

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

**PRİMER VE METASTATİK BAŞ BOYUN KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA ESM1 GENİNİN siRNA İLE BASKILANARAK
FONKSİYONEL ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan

ONUR BENDER

Tez Danışmanı

PROF. DR. MEHMET GÜNDÜZ

Ankara-2015

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

**PRİMER VE METASTATİK BAŞ BOYUN KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA ESM1 GENİNİN siRNA İLE BASKILANARAK
FONKSİYONEL ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan

ONUR BENDER

Tez Danışmanı

PROF. DR. MEHMET GÜNDÜZ

Ankara-2015

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

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

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

16.06.2015

ONUR BENDER



ONAY

Onur BENDER tarafından hazırlanan "*Primer ve Metastatik Baş Boyun Kanseri H¼cre Hatlarında ESM1 Geninin siRNA ile Baskılanarak Fonksiyonel Analizi*" başlıklı bu ¼alıřma, *16.06.2015* tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oybirliği ile başarılı bulunarak j¼rimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Y¼ksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet G¼nd¼z (Başkan)



Doç. Dr. Beyhan Cengiz



Yrd. Doç. Dr. ¼mer Faruk Hatipoğlu



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her türlü araştırma imkan ve olanaklarını sağlayan, tüm yönleriyle örnek aldığım kıymetli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet GÜNDÜZ'e teşekkür ederim.

Desteğini her daim hissettiren, pozitif enerjisiyle en yorgun düştüğümüz zamanlarda bile bizi ayağa kaldıran, hiçbir isteğimi geri çevirmeyen ve tüm imkanları seferber eden Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları esnasında geldiğim ilk günden beri eşsiz bilgi ve tecrübesiyle kendisinden çok şey öğrendiğim, hakkını hiçbir şekilde ödeyemeyeceğim hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Muradiye ACAR'a teşekkür ederim.

3 yıl boyunca bitmek bilmeyen sorularıma büyük bir sabırla cevap veren, gece gündüz birlikte çalıştığımız, akademik bilgi birikimini sonuna kadar paylaşan ve benim için bir hocadan çok daha fazlası olan sevgili hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca fedakarlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen, her türlü sorumuzda yardımımıza koşan, çalışkanlığını, disiplinini ve bilimsel karakterini örnek aldığım, aramıza Massachusetts Institute of Technology'den katılan yabancı araştırmacı Sayın Catherine MOROSKİ ERKUL'a teşekkür ederim.

Gerek deneylerde, gerekse çalışma sonuçlarının analiz ve yorumlanmasındaki değerli görüşlerinden ve katkılarından dolayı doktora sonrası araştırmacı Sayın Dr. Sadık ÇİĞDEM'e ve Sayın Araş. Gör. Dr. Eyyüp ÜÇTEPE'ye, birlikte çalışma fırsatı bulduğum, görüşlerine her zaman önem verdiğim Sayın Araş. Gör. Burak YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın ana materyali olan UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarını sağlayan Turku University Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Reidar GRENMAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca burs desteği sağlayan, tez çalışmamı maddi olarak destekleyen*, bilimsel kongre ve sempozyumlara katılımımı sağlayan TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu'na teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince tanıdığım tüm yüksek lisans, doktora ve tıp fakültesinden arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak; bu tez çalışmamı ithaf ettiğim, bugünlere gelmemde beni her zaman destekleyen, hiçbir zaman esirgemedikleri maddi manevi destekleriyle bana güç veren, ideallerimin arkasında duran ve her daim gösterdikleri anlayışlarından ötürü babam Vedat BENDER'e, annem Ümmü BENDER'e ve biricik kardeşim Bahar BENDER'e çok teşekkür ederim.

Onur BENDER

Ankara – Haziran 2015

* Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 113S835 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

BENDER Onur. Primer ve Metastatik Baş Boyun Kanseri Hücre Hatlarında ESM1 Geninin siRNA ile Baskılanarak Fonksiyonel Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2015

Baş boyun kanserleri dünya çapında sık rastlanılan kanser tiplerindedir. Bu durumun sebepleri arasında; hastalık tanısının erken yapılamaması, kanserin metastaz kabiliyetinin ve nüks oranlarının yüksek olması yer almaktadır. Baş boyun kanserlerinde esas tedaviyi cerrahi ve kemoradyoterapi oluştursa da bu yöntemler hastalar üzerinde yaşam standartlarını olumsuz etkileyen deformasyonlara sebep olmaktadır. Tıp ve temel bilimlerdeki teknolojik gelişmeler ile birlikte baş boyun kanserlerinde alternatif tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekli hale gelmiştir. Bu çalışmada da çeşitli kanser türlerinde aktif rolü olduğu kanıtlanan, tümör büyümesinde, metastazında ve anjiyogenezinde etkileri ortaya konulmuş, kritik bir gen olan ESM1'in baş boyun kanseri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamız kapsamında, baş boyun kanserine ait UT-SCC-74A ve metastazi UT-SCC-74B hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler üzerinde ESM1 geninin ekspresyonu immunofloresan boyama ile gösterilmiştir. Kültüre edilen hücrelerin transfeksiyon etkinliği GAPDH-siRNA ile belirlenmiş ve ardından hücrelere ESM1-siRNA transfekte edilerek ESM1 geni baskılanmıştır. Baskılanma düzeyleri kantitatif real time PCR ve western blot analizleriyle gösterilmiştir. ESM1 geninin baş boyun kanseri hücre hatları üzerinde proliferasyon ve migrasyona olan etkileri xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile araştırılmıştır. Aynı zamanda proliferasyon analizlerinin validasyonu için XTT testi, migrasyon analizlerinin validasyonu için ise in vitro scratch assay testi yapılmıştır. Hücrelerin proliferasyon ve migrasyon kinetiklerinin değişimi sırasındaki apoptoz durumu ise kaspaz 3 aktivite analizi ile araştırılmıştır.

Çalışmamız sonucunda UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarında ESM1 geni ekspresyonu gösterilmiştir. Hücrelerde ESM1 ekspresyonu ESM1-

siRNA kullanılarak anlamlı şekilde baskılanmıştır. Optimal baskılama şartlarında gerçekleştirilen proliferasyon ve migrasyon analiz sonuçlarına göre hem UT-SCC-74A hem de UT-SCC-74B hücrelerinde ESM1 ekspresyonunun baskılanması kanser hücrelerinin büyümesini ve göç kabiliyetini de anlamlı şekilde azaltmıştır. ESM1 ekspresyonu baskılandığında hücrelerde kaspaz 3 aktivite ölçüm sonuçlarına göre de her iki hücre grubunda da ESM1-siRNA ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır.

Sonuç olarak; çalışmamız kapsamında ESM1 geninin baş boyun kanser ve metastazlı hücreleri üzerindeki etkileri ortaya konulmuştur. Bu fonksiyonel çalışma ile ESM1 geninin baş boyun kanserlerindeki temel moleküler rolleri belirlenmiş ve bundan sonraki aşamada mevcut agresif tedavilere alternatif olarak ESM1 geni ile yeni moleküler tedavi yöntemlerine temel oluşturulmuştur.

Anahtar Sözcükler:

- 1. Baş Boyun Kanseri**
- 2. ESM1**
- 3. RNA Interference**
- 4. siRNA**
- 5. xCELLigence**

ABSTRACT

BENDER Onur. Functional Analysis of ESM1 Gene Function by siRNA knockdown in Primary and Metastatic Head and Neck Cancer Cell Lines, Master Thesis, Ankara, 2015

Head and neck cancer is a commonly seen cancer worldwide. Among the reasons for this are the difficulty in diagnosing the disease at an early stage, its metastatic capacity and high recurrence rate. The main treatment modalities are surgery and chemoradiotherapy which have a negative impact on patient quality of life due to deformations resulting from treatment. In combination with medical and basic science developments, there is a need for the development of alternative diagnosis and treatment methods. ESM1 has been shown to play an active role in many types of cancer in terms of tumor growth, metastasis and angiogenesis. In this study we investigated the effects of ESM1 in head and neck cancer.

Our study was conducted using the head and neck cancer cell lines UT-SCC 74A and its metastasis UT-SCC-74B. ESM1 gene expression in these cell lines is shown using immunofluorescence staining. Transfection efficiency of the cultured cells was determined via GAPDH-siRNA. Cells were then transfected with ESM1-siRNA. Knock-down is shown by q-RT-PCR and Western blot analysis. The effect on proliferation and migration capacity of ESM1 gene knock-down in the cell lines was studied using xCELLigence real-time cell analysis system. To confirm the proliferation and migration analysis, XTT and in vitro scratch assay, respectively, were also used. The apoptotic status of cells was investigated using caspase 3 activity analysis.

We show ESM1 gene expression in UT-SCC 74A and UT-SCC 74B cell lines. Efficient ESM1 gene knock-down was achieved using ESM1-specific siRNA. Using optimized knock-down conditions, proliferation and migration analysis showed significant reduction in the growth and migration capacity of both UT-SCC

74A and UT-SCC 74B. There was, however, no significant difference in caspase 3 activity between control and cells treated with ESM1-siRNA.

In conclusion, our results show a role for ESM1 in both primary and metastatic head and neck cancer cells. In this functional study, the basic molecular role of ESM1 in head and neck cancer is shown and the results suggest that new molecular treatment methods using ESM1 may be an alternative to currently available aggressive treatments.

Key Words:

- 1. Head and Neck Cancer**
- 2. ESM1**
- 3. RNA Interference**
- 4. siRNA**
- 5. xCELLigence**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KANSER.....	2
2.2. BAŞ BOYUN KANSERLERİ.....	3
2.2.1. Baş Boyun Kanseri Tanımı	3
2.2.2. Baş Boyun Kanserlerinin Epidemiyolojisi.....	4
2.2.3. Baş Boyun Kanserlerine Sebep Olan Faktörler	5
2.2.4. Baş Boyun Kanserlerinde Tanı ve Evrelendirme.....	7
2.2.5. Baş Boyun Kanserlerinde Tedavi.....	8
2.2.6. Baş Boyun Kanserlerinin Moleküler Biyolojisi.....	8
2.3. RNA INTERFERENCE.....	12
2.3.1. RNA Interference Tarihçesi	12
2.3.2. RNA Interference Mekanizması	15
2.3.3. RNA Interference Teknolojisinin Kullanım ve Uygulama Alanları	19
2.4. ESM1 GENİ.....	21
2.4.1. ESM1'in Genomik Organizasyonu	21
2.4.2. ESM1 Geni Moleküler Biyolojisi	22
2.4.3. ESM1 ile İlgili Yapılan Çalışmalar	25
3. MATERYAL VE METODLAR	29
3.1. MATERYAL.....	29
3.1.2. Hücre Hatları	29

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	29
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Sarf ve Kimyasal Malzemeler	31
3.2. METODLAR.....	33
3.2.1. Hücre Kültürü.....	33
3.2.1.1. Kullanılan Hücre Hatlarına Ait Bilgiler	33
3.2.1.2. Hücre Kültürü Çalışma Alanı.....	33
3.2.1.3. Hücreler İçin Besiyeri Hazırlığı	34
3.2.1.4. Stok Hücrelerin Ekimi.....	34
3.2.1.5. Hücrelerin Invert Mikroskop ile Görüntülenmesi.....	35
3.2.1.6. Hücrelerin Tutundukları Yüzeyden Ayrıştırılması (Tripsinizasyon) 35	
3.2.1.7. Hücrelerin Pasajlanması.....	35
3.2.1.8. Hücre Sayımı.....	36
3.2.1.9. Hücrelerin Stoğa Alınması.....	36
3.2.1.10. Hücrelerin Kültüründe Yüzeyle Göre Kullanılan Medium, PBS ve Tripsin Miktarları	37
3.2.2. Immunofloresan Boyama	37
3.2.3. siRNA Transfeksiyonları	38
3.2.3.1 siRNA ve Transfeksiyon Ajanı Temini.....	38
3.2.3.2 siRNA Dizileri	39
3.2.3.3 siRNA'ların Hazırlanması ve Saklanması	41
3.2.3.4 siRNA Transfeksiyonu.....	41
3.2.4. Hücrelerden RNA İzolasyonu	43
3.2.4.1. İzole Edilen RNA Miktarının Ölçümü	44
3.2.5. cDNA Sentezi.....	44
3.2.6. Gradient PCR ile Primerlerin Bağlanma Sıcaklıklarının Saptanması.....	45
3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi	47
3.2.7.1. Agaroz Jel Hazırlanması	47
3.2.7.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi	48
3.2.7.3. UV Işık Altında Jellerin Görüntülenmesi	48
3.2.8. Kantitatif Real Time RT-PCR.....	48
3.2.8.1 Standart Hazırlığı İçin Agaroz Jelden DNA Ekstraksiyonu	49
3.2.8.2. Agaroz Jelden Ekstrakte Edilen DNA'ların Ölçümü	50

3.2.8.3. Kantitatif Real Time PCR İçin Standart Hazırlığı	50
3.2.8.4. Kantitatif Real Time PCR Analizleri	51
3.2.9. Western Blot.....	53
3.2.9.1. Hücrelerden Protein İzolasyonu	53
3.2.9.2. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	53
3.2.9.3. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması.....	54
3.2.9.4 SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	55
3.2.9.5. Proteinlerin Jelden PVDF Membrana Transferi ve Bloklama	55
3.2.9.6. Antikor Uygulamaları ve Görüntüleme	56
3.2.10. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Proliferasyon Deneyleleri	57
3.2.11. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Migrasyon Deneyleleri.....	58
3.2.12. Hücre Proliferasyon Analizleri İçin XTT Testi	59
3.2.13. Hücre Migrasyon Analizleri İçin Scratch Assay Testi.....	60
3.2.14. Kaspaz 3 Aktivite Analizi	61
3.2.14.1. Hücrelerin Hazırlanması	61
3.2.14.2. MTP Plate Hazırlanması	61
3.2.14.3. Proteaz Aktivite Analizi.....	62
3.2.14.4. Kaspaz 3 Aktivite Analizi	62
3.2.15. İstatistiksel Analiz.....	63
4. SONUÇLAR	64
4.1. UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B Baş Boyun Kanseri Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi ve Morfolojileri.....	64
4.2. ESM1 Ekspresyonunun ImmunoFloresan Boyama ile Gösterilmesi.....	65
4.3. RNA İzolasyonu Ölçüm Sonuçları.....	66
4.4. Gradient PCR ile Primerlerin Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....	68
4.5. GAPDH Kantitatif Real Time PCR ile Hücrelerin Transfeksiyon Etkinliklerinin Saptanması	69
4.5.1. UT-SCC-74A Hücre Hattında GAPDH-siRNA Etkinliğinin Gösterilmesi	70

4.5.2. UT-SCC-74B Hücre Hattında GAPDH-siRNA Etkinliğinin Gösterilmesi	73
4.6. Kantitatif Real Time PCR ile ESM1 Geninin mRNA Düzeyinde Baskılama Düzeylerinin Gösterilmesi	76
4.6.1. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1 Geninin mRNA Düzeyinde Baskılama Düzeyinin Gösterilmesi.....	76
4.6.2. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1 Geninin mRNA Düzeyinde Baskılama Düzeyinin Gösterilmesi.....	80
4.7. Western Blot ile ESM1 Geninin Protein Düzeyinde Baskılama Düzeylerinin Gösterilmesi	83
4.8. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyon Analizleri.....	84
4.9. XTT Testi ile Hücre Proliferasyon Analizleri.....	86
4.10. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Migrasyon Analizleri.....	88
4.11. In Vitro Scratch Assay ile Hücre Migrasyon Analizleri	90
4.12. Kaspaz 3 Aktivite Analizi	93
5. TARTIŞMA	96
KAYNAKLAR.....	102
EKLER.....	114

KISALTMALAR

°C:	Santigrad
bp:	Base pair
cDNA:	Complementary DNA
Cm ² :	Santimetrekare
CO ₂ :	Karbondioksit
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole
dk:	Dakika
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DNA:	Deoksiribonükleik asit
dsDNA:	Double Stranded DNA
dsRNA:	Double Stranded RNA
ECL:	Enhanced chemiluminescence
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
ESM1:	Endothelial cell-specific molecule 1
FBS:	Fetal Bovine Serum
HPV:	Human Papilloma Virus
kDa:	Kilo dalton
miRNA:	Micro RNA
mL:	Mililitre
mM:	Milimolar
ng:	Nanogram
nm:	Nanometre
nM:	Nanomolar
nmol:	Nanomol
NT:	Non-Targeting
OD:	Optical density
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCR:	Polymerase Chain Reaction
pmol:	Pikamol

PVDF:	Polyvinylidene difluoride
RISC:	RNA-induced silencing complex
RNA:	Ribonükleik asit
RNAi:	RNA Interference
rpm:	Revolutions per minute
RT-PCR:	Reverse transcription polymerase chain reaction
RTCA:	Real time cell analyzer
SDS-PAGE:	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA:	Small interference RNA
TBE:	Tris Borik Asit EDTA
TBS:	Tris Buffered Saline
U:	Ünite
UT-SCC-74A:	University of Turku Squamous Cell Carcinoma 74A
UT-SCC-74B:	University of Turku Squamous Cell Carcinoma 74B
UV:	Ultraviyole
V:	Volt
W:	Watt
XTT:	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfohenyl)-2 <i>H</i> -Tetrazolium-5-Carboxanilide)
µg:	mikrogram
µl:	Mikrolitre
µM:	Mikromolar

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Hücrelerin Kültürü İçin Hazırlanan Besiyeri Bileşenleri ve Miktarları.....	34
Tablo 2. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyeri Kabına Göre Çeşitli Kimyasalların Miktarları.....	37
Tablo 3. ESM1 siRNA-pool içerisindeki siRNA Dizi Bilgileri.....	39
Tablo 4. GAPD siRNA-pool içerisindeki siRNA Dizi Bilgileri.....	40
Tablo 5. Non-Targeting siRNA-pool içerisindeki siRNA Dizi Bilgileri.....	40
Tablo 6. cDNA Sentezinde RNA, Primer ve dH ₂ O Bileşenlerinin Miktarları.....	44
Tablo 7. cDNA Sentezinde Enzim Karışımı İçin Kullanılan Bileşenlerin Miktarları.....	45
Tablo 8. PCR Çalışmasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları.....	46
Tablo 9. PCR Çalışması Basamaklarının Sıcaklık ve Süreleri.....	47
Tablo 10. Kantitatif Real Time PCR Çalışmasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları.....	52
Tablo 11. Kantitatif Real Time PCR Basamaklarının Sıcaklık ve Süreleri.....	52
Tablo 12. Running Jel Hazırlığında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları.....	54
Tablo 13. Staking Jel Hazırlığında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnsanda Baş Boyun Kanserlerinin Bölgesel Gösterimi.....	4
Şekil 2. Napoli ve Arkadaşlarının Petunyalar Üzerine Yaptıkları Çalışma Sonucu.....	13
Şekil 3. Dicer enziminin siRNA oluşturma mekanizması.....	16
Şekil 4. Dicer enziminin miRNA oluşturma mekanizması.....	17
Şekil 5. RNA Interference teknolojisinde siRNA ve miRNA mekanizmaları.....	18
Şekil 6. ESM1 Geninin Kromozomal Lokalizasyonunun Şematik Gösterimi.....	22
Şekil 7. ESM1 Geninin Hücre Üzerindeki Lokalizasyonunun Şematik Gösterimi...	23
Şekil 8. ESM1 Geninin İnsan Dokularındaki İfade Düzeyleri.....	24
Şekil 9. UT-SCC-74A Baş Boyun Kanseri Hücrelerinin Invert Mikroskop Altındaki Görüntüsü.....	64
Şekil 10. UT-SCC-74B Baş Boyun Kanseri Hücrelerinin Invert Mikroskop Altındaki Görüntüsü.....	65
Şekil 11. UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B Hücre Hatlarında ESM1 Ekspresyonunun Immunofloresan Boyama İle Gösterilmesi.....	66
Şekil 12. UT-SCC-74A Hücrelerinden İzole Edilen Total RNA'ların Ölçüm Sonuçları.....	67
Şekil 13. UT-SCC-74B Hücrelerinden İzole Edilen Total RNA'ların Ölçüm Sonuçları.....	67
Şekil 14. ESM1 Geni İçin Yapılan Gradient PCR Çalışmasının Agaroz Jel Görüntüsü.....	68
Şekil 15. Beta Actin Geni İçin Yapılan Gradient PCR Çalışmasının Agaroz Jel Görüntüsü.....	69
Şekil 16. GAPDH Geni İçin Yapılan Gradient PCR Çalışmasının Agaroz Jel Görüntüsü.....	69
Şekil 17. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 25 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi.....	71
Şekil 18. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 25 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde GAPDH Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	71

