içerisine döküldü.
10. HiSpeed Tip'in içerisine dökülen lizat kolondan geçirildi.
11. HiSpeed Tip'in içerisine 60 ml QC dökülerek yavaşça kolondan geçirildi.
12. Kolona 15 ml QF eklenerek steril 50 ml'lik falkonun içerisine yavaşça akması sağlandı.
13. Falkonun içerisine akıtılmış olan örnek 10.5 ml (QF'nin 0.7 kat hacminde) izopropanol ile karıştırılarak plazmit DNA çöktürüldü. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
14. 30 ml'lik enjektörün pistonu çıkarıldı ve ucuna QIAprecipitator Maxi Module (filtre) eklendi. İçerisine izopropanol ile karıştırılan örnek döküldü. Piston tekrar takılarak yavaş bir kuvvetle karışımın filtreden geçmesi sağlandı.
15. 2 ml %70 etanol filtreden yavaşça geçirildi.
16. Enjektör boşken birkaç kez filtreden hava geçirilir etanol kalıntısı atıldı ve filtre 10 dakika kuruması beklendi.
17. 1 ml TE filtreden geçirilerek plazmit DNA steril temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. DNA'nın miktar ve kalitesi nanordop kullanılarak ölçüldü. psiCHECK-2 PTEN 3'UTR yabancı tip ve psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR yabancı tip lusiferaz reporter vektörleri klonlanarak izole edilmiş oldu. Kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### **3.10.12. Yönlendirilmiş mutagenез (Site directed mutagenesis)**

Klonlanan psiCHECK-2 PTEN 3'UTR yabancı tip ve psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR yabancı tip vektörlerinde mutasyon oluşturmak için kullanılan yönlendirilmiş mutagenез yöntemi şekil 3-2'deki gibi gerçekleştirildi. Bunun için tasarlanan primerler tablo 3-3'te gösterilmiştir.



**Şekil 3-2.** 3'UTR klonlanan vektörde mutasyon oluşturmak için kullanılan yönlendirilmiş mutagenез yöntemi.

PCR, Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Kat. No:F530S, Thermo Fisher Scientific) ve MyCycler (BioRad) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon şartları şu şekildedir: 7.5 ng Plazmit DNA, 4 µl 5X Phusion HF Buffer, 0.4 µl dNTP (10 mM), 0.25 µl ileri primer (10 µM), 0.25 µl geri primer (10 µM), 0.4 µl DMSO, 0.2 µl Phusion DNA Polymerase, 20 µl'ye nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanıp karıştırıldı. Cihaz şartları şu şekildedir: 98°C 1 dakika enzim aktivasyonu, (98°C 30 saniye, 58°C (PTEN 3'UTR mutasyonu için) / 70°C (C2CD2 3'UTR mutasyonu için) 45 saniye, 72°C 3.5 dakika) 25 döngü, son uzatma 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi. PCR sonucu 0.8'lik agaroz jelde görüntülendi. PCR ürünleri başlık 3.10.3'te anlatıldığı gibi temizlendi.

30 ng PCR ürünü, 2 µl 10x T4 DNA Ligase buffer, 2 µl %50 PEG 4000 solüsyon, 1 µl T4 DNA Ligaz, 20 µl'ye nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. 22°C'de 1 saat inkübe edildi.

Ligasyon ürünü kullanarak başlık 3.10.9'da anlatıldığı şekilde transformasyon yapıldı ve başlık 3.10.10'da anlatıldığı gibi tablo 3-3'te gösterilen klonlama primerleri kullanılarak koloni PCR kuruldu ve mutasyonun olup olmadığının teyiti için bahsedildiği gibi Sentegen Biotech (Ankara) firmasından DNA dizileme hizmeti alındı. DNA dizi sonuçları mutasyonun olduğu tespit edilen kolonilerden başlık 3.10.11'de anlatıldığı şekilde çoğaltılarak plazmit izolasyonu yapıldı. psiCHECK-2 PTEN 3'UTR mutant ve psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR mutant vektörleri oluşturulmuş oldu.

### 3.11. Hücre İnvazyon ve Migrasyon Deneyi

Hücre invazyon deneyleri için BioCoat Matrigel Invasion Chambers (Kat. No:354480, Corning) kullanıldı. Deney üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Öncelikle invazyon odaları oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Ardından, serum içermeyen besiyerinde 37°C'de 2 saat rehidrasyon yapıldı. Bu süre içerisinde invazyon kapasitesi belirlenecek hücreler kültüre edildikleri kaplardan tripsin edilerek sayıldılar. İnvazyon odacığına  $2.5 \times 10^4$  hücre serum içermeyen besiyerine ekildi. Odacığın altında kalan kuyuya kemoatraktan olarak %10 serum içeren besiyeri eklendi. Hücreler 22 saat kültür şartlarında inkübe edildi. 22 saat sonunda invazyon odacığının içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve pamuklu çubukla odacığın içerisinde kalmış olan hücreler temizlendi. İnvazyon odacıkları öncelikle soğuk soğuk metanol içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra 10 dakika Toluidine blue (%1) ile boyandı. Mikroskop altında x20 büyütmede 5 farklı alan fotoğraflanıp invaziv hücreler sayıldı.

Hücre migrasyon deneyleri için Falcon FluoroBlok Cell Culture Insert (Kat. No:08-772-147, BD) kullanıldı. Migrasyon kapasitesi belirlenecek hücreler kültüre edildikleri kaplardan tripsin edilerek sayıldılar. İnvazyon odacığına  $1.25 \times 10^4$  hücre serum içermeyen besiyerine ekildi. Odacığın altında kalan kuyuya kemoatraktan olarak %10 serum içeren besiyeri eklendi. Hücreler 22 saat kültür şartlarında inkübe edildi. 22 saat sonunda migrasyon odacığının içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve pamuklu çubukla odacığın içerisinde kalmış olan hücreler temizlendi. Migrasyon odacıkları öncelikle soğuk soğuk metanol içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra 10 dakika %1 Toluidine blue (Kat. No:89640, Sigma-Aldrich) ile boyandı. Mikroskop altında 20x büyütmede 5 farklı alan fotoğraflanıp migrasyon yapan hücreler sayıldı.

### 3.12. Hücre Proliferasyon Deneyi

Hücre proliferasyon deneyleri Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit ile gerçekleştirildi (Kat. No:V13154, Thermo Fischer Scientific). Yöntem kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. 96 kuyulu hücre kültür kaplarına  $1 \times 10^4$  hücre ekildi. Hücreler tutunduktan sonra besiyeri tazelenerek her kuyuya 100 µl serumlu besiyeri eklendi. Hücre proliferasyonunun ölçüleceği kuyulara 10 µl MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromit) eklendi ve hücre kültür şartlarında 4 saat inkübe edildi. 4 saat

sonunda MTT eklenen kuyulara SDS eklenerek hücre kültür şartlarında 4 saat inkübe edildi. Ardından pipet yardımıyla kuyular karıştırılarak 560 nm'de absorbans değerleri okundu.

### **3.13. Sinyal Yolak Şekillerinin Oluşturulması**

Tezin 'Kuramsal Bilgiler' kısmında, bahsi geçen konularla ilgili sinyal yolak şekilleri web tabanlı bioRENDER (WEB\_11) programında bulunan hazır şablonlar kullanılarak çizilmiştir. Çizimler konuyla ilgili literatür bilgileri göz önünde bulundurularak uygun grafikler kullanılarak hazırlanmıştır.

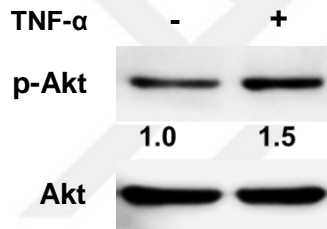
### **3.14. İstatistiksel Analiz**

Çalışma boyunca gerçekleştirilen real-time PCR sonuçları, lusiferaz aktivitesi ölçüm değerleri ve hücre invazyon sonuçlarının SPSS 17.0 kullanarak Student's t-test yöntemi ile analiz edildi. Hasta dokularına ait grafikler GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) kullanılarak çizildi. İstatistiksel analizleri yine aynı program ile parametrik olmayan Mann-Whitney U yöntemi ile gerçekleştirildi.  $p < 0.05$  değerine sahip sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçların ortalama değerleri  $\pm$  standart sapmaları belirtilerek gösterildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. TNF- $\alpha$ İndüklü AKT Aktivasyonu

TNF- $\alpha$  ile indüklenen PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının TNF- $\alpha$  tarafından aktive edildiğini tespit edebilmek için TNF- $\alpha$  indüklü H1299 hücrelerinde AKT'nin aktivasyonu değerlendirildi. Bunun için 6 kuyulu platelere ekilen H1299 hücreleri 24 saat serum açlığına maruz bırakıldı. 30 ng/ml TNF- $\alpha$  ile muamele edildikten 24 saat sonra hücrelerin lizatları ripa tamponu ile toplandı ve western blot analizi ile p-AKT ve AKT seviyeleri belirlendi. Şekil 4-1'de görüldüğü üzere TNF- $\alpha$  ile muamele edilen H1299 hücrelerinde p-AKT seviyesi, TNF- $\alpha$  uygulanmayan gruba göre 1.5 kat fazla olduğu gözlemlendi.



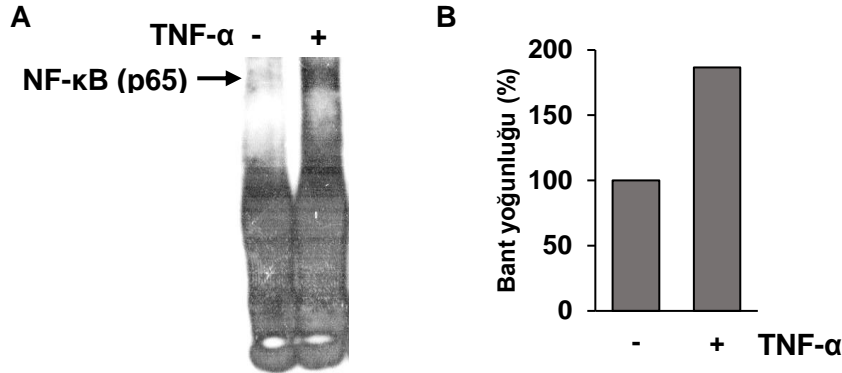
**Şekil 4-1.** H1299 hücrelerinin TNF- $\alpha$  muamelesi sonucu AKT aktivasyonunun western blot görüntüsü. Bant yoğunlukları Image Studio Lite Ver 4.0 programıyla ölçüldü. p-AKT değeri, AKT'ninkine oranlanarak normalize edildi. Kontrole oranla kat değişimi değerleri bantların altına eklendi.

### 4.2. TNF- $\alpha$ İndüklü NF- $\kappa$ B Aktivasyonu

#### 4.2.1. TNF- $\alpha$ indüklü NF- $\kappa$ B (p65)'nin DNA'ya bağlanma kapasitesi

TNF- $\alpha$  uyarımıyla AKT yolağının aktifleştiği tespit edildikten sonra p65'in DNA'ya bağlanma kapasitesini belirleyebilmek için EMSA deneyi gerçekleştirildi. H1299 hücreleri, 6 kuyulu platelerde 24 saat serumsuz besiyerinde kültüre edildikten sonra 30 dakika 30 ng/ml TNF- $\alpha$  ile muamele edildi. Muamele edilen ve edilmeyen grubun nükleer lizatları EMSA deneyi için toplandı. Şekil 4-2'de TNF- $\alpha$  ile uyarılan grupta p65'in DNA bağlanma kapasitesinin TNF- $\alpha$  muamele edilmeyen gruba göre 2 kat fazla olduğu saptandı.

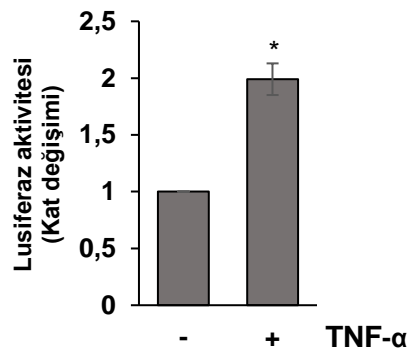




**Şekil 4-2.** TNF- $\alpha$  indüklü p65 DNA bağlanma kapasitesi. H1299 hücrelerini 30 ng/ml TNF- $\alpha$  ile 30 dakika indükledikten sonra gerçekleştirilen EMSA sonucunun görüntüsü (A). EMSA görüntüsündeki bant yoğunlukları Image Studio Lite Ver 4.0 programıyla grafiğe döküldü (B).

#### 4.2.2. TNF- $\alpha$ indüklü NF- $\kappa$ B (p65) transkripsiyonel aktivitesi

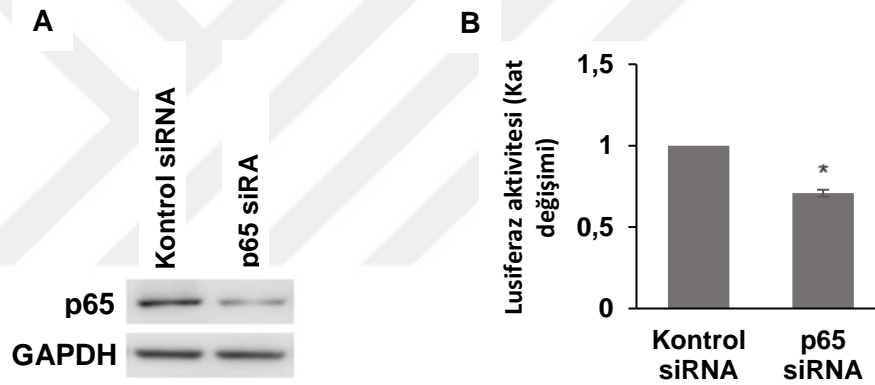
TNF- $\alpha$  uyarımının p65'in DNA bağlanma kapasitesinin arttırdığı gösterildikten sonra p65'in transkripsiyonel aktivitesine olan etkisi lusiferaz reporter deneyleri ile saptandı. Bir gün önce 96 kuyulu platelere ekilen H1299 hücreleri, pGL3-NF- $\kappa$ B-promoter-Luc vektörü ve normalizatör olarak pRL-*Renilla* vektörü birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler, kontrol grubu hariç 30 ng/ml TNF- $\alpha$  ile 8 saat muamele edilip passive lizis buffer ile lizatları toplanarak lusiferaz aktivitesi ölçümleri gerçekleştirildi. H1299 hücrelerinin TNF- $\alpha$  ile indüklenmesi sonucunda p65'in transkripsiyonel aktivitesinin, TNF- $\alpha$ 'nın uygulanmadığı hücrelere oranla 2 kat anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 4-3).



**Şekil 4-3.** H1299 hücrelerinin TNF- $\alpha$  uyarımı sonucu p65 transkripsiyonel aktivitesinin ölçümü. pGL3-NF $\kappa$ B-promoter-Luc (100 ng/kuyu) ve pRL-*Renilla* (10 ng /kuyu) vektörlerinin birlikte transfekte edildiği hücrelere 30 ng/ml TNF- $\alpha$  uygulaması sonucu ölçülen lusiferaz aktivitesi. \* p<0.05.

Lusiferaz reporter deneyinde TNF- $\alpha$ 'nın p65 transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı tespit edildikten sonra p65'in transkripsiyonel aktivitesini azaltmak için siRNA aracılı gen

susturma yöntemi kullanıldı. p65 siRNA'nın, p65'in transkripsiyonel aktivitesine olan etkisi değerlendirilmeden önce, siRNA aracılığıyla p65'in downregüle olduğu saptandı. 6 kuyulu platalere ekilen H1299 hücreleri p65 siRNA ve kontrol siRNA ile transfekte edildikten 24 saat sonra ripa buffer ile hücre lizatları toplanarak western blot analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda, p65 siRNA'nın kontrol siRNA'ya göre etkili şekilde p65 ekspresyon seviyesini azalttığı gözlemlendi (Şekil 4-4A). p65 siRNA'nın çalıştığı teyit edildikten sonra, 6 kuyulu platalere ekilen H1299 hücrelerine kontrol siRNA ve p65 siRNA transfekte edildi. 24 saat sonra pGL3-NF-κB-promoter-Luc ve pRL-*Renilla* vektörü tüm gruplara birlikte transfekte edilerek 48 saat sonra hücrelerin lizatları passive lizis buffer ile toplandı ve lusiferaz aktiviteleri ölçüldü. p65'in susturulduğu grupta kontrole oranla yaklaşık %30 oranında anlamlı derecede azalma gözlemlendi (Şekil 4-4B).

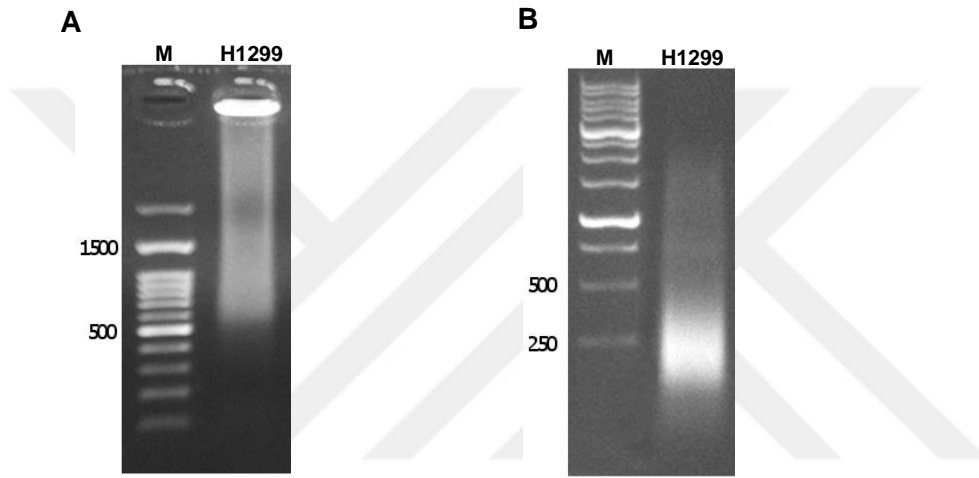


**Şekil 4-4.** H1299 hücrelerinin p65 siRNA aracılığıyla NF-κB (p65)'in transkripsiyonel aktivitesinin azaltılması. p65'in siRNA aracılı susturulduğunun western blot görüntüsü (A). pGL3-NFκB-promoter-Luc (100 ng/kuyu) ve pRL-*Renilla* (10 ng /kuyu) vektörlerinin birlikte transfekte edildiği H1299 hücrelerinde p65 siRNA'nın lusiferaz aktivitesi ölçümü (B). \*  $p < 0.05$ .

### 4.3. Kromatin İmmünpresipitasyon-Sekans (ChIP-Seq)

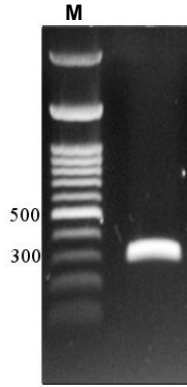
KHDAK'nde TNF- $\alpha$  indüklü NF-κB (p65)'nin miRNA'ların promotorlarına bağlanarak transkripsiyonlarını aktive ettiğini ve bu miRNA'ların çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde görev aldığını hipotez etmiştik. Hipotezin ilk basamağı olan, NF-κB'nin promotorlarına bağlanarak transkripsiyonlarını düzenlediği miRNA'ları tespit edebilmek için Kromatin immünpresipitasyon-sekans (ChIP-Seq) yöntemini kullanıldı. ChIP-Seq yöntemi ile H1299 KHDAK genomundaki p65'in bağlandığı DNA bölgelerini saptayarak bu bölgelerin bir miRNA'nın promotor bölgesi olup olmadığının tespit edilmesi amaçlandı. 24 saat

serumsuz besiyerinde kültüre edilen H1299 hücrelerini, 30 ng/ml TNF- $\alpha$  ile 1 saat muamele ettikten sonra DNA ve transkripsiyon faktörlerinin fiksasyonu için %18.5'lik formaldehit uygulanarak hücreler toplandı. Toplanan hücrelerde nükleuslar izole edilip nükleer lizis tamponu ile parçalandı. Açığa çıkan H1299 kromatini sonikasyon yöntemiyle, uzunluğu 250-500 baz olacak şekilde fragmente edildi. Sonikasyon öncesi ve sonikasyon sonrası H1299 genom agaroz jelde görüntülenerek deneyin sonikasyon aşamasının gerçekleştiği teyit edildi (Şekil 4-5).



**Şekil 4-5.** Sonikasyon öncesi (A) ve sonikasyon sonrası (B) H1299 genomik DNA'sının %0.8'lik agaroz jel görüntüsü. (M: Marker, H1299: H1299 KHDAK hücre hattının genomik DNA örneği)

İstenilen uzunlukta parçalanan H1299 kromatininde, p65'in bağlandığı DNA fragmentlerini seçebilmek için CHIP deneyine uygun p65 antikorunu kullanarak immüno-presipitasyon işlemi gerçekleştirildi. DNA, protein ve RNA'dan arındırıldı. Elde ettiğimiz DNA fragmentlerinin içerisinde p65'in bağlanma bölgesi olup olmadığını teyit etmek için, p65'in bağlandığı bilinen *IKK* geninin promotor bölgesine spesifik primerler kullanarak PCR gerçekleştirildi ve sonuçlar agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4-6). PCR sonucunda immüno-presipitasyonu doğruladıktan sonra örneğin kalite ve konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldü (Tablo 4-1) ve örnek CHIP-seq yöntem için TÜBİTAK BİLGEM İleri Genom ve Biyoformatik Araştırma Merkezi'ne gönderildi.



**Şekil 4-6.** *IKK* geninin promotorunda bulunan NF- $\kappa$ B (p65) bağlanma bölgesine spesifik primerler ile yapılan PCR sonucunun %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde görüntüsü. (M: Marker, H1299: H1299 KHDAK hücre hattının genomik DNA örneği)

**Tablo 4-1.** Chip Sekans için gönderilen örneklerin miktar ve absorbans değerleri.

Miktar (ng/ $\mu$ l)	Hacim ( $\mu$ l)	A260/A280	A260/A230
5,67	50	1,7	2

#### 4.4. ChIP-Seq Sonuçlarının Biyoformatik Analizleri

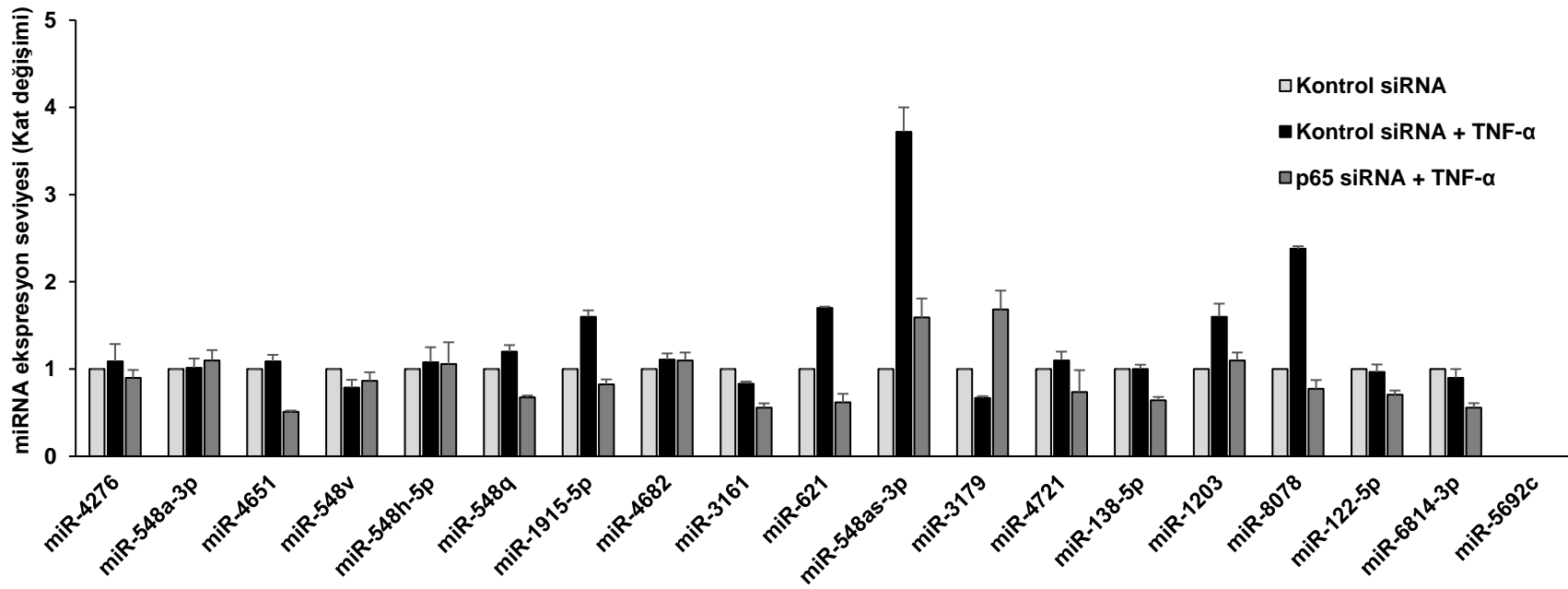
Sekanslanan genom bölgeleri hg38'e göre hizalanmış olarak gönderildi. Sekanslanan bölgelerin insan genomunda herhangi bir miRNA'nın promotor bölgesi olup olmadığını tespit edebilmek için bu bölgelerin pre-miRNA genlerine uzaklıkları tespit edildi. Integrative Genomics Viewer (IGV) programı kullanılarak, hem ChIP-seq sonucu elde edilen bölgeler hem de insan genomunda bilinen tüm pre-miRNA genlerinin lokasyonları birlikte görüntülendi. Pre-miRNA genlerinin 5' yönünde yaklaşık 20 kilobaz içerisinde ChIP-seq sonucu okunan bölge varsa o pre-miRNA filtrelendi, o bölge de miRNA'nın promotor bölgesi olarak kabul edildi. p65 antikoru kullanarak gerçekleştirdiğimiz ChIP deneyi sırasında yanlış pozitif bağlanmalar söz konusu olabileceğinden dolayı sekanslanan H1299 genom bölgelerinde p65 DNA bağlanma motifleri olup olmadığı araştırıldı. miRNA'ların tahmini promotor bölgeleri olarak belirlediğimiz ChIP-seq bölgelerinde p65 bağlanma motifi olup olmadığını tespit etmek için web tabanlı JASPAR ve TRANSFAC programı kullanıldı. Bu analiz sonucunda bazı bölgeler ve dolayısıyla pre-miRNA'lar elenerek ikinci bir filtreleme yapılmış oldu. Tüm analizler sonucunda filtrelenen bölgeler ve pre-miRNA'lar tablo 4-2'de verilmiştir.

**Tablo 4-2.** ChIP-seq sonuçlarının biyoenformatik analizleri sonucunda potansiyel p65 bağlanma bölgeleri ve düzenlediği miRNA genleri.

Pre-miRNA	Lokasyon	Konak geni	DNA zinciri	Okunan ChIP-seq bölgesinin pre-miRNA'ya olan uzaklığı	Okunan ChIP-seq bölgesinin koordinatı	ChIP-seq bölgelerinin kat zenginliği (Fold enrichment)	ChIP-seq bölgesindeki potansiyel NF-κB (p65) bağlanma bölgesi
hsa-miR-4276	interjenik		+	~20kb	chr4:174,404,075-174,406,359	24.68	GAGGATTTCC
hsa-miR-548a-2	interjenik		+	~10kb	chr6:135,228,599-135,229,280	42.50	TGGAACCTACC
hsa-miR-4651	intronik	POR	+	~19kb	chr7:75,895,529-75,896,065	18.64	TGGGGTTTCA
hsa-miR-5692c-2	interjenik		-	~20kb	chr7:97,982,666-97,983,060	26.28	GCTGGTTTCC
hsa-miR-548v	intronik	MTUS1	-	~4.5kb	chr8:17,676,955-17,677,652	23.57	CTGATTTTCC
hsa-miR-548h-4	interjenik		-	~3kb	chr8:27,051,779-27,052,082	17.34	ATGGGTTTCC
hsa-miR-548q	intronik	CAMK1D	-	~11kb	chr10:12,735,948-12,736,625	46.15	TGGAAATTTTC
hsa-miR-1915	intronik	CASC10	-	~25 kb	chr10:21,522,265-21,523,065	10.29	GAGACTTACC
hsa-miR-4682	interjenik		+	~1kb	chr10:119,956,983-119,957,722	11.90	GGGACTTCCT
hsa-miR-3161	intronik	PTPRJ	+	~22kb	chr11:48,074,669-48,075,119	35.17	TGGGTTTTAC
hsa-miR-621	ekzonik	SLC25A15	+	~20kb	chr13:40,788,345-40,788,907	31.05	GGGAGGTTGC
hsa-miR-548as	intronik	GPC5	+	~7kb	chr13:92,483,043-92,483,434	20.51	TGTGATTTCA
hsa-miR-3179-1	interjenik		+	~2.5kb	chr16:14,898,312-14,898,861	27.00	TGGGGTTACA
hsa-miR-4721	ekzonik	TUFM	-	~20kb	chr16:28,864,070-28,864,619	19.05	TGATATTTCC
hsa-miR-138-2	interjenik		+	~16kb	chr16:56,842,047-56,842,341	27.91	CTCAGTTTCC
hsa-miR-1203	intronik	SKAP1	-	~6.5kb	chr17:48,163,058-48,163,737	20.91	GGGAAGTTCC
hsa-miR-8078	interjenik		-	~0.2kb	chr18:112,253-112,542	18.96	CTGGGATTCC
hsa-miR-122	interjenik		+	~16kb	chr18:58,435,041-58,435,380	16.39	TTTAAATTCC
hsa-miR-6814	intronik	RIPK4	-	~1.8kb	chr21:41,748,349-41,748,611	10.82	TGGTGTTTGC

#### 4.5. NF-κB Tarafından Düzenlenen miRNA'lar

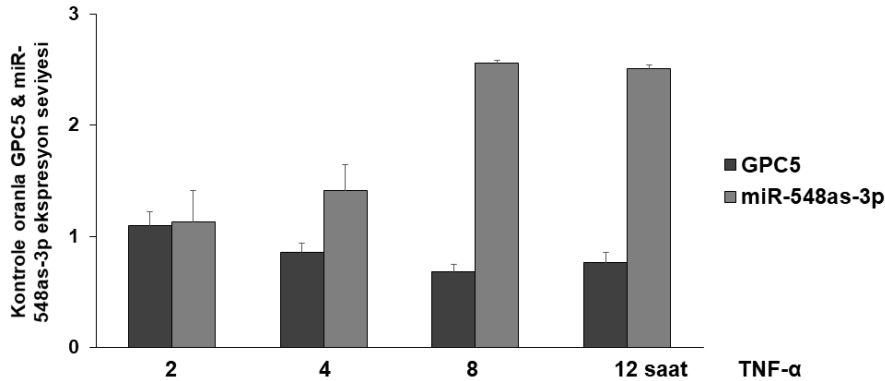
NF-κB (p65) tarafından potansiyel olarak düzenlendikleri biyoenformatik araçlar kullanılarak tespit edilen pre-miRNA'ların işlevsel birimi olan olgun miRNA'ların seçimi gerçekleştirildi. Bunun için miRBase database'inde, derin sekanslama (deep sequencing) deney sonuçlarında pre-miRNA'nın en çok okunan olgun formu (3p veya 5p) seçildi. Seçilen olgun miRNA'ların, NF-κB tarafından düzenlenip düzenlenmediklerini tespit edebilmek için real-time PCR deneyleri gerçekleştirildi. Bunun için 6 kuyulu platelere ekilen H1299 hücrelerine kontrol siRNA ve NF-κB (p65) siRNA transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra kontrol siRNA ve p65 siRNA grupları TNF-α (30 ng/ml) ile 8 saat muamele edildi. Hiçbir uygulama yapılmayan diğer kontrol siRNA grubu TNF-α uygulanan gruplar için kontrol olarak kullanıldı. Hücreler Trizol ile toplanarak miRNA'ları izole edildi ve real-time PCR deneyleri gerçekleştirildi. Sonuçlar, Snord61'e normalize edilerek  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  yöntemi ile analiz edildi. Tablo 4-1'de tespit edilen ve olgun formları seçilen miRNA'ların ekspresyon seviyeleri tüm gruplarda ölçülerek analiz edildi. Real-time PCR analizi sonucunda, 19 miRNA'dan 5 tanesinin (miR-548as-3p, miR-8078, miR-621, miR-1203, miR-1915) TNF-α ile ekspresyonları anlamlı derecede artarken NF-κB (p65) siRNA varlığında bu artışın azaldığı tespit edildi. TNF-α uygulamasıyla en yüksek ekspresyon seviyesi yaklaşık 4 kat ile miR-548as-3p ve 2.5 kat ile miR-8078'dir. TNF-α muamelesiyle ekspresyonu yaklaşık %40 azalan miR-3179, p65 siRNA varlığında ekspresyonu 2 kat artarak diğer miRNA'ların tersi durum göstermiştir. miR-5692c'nin ekspresyon seviyesinde herhangi bir sinyal alınamamıştır. Diğer miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir (Şekil 4-7). Bu sonuçlar doğrultusunda miR-548as-3p, miR-8078, miR-1915-5p, miR-621, miR-1203 ve miR-3179'un ekspresyonlarının NF-κB tarafından düzenleniyor olduğu tespit edilmiştir. miR-3179 diğer miRNA'ların aksine, TNF-α uyarımı ile ekspresyonu azalmıştır. TNF-α muamelesine rağmen p65 siRNA varlığında ise ekspresyonu artmıştır. Bu durum NF-κB'nin, miR-3179'un ekspresyonunu baskılayarak negatif yönde bir düzenlenme gösteriyor olduğu sonucuna ulaştırmaktadır.



Şekil 4-7. NF-κB aktivasyonu ile transkripsiyonel olarak indüklenen miRNA'lar.

#### 4.6. miR-548as-3p'nin Promotor Analizi

miR-548as-3p, GPC5 geninin 7. intronunda yer alan intronik bir miRNA'dır. miR-548as-3p'nin promotorunu tahmin edebilmek için öncelikle, konak geni GPC5 ile ortak promotora sahip olup olmadığı araştırıldı. TNF- $\alpha$  muamelesi ile upregüle olan miR-548as-3p, GPC5 ile ortak promotora sahip olduğu takdirde GPC5'inde upregüle olması gerekmekteydi. Bunun için, 6 kuyulu platelere ekilen H1299 hücrelerini 30 ng/ml TNF- $\alpha$  ile muamele edip 2, 4, 8 ve 12 saat sonra trizol ile toplandı. miRNA'yı içeren toplam RNA'ları izole edilerek miR-548as-3p ve GPC5'in ekspresyon seviyeleri real-time PCR ile belirlendi. miR-548as-3p Snord61'le, GPC5  $\beta$ -aktin'le normalize edilip  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  yöntemi kullanılarak analiz edildi. Sonuçlarda, miR-548as-3p zamana bağlı olarak ekspresyonu artarken GPC5'in ekspresyonunun azaldığı tespit edildi (Şekil 4-8).

