

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KANSER HÜCRELERİNİN PROGRAMLANMASININ MİKRORNA İFADE PROFİLİ  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Necati Kaan Kutlu

Danışman Öğretim Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Açelya Yilmazer Aktuna

Nisan

2018

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Necati Kaan Kutlu

İmza



## ONAY

Dr. Öğr. Üyesi Açelya Yılmaz Aktuna danışmanlığında Necati Kaan Kutlu tarafından hazırlanan bu çalışma 17/04/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Açelya Yılmaz Aktuna

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Onur Çizmecioğlu

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Kanser Hücrelerinin Programlanmasının MikroRNA İfade Profili Üzerindeki Etkileri

Necati Kaan Kutlu

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Dr. Öğr. Üyesi Açelya Yılmaz Aktuna

Hücre programlanması ile günümüzde doku mühendisliği, hastalık modellemesi, ilaç taraması ve toksikoloji alanlarında kullanılmaya başlanan pluripotent hücre elde etmek mümkündür. Normal gelişim sürecinde hücreler belli bir dönem bütün hücrelere dönüşebilecekleri pluripotent bir evreden geçerler ve daha sonra normal gelişim sürecine göre farklılaşırlar. 2006 yılında Yamanaka yaptığı çalışmada somatik hücreleri, seçilen dört transkripsiyon faktörünün aşırı ifade edilmesi sayesinde, kök hücre haline geri döndürülmeyi başarmıştır.

Bu tez çalışmasında, Yamanaka faktörleri (Oct3/4, Klf-4, Sox-2 ve c-Myc) Sendai viral vektörleriyle melanoma kanser hücrelerine verilmiş ve bu hücrelerde miRNA ifade profillerinde oluşabilecek farklılıklar araştırılmıştır. Daha sonrasında belirlenen miRNA'ların ifadelerinin transkripsiyon faktörleriyle muamele edilen hücrelerde kanser durumunda çalışmayan hangi metabolik yollarda değişikliklere sebep oldukları tanımlanmıştır. Son olarak kanser hücrelerinin programlanması ve miRNA ifade profilinin karşılaştırılması sayesinde tümör gelişiminin daha iyi anlaşılabilmesi için biyobelirteç olarak kullanılacak miRNA'lar tanımlanmıştır.

2018, 62 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Hücre programlanması, Melanoma, miRNA profillemesi, epigenetik değişiklikler, metabolik yollar

## **ABSTRACT**

MSc Thesis

Effects of Cancer Cell Programming on MicroRNA Expression Profiles

Necati Kaan Kutlu

Ankara University Biotechnology Institute

Asst. Prof. Açelya Yilmazer Aktuna

It is possible to obtain induced pluripotent stem cells with cellular programming nowadays in tissue engineering, drug development, disease modeling and toxicology fields. Normally, all cells have a pluripotent stage where they could transform to differentiated cells. In 2006, Yamanaka achieved reprogramming somatic cells with four selected transcription factors to stem cell form.

In this thesis, Yamanaka factors (Oct3/4, Klf-4, Sox-2 and c-myc) were transferred to melanoma cancer cells with Sendai viral vectors and possible differences in their miRNA expressions were analyzed. Furthermore it was identified with reprogramming, differentiated miRNA expressions cause changes in metabolic pathways that were expressed differently in cancer cells. Finally, miRNAs that can be used as biomarkers to better understand tumor development are described through the programming of cancer cells and the comparison of miRNA expression profiles.

2018, 62 pages

**Keywords:** Cellular programming, Melanoma, miRNA profiling, epigenetics, metabolic pathways

## TEŞEKKÜRLER

Kariyerimde uzmanlaşmamın başlangıcı olan yüksek lisans eğitimimi Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü öğrencisi olarak tamamlama şansını sahip olduğum için onur duyuyorum. Bu süreç boyunca hem bilimsel olarak hem de manevi anlamda her türlü desteği veren değerli hocalarıma bir teşekkür borç bilirim.

Öncelikle zorlu ve uzun yüksek lisans eğitimin boyunca bana yol gösteren, her türlü zorlukta yanımda olan ve yönelmek istediğim çalışma alanı için beni koşulsuzca destekleyen saygı değer hocam Dr. Öğr. Üyesi Açelya YILMAZER AKTUNA'ya, sonsuz saygı ve minnetimlerimi yürekten arz ediyorum. Kendileriyle çalışmanın ne kadar onur verici olduğunu ve bu şansı bana vermelerinden dolayı kendimi ne kadar şanslı hissettiğimi belirtmek isterim.

Tez çalışmam boyunca imkânlarından faydalandığım Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'ne ve Max Planck enstitüsüne teşekkür ederim.

Biyoteknoloji enstitüsü hocalarımdan Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a, verdiği önerileri ve desteği için teşekkürlerimi iletmek isterim.

Yüksek lisans eğitimimde maddi destek sağlayan, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, tez çalışmamı 315S102 nolu proje olarak destekleyen TÜBİTAK'a ve birlikte çalışmaktan ve tanımaktan mutluluk duyduğum Elvira TAHERİ'ye teşekkür ederim.

Hayatımın en zorlu dönemlerinde bana yol gösteren çok değerli arkadaşlarım; Kübra, Oğuzhan ve Pınar'a hayatımda oldukları ve her koşulda beni destekledikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca maddi ve manevi olarak her zaman arkamda olan ve aldığım her kararı destekleyen aileme, hayatımın bu aşamasında da desteklerini her an hissettirdikleri için sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜRLER .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. MİRNALARIN HÜCREDEKİ ROLÜ .....	3
2.2. MİRNA VE KANSER BAĞLANTISI.....	5
2.2.1. Tümör Baskılayıcı miRNALAR .....	5
2.2.2. Onkogen Özellikli miRNALAR.....	6
2.3. UYARILMIŞ PLURİPOTENT HÜCRELER VE HÜCRE PROGRAMLANMASI.....	8
2.3.1. İletim Yöntemleri.....	9
2.3.1.1. Viral Yöntemler .....	9
2.3.1.2. Viral Olmayan Yöntemler .....	10
2.3.1.3. Direkt Transfeksiyon .....	10
2.3.2. Hücre Programlanmasının Uygulama Alanları.....	10
2.4. KANSER HÜCRELERİNİN PROGRAMLANMASI VE MİRNALARIN ROLÜ .....	12
3. GEREKÇE VE AMAÇ.....	13
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
4.1. MATERYAL.....	14
4.1.1. Hücre Kültürü ve Programlama .....	14
4.1.2. miRNA İzolasyonu ve Mikro Dizin Analizi .....	14
4.2. YÖNTEM .....	15

4.2.1. KANSERLİ HÜCRE HATLARININ KÜLTÜR ORTAMINDA BÜYÜTÜLMESİ VE PROGRAMLANMASI.....	15
4.2.2. RNA İZOLASYONU.....	15
4.2.3. RNA MİKRODİZİN HİBRİDİZASYONU.....	16
4.2.4. MİKRODİZİN VERİLERİNİN ANALİZİ.....	18
4.2.5. MİKRORNA HEDEF GEN BELİRLEME ANALİZLERİ.....	19
<b>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>24</b>
<b>5.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARINDA MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLEME ANALİZLERİ.....</b>	<b>24</b>
<b>5.2. MİKRODİZİN İLE KANSER HÜCRE HATLARININ PROGRAMLAMA ÖNCESİ VE SONRASI MİRNA İFADELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.....</b>	<b>24</b>
5.2.1. MDA-MB-435 Hücre Hattının Programlanması Sonrası miRNA İfadelerinin Karşılaştırılması.....	24
5.2.2. G361 Programlanması Sonrası miRNA ifade Değişimlerinin Karşılaştırılması	26
5.2.3. miRNA Hedef Gen Yolak Analizleri.....	27
<b>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>31</b>
<b>6.1. TARTIŞMA.....</b>	<b>31</b>
6.1.1. HÜCRE PROGRAMLANMASI SONRASI MDA-MB-435 HÜCRE HATTINDA DEĞİŞİM GÖZLENEN MİRNA PROFİLİ VE PROGRAMLANMANIN KANSER İLERLEMESİNE ETKİLERİ.....	31
6.1.2. G361 HÜCRE HATTINDA PROGRAMLAMANNIN KANSER GELİŞİMİNE ETKİSİ VE GÖZLENEN MİRNA İFADE DEĞİŞİMLERİ.....	32
<b>6.2. SONUÇ.....</b>	<b>33</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>34</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>39</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>48</b>
<b>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</b>	<b>49</b>



## SİMGELER DİZİNİ

$\mu\text{g}$	mikrogram
$\mu\text{l}$	mikrolitre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phospatase
$\text{CO}_2$	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
FBS	Fetal bovin serum
IVV	Entegre olan viral vektörler
mikroRNA	miRNA
mL	Mililitre
ng	Nanogram
$\text{ng}/\mu\text{l}$	Nanogram/Mikrolitre
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
oncomiR	Onkogenik miRNA
OSKM	Oct4, Sox2, Klf4, c-myc
pre	Öncül
pri	İlkin
PVV	Polisistronik viral vektörler
uPK hücre	Uyarılmış pluripotent kök hücre
UTR	Untranslated Region

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Wadington'un epigenetik manzarası (1).....	1
Şekil 2.1. Hücrede miRNAların üretimi ve gelişimi (12).....	4
Şekil 2.2. Kanser hücresinde tümör baskılayıcı miRNA ifadesinde düşüş ile onkogenlerin aktive oluşu (19).....	6
Şekil 2.3. Kanser hücrelerinde onkomiR ifadesinde artış ve tümör baskılayıcı genlerin ifadesinin düşüşü (19).....	7
Şekil 2.4. Hücre programlanması çalışma mekanizması (26).....	9
Şekil 4.1. TargetSpy veritabanı analiz sonuç listesi.....	19
Şekil 4.2. TargetScan veritabanı analiz sonucu.....	20
Şekil 4.3. miRWalk veritabanı analizi sonrasında miR-1182 için valide edilmiş hedef genler listesi.....	20
Şekil 4.4. MDA-MB-435 miRNA Gen hedef veritabanları venn diyagramı.....	21
Şekil 4.5. G361 hücre hattında miR-199a için TargetSpy veritabanı hedef gen listesi.....	21
Şekil 4.6. TargetScan analizi sonrası hedef gen listesi.....	22
Şekil 4.7. miRWalk veritabanı hedef gen analiz sonuç listesi.....	22
Şekil 4.8. G361 miRNA hedef genler venn diyagramı.....	23
Şekil 5.1. MDA-MB-435 hücre hattında programlama öncesi ve sonrası farklı ifade edilen miRNA dağılım grafiği.....	25
Şekil 5.2. MDA-MB-435 hücre hattında değişim gözlenen miRNA'ların ısı haritalama dağılım sonuçları.....	25
Şekil 5.3. G361 hücre hattında programlama öncesi ve sonrası farklı ifade edilen miRNA dağılım grafiği.....	26
Şekil 5.4. G361 hücre hattında programlama öncesi ve sonrası miRNA'ların ifade değişimlerinin gösterildiği ısı haritalaması.....	26
Şekil 5.5. JNK/MAPK sinyal yolağı haritasında MAP3K3 geninin yeri.....	27
Şekil 5.6. p38/MAPK sinyal yolağında MAP3K4 geninin Yeri.....	28
Şekil 5.7. MAP3K3 genindeki mutasyonların etkilediği klinik vakaların dağılımı.....	29
Şekil 5.8. MAP3K4 genindeki mutasyonların etkilediği klinik vakaların dağılımı.....	29
Şekil 8.1. G361 ve MDA-MB-435 hücre hatlarının programlama süreci boyunca mikroskopik görüntüleri.....	46

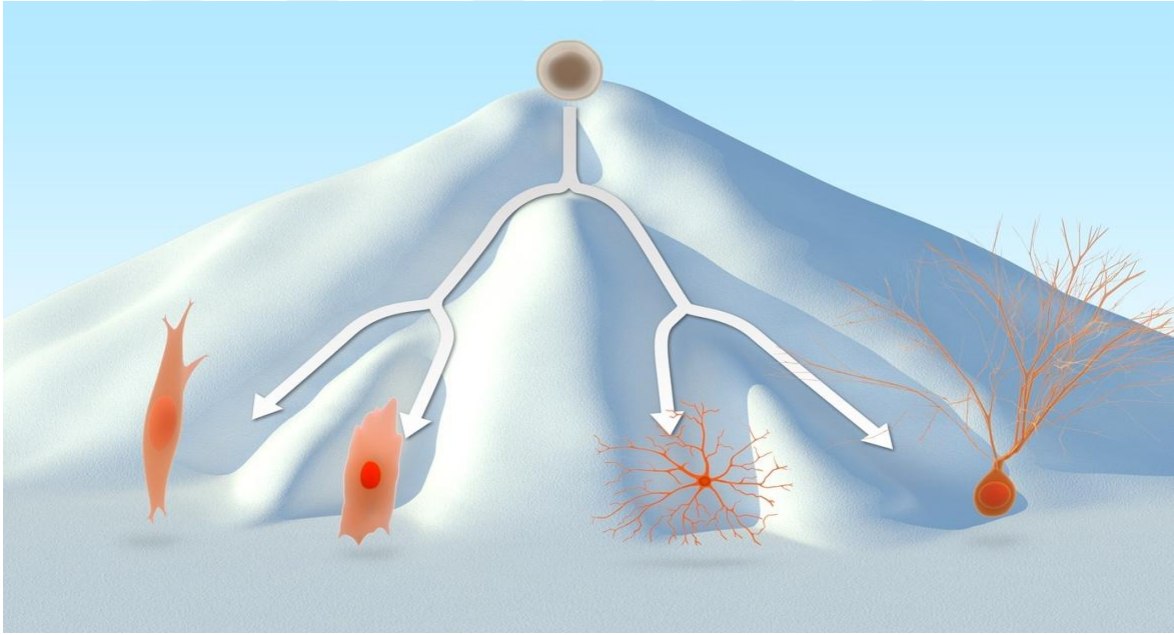
## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 4.1.</b> Hücre hatlarının idamesinde kullanılan besiyerleri .....	15
<b>Çizelge 8.1.</b> G361 hücre hattında programlamayla ifadesi değişen miRNA listesi.....	42
<b>Çizelge 8.2.</b> MDA-MB-435 hücre hattında programlama sonrası ifadesi değişen miRNA listesi.....	42



## 1. GİRİŞ

Normal bir gelişim sürecinde döllenmiş yumurta embriyoya dönüşür ve bunun sonucunda bir erişkin meydana gelir. Döllenmemiş yumurta farklılaşmamış safhada iken, gelişim sürecinde tam olarak farklılaşmış safhaya doğru tek yönlü bir gidiş vardır (1). Waddington'un epigenetik manzarası anlatımında görüldüğü gibi (Şekil 1.1) tepe üstünde farklılaşmamış hücre oturur, farklılaştıkça aşağı doğru iner ve yuvarlanır ve daha sonrada farklı hücre tiplerini dönüşür. Burada aşağı doğru tek yönlü gidiş olduğu ve yukarı doğru çıkışın zor olduğunu gösterilmektedir ve ayrıca vadiler arasında farklı hücre tipleri arasında da geçiş olmadığını göstermektedir. 1960'lara kadar, "farklılaşmamış safhaya geri dönüş imkânsızdır" olarak biliniyordu ama daha sonraki çalışmalar bunun yanlış bir görüş olduğunu gösterdi (2,3).



**Şekil 1.1.** Waddington'un epigenetik manzarası (1)

İnsan embriyonik kök hücreleri bazı hastalıkların tedavi edilmesi için kullanılabilir. Ancak, insan embriyolarının kullanılması ile ilgili etik sorunlar ve oluşabilecek doku uyumsuzlukları bunu zorlaştırmaktadır. Bu zorluk, hastaların kendi somatik hücreleri kullanılarak aşılabılır (3). Memeli blastosist hücrelerinden elde edilmiş embriyonik kök hücreler, süresizce büyüme yeteneği barındırırken aynı zamanda da pluripotentiği devam ettirebilme özelliğine de sahiptirler (4). Pluripotentiği, tek bir hücrenin esnek bir şekilde bütün hücre hatlarına gelişerek yetişkin bir organizmaya dönüşebilme kapasitesidir. Pluripotent hücreler embriyo hücreleri dışında somatik hücrelerin programlanmasıyla da elde edilir (5). Oct3/4, Sox2 ve

Nanog'u içeren çeşitli transkripsiyon faktörleri erken embriyonik dönemde pluripotentiğin devamında rol oynar. Stat3, E-Ras, c-myc, Klf4 ve  $\beta$ -catenin gibi çeşitli genler de embriyonik kök hücrelerinde çoğalmanın kontrolünde görev alırlar. Bu faktörlerden dört tanesinin (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc) birlikte kullanılmasıyla somatik hücrelerde pluripotentiğin elde edilebilir (3).



## 2. KURAMSAL TEMELLER

miRNAlar hücrelerde epigenetik düzenleyici olarak görev yapan kodlanmayan RNA molekülleridir. Gerçekleştirdikleri transkripsiyon sonrası görevlerle hücrelerde oldukça farklı metabolik işleri kontrol ederler. Hücre programlanması sonrasında kanser hücrelerinde gözlenen değişimlerin tanımlanması ve kontrol edilebilmesi için belirteç olacak yeni miRNAlar tespit edilmeye çalışılmıştır.