Şekil 19. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 25 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	71
Şekil 20. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 50 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi.....	72
Şekil 21. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 50 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde GAPDH Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	72
Şekil 22. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 50 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	73
Şekil 23. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 25 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi.....	74
Şekil 24. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 25 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde GAPDH Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	74
Şekil 25. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 25 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	74
Şekil 26. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 50 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi.....	75
Şekil 27. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 50 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde GAPDH Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	75
Şekil 28. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 50 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	76
Şekil 29. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 25 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi.....	77
Şekil 30. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 25 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde ESM1 Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	78

Şekil 31. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 25 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	78
Şekil 32. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 50 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi.....	79
Şekil 33. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 50 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde ESM1 Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	79
Şekil 34. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 50 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	79
Şekil 35. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 25 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi.....	80
Şekil 36. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 25 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde ESM1 Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	81
Şekil 37. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 25 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	81
Şekil 38. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 50 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi.....	82
Şekil 39. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 50 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde ESM1 Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	82
Şekil 40. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 50 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösteriminde Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	82
Şekil 41. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1-siRNA Etkinliğinin Western Blot ile Gösterimi.....	83
Şekil 42. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1-siRNA Etkinliğinin Western Blot ile Gösterimi.....	84

Şekil 43. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin xCELLigence Sistemi ile Gösterimi.....	85
Şekil 44. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin xCELLigence Sistemi ile Gösterimi.....	86
Şekil 45. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin XTT Testi ile Gösterimi.....	87
Şekil 46. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin XTT Testi ile Gösterimi.....	88
Şekil 47. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Migrasyonuna Olan Etkisi.....	90
Şekil 48. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Migrasyonuna Olan Etkisi.....	90
Şekil 49. UT-SCC-74A Hücreleri ile Yapılan In Vitro Scratch Assay Mikroskop Görüntüleri.....	91
Şekil 50. UT-SCC-74A Hücreleri ile Yapılan In Vitro Scratch Assay Mikroskop Görüntülerinin Image J Analiz Sonuçları.....	92
Şekil 51. UT-SCC-74B Hücreleri ile Yapılan In Vitro Scratch Assay Mikroskop Görüntüleri.....	92
Şekil 52. UT-SCC-74B Hücreleri ile Yapılan In Vitro Scratch Assay Mikroskop Görüntülerinin Image J Analiz Sonuçları.....	93
Şekil 53. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Kaspaz 3 Aktivitesi Üzerine Etkisinin Gösterimi.....	94
Şekil 54. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Kaspaz 3 Aktivitesi Üzerine Etkisinin Gösterimi.....	95

1. GİRİŞ

Baş boyun kanserleri her yıl binlerce insanın ölümüne sebep olan, dünyada en sık görülen kanserler sıralamasında 6. sırada ve tedavisi zor bir kanser türüdür. Daha çok çevresel faktörlere dayandırılan baş boyun kanserlerinde, cerrahi tedavi yöntemleri hastaların yüz, boyun, ağız içi gibi anatomik yapılarda da ciddi bozulmalara ve bunun sonucunda da yutma, konuşma gibi hayat kalitesini etkileyen önemli fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılmamış baş boyun kanserlerinde, moleküler yolların ortaya çıkarılması, kanserleşme mekanizmalarının aydınlatılması ve buna yönelik tedavilerin oluşturulmasına ihtiyaç vardır.

Çalışmamız konusu ESM1 geni de çeşitli kanser türlerinde aktif rolü olduğu kanıtlanan, insanda endotel hücrelerinden salgılanan, tümör büyümesinde, metastazında ve anjiyogenezinde etkileri ortaya konulmuş kritik bir genidir. ESM1 geni ile ilgili şu ana dek baş boyun bölgesi kanserlerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. İnsan baş boyun bölgesinin kan damarlarıyla örülü, metastaz oranlarının yüksek ve bu bölgedeki endotel hücrelerin varlığını düşünerek çalışmamız kapsamında bu genin baş boyun kanserlerindeki etkisinin ne yönde olduğu araştırılmıştır.

Araştırmamız kapsamında kullandığımız RNA temelli gen susturulması tekniği olarak da bilinen RNA Interference, moleküler biyolojide son on yılın en önemli tekniklerinden biri haline gelmiştir. Genlerin model organizma veya hücre hatlarında ekspresyonlarını engelleyerek post transkripsiyonel analizler yapılmasına olanak sağlamaktadır.

Çalışmamızın hedefi; ESM1 genini kullanarak yeni moleküler tedavi yöntemlerine temel oluşturmaktır. Bu fonksiyonel çalışma ile ESM1 geninin baş boyun kanserlerindeki temel moleküler rolleri ortaya çıkarılmıştır. Çalışmamız aynı zamanda hem ESM1 geni için hem de baş boyun kanserleri için bir ilk olacağından literatüre de önemli bir katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser vücudun belirli bir bölümünde normal hücrelerin kontrol dışı büyümesiyle gelişen bir hastalıktır [1]. Kanser kelimesi köken ilk defa Yunan hekim Hipokrat tarafından kullanılmıştır. Hipokrat bir mide hastalığı olan ülser için; ülserli olmayan forma carcino, ülserli olan forma ise carcinoma demiştir. O zamanlarda Yunanistan'da ise kanser hastalığı için Türkçe karşılığı yengeç olan crab kelimesi kullanılmıştır. Daha sonra Roma'lı hekim Celsus crab kelimesini cancer olarak çevirmiştir [2].

Tarihi yüzyıllar öncesine dayanan kanser, bugün hala en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 12 Aralık 2013 tarihli basın bildirisinde; GLOBOCAN'a göre dünya çapında 2012 yılında 8.2 milyonu ölümle sonuçlanan 14.1 milyon kanser vakası, 2008 yılında ise 7.6 milyonu ölümle sonuçlanan 12.7 milyon kanser vakası meydana gelmiştir. Ve bu periyotta kanser tanısı konan 32.6 milyon kişinin hayatta olduğu belirlenmiştir. En çok tanı konulan kanser türleri sırasıyla; akciğer (1.8 milyon, %13), meme (1.7 milyon, %11.9) ve kolorektum (1.4 milyon, %9.7), en ölümcül kanser türleri ise sırasıyla akciğer (1.6 milyon, %19.4), karaciğer (0.8 milyon, %9.1), ve mide (0.7 milyon, %8.8) kanserleri olarak gösterilmiştir [3].

Amerika Birleşik Devletleri'nde yayınlanan 2015 yılı kanser istatistiklerine göre; kanser hastalığı ülke genelinde kalp hastalıklarından sonra en çok görülen 2. hastalık olarak belirtilmiştir [4]. Türkiye'de de durum farklı değildir. Türkiye İstatistik Kurumu 2013 yılı ölüm nedeni istatistiklerine göre; kanser %21.3 oranla dolaşım sistemi hastalıklarından sonra en ölümcül 2. hastalık türü olarak kayıtlara geçmiştir. Sağlık Bakanlığı 2013 Türkiye Kanser İstatistiklerine göre ise; her yıl 97 bin erkek ve 62.000 kadın olmak üzere toplam 159.000 kişiye kanser tanısı konmaktadır [5].

Kanserin ölüm insidansının bu kadar yüksek olmasının temelinde multifaktöriyel bir hastalık olması yatmaktadır. Bu faktörler arasında temel olarak radyasyon, UV ışınları, kimyasallar, virüsler, sigara alkol tüketimi, gıdalar, çevresel faktörler ve genetik yatkınlık yer almaktadır. Ayrıca kanser oluşumu ve oluşumuna sebep olan faktörler yaş, cinsiyet, ırk ve yaşanan bölgeye göre değişmektedir [6].

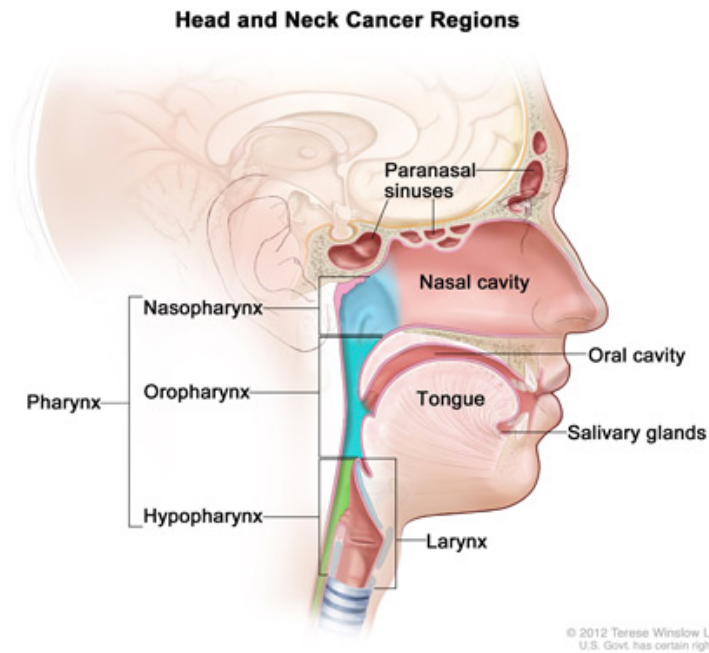
Günümüzde 80'in üzerinde kanser türü vardır. Bu kanserler olduğu bölgeye göre farklı şekilde isimlendirilir ve sınıflandırılırlar. Yapılan çalışmalarla hemen hemen tüm kanser türlerinin epidemiyolojisi çıkarılmıştır [7-9]. Bu epidemiyolojik çalışmaların derinliği de kanserde hedefe yönelik tedaviler açısından büyük önem arz etmektedir. Kanserde kabul edilen ve önde gelen tedaviler sırasıyla cerrahi, radyoterapi, hormonal tedavi içeren kemoterapi, immünoterapi ve diğer tür tedavilerdir [10-11]. Cerrahi tedavi hala önde gelmesine rağmen son yıllardaki teknolojik gelişmelerle birlikte moleküler tıp, nanotıp, kök hücre, nanoteknoloji, biyoteknoloji gibi alanlar başta olmak üzere daha bir çok alanda kanser araştırmaları sürmekte, tanı ve tedaviyi kolaylaştırıcı çözümler üretilmektedir [12-18]. Zamanla birçok kanserin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması beklenmekte ve bu mekanizmalara multidisipliner çalışmalarla yaklaşarak hedefe yönelik ve özgün yeni tedavi şekillerinin ortaya çıkması düşünülmektedir.

2.2. BAŞ BOYUN KANSERLERİ

2.2.1. Baş Boyun Kanseri Tanımı

Baş ve boyun kanserleri, üst sindirim yollarında epitel maligniteler içeren kanser türleridir [19]. Geleneksel olarak tümörler, anatomik olarak yerleşimlerine ve evrelerine göre sınıflandırılırlar. Baş boyun kanserleri de yerleştikleri bölge ve bu bölgedeki alt yerleşimlerine göre çeşitli şekillerde isimlendirilir. Baş boyun kanseri; baş boyun bölgesindeki ağız boşluğu, farinks ve larinks bölgesinden kaynaklanan ve çoğunlukla skuamoz hücreli kanser tipini oluşturan önemli bir tümör gurubudur. Üst

sindirim yolları; nazofarinks, ağızboşluğu, orofarinks, hipofarinks, larinksden oluşur. Ayrıca üst sindirim yollarından başka, paranasal sinüsler, kafa iskeleti, tükürük bezleri, endokrin bezler, deri, kulak ve temporal kemiklerde baş boyun kanserlerinde primer tümörlerin oluşabileceği bölgelerdir [20-21].



Şekil 1. İnsanda Baş Boyun Kanserlerinin Bölgesel Gösterimi [48]

2.2.2. Baş Boyun Kanserlerinin Epidemiyolojisi

Baş boyun kanserleri dünya çapında sık rastlanılan kanser tiplerindedir. Dünyada en sık kanser sıralamasında 6. sırayı alırlar. Her yıl yaklaşık 650.000 yeni kanser vakası ve 350.000 hastanın ölümüyle sonuçlanan, tüm kanser vakalarının %6'sını oluşturan önemli bir kanser türüdür [22-23].

Baş boyun kanser türlerine bakıldığında ise dünyada en sık görülen baş boyun kanseri türü ağız boşluğu ve larinks kanserleridir [24]. 2007 yılı verilerine göre; Amerika Birleşik Devletleri'nde toplam 45.660 baş boyun kanseri tanısı konmuş ve bu sayı tüm kanserler arasında %3'lük bir dilime sahip olmuştur.

Hastaların neredeyse %66'sına ileri evrede iken tanı konulmuştur. Tedavi seçeneklerinin gelişmesine rağmen 2007 yılında Amerika'da 11.210 kişi baş boyun kanserlerinden hayatını kaybetmiştir [19,25]. Hastalara tanı konulan yaş ortalamasına bakıldığında 60'lı yaşlar olduğu görülürken, erkek hastaların kadın hastalardan sayıca daha fazla olduğu tespit edilmiştir [19,26]. 2015 yılına gelindiğinde ise; istatistiklere göre yine Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 60.000 kişiye baş boyun kanserleri tanısı konmuş ve neredeyse 12.290 kişi hayatını kaybetmiştir. Kadın-erkek arası farkta ise hem tanıda hem de ölüm insidansında erkeklerin sayıca 3 kat fazla olduğu görülmüştür [4].

Türkiye'de de baş boyun kanserlerinin insidansı %3 olarak bildirilmiştir. Alkol ve özellikle tütün tüketiminin yoğun olduğu bölge ve kişilerde de bu insidansın arttığı görülmüştür. Türkiye'de de ağız boşluğu ve larinks kanseri en sık görülen baş boyun kanser türleridir [27]. Baş boyun kanserlerinin meydana gelmesi genellikle geç yaşlarda olmaktadır [28]. Genç hastaların tüm baş boyun kanseri vakalarının %1-5'ini oluşturdukları görülmüştür [29-30]. Ayrıca baş boyun kanserleri tanısı alan hastaların %50'sinde 5 yıllık sağ kalım görülmüştür [31]. Araştırmacılar ayrıca baş boyun kanserlerinin epidemiyoloji haritaları çıkarılırken, farklı hastalar üzerindeki farklı risk faktörlerinin de sonuçları etkileyebileceğini belirtmişlerdir [29,30,32].

2.2.3. Baş Boyun Kanserlerine Sebep Olan Faktörler

Baş boyun kanserlerinin ana risk faktörü tütün kullanımınıdır. Bu risk faktörü de kişinin tütün kullanım süresi ve sıklığı ile güçlü bir korelasyon gösterir [33]. Tütün kullanım çeşitleri hangi türü olursa olsun ciddi risk oluştururlar [34]. Yapılan araştırmalara göre tütün kullanımını azaltan veya bırakan insanlarda baş boyun kanseri gelişme riski azalmıştır. Aynı zamanda tütün dumanına maruz kalan kişilerde de kalmayan kişilere göre baş boyun kanseri gelişme riski yüksek çıkmıştır [35-36]. Sigara, pipo veya tütün çiğneme gibi alışkanlıklar yüksek miktarda karsinojen içerdiklerinden hemen hemen tüm kanser türlerinde risk faktörleri arasında yer alırlar. Bu ürünlerin kullanımının baş boyun kanserlerinde primer risk oluşturmasının

sebebi ise ağız yoluyla kullanılmalarıdır. Özellikle baş boyun kanserlerinden en sık görülen ağız boşluğu ve larinks kanserlerinde bu bölümler tütün dumanına direk maruz kalan organlardır. Tütün ürünleri kullanımıyla birlikte kötü ağız hijyeni de baş boyun kanser gelişiminde etkin rol oynamaktadır [37].

Alkol tüketimi de baş boyun kanserlerinde önemli bir risk faktörüdür. Alkolün tütün kullanımıyla birlikte etkisinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir. 2008 yılında yapılan bir çalışmada; 11.211 baş boyun kanseri hastasında hastaların öyküleri alındığında %7.4'ü sadece alkol, %6'sı sadece tütün, %81.6'sının ise hem alkol hem de tütün ürünleri kullandıkları belirlenmiştir [38].

Baş boyun kanserlerinde risk faktörü olarak gösterilen bir başka konuda Human Papilloma Virus (HPV) olmuştur. HPV cinsel yolla bulaşan bir hastalıktır. Papillomavirus familyasına ait bir DNA virüsüdür. HPV, deri başta olmak üzere vücudun farklı bölgelerini enfekte eder. Seksüel olarak aktif olan kişilerin %50'sinde HPV görülme riski vardır. Aynı zamanda çocuk ve gençlerde de görülebilmektedir [39-40]. HPV'nin enfeksiyon hastalıklarına yol açmasının yanı sıra kanser ile ilgisi olduğuda saptanmıştır. HPV; serviks, vajina, vulva, penis, anüs, konjoktiva ve üst sindirim yollarına tutunarak bu bölgelerde kanserleşmeye sebep olabilmektedir [41-43]. Baş boyun kanserlerinde de HPV'nin önemli bir risk faktörü olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Yapılan araştırmalarda HPV'nin baş boyun kanserinde tedaviyi olumsuz etkilediği saptanmıştır. Ayrıca baş boyun kanserli hastaların %34,5'unda HPV vakası görülmüştür [44-46]. Baş boyun kanserleri içinde önemli bir konu olan HPV ile ilgili araştırmalar devam etmekte, yapılan taramalar, tiplendirmeler ve analizler HPV-baş boyun kanseri korelasyonunu aydınlatmaya devam etmektedir.

Bunların dışında baş boyun kanserlerinde; sağlıksız beslenme, kötü yaşam koşulları, radyasyona maruz kalma, karsinojenlere maruz kalma, çeşitli kimyasallar, genetik yatkınlık ve faktörlerde rol oynamaktadır.

2.2.4. Baş Boyun Kanserlerinde Tanı ve Evrelendirme

Baş boyun kanserleri genellikle fiziksel semptomlarla kendilerini belli ederler. Hastada şişlik, yutma güçlüğü, ağrı, ağız boşluğunda yara ve hatta psikolojik bozukluklar bile görülebilir. Hasta bu tip şikayetlerle geldiğinde hekim ilk olarak hastanın öyküsünü dinler, fiziksel muayene yapar ve ilk bulgularını değerlendirir. Çok düşük ihtimal dahilinde de olsa hasta için tanı testleri istenir. Bu test genellikle ilk olarak biyopsi şeklinde olmakla birlikte, çeşitli endoskopik incelemelerde yapılabilir. Biyopsi ile alınan doku parçasının patolojik incelemeleri sonucunda kanser tanısı yapılabilmektedir. Kanser tanısı pozitif ise hekim bu noktadan sonra tümörün derecesini ister. Dereceleme ile birlikte çeşitli görüntüleme teknolojileri ise kanserin yayılım bölgeleri de araştırılır [47-49]. Baş boyun kanserleri evrelendirmesinde AJCC'nin (American Joint Committee on Cancer) TNM (Tumor Node Metastases) evreleme sistemi kullanılmaktadır [50]. Bu evreleme sisteminde T primer tümörü, N lenf nodlarını, M ise metastaz durumunu belirtir. Evrelendirme ise şu kodlara göre yapılmaktadır.

TX: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümör kanıtı yok

Tis: In situ karsinom (erken kanser komşu dokulara yayılmamıştır)

T1-T4: Tümörün boyutu ve/veya yayılımı (T1= \leq 2 cm, T2=2-4 cm, T3=4-6 cm, T4= \geq 6cm ve/veya primer bölge dışına taşma)

NO: Bölgesel lenf nodu tutulumu yok (lenf nodlarında kanser bulunmamıştır)

N1-N3: Bölgesel lenf nodları tutulumlarının sayı ve yayılım ölçüleri

M0: Metastaz yok (kansere vücudun diğer bölgelerine yayılmamıştır)

M1: Metastaz var (kansere vücudun diğer bölgelerine yayılmıştır)

Hekim tüm sonuçları aldıktan sonra hasta için en uygun tedavi yöntemine karar verir.