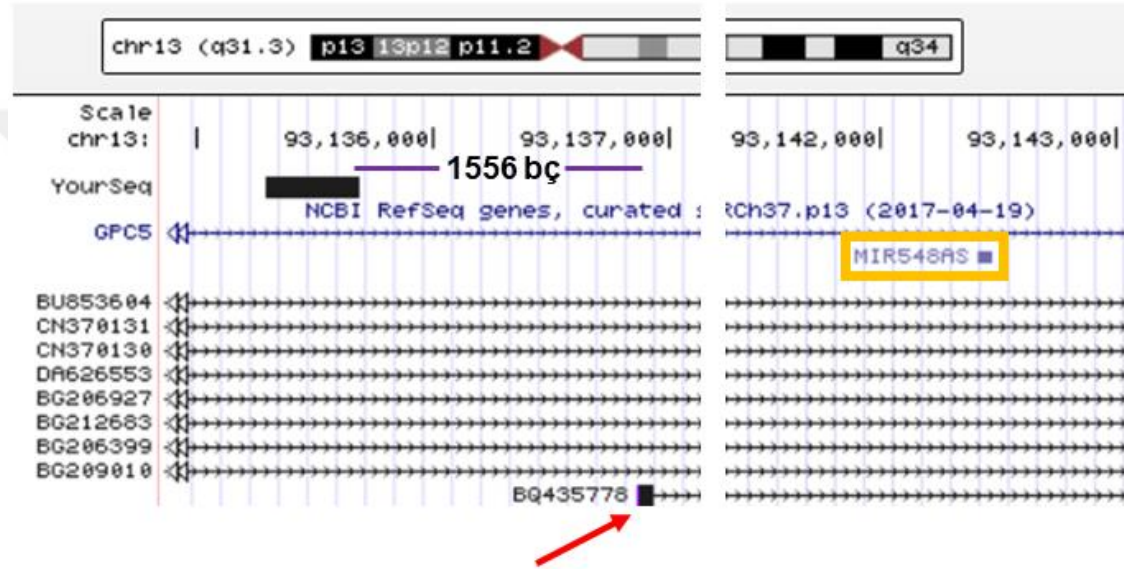


**Şekil 4-8.** miR-548as-3p ve GPC5 geninin TNF- $\alpha$  ile muamele edilen H1299 hücrelerinde zamana bağlı ekspresyon değişimleri.

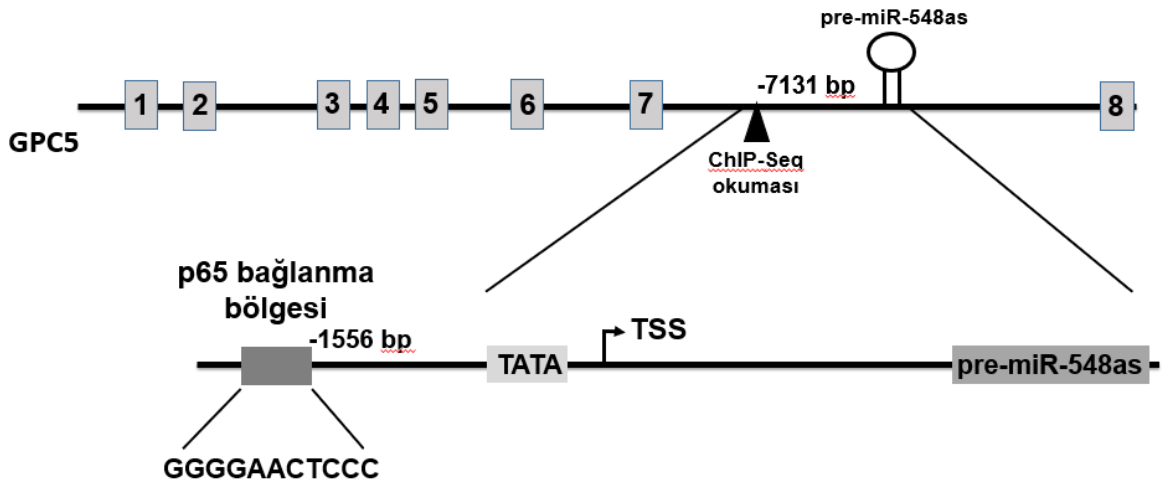
miR-548as-3p'nin konak geni olan GPC5'ten bağımsız bir promotora sahip olduğu tespit ettikten sonra, promotor bölgesini biyoenformatik araçlar kullanarak tahmin etmeyi amaçladık. ChIP-Seq sonucu okunan ve NF- $\kappa$ B bağlanma motifi taşıyan bölgenin pre-miR-548as'ye olan uzaklığı 7131 nükleotittir. pri-miR-548as primer transkriptinin uzunluğu bilinmediği için transkripsiyon başlangıç noktası da (TSS) bilinmemektedir. Dolayısı ile, NF- $\kappa$ B bağlanma motifinin bulunduğu bölgede RNA Polimeraz II promotorlarında bulunan özelliklerin (CpG adaları, transkripsiyon başlangıç noktası (TSS), TATA kutusu, Transkripsiyon bağlanma bölgesi) varlığını araştırmak gerekmektedir. USCS genome



browser (WEB\_12) kullanarak gerçekleştirdiğimiz tahmini promotor bölgesi incelemesinde, ChIP-Seq sonucu okunan bölge ile pre-miR-548as arasında, pre-miR-548as'yi de kapsayan insan genomunda eksprese olan bir 'expressed sequence tags' (EST) olduğunu saptadık (Şekil 4-9). EST'nin başladığı bölge miRNA'nın transkripsiyonunun başlangıç bölgesi olarak ifade edilebilir. EST başlangıcı yani miRNA TSS'i ile ChIP-Seq bölgesindeki NF-κB motifi arasında 1556 baz çifti bulunmaktadır. Ayrıca, NF-κB motifi ve TSS arasında bir TATA kutusu saptadık (Şekil 4-10).



**Şekil 4-9.** ChIP-Seq sonucu okunan bölge (siyah bar), miR-548as'nin lokasyonu (turuncu çerçevesi) ve EST'in başlangıç bölgesinin (kırmızı okun gösterdiği dizi) gösterildiği USCS browser görüntüsü.



**Şekil 4-10.** miR-548as-3p'nin tahmini promotor analizinin şematik gösterimi.

#### 4.7. miR-548as-3p'nin Hedeflerinin Tespit Edilmesi

TNF- $\alpha$  indüklü NF- $\kappa$ B tarafından upregüle olan miR-548as-3p'nin hedef genlerini tespit edebilmek için öncelikle biyoenformatik araçlardan yararlanıldı. Bunun için, mRNA'ların 3'UTR'lerinde miRNA tanıma bölgelerinin olup olmadığını tahmin eden TargetScan, miRWalk, miRTarBase ve miRDB web tabanlı araçlar kullanıldı. Her bir programda miR-548as-3p'nin hedef genlerini tespit ederek tüm programlarda ortak olanlar belirlendi. Analiz sonucunda *PTEN*'in 4 programda da miR-548as-3p'nin tahmini hedefleri arasında olduğu tespit edildi (Şekil 4-11).

ID	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods							Sum	# of papers
					Strong evidence			Less strong evidence					
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC	Other		
MIRT622570	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-548as-3p	<u>PTEN</u>					✓			1	3

Position	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	pCT
Position 163-169 of <u>PTEN</u> 3' UTR	5' ...CCCUAUACAUCCACA-GGGUUUG... 3' UGUUUGAUUAACACCCAAAAU	7mer-m8	-0.04	78	-0.03	0.234	N/A

Region	Binding Type	Transcript position	Score	Conservation
UTR3	6mer	141-146	0.00671983455375518	6
UTR3	7mer	153-169	0.0165283962130124	10

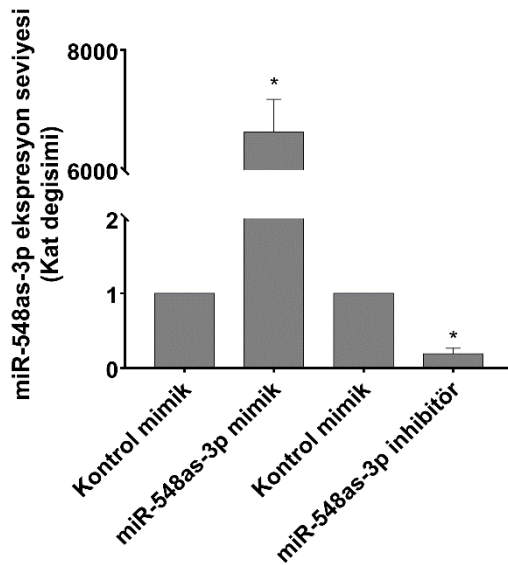
  

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
Details	541	67	hsa-miR-548as-3p	<u>PTEN</u>	phosphatase and tensin homolog

Şekil 4-11. miR-548as-3p'nin hedef gen tahmin sonuçları.

#### 4.7.1. miR-548as-3p'nin PTEN ekspresyonu üzerine etkisi

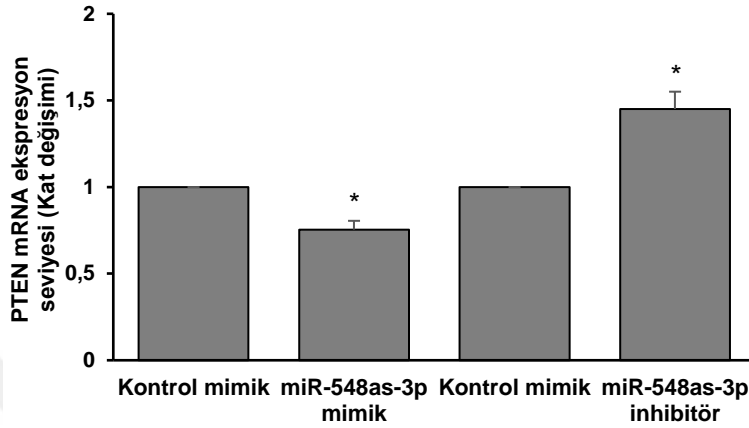
miR-548as-3p'nin tahmini olarak PTEN'i hedef aldığı biyoenformatik araçlar yardımıyla tespit edildikten sonra miR-548as-3p'nin PTEN ekspresyonu üzerine etkisini deneysel olarak araştırmak için real-time PCR ve western blot deneyleri gerçekleştirildi. 12 kuyulu platelere ekilen H1299 hücrelerini 50 nM kontrol mimik, miR-548as-3p mimik ve miR-548as-3p inhibitörü ile transfekte ettikten 24 saat sonra trizol ile toplayarak miRNA'yı içeren toplam RNA'ları izole edildi. İzole edilen örneklerde öncelikle, H1299 hücrelerine transfekte edilen miR-548as-3p mimik ve inhibitörünün, miR-548as-3p'nin ekspresyon seviyesine olan etkisi real-time PCR ile incelendi. Sonuçlar Snord61'e karşı normalize ederek  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  metodu ile kat değişimleri hesaplandı. miR-548as-3p mimik transfekte edilen H1299 hücrelerinde miR-548as-3p'nin ekspresyon seviyesi, kontrol mimik transfekte edilenlere oranla anlamlı olarak yaklaşık 7000 kat arttığı tespit edildi. miR-548as-3p inhibitörü, miR-548as-3p'nin ekspresyon seviyesini anlamlı olarak %80 oranında baskıladığı gözlemlendi (Şekil 4-12).



**Şekil 4-12.** miR-548as-3p mimik ve inhibitör transfekte edilen H1299 hücrelerindeki miR-548as-3p'nin ekspresyon seviyesinin real-time PCR sonucu. \*  $p < 0.05$

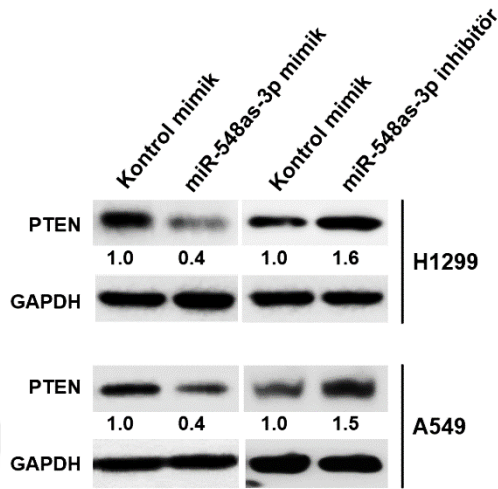
miR-548as-3p mimik ve inhibitörünün etkili bir transfeksiyon verimliliğine sahip olduğu teyit edildikten sonra aynı RNA örneklerinde PTEN ekspresyon seviyesi incelendi. Sonuçlar,  $\beta$ -aktin'e karşı normalize edilip  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  metoduna göre kat değişimleri hesaplandı. miR-548as-3p mimik transfekte edilen H1299 hücrelerinde kontrol mimik transfekte edilenlere oranla PTEN ekspresyonunda anlamlı ölçüde %25'lik bir azalma gözlemlendi. miR-548as-3p'nin

inhibisyonu ile PTEN ekspresyon seviyesinin anlamlı şekilde %50 oranında arttığı tespit edildi (Şekil 4-13).



**Şekil 4-13.** H1299 hücrelerinde miR-548as-3p'nin PTEN ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin real-time PCR sonucu. \*  $p < 0.05$

mRNA düzeyinde elde edilen sonuçlar, miRNA'ların asıl fonksiyonu olan translasyonun inhibisyonundaki etkisini incelemek için protein düzeyindeki ekspresyon değişimleri incelendi. PTEN ekspresyon seviyesi H1299 ve A549 KHDAK hücre hatlarında değerlendirildi. 6 kuyulu platelere ekilen H1299 ve A549 hücrelerine 50 nM kontrol mimik, miR-548as-3p mimik ve miR-548as-3p inhibitör transfekte edildikten 48 saat sonra lizatlar ripa buffer ile toplanarak western blot analizleri yapıldı. PTEN protein ekspresyon seviyeleri GAPDH'inkine normalize edilerek karşılaştırıldı. miR-548as-3p mimik transfekte edilen H1299 ve A549 hücre hatlarında PTEN'in ekspresyon seviyesinin %60 oranında azaldığı gözlemlendi. miR-548as-3p'nin inhibe edildiği H1299 ve A549 hücre hatlarında PTEN proteininin ekspresyon seviyesinin her iki hücre hattından da yaklaşık olarak %60 oranında arttığı gözlemlendi (Şekil 4-14).



**Şekil 4-14.** H1299 ve A549 KHDAK hücrelerinde miR-548as-3p'nin PTEN ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin western blot analizi görüntüsü. Bant yoğunlukları Image Studio Lite Ver 4.0 programıyla ölçüldü. Bant değerleri GAPDH'inkine oranlanarak normalize edildi. Kontrolle oranla kat değişimi değerleri bantların altına eklendi.

#### 4.7.2. PTEN 3'UTR'sinin psiCHECK-2 lusiferaz reporter vektörüne klonlanması

Western blot ve real-time PCR sonuçlarında miR-548as-3p'nin PTEN'i doğrudan hedeflediği tespit edilemeyeceğinden dolayı, miR-548as-3p bağlanma bölgesini taşıyan PTEN'in 3'UTR bölgesinin lusiferaz reporter vektörüne klonlanarak lusiferaz deneylerinin yapılması gerekmektedir. Şekil 4-8'te gösterildiği gibi miR-548as-3p tanıma bölgesinin (7 mer) olduğu 582 nükleotitik PTEN 3'UTR'si psiCHECK-2 lusiferaz vektörüne klonlandı (Şekil 4-15).

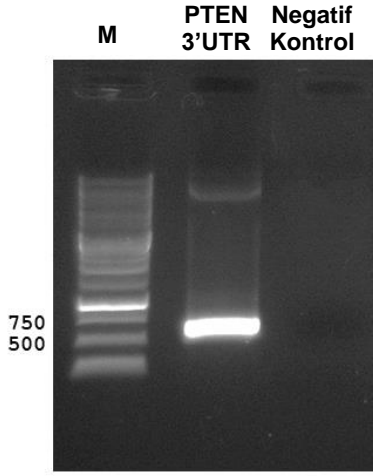
```

ACACCACTGACTCTGATCCAGAGAATGAACCTTTTGATGAAGATCAGCATACACAAATTACAAA
AGTCTGAATTTTTTTTTTATCAAGAGGGATAAAACACCATGAAAATAAACTTGAATAAACTGAAA
ATGGACCTTTTTTTTTTTAATGGCAATAGGACATTGTGTCAGATTACCAGTTATAGGAACAATT
CTCTTTTCCTGACCAATCTTGTTTTACCCTATACATCCACAGGGTTTTGACACTTGTTGTCCAG
TTGAAAAAAGGTTGTGTAGCTGTGTCATGTATATACCTTTTTGTGTCAAAGGACATTTAAAT
TCAATTAGGATTAATAAAGATGGCACTTTCCCGTTTTATTCCAGTTTTATAAAAAGTGGAGACA
GACTGATGTGTATACGTAGGAATTTTTTCCCTTTGTGTTCTGTCACCAACTGAAGTGGCTAAAG
AGCTTTGTGATATACTGGTTCACATCCTACCCCTTGCCTTGTGGCAACAGATAAGTTTGCAG
TTGGCTAAGAGAGGTTTCCGAAGGGTTTTGCTACATTCTAATGCATGTATTCTGGGTTAGGGGAA
TGGAGG

```

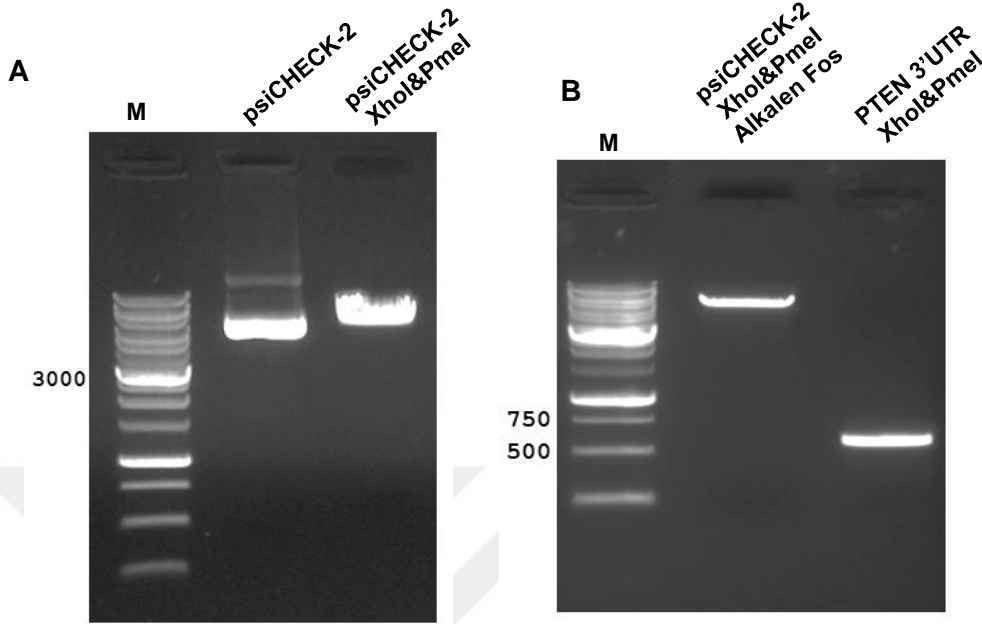
**Şekil 4-15.** miR-548as-3p'nin bağlanma bölgesinin olduğu (italik ve kalın) PTEN 3'UTR'sinin cDNA dizisi.

Klonlanacak olan PTEN 3'UTR bölgesi, XhoI kesim bölgesi taşıyan PTEN 3'UTR ileri klonlama primeri, PmeI kesim bölgesi taşıyan PTEN 3'UTR geri klonlama primeri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4-16).



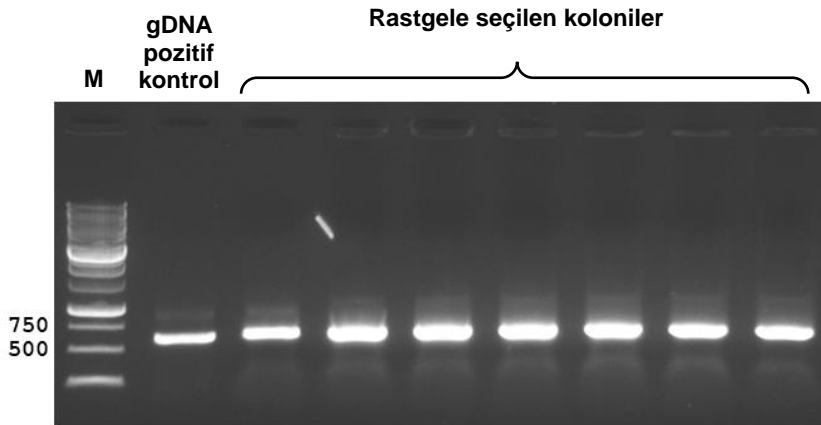
**Şekil 4-16.** H1299 gDNA'sında PCR ile çoğaltılan PTEN 3'UTR bölgesinin %0.8 agaroz jelde görüntüsü. (M: Marker)

psiCHECK-2 vektörü, klonlamak için XhoI ve PmeI enzimleri ile sırasıyla kesildi. psiCHECK-2'nin kesildiğinin teyiti için agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4-17A). Kesilen psiCHECK-2 vektörünün 5' uçlarından fosfatlar Alkalen Fosfataz ile defosforile edilerek ligasyon için hazır hale getirildi. PTEN 3'UTR PCR ürünü saflaştırılarak sırasıyla XhoI ve PmeI enzimleri ile kesilip ligasyona hazır hale getirildi. Hazırlanan psiCHECK-2 vektörü ve PTEN 3'UTR'si ligasyon öncesi konsantrasyon tayini için agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4-17B).



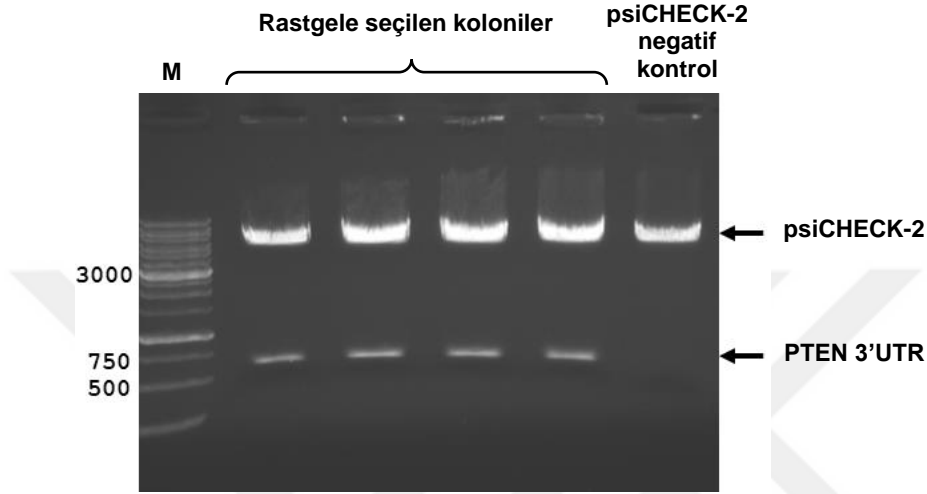
**Şekil 4-17.** Klonlanacak PTEN 3'UTR ve vektörün ligasyon için hazırlığı. Klonlamak için kesilen psiCHECK-2 vektörünün kesim öncesi ve sonrası %0.8 agaroz jel görüntüsü (A). Kesilen psiCHECK-2'nin alkalen fosfataz ile muamelesi sonrası ve PTEN 3'UTR PCR ürününün kesim sonrası konsantrasyon tayinleri için %0.8 agaroz jel görüntüsü (B).

Kesilen psiCHECK-2 ve PTEN 3'UTR'sinin, ligasyonu gerçekleştirildikten sonra ligasyon ürünü *E.coli* 5α kompetent bakterisine transforme edildi ve koloni oluşumu için 100 µg/ml ampisilinli LB agar içeren petri kaplarına ekildi. Petrilerde oluşan kolonilerden PTEN 3'UTR'sinin klonlandığı koloniyi belirleyebilmek için koloni PCR kuruldu ve PCR ürünleri agaroz jelde görüntülendi. Rastgele seçilen 7 koloninin tamamının PCR sonuçlarında amplifikasyon gözlemlendi (Şekil 4-18).



**Şekil 4-18.** Transformasyon sonrası oluşan kolonilerden gerçekleştirilen PCR sonuçlarının %0.8'lik agaroz jel görüntüsü. (M: Marker, gDNA pozitif kontrol: H1299 gDNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu)

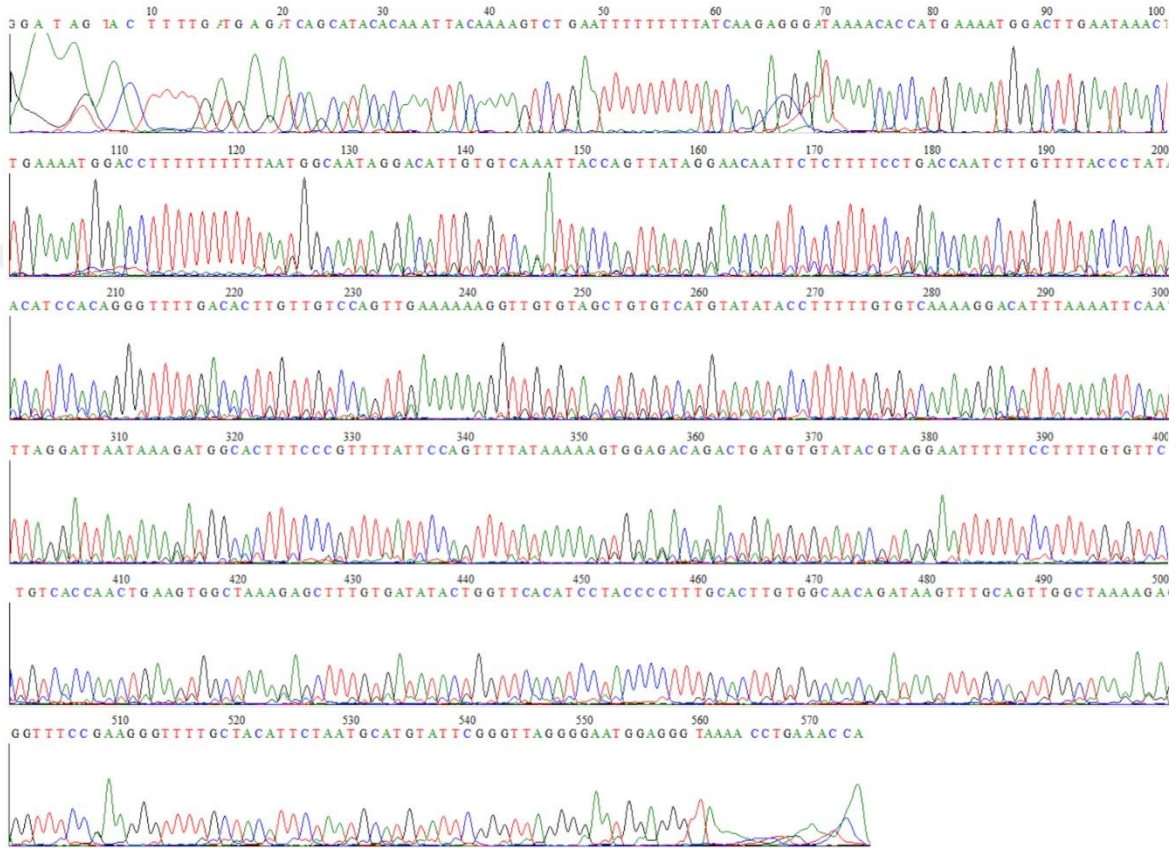
Rastgele seçilen kolonilerin tamamında amplifikasyon gözlemlendi için, sonuçlar teyit edildi. Bunun için, 4 koloniden plazmit izolasyonu yapılarak sırasıyla XhoI ve PmeI restriksiyon enzimleri ile kesilerek kesim sonuçları agaroz jelde görüntülendi. 4 kolonide de kesim sonucu insert olduğu saptandı (Şekil 4-19).



**Şekil 4-19.** Koloni PCR sonucu amplifikasyon olan kolonilerden elde edilen plazmitlerin XhoI ve PmeI ile kesim sonucu %0.8'lik agaroz jel görüntüsü. (M:Marker, psiCHECK-2 negatif kontrol: Boş vektör).



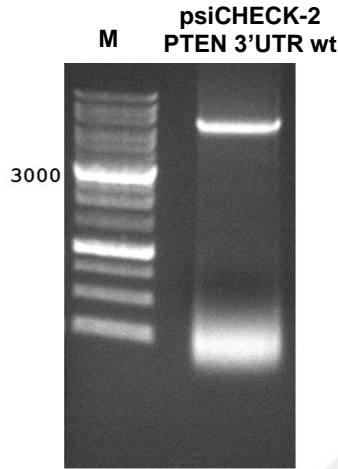
PTEN 3'UTR'sinin psiCHECK-2 lusiferaz vektörüne klonlandığı teyit edildikten sonra klonlanan UTR bölgesinin DNA dizisinin doğruluğunu analiz etmek için, rastgele seçilen plazmitlerden bir tanesinin DNA dizi analizi yapıldı (Şekil 4-20). DNA dizi analizi sonucunda, klonlanan PTEN 3'UTR'sinin yabanıl tip (wt) ile örtüştüğü tespit edildi.



Şekil 4-20. Klonlanan PTEN 3'UTR'sinin DNA dizi analizi sonucu kromatogram görüntüsü.

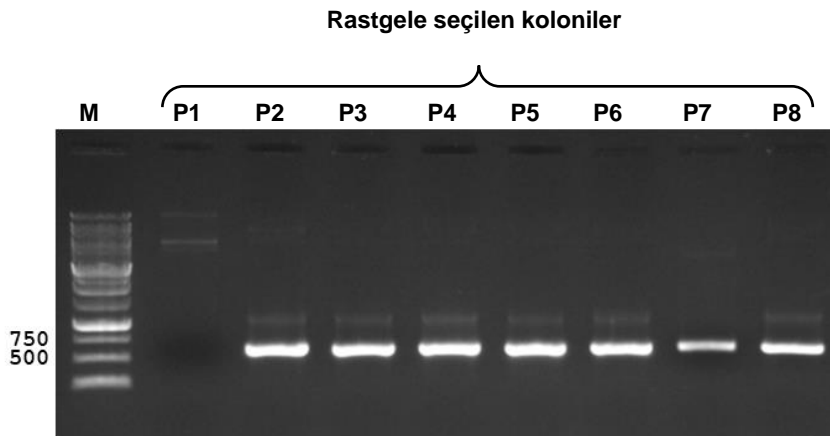
#### 4.7.3. Klonlanan PTEN 3'UTR'nin yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ile mutantının oluşturulması

PTEN 3'UTR'sinin doğru şekilde klonlandığı tespit edildikten sonra miR-548as-3p'nin PTEN 3'UTR'sindeki tahmini tanıma dizisine bağlanıp bağlanmadığının belirlenebilmesi için yönlendirilmiş mutagenез deneyleri yapıldı. PTEN 3'UTR'sinde 7mer'den oluşan miR-548as-3p'nin tahmini tanıma dizisinin (GGGTTTT) tamamı değiştirilerek mutant PTEN 3'UTR'sini taşıyan psiCHECK-2 lusiferaz vektörü oluşturuldu. Öncelikle, PTEN 3'UTR mutant primerleri ile PCR gerçekleştirilerek sonuçlar agaroz jelde görüntüldü (Şekil 4-21).



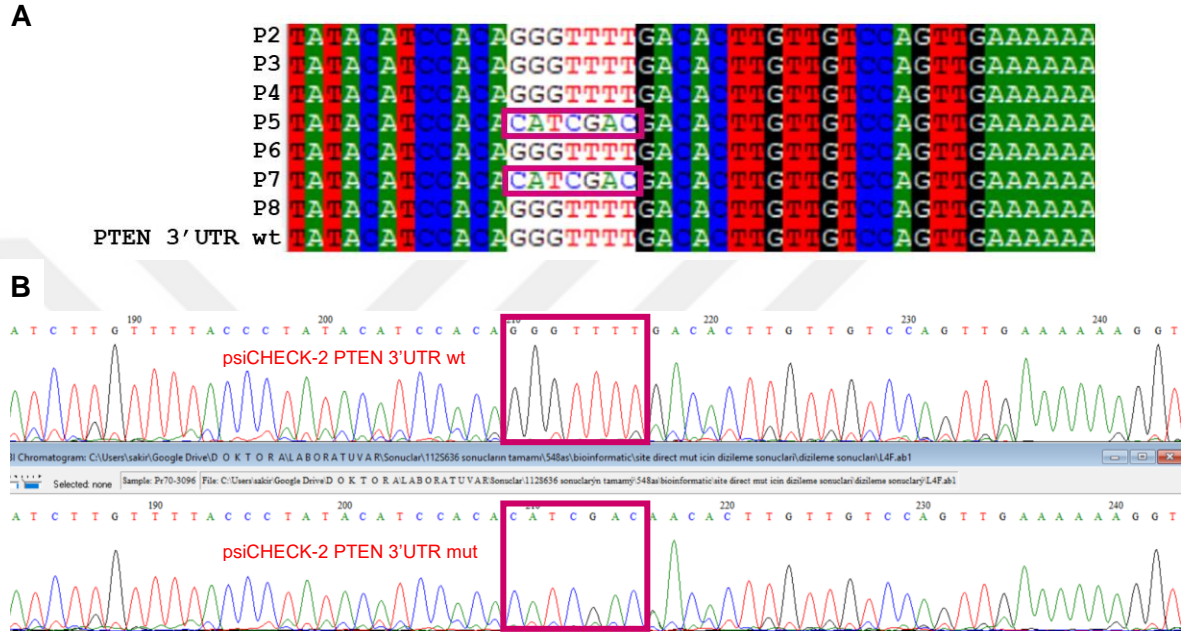
**Şekil 4-21.** PTEN 3'UTR'sinde miR-548as-3p'nin tanıma bölgesinde oluşturulacak mutasyon için mutant primerler kullanılarak yapılan PCR'ın %0.8'lik agaroz jel görüntüsü. (M: Marker, psiCHECK-2 PTEN 3'UTR wt: PTEN 3'UTR'sinin klonlandığı psiCHECK-2 lusiferaz vektörü kalıp olarak kullanılan PCR sonucu)

Mutant PTEN 3'UTR primerleri ile çoğaltılan PCR ürünü saflaştırılarak T4 DNA ligaz ile muamele edildikten sonra *E.coli* 5α kompotent bakterisine transforme edildi ve koloni oluşumu için 100 µg/ml ampisilinli LB agar içeren petri kaplarına ekildi. Oluşan kolonilerden rastgele 8 tane seçilerek klonlama primerleri ile koloni PCR yapıldı ve sonuçlar agaroz jelde görüntülendi. 8 koloniden 7 tanesinde çoğalma gözlemlendi (Şekil 4-22).