### 2.1. MİRNALARIN HÜCREDEKİ ROLÜ

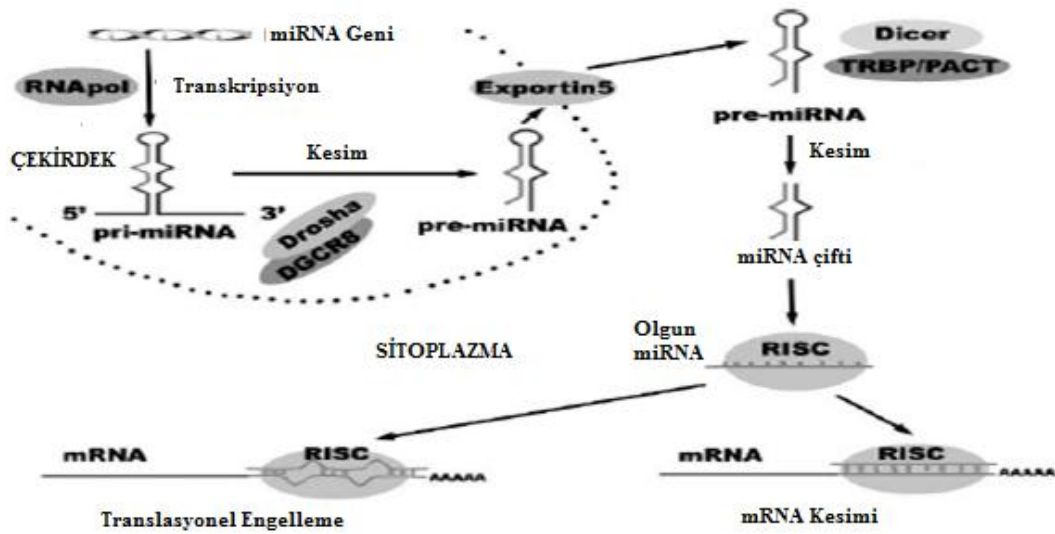
miRNAlar, mRNAları hedefleyerek gen ifadesinin kontrolünde transkripsiyon sonrası mekanizmaları kullanan çoğunlukla korunmuş anahtar epigenetik elemanlardır. miRNAlar hücrelerde büyüme ve farklılaşma, apoptoz, enerji üretimi gibi farklı işlemin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Ayrıca rejeneratif tıp yaklaşımlarının gelişiminin de kritik rolleri bulunmaktadır.

miRNAlar, düzenleyici etkiye sahip kodlayıcı özelliğe sahip olmayan yaklaşık 22 nükleotid uzunluğu olan RNA molekülleridir. Bu RNA molekülleri hücrede gen ifadesini transkripsiyon sonrası mekanizmalarla kontrol ederler (6). Gen regulasyonu ve kontrolündeki bu kritik görevlerinden dolayı tümör gelişimi, apoptoz, hücre üremesi, farklılaşma üzerindeki rollerini anlamak oldukça önemlidir (7). miRNAların ifade profilinin çıkartılması ile kanser sınıflandırılması üzerine yapılmış çalışmalar, kanser tedavisinde miRNA hedefleyen ilaç araştırmaları, miRNA'lar kullanılarak kanser hücrelerinin programlanması bu önemli görevlerinin kullanım alanlarından sadece bazılarıdır (8,9,10). miRNAların teröpatik olarak bu kadar farklı şekillerde kullanılması kanser hücre programlanması sırasında hücrelerin gösterdikleri değişimi takip etmek için biyobelirteç olarak belirlenmelerinin de mümkün olduğunu göstermektedir.

Yetişkin miRNAlar 18 ile 24 nükleotid uzunluklarında olup hedef mRNAların 3' UTR bölgesine bağlanarak gen ifadesinin değişimini sağlarlar (6). Primer miRNAlar hücrede RNA polimeraz II enzimi tarafından transkribe olurlar. Pri-miRNAlar genellikle uzun nükleotid sekansı barındırmaktadır. Bu uzun sekanslı Pri-miRNAlar, mRNAlarla benzer şekilde 5' ucunda bir şapka ve 3' ucunda da poli A uzantısına sahiptir. Sonrasında bu yapı spesifik ikincil saç tokası yapısı oluşturarak Drosha ve temel bir kofaktör olan DGCR8/Pasha içeren mikroşlemci kompleksine alınır. Bu kompleksteki işlem sonucunda yaklaşık 70 nükleotid uzunlukta 5' fosfat ve 3' 2 nükleotid farkı içeren pre-miRNA elde edilir. Çekirdekte oluşan bu

pre-miRNA'lar Exportin-5 (Exp5) molekülü ile sitoplâzma'ya taşınır. Sitoplâzma'ya ulaştıklarında bu pre-miRNAlar Dicer enzimi ile daha da ileri işlemlerden geçerek kısa çift zincirli miRNA: miRNA\* çifti haline getirilir. Son olarak miRNA: miRNA\* çifti Helikaz enzimi ile olgun miRNA ve miRNA\*'ya dönüşecek şekilde çözülür. Olgun miRNAlar asimetrik bir birleşim ile RNA baskılayıcı kompleks (RISC) ile birleşerek gen düzenlenmesinde rol almaya hazır hale gelirler (şekil 2.1) (11).

Genellikle, olgun miRNAlar gen ifadesinin düzenlenmesi rolünü hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanarak gerçekleştirir. Ancak miRNAların hedef mRNA'nın başka bölgelerine bağlanarak görev de alabilirler. miRNA: mRNA etkileşimleri çoğunlukla transkripsiyonel baskılamaya ya da mRNA kesimine sebep olarak ürün protein oluşumunun düşürülmesini sağlarlar. Bu çalışma mekanizmaları ile miRNAların negatif düzenleyici rolü oynamaları mümkün olmuştur. Ancak bazı miRNAlar hedef mRNA transkripsiyon seviyesini direkt olarak mRNA'daki AU bazlarınca zengin bölgelerine bağlanıp bir protein kompleks yapısı oluşturarak, indirekt olarak da hedef protein ürünü seviyesinin artması ile mRNA'ların yeniden baskılanmasını önleyerek arttırırlar (9).



**Şekil 2.1.** Hücrede miRNAların üretimi ve gelişimi (12)

miRNAlar gen ifade kontrolündeki bu önemli görevlerinden dolayı ifadelerinde gözlenebilecek değişiklikler kanserleşme ile bağlantılı olabilir (8).

## **2.2. MİRNA VE KANSER BAĞLANTISI**

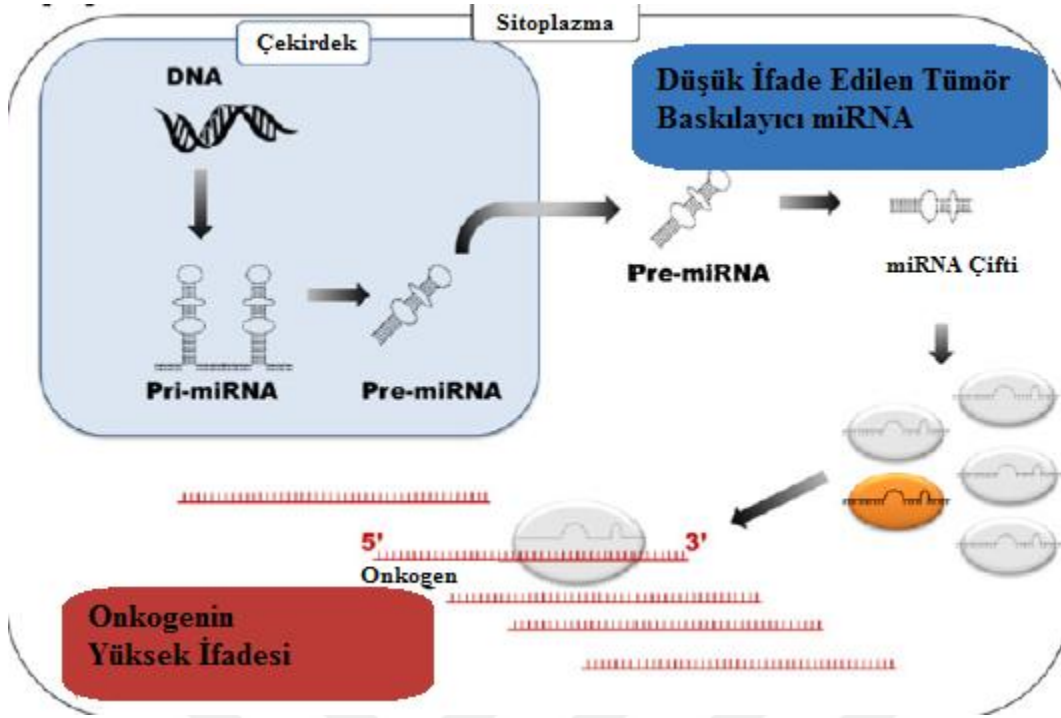
Kanser, normal hücrelerin yaşadıkları çok basamaklı genetik değişiklikler sonucu gözlenen bir durumdur. Kanserleşme sürecinde hücrelerin fenotipi, kontrolsüzce çoğalma, apoptozun baskılanması, farklılaşmanın baskılanması gibi metabolizma yollarında değişimler görülür (13). miRNAlar hücrede çoğalma, farklılaşma, programlı hücre ölümü, gelişme gibi önemli yollarda gen ifadesinin kontrolünde görev aldıklarından dolayı kanser ve metabolik rahatsızlıkların patolojisinde oldukça önemli bir yer tutmaktadırlar (14,15). Kanser hücreleriyle yapılan çalışmalar normal hücreler ile tümör hücreleri arasında miRNA seviyelerinde değişiklikler olduğunu ortaya koymaktadır (16,17).

miRNAların yarısından çoğu genomda kanser bağlantılı bölgelerde ya da hassas konumlarda bulunmaktadır (11). Ayrıca, çoğunun kanserleşme durumunda ifadesinde değişiklikler olduğu gözlenmektedir (18). Bu durum miRNAların kanserde düşünülenden daha önemli rolleri olduğuna işaret etmekte ve bazı miRNAların kanser hücrelerinden ifade seviyelerindeki değişikliklere göre onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak davrandıkları görülmektedir (11,15).

### **2.2.1. Tümör Baskılayıcı miRNALAR**

Onkojenez sırasında bazı miRNAlar kanser hücrelerinde normal hücrelere göre daha düşük seviyelerde ifade edilmektedir. Bu tarz ifadeye sahip miRNAların genel olarak tümör baskılayıcı özellikte oldukları düşünülmektedir. Bu miRNAlar genellikle tümör büyümesinin durdurulması için onkogenleri baskılayarak ya da farklılaşma ve apoptoz gibi metabolik yollar üzerinde görev alan genlerin çalışmasını sağlayacak şekilde görev alırlar (11). Bu miRNAların kanser hücrelerinde ifadelerinin düşürülmesi, kodlayıcı gen bölgelerinde oluşan mutasyonlar onkogenlerin daha yüksek ifade edilmesine ve tümör oluşumunun artmasına sebep olur (Şekil 2.2) (19).

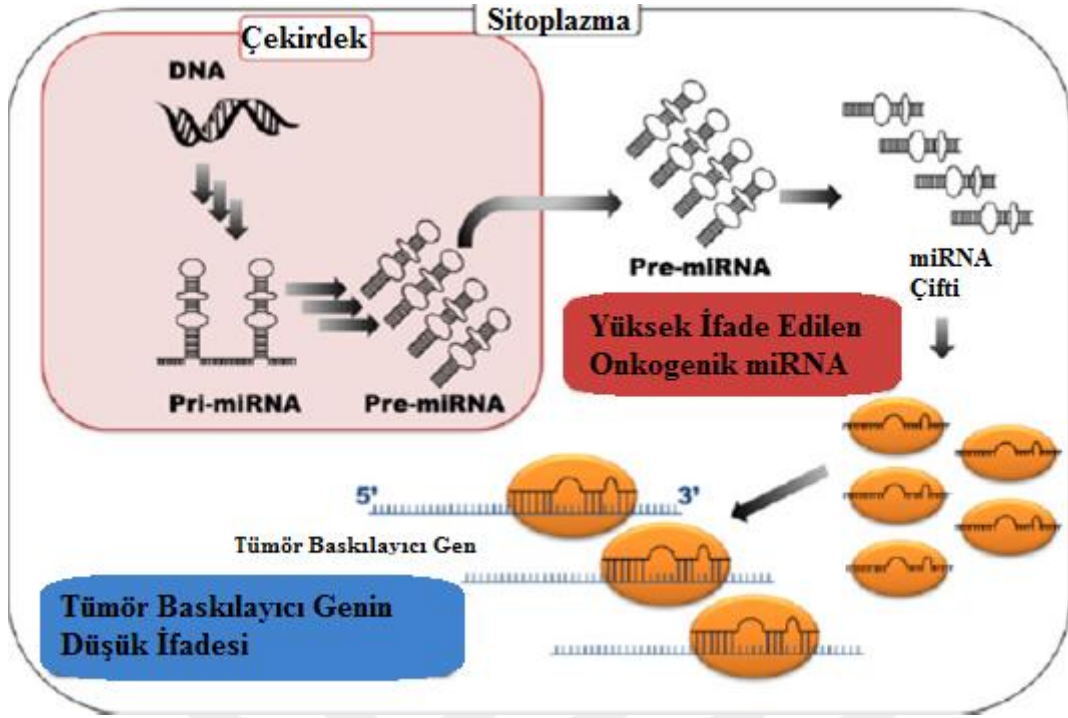




**Şekil 2.2.** Kanser hücresinde tümör baskılayıcı miRNA ifadesinde düşüş ile onkogenlerin aktive oluşu (19)

### 2.2.2. Onkogen Özellikli miRNALAR

Yapılan çoğu araştırma ve klinik analizler sonucunda bazı miRNAların özgün birer onkogen gibi davrandıkları gözlenmiştir. Bu miRNAlar tümör hücrelerinde yüksek seviyelerde ifade edilmekte oldukları için onkogen etkiye sahip oldukları düşünülmektedir. OncomiR olarak adlandırılan bu miRNAlar genellikle tümör gelişimini engelleyecek roller alan genleri hedefleyerek hücre farklılaşması, programlı hücre ölümü gibi metabolik yolların çalışmasını engellerler (Şekil 2.3) (11). Bu miRNAlar ayrıca normal hücrelerde proto-onkogen olarak davranarak hücrelerin fenotiplerinin kanser fenotipine yönelmesinde de rol alırlar (20).

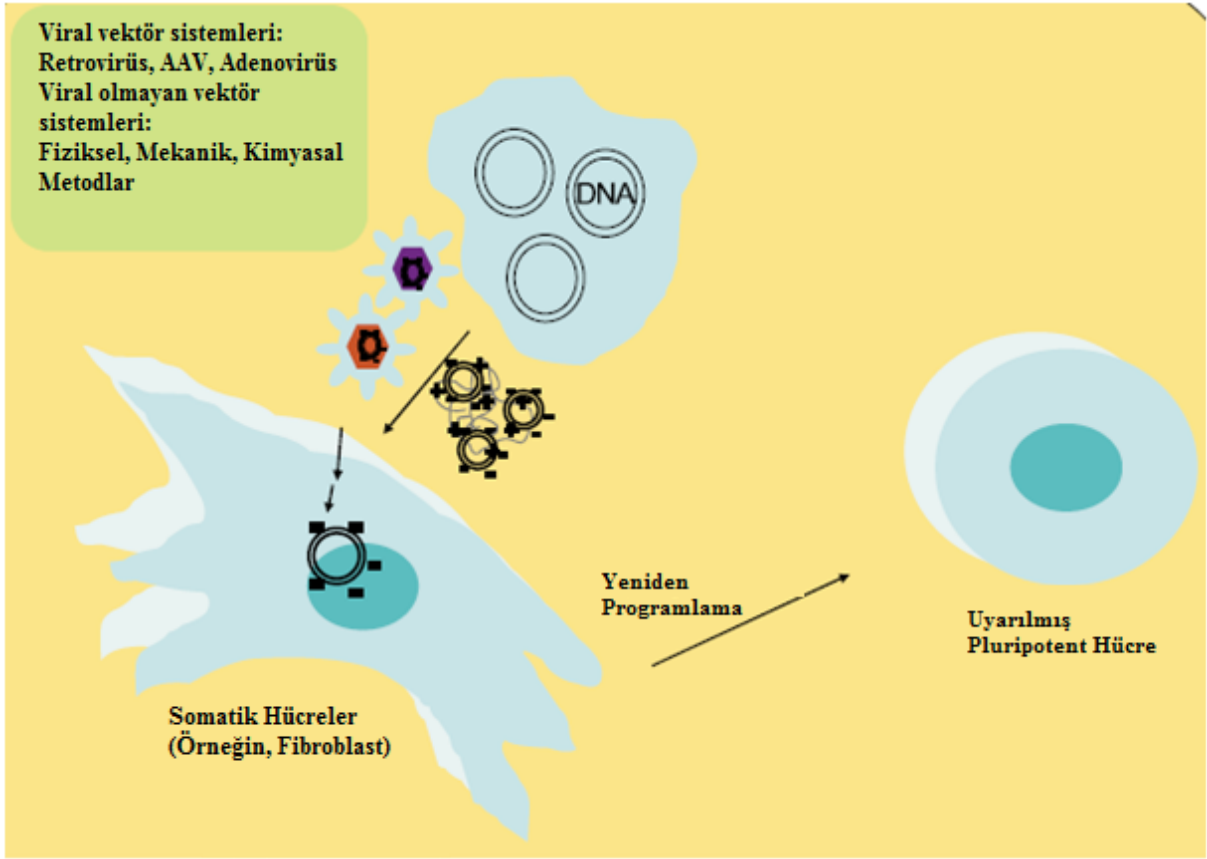


**Şekil 2.3.** Kanser hücrelerinde onkomiR ifadesinde artış ve tümör baskılayıcı genlerin ifadesinin düşüşü (19)

### **2.3. UYARILMIŞ PLURİPOTENT HÜCRELER VE HÜCRE PROGRAMLANMASI**

Çok hücreli organizmaların gelişiminde döllenmiş tek bir hücre bütün organizmayı oluşturacak özelliğe sahip durumdadır. Waddington'a göre farklılaşmış hücreler epigenetik bir tepenin en alt seviyesinde bulunmaktadır ve yukarıya dönüşleri imkânsızdır. Ancak bu düşüncenin doğru olmadığı, Gurdon'un somatik hücrelerin çekirdeklerinin yeniden programlayarak pluripotent bir evreye ulaşmalarını sağlamasıyla gösterilmiştir (21). Gurdon ile oluşan farklılaşmış hücrelerde uyarılmış pluripotentlik elde edilmesi düşüncesi klonlama ve nükleer transfer çalışmaları ile başlamıştır. Özellikle 1950 ve 1960lı yıllarda amfibilerle daha sonrasında da memeliler ile yapılan nükleer transfer çalışmaları genomu farklılaşmış hücrelerde bile geri dönüş olabileceğini göstermiştir. Sonuç olarak hücre çekirdeğinde, hücreleri uyarılmış bir pluripotent evreye sokabilecek yeniden programlama faktörlerinin var olduğu görüşü oluşmuştur (22,23).

Yamanaka, embriyonik kök hücrelerin çekirdekleri ile somatik hücreleri hücre füzyonu ile bir araya getirerek uyarılmış pluripotentlik elde etmeyi başarmıştır. Sonrasında bu hücrelerde pluripotentliği sağladığını düşündüğü 24 embriyonik kök hücre transkripsiyon faktörünü pluripotentliği sağlayacak aday faktörler olarak seçmiştir (1). 2006 yılında Yamanaka, önceki çalışmalarıyla belirlediği aday transkripsiyon faktörlerinden dört tanesini (Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-myc) retroviral yöntemlerle deri fibroblast hücrelerine verip bu faktörlerin ifadelerini arttırarak bu hücreleri uyarılmış pluripotent hale sokmayı başarmıştır (Şekil 2.4) (24,25).