2.2.5. Baş Boyun Kanserlerinde Tedavi

Baş boyun kanserleri için etkin tedavi seçiminde bir çok faktör yer almaktadır. Genellikle geç yaşta ortaya çıkan bu kanser türünde erken tanı sağlanabilirse başarı şansı yüksektir. Erken tanı sağlanamadığı durumlarda ise tedavi için; hastanın yaşı, genel sağlık durumu, tümörün lokalizasyonu, büyüklüğü, evresi, hastanın tedaviye yaklaşımı, psikolojik durumu ve hatta sosyolojik durumu dahi göz önüne alınır. Baş boyun kanserlerinde uzun yıllardır süregelen ve günümüzde halen en etkili tedavi yöntemi cerrahidir. Hekimler organ ve/veya doku kaybı olmaması için tüm seçenekleri değerlendirmektedirler. Cerrahi operasyonun büyüklüğü de tümör ve yayılım durumuna göre değişir. Ayrıca radyoterapi ve kemoterapi de cerrahi ile birlikte en önemli tedavi yöntemleridir [51]. Baş boyun kanserlerinde ne kadar istenmeyen bir durumda olsa tedavi sonrası hastanın yaşam koşullarında değişiklikler olabilir. Buna yeme, içme, yutma, konuşma gibi etkinlikler örnek olarak verilebilir [52]. Cerrahi yöntemler bu kayıpları minimuma indirmek için her geçen gün gelişmektedir. Aynı zamanda moleküler biyoloji, biyokimya, biyoteknoloji gibi alanlardaki hızlı gelişmeler tedavileri destekleyici öneriler sunmakta ve özellikle de kanserde erken tanı için çok önemli gelişmeler kaydedilmektedir [53-56].

Günümüzde genom ebadında yapılan çalışmalarla birçok kanser türünde erken tanı markerları keşfedilmiştir. Önümüzdeki yıllarda da moleküler tıp alanında klinik uygulamaların kanser tedavilerinde ciddi yer edineceği düşünülmektedir.

2.2.6. Baş Boyun Kanserlerinin Moleküler Biyolojisi

Karsinogenez yani normal hücrelerden kanserli hücrelerin meydana gelmesi durumu her kanser türünde olduğu gibi baş boyun kanserlerinde de çok basamaklı bir süreçtir. Belirli bir bölgenin dış karsinojen faktörlere maruz kalmasıyla o bölgede kanserleşme başlayabilir. Aynı zamanda dış faktörlerle birlikte çeşitli genetik değişikliklerin oluşması da karsinogenezi tetikleyen en önemli faktörlerdendir. Bu şekilde çok etkenli oluşan karsinogeneze “çok basamaklı karsinogenezis (multistep

carcinogenesis)” denmiştir [57].

Baş boyun kanserindeki genetik değişiklikler, insan genom projesi ile ortaya çıkan gen kopya sayıları (CNV, copy number variation), heterozigosite kazancı ve kaybı (LOH) tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna veya onkogenlerin aktivasyonuna sebep olur. Böylece hücrenin normal yaşam döngüsü bozulur, hücreler kontrol edilemeyecek kadar çoğalırlar ve sonunda metastaz dahi yapabilirler. Genomdaki bu değişikliklerin bu şekilde hücre karakterine yansımalarıyla karsinogenez oluşur [58].

Baş boyun kanserleri tanısı geç koyulabilen kanser türleridir. Geç tanı sonrası da hem tedavi seçenekleri daralmakta, hem de hastalar için agresif uygulamalar doğmakta ve sonuç olarak doku ve organ kaybına varan durumlar yaşanmaktadır. Moleküler biyolojinin gelişmesi ve tıpta uygulamalarıyla da baş boyun kanserleri ile ilgili çokça çalışma yapılmıştır. Bazı genler ve gen ailelerinin de gelen değişimler kanserleşmeye direk olarak etki etmiştir. Bu genler ile yapılan çalışmalar ile baş boyun kanserinde erken tanıyı sağlayabilecek bazı biomarkerlar belirlenmiş ve bunların klinik uygulamalarına geçilmeye başlanmıştır. Bu biomarkerlar hastalarda baş boyun kanserlerinin gelişme riskini erken tanı ile gösterebilmekle beraber, bazı hastalar için de daha etkili tedavi yöntemlerinin seçilmesi konusunda belirleyici olabilmektedirler [33,59].

Baş boyun kanserlerinde normalden karsinom sürecine geçişteki en önemli değişikliklerden biri p53 geninde meydana gelmektedir. p53 tümör baskılayıcı bir gen olup, hücre döngüsü, apoptoz, DNA tamir mekanizmaları ve hücre yaşam olaylarını düzenler. Baş boyun kanserleri hastaların %60-80’inde p53’ün somatik mutasyonlarına rastlanmaktadır. Bu bakımdan p53’ün baş boyun kanserlerinde tanı, hayatta kalma, nüks ve lenf nodu durumlarını belirleme gibi olaylarda büyük önemi vardır [60-62].

P16’da tümör baskılayıcı bir gen olup, senesens ve hücre döngüsünü düzenleyen önemli bir proteindir. Bunu siklin bağımlı kinazlar olan 4 ve 6’ya bağlanıp bunların siklin D ile kompleks oluşturmasını inhibe ederek sağlar. Baş

boyun kanserli hastaların %50-80'inde p16 geninde ekspresyon kaybı gözlenmiştir. Bu kayıp hayatta kalma ve uzak bölge metastazlarının tanısında değerlidir. Ayrıca baş boyun kanserleriyle ilgili olarak HPV enfeksiyonunda p16 geni ekspresyonunun artış gösterdiği bilinmektedir. HPV teşhisinde de p16 ekspresyon düzeyi önemli bir tanı markeridir [63-66]

Tümör baskılayıcı bir başka gen olan PTEN'deki inaktivasyon veya mutasyonlarda vücutta birçok kansere sebep olabilmektedir. PTEN geni sinyal yollarını düzenleyerek, hücre proliferasyonunu ve apoptoz mekanizmalarını kontrol eder. Baş boyun kanserli hastaların %30'unda PTEN kaybı gözlenmiştir [67-68].

EGFR tirozin kinaz ailesinin hücre yüzeyi reseptörüdür. Hücrelerde birçok yolağı kullanarak hücre döngüsü, proliferasyon, apoptoz, anjiyogenez, tümör invazyon ve metastazını düzenlemektedir. EGFR bazı kanser türlerinde aşırı ekspresyon göstermektedir. Baş boyun kanserlerinde de %34-90 aralığında EGFR overekspresyonu gözlenmiştir [69-71].

Baş boyun kanserleri için diğer önemli bir molekül grubunda VEGF ailesidir. VEGF grubu endotel hücreleri için özgül etkilere sahiptir. VEGF overekspresyonu tümör oluşumu sırasında hücre proliferasyonuna ve migrasyonuna sebep olurlar. VEGF aynı zamanda bilinen en önemli anjiyogenez markerlarından biridir. Yapılan çalışmalarda baş boyun kanserlerinin %90'ında VEGF overekspresyonu görülmüştür. Özellikle damar oluşumunda primer rolü olan VEGF, baş boyun kanserlerinin bölgesel özelliğinden dolayı karsinogenez ve metastazda aktif rol oynamaktadır [72-73].

ING gen ailesi de hücre döngüsü, apoptoz ve senesens ile ilgili, kanserde önemli rolleri bulunan bir gen ailesidir [74]. ING proteinlerinin özelliği, hücre büyümesini ve hücrelerin diğer proteinlerle etkileşimini inhibe etmesidir. Bu özelliklerinin kanser hücrelerinde gözlenmesiyle tümör supresör genler olarak ele düşünülmüşlerdir [75]. 5 üyeye sahip bu gen ailesinin yapılan çalışmalarla özellikle kanser hücreleri üzerinde önemli etkileri bulunmuştur [74]. Baş boyun kanserlerinde

de ING ailesine ait genlerin hücrelerde tümör supressor etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [76-80].

Bunlarla birlikte Cyclin D1, Cox2, TGF Alfa ve MMP grubu gibi baş boyun kanserlerinde çeşitli yollardan erken tanıyı sağlayacak biomarkerlar tanımlanmıştır [33].

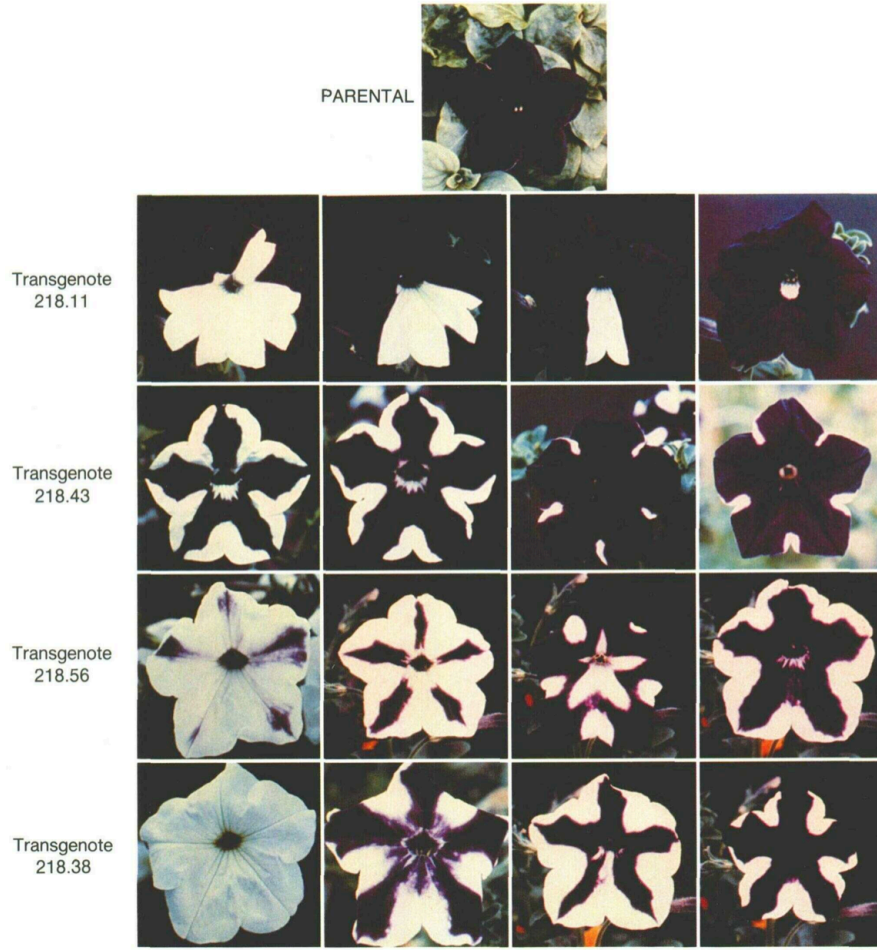
2.3. RNA INTERFERENCE

İngilizce olan “Interference” kelimesinin Türkçe karşılığında müdahale, karışma, girişim, engelleme gibi ifadeler bulunmaktadır. RNA Interference olayında ise belirli bir genin ifadesinin durdurulması gerçekleştiği için bu olay gen susturulması, baskılanması, sessizleştirilmesi şeklinde çevrilmiştir. Teorik olarak RNA Interference (RNAi) terimi, çift zincirli RNA’lar (dsRNA) kullanarak hedef mRNA’ları parçalayıp sonuç olarak bu mRNA’ların ekspresyonlarının susturulması anlamına gelmektedir [81]. Genlerin transkripsiyon sonrası aşamada susturularak fonksiyonlarının ortaya çıkartılmasında ve hedefteki istenmeyen genetik aktivitenin durdurulması yoluyla hastalık tedavisinde özgün bir yaklaşım sunmaktadır [82].

Moleküler biyolojik anlamda dünyanın en büyük projesi olarak kabul edilen “İnsan Genom Projesi” ile insan genomunun dizisi çıkartılmış ve böylece bu bilgilerin kullanıldığı çalışmalarla genlerin organizmadaki fonksiyonlarını öğrenmek mümkün olmuştur. Bu süreçte ortaya çıkan RNAi teknolojisi ile de hedef genlerin susturularak ilgili organizmalardaki etkilerinin gözlemlenmesi bir çok hastalığın genetik temellerini öğrenmede büyük rol oynamıştır.

2.3.1. RNA Interference Tarihçesi

RNA Interference ile ilgili ilk çalışma 1990 yılında Petunya bitkisinin taç yapraklarında yapılmıştır. Napoli ve arkadaşları pigment oluşturan genlerin ekstra kopyaları ile transgenik bitkiler oluşturmuşlardır. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar daha canlı ve parlak bir renk beklerken Şekil 2’de de görüldüğü üzere bazı transgenik bitkiler beyaz veya alacalı renk vermişlerdir. Burada pigment oluşturmak için bitkilere aktarılan CHS (chalcone synthase) enzimi baskılanmış ve bitkiler açık renk vermişlerdir [83]. Tarihte post transkripsiyonel gen susturma ilk kez bu çalışma ile kayıtlara geçmiştir.



Şekil 2. Napoli ve Arkadaşlarının Petunyalar Üzerine Yaptıkları Çalışma Sonucu [83]

Gen susturma işlemi bitkilerle sınırlı kalmamıştır. Aynı şekilde paralel bir çalışma 1995 yılında *Caenorhabditis elegans* üzerinde gerçekleştirilmiştir. Guo ve Kempfues belirli endojenik genlere özgü RNA'ların antisense zincirini kurtçuklara enjekte etmişlerdir. Bu zincirlerin kurtçuk genomunda ilgili genlerle hibridize olup, translasyonu bloke edeceğini düşünmüşlerdir. Aynı zamanda negatif kontrol amaçlı aynı RNA'nın sense zincirini de başka bir kurtçuğa enjekte etmişlerdir. Şaşırtıcı bir şekilde ilgili genin susturulmasında sense zincirinin, antisense zinciri kadar etkili olduğunu gözlemlemişlerdir [84].

1998 yılına gelindiğinde ise Fire ve arkadaşları yine *Caenorhabditis elegans* üzerinde RNA'nın sense ve antisense dizilerinin sinerjik etkisini görmek amacıyla aynı anda iki dizinin de enjeksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kurtçuklara çift zincirli RNA enjeksiyonu yapıldığında, etkinin tek bir zincire göre en az 10 kat hatta belki 100 kata kadar daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir [85]. Bilim tarihine yeni bir alan kazandıran bu çalışma 1998 yılında Nature dergisinde yayınlanmıştır. Aynı zamanda Andrew Fire ve Craig Mello bu çalışmalarından ötürü 2006 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'ne layık görülmüşlerdir.

Çift zincirli RNA (dsRNA) moleküllerinin *Caenorhabditis elegans* üzerindeki etkisi ortaya konulduktan sonra hem RNA Interference mekanizmasını çözmek hem de bu mekanizmayı diğer bir çok organizmada (bitki, mantar, insan vb.) göstermek mümkün olmuştur.

1999 yılında Hamilton ve Baulcombe bitkiler üzerinde yaptıkları çalışmada hürelere sadece dsRNA verildiğinde 25 baz çiftlik RNA türevlerinin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Science dergisinde yayınlanan bu çalışma RNAi iç mekanizmasını ortaya koymak açısından önemli rol oynamıştır [86].

2000 yılında Zamore ve arkadaşlarının Cell dergisinde yayınladıkları çalışmalarında; RNAi mekanizmasını *Drosophila* üzerinde araştırmışlardır. Çalışma sonucunda hücre ekstraktlarında dsRNA'ları oluşturan 21-23 baz çiftlik küçük RNA parçaları gözlemlemişlerdir. Bu oluşumun da RNase III ailesine ait Dicer adlı enzim tarafından yapıldığını göstermişlerdir [87]. Buna ek olarak aynı yıl Hammond ve arkadaşları bu küçük RNA'ların ribonükleazlar ile sıkı bir ilişkisi olduğunu keşfetmişlerdir. *Drosophila* üzerinde yapılan çalışma sonucu bu RNA ve ribonükleaz bileşenine RISC (RNA-induced silencing complex) adını vermişlerdir. [88].

2001 yılında; Dicer enzimi, Bernstein ve arkadaşları tarafından *Drosophila*'dan klonlanmıştır [89]. Bu klonlama, sentetik olarak üretilecek RNA'ların insan hücrelerine gönderilerek insan genom ebadında çalışmaların başlamasına sebep olmuştur.

Bu şekilde ortaya çıkarılan RNAi mekanizması ve bu mekanizmada görevli enzimlerin in vitro ortamda üretilir hale gelmesinin hemen akabinde memeli hücre kültürlerinde bu hücrelere dsRNA'ların gönderilmesi için çalışmalar başlamıştır. Sırasıyla siRNA ve miRNA prosesleri geliştirilmiş ve memeli hücrelerinde hedefe özgül spesifik genlerin baskılanmasına yönelik çalışmalar başarıyla gerçekleştirilmiştir [90-91].

1990 yılında başlayan ve 2001 yılında mekanizması çözümlenen bu teknoloji; bugüne değin başta bir Nobel ödülü olmak üzere, Nature, Cell, Science gibi dergilerde yüzlerce yayına spesifik olarak konu olmuştur. Önümüzdeki yıllarda da moleküler biyoloji, tıp ve biyoteknoloji gibi bilim dallarının multidisipliner yaklaşımıyla RNA Interference teknolojisinin yaygın klinik uygulamalarının gerçekleşmesi beklenmektedir.

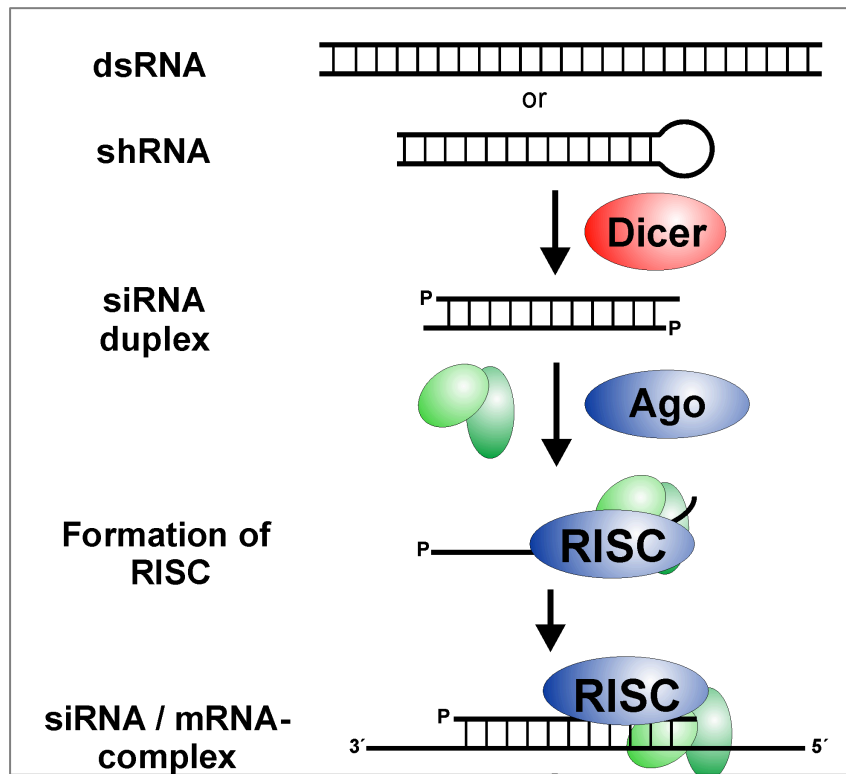
2.3.2. RNA Interference Mekanizması

RNA Interference teknolojisinin keşfiyle, genlerin ekspresyonlarının posttranskripsiyonel olarak susturulması başarılmıştır. Akabinde bu susturma mekanizmasının işleyişi ile ilgili çalışmalar yürütülmüş ve çözümlenmiştir.

