



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

AKCİĞER KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE MYC
ONKOGENİ İLE İLİŞKİLİ MİKRORNA'LARIN KANSER
HÜCRE METABOLİZMASINDAKİ ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Onur TOKGÜN

Haziran 2017
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE MYC ONKOGENİ
İLE İLİŞKİLİ MİKRORNA'LARIN KANSER HÜCRE
METABOLİZMASINDAKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Onur TOKGÜN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan AKÇA

Denizli, 2017

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Onur TOKGÜN tarafından Prof. Dr. Hakan AKÇA yönetiminde hazırlanan "AKCİĞER KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE MYC ONKOGENİ İLE İLİŞKİLİ MİKRORNA'LARIN KANSER HÜCRE METABOLİZMASINDAKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

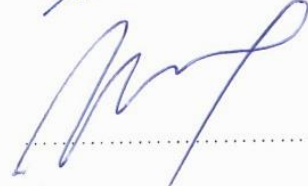
Jüri Başkanı (Danışman): Prof. Dr. Hakan AKÇA
Pamukkale Üniversitesi



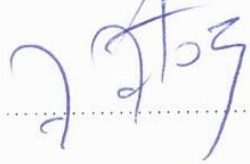
Üye: Prof.Dr. Bülent KAYA
Akdeniz Üniversitesi



Üye: Doç.Dr. Ayşe Gaye TOMATIR
Pamukkale Üniversitesi



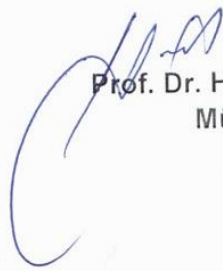
Üye: Doç.Dr. Gamze GÖKÖZ DOĞU
Pamukkale Üniversitesi



Üye: Doç.Dr. Nuray ALTINTAŞ
Celal Bayar Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
~~20.1.7.2017~~ tarih ve ~~11/11~~ sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının 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 : Onur TOKGÜN

İmza :

ÖZET

Akciğer Kanseri Hücre Dizilerinde Myc Onkogeni ile İlişkili MikroRNA'ların Kansere Hücre Metabolizmasındaki Rollerinin Araştırılması

Onur TOKGÜN
Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji AD
Tez Yöneticisi: Prof.Dr.Hakan AKÇA
Haziran 2017, 130 Sayfa

Akciğer kanserlerinin %15-20'ni oluşturan küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) yüksek ölüm oranı ve agresif fenotiple karakterizedir. KHAK'lerinde en sık gözlenen genetik değişimler tümör baskılayıcı TP53 ve RB1 ile MYC ailesi onkogenlerde gözlenen değişimlerdir. Myc geni KHAK olgularının yaklaşık %20'sinde aşırı ifade ya da amplifikasyonu gözlenmektedir. Bu sebeple Myc geni KHAK tedavisi için önemli bir hedeftir. Myc pek çok biyolojik süreci düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörüdür.

Çalışmamızda ilk olarak kalıcı (pCDH-MYC) ve indüklenebilir (pTIJ-MYC) ekspresyon vektörleri ile indüklenebilir baskılama vektörleri (pTRIPZ-MYC) tasarlandı. Ardından, Myc amplifikasyonu taşımayan H209 hücreleri pCDH-MYC ile H345 hücreleri pTIJ-MYC ile, Myc amplifikasyonu taşıyan H82 ve N417 hücreleri ise pTRIPZ-MYC ile infekte edildi. Kalıcı infekte edilmiş hücreler puromisin ile seçildikten sonra indüklenebilir vektör sistemleri doksisisiklin ile muamele yapılarak Myc ifadesi düzenlendi. Myc ifadesindeki değişimin hücre çoğalması, metabolizma ve gen ekspresyonu üzerine etkisi western blot, gerçek zamanlı PZR, miRNA/mRNA mikrodizin (Affymetrix miRNA 4.0/ Illumina HT-12) ve LC-MS analizi ile araştırıldı.

Çalışmada kullanılan hücrelerdeki hücresel proliferasyonun MYC ekspresyonuna bağımlı olduğu belirlendi. Sonrasında, kanser progresyonunda önemli rol oynayan miRNA'ların (miR-9, miR-181, miR-378, vb) ve mRNA'ların (HK2, GLS1, LDHA, vb) ekspresyonları araştırıldı. MYC tarafından düzenlenen metabolik genlerin ekspresyonlarında değişimler saptandı. Bu genlerin fonksiyonları LC-MS analizi ile değerlendirildi.

Sonuçlarımız, MYC amplifikasyonuna sahip KHAK hücrelerinin sağkalımı için MYC'e bağımlı olduklarını göstermiştir. Bu çalışmanın KHAK'lerinde ileriki terapötik stratejilerin gelişiminde MYC tarafından düzenlenen metabolik genlerin önemini vurguladığı kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: KHAK, Myc, metabolizma, proliferasyon

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu (Proje No: 2013SBE012) ve TÜBİTAK 2214/a programı kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Searching The Role of MYC Oncogene Related MicroRNAs on Cancer Cell Metabolism in Lung Cancer Cell Lines

Tokgun, Onur
PhD.Thesis in Medical Biology
Supervisor: Prof.Dr. Hakan AKCA (PhD.)
June 2017, 130 Pages

Small cell lung cancer (SCLC), which accounts for 15-20% of all lung cancer types, is an aggressive malignancy with an extremely high mortality rate. The most frequently altered genes in SCLC are the tumor suppressor genes *TP53* and *RB1* and the *MYC* family oncogenes *MYC*, *MYCL* and *MYCN*. Overall, *MYC* genes are amplified and overexpressed in 20% of SCLCs, showing that *MYC* proteins are strong candidates as therapeutic targets in SCLC. *MYC* acts as a transcription factor that coordinates many biological processes.

In this study, at first two lentiviral vectors for the constitutive (pCDH-MYC) and the inducible (pTIJ-MYC) expression of *MYC* and a lentiviral vector for the inducible down-regulation of *MYC* (pTRIPZ-MYC) were constructed. Subsequently, we infected *MYC*-non amplified SCLC cell lines, H209, with pCDH-MYC and H345 with pTIJ-MYC, and two *MYC*-amplified and over-expressing SCLC cell lines, N417 and H82, with pTRIPZ-MYC. Stable infected cells were selected with puromycin and for the inducible expression systems, *MYC* was over-expressed or down-regulated by addition of doxycycline. The effects of *MYC* over-expression or down-regulation on cellular proliferation, metabolism and gene expression were evaluated by western blot, qRT-PCR, miRNA/mRNA microarray (Affymetrix miRNA 4.0/Illumina HT-12) and LC-MS analysis.

Cellular proliferation was found to be dependent on the expression of *MYC* on the cells used in this study. Then, we evaluated the expression of miRNAs (miR-9, miR-181, miR-378, etc) and mRNAs (HK2, GLS1, LDHA, etc) that play an important role in cancer progression. We observed alterations in the expression of several *MYC*-regulated metabolic genes. The functions of these genes were analyzed by performing LC-MS analysis.

Our results indicate that SCLC cells with *MYC* amplification are addicted to *MYC* for their survival. In our belief, this study highlights the relevance of *Myc*-regulated metabolic pathways for the development of future therapeutic strategies in SCLC.

Keywords: SCLC, *Myc*, metabolism, proliferation

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2013SBE012 and TUBITAK 2214/A programme.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince tecrübelerinden yararlandığım başta tez danışman hocam Prof. Dr. HAKAN AKÇA olmak üzere,

Tez çalışmam sürecinde yaptığımız toplantılarda bilimsel ve deneyimsel katkılarını benden esirgemeyen değerli TİK komitesi üyelerine,

Lisans eğitimimden bu yana derslerinde bana kattıkları değerli bilgiler ve yorumlarla bilimsel alt yapımın gelişimine katkısı bulunan tüm hocalarıma,

Ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan canım aileme, eşime ve yakın zamanda hayatımıza katılan kızıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1 Amaç	3
2. KURAMSAL BİLGİ VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1 Akciğer Kanseri.....	4
2.1.1 Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2 Etyoloji.....	5
2.1.2.1. Sigara	5
2.1.2.2 Beslenme.....	5
2.1.2.3 Mesleki ve Çevresel Maruziyet.....	6
2.1.2.3 Sosyoekonomik Durum	6
2.1.2.4 Radyoterapi	7
2.1.2.5 Ailesel Faktörler ve Genetik Yatkınlık	7
2.2 Akciğer Kanseri Histopatolojisi ve Evrelendirme.....	7
2.2.1 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri.....	9
2.2.2 Evreleme	10
2.2.3 Küçük Hücreli Akciğer Kanserinde Prognostik Faktörler	11
2.2.4 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi.....	12
2.3 Myc Onkogeninin Yapısı ve Fonksiyonu	15
2.4 Küçük Hücreli Akciğer Kanserlerinde Tedavi Hedefleri.....	18
2.4.2 PI3K/Akt/mTOR yolağı inhibitörleri	19
2.4.3 Hedgehog Yolağı İnhibitörleri	19
2.4.4 Anjiyogenez İnhibitörleri.....	19
2.4.5 Apoptozun Hedeflenmesi.....	19
2.4.6 DNA Tamiri.....	20
2.4.7 Aurora Kinaz İnhibitörleri	20

2.4.8 İmmünoterapi	20
2.4.9 Transkripsiyonun Hedeflenmesi.....	20
2.5 Kanser Hücre Metabolizması	21
2.6 MikroRNA Biyogenezi ve Fonksiyonları	24
2.6.1 mikroRNAların Aktivitelerinin Kanserdeki Bozulma Mekanizmaları	26
2.7 MYC Onkogeni ve miRNA İlişkisi	27
2.8 Hipotez	29
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
3.1 Gereçler.....	30
3.2 Yöntemler	34
3.2.1 Hücre Kültürü	34
3.2.2 Hücrelerin Dondurulması	35
3.2.3 Hücrelerin Çözülmesi	36
3.2.4 Kalıcı Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması	36
3.2.4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	36
3.2.4.2 Agaroz Jel Elektforezi	39
3.2.4.3 DNA Ligasyonu	39
3.2.4.4 Kompetent DH5α Bakteriyal Hücrelerinin Hazırlanması	40
3.2.4.5 DH5α Bakteriyal Hücelere Transformasyon	40
3.2.4.6 Plazmit İzolasyonu	41
3.2.4.7 DNA Miktar ve Saflık Tayini.....	41
3.2.4.8 İzole edilen plazmit DNA'larının Validasyonu	42
3.2.5 İndüklenebilir Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması	42
3.2.5.1 İndüklenebilir Lentiviral Aşırı Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması	42
3.2.5.1.1 Ligasyon Reaksiyonu	43
3.2.5.1.2 MYC' nin pTIJ Vektörüne Klonlanması	44
3.2.5.1.3 İndüklenebilir Lentiviral shRNA Vektörünün Oluşturulması	44
3.2.5.1.4 Transfeksiyon	46
3.2.5.1.5 Lentivirüs Üretimi.....	47
3.2.5.1.6 İnfeksiyon	49
3.2.6 İnfekte Edilen Hücrelerin Seçilimi	49
3.2.7 Hücre Çoğalma Analizi	50
3.2.8 RNA İzolasyonu.....	50
3.2.8.1 Total RNA İzolasyonu	50
3.2.8.2 miRNA İzolasyonu	51
3.2.9 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	52

3.2.10 cDNA sentezi.....	52
3.2.10.1 Total RNA'nın cDNA'ya Çevrimi	52
3.2.10.2 İzole Edilen Total miRNA'nın cDNA'ya Çevrimi	52
3.2.11 Real Time PCR (qRT-PCR).....	53
3.2.11.1 Total RNA Örneklerinden Ekspresyon Analizi	53
3.2.11.2 miRNA Örneklerinden Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Analizi	54
3.2.12 Hücrelerden Protein Örneklerinin İzolasyonu	54
3.2.13 Protein Miktar Tayini	54
3.2.14 SDS-PAGE ve Western Blot Analizi.....	55
3.2.15 miRNA Mikrodizin	55
3.2.16 mRNA Mikrodizin	57
3.2.17 mRNA ve miRNA Mikrodizin Sonuçlarının Analizi.....	57
3.2.18 Q-TOF LC-MS Metabolit Analizi	58
3.2.19 İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR	61
4.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Dizilerinin Myc İfade Düzeyleri	61
4.2 Kalıcı Lentiviral Myc Ekspresyon Vektörünün Hazırlanması	62
4.3 Kalıcı Lentiviral Myc Ekspresyon Vektörü Etkinliğinin Belirlenmesi	67
4.4 İndüklenebilir Lentiviral Myc Ekspresyon Vektörünün Hazırlanması	67
4.5 MYC' nin pTIJ Vektörüne Klonlanması	70
4.6 İndüklenebilir Lentiviral Myc Ekspresyon Vektörü Etkinliğinin Belirlenmesi.....	72
4.7 İndüklenebilir Lentiviral Myc-shRNA Vektörünün Hazırlanması	73
4.8 İndüklenebilir Lentiviral Myc-shRNA Vektörü Etkinliğinin Belirlenmesi.....	76
4.9 KHAK Hücre Dizilerinde Myc İfadesindeki Değişimin Hücre Proliferasyonuna Etkisi ...	77
4.10 KHAK hücrelerinde PTEN ifadesinin Myc Ekspresyonu Tarafından Belirlenmesi	79
4.11 Sonradan Oluşturulan Myc ifadesinin Hücre Fenotipine Olası Etkisinin Western Blot Analizi ile Belirlenmesi	80
4.12 Myc Tarafından İfadesi Düzenlenen Genlerin Realtime PCR Aracılığıyla Belirlenmesi	81
4.13 KHAK hücre dizilerinde Myc transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenen mRNA ekspresyonunun mikrodizin yöntemi ile belirlenmesi	84
4.14 mRNA mikrodizin sonuçlarının Gen Ontoloji (GO) analizi.....	88
4.15 Myc transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenen miRNA ekspresyonunun mikrodizin yöntemi ile belirlenmesi.....	89
4.16 miRNA Mikrodizin Analizi Sonucunda Belirlenen miRNA'ların Gerçek Zamanlı PZR aracılığıyla teyit edilmesi.....	92

4.17 KHAK Hücre Dizilerinde Myc İfadesine Bağlı Olarak Değişen Hücresel Metabolizmanın Q-TOF LC-MS Yöntemi ile Belirlenmesi	94
5. TARTIŞMA.....	99
6. SONUÇ	112
7. KAYNAKLAR.....	114
8. ÖZGEÇMİŞ	129
9. EKLER.....	130



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Akciğer kanseri alt tipleri mikroskopik görüntüsü	9
Şekil 2.2 Akciğer Kanserlerinin Evrelendirilmesi. a) T,N ve M kriterlerinin 7. ve son versiyonlara göre sınıflandırılması b) Son sınıflandırma versiyonuna göre Akciğer kanser evrelerinin gruplandırılması (Detterbeck vd 2017)	11
Şekil 2.3 MYC onkogeninin genomik DNA, RNA ve protein yapısı. a) MYC onkogeninin genomik ve mRNA yapıları. b) Myc proteininin yapısal bölgeleri ve heterodimer oluşturduğu partnerler.....	16
Şekil 2.4 MYC onkogeni pek çok önemli hücrel biyolojik süreci düzenler	18
Şekil 2.5 Oksidatif fosforilasyon, anaerobik glikoliz ve aerobik glikoliz (Warburg Etkisi) süreçlerinin şematik gösterimi (Vander Heiden vd 2009).....	22
Şekil 2.6 MYC tarafından düzenlenen hücrel metabolizma süreçlerinin gösterimi (Stine vd 2015).....	24
Şekil 2.7. miRNA biyogenez aşamalarının gösterimi (Stine ve Gregory 2015)	26
Şekil 2.8 Myc tarafından miRNA biyogenez süreçlerinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlenmesi. a) Myc transkripsiyon faktörünün miRNA genlerinin promotor bölgesine bağlanması b) Myc'nin miRNA biyogenez süreçlerini düzenlemesi c) Myc'nin Drosha'yı baskılamak yoluyla miRNA biyogenez ürecini düzenlemesi (Jackstad ve Hermeking 2015).....	28
Şekil 3.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Dizilerinin Mikroskopik Görüntüsü.....	35
Şekil 3.2 pCDH-CMV lentiviral vektör haritası, restriksiyon enzimlerinin ve MYC cDNA dizisinin gösterilmesi	36
Şekil 3.3 Kalıcı Myc ekspresyon vektörü için tasarlanan primer dizileri	37
Şekil 3.4 pCMV-Sport6 vektörünün şematik görünümü	39
Şekil 3.5 pTRIPZ boş vektör haritası ve restriksiyon bölgelerinin	42
Şekil 3.6 Çoklu Klonlama Bölgesi (MCS) dizisi.....	43
Şekil 3.7 shRNA oligo yapısı.....	44
Şekil 3.8 MYC shRNA'larının bağlanma dizileri.....	45
Şekil 3.9 PZR primer dizileri.....	45
Şekil 3.10 Lentivirüs üretiminin şematik gösterimi	49
Şekil 3.11 Lentivirüs enfeksiyonu	49
Şekil 3.12 A) miRNA probunun yapısı B) Mikrodizin analizi süreci	56
Şekil 3.13 LC-MS sisteminde bir metabolitin kolondan geçilmesi ve algılanması	59
Şekil 3.14 LC-MS sonuçlarının analiz süreci	60
Şekil 4.1 Çalışmada kullanılan hücrelerin Myc ifade düzeyleri	61
Şekil 4.2 Kalıcı Lentiviral Myc vektörünün hazırlanma aşamaları	63
Şekil 4.3 pCDH-CMV vektörünün NotI ve XbaI enzimleriyle kesilmesi	64

Şekil 4.4 Yabanıl tip Myc cDNA'sının PZR ile çoğaltılması.....	64
Şekil 4.5 Transformasyon sonrasında petride çoğalan koloniler.....	65
Şekil 4.6 Transformasyon sonrası seçilen kolonilerin validasyonu	65
Şekil 4.7 Koloni 5 sekans sonuçlarının analizi.....	66
Şekil 4.8 Koloni 8 sekans analizi sonuçları.....	66
Şekil 4.9 Kalıcı Myc ekspresyon vektörlerinin etkinliğinin gösterilmesi	67
Şekil 4.10 İndüklenebilir lentiviral Myc ekspresyon vektörü oluşturma aşamaları	68
Şekil 4.11 pTRIPZ boş vektörden shRNA ve TRFP dizilerinin uzaklaştırılması	68
Şekil 4.12 İndüklenebilir PTIJ vektörünün restriksiyon enzimleriyle validasyonu	69
Şekil 4.13 pTIJ vektörünün yapısı	69
Şekil 4.14 Myc cDNA'sının PZR ile çoğaltılması	70
Şekil 4.15 Seçilen kolonilerin restriksiyon enzimleriyle validasyonu	70
Şekil 4.16 pTIJ koloni 2 sekans analizi sonuçları	71
Şekil 4.17 pTIJ koloni 4 sekans analizi sonuçları	71
Şekil 4.18 pTIJ koloni 6 sekans analizi sonuçları	72
Şekil 4.19 İndüklenebilir Myc ekspresyon vektörlerinin Myc ifadesi üzerine etkinliği.....	73
Şekil 4.20 Ticari olarak temin edilen Myc-shRNA vektörlerinin Myc baskılanması üzerine etkisi.....	73
Şekil 4.21 İndüklenebilir Myc-shRNA vektörü oluşturma aşamaları.....	74
Şekil 4.22 Tasarlanan shRNA oligonükleotitlerinin PZR sonuçları.....	75
Şekil 4.23 Tasarlanan shRNA vektörlerinin restriksiyon analiziyle validasyonu.....	75
Şekil 4.24 Tasarlanan shRNA1 vektörünün sekans analizi sonucu (Kırmızı ile belirtilen sekans tasarlanan shRNA oligonükleotit1 'i göstermektedir)	76
Şekil 4.25 Klonlanan üç farklı shRNA'nın etkinliklerinin western blot ile analizi	76
Şekil 4.26 H209 hücrelerinin hücre çoğalma analizi sonuçları.....	77
Şekil 4.27 H345 hücrelerinde Myc ifadesindeki değişime bağlı olarak hücre çoğalma hızındaki değişim.....	78
Şekil 4.28 N417 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak hücre çoğalma hızındaki değişim .78	
Şekil 4.29 H82 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak değişen hücre çoğalma hızındaki değişim.....	79
Şekil 4.30 KHAK hücre dizilerinde PTEN ifadesi Myc ekspresyonuna bağlı olarak değişir A) H209 ve H82 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak PTEN ifadesinin protein seviyesinde değişimi B) Myc ifadesindeki değişime bağlı olarak PTEN ifadesinin mRNA düzeyinde değişimi.....	80
Şekil 4.31 Myc ifadesine bağımlı olarak değişen hücre fenotip markırları A) Kök hücre, metastaz, hücre metabolizması ile ilişkili markır proteinler B) Nöroendokrin akciğer hücresi markır protein analizi	81
Şekil 4.32 H209 hücrelerinde Myc ifadesine bağımlı olarak değişen mRNA'lar	82

Şekil 4.33 H345 hücrelerinde Myc ifadesi artışına bağlı olarak değişen mRNA'lar	82
Şekil 4.34 Myc ifadesinin baskılanmasına bağlı olarak ifadesi değişen mRNA'lar A) H82 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen mRNA'lar B) N417 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen mRNA'lar	83
Şekil 4.35 H82 ve H209 hücrelerinde değişen SRM ve SMS düzeyleri	84
Şekil 4.36 Mikrodizin analizi sonucunda herbir örnekte belirlenen prob sayısı ve örnekler arasındaki korelasyon.....	85
Şekil 4.37 Örnekler arasında ifadesi artan ve azalan mRNA prob sayıları.....	86
Şekil 4.38 mRNA mikrodizin sonuçlarının GO analiz sonuçları	89
Şekil 4.39 miRNA mikrodizin analizi sonucunda herbir örnekte belirlenen prob sayısı ve örnekler arasındaki korelasyon	90
Şekil 4.40 Örnekler arasında ifadesi artan ve azalan miRNA prob sayıları.....	91
Şekil 4.41 Myc ifadesinin artmasına bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'lar A) H345 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen miRNA'lar B) H209 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen miRNA'lar	93
Şekil 4.42 Myc ifadesinin azalmasına bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'lar A) H82 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen miRNA'lar B) N417 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen miRNA'lar	94
Şekil 4.43 Hücre gruplarında Myc ifadesi değişimine bağlı olarak saptanan metabolit sayıları A) Myc ifadesi arttırılan hücrelerde saptanan metabolit sayıları B) Myc ifadesi baskılanan hücrelerde saptanan metabolit sayıları	95
Şekil 4.44 H209 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak miktarı artan metabolitler	96
Şekil 4.45 H209 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak miktarı artan metabolitler	96
Şekil 4.46 H82 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak miktarı azalan metabolitler	97
Şekil 4.47 N417 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak miktarı azalan metabolitler	97

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 DSÖ' ne göre Akciğer kanserlerinin histopatolojik sınıflandırılması	8
Tablo 2.2 KHAK İmmünohistokimyasal Belirteçleri.....	10
Tablo 2.3 KHAK prognostik faktörleri	12
Tablo 3.1 Çalışmada kullanan cihazlar	30
Tablo 3.2 Çalışmada kullanan kitler	30
Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan vektörler ve özellikleri	31
Tablo 3.4 Çalışmada kullanılan enzimler.....	31
Tablo 3.5 mRNA Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmasında kullanılan primer oligonükleotitler	32
Tablo 3.6 miRNA RT-PZR çalışmasında kullanılan primerler	32
Tablo 3.7 Çalışmada kullanılan antikolar	33
Tablo 3.8 Çalışmada kullanılan hücre dizileri ve özellikleri.....	35
Tablo 3.9 PZR Koşulları.....	37
Tablo 3.10 PZR Optimizasyon Şartları.....	37
Tablo 3.11 Ligasyon reaksiyonu şartları.....	40
Tablo 3.12 Ligasyon Reaksiyonu Şartları.....	43
Tablo 3.13 PZR koşulları	45
Tablo 3.14 cDNA dönüşüm reaksiyonu koşulları.....	52
Tablo 3.15 miScriptII reaksiyonunun koşulları.....	53
Tablo 3.16 mRNA RT-PZR koşulları	53
Tablo 3.17 miRNA RT-PZR koşulları	54
Tablo 3.18 %8'lik SDS ayırma jeli hazırlanması	55
Tablo 4.1 KHAK hücre dizilerinin hücre çoğalma analizleri	62
Tablo 4.2 Myc ifadesi artışına bağlı olarak mikrodizin sonuçlarında ifadesi azalan mRNA'lar	87
Tablo 4.3 Myc ifadesi artışına bağlı olarak mikrodizin sonuçlarında ifadesi artan mRNA'lar.....	88
Tablo 4.4 miRNA mikrodizin sonuçlarına göre Myc tarafından pozitif yönde düzenlenen miRNA'lar	92
Tablo 4.5 Gruplar arasında Myc ifadesine bağlı olarak değişen metabolit sayıları	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACC.....	Asetil CoA Sentaz
ADCY1.....	Adenilat Siklaz 1
ADK.....	Adenokarsinom
Ago.....	Argonat
AGPAT4.....	AGP Açıltransferaz 4
ALDH1A1.....	Aldehit Dehidrogenaz 1A1
AMPK.....	AMP Aktive Edici Kinaz
APS.....	Amonyum Persülfat
ASCL1.....	Akut-Skut Homolog 1
BASP1.....	Beyin Çözünebilir Asit Protein 1
BCL2.....	B Hücreli Lenfoma 2
BSA.....	Dana Serum Albumin
CDK6.....	Siklin Bağımlı Kinaz 6
cDNA.....	Komplementer DNA
Cox-2.....	Siklooksigenaz 2
CREBBP.....	CREB Bağlanma Proteini
CTLA-4.....	Sitotoksik T lenfosit ilişkili Protein-4
DDIT4.....	DNA Hasar İndüklü Transkript 4
DLK1.....	Delta Benzer Homolog 1
DNA.....	Deoksiribonükleik Asit
DSRBD.....	Çift İplikli RNA Bağlanma Domaini
E2F1.....	E2 Transkripsiyon Faktör 1
EGFR.....	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
Eno1.....	Enolaz 1
EP300.....	Protein 300
Exp-5.....	Ekspartin 5
EZH2.....	Zeste Homolog 2 Hızlandırıcı
FASN.....	Yağ Asit Sentaz

FBS.....	Fötal Dana Serumu
FGF.....	Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR.....	Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü
FHIT.....	Frajil Histidin Triat
GDO.....	Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GLS.....	Glutaminaz
GLUT1.....	Glukoz Taşıyıcı 1
GRP.....	Gastrin Salıcı Peptit
GZ-PZR.....	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Hh.....	Hedgehog
HIF1A.....	Hipoksi İndüklü Faktör 1A
HK2.....	Hekzokinaz 2
IASLC.....	Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Örgütü
IMPDH.....	İnozin monofosfat dehidrogenaz
JAK.....	Janus Kinaz
KCNA1.....	Potasyum Voltaj Kanal Alt Ailesi 1
KHAK.....	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK.....	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
KLF2.....	Krüppel Benzer Faktör 2
LC-MS.....	Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometri
LDHA.....	Laktat Dehidrogenaz A
LKB1.....	Karaciğer Kinaz B1
RET.....	Ret Protoonkogen
RISC.....	RNA İndüklü Susturma Kompleksi
RNP.....	Ribonükleoprotein
miRNA.....	MikroRNA
MLL.....	Lizin Metil Transferaz 2A
mRNA.....	Mesajcı RNA
NEUROD1.....	Nöronal Farklılaşma 1
ODC.....	Ornitin Dekarboksilaz
P21.....	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1

P73.....	Protein 73
PAH.....	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PARP1.....	Poliadenozil Riboz Transferaz 1
PFK.....	Fosfofruktokinaz
PHLDA1.....	Pleksitrin Homoloji Benzer Domaini 1
PI3K.....	Fosfolinositol 3,4,5 Tri Fosfat
PRPS2.....	Fosforibozil pirofosfat sentetaz
PSAT.....	Fosfoserin aminotransferaz
PSPH.....	Fosfoserin fosfataz
PTEN.....	Kromozom 10'dan Fosfat ve Tensin Delesyonu
PVDF.....	Poliviniliden diflorid
PZR.....	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Q-TOFL-C-MS.....	Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
RASSF1.....	Ras İlişkili Domain Aile Üyesi 1
RB1.....	Rb Transkripsiyonel Korepresör 1
RNA.....	Ribonükleik Asit
RNP.....	Ribonükleoprotein
Robo1.....	Roundabout Guidance Reseptör 1
RR.....	Relatif Risk
RT.....	Radyoterapi
RTK.....	Reseptör Tirozin Kinaz
SCD.....	Stearyl CoA desaturaz
SDS.....	Sodyum Dodesil Sülfat
SHK.....	Skuamoz Hücreli Karsinom
SHMT.....	Serin hidrometiltransferaz
siRNA.....	Small interfering RNA
shRNA.....	Kısa saç tokası RNA
SMS.....	Spermin Sentaz
Sox-2.....	SRY (sex determining region Y)-box 2
SRM.....	Spermidin Sentaz
TGF β	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta

TP53.....	Protein 53
TRBP.....	Transaktivasyondan Sorumlu RNA Bağlanma Proteini
TÜİK.....	Türkiye İstatistik Kurumu
VEGF.....	Vaskulo Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO.....	Dünya Sağlık Örgütü
µg.....	Mikrogram
µl.....	Mikrolitre



1. GİRİŞ

Son yıllarda hızla artan dünya nüfusu ve artan nüfus paralelinde gelişen teknoloji sonucunda ortaya çıkan çevre kirliliği çağımızın önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser hastalığı sıklığını arttırmıştır. Gelişen teknoloji doğrultusunda son yıllarda ortaya çıkan artmış egsoz gazı, gıda katkı maddeleri, Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO)'lu besinlerin artması, radyasyon kaynaklarının artması, ekolojik dengenin bozulması sebebiyle ortaya çıkan mutajenik bakteri ve virüslerin yayılımı, mesleki maruziyetlerin artması ve son yıllarda sigara ve alkol tüketiminin artması sebebiyle farklı kanser türlerinin sıklıklarında önemli değişimler saptanmıştır. Son yıllarda görülme sıklığında artış gözlenen kanser türlerinden en önemlisi ise akciğer kanserleridir.

Akciğer kanserleri ülkemizde tüm kanser türleri arasında erkeklerde birinci kadınlarda ise ikinci sırada yer alır. Tüm dünya genelinde düşünüldüğünde ise akciğer kanserleri ikinci sırada yer almaktadır. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), tüm akciğer kanseri olgularının %15-20'sini oluşturup hızlı çoğalma ve erken metastaz ile karakterizedir. KHAK olgularının ileri evrede tanı almaları sebebiyle son yıllara kadar genetik analizler için uygun materyal bulunmasında sıkıntılar yaşanıyordu. Fakat son dönemlerde erken evrede tanısı koyulan hastaların sayısının artması ve biyopsi örneklerinin artması sebebiyle KHAK'lerinde pek çok genetik değişim saptanmıştır. KHAK'lerinde tanımlanmış olan önemli genetik değişimlerden birisi Myc ailesi üyelerinin amplifikasyonu yada aşırı ifadesidir. Myc ailesi onkogenleri Myc, MycL1 ve MycN'den oluşmaktadır. KHAK olgularının %15'inde Myc ailesi genlerin amplifikasyon yada aşırı ifade durumları gösterilmiştir.

KHAK, akciğer kanserinin diğer alt türlerine kıyasla erken ve uzak metastaz ile karakterize olduğu için tedaviye yanıt oranı oldukça düşüktür. İlk kemoterapi uygulamasının ardından hastaların çoğunda kemoterapiye direnç gelişmektedir. Bu sebeple KHAK olgularında etkin bir tedavi stratejisi belirlemek oldukça zor olmuştur. Son yıllarda, önemli

sinyal yolları, Deoksiribonükleik Asit (DNA) tamir mekanizmaları, hücre sağ kalım yolları vb. yolları hedefleyen tedavi stratejileri üretilmiş fakat hiçbiri tam anlamıyla olumlu bir sonuç alamamıştır. Bu sebeple son yıllarda KHAK gelişiminde önemli bir fonksiyonu olduğu düşünülen Myc onkogenini hedefleyen stratejiler üretilmeye başlanmıştır.

Myc ailesi onkogenlerin farklı kanser türlerinde hücre çoğalması, apoptoz, metastaz ve transkripsiyonel düzenleme ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Myc tarafından transkripsiyonun indüklendiği hücrelerde normal hücrelere kıyasla kalitatif ve kantitatif olarak farklılık göstermektedir. Myc tarafından transkripsiyonun indüklenmesi hücre grubuna bağlı olarak farklı biyolojik sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir. Bazı hücrelerde Myc ifade artışı mitotik kaosu indükleyerek hücre ölümüne sebep olmakta iken KHAK ve kolon kanseri hücreleri gibi hücre dizilerinde Myc aktivasyonu agresif fenotip ile ilişkilidir. Myc transkripsiyon faktörünün normal hücrelerde aktif promotorların %34'üne, tümör örneklerinde ise yaklaşık %66'sına bağlandığı Sabo ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada gösterilmiştir (Sabo vd., 2014). Bu sonuçta hem transkripsiyonel aktivatör hem de transkripsiyonel represör olarak fonksiyon gösteren Myc transkripsiyon faktörünün pek çok farklı türünde birbirinden farklı binlerce hedef geni kontrol ediyor olma durumunu açıkça göstermektedir

Transkripsiyonel olarak önemli bir düzenleyici olan Myc'nin hücre metabolizması, hücre proliferasyonu, metastaz ve kök hücre fenotipi gibi biyolojik özellikleri düzenleyen pek çok önemli genin ifadesini kontrol etmesi olasıdır. Literatürde son yıllarda genom boyutunda yapılan çalışmalar Myc' nin hedef genlerini tanımlamaktadır. Hücre grubuna bağlı olarak farklılık gösterebilen bu hedef genler arasında her hücre grubunda Myc tarafından düzenlendiği bilinen ve "core signature" olarak adlandırılan genler bulunmaktadır. Bu genler normal ve kanser hücreleri de dahil Myc ifadesi bulunan tüm hücrelerde ortak olarak tanımlanmıştır. Core signature olarak adlandırılan genler dışında Myc tarafından ifadeleri düzenlenen ve hücre tipine göre değişen hedef genler de bulunmaktadır. Bu durumda, Myc geninin hücre grubuna bağlı olarak farklı fonksiyonları düzenlediğini göstermektedir.

1.1 Amaç

Gerçekleştirilen tez projesinin amaçlarına değinecek olursak;

- i. KHAK hücre dizilerinde Myc onkogeni tarafından ifadeleri düzenlenen mRNA ve miRNA'ları tanımlamak
- ii. KHAK hücre dizilerinde Myc ifade değişimine bağlı olarak değişen hücresel fonksiyonları (metabolizma ve proliferasyon gibi) belirlemek
- iii. Myc tarafından ifadesi düzenlenen miRNA'ların olası hedef mRNA'ları belirlemek ve bu mRNA'ların hücre metabolizması gibi KHAK gelişimindeki olası rollerini belirlemek.
- iv. Gerçekleştirilen Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (QTOF-LC-MS) analizi sonucunda KHAK hücre dizilerinde aktif hücresel metabolik yolları ve ürünleri belirleyerek KHAK tedavi stratejisi olabilecek potansiyel hedefleri belirleyebilmektir.

2. KURAMSAL BİLGİ VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en yaygın olarak gözlenen malignant hastalıktır. Mortalite bakımından kadın ve erkekler arasında birinci sırada yer alır iken, insidansı göz önüne alındığında erkeklerde prostat kanseri kadınlarda ise meme kanserinden sonra gelmektedir (Torre vd 2015).

2.1.1 Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi artan sigara kullanımı nedeniyle 1930'lu yıllardan bu yana artmaktadır (Ridge vd 2013). Geçmiş yüzyıl içerisinde akciğer kanserinin nadir bir hastalıktan olmaktan çıkıp sık gözlenen bir hastalığa dönüşmesi global bir sağlık problemi olarak ortaya çıkmasına neden olmuştur (Adler vd 1912).

Akciğer kanseri vakaları tüm kanser vakalarının yaklaşık %14' ünü oluşturmaktadır (De la Cruz vd 2011). Görülme sıklığı açısından erkeklerde daha çok rastlansa da son dönemlerde kadınlarda sigara kullanım alışkanlığının artışı bu oranı erkeklere yaklaştırmaktadır. Özellikle, erkekler açısından insidans doğu ve güney Avrupa ülkeleri ile Japonya ve Çin' de artarken kadınlar açısından gelişmiş ve gelişmekte olan tüm ülkelerde artmaktadır (Ferlay vd 2010). Tam anlamıyla etkili bir tedavi yönteminin olmaması sebebiyle hastaların yaklaşık % 16' sı tedaviden sonra 5 yıl daha yaşayabilmektedir (Siegel vd 2012).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verileri göz önüne alındığında akciğer kanserine bağlı olarak her yıl yaklaşık 1.4 milyon insan ölmektedir (Ferlay vd 2013). Ülkemizdeki kanser vakalarının istatistikleri incelendiğinde her yıl yaklaşık olarak 96.200 erkek ve 67.200 kadının kanser teşhisi aldığı öngörülmektedir. Son 5 yıla ait kanser verileri göze alındığında kanser görülme sıklığında herhangi bir istatistiksel değişim saptanmamıştır. Türkiye

Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu Kansere Daire Başkanlığı tarafından 2014 yılında yayınlanan verilere göre erkeklerde kanser insidansı 220.3/100000, kadınlardaki kanser insidansı ise 156,8/100000 olarak öngörülmüştür. Akciğer kanseri açısından ülkemizde tutulmuş veriler incelendiğinde akciğer kanseri insidansının 11.5/100000 olduğu tahmin edilmektedir (web1).

2.1.2 Etiyoloji

2.1.2.1. Sigara

Sigara kullanımı akciğer kanseri etiolojisinden sorumlu en önemli faktördür. Akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %90' ı sigara kullanmaktadır (Shopland 1995, Wingo vd 1999). Özellikle akciğer kanseri alt türü olan küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hastalarında bu oran %95' e kadar çıkabilmektedir. Sigara dumanının 4000'den fazla bileşen içerdiği bilinmektedir (Condolucci vd 2016). Çekilen sigara dumanı potansiyel karsinojenik özellikteki polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aromatik aminler, vinil klorid, arsenik ve krom gibi bileşikleri içermektedir. Nikotin ise bağımlılık yapıcı özellikte bir molekül olup karsinojen özelliğe sahip değildir (Wynder 1967). Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı (IARC) tütün dumanında yaklaşık elliden fazla karsinojen özellikte bileşen tanımlamıştır.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2012 verilerine göre ülkemizde sigara kullanımının erkeklerde %41.4 kadınlarda ise %13.1 oranında olduğu belirtilmiştir. Sigara kullanan bireylerde kullanmayan bireylere kıyasla kansere yakalanma riskinin 20 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu risk artışı sigara içme süresi, içilen sigara sayısı, içilen sigara tipi ve sigaraya başlama yaşı ile orantılıdır (web 2). 2000 yılında İngiltere'de yapılmış bir çalışmada günlük sigara sayısının 1-14 olması durumunda relatif riskin (RR) 7.7 olduğu, 15-24 arasında olması durumunda ise 13.7, 25 ve üzerinde ise 24.5 olduğu gösterilmiştir (web2). Sigarayı bırakma süresi 10-19 yıl olan bireyler ile sigara içmeye devam eden bireyler arasındaki rölatif riskin yaklaşık 5 kat kadar azaldığı saptanmıştır. Buna rağmen sigarayı bırakma süresi 40 yılı aşan bireylerde risk hiç sigara içmemiş bireylere kıyasla yüksektir.

Pasif sigara içiminde akciğer kanserine yakalanma riskinin 3.5 kat arttığı bilinmektedir. Literatürde yapılan bir çalışmada sigara kullanan bireylerle evli kişilerde akciğer kanserine yakalanma riskinin %30 oranında arttığı gösterilmiştir (web2).

2.1.2.2 Beslenme

Literatürde diyetel faktörlerin akciğer kanseri gelişiminde rol oynayabileceğini destekleyen görüşler bulunmaktadır. Yapılan birçok epidemiyolojik çalışma sonucunda

diyetle sebze alımının akciğer kanseri dahil pek çok kanser türüne yakalanma riskini azalttığı gösterilmiştir. Vitamin A ve E türevi antioksidanların noksanlığı veya düşük miktarlarının akciğer kanserleri ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Boone vd 1990). Antioksidanların en çok bulunduğu besinler olan meyve ve sebzeleri günlük diyetinde yüksek miktarda tüketen bireylerin daha az tüketen bireylere oranla akciğer kanseri riskinin daha düşük olduğu saptanmıştır (Feskanich vd 2000, Smith-Warner vd 2003, Miller vd 2004). Öte yandan yüksek yağlı diyetle beslenen ve sigara kullanan bireylerde kanser gelişim riskinin daha yüksek olduğu bilinmektedir.

Akciğer kanserlerinde beta karoten düzeyinin sigara öyküsü ile ilişkisi araştırılmış ve sigara içenlerde serum beta karoten seviyesinin sigara kullanmayan bireylere kıyasla daha düşük seviyelerde olduğu saptanmıştır. Ayrıca diyetle alınan retinol'ün de akciğer kanseri gelişimi ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Fritz vd 2011). Yüksek dozda E vitamini takviyesinin de artmış akciğer kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2.1.2.3 Mesleki ve Çevresel Maruziyet

Akciğer kanseri mesleki maruziyet nedeniyle ortaya çıkan kanser türleri arasında en sık rastlanandır. Akciğer kanserinin pek çok farklı meslek alanında çalışan bireylerde ortaya çıkabildiği bilinmektedir. Mesleki ve çevresel maruziyette en önemli ve tehlikeli madde asbesttir (Jones vd 1996). Asbeste olan maruziyet süresi önemlidir. Türkiye'de belirlenen kanser hastalarının %1'inin de çevresel asbest maruziyeti saptanmıştır. Ayrıca başta asbest ve radon olmak üzere arsenik, bis-klorometil eter, krom, formaldehit, iyonize radyasyon, nikel, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, sert metal tozları ve vinil kloridinde akciğer kanseri gelişiminde önemli rol oynadıkları saptanmıştır (Driscoll vd 2005, Fingerhut vd 2006).

Mesleki maruziyet yanında doğada da bulunan radonun akciğer kanserine sebep olabileceği düşünülmektedir. Radonun akciğer kanseri riskini 2 kat artırdığı saptanmıştır. Gelişen endüstri ile birlikte artan hava kirliliği de akciğer kanseri gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle kırsal kesimde yaşayan bireylerde çevresel maruziyet nedeniyle kentte yaşayan bireylere göre daha düşük oranda kanser riski bulunmaktadır.

2.1.2.3 Sosyoekonomik Durum

Sosyoekonomik durumu kötü olan bireylerde akciğer kanserine yakalanma riskinin 2-5 kat daha fazla olduğu bilinmektedir (Mao vd 2001). Bu durumun en önemli sebebi ise etyolojik faktörlere daha fazla maruz kalması ile ilişkili olmasıdır.

2.1.2.4 Radyoterapi ve Hormon Tedavisi

Farklı bir malignite nedeniyle radyoterapi (RT) alan hastalarda akciğer kanseri gelişim riskinin arttığı bilinmektedir. Kadınlarda meme kanseri tedavisi sırasında uygulanan radyoterapi ile akciğer kanseri gelişme riskinin 2 kat arttırıldığı saptanmıştır (Kaufman vd 2008). Hodgkin dışı lenfoma hastalarında da radyoterapi uygulamasından 5 yıl sonraki süreçte akciğer kanseri geliştirme riski 1.5 kat artmıştır. Öte yandan son zamanlarda kadınlarda östrojen ve progesteronu kapsayan hormon tedavi stratejilerinin de akciğer kanseri geliştirme riskini arttırdığı bilinmektedir.

2.1.2.5 Ailesel Faktörler ve Genetik Yatkınlık

Yapılan analizler sonucunda birinci derece akrabalarında akciğer kanseri gözlenen bireylerde akciğer kanseri gelişimi riskinin 2.4 kat artmış olduğu bulunmuştur (Tokuhata vd 1963, Ooi vd 1996). Bu durum, akciğer kanseri gelişiminde kalıtsal faktörlerin rol oynadığını göstermektedir.

Literatürde yapılan bir çalışmada küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) tanısı alan hastaların %18' i sigara kullanmamalarına rağmen Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (*EGFR*) mutasyonu ve ailesel risk nedeniyle akciğer kanserine yakalandıkları gösterilmiştir (Gaughan vd 2013). Bu çalışmalar da ailesel akciğer kanserlerinin çevresel ve genetik faktörlerin akciğer kanseri gelişimi üzerine olası etkilerini araştırmak için iyi bir model oluşturmaktadır (Kanwal vd 2017).

2.2 Akciğer Kanseri Histopatolojisi ve Evrelendirme

WHO 1967 yılında ilk kez bugün kullanılan akciğer kanseri sınıflandırmasının esaslarını yayınlamıştır. Yine WHO tarafından 1982, 1999 ve 2004 yıllarında farklı sınıflandırma esasları yayınlansa da sigara içme alışkanlıklarındaki farklılaşmalara bağlı olarak tüm dünyadaki akciğer kanseri insidansı ve mortalitesindeki değişimden dolayı sınıflandırma 2015 yılında son halini almıştır. 2015 yılında yapılan patolojik sınıflandırma Tablo 2.1'de verilmiştir (Travis vd 2015).

Tablo 2.1 DSÖ' ne göre Akciğer kanserlerinin histopatolojik sınıflandırılması (Travis vd. 2015)

Histologic Type and Subtypes	ICDO Code	Histologic Type and Subtypes	ICDO Code
Epithelial tumors		Papillomas	
Adenocarcinoma	8140/3	Squamous cell papilloma	8052/0
Lepidic adenocarcinoma*	8250/3 ^d	Exophytic	8052/0
Acinar adenocarcinoma	8551/3 ^d	Inverted	8053/0
Papillary adenocarcinoma	8260/3	Glandular papilloma	8260/0
Micropapillary adenocarcinoma*	8265/3	Mixed squamous and glandular papilloma	8560/0
Solid adenocarcinoma	8230/3	Adenomas	
Invasive mucinous adenocarcinoma*	8253/3 ^d	Sclerosing pneumocytoma*	8832/0
Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma	8254/3 ^d	Alveolar adenoma	8251/0
Colloid adenocarcinoma	8480/3	Papillary adenoma	8260/0
Fetal adenocarcinoma	8333/3	Mucinous cystadenoma	8470/0
Enteric adenocarcinoma*	8144/3	Mucous gland adenoma	8480/0
Minimally invasive adenocarcinoma*		Mesenchymal tumors	
Nonmucinous	8256/3 ^d	Pulmonary hamartoma	8992/0 ^d
Mucinous	8257/3 ^d	Chondroma	9220/0
Preinvasive lesions		PEComatous tumors*	
Atypical adenomatous hyperplasia	8250/0 ^d	Lymphangioliomyomatosis	9174/1
Adenocarcinoma in situ*		PEComa, benign*	8714/0
Nonmucinous	8250/2 ^d	Clear cell tumor	8005/0
Mucinous	8253/2 ^d	PEComa, malignant*	8714/3
Squamous cell carcinoma	8070/3	Congenital peribronchial myofibroblastic tumor	8827/1
Keratinizing squamous cell carcinoma*	8071/3	Diffuse pulmonary lymphangiomatosis	
Nonkeratinizing squamous cell carcinoma*	8072/3	Inflammatory myofibroblastic tumor	8825/1
Basaloid squamous cell carcinoma*	8083/3	Epithelioid hemangioendothelioma	9133/3
Preinvasive lesion		Pleuropulmonary blastoma	8973/3
Squamous cell carcinoma in situ	8070/2	Synovial sarcoma	9040/3
Neuroendocrine tumors		Pulmonary artery intimal sarcoma	9137/3
Small cell carcinoma	8041/3	Pulmonary myxoid sarcoma with <i>EWSR1-CREB1</i> translocation*	8842/3 ^d
Combined small cell carcinoma	8045/3	Myoepithelial tumors*	
Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Myoepithelioma	8982/0
Combined large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Myoepithelial carcinoma	8982/3
Carcinoid tumors		Lymphohistiocytic tumors	
Typical carcinoid tumor	8240/3	Extranodal marginal zone lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	9699/3
Atypical carcinoid tumor	8249/3	Diffuse large cell lymphoma	9680/3
Preinvasive lesion		Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia	8040/0 ^d	Intravascular large B cell lymphoma*	9712/3
Large cell carcinoma	8012/3	Pulmonary Langerhans cell histiocytosis	9751/1
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Erdheim-Chester disease	9750/1
Sarcomatoid carcinomas		Tumors of ectopic origin	
Pleomorphic carcinoma	8022/3	Germ cell tumors	
Spindle cell carcinoma	8032/3	Teratoma, mature	9080/0
Giant cell carcinoma	8031/3	Teratoma, immature	9080/1
Carcinosarcoma	8980/3	Intrapulmonary thymoma	8580/3
Pulmonary blastoma	8972/3	Melanoma	8270/3
Other and Unclassified carcinomas		Meningioma, NOS	9530/0
Lymphoepithelioma-like carcinoma	8082/3	Metastatic tumors	
NUT carcinoma*	8023/3 ^d		
Salivary gland-type tumors			
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3		
Adenoid cystic carcinoma	8200/3		
Epithelial-myoepithelial carcinoma	8562/3		
Pleomorphic adenoma	8940/0		

(Continued)

*The morphology codes are from the ICDO.² Behavior is coded /0 for benign tumors, /1 for unspecified, borderline or uncertain behavior, /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia, and /3 for malignant tumors.

^dThe classification is modified from the previous WHO classification³ taking into account changes in our understanding of these lesions.

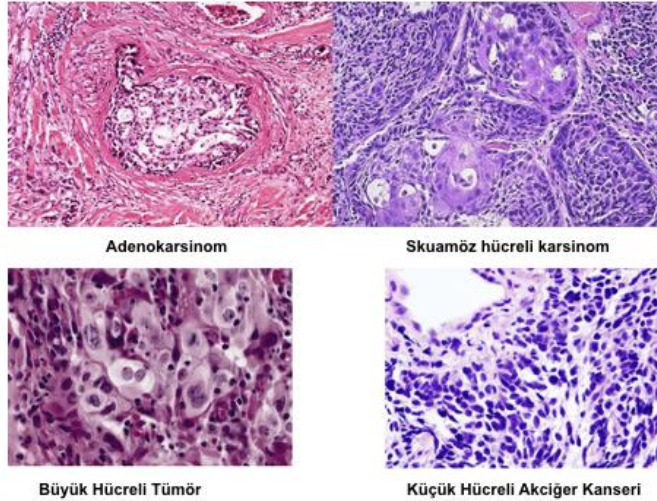
¹This table is reproduced from the 2015 WHO Classification by Travis et al.¹

²These new codes were approved by the International Agency on Cancer Research/WHO Committee for ICDO.

³New terms changed or entities added since 2004 WHO Classification.¹

LCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma, WHO, World Health Organization; ICDO International Classification of Diseases for Oncology.

Tüm akciğer kanserlerinin %15-20'si küçük hücreli karsinomlar, %9'u büyük hücreli/farklılaşmamış karsinomlar, %28-42'si adenokarsinom, %25-44'ü epidermoid karsinom ve %1-2'si karsinoid tümörlerden oluşmaktadır (Şekil 2.1). Geri kalan %2'den az kısmını ise nadir akciğer tümörleri oluşturmaktadır (Travis vd 2004).



Şekil 2.1 Akciğer kanseri alt tipleri mikroskopik görüntüsü

2.2.1 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHAK, akciğer kanseri alt türlerinin en agresif tipi olup tüm akciğer kanseri vakalarının %15-20' sini oluşturmaktadır. Hemen hemen tüm olgular sigara öyküsüne sahiptir. Hızlı çoğalma, erken yayılım ve kötü prognoz ile ilişkili olan KHAK, erken evrede platinyum bazlı kemoterapiye hassasiyet göstermesine rağmen hastaların çoğunda rekürrens kısa sürede gerçekleşmektedir (Meerbeeck vd 2011). Rekürrens gözlenen ileri evre hastalarda sağ kalım oranı ise %7'den daha azdır (Yu vd 2016). KHAK hastalarının tedavisinde genellikle ilk aşamada kemoterapi ile tedavi yolu tercih edilip sonraki aşamada cerrahi müdahale yapılmaktadır.