Şekil 2.4. Hücre programlanması çalışma mekanizması (26)

### 2.3.1. İletim Yöntemleri

Somatik hücrelerin pluripotent kök hücre benzeri hücrelere programlanması spesifik transkripsiyon faktörlerinin ifadelerinin değiştirilmesi ile mümkündür. Hücre programlanması için bu transkripsiyon faktörlerinin ifadelerindeki değişimler viral, viral olmayan iletim yöntemleri ve direkt transfeksiyon şeklinde yapılabilmektedir (27).

#### 2.3.1.1. Viral Yöntemler

Genel olarak viral yöntemlerle iletim sistemi, virüslerin enfeksiyona sebep olan bölgelerinin yerine programla faktörlerinin entegre edilmesi ve bu vektörler ile konak hücrelere verilmesi yöntemidir (26). Hücre programlaması ve uPK hücre elde edilmesinde IVVler Retrovirüs ve Lentivirüsler en yaygın kullanılan iletim sistemleridirler. Ancak bu süreç konak hücre genomunda rastgele birden fazla öncül viral kopyaların oluşmasına ve genomik kararsızlıklara sebep vermiştir. Bu sebeple yerlerini PVVlere bırakmışlardır. PVVler bütün programlama faktörlerini tek bir viral yapıda taşıyan entegre özelliği bulunmayan vektörlerdir (28). IVVlerde gözlenen insersiyonal mutasyonların gözlenmediği uPK hücreleri elde edilmesi için

ayrıca Sendai virüsleri, piggyBac sistemi, mini dairesel vektörler, episomal vektörler, direkt protein iletimi ve sentetik mRNA kullanılması gibi birçok farklı metot geliştirilmiştir (29).

### **2.3.1.2. Viral Olmayan Yöntemler**

Viral olmayan iletim sistemleri son zamanlarda büyük ölçüde viral iletim sistemlerinin yerine geçmektedir. Bu vektör sistemleri episomal vektörler, mini dairesel vektörler, sentetik RNA replikonları, yapay insan kromozomları, transpozon sistemleri ve nano partikül taşıyıcılar gibi birden çok viral olmayan vektör sistemini içermektedir (28,30). Viral olmayan yöntemler içinden en yaygın kullanılan episomal vektörler viral sistemlere göre daha az toksik, daha az riskli olmasına rağmen programlama etkinlikleri daha düşüktür (26,27). Bu programlama yöntemi kullanıldığı zaman kullanılan materyal ekstakromozomal DNA şeklinde çekirdekte ifadelendiği için entegrasyon gözlenmez (31).

### **2.3.1.3. Direkt Transfeksiyon**

Vektör tabanlı iletim yöntemleri ile programlama yaklaşımlarına ek olarak direkt transfeksiyon metotları da kullanılmaktadır. Direkt transfeksiyon yapılırken hücrelerin uPK hücrelere dönüşmesinde rol alan programlama faktörleri Oct4, Sox2, Klf4, c-myc (OSKM faktörleri) sentetik olarak üretildikten sonra bu proteinler saflaştırılıp direkt olarak hücreye verilir. Bu verilme yöntemine ek olarak OSKM faktörlerini kodlayan mRNA'lar ile OSKM faktörlerini epigenetik mekanizmalarla kontrol eden miRNA'lar da direkt transfeksiyon yapmak amacıyla hücrelere verilebilir (28,31).

### **2.3.2. Hücre Programlanmasının Uygulama Alanları**

Günümüzde, uPK hücre teknolojisi potansiyel olarak hastalıkları iyileştirmede ve hastalıkların gelişme yollarını araştırmada yeni ve daha önce görülmemiş yolları kullanıma açmış durumdadır. uPK hücre teknolojisi ve alakalı teknolojilerde görülecek ilerlemeler rejeneratif tıp, hastalık modellemesi ve ilaç keşifleri gibi alanlara daha hassas bir bakış getirecektir (22,32).

Hücre programlanması yöntemlerinin uygulama alanlarının başında rejeneratif tıp çalışmaları gelmektedir. İnsan uPK hücreleri farklı birçok fonksiyonu gerçekleştirebilecek somatik hücrelere dönüştürülebilirler. Bu farklılaşmış hücrelerin transplantasyonu ile hastalarda fonksiyonel iyileşme beklenmektedir. Ancak bu yöntemler günümüzde oldukça pahalı ve uzun süreli olduklarından dolayı genel kullanıma açık durumda değildir. Rejeneratif tıp için uPK hücresi Eldesi için kullanılan metotlarda oldukça büyük öneme sahiptir. Genellikle uPK

hücre elde etmek için viral vektörler kullanılmaktadır ve bu yöntemle viral genomun hücre DNA'sına entegre olduğu gözlenmektedir. Bu sebeplerden dolayı da uyarılmış hücreler ciddi zararlar verilebilir durumdadır (22). Ancak hücre transplantasyonu için dinamik modellemeler, kompleks organların bir kısmının hücre kültürü ortamlarında 3 boyutlu olarak yapısal kendini oluşturması gibi yeni yöntemler de geliştirilmektedir (33).

uPK hücre teknolojisinin uygulama alanlarına, rejeneratif tıp çalışmalarının yanında hastalık modellemeleri ve kimyasalların belirlenmesiyle ilaç üretimi de dâhildir. Hastalardan alınan farklılaşmış hücrelerden elde edilen kişiye özel uPK hücreleri ile *in vitro* ortamlarda hastalık fenotipinin yeniden oluşturulması mümkündür. Bu sayede hastalığın gelişimi hakkında bilgilenmek mümkündür (22). Hastalık modellemeleri kullanılarak uPK hücrelerinde farklılaşma süreci boyunca hastalık etkeni kimyasallarda oluşabilecek değişikliklerin gözlenebilmesi ilaç üretimi ve yeni ilaç keşfi için oldukça önemli bir basamak durumundadır (32).

## 2.4. KANSER HÜCRELERİNİN PROGRAMLANMASI VE MİRNALARIN ROLÜ

Hücre programlanması farklılaşmış hücrelerin uyarılmış bir farklılaşmamış evreye geri döndürülmesi durumudur. Bu uPK hücreleri OSKM (Oct4, Sox2, Klf4, c-myc) faktörleri kullanılarak somatik hücrelerden elde edilebilirler. Bu yöntemi kullanarak kanser hücrelerinin programlanması da mümkündür (10). Programlama teknolojisi ile kötü huylu hücrelerin uyarılmış bir duruma döndürülebilir olması kanser hastalık modellemesi ve sonrasında teröpatik yöntemlerin bulunabilmesinde oldukça önemlidir (34). Kanser hücrelerinin programlanması kanserle ilişkili genlerin ve mekanizmaların çalışılmasında ve bu genler ile hücre ortamının programlanma öncesi ve sonrası etkileşimlerinin ortaya çıkartılması için önemli bir çalışma alanıdır (35).

Kolon kanseri ile yapılan çalışmalar sonucunda OSKM faktörlerinin kullanılması sonucunda kanser hücrelerinde pluripotenslik elde edildiği gösterilmiştir. Ancak, programlama için verilen transkripsiyon faktörlerden birisi onkogen c-myc faktörünün genoma entegre olması kaynaklı endişeler bulunmaktadır (10,36). Genoma entegrasyon riskini azaltmak için viral vektörlerin yerini plazmid vektörler almış, c-myc yerine de onkogen özelliği olmayan myc ailesi üyesi olan başka transkripsiyon faktörleri kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca OSKM faktörlerini kodlayan mRNA'lar, hücrelerde epigenetik mekanizmalarda rol alan miRNA'ların direkt olarak kanser hücrelerine verilmesi ve embriyonik kök hücre miRNA ifadelerinin kanser hücrelerinde arttırılarak metabolik programlama yapılması da güvenli entegrasyon gözlenmeyen programlanma yöntemleridir (28,31,37,38). Ayrıca birçok miRNA programlama sırasında OSK faktörleriyle beraber programlamada kullanılabilir ve c-myc yerine kullanılabilir durumdadır (31). Kanser hücresinden uPK hücresi eldesinde miRNA'ların büyük bir önem taşımasının temel sebebi kanser genetik bir rahatsızlık olmasına karşın ilerlemesinde epigenetik değişimlerin tuttuğu yerin oldukça büyük olmasıdır (36).

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Literatürde kanser programlama çalışmaları bulunmaktadır. Ancak çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. Kanser hücrelerinden farklı yöntemlerle uPK hücreleri elde edilmeye çalışılmıştır, ancak bunlardan azı hücre programlamanın tümörjeniteye olan etkisini incelemiştir. Hatta aynı kanser tipi için (örneğin karaciğer) gerçekleştirilen hücre programlaması sonucunda, bir çalışmada tümörjenik özelliklerin azaldığı gösterilirken, diğerinde ise ana kanser hattına göre daha fazla tümörjenik hücre tipleri elde edildiği belirtilmiştir. Bu gibi çelişkili sonuçlar, hücre programlamanın ne gibi koşullar altında terapi potansiyeli taşıdığını gösteren araştırmalara duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır. Literatüre bakıldığında fark edilen diğer bir eksik ise, programlanmış hücreler ile yapılan çalışmalarda kanser mekanizmasını anlamaya çalışan ya da programlamayla elde edilen kanser hastalık modelinin ne şekilde kullanılabileceğini gösteren çalışmaların bulunmamasıdır. Özellikle hücrelerde önemli rolleri olan miRNA'ların programlanmış hücrelerdeki etkisini araştıran ve miRNA temelli biyobelirteç bulan bir çalışmaya rastlanmamaktadır.

Kanser hücrelerinde, hücre düzenleme sisteminde rol oynayan miRNA'lar normal somatik hücrelere göre oldukça farklı ifade edilmektedir. Bu nedenle kanser hücrelerinde görülen miRNA profillerinin hücre programlanması sonrasında elde edilen hücrelerde miRNA profilinin de değişiklik göstermesi beklenmektedir. Bu tez çalışmasıyla yeniden programlama sonrası elde edilecek hücrelerde görülen miRNA profili ile ana kanser hücre hatları arasında gözlenen ifade değişikliklerinin belirlenmesi, bu sayede kanser biyolojisi ve terapisi hakkında yeni bilgiler elde edilmesi de hedeflenmektedir. Son olarak kanser hücrelerinin programlanması ve miRNA ifade profilinin karşılaştırılması sayesinde tümör gelişiminin daha iyi anlaşılabilmesi için biyobelirteç olarak kullanılabilecek miRNA'ların tanımlanması hedeflenmektedir.



## **4. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **4.1. MATERYAL**

#### **4.1.1. Hücre Kültürü ve Programlama**

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Cat. No.14130-094. LifeTechnologies), DMEM (1X) Dulbecco's Modified Eagle medium (Cat.No. 11995-065. LifeTechnologies)

Methanol.(Lot. No. SHBF0179V.SIGMA-ALDRICH), Versene (EDTA) ( Cat. No. BE17-711E. Lot. No. 6MB127.Lonza), Dimethyl Sulfoxide (Cat. No. D2650. Lot. No. RNBF0698SIGMA-ALDRICH)

DMEM/F12+Glutamax™ (Cat. No. 10565-018. gibco Life Technologies), (Attachment Factor. Cat. No. S-006-100.gibco Life Technologies), 2-Mercaptoethanol (Cat. No. 31350-010.Gibco), Trypsin-EDTA (1X) (Cat. No. 25300-054. Gibco), Pen Strep Penicilin Streptomycin (Cat. No. 15140-122.Gibco),Trypsin/ EDTA (Cat. No. CC-5012. Lot. No. 0000556831. Lonza)

Recombinant Human FGF-basic (Cat. No. PHG0264. Invitrogen), KnockOut™ SR. Serum Replacement for ESCs/iPSCs(Cat. No. 10828-010. gibco Life Technologies), CytoTune™-iPS2.0 Sendai programlama kiti (Cat.No.A16517. Lot. No.L2130016.Invitrogen-Life Technologies)

#### **4.1.2. miRNA İzolasyonu ve Mikro Dizin Analizi**

Qiagen miRNA izolasyon kiti (Cat. No. 217004), miRNA işaretleme ve hibridizasyon Kiti (Agilent p/n 5190-0456), Gen ifadesi yıkama buffer kiti (Agilent p/n 5188-5327), MicroRNA Spike-In Kit (Agilent p/n 5190-1934), Universal miRNA Referans Kiti (Agilent p/n 750700), MicroBioSpin 6 Columns (Bio-Rad p/n 732-6221), PCR 96 plate (Eppendorf p/n 951020401).

## 4.2. YÖNTEM

### 4.2.1. KANSERLİ HÜCRE HATLARININ KÜLTÜR ORTAMINDA BÜYÜTÜLMESİ VE PROGRAMLANMASI

Bu araştırmanın amacı programlama sırasında gözlenen miRNA ifade değişiklikleri tespit ederek tümör gelişimi ve kanserleşmeyi işaret edecek biyobelirteçler ortaya çıkartmaktır. Araştırmada iki farklı insan kaynaklı kanser hücre hattı kullanılmıştır. Aşağıdaki Çizelge 4.1’de kullanılan hücre hatlarının idamesi için kullanılan besiyerleri hakkında bilgiler belirtilmiştir. Kullanılan hücre hatlarının özellikleri EK-1 içinde belirtilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Hücre hatlarının idamesinde kullanılan besiyerleri

Hücre Hattı	Hücre Adı	Ortam İçeriği
G-361	Melanoma	DMEM + %10 FBS
MDA-MB-435	Melanoma	DMEM + %10 FBS

İnsan kaynaklı iki değişik kanser hücre hattı G-361 ve MDA-MB-435, Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) besiyerinde, %10 fetal bovin serumu ile 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> ortamında büyütülmüştür. Kültür ortamındaki hücreler büyütüldükten sonra 6 kuyucuklu plakalara alınarak programlanmasının gerçekleştirilmesi için OSKM faktörlerini kodlayan Sendai virüsleri ile transfeksiyon sağlanmıştır. Programlanma öncesi hücreler ile programlanmanın sonrasında elde edilen hücrelerin 2. pasajındaki hücrelerin morfolojileri, sitoplazmik granüle görüntüleri, çekirdek yapıları ışık mikroskopuyla incelenmiş ve karşılaştırma yapılmıştır. Bu kısım Dr. Öğr. Üyesi Açelya Yılmaz Aktuna danışmanlığındaki doktora öğrencisi Hadiseh Taheri tarafından TÜBİTAK 11S897 nolu proje dahilinde yapılmıştır ve bu çalışmadan elde edilen hücreler bu tezde kullanılmıştır.

### 4.2.2. RNA İZOLASYONU

Çalışmanın devamında miRNA ifadelerinin karşılaştırılabilmesi için her iki hücre hattı içinde hem programlanmış hem de programlanma öncesi hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Her iki hücre hattı için de 3’er tekrar olacak şekilde hem programlanmış hem de programlanmamış hatlar için 5 milyon hücre kültür ortamında yetiştirilmiştir. Daha sonrasında örnekler tüplere aktarılmış ve Qiagen miRNA izolasyonu protokolüne uygun olacak şekilde izolasyon gerçekleştirilmiştir. Öncelikle örneklerin homojenizasyonu

sağlanmıştır. Daha sonrasında hücrelerin lizis edilmesi sağlanmıştır. Parçalanmış hücrelerin içerikleri filtrelenmiş ve diğer hücre içeriklerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Diğer hücre içerikleri uzaklaştırıldıktan sonra sırasıyla tüplerdeki tuzların yıkanması, DNA'nın ortamdan uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. Son olarak tüplerdeki membranların yıkanması sonrasında saf RNA eldesi sağlanmıştır. İzolasyon sonrasında her bir örnekten 1,5 µg alınıp 2100 Bioanalyser ile ölçülmüş ve kalite kontrolü gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.3. RNA MİKRODİZİN HİBRİDİZASYONU**

İzolasyonu gerçekleştirilen hücre örnekleri kalite kontrolünü geçtikten sonra hibridizasyon için dilue edilip her teknik tekrar için 100 ng'lik 3 tüp olacak şekilde gruplara ayrılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde daha gerçekçi sonuçlar elde edilebilmesi için 27 günlük örnekler ve programlanmamış hücre grupları aynı hücre hattı için olacak şekilde gruplandırılmıştır.

Toplamda mikrodizin cihazına girecek 12 örnek için öncelikle işaretleme reaksiyon sistemi kurulmuştur. Bu reaksiyona RNA örneklerinin hazırlanması için ilk adım defosforilasyon basamağıdır. Total RNA örnekleri 50 ng/µl olacak şekilde dilue edilmiştir. Sonrasında dilue edilmiş total RNA'nın 2 µl'si 1.5 mL'lik mikrosantrijüf tüplerine alınmış ve buzda bekletilmiştir. Bu sırada bütün örnekler için bir örneğe 2 µl olacak şekilde 13 örneklilik CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) master mix oluşturulmuştur. Bu master mix içinde 0.4 µl 10X CIP Buffer, 1.1 µl işaretleme spike-in'ler ve 0.5 µl CIP bulunmaktadır. Elde edilen master mix her tüpe 2 µl olacak şekilde nazikçe pipetleme yapılarak eklenmiştir. Örnekler hemen önceden hazırlanmış 37 °C ısı bloğuna alınıp 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

Defosforilasyon basamağından sonra hızla denatürasyon basamağına geçilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir örneğe 2.8 µl %100 DMSO eklenir ve 10 dakika boyunca 100 °C'de ısı bloğunda inkübe edilir. İnkübasyon sonrası örnekler hemen buza alınmış ve ligasyon basamağına geçilmiştir. İlk olarak 10X T4 RNA ligaz Buffer 37 C'ye çıkartılmış ve katı parçacıkların tamamı çözülene kadar vortekslenmiştir. Buffer tamamen çözüldükten sonra bir örnek için 4.5 µl olacak şekilde 13 örnek için Ligasyon master mix oluşturulmuştur. Bu master mix içinde 1 µl 10X T4 RNA ligaz Buffer, 3 µl Cyanine3-pCp boyası ve 0.5 µl T4 RNA ligaz bulunmaktadır. Master mix içinde ışığa duyarlı Cyanine3-pCp boyası bulunduğu için çalışmanın bu kısmı gölgede tamamlanmıştır. Master mix'ten her bir tüpe 4.5 µl yavaşça eklenip nazikçe birkaç sefer pipetlendikten sonra örnekler soğuk blokta 16 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.

Örnekler inkübe olurken işaretlenmiş RNA'ların saflaştırılması için mikro bio-spin hazırlanır. Kolonların üstünde yerleşik jelin süspanse edilmesi ve hava kabarcıklarının giderilmesi için kolonlar birkaç kez altüst edilmiştir. Kolonların üst kısmı filtrelili 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpleri yerleştirilmiş ve kolonun yeşil şapka kısmı çıkartılmıştır. Sonrasında jelin süzülürken 2 dakika boyunca ağzı açık şekilde kurutulmuştur. Bütün kolonlar yeterince kurutulduktan sonra mikrosantrifüj tüpleri 2 dakika için 1000 xg hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında kolonlar 2 mL'lik tüplerden çıkartılıp yeni 1.5 mL'lik tüplerin üstüne yerleştirilmiştir. Aynı işlem bir sefer daha tekrarlanmıştır.