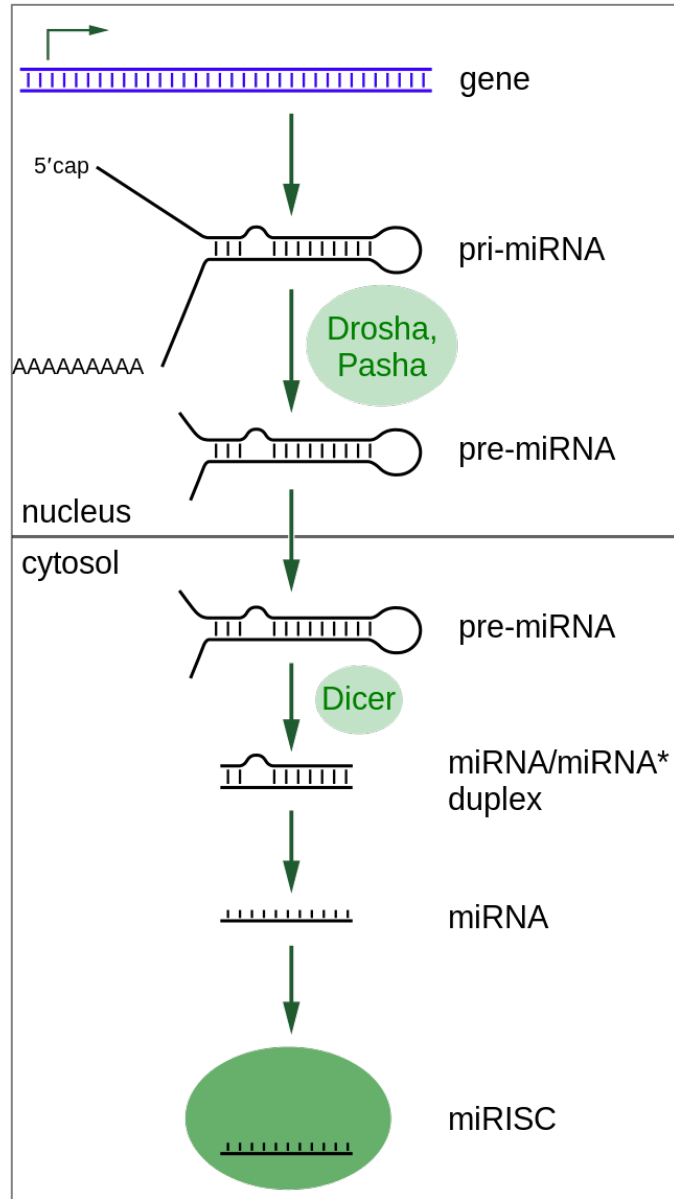
RNA Interference, RISC kompleksi tarafından kontrol edilen RNA bağımlı bir gen susturma işlemidir. Bu mekanizma hücrenin sitoplazmasında gerçekleşmektedir. Çift zincirli küçük RNA moleküllerinin sitoplazmada katalitik RISC komponenti ile karşılıklı etkileşimi sonucu gerçekleşir [92].

Bu mekanizmada 2 tip çift zincirli küçük RNA molekülü bulunmaktadır. Birincisi endojen veya ekzojen kaynaklı, 21-23 baz uzunluğunda olabilen ve mRNA'nın yıkılmasını sağlayan siRNA (small interfering RNA)'lardır [89]. İkincisi ise endojen kaynaklı, genellikle 22 baz uzunluğunda olan ve translasyonun baskılanmasını sağlayan miRNA (microRNA)'lardır [93].

RNA Interference mekanizmasının ilk adımı hücre sitoplazmasında dsRNA'nın Dicer adı verilen bir enzim tarafından 20-25 bazlık küçük RNA'lara parçalanmasıdır. Aynı zamanda Endoribonükleaz Dicer olarak da bilinen Dicer enzimi, RNase III ailesinin bir üyesidir. Bu şekilde oluşan küçük RNA parçalarına siRNA denmektedir. miRNA için ise tek fark; Dicer enziminin çekirdekte dsRNA yerine pre-miRNA'yı yine 20-25 bazlık küçük RNA'lara parçalamasıdır. Bu ilk aşamadan sonra RNA Interference mekanizması her iki grup içinde ortak ilerlemektedir [94-97]. Dicer enziminin siRNA ve miRNA oluşumundaki rolleri Şekil 3'te siRNA için Şekil 4'te de miRNA gösterilmiştir.



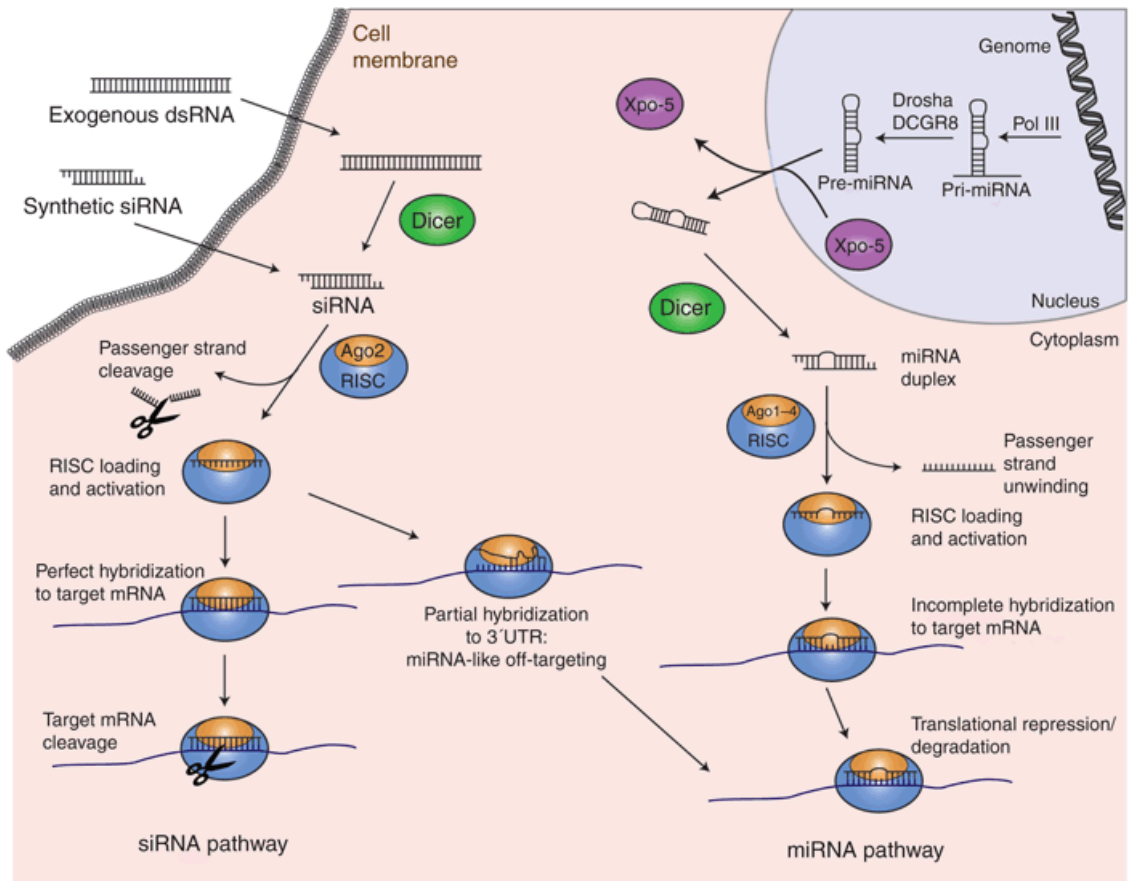
Şekil 3. Dicer enziminin dsRNA'yı parçalayarak siRNA oluşturma mekanizması [98]



Şekil 4. Dicer enziminin pre-miRNA'yı parçalayarak miRNA oluşturma mekanizması [99-100]

RNA Interference mekanizmasının ikinci adımı ise Dicer enziminin kesim işlemiyle oluşan siRNA veya miRNA'nın RISC kompleksine aktarılmasıdır. Şekil 3'te siRNA'nın şekil 4'te de miRNA'nın RISC kompleksine bağlanma mekanizması gösterilmiştir. siRNA ve miRNA'ların yapısal özellikleri RISC kompleksine bağlanmaları açısından önemlidir. Bu yapıların RISC kompleksine bağlanmaları için bir diğer önemli faktör Argonaute proteinleridir. Bu proteinler hem mRNA yıkımı

için katalitik bölge olup, hem de substrat seçiminde görevlidirler. RISC kompleksine aktarılan siRNA veya miRNA molekülleri komplementeri oldukları hedef mRNA'ya asimetrik olarak bağlanıp mRNA'nın yıkımına yol açarlar. Bu aşamada siRNA'lar mRNA'yı tamamen parçalayarak gen susturulması işlemini tamamlarlar. miRNA'lar ise farklı olarak mRNA'yı tamamen parçalamadan translasyon aşamasını baskırlar [81,87,101-102] Şekil 5'te de siRNA ve miRNA'ların ayrıntılı mekanizmaları görülmektedir.



Şekil 5. RNA Interference teknolojisinde siRNA ve miRNA mekanizmaları [103]

2.3.3. RNA Interference Teknolojisinin Kullanım ve Uygulama Alanları

RNA Interference teknolojisinin keşfiyle bu alandaki çalışmalar son 10 yılda çok hızla artan bir ivme göstermiştir. Bu süreçte sentetik olarak üretilen siRNA ve miRNA'lar ile fonksiyonel analizler yapılmış, bu analizler sonucunda genlerin çeşitli hastalıklardaki etki mekanizmaları öğrenilebilmiştir. RNA Interference teknolojisi ile hastalıklara terapötik bir yaklaşım uygulamak sadece in vitro olarak laboratuvar ortamında kalmamış bu teknolojinin klinikte kullanımı için de çalışmalar başlatılmıştır.

RNA Interference uygulamaları başta kanser moleküler biyolojisi ve kanser genetiği çalışmalarında olmak üzere, enfeksiyon hastalıklarında, genetik hastalıklarda, nörodejeneratif hastalıklarda, immün sistem hastalıklarında, gelişimsel hastalıklarda vb. kullanılmıştır [104].

RNAi tedavi amaçlı olarak ilk kez kronik myeloid lösemi (KML) hastalığında kullanılmıştır. KML kromozomal bir translokasyon sonucu Bcr-Abl proteininin gereğinden fazla aktive olması ve sonuç olarak yüksek miktarda akyuvar üretimiyle karakterize bir hastalıktır. siRNA'lar yardımıyla Bcr-Abl proteini baskılanarak tedavi yoluna gidilmiştir [105]. Ayrıca birçok kanser türünde çeşitli onkogenler in vitro ortamda baskılanarak kanserli hücrelerin bu durumda gösterdiği değişimler araştırılmıştır. Aynı zamanda kanserli hücrelerde çeşitli hedef genler baskılanarak hücrelerin proliferasyon ve migrasyon karakterleri gözlemlenmiştir. Bu şekilde birçok kanser türünde sayısız çalışma bulunmaktadır. RNAi teknolojisinin gelişmesi kanser genetiği alanında yepyeni bir pencere açmıştır. Her ne kadar şu ana değin kanser üzerindeki siRNA uygulamaları in vitro olarak laboratuvar ortamında yapılsa da, yakın gelecekte hastalar üzerinde etkili bir tedavi yöntemi olması beklenmektedir.

RNAi çalışmalarının ses getirdiği bir diğer alan enfeksiyon hastalıklarıdır. Klinik tıpta şu ana değin en yoğun çalışma hepatik viral enfeksiyon hastalıkları üzerine yapılmıştır. Fareler üzerinde nükleik asitlerin karaciğere kolayca

ulaştırılabilmesi bunun temel sebebi olmuştur [106]. Buradan yola çıkarak Hepatit C ve Hepatit B gibi enfeksiyon hastalıkları üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Bu hastalıkların virüslerinin genetik aktivitesini baskılamaya yönelik çalışmalarda siRNA uygulamaları başarılı olmuştur [107]. Ayrıca 2003 yılında Song ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; akut karaciğer yetmezliği modeli oluşturulmuş farelerde siRNA'lar bir hücre ölüm reseptörü olan Fas'a hedeflenmiş, bu siRNA'lar karaciğere ulaşıp Fas reseptörüyle birebir eşleşerek Fas ekspresyonunu baskılamışlardır. Sonuç olarak siRNA tedavisi uygulanan karaciğer hasarlı model fareler hayatta kalmışlardır [108].

Bu ve bunun gibi birçok in vivo ve in vitro moleküler çalışmanın başarıyla sonuçlanması ardından, RNAi teknolojisiyle ilaç geliştirme çalışmaları, klinik denemelerle başlamıştır. Şu an için dünya genelinde 14 farklı RNAi programı yürütülmektedir [109]. Bu tedavi programları RNAi temelli ilaç geliştirme ve bu ilaçların klinik denemeleri üzerine sürdürülmektedir. İlaç geliştirme sürecinde fazI keşif ve araştırma, fazII prelinik çalışmalar, fazIII klinik çalışmalar, fazIV ise onay anlamına gelmektedir [110]. Bu 14 program hakkındaki yayınlar, gelişmeler, ayrıntılı veriler, basın bildirimleri vb. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü tabanlı www.clinicaltrials.gov adresinde yayınlanmaktadır. Programların yürütüldüğü şirket, çalışma alanı ve seviyelerini özetlemek gerekirse;

Alnylam/Cubist/Kyowa Kirin şirketlerinin insan RSV enfeksiyonu üzerine çalışmaları fazIIb aşamasında, Pfizer/Quark şirketlerinin yaşa bağlı makula dejenerasyonu üzerine çalışmaları fazII aşamasında, Quark şirketinin akut böbrek yetmezliği üzerine çalışmaları fazII aşamasında, Zabecor şirketinin astım üzerine çalışmaları fazII aşamasında, Alnylam şirketinin primer ve sekonder karaciğer kanseri üzerine çalışmaları fazI aşamasında, Calando firmasının kanser üzerine çalışmaları fazI aşamasında, Silence şirketinin kanser üzerine çalışmaları fazI aşamasında, Sylentis şirketinin gözdeki glokom hastalığı üzerine çalışmaları fazI aşamasında, Alnylam şirketinin TTR amiloidozu üzerine çalışmaları fazI aşamasında devam etmektedir.

Tekmira firmasının hiperkolesterolemi hastalığı üzerine çalışmaları fazI aşamasında, Transderm firmasının pakionişi konjenita hastalığı üzerine çalışmalarında fazI aşaması tamamlanmıştır [109]. Opko firmasının yaşa bağlı makula dejenerasyonu üzerine çalışmaları fazIII aşamasında, Allergan/SIRNA şirketlerinin yaşa bağlı makula dejenerasyonu üzerine çalışmaları fazII aşamasında sonlandırılmıştır [109]. Duisburg-Essen Üniversitesi'nde yürütülen kronik myeloid lösemi hastalığında da fazI aşaması tamamlanmış durumdadır [109].

Sonuç olarak RNAi klinik çalışmaları her geçen gün ilerlemekte, aynı zamanda gelişimini sürdüren moleküler biyoloji alanında da yerleşik bir araç olarak kullanılmaktadır.

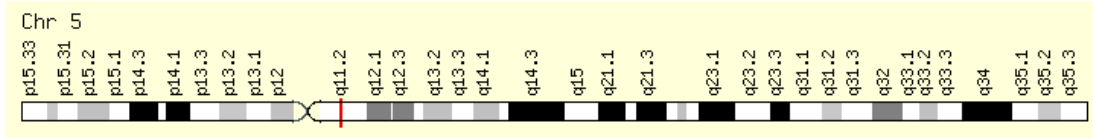
2.4. ESM1 GENİ

Açık adı Endothelial Cell Specific Molecule-1 olan ESM1 geni 1996 yılında Philippe Lassalle ve arkadaşları tarafından HUVEC hücre hattında tanımlanmıştır [111]. Literatürde bilinen bir diğer ismi Endocan'dır. ESM1 geninin tanımlanmasıyla birlikte Lassalle ve arkadaşlarının yayınladıkları ilk makalede bu genin vasküler hücre biyolojisi ve insan akciğer fizyolojisi alanında güçlü sonuçlar doğurabileceği belirtilmiştir. 1996 tarihinden bugüne kadar da ESM1 geni ile ilgili 100'ü aşkın bilimsel çalışma yayınlanmıştır. Başta kanser olmak üzere birçok hastalıkta ESM1 geninin etkileri literatürde kendisine yer bulmuştur.

2.4.1. ESM1'in Genomik Organizasyonu

ESM1 geni insanda 5. kromozom uzun kolu üzerinde bölge 1, bant 1 ve alt bant 2 bölgesinde lokalizedir. 5. kromozom üzerinde 54.273.692 ile 54.318.499. bazlar arasında 44.808 bazlık büyüklüğe sahiptir. 2 intron tarafından ayrılmış 3 ekzon şeklinde organize olmuştur [111]. Ekzon 1 362 baz, ekzon 2 150 baz ve ekzon

3 1560 baz uzunluğundadır.



Şekil 6. ESM1 Geninin Kromozomal Lokalizasyonunun Şematik Gösterimi [112]

ESM1 gen ürünü 50 kDa’luk bir proteindir. 165 aminoasitten oluşmuş olgun bir polipeptid yapısındadır. Dermatan sülfat ile serin 137 bölgesine bağlanarak kovalent bağ oluşturur. ESM1 2001 yılında dermatan sülfat proteoglikan olarak tanımlanmıştır. Öncelikle HUVEC hücrelerinde kültüre edilmiş ardından HEK hücrelerinde overeksprese edilmiştir. Bu aşamada ESM1’in bir proteoglikan olduğu tespit edilmiştir. Ardından ESM1 “endocan” ismi verilerek proteoglikanlar ailesine dahil olmuştur [113]. Vasküler endotelyumlar tarafından eksprese edilen bu proteoglikanın sağlıklı bireylerde kanda serbest halde dolaştığı bulunmuştur [111,114].

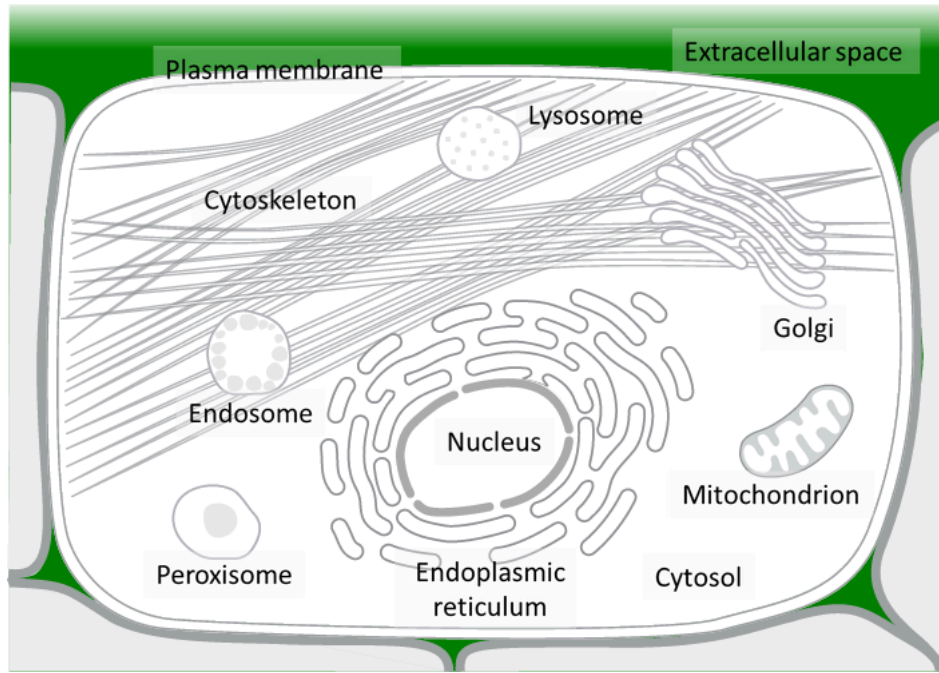
ESM1 geni 552 nükleotidlik açık okuma bölgesine (open reading frame) sahiptir. 4 adet transkript varyantı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi 184 aminoasitten oluşmakta ve 2169 baz uzunluğundadır. İkincisi 134 aminoasitten oluşmakta ve 1326 baz uzunluğundadır. Üçüncüsü 89 aminoasitten oluşmakta ve 756 baz uzunluğundadır. Dördüncüsü aminoasit içermemekte yani protein kodlamamakta ve 607 bazlık diziye sahiptir [115].

2.4.2. ESM1 Geni Moleküler Biyolojisi

ESM1 geni özellikle insan akciğer ve böbrek dokularında endotel hücrelerinde eksprese olan salgılanmış bir proteini kodlar. Bu genin ekspresyonu

sitokinler tarafından düzenlenmektedir ve aynı zamanda endotel bağımlı patolojik bozukluklarda etkili olduğu düşünülmektedir.