**Şekil 4-22.** Mutant PTEN 3'UTR'si için yapılan yönlendirilmiş mutagenез sonucunda oluşan kolonilerden gerçekleştirilen koloni PCR sonuçlarının %0.8'lik agaroz jelde görüntüsü. (M: Marker)

PCR sonucu çoğalma görülen 7 koloninin hangisinde mutasyonun oluştuğunun tespiti için DNA dizi analizi yapıldı. DNA dizi analizleri sonucunda, gönderilen 7 vektörün 2 tanesinde istenilen mutasyonun oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4-23).

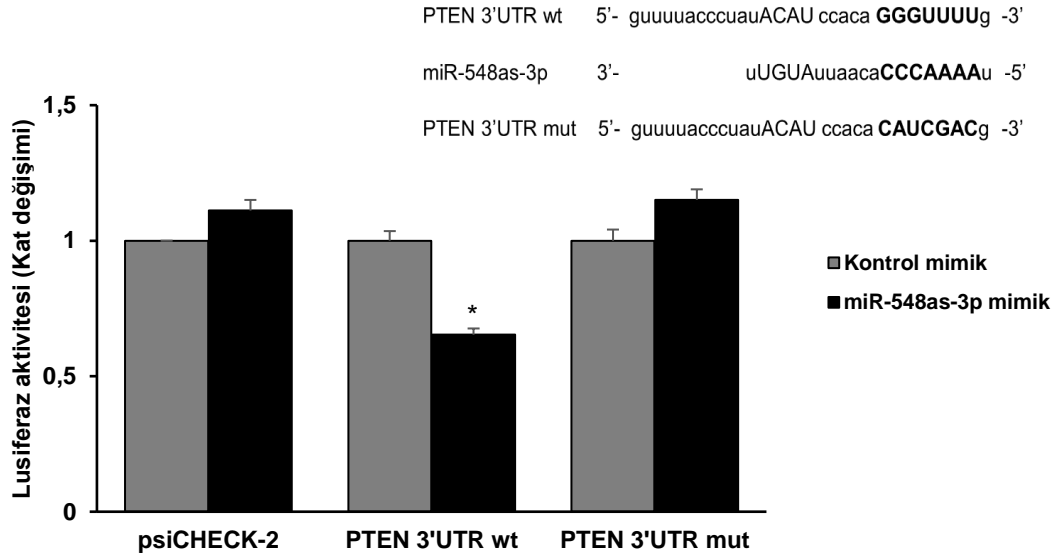


**Şekil 4-23.** PTEN 3'UTR'sinde miR-548as-3p tanıma bölgesinde oluşturulan mutasyonun DNA dizi analizi sonucu. Yönlendirilmiş mutagenез sonucu seçilen 7 koloniden elde edilen plazmitlerin DNA dizi analizi sonuçlarının PTEN 3'UTR wt DNA dizisi ile karşılaştırılması (A). Mutasyonun oluştuğu psiCHECK-2 PTEN 3'UTR mutant vektör ile psiCHECK-2 PTEN 3'UTR wild tip vektörün DNA dizilerinin kromatogram görüntüsü (B).

#### 4.7.4. miR-548as-3p'nin lusiferaz aktivitesine olan etkisi

miR-548as-3p'nin PTEN'i doğrudan hedeflediğini tespit edebilmek için gerçekleştirilen lusiferaz deneylerinde transfeksiyon verimliliği yüksek olan insan embriyonik böbrek hücre hattı HEK293T kullanıldı. 96 kuyulu plakelere ekilen HEK293T hücreleri 100 ng psiCHECK-2 (boş vektör), psiCHECK-2 PTEN 3'UTR wt ve psiCHECK-2 PTEN 3'UTR mut vektörleri ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra her bir vektör ile transfekte edilen hücreler ayrı ayrı 50 nM kontrol mimik ve miR-548as-3p mimik ile transfekte edildi. 48 saat sonra hücreler pasive lizis buffer ile toplanarak lusiferaz aktiviteleri ölçüldü. Normalizatör olarak *firefly* lusiferaz kullanıldı ve kontrole oranla kat değişimleri hesaplandı. miR-548as-3p mimik, kontrol mimike oranla yalnızca psiCHECK-2 PTEN 3'UTR wt transfekte edilen hücrelerde lusiferaz aktivitesini anlamlı olarak %35 oranında düşürdüğü gözlemlendi. psiCHECK-2 PTEN

3'UTR mut vektörde gerçekleştirilen mutasyon sonucunda lusiferaz aktivitesinde anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 4-24). psiCHECK-2 PTEN 3'UTR wt vektörün transfekte edildiği hücrelerde miR-548as-3p mimik lusiferaz aktivitesini azaltırken, psiCHECK-2 PTEN 3'UTR mut vektörün transfekte edildiği hücrelerde kayda değer bir lusiferaz aktivitesi değişiminin olmaması, iki vektör arasındaki fark olan mutant diziden kaynaklanmaktadır. Bu sonuç, miR-548as-3p'nin PTEN 3'UTR'sindeki tanıma dizisine bağlanarak PTEN ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir.

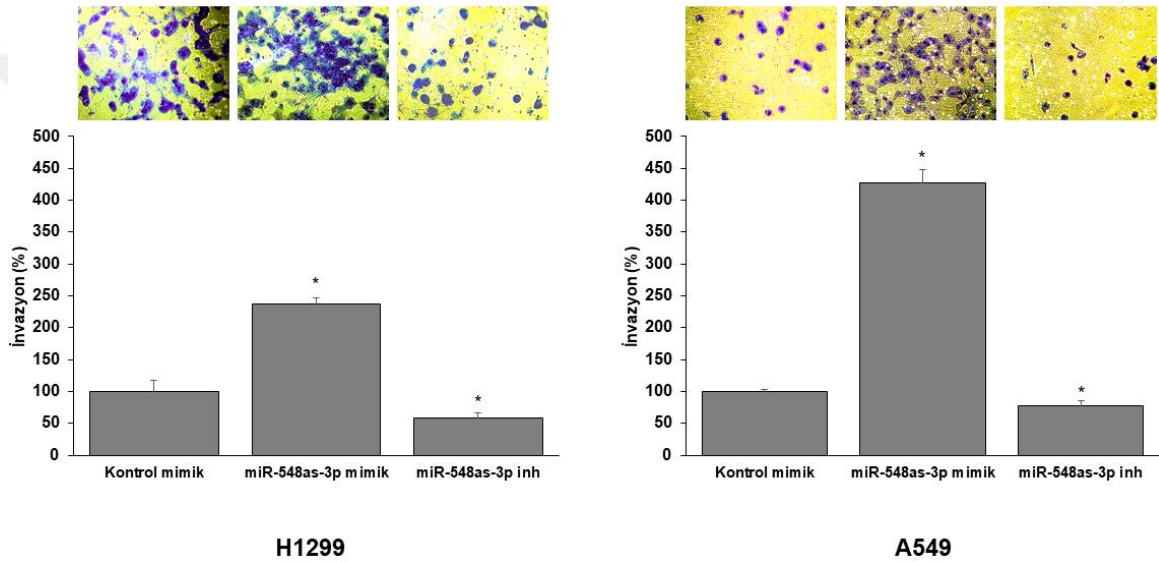


**Şekil 4-24.** miR-548as-3p'nin lusiferaz aktivitesi üzerine etkisi. psiCHECK-2 (boş vektör), psiCHECK-2 PTEN 3'UTR wt ve psiCHECK-2 PTEN 3'UTR mut vektör transfekte edilen her hücreye ayrı ayrı kontrol mimik ve miR-548as-3p mimik transfekte edilerek lusiferaz aktiviteleri ölçüldü. \*  $p < 0.05$

#### 4.8. miR-548as-3p'nin H1299 ve A549 KHDAK Hücrelerinin İnvazyonu Üzerine Olan Etkisi

miR-548as-3p'nin doğrudan PTEN'i hedefleyerek ekspresyonunu baskıladığı tespit edildikten sonra KHDAK hücrelerinin invazyonu üzerine etkileri incelendi. Bunun için H1299 ve A549 hücreleri kullanılarak transwell invazyon deneyleri gerçekleştirildi. 6 kuyulu platelere ekilen H1299 ve A549 hücre hatlarının her birine ayrı ayrı 50 nM kontrol mimik, miR-548as-3p mimik ve miR-548as-3p inhibitörü transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler tripsin edilerek sayıldı ve transwell deneyi için kullanılan odacıklara ekildi. Ekimden 22 saat sonra odacığın içinde kalan hücreler temizlendi ve geçen hücreler metanol ile fikse edilerek toluidine mavisi (%1) ile boyandı. Boyanan hücrelerin olduğu 5 bağımsız alan mikroskopta fotoğraflanarak her bir alandaki hücreler sayıldı. Sayılan hücreler kontrole göre oranlanarak yüzde değişim değerleri hesaplandı. H1299 hücreleriyle yapılan invazyon

sonuçlarında miR-548as-3p mimik transfekte edilen hücrelerde kontrol mimik transfekte edilenlere oranla yaklaşık olarak 2.5 kat anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. miR-548as-3p inhibitör transfekte edilen hücrelerde ise hücrelerin invazyon kapasitesi anlamlı olarak %50 oranında azaldığı tespit edildi. miR-548as-3p'nin A549 hücrelerinin invazyonuna etkisi ise; miR-548as-3p inhibitörü ile transfekte edilen hücrelerin kontrole oranla hücresel invazyonu %20 oranında azalttığı gözlenirken, miR-548as-3p mimikin kontrole oranla hücresel invazyonu anlamlı derecede yaklaşık 4 kat arttırdığı gözlemlendi (Şekil 4-25).

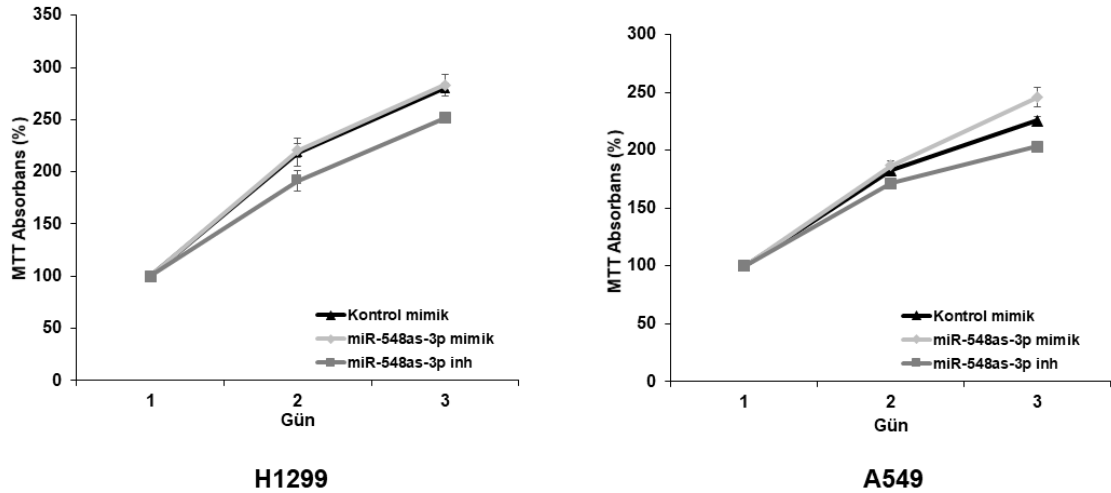


**Şekil 4-25.** miR-548as-3p'nin H1299 ve A549 KHDAC hücrelerinin invazyonu üzerine etkisi. \*p<0.05

#### 4.9. miR-548as-3p'nin H1299 ve A549 KHDAC Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Olan Etkisi

miR-548as-3p'nin, PTEN'in ekspresyonunu baskılayarak invazyonu arttırdığı tespit edildikten sonra, H1299 ve A549 hücrelerinde, proliferasyon üzerine etkileri incelendi. 96 kuyulu platelere ekilen H1299 ve A549 hücrelerinin herbirine, ayrı ayrı 50 nM kontrol mimik, miR-548as-3p mimik ve miR-548as-3p inhibitör transfekte edildi. Transfeksiyon aşaması 0. saat kabul edildi ve transfeksiyondan sonra 24. ve 48. saatte MTT kullanılarak hücre canlılığı ölçüldü. Hücre canlılıkları 0. saate göre oranlandı ve analizi yapıldı. H1299 hücrelerinde, miR-548as-3p mimik transfeksiyonu sonucu kontrole oranla herhangi bir değişim gözlenmezken, miR-548as-3p inhibitör transfekte edilen hücrelerde kontrole oranla hücre canlılığında %10 oranında azalma gözlemlendi. A549 hücrelerinde, miR-548as-3p mimik

transfeksiyonu sonucu hücre canlılığı %20 oranında artarken, miR-548as-3p inhibitör transfeksiyonu sonucu hücre canlılığının yaklaşık %10 azaldığı saptandı (Şekil 4-26).



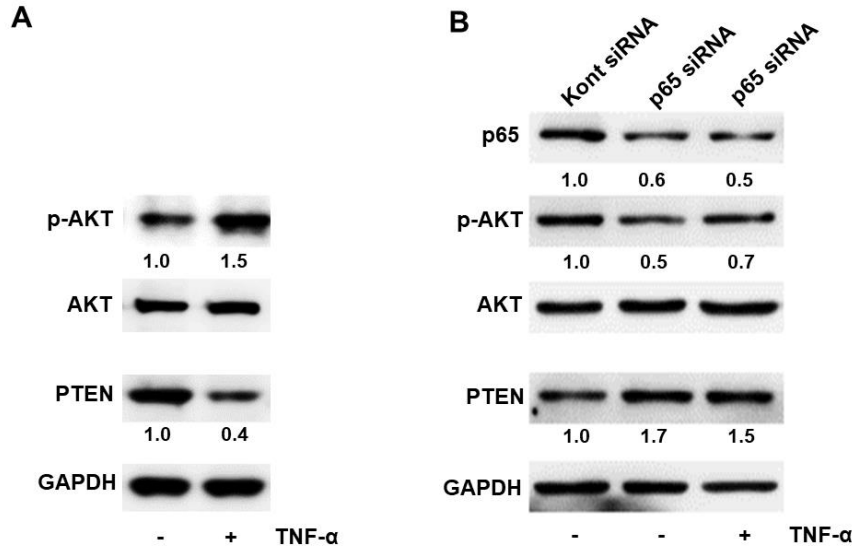
Şekil 4-26. miR-548as-3p'nin H1299 ve A549 KHDAK hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.

#### 4.10. miR-548as-3p'nin KHDAK invazyon mekanizmasındaki rolü

##### 4.10.1. NF-κB'nin PTEN ekspresyonuna etkisi

TNF-α indüklü NF-κB aktivasyonu ile upregüle olan miR-548as-3p'nin PTEN'i hedef alması ile; TNF-α indüklü NF-κB'nin, PTEN downregülasyonunu postranskripsiyonel seviyede miR-548as-3p aracılığıyla gerçekleştiriyor olduğunu ve PTEN'in downregüle olmasıyla PI3K/AKT yolağının aktivasyonunu sağladığını öngördük. Bunun için öncelikle, NF-κB'nin PTEN ekspresyonu üzerindeki etkisi incelendi. 6 kuyulu platelerde kültüre edilen H1299 hücreleri 24 saat serum açlığına maruz bırakılarak 30 ng/ml TNF-α ile muamele edildi. 24 saat sonra protein lizatları ripa buffer ile toplanarak western blot deneyi gerçekleştirildi. TNF-α muamelesi sonucu PTEN ekspresyonunun %60 oranında azaldığı, AKT'nin aktivasyonunun 2 kat arttığı tespit edildi (Şekil 4-27A). TNF-α'nın p65'i aktive ettiği daha önceki sonuçlarda gösterilmişti. TNF-α'nın PTEN ekspresyonuna olan etkisinin p65 tarafından gerçekleştiriliyor olduğunu tespit edebilmek için, 6 kuyulu platalere ekilen H1299 hücreleri kontrol siRNA ve p65 siRNA ile ayrı ayrı transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra, hücreler 24 saat boyunca serumsuz besiyerinde kültüre edildi. p65 siRNA ile transfekte edilen gruptan biri 30 ng/ml TNF-α ile muamele edildikten 24 saat sonra hücreler ripa buffer ile toplanarak western blot deneyi gerçekleştirildi. Öncelikle, p65

siRNA'nın p65'i downregüle ettiği tespit edildikten sonra PTEN ve p-AKT ekspresyon seviyesi incelendi. p65 siRNA'nın, p65 ekspresyonunu her iki grupta da yarı yarıya düşürdüğü saptanmıştır. p65'in ekspresyonunun düşmesiyle kontrole oranla PTEN ekspresyon seviyesinin 1.7 kat arttığı, TNF- $\alpha$  varlığında bu artışın 1.5 kat olduğu belirlendi. Hücrelerdeki PTEN ekspresyon seviyesi artarken, her iki grupta da p-AKT'nin ekspresyon seviyesinin %50 oranında düştüğü tespit edildi (Şekil 4-27B). Böylece, TNF- $\alpha$  indüklü NF- $\kappa$ B'nin PTEN'i downregüle ederek, PI3K/AKT yolağını aktive ettiği tespit edilmiş oldu.

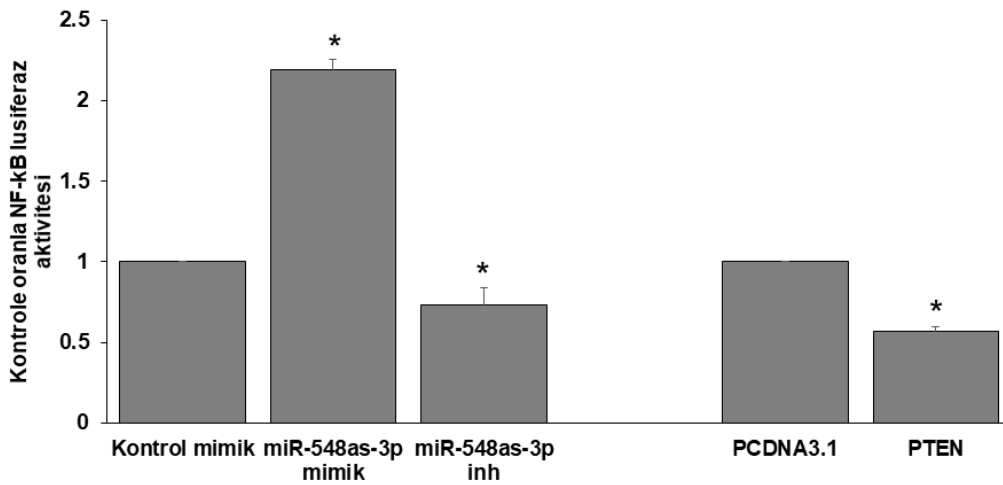


**Şekil 4-27.** NF- $\kappa$ B aktivasyonu (A) ve downregülasyonu (B) sonucunda, AKT aktivasyonu ve PTEN ekspresyonu üzerine etkisinin western blot görüntüsü. Bant yoğunlukları Image Studio Lite Ver 4.0 programıyla ölçüldü. p-AKT değeri, AKT'ninkine oranlanarak PTEN ve p65 değerleri, GAPDH'inkine oranlanarak normalize edildi. Kontrole oranla kat değişimi değerleri bantların altına eklendi.

#### 4.10.2. miR-548as-3p'nin NF- $\kappa$ B aktivasyonuna etkisi

TNF- $\alpha$  indüklü NF- $\kappa$ B'nin, miR-548as-3p aracılığıyla PTEN'in downregüle ederek PI3K/AKT yolağını aktive ettiği tespit edilmiştik. Bu sonuçlar doğrultusunda NF- $\kappa$ B, miR-548as-3p aracılığıyla PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının sürekli aktivasyonunu sağlayarak *positive feedback loop* oluşturduğunu öngördük. miR-548as-3p'nin PTEN'i downregüle ederek AKT'yi aktive ettiğini göstermiştik. Hipotezimizde kalan parça olan; miR-548as-3p'nin NF- $\kappa$ B aktivasyonuna olan etkisini lusiferaz deneyleri ile inceledik. Bunun için, miR-548as-3p mimik ve inhibitörü transfekte edilen hücrelerde ve PTEN'in overeksprese edildiği hücrelerdeki NF- $\kappa$ B lusiferaz aktivitesini ölçtük. 96 kuyulu platelere ekilen H1299 hücrelerine 100 ng pGL3-NF- $\kappa$ B-promoter-Luc vektörü, normalizatör olarak kullanmak için 10 ng pRL-*Renilla* vektörü

ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra her bir hücreye ayrı ayrı 50 nM kontrol mimik, miR-548as-3p mimik ve inhibitörü, 100 ng pcDNA3.1 boş vektör ve PTEN overekspresyon vektörü transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra lusiferaz aktiviteleri ölçülerek değerler normalize edildi. miR-548as-3p mimik transfekte edilen hücrelerde kontrole oranla NF- $\kappa$ B lusiferaz aktivitesinin anlamlı şekilde 2 kat arttığı tespit edildi ( $P<0.05$ ). miR-548as-3p inhibitör transfekte edilen hücrelerde NF- $\kappa$ B lusiferaz aktivitesinin anlamlı şekilde yaklaşık %25 oranında azaldığı tespit edildi. PTEN'i overeksprese ettiğimiz hücrelerde boş vektör transfekte edilenlere oranla lusiferaz aktivitesinde, miR-548as-3p inhibitör transfekte edilenlerle paralel olarak, anlamlı şekilde %50 oranında azalma gözlemlendi ( $P<0.05$ ) (Şekil 4-28). NF- $\kappa$ B'nin miR-548as-3p aracılığıyla PTEN downregülasyonu ile *positive feedback loop* oluşturarak tekrar aktivasyonunu sağladığını göstermiş olduk.



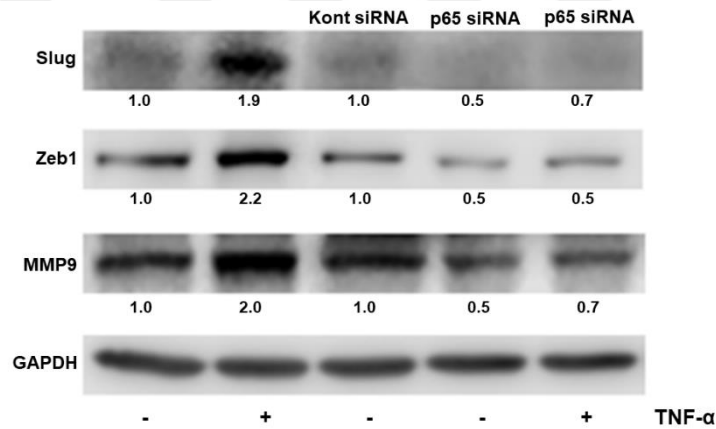
Şekil 4-28. miR-548as-3p mimik ve inhibitörün NF- $\kappa$ B lusiferaz aktivitesi üzerine etkisi. \* $p<0.05$

#### 4.10.3. miR-548as-3p'nin EMT mekanizmasına etkisi

miR-548as-3p'nin PTEN'i hedef alarak PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının sürekli aktivasyonuna katkı sağladığını belirledikten sonra invazyonu indüklediği sonuçlarından yola çıkarak mekanizmadaki rolünü tespit etmeyi amaçladık. Bunun için, NF- $\kappa$ B tarafından düzenlendiği bilinen ve invazyonun başlangıç aşaması olan EMT'de rol oynayan marker genlerinin ekspresyon seviyeleri, NF- $\kappa$ B'yi aktive ederek ve inhibe ederek incelendi. 6 kuyulu platelere ekilen H1299 hücreleri 24 saat serum açlığına maruz bırakıldı ve 30 ng/ml TNF- $\alpha$  ile 24 saat muamele edildikten sonra hücreler ripa buffer ile toplandı. Bir diğer grup için,



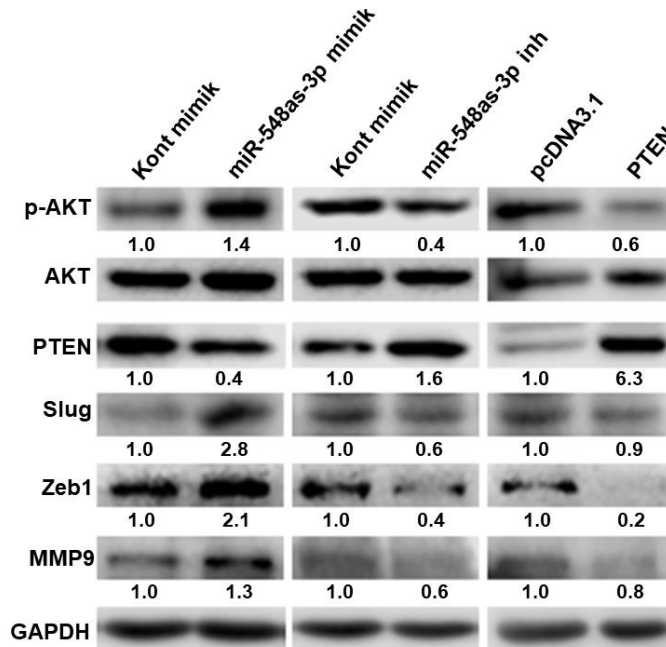
ekilen hücrelere kontrol siRNA ve p65 siRNA ayrı ayrı transfekte edildikten 24 saat sonra 24 saatlik serum açlığına maruz bırakılarak p65 siRNA transfekte edilen grup 30 ng/ml TNF- $\alpha$  ile muamele edildi. 24 saat sonra ripa buffer ile hücreler toplanarak western blot deneyi gerçekleştirildi. NF- $\kappa$ B'yi aktive etmek için TNF- $\alpha$  uygulanan hücrelerde beklendiği gibi Slug, Zeb1 ve MMP9'un ekspresyon seviyelerinin kontrole oranla yaklaşık 2 kat arttığı tespit edildi. p65 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde kontrol siRNA transfekte edilenlere oranla Slug, Zeb1 ve MMP9'un ekspresyon seviyelerinin %50 oranında azaldığı tespit edildi. Slug, Zeb1 ve MMP9'un ekspresyon seviyelerinin p65 siRNA ile baskılanması sonucunda TNF- $\alpha$  muamelesi sonrasında da kayda değer bir değişim gözlenmedi (Şekil 4-29). Böylece TNF- $\alpha$  ile muamele edilen H1299 hücrelerinin Slug, Zeb1 ve MMP9'un NF- $\kappa$ B aracılığıyla indüklendiği saptandı.



**Şekil 4-29.** NF- $\kappa$ B'nin Slug, Zeb1 ve MMP9 ekspresyon seviyeleri üzerine etkisinin western blot görüntüsü. Bant yoğunlukları Image Studio Lite Ver 4.0 programıyla ölçüldü. Bant değerleri GAPDH'inkine oranlanarak normalize edildi. Kontrole oranla kat değişimi değerleri bantların altına eklendi.

PTEN'i hedefleyerek NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonunu sağlayan miR-548as-3p'nin, NF- $\kappa$ B tarafından indüklenen Slug, Zeb1 ve MMP9'un ekspresyonlarına olan etkisini araştırdık. Bunun için, 6 kuyulu platelere ekilen H1299 hücrelerine 50 nM kontrol mimik, miR-548as-3p mimik, miR-548as-3p inhibitör, 2500 ng pcDNA3.1 boş vektör ve PTEN over ekspresyon vektörü transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler ripa buffer ile toplanarak western blot deneyleri gerçekleştirildi. Deney sonucunda, miR-548as-3p mimik transfekte edilen hücrelerde kontrole oranla PTEN ekspresyon seviyesi %50 azalırken AKT aktivitesinin 1.4 kat arttığı tespit edildi. Buna bağlı olarak miR-548as-3p mimik, Slug'un ekspresyon seviyesini 2.8 kat, Zeb1 ekspresyon seviyesini 2.1 kat ve MMP9 ekspresyon seviyesini ise 1.3 kat arttırdığı tespit edildi. miR-548as-3p inhibitör transfekte edilen hücrelerde kontrole oranla PTEN ekspresyon seviyesi 1.6 kat arttığı ve bununla birlikte AKT

aktivitesinin %50'den fazla azaldığı tespit edildi. miR-548as-3p'nin inhibisyonu sonucu Slug ekspresyon seviyesinin %40, Zeb1 ekspresyon seviyesinin %60 ve MMP9 ekspresyon seviyesinin %40 azaldığı tespit edildi. PTEN'in over ekprese edildiği grupta ise miR-548as-3p'nin inhibe edildiği gruba paralel sonuçlar elde edildi. PTEN ekspresyon seviyesinin artışı ile AKT aktivasyonunun azaldığı ve buna bağlı olarak Slug ekspresyon seviyesinin %10, Zeb1 ekspresyon seviyesinin %80 ve MMP9 ekspresyon seviyesinin %20 azaldığı tespit edildi (Şekil 4-30). Bu bağlamda miR-548as-3p'nin, PTEN'i hedefleyerek NF- $\kappa$ B'nin sürekli aktivasyonuna neden olarak EMT sürecinde görevli olan Slug, Zeb1 ve MMP9'u indükleyip KHDAK invazyon mekanizmasında rol oynadığı tespit edildi.

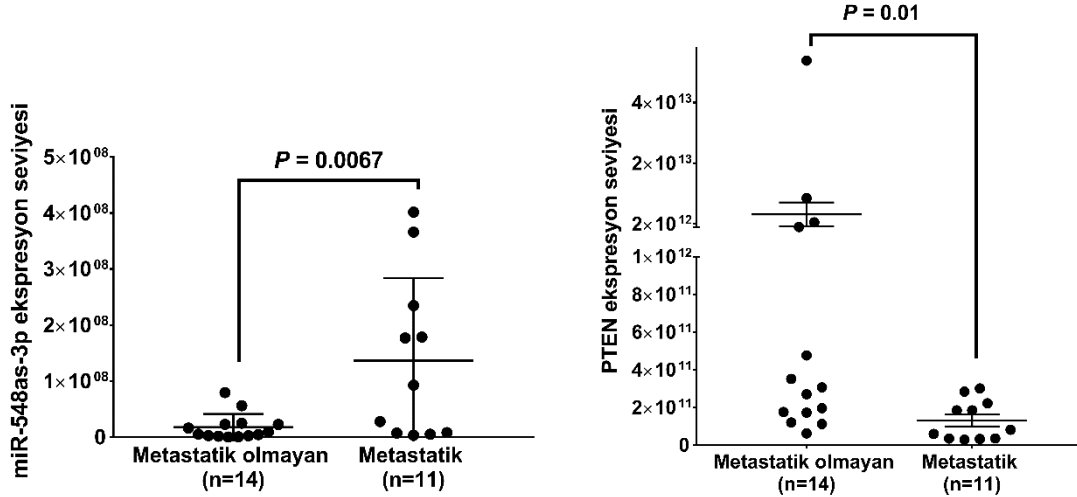


**Şekil 4-30.** miR-548-3p'nin Slug, Zeb1 ve MMP9 ekspresyon seviyelerine etkisinin western blot görüntüsü. Bant yoğunlukları Image Studio Lite Ver 4.0 programıyla ölçüldü. p-AKT'nin bant değerleri AKT ile oranlanarak normalize edildi. Diğer genlerin bant değerleri GAPDH'inkine oranlanarak normalize edildi. Kontrolle oranla kat değişimi değerleri bantların altına eklendi.

#### 4.11. miR-548as-3p ve PTEN'nin KHDAK Hastalarının Tümör Dokularındaki Ekspresyon Seviyeleri

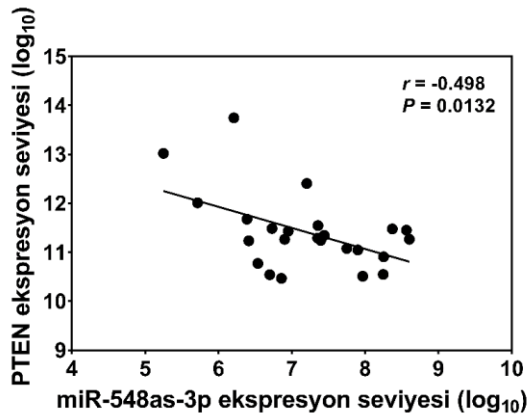
KHDAK hücre hatlarının invazyonunu indüklediği tespit edilen miR-548as-3p'nin klinik olarak anlamlılığı araştırıldı. Bunun için, miR-548as-3p ve hedef geni PTEN'in ekspresyon seviyeleri, metastatik tanı almamış olan KHDAK hastalarının parafine gömülü primer tümör dokusundan ve metastatik tanı almış olan KHDAK hastasının parafine gömülü primer tümör dokusundan elde edilen RNA örneklerinden real-time PCR yöntemi ile belirlendi. Metastatik tanı almış olan hastalarda (n=11), metastatik tanı almamış olan hastalara (n=14) göre miR-

548as-3p'nin ekspresyon seviyesinin anlamlı ölçüde fazla olduğu tespit edildi ( $P=0.0067$ ) (Şekil 4-31). Aynı tümör doku örneklerindeki PTEN ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında metastatik tanı almış olan hastalarda, metastatik tanı almamış olanlara göre anlamlı derecede düşük seviyede ekspresyona olduğu tespit edildi ( $P=0.01$ ) (Şekil 4-31).



**Şekil 4-31.** KHDAC hastalarının parafine gömülü primer tümör dokularında miR-548as-3p ve PTEN'nin ekspresyon seviyelerinin real time PCR sonucu. miR-548as-3p için normalizatör olarak Snord61, PTEN için  $\beta$ -aktin kullanıldı.