İnkübasyonu biten örnek tüplerinin her birine 38.7 µl RNaz içermeyen su eklenip tüplerin toplam hacmi 50 µl'ye tamamlanmıştır. Bu tüplerin içerikleri filtreleri delmeyecek şekilde aktarılmıştır. Örneklerin saflaştırılması için 1.5 mL'lik tüplere yerleştirilmiş kolonlar 1000 xg hızında 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında kolonlar atılıp miRNA içeren tüpler ağızları kapatılarak buza alınmıştır. Tüp içeriklerinin hafif pembe, şeffaf olup olmadığı kontrol edildikten sonra saflaştırılmış RNA içeren yaklaşık 50 µl'lik tüpler elde edilmiştir. Örneklerin tamamen tüplere yapışmasının sağlanması için tüpler ağızları açık şekilde vakum konsantratörüne yerleştirilip 1 saat boyunca orta hızda 45-55 °C arasında kurutulmuştur.

RNA örnekleri kurutulurken 10X bloke edici ajan hazırlanmıştır. Kitten liyofilize şekilde çıkan 10X bloke ajan tüpüne 125 µl nükleaz içermeyen su eklenmiş ve düşük hızda vortekslenip sonrasında 5 dakika 37 °C' de tutulmuştur. İyice karışmış tüpler son olarak 17000 g hızda santrifüj edilmiştir.

Örnekler buzda bekletilirken ısı bloğu 100 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. Buz üzerinde kurutulmuş örneklere 17 µl nükleaz içermeyen su pipetleme yapılarak eklenmiştir. Sonrasında her bir örneğe 3 sefer dilue edildikten sonra 1µl hibridizasyon spike-in solüsyonu eklenmiştir. Sonrasında her bir örneğe 4,5 µl 10X bloke ajanı eklenmiş ve tüplerin hacimleri 45 µl olacak şekilde 22,5 µl 2X Hi-RPM hibridizasyon buffer eklenmiştir. Tüplerin iyice karışması için çok hızlı olmayacak şekilde tüpler vortekslenmiştir. Tüpler daha sonrasında 100 C'de hazırlanmış olan ısı bloklarında 5 dakika inkübe edilmiş ve sonrasında hemen buzlu suya transfer edilip 5 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Buzda bekleyen tüpler dibe inen işaretlenmiş miRNA'ların karışması için birkaç saniye için santrifüj edilmiştir. Sonrasında hemen mikrodizin cihazına koyulacak hibridizasyon odalarının hazırlanması basamağına geçilmiştir. Kitin içinden çıkan işaretlenmiş ve 8 odacığa ayrılmış tabanlar çıkartılıp doğru yüzün çevrili olduğundan emin olunmuştur. Tüpler 8'er gruplara ayrılıp her bir tüpün

içeriğinin tamamı cam yüzey üzerindeki bir odacığının merkezine hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde pipetlenmiştir. Daha sonrasında hibridizasyon oligoları olan cam yüzeyler örnekler bulunan lamaların üstüne yerleştirilmiş ve sandviç dizinler elde edilmiştir. Lamın cam yüzeyindeki sayısal barkodun üste olduğu ve dizinlerin doğru yerleştirilip edilmediği tekrar kontrol edilmiştir. Sonrasında dizin lamalarının arasında boşluk kalmasının önlenmesi için kıskaç mekanizmalarının arasına alınıp sıkıca kapatılmıştır. Lamalar arasında örneklerin akışkan bir şekilde hareket edip etmediğinin kontrol edilmesi için kıskaçlar hala sıkıca kapalıyken dizin aşağı yukarı şekilde hareket ettirilmiş ve örneklerin bulunduğu sıvı içeriğin homojen bir şekilde her yöne hareket ettiği doğrulanmıştır. Sonrasında dizinler 20 saat boyunca 55 °C'de 20 rpm hızla dönecek şekilde hibridizasyon rotatoruna yerleştirilmiştir.

Dizinler 20 saat boyunca hibridize olduktan sonra Triton X-102 gen ifadesi yıkama bufferları hazırlanmıştır. 3 farklı kap içinde ilk ikisine oda ısısında GE yıkama buffer 1, sonuncuya da 37 C'de GE yıkama buffer 2 eklenmiştir. Dizinlerin kıskaçları çıkartılmadan dizin hibridizasyonun sonlanması için GE buffer 1 olan ilk kaba alınmıştır. Sonrasında içinde manyetik karıştırıcı olan GE buffer 1 içeren kaba alınmış ve 5 dakika boyunca buffer içinde karıştırılmışlardır. Sonrasında 37 C'de bekleyen GE buffer 2 başka bir kaba eklenmiş ve dizinler yine manyetik karıştırıcılarla birlikte bu kaba aktarılıp 5 dakika da burada tutulmuştur. Dizinler sırayla çıkartılıp hareket edebilen baloncukların olduğu kontrol edilmiştir. Dizinler numaralı barkot yüzü üste gelecek şekilde yerleştirilip kıskaçlar dikkatlice açılmış ve dizinler hızlıca GE buffer 1 içeren kaplara yeniden alınmış ve barkotlu kısımdan tutularak yıkama buffer ile yıkanabilmesi için sandviç dizinler pensler yardımıyla hareket ettirilmiştir. Örnekleri içeren lam yine pensler yardımıyla alınıp GE buffer 2 içeren kaba alınmıştır. GE buffer kabının 37 C'de olduğundan emin olunmuştur. Sonrasında lamalar üzerinde sıvı damla oluşmayacak şekilde yavaşça çıkartılıp dizin cihazına yerleştirileceği lam tutuculara kenarlarından tutularak yerleştirilmiş ve dizinler cihaza numaralı barkot arka kısma gelecek şekilde yerleştirilmiş ve mikro dizin cihazıyla okuma hemen başlatılmıştır. Bu kısım Erasmus Staj programı dahilinde gitmiş olduğum Dresden Teknik Üniversitesi nanoteknoloji ve materyal bilimler enstitüsü aracılığıyla, Max Planck moleküler hücre biyolojisi ve genetiği enstitüsü moleküler genetik araştırma bölümünde gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.4. MİKRODİZİN VERİLERİNİN ANALİZİ**

Mikro dizin cihazından elde edilen veriler GeneSpring programı üzerinden analiz edilmiştir. Analiz sırasında her iki hücre hattı için ayrı olacak şekilde programlanmış ve ana kanser

hatlarının arasında ifadeleri değişen miRNA'lar belirlenmiştir. Program üzerinde gruplar oluşturulduktan sonra program içinde hazır olan algoritmaya göre programlanma öncesi ve sonrası miRNA'lar her iki hücre hattı için ayrı olacak şekilde dağılım haritaları elde edilmiştir.

Her iki hücre hattı için de miRNAların değişiklik göstermeleri için uygulama içine kurulu bir algoritmaya bağlı kalınarak t testi gerçekleştirilerek ifadesi değişen miRNAlar ayırt edilmiştir. Her iki hücre hattı için moderated t test yöntemi kullanılmış olup FDR kontrolü Benjamini Hochberg hesaplamasına göre gerçekleştirilmiştir. Bu algoritmalara göre elde edilen sonuç miRNAlar en az 2.0 kat değişimi olacak şekilde analiz edilmiştir. Her iki hücre hattı için de bu özellikleri taşıyan miRNA'lar içinde son olarak p değeri 0.05 sınırı seçilmiştir. MDA-MB-435 hücre hattında bütün bu işlemler sonrası elde edilen miRNA sayısının yüksekliğinden dolayı daha gerçeğe yakın ve biyobelirteç seçim alanını daraltmak amacıyla p değeri 0.001 olacak şekilde düşürülmüştür.

#### 4.2.5. MİKORNA HEDEF GEN BELİRLEME ANALİZLERİ

Bütün istatistik analizleri GeneSpring uygulamasında gerçekleştirildikten sonra her iki hücre hattı için de olası biyobelirteç miRNAlar seçilmiştir. Bu seçilen miRNA'ların hedefledikleri genleri belirlemek ve bu sayede düzenlenmesini kontrol ettikleri metabolik yolları anlamak amacıyla miRNA-hedef Gen veritabanları kullanılmıştır. Her iki hücre hattı için de seçilen veritabanları sırasıyla TargetScan, TargetSpy ve miRWalk veritabanlarıdır. Bunlar içinde özellikle sonuçları doğrulayıcı özellik taşıması amacıyla miRWalk veritabanında sadece validasyonu yapılmış hedef genler kullanılmıştır. Bu sayede her üç veritabanında da ortak gösterilen genlerin hepsi validasyonu yapılmış genler olması hedeflenmiştir.

0.999989	mir-1182	NM_004863	4025-4076	TCCACATTCATGAAGATTATGAATTGTTAGGACAGCCAGGGCAAGATAGACCCTG      :        CAGUGUAGGGA-----GGGU-----UCUGGGAG	-17.89
0.999988	mir-1182	NM_020708	60-98	GCCGCG-CCC-CCCGCGCTGTCAACCGTTTACATACAGACCCTG : :      :       CAGUGUAGGGAGGGU-----UCUGGGAG	-24.69
0.999986	mir-1182	NM_020778	1915-1959	CATCATTGAGCAGACATATACTGAGTGCTACTTTATGCC-AGACCCTG      :             CAGUGUAGGG-----AGGUUCUGGGAG	-17.29
0.999984	mir-1182	NM_005748	1340-1391	ATCACAATAGACATCATGATAACATTTGAGAAAAATAAACTGTAGACCCTA       :         CAGUGUAGGGAG-GGU-----UCUGGGAG	-16.31
0.999984	mir-1182	NM_001077484	2332-2374	TGTATGTTTCTCTAAATTGTTGTTGACTGAATATAATAGACCCTA : :     :       CAGUGUAGGGAGGGU-----UCUGGGAG	-19.83
0.999984	mir-1182	NM_030674	2332-2374	TGTATGTTTCTCTAAATTGTTGTTGACTGAATATAATAGACCCTA : :     :       CAGUGUAGGGAGGGU-----UCUGGGAG	-19.83

Şekil 4.1. TargetSpy veritabanı analiz sonuç listesi

Şekil 4.1’de TargetSpy veritabanında MDA-MB-435 hücre hattı için seçilen miR-1182 ile yapılan analiz sonrası elde edilen verilerinin bir kısmı görünmektedir. Analiz sonuçları hedef genlerin tamamını içeren bir Excel dosyası şeklinde kaydedilmiş ve sonrasında genler referans numaralarına göre kontrol edilerek belirlenmiştir.

Gene	ENST	Gene	Count	Site	UTR	5'	3'	5'	3'	miR-1182	Score	Score
MTRNR2L8	ENST00000536684.1	MT-RNR2-like 8	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1182	-0.87	-0.87
MTRNR2L11	ENST00000604646.1	MT-RNR2-like 11 (pseudogene)	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1182	-0.85	-0.85
HBD	ENST00000380299.3	hemoglobin, delta	262	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1182	-0.85	-0.85
MTRNR2L10	ENST00000545075.1	MT-RNR2-like 10	7	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1182	-0.84	-0.84
MTRNR2L1	ENST00000540040.1	MT-RNR2-like 1	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1182	-0.79	-0.79
MRPL2	ENST00000487429.1	mitochondrial ribosomal protein L2	935	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1182	-0.74	-0.74
NPSR1	ENST00000381539.3	neuropeptide S receptor 1	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1182	-0.74	-0.74
HTN3	ENST00000530128.1	histatin 3	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1182	-0.73	-0.73
UBBP4	ENST00000583708.1	ubiquitin B pseudogene 4	5	Sites in UTR	2	0	2	0	3	hsa-miR-1182	-0.72	-0.72
JTB	ENST00000271843.4	jumping translocation breakpoint	872	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1182	-0.69	-0.69
HSPB6	ENST00000587965.1	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	121	Sites in UTR	2	1	1	0	0	hsa-miR-1182	-0.64	-0.68
CTB-58E17.5	ENST00000539023.1	Uncharacterized protein; cDNA FLJ52623	12	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-miR-1182	-0.63	-0.63
KRBOX4	ENST00000360017.5	KRAB box domain containing 4	162	Sites in UTR	2	1	0	1	0	hsa-miR-1182	-0.63	-0.63
FOXJ3	ENST00000372571.1	forkhead box J3	329	Sites in UTR	2	1	0	1	0	hsa-miR-1182	-0.60	-0.60
SPRED3	ENST00000587013.1	sprouty-related, EVH1 domain containing 3	42	Sites in UTR	5	1	3	1	0	hsa-miR-1182	-0.59	-0.93
THBS3	ENST00000368378.3	thrombospondin 3	171	Sites in UTR	3	0	3	0	0	hsa-miR-1182	-0.59	-0.59

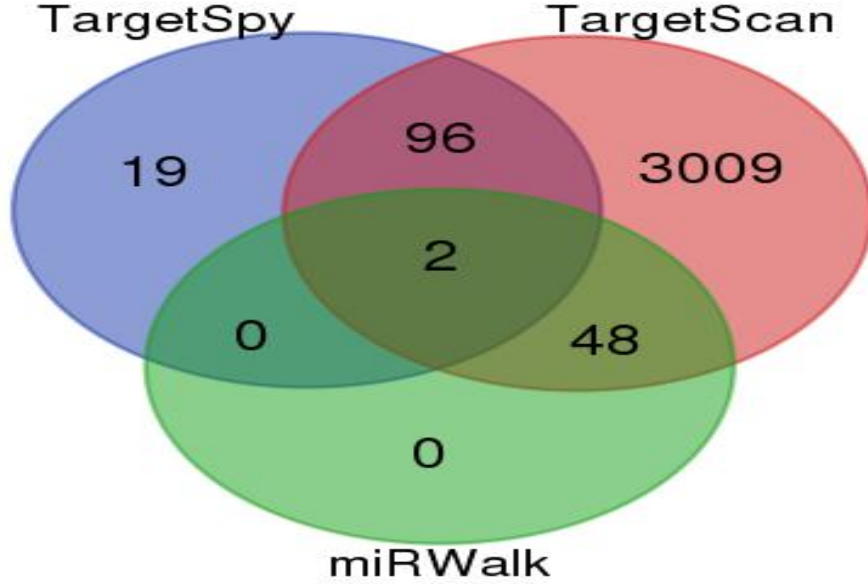
Şekil 4.2. TargetScan veritabanı analiz sonucu

Hedef gen belirlenmesinde kullanılan diğer veritabanı TargetScan analizi sonucu Şekil 4.2’de gösterildiği gibidir. Bu veritabanında miRNA korunmuşluğu temeline göre analiz gerçekleştirildiğinden ve miR-1182 korunmuş miRNA bölgelerinde yer almadığından dolayı hedef genler sekans uyumuna göre validasyonu yapılmamış, biyoinformatik olarak tahmini hedef gösterilen genlerden oluşmaktadır. Bu nedenle miR-1182 tarafından hedeflenen gen sayısı oldukça yüksek görünmektedir.

miRNA	MIMATID	Gene	EntrezID	PMID
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">OARD1</a>	221443	<a href="#">23446348</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">SEC14L5</a>	9717	<a href="#">21572407</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">PCSK9</a>	255738	<a href="#">24398324</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">IFRD1</a>	3475	<a href="#">20371350</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">CIRH1A</a>	84916	<a href="#">22012620</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">GTF3C4</a>	9329	<a href="#">23313552</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">PRR11</a>	55771	<a href="#">21572407</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">ZNF622</a>	90441	<a href="#">24398324</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">PAGR1</a>	79447	<a href="#">20371350</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">PPIC</a>	5480	<a href="#">22012620</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">MAU2</a>	23383	<a href="#">23313552</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">AP1S1</a>	1174	<a href="#">21572407</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">NANOS1</a>	340719	<a href="#">23824327</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">PGAM5</a>	192111	<a href="#">20371350</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">CHRN1</a>	1140	<a href="#">22012620</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">TSKU</a>	25987	<a href="#">23313552</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">RB1</a>	5925	<a href="#">21572407</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">KLHL3</a>	26249	<a href="#">23824327</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">ZNF622</a>	90441	<a href="#">20371350</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">SLC4A1</a>	6521	<a href="#">22012620</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">PRDM10</a>	56980	<a href="#">23313552</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">COL13A1</a>	1305	<a href="#">21572407</a>
<a href="#">hsa-miR-1182</a>	MIMAT0005827	<a href="#">RANGAP1</a>	5905	<a href="#">23824327</a>

Şekil 4.3. miRWalk veritabanı analizi sonrasında miR-1182 için valide edilmiş hedef genler listesi

Son olarak kullanılan veritabanı miRWalk olup burada miR-1182 için sadece valide hedef genler üzerinde analiz yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen listenin bir kısmı Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. MDA-MB-435 miRNA Gen hedef veritabanları venn diyagramı

MDA-MB-435 hücre hattı için ifadesi değişen miRNA’lar içinden seçilen miR1182 için hedeflenen genlerin belirlenmesi için kullanılan miRWalk, TargetScan ve TargetSpy veritabanlarında gerçekleştirilen analiz sonrasında yapılan karşılaştırma ile hepsinde ortak bulunan ve bulunmayan genler belirlenmiştir ve venn diyagramı Şekil 4.4’de verilmiştir.

0.999986	mir-199a-3p	NM_018035	329-372	CTGCCATTTCITGCAGGGACCCCTGACTGACACAGGGGCTACTACTGA :                 AUUGGUUAC--ACGUC-----UGAUGACA	-16.60
0.999986	mir-199a-3p	NM_015176	568-593	TGACTATATATTTTTATAA ACTACTGG  :   :        AUUGGUUACACGUC----UGAUGACA	-10.50
0.999978	mir-199a-3p	NM_138714	895-913	GACTATTAAATAT-ACTACTGG    :        AUUGGUUACACGUCUGAUGACA	-12.36
0.999978	mir-199a-3p	NM_006599	895-913	GACTATTAAATAT-ACTACTGG    :        AUUGGUUACACGUCUGAUGACA	-12.36
0.999978	mir-199a-3p	NM_001113178	895-913	GACTATTAAATAT-ACTACTGG    :        AUUGGUUACACGUCUGAUGACA	-12.36
0.999978	mir-199a-3p	NM_173214	895-913	GACTATTAAATAT-ACTACTGG    :        AUUGGUUACACGUCUGAUGACA	-12.36

Şekil 4.5. G361 hücre hattında miR-199a için TargetSpy veritabanı hedef gen listesi

MDA-MB-435 hücre hattında olduğu gibi aynı analizler G361 hücre hattı için de gerçekleştirilmiştir. TargetSpy ile gerçekleştirilen analiz sonrasında elde edilen genlerin listesi Şekil 4.5’de görüldüğü gibidir. G361 için biyobelirteç olarak seçilen miR-199a’nın genel



olarak korunmuş miRNAlardan biri olmasından dolayı skor güvenilirliği hassas olacak şekilde seçilmiştir. Aynı şekilde Şekil 4.6'da gösterilen TargetScan veritabanında yapılan analiz için de korunmuş miRNAlar arasından seçim yapılmış olmasından dolayı daha hassas gen hedefleme analizi gerçekleştirilmiştir.