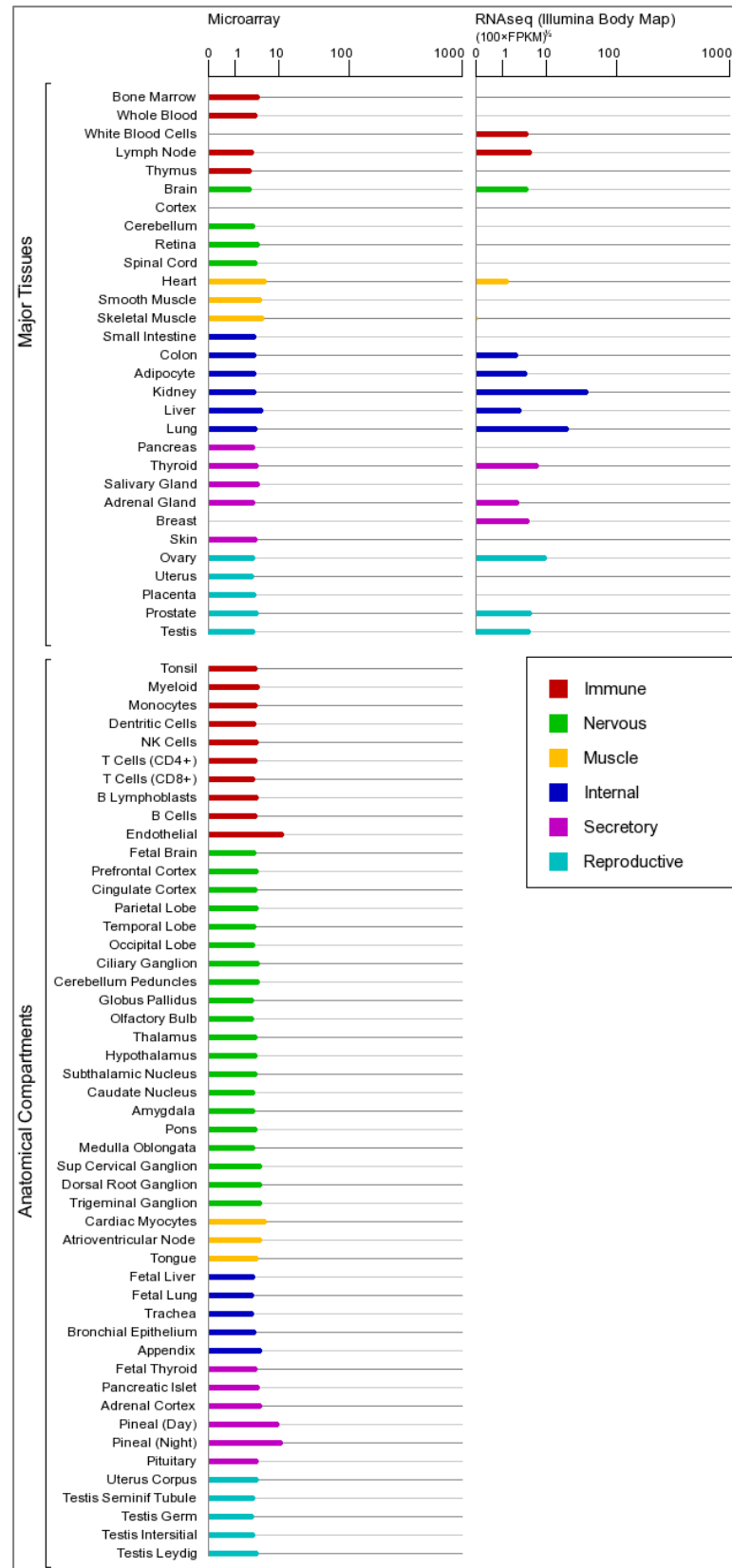
ESM geninin hücre üzerindeki lokalizasyonunun ekstraselüler bölgede olduğu tespit edilmiştir. Şekil 7’de temel hücre yapısı gösterilmiş, yeşil boyalı bölgede ESM1 varlığı belirtilmiştir.



Şekil 7. ESM1’in Hücre Üzerindeki Lokalizasyonunun Şematik Gösterimi [112]

Aynı zamanda birçok hastalığın moleküler temellerinin araştırılmasında; çeşitli genlerin rollerinin belirlenmesi de çok önemlidir. Son yıllarda moleküler biyolojik araçların gelişmesiyle genlerin farklı doku tiplerindeki ifade düzeyleri belirlenebilmektedir. Başta PCR sistemleri olmak üzere, microarray, RNAseq gibi ileri teknolojiler sayesinde bu işlemler daha spesifik düzeyde incelenebilmektedir. Şekil 8’de de ESM1 geninin farklı doku tiplerinde yapılan microarray ve RNAseq çalışması sonuçları görülmektedir. Microarray çalışması hem majör dokularda hem de daha derin olarak anatomik yapılarda gerçekleştirilmiştir.

ESM1’in hem hücrelerde ekstraselüler boşlukta lokalize olması, hemde vücutta endotel hücrelerinden salgılanması onu birçok dokuda aktif hale getirmiştir.



Şekil 8. ESM1 Geninin İnsan Dokularındaki İfade Düzeyleri [112]

2.4.3. ESM1 ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Yapılan çalışmalarla ESM1 mRNA seviyesinin büyük ölçüde içinde bulunulan şartlara göre düzenlendiği gösterilmiştir. İnflamatuvar sitokinler örneğin tümör nekrozis faktör (TNF-a) veya Interlökin-1 (IL-1)'in HUVEC hücrelerinde ESM1 mRNA seviyesini zamana bağlı bir şekilde artırdığı gözlemlenmiştir. ESM1 mRNA seviyesindeki artış TNF-a uygulamasından 1 saat sonra ortaya çıkmış, 18 saat sonra ise tepe noktasına ulaşmıştır [111]. Aynı zamanda ESM1 mRNA ifadesinin yükselişi adipositlerde PMA veya retinoik asit ile uyarımdan sonra da gözlenmiştir [116]. Bunun aksine bir diğer inflamatuvar aracı olan IFN-g uygulamasından 24 saat sonra ESM1 mRNA düzeyinde bir değişiklik oluşmamıştır. Ancak; endotel hücrelerinde TNF-a uygulaması ile artan ESM1 mRNA seviyesinin de IFN-g ile tamamen baskılandığı gözlenmiştir [111]. Bu sonuçlar göstermektedir ki; inflamatuvar süreçte ESM1'in mRNA düzeyindeki ekspresyonunun süreci düzenleyici bir rolü bulunmaktadır [114].

Şekil 8'de görüldüğü gibi ESM1 insanda birçok dokuda eksprese olmaktadır. Aynı zamanda bu dokuların kanserleşmiş tiplerinde de ESM1 ekspresyonu gözlenmiştir. Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada ESM1'in karsinogenez, metastaz ve anjiyogenezde çeşitli etkilerinin olduğu ortaya konmuştur. Mide, hepatoselüler, kolorektal, böbrek, nazofaringeal, küçük hücreli akciğer, akut myeloid lösemi ve yumurtalık kanserlerinde ESM1 geni ile ilgili fonksiyonel çalışmalar yapılmıştır.

Mide kanserlerinde ESM1 geninin profili yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Liu ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınladıkları çalışmalarında; ESM1'in mRNA ve protein ekspresyonları mide kanseri ve normal mide dokularında analiz edilmiş, bu analizlerin klinik ve histopatolojik değerlendirmelerle korelasyonları belirlenmiştir. Bu sonuçlar hastaların yaşam süreleriyle analiz edilmiştir. Sonuçlara göre yüksek ESM1 ekspresyonu mide kanserli hastalarda potansiyel bir tümör biomarkeri olarak değerlendirilmiştir. Aynı çalışmada bu sonuçlar ESM1'in mide kanseri ve normal endotel hücrelerinde overeksprese edilerek proliferasyon analizleriyle de

desteklenmiştir [117]. Diğer yandan mide kanserli hastalarda ESM1 serum seviyeleri de araştırılmıştır. Mide kanseri ve sağlıklı gruplar arasında ELISA testiyle ESM1 seviyesi ölçülmüş ve sonuç olarak hasta grubunda ESM1 seviyesi anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır. Bu sonuçlara göre araştırmacılar, mide kanserlerinde ESM1 serum seviyesinin klinik önemini ve potansiyel bir serum markerı olabileceğini belirtmişlerdir [118-119].

Hepatoselüler karsinoma da ESM1'in fazlaca çalışıldığı bir diğer kanser türü olmuştur. Huang ve arkadaşları bu konudaki ilk çalışmayı 2009 yılında yapmışlar ve hepatoselüler karsinoma hastalarına ait dokularda ESM1 ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda hepatoselüler karsinoma dokularında ESM1 ekspresyonunun düşük sağ kalımla doğru orantılı olduğunu ortaya koymuşlardır [120]. Aynı şekilde yürütülen iki çalışmada daha ESM1'in hepatoselüler karsinomada tümör invazyonu ve anjiyogenezinde etkili olduğu bulunmuştur [121-122]. Hepatoselüler karsinomada kapsamlı bir moleküler çalışma Kang ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yayınlanmıştır. Hepatoselüler karsinomada ESM1 mRNA ve protein ekspresyonları klinik ve patolojik verilerle korele edilmiş, ESM1 serum düzeyleri ölçülmüştür. Bunlara ek olarak SK-Hep1 hepatoselüler karsinoma hücrelerinde ESM1 ekspresyonu ESM1-siRNA kullanılarak baskılanmış ve farklı etkiler gözlemlenmiştir. SK-Hep1 hücrelerinde ESM1 ekspresyonunun olmaması hücrelerin hayatta kalma başarısını NF- κ B yolağını inhibe ederek düşürmüştür. Ayrıca hücrelerde ESM1'in baskılanması migrasyon ve invazyonu da inhibe etmiştir. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar ESM1'in hepatoselüler karsinoma için tanıda kullanılabilir bir marker olduğunu belirtmişlerdir [123].

Kolorektal kanserlerde de Ji ve arkadaşları 2010 yılında ESM1 serum düzeyinin kanserli hastalarda sağlıklı gruba göre iki katından daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın analizinde ESM1'in kolorektal kanserlerin erken tanısında potansiyel bir serum markerı olabileceği belirtilmiştir [124]. Kolorektal kanserlerde de kapsamlı bir moleküler çalışma yine Kang ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada ESM1 geni kolorektal kanser hücre

hatlarında siRNA kullanılarak baskılanmış ve akabinde bir dizi moleküler analiz gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda ESM1'in kolorektal kanserlerde hücre yaşamı, hücre döngüsü, proliferasyonu, migrasyon ve invazyonu çok çeşitli yollardan etkilediği ve baskıladığı bulunmuştur. ESM1'in kolorektal kanserlerde NF- κ B ile bağlantılı olduğu ve NF- κ B'nin promotorunu aktive ettiği belirlenmiştir. Aynı zamanda ESM1'in, NF- κ B aktivasyonu ile hücre büyümesi ve metastatik süreci düzenlediği gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ESM1'in kolorektal kanser tedavisinde kullanılabilir bir terapötik ajan olduğu belirtilmiştir [125]. Bir başka çalışmada da, Kim ve arkadaşları 2012 yılında kolorektal kanserlerde hipoksik şartlarda tümörjenez sürecinde ESM1 ve HIF-1 α arasındaki korelasyonu belirlemişlerdir. Buna göre kolorektal kanser hücrelerinde HIF-1 α 'nın ESM1 ekspresyonunu indüklediğini, ve ESM1 ekspresyonunun HIF-1 α tarafından düzenlendiği gösterilmiştir [126].

Böbrek kanserlerinde de ESM1'in etkinliği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. 2009 yılında Rennel ve arkadaşları çeşitli anjiyogenik büyüme faktörlerini hücrelere uygulamışlar, bu faktörler arasında VEGF-A'nın spesifik olarak ESM1 transkripsiyonunu artırdığını tespit etmişlerdir. Aynı zamanda böbrek kanserlerinde artan ESM1 ekspresyonunun tümör büyümesinde rol aldığını bildirmişlerdir [127]. Leroy ve arkadaşları da 2010 yılında berrak hücreli böbrek kanserinde yüksek ESM1 ekspresyonu olduğunu bulmuşlar, ESM1'in takip edilmesi gereken ilginç bir marker olabileceğini belirtmişlerdir [128].

Nazofaringeal karsinoma ile ESM1 ilişkisi de çalışılan bir başka konu olmuştur. 2013 yılında Yu ve arkadaşları; LMP1 (latent membrane protein 1)'in EBV (Epstein-Barr virüs) ile alakalı nazofaringeal kanserlerdeki rolünün mekanizmasını araştırmışlardır. Yapılan microarray çalışmasında LMP1 tarafından upregüle edilen en majör genin ESM1 olduğunu bulmuşlardır. Bu sonucu dokular üzerinde yaptıkları ekspresyon çalışmasıyla doğrulamışlar, nazofaringeal kanserli dokularda ESM1 ve LMP1 arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlemişlerdir. Ayrıca ESM1 ekspresyonuna sahip nazofaringeal kanser hastalarının ESM1 ekspresyonu olmayanlara göre daha az yaşadıklarını tespit etmişlerdir. Sonuç

itibariyle bu çalışmada ESM1 ile ilgili olarak, nazofaringeal karsinomada yeni bir moleküler marker olduğu belirtilmiştir [129].

Küçük hücreli akciğer kanseri, akut myeloid lösemide ve epitelyal yumurtalık kanserinde de hastalarda sağlıklı gruba göre ESM1 ekspresyonu yüksek bulunmuş, ESM1'in bu kanser türlerinde moleküler tıpta kullanılabilir bir biomarker olabileceği belirtilmiştir [130-132].

Diğer hastalık gruplarında da ESM1 hakkında çeşitli çalışmalar mevcuttur. ESM1'in kan dolaşımında bulunan bir proteoglikan oluşundan yola çıkan araştırmacılar kan zehirlenmesi olarak bilinen sepsis'te ESM1 seviyesinin normale göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. ESM1'in kandaki seviyesinin çeşitli hastalıklarla ilgili olabileceğini belirtmişlerdir [133-134]. Balta ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladıkları çalışmalarında ESM1 serum düzeylerinin Behçet hastalığında kullanılabilir bir marker olabileceğini belirtmişlerdir [135]. ESM1 ile ilgili ilginç bir başka çalışma da 2012 yılında Li ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Araştırmacılar böbrek naklinden sonra kronik reddetme sorunu yaşayan hastalarda ESM1 mRNA ve protein seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığını tespit etmişlerdir [136]. 2014 yılında Voiosu ve arkadaşları ESM1'in inflamatuvar bağırsak hastalığında serumda bulunma düzeyinin hem sağlıklı hemde kanser hastalarının serum düzeylerine göre anlamlı şekilde daha yüksek çıktığını belirlemişler ve ESM1'in inflamatuvar bağırsak hastalıklarında potansiyel bir rolü olduğunu ifade etmişlerdir [137].

Yapılan bu çalışmalarla ESM1 moleküler tıpta kendisine önemli bir yer edinmiştir. Gelecek yıllarda yüksek popülasyonlara uygulanmış daha kapsamlı analizler, çeşitli in vivo çalışmalar ve farklı disiplinlerin yaklaşımıyla ESM1'in hastalıklardaki etkisi, tanı ve tedavide biomarker olarak kullanımı ve çeşitli farmakolojik ürün çıktılarının bilim dünyasında yer alması beklenmektedir.

3. MATERYAL VE METODLAR

3.1. MATERYAL

3.1.2. Hücre Hatları

Baş boyun kanserine ait UT-SCC-74A (University of Turku Squamous Cell Carcinoma 74A) ve metastazı UT-SCC-74B (University of Turku Squamous Cell Carcinoma 74B) hücre hatları Prof. Dr. Reidar Grénman'ın nazik katkılarıyla Turku Üniversitesi, Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Bölümü'nden (Turku, Finlandiya) temin edildi.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

-20 °C Buzdolabı: Uğur UCF410SSL, Türkiye

-80 °C Buzdolabı: Sanyo MDF U5386S, Japonya

Agaroz Jel Elektroforezi Güç Kaynağı: VWR Power Source 300V, ABD

Agaroz Jel Elektroforezi Sistemi: Cleaver Scientific MS Choice, İngiltere

Benmari: Nüve, NB20 Su banyosu, Türkiye

Buz Makinesi: Scotsman AF80, ABD

Class 2 Biyogüvenlik Kabini: Metisafe MSC-II-120, Türkiye

CO2 İnkübatörü: Thermo Scientific Forma Stericycle 371, ABD

Etüv: Nüve FN400, Türkiye

Hassas Terazisi: Precisa XB1200C, İsviçre

Hücre Sayım Cihazı: BIO-RAD TC20, ABD

Immunofloresan Mikroskop: Leica DM1000 DFC 295, Almanya

Invert mikroskop: Leica DM IL LED DFC295, Almanya

Isı Bloğu: Techne Dri-Block DB-2D Heatblock, İngiltere

Katı Otoklav: Nüve OT23B, Türkiye

Makrosantrifüj: Hettich Rotina 380 R, Almanya

Manyetik Karıştırıcı: VWR VMS-C7, ABD
Mikrodalga Fırın: Samsung MV71E, Kore
Mikropipet Takımı: Gilson F144569, Fransa
Mikroplate Okuyucu: Thermo Scientific Varioskan™ Flash Multimode Reader, ABD
Mikrosantrifüj: Hitachi Himac CT15RE, Japonya
MiliQ Su Arıtma Sistemi: Thermo Scientific Barnstead Easypure II, ABD
Nano Drop: Thermo Scientific NanoDrop 2000c, ABD
PH metre: Hanna PH 211, ABD
Pipet Tabancası: Dragon Lab Levoplus, Çin
Real Time PCR Cihazı: Qiagen Rotor Gene Q, Almanya
Resiprokal Shaker: Heidolph Promax 1020, Almanya
Saf Su Arıtma Sistemi: Thermo Scientific Barnstead RO System, ABD
Shaker: VWR Rocking Platform, ABD
Sıvı Azot Tankı: Thermo Scientific BIOCANNE 34, ABD
Sıvı Otoklav: Nüve OT40L, Türkiye
Sonikasyon Cihazı: Diagenode Bioruptor Sonicator, Belçika
Spinner Cihazı: Biosan FVL-2400N, Letonya
Thermal Cycler: BIO-RAD T100, ABD
Ultra Hassas Terazî: Shimadzu AUW220D, Japonya
UV transillüminatör: Vilber Lourmat Quantum ST4, Fransa
Vorteks Cihazı: Stuart Biocote Vortex Mixer SA8, İngiltere
Western Blot Görüntüleme Cihazı: BIO-RAD ChemiDoc MP, ABD
Western Blot Güç Kaynağı: BIO-RAD Powerpac Basic, ABD
Western Blot Hızlı Transfer Cihazı: Thermo Scientific Pierce G2 Fast Blotter, ABD
Western Blot Jel Elektroforez Sistemi: BIO-RAD Mini Protean Tetra Cell, ABD
xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi: RTCA-DP, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya ve ACEA Bio- sciences, San Diego, CA

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Sarf ve Kimyasal Malzemeler

%37 Formaldehide Solution: Merck, #1040022500

0,2 mL PCR tüp: Thermo Scientific, #AB-0620

0,5 mL Ependorf tüp : Neptune, #3735.X

1,5 mL Ependorf tüp: Neptune, #3745.X

100 Bp Marker: Thermo Scientific, #SM0241

10X PBS: Lonza, Accugene #51226

2-propanol: Sigma Aldrich, #24137-2,5L-R

6X Loading Dye: New England Biolabs, #B7021S

Acrylamide: Sigma Aldrich, #A3553-100G

Agaroz: Lonza, #50004

Bis Acrylamide: Sigma Aldrich, #M7279-100G

Borik Asit: Merck, #1.00165.1000

BSA (Bovine Serum Albumine): Sigma Aldrich, #A3294

Coomassie: Thermo Scientific, #1856210

Coverslips: Thermo Scientific, Nunc Thermanox, #174950

Cryovial Tüp: Thermo Scientific, #377267

DEPC Treated Water: Ambion, #AM9915G

DMSO: Santa Cruz, #sc202581

EDTA: Sigma Aldrich, #E5513-100G

Ethanol: Merck, #1009832511

Ethidium Bromide: Merck, #1.11608.0030

Falkon Tüpler: Thermo Scientific, Nunc (15mL #339650, 50mL #339652)

Glycine: Sigma Aldrich, #33226-250G

Hızlı Transfer Buffer: Lonza, #00200256

Hücre Kültür Flaskları: Thermo Scientific, Nunc (T-25 cm² #156367, T-75 cm² #156499, T-175 cm² #159910)

Hücre Kültür Well Plate: Thermo Scientific, Nunc (6'lık #140675, 12'lik #150628, 96'lık #167008)

Hücre Sayım Slide: BIO-RAD, #145-0011

Jel Ekstraksiyon Kesim Ucu: Cleaver Scientific, #CSLGelX4

KCl: Merck, #1.04936.1000
Kloroform – Merck, #1024312500
Koruyucu Madde: Life Technologies, ProLong® Gold Antifade Reagent, #P36934
Methanol: Merck, #1.06009.2511
NaCl: Sigma Aldrich, #31434-1KG-R
NaOH: Merck, #1.06462.1000
Nuclease Free Water: GE Healthcare Hyclone, #SH30538.02
Parafilm: Bemis, #PM992
Paraformaldehit: Sigma Aldrich, #158127
Protease Inhibitor Coctail: Santa Cruz, #sc-24948A
Protein Extraction Reagent: Thermo Scientific, #87792
PVDF Membran: Thermo Scientific, #88518
Scraper: Greiner Bio, #541080
SDS: Sigma Aldrich, #L3771-100G
Steril Filtreli Pipet Uçları: Neptune, (10 µl #BT10, 100 µl #BT100, 200 µl #BT200, 1000 µl #BT1250)
Steril Serolojik Pipetler: Thermo Scientific, Nunc (2mL #170354, 5 mL #170355, 10 mL #170356, 25 mL #170357)
Süt Koruyucu: Supelco, #48912-U
TEMED: Nacalai Tesque
Tripan Blue: BIO-RAD, #145-0021
Tripsin-EDTA: Biochrom, #L2153
Tris-HCl: Amresco, #0234-100G
Triton X-100: MP Biomedicals, #807426
Trizma: Sigma Aldrich, #T1503
Tween-20: Fisher Scientific, #BP337-100
Western Blot ECL Solution, BIO-RAD, #170-5060
Yağsız Süt Tozu: Fluka Analytical, #70166-500G

3.2. METODLAR

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Kullanılan Hücre Hatlarına Ait Bilgiler

Baş boyun kanserine ait UT-SCC-74A (University of Turku Squamous Cell Carcinoma 74A) ve metastazı UT-SCC-74B (University of Turku Squamous Cell Carcinoma 74B) hücre hatları Prof. Dr. Reidar Grénman'ın nazik katkılarıyla Turku Üniversitesi, Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Bölümü'nden (Turku, Finlandiya) temin edildi.