KHAK nöroendokrin hücrelerden köken almaktadır. Hiperkromatik nükleuslu, dar sitoplazmalı, lenfositten iki kat büyük hücrelerin oluşturduğu gruplardan oluşur. Bol mitoz, yaygın nekroz gösterir. Sitolojik olarak dar sitoplazmalı, organelden fakir hücrelerdir. İnce sitoplazmik uzantıları mevcuttur. Tanı konulduğunda hastaların %80'i uzak metastaz yapmıştır (Kumar vd 2004, Mills vd 2012). İkiye katlanma zamanı yaklaşık 30 gündür. Tedavi edilmediklerinde ortalama yaşam süresi 6-17 haftadır. Paraneoplastik sendromların en sık görüldüğü akciğer kanseri alt türüdür (Uygunuz antidiüretik hormon salınımı sendromu (Hiperkalsemi gibi) (Jackman ve Johnson 2005).

Damar duvarlarında tümör hücrelerinden çıkan artmış miktardaki DNA'nın oluşturduğu bazofilik görünüm belirgin bir bulgudur (Azzopardi etkisi). KHAK tanı konma aşamasında saf ya da kombine türlerde bulunabilmektedir. Alanda en az %10 oranında büyük hücre grubu gözleniyorsa "Kombine küçük ve büyük hücreli karsinom" olarak nitelendirilmektedir. Bunun yanı sıra tümör içerisinde adenokarsinom (ADK) ya da skuamöz

hücreli karsinom (SHK) komponentleri olduğunda, benzer şekilde sırasıyla “Kombine KHK ve ADK” ya da “Kombine KHK ve SHK” tanısı verilmektedir. Küçük hücreli akciğer karsinomu diğer akciğer alt türlerinden daha belirgin özellikler gösterdikleri için histolojik olarak detaylı olarak araştırılmalıdır (Tablo 2.2). İmmünohistokimyasal olarak CD56, kromogranin, sinaptofizin belirteçleri nöroendokrin kökeni tanımlayabilmek için kullanılmaktadır (Travis 2012). Ancak bunlar negatif bile olsa tipik morfolojik bulgular varsa KHAK tanısı verilmektedir.

Tablo 2.2 KHAK İmmünohistokimyasal Belirteçleri

İmmünohistokimyasal Belirteçler	
Metastatik Adenokarsinom	Napsin A (-), TTF-1 (-), CK 20 (+)
Primer Akciğer Adenokarsinom	Napsin A (+), TTF-1 (+), CK 7 (+)
Küçük Hücreli Karsinom	TTF-1 (+), Sinaptofizin (+), CD56 (+), Kromogranin (+)
Skvamöz Hücreli Karsinom	p40 (+), p63 (+), CK 5/6 (+)
Malign Mezotelyoma	TTF-1 (-), CK 5/6 (+), WT1 (+), Kalretinin (+), BerEP4 (-)

TTF-1: Tiroid Transkripsiyon Faktör 1, CK: sitokeratin

2.2.2 Evreleme

Akciğer kanserlerinde sağkalımın en önemli belirtecinin histolojik alt türünden ziyade tümörün evresi olduğu bilinmektedir. Evrelendirme, tümörün yayılımını göstermek, olası prognoz ve tedavi yaklaşımlarını belirlemek açısından oldukça önemlidir. Evrelendirmek için primer tümörün büyüklüğü ve yayılımına (T), bölgesel lenf bezi tutulumuna (N), uzak metastaz varlığına (M) dayanan TNM evrelendirme sistemi kullanılır. Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Örgütü (IASLC) tarafından 1990 ve 2000 yılları arasında toplanan 68463 KHDAK ve 13032 KHAK’li hastaya ait veriler tümör boyutu, lenf nodu durumu ve metastaz varlığına bağlı olarak analiz edilmiştir ve sınıflandırma son halini 2016 yılında yayınlanmış sekizinci versiyonu ile almıştır (Şekil 2.2a,b)(Stahel vd 1989, Detterbeck vd 2016).

A)

Descriptor	7th edition	8th edition (recommended classification)
T component		
<=1cm	T1a	T1a
>1-2cm	T1a	T1b
>2-3cm	T1b	T1c
>3-4cm	T2a	T2a
>4-5cm	T2a	T2b
>5-7cm	T2b	T3
>7cm	T3	T4
Bronchus <2cm from carina	T3	T2
Total atelectasis/pneumonitis	T3	T2
Invasion of diaphragm	T3	T4
Invasion of mediastinal pleura	T3	-
N component		
No involvement or involvement of regional lymph nodes	N0, N1, N2, N3	N0, N1, N2, N3
M component		
Metastases within the thoracic cavity	M1a	M1a
Single extrathoracic metastasis	M1b	M1b
Multiple extrathoracic metastases	M1b	M1c

B)

T/M		N0	N1	N2	N3
T1	T1a ≤ 1	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b >1-2	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c >2-3	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a <i>Cent, Yisc Pl</i>	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2a >3-4	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b >4-5	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3 >5-7	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Inv</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Satell</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 >7	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Inv</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Ipsi Nod</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a <i>Contr Nod</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a <i>Pl Dissem</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b <i>Single</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c <i>Multi</i>	IVB	IVB	IVB	IVB

Şekil 2.2 Akciğer Kanserlerinin Evrelendirilmesi. a) T,N ve M kriterlerinin 7. ve son versiyonlara göre sınıflandırılması b) Son sınıflandırma versiyonuna göre Akciğer kanser evrelerinin gruplandırılması (Detterbeck vd 2017)

2.2.3 Küçük Hücreli Akciğer Kanserinde Prognostik Faktörler

KHAK ile ilişkili pek çok prognostik faktör bilinmektedir. Kötü performans durumu (PD), yaygın evre hastalık, kilo kaybı ve hastalığın aşırı yaygın oluşu en önemli olumsuz prognostik faktörler iken iyi PD, 70 yaş altı olmak, normal seviyede LDH ve evre I hastalık iyi prognoz ile ilişkilidir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3 KHAK prognostik faktörleri

	İyi Prognoz	Kötü Prognoz
Cinsiyet	Kadın	Erkek
Yaş	<70	>70
İrk	Beyaz	Siyah
Vücut Ağırlığı	Değişmemiş	> %10 azalmış
Evre	Sınırlı	Yaygın
Performans Durumu	0-1	2-4
Serum Na⁺	Normal	Düşük
Albumin	Normal	Düşük
Laktat Dehidrogenaz (LDH)	Normal	Yüksek
Metastaz Bölgesi	1	>1

2.2.4 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi

KHAK hastalarının tedavisinde genellikle ilk aşamada kemoterapi ile tedavi yolu tercih edilip sonraki aşamada cerrahi müdahale yapılmaktadır. Bu durum genomik boyuttaki çalışmalar için materyal bulunması konusunda zorluklar yaşanmasına sebep olmaktadır. Ancak son dönemlerde kemoterapi öncesi cerrahi müdahale yapılmış hastalardan alınan örneklerin kullanılmasıyla KHAK'lerinde genom düzeyinde analizler yapılmaya başlanmıştır (Sos vd 2012; Peifer vd 2012, Iwakawa vd 2013). Yapılan genom düzeyindeki analizlere rağmen KHAK'de hedef alınabilecek herhangi bir etkili genetik değişim tam anlamıyla belirlenmemiştir. Bu durum pek çok sebepten ötürü ortaya çıkmış olabilir. Bu sebeplerden en önemlisi diğer kanser türlerine kıyasla KHAK'lerinde yüksek düzeyde gözlenen mutasyonlardır (Iwakawa vd 2015). KHAK, kendine özgü kromozomal değişiklikler, tümör baskılayıcı genlerdeki değişimler, onkogenler, hücrel biyobelirteçler ve sinyal iletim yollarına sahip olmasıyla karmaşık bir yapıya sahiptir.

KHAK yüksek bir mitotik indekse sahiptir ve akciğerdeki nöroendokrin yada nöroendokrin öncü hücrelerinden köken almaktadır. Fare modellerinde oluşturulan KHAK'i incelendiğinde hücrelerin onkogenik mutasyon ve tümör baskılayıcı kayıpları göz önüne alındığında nöroendokrin ya da nöroendokrin öncü hücrelerinden köken aldığı teyit edilmiştir (Park vd 2011, Sutherland vd 2011, Song vd 2012).

Küçük hücreli akciğer kanserlerinde, kanser gelişimini indükleyici değişimleri saptamak amacıyla kullanılan ilk yöntemler olan karyotipleme ve genomik hibridizasyon yöntemleri kromozomal düzeyde meydana gelen değişimleri göstermiştir. Bu yöntemler aracılığıyla 3. kromozomun kısa kolunda görülen heterozigotluk kaybı akciğer kanseri gelişiminde en erken saptanmış olan moleküler değişiklik olmuştur. Kromozom 3p'de

gözlenen heterozigotluk kaybı KHAK'nin yaklaşık %90'ında gözlenmektedir (Dally vd 1993, Todd vd 1997). Bu kromozom bölgesi Frajil Histidin Triat (*FHIT*), *Roundabout Guidance Reseptör 1 (ROBO1)* ve *RASSF1* gibi tümör baskılayıcı genleri bulundurması nedeniyle önemlidir (George vd 2015). Öte yandan kromozom 4p, 4q,10q,13q,16q ve 17q bölgelerinde de önemli derecede heterozigotluk kaybı gözlenmektedir (Virmani 1998, Shivapurkar 1999).

Genom düzeyinde yapılan çalışmalar sonucunda KHAK hücre ve doku örneklerinde yüksek oranda (%90-95) protein 53 (*TP53*) ve Rb Transkripsiyonel Korepresör 1 (*Rb1*) inaktive edici mutasyonları saptanmıştır (Iwakawa vd 2015). Deney modellerinde *TP53* ve *Rb1* mutasyonları KHAK gelişimini indükleyici özellikle olan öncü mutasyonlardır. *TP53* inaktivasyonunun yanı sıra KHAK'lerinde p53 ailesinden olan onkogenik protein 73 (*p73*) ifadesi yüksek seviyede gözlenmektedir. *p73*, ekzon 2 ve 3'te gözlenen mutasyon sonucu onkogenik bir yapı almaktadır. Bu durum *p73* gibi *p53* ailesinden bir üyenin KHAK gelişiminde rol oynayabileceğini göstermiştir (Tannapfel 2008, George 2015). Kromozom 10'dan Fosfat ve Tensin Delesyonu (*PTEN*) ifadesi ise KHAK olgularında %10-18 oranında gözlenmektedir (Yokomizo vd 1998). Bazı kanser türlerinde NOTCH yolağı aktivasyonu onkogenik özellik gösterir iken KHAK'lerinde NOTCH aktivasyonu tümör gelişimini baskılamaktadır (Kunnimalaiyaan ve Chen 2007, Espinoza ve Miele 2013). KHAK'lerinde %25 oranında NOTCH inaktivasyonu gözlenmektedir.

Antiapoptotik genlerin ifadelerindeki artış KHAK olgularında gözlenen önemli bir genetik değişimdir. Bir antiapoptotik molekül olan B hücreli lenfoma 2 (*BCL2*) seviyesi KHAK'lerinin %75-90'ında önemli seviyede artmıştır (Kaiser ve Haag 1996). *BCL2* seviyesi *p53* tarafından düzenlenmektedir. Bu durumda *p53* ifadesinin kayıp olduğu KHAK'lerinde *BCL2* seviyesindeki artışın bir göstergesidir (Miyashita vd 1994).

Histolojik analizlerin yerine metilom ve transkriptom analizleri kullanılarak KHAK alt tipleri belirlenebilmektedir (Poirier vd 2013). Histolojik ve genetik olarak aynı yapıdaki KHAK olgularında epigenetik olarak farklı alt gruplar bulunabilmektedir. Bu alt gruplar transkripsiyonel olarak farklı yapıdadırlar. Akut-Skut Homolog 1 (*ASCL1*) ve Nöronal Farklılaşma 1 (*NEUROD1*) gibi farklı nörojenik sarmal dönüş sarmal transkripsiyon faktörleri alt grupları betimlemektedir. KHAK'lerinde gözlenen diğer önemli değişim ise epigenetik düzenleyici olarak rol oynayan genlerde meydana gelen değişimlerdir. Histon asetiltransferaz CREB Bağlanma Proteini (*CREBBP*) ve Protein 300 (*EP300*) ile Lizin Metil Transferaz 2A (*MLL*), *MLL2* ve Zeste Homolog 2 Hızlandırıcı (*EZH2*) mutasyonları %4-6 oranında gözlenmektedir. *EZH2*'nin normal akciğer dokularına kıyasla KHAK olgularında aşırı ekspresyonu gözlenmektedir. *EZH2* özellikle nöral kök hücrelerde yüksek seviyede ekspresyon olup akciğerde sekretör ve bazal hücreler arasındaki fenotipik değişimde önemli rol oynamaktadır. *EZH2* aşırı ekspresyonu, RB/E2F yolağının deregülasyonu sonucu ortaya

çıkılmaktadır ve bu aşırı ekspresyon KHAK hücre proliferasyonunu indüklemektedir (Peifer vd 2012, Umemura vd 2014, Poirier vd 2015).

Hedgehog (Hh) sinyal iletim yolağı KHAK gelişiminde hayati rol oynayan bir yoldur. Hedgehog sinyal iletim yolağının sinyal molekülü olan Smoothened (Smo)'ın *invivo* ve *invitro* deney modellerinde KHAK'ni başlatıcı ve hızlandırıcı bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Park vd 2011). Fibroblast büyüme faktörü reseptörü sinyal iletim yolağı KHAK gelişiminde önemli rol oynamaktadır. KHAK olgularında yaklaşık %5-6 oranında Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü (*FGFR1*) amplifikasyonu gözlenmektedir (Schultheis vd 2014). *FGFR1*, Fibroblast Büyüme Faktörü (*FGF2*) ve *FGF9* protein ve ribonükleik Asit (RNA) düzeylerinin kötü pronozla ilişkili olduğu bilinmektedir (Zhang vd 2015). Ret Protoonkogen (*RET*) bir transmembran tirozin kinaz olup kromozom 10q11.2 bölgesinde lokalizedir. *RET* geninde gözlenen M918T somatik mutasyonu KHAK'i beyin metastazı yapmış lezyonlarında önemli derecede gözlenmektedir. Bu mutasyon sonucu *RET* yolağı ligand bağlanmaksızın aktive olmakta ve *Myc* ile ERK gibi alt yolları aktive etmektedir (Rudin vd 2014). Öte yandan *RET* mutasyonu gözlenen KHAK hücre dizilerinde mutasyon gözlenmeyen hücrelere kıyasla artmış bir çoğalma hızı gözlenmektedir. Fosfoinozitol 3,4,5 üç Fosfat (PI3K)/AKT/mTOR sinyal iletim yolağı mutasyonları KHAK olgularında önemli seviyede gözlenmektedir. Öte yandan WNT yolağının da hem KHAK hem de KHDAK'i gelişiminde rol oynayabileceği öngörülmektedir (Tai vd 2015). Proteomik analizler sonucunda KHAK'lerinde poliadenozil Riboz Transferaz 1 (*PARP1*) ifadesinin önemli seviyede arttığı gösterilmiştir (Byers vd 2012, Wainberg vd 2014). *Aurora kinaz A* yada *B*'nin yüksek ekspresyonu da akciğer kanserlerinde kötü prognoz ile ilişkilidir (Vischioni vd 2006, Hayama vd 2007).

Telomerazlar kromozomların uçlarında tandem tekrarlar şeklinde bulunan genetik elementler olup kromozomları degradasyon, hücre yaşlanma ve hatalı rekombinasyondan engelleme görevi görmektedirler (Harley ve Kim 1997). Germ hücrelerinde ve özellikle pek çok kanser hücrelerinde uzamış telomer dizileri bulunmaktadır. Telomeraz aktivitesi özellikle solid tümörlerde malignant ve metastatik fenotiple korelasyon göstermektedir. Literatürde yapılmış bir çalışmada akciğer kanseri doku örneklerinin %80'inde telomeraz aktivitesi saptanmıştır (Hiyama vd 1995.). KHAK'lerinde yaklaşık %98 oranında *Htr* geninde aşırı ekspresyon ve artmış telomeraz aktivitesi saptanmıştır (Salgia ve Skarin 1998).

Yaklaşık 30 yıl önce *EGFR* ifadesinin KHAK'lerinde düşük seviyede olduğu bildirilmiştir (Gamou vd 1987). Yüksek seviyede *EGFR* ifadesinin KHAK gelişiminde seçici bir özellik olmadığı gösterilmiştir. Son dönemde yapılan RNA dizileme çalışmaları sonucunda KHAK örneklerinde *EGFR* transkript seviyesinin oldukça düşük olduğu gösterilmiştir (George vd 2015). Ek olarak RAS/RAF/MEK/ERK onkogenik sinyal iletim yollarında gözlenen aktive edici mutasyonların nadir olarak gözlemlendiği bilinmektedir (George vd 2015). Son dönemlerde KHAK'ne dönüşen *EGFR* mutasyonu bulunan akciğer adenokarsinomlarında yapılan

çalışmalar sonucunda KHDAK'den KHAK'ne dönüşüm sırasında *EGFR* ifadesinin önemli seviyede azaldığı gösterilmiştir (Niederst vd 2015). RAF/MEK/ERK sinyal iletim yolağının KHAK olgularında çok aktif olamamasının sebebi olarak *c-RAF-1* geni açısından hemizigot olması gösterilmektedir (Graziano vd 1991).

Son dönemlerde yapılan genom düzeyinde yapılan dizileme çalışmaları sonucunda KHAK tümör örnekleri diğer kanser türlerine kıyasla yüksek sayıda bir somatik mutasyon profili göstermektedir. KHAK tümör örnekleri yaklaşık 170 adet protein değişimine neden olan mutasyon taşımaktadır (Rudin vd 2012). Öte yandan *MYC*, *MYCL1*, *MYCN*, *SRY* (sex determining region Y)-box 2 (*SOX2*), *SOX4* ve *KIT* genlerinde kopya sayısı artışı saptanmıştır (Sos vd 2012, Rudin vd 2012). KHAK'lerinde en yaygın ve sık gözlenen genetik değişim ise *MYC* ailesi gen amplifikasyonlarıdır. *MYC* ailesi onkogenler, *MYC* (*c-Myc*), *MYCN* (*N-Myc*) ve *MYCL1* (*L-Myc*)' dan oluşmaktadır. (Kim vd 2006). *MYC* onkogen ailesi üyeleri pek çok kanser türü etyolojisi ile doğrudan ilişkilidir (Francesco vd 2016).

2.3 Myc Onkogeninin Yapısı ve Fonksiyonu

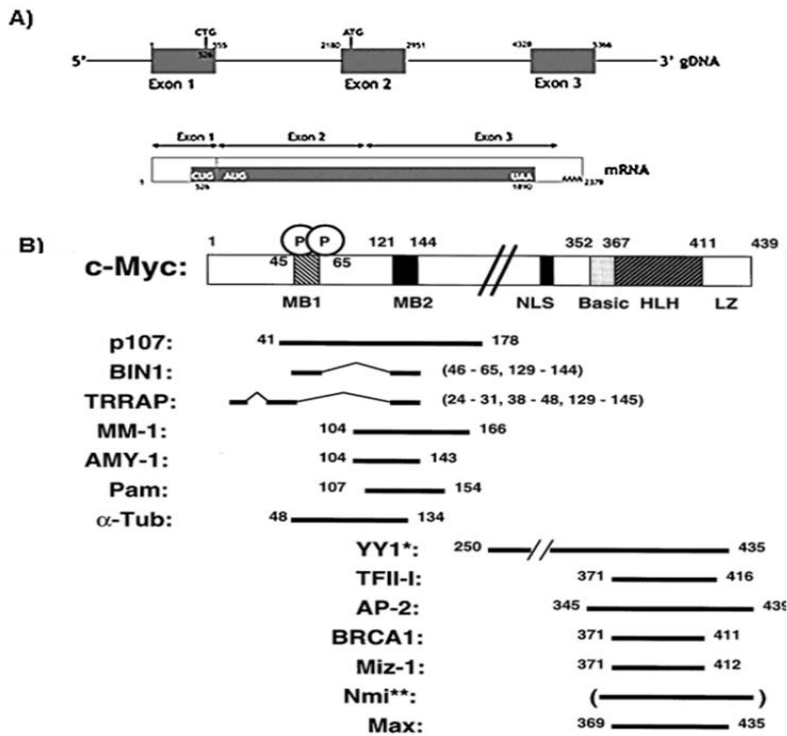
20. yüzyılın başlarında Peyton Rous, tavuk sarkoma ve lösemilerinin tümör hücrelerinden bağımsız ekstraktlar tarafından geçirilebileceğini öne sürmüştür (Rous 1911). Öne sürdürülen model ışığında sarkoma ve lösemiler için virüslerin önemli bir etyolojik ajan olabileceğini literatüre sunmuşlardır (Ellerman ve Bang 1908). 1960 ve 1970'li yıllar içerisinde melanositoma, endotelyoma, karaciğer ve böbrek kanserlerini indükleyici potansiyelde 4 adet retrovirüs (MH-2, MC29, CMII ve OK10) tanımlanmıştır (Mladenov vd 1967). Bishop ve arkadaşlarının tavuklarda lösemi, sarkoma, böbrek, karaciğer ve diğer tümör türlerinin gelişimine katkıda bulunan avian retrovirüsleri sınıflandırdıkları çalışma sonucunda v-myc onkogenini tanımlamışlardır (Vennstrom vd 1982).

MYC ve kanser arasındaki ilişki *Myc* geni yakınında retroviral insersiyon içeren avian-lökosis virüs aracılı B hücreli lenfoma üzerindeki çalışmalar sonucunda belirlenmiştir (Hayward vd 1981). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda 8q24 bölgesinde lokalize olan *Myc* ile t(8;14)'in agresif Burkitt lenfoma gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Dalla Favera vd 1982). *Myc* onkogeninin amplifikasyonu ise ilk olarak myeloid lösemiler ve kolon kanserlerinde tanımlanmıştır (Collins ve Groudine 1982, Alitalo vd 1983).

Myc proteinleri sarmal-dönüş-sarmal lösin zincir transkripsiyon faktörleri olup pek çok biyolojik süreçte anahtar rol oynamaktadır (Lin vd 2012). *MYC* aktivasyonu hücre proliferasyonu, artmış protein sentezi, değişen hücre metabolizması, farklılaşma ve metastaz ile ilişkilidir (Stine vd 2015). *Myc* ailesi proteinlerin diğer bir önemli görevi ise kök hücre varlığının sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır (Fragnocci ve Zippo 2017). *Myc* ailesi

üyeleri bu üç protein de yüksek düzeyde korunmuş ortak bölgelere sahiptirler (Conacci-Sorell vd 2014)

c-Myc (*Myc*) proteini 64 kDa ağırlığında olup 439 amino asite sahiptir. Ailenin diğer üyeleri olan *L-Myc* ve *N-Myc* ise sırasıyla 364 ve 464 amino asite sahiptirler. *Myc* sekansı iki adet translasyon başlama sekansına sahiptir. CTG başlangıç kodonundan 64 kDa proteini, ATG başlangıç kodonundan ise 64 kDa ağırlığında fonksiyonel *Myc* proteinini kodlamaktadır. Literatürde p67 ve p64 arasındaki fonksiyon farkını gösteren detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. *Myc*'nin C-terminal bölgesi sarmal-dönüş-sarmal lösin fermuar dimerizasyon motifine sahiptir. Bu bölge aracılığıyla yanı domain sahip proteinlerle homotipik yada heterotipik dimerizasyon yapabilmektedir (Şekil 2.3a,b) (Vastrik vd 1994). *Myc* transkripsiyonel aktivasyon görevini genellikle Max proteini ile oluşturduğu dimer aracılığıyla gerçekleştirir. *Myc*-Max heterodimeri DNA üzerindeki spesifik E-kutusu (5'-CACGTG-3') bölgesine bağlanarak görev yapmaktadır. Bu heterodimer yapı DNA'da ilgili bölgeye bağlandıktan sonra MYC proteininin N-terminal bölgesi çeşitli transkripsiyon regülatör proteinlerle etkileşime girerek transkripsiyonel düzenlenme sağlanmaktadır.



Şekil 2.3 MYC onkogeninin genomik DNA, RNA ve protein yapısı. a) MYC onkogeninin genomik ve mRNA yapıları. b) Myc proteininin yapısal bölgeleri ve heterodimer oluşturduğu partnerler

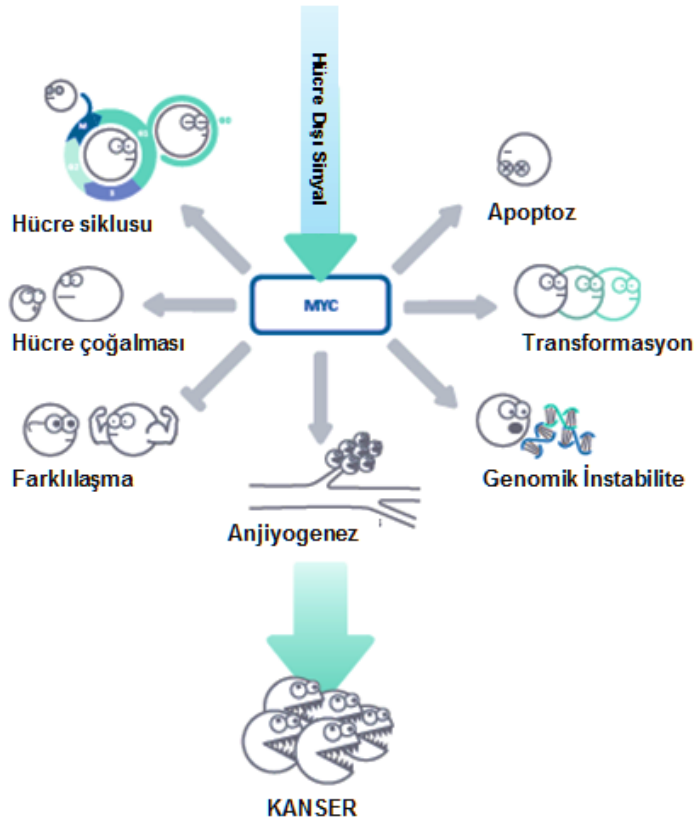
Onkogenik potansiyelinden dolayı MYC proto-onkogeni normal hücrelerde transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde regüle edilmektedir. Bu regülasyon hem hücre siklusu hem de eksternal (büyüme faktörleri ve ekstraselüler matris etkileşimleri)

sinyal mekanizmaları aracılığıyla gerçekleşmektedir. Dinlenme halindeki bir hücre normalde az miktarda Myc eksprese etmekle birlikte büyüme faktörleri ile stimule edildiğinde dramatik düzeyde ekspresyon artışı gözlenmektedir. Pek çok kanser türünün gelişimine katkı sağlayan Myc geninin aktivasyonu pek çok yolla gerçekleşmektedir. Bunlara kromozomal translokasyonlar, gen amplifikasyonları, 3'-UTR sekanslarının uzaklaştırılması ve *MYC* lokusunun yakınına retrovirüslerin insersiyonu örnek verilebilir.

Myc ve kanser arasındaki bağlantı hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak iyi bir şekilde açıklanmasına rağmen Myc aracılı transformasyonun moleküler hücresel mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Myc hücre siklusu mekanizmalarının direkt regülatörüdür. Hücre siklusunda G1/S geçişini hızlandırır ve G2/M fazını uzatmaktadır. DNA hasarı tarafından indüklenen hücre siklusunun duraklatılmasını önlemektedir (Chernova vd 1998). Bu durumu da *p16*, Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1 (*p21*), *p27* ve *p53* gibi hücre siklusu kontrol noktası gen ürünlerinin aşırı ekspresyonu aracılığıyla gerçekleştirir (Amati vd 1998). Pek çok çalışma Myc'in hücre siklusunun G1/S fazı geçişinde düzenleyici proteinler üzerindeki etkilerine odaklanmıştır. Bu geçiş siklin bağımlı kinazların spesifik siklinler ile ilişkisi sonucu aktive olmasıyla düzenlenmektedir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri bu aktivasyonu baskılamaktadır. Myc siklin D1, siklin D2, siklin E, CDK4 ve *cdc25a*'yı indükler. Uygun olmayan hücre siklus proliferasyonu genomik instabiliteye neden olarak yeni mutasyonların ve anormal kromozom sayıları ve yapılarının oluşmasına neden olur. Myc aşırı ekspresyonu gen amplifikasyonu, anöploid ve poliploid ile karakterize edilen genomik instabiliteyi indükler. Hücre siklusu progresyonu üzerindeki rolüne ilave olarak Myc'in farklılaşma programlarını ve hücre adezyonunu aktif olarak baskıladığı da düşünülmektedir.

Myc tarafından indüklenen apoptoz ilk defa IL-3 bağımlı 32.d3 myeloid progenitör hücre hattıyla yapılan bir çalışmada anlaşılmıştır. IL-3 yokluğunda artmış Myc ekspresyonu hücrelerin S fazına geçişini sağlamıştır ve hücre ölüm oranını arttırmıştır. Myc aşırı ekspresyonu olan fibroblastlar ayrıca düşük serum, hipoksi, düşük glukoz gibi çevresel streslere cevap olarak apoptoza gitmektedirler. Ornitin dekarboksilaz (*ODC*) ve laktat dehidrogenaz A (*LDH-A*) gibi Myc hedefi olan genler Myc tarafından indüklenen apoptoz ile ilişkili gibi görünseler de mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Hücre siklusu ve apoptoz süreçlerinin düzenlenmesinin yanında MYC onkogeni hücresel metabolizma, anjiyogenez ve hücresel transformasyon süreçlerinde rol oynayan pek çok genin ifadesini düzenlediği bilinmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 MYC onkogeni pek çok önemli hücresel biyolojik süreci düzenler

2.4 Küçük Hücreli Akciğer Kanserlerinde Tedavi Hedefleri

KHAK diğer akciğer kanseri alt türlerine kıyasla erken metastaz, hızlı çoğalma, uzak metastaz ve yüksek mortalite ile karakterizedir. KHAK olgularında tedavi sonrası 5 yıllık sağ kalım oranı %5'ten azdır (Teicher 2014). Son 10 yıl içerisinde KHAK terapisi amacıyla pek çok strateji geliştirilmiştir (Lopez-Chavez vd 2012, Joshi vd 2013). Bu stratejiler içerisinde reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve ilişkili PI3K/Akt/mTOR yolağı gibi alt sinyal yollarını hedefleyen stratejiler bulunmaktadır. Öte yandan anjiyogenez, Hedgehog sinyal yolağı, apoptoz, epigenetik, hücre yüzey molekülleri, transkripsiyon faktörleri, metabolizma ve immünoterapi hedefli stratejiler üretilmiştir.

2.4.1 Reseptör Tirozin Kinaz İnhibitörleri

KHAK'lerinde RTK'ları hedefleyen spesifik pek çok bileşen klinik denemelerde kullanılmıştır. *c-Met* ekspresyonu KHAK olgularında önemli seviyede saptanmıştır ve *c-Met* inhibisyonu için kullanılan SU11274 irinotekan türevi olan SN-38'in etkinliğini artırdığı literatürde gösterilmiştir (Rolle vd 2014). FGFR ailesi reseptörlerin KHAK'inde yüksek

seviyede ifade olduğu bilinmektedir. Bu sebeple FGFR ailesi reseptörleri KHAK'inde potansiyel hedef tedavi stratejisi olmaktadır (Schulteis vd 2014). PD173074, FGFR'ı hedefleyen bir molekül olup KHAK modellerinde kanser gelişimini baskılayıcı özellik gösterdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Pardo vd 2009). Diğer bir RTK olan IGF-1R KHAK olgularında aşırı ekspresyonu gözlenmesi sebebiyle önemli bir hedef stratejisi olduğu bilinmektedir (Nakanishi vd 1988). Literatürde IGF-1R' yi hedefleyen MK-0646, OSI-906, figitumumab ve cixutumumab KHAK'lerinde tedavi amacıyla kullanılmıştır.

2.4.2 PI3K/Akt/mTOR yolağı inhibitörleri

PI3K/AKT/mTOR yolağı aktivasyonu KHAK olgularında artmış hücrel çoğalma ve kemoterapiye direnç ile ilişkilidir (Ali vd 2011). KHAK'lerinde bu sinyal yolağı üyelerinin çoğunda genetik değişimler saptanmıştır (Rudin vd 2012). Everolimus ve erlotinibin kombine uygulamasının KHAK'lerinde PI3K yolağının baskılanması yoluyla hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Boller vd 2012). Literatürde PF-4989212 ve MK-2206 gibi inhibitörlerin KHAK'lerinde PI3K/AKT yolağını baskılanması yoluyla kanser gelişimi sürecini yavaşlattığı belirtilmektedir.

2.4.3 Hedgehog Yolağı İnhibitörleri

Hedgehog sinyal iletim yolağı KHAK'lerinde oldukça araştırılmış bir yoldur. Bu sinyal iletim yolağının baskılanması insan ve fare modellerinde KHAK gelişimini engelleyici özellikte olduğu saptanmıştır (Neal vd. 2010). GDC-0449 gibi Hh yolağı inhibitörleri faz I ve faz II çalışmalarında denenmektedir.

2.4.4 Anjiyogenez İnhibitörleri

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) önemli bir anjiyogenik faktör olup aşırı ifadesi KHAK olgularında kötü prognoz ile ilişkilidir (Zhan vd 2009). Bevacizumab gibi VEGF'ı hedefleyen stratejiler KHAK tedavisi için uygulanmış ancak istatistiksel anlamda etkili bulunmamıştır. Bevacizumab gibi thalidomid, sorafenib, vandetanib ve sunitinib de KHAK tedavi stratejisi olarak denenmektedir (Ramalingam vd 2009).

2.4.5 Apoptozun Hedeflenmesi

KHAK'lerinde apoptoz sürecinde rol oynayan pek çok gende değişim saptanmıştır. Bu genetik değişimler sonucunda KHAK'lerinde apoptotik süreçte rol oynayan proteinleri hedefleyen stratejiler oldukça artmıştır (Shivapurkar vd 2003). Özellikle *Bcl-2* ailesi proteinleri

hedefleyen ABT-737, S44563, navitoclax ve obtoclax gibi inhibitörler klinik denemelerde kullanılmıştır (Loriot vd 2014).

2.4.6 DNA Tamiri

Son yıllarda yapılan çalışmalar KHAK'lerinde DNA tamirinde rol oynayan bir protein olan PARP1 enzimini hedef alan tedavi stratejilerinin verimli olduğu gösterilmiştir. Özellikle KHAK'nin diğer akciğer kanseri alt türlerine kıyasla PARP inhibisyonuna karşı daha hassas olduğu belirtilmiştir (Byers vd 2012). BMN673 ve ABT-888'in PARP inhibisyonu amacıyla KHAK'lerinde etkili olduğu bilinmektedir.

2.4.7 Aurora Kinaz İnhibitörleri

Aurora kinaz A ve B'nin aşırı ekspresyonunun akciğer kanserlerinde kötü prognoza ilişkili olduğu bilinmektedir (Vischioni vd 2006). Literatürde Aurora kinaz inhibitörü olan MLN8237 ve PHA680632'nin özellikle Myc ifadesi yüksek olan KHAK hücre dizilerinde hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Sos vd 2012). Öte yandan MLN8237 ve paklitaksel'in kombine uygulanmasının KHAK hastalarında olumlu sonuç verdiği bilinmektedir.

2.4.8 İmmünoterapi

Son yıllarda kanser tedavisinde immünoterapi tabanlı yapılan araştırmalar KHAK'lerinde de olumlu sonuçlar vermektedir (Hall vd 2013). Ipilimumab, sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4 (CTLA4)'ü hedef alan ve kemoterapi ile kombine uygulandığında KHAK'lerinde olumlu sonuçlar vermiş bir moleküldür.

2.4.9 Transkripsiyonun Hedeflenmesi

KHAK gelişiminde pek çok transkripsiyon faktörünün rol oynadığı bilinmektedir. Bu sebeple KHAK tedavi stratejileri açısından kanser gelişiminde rol oynayan bu önemli transkripsiyon faktörleri hedeflenmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar ışığında kovalent CDK7 inhibitörü olarak bilinen ve *Myc* gibi süper arttırıcı ilişkili transkripsiyon faktörlerinin ifadesini baskılayan *THZ1*'in KHAK tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Umamura vd 2014).

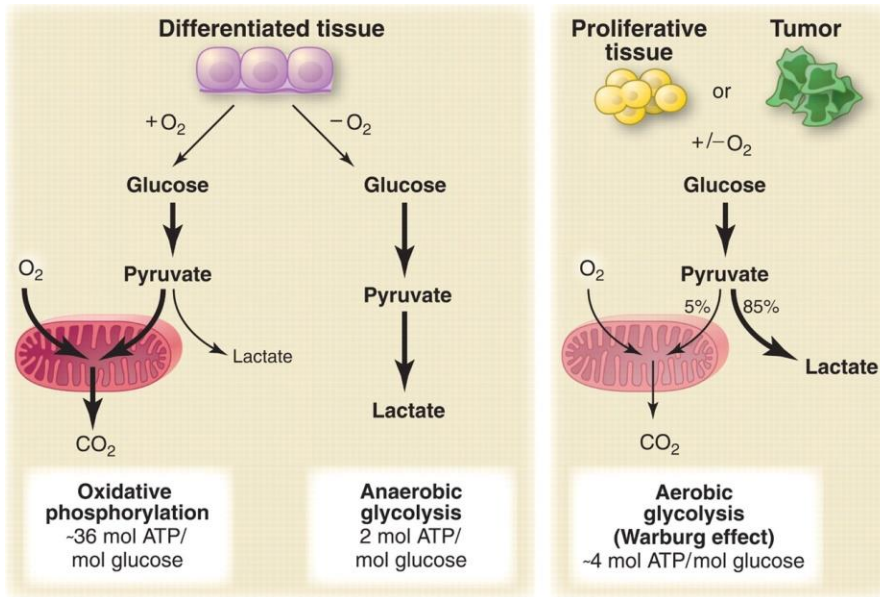
JAK/STAT yolağında görev yapan Janus Kinaz (*JAK1*) ve *JAK2*'nin KHAK olgularında yüksek ekspresyonu bilinmektedir. Bu yolağı baskılamak amacıyla kullanılan AZD1480'in

KHAK gelişiminde negatif etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (Lee vd 2013).

Myc onkogeni de önemli bir transkripsiyon faktörü olup KHAK dahil pek çok kanser türünün gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu sebeple literatürde Myc transkripsiyon faktörünü hedefleyen pek çok strateji bulunmaktadır (Dellmore vd 2011). JQ1 bir bromodomain inhibitörü olup Myc ifadesini önemli seviyede baskıladığı bilinmektedir (Fuyumi vd 2016). Literatürde JQ1'in etkisinin KHAK hücre dizilerinde Myc ifadesini ve proliferasyonu önemli seviyede baskıladığı gösterilmiştir (Fuyumi vd 2016).

2.5 Kanser Hücre Metabolizması

Metabolizma kelime olarak Yunan kökenli olup değişim süreci anlamına gelmektedir. Hücresel metabolizma genellikle biyokimyasal araştırma projelerinin konusu olmuştur. Kanser hücrelerinin metabolizması son yıllarda yapılan araştırma projelerinin önemli bir konusu haline gelmiştir. 1920'li yıllarda Otto Warburg ile başlayan ve onun önermeleri doğrultusunda devam eden çalışmalarda kanser gelişim sürecinin değişen metabolizma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Cairns vd 2011). Otto Warburg 20. yüzyıla iz bırakmış önemli bir biyokimyacı olup kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki metabolik farklılığı ortaya koymuştur (Warburg vd 1924, Warburg vd 1927). Warburg, kanser hücrelerinin aerobik ya da anaerobik şartlar altında glukozu laktik asit fermentasyonu yoluyla metabolize ettiğini göstermiştir. Kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla glukozu metabolize ederken adenozin üç fosfat (ATP) üretmek yerine karsinogenez sürecinde ihtiyacı olan diğer ara metabolitleri sentezlemeyi tercih etmektedir (Pedersen 2007). Bu önemli moleküler olay literatürde "Warburg etkisi" olarak bilinmektedir (Şekil 2.5). Glikolitik yolağın diğer hücresel makromoleküllerin özellikle hızlı çoğalan hücrelerde biyosentezi için önemli bir karbon kaynağı olduğu bilinmektedir. Kanser hücrelerinin bu metabolik özelliği oksijenin yetersiz olduğu koşullarda da varlıklarını sürdürebileceklerini göstermektedir. Warburg etkisinin önemini tam anlamıyla yorumlayabilmek için öncelikle hücre metabolizmasını, hücresel gereksinimleri ve enerji üretimi ve makromolekül biyosentezi aşamalarını anlamak gerekmektedir.



Şekil 2.5 Oksidatif fosforilasyon, anaerobik glikoliz ve aerobik glikoliz (Warburg Etkisi) süreçlerinin şematik gösterimi (Vander Heiden vd 2009)

Glukoz hücreler için enerji kazanımı açısından en önemli moleküldür ve öte yandan biyosentez reaksiyonları için de önemli bir öncül molekül kaynağıdır. Glukoz hücrelerde oksidatif fosforilasyon ya da laktik asit fermentasyonu aracılığıyla metabolize olmaktadır. Oksidatif fosforilasyon sonucunda hücrelerde net 36 ATP kazancı olur iken laktik asit fermentasyonu sonucu 2 ATP kazanılmaktadır. Glukoz metabolizmasında görev alan pek çok gen *Myc* transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenmektedir. *Myc* transkripsiyon faktörü glukoz taşıyıcı (*Glut1*), heksokinaz II (*HKII*), fosfofruktokinaz, enolaz, fosfoglukoz izomeraz ve laktat dehidrogenazın ifadesini arttırmaktadır (Osthus vd 2000).

Glutamin, kanser hücreleri için diğer bir önemli molekül olup hücrelere krebs döngüsü için enerji sağlamasının yanı sıra önemli bir nitrojen kaynağı olarak görev yapmaktadır. Glutamin hücre içerisine *ASCT2* aracılığıyla alınıp glutaminaz (*GLS*) aracılığıyla glutamata dönüşmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar *Myc* tarafından indüklenen kanser türlerinin glutamin metabolizmasına bağımlı olduklarını göstermiştir (Reitzer vd 1979). *Myc* transkripsiyon faktörü, glutamin taşıyıcı *ASCT2* ve glutamin metabolize edici *GLS*'yi doğrudan transkripsiyonel olarak düzenlemektedir (Wise vd 2008).

Kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla artmış bir transkripsiyonel ve translasyonel aktiviteye sahiptir. Hızlı çoğalan kanser hücrelerinin artmış protein ve ribozom sentezi ile karakterize olması olasıdır. Transkripsiyon ve translasyon süreçlerinde rol oynayan *eIF-4e* ve *eIF-4a* gibi genlerin ifadesini düzenleyerek kanser hücre metabolizmasında önemli bir rol almaktadır (Ruggero 2009).

Hızlı çoğalan hücrelerde nükleotid metabolizması, DNA ve RNA sentez süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Pürin ve pirimidin sentezinde rol oynayan pek çok genin ifadesinin *Myc* tarafından düzenlendiği literatürde bilinmektedir. Nükleotid metabolizmasında

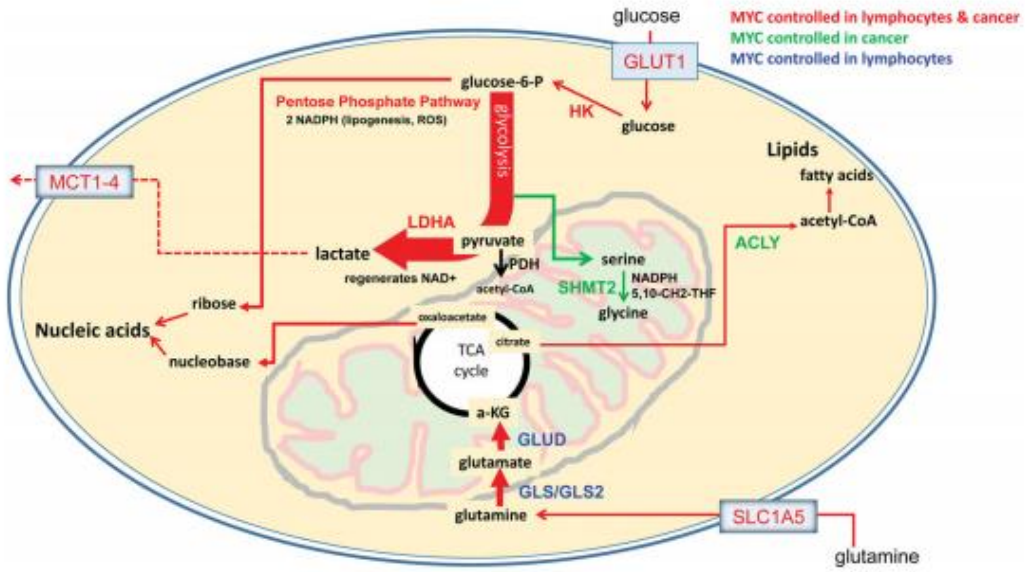
rol oynayan Fosforibozil pirofosfat sentetaz (*PRPS2*), İnozin monofosfat dehidrogenaz (*IMPDH1/2*), Fosfoserin aminotransferaz (*PSAT1*), Fosfoserin fosfataz (*PSPH*) ve Serin hidrometiltransferaz (*SHMT1/2*)'nin *Myc* tarafından düzenlendiği literatürde yapılmış olan çalışmalar tarafından gösterilmiştir (Vasquez vd 2011, Mannava vd 2008).

Hücre çoğalması ve bölünmesi süreçlerinde yeni membran sentezlenmesi ve enerji önemli gereksinimlerdir. Yağ asitleri ve kolesterol hızlı çoğalan hücrelerde hücre membranının yeniden yapılanması için oldukça elzemdir (Yoon vd 2007, Santos vd 2012,). Literatürde yapılan çalışmalarda Yağ asit sentaz (*FASN*), Asetil CoA sentaz (*ACC*) ve Stearil CoA desaturaz (*SCD*) gibi yağ asidi metabolizmasında rol oynayan genlerin *Myc* transkripsiyon faktörünün doğrudan hedefi olduğu gösterilmiştir (Zeller vd 2006).

Literatürde yapılan çalışmalar pek çok kanser türünün *Myc* ifadesine bağımlı olduğu gösterilmiştir. Bu kanser türlerinde *Myc* ifadesini baskılamayı hedefleyen tedavi stratejileri denenmektedir. Ancak tam anlamıyla olumlu sonuç almış bir strateji bulunmamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar karsinogenez sürecinde önemli bir aşama olan metabolizmayı hedef alan tedavi stratejileri üretmektedir. Bu stratejiler doğrultusunda *Myc* tarafından ifadesi düzenlenen ve metabolik süreçte rol oynayan birbirinden farklı proteinler hedef alınmaktadır. Laktat dehidrogenaz A (*LDHA*) *Myc* tarafından ifadesi düzenlenen bir enzim olup glukoz metabolizmasında rol oynamaktadır. Karsinogenez sürecinde ifadesi aşırı şekilde artan bu enzimi hedefleyen pek çok strateji üretilmiştir. *Myc* tarafından indüklenen kanser türlerinde *LDHA* önemli bir hedef olup ifadesinin baskılanmasının *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda önemli sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Fantin vd 2006, Le vd 2010).

Myc tarafından düzenlenen nükleotid metabolizmasının hedeflenmesi de literatürde son yıllarda yapılan çalışmalarda önemli yer tutmuştur. Nükleotid metabolizmasında rol oynayan *SHMT1* ve *PHGDH* gen ifadelerinin baskılanmasının *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda tümör gelişimine negatif etkisi olduğu gösterilmiştir (Nilsson vd 2012)

Karsinogenez sürecinde gözlenen en önemli değişimlerden biri de hücrelerin metabolik aktivitesindeki değişimlerdir. *Myc* tarafından indüklenen kanserlerde bu aktivite değişimi *Myc* onkogeni tarafından doğrudan düzenlenmektedir (Şekil 2.6). Bu sebeple *Myc* indüklü kanserlerde bu gen ya da bu genlerin protein ürünlerinin hedeflenmesi olasıdır. Son yıllarda bu alanda pek çok çalışma yapılmıştır (Wise vd 2008, Fuyumi vd. 2016).



Şekil 2.6 MYC tarafından düzenlenen hücresel metabolizma süreçlerinin gösterimi (Stine vd 2015)

2.6 MikroRNA Biyogenezi ve Fonksiyonları

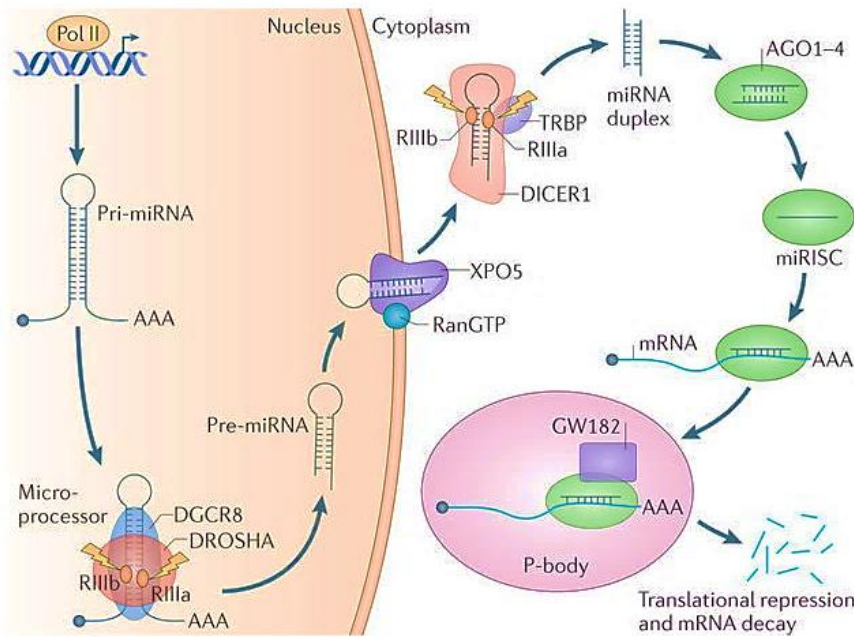
Son yıllarda genom boyutunda yapılan araştırmalar ışığında eskiden DNA üzerinde kodlanmayan ve çöp adı verilen bölgelerin gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Bu bölgelerden üretilen pek çok transkriptin gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. MikroRNA'larda (miRNA) gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan ve proteine dönüşmeyen RNA ailesi üyelerinden biridir. miRNA'lar, posttranskripsiyonel seviyede gen düzenlemesinde gerekli olan yaklaşık 20-30 nükleotid boyutunda kodlanmayan tek zincirli RNA'lardır. İlk tanımlanan miRNA 1993 yılında Ambros ve ark tarafından *Caenorhabditis elegans*'ta gelişimsel süreçte zamanlamayı kontrol eden *lin-4* tür (Lee vd 1993). Ambros ve ark. *lin-4* genini klonlar iken bu genin 22 nükleotidlik kodlanmayan bir dizi olduğunu göstermişlerdir (Lee vd 1993). Daha sonra yapılan çalışmalar *lin-14* geni 3'-UTR (Untranslated region: translasyon olmayan bölge) bölgesinde korunmuş dizilerin olduğu ve bu korunmuş dizilerin *lin-4* dizisine komplementer olduğunu bildirdiler (Wightman vd 1991).

2000 yılında *C. elegans*'ta yapılan çalışmalar sonucunda 21 nükleotid uzunluğundaki *let-7* isimli translasyonel baskılayıcı RNA molekülü bulunmuştur (Reinhart vd 2000). *Let-7*'nin insan da dahil diğer organizmalarda saptanmasının ardından gen ifadesini düzenleyen bu küçük kodlanmayan RNA molekülleri bilim insanları tarafından dikkat çekici hale gelmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda yaklaşık olarak 30 bin üzerinde olgun miRNA

tanımlanmıştır ve bu miRNA'lar gen ifadesini hedef mRNA'ların 3'UTR bölgelerine bağlanarak mRNA degradasyonuna ya da translasyonun baskılanması yoluyla sağlamaktadır (Filipowicz vd 2008). miRNA'ların pekçoğu RNA polimeraz II (Pol II) tarafından nükleusta transkribe olmaktadır. (Lee vd 2004).