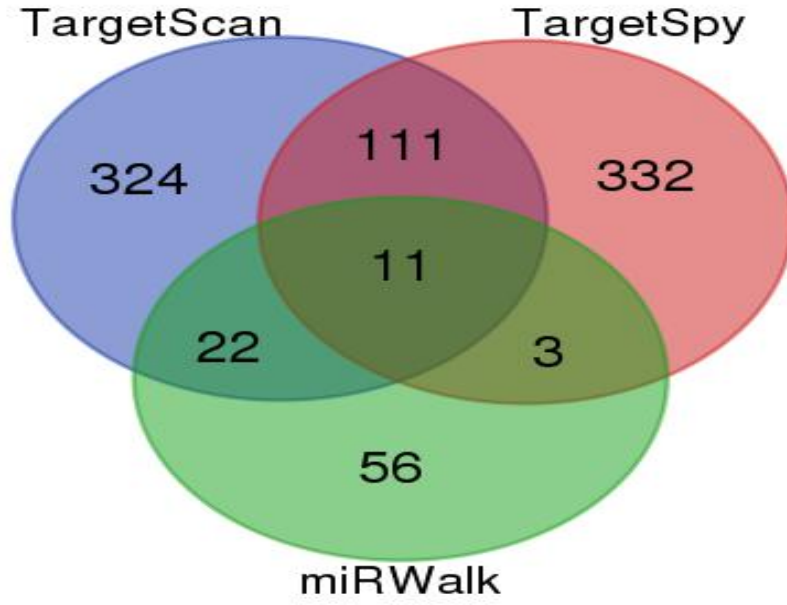
KLHL3	ENST00000541417.1	kelch-like family member 3	40	Sites in UTR	3	1	1	1	1	0	1	0	3	hsa-miR-199a-3p
SERPINE2	ENST00000409304.1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	1372	Sites in UTR	1	1	0	0	1	0	1	0	0	hsa-miR-199a-3p
TMSB4X	ENST00000451311.2	thymosin beta 4, X-linked	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-199a-3p
PAWR	ENST00000328827.4	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	1872	Sites in UTR	1	1	0	0	1	0	0	1	1	hsa-miR-199a-3p
NLK	ENST00000407008.3	nemo-like kinase	61	Sites in UTR	1	1	0	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-199a-3p
QKI	ENST00000392127.2	QKI, KH domain containing, RNA binding	323	Sites in UTR	3	0	3	0	1	0	1	0	1	hsa-miR-199a-3p
GNA12	ENST00000275364.3	guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12	565	Sites in UTR	2	1	0	1	1	0	0	1	0	hsa-miR-199a-3p
PAK4	ENST00000599386.1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4	130	Sites in UTR	2	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-199a-3p
DEPDC1B	ENST00000265036.5	DEP domain containing 1B	449	Sites in UTR	1	1	0	0	1	0	0	1	0	hsa-miR-199a-3p
BCAR3	ENST00000370247.3	breast cancer anti-estrogen resistance 3	321	Sites in UTR	1	1	0	0	1	0	1	0	0	hsa-miR-199a-3p
NOVA1	ENST00000465357.2	neuro-oncological ventral antigen 1	5	Sites in UTR	2	1	1	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-199a-3p
PON2	ENST00000536183.1	paraoxonase 2	597	Sites in UTR	1	1	0	0	0	0	0	0	1	hsa-miR-199a-3p
FAM199X	ENST00000493442.1	family with sequence similarity 199, X-linked	856	Sites in UTR	2	2	0	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-199a-3p
CYB5R4	ENST00000369681.5	cytochrome b5 reductase 4	329	Sites in UTR	1	1	0	0	0	0	0	0	2	hsa-miR-199a-3p
CD2AP	ENST00000359314.5	CD2-associated protein	145	Sites in UTR	1	1	0	0	1	1	0	0	0	hsa-miR-199a-3p
MCFD2	ENST00000444761.2	multiple coagulation factor deficiency 2	1648	Sites in UTR	1	0	1	0	2	0	2	0	1	hsa-miR-199a-3p
UPRT	ENST00000373379.1	uracil phosphoribosyltransferase (FUR1) homolog (S. cerevisiae)	943	Sites in UTR	1	1	0	0	0	0	0	0	1	hsa-miR-199a-3p

Şekil 4.6. TargetScan analizi sonrası hedef gen listesi

Diğer iki veritabanında yüksek hassasiyetle analiz gerçekleştirilmiş olmasına rağmen sonuçlar yine de valide edilmiş genlerden oluşmamaktadır. Bu nedenle miRWalk veritabanında yapılan analizler tamamen valide edilmiş genler içinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarını Şekil 4.7'de gösterildiği gibidir.

hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	FUT4	2526	22411914
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	CREBZF	58487	21572407
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	SGPL1	8879	23592263
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	CSRP2	1466	23592263
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	MAPK9	5601	18456660
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	ID2	3398	22291592
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	STC2	8614	20371350
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	PAQR5	54852	24906430
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	GFPT2	9945	21572407
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	UCK2	7371	23592263
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	HLA-B	3106	23592263
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	MAPK1	5594	18456660
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	RGS17	26575	22291592

Şekil 4.7. miRWalk veritabanı hedef gen analiz sonuç listesi



**Şekil 4.8.** G361 miRNA hedef genler venn diyagramı

G361 hücre hattı için hedef miRNA, olarak seçilen miR199a-3p için hedef genlerin belirlenmesi için MDA-MB-435 hücre hattında kullanılan veritabanları kullanılarak her birinde ortak olarak hedeflenen genler belirlenmiştir. Her üç veritabanında da ayrı ayrı ve hepsinde ortak bulunan genlerin venn diyagramı Şekil 4.8 üzerinde verilmiştir.

## **5. ARAŞTIRMA BULGULARI**

Melanoma hücrelerinin programlanması işlemi yapılmış hücre kültürü boyunca hücrelerin fiziksel değişimleri yorumlanmıştır. Daha sonrasında mikrodizin ile karşılaştırma işlemleri, miRNA tanımlama analizleri gerçekleştirilmiş ve MDA-MB-435 melanoma hücre hattı ve G-361 melanoma hücre hattı için sonuçlar ayrı ayrı yorumlanmıştır.

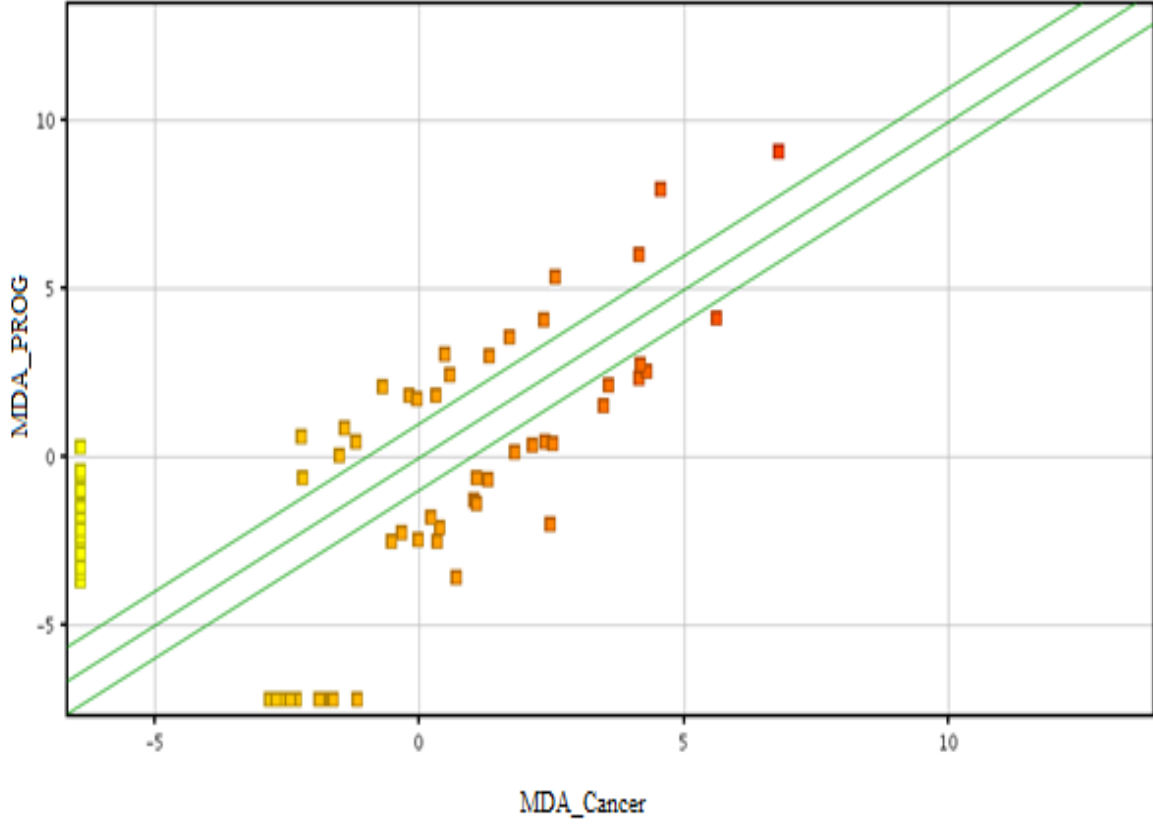
### **5.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARINDA MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLEME ANALİZLERİ**

Melanoma hücrelerinin morfolojileri, sitoplazmik granüle ve çekirdek görüntüleri ile kültür ortamındaki koloni görüntüleri programlama öncesinde ışık mikroskobu altında incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Melanoma hücre hatlarının Sendai viral vektörleri yardımı ile Yamanaka faktörleriyle transfekte edilmesi ile programlama gerçekleştirildikten sonra hücre kültürlerinin izlenmesiyle ters mikroskopta görüntüler elde edilmiştir. Hücrelerin programlama devam ettikçe epidermal deri hücrelerine has mekik morfolojisinin daha yuvarlak bir forma geçtiği ve kümelenerek büyüdüğü gözlenmiştir. Programlama öncesi ve sonrası için mikroskobik görüntüler iki hücre hattı için de sırasıyla EK-3’de verilmiştir.

### **5.2. MİKRODİZİN İLE KANSER HÜCRE HATLARININ PROGRAMLAMA ÖNCESİ VE SONRASI MİRNA İFADELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

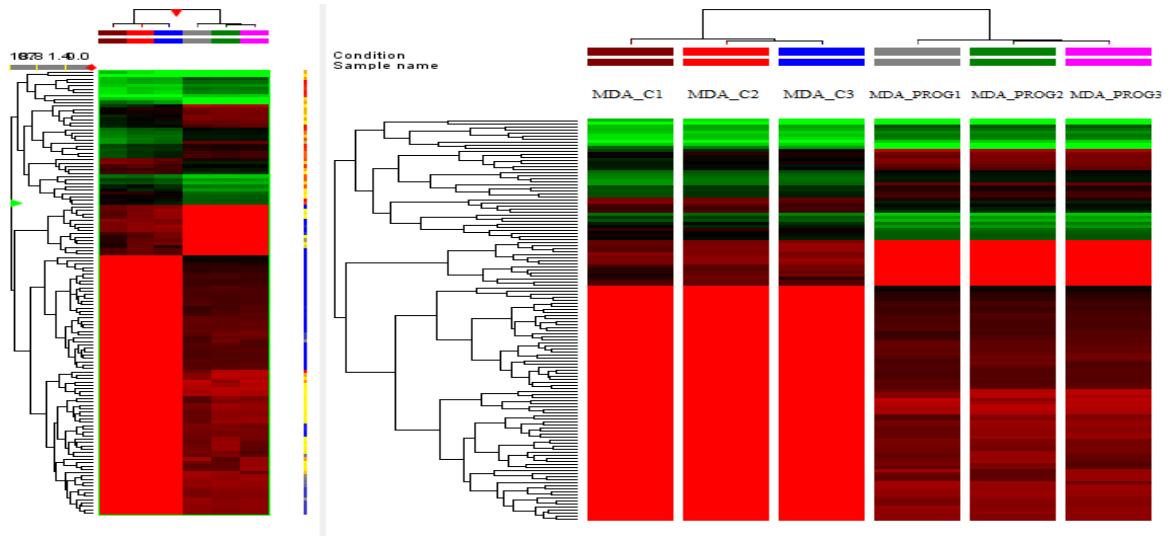
#### **5.2.1. MDA-MB-435 Hücre Hattının Programlanması Sonrası miRNA İfadelerinin Karşılaştırılması**

Mikrodizin cihazı ile hibridizasyonu yapılmış olan hücre hatlarının programlanma öncesi ve sonrası miRNA ifadeleri birbirleri ile karşılaştırılmış ve sonuçlar Şekil 5.1’de gösterilmiştir. GeneSpring yazılımı üzerinden yapılan veri analizlerinde MDA-MB-435 melanoma hücre hattında t testi kullanılarak yapılan karşılaştırma sonrasında 0.001 p değerinde programlanma öncesi ve sonrası bazı miRNA’ların ifade edilme seviyelerinde ciddi değişimler gözlemlenmiştir.



**Şekil 5.1.** MDA-MB-435 hücre hattında programlama öncesi ve sonrası farklı ifade edilen miRNA dağılım grafiği

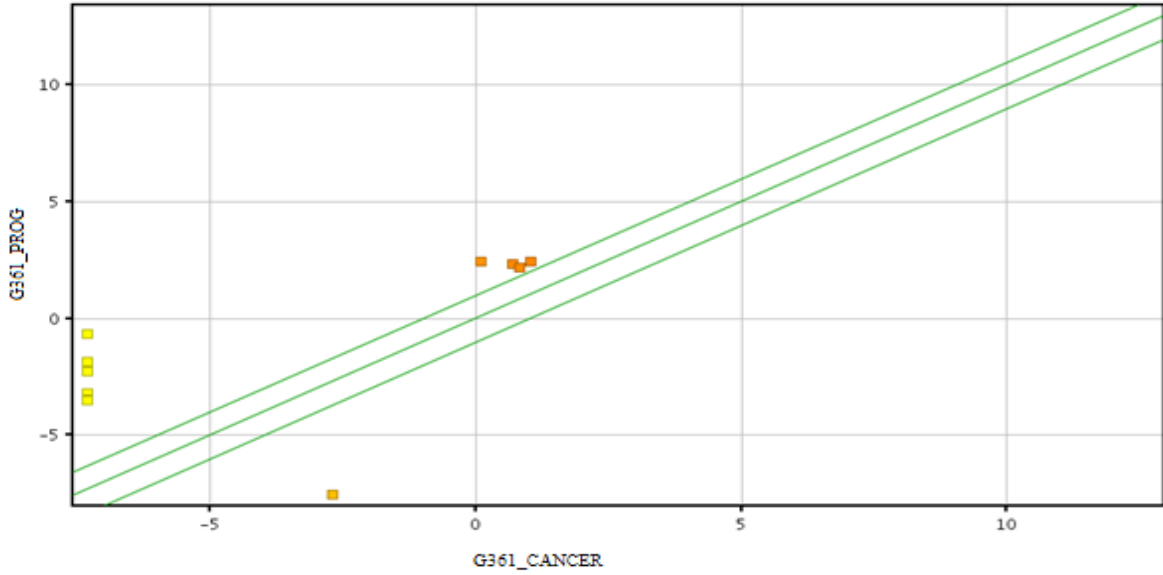
Ayrıca bu miRNA'ların programlama öncesi ve sonrası ifade değişimlerine göre hem içlerindeki yakınlıkları hem de ifade değişim profillerinin gösterildiği ısı haritası da aşağıda Şekil 5.2'de verilmiştir.



**Şekil 5.2.** MDA-MB-435 hücre hattında değişim gözlenen miRNA'ların ısı haritalama dağılım sonuçları

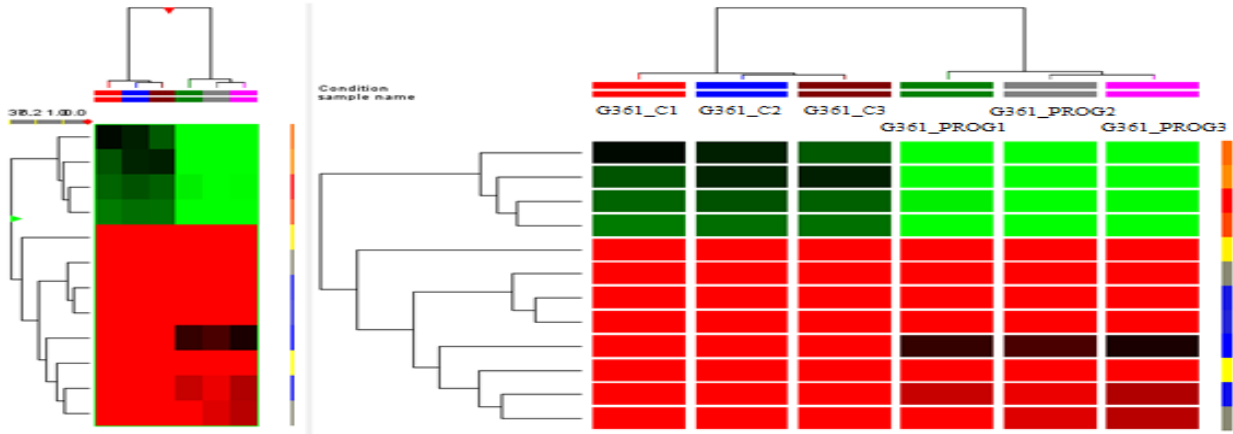
## 5.2.2. G361 Programlanması Sonrası miRNA ifade Değişimlerinin Karşılaştırılması

G-361 melanoma hücre hattı için GeneSpring programında yapılan analiz sonrasında ifade değişimi görülen miRNAlar karşılaştırılmıştır. Bu hücre hattında t testi doğruluk oranı 0.05 p değerinde tutulmuş olup ifadesinde değişim gözlenen miRNA dağılım grafiği aşağıdaki Şekil 5.3'de gösterilmiştir.