UT-SCC-74A hücre hattı 31 yaşında bir erkek hastanın dil sağ marjinde skuamoz hücreli karsinom olan, G1-G2 evresinde T3N1M0 tümörden hazırlanmıştır. UT-SCC-74B hücre hattı ise aynı hastanın ileri safha metastaz yapmış tümöründen hazırlanmıştır.

3.2.1.2. Hücre Kültürü Çalışma Alanı

Tüm hücre kültürü çalışmaları, hücre kültürü için özel olarak dizayn edilmiş hücre kültürü araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu laboratuvar; hepafiltre havalandırmalı, günlük olarak oda içerisine yerleştirilmiş UV lambaları ile sterilize edilen, çalışanların bu bölüm için ayrı birer önlük, terlik, maske kullandığı, dışarıyla hiçbir madde-malzeme alışverişi yapılmayan ve hücre kültürü çalışmalarını gerçekleştirmek için tüm ekipmanların bulunduğu steril bir alandır. Hücre kültürü deneysel çalışmaları laboratuvarında bulunan Class 2 Laminar Flow kabin içerisinde gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce kabin içi 2-propanol ile temizlendi ve kabin UV lambası 30 dk çalıştırıldı.

3.2.1.3. Hücreler İçin Besiyeri Hazırlığı

500 mL DMEM/High Glucose içerisine, %10 Fetal Bovine Serum, %1 Penicillin-Streptomycin, %0,8 L-Glutamine ve %0,01 Plasmocin eklenerek hazırlandı. Hazırlanan medium 50 mL'lik steril falkon tüplere bölünerek +4 °C'de muhafaza edildi.

Bileşen	Miktar
DMEM / High Glucose (Hyclone, GE Healthcare SH30243.01)	500mL
Fetal Bovine Serum (Hyclone GE Healthcare SV30160.03)	50mL
Penicillin-Streptomycin 100U/mL (Hyclone, GE Healthcare SV30010)	5mL
L-Glutamine 200mM (Hyclone, GE Healthcare SH30034.01)	4mL
Plasmocin 2,5µg/mL (Invivogen ant-mpp)	50µl

Tablo 1. Hücrelerin Kültürü İçin Hazırlanan Besiyeri Bileşenleri ve Miktarları

3.2.1.4. Stok Hücrelerin Ekimi

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarının kültürü için öncelikle benmari 37 °C'ye ayarlandı. Medium 20-30 dk ısınmaya bırakıldı. Hücre hatları -80 °C stoktan alındı. 2 dk 37 °C'de eritildi. Class 2 biyogüvenlik kabini içinde alkolle silinip açıldı ve 1000 µl mikropipet ile alınıp 15 mL'lik falkon içinde 8 mL medium ile nazıkçe karıştırıldı. Makro santrifüjde 1100 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Hücreler 8 mL temiz mediumda çözüldü. Üzerine 10 mL daha medium eklenerek T-75 cm² flaska aktarıldı. Zemin üzerinde + şeklinde karıştırılarak, 37 °C %5 CO₂ ayarlı inkübatöre kaldırıldı.

3.2.1.5. Hücrelerin Invert Mikroskop ile Görüntülenmesi

Stoktan hücre ekiminden yaklaşık 24 saat sonra hücreler invert mikroskop altında görüntülendi. Tüm flask yüzeyi taranarak, hücrelerin dağılımı, morfolojisi ve medyumları incelendi.

3.2.1.6. Hücrelerin Tutundukları Yüzeyden Ayrıştırılması (Tripsinizasyon)

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücreleri %0.25'lik Tripsin-EDTA solüsyonu ile tripsinize edildi. Bunun için hücreler öncelikle steril 1X PBS ile 2 kez yıkandı. Ardından %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 2-3 dk 37 °C'de bekletildi. Tutundukları yüzeyden kalkan hücreler 8 mL medium ile toplandıktan sonra 15 mL'lik falkona alınarak 1100 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet kısmında bulunan hücreler temiz medium ile çözüldü.

3.2.1.7. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler buldukları flasklarda yeterli doluluğa ulaştıkları zaman pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama için kültür edilmiş hücreler öncelikle tripsinize edildi. Tripsin ile buldukları yüzeyden kaldırıldıktan sonra pellet şeklinde elde edilen hücreler 5 mL mediumda çözümlenerek 2 veya duruma göre 3 ayrı flaskta kültür edildi. UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücreleri için pasajlama işlemi hücre ekiminden sonra ortalama 3 günde bir yapıldı.

3.2.1.8. Hücre Sayımı

Tüm deneylerde hücre sayım işlemi BIO-RAD TC20™ Automated Cell Counter hücre sayım cihazı ile gerçekleştirildi. Kültür edilen hücreler 1X PBS ile 2 kez yıkandı ve %0.25'lik Trypsin-EDTA solüsyonu ile tutundukları yüzeyden kaldırıldı. Akabinde temiz medium içerisinde çözdürülen hücre süspansiyonundan 10 µl, tripan blue boyasından da 10 µl alınıp 0,2 mL'lik ependorf tüpünde karıştırıldı. Sonrasında cihaza ait özel slide'a 10µl hücre-tripan blue boyası karışımından konuldu. Slide cihaza yerleştirilerek sayım işlemi tamamlandı. Sayım sonucunda cihazdan, toplam hücre sayısı ve hücrelerin canlılık yüzdesi bilgileri elde edildi. Neredeyse tüm ölçüm işlemlerinde hücre canlılığı %99 düzeyinde çıktı.

3.2.1.9. Hücrelerin Stoğa Alınması

Kültür işlemleri sonunda veya pasajlama işlemleri sırasında fazla olan hücreler daha sonra tekrar kullanılmak üzere stoğa alındı. Stok işlemine başlamadan önce stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyonu her zaman taze ve soğuk olarak %8 DMSO içeren FBS şeklinde hazırlandı. Uygun miktarda hazırlanan stok solüsyonu kullanılabilecek kadar buz içerisinde bekletildi. Stoğa alınacak hücreler öncelikle 1X PBS ile 2 kez yıkandı. Sonrasında %0.25'lik Trypsin-EDTA solüsyonu ile tutundukları yüzeyden kaldırıldı. Kaldırılan hücreler pellet halinde alındıktan sonra 5 mL temiz mediumda çözdürüldü. Çözdürülen hücreler ikinci kez 1100 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet kısmında bulunan hücreler stok solüsyonunda çözdürüldü. Sonrasında 1'er mL olacak şekilde cryovial tüplere aktarıldı. Aktarım sonrası tüpler ilk olarak 10 dk +4 °C'de, sonrasında 30 dk -20 °C'de bekletildi ve en son -80 °C'ye kaldırılarak stoğa alındı.

3.2.1.10. Hücrelerin Kültüründe Yüzeyle Göre Kullanılan Medium, PBS ve Tripsin Miktarları

Hücreler kültür edilirken duruma göre farklı büyüklükte flasklar ve platerler kullanıldı. Flask veya plate büyüklüğüne göre kullanılan bazı bileşenlerin miktarları tablo 2’de olduğu gibi ayarlandı.

Flask Tipi	Medium	1X PBS	Tripsin-EDTA
T-25 cm ²	6 mL	2 mL	1 mL
T-75 cm ²	18 mL	6 mL	5 mL
T-175 cm ²	32 mL	10 mL	10 mL
6 well plate	2 mL	1 mL	1 mL
12 well plate	1 mL	500 µl	500 µl
96 well plate	200 µl	200 µl	100 µl

Tablo 2. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyeri Kabına Göre Çeşitli Kimyasalların Miktarları

3.2.2. Immunofloresan Boyama

ESM1 geninin UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B baş boyun kanseri hücre hatlarındaki ekspresyonunu gözlemek amacıyla immunofloresan boyama deneyleri gerçekleştirildi.

Bunun için ilk olarak hücreler, 6’lık well plate içerisine her well’e 3 adet yerleştirilen 13 mm Nunc Thermanox Coverslips (Thermo Scientific, Nunc 174950) üzerine 3×10^5 sayıda ekildi. Ekimden 24 saat sonra cover slipsler 1 kez 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra 6’lık well plate’de bulunan slipsler steril enjektör iğnesi ve cımbız yardımıyla her well’e bir slip olacak şekilde 24 well plate’e aktarıldı. 24 well plate’e aktarılan slipsler üzerine fiksasyon için 250 µl %4’lük paraformaldehit eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Paraformaldehit çekilerek slipsler 2

kez 1X PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası slipsler üzerine permeabilizasyon için 250 µl %0,5'lik Triton eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Permeabilizasyon sonrası 250 µl %1'lik BSA eklenip oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. 30 dk sonrasında %1'lik BSA içerisinde 1. Antikor olarak 1:100 oranında anti-ESM1 antibody (ab56914; Abcam) eklendi ve slipsler üzerine 250'şer µl dağıtıldı. Negatif kontrol için ise sadece 250 µl %1 BSA kullanıldı. 1 saat inkübe edildi. 1 saat sonrasında antikor çekildi ve slipsler 300 µl %0,1'lik Triton ile 2 kez yıkandı. Yıkama sonrası tüm well'lere 2. antikor (Alexa Fluor® 546, A-11030; Life Technologies) %0,1'lik triton içerisinde 1/1000 oranında eklendi ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dk inkübe edildi. 30 dakika sonunda 2. antikor çekildi ve well'ler 300 µl %0,1'lik triton ile 2 kez yıkandı. Sonrasında çekirdek boyaması için 1X PBS içerisinde 1/1000 oranında DAPI hazırlanıp her well'e 250 µl eklendi ve 5 dk inkübe edildi. 5 dk sonunda DAPI çekildi. Tüm well'ler 300 µl %0,1'lik BSA ile 2 kez yıkandı. %0,1'lik BSA'lar çekildi. Son olarak well'lere 250'şer µl 1X PBS eklendi.

Boyama işlemi tamamlanan slipsler görüntülemek üzere lamlara aktarıldı. Bunun için slipsler lam üzerine hücreli kısım üste gelecek şekilde yerleştirildi. Her bir slipin üzerine 3 µl ProLong® Gold Antifade Reagent (Life Technologies, P36934) koruyucu madde olarak eklendi. Koruyucu madde kuruduktan sonra slipsler immunofloresan mikroskop altında görüntülendi.

3.2.3. siRNA Transfeksiyonları

3.2.3.1 siRNA ve Transfeksiyon Ajanı Temini

Çalışmada hedef ve kontrol siRNA'lar için siRNA pool teknolojisi kullanıldı. Herbir siRNA pool, hedef geni kapsayan 4 farklı siRNA dizisi içererek baskılamayı maksimum düzeye çıkartmak için tasarlanmıştır. Çalışma kapsamında ESM1, GAPDH ve Kontrol siRNA pool dizileri Dharmacon, GE Healthcare firmasından

temin edildi. Bunlardan ESM1-siRNA ve GAPDH-siRNA bu genler ile ilgili spesifik diziler içerirken, kontrol siRNA ise insan genomu ile hiçbir homoloji göstermeyen diziler içermektedir. Transfeksiyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi için transfeksiyon ajanı olarak da DharmaFECT 4 (T-2004-02 Dharmacon, GE Healthcare) kullanıldı.

3.2.3.2 siRNA Dizileri

Çalışma kapsamında ESM1, GAPDH ve Kontrol siRNA'ları kullanılmıştır. Bu siRNA'ların katalog ve dizi bilgileri aşağıdaki gibidir.

ESM1; ON-TARGETplus Human ESM1 (11082) siRNA – SMARTpool, 50 nmol (Dharmacon, GE Healthcare, L-012338-00-0050)

Dizi	Dizi Bilgileri
1. siRNA dizisi	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-012338-10, ESM1 GGAGAAACUUGCACCGCA Mol. Wt: 13,444.9 (g/mol) Ext. Coeff: 363,743 (L/mol.cm)
2. siRNA dizisi	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-012338-09, ESM1 GUAAUGAGGAAAUGGUAA Mol. Wt: 13,384.7 (g/mol) Ext. Coeff: 385,815 (L/mol.cm)
3. siRNA dizisi	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-012338-08, ESM1 GAGCAAUAAUUAUGCGGUG Mol. Wt: 13,414.9 (g/mol) Ext. Coeff: 374,690 (L/mol.cm)
4. siRNA dizisi	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-012338-09, ESM1 GUAACCAAGUCUCCAACA Mol. Wt: 13,414.8 (g/mol) Ext. Coeff: 374,957 (L/mol.cm)

Tablo 3. ESM1 siRNA-pool içerisindeki siRNA Dizi Bilgileri

GAPDH; ON-TARGETplus Human GAPDH Control Pool, 5 nmol (Dharmacon, GE Healthcare, D-001830-10-05)

Dizi	Dizi Bilgileri
1. siRNA dizisi	GUCAACGGAUUUGGUCGUA
2. siRNA dizisi	CAACGGAUUUGGUCGUAUU
3. siRNA dizisi	GACCUCAACUACAUGGUUU
4. siRNA dizisi	UGGUUUACAUGUCCAAUA

Tablo 4. GAPD siRNA-pool içerisindeki siRNA Dizi Bilgileri

Kontrol; ON-TARGETplus Human Non-targeting Pool, 5 nmol (Dharmacon, GE Healthcare, D-001810-10-05)

Dizi	Dizi Bilgileri
1. siRNA dizisi	UGGUUUACAUGUCGACUAA
2. siRNA dizisi	UGGUUUACAUGUUGUGUGA
3. siRNA dizisi	UGGUUUACAUGUUUUCUGA
4. siRNA dizisi	UGGUUUACAUGUUUCCUA

Tablo 5. Non-Targeting siRNA-pool içerisindeki siRNA Dizi Bilgileri

3.2.3.3 siRNA'ların Hazırlanması ve Saklanması

ESM1-siRNA, GAPDH-siRNA ve Non-Targeting-siRNA (Kontrol siRNA) ilgili firmadan liyofilize halde teslim alındı. -20 °C koşullarında teslim alınan siRNA'lar hem sulandırmadan önce, hem de sulandırdıktan sonra -20 °C'de muhafaza edildi. siRNA'larla birlikte alınan transfeksiyon ajanı DharmaFECT ise +4 °C'de teslim alındı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

siRNA'lardan ESM1-siRNA 50 nmol, GAPDH ve Non-Targeting-siRNA ise 5 nmol konsantrasyonda alındı. siRNA'ları çözdürmek için yine aynı firmadan alınan 5X siRNA Buffer (B-002000-UB-100, Dharmacon, GE Healthcare), DEPC Treated Water ile 1X'e seyreltilerek kullanıldı. Belirtilen konsantrasyonda gelen siRNA'lar 1X siRNA Buffer ile 100 µM konsantrasyona seyreltilti. Bunun için öncelikle siRNA'ların liyofilize halde bulunduğu tüpler 1 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpler 2-propanol ile silinerek temizlendi. 50 nmol'lük ESM1-siRNA tüpüne 500 µl 1X siRNA Buffer, 5 nmol'lük GAPDH ve Non-Targeting-siRNA tüplerine ise 50 µl 1X siRNA Buffer konularak pipetaj yapıldı. Daha sonra oda sıcaklığında 30 dk shakerda karıştırıldı. 30 dk sonunda 100 µM konsantrasyonda elde edilen siRNA'lar 10'ar µl olacak şekilde 0,2 mL'lik ependorf tüplere bölünerek -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.3.4 siRNA Transfeksiyonu

siRNA transfeksiyon işlemleri için, kullanılacak well plate büyüklüğüne göre üretici firmanın (Dharmacon, GE Healthcare) referans bilgileri dikkate alındı.

siRNA transfeksiyon işlemleri yapılacak analize uygun well plate'lerde gerçekleştirildi. siRNA transfeksiyon çalışması için en önemli faktör transfeksiyon işleminin antibiyotiksiz ortamda uygulanmasıdır. Bu bakımdan kültür edilen hücreler well plate'lere aktarılmak üzere kaldırıldığı zaman içerisinde %10 FBS ve %0,8 L-Glutamine bulunan, hiçbir antibiyotik ve türevi bulundurmuyan ve complete medium

olarak adlandırılan mediumda çözdürüldü. Complete mediumda çözdürülen hücreler sayıldı. Sayım sonrası well büyüklüğüne göre uygun sayıda hücre ekimi yapıldı. Tüm deneylerde siRNA transfeksiyonları, hücreler well plate'lere ekildikten 24 saat sonra gerçekleştirildi. Burada temel faktör hücre ekiminden 24 saat sonra hücrelerin buldukları yüzeyde %60-80 oranında doluluğa ulaşması olarak ele alındı. Transfekte edilecek siRNA'lar her zaman taze olarak hazırlandı. Stoklarda 100 µM konsantrasyonda saklanan siRNA'lar her deney öncesi 1X siRNA Buffer ile 5 µM konsantrasyona dönüştürüldü. 5 µM konsantrasyonda olan siRNA'lar ise çalışmada kullanılacak optimal doza ayarlanarak uygulandı.

İlk olarak uygun doz ve kullanılacak miktarda ayarlanan siRNA ve transfeksiyon ajanı DharmaFECT ayrı tüplerde, içerisinde hiçbir bileşen bulunmayan mediuma eklendi. Tüpler nazikçe karıştırılıp pipetaj yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 2 ayrı tüpte bulunan siRNA ve DharmaFECT bir tüpte birleştirildi. Birleştirilen karışım yine pipetajla karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. 20 dk sonunda karışım üzerine kullanılan well plate'e uygun miktarda içerisinde %10 FBS ve %0,8 L-Glutamine bulunan complete medium eklendi. Hafif vorteks ile güzelce karıştırıldıktan sonra pipetaj yaparak karışım hazırlanmış oldu. Hücreler üzerinde bulunan mediumlar tamamen çekildi. Hazırlanan karışımdan uygun miktarlarda alınarak hücrelere verildi. siRNA karışımı bulunan medium hücrelere verildikten sonra plateler inkübatöre kaldırıldı.