Yaklaşık olarak miRNA'ların %30'u protein kodlayan genlerin intron bölgelerinden kodlanırken, diğer pekçok miRNA ise belirlenmiş olan gen lokuslarından kodlanmaktadır. Fakat genel olarak kodlandıkları genetik lokasyona göre miRNA'lar 4 sınıfa ayrılırlar; i) Kodlanmayan bölgelerdeki intronik miRNA'lar ii) Kodlanmayan bölgelerdeki ekzonik miRNA'lar iii) Kodlayan bölgelerdeki intronik miRNA'lar iv) Kodlayan bölgelerdeki ekzonik miRNA'lar. miRNA genleri Y kromozomu hariç bütün kromozomlarda dağılmıştır. Pol II tarafından transkribe olan pri-miRNA'lar bir dizi enzimatik reaksiyon sonucunda olgun miRNA halini almaktadır. Pri-miRNA'lar yapı olarak bir ya da daha fazla ilmek yapısına sahip olup yaklaşık olarak 1000 nükleotid boyutuna kadar ulaşabilmektedirler. Pri-miRNA'lar yapısal olarak mRNA'lara benzer yapıda olup bir ya da daha fazla sayıda fonksiyonel miRNA oluşturabilirler (Cai vd. 2004, Borchert vd. 2006). Klasik miRNA biyogenez sürecinin ilk aşaması nükleusta gerçekleşen pri-miRNA'nın kırılarak yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA (prekürsör miRNA) formuna dönüşmesidir. Bu süreç birden çok protein içeren mikroşlemci kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Bu kompleksin yapısında bulunan proteinlerin en temel bileşenleri, RNaz II enzimi olan Drosha, DGCR8 ve çift-zincir RNA bağlama proteini (dsRBD)'dir. Drosha mikroşlemci kompleksinde katalitik alt birim olarak görev alır iken, DGCR8 RNA yapısını tanımaktadır. Pri-miRNA'nın işlenmesi aşamasında DGCR8 proteini tek ve çift iplikli RNA molekülünü tanımaktadır. Bu aşamanın ardından Drosha çift iplikli ilmek yapısını keser ve 5' ucunda monofosfat, 3' ucunda 2 nükleotid hidroksil uzantısı bulunan yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA oluşmaktadır (Denli vd 2004, Lin ve Gregory 2015). Drosha tarafından kesilme işleminin ardından pre-miRNA'nın 3' ucunda oluşan 2 nükleotidlik hidroksil yapısı pre-miRNA'yı çekirdekten sitoplazmaya Ran-GTP bağımlı mekanizma aracılığıyla taşıyan exportin-5 (Exp-5) tarafından tanınır (Okada vd 2009). Exp-5 ve Ran-GDP aracılığıyla sitoplazmaya taşınan pre-miRNA, 5'cap ve 3' poli A kuyruğuna sahiptir ve sitoplazmada DICER1 enzimi tarafından terminal ilmek yakınından kesilmektedir. DICER1 pre-miRNA'nın uç bölgelerine bağlanabilen ve iki adet katalitik RNaz III bölgesine sahip bir proteindir. Katalitik aktif bölgeleri sayesinde pre-miRNA'ları ilmek bölgeleri yakınından keserek yaklaşık 22-23 nükleotid uzunluğunda ve 3' bölgesinde 2 nükleotidlik hidroksil yapısına sahip olgun miRNA'yı oluşturmaktadır. DICER1, çift iplikli RNA moleküllerine bağlanabilen transaktivasyondan sorumlu RNA bağlama proteini (TRBP) ile etkileşim halindedir (Chendrimada vd 2005). TRBP, DICER1 aracılığıyla gerçekleşen pre-miRNA kırılmasının doğruluğunu artırırken kararlı miRNA ipliğinin seçiminde de rol almaktadır (Lee ve Doudna 2012). Sitoplazmaya gelen pre-miRNA Dicer ile

kesildikten sonra oluşan olgun miRNA dupleksi açılır ve RNA baskılanmasında görev alan kararlı iplik ile komplementer miRNA ipliği açığa çıkar. RNA İndüklü Susturma Kompleksi (RISC) kompleksi bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi olup yapısında TRBP ve Argonat (Ago) proteinlerinden oluşmaktadır (Chendrimada vd 2005). Kararlı yapıdaki miRNA zinciri Ago proteinlerine bağlanarak miRNA indüklü susturma kompleksi (miRISC)'e katılır (Şekil 2.7). Bu kompleks; mRNA degradasyonu, translyasyonel baskılama ve kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi fonksiyonlarını gerçekleştirmektedir (Diederichs vd 2007). Oluşan miRISC kompleksi hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanarak genellikle ekspresyonu düzenler (Cordes ve Srivastava 2009).



Şekil 2.7 miRNA biyogenez aşamalarının gösterimi (Stine ve Gregory 2015)

Klasik miRNA biyogenez süreçlerinin dışında literatürde yapılan çalışmalar sonucunda Drosha ve Dicer bağımsız miRNA biyogenez süreçlerinin de gerçekleştiği gösterilmiştir. Mirtron'lar mikroRNA'ların alt bir sınıfı olup kodlayan genlerin intron bölgelerinde bulunmaktadırlar ve saçtokası yapısına sahip olmalarından dolayı biyogenez süreçlerinde Drosha ile işleme aşamasına gereksinimleri yoktur (Miyoshi vd 2010). Öte yandan pre-miR-451 gibi miRNA'ların biyogenez süreçlerinde Drosha enziminin aktif olarak rol aldığı ve Dicer kesim işlemine gereksinim duymadıkları gösterilmiştir (Cheloufi vd 2010).

2.6.1 mikroRNAların Aktivitelerinin Kanserdeki Bozulma Mekanizmaları

1. miRNA ekspresyon düzeyinin değişmesi: Birçok kanser türünde miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin normal dokulara göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bu

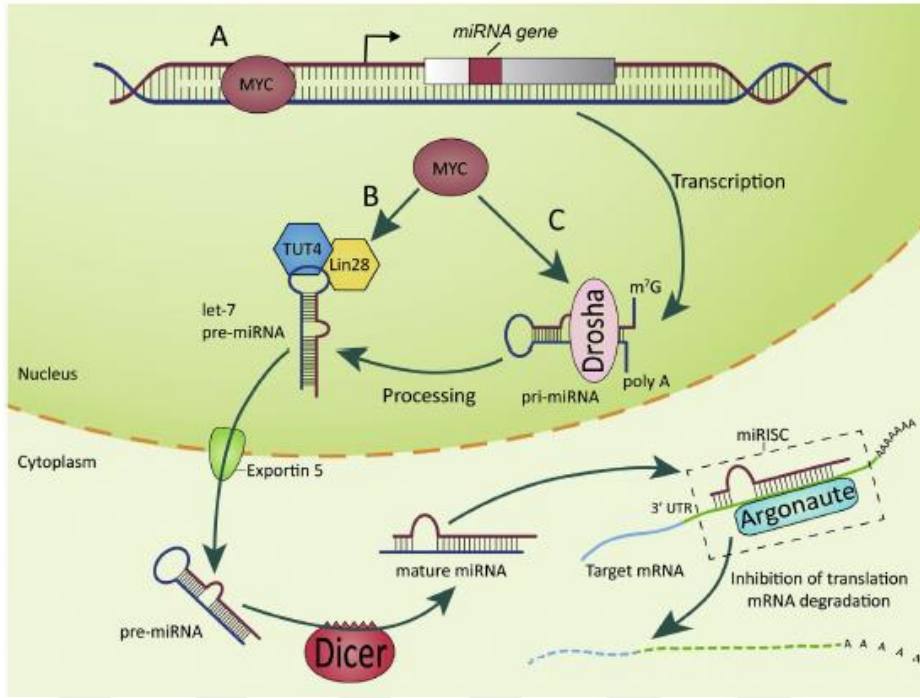
ekspresyon değişimini açıklamak için birçok mekanizma öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar; miRNA'ların promotor bölgelerindeki metilasyon, miRNA'lardaki mutasyonlar, miRNA işlenmesinin değişmesi olabilir

2. miRNA işlenmesinin değişmesi: miRNA işlenmesinde görev alan Drosha ve RISC (RNA indüklü susturma kompleksi) yapısının oluşmasında yer alan Argonat ailesi üyesi proteinleri etkileyen mutasyon veya ekspresyon değişimleri de olgun miRNA oluşmasını ve RISC yapısının görevini yerine getirmesini engellemektedir. Bu nedenle bazı kanser türlerinde bu proteinlerin ekspresyon düzeyleri ve kodlayan genlerin mutasyonlarının da moleküler patogeneizde rol oynadığı gösterilmiştir.

3. miRNA/mRNA eşleşmesini sağlayan dizilerde mutasyonlar: Bu mutasyonlar miRNA'lardaki mutasyonlar ve mRNA'nın 3'UTR bölgesindeki mutasyonlar olarak iki gruba ayrılabilir. mRNA'nın 3' UTR kısmındaki mutasyonlar i) miRNA'nın bağlanmasını azaltabilir veya arttırabilir ii) miRNAlar için yeni bağlanma bölgeleri oluşturabilir.

2.7 MYC Onkogeni ve miRNA İlişkisi

Myc transkripsiyon faktörü yaklaşık olarak transkriptomun %15'inden fazlasını düzenlemektedir (Eiler ve Einsman 2008). Ancak literatürde yapılan çalışmalar sonucunda *Myc* tarafından ifadesi düzenlenen genler incelendiğinde sadece belirli bir kısmının promotorunda *Myc* bağlanma bölgesi içerdiği ve diğer genlerin ise *Myc* tarafından indirekt olarak düzenlendiği önerilmektedir (Adhikary ve Eilers 2005). *Myc* tarafından indirekt olarak ifadesi düzenlenen genler için iki model önerilmektedir. Bunlardan ilkinde *Myc* tarafından ifadesi düzenlenen transkripsiyon faktörleri aracılığıyla genlerin ifadesi düzenlenmesi, diğer modelde ise post-transkripsiyonel olarak miRNA'lar aracılığıyla genlerin ifadesinin düzenlenmesidir. (Schuhmacher vd 2001, Fan vd 2010, Jackstadt ve Hermeking 2015)(Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Myc tarafından miRNA biyogenez süreçlerinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlenmesi. a) Myc transkripsiyon faktörünün miRNA genlerinin promotor bölgesine bağlanması b) Myc'nin miRNA biyogenez süreçlerini düzenlemesi c) Myc'nin Drosha'yı baskılamak yoluyla miRNA biyogenez ürecini düzenlemesi (Jackstad ve Hermeking 2015)

Literatürde ilk olarak Mendell ve Dang tarafından 2005 yılında yapılan çalışmalar sonucunda C13orf25 lokusunun insanda miR-17-92 (miR-17, -18a, -19a, -20a, -19b ve 92a) ailesi miRNA'ları kodladığı ve bu lokusun Myc tarafından transkripsiyonel olarak aşırı ekspresyonunun uyarıldığı belirtilmiştir (Dews vd 2006). Dang ve Mendell'in çalışmalarına ek olarak He ve arkadaşlarının 2005 yılında B hücreli lenfomada miR-17-92 ailesi miRNA'ların Myc tarafından düzenlendiğini göstermiştir (O'Donnel vd 2005). Sonraki yıllarda farklı kanser türleri üzerinde yapılan çalışmalar ışığında Myc tarafından ifadesi düzenlenen pek çok mikroRNA tanımlanmıştır. Bu çalışmaların yanında Mendell ve Thomas-Tikhonenko'nun yaptığı çalışmalar sonucunda Myc tarafından ifadesi arttırılan mRNA'ların yanı sıra Myc tarafından ifadesi baskılanan miRNA'larda saptanmıştır (Chang vd 2008).

Myc tarafından ifadesi düzenlenen miRNA'ların hücre siklusu, mitoz bölünme, apoptozun düzenlenmesi, hücre metabolizması, metastaz, anjiyogenez ve kök hücre fenotipi gibi önemli hücresel süreç ve özelliklerde önemli fonksiyonları olduğu literatürde gösterilmiştir. Myc tarafından ifadesi düzenlenen miRNA'lar hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı özellik gösterebilmekte ve bu özellikleri sayesinde Myc tarafından düzenlenen karsinogenez sürecinde rol alabilmektedirler. Kısacası Myc miRNA biyogenez sürecinde hem

aktivatör hemde represör olarak rol oynaması sebebiyle pek çok önemli hücre biyolojik süreci düzenlemektedir.

Myc transkripsiyon faktörü önceden de bahsedildiği üzere hücre metabolizmasında rol oynayan pek çok önemli genin ifadesinin doğrudan düzenlemektedir. Bu sayede Myc onkogeni karsinogenez sürecinde önemli bir basamak olan kanser hücre metabolizmasındaki değişimi doğrudan yönetmektedir. Fakat direkt olarak gen ifadesini düzenleme özelliğinin yanında Myc onkogeni miRNA'lar aracılığıyla indirekt olarak ta kanser hücre metabolizmasında rol oynayan pek çok genin ifadesini düzenlemektedir. Myc tarafından transkripsiyonu indüklenen miR-17-92 ailesi miRNA'lar *PTEN* ifadesini baskılayarak AKT yolağının aktivasyonu uyarılması yoluyla glikoliz sürecinde rol oynayan fosfofruktokinaz (*PFK1*), *PFK2* ve *GLUT1* 'in ifadesini arttırmaktadır (Mu vd 2009, Olive vd 2009, Mavrakis vd 2010). Öte yandan Myc, glutamin metabolizmasında rol oynayan *GLS1*'i hedef alan miR-23a/b'nin ifadesini baskılayarak karsinogenez sürecinde önemli bir biyolojik süreç olan glutamin metabolizmasını indüklemektedir (Gao vd 2009).

2.8 Hipotez

KHAK hücre dizilerinde Myc onkogeni, kanser hücre metabolizmasını transkripsiyonel ve miRNA'lar aracılığıyla post transkripsiyonel seviyede kontrol eder.

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Gereçler

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka/Model
Flörosan özellikli mikroskop	Olympus CKX-41
Western Blot Sistemi	Biorad
Flörosan, Absorbans ve Luminometrik ölçüm cihazı	Promega Glomax
Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometri (LC-MS) cihazı Accurate-Mass Q-TOF	Agilent 6530
HPLC cihazı	Agilent 1100
Affymetrix miRNA dizin tarayıcı	Affymetrix
Illumina iScan mRNA dizin tarayıcı	Illumina
Gerçek zamanlı PZR cihazı	Corbett 6000
Hücre sayım cihazı	Cell countess Thermo
Licor Western Blot görüntüleme cihazı	Licor Oddysey FC

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan kitler

Kit	Firma
Pure Yield Maxi Prep kit	Promega
Qiaquick kit	Qiagen
miRNeasy Mini kit	Qiagen
Hi-Capacity komplementer DNA (cDNA)	Applied

Revers Transkripsiyon kiti	Biosystems
miScript II RT kiti	Qiagen
miScript miRNA PCR array kiti	Qiagen
Kilogreen Master Mix	ABM

Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan vektörler ve özellikleri

Vektör	Seçilim Markırı	Promotor	Temin Edilen Kişi/Firma
PCDH-CMV-MCS	G418	CMV	Addgene, Amerika
PCMV-SPORT6	Amfisilin	CMV	Tohru Kiyono
pTRIPZ boş vektör	Puromisin	TRE	Sonia Forcales
pTRIPZ Myc kısa saç tokası RNA (shRNA)	Puromisin	TRE	Dharmacon, Amerika

Tablo 3.4 Çalışmada kullanılan enzimler

Enzim	Firma
NotI	New England Biolabs (NEB)(Almanya)
XbaI	New England Biolabs (NEB)(Almanya)
AgeI	New England Biolabs (NEB)(Almanya)
MluI	New England Biolabs (NEB)(Almanya)
EcoRI	New England Biolabs (NEB)(Almanya)
XhoI	New England Biolabs (NEB)(Almanya)
T4 ligaz	New England Biolabs (NEB)(Almanya)
Alkalen fosfataz	New England Biolabs (NEB)(Almanya)
Fast Start Taq pol.	Sigma Aldrich Amerika
High Fidelity Taq pol	Sigma Aldrich Amerika

Tablo 3.5 mRNA Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmasında kullanılan primer oligonükleotitler

Oligonükleotit	Sekans (5`-3`)
<i>BCL2</i> Forward	CTGCACCTGACGCCCTTCACC
<i>BCL2</i> Reverse	CACATGACCCCACCGAACTCAAAGA
<i>Ascl1</i> Forward	GCAACCGCGTCAAGTTGGT
<i>Ascl1</i> Reverse	GTCGTTGGAGTAGTTGGGGG
<i>Sox-2</i> Forward	AACCCCAAGATGCACAACCTC
<i>Sox-2</i> Reverse	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC
<i>P21</i> Forward	GAGGCCGGGATGAGTTGGGAGGAG
<i>P21</i> Reverse	CAGCCGGCGTTTGGAGTGGTAGAA
<i>Cyclin D1</i> Forward	CCGTCCATGCGGAAGATC
<i>Cyclin D1</i> Reverse	GAAGACCTCCTCCTCGCACT
<i>LDHA</i> Forward	AGCCCGATTCCGTTACCT
<i>LDHA</i> Reverse	CACCAGCAACATTTCATTCCA
<i>CDK6</i> Forward	TGCACAGTGTCACGAACAGA
<i>CDK6</i> Reverse	ACCTCGGAGAAGCTGAAACA
<i>Enolaz 1 (ENO1)</i> Forward	AAA GCT GGT GCC GTT GAG AAG
<i>ENO1</i> Reverse	AGC ATG AGA ACC GCC ATT GAT
<i>Hekzokinaz 2 (HK2)</i> Forward	CAAAGTGACAGTGGGTGTGG
<i>HK2</i> Reverse	GCCAGGTCCTTCACTGTCTC
<i>GLS1</i> Forward	TGGTGGCC TCAGGTGAAAAT
<i>GLS1</i> Reverse	CCAAGCTAGGTAACAGACCCTGTTT
<i>SLC2A1</i> Forward	GGCATTGATGACTCCAGTGTT
<i>SLC2A1</i> Reverse	ATGGAGCCCAGCAGCAA
<i>Siklooksijenaz 2 (Cox2)</i> Forward	CCCTTGGGTGTCAAAGGTAA
<i>Cox-2</i> Reverse	GCCCTCGCTTATGATCTGTC
<i>Notch1</i> Forward	TCCACCAGTTTGAATGGTCA
<i>Notch1</i> Reverse	AGCTCATCATCTGGGACAGG
<i>Beta aktin</i> Forward	CGCGAGAAGATGACCCAGGA
<i>Beta aktin</i> Reverse	GATAGCACAGCCTGGATAGCAAC
<i>Myc</i> Forward	CTTCTCTCCGTCCTCGGATTCT
<i>Myc</i> Reverse	GAAGGTGATCCAGACTCTGACCTT

Tablo 3.6 miRNA RT-PZR çalışmasında kullanılan primerler

miRNA	Firma
miR-17a-5p	Qiagen, Almanya
miR-18a-5p	Qiagen, Almanya
miR-4417	Qiagen, Almanya
miR-455-3p	Qiagen, Almanya

miR-181a-5p	Qiagen, Almanya
miR-642b-5p	Qiagen, Almanya
miR-92a	Qiagen, Almanya
miR-193b	Qiagen, Almanya
miR-125b-2	Qiagen, Almanya
miR-9	Qiagen, Almanya
miR-378	Qiagen, Almanya
miR-7	Qiagen, Almanya
miR-375	Qiagen, Almanya

Tablo 3.7 Çalışmada kullanılan antikolar

Antikor	Firma
c-MYC	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
P21	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
PTEN	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
Tubulin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
Cox-2	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
Sox-2	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
Aldehit Dehidrogenaz 1A1 (Aldh1a1)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
CD133	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
N-Kaderin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
PARP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
T-RFP	Santa Cruz Biotechnology Inc.,

	Santa Cruz (USA)
ASCL1	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
HIF1-alfa (Hipoksi İndüklü Faktör 1A)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
P73	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)

3.2 Yöntemler

3.2.1 Hücre Kültürü

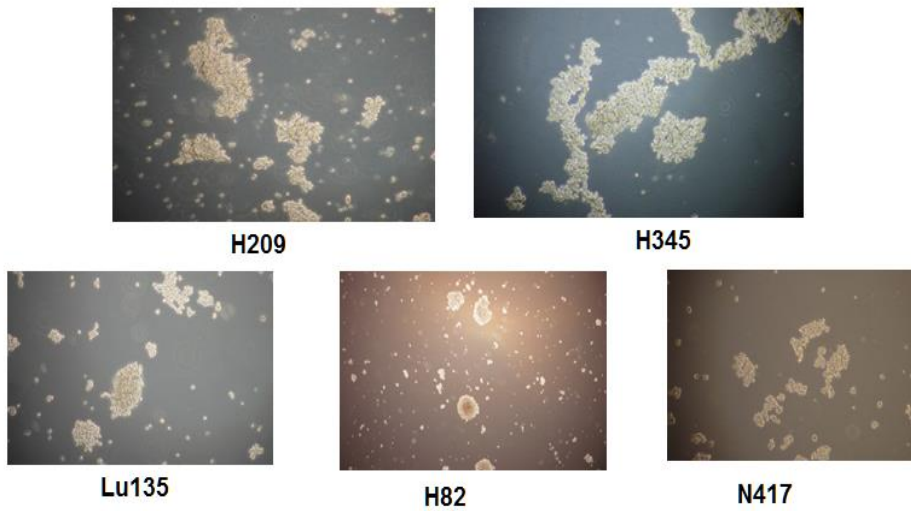
Çalışmada kullanılan HEK293T, H209, H345, H69, H82 ve N417 hücreleri Dr.Jun Yokota' dan (IMPPC, İspanya) temin edildi. H209 ve H69 hücre dizisi %10 fetal dana serumu ve % 0,5'lik penisilin/steptomisin içeren RPMI1640 (Gibco) besi ortamında, H82, H345 ve N417 hücre dizileri %10 Tetrasiklinsiz serum içeren RPMI 1640 besi ortamında 37°C'de, %5 CO2 ve %95 nemli hava ortamında kültüre edildi. H209 hücreleri kalıcı Myc lentiviral ekspresyon vektörü ile infekte edildiği çalışmalarda besiyerine seçilim markırı olan G418 (400 µg/mL) eklendi. H345 hücrelerinin indüklenebilir pTIJ vektör ile infekte edildiği çalışmalarda ise besiyerine seçilim markırı olarak puromisin 2 µg/mL konsntrasyonunda eklendi. H82 ve N417 hücrelerinin indüklenebilir Myc shRNA vektörü ile infekte edildiği çalışmalarda besiyerine seçilim markırı olan puromisin 2 µg/mL konsntrasyonunda eklendi.

İndüklenebilir shRNA ve PTIJ vektör sistemi tetrasiklin bağımlı promotör sistemine sahip oldukları için indüklenebilir ekspresyon vektörleri ile infekte edilmiş hücreler tetrasiklinsiz serum (Clontech) içeren besiyeri ortamında kültüre edildi. H69 ve HEK293 hücreleri transfeksiyon ve lentivirüs üretim aşamalarında kullanılmak üzere çoğaltıldı. HEK293 hücreleri fetal dana serumu (FBS) ve % 0,5'lik penisilin/steptomisin içeren DMEM (Dulbecco'nun modifiye edilmiş besiyeri) (Gibco) besiyerinde çoğaltıldı. Çalışmada kullanılan KHAK hücre dizilerinin sahip oldukları Myc ifadesi durumları ve çoğalma özellikleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 3.8 Çalışmada kullanılan hücre dizileri ve özellikleri

Hücre Dizisi	<i>Myc</i> ifadesi durumu	Çoğalma Özelliği
N417	<i>MYC</i> Amplifikasyonu	Süspansiyon
H82	<i>MYC</i> Amplifikasyonu	Süspansiyon
H209	Amplifikasyon yok	Süspansiyon
H345	Amplifikasyon yok	Süspansiyon
H69	<i>N-MYC</i> Amplifikasyonu	Süspansiyon

Tez çalışmasının ana çalışmalarında kullanılan H209, H345, H82 ve N417 hücrelerinin mikrobik görüntüsü Şekil 3.1’ da verilmiştir.

**Şekil 3.1** Çalışmada Kullanılan Hücre Dizilerinin Mikroskopik Görüntüsü

3.2.2 Hücrelerin Dondurulması

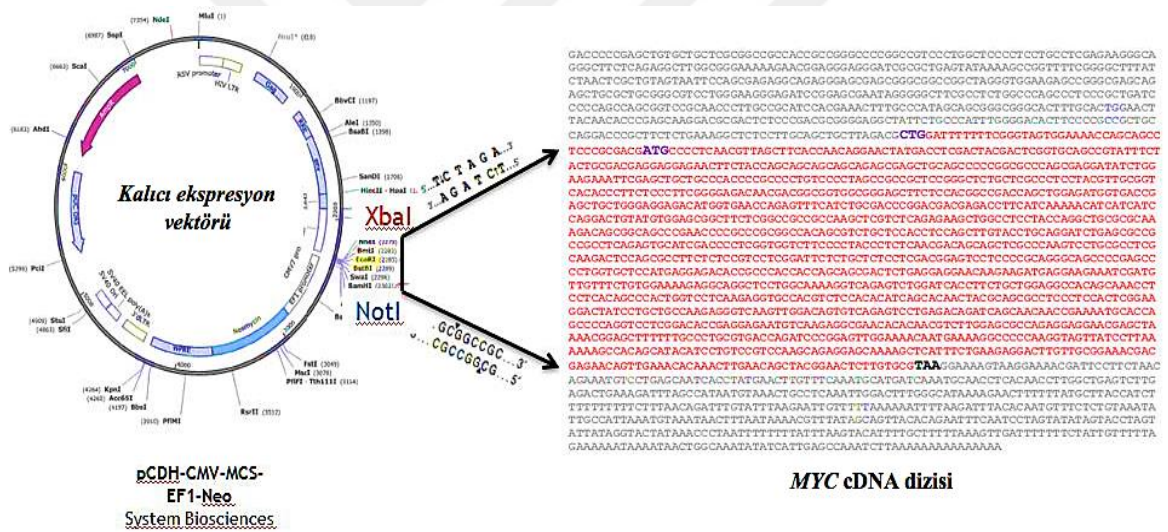
Hücreleri dondurmak amacıyla %10 DMSO (Dimetil sülfoksiy) içeren besiyeri hazırlandı. Hücreler pasajlama işlemi için 15 ml’ lik falkon içerine alındı ve 100xg’de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldıktan sonra falkon içerisine dondurma amacıyla hazırladığımız besi eklendi ve yavaş pipetaj ile homojen hale getirildi ve özel cryotüplere aktarıldı. Tüpler ardından alt haznesinde %100’lük isopropanol içeren Mr.Frosty kabı (Thermo) içerisine konarak -80°C’ de saklandı.

3.2.3 Hücrelerin Çözülmesi

Hücreler -80°C ' den alınan tüpler 50 ml'lik falkon tüpü içerisine konarak su banyosunda (37°C) çözüldükten sonra hücreler 15 ml' lik falkon içerisine alındı ve üzerlerine 5 ml besiyeri eklendi. Ardından hücreler $100\times$ ' de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atılıp elde edilen pelet üzerine besi yeri eklenerek homojen hale getirildi ve toplam hacim 5ml olacak şekilde flaslara alınarak kültüre edildi.

3.2.4 Kalıcı Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

Myc ifadesi gözlenmeyen hücrelerde lentiviral kalıcı ekspresyon oluşturmak amacıyla pCDH-CMV-MCS-EF1-NEO (System Biosciences) (Şekil 3.2) ve yabancı tip c-MYC cDNA'sı içeren pCMV-Sport6 (Şekil 3.4) vektörleri kullanıldı. Klonlama amacıyla Myc cDNA'sı içeren pCMV-Sport6 vektöründen tasarlanmış olan klonlama primerleri kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltıldı.



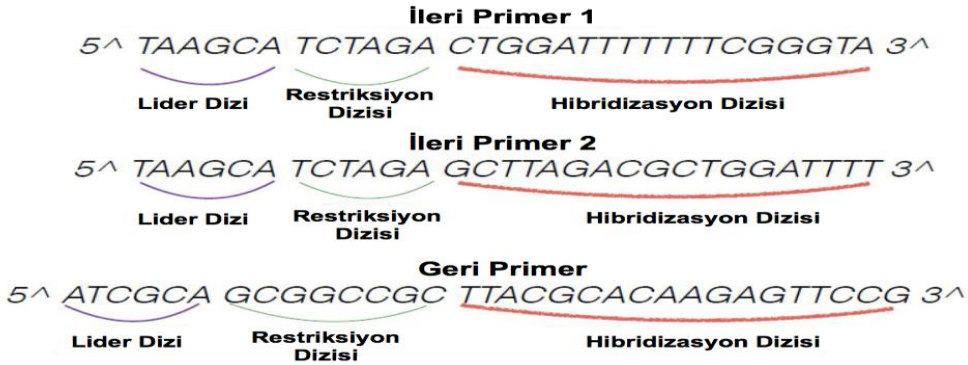
Şekil 3.2 pCDH-CMV lentiviral vektör haritası, restriksiyon enzimlerinin ve MYC cDNA dizisinin gösterilmesi

3.2.4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Moleküler klonlama için kullanılan PZR primerleri aşağıdaki dizileri içermektedir:

- **Lider Dizi:** Primerin 5' ucunda restriksiyon enzim kesimine yardımcı ekstra baz çiftleri (3-6 bp)
- **Restriksiyon enzim tanıma bölgesi:** Klonlama için seçilmiş seçilmiş kesim bölgesi (6-8 bp)

- **Hibridizasyon Dizisi:** Amplifiye edilecek diziye bağlanan primer dizisi (18-21 bp)
Primerler XbaI ve NotI restriksiyon dizilerini içerecek şekilde tasarlandı (Şekil 3.3). Bu primerler kullanılarak başlangıç ve bitiş kodonlarını içeren c-MYC cDNA'sının çoğaltılması amaçlandı.



Şekil 3.3 Kalıcı Myc ekspresyon vektörü için tasarlanan primer dizileri

PZR reaksiyon koşulları aşağıdaki tablodaki şekilde hazırlandı (Tablo 3.9).

Tablo 3.9 PZR Koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	5 dk	1
95°C	40 sn	40
64°C	40 sn	
72°C	2 dk	
72°C	5 dk	1

PZR reaksiyonu aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

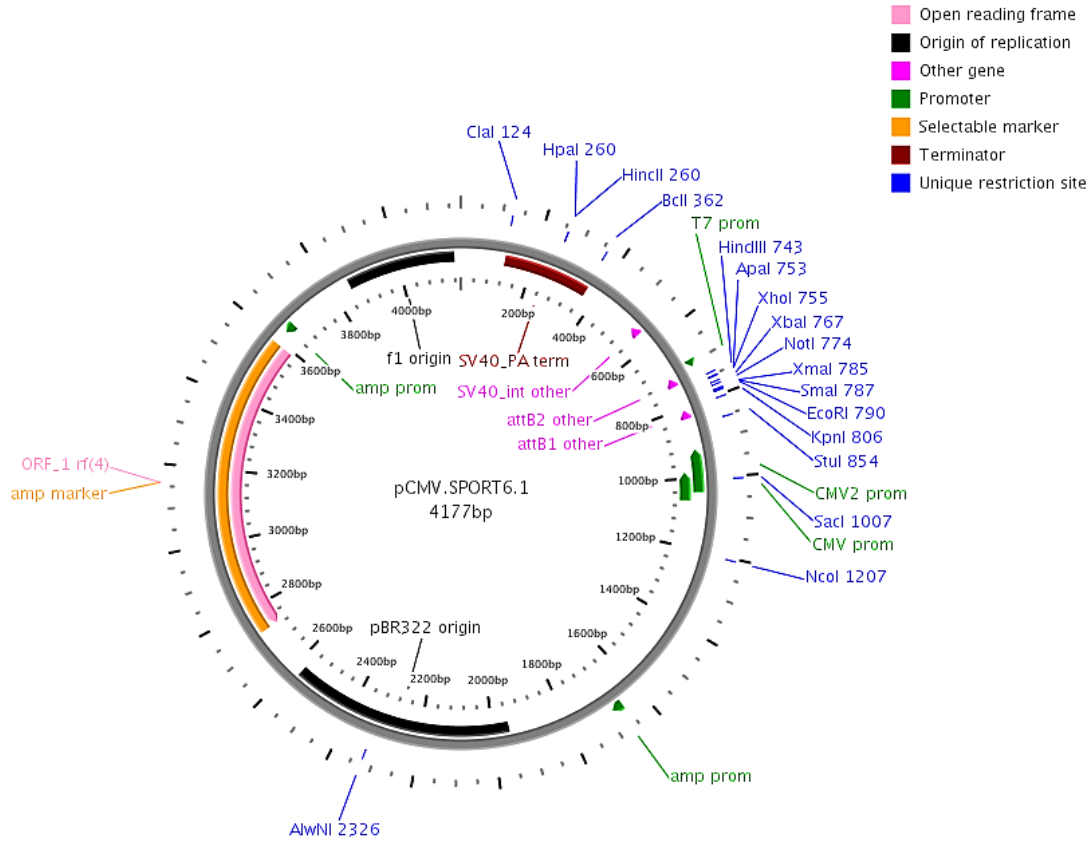
Tablo 3.10 PZR Optimizasyon Şartları

	1.Reaksiyon	2.Reaksiyon	3.Reaksiyon	4.Reaksiyon
Taq polimeraz	0.25 µl	0.25 µl	0.25 µl	0.25 µl
10X Buffer	-	-	2.5 µl	2.5 µl
dNTP karışımı	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
MgCl₂	-	-	1.5 µl	1.5 µl
İleri Primer 1	1 µl	-	1 µl	-
Geri Primer	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
İleri Primer 2	-	1 µl	-	1 µl
Fast Start Karışım	2.5 µl	2.5 µl	-	-
dH₂O	17.75 µl	17.75 µl	16.25 µl	16.25 µl
Örnek	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl

Restriksiyon enzim kesim protokolü

NotI ve XbaI enzimleri ile kesim	NotI enzimi ile kesim	XbaI enzimi ile kesim
1 ug plazmid vektörü	1 ug plazmid vektörü	1 ug plazmid vektörü
1 µl NotI HF (NEB)	1 µl NotI HF	1 µl XbaI
1 µl XbaI (NEB)	2 µl Cut Smart Buffer	2 µl Cut Smart Buffer
2 µl Cut Smart Buffer	dH ₂ O (20 µl'ye tamamlanır)	dH ₂ O (20 µl'ye tamamlanır)
dH ₂ O (20 µl'ye tamamlanır)		

pCDH-CMV ve PZR ürünleri DNA'sı NotI ve XbaI restriksiyon enzimleriyle 37⁰C'de 1 saat boyunca kesildi ve enzimler 65⁰C'de 20 dk süresince inaktive edildi. Enzim kesim işleminin ardından ürünler Qiaquick kit (Qiagen) kullanılarak saflaştırılarak %1 'lik agaroz jelde yürütüldü. Saflaştırma işleminden sonra, kesim yapılan örnekler Alkalın fosfataz (NEB) ile muamele edildi. Reaksiyon karışımını hazırlamak için DNA ≥ 1 µg, 2 µl rSAP Reaction Buffer (10X) ve 1 µl rSAP (1 unit/µl) kullanılarak distile su ile total hacim 20µl'ye tamamlandı. Reaksiyon karışımı 37⁰C'de 30 dk inkübe edildi ve enzim 65⁰C'de 5 dk süresince ısı ile inaktive edildi.



Şekil 3.4 pCMV-Sport6 vektörünün şematik görünümü

3.2.4.2 Agaroz Jel Elektrofrez

PZR ve enzim kesim ürünlerinin validasyonu amacıyla agaroz jelde elektroforez yapıldı. Elektroforez işlemleri için 1X lik TAE tampon içinde 5-6V/cm akım uygulanan %1'lik agaroz jel hazırlandı. Jelde kontrol amacıyla ilk kuyuya 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen), kuyucuklara 5 µl örnek ve 1 µl jel yükleme boyası olacak şekilde örnekler yüklendi.

3.2.4.3 DNA Ligasyonu

DNA ligaz, nükleik asitin serbest 5' fosfat ve serbest 3'OH uçları arasında fosfodiester bağı oluşturarak DNA fragmentlerini bağlamak için kullanılan enzimdir. T4 DNA ligaz olarak adlandırılan bu enzim T4 bakteriyofajdan izole edilmiştir. Bu çalışmada ligasyon reaksiyonunu gerçekleştirmek için restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş vektör ve PZR ürünleri aşağıdaki tabloda verilen protokole göre hazırlandı (Tablo 3.11) ve ligasyon işlemi için 3 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

Tablo 3.11 Ligasyon reaksiyonu şartları

İçerik	Miktar
10X T4 DNA Ligase Buffer*	2 µl
Vektör DNA (7,5kb)	50 ng
Klonlanacak DNA (1,3 kb)	36 ng
dH2O	20 µl(Final Hacmi)
T4 DNA Ligaz	1 µl

3.2.4.4 Kompetent DH5α Bakteriyal Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetent bakteri hazırlanması için sıcaklık şoku CaCl₂ protokolü uygulandı. Bu protokole göre;

- Gliserol stoktan alınan bir tüp bakteri 16 saat 37⁰C'de 4 mL LB agar besiyerinde pre-inokulasyon yapıldı.
- Ertesi gün çoğalma olan tüpten 1 mL bakteri alınarak 49 mL LB besiyerinde 37⁰C'de 30 dakika inkübe edildi.
- Ardından tüp alınarak buz içerisinde 10 dakika bekletildi.
- 1000xg' de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak buz üzerine yerleştirildi.
- Pellet 12 mL soğuk CaCl₂(0.1 M) ile süspansiyon edilerek 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- 1000xg' de 10 dakika santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet 2.5 mL gliserol stokta süspansiyon edildi ve 100' er µl'lik stoklar halinde -80⁰C'de saklandı.
-

3.2.4.5 DH5α Bakteriyal Hücrelere Transformasyon

Gliserol stokta -80⁰C'de saklanan DH5α hücreleri buz üzerinde 10 dk bekletilerek çözüldü. 100 µl hücre soğuk polipropilen tüpe aktarıldı. 10 µl ligasyon karışımı kompetent hücre içeren tüpe eklendi ve buz üzerinde 30 dk bekletildi. Hücreler 42⁰C'de 70 sn sıcaklık şokuna maruz bırakıldıktan sonra 2 dk boyunca buz üzerinde bekletildi. Sonrasında 900 µl soğuk SOC besiyeri ilave edilerek 37⁰C'de 1 saat boyunca sallanarak inkübe edildi. Örnekler 1000xg'de 5 dk santrifüj edildikten sonra pellet 100 µl LB ile süspansiyon hale getirildi. Ardından LB ve antibiyotik içeren kültür kaplarına ekildi. Kültür kaplarınının 37⁰C'de gece boyunca inkübasyonu sağlandı. Ertesi gün kültür kaplarından seçilen koloniler sıvı LB besiyerine eklendi ve 16 saat 37⁰C'de çoğalmaya bırakıldı.

3.2.4.6 Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu PureYield Plasmid kit (Promega) kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon protokolü aşağıda belirtilen şekilde uygulandı.

- Bir gece öncesinde sıvı LB besiyerine ekilerek çoğaltılan bakteriler 5000xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Pellet 12 mL hücre resüspanسیون solüsyonu ile süspanse edildi.
- Hücrelerin üzerine 12 mL hücre lizis solüsyonu ilave edilerek 3-5 kez alt üst edildi ve oda sıcaklığında 3 dk bekletildi.
- 12 mL nötralizasyon solüsyonu eklenerek 10-15 kez alt üst edildi.
- Lizat 14000xg'de 20 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant Promega vakum cihazı kullanılarak PureYield temizleme ve bağlama kolonlarından yavaşça geçirildi.
- Temizleme kolonu uzaklaştırıldı ve bağlama kolonu üzerine 5 mL endotoksin uzaklaştırma solüsyonu eklendi ve vakum cihazında yavaşça süzdürüldü.
- 20 mL kolon yıkama solüsyonu eklendi ve vakum cihazında yavaşça süzdürüldü.
- Bağlama kolonu vakum cihazında boş olacak şekilde 5 dakika boyunca yavaşça süzdürüldü.
- Sonraki aşamada vakum cihazının elüsyon aparatı altına 1.5 mL ependorf tüp ve üzerine bağlanma kolonu gelecek şekilde vakum cihazına yerleştirildi.
- Bağlanma kolonunun üzerine 1 ml nükleaz içermeyen su damlatıldı ve 1 dakika bekletildi.
- Ardından maksimum vakumda 1 dakika boyunca bağlanma kolonundan ependorf tüpe süzdürüldü.

3.2.4.7 DNA Miktar ve Safılık Tayini

İzolasyonu yapılan plazmit DNA'larının miktar ve saflık ölçümleri nanodrop 2000 (Thermo) cihazında yapıldı. Konsantrasyon ve saflık miktarlarının tayini aşağıdaki formüllere göre cihaz tarafından hesaplandı.

Miktar tayini formülü;

$(260 \text{ nm DNA} - 260 \text{ nm ddH}_2\text{O}) \times \text{dilüsyon faktörü} \times \text{DNA sabiti}$

Saflık tayini formülü;

$(260 \text{ nm DNA} - 260 \text{ nm ddH}_2\text{O}) / (280 \text{ nm DNA} - 280 \text{ nm ddH}_2\text{O})$

3.2.4.8 İzole edilen plazmit DNA'larının Validasyonu

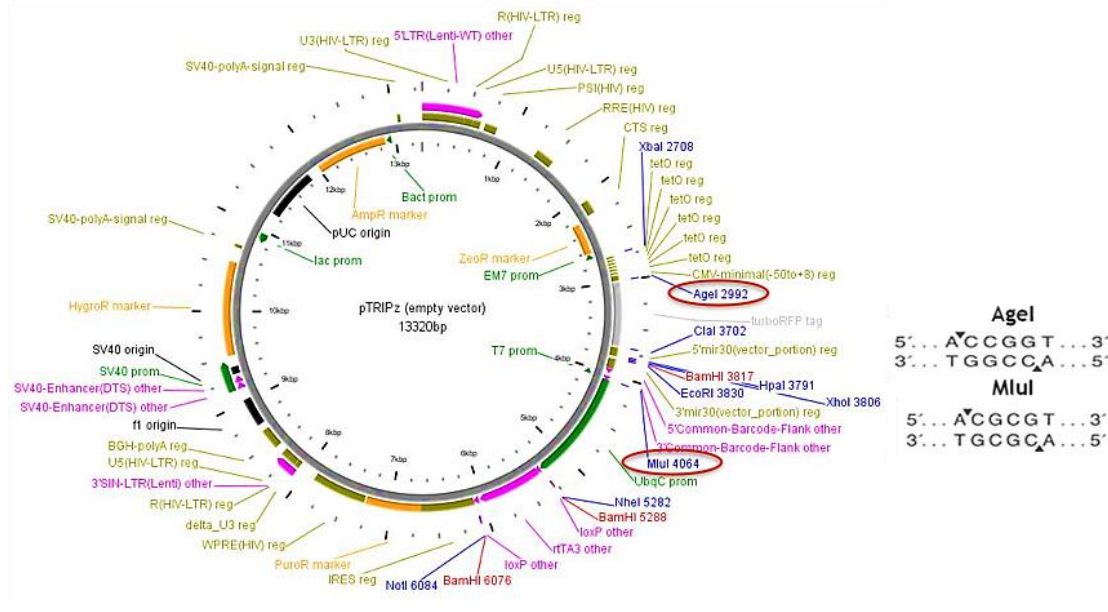
Farklı kolonilerden izole edilen plazmit DNA'larının *MYC* genini taşıyıp taşımadıklarını tespit etmek için plazmit DNA'ları NotI ve XbaI restriksiyon enzimleri ile ikili kesim yapıldı. NCBI 'dan alınan gen dizileri NEB cutterV2,0 programına eklenerek kesim enzim haritası çıkarıldı. Enzim kesim işleminin ardından örnekler %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Agaroz jel görüntüleri sonucunda beklediğimiz *MYC* bandını taşıyan plazmit DNA örnekleri validasyon amacıyla sekanslama işlemine tabi tutuldu. Sekanslama işlemi sonucu elde edilen veriler Serial Cloner v2 kullanılarak analiz edildi. Bu analizler sonucunda yabancı tip *MYC* cDNA dizisine sahip olan örnekler ileri çalışmalarda kullanıldı.

3.2.5 İndüklenebilir Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

Zamana bağlı olarak değişen Myc hedeflerini belirleyebilmek amacıyla indüklenebilir aşırı ekspresyon ve shRNA vektörleri tasarlandı.

3.2.5.1 İndüklenebilir Lentiviral Aşırı Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması

İndüklenebilir aşırı ekspresyon vektörünün hazırlanması için pTRIPZ boş vektörü (GE Healthcare Dharmacon) kullanıldı. pTRIPZ boş vektörü 13.4 kb büyüklüğündedir ve tRFP dizisine sahiptir. *MYC* cDNA'sını bu vektöre yerleştirmek için ilk olarak MluI (NEB) ve AgeI (NEB) enzimleri kullanılarak tRFP ve shRNA dizileri uzaklaştırıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 pTRIPZ boş vektör haritası ve restriksiyon bölgelerinin

Çoklu klonlama bölgesini (MCS) oluşturmak için birbirine komplementer, istediğimiz restriksiyon enzim kesim bölgelerini içeren iki oligonükleotid dizisi tasarlandı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Çoklu Klonlama Bölgesi (MCS) dizisi

Tasarlanan iki oligonükleotit birleştirme solüsyonu içerisinde eşit konsantrasyonlarda olacak şekilde süspansiyon edildi. Birleştirme reaksiyonu için 2 µg ileri oligonükleotid dizisi ve 2 µg geri oligonükleotid dizisi kullanılarak birleştirme tamponu ile total hacim 50 µl'ye tamamlanarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışım 95°C'de 4 dk bekletildikten sonra yaklaşık 45 dk boyunca oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.

3.2.5.1.1 Ligasyon Reaksiyonu

Birleştirme reaksiyonu ardından Agel ve MluI ile kesilmiş pTRIPZ boş vektör ile birleşme reaksiyonu ürünleri aşağıda belirtilen şekilde ligasyon işlemine tabi tutuldu (Tablo 3.12).

Tablo 3.12 Ligasyon Reaksiyonu Şartları

İçerik	Miktar
10X T4 DNA Ligase Buffer*	2 µl
Vektör DNA	10 µl
Klonlanacak DNA (Birleştirilmiş oligolar)	4 µl
dH2O	20 µl(Final Hacmi)
T4 DNA Ligaz	1 µl

Reaksiyon karışımı 3 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ligasyon reaksiyonundan sonra transformasyon aşamasına geçildi. Transformasyon işleminin ardından plazmid izolasyonu Promega Pure Yield Maxi Prep kit kullanılarak gerçekleştirildi. İzole edilen plazmitlerin validasyonu için Agel (NEB), MluI (NEB), HpaI (NEB) and BamHI (NEB) restriksiyon enzimleri ile kesimleri gerçekleştirildi. Enzim kesim işlemleri ardından agaroz jel görüntüleme ve DNA sekanslama yöntemleri aracılığıyla seçilen koloniler valide edildi. Serial Cloner v2 aracılığıyla tasarladığımız restriksiyon enzim kesim bölgelerini içeren

3 adet vektör sonraki aşamalarda kullanıldı. Validasyon işlemleri sonucunda AgeI, MluI, HpaI, BstBI, XhoI, EcoRI, ClaI restriksiyon bölgelerini içeren tetrasiklin ile indüklenebilir plazmit vektörümüzü “pTIJ” olarak isimlendirildi.

3.2.5.1.2 MYC' nin pTIJ Vektörüne Klonlanması

MYC cDNA'sı EcoRI ve XhoI restriksiyon enzim kesim bölgelerini içeren primerler yardımıyla pCMV-Sport6 vektöründen PZR yöntemi ile çoğaltıldı. PZR işleminin ardından PZR ürünü ve pTIJ vektör EcoRI ve XhoI restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim işlemi gerçekleştirildi. Enzim kesim işleminin ardından saflaştırma ve ligasyon işlemleri yapıldı. Ligasyon ürünleri DH5 α kompetent bakteri hücrelerine transforme edildi. Transformasyon aşamasından sonra 10 adet koloni seçildi ve enzim kesimi analizi sonuçlarına göre 3 koloni için sekans analizi yapıldı. Serial Cloner v2 aracılığıyla yapılan analiz sonucunda yabancı tip MYC cDNA'sı içeren koloniler seçildi.

3.2.5.1.3 İndüklenebilir Lentiviral shRNA Vektörünün Oluşturulması

İndüklenebilir shRNA vektörünün hazırlanması için BamHI, HpaI, XhoI ve XhoI restriksiyon bölgeleri bulunan pTRIPZ boş vektörü kullanıldı. pTRIPZ boş vektörü kesmek için EcoRI ve XhoI enzimleri kullanıldı. Enzim kesim reaksiyonu 37⁰C'de 1 saat boyunca gerçekleştirildi ve enzimler 65⁰C'de 20 dk inaktive edildi. Örnekler, Qiaquick kit kullanılarak saflaştırıldı ve %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

Myc ifadesini baskılamak amacıyla kullanılacak shRNA oluşturmak amacıyla Myc cDNA'sına komplementer 19-23 nt uzunluğunda antisens diziler içeren primerler tasarlandı (Şekil 3.7). Tasarlanan antisens dizilerin Myc cDNA'sı üzerindeki bağlanma bölgeleri Şekil 3.8'de gösterilmiştir.

shRNA oligo 1

5' TGCTGTTGACAGTGAGCG CGATGTTGTTTCTGTGGAAAGTGAAGCCACAGATGTA TTCCACAGAAACAACATCG TGCCCTACTGCCTCGGA 3'

shRNA oligo 2

5' TGCTGTTGACAGTGAGCG CCTGAGACAGATCAGCAACAAAGTGAAGCCACAGATGTA TTGTTGCTGATCTGTCTCAGG TGCCCTACTGCCTCGGA 3'

shRNA oligo 3

5' TGCTGTTGACAGTGAGCG GATGAGGAAGAAATCGATG AGTGAAGCCACAGATGTA CATCGATTTCTTCTCATC TGCCCTACTGCCTCGGA 3'



Şekil 3.7 shRNA oligo yapısı

```

CTGGATTTTTTTCGGGTAGTGGAAAACCAGCAGCCTCCCGCGACGATGCCCTCAACGTTAGCTTACCAAACAGGAACTATGACCTCG
ACTACGACTCGGTGCGCCGATTTTCTACTGCGACGAGGAGGAGAACTTCTACCAGCAGCAGCAGCAGAGCGAGCTGCAGCCCCCGGC
GCCAGCGAGGATATCTGGAAGAAATTCGAGCTGCTGCCACCCCGCCCTGTCCCTAGCCGCGCTCCGGGCTCTGCTCGCCCTCC
TACGTTGCGGTACACCCCTTCTCCCTTCGGGGAGACAACGACGGCGGTGGCGGGAGCTTCTCCACGGCCGACCAGCTGGAGATGGTGA
CCGAGCTGCTGGGAGGAGCATGGTGAACAGAGTTTCTATCTGCGACCCGGACGACGAGACCTTCTATCAAAAACATCATCATCCAGGA
CTGTATGTGGAGCGGCTTCTCGGCCCGCCCAAGCTCGTCTCAGAGAAGCTGGCCTCCTACCAGGCTGCGCGCAAAGACAGCGGCAGC
CCGAACCCCGCCCGGCCACAGCGTCTGCTCCACCTCCAGCTTGTACCTGCAGGATCTGAGCGCCCGCCCTCAGAGTGCATCGACC
CCTCGGTGGTCTTCCCTTACCTCTCAACGACAGCAGCTCGCCCAAGTCTGCGCCTCGCAAAGACTCCAGCGCCTTCTCTCCGTCTC
GGATTCTGCTCTCCTCGACGGAGTCTCCCCCGCAGGGCAGCCCGAGCCCTGGTGTCTCCATGAGGAGACCCGCCACCACCAGC
AGCGACTCTGAGGAGGAACAAGAGATGAGGAAAGAAATCGATGTTGTTCTGTGGAAAAGAGGCAGGCTCCTGGCAAAAGGTGAGAGT
CTGGATCACCTTCTGCTGGAGGCCACAGCAAACTCCTCACAGCCCACTGGTCTCAAGAGGTGCCACGTCTCCACACATCAGCACAA
CTACGACGCGCTCCCTCCACTCGGAAGGACTATCCTGCTGCCAAGAGGGTCAAGTTGGACAGTGTGAGAGTCTGAGACAGATCAGC
AAACAACCGAAAATGCACCAGCCCAAGTCTCGGACACCGAGGAGAATGTCAAGAGGGCAACACACAACGCTTGGAGCGCCAGAGGA
GGAACGAGCTAAAACGGAGCTTTTTTGCCTGCGTGACCAGATCCCGGAGTTGGAAAACAATGAAAAGGCCCCCAAGGTAGTTATCTT
TAAAAAGCCACAGCATACTCTGTCCGTCCAAGCAGAGGAGCAAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGTGCGGAAAACGACGAGAA
CAGTTGAAAACAAAACCTTGAACAGCTACGGAACCTTGTGCGTAA

```

— shRNA 1 (831-849)
— shRNA 2 (1041-1061)
— shRNA 3 (817-835)

Şekil 3.8 MYC shRNA'larının bağlanma dizileri

Tasarlanan shRNA oligonükleotit dizilerinin PZR yöntemiyle çoğaltılması için EcoRI ve XhoI restriksiyon bölgelerini içeren ve miR-30' dan alınan özel dizileri içeren 5' ve 3' primerler tasarlandı (Şekil 3.9).

5'miR30PCR xhoI

5'- CAGAAGGCTCGAGAAGGTATAT**TGCTGTTGACAGTGAGCG** -3'

3'miR30PCR EcoRI

5'- CTAAAGTAGCCCCTTGAAT**TCCGAGGCAGTAGGCA** -3'

Şekil 3.9 PZR primer dizileri

Oligonükleotit dizileri tasarlanan primerler yardımıyla aşağıda belirtilen koşullarda PZR reaksiyonuna tabi tutuldu (Tablo 3.13).