**Şekil 5.3.** G361 hücre hattında programlama öncesi ve sonrası farklı ifade edilen miRNA dağılım grafiği

G361 hücre hattında t testi yardımıyla programlama sonrasında ifade seviyesinde değişim olduğu belirlenen miRNA'ların ısı haritası çıkartılmıştır. Şekil 5.4'de görüldüğü programlama sonrasında ifadesi değişen miRNA'lar genellikle kanser durumunda düşük ifade edilirken programlamayla ifadeleri artmıştır.

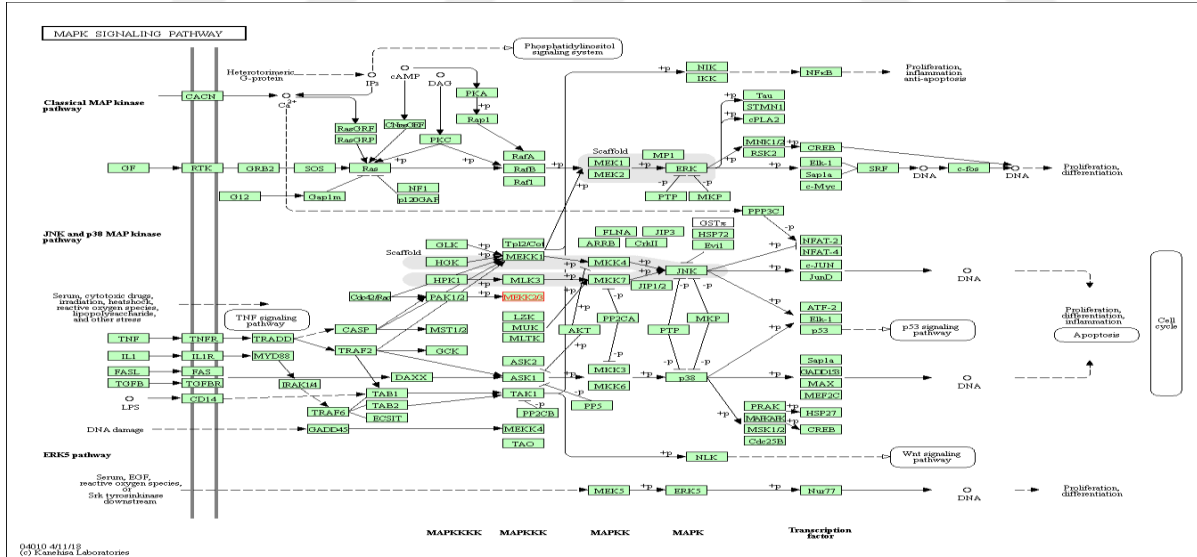


**Şekil 5.4.** G361 hücre hattında programlama öncesi ve sonrası miRNA'ların ifade değişimlerinin gösterildiği ısı haritalaması

### 5.2.3. miRNA Hedef Gen Yolak Analizleri

Her üç veritabanında da ortak olarak bulunan genler belirlendikten sonra her iki hücre hattı için de, biyobelirteç olarak seçilen miRNAlar tarafından hedeflenen genlerin hangi metabolik yollarda görev aldığı belirlenmesi amacıyla KEGG veritabanı kullanılmıştır.

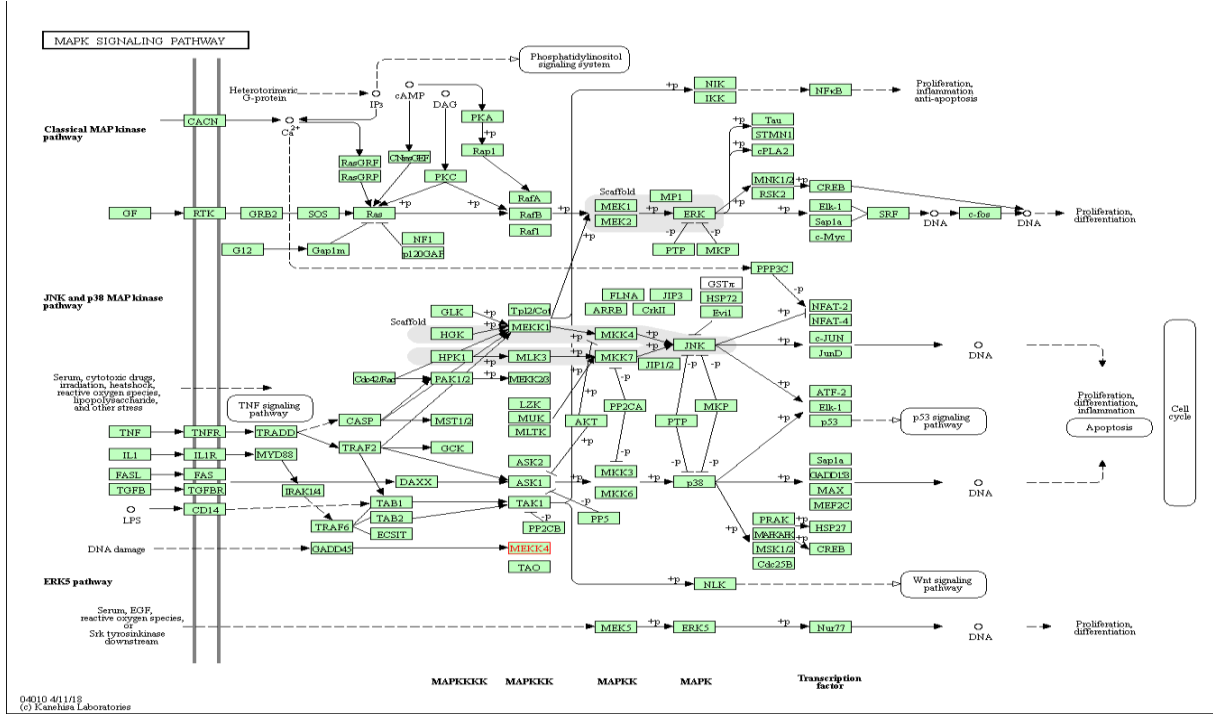
MDA-MB-435 hücre hatları için veri analizi ve miRNA'ların karşılaştırılmasından sonra programlama ile ifade seviyelerinde yüksek oranlar gözlenen miRNA'lar tanımlanmış ve hedef gen taraması gerçekleştirilmiştir. Bu miRNA'lar içinden dağılım tablosu sonuçlarına dayanarak ifadesi programlama sonrası artan ve kanserde tümör baskılayıcı özelliğe sahip olduğu gösterilmiş miR-1182 bulunmuştur. TargetScan, miRWalk ve TargetSpy olmak üzere 3 farklı hedef gen tarama sistemi üzerinden en yüksek ifade değişimi gözlenen miR-1182 isimli miRNA'nın hedeflediği genler listelenmiş ve sonrasında hepsinde ortak bulunan genler tespit edilmiştir. Bu genler ERK yolağında görev alan MAP3K3 ve apoptoz mekanizmalarında rol oynayan ARID1A'dır. Özellikle MAP3K3 geni stresle aktive olan kinazları ve ERK yolağını SEK ve MEK1/2 genlerini aktive ederek kontrol etmektedir. Bunun sonucunda miR-1182 tarafından hedeflendiği düşünülen MAP3K3 geninin Şekil 5.5'de gösterildiği üzere JNK sinyal yolağında bulunduğu gösterilmiştir.



Şekil 5.5. JNK/MAPK sinyal yolağı haritasında MAP3K3 geninin yeri

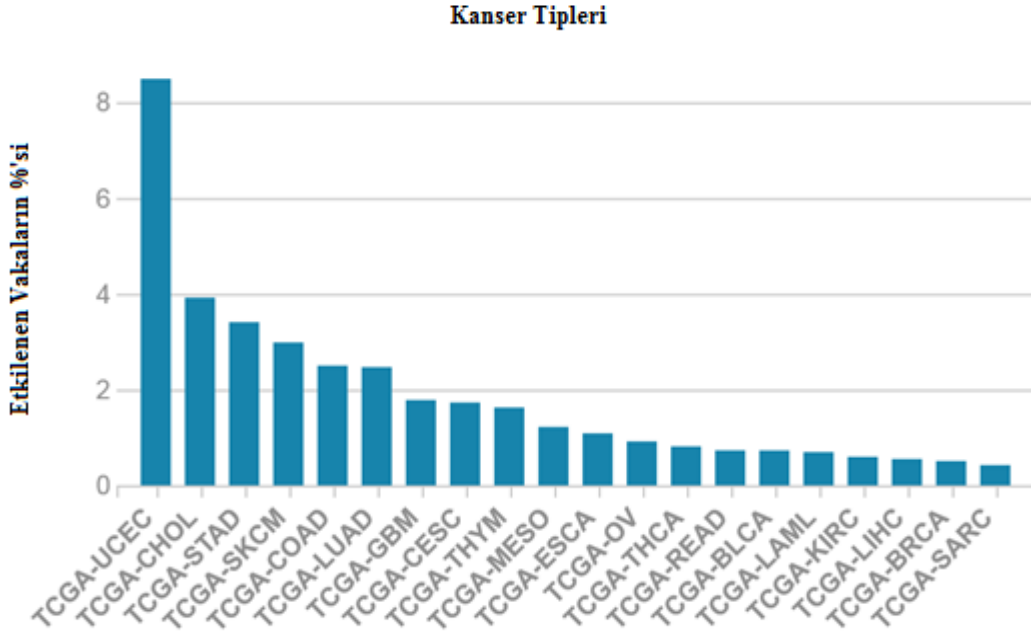
miR-199a-3p için her üç veritabanında da ortak bulunan 11 gen tespit edilmiş olup bu genler arasında en göze çarpan gen MAP3K4, p38/MAPK ve JNK yollarında rol oynamaktadır. Bu gen yolağı üzerinde oksidatif stres durumunda p38'in uyarılmasıyla apoptoz cevabın

oluşmasında sinyal verici olarak görev almaktadır. Ayrıca kök hücrelerde epitelden mezenşimale geçiş için gerekli bir yolak olan TGFβ yolağında da düzenleyici olarak rol oynamaktadır. miRNA-Hedef Gen veritabanlarında yapılan analiz sonucunda miR-199a-3p tarafından hedeflendiği düşünülen MAP3K4 geninin Şekil 5.6’da gösterildiği üzere p38/MAPK sinyal yolağında rol oynadığı gösterilmiştir.



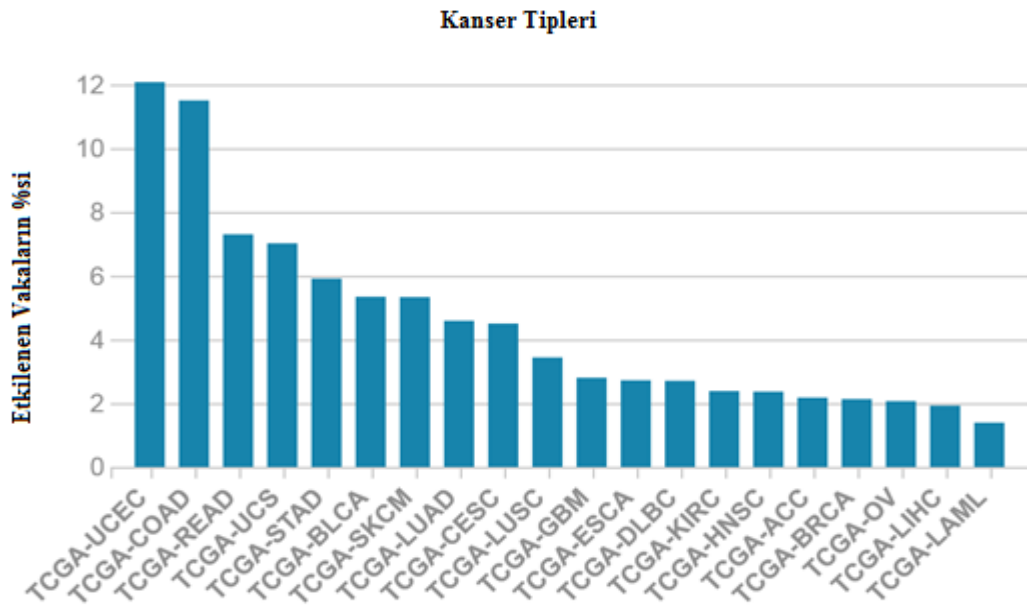
**Şekil 5.6.** p38/MAPK sinyal yolağında MAP3K4 geninin yeri

Bu çalışmada biyobelirteç olarak önerilen miRNAların ve hedef genlerin klinik bilgiler ile birleştirilmesi amacıyla son olarak TCGA üzerinde araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Melanoma için gerçekleştirilen miRNAseq analizlerinin incelenmesi sonucunda miR-1182'nin kanserli hastalarda ifade edilmediği görülmüştür. Bu sonuç tümör baskılayıcı etkisi olması sebebiyle kanserli hücrelerde susturulan miRNAlar arasında olduğu sonucunu desteklemektedir. Aynı şekilde miR-199a-3p'nin de melanoma hücrelerinde oldukça az tekrar sayısında okunması gerçekleştiği görülmüştür.



**Şekil 5.7.** MAP3K3 genindeki mutasyonların etkilediği klinik vakaların dağılımı

Hedef genler incelendiğinde miR-1182 hedef geni MAP3K3 geninde görülebilecek mutasyonların farklı kanser tiplerindeki klinik vakalara olan etkisi grafiksel olarak Şekil 5.7’de gösterilmiştir. Bütün kanser tipleri için gerçekleştirilen 25 proje içinde 149 farklı vaka MAP3K3 genindeki mutasyonlardan etkilenmiştir. Melanoma vakalarının % 2.99’unda MAP3K3 geninde somatik mutasyonlar bulunmaktadır.



**Şekil 5.8.** MAP3K4 genindeki mutasyonların etkilediği klinik vakaların dağılımı



Aynı araştırma MAP3K4 geni için yapıldığında 28 proje içindeki 348 farklı vakanın bu gendeki 390 mutasyondan etkilendiği görülmüştür. miR-199a-3p hedef geni MAP3K4 mutasyonlarının klinik vakalara etkisinin dağılım grafiği Şekil 5.8'da gösterilmektedir. Ayrıca belirlenen bu mutasyonlar melanoma vakalarının % 5.33'ünde görülmektedir.

Programlama yapılan her iki hücre hattı için değişim elde edilen bütün miRNA değerleri ve bu miRNA'ların programlama öncesine göre değişen ifade seviyeleri EK-2 içinde ayrıntılı olarak verilmiştir.



## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1. TARTIŞMA

MDA-MB-435 ve G-361 melanoma hücreleri OSKM faktörleri (Oct4, Sox2, Klf4, c-myc) ile yeniden programlanmış ve sonrasında hücrelerde ifadesi değişen miRNA'lar incelenmiştir. Hücrelerde programlamanın gerçekleşmiş olup olmadığı kültür ortamında morfolojik görüntülemeler yapılarak teyit edilmiştir.

#### 6.1.1. HÜCRE PROGRAMLANMASI SONRASI MDA-MB-435 HÜCRE HATTINDA DEĞİŞİM GÖZLENEN MİRNA PROFİLİ VE PROGRAMLANMANIN KANSER İLERLEMESİNE ETKİLERİ

MDA-MB-435 hücre hattında programlama öncesi ve sonrası miRNA seviyeleri t test ile karşılaştırılmış olup programlamayla birlikte kanser haline göre ifadesi artan ve azalan miRNA'lar belirlenmiştir. Ayrıca Şekil 5.3'de gösterildiği üzere miRNA ısı haritasına göre ifade değişimi miRNA aile grupları arasında tutarlılık göstermekte olup aynı metabolik yolların düzenlenmesinde görev alan miRNA ifadeleri aynı yönde değişim göstermiştir.

Programlama sonrası elde edilen sonuçlara göre yüksek seviyelerde ifade seviyesi değişimi gözlenen miRNA'lar arasında daha önceki çalışmalar ile idrar torbası kanserine karşı tümör baskılayıcı özellik gösterdiği belirlenmiş (39) miR-1182 ifade değişimi varlığı programlanma ile kanser durumundan uzaklaşmayı doğrulayıcı nitelikte taşımaktadır. Bu miRNA, hücre çoğalmasında görev alan ve melanoma tümörlerinde ifade edilemeyen ERK yolağının regülasyonunda rol oynamaktadır. Bu yolak gibi Kinaz grubu yolaklarda oluşabilecek her türlü hasar kanserin apoptoza direnç kazanmasına ve kontrolsüz çoğalmaya yol açabilmektedir (40).

Biyoinformatik hedef belirleme analizleri sonrasında miR-1182 tarafından regüle edildiği tanımlanan MAP3K3 geni ERK, JNK ve p38 gibi sinyal yolaklarını hücrel stres ve büyüme faktörleriyle uyarılma durumlarında uyararak bu yolakları kontrol altında tutan düzenleyici genlerdendir. Ayrıca bu genin normalden fazla ifade edilmesi durumunda, yapılan bir çalışmaya göre yumurtalık kanseri hücrelerinde metastazı ve agresif tümörleşmeyi uyarıcı etkiler gösterebilen onkogenik bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (41). Programlama sonrası MDA-MB-435 melanoma hücre hattında bu geni post transkripsiyonel mekanizmalarla kontrol altında tutan miR-1182 ifadesinin mikrodizin analizi ile yükseldiğinin gösterilmesiyle

hedef genin ifadesinin düşmüş olması beklenmektedir. Bunun sonucunda programlamayla birlikte hücrelerin tümöröjenitesinin azaldığı söylenilebilir.

Bu gen dışında miR-1182 mide kanser hücrelerinde telomeraz reverse transkriptaz ifadesinin düşürülmesinde rol oynayarak tümör baskılayıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir (42). Tümör baskılayıcı etkisi nedeniyle programlanma öncesinde düşük bir ifade seviyesine sahip olan bu miRNA'nın programlanmış kanser hücrelerinde ifadesinin artmış olması OSKM faktörleriyle gerçekleştirilen yeniden programlama işleminin başarılı olduğunu ve hücrelerin daha az agresif bir forma geçtiğini göstermektedir.

### **6.1.2. G361 HÜCRE HATTINDA PROGRAMLAMANNIN KANSER GELİŞİMİNE ETKİSİ VE GÖZLENEN MİRNA İFADE DEĞİŞİMLERİ**

G361 hücre hattı için yapılan çalışma için ifade değişimi gözlenen miRNA sayısı MDA hücre hattına göre daha az durumdadır. Ancak, değişim gözlenen miRNA'ların genelinde programlamayla birlikte ifade artışı olduğu gözlenmiştir. En ciddi ifade değişimi tanımlanan miR-199a-3p, hedef gen veritabanları karşılaştırması sonucunda MAP3K4 genini hedeflediği gözlenmektedir. Bu gen birçok farklı hücre tipinde stres durumlarında aktive olan p38 ve JNK gibi yollarda sinyal iletici olarak rol almaktadır. Ayrıca bu genin ifade eksikliğinin görülmesi durumunda embriyonik dönemlerde hücrelerde epitelden mezenşimale geçişe sebep olduğu görülmektedir (43).