6'lık well plate için: Bir tüpte 10 µl 25 nM siRNA 190 µl hiçbir bileşen içermeyen medium ile, ikinci tüpte 4 µl DharmaFECT 196 µl hiçbir bileşen içermeyen medium ile karıştırılıp 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra iki tüp birleştirilip karıştırılarak 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak üzerine 1800 µl complete medium eklenerek toplamda 2 mL hücrelere verildi.

12'lik well plate için: Bir tüpte 5 µl 25 nM siRNA 95 µl hiçbir bileşen içermeyen medium ile, ikinci tüpte 2 µl DharmaFECT 98 µl hiçbir bileşen içermeyen medium ile karıştırılıp 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra iki tüp

birleştirilip karıştırıldıktan sonra 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak üzerine 800 µl complete medium eklenerek toplamda 1 mL hücrelere verildi.

3.2.4. Hücrelerden RNA İzolasyonu

siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde, siRNA transfeksiyon etkinliği ve baskılama miktarını mRNA düzeyinde saptamak için hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı.

İlk olarak UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücreleri 12 well platelere her well için 1×10^5 sayıda ekildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra ESM1-siRNA, GAPDH-siRNA ve Non-Targeting-siRNA 25 nM ve 50 nM dozlarda, 2 µl DharmaFECT ile her bir örnek 3'erli tekrarlar şeklinde transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra RNA izolasyonu işlemine başlandı.

Hücreler 2 kez 1 mL 1X PBS ile yıkandı. Çeker ocakta 400 µl Tripure (Roche Tripure Isolation Reagent, 11 667 157 001) eklendi. Hücrelerin kalkması ve homojenize olması için 10-15 defa pipetaj yapıldı, ardından pipet ucu ile tüm yüzey kazındı. Tüm lizatlar her well için ayrı 1,5 mL'lik ependorf tüplere alındı. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. 80 µl kloroform eklendi ve renk değişene kadar 2-3 dk sallandı. 12.000 rpm'de 15 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Üstteki şeffaf kısım yeni 1,6 mL'lik ependorf tüplere aktarıldı. 200 µl 2-propanol eklendi. Sallanarak karıştırıldı ve 10 dk oda ısısında inkübe edildi. 12.000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant RNA'ya zarar vermeden dikkatlice atıldı. %75'lik ethanolden 400 µl eklendi. Hafifçe sallanarak karıştırıldı. 12.000 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve alkolün uzaklaşması için 10 dk oda sıcaklığında kapakları açık olarak bekletildi. 20 µl DEPC Treated Water eklenerek RNA pipetejla çözüldü.

3.2.4.1. İzole Edilen RNA Miktarının Ölçümü

Hücrelerden izole edilen total RNA'ların konsantrasyon ölçümleri için NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanıldı. Ölçüm sırasında RNA'lar buz içerisinde bekletildi. Ölçüm için öncelikle cihaza RNA modunda RNA'nın çözdürüldüğü DEPC Treated Water "Blank" olarak tanıtıldı. Akabinde RNA'lar 2'şer μl şeklinde okutuldu. Nükleik asit konsantrasyonu için 260 nm dalga boyu ölçümü esas alındı. RNA'nın saflığı ve kalitesi ise 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki ölçümlerin oranı ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) esas alınarak hesaplandı. Ölçümü yapılan RNA'lar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

3.2.5. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lar amplifikasyon çalışmalarında kullanılmak üzere cDNA formuna çevrildi. RNA'ların cDNA formuna çevrilmesi için Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (05 091 284 001) kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce, ölçüm sonuçlarına göre cDNA formuna çevirilecek tüm RNA örnekleri $1\ \mu\text{g}$ 'a eşitlendi.

Öncelikle kit içeriğinde bulunan tüm malzemeler buz üzerinde çözüldü. Çözünmüş reaktiflere kısa süreli spin atırıldı. İlk olarak tablo 6'daki bileşenlerden oluşan tüpler hazırlandı.

Reaktif	Miktar
RNA	$1\ \mu\text{g}$
Anchored oligo(dT)18 Primer 50 pmol/l	$1\ \mu\text{l}$
dH ₂ O	Toplam volüm $11,4\ \mu\text{l}$ tamamlayacak miktarda değişken
Toplam volüm	$11,4\ \mu\text{l}$

Tablo 6. cDNA Sentezinde RNA, Primer ve dH₂O Bileşenlerinin Miktarları

Her bir RNA örneği için ayrı tüpte tablo 6'daki karışım buz üzerinde hazırlandı. Daha sonra tüpler T-100 thermal cyclers (BIO-RAD, ABD) cihazında 65 °C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüpler tekrar buz üzerine alındı. Bu aşamadan sonra ayrı bir tüpte ayrı bir karışım aşağıdaki reaktiflerden her bir örnek için karşılardaki miktarlarda hazırlandı.

Reaktif	Miktar
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5X	4 µl
Protector RNase Inhibitor, 40 U/l	0,5 µl
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each	2 µl
DTT	1 µl
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1,1 µl
Toplam volüm	8,6 µl

Tablo 7. cDNA Sentezinde Enzim Karışımı İçin Kullanılan Bileşenlerin Miktarları

Tablo 7'de verilen bileşenlerden hazırlanan karışım pipetajla karıştırıldı. Ve ilk hazırlanan 11,4'lük RNA-primer karışımı bulunan tüplere her bir tüpe 8,6 µl olacak şekilde dağıtıldı. Bu işlem sonunda her bir tüpte 20 µl RNA-enzim karışımı oluştu. Tüpler T-100 thermal cyclers (BIO-RAD, ABD) cihazına yerleştirildi. Sırasıyla 29 °C'de 10 dk, 48 °C'de 60 dk, ve 85 °C'de 5 dk inkübe edildi. İşlem sonunda örnekler cihazdan alındı -80 °C derecede muhafaza edildi.

3.2.6. Gradient PCR ile Primerlerin Bağlanma Sıcaklıklarının Saptanması

Amplifikasyon çalışmalarında kullanılacak olan primerlerin optimal bağlanma sıcaklıklarını belirlemek amacıyla öncelikle ESM1, GAPDH ve BETA ACTIN genleri için gradient PCR çalışması yapıldı. Bu bağlamda örnek olarak UT-SCC-74A hücrelerinden elde edilmiş, kalitesi yüksek RNA'dan sentezlenmiş bir cDNA kullanıldı.

Her bir genin amplifikasyonu için aşağıdaki primer dizileri kullanıldı.

ESM1 (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 246 bp

F: 5' GGTGGACTGCCCTCAACACT 3'

R: 5' AAGGTGCCGTAGGGACAGTCT 3'

Beta Actin (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 204 bp

F: 5' TTCCTGGGCATGGAGTCCT 3'

R: 5' AGGAGGAGCAATGATCTTGATC 3'

GAPDH (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 496 bp

F: 5' CAAGGTCATCCATGACAACTTTG 3'

R: 5' GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'

PCR için tablo 8'de bulunan bileşenler her bir örnek için belirtilen miktarlarda alınarak bir karışım oluşturuldu.

Reaktif	Miktar
10X Taq (NH ₄)SO ₂ buffer (Thermo Scientific)	2,5 µl
25 mM MgCl ₂ (Thermo Scientific)	2,5µl
100 µM dNTP #R0181 (Thermo Scientific)	0,5 µl
20 pmol Forward Primer	0,5 µl
20 pmol Reverse Primer	0,5 µl
Taq DNA Polymerase (recombinant) 5U/ µl, 500U #EP0402 (Thermo Scientific)	0,2 µl
dH ₂ O	16,3µl
cDNA	2 µl

Tablo 8. PCR Çalışmasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

Oluşturulan 23 µl'lik karışım üzerine 2 µl cDNA konularak herbir gen için 50-52-54-56-58-60-62-64 °C sıcaklıklarda Gradient PCR çalışması kuruldu. T100 model PCR cihazında (BIO-RAD, ABD) aşağıdaki koşullarda amplifikasyon gerçekleştirildi.

Reaksiyon	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyon	95 °C	5 dakika	
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	42 döngü
Primer bağlanma	50-64 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72°C	5 dakika	

Tablo 9. PCR Çalışması Basamaklarının Sıcaklık ve Süreleri

3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR çalışması sonucunda amplifiye edilen ürünün görüntülenmesi için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Elektroforez işlemi sırasıyla jel hazırlama, PCR örneklerinin jele yüklenmesi ve yürütülmesi, yürütülen jellerin UV ışık altında görüntülenmesi şeklinde gerçekleştirildi.

3.2.7.1. Agaroz Jel Hazırlanması

Agaroz jel elektroforezinde hem jelin hazırlanmasında hem de jelin yürütüleceği tankta kullanmak için tampon çözelti olarak 10X TBE (Tris Borik Asit EDTA) hazırlandı. 10X TBE distile su ile 1X TBE yapıldı. %2'lik agaroz jel için 2 gr. agaroz tartılıp 100 mL 1X TBE üzerine eklendi. Karışım mikrodalga fırında 600 W'da 3 dk ısıtıldı. Agarozun eridiği ve karışımın homojen hale geldiği gözlemlendi. Vakit kaybetmeden karışıma 3,6 µl Etidium Bromide eklendi. Manyetik karıştırıcıda

10 saniye karıştırıldı. Karışım jel kasetlerine döküldü. Taraklar takılarak 30 dk süreyle donduruldu.

3.2.7.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Donan jeller üzerinden taraklar çıkarıldı. Jeller, üzerinde buldukları kasetleri ile birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. İlk kuyucuğa 5 µl 100 Bp marker yüklendi. Örnekler ise 1 µl 3X Loading Dye-5 µl örnek olacak şekilde parafilm üzerinde karıştırılarak yüklendi. Elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı. Güç kaynağı 90 V 30 dk ayarlanarak yürütme yapıldı.

3.2.7.3. UV Işık Altında Jellerin Görüntülenmesi

Yürütme tamamlandıktan sonra jeller kasetlerinden ayrılarak UV transillüminatör cihazına yerleştirildi. Gerekli ayarlamalar yapıldı. Jellerin UV ışık altında görüntüleri kaydedildi.

3.2.8. Kantitatif Real Time RT-PCR

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B baş boyun kanseri hücre hatlarında, transfekte edilen siRNA'lerin mRNA düzeyinde etkinliklerinin saptanması amacıyla kantitatif real time PCR çalışması yapıldı.

Bunun için öncelikle hücreler 12 well plakelere her bir well'e 1×10^5 sayıda olacak şekilde complete medium ile ekildi. 24 saat sonra hücrelere 25 nM dozda 2 µl DharmaFECT kullanılarak ESM1-siRNA, GAPDH-siRNA ve Non-Targeting-siRNA transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'lar cDNA formuna çevrildi. Hazırlanan cDNA'lar bu aşamada kullanıldı.

Kantitatif Real Time PCR deneyleri Qiagen Rotor Gene Q cihazında gerçekleştirildi. Standart bazlı yapılan çalışmada, örneklerin standartlar arasındaki konumuna göre değerlendirme yapıldı. Bunun için öncelikle her gen için ayrı standartlar hazırlandı. Standartlar her gen için UT-SCC-74A hücrelerinden elde edilmiş cDNA ile yapılan PCR çalışması sonrası, PCR ürününün yüklendiği jelden ekstraksiyonu ile elde edildi. Jel ekstraksiyonu sonrası elde edilen DNA'lardan standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar kullanılarak kantitatif real time PCR analizleri gerçekleştirildi.

3.2.8.1 Standart Hazırlığı İçin Agaroz Jelden DNA Ekstraksiyonu

Agaroz jelden DNA ekstraksiyonu GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, K0691) ile gerçekleştirildi.

Bunun için UT-SCC-74A hücrelerinden elde edilmiş cDNA ile yapılan PCR işlemi sonrası, PCR ürününün tamamı (25 µl) jele yüklendi. Yürütme işlemi sonrası jel UV transilluminator üzerine alındı. CSL-GelX4 uç yardımıyla bantlar jelden kesildi ve 1,5 mL ependorf tüplere alındı. Tüplere 40 µl Binding Buffer eklendi. Sonrasında tüpler ısıtıcı blok üzerinde 55 °C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon esnasında 2-3 dk'da bir vorteks yapıldı. İnkübasyon sonunda jellerin olması gerektiği gibi tamamen erimiş ve sarı bir renk almış olduğu gözlemlendi. Ardından tüplere 40 µl 2-propanol eklendi ve 5'er saniye vorteks yapıldı. Elde edilen karışım kit içeriğinde bulunan spin kolona (GeneJET purification column) aktarıldı. 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolonda bulunan toplama tüpü boşaltılıp 100 µl Binding Buffer eklendi ve 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Tekrar toplama tüpü boşaltıldı ve Spin kolona 700 µl Wash Buffer eklendi. 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tekrar tüpü boşaltıldı. Silica membranın tamamen pürifiye hale gelmesi için birşey eklemeyen ve toplama tüpü boş olacak şekilde 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Sonrasında spin kolon 1.5 mL'lik yeni ve temiz bir ependorf tüpe aktarıldı. Spin kolonun merkezine doğru 50 µl Elution Buffer eklendi. 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolon atıldı ve DNA elde edilmiş oldu.

3.2.8.2. Agaroz Jelden Ekstrakte Edilen DNA'ların Ölçümü

Agaroz jelden ekstrakte edilerek elde edilen DNA'ların miktar tayini için NANODROP 2000c (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanıldı. Ölçüm için öncelikle cihaza DNA modunda DNA'nın çözündürüldüğü Elution Buffer blank olarak tanıtıldı. Akabinde DNA'lar 2'şer μl şeklinde okutuldu. Nükleik asit konsantrasyonu için 260 nm dalga boyu ölçümü esas alındı. DNA'nın saflığı ve kalitesi ise 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki ölçümlerin oranı ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) esas alınarak hesaplandı. Ölçümü yapılan DNA'lar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

3.2.8.3. Kantitatif Real Time PCR İçin Standart Hazırlığı

Agaroz jelden ekstraksiyon yapılarak her bir gen için elde edilen DNA'lar kullanılarak kantitatif real time PCR analizleri için standartlar hazırlandı. Bunun için ölçümü yapılan DNA'ların konsantrasyonu baz alınarak hesaplama yapıldı. DNA ölçüm sonuçları; Beta Actin: $9,51\text{ ng}/\mu\text{l}$, GAPDH: $11,86\text{ ng}/\mu\text{l}$, ESM1: $9,86\text{ ng}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi. Standart hazırlığı için öncelikle bu birimler pg cinsine çevrildi.

Beta Actin: $9,51\text{ ng}/\mu\text{l} = 9500\text{ pg} \rightarrow 95 \times 100\text{x} \rightarrow 1\text{ }\mu\text{l DNA} + 94\text{ }\mu\text{l ddH}_2\text{O}$

GAPDH: $11,86\text{ ng}/\mu\text{l} = 11900\text{ pg} \rightarrow 119 \times 100\text{x} \rightarrow 1\text{ }\mu\text{l DNA} + 118\text{ }\mu\text{l ddH}_2\text{O}$

ESM1: $9,86\text{ ng}/\mu\text{l} = 9900\text{ pg} \rightarrow 99 \times 100\text{x} \rightarrow 1\text{ }\mu\text{l DNA} + 98\text{ }\mu\text{l ddH}_2\text{O}$

Ölçümü yapılan DNA'lerden yukarıda belirtilen miktarlarda Nuclease Free Water ile dilüe edilerek standart 1'ler hazırlanmış oldu. Diğer standartlar ise 10 µl standart, 90 µl Nuclease Free Water şeklinde seri dilüsyon ile hazırlandı.

10 µl Standart 1 + 90 µl Nuclease Free Water = Standart 2

10 µl Standart 2 + 90 µl Nuclease Free Water = Standart 3

10 µl Standart 3 + 90 µl Nuclease Free Water = Standart 4

10 µl Standart 4 + 90 µl Nuclease Free Water = Standart 5

10 µl Standart 5 + 90 µl Nuclease Free Water = Standart 6

10 µl Standart 6 + 90 µl Nuclease Free Water = Standart 7

3.2.8.4. Kantitatif Real Time PCR Analizleri

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarından elde edilen cDNA'lar ve çalışmada kullanılan her bir gen için hazırlanan standartlarla kantitatif real time PCR işlemi yapıldı. Kantitatif real time PCR işlemi 5 plex Rotor Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazında yeşil kanal kullanılarak SYBR Green PCR Master Mix (DNA polimeraz, SYBR Green I Dye, dUTP içeren dNTP karışımı, 5 mM MgCl₂, PCR buffer) ile gerçekleştirildi. Her bir genin amplifikasyonu için aşağıdaki primer dizileri kullanıldı.

ESM1 (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 246 bp

F: 5' GGTGGACTGCCCTCAACACT 3'

R: 5' AAGGTGCCGTAGGGACAGTCT 3'

Beta Actin (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 204bp

F: 5' TTCCTGGGCATGGAGTCCT 3'

R: 5' AGGAGGAGCAATGATCTTGATC 3'

GAPDH (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 496bp

F: 5' CAAGGTCATCCATGACAACTTTG 3'

R: 5' GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'

Çalışmada ESM1 hedef gen, GAPDH hücre hatlarının transfeksiyon etkinliğini saptamak ve Beta Actin normalizasyon için kullanıldı.

Tablo 10'daki bileşenler; her bir örnek ve standart 3'er tekrarlı, 20 µl final volüm olacak biçimde karıştırıldı ve Rotor Gene Q cihazına yerleştirildi.

Reaktif	Miktar
2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, #204245)	12,5 µl
20 pmol Forward Primer	0,5 µl
20 pmol Reverse Primer	0,5 µl
dH ₂ O	9 µl
cDNA	2,5 µl

Tablo 10. Kantitatif Real Time PCR İçin Oluşturulan Karışıma Ait Bileşenler ve Miktarları

Örnekler cihaza yerleştirildikten sonra cihazın bağlı bulunduğu bilgisayardan gerekli ayarlamalar yapıldı ve kantitatif real time PCR işlemi Tablo 11'deki koşullara ayarlanarak başlatıldı.

Reaksiyon	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	45 döngü
Primer bağlanma	ESM1, Beta Actin ve GAPDH için 58 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	30 saniye	

Tablo 11. Kantitatif Real Time PCR Basamaklarının Sıcaklık ve Süreleri

Kantitatif real time PCR işlemi sonrası sonuçlar Rotor Gene Q Software 1.2 programında analiz edildi. Aynı zamanda gerçekleştirilen tüm PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile; primerlerin doğru hedef bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığı kontrol edildi ve negatif kontroller ile birlikte jel üzerinde görüntüleri alındı.

3.2.9. Western Blot

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B baş boyun kanseri hücre hatlarında, transfekte edilen siRNA'lerin protein düzeyinde etkinliklerinin saptanması amacıyla western blot çalışması yapıldı.

Bunun için hücreler 6 well platalere her well'e 3×10^5 sayıda olacak şekilde complete medium kullanılarak ekildi. Hücrelerin 6 well platalere ekiminden 24 saat sonra 25 nM ESM1-siRNA ve 25 nM Non-Targeting-siRNA 4 µl DharmaFECT aracılığıyla hücelere transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra hücrelerden protein izolasyonu yapıldı. İzole edilen proteinler kullanılarak western blot analizleri gerçekleştirildi.

3.2.9.1. Hücrelerden Protein İzolasyonu

6'lık well plate'de bulunan hücrelerin mediumları tamamen çekildi. Hücreler 2'şer kez soğuk 1mL (+4 °C) 1X PBS ile yıkandı. %5 Protease Inhibitor Cocktail içeren 250 µl N-PER Neuronal Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, 87792) eklendi. 15 dk +4 °C'de shakerda sallandı. Cell scrapper ile her well kazındı, birkaç defa pipetaj yapıldı. Süspansiyon 0,5 mL ependorf tüplere alındı. 15 dakika +4 °C'de shakerde sallandı. Tüpler sonikatör cihazına konuldu (Bioruptor sonicator, Belgium). 30''/30'' (ON/OFF cycles) aralıkla 10 döngü yüksek seviyede sonikasyon yapıldı. Sonrasında tüpler 15.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Protein olan süpernatant alındı. Pellet atıldı.