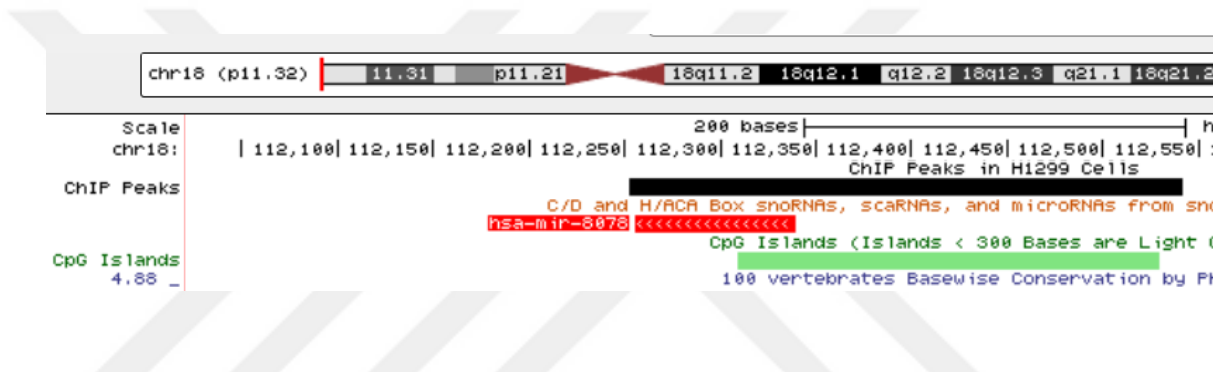
miR-548as-3p'nin ekspresyon seviyesinin metastatik tanı almış olan hastalarda yüksek, PTEN'in ekspresyon seviyesinin düşük olarak tespit edilmesinin ardından aynı hasta dokusunda miR-548as-3p ve PTEN genleri arasında negatif korelasyon olup olmadığı araştırıldı. Metastatik tanı almış ve almamış olan aynı hastalardaki (25 adet) miR-548as-3p ve PTEN ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı ve anlamlı şekilde ( $P=0.0132$ ) ikisi arasında negatif bir korelasyon olduğu tespit edildi (Şekil 4-32).



**Şekil 4-32.** KHDAC hastalarının tümör dokularında miR-548as-3p ve PTEN arasındaki korelasyon grafiği. miR-548as-3p ve PTEN ekspresyon seviyeleri değerlerinin logaritmaları alınarak karşılaştırılma yapıldı.

#### 4.12. miR-8078'in Promotor Analizi

miR-8078 intergenik bir miRNA olduğundan kendine özgü promotora sahiptir. Promotor bölgesinin, ChIP-Seq sonucu okunan bölge ile ilişkisi olup olmadığını araştırmak için, ChIP-Seq sonucu okunan bölge ve pre-miR-8078'in bulunduğu lokasyonu birlikte USCS genome browser kullanarak görüntüldü. ChIP-Seq sonucu okunan bölge pre-miR-8078'yi kapsamakla birlikte 5' tarafında yer almaktaydı. Yine 5' tarafında yüksek skorda 220 bazdan oluşan CpG adaları olduğu tespit edildi (Şekil 4-33). CpG adalarının yer alması bu bölgenin miR-8078'in promotor bölgesi olabileceği ihtimalini arttırmaktadır.



**Şekil 4-33.** ChIP-Seq sonucu okunan bölge (siyah bar), pre-miR-8078'in lokasyonu (kırmızı bar) ve CpG adalarının (yeşil bar) gösterildiği USCS browser görüntüsü.

#### 4.13. miR-8078'in Hedeflerinin Tespit Edilmesi

TNF- $\alpha$  indüklemesiyle NF- $\kappa$ B aktivasyonu sonucunda transkripsiyonunun indüklendiği tespit edilen miRNA'lardan miR-8078'in hedef genlerini tespit edebilmek için miRNA-hedef gen tahmin araçları TargetScan, miRWalk, miRTarBase ve miRDB kullanıldı. Her bir programda miR-8078'in hedefleri tespit edildi ve tüm programlarda ortak olan hedef genler belirlendi. Analiz sonucunda *GREB1*'in 4 programda da miR-8078'in tahmini hedefleri arasında olduğu saptandı (Şekil 4-34).

ID	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods							Sum	# of papers	miRTarBase
					Strong evidence			Less strong evidence						
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC	Other			
MIRT537032	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-8078	GREB1					✓			1	1	

Position	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P <sub>CT</sub>	TargetScan
1999-2006 of GREB1 3' UTR	5' ...UUCUUACACAUUCCUAGACA...                      hsa-miR-8078 3' CUCAGAGAGUGGCC--GGAUCUGG	8mer	-0.29	95	-0.25	0.609	N/A	

Gene details	miRNA details	pubMed links	UCSC graphic	Region	Binding Type	Transcript position	Score	Conservation	miRWalk
110	ENSG00000196208 (GREB1)	hsa-miR-8078	0.737671674230083	UTR3	6mer	815-833	0.0030552777835931	3	
				UTR3	7mer	1983-2004	0.0245485417492445	2	
Position on chromosome: 2:11782564-11782585									
Conserved species: panTro2,rheMac2									
(Transcript)5' AAUGCA ACAUCAU A3'									
Binding area:									
(miRNA) 3' A GCCC GGAUCUG 5'									

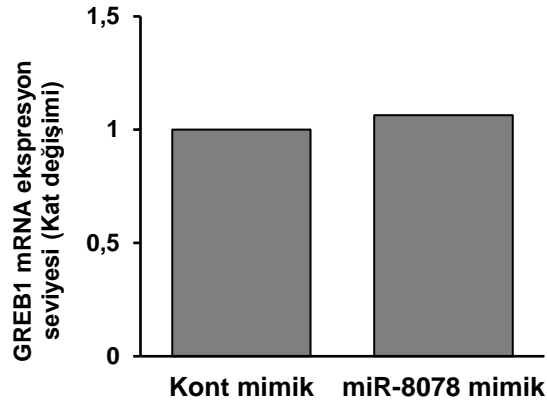
  

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description	miRDB
Details	3	93	hsa-miR-8078	GREB1	growth regulating estrogen receptor binding 1	

Şekil 4-34. miR-8078'in hedef gen tahmin sonuçları.

#### 4.13.1. miR-8078'in GREB1 ekspresyonu üzerine etkisi

miR-8078'in tahmini olarak GREB1'i hedef aldığı biyoenformatik araçlar yardımıyla tespit edildikten sonra miR-8078'in GREB1 ekspresyon seviyesi üzerine etkisini deneysel olarak araştırmak için real-time PCR deneyleri gerçekleştirildi. 12 kuyulu plâtelere kültüre edilen H1299 hücreleri 50 nM kontrol mimik ve miR-8078 mimik ile transfekte edildikten 24 saat sonra hücreler trizol ile toplanarak toplam RNA'ları izole edildi. Her iki grupta da real-time PCR ile GREB1 ekspresyon seviyeleri araştırıldı. Sonuçlar,  $\beta$ -aktin ile normalize edilerek  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  metoduna göre kat değişimleri hesaplandı. Deney sonucunda, miR-8078 mimik transfekte edilen grup ile kontrol mimik transfekte edilen grupta GREB1'in ekspresyon seviyesinde herhangi bir değişim olmadığı tespit edildi (Şekil 4-35).



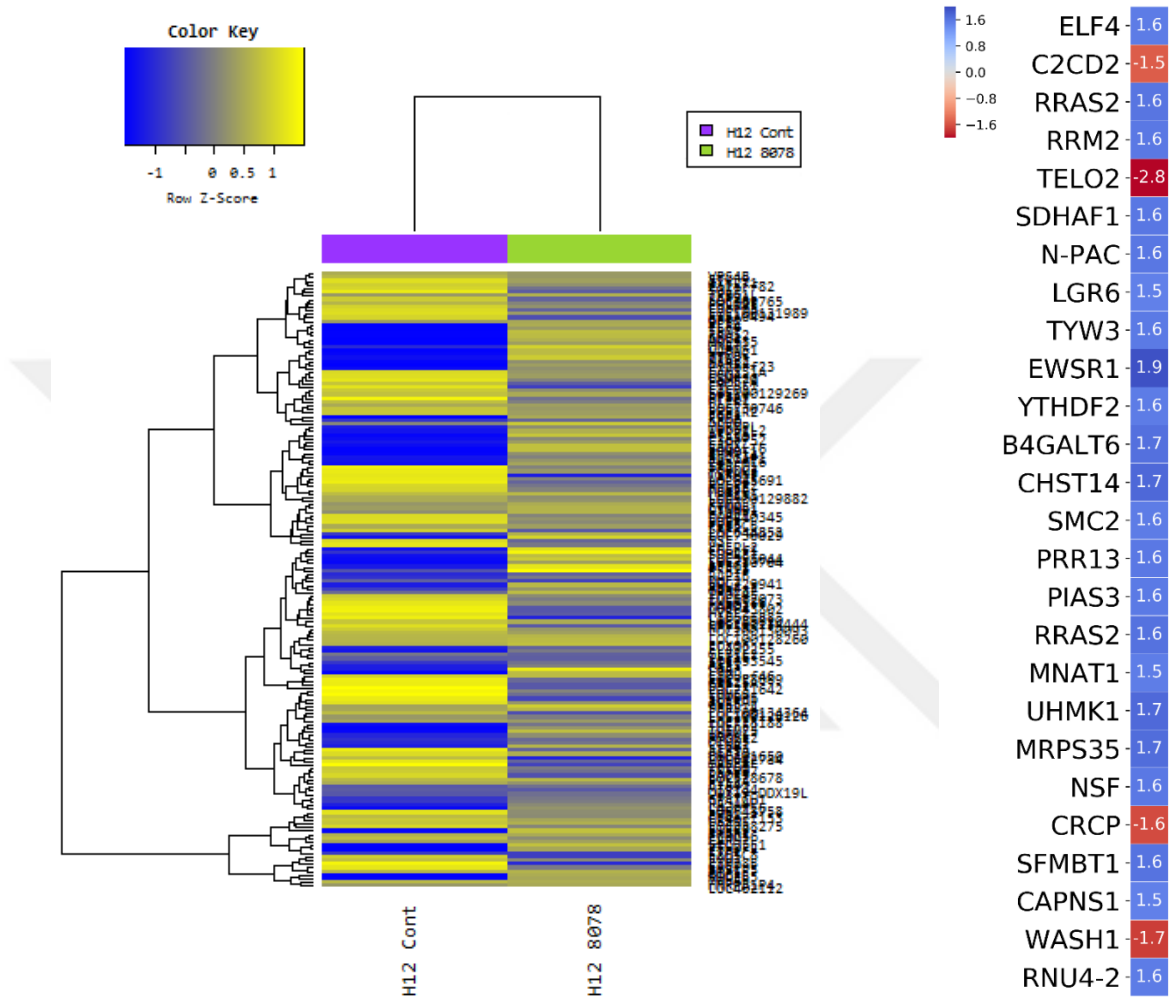
**Şekil 4-35.** H1299 hücrelerinde miR-8078'in GREB1 ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin real-time PCR sonucu.

#### 4.13.2. Mikroarray

miR-8078'in aday hedef genlerini biyoenformatik araçlar ile belirleyemediğimizden dolayı miR-8078'in H1299 hücrelerindeki tüm mRNA değişimini tespit edebilmek için mikroarray tekniğini uyguladık. 6 kuyulu platalere ekilen H1299 hücrelerine 50 nM kontrol mimik ve miR-8078 mimik transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler trizol ile toplanarak toplam RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Örnekler, mRNA mikroarray hizmet alımı için Macrogen Inc. (Güney Kore)'e gönderildi. Mikroarray analiz sonuçlarında, miR-8078 mimik transfekte edilen hücrelerdeki mRNA ekspresyon seviyeleri kontrol mimik transfekte edilenlere oranlandı ve genlerin kat değişim değerleri için eşik değeri (cut-off) 1.5 olarak ele alındı. miR-8078 mimik transfeksiyonu sonucunda gen ekspresyon değişimlerinde kontrole oranla azalan genler değerlendirmeye alındı. Tüm gen değişimleri incelendiğinde, miR-8078 mimik transfekte edilen hücrelerdeki mRNA'ların ekspresyonları kontrol mimik transfekte edilen hücrelerdeki mRNA'lara oranlandığında 26 adet genin mRNA'sının ekspresyonlarının değiştiği gözlemlendi. Bu genlerden yalnızca 4 tanesinin TELO2 ekspresyonununun 2.8 kat, C2CD2'nin 1.5 kat, CRCP'nin 1.6 kat, WASH1'in ise 1.7 kat miR-8078 mimik transfekte edilen grupta azaldığı tespit edildi. (Şekil 4-36).

Ekspresyonları azalan TELO2, CRCP, C2CD2 ve WASH1 genlerinin, miR-8078'in doğrudan hedefi olup olmadıklarının tespit edilebilmesi için TargetScan, miRWalk, miRTarBase ve miRDB miRNA-hedef gen tahmin programları kullanılarak TELO2, CRCP, C2CD2 ve WASH1 3'UTR'lerinde miR-8078'in tanıma bölgesi olup olmadığı araştırıldı. Analiz sonucunda, TargetScan programı ile CRCP ve C2CD2'nin 3'UTR'lerinde miR-8078

tanıma bölgesi olduğu tespit edildi (Şekil 4-37). TELO2 ve WASH1'in 3'UTR'lerinde miR-8078 tanıma bölgesine rastlanılmadı.

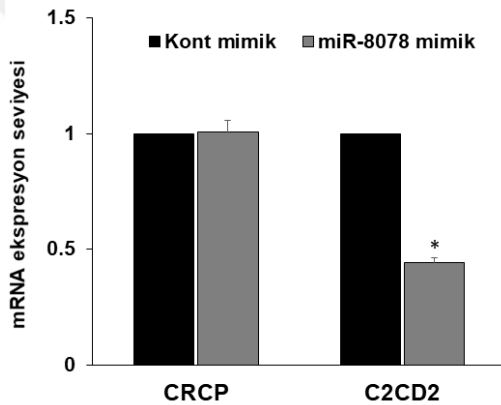


**Şekil 4-36.** miR-8078'in hedef genlerini tespit etmek için gerçekleştirilen mikroarray analiz sonuçlarının heatmap görüntüsü (solda). miR-8078 mimik transfekte edilen grupta artan ve azalan genlerin heatmap görüntüsü (sağda). Artan (mavi) ve azalan genlerin (kırmızı) kat değişimleri değerleri ile gösterilmiştir. Heatmap Python 2.7 programının seaborn paketi kullanılarak çizilmiştir.

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score
Position 3568-3575 of <u>C2CD2</u> 3' UTR	5' ...ACUGCCCAACCGG-CCUAGACA... 	8mer	-0.05
hsa-miR-8078	3' CUCAGAGAGUGGCCCGGAUCUGG		
	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score
Position 7131-7137 of <u>CRCP</u> 3' UTR	5' ...CAGGUAUCAGACUUCUAGACAA... 	7mer-A1	-0.17
hsa-miR-8078	3' CUCAGAGAGUGGCCCGGAUCUGG		

**Şekil 4-37.** Mikroarray analizi sonucunda tespit edilen genlerin 3'UTR'lerinde miR-8078 tanıma bölgesinin tespit edildiği TargetScan programı analiz sonuçları.

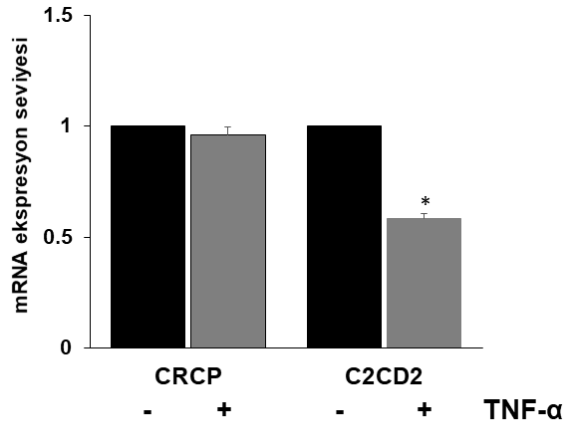
Mikroarray analizi sonuçlarında, ekspresyonları azalan ve 3'UTR'lerinde miR-8078 tanıma bölgesi tespit edilen CRCP ve C2CD2 genlerinin ekspresyonları, miR-8078 mimik transfekte edilen H1299 hücrelerinde real-time PCR ile doğrulandı. miR-8078 mimik ve kontrol mimik transfekte edilen H1299 hücrelerinden elde edilen toplam RNA'lar kullanılarak real-time PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. CRCP ve C2CD2 genlerinin ekspresyon seviyeleri  $\beta$ -aktin ile normalize edilerek  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  metoduna göre kat değişimleri hesaplandı. Real-time PCR validasyon sonucu gen ekspresyon analizlerinde miR-8078 mimik transfekte edilen grupta C2CD2'nin ekspresyon seviyesi kontrole oranla anlamlı şekilde %50 azaldığı tespit edildi. Fakat, CRCP'nin ekspresyon seviyesinde herhangi bir değişim olmadığı gözlemlendi (Şekil 4-38).



**Şekil 4-38.** miR-8078'in aday hedef genleri CRCP ve C2CD2 genlerinin miR-8078 mimik transfeksiyonu sonucu ekspresyon seviyelerinin real-time PCR sonuçları. \*p<0.05

Mikroarray sonuçlarının doğrulanması için ikinci bir yaklaşımla kullandık. Daha önceden, miR-8078'in TNF- $\alpha$  muamelesi ile ekspresyonunun indüklendiğini tespit edilmişti. Dolayısı ile, TNF- $\alpha$  muamelesi sonucu miR-8078'in hedef genlerinin de ekspresyonunun azalması beklenildiğinden CRCP ve C2CD2'nin ekspresyon seviyeleri TNF- $\alpha$  indüklü hücrelerde incelendi. 12 kuyulu platelerde kültüre edilen H1299 hücreler 24 saat serum açlığına maruz bırakılarak 30 ng/ml TNF- $\alpha$  ile muamele edildi ve 24 saat sonra hücreler trizol ile toplandı. Toplam RNA'lar izole edilerek real-time PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. CRCP ve C2CD2'nin ekspresyon seviyeleri  $\beta$ -aktin ile normalize edilerek  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  metoduna göre kat değişimleri hesaplandı. Analiz sonucunda, TNF- $\alpha$  ile muamele edilen grupta kontrole oranla CRCP geninde herhangi bir değişim gözlenmezken, C2CD2'nin ekspresyon seviyesi anlamlı şekilde yaklaşık 2 kat azaldığı gözlemlendi (Şekil 4-39). İki farklı yaklaşım ile elde edilen bulgular doğrultusunda, CRCP genini miR-8078'in hedef geni olma adaylığından elenerek çalışmaya C2CD2 ile devam edildi.

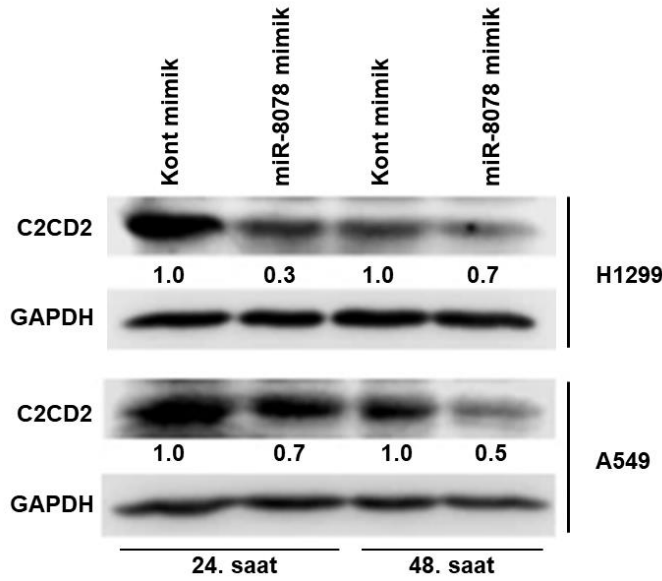




**Şekil 4-39.** miR-8078'in aday hedef genleri CRCP ve C2CD2 genlerinin TNF- $\alpha$  muamelesi sonucu ekspresyon seviyelerinin real-time PCR sonuçları. \* $p < 0.05$

#### 4.13.3. miR-8078'in C2CD2 ekspresyonu üzerine etkisi

Mikroarray sonuçlarının biyoenformatik analizlerle desteklenerek real-time PCR analizleriyle doğrulanması sonucunda, C2CD2'nin miR-8078'in doğrudan hedefi olabileceği saptandı. mRNA düzeyinde elde edilen C2CD2'nin ekspresyon seviyesi değişimleri, H1299 ve A549 KHDAK hücre hatlarını kullanarak protein düzeyinde de incelendi. 6 kuyulu platelere ekilen H1299 ve A549 hücreleri 50 nM kontrol mimik ve miR-8078 mimik ile transfekte edildi. Transfeksiyondan sonra 24. ve 48. saatte her iki hücre ripa buffer ile toplanarak western blot deneyi gerçekleştirildi. H1299 hücre hattında miR-8078 mimik transfekte edilen grupta kontrole oranla C2CD2'nin ekspresyon seviyesinin 24 saatte %70, 48 saatte %30 azaldığı tespit edildi. Benzer sonuçlar A549 hücre hatlarında da elde edildi. miR-8078 mimik transfekte edilen grupta kontrole oranla C2CD2'nin ekspresyon seviyesinin 24 saatte %30, 48 saatte %50 azaldığı saptandı (Şekil 4-40).



**Şekil 4-40.** H1299 ve A549 KHDAK hücrelerinde miR-8078'in C2CD2 ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin western blot analizi görüntüsü. Bant yoğunlukları Image Studio Lite Ver 4.0 programıyla ölçüldü. Bant değerleri GAPDH'inkine oranlanarak normalize edildi. Kontrole oranla kat değişimi değerleri bantların altına eklendi.

#### 4.13.4. C2CD2 3'UTR'sinin psiCHECK-2 lusiferaz reporter vektörüne klonlanması

Western blot ve real-time PCR sonuçlarında miR-8078'in C2CD2'yi doğrudan hedeflediği tespit edilemeyeceğinden dolayı miR-8078 tanıma dizisini taşıyan C2CD2'nin 3'UTR bölgesi lusiferaz vektörüne klonlandı. Şekil 4-34'te gösterildiği gibi miR-8078'in tanıma dizisinin (7 mer) olduğu 665 nükleotitlik C2CD2 3'UTR'si psiCHECK-2 lusiferaz vektörüne klonlandı (Şekil 4-41).

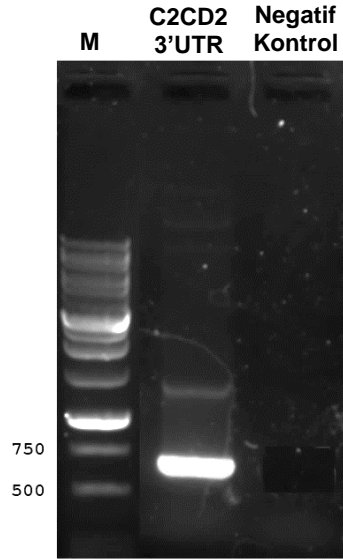
```

ATGACCAACTGCTACTCGACCAGTCGCCACTCAGTGGCCACCTGGTGCCCGTTTAGATTTTGC
TTGGGTTTTACTGGCCACCTCTATAGACGAGAGTTGCAAAGTTGCTTTGAGCAGAGAGGGAAAG
ATTAATTTTACACTGCTGGCCACCGAAGGCAGGTGTTTCCCTGGGTAGTAATCTCACGGCTCTTGA
TCTGGAAACTTCAGAGTACAAATTGGTGGATGGTGGAAAGGCAGGACACGTATCTCTGTCTGACG
GAAAACAGACCTCGGGGCTGGCGTAAACCCCTGCTGCCAGGCCCTCTCCCCACTGCCCAAACCG
GCCTAGACACGAAGACCAAAGCAGCCTGCACAGGGCAAGGCCCCCGCGGAATCCTGCAGAGCAA
ACTCAGGTTAACTTGGGTCCATGACCGTTTGCATTGCAAACACAATACTGCCTCGTTCTCTC
AGTTAGCAGCTGGGCAGCAGCGCACCATTTCATCATTTAGGCTTGTGGTTTGTGTTTACTCTAC
CAATGTTATGTCGAAACTGCATTGTAATAAAGAGAAGAAAGTGGCAGGTTTCCAGGTCCACGGA
AAGTTTTGGCTGACGCTGGAGTGCAGGTGATGAACTTACGTGACAATGATTGTATTCTCAGTA
GCACTTTAAACGCCGAAGACAGCCC

```

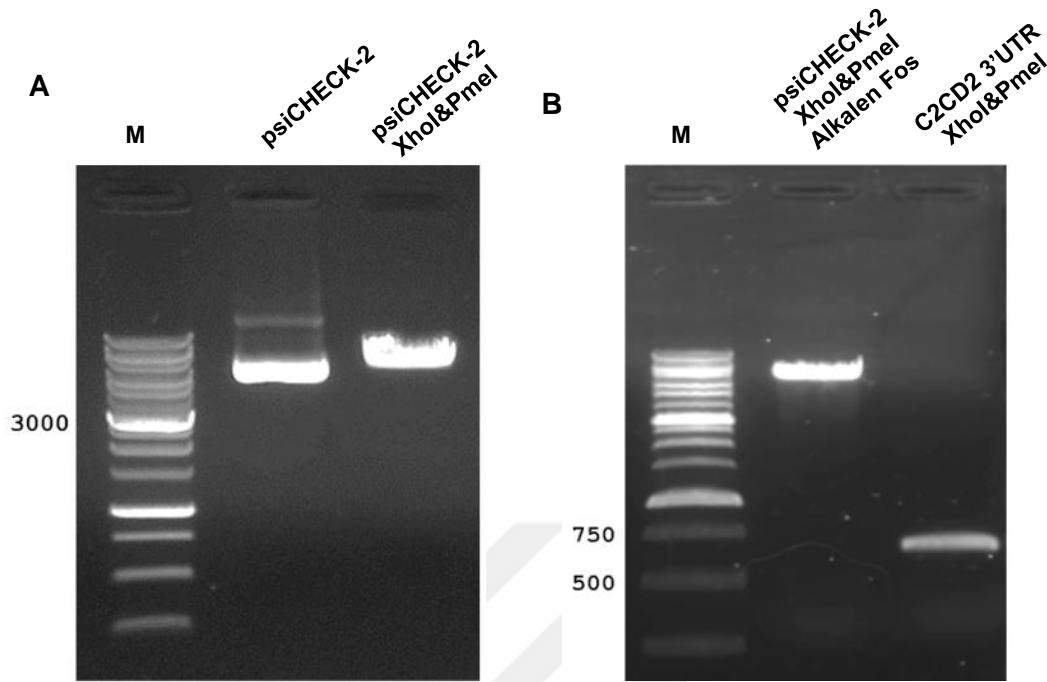
**Şekil 4-41.** miR-8078'in bağlanma bölgesinin olduğu (italik ve kalın) C2CD2 3'UTR'sinin cDNA dizisi.

Klonlanacak olan C2CD2 3'UTR bölgesi, tablo 3-3'te gösterilen XhoI kesim bölgesi taşıyan C2CD2 3'UTR ileri klonlama primer ile PmeI kesim bölgesi taşıyan C2CD2 3'UTR geri klonlama primeri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4-42).



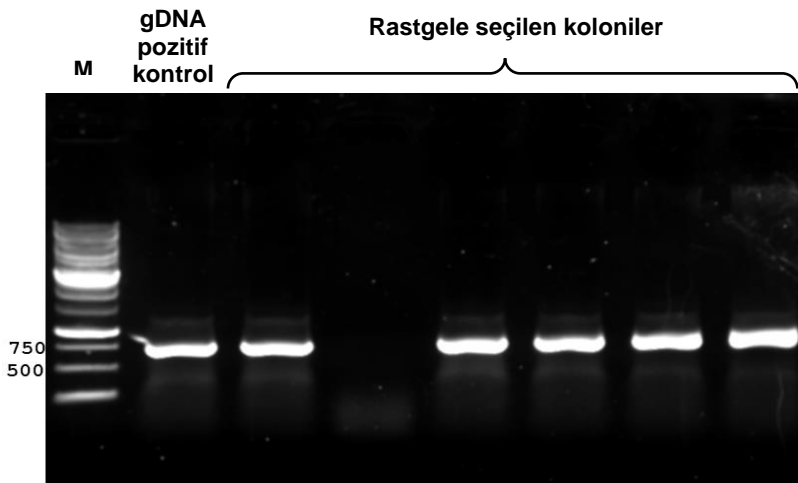
**Şekil 4-42.** H1299 gDNA'sında PCR ile çoğaltılan C2CD2 3'UTR bölgesinin %0.8 agaroz jelde görüntüsü. (M: Marker)

psiCHECK-2 vektörü, klonlamak için XhoI ve PmeI enzimleri ile sırasıyla kesilip agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4-43A). Kesilen psiCHECK-2 vektörünün 5' uçlarından fosfatlar Alkalen Fosfataz ile defosforillenerek ligasyon için hazır hale getirildi. C2CD2 3'UTR PCR ürünü saflaştırılıp sırasıyla XhoI ve PmeI enzimleri ile kesilerek ligasyona hazır hale getirildi. Hazırlanan psiCHECK-2 vektörü ve C2CD2 3'UTR'si ligasyon öncesi konsantrasyon tayini için agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4-43B).



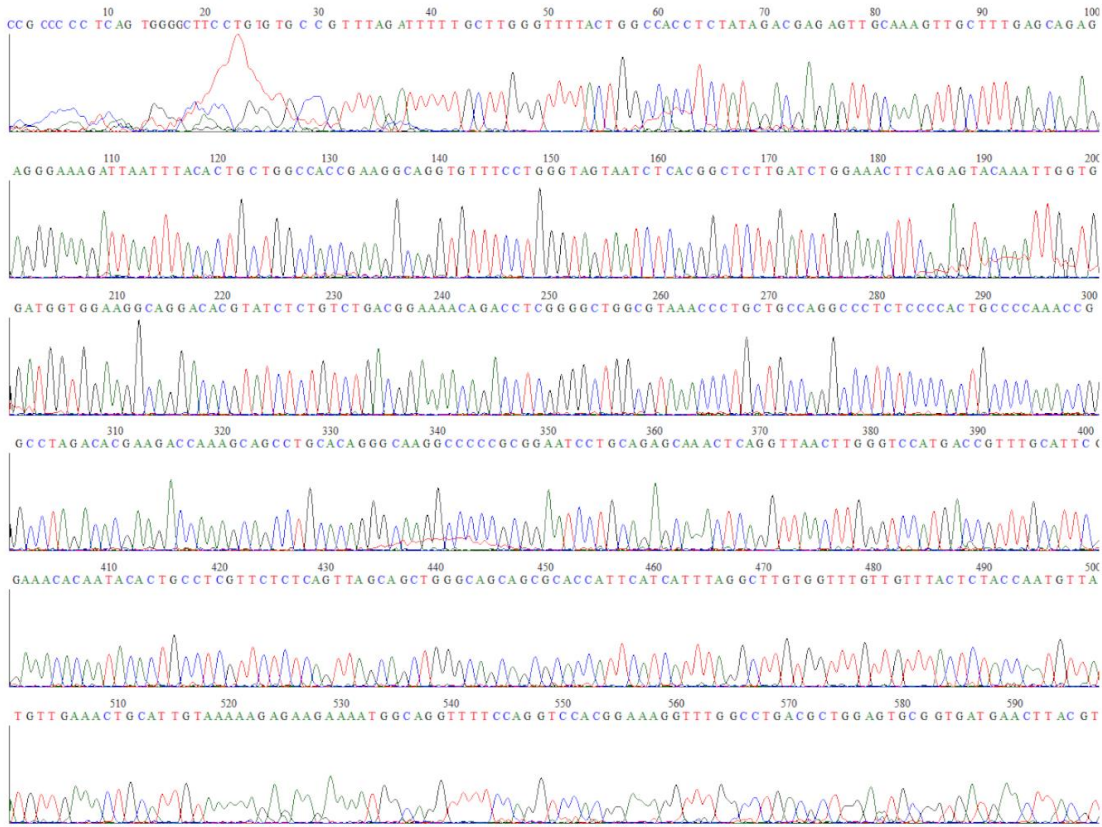
**Şekil 4-43.** Klonlanacak PTEN 3'UTR ve vektörün ligasyon için hazırlığı. Klonlamak için kesilen psiCHECK-2 vektörünün kesim öncesi ve sonrası %0.8 agaroz jel görüntüsü (A). Kesilen psiCHECK-2'nin alkalen fosfataz ile muamelesi sonrası ve PTEN 3'UTR PCR ürününün kesim sonrası konsantrasyon tayinleri için %0.8 agaroz jel görüntüsü (B).

Kesilen psiCHECK-2 ve C2CD2 3'UTR'sinin, ligasyonu gerçekleştirildikten sonra ligasyon ürünü *E.coli* 5α kompetent bakterisine transforme edildi ve koloni oluşumu için 100 µg/ml ampisilinli LB agar içeren petri kaplarına ekildi. Petrilere oluşan kolonilerden C2CD2 3'UTR'sinin klonlandığı koloniyi belirleyebilmek için, rastgele seçilen 6 koloniden koloni PCR gerçekleştirilerek PCR ürünleri agaroz jelde görüntülendi. 6 koloninin PCR sonuçlarında 5 tane kolonide amplifikasyon gözlemlendi (Şekil 4-44).



**Şekil 4-44.** Transformasyon sonrası oluşan kolonilerden gerçekleştirilen PCR sonuçlarının %0.8'lik agaroz jel görüntüsü. (M: Marker, gDNA pozitif kontrol: H1299 gDNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu)

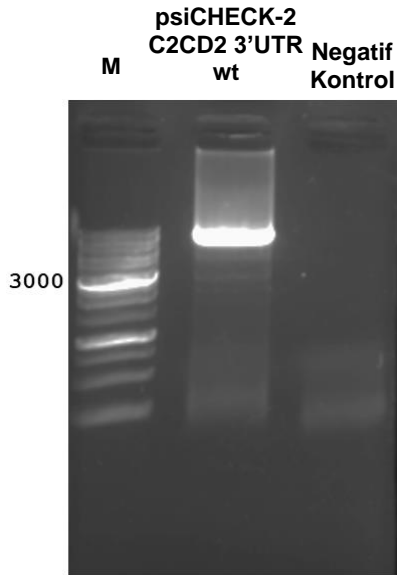
C2CD2 3'UTR'sinin psiCHECK-2 lusiferaz vektörüne klonlandığı koloni PCR ile teyit edildikten sonra klonlanan UTR bölgesinin DNA dizisinin doğruluğunun analizi için rastgele seçilen plazmitlerden bir tanesinin DNA dizi analizi yapıldı (Şekil 4-45). DNA dizi analizi sonucunda, klonlanan C2CD2 3'UTR'sinin yabani tip (wt) ile örtüştüğü tespit edildi.