MAPK sinyal yollarında görev alan genler evrimsel olarak korunmuş olup hücrede fiziksel stres, hücre çoğalması, adaptasyon, farklılaşma, hücre ölümü, hücre hareketlilik ve anjiyogenez mekanizmaları gibi oldukça önemli yollarda görev yapmaktadırlar (44). Bu protein grubunun bir üyesi olan MAP3K4 özellikle apoptoz mekanizmalarından olan p38 ve JNK yollarında rol oynamakta ve bu yolların aktive edilmesi kanserin ilerlemesini durdurucu etkilere sahiptir. p38 yolağının aktive edilmesiyle ifadesi artan miRNA'lardan biri olan tümör baskılayıcı etkiye sahip miR-199a (45) seviyesinin programlanma sonrasında artmış olması G361 hücre hattı için programlamanın kanser gelişmesini durdurucu, yavaşlatıcı bir etki oluşturmuş olduğunu göstermektedir.

G361 hücre hattında ifade edilme seviyesi programlama ile artmış olan bu miRNA'nın tümör baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu daha önceden gösterilmiş olması OSKM faktörleri ile gerçekleştirdiğimiz programlamanın hücre hattının kanser hücresinden çok bir uPK hücresi

formuna daha yakın olduğunu göstermekte olup morfolojik kültür verileri de bunu desteklemektedir.

## **6.2. SONUÇ**

MDA-MB-435 ve G361 melanoma hücre hatlarında Yamanaka faktörleri kullanılarak yapılan programlama sonrasında kültür ortamlarının mikroskop altındaki incelenmesinde morfolojik bir değişim olduğu gösterilmiştir. Oluşan değişimi desteklemek ve programın etkilerini daha iyi anlamak amacıyla miRNA ifade analizleri yapılmış ve programlamanın miRNA profillerinde oldukça büyük değişiklikler yarattığı gösterilmiştir.

Kanser hücreleriyle yapılan programlama çalışmalarında elde edilen çelişkili sonuçlar göz önüne alındığında tespit edilen miRNAlar için daha ileri çalışmaların yapılması önemlidir. Ayrıca değişen miRNA profilinin kök hücre profiline benzer olması da gelecek araştırmalar için de bir adım oluşturmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Gurdon JB, Yamanaka S. Mature cells can be reprogrammed to become pluripotent. Nobel Lect. 2012;1–12.
2. Gurdon JB. The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. J Embryol Exp Morphol. 1962;10(December):622–40.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell. 2006;126(4):663–76.
4. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981;292(July):154–6.
5. Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, et al. Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. Cell [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;138(4):722–37. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409009696>
6. Ong S-G, Lee WH, Kodo K, Wu JC. MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;88:3–15. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000605>
7. Howell PM, Li X, Riker AI, Xi Y. MicroRNA in Melanoma. Ochsner J [Internet]. 2010;10(2):83–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603362>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3096202>
8. Ghosh S. Micro RNA-Biogenesis, Mechanism of Action and Applications-A Review. Int J Res Biotechnol Biochem [Internet]. 2011;1(1):11–36. Available from: [http://urpjournals.com/tocjnls/29\\_3.pdf](http://urpjournals.com/tocjnls/29_3.pdf)
9. Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. Nat Rev | Drug Discov [Internet]. 2013;12(11):847–65.

Available from:  
<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=24172333&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/nrd4140>

10. Miyazaki S, Yamamoto H, Miyoshi N, Wu X, Ogawa H, Uemura M, et al. A Cancer Reprogramming Method Using MicroRNAs as a Novel Therapeutic Approach against Colon Cancer: Research for Reprogramming of Cancer Cells by MicroRNAs. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2014;22 Suppl 3:S1394-401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384704>
11. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007;302(1):1–12.
12. Chan B, Manley J, Lee J, Singh SR. The emerging roles of microRNAs in cancer metabolism. *Cancer Lett* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2014;356(2PA):301–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383514005990>
13. MacFarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* [Internet]. 2010;11(7):537–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3048316/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3048316/pdf/CG-11-537.pdf>
14. Lujambio A, Calin G a, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008;105(36):13556–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768788%5Cnhttp://www.pnas.org/content/105/36/13556.full.pdf>
15. Ohdaira H, Sekiguchi M, Miyata K, Yoshida K. MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells. *Cell Prolif*. 2012;45(1):32–8.
16. Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2257–61.
17. Lu J, Getz G, Miska EA, Varez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA

- expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834–8.
18. Jiao LR, Frampton AE, Jacob J, Pellegrino L, Krell J, Giamas G, et al. MicroRNAs targeting oncogenes are down-regulated in pancreatic malignant transformation from benign tumors. *PLoS One*. 2012;7(2).
  19. Nohata N, Hanazawa T, Kinoshita T, Okamoto Y, Seki N. MicroRNAs function as tumor suppressors or oncogenes: Aberrant expression of microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2013;40(2):143–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2012.07.001>
  20. Cheng CJ, Slack FJ. The duality of oncomiR addiction in the maintenance and treatment of cancer. *Cancer J*. 2012;18(3):232–7.
  21. Wang T, Warren ST, Jin P. Toward pluripotency by reprogramming: Mechanisms and application. *Protein Cell*. 2013;4(11):820–32.
  22. Anabe BKT, Akahashi KT, Amanaka SY. Review Induction of pluripotency by defined factors. 2014;90(3):83–96.
  23. Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*. 2009;136(4):509–23.
  24. Faulkner SD, Vawda R, Fehlings MG. Adult-Derived Pluripotent Stem Cells. *World Neurosurg* [Internet]. Elsevier Inc; 2014;82(3–4):500–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878875013009650>
  25. Girlovanu M, Susman S, Soritau O, Rus-Ciuca D, Melincovici C, Constantin A-M, et al. Stem Cells - biological update and cell therapy progress. *Clujul Med* [Internet]. 2015;88(3):265. Available from: <http://www.clujulmedical.umfcluj.ro/index.php/cjmed/article/view/483>
  26. Um SH. Delivering factors for reprogramming a somatic cell to pluripotency. *Int J Stem Cells*. 2012;5(1):6–11.
  27. Yilmazer A, de Lazaro I, Bussy C, Kostarelos K. In Vivo Cell Reprogramming towards Pluripotency by Virus-Free Overexpression of Defined Factors. *PLoS One*. 2013;8(1).

28. Rony IK, Baten A, Bloomfield JA, Islam ME, Billah MM, Islam KD. Inducing pluripotency in vitro: Recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell Prolif.* 2015;48(2):140–56.
29. Brouwer M, Zhou H, Nadif Kasri N. Choices for Induction of Pluripotency: Recent Developments in Human Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies. *Stem Cell Rev* [Internet]. 2016;12(1):54–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26424535>
30. Park HJ, Shin J, Kim J, Cho SW. Nonviral delivery for reprogramming to pluripotency and differentiation. *Arch Pharm Res.* 2014;37(1):107–19.
31. Augustyniak J, Zychowicz M, Podobinska M, Barta T, Buzanska L. Reprogramming of somatic cells: possible methods to derive safe, clinical-grade human induced pluripotent stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* [Internet]. 2014;74(4):373–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25576968>
32. Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO J* [Internet]. 2014;33(5):409–17. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3989624&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
33. Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: Organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;12(5):520–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.009>
34. Izgi K, Canatan H, Iskender B. Current status in cancer cell reprogramming and its clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol.* Springer Berlin Heidelberg; 2016;1–13.
35. Aparecida D, Câmara D, Mambelli LI, Porcacchia AS, Kerkis I. Advances and Challenges on Cancer Cells Reprogramming Using Induced Pluripotent Stem Cells Technologies. *J Cancer.* 2016;7.
36. Ogawa H, Wu X, Kawamoto K, Nishida N, Konno M, Koseki J, et al. MicroRNAs induce epigenetic reprogramming and suppress malignant phenotypes of human colon cancer cells. *PLoS One.* 2015;10(5).



37. Eguchi T, Kuboki T. Cellular Reprogramming Using Defined Factors and MicroRNAs. *Stem Cells Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016.
38. Bao X, Zhu X, Liao B, Benda C, Zhuang Q, Pei D, et al. MicroRNAs in somatic cell reprogramming. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;25(2):208–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2012.12.004>
39. Zhou J, Dai W, Song J. MIR-1182 inhibits growth and mediates the chemosensitivity of bladder cancer by targeting hTERT. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;470(2):445–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.014>
40. Satoh R, Hagihara K, Matsuura K, Manse Y, Kita A, Kunoh T, et al. *Genes to Cells*. 2017;1–11.
41. Jia W, Dong Y, Tao L, Pang L, Ren Y. MAP3K3 overexpression is associated with poor survival in ovarian carcinoma ☆ , ☆☆☆. *Hum Pathol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;50:162–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2015.12.011>
42. Zhang D, Xiao Y, Zhang J, Xie R, Hu C, Tang B, et al. miR-1182 attenuates gastric cancer proliferation and metastasis by targeting the open reading frame of hTERT. *Cancer Lett* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2015;360(2):151–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.044>
43. Yang L, Gao Q, Shi J, Wang Z, Zhang Y, Gao P, et al. Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 4 Deficiency in Intrahepatic Cholangiocarcinoma Leads to Invasive Growth and Epithelial-Mesenchymal Transition. 2015;1804–16.
44. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. 2001;37–40.
45. Antoon JW, Nitzchke AM, Martin EC, Rhodes L V, Nam S, Wadsworth S, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase alters microRNA expression and reverses epithelial-to-mesenchymal transition. 2013;1139–50.

## 8. EKLER

Yamanaka faktörleri ile transfekte edilmiş kanser hücre hatları MDA-MB VE G361 hücre hatlarının özellikleri, programlama öncesi ve sonrası için mikroskopik görüntüler ve mikro dizin işlemi sonrasında GeneSpring üzerinden elde edilen ifadesi değişen miRNA listeleri her iki hücre hattı için de aşağıdaki eklerde verilmiştir. Kullanılan cihaz ve teçhizat listesi de ayrıca verilmiştir.

### EK-1

#### KULLANILAN HÜCRE HATLARININ ÖZELLİKLERİ

##### G361 (ATCC® CRL1424™)

**Organism:** *Homo sapiens*, human

**Tissue:** skin

**Disease:** malignant melanoma

**Age:** 31 years adult

**Gender:** male

**Morphology:** epithelial

**Isoenzymes:**

G6PD, B

**DNA Profile:**

Amelogenin: X

CSF1PO: 10

D13S317: 11

D16S539: 15

D5S818: 11

D7S820: 8,11

THO1: 7,9

TPOX: 8,10

All human sourced products should be handled at the Biological Safety Level 2 to minimize exposure of potentially infectious products, as recommended in the CDC-NIH Manual, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.

**MDA-MB-435S (ATCC® HTB129™)**

**Organism:** *Homo sapiens*, human

**Tissue:** previously described as: mammary gland/breast; derived from metastatic site: pleural effusion

**Disease:** previously described as ductal carcinoma

**Cell Type:** melanocyte, Melanoma

**Age:** 31 years

**Gender:** female

**Morphology:** spindle shaped

**Growth Properties:** adherent

**Isoenzymes:**

AK1,1

ESD,1

G6PD, B

GLOI,2

PGM1, 2

PGM3, 1

**DNA Profile:**

Amelogenin: X

CSF1PO: 11

D13S317: 12

D16S539: 13

D5S818: 12

D7S820: 8,10

THO1: 6,7

TPOX: 8,11

vWA: 16,18

**Cytogenetic Analysis:** modal number = 56; range = 55 to 62

The cell line is aneuploid human female (XX), with most chromosome counts in the 55 to 60 range. Normal chromosomes N6, N11, and N22 were absent, while chromosomes N7, N13, N18 and N21 were single. Most of the remainder of normal chromosomes were usually paired, but chromosome N2 was triple. Nineteen marker chromosomes were identified, with most of them formed from structural alterations of the missing copies of the normal chromosomes. Six of these markers involve regions of chromosome N7, while three are recognized as derivatives of chromosome N6. Regions of a third copy of the normal and paired chromosomes N3, N15, N17, N20 are noted in markers M1, M2, M15, and M5, respectively. All human sourced products should be handled at the Biological Safety Level 2 to minimize exposure of potentially infectious products, as recommended in the CDC-NIH Manual, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.

## EK-2

G361 hücre hattında 0.05 p değerinde programlama sonrası ifade değişikliği bulunan miRNA listesi ve bu miRNA'ların ifadesinin nasıl değiştiğine ait çizelge aşağıdaki gibidir.

**Çizelge 8.1.** G361 hücre hattında programlamayla ifadesi değişen miRNA listesi

Systematic_name	Regulation	mirbase accession No
hsa-miR-146a-3p	up	MIMAT0004608
hsa-miR-199a-3p	up	MIMAT0000232
hsa-miR-199a-5p	up	MIMAT0000231
hsa-miR-210-3p	up	MIMAT0000267
hsa-miR-214-3p	up	MIMAT0000271
hsa-miR-3687	up	MIMAT0018115
hsa-miR-4487	up	MIMAT0019021
hsa-miR-5703	up	MIMAT0022496
hsa-miR-630	up	MIMAT0003299
hsa-miR-663a	up	MIMAT0003326
hsa-miR-6848-3p	up	MIMAT0027597
hsa-miR-6858-3p	down	MIMAT0027617

MDA-MD-435 hücre hattında 0.001 p değerinde elde edilen ifadesi değişen miRNA listesi aşağıdaki gibidir.

**Çizelge 8.2.** MDA-MB-435 hücre hattında programlama sonrası ifadesi değişen miRNA listesi

systematic_name	Regulation	mirbase accession No
hsa-miR-100-3p	up	MIMAT0004512
hsa-miR-101-3p	down	MIMAT0000099
hsa-miR-106a-3p	down	MIMAT0004517
hsa-miR-106b-5p	down	MIMAT0000680
hsa-miR-1182	up	MIMAT0005827
hsa-miR-1273c	up	MIMAT0015017
hsa-miR-1273e	up	MIMAT0018079
hsa-miR-1273f	up	MIMAT0020601
hsa-miR-1275	up	MIMAT0005929
hsa-miR-1287-5p	up	MIMAT0005878
hsa-miR-1291	up	MIMAT0005881
hsa-miR-1469	up	MIMAT0007347
hsa-miR-149-3p	up	MIMAT0004609
hsa-miR-149-5p	down	MIMAT0000450
hsa-miR-155-5p	up	MIMAT0000646
hsa-miR-181a-2-3p	down	MIMAT0004558
hsa-miR-186-5p	down	MIMAT0000456
hsa-miR-18a-5p	down	MIMAT0000072
hsa-miR-18b-5p	down	MIMAT0001412

hsa-miR-193b-3p	down	MIMAT0002819
hsa-miR-1973	up	MIMAT0009448
hsa-miR-198	up	MIMAT0000228
hsa-miR-19a-3p	down	MIMAT0000073
hsa-miR-21-3p	up	MIMAT0004494
hsa-miR-211-5p	down	MIMAT0000268
hsa-miR-2277-3p	up	MIMAT0011777
hsa-miR-301a-3p	down	MIMAT0000688
hsa-miR-30c-1-3p	up	MIMAT0004674
hsa-miR-30d-3p	down	MIMAT0004551
hsa-miR-30d-5p	down	MIMAT0000245
hsa-miR-3137	up	MIMAT0015005
hsa-miR-3161	up	MIMAT0015035
hsa-miR-3174	up	MIMAT0015051
hsa-miR-320e	down	MIMAT0015072
hsa-miR-324-5p	down	MIMAT0000761
hsa-miR-33a-5p	down	MIMAT0000091
hsa-miR-34c-3p	up	MIMAT0004677
hsa-miR-3607-5p	up	MIMAT0017984
hsa-miR-362-3p	down	MIMAT0004683
hsa-miR-3620-5p	up	MIMAT0022967
hsa-miR-3622b-5p	up	MIMAT0018005
hsa-miR-3652	up	MIMAT0018072
hsa-miR-3654	up	MIMAT0018074
hsa-miR-365a-3p	down	MIMAT0000710
hsa-miR-3682-3p	up	MIMAT0018110
hsa-miR-3692-5p	up	MIMAT0018121
hsa-miR-370-3p	up	MIMAT0000722
hsa-miR-373-5p	down	MIMAT0000725
hsa-miR-374c-5p	down	MIMAT0018443
hsa-miR-3926	up	MIMAT0018201
hsa-miR-3935	up	MIMAT0018350
hsa-miR-3945	up	MIMAT0018361
hsa-miR-3976	up	MIMAT0019361
hsa-miR-4252	up	MIMAT0016886
hsa-miR-4306	down	MIMAT0016858
hsa-miR-4313	up	MIMAT0016865
hsa-miR-4441	up	MIMAT0018959
hsa-miR-4446-3p	up	MIMAT0018965
hsa-miR-4462	up	MIMAT0018986
hsa-miR-4468	up	MIMAT0018995
hsa-miR-4476	up	MIMAT0019003
hsa-miR-4485-5p	up	MIMAT0032116