Tablo 3.13 PZR koşulları

5 µl 10x reaksiyon tamponu
2.5 µl DMSO
1 µl dNTP'ler (10mM stok)
0.5 µl 5' primer (50uM stok)
0.5 µl 3' primer (50uM stok)

1 µl kalıp oligo (100ng/uL)
0.5 µl High Fidelity Taq polimeraz (Roche)39 µl H ₂ O

Thermal cycler cihazında oligonükleotitlerin çoğaltılması için oluşturulan PZR reaksiyonu 1 döngü 94°C'de 1 dk, 54°C'de 30 sn, 75°C'de 1 dk ; 24 döngü 94°C'de 30 sn, 54°C'de 30 sn, 75°C'de 1 dk; 1 döngü 94°C'de 30 sn, 54°C'de 30 sn, 75°C'de 11 dk olacak şekilde yapıldı. Reaksiyonun ardından PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Qiagen PCR pürifikasyon kiti kullanılarak örnekler pürifiye edildi. Sonrasında hem pTRIPZ boş vektör hem de shRNA PZR ürünleri için enzim kesimleri gerçekleştirildi. Totalde 20 µl reaksiyon hacmi için 9 µl PZR ürünü, 0.7 µl EcoRI, 0.7 µl XhoI ve 2x buffer Tango ile reaksiyon karışımı hazırlanarak 37°C'de 1 saat boyunca bekletildi ve enzimler 80°C'de 20 dk inaktive edildi.

Ligasyon reaksiyonu: PZR ile çoğaltılan ve restriksiyon enzimleri ile kesilen oligonükleotitler ve pTRIPZ boş vektörü ligasyon işlemine tabi tutuldu. Ligasyon reaksiyonundan sonra her bir oligonükleotit için transformasyon işlemleri gerçekleştirildi. Plazmid izolasyonu Promega PureYield Plasmid kit kullanılarak gerçekleştirildi. Sonrasında, plazmidlerin validasyonu için EcoRI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle kesim yapıldı. Totalde 20 µl reaksiyon hacmi için 1 µg plazmid vektörü, 1 µl EcoRI , 1 µl XhoI ve 2 µl Cut Smart Buffer ile reaksiyon karışımı hazırlanarak 37°C'de 1 saat boyunca bekletildi ve enzimler 80°C'de 20 dk inaktive edildi. Qiaquick kit ile örnekler pürifiye edildi ve %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jel elektroforezi ile validasyon işleminin ardından sekans analizi için her shRNA vektöründen 2 koloni seçildi ve sekanslama reaksiyonları **5'-GGAAAGAATCAAGGAGG-3'** primer dizisi kullanılarak gerçekleştirildi. Sekans işlemi sonucunda elde edilen verilerin analizi Serial Cloner v2 kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.5.1.4 Transfeksiyon

Agaroz jel elektroforezi ve DNA dizi analizleri sonucunda validasyonu yapılan klonladığımız vektör sistemlerinin gen ifadesi üzerine olan etkinliğini değerlendirmek amacıyla hücrelere transient transfeksiyonları yapıldı.

Kalıcı Myc ekspresyon vektörünün etkinliğini belirleyebilmek amacıyla Western Blot yöntemiyle belirlenemeyecek düzeyde Myc ifadesi taşıyan H69 ve H345 KHAK hücre dizilerine transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra hücrelerdeki Myc ifadesi değişimi değerlendirildi.

İndüklenebilir Myc ekspresyon vektörünün etkinliğini değerlendirebilmek amacıyla H69 hücrelerine transfekte edildi. Vektör sistemi tetrasiklin indüklenebilir bir promotora sahip olduğu için transfeksiyon işleminden 24 saat sonra hücrelere 2 µg/mL konsantrasyonunda doksisisiklin (Dox) verildi. Dox verilmesinden 48 saat sonra hücrelerdeki Myc ifadesi değişimi değerlendirildi.

Ticari olarak Dharmacon firmasından temin edilen Myc small interfering RNA (siRNA) havuzu sistemi kullanılarak Myc amplifikasyonu taşıyan N417 hücrelerinde Myc ifadesinin baskılanması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda N417 hücreleri Myc siRNA'sı kullanılarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra Myc ifadesindeki değişim değerlendirildi.

İndüklenebilir shRNA vektörünün Myc ifadesi baskılanması üzerine etkinliğini araştırmak amacıyla Myc amplifikasyonu taşıyan N417 hücrelerine transfekte edildi. Vektör sistemi tetrasiklin indüklenebilir bir promotora sahip olduğu için transfeksiyon işleminden 24 saat sonra hücrelere 2 µg/mL konsantrasyonunda Dox verildi. Dox verilmesinden 48 saat sonra hücrelerdeki Myc ifadesi değişimi değerlendirildi. Transfeksiyon protokolü aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi:

Transfekte edilecek hücreler yeterli sayıya ulaştıkları zaman 6 odacıklı plaklara her bir gözde 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde 3 mL besiyerine ekildi. Ertesi gün uygun durumda olan hücreler, katyonik lipid bazlı transfeksiyon ajanı olan Fugene HD (Roche) ile üretici firmanın önerdiği protokole göre transfekte edildi. Transfeksiyon karışımı 1 µg plasmid DNA'sı/30 pmol siRNA ve 4 µl Fugene HD reaktifi 100 µl total hacim olacak şekilde Optimem (Gibco) içerisinde hazırlandı. Karışım oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi ve hücrelere damla damla eklendi. Hücreler 37°C' de %5'lik CO₂ inkübatörde protokolüne uygun sürede olacak şekilde bırakıldı.

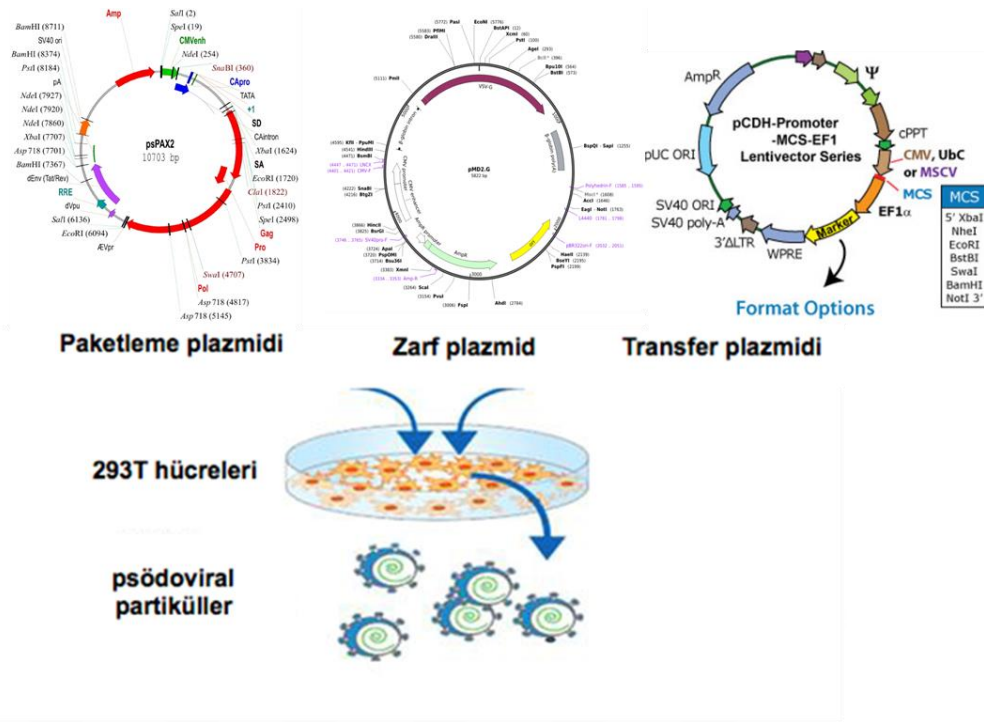
3.2.5.1.5 Lentivirüs Üretimi

Çalışmada kullanılan kalıcı Myc ekspresyon vektörü, indüklenebilir Myc ekspresyon ve indüklenebilir shRNA vektör sistemlerinin lentiviral kökenli olması ve gen ifadesinin regülasyonunda lentiviral sistemlerin geçici transfeksiyon yöntemlerine kıyasla uzun süreli etkinlik sağlamaları nedeniyle lentiviral infeksiyon yöntemi tercih edildi. Lentiviral infeksiyon sistemleri birden çok vektör sistemine (paketleme ve zarf vektörleri) sahip olup konak hücre genomuna entegre olabilme özelliğindedir.

Bu çalışmada lentivirüs üretimi için ikinci nesil paketleme sistemi kullanıldı. İkinci nesil lentiviral paketleme sisteminin protokol aşamaları (Şekil 3.9) aşağıdaki şekilde gibidir:

- Lentivirüs üretiminde kullanılacak HEK293T DMEM besi yeri kullanılarak T75 flasklara ekildi.

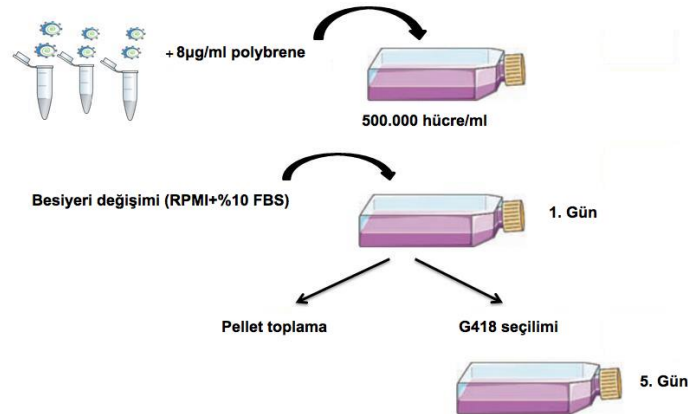
- 48 saat sonra hücreler toplandı, sayıldı ve 3.375×10^6 HEK293T hücresi lentivirüs üretimi için 15 mL DMEM ve %10 FBS içeren besiyerinde çözülerek T75 flaska ekildi.
- 293T hücrelerinin besiyeri 25 μ M chloroquine içeren 7,5 mL DMEM ve %10 FBS içeren taze besiyeri ile değiştirildi ve 1-2 saat beklendi.
- 15 ml falkon tüpte 15 μ g transfer plazmid, 3.5 μ g pMD.G2 ve 6.5 μ g pPAX2 513 μ l dH₂O ile çözüldü.
- 57 μ l CaCl₂ (2.5M) eklendi ve alt üst ederek karıştırıldı.
- 15 ml tüp düşük hızda karıştırılırken 570 μ l HBSS (Hank's balanced tuz solüsyonu) damla damla eklendi ve 5 dk beklendi.
- Transfeksiyon karışımı 293T hücrelerinin besiyerine eklendi ve inkübatörde 16-17 saat inkübasyona bırakıldı.
- Transfeksiyon besiyeri, 7.5 mL DMEM ve %10 FBS içeren besiyeri ile değiştirildi. 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- Virüs içeren 293T hücre besiyeri toplandı ve 0.45 μ M PVDF (Poliviniliden Florid) filtreden geçirilerek 4⁰C'de saklandı.
- Hücelere 7.5 mL DMEM ve %10 FBS içeren taze besiyeri eklendi ve inkübatörde 24 saat inkübe edildi.
- Virüs içeren 293T hücre besiyeri toplandı ve 0.45 μ M PVDF filtreden geçirilerek 4⁰C'deki ilk ayrılan virus ile birleştirildi.
- 1 hacim Lenti-X concentrator (Clontech) ve 3 hacim virus içeren DMEM eklendi.
- 5-10 kez dikkatlice karıştırıldı ve 4⁰C'de 1 gece bekletildi.
- 4⁰C'de 1500xg'de 45 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınıp 4⁰C'de 1500xg'de 3 dk tekrar santrifüj edildi.
- Pellet virus içeren DMEM hacminin 1/100 oranında PBS ile iki kez yıkandı.
- Virüs 20 μ l'lik tek kullanımlık şekilde stoklandı ve -80⁰C'de saklandı.



Şekil 3.10 Lentivirüs üretiminin şematik gösterimi

3.2.5.1.6 İnfeksiyon

Lentivirüs hazırlandıktan sonra hücreler 20 µl lentivirüs ve 8 µg/ml polybrene ile infekte edildi (Şekil 3.10). Ertesi gün besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2 kez PBS ile yıkanarak üzerlerine %10 FBS içeren RPMI besiyeri eklendi.



Şekil 3.11 Lentivirüs infeksiyonu

3.2.6 İnfekte Edilen Hücrelerin Seçilimi

İnfekte edilen hücrelerde aktarılan vektörün gen ifadesine olası etkisini gösterebilmesi için hücrelerin en az 2 pasaj uygun koşullarda çoğaltılması gerekmektedir. Bu durumun en önemli

sebebi ise viral vektör sistemlerinin hücre genomuna entegrasyon sürecinin konak hücrenin çoğalma evresinde gerçekleşmesidir. Öte yandan viral vektör ile infekte edilmiş kültürlerde tüm hücrelerin vektörü alma durumu mümkün olmamaktadır. Bu sebeple viral vektörler ile infekte edilmiş hücrelerin viral vektör genomunda yer alan ökaryotik seçilim markırına bağlı olarak seçilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada kalıcı Myc ekspresyon vektörü ile infekte edilmiş hücreler 400 µg/ml G418 ile seçilmiş iken indüklenebilir vektör sistemi ile infekte edilmiş hücreler 2 µg/ml puromisin ile seçildi. Bu seçim süreçleri sonucunda infekte edilmiş vektörlere sahip hücre kolonileri elde edilmiş oldu.

3.2.7 Hücre Çoğalma Analizi

Lentiviral vektörler kullanılarak infekte edilen hücrelerde Myc ifadesindeki değişime bağlı olarak hücrelerde değişen çoğalma kinetiğini araştırmak amacıyla kümülatif popülasyon değişimi yöntemi kullanıldı. Bu yöntem için ilk aşamada hücreler 500.000 hücre/ 5 ml olacak şekilde T25 flasklara ekildi. Ekildikten 3 gün sonra tripan mavisi aracılığıyla Countess Cell Counter (Thermo) cihazında sayıldı. Sayım işleminin ardından yine hücreler 500.000 hücre/ 5 ml olacak şekilde T25 flasklara ekildi. Bu ekim işlemi en az 3 pasaj gerçekleştirildi ve 3. pasajın ardından aşağıdaki formüle göre hücrelerin popülasyon ikileme zamanları hesaplandı.

$$PD = \frac{t(h)}{\log_2 \frac{C_f}{C_i}}$$

PD= popülasyon ikiye katlanma zamanı

t(h)= zaman (saat)

Cf= final konsantrasyonu

Ci= Başlangıç konsantrasyonu

3.2.8 RNA İzolasyonu

3.2.8.1 Total RNA İzolasyonu

Myc ifadesi, klonlanan vektörler aracılığıyla yeniden düzenlenen hücrelerde Myc ifadesindeki artış yada azalmaya bağlı olarak ifadesi değişen mRNA'ları belirlemek amacıyla hücrelerden RNA izolasyonu Qizol (Qiagen) reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon protokolü aşağıda belirtilen şekilde uygulandı:

- Kültür flasklarından toplanan hücreler 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 1 mL Qiazol reaktifi eklendi 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 200 µl kloroform eklendikten sonra vorteks yapıldı ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi.

- 12000 rpm de 15dk 4°C' de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası oluşan en üst fazda bulunan RNA toplandı ve 500 µl izopropanol içeren yeni tüpe alındı.
- RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 12000 rpm de 10 dk 4°C' de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü. Pelet üzerine %70 etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
- RNA'nın degrade olmasını ve kırılmasını önlemek için düşük hızda (7500 rpm) 10 dk 4°C' de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası %70 etanol uzaklaştırıldı ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA peleti kurumaya bırakıldı.
- Pelet miktarına bağlı olarak 20-25 µl RNaz içermeyen su eklendi.
- 60°C' de 10 dk bekletildi ve -80°C' de saklandı.

3.2.8.2 miRNA İzolasyonu

Myc ifadesi, klonlanan vektörler aracılığıyla yeniden düzenlenen hücrelerde Myc ifadesindeki artış yada azalmaya bağlı olarak ifadesi değişen mRNA'ları belirlemek amacıyla hücrelerden RNA izolasyonu miRNeasy Mini kit (Qiagen) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon protokolü aşağıda belirtilen şekildedir:

- Kültür flasklarından toplanan hücreler 300xg'de 5 dk santrifüj edildikten sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 700 µl Qiazol lizis reaktifi eklenerek vorteks yapıldı.
- Homojenat oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 140 µl kloroform eklenerek iyice karıştırıldı.
- 12000xg'de 15 dk 4°C' de santrifüj edildi.
- Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak 525 µl %100 EtOH eklendi ve pipetaj yapıldı.
- 700 µl örnek RNeasy mini spin kolonlara aktarıldı. Oda sıcaklığında 8000xg'de 15 sn santrifüj edildi ve alt faz atıldı.
- Örneğin kalan kısmı aynı kolonlara aktararak santrifüj edildi. Alt faz atıldı.
- Kolona 700 µl Buffer RWT eklenerek oda sıcaklığında 8000xg'de 15 sn santrifüj edildi ve alt faz atıldı.
- Kolona 500 µl Buffer RPE eklenerek oda sıcaklığında 8000xg'de 15 sn santrifüj edildi ve alt faz atıldı.
- Kolona tekrar 500 µl Buffer RPE eklenerek oda sıcaklığında 8000xg'de 15 sn santrifüj edildi ve alt faz atıldı.

- Kolon 1.5 ml ependorf tüpe aktarıldı ve kolona 50 µl RNA içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 8000xg'de 1 dk santrifüj edilerek RNA ependorf tüpe aktarıldı.
-

3.2.9 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen RNA'lar kalite ve kantite açısından değerlendirilmek üzere konsantrasyonları Nanodrop ND-2000c cihazında ölçüldü. 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans alındı. A260/A280 oranına göre RNA'nın saflığı belirlendi.

3.2.10 cDNA sentezi

3.2.10.1 Total RNA'nın cDNA'ya Çevrimi

Total RNA örnekleri Hi-Capacity cDNA Revers Transkripsiyon kiti (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) kullanılarak cDNA'ya çevrildi (Tablo 3.14).

Tablo 3.14 cDNA dönüşüm reaksiyonu koşulları

Bileşen	Hacim
10x RT Solüsyonu	2 µl
25x dNTP karışımı	0.8 µl
10x RT random primer	2 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
Nükleaz içermeyen su	4.2 µl
Total hacim	10 µl

Hazırlanan 10 µl 'lik karışım üzerine 10 µl (1 µg) izolasyonu yapılan total RNA örneği eklendi. Ardından reaksiyon karışımı PZR cihazında sırasıyla 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk ve 85°C'de 5 dk olacak şekilde reaksiyona tabi tutuldu. cDNA'ya dönüşen örnekler -20°C'de saklandı.

3.2.10.2 İzole Edilen Total miRNA'nın cDNA'ya Çevrimi

İzolasyonu yapılan total miRNA örnekleri miScript II RT kiti (Qiagen) kullanılarak cDNA'ya çevrildi (Tablo 3.15).

Tablo 3.15 miScriptII reaksiyonunun koşulları

Bileşen	Hacim
10x miScript Nükleik Karışımı	2 µl
5x miScript Hispect solüsyonu	4 µl
miScript Revers Transkriptaz karışımı	2 µl
Nükleaz içermeyen su	2 µl
Total hacim	10 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımı üzerine 10 µl (1 µg) izolasyonu yapılan total miRNA örneği eklendi. Örnek 37°C'de 60 dk inkübe edildi ve ardından miScript Revers Transkriptaz karışımı inaktive etmek için 95°C'de 5 dk inkübasyon gerçekleştirildi. Örnekler buz üzerine bir süre bekletildikten sonra -20°C'de saklandı.

3.2.11 Real Time PCR (qRT-PCR)

3.2.11.1 Total RNA Örneklerinden Ekspresyon Analizi

Myc ifadesindeki değişime bağlı olarak ifadesi artan yada azalan mRNA'ları saptamak amacıyla hücrelerden izolasyonu yapılan ve cDNA'ya dönüştürülen örnekler KiloGreen 2X (ABM) master karışımı kullanılarak Corbett Rotor-Gene 6000 cihazında analiz edildi. Reaksiyon karışımı hazırlanmadan önce cDNA örnekleri 1/5 oranında nükleaz içermeyen su kullanılarak dilüe edildi. Ardından reaksiyon karışımı 2 µl cDNA örneği, 10 µl KiloGreen 2X master mix, 0.3 µM ileri ve geri primerler ile total hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı. Sonuçların analizi için β-Aktin endojen kontrol olarak kullanıldı. Reaksiyon döngüsü aşağıda belirtildiği gibi her örnek için 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 3.16 mRNA RT-PZR koşulları

Segment	Döngü	Sıcaklık	Süre
1	1	95°C	10 dk
2	40	95°C	15 sn
		60°C'	60 sn

3.2.11.2 miRNA Örneklerinden Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Analizi

Myc ifadesindeki değişime bağlı olarak ifadesi artan yada azalan miRNA'ları saptamak amacıyla hücrelerden izolasyonu yapılan ve cDNA'ya dönüştürülen örnekler 1/5 oranında nükleaz içermeyen su kullanılarak dilüe edildi. cDNA örnekleri değişen miRNA ekspresyon profili miScript miRNA PCR array kiti kullanılarak değerlendirildi. Kit protokolüne göre aşağıdaki tabloda belirtilen karışım hazırlandı (Tablo 3.16). Hazırlanan karışım Rotor Gene 6000 cihazında ön-denatürasyon 95⁰C' de 15 dk, 95⁰C' de 15 sn denatürasyon, 55⁰C' de 130 sn bağlanma ve 70⁰C' de 30 sn 40 döngü olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi. Örnekler arasındaki miRNA ekspresyon değişimlerini kat değişimi olarak hesaplayabilmek için normalizatör olarak Snord ve U6 genleri kullanıldı. Her bir miRNA için kat değişimi $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ formülüyle belirlendi. Her örnek için deney 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi

Tablo 3.17 miRNA RT-PZR koşulları

Bileşen	Hacim
2x Quantitect SYBR Green Master Mix	10 µl
10x miScript Universal Primer	2 µl
10x miScript Primer	2 µl
RNaz içermeyen su	4 µl
cDNA	2 µl
	Total hacim 20 µl

3.2.12 Hücrelerden Protein Örneklerinin İzolasyonu

Myc ifadesi ekspresyon vektörleri aracılığıyla değiştirilen H209, H345, H82 ve N417 hücrelerinden protein özütleri RIPA Buffer (0.15 molar NaCl, % 10 SDS, 0,05 molar tris-HCl pH: 7,65, % 1 NP-40 ve % 0,5 deoxycholate) aracılığıyla toplandı. Ardından 15000x g'de, 4⁰C'de 15 dakika santrifüj edilerek istenmeyen hücre artıklarının ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Süpernatant alınarak yeni ependorf tüpe protein miktar tayini için aktarıldı.

3.2.13 Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini için 1/1000 oranında sulandırılan protein örnekleri üzerine Bradford reaktifi (BioRad 500-0006) eklendi. Örneklerdeki protein miktarları 25, 12,5, 5, 2,5 ve 1 µg Dana serum albümin (BSA) standartlarına karşı tespit edildi. Ölçümler 595 nm dalga boyunda Glomax Multi Detection System (Promega) cihazında gerçekleştirildi.

3.2.14 SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

Protein miktar tayininden sonra örneklerden 30 mikrogram protein olacak şekilde alındı ve üzerlerine 1:1 oranında olacak şekilde protein yükleme boyası (100 mM Tris-HCL (pH 6.8), %12 betamerkaptoetanol, 2% SDS, 1% Bromofenol blue, 20% gliserol) eklenerek, 5 dakika 99°C'de kuru blokta kaynatıldı. Kaynatma işleminin hemen ardından 10 mikrolitrelik otomatik pipet kullanılarak, ependorf tüp içindeki örnekler %8'lik SDS jele yüklendi ve yürüme tamponu (Tris baz 0.1 M, Hepes 0,1 M, SDS 3 mM) ile 90 voltta 1-1,5 saat elektroforeze tabi tutuldu (Tablo 3.18).

Tablo 3.18 %8'lik SDS ayırma jeli hazırlanması

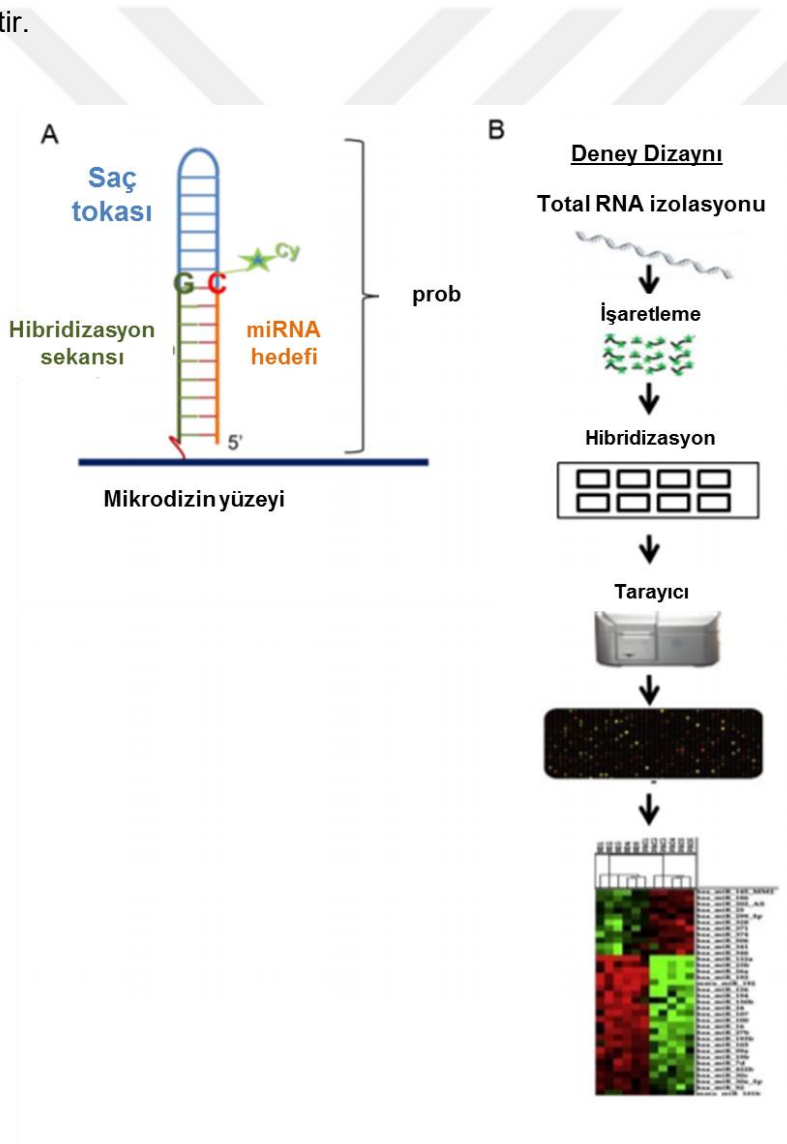
	%8 Akrilamit Jel (Ayrırma Jeli)
Distile Su	4.6 mL
%30 akrilamit-bis akrilamit (29:1)	2.7 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
%10 SDS	100 µl
%10 Amonyum persülfat (APS)	100 µl
TEMED	6 µl

Elektroforez işleminin ardından proteinler transfer tamponu (20% metanol, 50 mM Tris, 40 mM glisin) içinde 4°C'de 75 mAmp akım şiddetinde bir gece boyunca nitroselüloz (Millipore) üzerine transfer edildi. Bu işlemden sonra membran, %5'lik yağsız süt tozu içeren TBST (34 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH:7,6 %1 Tween 20) çözeltisi içinde oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Ardından aynı membran %5 yağsız süt içinde Myc, PTEN, P21, Cox-2, Sox-2, Aldh1a1, CD133, p73, ASCL1, N-kaderin, Parp, TRFP, Tubulin ve GAPDH primer antikoları (1:1000 oranında) kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat işaretlendi. Membran üzerindeki spesifik proteinlerin primer antikolarla işaretlenmesinin ardından, membran 30 dk TBS-T ile oda sıcaklığında yıkandı. Yıkama işleminin bitmesiyle membran primer antikoların immünooglobulinlerine karşı spesifik olarak geliştirilmiş olan ve 1:7500 oranında HRP (Horseradish Peroksidaz Cell Signaling) bağlı sekonder antikor bulunduran %5'lik yağsız kuru süt tozu içeren TBS-T içerisinde tekrar işaretlendi. Ardından artmış kemilüminosans ECL reaktifi (Millipore) kullanılarak Licor Odyssey FC Cihazında bantlar değerlendirildi.

3.2.15 miRNA Mikrodizin

H209, H345, H82 ve N417 hücrelerinde miRNA ve mRNA mikrodizin analizleri için MacroGen (Güney Kore) şirketinden hizmet alımı yapıldı. miRNA mikrodizin analizi Affymetrix

miRNA 4.0 platformu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu platform 30 bin üzerinde olgun miRNA için prob taşımaktadır. Bu sistemde her bir gen için 9 ayrı prob bulunmaktadır. Mikrodizin için örneklerden izole edilen RNA'ların ND-1000 spektrofotometre (NanoDrop, Amerika) ve Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Amerika) cihazları ile saflık ve kalitesi ölçüldü. Affymetrix Genechip miRNA 4.0 mikrodizin platformu protokollerine göre örnekler hazırlandı. Ardından 1000 ng RNA örneği FlashTag Biotin RNA işaretleme kiti kullanılarak işaretlendi (3.11). İşaretlenen RNA örnekleri miRNA mikrodizin çipleri ile 99°C'de 5 dakika ve ardından 45°C 'de 5 dakika hibridize edildi. RNA-mikrodizin hibridizasyon protokolü 16 saat 48°C'de Affymetrix® 450 Fluidics istasyonunda gerçekleştirildi. Hibridizasyonu yapılan çipler Affymetrix GCS 3000 tarayıcı (Affymetrix, Santa Clara, Amerika) aracılığıyla tarandı. Affymetrix GeneChip yazılımı aracılığıyla sonuçlar analiz edildi. Analiz sonucunda örnek ve kontrol grubu arasındaki ifade farklılıkları filtreledikten sonra kat değişimleri şeklinde verilmiştir.



Şekil 3.12 A) miRNA probunun yapısı B) Mikrodizin analizi süreci

3.2.16 mRNA Mikrodizin

H209, H345, H82 ve N417 hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin ND-1000 spektrofotometre (NanoDrop, Amerika) ve Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Amerika) cihazları ile saflık ve kalitesi ölçüldü. Illumina HT-12 v4.0 platformu kullanılarak direkt hibridizasyon yöntemi ile mRNA mikrodizin işlemi gerçekleştirildi. RNA örnekleri çip üzerine hibridize edilmeden önce çoğaltıldı ve biotin ile işaretlendi. Hibridizasyon sonrası Cy3- streptavidin ile işaretleme yapıldı ve çip görüntüldü. Illumina HT-12 v4.0 platformu iyi tanımlanmış genler, gen adayları ve sprints varyantlarını içermektedir ve transkriptomun büyük bir kısmını saptayabilmektedir. Her bir mikrodizin sisteminde 47 bin adet prob bulunmaktadır. Problar NCBI RefSeq Release 38 içeriğine göre dizayn edilmiştir. Problar 50-mer uzunluğunda olup artmış bir seçicilik ve hassaslığa sahiptir. Mikrodizin sonucu elde edilen veriler örnekler arasında kat değişimi şeklinde analiz edildi. Gruplar arasında korelasyon analizi ve küme analizleri yapıldı.

3.2.17 mRNA ve miRNA Mikrodizin Sonuçlarının Analizi

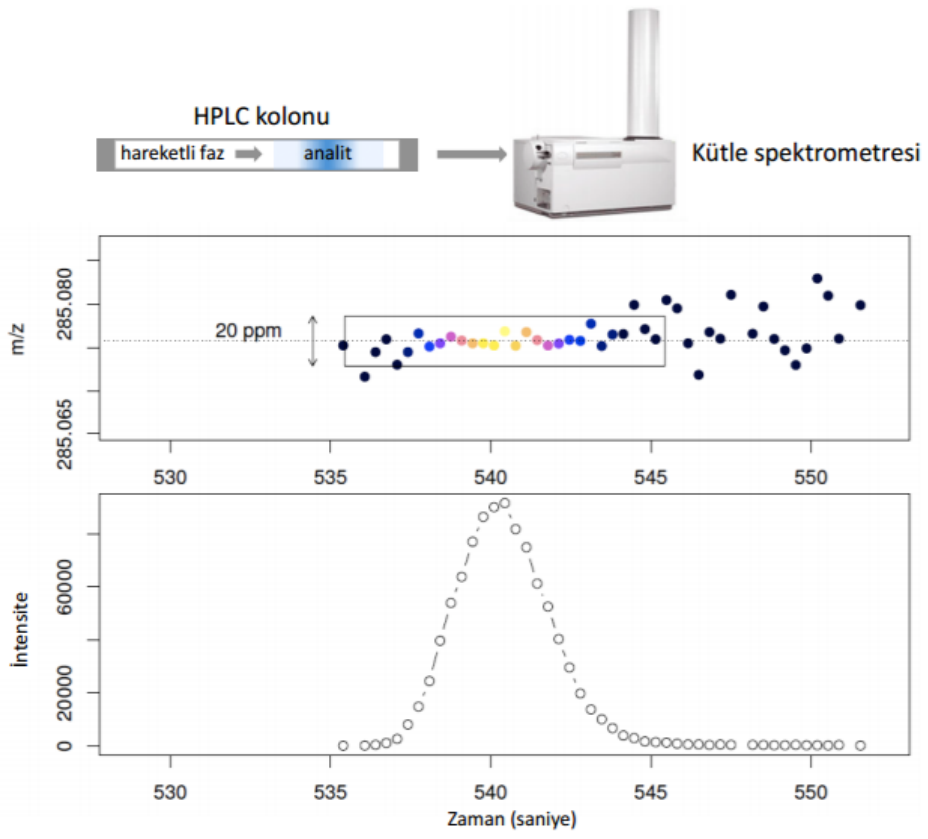
Mikrodizin analizleri sonucu elde edilen veriler kullanılan platformların yazılımları sonucunda her bir örnek ve kontrolü için işlendi. miRNA mikrodizin analizinde her bir miRNA için 9 adet prob bulunmakta ve analiz aşamasında bu problemlerin en az 4 ve üzeri adet prob ile sonuç veren miRNA'lar analiz için kullanıldı. miRNA mikrodizin analizi sonucunda belirlenen miRNA'ların hedef mRNA'ları miRTarbase, Targetscan, miRanda ve miRDB veri tabanları kullanılarak seçildi. Seçilen hedef mRNA'ların 3'UTR bölgeleri UCSC genome browser ve NCBI web siteleri kullanılarak teyit edildi. Öte yandan Serial Cloner programı aracılığıyla 3'UTR-miRNA eşleştirilmesinin olup olmadığı kontrol edildi.

mRNA dizin sonuçları Gen ontoloji (GO) ve KEGG Yolak analizleri ile analiz edildi. Gen Ontoloji (GO) Analizi: Farklı ekspresyon gösteren mRNA'ların rol aldığı hücresel, biyolojik ve moleküler açıdan fonksiyonel genleri ve gen gruplarını ortaya koymak amacıyla yapıldı. Her bir analiz için kontrol ve hedef grup karşılaştırması yapılarak en belirgin farklılık gösteren hücresel süreçler belirlendi. Tüm analizlerin değerlendirmesinde $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Yolak Analizi: Ekspresyon farklılığı gösteren mRNA'ların birbirleri ile olan ilişki ağını ve hücre metabolizması hakkında bilgi vermek için de KEGG yolak analizi gerçekleştirildi. Her bir analiz için kontrol ve hedef grup karşılaştırması yapılarak yollarda en yoğun değme noktası farklılığı gösteren yollar belirlendi. Tüm analizlerin değerlendirmesinde $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

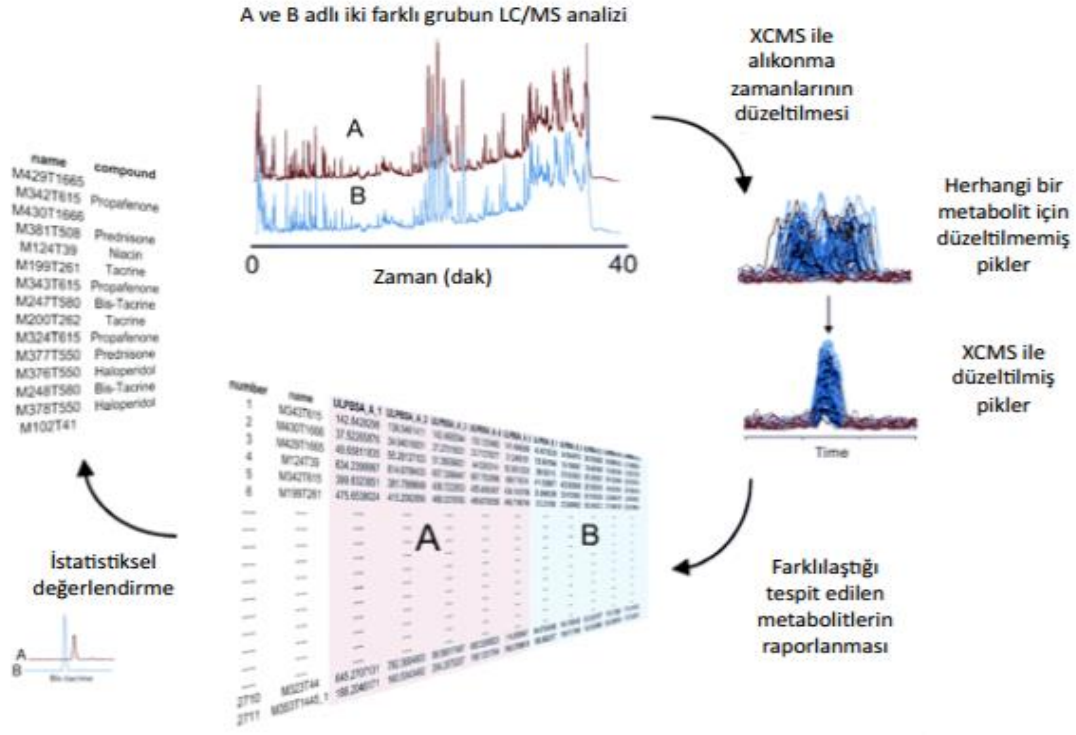
3.2.18 Q-TOF LC-MS Metabolit Analizi

H209, H345, H82 ve N417 hücreleri DPBS (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH: 7.4, Sigma-Aldrich) çözeltisi ile yıkanarak homojenizasyon tamponunda (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 120 mM NaCl, pH:7.4, Sigma-Aldrich) çözüldü ve Bandelin Sonoplus cihazı kullanılarak homojenat hazırlandı. Ardından homojenat santrifüj edildi ve santrifüj işlemi (14.000 g x 14 dakika, 4 °C' de) sonrasında oluşan çökelti (nükleer fraksiyon ve mitokondriyal fraksiyon) atıldı. Kalan çözelti santrifüj cihazında tekrar santrifüj (20.000 g x 1 saat, 4 °C' de) edildi. Sitolitik fraksiyonun konstantrasyon tayini için Bradford protein tayini yapıldı. Bradford tayininin ardından sitozolik fraksiyon alınarak kullanılacağı zamana kadar -80 °C' de 500 µL' lik fraksiyonlar halinde saklandı. Sitolitik fraksiyonlardan metabolitlerin ekstraksiyonu amacıyla ultrafiltrasyon tekniği ve metanolle ekstraksiyon teknikleri uygulandı. Sitolitik fraksiyonlar, Microkon Amicon ultra 3kDa santrifüj filtreleri kullanılarak 16000 rpm'de santrifüj edildi. Böylelikle 3 kDa'nın üzerindeki numuneler örneklerden ayrıldı. Mikrokon'dan alınan süzüntü vakum santrifüj cihazında +4°C'de uçuruldu daha sonra 50:50 MeOH:dH₂O karışımında çözüldü. Numunelere, hareketli faz 1:1 oranında seyreltilip enjeksiyon yapıldı. Örnekler, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi İlaç ve Kozmetik Ar-Ge ve Kalite Kontrol Laboratuvarı (HÜNİKAL)' de bulunan yüksek hassasiyetli Agilent LC-Q-TOF-MS 6530 cihazı ile HILIC veya C18 kolonlar kullanılarak %0.1 Formik asit, Asetonitril çözeltileri kullanılarak gradiyent bir elüsyon programı kullanılarak her hücre grubu için kontrol hücrelere kıyasla metabolit profillemesi yapıldı (Şekil 3.12). Metabolit profillemeye çalışmaları için XCMS açık kaynak kodlu yazılım ve Metlin (<http://metlin.scripps.edu/>), HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) vb. serbest olarak erişilebilen online veribankaları kullanıldı. LC-MS cihazında kolondan geçirilmiş olan ve kütleleri virgülden sonra 4 basamağa kadar yüksek hassasiyetle ölçülen metabolitler cihazın hata sınırları çerçevesinde veribankalarında tarandı. XCMS programından alınan ham veriler, ortalama değerlere göre normalize edilip, güven aralığı %95 ve değişim miktarları kat değişimi şeklinde sıralanarak, m/z ve alıkonma zamanları belirlendi.



Şekil 3.13 LC-MS sisteminde bir metabolitin kolondan geçilmesi ve algılanması

Nordstrom ve ark. tarafından bu işleyiş Şekil 3.13' de verildiği biçimde şematize edilmiştir (169)



Şekil 3.14 LC-MS sonuçlarının analiz süreci

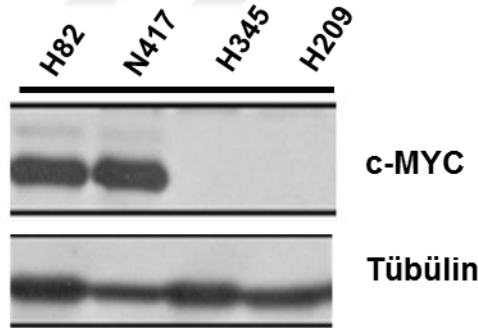
3.2.19 İstatistiksel Analiz

miRNA ve mRNA dizin çalışması sonucunda gruplar arasında ekspresyonel değişim gözlenen miRNA ve mRNA'ların istatistiksel analizi için R istatistik dili v.3.1.2 kullanıldı. Hücre gruplarındaki miRNA ve mRNA Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) dataları karşılaştırmalı Ct yöntemi olan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analiz istatistik yöntemi ve basic student t testleri kullanıldı (Livak ve Schmittgen 2001). Data analizi SPSS software programı kullanılarak yapıldı. LC-MS sonuçları dahil tüm analizlere $P < 0,05$ anlamlılık seviyesi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Dizilerinin Myc İfade Düzeyleri

Çalışmamızda kullanılan H209, H345, N417 ve H82 hücreleri Myc amplifikasyonu taşımaları (H82 ve N417) ve Myc ifadelerinin düşük seviyede (H209 ve H345) olması sebebiyle Myc tarafından düzenlenen metabolizma hipotezimizi doğrulamak amacıyla tüm deneysel aşamalarda kullanılmıştır. KHAK hücre dizileri olan bu hücreler Myc ifadesi, hücresel çoğalma hızı ve morfoloji açısından birbirlerinden farklılıklar taşımaktadır. Bu değişimleri saptamak amacıyla ilk olarak hücrelerdeki Myc ifade düzeyleri western blot yöntemi aracılığıyla protein düzeyinde saptandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Çalışmada kullanılan hücrelerin Myc ifade düzeyleri

Western Blot analizi sonuçlarına göre literatürde Myc amplifikasyonu olduğu bilinen H82 ve N417 hücrelerinde Myc ifadesi H209 ve H345 hücrelerine kıyasla yüksek bir düzeyde olduğu saptandı. H345 ve H209 hücrelerinin ise Western Blot yöntemiyle saptanamayacak kadar düşük seviyede bir Myc ifadesine sahip oldukları gözlemlendi.

Hücrelerin çoğalma hızlarını belirlemek amacıyla materyal ve metod bölümünde bahsedildiği gibi hücre çoğalma analizi gerçekleştirildi. Hücre çoğalma analizleri sonucunda Myc amplifikasyonuna sahip H82 ve N417 hücrelerinin çoğalma hızlarının Myc ifadesi düşük olan H209 ve H345 hücrelerine kıyasla belirgin şekilde yüksek olduğu belirlendi (Tablo 4.1).

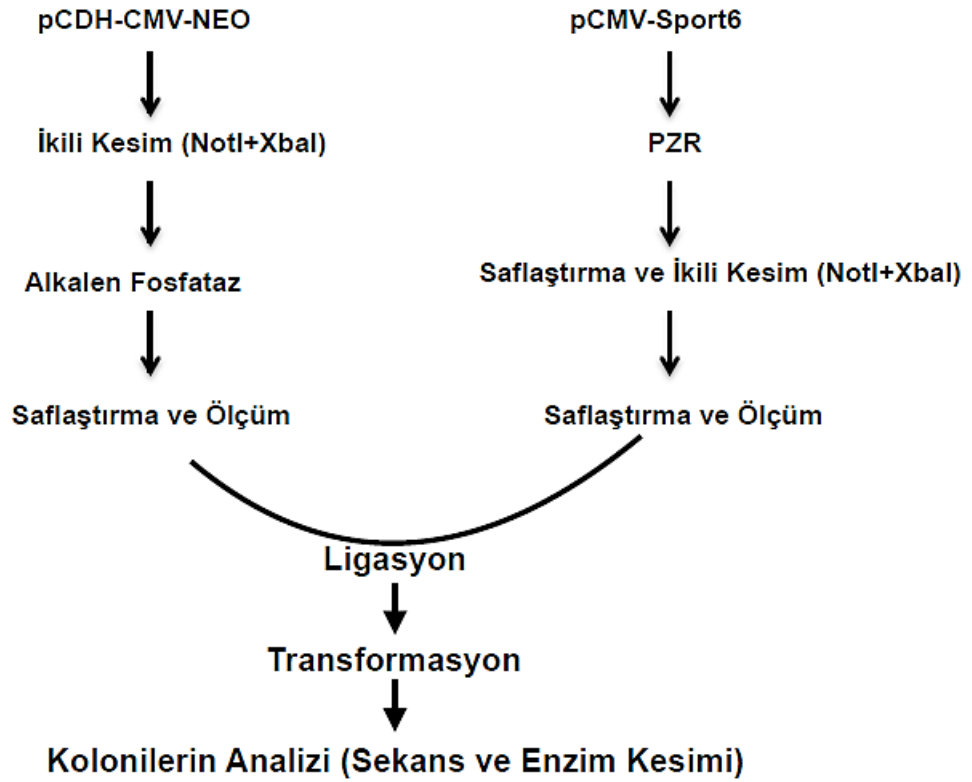
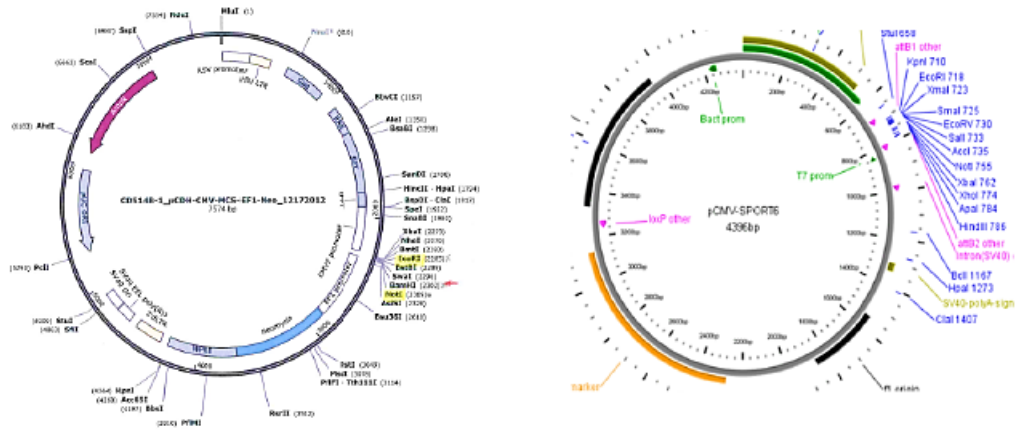
Myc ifadesi düşük olan H209 hücrelerinde popülasyon ikileme süresi 92 saat olarak belirlenmiş olup H345 hücresinde ise 83 saat olarak saptandı. Myc amplifikasyonu taşıyan H82 ve N417 hücrelerinde ise popülasyon ikileme süreleri sırasıyla 39 ve 35 saat olarak saptandı.

Tablo 4.1 KHAK hücre dizilerinin hücre çoğalma analizleri

Hücre Adı	Popülasyon İkileme Süresi (saat)
H209	92
H345	83
H82	39
N417	35

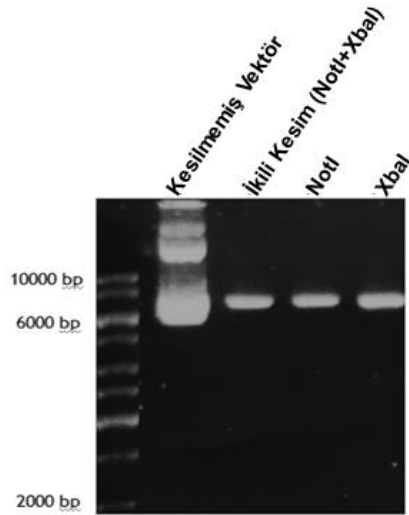
4.2 Kalıcı Lentiviral Myc Ekspresyon Vektörünün Hazırlanması

Myc ifadesi taşımayan H209 ve H345 hücrelerinde Myc ifadesini kalıcı şekilde oluşturabilmek için kalıcı lentiviral Myc vektörü klonlanması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda kalıcı lentiviral Myc ekspresyon vektörü hazırlamak için pCDH-CMV-MCS vektörü kalıp olarak kullanıldı. Şekil 4.2' de kalıcı Myc vektörünün klonlama aşamaları şematize edilmiştir.



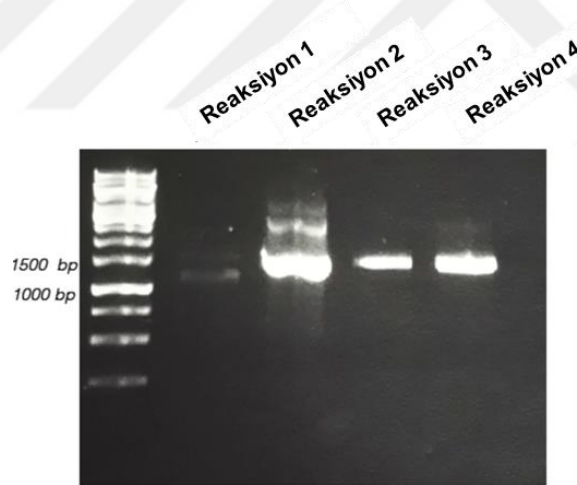
Şekil 4.2 Kalıcı Lentiviral Myc vektörünün hazırlanma aşamaları

pCDH-CMV vektörü kalıcı lentiviral bir vektör olup çoklu klonlama bölgesinde NotI ve XbaI enzimleri için kesim bölgesi içermektedir. Myc cDNA'sını vektöre klonlamak için vektör ilk olarak NotI ve XbaI enzimleri ile ayrı ayrı ve ikili kesim olacak şekilde kesildi (Şekil 4.3). Enzim kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve görüntüleme sisteminde analiz edildi.