Şekil 4-45. Klonlanan C2CD2 3'UTR'sinin DNA dizi analizi sonucu kromatogram görüntüsü.

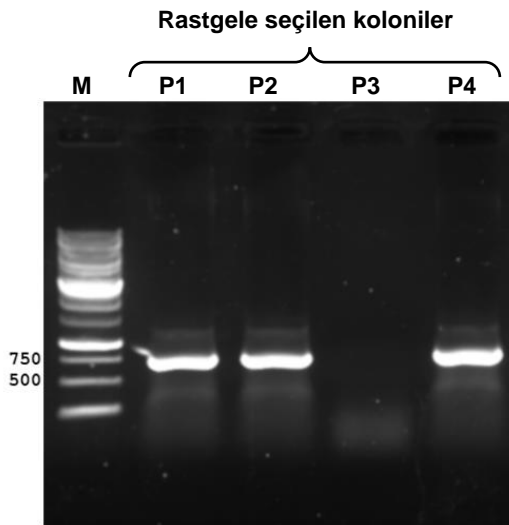
#### 4.13.5. Klonlanan PTEN 3'UTR'nin yönlendirilmiş mutagenез yönetmi ile mutantının oluşturulması

C2CD2 3'UTR'sinin doğru şekilde klonlandığı tespit edildikten sonra miR-8078'in C2CD2 3'UTR'sindeki tahmini tanıma dizisine bağlanıp bağlanmadığını belirlemek için yönlendirilmiş mutagenез deneyleri gerçekleştirildi. C2CD2 3'UTR'sinde 7mer'den oluşan miR-8078 tahmini tanıma dizisinin (CCTAGAC) tamamını değiştirerek mutant C2CD2 3'UTR'sini taşıyan psiCHECK-2 lusiferaz vektörü oluşturuldu. Öncelikle, C2CD2 3'UTR mutant primerleri ile PCR gerçekleştirilerek sonuçlar agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4-46).



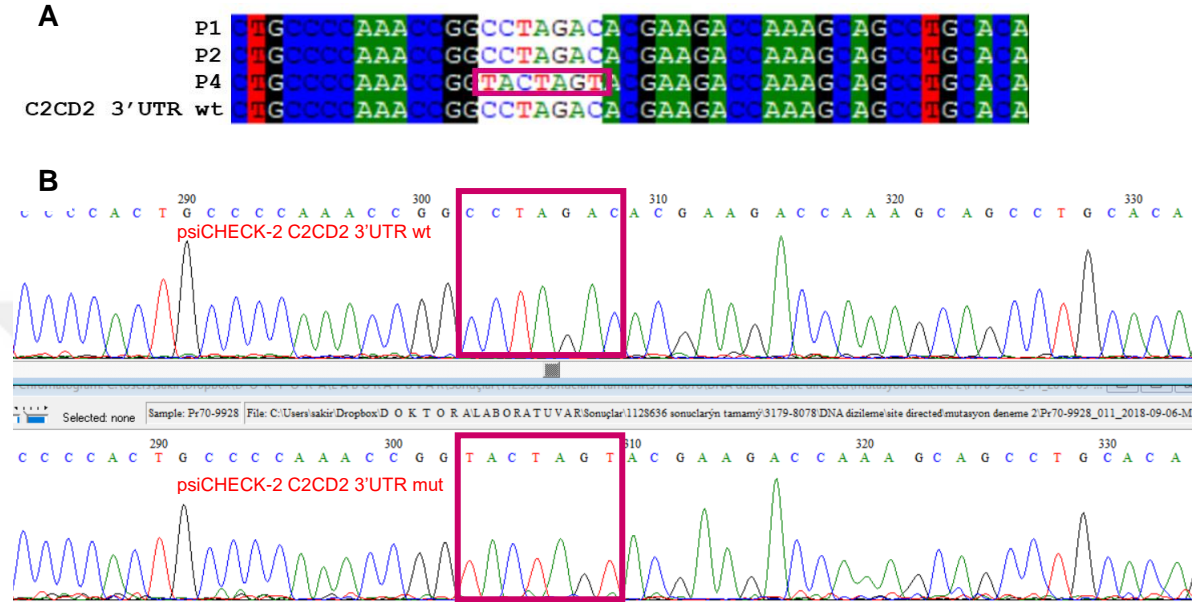
**Şekil 4-46.** C2CD2 3'UTR'sinde miR-8078'in tanıma bölgesinde oluşturulacak mutasyon için mutant primerler kullanılarak yapılan PCR'in %0.8'lik agaroz jel görüntüsü. (M: Marker, psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR wt: C2CD2 3'UTR'sinin klonlandığı psiCHECK-2 lusiferaz vektörü kalıp olarak kullanılan PCR sonucu)

Yönlendirilmiş mutagenез için, C2CD2 3'UTR mutant primerleri ile gerçekleştirilen PCR ürünleri saflaştırılarak T4 DNA ligaz ile muamele edildikten sonra *E.coli* 5α kompotent bakterisine transforme edildi ve koloni oluşumu için 100 µg/ml ampisilinli LB agar içeren petri kaplarına ekildi. Oluşan kolonilerden rastgele 4 tane seçilerek C2CD2 3'UTR klonlama primerleri ile koloni PCR gerçekleştirildi ve sonuçlar agaroz jelde görüntüldü. 4 koloniden 3 tanesinde çoğalma gözlemlendi (Şekil 4-47).



**Şekil 4-47.** Mutant C2CD2 3'UTR'si için yapılan yönlendirilmiş mutagenез sonucunda oluşan kolonilerden gerçekleştirilen koloni PCR sonuçlarının %0.8'lik agaroz jelde görüntüsü. (M: Marker)

PCR sonucu çoğalma görülen 3 koloniye ait vektörlerde mutasyonun oluşup oluşmadığının tespiti için DNA dizi analizi yapıldı. DNA dizi analizleri sonucunda, gönderilen 3 vektörün 1 tanesinde istenilen mutasyonun olduğu gözlemlendi (Şekil 4-48).

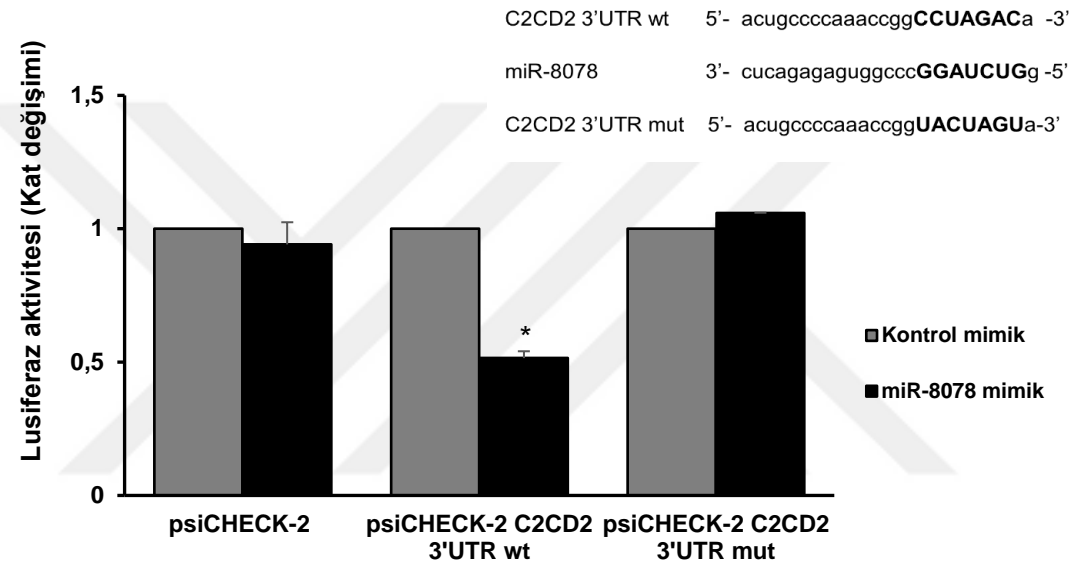


**Şekil 4-48.** C2CD2 3'UTR'sinde miR-8078 tanıma bölgesinde oluşturulan mutasyonun DNA dizi analizi sonucu. Yönlendirilmiş mutagenез sonucu seçilen 3 koloniden elde edilen plazmitlerin DNA dizi analizi sonuçlarının C2CD2 3'UTR wt DNA dizisi ile karşılaştırılması (A). Mutasyonun olduğu psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR mutant vektör ile psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR wild tip vektörün DNA dizilerinin kromatogram görüntüsü (B).

#### 4.13.6. miR-8078'in Lusiferaz aktivitesine olan etkisi

miR-8078'in C2CD2'yi doğrudan hedeflediğini tespit edebilmek için gerçekleştirilecek lusiferaz deneylerinde transfeksiyon verimliliği yüksek olan insan embriyonik böbrek hücre hattı HEK293T kullanıldı. 96 kuyulu plakelere ekilen HEK293T hücreleri 100 ng psiCHECK-2 (boş vektör), psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR wt ve psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR mut vektörleri ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra her bir vektör ile transfekte edilen hücreler ayrı ayrı 50 nM kontrol mimik ve miR-8078 mimik ile transfekte edildi. 48 saat sonra hücreler passive lizis buffer ile toplanarak lusiferaz aktiviteleri ölçüldü. Normalizatör olarak *firefly* lusiferaz kullanıldı ve kontrole oranla kat değişimleri hesaplandı. miR-8078 mimik, kontrole mimik'e oranla yalnızca psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR wt transfekte edilen hücrelerde lusiferaz aktivitesini anlamlı olarak %50 oranında düşürdüğü gözlemlendi. psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR mut vektörde gerçekleştirilen mutasyon sonucunda lusiferaz aktivitesinde anlamlı bir

değişim gözlenmedi (Şekil 4-49). psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR wt vektörün transfekte edildiği hücrelerde miR-548as-3p mimik lusiferaz aktivitesini azaltırken, psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR mut vektörün transfekte edildiği hücrelerde kayda değer bir lusiferaz aktivitesi değişiminin olmaması, iki vektör arasındaki fark olan mutant diziden kaynaklanmaktadır. Bu sonuç da bize, miR-8078'in C2CD2 3'UTR'sindeki tanıma dizisine bağlanarak PTEN ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir.



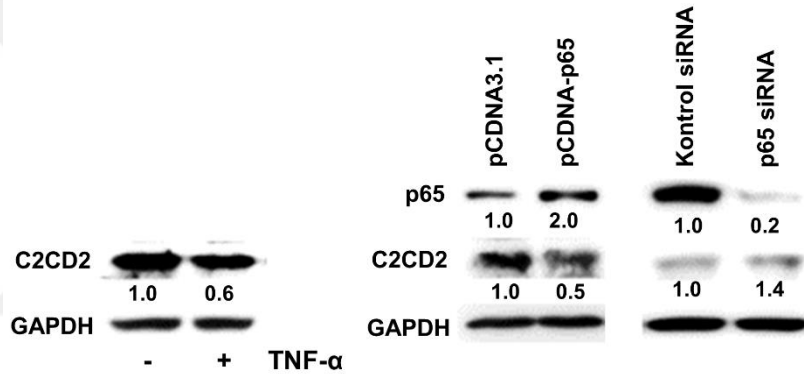
**Şekil 4-49.** miR-8078'in lusiferaz aktivitesi üzerine etkisi. psiCHECK-2 (boş vektör), psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR wt ve psiCHECK-2 C2CD2 3'UTR mut vektör transfekte edilen her hücreye ayrı ayrı kontrol mimik ve miR-8078 mimik transfekte edilerek lusiferaz aktiviteleri ölçüldü. \* p<0.05

#### 4.13.7. NF-κB'nin C2CD2 ekspresyonuna etkisi

miR-8078'in, TNF-α indüklü NF-κB aktivasyonu ile transkripsiyonunun indüklediğini ve miR-8078'in hedefinin C2CD2 olduğunu tespit ettikten sonra TNF-α-NF-κB-miR-8078-C2CD2 ekseninde NF-κB-C2CD2 ilişkisi incelendi. Bunun için, NF-κB'nin aktivasyonu ve downregülasyonunun C2CD2 ekspresyonuna etkisi western blot yöntemi ile araştırıldı. 6 kuyulu platelere ekilen H1299 hücreleri 3 farklı gruba ayrıldı: NF-κB'nin TNF-α ile aktive edildiği grup, NF-κB-p65 over ekspresyon grubu ve p65 siRNA ile downregülasyon grubu. NF-κB aktivasyonu için hücreler 24 saat serum açlığında kültüre edildi ve ardından 30 ng/ml TNF-α uygulanarak 24 saat sonra ripa buffer ile toplandı. Over ekspresyon grubu için hücrelere pcDNA3.1 boş vektör ve p65 over ekspresyon vektörü ayrı ayrı transfekte edilerek



48 saat sonra ripa buffer ile hücreler toplandı. Downregülasyon grubu için kontrol siRNA ve p65 siRNA ayrı ayrı transfekte edilerek 48 saat sonunda hücreler ripa buffer ile toplandı. Gerçekleştirilen western blot deneylerinde, TNF- $\alpha$  uygulaması sonucu C2CD2'nin ekspresyon seviyesinin %40 azaldığı saptandı. p65 over ekspresyonu ve p65 siRNA aracılı gruplarda öncelikle p65'in ekspresyon seviyesi belirlendi. Beklenildiği gibi p65 overekspresyon vektörünün ve p65 siRNA'nın etkili şekilde çalıştığı görülmektedir (Şekil 4-50). p65 over ekspresyon grubunda kontrole oranla C2CD2 ekspresyon seviyesinde %50 azalma gözlenirken, p65'in siRNA grubunda C2CD2 ekspresyon seviyesi %40 oranında arttığı tespit edildi. Bu sonuçlarda, TNF- $\alpha$  ile muamele edilen hücrelerde, C2CD2'nin ekspresyonunun p65 aracılığıyla downregüle edildiğini göstermektedir.

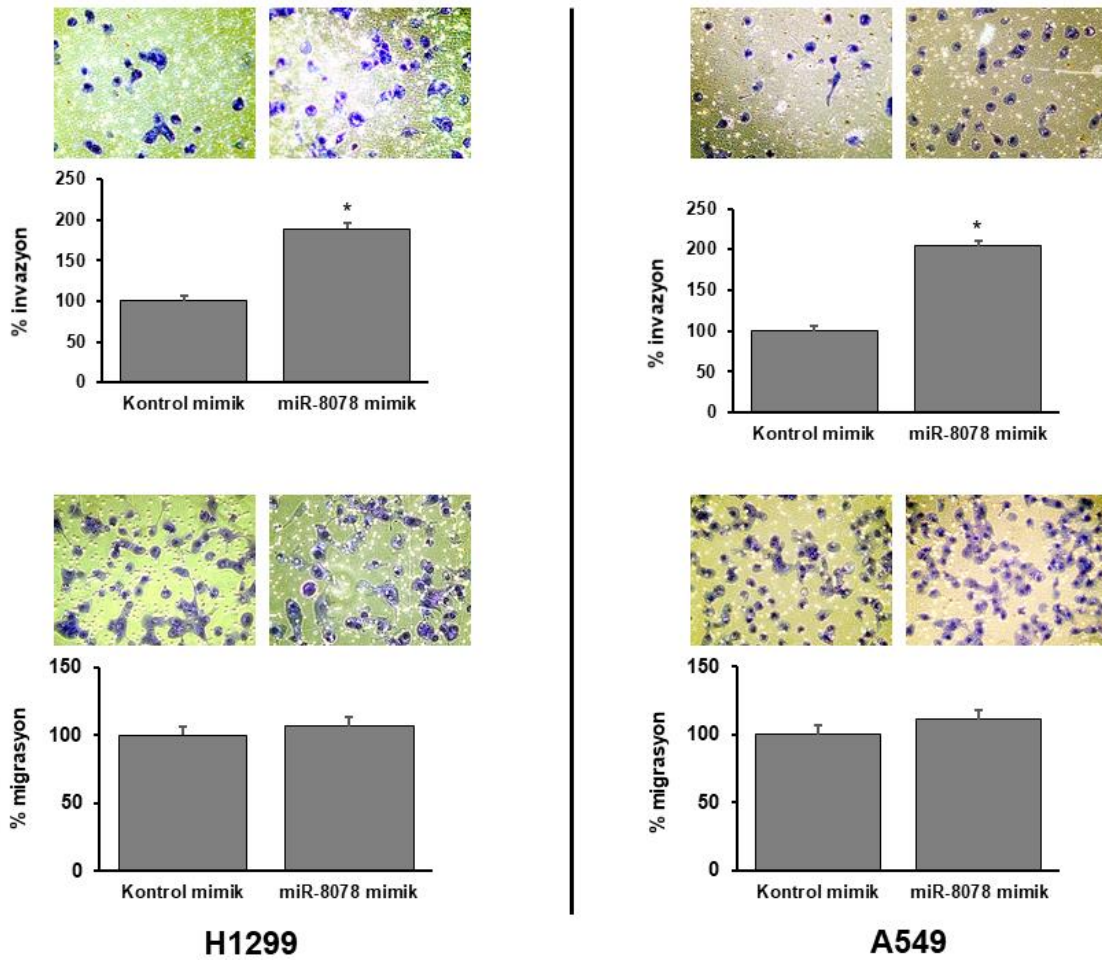


**Şekil 4-50.** NF- $\kappa$ B'nin C2CD2'nin ekspresyon seviyesi üzerine etkisinin western blot görüntüsü. Image Studio Lite Ver 4.0 programıyla ölçüldü. C2CD2 ve p65 değerleri, GAPDH'ine oranlanarak normalize edildi. Kontrole oranla kat değişimi değerleri bantların altına eklendi.

#### 4.14. miR-8078'in H1299 ve A549 KHDAK Hücrelerinin İnvazyon ve Migrasyonu Üzerine Olan Etkisi

miR-8078'in C2CD2'yi hedefleyerek ekspresyonunu baskıladığı tespit edildikten sonra KHDAK hücrelerinin invazyon ve migrasyonuna etkisi incelendi. Bunun için, H1299 ve A549 hücreleri kullanılarak transwell invazyon ve migrasyon deneyleri gerçekleştirildi. 6 kuyulu platelere ekilen H1299 ve A549 hücre hatlarının herbirine ayrı ayrı 50 nM kontrol mimik ve miR-8078 mimik transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler tripsin edilerek sayıldı ve transwell invazyon ve migrasyon deneyi için kullanılan odacıklara ekildi. Ekimden 22 saat sonra odacığın içinde kalan hücreler temizlendi ve geçen hücreler metanol ile fikse edilerek toluidine mavisi (%1) ile boyandı. Boyanan hücrelerin olduğu 5 bağımsız alan mikroskopta fotoğraflanarak her bir alandaki hücreler sayıldı. Sayılan hücreler kontrole göre

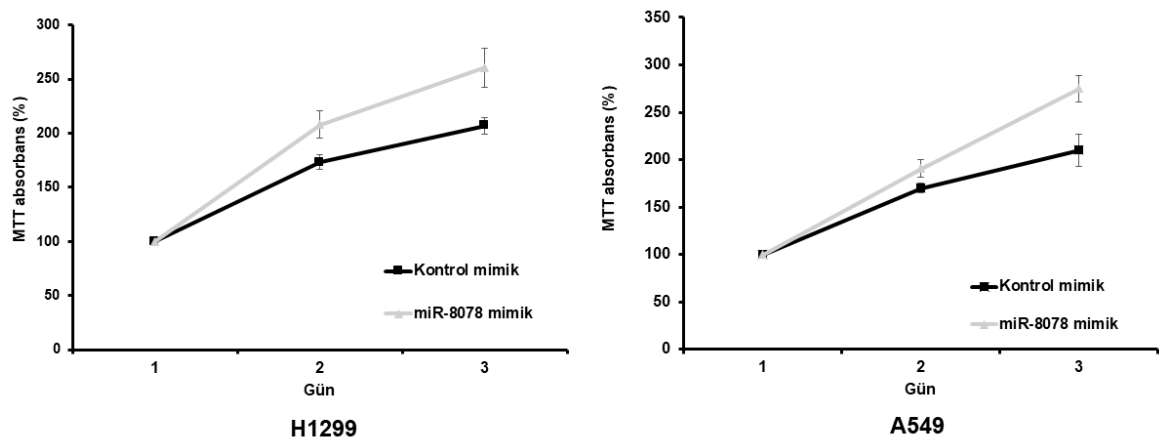
oranlanarak yüzde değişim değerleri hesaplandı. İnvazyon sonuçlarında, miR-8078'in hem H1299 hemde A549 hücrelerinin invazyon kapasitelerini yaklaşık 2 kat arttığı tespit edildi. Migrasyon deneyi sonuçlarında, miR-8078'in kontrole oranlandığında H1299 ve A549 hücrelerinin migrasyon yeteneklerinde kayda değer bir etkiye neden olmadığı tespit edildi (Şekil 4-51).



**Şekil 4-51.** miR-8078'in H1299 ve A549 KHDAK hücrelerinin invazyonu ve migrasyonu üzerine etkisi.  
\*p<0.05

#### 4.15. miR-8078'in H1299 ve A549 KHDAK Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Olan Etkisi

miR-8078'in C2CD2 ekspresyonunu baskılayarak invazyonu arttırdığı tespit edildikten sonra H1299 ve A549 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri incelendi. 96 kuyulu platelere ekilen H1299 ve A549 hücrelerine ayrı ayrı 50 nM kontrol mimik, miR-8078 mimik transfekte edildi. Transfeksiyon aşaması 0. saat kabul edildi ve transfeksiyondan sonra 24. ve 48 saat'lerde MTT kullanılarak hücre canlılığı ölçüldü. Hücre canlılıkları 0. saat'e göre oranlandı ve analizi yapıldı. H1299 hücrelerinde, miR-8078 mimik transfeksiyonu sonucu kontrole oranla hücre canlılığında %25 artış gözlemlendi. A549 hücrelerinde, miR-8078 mimik transfeksiyonu sonucu hücre canlılığı %30 oranında arttığı tespit edildi (Şekil 4-52).

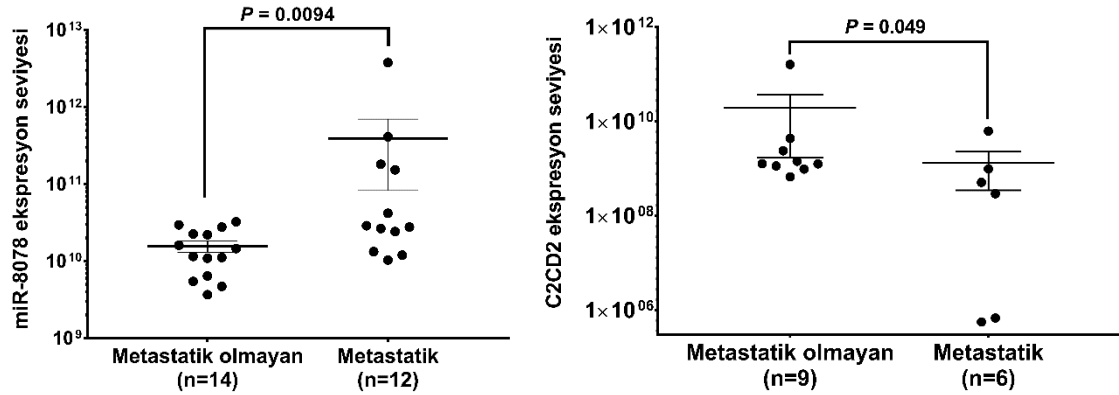


Şekil 4-52. miR-8078'in H1299 ve A549 KHDAK hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.

#### 4.16. miR-8078 ve C2CD2'nin KHDAK Hastalarının Tümör Dokularındaki Ekspresyon Seviyeleri

KHDAK hücre hatlarının invazyonunu indüklediği tespit edilen miR-8078'in klinik olarak anlamlılığı araştırıldı. Bunun için, miR-8078 ve hedef geni C2DC2'nin ekspresyon seviyeleri, metastatik tanı almamış ve almış olan KHDAK hastalarının parafine gömülü primer tümör dokusundan elde edilen RNA örneklerinde real-time PCR yöntemi ile belirlendi. Metastatik tanı almış olan hastalarda (n=12), metastatik tanı almamış olan hastalara (n=14) göre miR-8078'in ekspresyon seviyesinin anlamlı ölçüde fazla olduğu tespit edildi ( $P=0.0094$ ) (Şekil 4-53). Metastatik tanı almış olan hastalarda (n=6), metastatik tanı

almamış olan hastalara (n=9) göre C2CD2'nin ekspresyon seviyesinin anlamlı ölçüde düşük seviyede eksprese olduğu tespit edildi ( $P=0.049$ ) (Şekil 4-53). miR-8078 ve C2CD2'nin ekspresyon seviyeleri aynı hastalarda karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir korelasyon bulunamadı.



**Şekil 4-53.** KHDAC hastalarının parafine gömülü tümör dokularında miR-8078 ve C2CD2'nin ekspresyon seviyelerinin real time PCR sonucu. miR-8078 için normalizatör olarak Snord61, C2CD2 için  $\beta$ -aktin kullanıldı.

## 5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, tüm dünyada kanser ilişkili ölümlerin başında gelmektedir (Siegel vd. 2016). Akciğer kanserlerinin insidansı ve prevalansı özellikle batı dünyasında endişe verici oranda artmaktadır. Gelişen teşhis ve tedavilere rağmen 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %15'tir. Akciğer kanserine karşı mücadelede, yeni tedavi stratejileri ve yöntemlerinin gelişmesi için kanserleşmenin ve progresyonun altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması oldukça önemlidir. Akciğer kanseri teşhisi konulan hastaların yaklaşık %90'ı küçük hücreli dışı akciğer kanseri'dir.

Transkripsiyon, translasyon, proliferasyon, invazyon, migrasyon, büyüme ve sağkalım gibi başlıca hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan PI3K/AKT yolağı, akciğer kanseri dahil birçok kanserde sürekli aktif olan önemli bir sinyal yolağıdır (Akca vd. 2011, Shukla vd. 2007, Yun vd. 2013). PI3K/AKT yolağının düzensiz aktivasyonu kanser, diabetes, kardiyovasküler hastalıklar dahil birçok hastalığın gelişimi ile ilişkilidir (Vivanco vd. 2002). PI3K/AKT yolağı downstream hedeflerinde STAT3, Ap-1 ve NF- $\kappa$ B gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. Bu transkripsiyon faktörleri arasında en önemlilerinden biri kanser gelişimi, invazyon, anjiyogenez, farklılaşma, metastaz, proliferasyon, apoptozdan kaçış ve inflamasyon gibi birçok proste rol alan NF- $\kappa$ B'dir (Aggarwal 2004). Prostat, meme, boyun, pankreas ve akciğer kanseri dahil solid tümörlerde NF- $\kappa$ B'nin sürekli aktif olduğu bilinmektedir (Karin vd. 2005). NF- $\kappa$ B ailesi p65, p50, p52, RelB, c-Rel üyelerinin homodimer ya da heterodimer formlarından meydana gelmektedir. En yaygın olarak bilinen p65:p50 formu birçok hücresel prosesin gerçekleşmesi için gereken genlerin düzenlenmesini sağlamaktadır (Verma vd. 1995). NF- $\kappa$ B inaktif durumda I $\kappa$ B ailesi proteinleri tarafından sitoplazmada tutulur. IKK'lar tarafından I $\kappa$ B'nin fosforillenmesi ile serbest kalan p65:p50 heterodimeri, nükleusa transloke olur ve p65 altbirimi DNA'daki kB motiflerine bağlanarak hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonuna ya da baskılanmasına neden olur. NF- $\kappa$ B, 500'den fazla genin ekspresyonunu kontrol edebilmektedir. Çok farklı dış uyarılarla aktif olabilen NF- $\kappa$ B'nin en kuvvetli uyarıcısı TNF- $\alpha$ 'dır (Durand vd. 2017). Çok çeşitli hücresel fonksiyonlarda görev alması, NF- $\kappa$ B'yi kanserde en çok çalışılan transkripsiyon faktörlerinden biri yapmıştır. Akciğer kanserinin en sık görülen sınıfı olan KHKDAK'inde sürekli aktif olan NF- $\kappa$ B sinyal yolağının aydınlatılması, akciğer kanseri tedavisi için yeni stratejilerin gelişimine katkı sağlayacaktır.

miRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, küçük kodlamayan sınıfına giren RNA molekülleridir. Genlerin 3'UTR'lerine bağlanarak translasyonlarını inhibe eden miRNA'lar,

hücrenin çeşitli biyolojik süreçlerinde oldukça kritik rol oynarlar. *C.elegans*'ta keşfinden bu yana miRNA'lar, yeni bir alan açarak hücre biyoloji ve patolojisinin anlaşılmasında yeni yaklaşımlar getirmiştir. İnsan genomunda tespit edilmiş olan yaklaşık 2700 adet miRNA'nın çoğunun fonksiyonu bilinmemektedir. Çalışmalar, miRNA'ların anormal ekspresyonları ile kanser arasında ilişki olduğunu göstermiştir (Calin vd. 2002). miRNA biyogenezinin önemli aşaması; pri-miRNA'nın transkripsiyonudur ve bu aşama çoğu kanserde bozuktur. İnsan miRNA genlerinin çoğu, kanserde delesyonun, amplifikasyonun ya da translokasyonun olduğu fragil ya da genomik bölgelerde lokalizedirler (Calin vd. 2004). Bu genetik varyasyonlar sonucunda, pri-miRNA transkripsiyonu ve miRNA'nın ekspresyonu değişmektedir. Böylece, hedef mRNA anormal ekspresyonu ortaya çıkarak kanser oluşumu ve progresyonu indüklenebilmektedir (Zhang vd. 2006). Örneğin, Kronik lenfositik lösemi'de miR-15 ve miR-16'nın yer aldığı kromozom 13q14 bölgesinde sıklıkla delesyon gözükmemektedir. Böylece, *BCL-2* mRNA'larını hedefleyerek apoptozu kontrol eden miR-15 ve miR-16 kaybı ya da azalmış ekspresyonu sonucu apoptoz yolağı baskılanmaktadır (Cimmino vd. 2005). Genetik değişimlere ek olarak, miRNA ekspresyonlarındaki düzensizlikler tümör baskılayıcı veya onkogenik faktörlerdeki değişiklikler sonucunda ortaya çıkabilmektedir. Transkripsiyonal aktivatör ya da baskılayıcı olarak fonksiyon gösteren bu faktörler pri-miRNA'nın transkripsiyonunu kontrol etmektedirler. MYC, iyi bilinen bir proto-onkoproteindir ve kanserde miR-17~92 kümesi onkogenik miRNA'ların ekspresyonlarını aktive etmektedir (O'Donnell vd. 2005). Kanser dahil bazı hastalıklarla ilgili yapılan çalışmalarda, miRNA'ların NF- $\kappa$ B tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Örneğin, mide kanseri hücre hattında NF- $\kappa$ B'nin, miR-16 ve miR-21'in promotörlerine bağlanarak transkripsiyonlarını aktive ettiği bildirilmiştir (Shin vd. 2011). Karaciğer kanserinde miR-143'ün transkripsiyonunun NF- $\kappa$ B tarafından upregüle edilerek HepG2 and Huh7 hücrelerinde invazyon ve migrasyonu arttırdığı tespit edilmiştir (Zhang vd. 2009). Aynı çalışmada araştırmacılar, *in vitro* elde ettikleri sonuçları *in vivo* yaklaşımla araştırarak miR-143'in karaciğer metastazını indüklediğini tespit etmişlerdir. Günümüzde, KHDAK'nde bilinen NF- $\kappa$ B hedef miRNA'ların sayısı oldukça azdır (Tablo 2-1). Akciğer kanseri gelişiminde oldukça önemli role sahip olan NF- $\kappa$ B'nin, hedef miRNA'larının tespit edilerek NF- $\kappa$ B sinyal yolağındaki her bir elemanın ve fonksiyonunun bilinmesi akciğer kanseri ile mücadele için oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışma ile, akciğer kanserinin en sık görülen tipi olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri'nde sürekli aktif olan NF- $\kappa$ B tarafından düzenlenen miRNA'ları tespit etmeyi ve tespit edilen miRNA'ların hedef genlerini saptayarak KHDAK karsinogenezindeki fonksiyonlarını aydınlatmayı amaçladık.