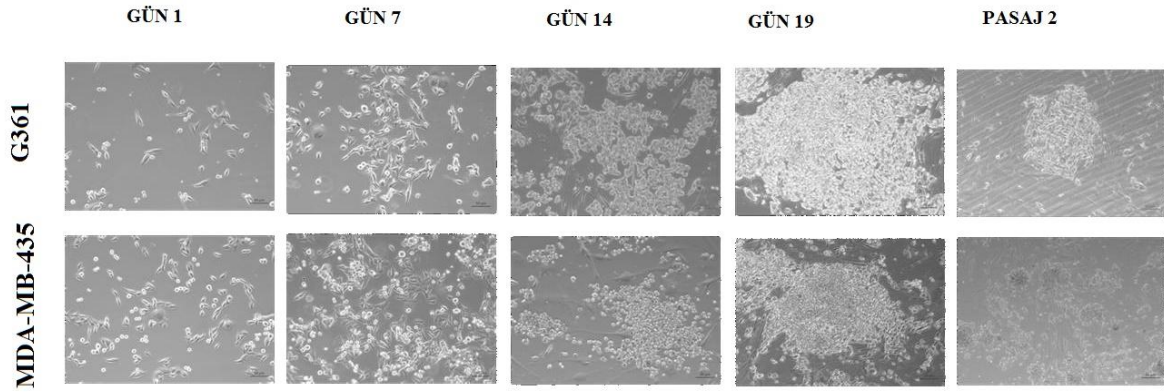
hsa-miR-4486	up	MIMAT0019020
hsa-miR-4487	up	MIMAT0019021
hsa-miR-4522	up	MIMAT0019060
hsa-miR-4358	up	MIMAT0019081
hsa-miR-4359	up	MIMAT0019082
hsa-miR-4647	up	MIMAT0019709
hsa-miR-4659a-3p	up	MIMAT0019727
hsa-miR-4685-5p	up	MIMAT0019771
hsa-miR-4690-5p	up	MIMAT0019779
hsa-miR-4710	up	MIMAT0019815
hsa-miR-4738-3p	up	MIMAT0019867
hsa-miR-4753-5p	up	MIMAT0019890
hsa-miR-4769-5p	up	MIMAT0019922
hsa-miR-4776-5p	up	MIMAT0019932
hsa-miR-484	down	MIMAT0002174
hsa-miR-494-3p	up	MIMAT0002816
hsa-miR-5006-5p	up	MIMAT0021033
hsa-miR-5008-5p	up	MIMAT0021039
hsa-miR-505-3p	down	MIMAT0002876
hsa-miR-506-3p	down	MIMAT0002878
hsa-miR-507	down	MIMAT0002879
hsa-miR-508-3p	down	MIMAT0002880
hsa-miR-509-3-5p	down	MIMAT0004975
hsa-miR-510-5p	down	MIMAT0002882
hsa-miR-513a-5p	up	MIMAT0002877
hsa-miR-514a-3p	down	MIMAT0002883
hsa-miR-5190	up	MIMAT0021121
hsa-miR-551b-3p	down	MIMAT0003233
hsa-miR-574-5p	up	MIMAT0004795
hsa-miR-582-3p	down	MIMAT0004797
hsa-miR-601	up	MIMAT0003269
hsa-miR-6088	down	MIMAT0023713
hsa-miR-6090	down	MIMAT0023715
hsa-miR-6132	up	MIMAT0024616
hsa-miR-622	up	MIMAT0003291
hsa-miR-650	up	MIMAT0003320
hsa-miR-662	up	MIMAT0003325
hsa-miR-664a-5p	up	MIMAT0005948
hsa-miR-665	up	MIMAT0004952
hsa-miR-6743-5p	up	MIMAT0027387
hsa-miR-6753-3p	up	MIMAT0027407
hsa-miR-6753-5p	up	MIMAT0027406
hsa-miR-6765-5p	up	MIMAT0027430

hsa-miR-6772-5p	up	MIMAT0027444
hsa-miR-6785-5p	up	MIMAT0027470
hsa-miR-6799-5p	up	MIMAT0027498
hsa-miR-6801-5p	up	MIMAT0027502
hsa-miR-6804-5p	up	MIMAT0027508
hsa-miR-6865-5p	up	MIMAT0027630
hsa-miR-6872-5p	up	MIMAT0027644
hsa-miR-6877-5p	up	MIMAT0027654
hsa-miR-6894-5p	up	MIMAT0027688
hsa-miR-7-5p	down	MIMAT0000252
hsa-miR-711	up	MIMAT0012734
hsa-miR-7155-3p	up	MIMAT0028221
hsa-miR-7162-3p	up	MIMAT0028235
hsa-miR-7515	up	MIMAT0029310
hsa-miR-758-5p	up	MIMAT0022929
hsa-miR-7641	up	MIMAT0029782
hsa-miR-769-3p	up	MIMAT0003887
hsa-miR-770-5p	up	MIMAT0003948
hsa-miR-7851-3p	up	MIMAT0030426
hsa-miR-8063	up	MIMAT0030990
hsa-miR-8075	up	MIMAT0031002
hsa-miR-8089	up	MIMAT0031016
hsa-miR-873-5p	down	MIMAT0004953
hsa-miR-887-3p	down	MIMAT0004951
hsa-miR-921	up	MIMAT0004971
hsa-miR-936	up	MIMAT0004979
hsa-miR-9500	up	MIMAT0035542



### EK-3

Kanser hücre hatlarının programlama sürecinde kültür ortamındaki görüntüleridir. Programlanmış G361 ve MDA-MB-435 hücre hatlarının ters ışık mikroskopundaki görüntüleri alınmıştır (10X büyütme).



**Şekil 8.1.** G361 ve MDA-MB-435 hücre hatlarının programlama süreci boyunca mikroskobik görüntüleri

**EK-4****KULLANILAN MAKİNA-TEÇHİZAT LİSTESİ**

<b>Kullanılan Makine – Teçhizat Listesi</b>	
<b>Adı/Modeli</b>	<b>Kullanım Amacı</b>
Microarray Scanner (Agilent p/n G4900DA, G2565CA or G2565BA)	İzolasyonu gerçekleştirilen RNA moleküllerinin mikrodizin plakalarıyla gerçekleştirdiği hibridizasyonun okunması için kullanılmıştır. Bu işlem, Max Planck moleküler hücre biyolojisi ve genetiği enstitüsü moleküler genetik araştırma bölümünde gerçekleştirilmiştir.
2100 Bioanalyser (Agilent p/n G2938A)	İzolasyon sonrası RNA ölçümlerinin gerçekleştirilmesi için kullanılmıştır. . Bu işlem, Max Planck moleküler hücre biyolojisi ve genetiği enstitüsü moleküler genetik araştırma bölümünde gerçekleştirilmiştir.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Necati Kaan KUTLU

**Doğum Yeri:** Ankara

**Doğum Tarihi:** 13.02.1990

**Medeni Hali:** Bekar

**Yabancı Dili:** İngilizce

### Eğitim Durumu

**Lise:** 20 Mayıs Turgut Özal Lisesi, Malatya, Türkiye

(2004-2007).

**Lisans:** Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

(2008-2014).

### İş Tecrübesi

**Kurumu:** Ankara Üniversitesi Biyomedikal mühendisliği bölümü

“Grafenin immün etkilerinin omik yöntemler ve genotoksik analizler ile karakterize edilmesi (G-IMMUNOMICS)”

**Görevi:** TÜBİTAK 315S102 nolu proje bursiyeri

**Yılları:** 2016-2017

**Kurumu:** Dresden Teknik Üniversitesi Nanoteknoloji ve Materyal bilimler enstitüsü

**Görevi:** Stajyer

**Yılları:** Temmuz-Ekim 2016

## 10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

### KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

#### Uluslararası Kongrelerde Sunulan Poster Bildirileri

**N.K. Kutlu**, H. Taheri, A. Yilmazer. Upregulation of MicroRNA-1182 activates the apoptotic pathway p38/MAPK in MDA-MB-435 melanoma cells following reprogramming with transcription factors Oct3/4, Klf-4, Sox-2, c-Myc, European Cancer Congress, 27-30 January 2017, Amsterdam, Netherlands.

H. Taheri, **N.K. Kutlu**, A. Yilmazer. Force dexpression of reprogramming factors (OSKM) in human melanoma cells alters cancer-related pathways and tumorigenicity, International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 14-17 June, 2017, Boston, USA.



Volume 72, Supplement 1, February 2017

ISSN 0959-8049

# EJC

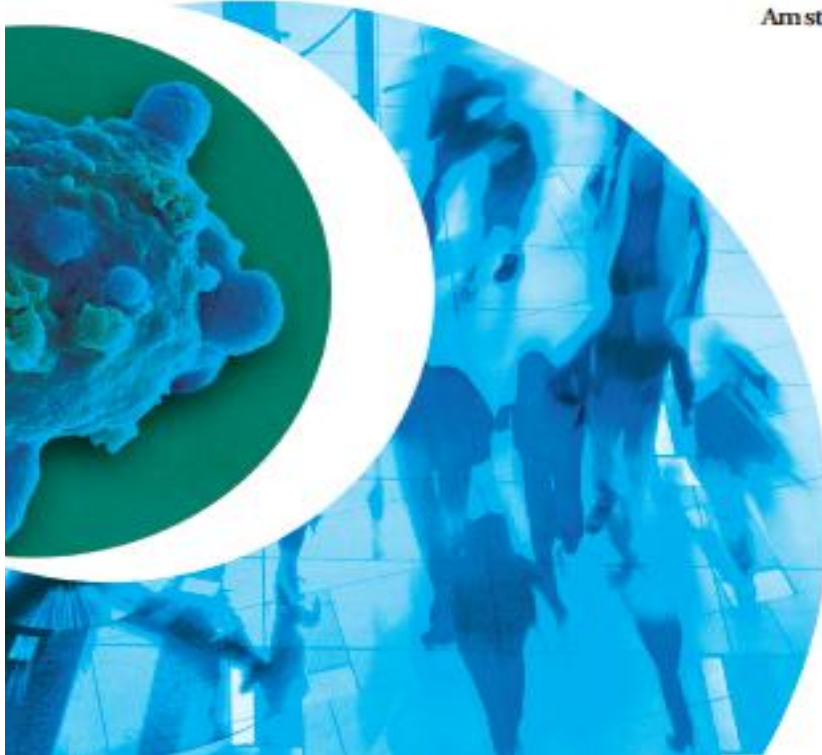
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER

IN THIS SUPPLEMENT

**ECCO2017**  
**European Cancer Congress**

**27 – 30 January 2017**  
**Amsterdam, The Netherlands**

**Abstract Book**



THE OFFICIAL JOURNAL OF  
**EORTC**  
European Organisation for Research  
and Treatment of Cancer

**ECCO** **EUROPEAN  
CANCER  
ORGANIZATION**

**EACR** European Association  
for Cancer Research



phosphorodiester backbones. First data from the CT26 colon carcinoma model showed that dSLIM2006 reduces tumor growth and prolongs the survival of mice.

**Conclusions:** dSLIM2006, a member of dSLIM<sup>®</sup> family of TLR9 agonists, broadly activates the immune system in vitro. The use of dSLIM2006 in a murine CT26 tumor model resulted in a reduction of tumor growth and therefore this TLR9 agonist has the potential for the development as an immune surveillance modulator for the treatment of cancer.

**Conflict of Interest:** Ownership: BW is shareholder of Moligen AG. Advisory Board: BW is a member of the advisory board of Moligen AG. Other Substantive Relationships: BV, KK, DO and MS are employees of Moligen AG.

1465

POSTER

#### Preliminary clinical results of a metabolite-based method to detect circulating tumor cells

E. Del Ben<sup>1</sup>, M. Tanioti<sup>2</sup>, E. Nicotri<sup>1</sup>, G. Dirocco<sup>1,2</sup>, G. Calati<sup>4</sup>, A. Pirardolo<sup>5</sup>, M. Hutter<sup>6</sup>, D. Cassan<sup>7</sup>, A. Stefan<sup>1</sup>, A. Colombati<sup>8</sup>, W. Huck<sup>9</sup>, G. Scoles<sup>9</sup>. <sup>1</sup>Centro di Ricerche Oncologiche CYO IRCCS, Dept. of Translational research, Aviano, Italy; <sup>2</sup>Anatomic Pathology Institute-University of Udine, Medical and Biological Sciences, Udine, Italy; <sup>3</sup>Instituto Oncologico Veneto IOV IRCCS, Padova, Italy; <sup>4</sup>Institute for Molecular and Materials - Radboud University, Dept. of Physical Chemistry Nijmegen, Netherlands; <sup>5</sup>Purdue University, Dept. of Chemistry Princeton, NJ, USA

**Background:** Cancer imaging is the gold standard for monitoring cytotoxic cancer treatments, but has several limitations, the major ones being delayed diagnosis (due to a limit in tumor size-detection) and toxicity (due to ionizing radiation). Additionally, in the context of new molecular targeted therapies and, in particular, immunotherapy, clinical responses are measured by imaging and often dissociated from survival. New therapy-monitoring methods are an unmet clinical need in oncology.

The number of circulating tumor cells (CTC) in blood is correlated with the progress of metastatic cancer, and is emerging as a minimally-invasive diagnostic tool for therapy monitoring and recurrence detection. A CTC assay could be a serially repeatable, early-predictor of therapy response in traditional therapies and a candidate marker of effective immune response in immunotherapy.

In a previous work (Del Ben, Tanioti et al, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016) we demonstrated a label-free technique for CTC detection based on their altered metabolism, by measuring the secretion of H<sup>+</sup> or lactate production of individual, viable tumor cells compartmentalized in microfluidically prepared micro-droplets. We present here additional clinical data and current challenges.

**Methods:** Clinical samples (2 mL of whole blood collected in EDTA-tube) were lysed and CD45-depleted using Miltenyi LD columns and beads. Droplets containing single cells are generated by microfluidic water-in-oil emulsification. Cells are suspended in culture medium, together with a ratiometric pH-sensitive dye (SNARE-SF). Droplets are incubated at 37 degrees Celsius for 30 minutes and subjected for fluorescent pH measurement. A triggered camera collects pictures of selected drops.

**Results:** According to selected cut-off (pH=8.4) we detected significantly more events in metastatic breast (median 41/mL, range [3-312], n=6) and lung cancer (49/mL, [28-87], n=4) vs healthy donors (3/mL, [1-9], n=7), p<0.005. In breast cancer, we demonstrated the presence of both EpCAM(-) and EpCAM(+) acid-producing cells, while CD45 showed dim or no expression.

**Conclusion:** We observed a significant difference between patients and healthy donors, with the number of events/mL, comparable to existing literature on CTC. To further validate the technology, we set up a comparison study against Veridex CellSearch<sup>®</sup> and ongoing clinical trials on breast cancer focused on validating our metabolically activated CTC as a surrogate of survival. We are currently looking for collaborations conducting immunotherapy in order to test our system as a marker of effective immune response.

**Conflict of Interest:** Ownership: Cytobid Diagnostics B.V. (Innovative start-up, ca. 15% ownership). Board of Directors: Cytobid Diagnostics B.V. (Chief Scientific Officer, 0.7 FTE).

1466

POSTER

#### Upregulation of MicroRNA-1182 activates the apoptotic pathway p38MAPK in MDA-MB-435 melanoma cells following reprogramming with transcription factors Oct3A, Klf4, Sox-2, c-Myc

E. Saito<sup>1</sup>, H. Taher<sup>2</sup>, A. Yilmaz<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Ankara University Institute of Biotechnology, Basic Biotechnology, Ankara, Turkey; <sup>2</sup>Ankara University Engineering Faculty, Biomedical Engineering, Ankara, Turkey

**Background:** Micro RNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs, which work as the main epigenetic regulation of the cell metabolism. The miRNA

expression levels show differences between normal and tumour cells and generally tumour suppressor miRNAs are down regulated in cancer. In addition to cancer development and progression, miRNAs play an important role during cellular reprogramming and cell fate conversion through forced expression of exogenous transcription factors. We hypothesized that induction of cellular reprogramming via four reprogramming factors (Oct3A, Klf-4, Sox-2, c-Myc) should change the miRNA expression profile of cancer cells and hence open up a new therapeutic strategy. We first compared the miRNA expression levels in MDA-MB-435 melanoma cells after transfection with Oct3A, Klf-4, Sox-2, c-Myc, and identified candidate tumour suppressor miRNAs which could be important for tumorigenicity of the transfected cells.

**Materials and Methods:** MDA-MB-435 melanoma cells were cultured, and then transfected with Sendai viral vectors encoding the four reprogramming transcription factors Oct3A, Klf-4, Sox-2 and c-Myc. After 27 days of culturing following transfection, microRNAs were isolated from both naive and transfected cells and miRNA levels were analyzed by Agilent miRNA Micro Array. With the help of GeneSpring software, gene targeting and pathway analysis were also performed in order to identify key genes or microRNAs, which could play important roles in tumorigenicity following transfection with reprogramming factors.

**Results:** A significant difference in miRNA expression profile was observed between naive and transfected melanoma cells. Following gene targeting and pathway analysis, we identified miR-1182 as a tumour suppressor miRNA. Upregulation of miR-1182 activated an apoptotic signalling pathway p38MAPK and caused inhibition of metastatic gene MMP14. In addition, it was shown that some cancerous pathways were inhibited.

**Conclusions:** This study showed that miR-1182 can act as a tumour suppressor miRNA after transfection with four reprogramming factors. As a part of the p38MAPK signalling pathway, this miRNA has been shown to be involved in regulation of cellular apoptosis in response to DNA damage or oxidative stress. Therefore, activation of miR-1182 following induction of cellular reprogramming may represent a novel therapeutic strategy for the treatment of melanoma.

No conflict of interest.

### Poster Session (Sunday 29 January 2017)

#### Rare Cancers – NET

1516

POSTER

#### Mutational status of Yin Yang 1 gene in rare sporadic insulinomas: the Indian scenario with a review

K. Inthar<sup>1</sup>, V. Ajokar<sup>2</sup>, K. Choudh<sup>3</sup>, S. Agarwal<sup>4</sup>, S. Patil<sup>5</sup>. <sup>1</sup>AIMS, Biochemistry, New Delhi, India; <sup>2</sup>AIMS, Endocrinology & Metabolism, New Delhi, India; <sup>3</sup>AIMS, Pathology, New Delhi, India; <sup>4</sup>AIMS, Gastro-intestinal Surgery, New Delhi, India

**Background:** Insulinomas are infrequent pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs). Although extensive literature is present on the pathogenesis of other PNETs, the genetic causes underlying insulinoma are unclear and need investigation. Recently, three independent studies in the Chinese and Western Caucasian subjects reported a recurrent somatic mutation in Yin Yang 1 gene (YY1 T323R) in insulinoma tumors. It was shown to increase insulin secretion by β-cells. However, the status of this gene variation remains unknown in patients of other ethnicities. Hence, here we analyze YY1 T323R mutation in Indian insulinoma patients. We also review other mutation potential genes that have been documented in literature so far with respect to etiology and population genetics in PNETs, including insulinoma.

**Material and Methods:** 17 patients diagnosed and operated for insulinoma during 2010 to 2015 at the All India Institute of Medical Sciences were recruited retrospectively. Records of patients' family history and clinical parameters were collected. Formalin-fixed paraffin-embedded tumors were used to isolate genomic DNA that was subjected to PCR amplification of YY1 exon 5, followed by Sanger sequencing. The obtained nucleotide sequences were aligned against the known sequence of YY1 exon 5 from Ensembl database.

**Results:** All patients under study presented with clinical symptoms and biochemical diagnosis of insulinoma. On analyzing the sequence of YY1 exon 5 amplicon, we observed the absence of C to G mutation at YY1 codon 322 in all the 17 (100%) insulinoma tumors analyzed. Thus, as compared to the mutation frequency reported in Chinese patients, our results revealed genetic heterogeneity at the studied locus in insulinoma cases belonging to Indian subjects.

**Conclusions:** Ours is the first report on the status of YY1 T323R in insulinoma cases of Indian origin. On comparison with the Chinese cohort, our results point to genetic heterogeneity in the pathogenesis of insulinoma