Şekil 4.3 pCDH-CMV vektörünün NotI ve XbaI enzimleriyle kesilmesi

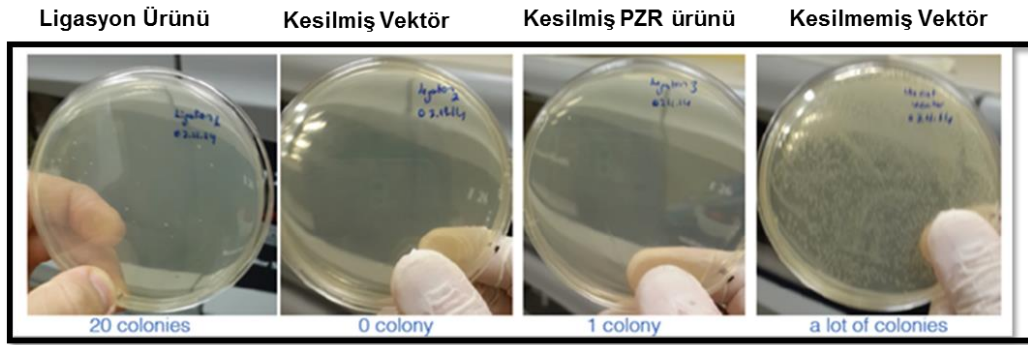
Vektörün restriksiyon enzimleriyle kesim işleminin ardından, tasarladığımız ve yapısında NotI enzim kesim bölgesi içeren ileri primer ile XbaI kesim bölgesi içeren geri primer kullanılarak yabancı tip Myc cDNA'sı pCMV-SPORT6 vektöründen PZR yöntemi kullanılarak çoğaltıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Yabancı tip Myc cDNA'sının PZR ile çoğaltılması

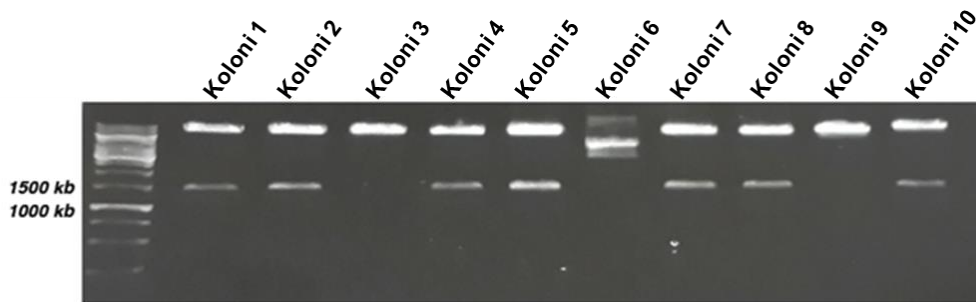
PZR analizi sonucunda yabancı tip Myc cDNA'sı 4 farklı reaksiyon sonucunda çoğaltıldı. Reaksiyon ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu ve jel görüntüleme sisteminde analiz edildi. 4 farklı reaksiyon ürünü jel elektroforezi sonucu analiz edildiğinde 1367 bp uzunluğunda Myc cDNA'sı belirlendi. Yapılan detaylı analiz sonucunda materyal metod bölümünde de gerçekleştirme koşulları belirtilen 3 numaralı reaksiyon koşulunun Myc cDNA'sını çoğaltmak için en uygun reaksiyon koşulu olduğu belirlendi. Klonlama işleminin sonraki aşaması için çoğaltılan PZR ürünleri NotI ve XbaI enzimleri ile ikili kesim işlemine

tabi tutuldu. İkili kesim ürünleri Qiaquick kiti kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılma işleminin ardından kesim yapılan vektör DNA'sı ve PZR ürünleri ligasyon işlemine tabi tutuldu. Ligasyon ürünleri kompetent DH5α bakterilerine transformasyon yapıldı. Transformasyon işlemi için; ligasyon ürünleri, sadece vektör DNA'sı, sadece PZR ürünü ve kesilmemiş vektör DNA'ları bakterilere transforme edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Transformasyon sonrasında petride çoğalan koloniler

Transformasyon sonrası amfisilin içeren petrilere çoğalan koloniler analiz edildiğinde, materyal metod bölümünde de bahsedildiği gibi beklendiği şekilde ligasyon ürünü transforme edilmiş bakterileri içeren petride 20 adet koloni sayılmış olup yalnızca kesilmiş vektör yada PZR ürünlerinin transforme edildiği bakterilerin bulunduğu petrilere bir çoğalma gözlenmemiştir. Bu sonuçlar da ligasyon ve transformasyon işlemi süreçlerinin doğru şekilde gerçekleştiğini gösterir niteliktedir. Transformasyon işlemi ardından 20 adet koloni çoğalan petriden 10 adet koloni seçilerek plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Plazmit izolasyonu ardından kolonilerin yabancı tip Myc cDNA'sını içerip içermediklerini belirlemek amacıyla NotI ve XbaI enzimleriyle kesim işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Transformasyon sonrası seçilen kolonilerin validasyonu

Restriksiyon enzimleri aracılığıyla 1367 bp uzunluğunda bant veren ve yabancı tip Myc cDNA'sı içerdiğini düşündüğümüz koloni 5 ve koloni 8 DNA'ları tasarladığımız 2 farklı primer aracılığıyla sekans analizine tabi tutuldu. Sekans işlemi sonucunda elde edilen veriler Serial Cloner v2 kullanılarak NCBI veritabanından alınan yabancı tip Myc cDNA'sı ile eşleştirildi ve

her iki kolonide de %100 oranında yabancı tip Myc cDNA' sı ile doğru yönde eşleşme görüldü (Şekil 4.7,8).



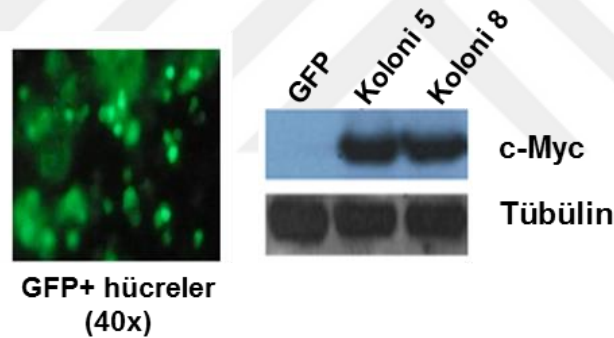
Şekil 4.7 Koloni 5 sekans sonuçlarının analizi



Şekil 4.8 Koloni 8 sekans analizi sonuçları

4.3 Kalıcı Lentiviral Myc Ekspresyon Vektörü Etkinliğinin Belirlenmesi

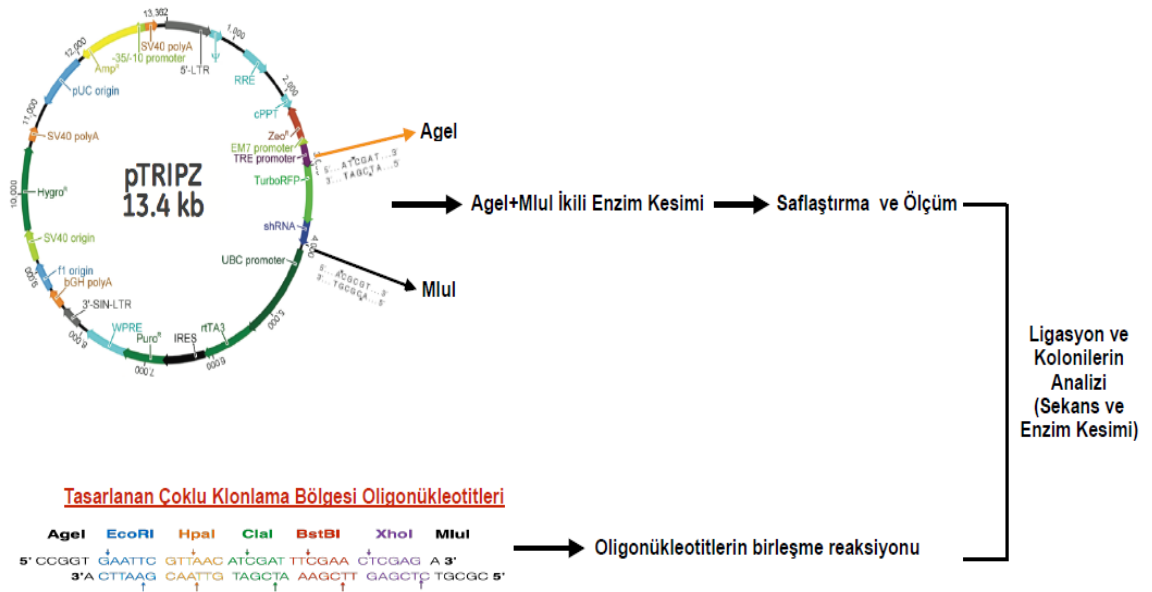
2 farklı koloniden izolasyonu yapılan klonlanmış kalıcı lentiviral Myc vektörünün etkinliğini belirlemek amacıyla Myc ifadesi western blot yöntemiyle belirlenemeyecek düzeyde düşük olan H69 KHAK hücre dizisine transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra hücre lizatları toplandı ve protein izolasyonu materyal metod bölümünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Western blot analizi sonuçlarına göre Myc ifadesi çok düşük seviyede olan H69 hücrelerinin transfeksiyondan 2 gün sonra her iki koloniden izole edilen plazmitin Myc ifadesini indüklediği saptandı (Şekil 4.9). Fakat sonraki çalışmalar için Myc ifadesini yaklaşık olarak aynı seviyede indükledikleri belirlenen iki koloniden biri olan koloni 8'den izole edilen vektör tercih edildi. Transfeksiyon verimliliğini belirlemek amacıyla H69 hücreleri Boş-GFP vektörüyle transfekte edildi ve floresans mikroskop görüntüleri sonucunda neredeyse tüm hücrelerin GFP (Yeşil floresans proteini) ifade ettikleri saptandı.



Şekil 4.9 Kalıcı Myc ekspresyon vektörlerinin etkinliğinin gösterilmesi

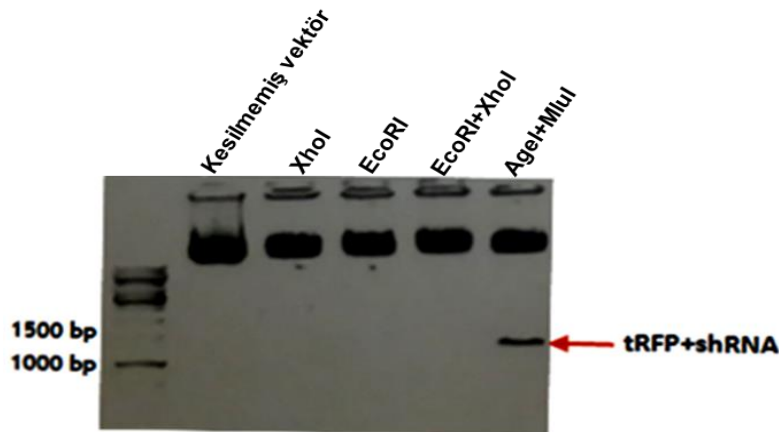
4.4 İndüklenebilir Lentiviral Myc Ekspresyon Vektörünün Hazırlanması

pTRIPZ boş vektörü tetrasiklin indüklenebilir bir promotor sistemine sahip olup gen ifadesini zaman bağımlı olarak düzenleyebilmektedir. Bu sebeple Myc ifadesi düşük olan H209 ve H345 hücrelerinde Myc ifadesini zamana bağımlı olarak düzenleyebilmek amacıyla indüklenebilir vektör sistemi oluşturmak amaçlandı. İndüklenebilir aşırı ekspresyon vektörünün hazırlanması için pTRIPZ boş vektörü (GE Healthcare, Dharmacon) kullanıldı. pTRIPZ boş vektörü kullanılarak oluşturulan indüklenebilir lentiviral Myc ekspresyon vektörü oluşturma aşamaları Şekil 4.10' da şematize edilmiştir.



Şekil 4.10 İndüklenebilir lentiviral Myc ekspresyon vektörü oluşturma aşamaları

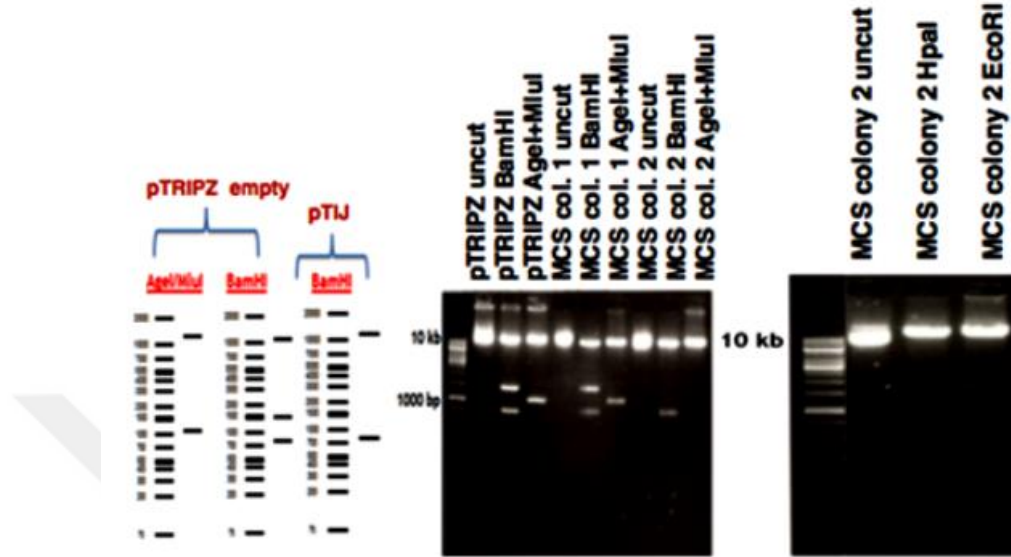
pTRIPZ boş vektörü yapısında tRFP (Kırmızı fluoresans proteini) ve miR-30' dan köken alan shRNA sekans bölgelerini içermektedir. Klonlamak istediğimiz Myc cDNA'sını vektöre entegre edebilmek amacıyla ilk olarak tRFP ve shRNA dizilerini vektörden uzaklaştırmayı amaçladık. Bu amaç doğrultusunda vektöre Agel ve MluI enzimleri kullanarak ikili kesim işlemi yapıldı. Yapılan kesim işlemi agaroz jelde görüntülendi ve vektörden yaklaşık 1200 bç uzunluğundaki sekans uzaklaştırıldı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 pTRIPZ boş vektörden shRNA ve TRFP dizilerinin uzaklaştırılması

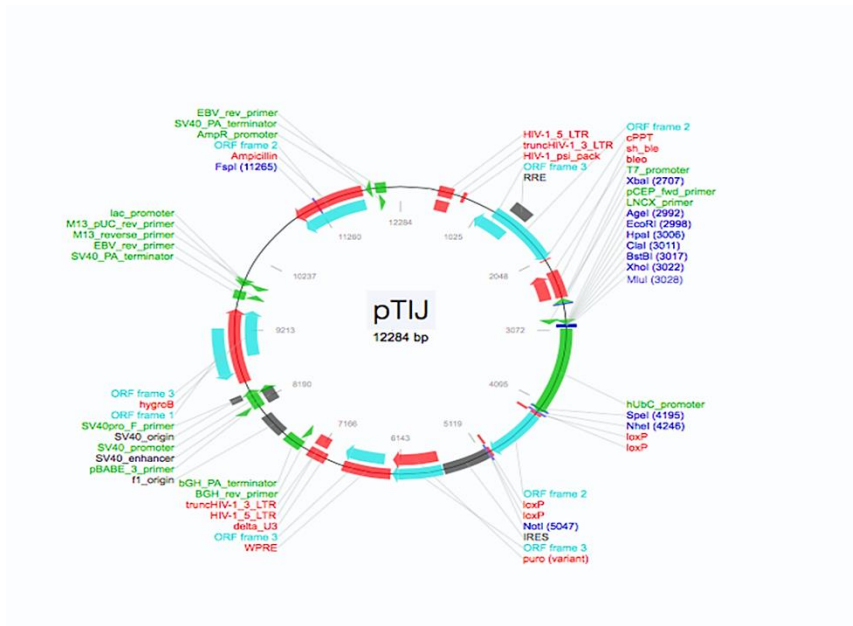
Enzim kesim işleminin ardından çoklu klonlama bölgesinde bulunmasını istediğimiz restriksiyon enzim kesim bölgelerini içeren oligonükleotitler birleşme reaksiyonuna tabi tutuldu. Tasarlanan oligonükleotitler içerisinde yer alan enzim kesim bölgeleri özellikle

ilerleyen aşamalarda diğer Myc ailesi genlerini klonlayabilmek açısından tercih edilmekle birlikte, olası diğer genleri klonlayabilmek için literatürde gen klonlama aşamalarında sıklıkla kullanılan restriksiyon enzim kesim dizileri tercih edildi. Birleşme reaksiyonu ardından reaksiyon ürünü ve vektörün ligasyonu yapıldı.



Şekil 4.12 İndüklenebilir PTIJ vektörünün restriksiyon enzimleriyle validasyonu

Ligasyon sonrasında yapılan transformasyon işlemi sonucunda 2 adet koloni restriksiyon enzimleri kullanılarak doğrulandı (Şekil 4.12). Restriksiyon enzimleri aracılığıyla validasyon işlemleri sonucunda pTIJ olarak adlandırdığımız indüklenebilir lentiviral klonlama vektörümüzü klonlamış olduk (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 pTIJ vektörünün yapısı

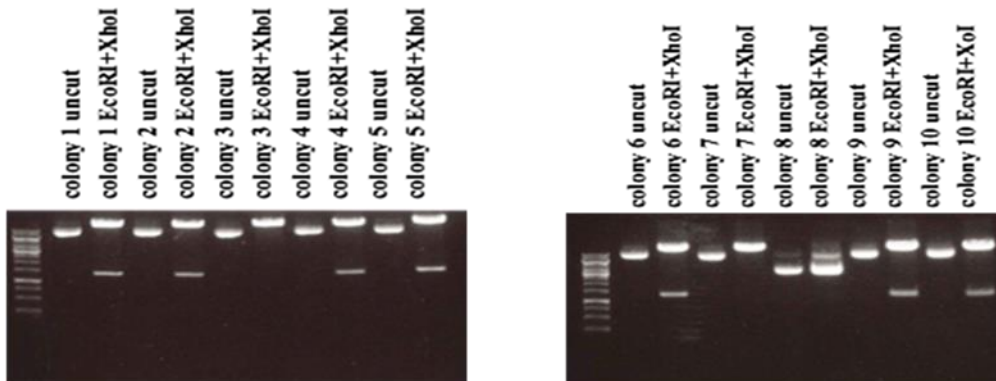
4.5 MYC' nin pTIJ Vektörüne Klonlanması

Myc cDNA'sı yapısında EcoRI ve XhoI restriksiyon enzim kesim bölgelerini içeren primerler ile pCMV-SPORT6 vektöründen PZR yöntemiyle çoğaltıldı (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Myc cDNA'sının PZR ile çoğaltılması

Sonraki aşamada EcoRI ve XhoI ile ikili kesilen pTIJ vektör ve PZR ürünleri ligasyon ve sonrasında transformasyon işlemlerine tabi tutuldu. Transformasyon sonucunda 10 adet koloni seçildi. Seçilen kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Ardından seçilen kolonilerin Myc cDNA'sını içerip içermediklerini saptamak amacıyla EcoRI ve XhoI enzimleriyle ikili kesimleri yapıldı (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Seçilen kolonilerin restriksiyon enzimleriyle validasyonu

Restriksiyon enzimleriyle kesim işleminin ardından seçilen 10 adet koloniden 7'sinde Myc cDNA'sının varlığı tespit edildi. Sonraki aşamada koloni 2, 4 ve 6 örnekleri 4 farklı primer kullanılarak sekans analizine tabi tutuldu (Şekil 4.16-18).

		Y12+	CMV PROMOTER	ECORI	
Reference	1	GATAGAGAAGCTATGTCGAGT TAGCGTGTACGGTGGAGGTTTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCTCAGATGCACCGGTGAATTC			181
Y4		-----GATAGAGAAGCTATGTCGAGT TAGCGTGTACGGTGGAGGTTTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCTCAGATGCACCGGTGAATTC			
Y5		-----			
		MYC CDS			
Reference	182	CTGGAATTTTTTGGGTAGTGGAAAACCCAGCAGCTCCCGGAGATGCCCCCAAGCTTAGCTTCCACACAGGAAGTATGACTCGACTAGACTCGGTGCAGCGTATTTCCTACTGCGAGAGGAGGAAGCTTCTACAGCAGCAGCAGCAGCGAGCTGCAGCCCCCGGCCA			362
Y4		CTGGAATTTTTTGGGTAGTGGAAAACCCAGCAGCTCCCGGAGATGCCCCCAAGCTTAGCTTCCACACAGGAAGTATGACTCGACTAGACTCGGTGCAGCGTATTTCCTACTGCGAGAGGAGGAAGCTTCTACAGCAGCAGCAGCAGCGAGCTGCAGCCCCCGGCCA			
Y5		-----			
Reference	363	GOGAGATATCTGGAGAAATTCGAGCTGCTGCCACCCCGCCCTGTCCCTAGCGCCCTCGCCGCTCTCTGCTGCTCCCTACTGTTGGGTGCACACCTTCTCCCTCGGGGAGACACGAGCGGCTGGGGAGCTTCTCCAGCGCCAGCAGCTGGAGTGGTACCGAGTCT			543
Y4		GOGAGATATCTGGAGAAATTCGAGCTGCTGCCACCCCGCCCTGTCCCTAGCGCCCTCGCCGCTCTCTGCTGCTCCCTACTGTTGGGTGCACACCTTCTCCCTCGGGGAGACACGAGCGGCTGGGGAGCTTCTCCAGCGCCAGCAGCTGGAGTGGTACCGAGTCT			
Y5		-----			
Reference	544	GGGAGGAGACATGGTAAACAGATTTTCATCTCGGACCCCGGACGAGAGACTTCATCAAAAACATCATCATCCAGGACTGTATGTGGAGCGCTCTCGGCCGCGCCAGCTGTCTCAGAGAGCTGGCTCTTACAGGCTCGCGCAAGACAGCGGACGCCGACCCCGCCG			724
Y4		GGGAGGAGACATGGTAAACAGATTTTCATCTCGGACCCCGGACGAGAGACTTCATCAAAAACATCATCATCCAGGACTGTATGTGGAGCGCTCTCGGCCGCGCCAGCTGTCTCAGAGAGCTGGCTCTTACAGGCTCGCGCAAGACAGCGGACGCCGACCCCGCCG			
Y5		-----			
Reference	725	GGCCACAGCTCTGCTCCACTCCAGCTTGTACTGACGATCTGAGGAGCGCGCGCTCAGAGTGCATGACCCCTCGTGGTCTTCCCTACTCCCTCAAGCAGCAGCTGCGCAAGTCTCGGCTCGCAAGCTCCAGGCTCTCCAGGCTCTCTCGCTCGCTCTCGA			905
Y4		GGCCACAGCTCTGCTCCACTCCAGCTTGTACTGACGATCTGAGGAGCGCGCGCTCAGAGTGCATGACCCCTCGTGGTCTTCCCTACTCCCTCAAGCAGCAGCTGCGCAAGTCTCGGCTCGCAAGCTCCAGGCTCTCCAGGCTCTCTCGCTCGCTCTCGA			
Y5		-----			
Reference	906	CGAGTCTCTCCCGCAGGGCAGCCCGAGCCCTGGTCTCCATGAGGAGACACCGCCACCCAGCAGCGGACTCTGAGGAGAACAGAAAGTGAAGTGTGTTTCTGTGGAAAAGGAGGCTCTCGCAAAGGTCAGAGCTGGATCACTTCTGCTGGAGCCA			1086
Y4		CGAGTCTCTCCCGCAGGGCAGCCCGAGCCCTGGTCTCCATGAGGAGACACCGCCACCCAGCAGCGGACTCTGAGGAGAACAGAAAGTGAAGTGTGTTTCTGTGGAAAAGGAGGCTCTCGCAAAGGTCAGAGCTGGATCACTTCTGCTGGAGCCA			
Y5		-----			
Reference	1087	CAGCAACCTCTCCAGCCACTGCTCTCAAGAGTGCACGCTCCACACATCAGCACAACAGCGAGCGCTCCCTCCACTCGGAGGACTATCTGCTGCGCAGAGGTCAGTGGACAGTCTCAGAGTCTGAGCAGATCAGCAACCGAAATGACAGCCCGAGTTC			1267
Y4		CAGCAACCTCTCCAGCCACTGCTCTCAAGAGTGCACGCTCCACACATCAGCACAACAGCGAGCGCTCCCTCCACTCGGAGGACTATCTGCTGCGCAGAGGTCAGTGGACAGTCTCAGAGTCTGAGCAGATCAGCAACCGAAATGACAGCCCGAGTTC			
Y5		-----			
Reference	1268	TGGACACCGAGGAAATGTCAGAGGCGAACACACAACTCTGGAGCGCCAGAGGAGAGAGTAAACAGGAGCTTTTTGCGCTGCGTGCAGAGTCCCGGAGTTGGAAAACATGAAAAGCCCGCAGGATGTTATCTTAAAAAGCCACAGCATACCTCTGCTCCAG			1448
Y4		TGGACACCGAGGAAATGTCAGAGGCGAACACACAACTCTGGAGCGCCAGAGGAGAGAGTAAACAGGAGCTTTTTGCGCTGCGTGCAGAGTCCCGGAGTTGGAAAACATGAAAAGCCCGCAGGATGTTATCTTAAAAAGCCACAGCATACCTCTGCTCCAG			
Y5		-----			
Reference	1449	CAGAGGACAAAAGCTCATTTCTGAGAGGACTTTGTGGAAACGACGAGAACGTTGAAACACAACTTGAACAGTACGAGAACTTTGTGTGTAACCTGAGAGCTGTGCTCGGCTCGCGCGGTTTGGCGCTCCCGCGGCGCCCTCTCCAGCGGAGCGCTGCACCTCAGAGA			1629
Y4		CAGAGGACAAAAGCTCATTTCTGAGAGGACTTTGTGGAAACGACGAGAACGTTGAAACACAACTTGAACAGTACGAGAACTTTGTGTGTAACCTGAGAGCTGTGCTCGGCTCGCGCGGTTTGGCGCTCCCGCGGCGCCCTCTCCAGCGGAGCGCTGCACCTCAGAGA			
Y5		-----			
Reference	1630	AGGGCGCAG			
Y4		-----			
Y5		AGGGCGCAG			

Şekil 4.16 pTIJ koloni 2 sekans analizi sonuçları

		Y12+	CMV PROMOTER	ECORI	
Reference	1	GATAGAGAAGCTATGTCGAGT TAGCGTGTACGGTGGAGGTTTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCTCAGATGCACCGGTGAATTC			181
Y4		-----GATAGAGAAGCTATGTCGAGT TAGCGTGTACGGTGGAGGTTTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCTCAGATGCACCGGTGAATTC			
Y5		-----			
		MYC CDS			
Reference	182	CTGGAATTTTTTGGGTAGTGGAAAACCCAGCAGCTCCCGGAGATGCCCCCAAGCTTAGCTTCCACACAGGAAGTATGACTCGACTAGACTCGGTGCAGCGTATTTCCTACTGCGAGAGGAGGAAGCTTCTACAGCAGCAGCAGCAGCGAGCTGCAGCCCCCGGCCA			362
Y4		CTGGAATTTTTTGGGTAGTGGAAAACCCAGCAGCTCCCGGAGATGCCCCCAAGCTTAGCTTCCACACAGGAAGTATGACTCGACTAGACTCGGTGCAGCGTATTTCCTACTGCGAGAGGAGGAAGCTTCTACAGCAGCAGCAGCAGCGAGCTGCAGCCCCCGGCCA			
Y5		-----			
Reference	363	GOGAGATATCTGGAGAAATTCGAGCTGCTGCCACCCCGCCCTGTCCCTAGCGCCCTCGCCGCTCTCTGCTGCTCCCTACTGTTGGGTGCACACCTTCTCCCTCGGGGAGACACGAGCGGCTGGGGAGCTTCTCCAGCGCCAGCAGCTGGAGTGGTACCGAGTCT			543
Y4		GOGAGATATCTGGAGAAATTCGAGCTGCTGCCACCCCGCCCTGTCCCTAGCGCCCTCGCCGCTCTCTGCTGCTCCCTACTGTTGGGTGCACACCTTCTCCCTCGGGGAGACACGAGCGGCTGGGGAGCTTCTCCAGCGCCAGCAGCTGGAGTGGTACCGAGTCT			
Y5		-----			
Reference	544	GGGAGGAGACATGGTAAACAGATTTTCATCTCGGACCCCGGACGAGAGACTTCATCAAAAACATCATCATCCAGGACTGTATGTGGAGCGCTCTCGGCCGCGCCAGCTGTCTCAGAGAGCTGGCTCTTACAGGCTCGCGCAAGACAGCGGACGCCGACCCCGCCG			724
Y4		GGGAGGAGACATGGTAAACAGATTTTCATCTCGGACCCCGGACGAGAGACTTCATCAAAAACATCATCATCCAGGACTGTATGTGGAGCGCTCTCGGCCGCGCCAGCTGTCTCAGAGAGCTGGCTCTTACAGGCTCGCGCAAGACAGCGGACGCCGACCCCGCCG			
Y5		-----			
Reference	725	GGCCACAGCTCTGCTCCACTCCAGCTTGTACTGACGATCTGAGGAGCGCGCGCTCAGAGTGCATGACCCCTCGTGGTCTTCCCTACTCCCTCAAGCAGCAGCTGCGCAAGTCTCGGCTCGCAAGCTCCAGGCTCTCTCGCTCGCTCTCGA			905
Y4		GGCCACAGCTCTGCTCCACTCCAGCTTGTACTGACGATCTGAGGAGCGCGCGCTCAGAGTGCATGACCCCTCGTGGTCTTCCCTACTCCCTCAAGCAGCAGCTGCGCAAGTCTCGGCTCGCAAGCTCCAGGCTCTCTCGCTCGCTCTCGA			
Y5		-----			
Reference	906	CGAGTCTCTCCCGCAGGGCAGCCCGAGCCCTGGTCTCCATGAGGAGACACCGCCACCCAGCAGCGGACTCTGAGGAGAACAGAAAGTGAAGTGTGTTTCTGTGGAAAAGGAGGCTCTCGCAAAGGTCAGAGCTGGATCACTTCTGCTGGAGCCA			1086
Y4		CGAGTCTCTCCCGCAGGGCAGCCCGAGCCCTGGTCTCCATGAGGAGACACCGCCACCCAGCAGCGGACTCTGAGGAGAACAGAAAGTGAAGTGTGTTTCTGTGGAAAAGGAGGCTCTCGCAAAGGTCAGAGCTGGATCACTTCTGCTGGAGCCA			
Y5		-----			
Reference	1087	CAGCAACCTCTCCAGCCACTGCTCTCAAGAGTGCACGCTCCACACATCAGCACAACAGCGAGCGCTCCCTCCACTCGGAGGACTATCTGCTGCGCAGAGGTCAGTGGACAGTCTCAGAGTCTGAGCAGATCAGCAACCGAAATGACAGCCCGAGTTC			1267
Y4		CAGCAACCTCTCCAGCCACTGCTCTCAAGAGTGCACGCTCCACACATCAGCACAACAGCGAGCGCTCCCTCCACTCGGAGGACTATCTGCTGCGCAGAGGTCAGTGGACAGTCTCAGAGTCTGAGCAGATCAGCAACCGAAATGACAGCCCGAGTTC			
Y5		-----			
Reference	1268	TGGACACCGAGGAAATGTCAGAGGCGAACACACAACTCTGGAGCGCCAGAGGAGAGAGTAAACAGGAGCTTTTTGCGCTGCGTGCAGAGTCCCGGAGTTGGAAAACATGAAAAGCCCGCAGGATGTTATCTTAAAAAGCCACAGCATACCTCTGCTCCAG			1448
Y4		TGGACACCGAGGAAATGTCAGAGGCGAACACACAACTCTGGAGCGCCAGAGGAGAGAGTAAACAGGAGCTTTTTGCGCTGCGTGCAGAGTCCCGGAGTTGGAAAACATGAAAAGCCCGCAGGATGTTATCTTAAAAAGCCACAGCATACCTCTGCTCCAG			
Y5		-----			
Reference	1449	CAGAGGACAAAAGCTCATTTCTGAGAGGACTTTGTGGAAACGACGAGAACGTTGAAACACAACTTGAACAGTACGAGAACTTTGTGTGTAACCTGAGAGCTGTGCTCGGCTCGCGCGGTTTGGCGCTCCCGCGGCGCCCTCTCCAGCGGAGCGCTGCACCTCAGAGA			1629
Y4		CAGAGGACAAAAGCTCATTTCTGAGAGGACTTTGTGGAAACGACGAGAACGTTGAAACACAACTTGAACAGTACGAGAACTTTGTGTGTAACCTGAGAGCTGTGCTCGGCTCGCGCGGTTTGGCGCTCCCGCGGCGCCCTCTCCAGCGGAGCGCTGCACCTCAGAGA			
Y5		-----			
Reference	1630	AGGGCGCAG			
Y4		-----			
Y5		AGGGCGCAG			

Şekil 4.17 pTIJ koloni 4 sekans analizi sonuçları

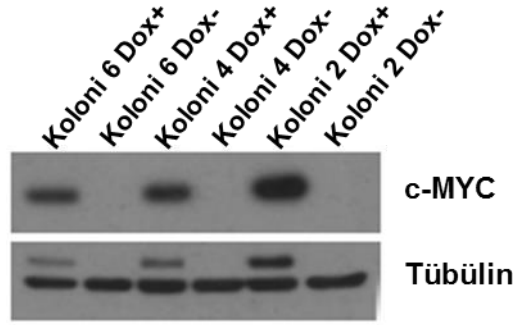
		Y12→	CMV PROMOTER	EcoRI
Reference	1	GATAGAGACGTATGTCGAGCTAGCCCTGTACGGTGGGAGTTTATAAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCTCAGATCCACCGGTGAATTC		181
Y4		-----		
Y5		-----		
		MYC CDS		
Reference	182	CTGGATTTTTTGGGTAGTGGAAACCCAGCAGCTCCCGGAGAGTCCCTCAACGTTAGCTTACCAACAGGAATATGACTGACTAGCTCGGTGAGCCGATTTCTACTGCGAGAGGAGGAACTTCTACAGCAGCAGCAGCAGGAGCTGAGCCGCGGCGCA		362
Y4		-----		
Y5		-----		
Reference	363	GGAGGATATCTGGAGAAATTCGAGCTGCTGCCACCCCGCCCTGTCCTAGCGCGGCTCCGGGCTCTGCTGCTTACTGCTGGGTCAGACCCCTTCTCCCTCGGGGAGACAGAGCGGCGTGGCGGGAGCTTCTCCAGCGCCAGCCTGGAGATGGTGAACGAGTGTCT		543
Y4		-----		
Y5		-----		
Reference	544	GGGAGGAGACATGGTGAACCCAGAGTTTCATCTGCGACCCGGACGAGCGAGACTTCATCAAAAACATCATCATCCAGAGCTGTATGTGGAGCGCTTCTCGGCGCGCCAGCTGGTCTCAGAGAGCTGGCCCTCTACAGGCTGGCGCAAGCAGCGCCGAAACCCCGCCGC		724
Y4		-----		
Y5		-----		
Reference	725	GGCCACAGCTGCTCCACTCCAGCTTGTACCTGCAAGATCTGAGCGCGCGCTCAGAGTGCATGACCCCTCGGTGGTCTTCCCTCAACCTCTCAAGCAGCAGCTGGCCCAAGTCTGGGCTCGCAAGCTCCAGGCTCCGCGCAAGCAGCGCCGAAACCCCGCCGC		905
Y4		-----		
Y5		-----		
Reference	906	CGAGTCTCCCGCAGGGCCCGGAGCCCTGGTGTCTCAAGAGGAGACAGCCCAACCCAGCAGCGACTCTGAGGAGAACAGAGATGAGGAGAAATGATGTTTCTGTGAAAAGGCGAGCTCTGGCAAAAGTCCAGAGTCTGGATCACTTCTGTGGAGCCCA		1086
Y4		-----		
Y5		-----		
Reference	1087	CGCAAACTCTCCAGCCCACTGGTCTCAAGAGTGCACCTCCACACATCAGCAACAACAGCGGCTCCCTCCACTCGGAAGACTATCTGTGCCAGAGGTCAGTTGGACAGTCTCAGAGTCTGAGCAGATCAGCAACAACCGAAATGACCAAGCCAGGCTCC		1267
Y4		-----		
Y5		-----		
Reference	1268	TGGACACCGAGGAAATGTCAGAGGCGAACACACAAGCTCTGGAGCGCCAGAGGAGAAAGAGCTAALAAAGGAGCTTTTTGGCCCTGGTGCAGCAGTCCCGAGTTGGAAAACATGAAAAGGCGCCCAAGGTAGTATCTTAAAAAGCCACAGCATACTCTGTCTCCAG		1448
Y4		-----		
Y5		-----		
Reference	1449	CAGAGGAGCAAAAGCTCATTTCTGAGAGGACTTGTGGGAAACGAGGAGACAGTTGAAACAACAATGAAACAGTACAGGAATCTTGTGGTAACTGAGACCTGGCCCTCGCGCGGGTTTTGGCGCTCCCGCGGGCGCCCTCTCCAGCGGAGCGTGCACGCTCAGACA		1629
Y4		-----		
Y5		-----		
Reference	1630	AGGGCGCAG		
Y4		-----		
Y5		AGGGCGCAG		

Şekil 4.18 pTIJ koloni 6 sekans analizi sonuçları

Sekans analizi sonuçları Serial Cloner v2 ile incelendiği zaman her 3 koloninin de yabancı tip Myc cDNA'sını doğru yönde taşıdıkları saptandı.

4.6 İndüklenebilir Lentiviral Myc Ekspresyon Vektörü Etkinliğinin Belirlenmesi

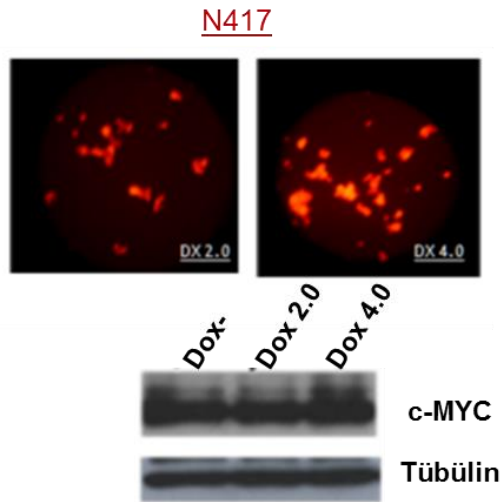
3 farklı koloniden izolasyonu yapılmış olan indüklenebilir lentiviral Myc vektörlerinin Myc ifadesi üzerine olası indükleyici etkilerini araştırmak amacıyla H69 hücre dizisine transfeksiyonları yapıldı. Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra besiyerine 2 µg/ml konsantrasyonunda Dox eklendi ve Dox eklenmesinden 48 saat sonra hücre lizatları western blot analizi için toplandı. Western blot analizi sonuçlarına göre Myc ifadesi çok düşük seviyede olan H69 hücrelerine Dox verilmesinden 2 gün sonra her 3 koloniden izole edilen plazmitin Myc ifadesini indüklediği saptandı (Şekil 4.19). Her 3 koloniden izole edilen vektörlerin Myc ifadesini indükleyici etkileri karşılaştırıldığında sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere koloni 2 den izole edilen vektör tercih edildi.



Şekil 4.19 İndüklenebilir Myc ekspresyon vektörlerinin Myc ifadesi üzerine etkinliği

4.7 İndüklenebilir Lentiviral Myc-shRNA Vektörünün Hazırlanması

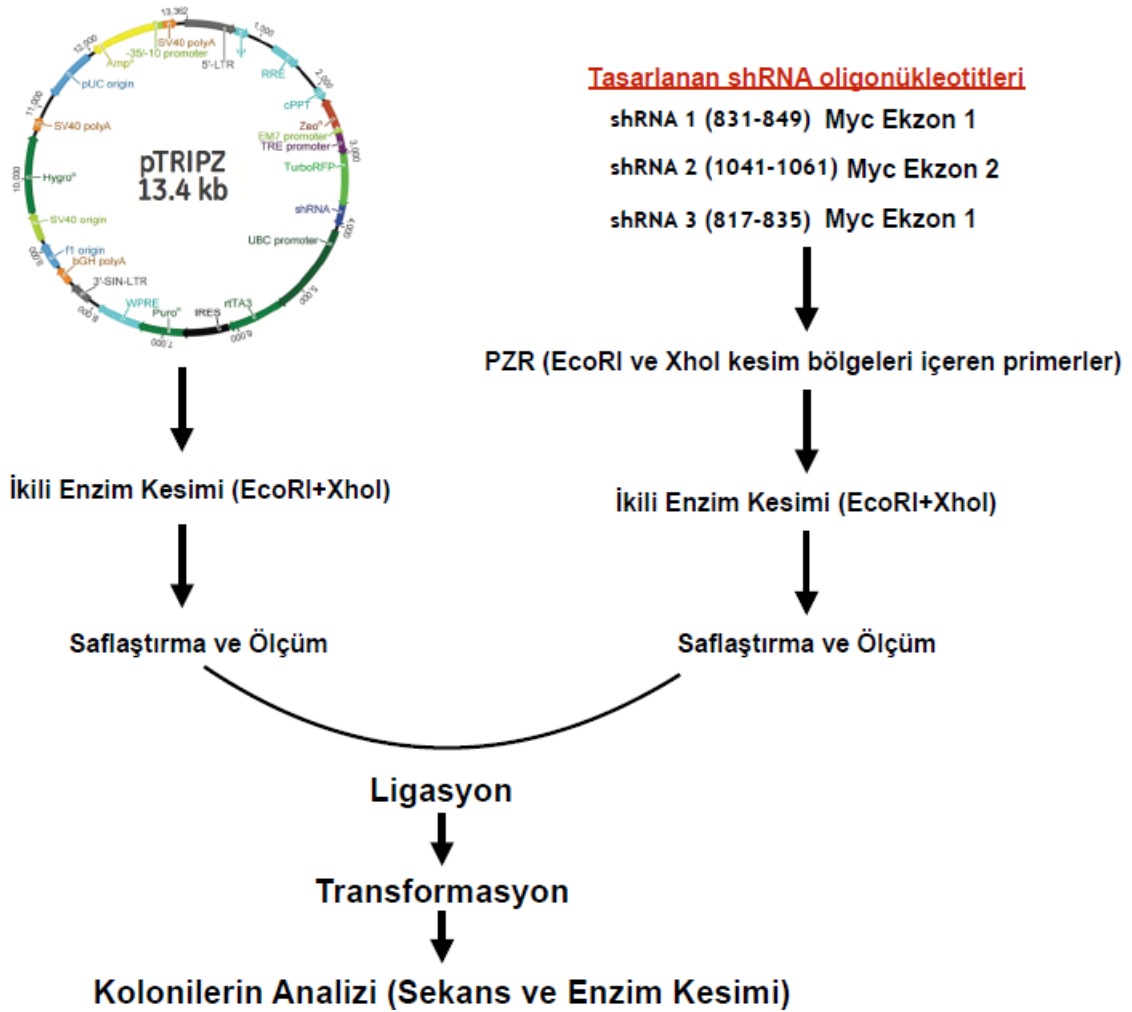
Myc ifadesini baskılayabilmek amacıyla ticari olarak Dharmacon firmasından temin edilen lentiviral indüklenebilir Myc-shRNA vektörleri kullanıldı. Myc-shRNA vektörleri Myc aşırı ekspresyonuna sahip N417 hücrelerine infekte edildi. İnfeksiyon işleminin ardından N417 hücreleri 2 ve 4 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda Dox ile muamele edildi ve hücre lizatları western blot analizi için toplandı. Western blot analizi sonuçları incelendiğinde ticari olarak temin edilen Myc-shRNA vektörlerinin Myc ifadesini baskılayıcı etkilerinin olmadığı görüldü (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 Ticari olarak temin edilen Myc-shRNA vektörlerinin Myc baskılanması üzerine etkisi

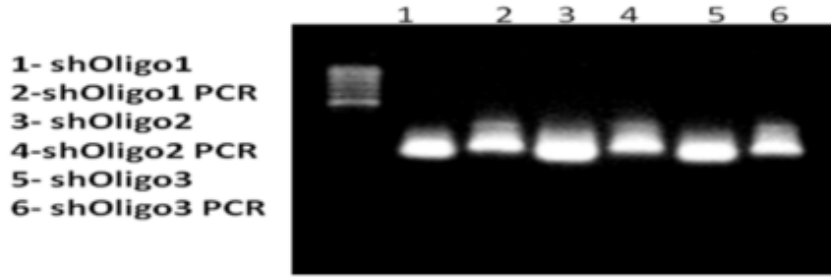
Ticari olarak temin edilen Myc-shRNA vektörlerinin Myc ifadesini baskılayamadıkları belirlendikten sonra kendi indüklenebilir Myc-shRNA vektörlerimizi tasarlamaya karar verdik. İndüklenebilir Myc-shRNA klonlayabilmek için tetrasiklin indüklenebilir promotor sistemi ve tRFP' ye sahip pTRIPZ vektör sistemi iskelet olarak kullanıldı. Klonlama amacıyla, ilk olarak

Myc ifadesini baskılama potansiyeli olan 3 adet oligo nükleotit tasarlandı. Tasarlanan oligonükleotitlerden biri ticari olarak Dharmacon firmasından temin edilen ve Myc ifadesini baskıladığı bilinen siRNA'dan köken aldı. Oligonükleotitlerden bir diğeri ise literatürde tanımlanmış olan fakat indüklenebilir özellikte olmayan Myc shRNA sekansı temel alınarak tasarlandı. Üçüncü oligonükleotit olarak ise Serial Cloner v2 yardımıyla Myc ekzon 2'de bağlanma bölgesi olan bir diziyi belirledik. Tasarlanmış olan oligonükleotitler kullanılarak klonlanan indüklenebilir Myc shRNA vektörü oluşturma aşamaları Şekil 4.21' de belirtilen şekilde şematize edilmiştir.



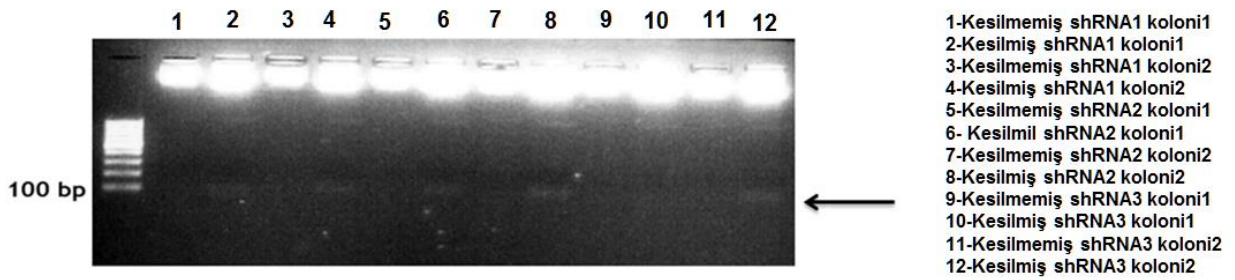
Şekil 4.21 İndüklenebilir Myc-shRNA vektörü oluşturma aşamaları

Tasarlanan oligonükleotitler EcoRI ve XhoI enzim kesim bölgelerini içeren primerler kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Ardından PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.22).



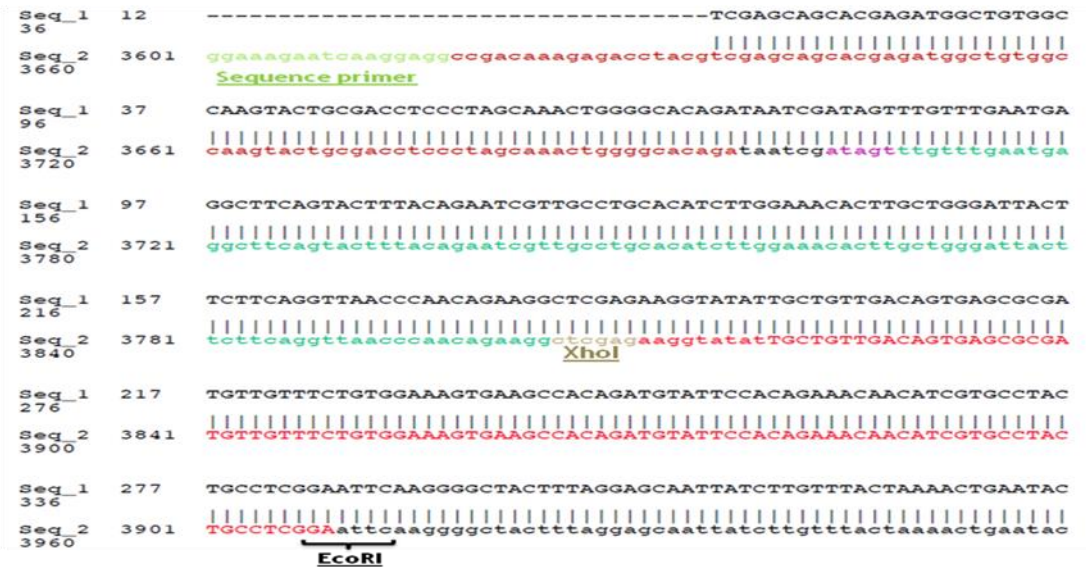
Şekil 4.22 Tasarlanan shRNA oligonükleotitlerinin PZR sonuçları

PZR ürünlerinin, EcoRI ve XhoI enzimleri ile ikili olarak kesilmiş pTRIPZ boş vektör ile ligasyonu gerçekleştirildi. Ligasyon işleminin ardından ürünler DH5α hürelere transforme edildi. Transformasyon işleminin ardından çoğalma gözlenen petri kaplarında her bir ligasyon ürünü için 2 adet koloni seçildi. Seçilen kolonilerden izole edilen vektör DNA'ları EcoRI ve XhoI enzimleriyle ikili kesim yapıldı (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 Tasarlanan shRNA vektörlerinin restriksiyon analiziyle validasyonu

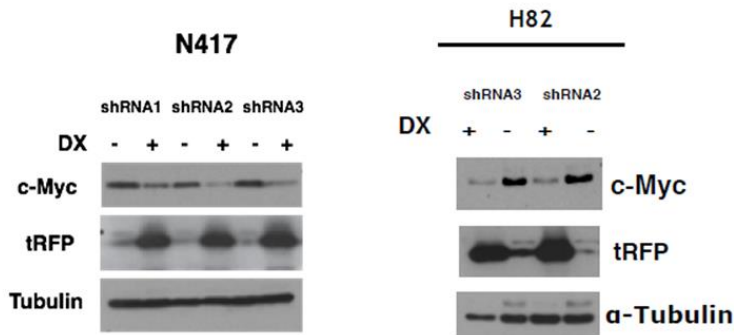
Restriksiyon analizi sonucunda izolasyonu yapılan tüm kolonilerde shRNA oligonükleotitlerinin varlığı saptandı. Sonraki aşamada her bir shRNA oligonükleotiti için birer koloniye ait DNA örnekleri sekans analizine tabi tutuldu. Yapılan sekans analizi sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde her 3 koloniye ait DNA'nın da tasarladığımız shRNA sekansına sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 Tasarlanan shRNA1 vektörünün sekans analizi sonucu (Kırmızı ile belirtilen sekans tasarlanan shRNA oligonükleotit 1 'i göstermektedir)

4.8 İndüklenebilir Lentiviral Myc-shRNA Vektörü Etkinliğinin Belirlenmesi

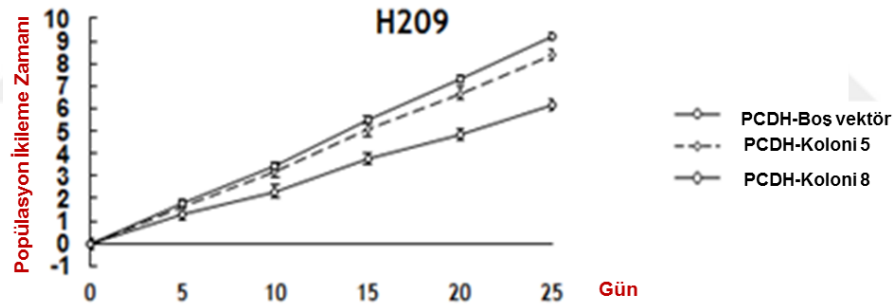
İndüklenebilir Myc-shRNA vektörlerinin Myc ifadesi baskılanması üzerine olan etkilerini belirleyebilmek amacıyla Myc amplifikasyonu taşıyan H82 ve N417 hücrelerine lentiviral infeksiyonları yapıldı. Lentiviral infeksiyon sürecinin ardından 2 µg/ml puromisin ile seçilimi yapılan hücrelere 2 µg/ml konsantrasyonunda Dox verildi ve 2 gün beklendi. Dox ile muameleden 2 gün sonra hücre lizatları western blot analizi için toplandı. Yapılan western blot sonucuna göre Myc ifadesini baskılamak amacıyla klonladığımız 3 farklı shRNA vektörünün de Myc ifadesini belirgin şekilde baskıladığı saptandı (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 Klonlanan üç farklı shRNA'nın etkinliklerinin western blot ile analizi

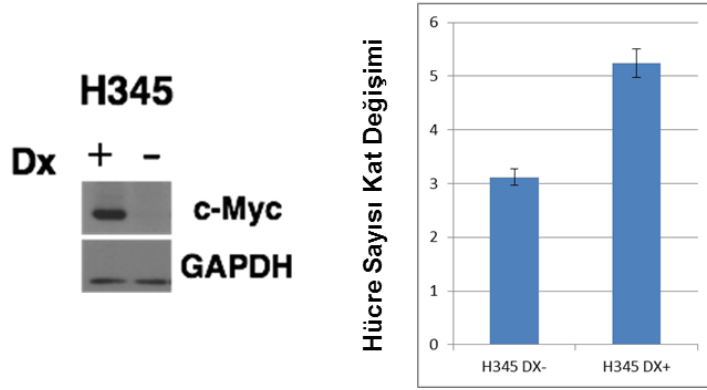
4.9 KHAK Hücre Dizilerinde Myc İfadesindeki Değişimin Hücre Proliferasyonuna Etkisi

KHAK hücre dizilerinde Myc ifadesindeki değişimin hücre proliferasyonuna olan olası etkisini araştırmak amacıyla materyal metod bölümünde belirtildiği şekilde hücre çoğalma analizi yapıldı. Hücre çoğalma analizinde kalıcı lentiviral Myc ekspresyon vektörü ile infekte edilmiş H209, indüklenebilir Myc ekspresyon vektörü ile infekte edilmiş H345 ve indüklenebilir Myc-shRNA ile infekte edilmiş H82 ve N417 hücreleri kullanıldı. Bu amaçla T25 kültür kaplarına 5×10^5 hücre/5 ml sayısında hücre ekildi ve 3 gün sonra hücreler tripan mavisi kullanılarak Thermo counter cihazında sayıldı. Kalıcı Myc ekspresyon vektörleriyle infekte edilmiş H209 hücrelerinde seçim sonrasında yapılan hücre çoğalma analizi neticesinde hem koloni 5 hem de koloni 8 den izole edilen vektör ile infekte edilmiş hücrelerin çoğalma hızında belirgin şekilde artış olduğu saptandı (Şekil 4.26). Çoğalma analizi sonucu elde edilen veriler incelendiğinde koloni 8 den izole edilen vektör ile infekte edilmiş H209 hücrelerinde diğer hücrelere kıyasla daha da artmış bir çoğalma kinetiği olduğu için ileri çalışmalarda bu hücreler kullanıldı.