Çalışmanın ilk aşamasında, TNF- $\alpha$  ile indüklenen hücrelerde, PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının aktive olup olmadığını belirledik. TNF- $\alpha$ 'nın bilinen iki reseptöründen biri olan ve tüm hücrelerde eksprese olan TNFR1'in sitoplazmik bölgesine PI3K'in alt birimi olan p85'in bağlandığı bilinmektedir (Guo vd. 1996). Aynı zamanda TNF- $\alpha$ 'nın, PI3K ve AKT'yi aktive ettiği tespit edilmiştir (Nidai Ozes vd. 1999). Endotel hücrelerinde TNF- $\alpha$  ve IL-1'in PI3K/AKT yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (Madge vd. 2000). Başka bir çalışmada, akciğer kanseri dahil farklı kanserlere ait hücre hatlarının TNF- $\alpha$  muamelesi ile gerçekleştirilen EMSA deneylerinde, NF- $\kappa$ B'nin DNA bağlanma kapasitesinin arttığı gösterilmiştir (Gustin vd. 2004). Literatür bilgileri doğrultusunda, çalışmamızda KHDAK hücre modeli olarak belirlediğimiz H1299 hücre hattını, TNF- $\alpha$  ile muamele ederek AKT'nin aktive olduğunu tespit ettik (Şekil 4-1). Daha sonra, AKT'nin downstream hedeflerinden olan NF- $\kappa$ B'nin alt birimi p65'in DNA bağlanma etkinliğini belirledik. TNF- $\alpha$  ile muamele ettiğimiz H1299 hücrelerinde gerçekleştirdiğimiz EMSA deneylerinde, p65'in DNA bağlanma kapasitesinin arttığını tespit ettik (Şekil 4-2). p65'in transkripsiyonel aktivitesini incelemek için lusiferaz deneyleri gerçekleştirdik. TNF- $\alpha$  ile muamele edilen H1299 hücrelerinde p65'in transkripsiyonel aktivitesinin arttığını saptadık (Şekil 4-3). p65'in transkripsiyonel aktivasyonunu arttırmak için kullandığımız TNF- $\alpha$ 'nın yaptığı etkinin tersine, p65 siRNA transfekte edilen H1299 hücrelerinde p65'in transkripsiyonel aktivitesinin azaldığını tespit ettik (Şekil 4-4). TNF- $\alpha$  indüksiyonu sonucu PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının aktive olduğunu ve NF- $\kappa$ B (p65)'nin DNA bağlanma aktivitesinin arttığını tespit ettikten sonra, NF- $\kappa$ B'nin promotorlarına bağlanarak düzenlediği hedef miRNA'ları tespit edebilmek için, p65'in H1299 genomunda bağlandığı bölgeleri belirledik. Bunun için, TNF- $\alpha$  ile indüklediğimiz H1299 hücrelerinde gerçekleştirdiğimiz ChIP-Seq deneyleri sonucunda p65'in bağlandığı genom bölgelerini saptadık. Saptadığımız bu bölgelerin herhangi bir miRNA'nın promotor bölgesi olabilme potansiyelini biyoenformatik araçlar vasıtasıyla belirledik. Özsolak ve arkadaşları, miRNA promotorlarını tanımladıkları çalışmalarında, miRNA'ların transkripsiyon başlangıç bölgesine (TSS) olan uzaklıklarının birkaç yüz bazdan 20 kilobaza kadar ve hatta daha uzun olabildiğini belirtmişlerdir (Ozsolak vd. 2008). Bu bağlamda, insan genomunda lokasyonu bilinen pre-miRNA'ların 5' yönünde, yaklaşık 20 kb'a kadar olan bölgede ChIP-Seq sonucu belirlediğimiz p65 bağlanma bölgesi varsa bu bölgeyi o miRNA'nın potansiyel olarak promotoru tayin ettik. Bu şekilde tespit ettiğimiz miRNA'lar Tablo 4-2'de gösterilmiştir. Bu miRNA'ların, NF- $\kappa$ B (p65) tarafından düzenlenip düzenlenmediğini belirlemek için p65 siRNA transfekte edilmiş ve edilmemiş H1299 hücrelerini TNF- $\alpha$  ile muamele ederek seçtiğimiz miRNA'ların ekspresyon seviyelerini belirledik. Bu deney sonucunda, TNF- $\alpha$

muamelesi sonucunda miR-548as-3p, miR-8078, miR-1915-5p, miR-621, miR-1203'ün transkripsiyonlarının indüklendiğini, p65 siRNA varlığında ise TNF- $\alpha$  muamelesinin bu indüklenmeyi gerçekleştiremediğini tespit ettik (Şekil 4-7). Dolayısı ile miR-548as-3p, miR-8078, miR-1915-5p, miR-621, miR-1203'ün NF- $\kappa$ B tarafından düzenlenen miRNA'lar olduğunu saptadık. miR-3179'un TNF- $\alpha$  muamelesi sonucu ekspresyonunun azalması ve p65 siRNA varlığında TNF- $\alpha$ 'nın miR-3179'un ekspresyonunu baskılayıcı etkisinin aksine ekspresyon seviyesinin artması sonucunda, miR-3179'un NF- $\kappa$ B tarafından negatif yönde düzenleniyor olduğu sonucuna vardık.

miR-548as-3p, host geni Glypican Proteoglycan 5 (GPC5) olan ve 7 ile 8. ekzon arasında bulunan intragenik bir miRNA'dır. Genel olarak intronik miRNA'lar, host genleri ile ortak promotora sahiptirler ve birlikte transkribe olurlar. Bu doğrultuda, TNF- $\alpha$  indüksiyonu sonucu transkripsiyonu indüklenen miR-548as-3p'nin, host geni GPC5'in transkripsiyonunda TNF- $\alpha$ 'nın etkisi olup olmadığını araştırdık. Zamana bağlı olarak, TNF- $\alpha$  uygulaması sonucu miR-548as-3p'nin ekspresyonu artarken, GPC5'in ekspresyonunun azaldığını tespit ettik (Şekil 4-8). Bu sonuç, miR-548as-3p'nin host geni GPC5'ten bağımsız bir promotora sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan birçok araştırmada intronik miRNA'ların, host genlerinden bağımsız promotora sahip olduğunun saptanmış olması da, bu bulgumuzu desteklemektedir (Ozsolak vd. 2008, Steiman-Shimony vd. 2018). ChIP-Seq sonucu tespit ettiğimiz p65 bağlanma bölgesi pre-miR-548as'nin 5' yönünde ve yaklaşık 7 kb uzağındadır. Bu bölgenin bir promotor bölgesi olup olmadığını biyoenformatik araçlar kullanarak tahmin etmeyi amaçladık. Bilindiği gibi, miRNA'ların çoğu RNA Pol II tarafından transkribe olmaktadır. Her ne kadar RNA Pol III'te miRNA'ların transkripsiyonunda kullanılsa da, mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Ayrıca, her iki polimeraz da, globin genlerinde olduğu gibi aynı promotoru kullanabilmektedir (Carlson vd. 1983) ve RNA Pol III, transkripsiyon faktörleri tarafından aktive edilebilmektedir (Gomez-Roman vd. 2003, Reina vd. 2006). Bu bilgiler doğrultusunda, RNA Pol II promotolarının özelliklerini, miR-548as'nin promotorunu tahmin etmek için kullandık. RNA Pol II promotoları CpG adaları, transkripsiyon başlama bölgesi (TSS), korunmuş transkripsiyon faktör bağlanma bölgesi (TFBS), poli A sinyali ve TATA kutusu içermektedir (Fujita vd. 2008). USCS genome browser kullanarak ChIP-Seq bölgesini ve pre-miR-548as arasında kalan bölgeyi incelediğimizde, pre-miR-548as'nin 3' tarafında 5.557 baz uzağında TSS'si olan bir EST'nin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4-9). Bu bilgiler, miR-548as-3p'nin EST ile birlikte transkribe olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca, EST'ye ait TSS ile p65'in bağlandığı bölge arasında TATA kutusunun varlığını tespit ettik. Tüm bu deneysel veri ve biyoenformatik analizler sonucunda,



intronik miRNA sınıfında olan miR-548as'nin host geni ile ortak promotora sahip olmadığını ve CHIP-Seq deneyi sonucunda tespit ettiğimiz bölgenin miR-548as'nin promotörü olma potansiyeli taşıdığını belirledik. Bu tahminin doğrulanması için, bu bölgenin lusiferaz reporter vektörüne klonlanarak lusiferaz aktivitesi ölçümleri gerekmektedir.

miR-548as-3p, miR-548 ailesinin 74 üyesinden biridir. Literatürde, miR-548as-3p hakkında yapılan çalışmalarda UGT2B15 3'-UTR'sinde tanıma bölgesi olduğu lusiferaz deneyleriyle tespit edilmiştir (Papageorgiou vd. 2017). Ancak, miR-548as-3p'nin kanser ile ilişkisinin tespit edildiği bir çalışma bulunmamaktadır. miR-548 ailesi üyelerine bakıldığında, miR-548a-5p'nin *Tg737* genini hedefleyerek karaciğer karsinomunda apoptozu inhibe ederek proliferasyonu arttırdığı tespit edilmiştir (Zhao vd. 2016). miR-548c'nin, yumurtalık ve endometriyal kanserinde *Twist*'i downregüle ettiği, böylece invazyon ve metastaz üzerinde tümör baskılayıcı rolü tespit edilmiştir (Sun vd. 2016). Kolon kanserinde miR-548c-5p'nin, *PGK1*'i hedefleyerek proliferasyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Ge vd. 2019). Meme kanseri hastalarından elde edilen tümör dokularında gerçekleştirilen bir çalışmada, miR-548c-5p'nin ekspresyonunun hastaliksız sağlıklıyla ilişkisinin anlamlı olduğu bulunmuştur (Block vd. 2018). miR-548-3p'nin özofagus skuamoz karsinoma hücrelerinde, invazyon ve migrasyonu arttırdığı saptanmıştır (Ni vd. 2018). Meme kanserinde yapılan bir çalışmada miR-548j'nin, *Tensin1* genini hedefleyerek metastazı indüklediği bulunmuştur (Zhan vd. 2016). KHDAK'nde tespit edilen miR-548 ailesi üyelerinden miR-548e-5p'nin, *UBE2C* genini hedef alarak *ZEB1/2* aracılığıyla KHDAK proliferasyonu ve invazyonunu inhibe ettiği *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalarla gösterilmiştir (Jin vd. 2019). miR-548l'nin *AKT1*'i downregüle ederek KHDAK invazyon ve migrasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Liu vd. 2015).

miR-548as-3p'nin NF- $\kappa$ B tarafından regüle edildiğini tespit ettikten sonra, biyolojik süreçteki etkisini tespit edebilmek için hedef genini saptamayı amaçladık. 4 farklı hedef gen tahmini programları kullanarak *PTEN*'in, miR-548as-3p'nin hedef geni olma potansiyeli taşıdığını tespit ettik (Şekil 4-11). Bunu doğrulamak için öncelikle, miR-548as-3p'nin *PTEN* ekspresyonuna etkisini mRNA düzeyinde değerlendirdik. H1299 hücrelerine miR-548as-3p mimik ve inhibitörünü transfekte ederek *PTEN* ekspresyon seviyesinin, miR-548as-3p mimik transfekte edilenlerde azaldığını, miR-548as-3p'nin inhibitörünün transfekte edildiği hücrelerde arttığını gözlemledik (Şekil 4-13). miRNA'lar, kanser çeşitine göre farklı genleri hedefleyebilmektedirler. Hatta, aynı kanser çeşitinin farklı hücre hatlarında dahi farklı genleri hedef alabilmektedirler. Bundan dolayı, miR-548as-3p'nin *PTEN*'i hedef aldığını yalnızca H1299 hücrelerinde ve mRNA düzeyinde belirlediğimizden dolayı çalışmaya A549 KHDAK hücre hattını da dahil ederek, miR-548as-3p'nin *PTEN* ekspresyonuna etkisini protein

düzeyinde inceledik. H1299 ve A549 KHDAK hücre hatlarına miR-548as-3p mimik transfekte edildiğinde, miR-548as-3p'nin PTEN ekspresyonu azalttığını, miR-548as-3p inhibe edildiğinde, PTEN ekspresyonunun arttığını tespit ettik (Şekil 4-14). miR-548as-3p'nin, PTEN mRNA'sını doğrudan hedeflediğini tespit edebilmek için lusiferaz deneyleri gerçekleştirdik. Lusiferaz deneyi için öncelikle, miR-548as-3p tanıma bölgesini taşıyan *PTEN* geninin 3'UTR bölgesini, psi-CHECK2 lusiferaz gen reporter vektörüne klonladık (Şekil 4-20). Site-directed mutagenез yöntemiyle klonlanan vektörde miR-548as-3p tanıma dizisinin tamamında mutasyon oluşturduk (Şekil 4-23). Hem yabanıl tip hem de mutanat vektörü transfekte ettiğimiz, transfeksiyon verimliliği yüksek olan HEK293T hücre hatlarında miR-548as-3p mimiğin etkisini değerlendirdik. Yabanıl tip PTEN 3'UTR'sinin klonlandığı vektörün transfekte edildiği hücrelerde miR-548as-3p mimik, kontrol mimike oranla lusiferaz aktivitesini azaltırken mutant vektörün transfekte edildiği hücrelerde, kontrol mimike oranla lusiferaz aktivitesinde kayda değer bir değişime neden olmadığı saptandı (Şekil 4-24). miR-548as-3p'nin lusiferaz aktivitesi üzerindeki etkisinin, klonlanan PTEN 3'UTR'den kaynaklandığını göstermek için, deneye psiCHECK-2 boş vektörde dahil edildi. miR-548as-3p hedef gen çalışmaları, miR-548as-3p'nin hedef geninin PTEN olduğunu, aynı zamanda PTEN'i hedeflemesi tek bir hücre hattına bağlı olmadığını göstermiştir.

PI3K/AKT yolağının başlıca negatif düzenleyicisi olan PTEN, tüm kanserlerde p53'ten sonra mutasyonun görüldüğü en yaygın ikinci tümör baskılayıcı gendir (McLoughlin vd. 2018). PI3K/AKT yolağının sürekli aktive olduğu KHDAK tümörlerinin yaklaşık %70'inde PTEN protein ekspresyonu downregüledir. Çok çeşitli fizyolojik süreçlerde rol alan PI3K/AKT yolağının düzenleyicisi PTEN'in sıkı kontrol edildiği aşıkardır. Bu kontrol, transkripsiyon öncesi ve sonrası, translasyon sonrası olabilmektedir. Transkripsiyon sonrası miRNA aracılı negatif düzenleme, bu kontrolün önemli aşamalarından biridir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar PTEN'in birçok miRNA tarafından hedef alındığını göstermektedir. Yalnızca KHDAK ele alındığında, günümüze kadar miR-543, miR-1297, miR-205, miR-486-5p, miR-429, miR-374b, miR-4286, miR26a, miR-92a, miR-494, miR-130b, miR-221, miR-183-5p, miR-328, miR-29b, miR-106a, miR-21, miR-155, miR-93-5p, miR-130, miR-10a, miR-130b, miR-454'ün PTEN'i hedef aldığı tespit edilmiştir (Bi vd. 2016, Bu vd. 2017, Cai vd. 2013, Gao vd. 2018, Lang vd. 2014, Li vd. 2019, Ling vd. 2019, Liu vd. 2012, Lu vd. 2017, Mao vd. 2015, Miao vd. 2017, Ren vd. 2016, Wang vd. 2018, Wang vd. 2015, Wang vd. 2019, Wang vd. 2019, Wang vd. 2018, Xie vd. 2015, Xu vd. 2014, Xue vd. 2016, Yang vd. 2018, Ye vd. 2017, Yu vd. 2015, Zhang vd. 2018, Zhu vd. 2016). Daha önceki çalışmamızda PTEN overekspresyonunun, KHDAK hücrelerinin invazyon ve proliferasyonunu azalttığını tespit

etmiştik (Akca vd. 2011). Diğer çalışmalarda, miR-21 aracılığıyla PTEN downregülasyonu, KHDAK proliferasyonu ve invazyonunu indüklediği gösterilmiştir (Liu vd. 2013). PTEN'i hedef alan miR-93-5p'nin inhibe edilmesiyle KHDAK proliferasyon, migrasyon ve invazyonun azaldığı gösterilmiştir (Yang vd. 2018). Bu bağlamda, PTEN'i hedefleyen miR-548as-3p'nin KHDAK'ndeki fonksiyonunu belirlemek için, invazyon ve proliferasyon deneyleri gerçekleştirdik. H1299 ve A549 KHDAK hücre hatlarını kullanarak gerçekleştirdiğimiz deneylerde, miR-548as-3p mimik transfekte ettiğimiz her iki H1299 ve A549 hücre hattında da invazyonu anlamlı şekilde arttırdığını belirledik (Şekil 4-25). miR-548as-3p'nin invazyonu artırıcı etkisi, A549 hücrelerinde H1299'a göre yaklaşık 2 kat daha fazlaydı. Bunun sebebinin, H1299 ve A549 hücrelerindeki miR-548as-3p'nin hedef geni olan PTEN ekspresyon farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. H1299 hücreleri, diğer KHDAK hücre hatlarının çoğuna göre düşük bir PTEN ekspresyonuna sahiptir. A549 hücrelerinde, H1299 hücrelerine göre daha yüksek seviyede PTEN ekspresyonu olduğunu düşünürsek, miR-548as-3p'nin A549 hücrelerinin invazyon kapasitesi üzerine etkisinin daha çarpıcı şekilde olduğunu düşünmekteyiz. miR-548as-3p'nin inhibe edildiği her iki hücre hattında da invazyonun baskılandığını tespit ettik. miR-548as-3p mimikin hem H1299 hem de A549 hücrelerinin proliferasyonuna kayda değer bir etkisinin olmadığı görülmektedir (Şekil 4-26). miR-548as-3p'nin inhibisyonu sonucu H1299 ve A549 hücre proliferasyonu yaklaşık %20 civarında azalmıştır. PTEN'in proliferasyon üzerindeki etkisi göz önünde bulundurulduğunda, miR-548as-3p'nin PTEN'i downregüle ederek proliferasyonu arttırmasını beklerken kayda değer bir değişimin gözlenmemesi, miR-548as-3p'nin *PTEN* geninden başka hedef geni/genleri olduğunu düşündürmektedir. Bunu tespit etmek için mikroarray gibi genom ölçeğinde gerçekleştirilen tekniklerin kullanımı gerekmektedir.

miR-548as-3p transkripsiyonel aktivasyonun NF-κB tarafından gerçekleştirildiği ve miR-548as-3p'nin PTEN'i hedef aldığı sonuçları; TNF-α indüklü NF-κB aktivasyonu sonucu PTEN downregülasyonunun posttranskripsiyonel düzeyde miR-548as-3p tarafından gerçekleşiyor olduğunu göstermektedir. Bunu doğrulamak için gerçekleştirdiğimiz deneylerde, NF-κB'nin aktivasyonunu sağlayan TNF-α ile muamele edilen H1299 hücrelerinde PTEN seviyesi azalırken, bununla bağlantılı olarak p-AKT seviyesinin arttığını tespit ettik (Şekil 4-27). Aynı zamanda, NF-κB (p65)'i siRNA aracılığıyla knockdown ettiğimiz H1299 hücrelerinde PTEN protein ekspresyon seviyesinin arttığını, p-AKT seviyesinin azaldığını tespit ettik. p65'in knockdown edildiği grupta TNF-α varlığında PTEN'in downregüle olamadığını tespit ettik. Dolayısı ile, TNF-α'nın PTEN üzerindeki etkisinin NF-κB (p65) aktivasyonu ile gerçekleştirildiği sonucuna vardık. Bu sonuçlar doğrultusunda, NF-

κB tarafından upregüle edilen miR-548as-3p, PTEN'i hedef alıp PI3K/AKT/NF-κB yolağının aktivasyonunu sağlayarak *positive feedback loop* oluşturuyor olduğunu öngördük. Bunu değerlendirmek için, miR-548as-3p mimik ve inhibitörleri ve PTEN overekspresyon vektörü kullanarak H1299 hücrelerinde NF-κB lusiferaz aktivitesi deneyleri gerçekleştirdik. Öngördüğümüz gibi, miR-548as-3p'nin NF-κB lusiferaz aktivitesini arttırdığını, miR-548as-3p inhibisyonunun ve PTEN overekspresyonunun, NF-κB aktivitesini azalttığını tespit ettik (Şekil 4-28). PTEN-NF-κB zıt ilişkisi, tiroid kanseri fare modellerinde PTEN yoksunluğunda NF-κB aktivitesinin arttığını tespit edildiği araştırmada gösterilmiştir (Guigon vd. 2008). Elde ettiğimiz sonuçlara benzer bir çalışma pankreas kanseri hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. miR-301a'nın, NF-κB tarafından upregüle edilerek Nkrf'yi (NF-κB-repressing factor) downregüle ettiğini ve bunun sonucu olarak NF-κB aktivasyonunu artırarak *positive feedback loop* oluşturduğu gösterilmiştir (Lu vd. 2011). Bu çalışmada, bulgularımızı destekler niteliktedir.

Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümör dokudan, ikinci bir bölgeye yayılmasıdır. Metastaz, hayatı en çok tehdit eden patolojik olaylardan biridir. Metastazın moleküler mekanizması oldukça karışık olmakla birlikte, süreç 4 farklı adımda gerçekleşmektedir; i) primer tümörden hücrelerin ayrılması, ii) çevre dokuya invazyon, iii) Kan veya lenfatik damalara intravazasyon, iv) Kan veya lenfatik sistemde yayılma, v) Damar yolundan ekstravazasyon ve ikincil kısımda büyüme. Bu sürecin en önemli aşamaları, hücrelerin primer tümörden ayrılarak etrafındaki dokuya invaze olmasıdır. Bunun için, hücre-hücre bağlantılarının kopması, hücre-matriks adezyon bölgesinin yeniden düzenlenmesi ve tümör hücrelerinden enzimler salınarak ekstraselüler matriksin degradasyonu gerekmektedir. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) olarak adlandırılan bu süreç, kanser dışında embriyonik dönemde ve yara iyileşmesi durumlarında da görülen geri döndürülebilir bir prosestir. Epitel özelliklerin kaybolarak invaziv karaktere neden olan mezenkimal fenotipin kazanılmasıyla gerçekleşir. Tümör hücreleri ikincil bölgeye göç ettiğinde, Mezenkimal-Epitelyal Geçiş (MET) gerçekleşerek süreç tersine döner. Bu süreç oldukça kompleks bir mekanizmaya sahiptir. Genel olarak EMT mekanizması, hücre-hücre bağlantı proteini E-Kaderinin downregülasyonu, mezenkimal marker olan N-Kaderin ve Vimentin'in ve ekstraselüler matriksin degradasyonu için Matriks Metalloproteinazların upregülasyonu şeklindedir. Bu süreç geri döndürülebilir olduğundan Snail1, Slug, Twist1, Zeb1, Zeb2 gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilmektedir (Cano vd. 2000, Vandewalle vd. 2005, Zhu vd. 2016). EMT içsel ve dışsal uyarılarla uyarılabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, EMT'nin PI3K/AKT/NF-κB tarafından aktive edildiğini tespit etmiştir (Xu vd.

2015). PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının glioblastomada aktivasyonu Snail'i indükleyerek metastaza sebep olduğu saptanmıştır (Ji vd. 2018). Pankreas kanseri hücrelerinde, TNF- $\alpha$  indüklü NF- $\kappa$ B'nin Zeb1 ve Vimentin'i indükleyerek EMT'ye girdikleri gösterilmiştir (Maier vd. 2010). NF- $\kappa$ B'nin aracılı Zeb1'in upregülasyonu, A549 KHDAK hücrelerini EMT'ye geçişi sağlayarak invazyon ve metastazı indüklediği belirtilmiştir (Gu vd. 2015). NF- $\kappa$ B tarafından MMP9'un upregüle olduğu akciğer, boyun ve meme kanserinde tespit edilmiştir (Kao vd. 2012).

miR-548as-3p'nin PTEN'i hedef alıp PI3K/AKT yolağının aktive ederek NF- $\kappa$ B'nin sürekli aktivasyonu sağladığını saptamıştık. Bundan dolayı, miR-548as-3p'nin invazyonu indükleyici etkisinin NF- $\kappa$ B üzerinden gerçekleştiriyor olduğunu hipotez ettik. Bunun moleküler mekanizmasını saptamak için, yukarıda verdiğimiz bilgiler doğrultusunda Slug, Zeb1 ve MMP9'un ekspresyon seviyelerini inceledik. miR-548as-3p'nin bu genler üzerindeki etkisini incelemeye önce, miR-548as-3p'nin düzenleyicisi NF- $\kappa$ B'nin bu genlerin ekspresyonları üzerindeki etkisini değerlendirdik. PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının aktivasyonu için kullandığımız TNF- $\alpha$  ile indüklediğimiz H1299 hücrelerinde Slug, Zeb1 ve MMP9'un protein ekspresyonlarının arttığını tespit ettik (Şekil 4-29). TNF- $\alpha$  indüklü H1299 hücrelerinde bu etkinin NF- $\kappa$ B (p65) üzerinden olduğunu gösterebilmek için, p65'i siRNA aracılığıyla knockdown ettiğimizde Slug, Zeb1 ve MMP9 protein ekspresyonlarının azaldığını belirledik. p65 siRNA varlığında TNF- $\alpha$  uyguladığımızda Slug, Zeb1 ve MMP9 ekspresyon seviyelerindeki azalma etkisinin geri döndüğünü tespit ettik. Böylece, NF- $\kappa$ B'nin H1299 hücrelerinde Slug, Zeb1 ve MMP9 genlerini indüklediğini belirledik. miR-548as-3p'nin KHDAK invazyonunu indükleyici etkisini NF- $\kappa$ B'nin sürekli aktivasyonunu sağlayarak gerçekleştirdiği öngörümüzde. miR-548as-3p overeksprese edilen H1299 hücrelerinde, PTEN'in azaldığını ve AKT'nin aktive olduğunu göstererek Slug, Zeb1 ve MMP9'in ekspresyonlarının arttığını belirledik (Şekil 4-30). Bu sonuçları doğrulamak için, miR-548as-3p'yi inhibe ettiğimiz ve PTEN'i over eksprese ettiğimiz hücrelerde, PTEN ekspresyonunun artmasıyla AKT aktivasyonunun ve Slug, Zeb1, MMP9 ekspresyonlarının azaldığını saptadık. Böylece, miR-548as-3p'nin KHDAK invazyonunu indükleyici etkisini, PTEN'i hedef alarak PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının sürekli aktive olmasını sağlayıp Slug, Zeb1 ve MMP9'in ekspresyonlarını artırarak gösterdiğini tespit etmiş olduk.

miR-548as-3p'nin invazyona olan etkisini klinik olarak incelemek için, metastatik tanı almış ve almamış olan KHDAK hastalarının primer tümör dokularından elde ettiğimiz örneklerde miR-548as-3p ve PTEN'in ekspresyon seviyesini inceledik. miR-548as-3p'nin ekspresyonu metastatik tanı almış olan örneklerde (n=11), metastatik tanı almamış olanlara

(n=14) göre yüksek seviyede olduğunu tespit ettik ( $P=0.0067$ ) (Şekil 4-31). Aynı hasta doku örneklerinde, PTEN'in ekspresyonunun beklenildiği gibi, metastatik tanı almamış hasta doku örneklerinde metastatik tanı alanlara göre yüksek seviyede olduğunu gördük ( $P=0.01$ ). miR-548as-3p ve PTEN ekspresyonları aynı hasta doku örneklerinde karşılaştırıldığında aralarında negatif korelasyon olduğunu belirledik (Şekil 4-32).

Gerek *in vitro* gerek klinik verilerden elde ettiğimiz sonuçlarda, PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B/miR-548as-3p ekseninde miR-548as-3p'nin, PTEN'i hedef alarak PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B sinyal yolağının sürekli aktif olmasında rol oynadığını saptadık. Bu rolü ile, NF- $\kappa$ B tarafından düzenlenen ve EMT sürecinde rol oynayan Zeb1, Slug ve MMP9'un upregüle olmasına katkı sağlayarak KHDAK karsinogenezini arttırdığını belirledik. Ayrıca miR-548as-3p'nin, miR-548 ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak onkogenik bir rol oynadığını ve KHDAK progresyonunu indüklediğini tespit etmiş olduk. Böylece, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının kontrolü için yepyeni bir mekanizma bulmuş olduk (Şekil 5-1).

NF- $\kappa$ B tarafından düzenlendiğini tespit ettiğimiz bir diğer miRNA, miR-8078 için literatür taramamız sonucunda, melanoma hastalarından elde ettikleri dokularda miR-8078'in metastatik olan dokularda metastatik olmayanlara göre yüksek seviyede eksprese olduğu tespit edildiğini gördük (Mikkelsen vd. 2019). miR-8078 hakkında KHDAK dahil diğer kanserlerdeki fonksiyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlamadık.

miR-8078, intergenik bir miRNA olduğundan dolayı kendisine ait promotor bölgesine sahiptir. CHIP-Seq sonucu elde ettiğimiz sekans sonuçlarında, okunan bölgenin pre-miR-8078'i kapsadığını USCS genome browser kullanarak tespit ettik (Şekil 4-33). Ayrıca, pre-miR-8078 ve CHIP-Seq sonucu okunan bölgeyi kapsayan bir CpG adalarının varlığını belirledik. CpG adalarının olması bu bölgenin promotor olma ihtimalini arttırmaktadır. Ancak, bunu deneysel olarak tespit etmek gerektiğinden, bu bölgenin lusiferaz reporter vektörüne klonlanarak lusiferaz deneyleri gerçekleştirilerek doğrulanması gerekmektedir.

KHDAK'ndeki rolünü tespit etmek için öncelikle miR-8078'in hedef genini, biyoformatik analizlerle bulmayı amaçladık. Kullandığımız 4 farklı miRNA hedef gen bulma programda, ortak olarak GREB1'in miR-8078'in hedefi olma potansiyeli taşıdığını belirledik (Şekil 4-34). Bu sonucu doğrulamak için gerçekleştirdiğimiz real-time PCR deneylerinde, miR-8078 ile transfekte ettiğimiz H1299 hücrelerinde GREB1 mRNA ekspresyon seviyesinde bir değişiklik olmadığını gördük (Şekil 4-35). miR-8078'in hedef geni tespit etmek için biyoformatik analizlerden sonuç elde edemediğimiz için mikroarray deneyleri gerçekleştirdik. miR-8078 mimik'in transfekte edildiği H1299 hücrelerinde, kontrole

oranla 26 genin ekspresyonunun değiştiğini ve bu genlerden yalnızca WASH1, C2CD2, CRCP ve TELO2'in ekspresyonunun azaldığını tespit ettik (şekil 4-36). Ekspresyonu azalan bu 4 genden yalnızca C2CD2 ve CRCP'nin 3'UTR bölgesinde miR-8078'in tanıma dizisi olduğunu belirledik (şekil 4-37) ve WASH1 ve TELO2 genlerini eledik. Bir genin miRNA tarafından hedeflendiğini tespit etmek için, genin mRNA'sının 3'UTR bölgesini lusiferaz reporter vektörüne klonlayarak lusiferaz deneyleri gerçekteştirmek gerekmektedir. Klonlama çalışmalarının zaman, iç gücü ve maliyet açısından yüksek olmasından dolayı miRNA'nın aday hedef sayısını daraltmak ve klonlama çalışmaları öncesi, olası her teyit yöntemini kullanmak önem arz etmektedir. Bundan dolayı, mikroarray analiz sonuçlarında belirlediğimiz C2CD2 ve CRCP genlerini teyit etmek için gerçekteştirdiğimiz real-time PCR deneylerinde, miR-8078 mimik transfekte edilen hücrelerde C2CD2 mRNA ekspresyonu azalırken CRCP'nin ekspresyonunda bir değişiklik olmadığını belirledik (şekil 4-38). miR-8078 transkripsiyonu TNF- $\alpha$  tarafından indüklenmektedir (şekil 4-7). Dolayısı ile miR-8078'in hedef geninin, TNF- $\alpha$  muamelesi sonucu ekspresyonunun azalması gerektiğinden C2CD2 ve CRCP'nin ekspresyon seviyelerini TNF- $\alpha$  indüklü H1299 hücrelerinde değerlendirdik. C2CD2'nin ekspresyonu azalırken CRCP'nin ekspresyonunda değişiklik gözlemlenmedi (şekil 4-39). Hem miR-8078 transfekte edildiğinde hem de TNF- $\alpha$  ile muamele edildiğinde C2CD2'nin ekspresyonu azalırken CRCP'nin ekspresyonunda bir değişiklik olmaması, CRCP'nin elenmesine C2CD2'nin de hedef gen olma potansiyelini arttırmaya neden olmuştur. miRNA'ların başlıca fonksiyonu translasyonun inhibisyonu olduğundan dolayı mRNA düzeyinde elde ettiğimiz sonuçları, protein ekspresyonu düzeyinde de elde etmek gerekmektedir. Bu etkinin yalnızca H1299 KHDAK hücresine özgü olmadığını araştırmak için çalışmaya A549 hücre hattını da dahil ederek western blot deneyleri gerçekteştirdik. miR-8078 mimik transfekte ettiğimiz H1299 ve A549 hücre hatlarında C2CD2'nin protein ekspresyon seviyesinin hem 24. hem de 48. saatlerde azaldığını belirledik (şekil 4-39). Klonlama öncesi farklı yöntemlerle C2CD2'nin kuvvetle muhtemel miR-8078'in hedef geni olduğunu belirlemiş olduk. Bunu doğrulamak için, C2CD2'nin miR-8078 tanıma dizisi taşıyan 3'UTR bölgesini psiCHECK-2 lusiferaz reporter vektörüne klonladık (şekil 4-45). Ayrıca, site-directed mutagenesis yöntemiyle klonlanan vektörde miR-8078 tanıma dizisinin tamamında mutasyon oluşturduk (şekil 4-48). Hem yabani tip hem de mutant vektörü transfekte ettiğimiz HEK293T hücre hatlarında miR-8078 mimik, C2CD2 3'UTR'sinin klonlandığı yabani tip vektörün transfekte edildiği hücrelerde lusiferaz aktivitesini azaltırken miR-8078 tanıma dizisinin mutant olduğu vektörün transfekte edildiği hücrelerde lusiferaz aktivitesinde kayda değer bir değişime neden olmadığını tespit

ettik (Şekil 4-49). Bu sonuçlar, miR-8078'in doğrudan hedefinin C2CD2 olduğunu ve bu etkinin tek bir hücreye bağlı olmadığını göstermektedir.

miR-8078'in NF-κB (p65) tarafından düzenlendiği sonucundan yola çıkarak, NF-κB'nin C2CD2'nin ekspresyonuna etkisini değerlendirdik. NF-κB aktivasyonu için TNF-α, NF-κB'yi overeksprese etmek için p65 vektörü, p65'i knockdown etmek için p65 siRNA kullanarak C2CD2'nin ekspresyonunu western blot yöntemi ile belirledik. TNF-α indüklü H1299 hücrelerinde C2CD2'nin mRNA düzeyinde ekspresyonunun azaldığını, miR-8078'in hedef genini tespit etme çalışmalarında belirlemiştik. Protein düzeyindeki ekspresyonda mRNA düzeyindeki sonuçlarla paralel olarak TNF-α uygulanmasıyla C2CD2'nin ekspresyonu azaldığını gösterdik (Şekil 4-50). p65 overeksprese ettiğimiz H1299 hücrelerinde C2CD2'nin ekspresyonunun azaldığını p65'in knockdown edilmesiyle C2CD2'nin ekspresyonunun arttığını belirledik. Bu veriler doğrultusunda, TNF-α indüklü NF-κB aktivasyonu ile gerçekleştirilen C2CD2 downregülasyonunda miR-8078'in aracılık ettiği sonucunu çıkardık.