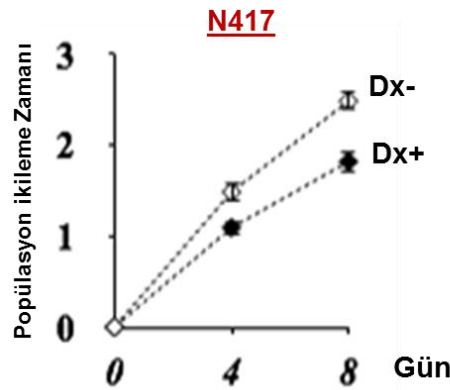
Şekil 4.26 H209 hücrelerinin hücre çoğalma analizi sonuçları

İndüklenebilir Myc ekspresyon vektörleri ile infekte edilmiş H345 hücrelerinde hücre çoğalma analizi Dox ile indüklemeyen 3 gün sonra hücrelerin sayımı yapılarak gerçekleştirildi. Hücre sayım işleminin ardından Dox ile indüklenmiş hücrelerde Myc ifadesindeki artışa bağlı olarak hücre sayısında belirgin şekilde bir artış saptanmıştır (Şekil 4.27).



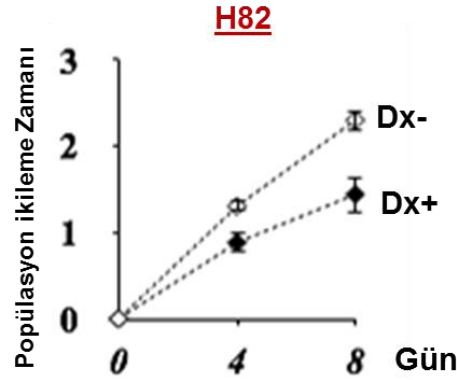
Şekil 4.27 H345 hücrelerinde Myc ifadesindeki değişime bağlı olarak hücre çoğalma hızındaki değişim

Klonladığımız vektörler aracılığıyla Myc ifadesi düşük seviyede olan H209 ve H345 hücrelerinde Myc ifadesindeki artışa bağlı olarak hücre çoğalma kinetiğinin de arttığı saptanmış oldu. Sonraki aşamada Myc amplifikasyonuna sahip olan H82 ve N417 hücre dizilerinde Myc ifadesinin klonladığımız shRNA vektörleri aracılığıyla baskılanmasının hücre çoğalma hızına olası etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu sebeple indüklenebilir Myc-shRNA vektörleri ile infekte edilmiş H82 ve N417 hücrelerinde hücre çoğalma analizi gerçekleştirildi. N417 hücrelerinin çoğalma analizi sonucunda Dox uygulanmasının ardından Myc ifadesindeki baskılamaya bağlı olarak popülasyon ikileme zamanında belirgin bir şekilde azalma saptandı (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 N417 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak hücre çoğalma hızındaki değişim

Myc amplifikasyonu taşıyan diğer bir hücre olan H82 hücrelerinde ise Dox ile muamelenin ardından değişen Myc ifadesi sebebiyle popülasyon ikileme zamanlarında bir azalış görüldü (Şekil 4.29).

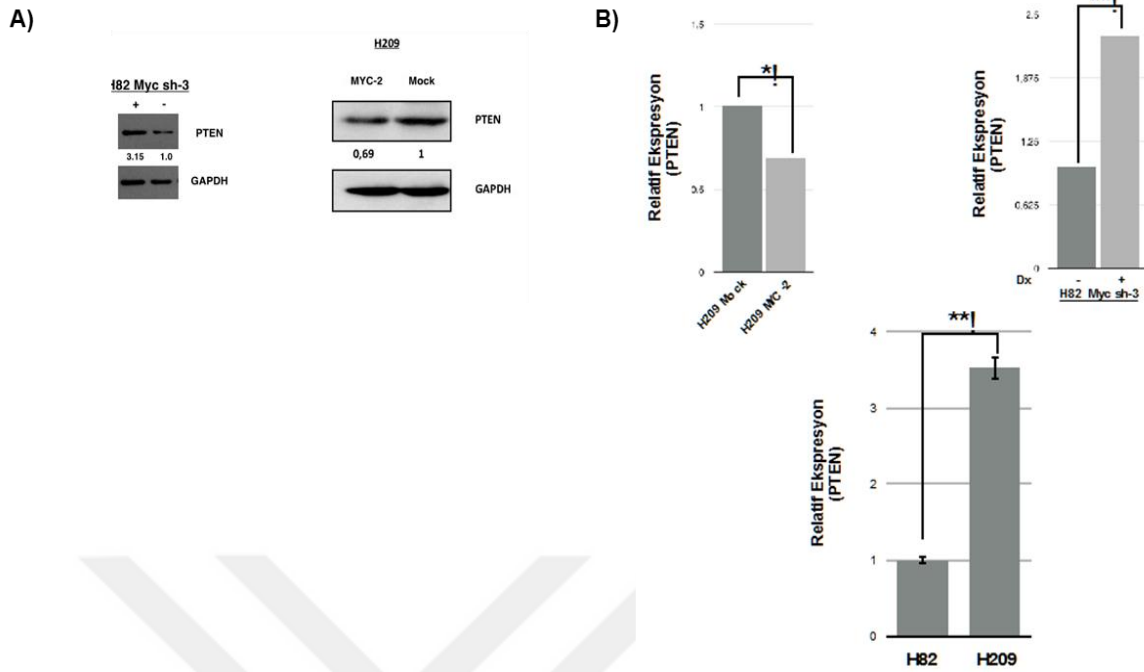


Şekil 4.29 H82 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak değişen hücre çoğalma hızındaki değişim

H82 ve N417 hücrelerinde yapılan hücre çoğalma analizleri sonucunda Myc ifadesindeki azalmaya bağlı olarak hücre çoğalma hızında bir azalma meydana geldiği görüldü. Bu durum da KHAK hücre dizilerinin çoğalma kinetiklerinin Myc ifadesine bağlı olabileceğini gösterdi.

4.10 KHAK hücrelerinde PTEN ifadesinin Myc Ekspresyonu Tarafından Belirlenmesi

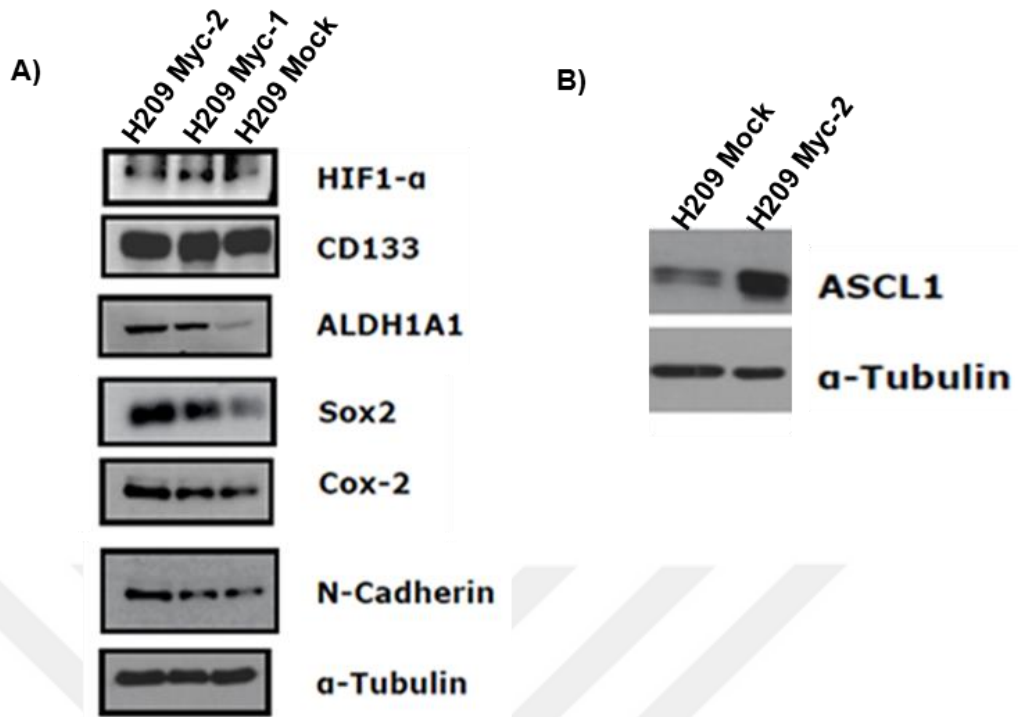
PTEN bilindiği üzere hücre çoğalma ve sağ kalımı açısından önemli bir yolak olan PI3K/AKT yolağının negatif düzenleyicisidir. Myc'in KHAK hücre dizilerinde hücre çoğalması üzerine olası etkisi önceki sonuçlarda gösterilmişti. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Myc'in hücre çoğalma ve sağ kalımı üzerinde rol oynayan yolak ve molekülleri düzenlemesi olasıdır. Bu sebeple kalıcı Myc ekspresyon vektörü ile infekte edilmiş H209 ve indüklenebilir Myc shRNA vektörü ile infekte edilmiş H82 hücrelerinde PTEN ifadesinin Myc ekspresyonundaki değişimden etkilenip etkilenmediğini araştırmak amacıyla gerçek zamanlı PZR ve western blot analizleri gerçekleştirildi. İndüklenebilir shRNA aracılığıyla Myc ifadesi baskılanmış H82 hücrelerinde PTEN ifadesi mRNA ve protein seviyesinde artmış iken Myc ifadesi arttırılmış olan H209 hücrelerinde PTEN ifadesi azalmış olduğu saptandı (Şekil 4.30).



Şekil 4.30 KHAK hücre dizilerinde PTEN ifadesi Myc ekspresyonuna bağlı olarak değişir A) H209 ve H82 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak PTEN ifadesinin protein seviyesinde değişimi B) Myc ifadesindeki değişime bağlı olarak PTEN ifadesinin mRNA düzeyinde değişimi

4.11 Sonradan Oluşturulan Myc ifadesinin Hücre Fenotipine Olası Etkisinin Western Blot Analizi ile Belirlenmesi

Kalıcı lentiviral Myc ekspresyon vektörü kullanılarak Myc ifadesi oluşturulan H209 hücrelerinde Myc ifadesindeki değişime bağlı olarak kök hücre fenotipi gibi çeşitli hücre özelliklerini belirleyen proteinlerin ifadelerindeki değişim western blot yöntemiyle analiz edildi. Bu analiz kapsamında HIF1- α , CD133, ALDH1A1, Sox-2, Cox-2, N-Kaderin ve ASCL1 proteinleri analiz edildi (Şekil 4.31a,b).



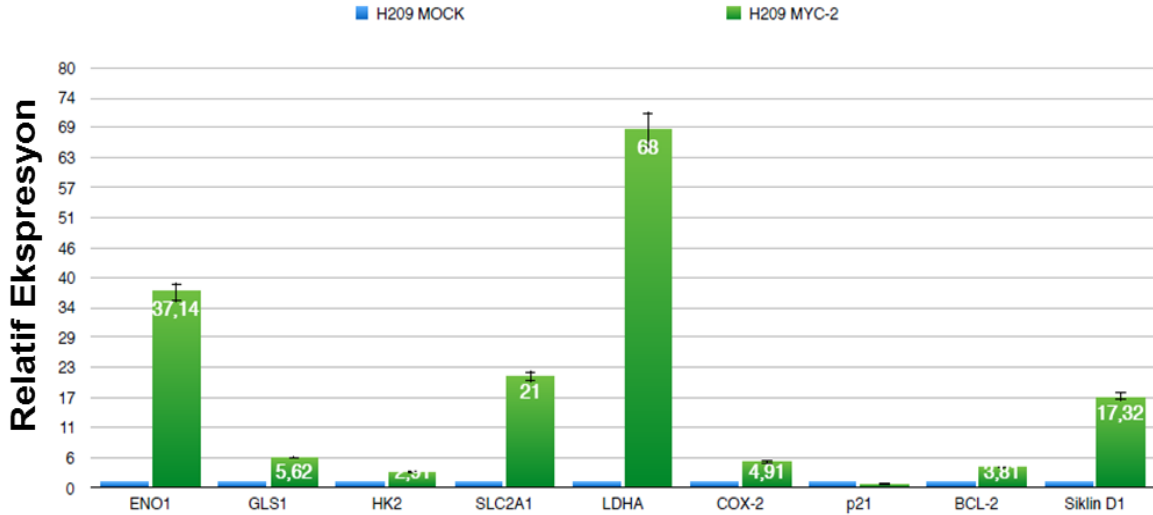
Şekil 4.31 Myc ifadesine bağımlı olarak değişen hücre fenotip markırları A) Kök hücre, metastaz, hücre metabolizması ile ilişkili markır proteinler B) Nöroendokrin akciğer hücresi markır protein analizi

Yapılan western blot analizi sonucunda Myc ifadesindeki artışa bağılı olarak CD133, ALDH1A1 ve Sox-2 gibi kök hücre markır protein ifadelerinin de artmış olduğu saptandı. Yine hücre metabolizması ve invazyon süreçlerinde rol oynayan HIF1- α , Cox-2 ve N-kaderin ifadelerinin de benzer şekilde arttığı gözlemlendi. Nöroendokrin hücre markırlarından biri olan ASCL1 ifadesinin de Myc ifadesindeki artışa bağılı olarak arttığı belirlendi.

4.12 Myc Tarafından İfadesi Düzenlenen Genlerin Realtime PCR Aracılığıyla Belirlenmesi

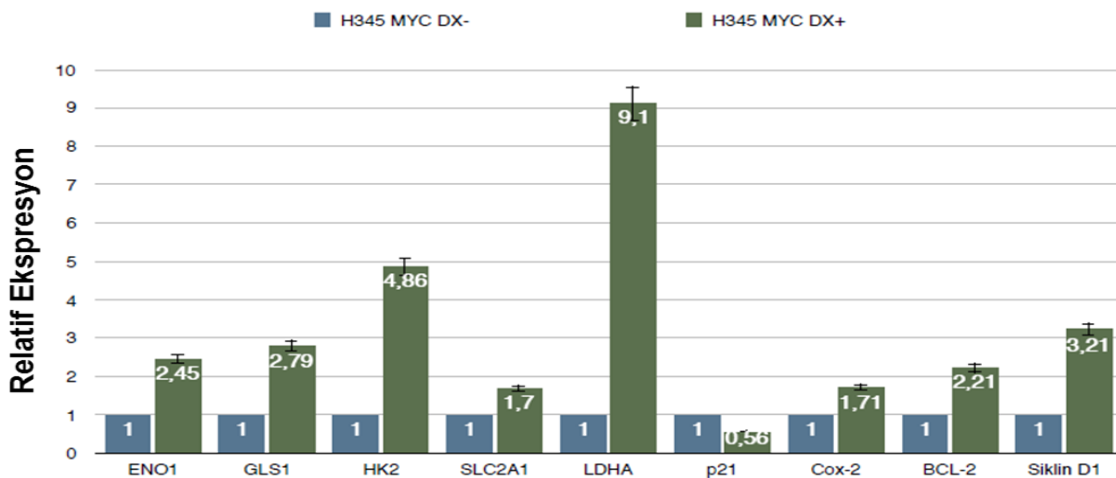
Bilindiği üzere Myc onkogeni önemli bir transkripsiyon faktörü olup DNA üzerinde E-kutusu adı verdiğimiz özel dizilere bağlanarak pek çok genin transkripsiyonunu düzenlemektedir. Myc transkripsiyon faktörü gen ifadesini hem aktivatör hem de inhibitör olarak düzenleyebilmektedir. Bu özelliklerinden ötürü Myc transkripsiyon faktörünün karsinogenez gibi önemli süreçlerde rol oynayan pek çok genin ifadesini düzenlemesi olasıdır. Bu sebeple tez çalışmamızda farklı kanser türlerinde Myc tarafından düzenlendiği ön görülen genlerin ifadelerini çalışma modelimizde analiz etmeyi amaçladık. Bu doğrultuda LDHA, GLS1, SLC2A1, HK2, Siklin Bağımlı Kinaz 6 (CDK6), Siklin D1, BCL2, Cox-2, p21 ve Eno1 gibi Myc'nin hedeflerini hücre örneklerimizde gerçek zamanlı PZR ile materyal metod

bölümünde bahsedildiği şekilde analiz ettik. Kalıcı Myc ekspresyon vektörü ile infekte edilmiş H209, indüklenebilir Myc ekspresyon vektörü ile infekte edilmiş H345 ve indüklenebilir Myc-shRNA vektörleri le infekte edilmiş H82 ve N417 hücrelerinde gerçek zamanlı PZR analizleri gerçekleştirildi. H209 hücrelerinde yapılan gerçek zamanlı PZR analizi sonuçlarına göre ENO1, GLS1, HK2, SLC2A1, Cox-2, LDHA, Siklin D1 ve Bcl-2 gibi genlerin ifadesi Myc artışına bağlı olarak istatistiksel olarak önemli seviyede artar iken hücre siklus inhibitörü olarak bilinen p21 ifadesi önemli seviyede azalmış olarak bulundu (Şekil 4.32).



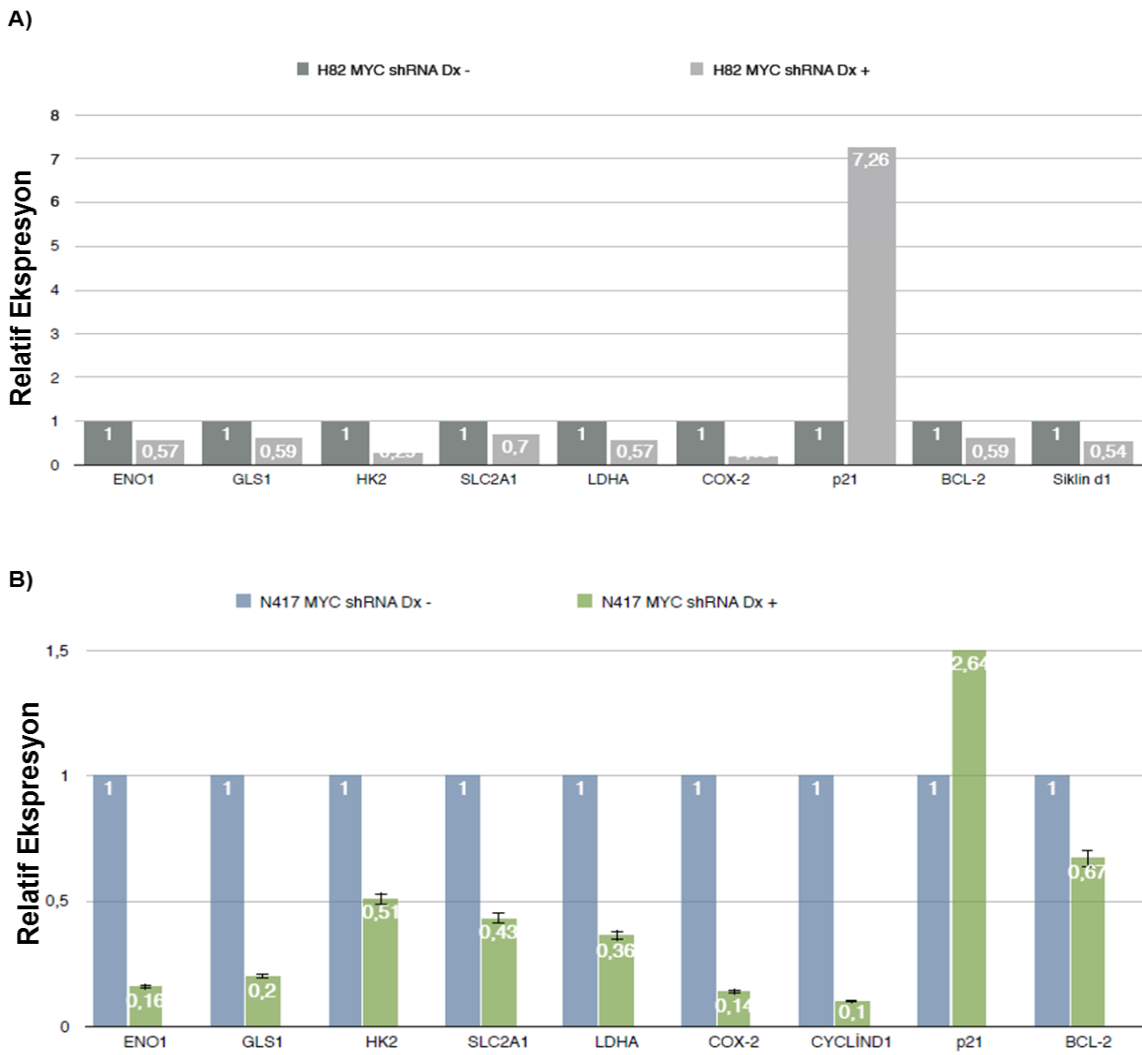
Şekil 4.32 H209 hücrelerinde Myc ifadesine bağımlı olarak değişen mRNA'lar

İndüklenebilir Myc ekspresyon vektörü ile infekte edilmiş H345 hücrelerinde H209 hücrelerinde olduğu gibi artan Myc ifadesine bağlı olarak ENO1, GLS1, HK2, SLC2A1, Cox-2, LDHA, Siklin D1 ve Bcl-2 gibi genlerin ifadesi istatistiksel olarak önemli seviyede artar iken hücre siklus inhibitörü olarak bilinen p21 ifadesi azalmış olarak bulunmuştur (Şekil 4.33).



Şekil 4.33 H345 hücrelerinde Myc ifadesi artışına bağlı olarak değişen mRNA'lar

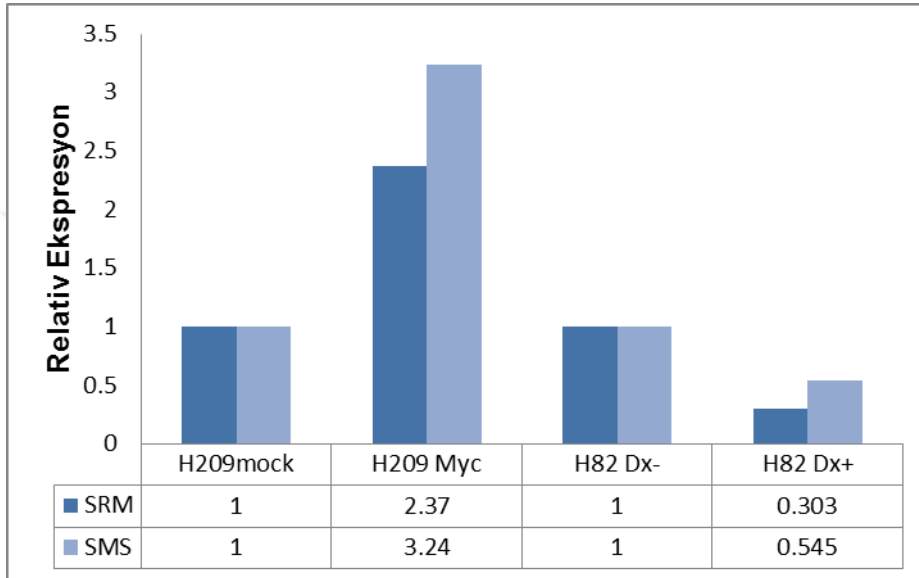
H209 ve H345 hücrelerinde oluşturulan aşırı Myc ifadesi modelinde Myc artışına bağlı olarak ifadesi azalan yada artan mRNA'lar belirlenmiş oldu. H82 ve N417 hücrelerinde ise bu modelin tersine indüklenebilir Myc-shRNA vektörleri aracılığıyla Myc baskılanması yoluyla H209 ve H345 hücrelerinde taranan mRNA'ların ifade değişimlerini analiz edilmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda Myc ifadesi shRNA vektörleri aracılığıyla baskılanan H82 ve N417 hücrelerinde LDHA, GLS1, SLC2A1, HK2, CDK6, Siklin D1, BCL2, Cox-2, p21 ve Eno1'in ifade değişimleri analiz edildi. Yapılan gerçek zamanlı PZR sonuçları doğrultusunda H82 ve N417 hücrelerinde ENO1, GLS1, HK2, SLC2A1, Cox-2, LDHA, Siklin D1 ve Bcl-2 gibi genlerin ifadesi istatistiksel olarak önemli seviyede azalmış iken hücre siklus inhibitörü olarak bilinen p21 ifadesinin artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.34 a,b).



Şekil 4.34 Myc ifadesinin baskılanmasına bağlı olarak ifadesi değişen mRNA'lar A) H82 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen mRNA'lar B) N417 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen mRNA'lar

Myc ifadesi değişimine bağlı olarak metabolizma, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynayan genlerin ifadesindeki değişimler belirlendikten

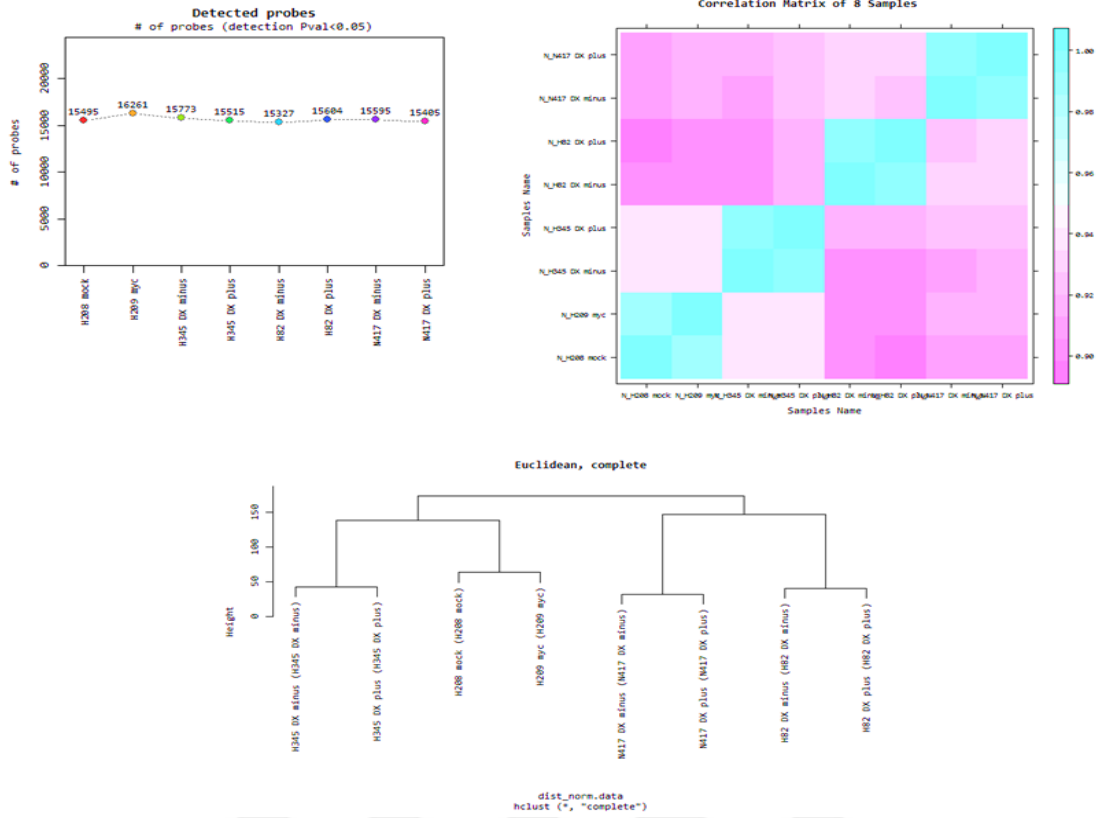
sonra literatürde son zamanlarda kanser gelişim süreçlerinde önemli bir rol oynadığı düşünülen poliamin metabolizmasında ki olası değişimleri hücre örneklerimizde araştırdık. Çalışmamızda kullandığımız H209 ve H82 hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinde spermidin sentaz (SRM) ve spermin sentaz genleri gerçek zamanlı PZR yöntemiyle analiz edildi. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde H209 hücrelerinde Myc ifade artışına bağlı olarak SRM ve Spermin Sentaz (SMS) genlerinin ifadeleri artarken Myc ifadesi baskılanmış olan H82 hücrelerinde ise SRM ve SMS genlerinin ifadelerinin azalmış olduğu saptandı (4.35).



Şekil 4.35 H82 ve H209 hücrelerinde değişen SRM ve SMS düzeyleri

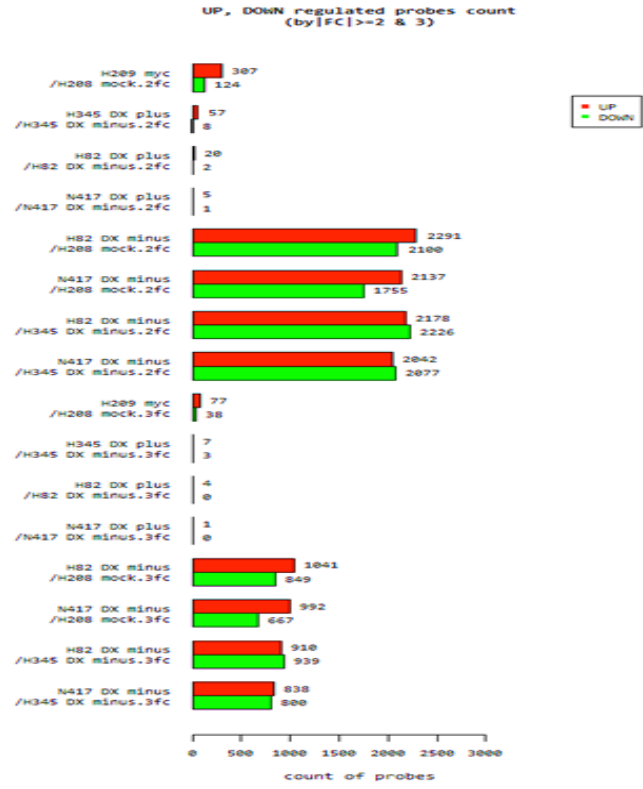
4.13 KHAK hücre dizilerinde Myc transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenen mRNA ekspresyonunun mikrodizin yöntemi ile belirlenmesi

Transkripsiyon faktörleri gibi önemli transkripsiyonel düzenleyiciler tarafından ifadesi düzenlenen mRNA'ların tanımlanması için mikrodizin temelli anlatım analizleri ideal bir tekniktir. İstenilen örnekte binlerce mRNA'nın ifadesinin bakılabilmesine imkan sağlayan bir yöntemdir. Bu özellikleri nedeniyle gerçek zamanlı PZR ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda örneklerde detaylı bir mRNA taraması yapabilmek için Macrogen şirketinden Illumina HT-12 v4 human mRNA mikrodizin yöntemi için hizmet alımı yapılmıştır. Mikrodizin sonuçları doğrultusunda her bir örnek için saptanan prob sayısı örnekler arasındaki korelasyon verileri gösterilmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36 Mikrodizin analizi sonucunda her bir örnekte belirlenen prob sayısı ve örnekler arasındaki korelasyon

Mikrodizin sonuçları sistemin filtreleme kriterleri doğrultusunda analiz edildiğinde H209myc/H209, H345Dx+/H345Dx, H82Dx+/H82Dx- ve N417Dx+/N417Dx- kıyaslamaları sonucu Myc ifadesine bağımlı olarak değişen mRNA sayıları Şekil 4.37'te gösterilmiştir.



Şekil 4.37 Örnekler arasında ifadesi artan ve azalan mRNA prob sayıları

mRNA mikrodizin sonuçlarına göre her kıyaslama grubunda Myc ifadesine bağımlı olarak değişen pek çok gen bulunmuştur. Mikrodizin sonucunda belirlenen mRNA'lar biyoinformatik olarak analiz edildiğinde pek çoğunun promotör bölgesinde Myc bağlanma sekansı olan E-kutusu bulunmuştur. Detaylı biyoinformatik ve genlerin fonksiyon analizleri ile birlikte sonuçlar filtrelendiğinde Tablo 4.2' de verilen genlerin ifadeleri Myc artışına bağılı olarak azalmış olarak bulunmuştur.

Tablo 4.2 Myc ifadesi artışına bağlı olarak mikrodizin sonuçlarında ifadesi azalan mRNA'lar

GEN ADI	Myc Artışına Bağlı Olarak Değişimi	Fonksiyon
<i>KLF2</i>	↓	Tümör Baskılayıcı
<i>Sox21</i>	↓	Tümör Baskılayıcı
<i>ADCY1</i>	↓	Metabolizma
<i>BASP1</i>	↓	Tümör Baskılayıcı
<i>MT1G</i>	↓	Tümör Baskılayıcı
<i>AGPAT4</i>	↓	Metabolizma
<i>DDIT4</i>	↓	Tümör Baskılayıcı
<i>ARHGEF10</i>	↓	Mitotik iğ oluşumu
<i>PHLDA1</i>	↓	Tümör Baskılayıcı
<i>CDO1</i>	↓	Metabolizma
<i>CBX1</i>	↓	Gen Susturma
<i>GALNT9</i>	↓	Metabolizma
<i>KCNA1</i>	↓	Hücrel Senesens
<i>MT1F</i>	↓	Tümör Baskılayıcı
<i>IRX2</i>	↓	Tümör Baskılayıcı

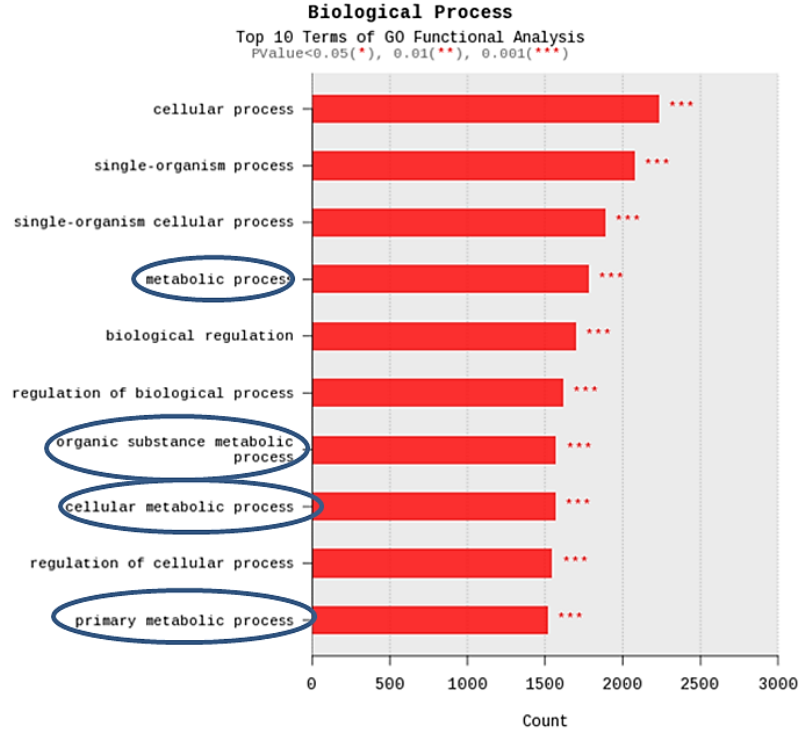
Myc ifadesindeki artışa bağlı olarak ifadesi azalan mRNA'ların dışında mikrodizin sonuçlarımızda yapılan biyoinformatik analizler doğrultusunda Myc ifadesindeki artışa bağlı olarak ifadelerinde artış saptanmış olan pek çok mRNA bulunmuştur. mRNA mikrodizin analizleri sonucunda ifadesi artmış olarak bulunan mRNA'lar Tablo 4.3' te gösterilmiştir.

Tablo 4.3 Myc ifadesi artışına bağlı olarak mikrodizin sonuçlarında ifadesi artan mRNA'lar

GEN ADI	Myc Artışına Bağlı Olarak Değişimi	Fonksiyon
<i>SLC6A15</i>	↑	Metabolizma
<i>CDK6</i>	↑	Hücre Döngüsü
<i>NELL2</i>	↑	Hücre Sağ Kalımı
<i>SLC2A43</i>	↑	Metabolizma
<i>GLRB</i>	↑	İyon Kanalı
<i>ENO1</i>	↑	Metabolizma
<i>GLDC</i>	↑	Metabolizma
<i>KCNS3</i>	↑	Potasyum Kanal
<i>RASEF</i>	↑	Hücre Çoğalması
<i>NPW</i>	↑	Nöropeptit
<i>NMNAT2</i>	↑	Metabolizma
<i>PLTP</i>	↑	Metabolizma
<i>NF1A</i>	↑	Transkripsiyon
<i>ABCC4</i>	↑	İlaç Dirençliliği
<i>SMAD6</i>	↑	Kötü Prognoz
<i>HK2</i>	↑	Metabolizma
<i>PLD6</i>	↑	Metabolizma
<i>Siklin D1</i>	↑	Hücre Döngüsü
<i>LDHA</i>	↑	Metabolizma

4.14 mRNA mikrodizin sonuçlarının Gen Ontoloji (GO) analizi

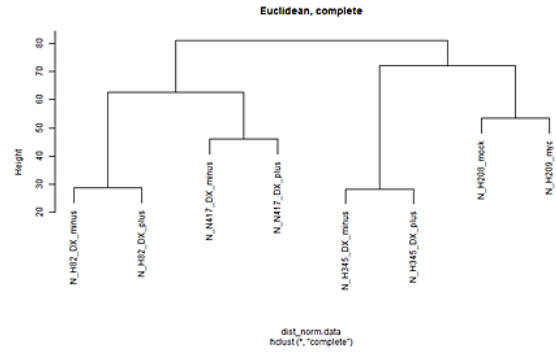
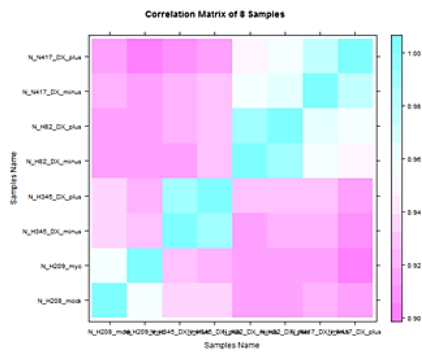
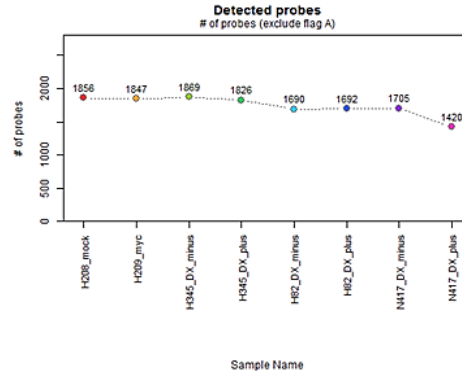
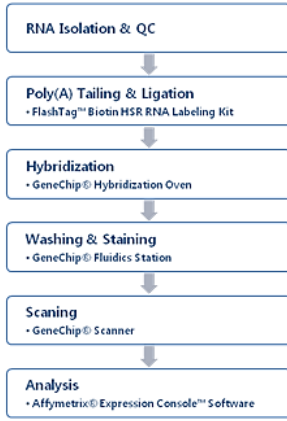
Myc ifadesi tasarladığımız vektörler aracılığıyla düzenlenen KHAK hücrelerinde gerçekleştirilen mRNA mikrodizin analizi sonucunda elde edilen veriler Gen ontoloji analizi ile detaylı olarak incelendiğinde saptanmış olan genlerin özellikle hücresel metabolik süreçte rol oynayan genlerden oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38 mRNA mikrodizin sonuçlarının GO analiz sonuçları

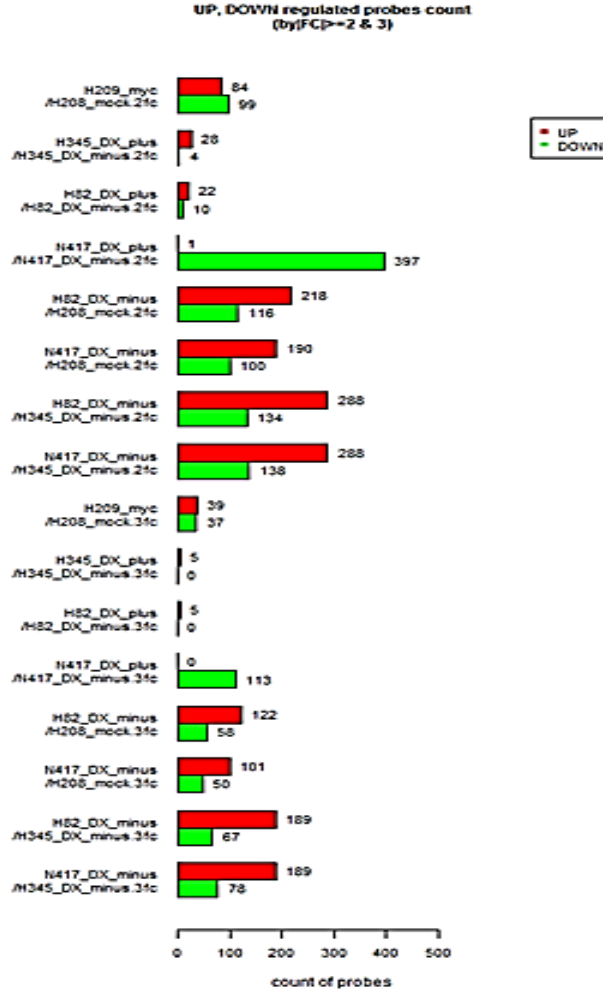
4.15 Myc transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenen miRNA ekspresyonunun mikrodizin yöntemi ile belirlenmesi

Proje kapsamında planlanan hedeflerden bir diğeri ise Myc tarafından ifadesi düzenlenen miRNA'ların saptanması ve bu miRNA'ların olası hedeflerinin analizi aşamasıydı. Bu sebeple Myc ifadesini klonladığımız vektörlerle düzenlediğimiz KHAK hücre dizilerinden total RNA izolasyonu yapıldı ve örnekler Affymetrix miRNA mikrodizin analizi için Macrogen firmasına gönderildi. Mikrodizin sonuçları doğrultusunda her bir örnek için saptanan prob sayısı örnekler arasındaki korelasyon verileri Şekil 4.39' te gösterilmiştir.



Şekil 4.39 miRNA mikrodizin analizi sonucunda her bir örnekte belirlenen prob sayısı ve örnekler arasındaki korelasyon

Mikrodizin sonuçları detaylı analiz edildiğinde her bir miRNA için sistemde 9 adet prob bulunmaktadır. Sistem elde edilen sonuçların anlamlılık düzeyini arttırmak için en az 4 prob ve üzerini okuyan genler kabul edilmiştir. Bu kriter doğrultusunda H209myc/H209, H345Dx+/H345Dx-, H82Dx+/H82Dx- ve N417Dx+/N417Dx- kıyaslamaları sonucu Myc ifadesine bağımlı olarak değişen miRNA sayıları Şekil 4.40' da gösterilmiştir.



Şekil 4.40 Örnekler arasında ifadesi artan ve azalan miRNA prob sayıları

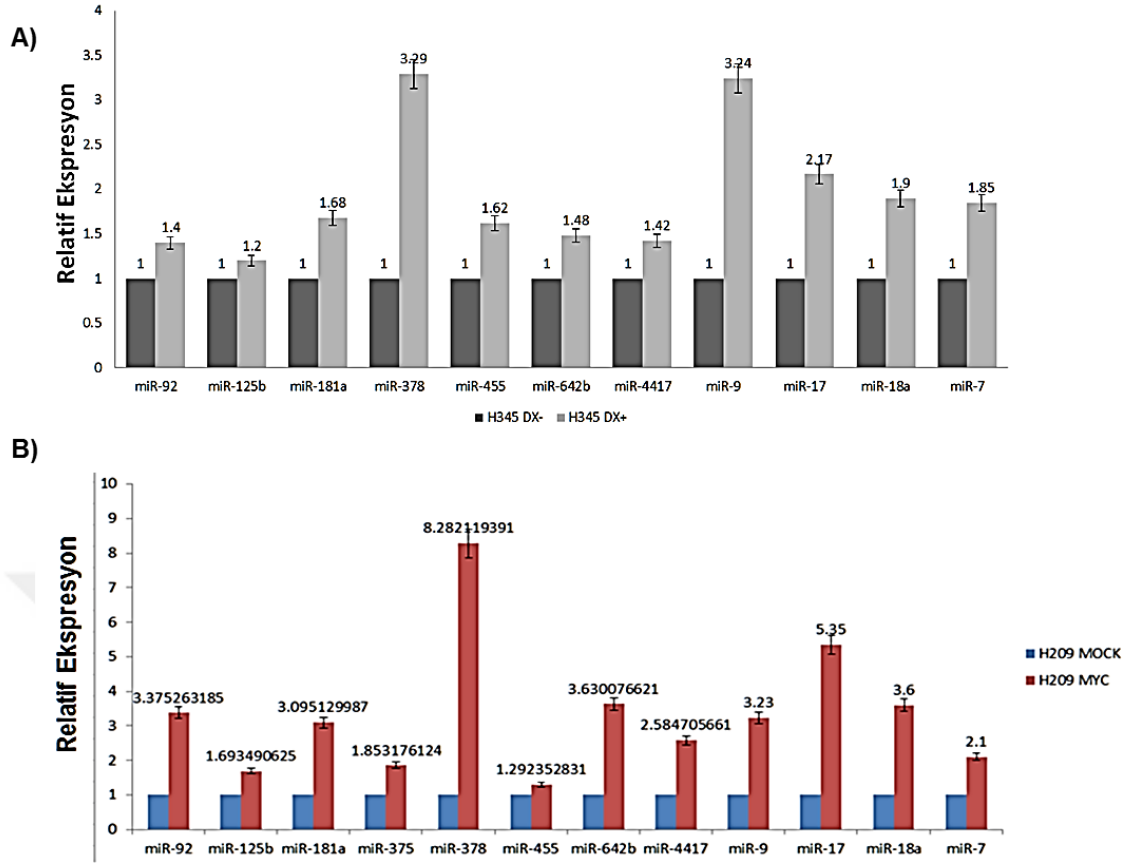
Mikrodizin sonuçları analiz edildiğinde Myc ifadesine bağımlı olarak değişen çok sayıda miRNA saptanmıştır. Mikrodizin sonucunda bulunan genlerin promotor bölgelerinde Myc bağlanma bölgesi olan E-Box (CACGTG) sekansı taranarak bu genlerin Myc tarafından transkripsiyonel düzeyde regüle edilip edilmediği biyoinformatik analizler ile araştırıldı. Mikrodizin sonucu belirlenen miRNA'lardan miR-9, miR-7, miR-17-92 ailesi üyeleri, miR-181 ve miR-378'nin promotorlarında Myc bağlanma sekansı olan E-Box dizisi saptanmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 miRNA mikrodizin sonuçlarına göre Myc tarafından pozitif yönde düzenlenen miRNA'lar

miRNA	Myc İfadesine Bağlı Olarak Değişim
<i>miR-4417</i>	↑
<i>miR-181a</i>	↑
<i>miR-378a</i>	↑
<i>miR-3687</i>	↑
<i>miR-6723</i>	↑
<i>miR-9</i>	↑
<i>miR-7</i>	↑
<i>miR-551b</i>	↑
<i>miR-18a</i>	↑
<i>miR-642a</i>	↑
<i>miR-181c</i>	↑
<i>miR-125b-2</i>	↑
<i>miR-18b</i>	↑
<i>miR-7152</i>	↑
<i>miR-455</i>	↑
<i>miR-17</i>	↑
<i>miR-92a</i>	↑

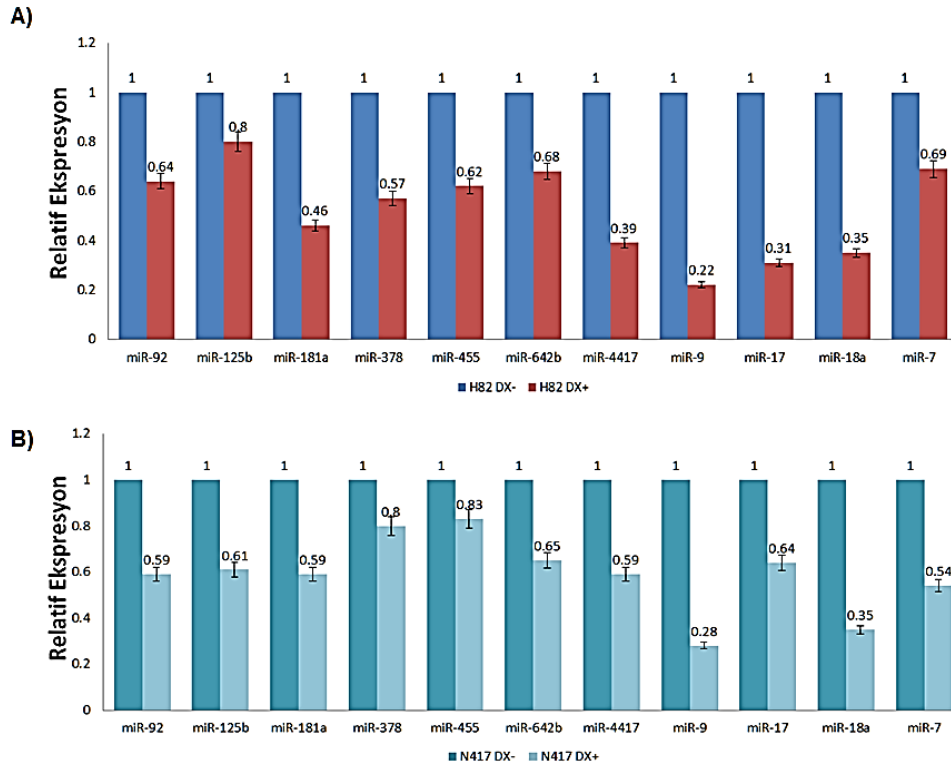
4.16 miRNA Mikrodizin Analizi Sonucunda Belirlenen miRNA'ların Gerçek Zamanlı PZR aracılığıyla teyit edilmesi

miRNA mikrodizin analizi sonucunda belirlemiş olduğumuz bazı miRNA'ların ifade değişimleri Qiagen firmasından temin edilen primerler aracılığıyla gerçek zamanlı PZR yöntemi ile teyit edildi. H209, H345, H82 ve N417 hücrelerinden izole edilen miRNA örneklerinde miR-7, miR-9, miR-17, miR-18a, miR-92a, miR-125b, miR-181a, miR-375, miR-378, miR-455, miR642b ve miR-4417'nin ifade değişimleri analiz edildi. Myc ifadesi lentiviral vektörler aracılığıyla artırılan H345 ve H209 hücrelerinde analiz edilen miRNA'ların ifadeleri anlamlı seviyede artmış olduğu bulundu (Şekil 4.41a,b).



Şekil 4.41 Myc ifadesinin artmasına bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'lar A) H345 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen miRNA'lar B) H209 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen miRNA'lar

Myc ifadesi artışına bağlı olarak ifadesi artan miRNA'ları çalışma modelimizde Myc ifadesi baskılanmış olan H82 ve N417 hücrelerinde teyit etmeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda H82 ve N417 hücrelerinde Myc ifadesi azalışına bağlı olarak miR-7, miR-9, miR-17, miR-18a, miR-92a, miR-125b, miR-181a, miR-375, miR-378, miR-455, miR642b ve miR-4417 analiz edildiğinde tüm analiz edilen mikroRNA'ların Myc baskılanmasına bağlı olarak ifadelerinde önemli bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.42a,b).

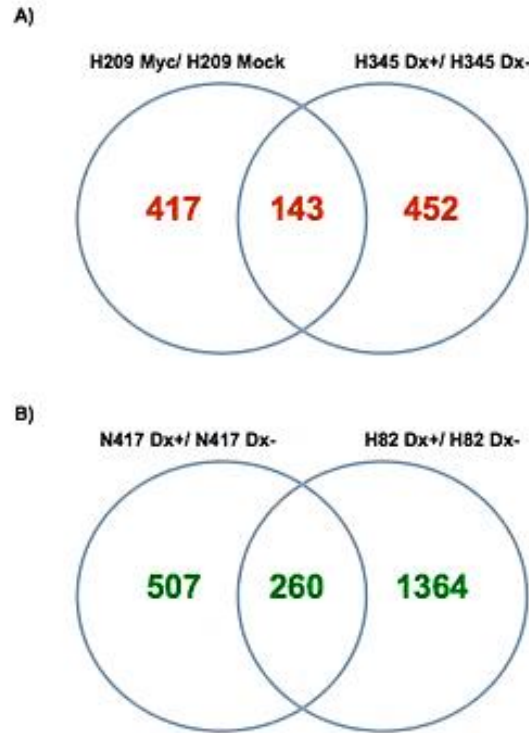


Şekil 4.42 Myc ifadesinin azalmasına bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'lar A) H82 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen miRNA'lar B) N417 hücrelerinde Myc baskılanması sonucu ifadesi değişen miRNA'lar

4.17 KHAK Hücre Dizilerinde Myc İfadesine Bağlı Olarak Değişen Hücresel Metabolizmanın Q-TOF LC-MS Yöntemi ile Belirlenmesi

Proje kapsamında yapılan gerçek zamanlı PZR ve mikrodizin analizleri sonucunda KHAK hücrelerinde çeşitli metabolik süreçlerde rol oynayan pek çok genin ifadesinin Myc tarafından doğrudan yada miRNA'lar aracılığıyla dolaylı olarak düzenlendiği gösterildi. Sonraki aşamada Myc tarafından düzenlenen KHAK hücre metabolizmasını analiz etmek için Q-TOF LC-MS LC-MS analizi ile metabolit tayini Hacettepe Üniversitesi HUNİKAL'de yapıldı. LC-MS analizinde H209-Myc/H209 Mock, H345 Dx+/H345 Dx-, N417 Dx+/N417 Dx- ve H82 Dx+/H82 Dx- hücre kıyaslamaları sonucunda miktarları kat değişimi şeklinde belirtilen maddeler saptandı. LC-MS sonucu elde edilen veriler Metlin gibi veritabanlarında detaylı olarak analiz edildi ve kıyaslamalar sonucunda Myc ifadesine bağlı olarak H209 ve H345 hücrelerinde miktarları artan H82 ve N417 hücrelerinde ise azalan metabolitler saptandı. LC-MS analizi sonucunda H209 Myc/H209 Mock karşılaştırması sonucu 560 adet metabolit saptanmış iken H345 Dx+/Dx- karşılaştırması sonucu 595 adet, H82 Dx+/Dx- karşılaştırmasında 1624 ve N417 Dx+/Dx- karşılaştırmasında ise 767 adet metabolit cihaz tarafından saptandı. Myc aşırı ekspresyonu oluşturulan H209 ve H345 hücrelerinde saptanan

metabolitlerden 143 adeti her iki hücre grubunda da görüldü. (Şekil 43a). Myc ifadesi baskılanan H82 ve N417 hücrelerinde saptanan metabolitlerden 260 adeti ise her iki hücre grubunda da görüldü (Şekil 4.43b).



Şekil 4.43 Hücre gruplarında Myc ifadesi değişimine bağlı olarak saptanan metabolit sayıları A) Myc ifadesi artırılan hücrelerde saptanan metabolit sayıları B) Myc ifadesi baskılanan hücrelerde saptanan metabolit sayıları

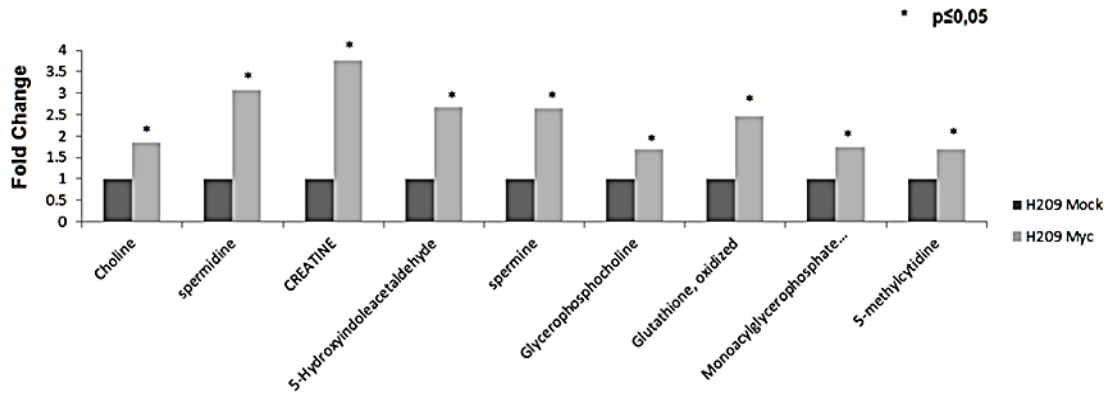
Karşılaştırılan hücre gruplarında Myc ifadesine bağlı olarak değişen metabolitlerin sayıları Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5 Gruplar arasında Myc ifadesine bağlı olarak değişen metabolit sayıları

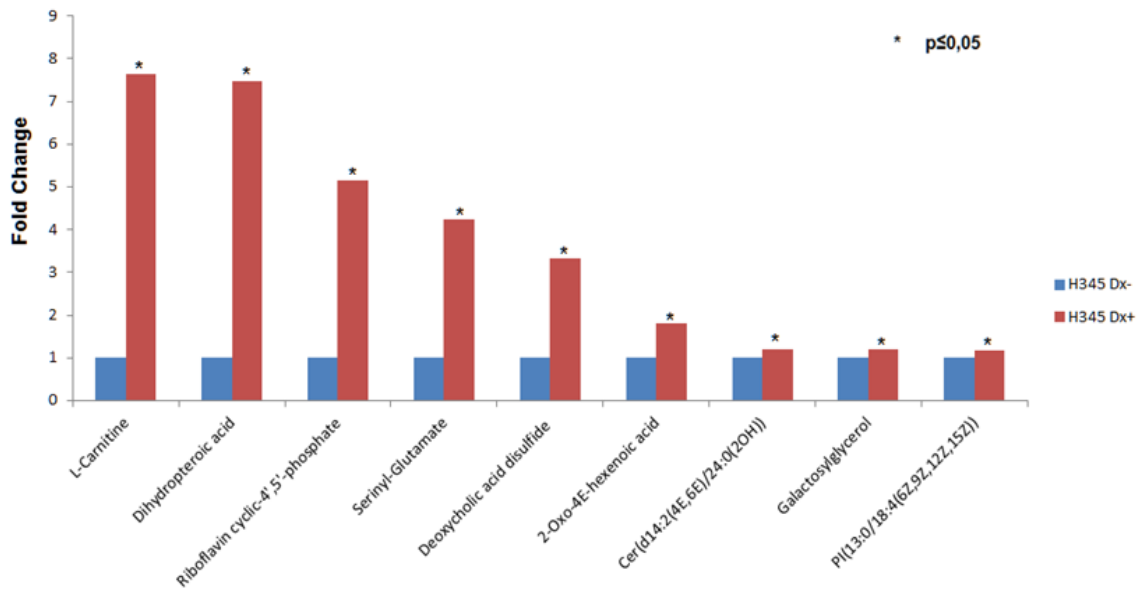
	H209 Myc/ H209 Mock	H345 Dx+/ H345 Dx-	N417 Dx+/ N417 Dx-	H82 Dx+/ H82 Dx-
↑	323	343	564	842
↓	241	253	128	716

Ekspresyon ve shRNA vektörleri aracılığıyla Myc ifadesi düzenlenen KHAK hücrelerinde saptanan metabolitler Human Metabolome Database de detaylı olarak analiz edildiğinde sonradan Myc ifadesi oluşturulan H209 ve H345 hücrelerinde 9 ar adet

metabolitin miktarının istatistiksel olarak Myc ifadesine bağımlı olarak arttığı saptandı (Şekil 4.44, 45).

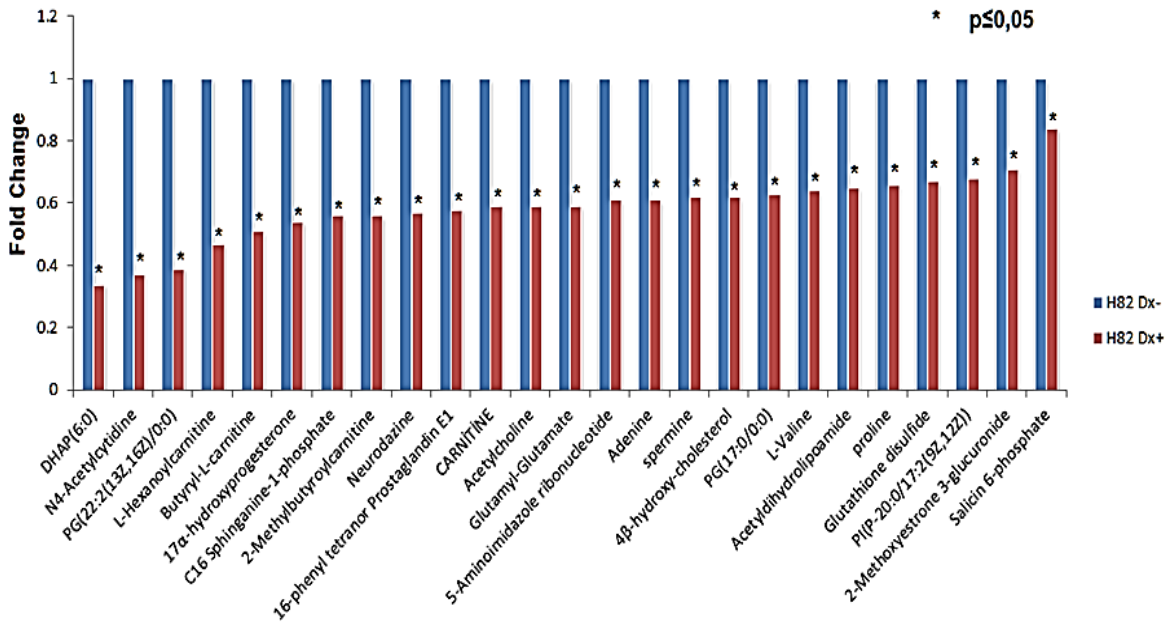


Şekil 4.44 H209 hücrelerinde Myc ifadesine bağımlı olarak miktarı artan metabolitler

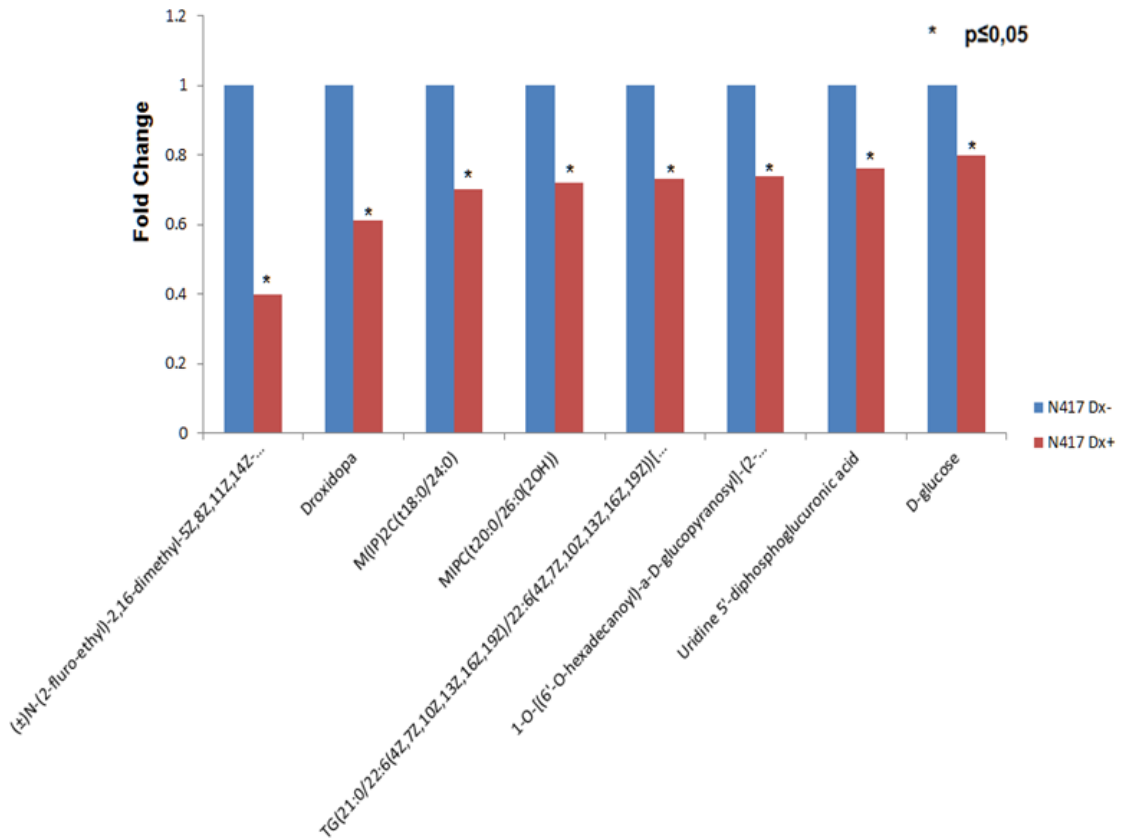


Şekil 4.45 H209 hücrelerinde Myc ifadesine bağımlı olarak miktarı artan metabolitler

İndüklenebilir shRNA vektörleri aracılığıyla Myc ifadesi baskılanmış H82 ve N417 hücrelerinde ise sırasıyla 25 ve 8 adet metabolitin miktarının istatistiksel olarak Myc ifadesine bağımlı olarak azaldığı saptandı (Şekil 4.46,47).



Şekil 4.46 H82 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak miktarı azalan metabolitler



Şekil 4.47 N417 hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak miktarı azalan metabolitler

Elde ettiğimiz veriler KHAK hücrelerinde Myc ifadesine bağlı olarak değişen hücresel metabolizmaya bağlı olarak bazı metabolitlerin miktarlarındaki değişimleri göstermiştir. Lipit metabolizması, glutamin metabolizması, glukoz metabolizması, poliamin metabolizması ve fosfokolin metabolizması gibi önemli hücresel süreçlerin Myc ifadesine bağımlı olarak düzenlendiği gösterilmiştir.



5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, kanser nedenli ölümler arasında ilk sırada yer alıp her iki cinsiyette de görülme sıklığı açısından ikinci sırada yer almaktadır. Akciğer kanserleri incelendiğinde erkeklerde kadınlara oranla görülme sıklığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Örneğin erkeklerde görülme oranı kadınlara göre kıyaslandığında Fransa ve Almanya'da 3/1, İtalya ve İspanya'da 5/1, Amerika'da ise 1.1/1 oranında olduğu saptanmıştır.

KHAK, akciğer kanseri alt histolojik tiplerinden biri olup yaklaşık olarak %15'ni oluşturmaktadır. KHAK, öncül nöroendokrin hücrelerinden köken almış agresif ve erken metastazla karakterizedir (Luna ve Espinosa 2016). İyonize radyasyon ve sitotoksik terapiye ilk aşamada hassasiyet gösterse bile ilerleyen aşamada geleneksel tedavi stratejilerine karşı direnç geliştirmektedir. KHAK gelişiminde en önemli faktörlerden birisi sigara kullanımınıdır ve KHAK olgularının yaklaşık %95' nin sigara öyküsüne sahip olduğu bilinmektedir (Pesch vd 2012). Sigara kullanımının bırakılması, KHAK insidansını azaltmanın yanı sıra sağ kalım süresinin uzaltılmasında önemli bir rolü vardır. KHAK olguları sınırlı ve yaygın hastalık olarak iki sınıf altında sınıflandırılmaktadır (Kalemkerian vd 2013). Sınırlı KHAK sahip olgular kombine kemoterapi (sisplatin, karboplatin, etoposid) ve iyonize radyasyon ile tedavi edilmektedir ve bu olguların ortalama yaşam süreleri 16-24 ayaralığındadır. Yaygın KHAK olguları ise kemoterapiye karşı oluşan direnç sebebiyle ortalama sağ kalım süresi 7-12 ay olmaktadır (Joshi vd 2013).

KHAK tanısı konan hastaların çoğu ileri evre olmaları sebebiyle genetik analizler için yeterli sayıda uygun materyal bulmak zor olmaktadır. Fakat son yıllarda erken evrede tanısı konan hastaların fazlalığı sayesinde elde edilen materyaller KHAK'lerinde kapsamlı genetik analizlerin yapılmasına imkan sağlamıştır. KHAK'lerinde ilk olarak yapılan karyotip çalışmaları sonucunda pek çok genin kopya sayısında değişim saptanmıştır (Miura vd 1992).

Dizin CGH (Karşılaştırmalık genomik hibridizasyon) ve allel tipleme çalışmaları sonucunda da pek çok genin kaybı yada kazanımı ile potansiyel hedef moleküller belirlenmiştir (Naylor vd 1987, Balsara ve Testa 2002). Yapılan çalışmalar sonucunda *p53* gibi tümör baskılayıcı genleri içeren kromozom 3p, 5q, 13q ve 17p bölgelerinin kayıp olduğu belirlenmiştir. Yine yapılan CGH çalışmaları ışığında pek çok KHAK olgusunda *MYC* ve *KRAS* gibi önemli onkogenleri içeren kromozom 1p, 2p, 3q, 5p, 8q ve 19p bölgelerinde kopya sayısında bir artış saptanmıştır (D'angelo ve Pietanza 2010). Elde edilen veriler ışığında günümüzde de KHAK'lerinin diğer kanser türlerine kıyasla yüksek bir mutasyon oranına sahip olduğu bilinmektedir. Bu durumda KHAK'lerinin diğer akciğer kanseri alt türlerine kıyasla daha agresif bir özelliğe sahip olması ile yorumlanabilir. Özellikle kromozom 3p21 bölgesinde gözlenen kayıp sonucu Ras ilişkili Domain Aile Üyesi 1 (*RASSF1A*), *FUS1*, *SEMA3B* ve *SEMA3F* gibi önemli tümör baskılayıcı genlerin kayıpları KHAK olgularında gözlenmektedir. Tümör baskılayıcı genlerde gözlenen genetik değişimler arasında yaklaşık %90 oranında gözlenen *TP53* ve *RB1* ifade kayıpları en önemli değişimlerdir. *p53* ve *RB1* ifade kayıpları KHAK olgularında genomik instabilite ve kontrolsüz hücre çoğalması ile sonuçlanmaktadır.

KHAK olgularında tümör baskılayıcı genlerde gözlenen genetik değişimlerin dışında pek çok önemli onkogenin ifadesinde de değişim saptanmıştır (Semenova vd 2015). *Myc* ailesi üyeleri, *JAK2*, *BCL2*, *FGFR1* ve *IRS2* amplifikasyonları ile *Siklin D1*, *kromogranin A*, gastrin salıcı peptit (*GRP*), Delta Benzer Homolog 1 (*DLK1*), *ASCL1*, *c-Kit*, *c-Met*, *IGFR* ve *VEGF* gibi genlerin aşırı ifadeleri belirlenmiştir (George vd 2016).

Myc ailesi üyesi gen amplifikasyonları KHAK olgularının yaklaşık %20'sinde gözlenmektedir. *Myc*, önemli bir transkripsiyon faktörü olup DNA üzerinde yer alan E-kutusu adı verilen dizilere bağlanarak transkripsiyon sürecinde hem aktivatör hem de baskılayıcı olarak rol oynayabilmektedir. Bu özellikleri sebebiyle *Myc* onkogeni farklı kanser türlerinde önemli bir hedef molekül olarak çalışılmıştır (Byers ve Rudin 2015). Son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında *Myc* tarafından ifadesi düzenlenen pek çok gen tanımlanmıştır (Levens 2002). *Myc* tarafından ifadesi düzenlenen bu genler hücre proliferasyonu, farklılaşma, transkripsiyon, apoptozis ve hücre metabolizması gibi önemli hücresel süreçlerde önemli rol oynamaktadırlar. Erken embriyonik gelişim sürecinde önemli rol oynayan *Myc* transkripsiyon faktörü farklı kanser türlerinde aşırı ifadesi sonucunda karsinogenez sürecinde önemli bir rol almaktadır. Farklı kanser türlerinde *Myc* onkogeni ifadesinin nasıl değiştiğini saptamaya yönelik yapılan çalışmalar sonucunda Burkitt lenfomada genomik translokasyonu gözlenir iken nöroblastom, kolorektal ve akciğer kanserlerinde ise aşırı ekspresyonu tanımlanmıştır. Aşırı ekspresyonu yada amplifikasyonu gözlenen *Myc* onkogeninin karsinogenez sürecinde nasıl rol oynadığını göstermeye yönelik yapılan çalışmalar doğrultusunda hücre döngüsünü indüklemesi, hücre ölüm yollarını yönetmesi, hücre çoğalma ve metabolizma süreçlerini

düzenlemesi, genomik instabiliteye sebep olması ve tümör çevresine etkisi özellikleri aracılığıyla gerçekleştirdiğini göstermiştir (Amati vd 1998, Zeller vd 2006, Chang vd 2008, Fagnocci vd 2017). Tez çalışmamızda Myc ifadesinin KHAK hücre dizilerinde hücre çoğalması ve metabolizma gibi hücreysel biyolojik süreçlerdeki olası rollerini araştırmak amacıyla kendi Myc ekspresyon ve shRNA vektörlerimizi tasarladık. Tasarladığımız vektör sistemleri genoma entegrasyon ve uzun süreli ifade sağlayabilme özellikleri nedeniyle lentiviral bazlı vektörlerdir. Myc ifade değişimlerinin KHAK hücre dizilerinde olası etki mekanizmalarını araştırmak amacıyla sürekli ifade eden ve doksisisiklin indüklemesiyle çalışan Myc ekspresyon sistemlerimizi oluşturduk (Tokgun vd 2017). Myc gibi transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerini belirleyebilmek amacıyla son yıllarda doksisisiklin indüklenebilir vektör sistemleri kullanılmaya başlanmıştır (Matsushita vd 2013). İndüklenebilir vektör sistemlerinin en önemli avantajı zaman bağımlı olarak ifadesi değişen genleri tanımlayabilmektir. Bu sebeple tez çalışmamızda Myc ekspresyon ve shRNA vektör sistemleri indüklenebilir özellikte vektör sistemleri olup tasarlanan vektör sistemlerinin etkinlikleri western blot ve gerçek zamanlı PZR yöntemleri ile teyit edilmiştir.

MYC onkogeni karsinogenez sürecinde sadece tek başına rol almayıp diğer onkogenik olay veya faktörler ile ilişki kurmaktadır (Murray vd 1983, Welm vd 2005, Clegg vd 2011). Örneğin Myc tarafından hücre siklusu düzenlenmesi aşamasında *BCL2* aşırı ifadesi, *p53* yada *p19ARF* ifade kaybı eşlik edebilmektedir (Green 1997, Schmitt ve Lowe 2001).

Myc tarafından hücre siklusunun düzenlenmesi aşamasında gözlenen en belirgin durum G1 ve G2 aşamalarının kısalıp hücrelerin hızlıca S ve M fazlarına girmesidir. Bu durumun en önemli sebepleri ise *siklin D1, D2, E1, A2*'nin yanı sıra *CDK4, CDC25A, E2* Transkripsiyon Faktör 1 (*E2F1*) ve *E2F2*'nin Myc transkripsiyon faktörü tarafından doğrudan aktifleştirilmesidir. Öte yandan Myc *GADD45, GADD153* ve *p21* ile *p15* gibi CDK inhibitör genlerini indirekt olarak düzenleyerek te sağlayabilmektedir (Lee ve Dang 2006). Sonuç olarak Myc aşırı ifadesi hücre proliferasyonu ile hücre farklılaşması süreçleri arasındaki dengeyi proliferasyon yönünde önemli seviyede değiştirmektedir. Tez çalışmamızın ilk aşamasında Myc ifadesi western blot yöntemiyle saptanamayacak derecede düşük seviyede olan H209 ve H345 hücrelerinde tasarladığımız lentiviral vektörler aracılığıyla Myc ifadesi oluşturuldu. Oluşturulan Myc ifadesinin hücre proliferasyonuna olası etkisini saptayabilmek amacıyla gerçekleştirilen hücre çoğalma analizi sonuçları değerlendirildiğinde hücre çoğalma hızlarında literatürde belirtilen şekilde Myc ifadesi oluşturulan hücrelerin kontrol Myc ifadesi taşımayan kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı seviyede artış olduğu gözlemlendi. Bu sonuçta sonradan oluşturulan Myc ifadesinin KHAK hücre dizileri olan H209 ve H345 hücrelerinde proliferasyonu arttırıcı bir etkisi olduğunu gösterdi. Literatürde yapılan çalışmalar sonucunda Myc ifadesindeki artışa göre bazı hücre hücre gruplarında proliferasyonun arttığı gözlenir

iken bazı hücre gruplarında ise artan mitotik stres sonucu hücre ölümünün gözlemlendiği belirtilmiştir (Hoffmann and Liebermann 2008). Bu durum bazı hücre gruplarının çoğalma ve gelişim süreçlerinde Myc ifadesine bağımlı olabildiklerini düşündürür iken diğer hücrelerin Myc ifadesine bağımlı olmadıklarını göstermiştir. H209 ve H345 hücrelerinde Myc ifadesindeki artışa bağlı olarak artan proliferasyonu gösterdikten sonra tez çalışmamızda kullanılan diğer hücre dizileri olan H82 ve N417 hücrelerinde Myc ifadesinin tasarladığımız vektörler aracılığıyla baskılanması amaçlandı. Myc ifadesi tasarladığımız Myc-shRNA vektörleri aracılığıyla baskılanan H82 ve N417 hücrelerinde gerçekleştirilen hücre çoğalma analizi sonuçları değerlendirildiğinde Myc ifadesi azalışına bağlı olarak hücre çoğalmasında anlamlı seviyede bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlarda bize çalışmada kullandığımız KHAK hücre dizilerinde Myc ifadesi değişimine bağlı olarak hücre proliferasyonunun doğrudan etkilendiğini göstermiştir.

Johnson vd (1986) yılında yapmış oldukları çalışmada elektroporasyon yoluyla Myc cDNA'sını içeren vektörü H209 hücrelerine aktardıklarında hücrelerin çoğalma hızında bir artış oldukları saptanmıştır (Johnson vd 1986). Yine aynı çalışmada yapılan çalışmalar sonucunda Myc tranfekte edilmiş hücrelerin morfolojileri incelendiğinde transfeksiyon yapılmamış hücrelere kıyasla daha büyük bir hücre morfolojisine sahip oldukları gösterilmiştir. Ancak hücre çoğalması ve morfolojisinde meydana gelen bu değişimin moleküler biyolojik temeli aydınlatılmamıştır.

Perez-Roger vd (1999) yılında yapmış oldukları çalışma Myc tarafından hücre siklus düzenleme mekanizmasını aydınlatma yönünde önemli veriler sunmuştur. Bu çalışmaya göre Myc tarafından düzenlenen hücre siklusunda Myc hedef genleri olan siklin d1 ve siklin e'nin önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (Perez-Roger vd 1999).

Claassen ve Hann'ın (2000) yılında yapmış oldukları çalışma ise transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF β) aracılı gerçekleştirilen hücre siklus durdurulmasının Myc tarafından nasıl düzenlendiğini açıklamaktadır (Claassen ve Hann 2000). Bu çalışmaya göre Myc ifade artışının, önemli bir hücre siklus inhibitörü olan p21'in ifadesini baskılayarak hücre çoğalmasını indüklediğini göstermiştir. Literatürde yapılan bu çalışmalar ışığında tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları değerlendirdiğimizde kalıcı Myc ekspresyon vektörü ile infekte edilmiş H209 ve H345 hücrelerinde gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR sonuçları incelendiğinde siklin d1 seviyesinin önemli seviyede artmış olduğu bulunmuş iken p21 ifadesinin tam aksine azalmış oldukları gözlemlendi. Myc-shRNA vektörleri ile infekte edilmiş H82 ve N417 hücrelerinde gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR sonuçları incelendiğinde ise siklin d1 ifadesinin azaldığı p21 ifadesinin ise önemli seviyede artmış olduğu görüldü. Elde

edilen sonuçlar değerlendirildiğinde Myc ifade artışına bağlı olarak hücre çoğalma hızı artmış olduğu gözlenen H209 ve H345 hücreleri ile Myc ifadesinin baskılanması sebebiyle hücre çoğalma hızlarının düştüğü gözlenen H82 ve N417 hücrelerinde siklin d1 ve p21 ifade değişimleri literatürde beklenen şekilde gerçekleşmiştir. Bu verilerde tez çalışmamızda dizayn ettiğimiz modelin uygun şekilde çalıştığını ve çalışmamızda kullanmış olduğumuz hücrelerin Myc ifade değişimlerinden doğrudan etkilendiklerini göstermiştir.

Myc onkogeni öncedende belirtildiği üzere hem transkripsiyonel aktivatör hem de baskılayıcı olarak görev alabilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle MYC aşırı ekspresyonu farklı hücre gruplarında farklı etkilere neden olabilmektedir. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda Myc ifadesi hücre çoğalma hızını arttırdığı gözlenmiş iken fare fibroblastlarında yapılmış olan bir çalışmada Myc aşırı ifadesinin mitokondriden sitokrom c salınmasını uyararak hücreleri apoptoza sürüklediği belirtilmiştir (Juin vd 1999). BCL2 önemli bi antiapoptotik molekül olup KHAK olgularında aşırı ifadesi saptanmıştır. KHAK olgularında öncedende belirtildiği apoptoz düzenleyici p53 ifadesinin kaybolduğu bilinmektedir. Bu sebeple Myc ifade artışının KHAK olgularında apoptoz yerine proliferasyonu indüklemesi olasıdır. Literatürde verilen bilgiler doğrultusunda tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları değerlendirdiğimizde kalıcı Myc ekspresyon vektörü ile infekte edilmiş H209 ve H345 hücrelerinde gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR sonuçları incelendiğinde BCL2 seviyesinin önemli seviyede artmış olduğu bulunmuş iken Myc-shRNA vektörleri ile infekte edilmiş H82 ve N417 hücrelerinde gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR sonuçları incelendiğinde BCL2 ifadesinin önemli seviyede azalmış olduğu görüldü. Bu durum, KHAK hücre dizilerinde Myc ifade artışının hücre apoptozu yerine hücre çoğalmasını indüklediği sonucunu teyit etmiştir.

PTEN, PI3K/Akt yolağının negatif regülatör molekülü olup tümör baskılayıcı özellikteki bir fosfatazdır (Akça vd 2011). *PTEN* geninde meydana gelen mutasyonlar KHAK dahil pek çok farklı kanser türünde tanımlanmıştır. Literatürde yapılan çalışmalar sonucunda *PTEN*de meydana gelen genetik değişimlerin sonucunda Akt aktivasyonunun gerçekleştiği ve bu aktivasyon sonucunda KHAK olgularında tümör agresifliği ve prognozunun kötüye gittiği gösterilmiştir (Tang vd 2006). Cui vd (2014) yılında yapmış oldukları çalışma sonucunda KHAK fare modelinde *PTEN* inaktivasyonunun KHAK gelişimini hızlandırdığı ve *PTEN* yolağının hedeflenmesinin KHAK açısından önemli bi tedavi stratejisi olabileceğini önermektedirler (Ciu vd 2014). Tez çalışmamızda *PTEN* ifadesini tasarladığımız vektörler aracılığıyla düzenlediğimiz H209 ve H82 hücrelerinde Myc ifadesindeki değişime bağlı olarak *PTEN* ifadesinde meydana gelebilecek olası değişimleri araştırmayı amaçladık. Yapılan çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde Myc ifadesi arttırılmış H209 hücrelerinde hücre çoğalma hızındaki artışa bağlı olarak *PTEN* ifadesinde önemli seviyede

bir azalma olduğu saptanır iken Myc ifadesi shRNA vektörleri aracılığıyla baskılanmış H82 hücrelerinde hücre proliferasyonundaki azalmaya bağlı olarak *PTEN* ifadesi önemli seviyede artmış olduğu bulundu. Bu sonuçlarda Myc ifadesi artışına bağlı olarak hücre çoğalmasının PI3K/Akt sinyal iletim yolağının aktivasyonu yada baskılanması yoluyla düzenlendiğini göstermiştir.

KHAK hücre dizileri diğer kanser hücre tiplerine kıyasla süspanse olarak kümeler oluşturarak çoğalmaktadır (Salcido vd 2010). KHAK hücreleri hızlı çoğalma ve hızlı ilaç dirençliliği oluşturabilme gibi özellikleri sayesinde kanser kök hücrelerine benzer özellikler taşıdıkları literatürde belirtilmiştir (Codony-Servat vd 2016). Yine literatürde KHAK hücrelerinin *CD44*, *CD90*, *CD133*, *CD87*, *OCT4*, *SOX2*, *ALDH1* ve *uPAR* gibi önemli kanser kök hücre belirteçlerini ifade ettikleri bilinmektedir (Codony-Servat vd 2016). Tez çalışmamızda kullandığımız hücre dizilerinde Myc ifade değişiminin *CD133*, *ALDH1A1* ve *Sox2* gibi kanser kök hücresi belirteçleri üzerine olası etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak kalıcı Myc vektörü ile infekte edilmiş H209 hücrelerinde *CD133*, *Sox2* ve *ALDH1A1* protein düzeylerindeki değişimler western blot yöntemiyle analiz edildi. Yapılan analiz sonucu elde edilen veriler Myc ifadesindeki artışa bağlı olarak *CD133*, *Sox2* ve *ALDH1A1* ifadelerinin artmış olduğu saptandı. KHAK hücreleri öncedende belirtildiği gibi nöroendokrin hücrelerden köken almaktadır. Nöroendokrin hücrelerde *ASCL1* ve *NeuroD1*, en önemli belirteç genler olarak bilinmektedir (Mollaoglu vd 2017). Tez çalışmamızda Myc ifadesi arttırılmış olan H209 hücrelerinde *ASCL1* ifadesindeki değişim western blot yöntemiyle analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda Myc ifadesindeki artışa bağlı olarak *ASCL1* ifadesinde de bir artış saptandı. Elde edilen bu veriler KHAK hücre dizilerinde kanser kök hücre belirteçleri ifade düzeylerinin Myc ifadesine bağlı olarak değiştiğini gösterdi.

Kanser hücreleri hızlı çoğalabilme özellikleri nedeniyle diğer hücre gruplarına kıyasla farklı bir metabolik aktiviteye sahiptir. Otto Warburg'un ortaya çıkardığı model doğrultusunda kanser hücreleri, oksijen varlığında ve yokluğunda glukozu glikoliz ile metaboliz etmektedir. Bu durum kanser hücrelerinin glukozu enerji kaynağı olarak kullanmak yerine diğer biyosentez aşamaları için gerekli ara metabolitleri sentezlemek amacıyla kullanmaktadır (Cairns vd 2011). Glukoz metabolizmasında gözlenen bu farklılığın dışında kanser hücreleri hızlı çoğalma özellikleri nedeniyle nükleik asit metabolizması, glutamin metabolizması, poliamin metabolizması ve lipit metabolizması aktiviteleri açısından normal hücrelere kıyasla farklılık göstermektedirler (Hsu ve Sabatini 2008). Myc transkripsiyon faktörü öncedende belirtildiği genom üzerindeki E-kutusu adı verilen özel dizilere bağlanarak pek çok genin ifadesini transkripsiyonel seviyede doğrudan ya da miRNA veya lncRNA'lar aracılığıyla dolaylı olarak düzenlemektedir. Otto Warburg'un ortaya çıkardığı teoriden sonra yapılan

çalışmalar *HIF1A*, *MYC*, Karaciğer Kinaz B1 (*LKB1*) ve AMP aktive edici kinaz (*AMPK*) gibi genlerin kanser hücre metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (Cairns vd 2011). Myc onkogeni literatürde yapılan çalışmalarla belirlendiği gibi *LDHA*, *HK2*, *ENO1* ve *SLC2A1* gibi glukoz metabolizmasında rol oynayan genlerin ifadesini doğrudan düzenlemektedir (Stine vd 2015). Bu durum Myc onkogeninin kanser hücrelerinin artan metabolik aktivitesini doğrudan düzenlediğini göstermektedir. Tez çalışmamızda Myc ifadesini tasarladığımız vektörlerle düzenlediğimiz H209, H345, H82 ve N417 hücrelerinde *LDHA*, *HK2*, *ENO1* ve *SLC2A1* mRNA ifade değişimleri gerçek zamanlı PZR yöntemiyle analiz edildi. Yapılan analiz sonuçları değerlendirildiğinde Myc ifadesi arttırılan H209 ve H345 hücrelerinde glukoz metabolizmasında rol oynayan bu mRNA'ların ifadeleri artan metabolik aktivite doğrultusunda artmış olarak bulundu. Myc ifadesi baskılanmış olan H82 ve N417 hücrelerinde ise hücre çoğalma hızındaki azalmaya paralel olarak glukoz metabolizmasında rol oynayan bu mRNA'ların ifadelerinde bir azalma gözlemlendi. Bu sonuçlar, çalışmamızda kullanmış olduğumuz KHAK hücre dizilerinin Myc tarafından hücre proliferasyonuna bağlı olarak değişen glukoz metabolizmasının da Myc tarafından düzenlendiğini göstermiştir.

Kanser hücreleri metabolik aktivite sırasında glukoz dışında kullandıkları diğer önemli molekül ise glutamindir. Literatürde Myc tarafından indüklenen kanser modellerinde hücrelerin glutamine bağımlı oldukları ve glutaminolizis yollarını hedef alan inhibitörlere karşı hassas oldukları gösterilmiştir (Wise vd 2008). GLS1 (Glutaminaz), Myc tarafından dolaylı olarak düzenlenen ve glutamin metabolizmasında glutmini glutamata dönüşümünde rol oynayan bir enzimdir. Myc transkripsiyon faktörü GLS1 3'UTR bölgesini hedef alan miR-23a ve miR-23b'nin ifadesinin baskılanması yoluyla GLS1 ifadesini düzenlemektedir (Gao vd 2009). Tez çalışmamızda Myc ifadesi düzenlenen KHAK hücre dizilerinde GLS1 mRNA ifade değişimleri gerçek zamanlı PZR yöntemiyle analiz edildi ve analiz sonucunda H209 ve H345 hücrelerinde GLS1 ifadesi artmış iken H82 ve N417 hücrelerinde azalmış olduğu gözlemlendi. Bu sonuç literatürde farklı kanser türlerinde gösterilen bilgilerin paralelinde KHAK'lerinde de glutamin metabolizmasının Myc tarafından düzenlendiğini göstermiştir.

Siklooksigenazlar prostaglandin biyosentezi alamasında rol oynayan ve inflamasyon ile karsinogenez sürecinde farklı kanser türlerinde ifadelerinin artmış olduğu belirlenen enzimlerdir (Sobolewski vd 2010). Cox-2 (Siklooksigenaz 2), kanser gelişiminin farklı aşamalarında hücre proliferasyonunun artması ve antikanser tedavi stratejilerine yanıt gibi fonksiyonları düzenleyen bir enzimdir (Cao ve Prescott 2002). Cox-2 ifadesinin KHAK gibi farklı kanser türlerinde artmış olduğu bilinmektedir (Petkova vd 2004). Tez çalışmamızda Myc ifadesindeki değişime bağlı olarak Cox-2 seviyesinde herhangi bir değişim olup

olmayacağını araştırmak amacıyla H209 hücrelerinde Cox-2 protein ve H209, H345, H82 ve N417 hücrelerinde gerçek zamanlı PZR yöntemiyle Cox-2 mRNA seviyelerine bakıldı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde KHAK hücre dizilerinde Cox-2 düzeyinin Myc ifadesi değişimine bağlı olarak değiştiği saptandı. Bu durumda KHAK hücrelerinin metanolik aktivitelerinin Myc ifadesi değişimlerinden doğrudan etkilendiklerini teyit etmiştir.

Poliaminler, alifatik katyonlar olup tüm hücrelerde bulunmaktadırlar. Literatürde pek çok kanser türünde poliamin metabolizmasının kanser hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Thomas ve Thomas 2003). *SRM* ve *SMS* genleri poliamin metabolizmasının önemli düzenleyici genlerindedir. Tez çalışmamızda Myc ifadesini düzenlediğimiz hücreler olan H209 ve H82 hücrelerinde poliamin metabolizmasında rol oynayan *SRM* ve *SMS* genlerinin ifadeleri gerçek zamanlı PZR ile analiz edildiğinde *SRM* ve *SMS* genlerinin ifadesi Myc ifadesindeki değişime paralel olarak değiştiği gözlenmiştir. Öncedende bahsedildiği üzere poliamin metabolizması aktivitesinin kanser hücrelerinde yüksek olduğu ve artan poliamin metabolizma aktivitesinin hücre çoğalma hızı ile doğru orantılı olduğu bilinmektedir. Tez çalışmamızda kullandığımız H209 hücrelerinde Myc ifade artışına bağlı olarak artan hücre çoğalma kinetiğinin *SRM* ve *SMS* genlerinin ifade artışına paralel olarak ortaya çıktığı fikrini düşündürmektedir. Bu durum Myc ifadesi değişimine bağlı olarak değişen hücre çoğalma hızının değişen poliamin metabolizması aracılığıyla değiştiğini göstermektedir.

Normal hücrelerde Myc, büyüme faktör stimülasyonu ve hücre çoğalması ile ilişkilidir. (Dang vd 2012). Tümör hücrelerinde ise yüksek seviyede Myc ifadesine sahiptir ve tümör hücrelerinde Myc ifadesi büyüme faktör stimülasyonuna bağımlı değildir. Artmış Myc ifadesinin değişen kromatin yapısı, ribozom biyogenezi, metabolik aktivite, hücre adezyonu, hücre boyutu, apoptoz ve anjiyogenez gibi süreçlerle doğrudan ilişkili olduğu literatürde bilinmektedir (Eiler ve Einsman 2008, Dang vd 2010). Myc literatürde bilindiği üzere DNA üzerinde E-kutusu adı verilen özel dizilere bağlanarak pek çok genin ifadesini transkripsiyonel düzeyde düzenleyen önemli bir faktördür. Literatürde Myc tarafından ifadesi düzenlenen genleri tanımlayan pek çok çalışma bulunmaktadır (Zeller vd.2003, Dang vd 2006, Kim vd 2006). Fakat, literatürde yapılan bu çalışmalar sonucunda belirlenmiş olan genlerin çok az bir kısmı ortak olarak tanımlanmıştır. Ortak olarak tanımlanmış olan bu genler literatürde "Myc core signature" olarak tanımlanmaktadır. Literatürde yapılmış olan pek çok çalışmada tanımlanmış olan ortak gen sayısının azlığı Myc transkripsiyon faktörünün farklı hücre gruplarında farklı özellik göstermesi ve gen ifadesi profillerinin kanser hücre gruplarına özgü olarak değişebileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Myc transkripsiyon faktörleri gen ifadesini transkripsiyonel düzeyde kontrol edebildikleri gibi miRNA ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA)'lar aracılığıyla da post transkripsiyonel seviyede gen ifadesini

düzenleyebilmektedir. Myc tarafından ifadesi düzenlenen genleri tanımlamak için gerçekleştirilen mikrodizin çalışmaları sonucunda belirlenmiş olan ortak genler dışında kanser hücre grubuna bağlı olarak tanımlanmış olan diğer genler, post transkripsiyonel seviyede gen ifadesinin düzenlenmesi sonucunda ortaya çıktıkları fikrini ortaya atmaktadır. miRNA'lar gen ifadesinin post transkripsiyonel seviyede düzenlenmesinde rol oynayan önemli RNA molekülleridir. Myc transkripsiyon faktörü DNA üzerindeki E-kutusu dizilerine bağlanarak protein kodlayan genlerin yanı sıra kodlanmayan miRNA genlerini de transkripsiyonel seviyede düzenleyebilmektedir. Bu sebeple, Myc aşırı ifadesi gözlenen kanser türlerinde mikroRNA ifade düzeylerinde de önemli değişimler belirlenmektedir. Myc tarafından ifadesi düzenlenen genlerde olduğu gibi miRNA genlerinin ifadeleride hücre grubuna ve o hücre grubundaki Myc onkogeninin fonksiyonuna bağlı olarak değişebilmektedir. Bu sebeple, Myc tarafından ifadesi değişen genleri tanımlamak amacıyla yapılan çalışmalar da elde edilen sonuçlar arasında farklılıklar gözlenebilmektedir. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında Myc ifade değişimlerinin KHAK hücre dizilerinde çoğalma, kök hücre belirteçleri ve hücre metabolizması gibi önemli süreçlerde görev alan genleri düzenlediğini gözlemledikten sonra Myc tarafından ifadesi düzenlenen mRNA ve miRNA genlerini daha geniş çaplı tarayabilmek amacıyla mikrodizin analizleri gerçekleştirildi. Mikrodizin çalışmaları H209, H345, H82 ve N417 hücreleri için gerçekleştirildi. Mikrodizin analizi sonucu elde edilen veriler promotör bölgelerinde E-kutusu bulunup bulunmaması ve Myc ifade değişimlerine pozitif ve negatif yönde değişim gösterme kriterlerine göre genler filtrelendi. Bu filtreleme sonucunda, *LDHA*, *Siklin D1*, *Eno1*, *HK2*, *CDK6*, *SPRY1* ve *NELL2* gibi bulgular kısmında belirtilmiş olan genler Myc ifade değişimleri ile aynı yönde değişim göstermişlerdir. Yapılan biyoinformatik analizler ve literatürde farklı kanser türlerinde önceden yapılmış olan çalışmaların sonuçları analiz edildiğinde belirlenmiş olan bu genlerin promotör bölgelerinde Myc bağlanma dizisi olan E-kutusu bulunmuştur. Bu sonuçta bize bu genlerin Myc tarafından transkripsiyonel seviyede doğrudan düzenlendiğini göstermiştir. Yine tez çalışmamızda kullanmış olduğumuz KHAK hücre dizilerinde gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR analizleri sonucunda incelendiğinde *HK2*, *Eno1*, *LDHA* ve *Siklin D1* gibi mRNA'ların ifade değişimleri mikrodizin analizleri ile korele şekilde olduğu gözlenmiştir. Tez çalışmamızın amaçlarından biri olan Myc tarafından ifadesi düzenlenen miRNA'lar aracılığıyla ifadeleri post transkripsiyonel seviyede değişen genleri tanımlayabilmek için mikrodizin analiz sonuçlarında Myc ifade değişimlerine ters yönde değişim gösteren genler belirlendi. Bulgular bölümünde belirtildiği gibi Krüppel Benzer Faktör 2 (*KLF2*), *Sox21*, Adenilat Siklaz 1(*ADCY1*), Beyin Çözünebilir Asit Protein 1 (*BASP1*), *MT1G*, DNA Hasar İndüklü Transkript 4 (*DDIT4*), AGP Açıl Transferaz 4 (*AGPAT4*) ve Pleksitrin Homoloji Benzer Domaini 1 (*PHLDA1*) gibi genlerin ifadeleri Myc artışına bağlı olarak azalıp Myc baskılanması durumunda ise artmış olduğu belirlendi. Bu sonuçlarda bize belirlenmiş olan bu genlerin

ifadelerinin Myc tarafından post transkripsiyonel seviyede miRNA'lar aracılığıyla düzenlenebileceği fikrini ortaya koydu. Bu fikir doğrultusunda çalışmamızda kullandığımız hücre dizilerinde miRNA mikrodizin çalışması gerçekleştirildi. miRNA mikrodizin sonuçları analiz edildiğinde miR-9, miR-7, miR-17-92 ailesi üyeleri, miR-181 ve miR-378'nin promotor bölgelerinde Myc bağlanma sekansı olan E-kutusu bulundurdukları gözlemlendi. He vd (2005) yılında B hücreleri lenfomada yaptıkları çalışma sonucunda miR-17-92 ailesi mikroRNA genlerini kodlayan bölgenin Myc tarafından düzenlendiğini göstermişlerdir. Yine Sato vd (2009) yılında yapmış oldukları çalışmada KHAK'lerinde miR-17-93 ailesi miRNA'ların aşırı ifade oldukları gösterilmiştir. Mikrodizin çalışmaları sonucunda belirlenen diğer bir miRNA olan miR-9 farklı kanser türlerinde farklı fonksiyonları olan bir miRNA'dır (Polley vd 2015). Tez çalışmamızda miR-9 ifadesinin Myc tarafından düzenlendiği belirlenmiş ve kanser gelişimine katkı sağlayan onkogenik bir miRNA olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. miR-181a ve miR-378 literatürde Myc tarafından ifadesi düzenlenen bir miRNA olarak bilinmekte fakat KHAK'lerinde ifadesi veya fonksiyonunu gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (Feng vd 2011, Mestdagh vd. 2010). miRNA mikrodizin analizleri sonucunda literatürde bilinen bu miRNA'lar dışında mikrodizin analizleri sonucunda Myc ifade değişimlerine korele olarak ifadeleri önemli seviyede değişen miR-4417, miR-3687, miR-6723, miR-551b, miR-455 ve miR-7152 gibi miRNA'larda belirlenmiştir. Belirlenmiş olan bu mikroRNA'ların Myc ile doğrudan transkripsiyonel seviyede yada Myc tarafından ifadesi düzenlenen ikincil faktörler aracılığıyla mı düzenlendiklerini belirlemek amacıyla ChIP gibi yöntemler ile ilerleyen dönemde teyit edilmesi amaçlanmaktadır.

mRNA ve miRNA mikrodizin analizleri sonucu elde edilen veriler biyoinformatik program ve web siteleri aracılığıyla detaylı olarak analiz edildiğinde belirlenen miRNA'lar ve bu miRNA'ların olası hedef mRNA'lar belirlendi. Bilindiği üzere miRNA'ların post transkripsiyonel düzeyde birden çok mRNA'nın ifadesini düzenlemesi olasıdır. miRNA'ların bu gen ifadesini düzenlemeleri hücre grubuna ve zamana bağlı olarak değişebilmektedir. miRNA'ların gen ifadesini düzenlemesinde, bu özellikleri göz önüne alınarak mRNA mikrodizin sonuçları detaylı olarak analiz edildi. Elde edilen veriler ışığında miR-92a'nın olası hedeflerinden olan Sox-21 ve KLF2 gibi tümör baskılayıcı özellikteki mRNA'ların ifade değişimleri miR-92a ifade değişimine ters orantılı olacak şekilde değişim göstermiştir. Yine miR-7'nin olası hedeflerinden biri olan DDIT4 ifadesinin miR-7 ifadesine ters orantılı olarak değiştiği gözlemlenmiştir. Hücre siklus baskılayıcı özellikteki bir gen olan *p21* ifadesinin ise miR-17 ifadesindeki değişimle ters orantılı olarak değiştiği saptanmıştır. Belirtilen bu ilişkilerin yanında miR-181a-PHLDA1, miR-18a-AGPAT4 ve miR-18a- Potasyum Voltaj Kanal Alt Ailesi 1 (KCNA1) miRNA-hedef mRNA etkileşimleri yapılan analizler sonucunda çalışmamızda saptanmıştır. Myc tarafından ifadesi düzenlenen miRNA'lar aracılığıyla tümör baskılayıcı

genlerin hedeflenmesi KHAK gelişimine katkı sağlama noktasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Elde edilen bu veriler Myc tarafından KHAK gelişimine hem gen ifadesinin transkripsiyonel düzeyde arttırarak hemde tümör baskılayıcı özellikteki genlerin ifadelerini miRNA'lar aracılığıyla post transkripsiyonel seviyede baskılayarak katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Myc ifade değişimlerinin KHAK hücre dizilerinde yapılan mikro dizin, western blot ve gerçek zamanlı PZR analizleri sonucunda gen ifadesinin düzenlenmesi yoluyla hücre fonksiyonları etkilediği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda protein ve mRNA düzeyinde metabolizma başta olmak üzere çeşitli hücre biyolojik süreçlerde rol oynayan genlerin ifade değişimleri gösterilmiştir. Kansere hücre metabolizmasının normal hücre metabolizmasına kıyasla daha karmaşık bir yapıda olduğu önceki bölümlerde belirtilmiştir. Öncedende belirtildiği üzere Myc, karsinogenez sürecinde pek çok metabolik yolağı düzenleyerek karsinogenez sürecine katkı sağlamaktadır. Çalışmamızda, KHAK hücre dizilerinde Myc ifade değişimlerine bağımlı olarak değişen metabolik aktiviteyi gösterebilmek amacıyla QTOF-LC-MS analizi gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen analiz sonucunda her hücre grubunda Myc ifade değişimine bağımlı olarak miktarları değişen moleküller belirlendi. Her hücre grubu için kontrollerine göre yapılan kıyaslamalarda birbirinden farklı sayıda molekül belirlendi. Bu durum hücre gruplarının izole edildiği hasta ve evre'nin farklı olmasından kaynaklanan farklı metabolik aktivite ile açıklanabilir. Her hücre grubunda kıyaslamalar sonucu elde edilen veriler metabolomik analizler ve karsinogenez sürecinde olası rolleri baz alınarak incelendiğinde genel olarak nükleotit, fosfokolin, lipit, glukoz, poliamin ve glutamin metabolizması ürünleri saptanmıştır. Önceki bölümlerde de bahsedildiği üzere poliamin metabolizması kanser hücrelerinin çoğalma hızlarını kontrol edebilme açısından önemli bir aktiviteye sahiptir (Ruiz-Perez vd 2015). Poliamin metabolizmasında önemli rol oynayan *SMS* ve *SRM* gen ifadelerinin Myc tarafından düzenlendiği elde ettiğimiz sonuçlar ile gösterilmiştir. Yapılan QTOF-LC-MS analizi sonuçları incelendiğinde H209 hücrelerinde spermin ve spermidin miktarlarının Myc ifade artışına bağımlı olarak artması ve H82 hücrelerinde Myc ifade azalmasına bağımlı olarak spermin ifadesinin önemli seviyede azalması literatürde farklı hücre gruplarında elde edilen sonuçlara paralel niteliktedir. Bu sonuç bize *SRM* ve *SMS* gen ifadelerinin değişimi sonucu poliamin metabolizması ürünlerinden olan spermin ve spermidin miktarlarının KHAK hücrelerinde değiştiğini göstermektedir. Elde edilen tüm bu sonuçlar KHAK hücre dizilerinde poliamin metabolizmasının hedeflenmesinin olası bir tedavi stratejisi olabileceğini göstermektedir. Bilindiği üzere kanser hücreleri gibi hızlı çoğalma özelliğine sahip hücreler her bölünme aşamasında oluşturulan hücre yapıları normal hücrelere kıyasla daha hızlı bir şekilde oluşturmaktadır. Hücre ve organel zarlarının oluşması hızlı çoğalan hücrelerde artan protein sentezi ve lipit metabolizması ile ilişkilidir.