Bilindiği gibi miRNA'lar hücreSEL fonksiyona etkilerini, hedefledikleri genlerin translasyonel olarak baskılayarak gerçekleştirmektedirler. miR-8078'in KHDAK'ndeki rolünü tespit etmek için, C2CD2'nin hücreSEL süreçteki rolünü tespit etmek gerekmektedir. Literatür araştırmalarımızda 696 aminoasitten oluşan C2CD2'nin, plazma membran proteini olmasının dışında fonksiyonu hakkında herhangi bir bilgiye rastlamadık. Huttlin ve arkadaşlarının *high-throughput affinity-purification* kütle spektrometresi ile HEK293T hücrelerini kullanarak protein-protein etkileşimlerini tespit etmek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarında, C2CD2'nin Rho GTPaz aktive edici protein 10 (ARHGAP10) ile etkileştiğini tespit etmişler (Huttlin vd. 2015). Rho GTPaz aktive edici protein ailesi üyesi olan ARHGAP10'un yumurtalık kanserinde downregüle olduğunu ve yumurtalık kanser hücrelerinin tümör oluşumunu baskıladığı bildirilmiştir (Luo vd. 2016). Akciğer kanseri ile ilgili yapılan bir çalışmada, ARHGAP10'un ekspresyonunun akciğer tümör dokularında normal dokulara göre düşük seviyede olduğunu göstermişlerdir (Teng vd. 2017). Aynı çalışmada, A549 ve H460 KHDAK hücre hatlarında ARHGAP10'un overekspresyonunun hücre proliferasyon, invazyon ve migrasyonu azalttığını tespit ederek tümör baskılayıcı bir rolü olduklarını belirtmişlerdir. C2CD2'nin ARHGAP10 ile etkileştiği bilgisinden yola çıkarak miR-8078'in KHDAK'ndeki biyoloji etkisini araştırmak için H1299 ve A549 hücre hatlarını kullanarak proliferasyon, invazyon ve migrasyon deneyleri gerçekleştirdik. miR-8078 mimik, H1299 ve A549 hücre hatlarında invazyonu artırırken migrasyonda bir değişikliğe neden olmadığını gözlemledik (Şekil 4-51). Schaeffer ve arkadaşlarının, EMT sonrası invazyon ve migrasyon arasındaki ilişkiyi anlamak için yapmış oldukları *in vivo* ve *in vitro* deneylerde,

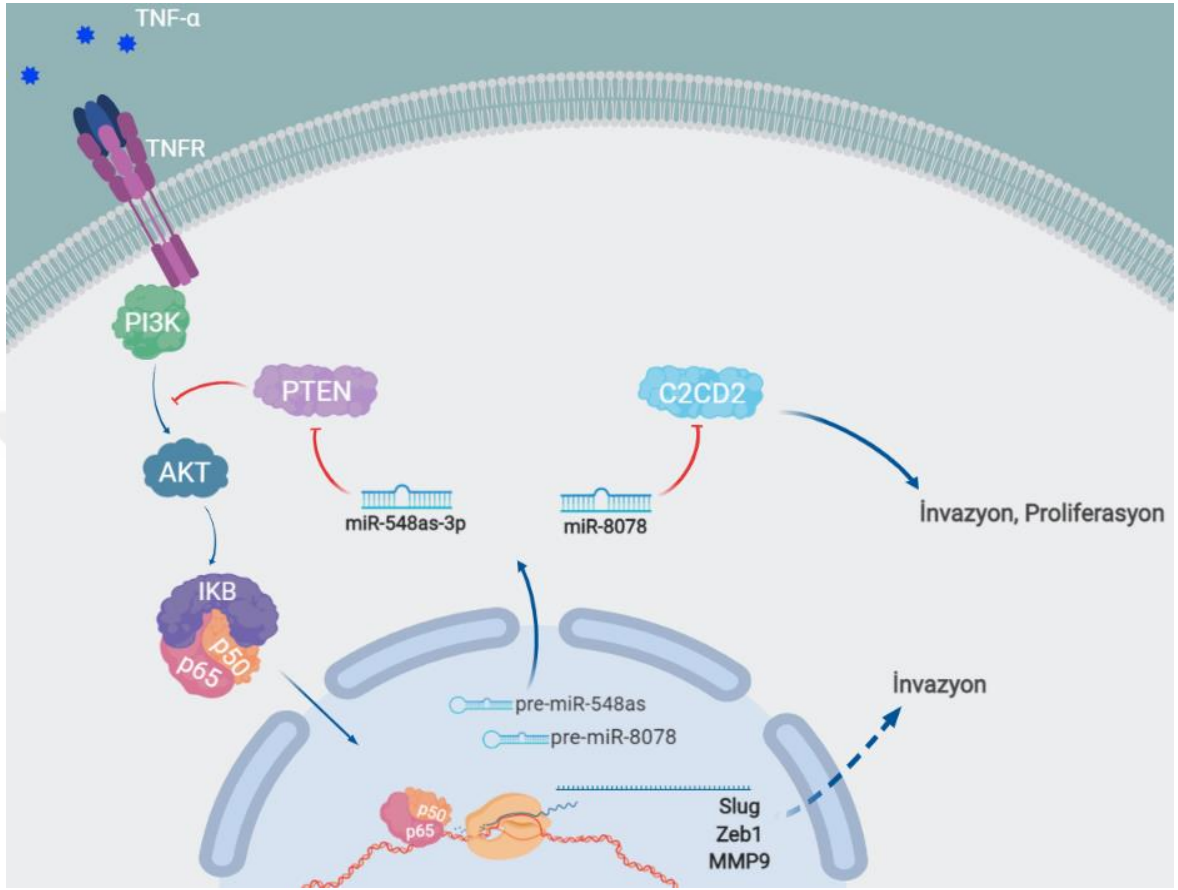


karsinom ilişkili EMT süresince migrasyon ve invazyonun ayrı olabileceğini belirtmişlerdir (Schaeffer vd. 2014). Nitekim, kolon kanseri hücrelerinde  $\alpha$ -kateninin hücre migrasyonu için gerekliken invazyon için gerekli olmadığı tespit edildiği çalışma, migrasyon ve invazyonun ayrı olabileceğini desteklemektedir (Andre vd. 2004). Hücre migrasyonunda herhangi bir etkisi olmayan miR-8078, H1299 ve A549 hücre hatlarında proliferasyonu arttırmaktadır (Şekil 4-52). Bu sonuçlar, miR-8078'in KHDAK hücre hatlarının invazyon ve proliferasyonunu arttırdığından dolayı onkogenik bir miRNA olduğunu göstermektedir. Ayrıca, miR-8078'in bu etkiyi C2CD2'yi downregüle ederek gerçekleştirmesi; C2CD2'nin KHDAK'nde tümör baskılayıcı görevi sonucunu doğurmuştur. C2CD2'nin invazyondaki rolünün aydınlatılması için daha ileriki çalışmalara ihtiyaç vardır.

miR-8078'in *in vitro* yaklaşımla tespit ettiğimiz invazyonu indükleyici etkisinin klinik önemini değerlendirmek için, metastatik tanı almış ve almamış olan KHDAK hastalarının primer tümör dokularında real-time PCR ile ekspresyon çalışmaları yaptık. miR-8078 ve hedef geni C2CD2'nin ekspresyon düzeyini değerlendirdik. Metastatik tanı almış olan hastalarda (n=12) miR-8078'in, metastatik tanı almamış hastalara (n=14) göre yüksek düzeyde eksprese olduğunu saptadık ( $P=0.0094$ ) (Şekil 4-51). C2CD2'nin ekspresyonunun ise, metastatik tanı almamış hastalarda (n=9), metastatik tanı almış olanlara (n=6) göre yüksek seviyede olduğunu belirledik ( $P=0.049$ ). Aynı hasta doku örnekleri karşılaştırıldığında, miR-8078 ve C2CD2'nin ekspresyonları aralarında anlamlı bir korelasyona rastlamadık.

*In vitro* ve klinik veriler sonucunda, TNF- $\alpha$  indüklü NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile upregüle olan miR-8078'in, KHDAK invazyon ve proliferasyonunu arttırdığını ve KHDAK hastalarında metastaz ile ilişkili onkogenik bir miRNA olduğunu saptamış olduk. Sonuçlarımızda, miR-8078'in KHDAK hücre hatlarındaki invazyon ve proliferasyona etkisini C2CD2'yi downregüle ederek gerçekleştiriyor olduğu görülmektedir (Şekil 5-1). Ayrıca, kanserde fonksiyonu hakkında literatürde herhangi bir bilgi bulunmayan C2CD2'nin, KHDAK'nde tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı görülmektedir. Bu sonucu teyit için daha fazla deneysel araştırmaya ihtiyaç vardır.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, TNF $\alpha$  indüklü PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B yolağının sürekli aktivasyonu sonucu upregüle olan miR-548as-3p ve miR-8078'in, KHDAK karsinogenezinde rol oynadığı mekanizmanın tespit edilmesi, akciğer kanseri ile mücadele için yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.



**Şekil 5-1.** miR-548as-3p ve miR-8078'in KHDAC progresyonunda rol aldığı mekanizmanın gösterimi.

## 6. SONUÇLAR

1. TNF- $\alpha$ , H1299 KHDAK hücrelerinde AKT'yi aktive ederek NF- $\kappa$ B'nin DNA bağlanma kapasitesini arttırmaktadır.
2. miR-548as-3p, miR-8078, miR-621, miR-1203, miR-1915-5p NF- $\kappa$ B tarafından pozitif olarak düzenlenirken miR-3179 negatif olarak düzenlenmektedir.
3. İntronik olan miR-548as-3p host geni olan GPC5'ten bağımsız bir promotora sahiptir. ChIP-Seq yöntemi ile p65'in bağlandığını tespit ettiğimiz bölgenin pre-miR-548as'nin 5' tarafında yaklaşık 7131 baz uzağında yer aldığı ve bu bölgenin büyük olasılıkla miR-548as'nin promotor bölgesidir. Bunu teyit etmek için, daha ileri deneysel araştırmalara ihtiyaç vardır.
4. miR-548as-3p, H1299 ve A549 KHDAK hücre hatlarında PTEN'i hedef alarak KHDAK invazyonunu arttırmaktadır. miR-548as-3p'nin A549 invazyon kapasitesini H1299'a göre 2 kat daha fazla arttırmıştır. Proliferasyon yeteneğinde değişiklik olmaması, miR-548as-3p'nin farklı hedeflerinin olduğunu düşündürmektedir.
5. NF- $\kappa$ B tarafından upregüle olan miR-548as-3p, PTEN'i downregüle ederek PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B aktivasyonunu sağlayıp *positive feedback loop* oluşturmaktadır. Böylece, NF- $\kappa$ B'nin sürekli aktivasyonunu sağlamaktadır.
6. miR-548as-3p'nin invazyonu arttırıcı etkisini; EMT sürecinde görev alan Zeb1, Slug ve MMP9'u upregüle eden NF- $\kappa$ B'yi aktive ederek gerçekleştirmektedir.
7. miR-548as-3p, metastatik tanı almış olan KHDAK hastalarının primer tümör dokularında, metastatik tanı almamış olanlara göre daha yüksek seviyede eksprese olmaktadır. PTEN'de bu durum tersidir. Aynı hasta dokularında miR-548as-3p-PTEN arasında negatif korelasyon bulunmaktadır.
8. İntergenik olan miR-8078, kendi promotoruna sahiptir. ChIP-Seq yöntemi ile p65 bağlanma motifinin olduğu bölgeyi ve pre-miR-8078'i kapsayan bir CpG adaları bulunmaktadır. Bu bölge muhtemelen miR-8078'in promotor bölgesidir. Bunu doğrulamak için, daha ileri deneysel araştırmalara ihtiyaç vardır.
9. miR-8078 C2CD2'yi hedef alarak KHDAK invazyonu ve proliferasyonunu arttırmakta, migrasyona bir etkisi olmamıştır.
10. NF- $\kappa$ B tarafından gerçekleşen C2CD2 downregülasyonu miR-8078 aracılığıyla gerçekleşmektedir.
11. miR-8078'in ekspresyon seviyesi, metastatik tanı almış olan KHDAK hastalarının tümör dokularında, metastatik tanı almamış olanlara göre yüksek seviyededir.

12. KHDAK'nde miR-8078 onkogenik bir rol oynarken C2CD2'nin tümör baskılayıcı bir gen olduğu öngörülmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

Aggarwal B B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. **Cancer Cell** 2004; 6 (3): 203-208.

Akca H, Demiray A, Tokgun O, Yokota J. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells. **Lung Cancer** 2011; 73 (3): 302-309.

Alessi D R, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings B A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. **The EMBO journal** 1996; 15 (23): 6541-6551.

Ameres S L, Zamore P D. Diversifying microRNA sequence and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2013; 14: 475.

Andre F, Janssens B, Bruyneel E, van Roy F, Gespach C, Mareel M, Bracke M. Alpha-catenin is required for IGF-I-induced cellular migration but not invasion in human colonic cancer cells. **Oncogene** 2004; 23 (6): 1177-1186.

Backer J M. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. **Biochem J** 2008; 410 (1): 1-17.

Bai D, Ueno L, Vogt P K. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. **International journal of cancer** 2009; 125 (12): 2863-2870.

Balsara B R, Pei J, Mitsuuchi Y, Page R, Klein-Szanto A, Wang H, Unger M, Testa J R. Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. **Carcinogenesis** 2004; 25 (11): 2053-2059.

Barbie D A, Tamayo P, Boehm J S, Kim S Y, Moody S E, Dunn I F, Schinzel A C, Sandy P, Meylan E, Scholl C, Frohling S, Chan E M, Sos M L, Michel K, Mermel C, Silver S J, Weir B A, Reiling J H, Sheng Q, Gupta P B, Wadlow R C, Le H, Hoersch S, Wittner B S, Ramaswamy S, Livingston D M, Sabatini D M, Meyerson M, Thomas R K, Lander E S, Mesirov J P, Root D E, Gilliland D G, Jacks T, Hahn W C. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. **Nature** 2009; 462 (7269): 108-112.

Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell** 2004; 116 (2): 281-297.

Bartel D P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell** 2009; 136 (2): 215-233.

Bartel D P. Metazoan MicroRNAs. **Cell** 2018; 173 (1): 20-51.

Basseres D S, Ebbs A, Levantini E, Baldwin A S. Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. **Cancer Res** 2010; 70 (9): 3537-3546.

Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. **Genes & Development** 2006; 20 (14): 1885-1898.

Bellacosa A, Kumar C C, Di Cristofano A, Testa J R. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. **Adv Cancer Res** 2005; 94: 29-86.

Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, Hannon G J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature** 2001; 409 (6818): 363-366.

Bi M, Chen W, Yu H, Wang J, Ding F, Tang D J, Tang C. miR-543 is up-regulated in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer and promotes cell proliferation and invasion via phosphatase and tensin homolog. **Biochem Biophys Res Commun** 2016; 480 (3): 369-374.

Bieler G, Hasmmim M, Monnier Y, Imaizumi N, Ameyar M, Bamat J, Ponsonnet L, Chouaib S, Grell M, Goodman S L, Lejeune F, Ruegg C. Distinctive role of integrin-mediated adhesion in TNF-induced PKB/Akt and NF-kappaB activation and endothelial cell survival. **Oncogene** 2007; 26 (39): 5722-5732.

Block I, Burton M, Sørensen K P, Andersen L, Larsen M J, Bak M, Cold S, Thomassen M, Tan Q, Kruse T A. Association of miR-548c-5p, miR-7-5p, miR-210-3p, miR-128-3p with recurrence in systemically untreated breast cancer. **Oncotarget** 2018; 9 (10): 9030-9042.

Borchert G M, Lanier W, Davidson B L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nat Struct Mol Biol** 2006; 13 (12): 1097-1101.

Braun J E, Zekri L, Nishihara T, Izaurralde E. miRISC recruits decapping factors to miRNA targets to enhance their degradation. **Nucleic Acids Research** 2013; 41 (18): 8692-8705.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R L, Torre L A, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** 2018; 68 (6): 394-424.

Bu W, Luo T. miR-1297 Promotes Cell Proliferation of Non-Small Cell Lung Cancer Cells: Involving in PTEN/Akt/Skp2 Signaling Pathway. **DNA Cell Biol** 2017; 36 (11): 976-982.

Cai J, Fang L, Huang Y, Li R, Yuan J, Yang Y, Zhu X, Chen B, Wu J, Li M. miR-205 targets PTEN and PHLPP2 to augment AKT signaling and drive malignant phenotypes in non-small cell lung cancer. **Cancer Res** 2013; 73 (17): 5402-5415.

Cai X, Hagedorn C H, Cullen B R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **RNA** 2004; 10 (12): 1957-1966.

Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce C M. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99 (24): 15524-15529.

Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce C M. Human microRNA genes are frequently located at fragile

sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 (9): 2999-3004.

Cano A, Perez-Moreno M A, Rodrigo I, Locascio A, Blanco M J, del Barrio M G, Portillo F, Nieto M A. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2 (2): 76-83.

Carlson D P, Ross J. Human beta-globin promoter and coding sequences transcribed by RNA polymerase III. *Cell* 1983; 34 (3): 857-864.

Carracedo A, Pandolfi P P. The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 2008; 27: 5527.

Chang T C, Wentzel E A, Kent O A, Ramachandran K, Mullendore M, Lee K H, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein C J, Arking D E, Beer M A, Maitra A, Mendell J T. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007; 26 (5): 745-752.

Chekulaeva M, Mathys H, Zipprich J T, Attig J, Colic M, Parker R, Filipowicz W. miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4–NOT through conserved W-containing motifs. *Nature Structural & Molecular Biology* 2011; 18: 1218.

Chen F, Lu Y, Zhang Z, Vallyathan V, Ding M, Castranova V, Shi X. Opposite effect of NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase on p53-independent GADD45 induction by arsenite. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276 (14): 11414-11419.

Chen G, Bhojani M S, Heaford A C, Chang D C, Laxman B, Thomas D G, Griffin L B, Yu J, Coppola J M, Giordano T J, Lin L, Adams D, Orringer M B, Ross B D, Beer D G, Rehemtulla A. Phosphorylated FADD induces NF-kappaB, perturbs cell cycle, and is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102 (35): 12507-12512.

Chen W, Li Z, Bai L, Lin Y. NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 2011; 16: 1172-1185.

Chendrimada T P, Gregory R I, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; 436 (7051): 740-744.

Chua H L, Bhat-Nakshatri P, Clare S E, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. NF-κB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 2006; 26: 711.

Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, Iorio M V, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik S E, Aqeilan R I, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C G, Kipps T J, Negrini M, Croce C M. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102 (39): 13944-13949.

Datta S R, Brunet A, Greenberg M E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 13 (22): 2905-2927.

Dong P, Konno Y, Watari H, Hosaka M, Noguchi M, Sakuragi N. The impact of microRNA-mediated PI3K/AKT signaling on epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness in endometrial cancer. *J Transl Med* 2014; 12: 231.

Du L, Schageman J J, Irnov, Girard L, Hammond S M, Minna J D, Gazdar A F, Pertsemlidis A. MicroRNA expression distinguishes SCLC from NSCLC lung tumor cells and suggests a possible pathological relationship between SCLCs and NSCLCs. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 75.

Durand J K, Baldwin A S. Targeting IKK and NF-kappaB for Therapy. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2017; 107: 77-115.

Emmendoerffer A, Hecht M, Boeker T, Mueller M, Heinrich U. Role of inflammation in chemical-induced lung cancer. *Toxicol Lett* 2000; 112-113: 185-191.

Fabian M R, Cieplak M K, Frank F, Morita M, Green J, Srikumar T, Nagar B, Yamamoto T, Raught B, Duchaine T F, Sonenberg N. miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nature Structural & Molecular Biology* 2011; 18: 1211.

Fabian M R, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19 (6): 586-593.

Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings B A. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2004; 279 (39): 41189-41196.

Fong Y-C, Liu S-C, Huang C-Y, Li T-M, Hsu S-F, Kao S-T, Tsai F-J, Chen W-C, Chen C-Y, Tang C-H. Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the alphavbeta3 integrin/FAK/Akt and NF-kappaB-dependent pathway. *Lung Cancer* 2009; 64 (3): 263-270.

Fujita S, Iba H. Putative promoter regions of miRNA genes involved in evolutionarily conserved regulatory systems among vertebrates. *Bioinformatics* 2008; 24 (3): 303-308.

Fukao A, Mishima Y, Takizawa N, Oka S, Imataka H, Pelletier J, Sonenberg N, Thoma C, Fujiwara T. MicroRNAs Trigger Dissociation of eIF4A1 and eIF4AII from Target mRNAs in Humans. *Molecular Cell* 2014; 56 (1): 79-89.

Gao Z J, Yuan W D, Yuan J Q, Yuan K, Wang Y. miR-486-5p functions as an oncogene by targeting PTEN in non-small cell lung cancer. *Pathol Res Pract* 2018; 214 (5): 700-705.

Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh S S, Ngankeu A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P, Gasparini P, Gonelli A, Costinean S, Acunzo M, Condorelli G, Croce C M. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell* 2009; 16 (6): 498-509.

Ge J, Li J, Na S, Wang P, Zhao G, Zhang X. miR-548c-5p inhibits colorectal cancer cell proliferation by targeting PGK1. *J Cell Physiol* 2019.



- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell** 2002; 109 Suppl: S81-96.
- Ghosh S, May M J, Kopp E B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu Rev Immunol** 1998; 16: 225-260.
- Gibbons D L, Lin W, Creighton C J, Rizvi Z H, Gregory P A, Goodall G J, Thilaganathan N, Du L, Zhang Y, Pertsemliadis A, Kurie J M. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. **Genes Dev** 2009; 23 (18): 2140-2151.
- Gilmore T D. The Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction pathway and cancer. **Cancer Treat Res** 2003; 115: 241-265.
- Giraldez A J, Mishima Y, Rihel J, Grocock R J, Van Dongen S, Inoue K, Enright A J, Schier A F. Zebrafish MiR-430 Promotes Deadenylation and Clearance of Maternal mRNAs. **Science** 2006; 312 (5770): 75-79.
- Gomez-Roman N, Grandori C, Eisenman R N, White R J. Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. **Nature** 2003; 421 (6920): 290-294.
- Gregory R I, Yan K-p, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature** 2004; 432 (7014): 235-240.
- Grivennikov S I, Greten F R, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell** 2010; 140 (6): 883-899.
- Gu K, Li M-M, Shen J, Liu F, Cao J-Y, Jin S, Yu Y. Interleukin-17-induced EMT promotes lung cancer cell migration and invasion via NF-kB/ZEB1 signal pathway. **American journal of cancer research** 2015; 5 (3): 1169-1179.
- Guigon C J, Zhao L, Willingham M C, Cheng S Y. PTEN deficiency accelerates tumour progression in a mouse model of thyroid cancer. **Oncogene** 2008; 28: 509.
- Guo D, Donner D B. Tumor Necrosis Factor Promotes Phosphorylation and Binding of Insulin Receptor Substrate 1 to Phosphatidylinositol 3-Kinase in 3T3-L1 Adipocytes. **Journal of Biological Chemistry** 1996; 271 (2): 615-618.
- Gustin J A, Ozes O N, Akca H, Pincheira R, Mayo L D, Li Q, Guzman J R, Korgaonkar C K, Donner D B. Cell type-specific expression of the I kappa B kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF-kappa B activation. **J Biol Chem** 2004; 279 (3): 1615-1620.
- Hatley M E, Patrick D M, Garcia M R, Richardson J A, Bassel-Duby R, van Rooij E, Olson E N. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. **Cancer Cell** 2010; 18 (3): 282-293.
- Hausser J, Zavolan M. Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression. **Nat Rev Genet** 2014; 15 (9): 599-612.
- Hayden M S, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev** 2004; 18 (18): 2195-2224.

Hendrickson D G, Hogan D J, McCullough H L, Myers J W, Herschlag D, Ferrell J E, Brown P O. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol* 2009; 7 (11): e1000238.

Hennessy B T, Smith D L, Ram P T, Lu Y, Mills G B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4 (12): 988-1004.

Henson E S, Gibson S B. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal* 2006; 18 (12): 2089-2097.

Herbst R S, Heymach J V, Lippman S M. Lung cancer. *N Engl J Med* 2008; 359 (13): 1367-1380.

Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 1999; 19 (4): 2690-2698.

Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* 2011; 12: 99.

Huttlin E L, Ting L, Bruckner R J, Gebreab F, Gygi M P, Szpyt J, Tam S, Zarraga G, Colby G, Baltier K, Dong R, Guarani V, Vaites L P, Ordureau A, Rad R, Erickson B K, Wühr M, Chick J, Zhai B, Kolippakkam D, Mintseris J, Obar R A, Harris T, Artavanis-Tsakonas S, Sowa M E, De Camilli P, Paulo J A, Harper J W, Gygi S P. The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell* 2015; 162 (2): 425-440.

Ipsaro J J, Joshua-Tor L. From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nature Structural & Molecular Biology* 2015; 22: 20.

Iwasaki S, Kawamata T, Tomari Y. Drosophila Argonaute1 and Argonaute2 Employ Distinct Mechanisms for Translational Repression. *Molecular Cell* 2009; 34 (1): 58-67.

Janssens S, Tschopp J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death Differ* 2006; 13 (5): 773-784.

Jeon Y J, Middleton J, Kim T, Lagana A, Piovan C, Secchiero P, Nuovo G J, Cui R, Joshi P, Romano G, Di Leva G, Lee B K, Sun H L, Kim Y, Fadda P, Alder H, Garofalo M, Croce C M. A set of NF-kappaB-regulated microRNAs induces acquired TRAIL resistance in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112 (26): E3355-3364.

Jin D, Guo J, Wu Y, Du J, Wang X, An J, Hu B, Kong L, Di W, Wang W. UBE2C, Directly Targeted by miR-548e-5p, Increases the Cellular Growth and Invasive Abilities of Cancer Cells Interacting with the EMT Marker Protein Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1/2 in NSCLC. *Theranostics* 2019; 9 (7): 2036-2055.

Jin X, Wang Z, Qiu L, Zhang D, Guo Z, Gao Z, Deng C, Wang F, Wang S, Guo C. Potential biomarkers involving IKK/RelA signal in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2008; 99 (3): 582-589.

Johnson C D, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack F J. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. **Cancer Res** 2007; 67 (16): 7713-7722.

Josse C, Bouznad N, Geurts P, Irrthum A, Huynh-Thu V A, Servais L, Hego A, Delvenne P, Bours V, Oury C. Identification of a microRNA landscape targeting the PI3K/Akt signaling pathway in inflammation-induced colorectal carcinogenesis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2014; 306 (3): G229-243.

Ju W, Wang X, Shi H, Chen W, Belinsky S A, Lin Y. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. **Molecular pharmacology** 2007; 71 (5): 1381-1388.

Kao S J, Su J L, Chen C K, Yu M C, Bai K J, Chang J H, Bien M Y, Yang S F, Chien M H. Osteonin inhibits the invasive ability of human lung adenocarcinoma cells via suppression of NF-kappaB-mediated matrix metalloproteinase-9 expression. **Toxicol Appl Pharmacol** 2012; 261 (1): 105-115.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. **Annu Rev Immunol** 2000; 18: 621-663.

Karin M, Greten F R. NF-[kappa]B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nat Rev Immunol** 2005; 5 (10): 749-759.

Karin M, Greten F R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nat Rev Immunol** 2005; 5 (10): 749-759.

Karin M, Lin A. NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. **Nature Immunology** 2002; 3: 221.

Kawamata T, Tomari Y. Making RISC. **Trends in Biochemical Sciences** 2010; 35 (7): 368-376.

Kim D, Sung Y M, Park J, Kim S, Kim J, Park J, Ha H, Bae J Y, Kim S, Baek D. General rules for functional microRNA targeting. **Nature Genetics** 2016; 48: 1517.

Korpál M, Ell B J, Buffa F M, Ibrahim T, Blanco M A, Celia-Terrassa T, Mercatali L, Khan Z, Goodarzi H, Hua Y, Wei Y, Hu G, Garcia B A, Ragoussis J, Amadori D, Harris A L, Kang Y. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. **Nat Med** 2011; 17 (9): 1101-1108.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic Acids Res** 2011; 39 (Database issue): D152-157.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science** 2001; 294 (5543): 853-858.

Lang Y, Xu S, Ma J, Wu J, Jin S, Cao S, Yu Y. MicroRNA-429 induces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer cells and targets multiple tumor suppressor genes. **Biochem Biophys Res Commun** 2014; 450 (1): 154-159.

- Langer C J, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria J-C. The Evolving Role of Histology in the Management of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. **Journal of Clinical Oncology** 2010; 28 (36): 5311-5320.
- Lee R C, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science** 2001; 294 (5543): 862-864.
- Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell** 1993; 75 (5): 843-854.
- Lee Y, Jeon K, Lee J T, Kim S, Kim V N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **Embo j** 2002; 21 (17): 4663-4670.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K H, Lee S, Baek S H, Kim V N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO Journal** 2004; 23 (20): 4051-4060.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K H, Lee S, Baek S H, Kim V N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **Embo j** 2004; 23 (20): 4051-4060.
- Li C-W, Xia W, Huo L, Lim S-O, Wu Y, Hsu J L, Chao C-H, Yamaguchi H, Yang N-K, Ding Q, Wang Y, Lai Y-J, LaBaff A M, Wu T-J, Lin B-R, Yang M-H, Hortobagyi G N, Hung M-C. Epithelial-mesenchyme transition induced by TNF- $\alpha$  requires NF- $\kappa$ B mediated transcriptional upregulation of Twist1. **Cancer Research** 2012; canres.3123.2011.
- Li F, Sethi G. Targeting transcription factor NF- $\kappa$ B to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. **Biochim Biophys Acta** 2010; 1805 (2): 167-180.
- Li J, Jia H, Xie L, Wang X, Wang X, He H, Lin Y, Hu L. Association of constitutive nuclear factor- $\kappa$ B activation with aggressive aspects and poor prognosis in cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2009; 19 (8): 1421-1426.
- Li J, Zhou Z, Xu F C, Li J, Zeng D, Cao X Q, Han Y. MicroRNA-374b accelerates the development of lung cancer through downregulating PTEN expression via activating PI3K/Akt pathway. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 2019; 23 (3): 1116-1124.
- Liao Y, Hung M-C. Physiological regulation of Akt activity and stability. **American journal of translational research** 2010; 2 (1): 19-42.
- Lin C W, Chang Y L, Chang Y C, Lin J C, Chen C C, Pan S H, Wu C T, Chen H Y, Yang S C, Hong T M, Yang P C. MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. **Nat Commun** 2013; 4: 1877.
- Lin S, Gregory R I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nat Rev Cancer** 2015; 15 (6): 321-333.
- Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S. The NF- $\kappa$ B activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. **Expert opinion on therapeutic targets** 2010; 14 (1): 45-55.

Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S. The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. **Expert Opin Ther Targets** 2010; 14 (1): 45-55.

Ling C, Wang X, Zhu J, Tang H, Du W, Zeng Y, Sun L, Huang J A, Liu Z. MicroRNA-4286 promotes cell proliferation, migration, and invasion via PTEN regulation of the PI3K/Akt pathway in non-small cell lung cancer. **Cancer Med** 2019.

Liu B, Wu X, Liu B, Wang C, Liu Y, Zhou Q, Xu K. MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN. **Biochim Biophys Acta** 2012; 1822 (11): 1692-1704.

Liu C, Yang H, Xu Z, Li D, Zhou M, Xiao K, Shi Z, Zhu L, Yang L, Zhou R. microRNA-548l is involved in the migration and invasion of non-small cell lung cancer by targeting the AKT1 signaling pathway. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology** 2015; 141 (3): 431-441.

Liu P, Cheng H, Roberts T M, Zhao J J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. **Nat Rev Drug Discov** 2009; 8 (8): 627-644.

Liu X, Sempere L F, Ouyang H, Memoli V A, Andrew A S, Luo Y, Demidenko E, Korc M, Shi W, Preis M, Dragnev K H, Li H, Drenzo J, Bak M, Freemantle S J, Kauppinen S, Dmitrovsky E. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors. **J Clin Invest** 2010; 120 (4): 1298-1309.

Liu Z L, Wang H, Liu J, Wang Z X. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. **Mol Cell Biochem** 2013; 372 (1-2): 35-45.

Lu C, Shan Z, Hong J, Yang L. MicroRNA-92a promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in non-small cell lung cancer metastasis. **Int J Oncol** 2017; 51 (1): 235-244.

Lu Z, Li Y, Takwi A, Li B, Zhang J, Conklin D J, Young K H, Martin R, Li Y. miR-301a as an NF-kB activator in pancreatic cancer cells. **The EMBO Journal** 2011; 30 (1): 57-67.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg J E, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science** 2004; 303 (5654): 95-98.

Luo L, Zhang T, Liu H, Lv T, Yuan D, Yao Y, Lv Y, Song Y. MiR-101 and Mcl-1 in non-small-cell lung cancer: expression profile and clinical significance. **Med Oncol** 2012; 29 (3): 1681-1686.

Luo N, Guo J, Chen L, Yang W, Qu X, Cheng Z. ARHGAP10, downregulated in ovarian cancer, suppresses tumorigenicity of ovarian cancer cells. **Cell Death & Disease** 2016; 7: e2157.

Lytle J R, Yario T A, Steitz J A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104 (23): 9667-9672.

Madge L A, Pober J S. A Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway, Activated by Tumor Necrosis Factor or Interleukin-1, Inhibits Apoptosis but Does Not Activate NF $\kappa$ B in Human Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275 (20): 15458-15465.

Maehama T, Dixon J E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; 273 (22): 13375-13378.

Manning B D, Cantley L C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007; 129 (7): 1261-1274.

Mao G, Liu Y, Fang X, Liu Y, Fang L, Lin L, Liu X, Wang N. Tumor-derived microRNA-494 promotes angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Angiogenesis* 2015; 18 (3): 373-382.

McLoughlin N M, Mueller C, Grossmann T N. The Therapeutic Potential of PTEN Modulation: Targeting Strategies from Gene to Protein. *Cell Chem Biol* 2018; 25 (1): 19-29.

Memmott R M, Dennis P A. The role of the Akt/mTOR pathway in tobacco carcinogen-induced lung tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 2010; 16 (1): 4-10.

Meylan E, Dooley A L, Feldser D M, Shen L, Turk E, Ouyang C, Jacks T. Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* 2009; 462 (7269): 104-107.

Miao Y, Zheng W, Li N, Su Z, Zhao L, Zhou H, Jia L. MicroRNA-130b targets PTEN to mediate drug resistance and proliferation of breast cancer cells via the PI3K/Akt signaling pathway. *Sci Rep* 2017; 7: 41942.

Mikkelsen L H, Andersen M K, Andreasen S, Larsen A C, Tan Q, Toft P B, Wadt K, Heegaard S. Global microRNA profiling of metastatic conjunctival melanoma. *Melanoma Res* 2019.

Miranda K C, Huynh T, Tay Y, Ang Y S, Tam W L, Thomson A M, Lim B, Rigoutsos I. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006; 126 (6): 1203-1217.

Naidu S, Shi L, Magee P, Middleton J D, Laganá A, Sahoo S, Leong H S, Galvin M, Frese K, Dive C, Guzzardo V, Fassan M, Garofalo M. PDGFR-modulated miR-23b cluster and miR-125a-5p suppress lung tumorigenesis by targeting multiple components of KRAS and NF-kB pathways. *Scientific Reports* 2017; 7 (1): 15441.

Ni X F, Zhao L H, Li G, Hou M, Su M, Zou C L, Deng X. MicroRNA-548-3p and MicroRNA-576-5p enhance the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells via NRIP1 down-regulation. *Neoplasia* 2018; 65 (6): 881-887.