Tez çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz QTOF-LC-MS analizi sonuçları incelendiğinde Myc ifadesi artışı sonucu hücre çoğalma hızında artış gözlemlediğimiz H209 ve H345 hücrelerinde fosfolipit metabolizması ürünlerinin artmış olduğunun saptanması öngörülerimizi doğrular niteliktedir. Yine QTOF-LC-MS analizi gerçekleştirdiğimiz hücrelerimizde belirlenen değişen glutamin ve glukoz düzeylerinde hipotezimizi doğrular nitelikte değişim gözlenmiştir.

Literatürde anormal kolin metabolizmasının onkogenezi ve tümör gelişimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Glunde vd 2011). Inazu vd (2013) yılında yaptıkları çalışma sonucunda kolin taşıyıcı protein olan CTL1'in ifadesinin KHAK'lerinde hedef molekül olabileceğini göstermişlerdir (Inazu vd 2013). Song vd (2003) yılında yapmış oldukları çalışma sonucunda ise asetil kolin sentezinin KHAK hücreleri için otokrin bir büyüme sinyali olduğunu göstermişlerdir (Song vd 2003). Bu bilgiler ışığında tez çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz QTOF-LC-MS analizi sonucunda hücrelerimizde kolin ve asetil kolin düzeylerinin Myc ifadesinde gözlenen değişimden etkilendikleri belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar bize KHAK hücrelerinde kolin metabolizmasının Myc tarafından düzenlendiğini ve KHAK tedavi stratejisi olarak bu hücre metabolizmasının hedeflenebileceğini göstermiştir.

Glutasyon hücre farklılaşması, çoğalma ve apoptoz yollarında önemli rol oynayan bir moleküldür (Traverso vd 2013). Glutasyon miktarındaki değişimler kanser hücrelerinin oksidatif strese karşı direnç mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Literatürde Gamcsik vd (2012) yılında yapmış oldukları çalışma sonucunda akciğer kanserli dokularda normal akciğer dokulara kıyasla 4 kat daha fazla miktarda glutasyon bulunduğu belirtilmiştir (Gamcsik vd 2012). Bu bilgiler doğrultusunda tez çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz QTOF-LC-MS analizi sonuçları değerlendirildiğinde Myc ifadesi artırılmış olan H209 hücrelerinde glutasyon seviyesinde önemli derecede bir artış olduğu gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç KHAK hücrelerinde Myc ifadesi artışına bağlı olarak hücrelerde glutasyon seviyesinin artışı yoluyla kemoteropatik ajanlara direnç oluşturabileceklerini düşündürmektedir.

Tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları özetlemek gerekirse; KHAK olgularında son yıllarda yapılan detaylı genetik analizler sonucunda Myc onkogeni önemli bir hedef molekül olarak ortaya çıkmıştır. Tez önerimizi verdiğimiz süreçten tez çalışmamızı tamamladığımız sürece kadar Myc onkogeni ve karsinogenez süreci üzerindeki roller hakkında oldukça yayın çıkmıştır. Literatürde, son yıllarda KHAK'lerinde Myc onkogenini hedef alan tedavi stratejileri gösterilmeye başlanmıştır. Fakat, Myc onkogeninin KHAK'lerinde karsinogenez sürecindeki olası rollerini detaylı olarak açıklayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bilindiği üzere Myc onkogeni farklı hücre gruplarında farklı fonksiyonlar gösterebilmektedir. Bu bilgiler ışığında KHAK hücre dizilerinde Myc onkogeninin olası etki

mekanizmalarını aydınlatılabilme amacıyla mRNA ve miRNA düzeyinde mikrodizin analizleri gerçekleştirildi. KHAK hücrelerinde Myc onkogeni tarafından düzenlenen transkriptomu detaylı olarak tanımlayan bir yayın literatürde bulunmamaktadır. Öte yandan çalışmamız, KHAK hücre dizilerinde Myc tarafından ifadeleri düzenlenen miRNA'ları tanımlayan ilk çalışmadır. Çalışmamız sonucunda kullandığımız 4 hücre hattında da ifadeleri Myc tarafından düzenlendiği gözlenen ve literatürde kendileri hakkında hiçbir fonksiyonel yayın bulunmayan miRNA'lar tanımlanmıştır. Belirlenmiş olan bu miRNA'lar ilerleyen dönemde planlanan çalışmalar yardımıyla KHAK gelişimindeki fonksiyonel rollerinin belirlenmesi ile KHAK'lerinde hedef olabilme potansiyellerine sahiptirler.

Bilindiği üzere değişen kanser metabolizması karsinogenez sürecinin en önemli basamaklarından biridir. Çalışmamız KHAK hücre dizilerinde Myc tarafından düzenlenen metabolomu gösteren ilk çalışmadır. Metabolomik çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz veriler KHAK hücre dizileri açısından önemli metabolik yolları gösterme ve ilerleyen aşamalarda bu yolları hedefleyen tedavi stratejilerine ışık tutabilme potansiyeline sahiptir.

Tez çalışmamız süresince elde ettiğimiz tüm veriler KHAK tedavisine ışık tutabilme potansiyeline sahip mRNA, miRNA ve metabolik yolları sunmuştur.

6. SONUÇ

KHAK, akciğer kanseri alt türleri arasında erken metastaz ve hızlı çoğalma özelliğine sahip en agresif türüdür. KHAK olgularının ileri evrede tanı almaları sebebiyle genetik analizler için yeterli materyal bulunmamaktaydı. Fakat son dönemlerde daha erken evrede ulaşılan olgular ve uygun biyopsi örnekleri sayesinde çok sayıda genetik analiz yapma imkanı bulundu. Yapılan genetik analizler KHAK tedavi stratejileri üretme noktasında katkıda bulundu. Son yıllarda içlerinde çeşitli hücre çoğalma yolları da dahil olmak üzere immün terapi, transkripsiyonun hedeflenmesi, DNA tamir mekanizmalarının hedeflenmesi ve anjiyogenez gibi süreçleri içeren pek çok tedavi stratejisi üretilmiştir. Ancak üretilen bu tedavi stratejilerinden hiçbiri tam anlamıyla KHAK gelişimini baskılayamamıştır.

Kanser tedavisi için son yıllarda önemli bir hedef strateji olarak kanser hücre metabolizmasının hedeflenmesi ön plana çıkmaktadır. Kanser hücre metabolizmasını hedef alan tedavi stratejileri son yıllarda oldukça artmıştır. Literatürde KHAK gelişiminde önemli bir rol oynayan Myc onkogeninin kanser hücre metabolizması üzerindeki rolü bilinmektedir. Çalışmamızda Myc onkogeninin KHAK hücrelerinde gen ifadesinin düzenlenmesi ve hücre metabolizma gibi hücre fenotipleri üzerine olası etkileri araştırmayı amaçladık. Bu amaç doğrultusunda elde ettiğimiz sonuçlar:

- 1) Tasarlamış olduğumuz vektörler Myc ifadesini kalıcı ve zamana bağlı olarak düzenleyebilmektedir.
- 2) Oluşturduğumuz indüklenebilir vektör sistemi literatürde özgün bir tasarıma sahip olup Molecular Biotechnology dergisinde yayınlanmıştır.
- 3) KHAK hücrelerinde sonradan oluşturulan Myc ifadesi hücre çoğalma hızını arttırır.
- 4) KHAK hücrelerinde Myc ifadesi hücrelerde kök hücre ve metastaz gibi hücre metabolizma süreçlerinde rol oynayan genlerin ifadesini düzenler.

- 5) KHAK Myc onkogeni glukoz, glutamin ve poliamin metabolizmasında rol oynayan anahtar genlerin ifadesini düzenler.
- 6) Myc onkogeni KHAK hücre dizilerinde agresif fenotipe katkıda bulunur.
- 7) Myc transkripsiyon faktörü KHAK hücrelerinde transkriptomun büyük bir kısmını düzenler.
- 8) KHAK gelişimi bakımından Myc ifadesine bağımlıdır.
- 9) Myc onkogeni KHAK hücrelerinde gen ifadesini genleri promotor bölgelerine bağlanarak transkripsiyonel düzeyde ve transkripsiyonunu düzenlediği miRNA'lar aracılığıyla post transkripsiyonel seviyede düzenlemektedir.
- 10) Myc onkogeni KHAK hücrelerinde metabolik aktiviteyi düzenlemektedir.
- 11) Poliamin metabolizmasının hedeflenmesi KHAK tedavisi açısından önemli bir strateji olabilir.
- 12) Myc onkogeni ve Myc onkogeni ile ilişkili hücre metabolik yollar (glukoz, glutamin, lipid vb.) KHAK tedavisi açısından hedef olabilirler.

Çalışmada kullandığımız vektör sistemleri kendi tasarladığımız sistemler olup literatüre yayın olarak katkı sağlamıştır. Tasarladığımız pTIJ vektör, zamana bağlı indüklenebilir gen ekspresyon profilleri çalışabilmesine imkan sağlayabilme özelliği nedeniyle ilerleyen çalışmalarda da katkı sağlayabilecek potansiyele sahiptir. Yapılan tüm çalışmalar ileri moleküler biyolojik ve genetik teknikler olup sonraki dönemde yapılacak çalışmalara örnek model olarak katkı sağlayabilecektir.

Tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar KHAK tedavi stratejileri geliştirme noktasında önemli veriler sunmaktadır. Son yıllarda kanser hücre metabolizması, kanser tedavi stratejileri üretme noktasında önemli bir hedef fonksiyon olarak oldukça tercih edilmektedir. Bu sebeple, yaptığımız çalışma KHAK hücre metabolizmasını hedefleyen stratejiler üretme noktasında katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(8):635-645.

Adler I. Primary malignant growth of the lung and bronchi: A Pathological and Clinical Study, *Longmans, Green&Co*, NewYork, 1912; s.325.

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

Ali G, Boldrini L, Capodanno A, Pelliccioni S, Servadio A, Crisman G, Picchi A, Davini F, Mussi A, Fontanini G. Expression of p-AKT and p-mTOR in a large series of bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2011;2:787-792.

Alitalo K, Schwab M, Lin CC, Varmus HE, Bishop JM. Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(6):1707-1711.

Alvarado-Luna G, Morales-Espinosa D. Treatment for small cell lung cancer, where are we now?-a review. *Transl Lung Cancer Res* 2016;5(1):26-38.

Amati B, Alevizopoulos K, Vlach J. Myc and the cell cycle. *Front Biosci.* 1998;3:d250-268.
Balsara BR, Testa JR. Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene* 2002;21(45):6877-6883.

Boller D, Doepfner KT, De Laurentiis A, Guerreiro AS, Marinov M, Shalaby T, Depledge P, Robson A, Saghir N, Hayakawa M, Kaizawa H, Koizumi T, Ohishi T, Fattet S, Delattre O, Schweri-Olac A, Höland K, Grotzer MA, Frei K, Spertini O, Waterfield MD, Arcaro A. Targeting PI3KC2β impairs proliferation and survival in acute leukemia, brain tumours and neuroendocrine tumours. *Anticancer Res* 2012;32:3015-3027.

Boone CW, Kelloff GJ, Malone WE. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Res* 1990;50(1):2-9.

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

Byers LA, Rudin CM. Small cell lung cancer: where do we go from here? **Cancer** 2015;121(5):664-672.

Byers LA, Wang J, Nilsson MB, Fujimoto J, Saintigny P, Yordy J, Giri U, Peyton M, Fan YH, Diao L, Masrourpour F, Shen L, Liu W, Duchemann B, Tumula P, Bhardwaj V, Welsh J, Weber S, Glisson BS, Kalhor N, Wistuba II, Girard L, Lippman SM, Mills GB, Coombes KR, Weinstein JN, Minna JD, Heymach JV. Proteomic profiling identifies dysregulated pathways in small cell lung cancer and novel therapeutic targets including PARP1. **Cancer Discov** 2012;2:798–811.

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **RNA** 2004;10(12):1957–66.

Cairns RA, Harris I, McCracken S, Mak TW. Cancer cell metabolism. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 2011;76:299-311.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer** 2011;11(2):85-95.

Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. **Nat Genet** 2008;40(1):43-50.

Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. **Nature** 2010; 465(7298):584–589.

Chendrimada TP, Gregory RI, 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.

Chernova OB, Chernov MV, Ishizaka Y, Agarwal ML, Stark GR. MYC abrogates p53-mediated cell cycle arrest in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-treated cells, permitting CAD gene amplification. **Mol Cell Biol** 1998;18(1):536-545.

Claassen GF, Hann SR. A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000;97(17):9498-9503.

Clegg NJ, Couto SS, Wongvipat J, Hieronymus H, Carver BS, Taylor BS, Ellwood-Yen K, Gerald WL, Sander C, Sawyers CL. MYC cooperates with AKT in prostate tumorigenesis and alters sensitivity to mTOR inhibitors. **PLoS One** 2011;6(3):e17449.

Codony-Servat J, Verlicchi A, Rosell R. Cancer stem cells in small cell lung cancer. **Transl Lung Cancer Res** 2016;5(1):16-25.

Collins S, Groudine M. Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. **Nature** 1982;298(5875):679-681.

Conacci-Sorrell M, McFerrin L, Eisenman RN. An overview of MYC and its interactome. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2014;4(1):a014357.

Condoluci A, Mazzara C, Zoccoli A, Pezzuto A, Tonini G. Impact of smoking on lung cancer treatment effectiveness: a review. **Future Oncol** 2016;12(18):2149-2161.

Cordes KR, Srivastava D. MicroRNA regulation of cardiovascular development. **Circ Res** 2009;104(6):724-732.

Cui M, Augert A, Rongione M, Conkrite K, Parazzoli S, Nikitin AY, Ingolia N, MacPherson D. PTEN is a potent suppressor of small cell lung cancer. **Mol Cancer Res** 2014;12(5):654-659.

D'Angelo SP, Pietanza MC. The molecular pathogenesis of small cell lung cancer. **Cancer Biol Ther** 2010;10(1):1-10.

Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1982;79(24):7824-7827.

Daly MC, Xiang RH, Buchhagen D, Hensel CH, Garcia DK, Killary AM, Minna JD, Naylor SL. A homozygous deletion on chromosome 3 in a small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppressor activity. **Oncogene** 1993;8(7):1721-1729.

Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. **Semin Cancer Biol** 2006;16(4):253-264.

Dang CV. MYC on the path to cancer. **Cell** 2012;149(1):22-35.

Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. **Clin Chest Med** 2011; 32(4):605-644.

Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, Kastiris E, Gilpatrick T, Paranal RM, Qi J, Chesi M, Schinzel AC, McKeown MR, Heffernan TP, Vakoc CR, Bergsagel PL, Ghobrial IM, Richardson PG, Young RA, Hahn WC, Anderson KC, Kung AL, Bradner JE, Mitsiades CS. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. **Cell** 2011;146(6):904-917.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature** 2004;432(7014):231-235.

Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. **Chest** 2017;151(1): 193-203.

Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. **Nat Genet** 2006;38(9):1060-1065.

Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. **Cell** 2007;131(6):1097-1108.

Driscoll T, Nelson DI, Steenland K, et al. The global burden of disease due to occupational carcinogens. **Am J Ind Med** 2005;48(6):419-431.

Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. **Genes Dev** 2008;22(20):2755-2766.

Ellermann V, Bang O. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg Abt Orig* 1908;46: 595-609.

Espinoza I, Miele L. Notch inhibitors for cancer treatment. **Pharmacol Ther** 2013;139:95-110.

- Fagnocchi L, Zippo A. Multiple Roles of MYC in Integrating Regulatory Networks of Pluripotent Stem Cells. *Front Cell Dev Biol* 2017;5:7.
- Fan Y, Dickman KG, Zong WX. Akt and c-Myc differentially activate cellular metabolic programs and prime cells to bioenergetic inhibition. *J Biol Chem* 2010;285(10):7324-7333.
- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006;9(6):425-434.
- Feng M, Li Z, Aau M, Wong CH, Yang X, Yu Q. Myc/miR-378/TOB2/cyclin D1 functional module regulates oncogenic transformation. *Oncogene* 2011;30(19):2242-2251.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127(12):2893-917.
- Feskanich D, Ziegler RG, Michaud DS, Giovannucci EL, Speizer FE, Willett WC, Colditz GA. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(22):1812-1823.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;9(2):102-114.
- Fingerhut M, Nelson DI, Driscoll T, Concha-Barrientos M, Steenland K, Punnett L, Prüss-Ustün A, Leigh J, Corvalan C, Eijkemans G, Takala J. The contribution of occupational risks to the global burden of disease: summary and next steps. *Med Lav* 2006; 97(2):313-321.
- Fritz H, Kennedy D, Fergusson D, Fernandes R, Doucette S, Cooley K, Seely A, Sagar S, Wong R, Seely D. Vitamin A and Retinoid Derivatives for Lung Cancer: A Systematic Review and Meta Analysis. *PLoS One* 2011; 6(6): e21107.
- Gamcsik MP, Kasibhatla MS, Teeter SD, Colvin OM. Glutathione levels in human tumors. *Biomarkers* 2012;17(8):671-691.
- Gamou S, Hunts J, Harigai H, Hirohashi S, Shimosato Y, Pastan I, Shimizu N. Molecular evidence for the lack of epidermal growth factor receptor gene expression in small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 1987;47:2668-2673.
- Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, Van Eyk JE, Mendell JT, Dang CV. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 2009;458(7239):762-765.
- Gaughan EM, Cryer SK, Yeap BY, Jackman DM, Costa DB. Family history of lung cancer in never smokers with non-small cell lung cancer and its association with tumor harboring EGFR mutations. *Lung Cancer* 2013;79(3):193-197.
- George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, Leenders F, Lu X, Fernández-Cuesta L, Bosco G, Müller C, Dahmen I, Jahchan NS, Park KS, Yang D, Karnezis AN, Vaka D, Torres A, Wang MS, Korbel JO, Menon R, Chun SM, Kim D, Wilkerson M, Hayes N, Engelmann D, Pützer B, Bos M, Michels S, Vlasic I, Seidel D, Pinther B, Schaub P, Becker C, Altmüller J, Yokota J, Kohno T, Iwakawa R, Tsuta K, Noguchi M, Muley T, Hoffmann H, Schnabel PA, Petersen I, Chen Y, Soltermann A, Tischler V, Choi CM, Kim YH, Massion PP, Zou Y, Jovanovic D, Kontic M, Wright GM, Russell PA, Solomon B, Koch I, Lindner M, Muscarella LA, la Torre A, Field JK, Jakopovic M, Knezevic J, Castañós-Vélez E, Roz L, Pastorino U, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Thunnissen E, Köhler J, Schuler M, Botling J,

Sandelin M, Sanchez-Cespedes M, Salvesen HB, Achter V, Lang U, Bogus M, Schneider PM, Zander T, Ansén S, Hallek M, Wolf J, Vingron M, Yatabe Y, Travis WD, Nürnberg P, Reinhardt C, Perner S, Heukamp L, Büttner R, Haas SA, Brambilla E, Peifer M, Sage J, Thomas RK. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. **Nature** 2015;524(7563):47-53.

Glunde K, Bhujwala ZM, Ronen SM. Choline metabolism in malignant transformation. **Nat Rev Cancer** 2011;11(12):835-848.

Graziano SL1, Pfeifer AM, Testa JR, Mark GE, Johnson BE, Hallinan EJ, Pettengill OS, Sorenson GD, Tatum AH, Brauch H. Involvement of the RAF1 locus, at band 3p25, in the 3p deletion of small-cell lung cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 1991;3:283–293.

Green DR. A Myc-induced apoptosis pathway surfaces. **Science** 1997;278(5341):1246-1247.

Growth suppression by MYC inhibition in small cell lung cancer cells with TP53 and RB1 inactivation. Fiorentino FP, Tokgün E, Solé-Sánchez S, Giampaolo S, Tokgün O, Jauset T, Kohno T, Perucho M, Soucek L, Yokota J. **Oncotarget** 2016;7(21):31014-31028.

Hall RD, Gray JE, Chiappori AA. Beyond the standard of care: a review of novel immunotherapy trials for the treatment of lung cancer. **Cancer Control** 2013;20(1):22-31.

Harley C, Kim N. Telomerase and cancer, in DeVita VJ, Hellman S, Rosenberg S (eds): Important Advances in Oncology, vol 11., **Lippincott-Raven**, Philadelphia, PA 1997, pp 1-11.

Hayama S, Daigo Y, Yamabuki T, et al. Phosphorylation and activation of cell division cycle associated 8 by aurora kinase B plays a significant role in human lung carcinogenesis. **Cancer Res** 2007;67:4113–4122.

Hayward WS, Neel BG, Astrin SM. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. **Nature** 1981;290(5806):475-480.

Hiyama K1, Ishioka S, Shirotani Y, Inai K, Hiyama E, Murakami I, Isobe T, Inamizu T, Yamakido M. Alterations in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and rb. **Oncogene** 1995;10:937-944.

Hoffman B, Liebermann DA. Apoptotic signaling by c-MYC. **Oncogene** 2008;27:6462–6472.

Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. **Cell** 2008;134(5):703-707.

Inazu M, Yamada T, Kubota N, Yamanaka T. Functional expression of choline transporter-like protein 1 (CTL1) in small cell lung carcinoma cells: a target molecule for lung cancer therapy. **Pharmacol Res** 2013;76:119-131.

Iwakawa R, Kohno T, Totoki Y, Shibata T, Tsuchihara K, Mimaki S, Tsuta K, Narita Y, Nishikawa R, Noguchi M, Harris CC, Robles AI, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S, Totsuka H, Yoshida T, Yokota J. Expression and clinical significance of genes frequently mutated in small cell lung cancers defined by whole exome/RNA sequencing. **Carcinogenesis** 2015;36(6):616-621.

Iwakawa R, Takenaka M, Kohno T, Shimada Y, Totoki Y, Shibata T, Tsuta K, Nishikawa R, Noguchi M, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Yokota J. Genome-wide identification of genes with

amplification and/or fusion in small cell lung cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2013;52(9):802-816.

J Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **Cell Physiol** 2002;190(3):279-286.

Jackman DM, Johnson BE. Small cell lung cancer. **Lancet** 2005;366(9494):1385-1396.

Johnson BE, Battey J, Linnoila I, Becker KL, Makuch RW, Snider RH, Carney DN, Minna JD. Changes in the phenotype of human small cell lung cancer cell lines after transfection and expression of the c-myc proto-oncogene. **J Clin Invest** 1986;78(2):525-532.

Jones RN, Hughes JM, Weill H. Asbestos exposure, asbestosis, and asbestos-attributable lung cancer. **Thorax** 1996;51 Suppl 2:9-15.

Joshi M, Ayoola A, Belani CP. Small-cell lung cancer: an update on targeted therapies. **Adv Exp Med Biol** 2013;779:385-404.

Juin P, Hueber AO, Littlewood T, Evan G. c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. **Genes Dev** 1999;13(11):1367-1381.

Kaiser U, S.M., Haag U. Expression of bcl-2—protein in small cell lung cancer. **Lung Cancer** 1996;15:31-40.

Kalemkerian GP. Staging and imaging of small cell lung cancer. **Cancer Imaging** 2012;11:253-258.

Kanwal M, Ding XJ, Cao Y. Familial risk for lung cancer. **Oncol Lett** 2017;13(2): 535–542.

Kato F, Fiorentino FP, Alibés A, Perucho M, Sánchez-Céspedes M, Kohno T, Yokota J. MYCL is a target of a BET bromodomain inhibitor, JQ1, on growth suppression efficacy in small cell lung cancer cells. **Oncotarget** 2016;7(47):77378-77388.

Kaufman EL, Jacobson JS, Hershman DL, Desai M, Neugut AI. Effect of breast cancer radiotherapy and cigarette smoking on risk of second primary lung cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26(3):392-398.

Kim YH, Girard L, Giacomini CP, Wang P, Hernandez-Boussard T, Tibshirani R, Minna JD, Pollack JR. Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. **Oncogene** 2006 Jan 5;25(1):130-138.

Kumar V, Fausto N, Abbas A. Pathologic Basis of Disease 7th edition, **Saunders** 2004.

Kunnimalaiyaan M, Chen H. Tumor suppressor role of Notch-1 signaling in neuroendocrine tumors. **Oncologist** 2007;12:535-542.

Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010;107(5):2037-2042.

Lee HY, Doudna JA. TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. **RNA** 2012;18(11):2012–2019.

Lee JH, Park KS, Alberobello AT, Kallakury B, Weng MT, Wang Y, Giaccone G. The Janus kinases inhibitor AZD1480 attenuates growth of small cell lung cancers in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res** 2013;19(24): 6777–6786.

Lee LA, Dang CV. Myc target transcriptomes. **Curr Top Microbiol Immunol** 2006;302:145-167.

Lee RC, Feinbaum RL, 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, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J** 2004; 23(20):4051– 4060.

Levens D. Disentangling the MYC web. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002;99(9):5757- 5759.

Lin CY, Lovén J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, Lee TI, Young RA. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. **Cell** 2012 ;151(1):56-67.

Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nat Rev Cancer** 2015;15(6):321-333.

Lopez-Chavez A, Sandler A. Systemic issues in small cell lung cancer. **Curr Probl Cancer** 2012;36:131-155.

Loriot Y, Mordant P, Dugue D, Geneste O, Gombos A, Opolon P, Guegan J, Perfettini JL, Pierre A, Berthier LK, Kroemer G, Soria JC, Depil S, Deutsch E. Radiosensitization by a novel Bcl-2 and Bcl-XL inhibitor S44563 in small-cell lung cancer. **Cell Death Dis** 2014;5:e1423.

Mannava S, Grachtchouk V, Wheeler LJ, Im M, Zhuang D, Slavina EG, Mathews CK, Shewach DS, Nikiforov MA. Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. **Cell Cycle** 2008;7(15):2392-2400.

Mao Y, Hu J, Ugnat AM, Semenciw R, Fincham S. Socioeconomic status and lung cancer risk in Canada. Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. **Int J Epidemiol** 2001;30(4):809-17.

Matsushita N, Matsushita S, Hirakawa S, Higashiyama S. Doxycycline-dependent inducible and reversible RNA interference mediated by a single lentivirus vector. **Biosci Biotechnol Biochem** 2013;77(4):776-781.

Mavrakis KJ, Wolfe AL, Oricchio E, Palomero T, de Keersmaecker K, McJunkin K, Zuber J, James T, Khan AA, Leslie CS, Parker JS, Paddison PJ, Tam W, Ferrando A, Wendel HG. Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Cell Biol** 2010;12(4):372-379.

Mestdagh P1, Fredlund E, Pattyn F, Schulte JH, Muth D, Vermeulen J, Kumps C, Schlierf S, De Preter K, Van Roy N, Noguera R, Laureys G, Schramm A, Eggert A, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. MYCN/c-MYC-induced microRNAs repress coding gene networks associated with poor outcome in MYCN/c-MYC-activated tumors. **Oncogene** 2010;29:1394–1404.

Miller AB, Altenburg HP, Bueno-de-Mesquita B, Boshuizen HC, Agudo A, Berrino F, Gram IT, Janson L, Linseisen J, Overvad K, Rasmuson T, Vineis P, Lukanova A, Allen N, Amiano P, Barricarte A, Berglund G, Boeing H, Clavel-Chapelon F, Day NE, Hallmans G, Lund E,

- Martinez C, Navarro C, Palli D, Panico S, Peeters PH, Quirós JR, Tjønneland A, Tumino R, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Slimani N, Riboli E. Fruits and vegetables and lung cancer: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2004;108(2):269-276.
- Mills SE, Carter D, Greenson JK, Reuter VE, Stoler MH. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. *Lippincott Williams & Wilkins*, 2004, s.3104.
- Miura I, Graziano SL, Cheng JQ, Doyle LA, Testa JR. Chromosome alterations in human small cell lung cancer: frequent involvement of 5q. *Cancer Res* 1992;52(5):1322-1328.
- Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 1994;54(12):3131-3135.
- Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics* 2010;284(2):95- 103.
- Mladenov Z, Heine U, Beard D. Strain MC29 Avian Leukosis Virus. Myelocytoma, Endothelioma, and Renal Growths: Pathomorphological and Ultrastructural Aspects, *J Natl Cancer Inst* 1967;38(3):251-285.
- Mollaoglu G, Guthrie MR, Böhm S, Brägelmann J, Can I, Ballieu PM, Marx A, George J, Heinen C, Chalishazar MD, Cheng H, Ireland AS, Denning KE, Mukhopadhyay A, Vahrenkamp JM, Berrett KC, Mosbrugger TL, Wang J, Kohan JL, Salama ME, Witt BL, Peifer M, Thomas RK, Gertz J, Johnson JE, Gazdar AF, Wechsler-Reya RJ, Sos ML, Oliver TG. MYC Drives Progression of Small Cell Lung Cancer to a Variant Neuroendocrine Subtype with Vulnerability to Aurora Kinase Inhibition. *Cancer Cell* 2017;31(2):270-285.
- Mu P, Han YC, Betel D, Yao E, Squatrito M, Ogdowski P, de Stanchina E, D'Andrea A, Sander C, Ventura A. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev* 2009;23(24):2806-2811.
- Murray MJ, Cunningham JM, Parada LF, Dautry F, Lebowitz P, Weinberg RA. The HL-60 transforming sequence: a ras oncogene coexisting with altered myc genes in hematopoietic tumors. *Cell* 1983;33(3):749-757.
- Nakanishi Y, Mulshine JL, Kasprzyk PG, Natale RB, Maneckjee R, Avis I, Treston AM, Gazdar AF, Minna JD, Cuttitta F. Insulin-like growth factor-I can mediate autocrine proliferation of human small cell lung cancer cell lines in vitro. *J Clin Invest* 1988;82:354-359.
- Naylor SL, Johnson BE, Minna JD, Sakaguchi AY. Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature*. 1987;329(6138):451-454.
- Neal JW, Sequist LV. Exciting new targets in lung cancer therapy: ALK, IGF-1R, HDAC, and Hh. *Curr Treat Options Oncol* 2010;11:36-44.
- Niederst MJ, Sequist LV, Poirier JT, Mermel CH, Lockerman EL, Garcia AR, Katayama R, Costa C, Ross KN, Moran T, Howe E, Fulton LE, Mulvey HE, Bernardo LA, Mohamoud F, Miyoshi N, VanderLaan PA, Costa DB, Jänne PA, Borger DR, Ramaswamy S, Shioda T, Iafrate AJ, Getz G, Rudin CM, Mino-Kenudson M, Engelman JA. RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat Commun* 2015;6:6377.

Nilsson LM, Forshell TZ, Rimpi S, Kreutzer C, Pretsch W, Bornkamm GW, Nilsson JA. Mouse genetics suggests cell-context dependency for Myc-regulated metabolic enzymes during tumorigenesis. *PLoS Genet* 2012;8(3):e1002573.

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005 Jun 9;435(7043):839-843.

Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y, Tsukihara T. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* 2009;326(5957):1275–1279.

Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li QJ, Lowe SW, Hannon GJ, He L. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev* 2009;23(24):2839-2849.

Ooi WL, Elston RC, Chen VW, Bailey-Wilson JE, Rothschild H. Increased familial risk for lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1986;76(2):217-222.

Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 2000;275(29):21797-21800.

Pardo OE, Latigo J, Jeffery RE, Nye E, Poulsom R, Spencer-Dene B, Lemoine NR, Stamp GW, Aboagye EO, Seckl MJ. The fibroblast growth factor receptor inhibitor PD173074 blocks small cell lung cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2009;69:8645-8651.

Park KS, Liang MC, Raiser DM, et al. Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell Cycle* 2011;10(16):2806-2815.

Park KS, Martelotto LG, Peifer M, Sos ML, Karnezis AN, Mahjoub MR, Bernard K, Conklin JF, Szczepny A, Yuan J, Guo R, Ospina B, Falzon J, Bennett S, Brown TJ, Markovic A, Devereux WL, Ocasio CA, Chen JK, Stearns T, Thomas RK, Dorsch M, Buonamici S, Watkins DN, Peacock CD, Sage J. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. *Nat Med* 2011;17:1504-1508.

Pedersen PL. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying of of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomemb* 2007;39(3):211-222.

Peifer M, Fernández-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, Kasper LH, Plenker D, Leenders F, Sun R, Zander T, Menon R, Koker M, Dahmen I, Müller C, Di Cerbo V, Schildhaus HU, Altmüller J, Baessmann I, Becker C, de Wilde B, Vandesompele J, Böhm D, Ansén S, Gabler F, Wilkening I, Heynck S, Heuckmann JM, Lu X, Carter SL, Cibulskis K, Banerji S, Getz G, Park KS, Rauh D, Grütter C, Fischer M, Pasqualucci L, Wright G, Wainer Z, Russell P, Petersen I, Chen Y, Stoelben E, Ludwig C, Schnabel P, Hoffmann H, Muley T, Brockmann M, Engel-Riedel W, Muscarella LA, Fazio VM, Groen H, Timens W, Sietsma H, Thunnissen E, Smit E, Heideman DA, Snijders PJ, Cappuzzo F, Ligorio C, Damiani S, Field J, Solberg S, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Sänger J, Clement JH, Soltermann A, Moch H, Weder W, Solomon B, Soria JC, Validire P, Besse B, Brambilla E, Brambilla C, Lantuejoul S, Lorimier P, Schneider PM, Hallek M, Pao W, Meyerson M, Sage J, Shendure J, Schneider R, Büttner R, Wolf J, Nürnberg P, Perner S, Heukamp LC, Brindle PK, Haas S, Thomas RK. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat Genet* 2012;44(10):1104-1110.

Perez-Roger I, Kim SH, Griffiths B, Sewing A, Land H. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). **EMBO J** 1999;18(19):5310-5320.

Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, Jöckel KH, Johnen G, Pohlabein H, Olsson A, Ahrens W, Gross IM, Brüske I, Wichmann HE, Merletti F, Richiardi L, Simonato L, Fortes C, Siemiatycki J, Parent ME, Consonni D, Landi MT, Caporaso N, Zaridze D, Cassidy A, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, Lissowska J, Stücker I, Fabianova E, Dumitru RS, Bencko V, Foretova L, Janout V, Rudin CM, Brennan P, Boffetta P, Straif K, Brüning T. Cigarette smoking and lung cancer--relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. **Int J Cancer** 2012;131(5):1210-1219.

Petkova DK, Clelland C, Ronan J, Pang L, Coulson JM, Lewis S, Knox AJ. Overexpression of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer. **Respir Med** 2004;98(2):164-172.

Poirier JT, Dobromilskaya I, Moriarty WF, Peacock CD, Hann CL, Rudin CM. Selective tropism of Seneca Valley virus for variant subtype small cell lung cancer. **J Natl Cancer Inst** 2013;105:1059-1065.

Poirier JT, Gardner EE, Connis N, Moreira AL, de Stanchina E, Hann CL, Rudin CM. DNA methylation in small cell lung cancer defines distinct disease subtypes and correlates with high expression of EZH2. **Oncogene** 2015;34(48):5869-5878.

Ramalingam SS, Belani CP, Mack PC, Vokes EE, Longmate J, Govindan R, Koczywas M, Ivi SP, Gandara DR. Phase II study of Cediranib (AZD 2171), an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor, for second-line therapy of small cell lung cancer (National Cancer Institute #7097). **J Thorac Oncol** 2010;5:1279– 1284.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** 2000;403(6772):901-906.

Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. **J Biol Chem** 1979;254(8):2669-2676.

Ridge CA, McErlean AM, Ginsberg MS. Epidemiology of Lung Cancer. **Semin Intervent Radiol** 2013; 30(2): 93–98.

Rolle JE, Kanteti R, Surati M, Nandi S, Dhanasingh I, Yala S, Tretiakova M, Arif Q, Hembrough T, Brand TM, Wheeler DL, Husain AN, Vokes EE, Bharti A, Salgia R. Combined MET inhibition and topoisomerase I inhibition block cell growth of small cell lung cancer. **Mol Cancer Ther** 2014;13:576-584.

Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. **J Exp Med** 1911;13:397–411.

Rudin CM, Drilon A, Poirier JT. RET mutations in neuroendocrine tumors: including small-cell lung cancer. **J Thorac Oncol** 2014;9:1240-1242.

Ruggero D. The role of Myc-induced protein synthesis in cancer. **Cancer Res** 2009;69(23):8839-8843.

Ruiz-Pérez MV, Medina MÁ, Urdiales JL, Keinänen TA, Sánchez-Jiménez F. Polyamine metabolism is sensitive to glycolysis inhibition in human neuroblastoma cells. **J Biol Chem** 2015;290(10):6106-6119.

Salcido CD, Larochelle A, Taylor BJ, Dunbar CE, Varticovski L. Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer. **Br J Cancer** 2010;102(11):1636-1644.

Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. **J Clin Oncol** 1998;16:1207-1217.

Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer. **FEBS J** 2012;279(15):2610-2623.

Schmitt CA, Lowe SW. Bcl-2 mediates chemoresistance in matched pairs of primary E(mu)-myc lymphomas in vivo. **Blood Cells Mol Dis** 2001;27(1):206-216.

Schuhmacher M, Kohlhuber F, Hölzel M, Kaiser C, Burtscher H, Jarsch M, Bornkamm GW, Laux G, Polack A, Weidle UH, Eick D. The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. **Nucleic Acids Res** 2001;29(2):397-406.

Schultheis AM, Bos M, Schmitz K, Wilsberg L, Binot E, Wolf J, Büttner R, Schildhaus HU. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) amplification is a potential therapeutic target in small-cell lung cancer. **Mod Pathol** 2014;27:214-221.

Semenova EA, Nagel R, Berns A. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. **Genes Dev** 2015;29(14):1447-1462.

Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary PM, Gazdar AF. Apoptosis and lung cancer: a review. **J Cell Biochem** 2003;88:885-898.

Shivapurkar N, Virmani AK, Wistuba II, Milchgrub S, Mackay B, Minna JD, Gazdar AF. Deletions of chromosome 4 at multiple sites are frequent in malignant mesothelioma and small cell lung carcinoma. **Clin Cancer Res** 1999;5(1):17-23.

Shopland DR. Tobacco use and its contribution to early cancer mortality with a special emphasis on cigarette smoking. **Environ Health Perspect** 1995;103 Suppl 8:131-142.

Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. **CA Cancer J Clin** 2011; 61: 212-236.

Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Albanes D, Beeson WL, van den Brandt PA, Feskanich D, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Kushi LH, Miller AB, Pietinen P, Rohan TE, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ. Fruits, vegetables and lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. **Int J Cancer** 2003;107(6):1001-1011.

Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. **Int J Cell Biol** 2010;2010:215158.

Song H, Yao E, Lin C, Gacayan R, Chen MH, Chuang PT. Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2012;109:17531-17536.

Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER. Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. **Cancer Res** 2003;63(1):214-221.

Sos ML, Dietlein F, Peifer M, Schöttle J, Balke-Want H, Müller C, Koker M, Richters A, Heynck S, Malchers F, Heuckmann JM, Seidel D, Evers PA, Ullrich RT, Antonchick AP, Vintonyak VV, Schneider PM, Ninomiya T, Waldmann H, Büttner R, Rauh D, Heukamp LC, Thomas RK. A framework for identification of actionable cancer genome dependencies in small cell lung cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2012;109(42):17034-17039.

Stahel RA, Ginsberg R, Havemann K, Hirsch FR, Ihde DC, Jassem J, Karrer K, Maurer LH, Osterlind K, Van Houtte P. Staging and prognostic factors in smallcell lung carcinoma of the lung. Consensus report. **Lung Cancer** 1989;5:119-126.

Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang CV. MYC, Metabolism, and Cancer. **Cancer Discov** 2015;5(10):1024-1039.

Sutherland KD, Proost N, Brouns I, Adriaensen D, Song JY, Berns A. Cell of origin of small cell lung cancer: inactivation of Trp53 and Rb1 in distinct cell types of adult mouse lung. **Cancer Cell** 2011;19:754-764.

Tai D, Wells K, Arcaroli J, Vanderbilt C, Aisner DL, Messersmith WA, Lieu CH. Targeting the WNT signaling pathway in cancer therapeutics. **Oncologist** 2015;20:1189–1198.

Tang JM, He QY, Guo RX, Chang XJ. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. **Lung Cancer** 2006;51(2):181-191.

Tannapfel A, John K, Mise N, Schmidt A, Buhlmann S, Ibrahim SM, Pützer BM. Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. **Carcinogenesis** 2008;29(1):211-218.

Teicher BA, Polley E, Kunkel M, Evans D, Silvers T, Delosh R, Laudeman J, Ogle C, Reinhart R, Selby M, Connelly J, Harris E, Monks A, Morris J. Sarcoma Cell Line Screen of Oncology Drugs and Investigational Agents Identifies Patterns Associated with Gene and microRNA Expression. **Mol Cancer Ther** 2015;14(11):2452-2462.

Teicher BA. Targets in small cell lung cancer. **Biochem Pharmacol** 2014;87(2):211-219.

Thomas T, Thomas TJ. Polyamine metabolism and cancer. **J Cell Mol Med** 2003;7(2):113-126.

Todd S, Franklin WA, Varella-Garcia M, Kennedy T, Hilliker CE Jr, Hahner L, Anderson M, Wiest JS, Drabkin HA, Gemmill RM. Homozygous Deletions of Human Chromosome 3p in Lung Tumors. **Cancer Res** 1997;57(7):1344-1352.

Tokgun O, Fiorentino FP, Tokgun PE, Yokota J, Akca H. Design of a Lentiviral Vector for the Inducible Expression of MYC: A New Strategy for Construction Approach. **Mol Biotechnol** 2017;59(6):200-206.

Tokuhata GK, Lilienfeld AM. Familial aggregation of lung cancer in humans. **J Natl Cancer Inst** 1963;30: 289- 312.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin** 2015; 65(2):87-108.

Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. ***Oxid Med Cell Longev*** 2013;2013:972913.

Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC, eds. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. ***IARC Pres***, Lyon, 2004;12, s.342.

Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. ***J Thorac Oncol*** 2015;10(9):1243-1260.

Travis WD. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. ***Mod Pathol*** 2012;25 Suppl 1:18-30.

U.S. Department of Health and Human Services. Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress. A Report of the Surgeon General. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. ***DHHS*** Publication No. (CDC) 89-8411. 1989.

Umemura S, Mimaki S, Makinoshima H, Tada S, Ishii G, Ohmatsu H, Niho S, Yoh K, Matsumoto S, Takahashi A, Morise M, Nakamura Y, Ochiai A, Nagai K, Iwakawa R, Kohno T, Yokota J, Ohe Y, Esumi H, Tsuchihara K, Goto K. Therapeutic priority of the PI3K/AKT/mTOR pathway in small cell lung cancers as revealed by a comprehensive genomic analysis. ***J Thorac Oncol*** 2014;9(9):1324-1331.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. ***Science*** 2009;324(5930):1029-1033.

Västrik I, Mäkelä TP, Koskinen PJ, Klefstrom J, Alitalo K. Myc protein: partners and antagonists. ***Crit Rev Oncog*** 1994;5(1):59-68.

Vazquez A, Markert EK, Oltvai ZN. Serine biosynthesis with one carbon catabolism and the glycine cleavage system represents a novel pathway for ATP generation. ***PLoS ONE*** 2011;6(11):e25881.

Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. ***J Virol*** 1982;42(3):773-779.

Virmani AK, Fong KM, Kodagoda D, McIntire D, Hung J, Tonk V, Minna JD, Gazdar AF. Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types. ***Genes Chromosomes Cancer*** 1998;21(4):308-319.

Vischioni B, Oudejans JJ, Vos W, Rodriguez JA, Giaccone G. Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients. ***Mol Cancer Ther*** 2006;5(11):2905-2913.

Wainberg ZA, Rafii S, Ramanathan RK, Mina LA, Byers LA, Chugh R, Goldman JW, Sachdev JC, Matei DE, Wheler LL, Henshaw JW, Zhang C, Gallant G, De Bono JS. Safety and antitumor activity of the PARP inhibitor BMN673 in a phase 1 trial recruiting metastatic

small-cell lung cancer (SCLC) and germline BRCA-mutation carrier cancer patients. **ASCO Annual Meeting** 2014;32:7522.

Warburg O, Posener K, Negelein E. On the metabolism of carcinoma cells. **Biochem Z** 1924;152:309-344.

Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. **J Gen Physiol** 1927;8:519-530.

Welm AL, Kim S, Welm BE, Bishop JM. MET and MYC cooperate in mammary tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005;102(12):4324-9.

Wightman B, Bürglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G. Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. **Genes Dev** 1991;5(10):1813-1824.

Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, Miller DS, Rosenberg HM, Shopland DR, Thun MJ, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. **J Natl Cancer Inst** 1999;91(8):675-690.

Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008;105(48):18782-18787.

Wynder EL, Hoffmann D. Tobacco and Tobacco Smoke: Studies in Experimental Carcinogenesis. **Academic Press**, New York, NY, 1963, pp. 234-236.

Yokomizo A, Tindall DJ, Drabkin H, Gemmill R, Franklin W, Yang P, Sugio K, Smith DI, Liu W. PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers. **Oncogene** 1998;17:475-479.

Yoon S, Lee MY, Park SW, Moon JS, Koh YK, Ahn YH, Park BW, Kim KS. Up-regulation of acetyl-CoA carboxylase alpha and fatty acid synthase by human epidermal growth factor receptor 2 at the translational level in breast cancer cells. **J Biol Chem** 2007;282(36):26122-26131.

Zeller KI, Zhao X, Lee CW, Chiu KP, Yao F, Yustein JT, Ooi HS, Orlov YL, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Kuznetsov VA, Sung WK, Ruan Y, Dang CV, Wei CL. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006;103(47):17834-17839.

Zhan P, Wang J, Lv XJ, Wang Q, Qiu LX, Lin XQ, Yu LK, Song Y. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. **J Thorac Oncol** 2009;4:1094-1103.

Zhang L, Yu H, Badzio A, Boyle TA, Schildhaus HU, Lu X, Dziadziuszko R, Jassem J, Varella-Garcia M, Heasley LE, Kowalewski AA, Ellison K, Chen G, Zhou C, Hirsch FR. Fibroblast Growth Factor Receptor 1 and Related Ligands in Small-Cell Lung Cancer. **J Thorac Oncol** 2015 Jul;10(7):1083-1090.

WEB_1 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Erişim Adresi: <http://globocan.iarc.fr>, Erişim Tarihi:16.01.2017.

WEB_2 Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı internet sitesi.
http://kanser.gov.tr/Dosya/2017Haberler/2014-RAPOR._uzun.pdf , (Alındığı tarih: 28 Mayıs 2017)



8. ÖZGEÇMİŞ

Onur TOKGÜN 1985 yılında İstanbul'un Şişli ilçesinde doğdu. İlkokulu Fikret Yüzatlı İlköğretim okulunda, ortaokulu Bahçelievler İlköğretimokulunda, lise eğitimini ise Ataköy Lisesinde tamamladı. 2005 yılında eğitime başladığı Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümünü 2009 yılında tamamladı. Üniversite eğitiminin ardından 2009 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD'da yüksek lisans eğitimine başladı. 2011 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD'da doktora eğitimine başladı ve 2014 yılında doktora eğitimine 1 yıl Barcelona-İSPANYA'DA devam etti. 2015 yılında Pamukkale Üniversitesine doktora eğitimini tamamlamak üzere geri dönmüştür. Evli ve bir çocuk babasıdır.

9. EKLER

EK-1: 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 Sep;73(3):302-9. Epub 2011 Feb 17

EK-2: Akça H, Demiray A, Acikbas I, Aslan M, **Tokgun O**. Tumour suppressor PTEN enhanced enzyme activity of GPx, SOD and catalase by suppression of PI3K/AKT pathway in non-small cell lung cancer cell lines., J Enzyme Inhib Med Chem. 2012 Feb 3.

EK-3: Cem Becerir, İlknur Kılıç, Özlem Şahin, Özmert Özdemir, **Onur Tokgün**, Bülent Özdemir, Hakan Akça. The Protective Effect Of Docosahexaenoic Acid On The Bilirubin Neurotoxicity. J Enzyme Inhib Med Chem. 2013 Aug;28(4):801-7. doi: 10.3109/14756366.2012.684053..

EK-4: Mehmet Bülent Özdemir, Hakan Akça, Çağdaş Erdoğan, **Onur Tokgün**, Aydın Demiray, Fenkçi Semin, Cem Becerir. Protective effect of insulin and glucose at different concentrations on penicillin-induced astrocyte death on the primer astroglial cell line NEURAL REGENERATION RESEARCH Volume 7, Issue 24, August 2012 Cite this article as: Neural Regen Res. 2012;7(24):1895-1899"

EK-5: **Tokgun O**, Akca H, Mammadov R, Aykurt C, Deniz G Convolvulus galaticus, Crocus antalyensis, and Lilium candidum Extracts Show Their Antitumor Activity Through Induction of p53-Mediated Apoptosis on Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 Cells. J Med Food. 2012 Nov;15(11):1000-5.

EK-6: Yildiz M, Bozcu H, **Tokgun O**, Karagur ER, Akyurt O, Akca H. Cyclamen exerts cytotoxicity in solid tumor cell lines: a step toward new anticancer agents? Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14(10):5911-3.

EK-7: Demir E, Akça H, Kaya B, Burgucu D, **Tokgün O**, Turna F, Aksakal S, Vales G, Creus A, Marcos R. Zinc oxide nanoparticles: genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential. *J Hazard Mater.* 2014 Jan 15;264:420-9. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.11.043. Epub 2013 Nov 25.

EK-8: Demir E, Akça H, Turna F, Aksakal S, Burgucu D, Kaya B, **Tokgün O**, Vales G, Creus A, Marcos R. Genotoxic and cell-transforming effects of titanium dioxide nanoparticles. *Environ Res.* 2015 Jan;136:300-8. doi: 10.1016/j.envres.2014.10.032. Epub 2014 Nov 22.

EK-9: **Tokgün O.**, Demiray A., Kaya B., Karagür E.R., Demir E., Burunkaya E., Hakan Akça., "Silica nanoparticles Can Induce Apoptosis Via Dead Receptor And Caspase 8 Pathway On A549 Cells ", *Advences in Food Sciences*, vol.37, pp.65-70, 2015.

EK-10: Francesco Paolo Fiorentino, Elvan Tokgün, Sònia Solé-Sánchez, Sabrina Giampaolo, **Onur Tokgün**, Toni Jauset, Takashi Kohno, Manuel Perucho, Laura Soucek, Jun Yokota. Growth suppression by MYC inhibition in small cell lung cancer cells with TP53 and RB1 inactivation. *Oncotarget* 7 (21), 31014-31028.

EK-11: **Onur Tokgun**, Francesco Paolo Fiorentino, Elvan Tokgun, Jun Yokota, Hakan Akca. Design of a lentiviral vector for the inducible expression of MYC: A new strategy for construction approach". *Molecular Biotechnology. Mol Biotechnol.* 2017 Jun;59(6):200-206. doi: 10.1007/s12033-017-0006-y.