Nidai Ozes O, Mayo L D, Gustin J A, Pfeffer S R, Pfeffer L M, Donner D B. NF-kB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999; 401: 82.

Nishimura T, Padamsi Z, Fakim H, Milette S, Dunham Wade H, Gingras A-C, Fabian Marc R. The eIF4E-Binding Protein 4E-T Is a Component of the mRNA Decay Machinery that Bridges the 5' and 3' Termini of Target mRNAs. *Cell Reports* 2015; 11 (9): 1425-1436.

O'Donnell K A, Wentzel E A, Zeller K I, Dang C V, Mendell J T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. **Nature** 2005; 435 (7043): 839-843.

Okamura K, Hagen J W, Duan H, Tyler D M, Lai E C. The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in Drosophila. **Cell** 2007; 130 (1): 89-100.

Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. **Nat Rev Immunol** 2003; 3 (4): 317-330.

Ørom U A, Nielsen F C, Lund A H. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. **Molecular Cell** 2008; 30 (4): 460-471.

Ozsolak F, Poling L L, Wang Z, Liu H, Liu X S, Roeder R G, Zhang X, Song J S, Fisher D E. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. **Genes Dev** 2008; 22 (22): 3172-3183.

Papageorgiou I, Court M H. Identification and validation of the microRNA response elements in the 3'-untranslated region of the UDP glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 and 2B15 genes by a functional genomics approach. **Biochem Pharmacol** 2017; 146: 199-213.

Perez-Ramirez C, Canadas-Garre M, Molina M A, Faus-Dader M J, Calleja-Hernandez M A. PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer. **Pharmacogenomics** 2015; 16 (16): 1843-1862.

Pincheira R, Castro A F, Ozes O N, Idumalla P S, Donner D B. Type 1 TNF Receptor Forms a Complex with and Uses Jak2 and c-Src to Selectively Engage Signaling Pathways That Regulate Transcription Factor Activity. **The Journal of Immunology** 2008; 181 (2): 1288-1298.

Place R F, Li L-C, Pookot D, Noonan E J, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 2008; 105 (5): 1608-1613.

Reina J H, Azzouz T N, Hernandez N. Maf1, a new player in the regulation of human RNA polymerase III transcription. **PLoS One** 2006; 1: e134.

Ren P, Gong F, Zhang Y, Jiang J, Zhang H. MicroRNA-92a promotes growth, metastasis, and chemoresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. **Tumour Biol** 2016; 37 (3): 3215-3225.

Salmena L, Carracedo A, Pandolfi P P. Tenets of PTEN Tumor Suppression. **Cell** 2008; 133 (3): 403-414.

Schaeffer D, Somarelli J A, Hanna G, Palmer G M, Garcia-Blanco M A. Cellular Migration and Invasion Uncoupled: Increased Migration Is Not an Inexorable Consequence of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. **Molecular and Cellular Biology** 2014; 34 (18): 3486-3499.

Schanen B C, Li X. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. **Genomics** 2011; 97 (1): 1-6.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46 (5): 705-716.

Shan N, Shen L, Wang J, He D, Duan C. MiR-153 inhibits migration and invasion of human non-small-cell lung cancer by targeting ADAM19. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 456 (1): 385-391.

Shi Z M, Wang L, Shen H, Jiang C F, Ge X, Li D M, Wen Y Y, Sun H R, Pan M H, Li W, Shu Y Q, Liu L Z, Peiper S C, He J, Jiang B H. Downregulation of miR-218 contributes to epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis in lung cancer by targeting Slug/ZEB2 signaling. *Oncogene* 2017; 36 (18): 2577-2588.

Shih V F-S, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NF $\kappa$ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell research* 2011; 21 (1): 86-102.

Shin V Y, Jin H, Ng E K, Cheng A S, Chong W W, Wong C Y, Leung W K, Sung J J, Chu K M. NF-kappaB targets miR-16 and miR-21 in gastric cancer: involvement of prostaglandin E receptors. *Carcinogenesis* 2011; 32 (2): 240-245.

Shukla S, MacLennan G T, Hartman D J, Fu P, Resnick M I, Gupta S. Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion. *International Journal of Cancer* 2007; 121 (7): 1424-1432.

Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady R S, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62 (4): 220-241.

Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66 (1): 7-30.

Smith C J, Perfetti T A, King J A. Perspectives on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers. *Inhal Toxicol* 2006; 18 (9): 667-677.

Staal S P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84 (14): 5034-5037.

Steck P A, Pershouse M A, Jasser S A, Yung W K, Lin H, Ligon A H, Langford L A, Baumgard M L, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng D H, Tavtigian S V. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15 (4): 356-362.

Steiman-Shimony A, Shtrikman O, Margalit H. Assessing the functional association of intronic miRNAs with their host genes. *RNA (New York, N.Y.)* 2018; 24 (8): 991-1004.

Su H, Meng S, Lu Y, Trombly Melanie I, Chen J, Lin C, Turk A, Wang X. Mammalian hyperplastic discs Homolog EDD Regulates miRNA-Mediated Gene Silencing. *Molecular Cell* 2011; 43 (1): 97-109.



Sun G, Ding X, Bi N, Wang Z, Wu L, Zhou W, Zhao Z, Wang J, Zhang W, Fan J, Zhang W, Dong X, Lv N, Song Y, Zhan Q, Wang L. Molecular predictors of brain metastasis-related microRNAs in lung adenocarcinoma. ***PLoS Genet*** 2019; 15 (2): e1007888.

Sun X, Cui M, Zhang A, Tong L, Wang K, Li K, Wang X, Sun Z, Zhang H. MiR-548c impairs migration and invasion of endometrial and ovarian cancer cells via downregulation of Twist. ***Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*** 2016; 35 (1): 10.

Sun Y, Ai X, Shen S, Lu S. NF-kappaB-mediated miR-124 suppresses metastasis of non-small-cell lung cancer by targeting MYO10. ***Oncotarget*** 2015; 6 (10): 8244-8254.

Sun Y, Fang R, Li C, Li L, Li F, Ye X, Chen H. Hsa-mir-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression in vitro. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2010; 396 (2): 501-507.

Suzuki H I, Katsura A, Yasuda T, Ueno T, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K. Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. ***Nature Structural & Molecular Biology*** 2015; 22: 512.

Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, Broide D H, Karin M. Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. ***Cancer Cell*** 2010; 17 (1): 89-97.

Takahashi R, Sonoda Y, Ichikawa D, Yoshida N, Eriko A Y, Tadashi K. Focal adhesion kinase determines the fate of death or survival of cells in response to TNFalpha in the presence of actinomycin D. ***Biochim Biophys Acta*** 2007; 1770 (4): 518-526.

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada K M. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. ***Science*** 1998; 280 (5369): 1614-1617.

Teng J-P, Yang Z-Y, Zhu Y-M, Ni D, Zhu Z-J, Li X-Q. The roles of ARHGAP10 in the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells. ***Oncology letters*** 2017; 14 (4): 4613-4618.

Travis W D, Brambilla E, Nicholson A G, Yatabe Y, Austin J H M, Beasley M B, Chirieac L R, Dacic S, Duhig E, Flieder D B, Geisinger K, Hirsch F R, Ishikawa Y, Kerr K M, Noguchi M, Pelosi G, Powell C A, Tsao M S, Wistuba I. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. ***Journal of Thoracic Oncology*** 2015; 10 (9): 1243-1260.

Tsurutani J, Castillo S S, Brognard J, Granville C A, Zhang C, Gills J J, Sayyah J, Dennis P A. Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells. ***Carcinogenesis*** 2005; 26 (7): 1182-1195.

Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Berx G. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. ***Nucleic Acids Res*** 2005; 33 (20): 6566-6578.

Verma I M, Stevenson J K, Schwarz E M, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kappa B/ kappa B family: intimate tales of association and dissociation. **Genes Dev** 1995; 9 (22): 2723-2735.

Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2 (7): 489-501.

Wang C, Wang S, Ma F, Zhang W. miRNA328 overexpression confers cisplatin resistance in nonsmall cell lung cancer via targeting of PTEN. **Mol Med Rep** 2018; 18 (5): 4563-4570.

Wang H, Guan X, Tu Y, Zheng S, Long J, Li S, Qi C, Xie X, Zhang H, Zhang Y. MicroRNA-29b attenuates non-small cell lung cancer metastasis by targeting matrix metalloproteinase 2 and PTEN. **J Exp Clin Cancer Res** 2015; 34: 59.

Wang H, Ma Z, Liu X, Zhang C, Hu Y, Ding L, Qi P, Wang J, Lu S, Li Y. MiR-183-5p is required for non-small cell lung cancer progression by repressing PTEN. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 2019; 111: 1103-1111.

Wang H, Ma Z, Liu X, Zhang C, Hu Y, Ding L, Qi P, Wang J, Lu S, Li Y. MiR-183-5p is required for non-small cell lung cancer progression by repressing PTEN. **Biomed Pharmacother** 2019; 111: 1103-1111.

Wang H, Wang H S, Zhou B H, Li C L, Zhang F, Wang X F, Zhang G, Bu X Z, Cai S H, Du J. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF-alpha requires AKT/GSK-3beta-mediated stabilization of snail in colorectal cancer. **PLoS One** 2013; 8 (2): e56664.

Wang N, Zhu C, Xu Y, Qian W, Zheng M. Negative Regulation of PTEN by MicroRNA-221 and Its Association with Drug Resistance and Cellular Senescence in Lung Cancer Cells. **Biomed Res Int** 2018; 2018: 7908950.

WEB\_1. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/>, (son güncelleme tarihi: 1.09.2018, alındığı tarih: 1.02. 2019).

WEB\_2. miRBase. <http://www.mirbase.org/>, (son güncelleme tarihi: 1.10.2018, alındığı tarih: 1.12. 2015).

WEB\_3. JASPAR. <http://jaspar.genereg.net/>, (son güncelleme tarihi: 4.06.2018, alındığı tarih: 13.11. 2016).

WEB\_4. GeneXplain platform: TRANSFAC database., <http://genexplain.com/transfac/>, (son güncelleme tarihi: 1.02.2018, alındığı tarih: 13.11. 2016).

WEB\_5. TargetScan. [http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/), (son güncelleme tarihi: 1.03.2018, alındığı tarih: 1.12. 2015).

WEB\_6. miRWalk. [http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=miroT\\_CDS/index](http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=miroT_CDS/index), (son güncelleme tarihi: 15.02.2016 alındığı tarih: 1.12. 2015).

WEB\_7. miRTarBase. <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>, (son güncelleme tarihi: 15.09.2017, alındığı tarih: 1.12. 2015).

WEB\_8. miRDB <http://mirdb.org/>, (son güncelleme tarihi: 22.01.2019, alındığı tarih: 1.12.2015).

WEB\_9. NCBI Primer BLAST. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome), (son güncelleme tarihi: 17.10.2019, alındığı tarih: 10.01.2018).

WEB\_10. psiCHECK™-2 vector. <https://worldwide.promega.com/products/rna-purification-and-analysis/rna-interference/psicheck-1-and-psicheck-2-vectors/?catNum=C8021>, (son güncelleme tarihi: 1.01.2019, alındığı tarih: 25.02.2019).

WEB\_11. bioRENDER. <https://biorender.com/>, (son güncelleme tarihi: 01.01.2019, alındığı tarih: 01.02.2019).

WEB\_12. UCSC genome browser. <https://genome.ucsc.edu/>, (son güncelleme tarihi: 06.06.2019, alındığı tarih: 06.05.2019).

Wegiel B, Bjartell A, Culig Z, Persson J L. Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer* 2008; 122 (7): 1521-1529.

Wei Q, Li Y X, Liu M, Li X, Tang H. MiR-17-5p targets TP53INP1 and regulates cell proliferation and apoptosis of cervical cancer cells. *IUBMB Life* 2012; 64 (8): 697-704.

Wong K K, Jacks T, Dranoff G. NF-kappaB fans the flames of lung carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3 (4): 403-405.

Xie X, Liu H T, Mei J, Ding F B, Xiao H B, Hu F Q, Hu R, Wang M S. miR-106a promotes growth and metastasis of non-small cell lung cancer by targeting PTEN. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8 (4): 3827-3834.

Xu L-f, Wu Z-p, Chen Y, Zhu Q-s, Hamidi S, Navab R. MicroRNA-21 (miR-21) Regulates Cellular Proliferation, Invasion, Migration, and Apoptosis by Targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in Lung Squamous Carcinoma, Gejiu City, China. *PLOS ONE* 2014; 9 (8): e103698.

Xue M, Cheng Y, Han F, Chang Y, Yang Y, Li X, Chen L, Lu Y, Sun B, Chen L. Triptolide Attenuates Renal Tubular Epithelial-mesenchymal Transition Via the MiR-188-5p-mediated PI3K/AKT Pathway in Diabetic Kidney Disease. *International journal of biological sciences* 2018; 14 (11): 1545-1557.

Xue X, Liu Y, Wang Y, Meng M, Wang K, Zang X, Zhao S, Sun X, Cui L, Pan L, Liu S. MiR-21 and MiR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN. *Oncotarget* 2016; 7 (51): 84508-84519.

Yang W, Bai J, Liu D, Wang S, Zhao N, Che R, Zhang H. MiR-93-5p up-regulation is involved in non-small cell lung cancer cells proliferation and migration and poor prognosis. *Gene* 2018; 647: 13-20.

Ye L, Wang Y, Nie L, Qian S, Xu M. MiR-130 exerts tumor suppressive function on the tumorigenesis of human non-small cell lung cancer by targeting PTEN. *Am J Transl Res* 2017; 9 (4): 1856-1865.

Yi R, Qin Y, Macara I G, Cullen B R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17 (24): 3011-3016.

Yu T, Liu L, Li J, Yan M, Lin H, Liu Y, Chu D, Tu H, Gu A, Yao M. MiRNA-10a is upregulated in NSCLC and may promote cancer by targeting PTEN. *Oncotarget* 2015; 6 (30): 30239-30250.

Yuan Y, Du W, Wang Y, Xu C, Wang J, Zhang Y, Wang H, Ju J, Zhao L, Wang Z, Lu Y, Cai B, Pan Z. Suppression of AKT expression by miR-153 produced anti-tumor activity in lung cancer. *Int J Cancer* 2015; 136 (6): 1333-1340.

Yun F, Jia Y, Li X, Yuan L, Sun Q, Yu H, Shi L, Yuan H. Clinicopathological significance of PTEN and PI3K/AKT signal transduction pathway in non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2013; 6 (10): 2112-2120.

Zang Y S, Zhong Y F, Fang Z, Li B, An J. MiR-155 inhibits the sensitivity of lung cancer cells to cisplatin via negative regulation of Apaf-1 expression. *Cancer Gene Ther* 2012; 19 (11): 773-778.

Zekri L, Kuzuoğlu-Öztürk D, Izaurralde E. GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *The EMBO Journal* 2013; 32 (7): 1052-1065.

Zha J, Lackner M R. Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2010; 16 (9): 2512-2517.

Zhan Y, Liang X, Li L, Wang B, Ding F, Li Y, Wang X, Zhan Q, Liu Z. MicroRNA-548j functions as a metastasis promoter in human breast cancer by targeting Tensin1. *Molecular Oncology* 2016; 10 (6): 838-849.

Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw M S, Giannakakis A, Liang S, Naylor T L, Barchetti A, Ward M R, Yao G, Medina A, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty P A, Weber B L, Coukos G. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103 (24): 9136-9141.

Zhang Q, Zhang B, Sun L, Yan Q, Zhang Y, Zhang Z, Su Y, Wang C. MicroRNA-130b targets PTEN to induce resistance to cisplatin in lung cancer cells by activating Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Biochem Funct* 2018; 36 (4): 194-202.

Zhang X, Liu S, Hu T, Liu S, He Y, Sun S. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression. *Hepatology* 2009; 50 (2): 490-499.

Zhang Y-K, Zhu W-Y, He J-Y, Chen D-D, Huang Y-Y, Le H-B, Liu X-G. miRNAs expression profiling to distinguish lung squamous-cell carcinoma from adenocarcinoma subtypes. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2012; 138 (10): 1641-1650.

Zhao G, Wang T, Huang Q-K, Pu M, Sun W, Zhang Z-C, Ling R, Tao K-S. MicroRNA-548a-5p promotes proliferation and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by targeting Tg737. **World journal of gastroenterology** 2016; 22 (23): 5364-5373.

Zhong H, May M J, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. **Mol Cell** 2002; 9 (3): 625-636.

Zhou H, Rigoutsos I. MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells. **RNA** 2014.

Zhu D Y, Li X N, Qi Y, Liu D L, Yang Y, Zhao J, Zhang C Y, Wu K, Zhao S. MiR-454 promotes the progression of human non-small cell lung cancer and directly targets PTEN. **Biomed Pharmacother** 2016; 81: 79-85.

Zhu Q Q, Ma C, Wang Q, Song Y, Lv T. The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. **Tumour Biol** 2016; 37 (1): 185-197.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Şakir AKGÜN 1982 yılında Bursa'da doğdu. İlkokulu ve Ortaokulu Yalova Gaziosmanpaşa Okulunda, Liseyi AKSA Anadolu Teknik Lisesinde okudu. Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2008 yılında mezun oldu. Yüksek Lisansını 2011 yılında Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Biyoloji Anabilim Dalı'nda tamamladı. 2013 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Evlidir.



## 9. EKLER

Ek-1

Psychiatry Research 245 (2016) 200–206



Contents lists available at ScienceDirect

Psychiatry Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/psychres](http://www.elsevier.com/locate/psychres)



### miR-181b-5p, miR-195-5p and miR-301a-3p are related with treatment resistance in schizophrenia



Huseyin Alacam<sup>a,\*</sup>, Sakir Akgun<sup>b,1</sup>, Hakan Akca<sup>b</sup>, Onder Ozturk<sup>c</sup>, Burge Basay Kabukcu<sup>c</sup>, Hasan Herken<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey

<sup>b</sup> Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey

<sup>c</sup> Department of Child and Adolescent Psychiatry, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 6 February 2016

Received in revised form

5 May 2016

Accepted 11 August 2016

Available online 12 August 2016

##### Keywords:

Schizophrenia

Treatment-resistant schizophrenia

miR-181b-5p

miR-195-5p

miR301a-3p

#### ABSTRACT

The aim of the study was to determine the differences between expression levels of certain miRNAs, as their association with schizophrenia has been well presented in the literature, and to investigate their relation to treatment resistance in schizophrenic patients. Three groups were formed: 1) treatment-resistant group, 2) treatment responsive group and 3) healthy control group. Expression levels of miRNAs from peripheral blood samples were determined by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). We investigated the roles of 29 schizophrenia-related miRNAs in schizophrenia treatment and their potentials to be considered as indicators. Among these miRNAs, only miR-181b-5p, miR-195-5p and miR-301a-3p expressions were found to be significantly different between the treatment-resistant group and the group responding well to the treatment. miRNAs may cause resistance by silencing the receptor genes of the drugs used for schizophrenia treatment. miR-181b-5p, miR-195-5p and miR-301a-3p may be candidate indicators that can be used to reveal resistance against schizophrenia treatment.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Schizophrenia is a mental disorder in which the affected person becomes distanced to real world and creates an idiosyncratic world and significant changes are observed in emotion, thought and behavior (Ozturk, 1990). Incidence of schizophrenia, a brain disorder considered being of organic and psychosocial origin, within society is between 0.5% and 1% (Tandon et al., 2008). Pregnancy and birth, gender and age, infection and immune system, autoimmune diseases, ethnic origin, stimulant substance use and genetic factors are among the most significant risk factors for schizophrenia (Kinney et al., 2010; Watkins and Andrews, 2015).

Whereas complete remission is observed in 10–20% of schizophrenic patients, partial remission is observed in 30% of the patients (Lieberman and Murray, 2012). At least half of the patients do not respond to treatment and the disease may progress further (Lieberman and Murray, 2012). Polymorphism/mutations in receptor/signal transduction molecules that are the target of treatment medication, and/or increased expression of transport

proteins that move the drug out of the cell are among known molecular mechanisms of treatment resistance (Longley and Johnston, 2005). Ota et al. (2012) represented that DRD1 rs4532 polymorphism showed a dose-response gradient with increased risk for treatment resistance and may be a potential pharmacogenetic marker for antipsychotic drug treatment response. Zhang et al. (2013) represented that Val66Met polymorphism in brain derived neurotrophic factor (BDNF), which is associated with many neurotransmitters, can cause resistance against schizophrenia treatment by adversely affecting the intracellular traffic of proBDNF. In addition to these data, factors regulating the expression of molecules mediating the effect of the drug are also considered to be mediating the development of resistance. The role of microRNA (miRNA), which takes part in regulation of the gene expression, in development of resistance against chemotherapeutics was clearly shown in cancer treatment (Qian et al., 2015). Similar to this resistance observed in cancer treatment, miRNA is also considered to be causing treatment resistance in schizophrenic patients.

miRNAs, containing approximately 20–25 nucleotides, are a large class of small endogenous RNA molecules (Kim, 2005). miRNAs, like other genes, are transcribed from DNA and, before being transformed into proteins, they participate in regulation of gene expression in the form of small RNA molecules (Kozomara

\* Corresponding author.

E-mail address: [d.huseyinalacam@hotmail.com](mailto:d.huseyinalacam@hotmail.com) (H. Alacam).

<sup>1</sup> These two authors are equal as the first author. They spent same amount of labor.

## ORIGINAL ARTICLE

## TGF- $\beta$ –SMAD–miR-520e axis regulates NSCLC metastasis through a TGFBR2-mediated negative-feedback loop

Hakan Kucuksayan, Sakir Akgun, Osman Nidai Ozes<sup>1</sup>, Arsenal Sezgin Alikanoglu<sup>2</sup>, Mustafa Yildiz<sup>3</sup>, Egemen Dal<sup>4</sup> and Hakan Akca\*

Medical Biology Department, School of Medicine, Pamukkale University, Kinikli, Denizli, Turkey, <sup>1</sup>ALTAY Biopharma, San Bruno, CA, USA, <sup>2</sup>Pathology Department and <sup>3</sup>Medical Oncology, Antalya Training and Research Hospital, Antalya, Turkey and <sup>4</sup>Faculty of Medicine, Pamukkale University, Kinikli, Denizli, Turkey

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +905388638078; Fax: +902582963968; Email: hakca@pau.edu.tr

### Abstract

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pathway plays crucial roles during the carcinogenesis and metastasis. TGF- $\beta$  receptor 2 (TGFBR2) is a key molecule for the regulation of TGF- $\beta$  pathway and frequently downregulated or lost in several cancer types including non-small cell lung cancer (NSCLC), and TGF- $\beta$  pathway is often regulated by negative-feedback mechanisms, but little is known about the mechanism of TGFBR2 downregulation in NSCLC. Here, we found that the expression of miR-520e is upregulated in metastatic tumor tissues compared with non-metastatic ones, and its expression is inversely correlated with that of TGFBR2 in clinical samples. We also discovered that TGF- $\beta$  dramatically increased the expression of miR-520e, which targeted and downregulated TGFBR2, and the suppression of miR-520e significantly impaired TGF- $\beta$ -induced TGFBR2 downregulation. Chromatin immunoprecipitation–PCR experiments further showed that miR-520e is transcriptionally induced by SMAD2/3 in response to TGF- $\beta$ . Our findings reveal a novel negative-feedback mechanism in TGF- $\beta$  signaling and the expression level of miR-520e could be a predictive biomarker for NSCLC metastasis.

### Introduction

Lung cancer has the highest rates of incidence and mortality compared with other cancer types (1). Lung cancer is histologically categorized as two different subtypes, small cell lung cancer (SCLC) or non-small cell lung cancer (NSCLC), with incidences of ~15 and 84%, respectively (2). NSCLC is the leading cause of cancer-related deaths and has a 5 year survival rate of <15% (3). Although the use of novel treatment options increased the survival of NSCLC patients, the survival rate of NSCLC patients is still poor due to distant metastasis. Therefore, understanding the molecular mechanisms of metastasis of NSCLC cells is essential to develop novel and effective strategies for NSCLC therapy.

The transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a multi-functional cytokine and has dual effects in cancer progression including NSCLC (4–6). TGF- $\beta$  plays a crucial role in cancer


metastasis by activating epithelial-mesenchymal transition (EMT). However, TGF- $\beta$  also regulates the cell cycle by inducing expression of CDK inhibitor p21 and causes G1 arrest (6,7). Mechanistically, when TGF- $\beta$  binds to TGF- $\beta$ -receptor type 2 (TGFBR2), which is a transmembrane serine-threonine kinase, it recruits and phosphorylates TGF- $\beta$ -receptor type 1 (TGFBR1). Activated TGFBR1 phosphorylates receptor-regulated Smads (R-SMADs), SMAD2 and SMAD3, which interact with SMAD4 (co-SMADs), resulting in the formation of the SMAD2/3–SMAD4 complex. This complex accumulates in the nucleus, binds to the regions called as SMAD-binding elements (SBEs) on the promoter of target genes (8,9) and induces or represses their transcription. The activated SMAD complex not only represses the expressions of E-cadherin and CAR1, which are epithelial markers, but also

Received: May 9, 2018; Revised: November 11, 2018; Accepted: November 20, 2018

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com.



## Exploring biomarkers in the overactive bladder: Alterations in miRNA levels of a panel of genes in patients with OAB

Elif Fırat<sup>1</sup>  | Zafer Aybek<sup>2</sup> | Şakir Akgün<sup>3</sup> | Kürşat Küçüker<sup>2</sup> | Hakan Akça<sup>4</sup> | Hülya Aybek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Biochemistry,  
Pamukkale University School of  
Medicine, Denizli, Turkey

<sup>2</sup>Department of Urology, Pamukkale  
University School of Medicine, Denizli,  
Turkey

<sup>3</sup>Department of Medical Biology, Kafkas  
University School of Medicine, Kars,  
Turkey

<sup>4</sup>Department of Medical Genetics,  
Pamukkale University School of  
Medicine, Denizli, Turkey

### Correspondence

Elif Fırat, MD, Department of Medical  
Biochemistry, Pamukkale University  
School of Medicine, Km11 20160,  
Denizli, Turkey.  
Email: elifbasak43@hotmail.com

### Funding information

Pamukkale University Scientific Research  
Projects Department, Grant/Award  
Number: 2017TİPF008

### Abstract

**Aims:** It has been demonstrated that there are abundant stable microRNAs (miRNAs) in plasma, which is potentially disease-specific. Adrenergic and muscarinic pathways play an important role in voiding physiology. Alterations in the levels of miRNAs are thought to influence the regulation of these pathways at the molecular level. The aim of this study was to investigate the relationship of miRNAs with overactive bladder pathogenesis and to provide a new perspective to treatment approaches.

**Methods:** This study included patients with an overactive bladder (OAB) diagnosis and a healthy control group. All patients completed a validated OAB-V8 questionnaire. The relative expression levels of 12 miRNAs were examined in plasma by PCR. Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated to evaluate the diagnostic qualification of miRNAs.

**Results:** The relative expression levels of let-7b-5p, miR-92a-3p, miR-98-5p, miR-142-3p, and miR-200c-3p were significantly upregulated and miR-139-5p was significantly downregulated in patients with OAB and no correlation was determined between the levels of miRNAs with OAB symptom score. Among the miRNAs, miR-98-5p provided the highest diagnostic accuracy alone (area under curve [AUC] = 0.79) in ROC analysis. The combination of miR-98-5p + miR-139-5p was seen to be a good indicator (AUC = 0.839).

**Conclusions:** These results suggest that alteration of the miRNA levels can be used as auxiliary parameters to explain the pathophysiology of OAB syndrome and could shed light on new treatment options.

### KEYWORDS

biomarkers, microRNA, overactive bladder

## 1 | INTRODUCTION

The Standardization Subcommittee of the International Continence Society (ICS), in 2002 defined overactive bladder (OAB) as a symptom syndrome consisting of

urgency, with or without urge incontinence, usually with frequency and nocturia, in the absence of proven infection or other obvious pathology.<sup>1</sup> OAB is a clinical diagnosis and spontaneous or induced abnormal detrusor muscle activity is observed in urodynamic tests. As

## RESEARCH ARTICLE

NF- $\kappa$ B-Induced Upregulation of miR-548as-3p Increases Invasion of NSCLC by Targeting PTENSakir Akgun<sup>a,d</sup>, Hakan Kucuksayan<sup>a</sup>, Osman N. Ozes<sup>e</sup>, Ozge Can<sup>a</sup>, Arsenal S. Alikanoglu<sup>f</sup>, Mustafa Yildiz<sup>g</sup> and Hakan Akca<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Medical Biology, <sup>b</sup>Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, <sup>c</sup>ILTAM Cancer Biology Laboratory, Pamukkale University, Kinikil, Denizli, Turkey; <sup>d</sup>Medical Biology Department, Faculty of Medicine, Kaftas University, Kars, Turkey; <sup>e</sup>Department of Medical Biology and Genetics, Akdeniz University, Antalya, Turkey; <sup>f</sup>Pathology Department, <sup>g</sup>Medical Oncology, Antalya Training and Research Hospital, Antalya, Turkey

**Abstract: Background:** Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) is an aggressive cancer type due to high metastatic capacity. Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) is a consistently active transcription factor in malignant lung cancer cells and has crucial significance in NSCLC progression. It is also implicated in the transcriptional regulation of many genes including microRNAs (miRNAs) that function as tumor suppressor or oncogene. It has been increasingly reported that several miRNAs defined as gene members are induced by NF- $\kappa$ B. The present study aimed to find novel miRNAs that are regulated by NF- $\kappa$ B.

**Methods:** Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq) experiment and bioinformatic analysis were used to determine NF- $\kappa$ B-dependent miRNAs. Western blot analysis, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), luciferase reporter gene assays were carried out to investigate the target genes of miRNAs. To determine biologic activity, transwell invasion and MTT assay were carried out on H1299 NSCLC cell line. miRNA expression level was evaluated in metastatic and non-metastatic tissue samples of NSCLC patients.

**Results:** ChIP-Seq and qRT-PCR experiments showed that miR-548as-3p is transcriptionally regulated by NF- $\kappa$ B in response to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) treatment. Then, we found that tumor suppressor Phosphatase and Tension homolog (PTEN) is a direct target of miR-548as-3p. Furthermore, miR-548as-3p mediates phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)/Akt pathway and NF- $\kappa$ B-implicated genes including Matrix Metalloproteinases 9 (MMP9), Slug and Zeb1. We further showed that miR-548as-3p increased invasiveness of NSCLC cells and was upregulated in metastatic tumor tissues compared to non-metastatic ones.

**Conclusion:** All these findings provide a miRNAs-mediated novel mechanism for NF- $\kappa$ B signaling and that miR-548as-3p could be a biomarker for NSCLC metastasis.

## ARTICLE HISTORY

Received: November 11, 2018  
Revised: January 24, 2019  
Accepted: January 26, 2019

DOI:  
10.2174/18715206190666190206185215

**Keywords:** NF-kappa B, neoplasm metastasis, invasion, miR-548as-3p, carcinoma, non-small-cell lung, PTEN.

## 1. INTRODUCTION

Lung cancer is the main cause of cancer-related deaths worldwide and more than a million new cases are added every year [1]. Incidence and prevalence of lung cancers are increasing at an alarming rate, particularly in the western world. Nearly 90% of lung cancers are NSCLC, including Squamous Cell Carcinoma (SCC), Large Cell Carcinoma (LCC), adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma. In spite of advanced diagnostic and therapeutic improvements, 5-year survival rate increased only by 15% in the past 40 years [2]. Therefore, understanding the molecular mechanisms underlying carcinogenesis and progression of lung cancer is very important to fight against this cancer type.

As a multifunctional transcription factor, NF- $\kappa$ B induces cell survival, invasion, metastasis, angiogenesis, differentiation and prevents apoptosis in a variety of cancer cells, including lung cancer [3-6]. NF- $\kappa$ B is constitutively active in many types of cancer, especially in NSCLC [7, 8]. NF- $\kappa$ B is normally sequestered in the

cytoplasm of uninduced cells by binding to Inhibitor kappa B (I $\kappa$ B) family proteins. NF- $\kappa$ B can be activated by a series of stimuli including epidermal growth factor (EGF), insulin, K-Ras, (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in human cancers [4]. While TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  induces NF- $\kappa$ B activation via canonical pathway, the others use non-canonical pathway to activate NF- $\kappa$ B. At the end, regardless of whether the activated pathway is canonical or not, all these stimuli induce activation of I $\kappa$ B kinases, consisting of IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , IKK- $\gamma$ . When activated, IKKs phosphorylate I $\kappa$ Bs and induce their degradation by proteasome. Subsequently, NF- $\kappa$ B subunits releasing from I $\kappa$ Bs translocate to nucleus and induce the transcription of target genes by binding to NF- $\kappa$ B-binding sites on the promoters of responsive genes [6, 9].

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules containing approximately 22 nucleotides that negatively regulate the translations of messenger RNAs (mRNA) by binding to their 3' untranslated regions (UTR). miRNAs play important regulatory roles in many biological processes including invasion, proliferation, apoptosis and differentiation of cells [10]. Recent studies have shown that miRNAs are frequently dysregulated in most human cancer types including lung cancer [11, 12]. Transcriptions of miRNA genes are controlled by various transcription factors such

\*Address correspondence to this author at the Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli 20160, Turkey; Tel: +90 258 296 4804, +90 538 863 8078; E-mail: hakca@pau.edu.tr

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Tarihi	27.12.2016	Karar	19
Toplantı Sayısı	2016/23	Toplantı Saati	15:00
Toplantı Günü	Salı	Toplantı Yeri	Dekanlık

**Karar 19-** Fakültemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Öğretim Üyesi Prof.Dr.Hakan AKÇA'nın yürütücüsü olduğu "Akciğer kanser metastazı ile ilgili miRNA'ların belirlenmesi ve bu miRNA'ların kanser progresyonu ve sağkalm ile ilişkilerinin tesbiti" konulu çalışması görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasında **ETİK AÇIDAN SAKINCAOLMADIĞINA**, altı ayda bir çalışma hakkında Kurulumuza bilgi verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Raportör.Dr.S.PEKCAN

Prof. Dr. Tahir TURAN  
Başkan

Prof.Dr. Beyza AKDAĞ	Prof.Dr.Sibel PEKCAN
Prof.Dr.Ahmet BAKI YAĞCI	Prof.Dr.Nalan K.OĞUZHANOĞLU
Doç.Dr.Aylin KÖSELER	Doç.Dr.Mehmet AKIN
Doç.Dr.Hülya ÇETİN SORGUN	Doç.Dr.Türkan TURAN
Doç.Dr.Murat ÖZBAN	Doç.Dr.Nihal BÜKER