3.2.9.2. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

İzole edilen proteinlerin konsantrasyon ölçümleri Bradford analizi ile yapıldı. Ölçüm için BSA (Bovine Serum Albumine) 2 µg – 0 µg aralığında olacak şekilde standartlar hazırlandı. Standartlardan sonra 96'lık well plate üzerinde her bir

proteinden 2 µl alınarak 98 µl Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası ile karıştırıldı. Karanlık ortamda 10 dk inkübe edildi. Ardından Varioskan Flash mikroplate okuyucuda 595 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Ölçüm sonuçları standart bazlı analiz edilerek her bir protein örneği 20 µg'a eşitlendi.

3.2.9.3. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması

Western blotta SDS-PAGE için running ve staking olmak üzere 2 tip jel hazırlandı. Running jel için tablo 12'deki, Staking jel için ise tablo 13'deki maddeler karıştırılıp kasetlere dökülerek kullanıldı. Burada dikkat edilmesi gereken nokta APS ve TEMED kimyasalları jelin donmasını sağladığı için en son eklendi. Bu maddeler jel kasete döküleceği zaman hızla eklendi, karıştırıldı ve döküldü. Çalışmada kullanılacak antikorlar 30-45 kDa aralığında oldukları için %10'luk jeller hazırlandı. Öncelikle running jel hazırlandı. Tarakların hizasına kadar döküldü. Üzerine düz bir şekilde donması için 2-propanol eklendi. Yaklaşık 30 dk sonra running jel dondu. Running jel ile karışmayan 2-propanol döküldü. Bundan sonra staking jel hazırlandı. Staking jelde kasetlerin en üst noktasına kadar döküldü. Sonrasında taraklar takıldı ve 30 dk süreyle staking jelinde donması beklendi. Staking jel de donduktan sonra %10'luk jeller hazırlanmış oldu.

Bileşen	%10
dW	5.5 mL
%30 ACA	4 mL
2M Tris	2.25 mL
%10 APS	160 µL
%10 SDS	120 µL
TEMED	16 µL

Tablo 12. Running Jel Hazırlığında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

Bileşen	%10
dW	2,7 ml
%30 ACA	0,66 mL
0,5 M Tris	1 mL
%10 APS	50 µL
%10 SDS	40 µL
TEMED	10 µL

Tablo 13. Staking Jel Hazırlığında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

3.2.9.4 SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Bradford yöntemi ile konsantrasyonu ölçülen proteinler, jele yükmeden önce tüm konsantrasyonlar 20 µg'a eşitlendi. -20°C'de muhafaza edilen proteinler her çalışma öncesi eridikten sonra 37 °C'de 5 dk ısıtıldı. Isıtıldıktan sonra 20 mg miktarda ilk ve son kuyu marker olacak şekilde sırasıyla yüklendi. Elektrofrez için running buffer olarak 1X ProSieve™ EX Running Buffer (Lonza) kullanıldı ve elektrofrez işlemi 100 V'da 5 dk ve hemen ardından 240 V'da 17 dk şeklinde gerçekleştirildi.

3.2.9.5. Proteinlerin Jelden PVDF Membrana Transferi ve Bloklama

Elektrofrez tamamlanan jeller PVDF (polyvinylidene difluoride) membrana transfer edildi. Bunun için öncelikle PVDF membran hassas bir şekilde her biri kullanılacağı jelden biraz daha büyük boyda olmak üzere kesildi. Jeller membrana aktarılmadan önce ilk olarak %100 metanol ile nazikçe yıkandı ve ardından Transfer Bufferdan bir kez yüzeysel olarak geçirildi. Jelden membrana transfer için Pierce G2 Fast Blotter (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanıldı. Filtre kağıdı, membran ve jelden oluşan sandviç cihaz üzerinde aşağıdan yukarı doğru 2 kat filtre

kağıdı-membran-jel-2 kat filtre kağıdı şeklinde oluşturuldu. Sandviç oluşturulurken filtre kağıtları Transfer Buffer ile ıslatıldı. Sandviç oluşturulduktan sonra baskı silindiri ile (roller) üzerlerinden geçilerek arada kalan boşluk ve hava kabarcıkları giderildi. Ardından sandviçlerin üzeri Transfer Buffer ile ıslatıldı. Cihaz kapağı dikkatlice kapatılıp transfer 25 V'da 30 dk ayarlanarak başlatıldı. Transfer bittikten sonra membranlar dikkatlice alınarak 1X TBS-T içerisinde hazırlanmış %5 yağsız süt tozu çözeltisine alındı. Bloklama işlemi bu çözelti içerisinde oda sıcaklığında shaker üzerinde 30 dk süreyle yapıldı.

3.2.9.6. Antikor Uygulamaları ve Görüntüleme

Bloklama sonrasında, UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücrelerinin proteinlerinin bulunduğu 2'şer adet membranlar ESM1 ve Beta Actin antikorları ile muamele edildi. ESM1 için "Anti-ESM1-Antibody" (ab56914; Abcam, ABD) antikorunu, Beta Actin için " β -Actin Antibody (C4)" (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, ABD) antikorunu kullanıldı. 1. Antikorlar yağsız süt tozu içinde ESM1 1/1000 Beta Actin ise 1/20000 oranında eklendikten sonra membranlar +4 °C'de shaker üzerinde bir gece bırakıldı.

Yaklaşık 16 saat sonra membranlar üzerinde bulunan 1. Antikorlar falkonlara alındı ve koruyucu madde eklenerek daha sonra kullanılmak üzere +4 °C buzdolabına kaldırıldı. Membranlar 3 kez 1X TBST ile yıkandı. Yıkama sonrasında 1X TBST içerisinde 1/2500 oranında anti-mouse IgG, HRP-linked secondary antibody (7076P2; Cell Signaling, ABD) ile oda ısısında 40 dk shaker üzerinde sallandı. 40 dk sonunda membranlar tekrar 3 kez 1X TBST ile yıkandı. Yıkama sonrası membranlar 1:1 ECL çözeltisi (BIORAD, #170-5060) ile 2-3 dk karanlıkta muamele edildi. Son olarak membranlar plastik poşet içerisinde konularak BIO-RAD Chemidoc MP cihazında görüntülendi.

3.2.10. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Proliferasyon Deneyleri

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi, hücelere ek hiçbir işaretleme yapmadan hücre proliferasyonunu eş zamanlı olarak ölçüp, analiz etmektedir. Bu çalışmada da xCELLigence serisinin RTCA-DP modeli kullanıldı. xCELLigence RTCA-DP sistemi, bir bilgisayar, sisteme ait özel E plate 16 ve RTCA-DP analizatör içermektedir. Sistem bilgisayara bağlı olup, eşzamanlı bir şekilde çalışmaktadır. Analizatör hücre kültürü inkübatörünün içinde yer alıp, bilgisayar ise dışında yer almaktadır. Hücrelerin ekildiği tek kullanımlık E plate 16'lar ise firmadan steril ve kapalı bir paket içerisinde, her plate için özel seri numarası ile satın alınmaktadır. Bu özel plate'lere hücre ekiminden sonra RTCA-DP analizatörüne entegre edilmekte ve analiz bilgisayar aracılığı ile başlatılarak eş zamanlı bir şekilde sürdürülmektedir. E plate 16'ların özelliği ise her bir kuyucuğun tabanında altın kaplama mikroelektrodlar bulunmakta ve bu elektrodla bağlı sensörler aracılığıyla hücre sayısı, morfolojisi ve canlılığı bilgileri ölçülmektedir. Ölçülen bilgiler Cell Index değeri olarak bilgisayar ekranında ayarlanan ölçüm süresine göre anlık olarak yansıtılmakta ve takip edilebilmektedir. Analizler sistemin kendisine ait ve analiz sırasında kullanılan RTCA-DP Software 1.2 programında bulunan Data Analizi bölümünden yapılabilmektedir.

ESM1 geninin UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B baş boyun kanseri hücre hatları üzerindeki proliferatif etkisini gözlemlemek amacıyla xCELLigence sistemi kullanıldı. Bunun için öncelikle hücreler 6'lık well plate'lere her kuyucuğa 3×10^5 sayıda olacak şekilde complete medium ile ekildi. Ekimden 24 saat sonra hücrelere 25 nM ESM1-siRNA ve 25 nM Non-Targeting-siRNA 4 µl DharmaFECT kullanılarak her bir örnek 3'erli tekrarlar şeklinde transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra öncelikle E plate 16'lar açıldı. UT-SCC-74A için bir adet E plate 16, UT-SCC-74B için bir adet E plate 16 kullanıldı.

İlk olarak her bir kuyucuğa 100 µl complete medium eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 30 dakika sonra E plate 16'lar RTCA-DP sistemine

yerleştirildi. Program başlatılıp 1 dakikalık blank ölçümü alındı. E plate 16'lar tekrar sistemden çıkartıldı. 6'lık well platelerde bulunan hücreler kaldırıldı, sayıldı ve E plate 16'lara her kuyucuğa 1×10^5 sayıda olacak şekilde ekildi. Ekimden sonra E plate 16'lar laminar flow kabin içerisinde 30 dk bekletildi. 30 dk sonunda sisteme tekrar yerleştirildi. Sistem her 15 dk'da bir ölçüm alacak şekilde 48 saate ayarlanarak analiz başlatıldı.

3.2.11. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Migrasyon Deneyleleri

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz Sistemi ile migrasyon deneyleleri içinde proliferasyon deneylelerinde kullanılan RTCA-DP sistemi kullanıldı. Migrasyon analizleri için tek fark; proliferasyondaki E-plate 16 yerine CIM-Plate 16 kullanılmasıdır. CIM-Plate dışında, analizatör, bilgisayar ve inkübatör aynıdır. CIM-plate xCELLigence sisteminde migrasyon ve invazyon analizleri için özel olarak üretilmiş, tek kullanımlık platelerdir. CIM-Plate bir kapak, alt kısım (lower chamber) ve üst kısım (upper chamber) olmak üzere 3 parçadan oluşmaktadır. Bunlardan üst kısım tabanında microporous polyethylene terephthalate (PET) membran bulunmakta ve bu membran altın mikroelektrodlar içermektedir. Membran üzerinde hücrelerin alt kısma geçebilmesi için mikroporlar bulunmakta ve bu porların büyüklüğü $8 \mu\text{m}$ 'dir. Alt kısım ise üst kısma eş 16 kuyucuk içermektedir. Deney aşamasında alt kısma kemoterapi çekici (chemoattractant) konulmakta akabinde üzerine üst kısım kapatılıp buraya da hücreler konulmaktadır. Üst kısımda bulunan hücreler durum ve özelliklerine göre alt kısımda bulunan kemoterapi çekiciye doğru göç etmekte, bu göç sırasında da üst kısım ile alt kısım arasında bulunan PET membrandaki mikroelektrodlar hücre göçünü eş zamanlı olarak ölçerek bilgisayar ekranına yansıtmaktadır. Bu ölçümler Cell Index değeri olarak verilmekte olup, gruplar arası migrasyon farkını kantitatif olarak göstermektedir.

Bu çalışmada da ESM1 geninin UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B baş boyun kanseri hücre hatları üzerinde migrasyona olan etkisini gözlemlemek amacıyla

xCELLigence sistemi ile CIM-Plate 16 kullanıldı. Bunun için öncelikle hücreler 6'lık well plate'lere her kuyucuğa 3×10^5 sayıda olacak şekilde complete medium ile ekildi. Ekimden 24 saat sonra hücrelere 25 nM ESM1-siRNA ve 25 nM Non-Targeting-siRNA 4 μ l DharmaFECT kullanılarak her bir örnek 3'erli tekrarlar şeklinde transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler CIM-Plate 16'lara aktarıldı. Bunun için öncelikle CIM-Plate 16'lar steril paketlerinden çıkarıldı. UT-SCC-74A için bir adet UT-SCC-74B için de bir adet CIM-Plate 16 kullanıldı. Öncelikle alt kısımda bulunan kuyucuklardan 10 tanesine chemo attractant olarak 100 μ l %10 FBS içeren complete medium konuldu. Geri kalan 6 tanesine ise negatif kontrol için 100 μ l hiçbir bileşen içermeyen medium konuldu. Üst kısım alt kısmın üzerine kapatıldı. Üst kısımdaki kuyucukların hepsine 37,5 μ l hiçbir bileşen içermeyen medium tabanda bulunan membrana değmeden dikkatli bir şekilde eklendi. Üst kısmın üzerine kapak kapatıldı. Ardından CIM-Plate 16'lar 1 saat süresince 37 °C hücre kültürü inkübatöründe bekletildi. 1 saat sonra CIM-Plate 16'lar xCELLigence sistemine takıldı. 1 dk süreyle blank ölçümü alındı ve çıkarıldı. Daha sonra ESM1-siRNA ve Non-Targeting-siRNA transfekte edilmiş hücreler transfeksiyondan tam olarak 48 saat sonra her kuyucuğa 8×10^5 sayıda olacak şekilde ekildi. Ekimden sonra 30 dk süreyle laminar flow kabinde oda sıcaklığında bekletildi. 30 dk sonunda CIM-Plate 16'lar xCELLigence RTCA-DP sistemine yerleştirildi. Her 15 dk'da bir ölçüm olacak şekilde 48 saate ayarlandı ve analiz başlatıldı.

3.2.12. Hücre Proliferasyon Analizleri İçin XTT Testi

XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) testi hücre proliferasyon ve sitotoksite analizlerinde kullanılan kolorimetrik ölçüm tekniğine dayanan bir analizdir. Bu çalışmada XTT testi için Cell Proliferation Kit II (Roche, 11465015001) kullanıldı.

ESM1 geninin UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B baş boyun kanseri hücre hatları üzerinde hücre proliferasyonuna olan etkisini XTT testi ile gözlemlemek için

öncelikle hücreler 6'lık well plate'lere her kuyucuğa 3×10^5 sayıda olacak şekilde complete medium ile ekildi. Ekimden 24 saat sonra hücrelere 25 nM ESM1-siRNA ve 25 nM Non-Targeting-siRNA 4 µl DharmaFECT kullanılarak her bir örnek 3'erli tekrarlar şeklinde transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler kaldırıldı, sayıldı ve her iki hücre hattı için 3'er adet 96 well platelere her kuyucuğa 1×10^5 sayıda olacak şekilde complete medium ile ekildi. Ekimden 24, 48 ve 72 saat sonra 50 µl XTT Labelling Reagent ve 1 µl Electron Coupling Reagent karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışımdan örnek bulunan her kuyucuğa 51'er µl aktratıldı. Plate 37 °C %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldı. XTT karışımı eklendikten 4 saat sonra Varioskan Flash mikropate okuyucuda 650 nm ve 450 nm dalga boylarında okuma yapıldı. Veriler kaydedildi.

3.2.13. Hücre Migrasyon Analizleri İçin Scratch Assay Testi

Scratch Assay, hücre migrasyon çalışmaları için pratik ve ekonomik in vitro bir moleküler yöntemdir.

Bu çalışmada da ESM1 geninin UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B baş boyun kanseri hücre hatları üzerinde migrasyona olan etkisini belirlemek amacıyla Scratch Assay deneyleri yapıldı. Bunun için öncelikle hücreler 6'lık well plate'lere her kuyucuğa 3×10^5 sayıda olacak şekilde complete medium ile ekildi. Ekimden 24 saat sonra hücrelere 25 nM ESM1-siRNA ve 25 nM Non-Targeting-siRNA 4 µl DharmaFECT kullanılarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler kaldırıldı, sayıldı ve yeni 6 well platelere her kuyucuğa 3×10^5 sayıda olacak şekilde complete medium ile ekildi. Ekimden 24 saat sonra 1000 µl steril pipet ucunun uç kısmı ile kuyucuklar boyuna çizildi. Çizim sonrası her kuyucuğun dış alt kısmı mavi asetat kalem ile enine çizildi. Fotoğraflar invert mikroskop altında 10X optikte 0, 12, 24, ve 48. saatlerde kalem ile çizilen bölgenin üst kısmından çekildi. Sonuçlar Image J programı ile analiz edildi.

3.2.14. Kaspaz 3 Aktivite Analizi

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B baş boyun kanseri hücre hatlarında ESM1 geni baskılandığında hücrelerde kaspaz 3 aktivitesinin değişimini analiz etmek için Caspase 3 Activity Assay Kit (Roche Life Sciences, 12 012 952 001) kullanıldı.

3.2.14.1. Hücrelerin Hazırlanması

Hücreler 6'lık well plate'lere her kuyucuğa 3×10^5 sayıda olacak şekilde complete medium ile ekildi. Ekimden 24 saat sonra hücrelere 25 nM ESM1-siRNA ve 25 nM Non-Targeting-siRNA 4 µl DharmaFECT kullanılarak her bir örnek 3'erli tekrarlar şeklinde transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası tripsinize edilerek kaldırıldı. Kalkan hücreler santrifüjden sonra falkon içerisinde 1 mL soğuk 1X PBS ile pipetaj yapılarak yıkandı. 1X PBS içinde çözünen hücreler tekrar 300 g'de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı. Pellette kalan hücreler üzerine 200 µl 1X DDT solüsyonu eklendi ve hücreler pipetajla çözdürüldü. Çözünen hücreler 1 dk buz üzerinde inkübe edildi. Daha sonra 15.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. 200 µl süpernatant analiz için ayrı tüplere alındı. Pellet atıldı. Analiz için alınan süpernatantlar hemen kullanılabilmeyle birlikte daha sonra analiz etmek için -20 °C'de 6 ay süreyle muhafaza edilebilir.

3.2.14.2. MTP Plate Hazırlanması

Kaspaz 3 aktivite analizi kit içeriğinden çıkan özel MTP plate üzerinde gerçekleştirildi. Hücre lizatları MTP plate'e aktarılmadan önce plate bazı solüsyonlarla kaplandı. Bunun için ilk olarak uygulama yapılacak her kuyucuğa 100 µl anti-caspase-3 Coating Solution eklendi, MTP'nin üzeri yapışkan folyo ile sıkıca kapatıldı ve 1 saat 37°C inkübatörde inkübe edildi. 1 saat sonra anti-caspase-3 Coating Solution tamamen çekildi. Ardından kuyucuklara 200 µl Blocking Buffer

eklendi. MTP üzeri yapışkan folyo ile sıkıca kapatıldı ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Sonrasında Blocking Buffer tamamen çekildi. Uygulama yapılan tüm kuyucuklar 3 kez 200 µl 1X Incubation Buffer ile yıkandı. Bu işlemler sonunda MTP örneklerin yüklenmesi için hazır hale geldi.

3.2.14.3. Proteaz Aktivite Analizi

Kaplama işlemi MTP plate kuyucuklarına örneklerden 100'er µl, kit içeriğinden çıkan pozitif kontrol'den de 100 µl eklendi, MTP üzeri yapışkan folyo ile sıkıca kapatıldı ve 1 saat 37 °C inkübatörde inkübe edildi. 1 saat sonra örnekler ve pozitif kontrol çekildi ve uygulama yapılan tüm kuyucuklar 3 kez 200 µl 1X Incubation Buffer ile yıkandı. Ardından kuyucuklara 100 µl 1X Substrate Solution eklendi. MTP üzeri yapışkan folyo ile sıkıca kapatıldı ve bir gece 37 °C inkübatörde inkübe edildi.

3.2.14.4. Kaspaz 3 Aktivite Analizi

Bir gecelik inkübasyonun ardından kaspaz 3 aktivite analizi için öncelikle standartlar hazırlandı. Kit içeriğinde bulunan AFC 1X Substrate Solution ile dilüe edildi. Dilüe edilen AFC ile aşağıdaki şekilde standartlar hazırlandı.

50 µM standart için: 250 µl AFC

25 µM için: 125ul AFC + 125 µl Substrate Solution

10 µM için: 50ul AFC + 200 µl Substrate Solution

1 µM için: 5ul AFC + 245 µl Substrate Solution

0.5 µM için: 5 ul AFC + 495 µl Substrate Solution

0 µM için: 200 µl Substrate Solution

Standartlar hazırlandıktan hemen sonra MTP üzerinde daha önce standartlar için kaplanmış kuyucuklara 100'er µl eklendi. Daha sonra MTP mikroplate

okuyucuda florometrik ölçüm yapıldı. Ölçüm için excitation filter 370-425 nm ve emission filter 490-530 nm (maxima λ_{ex} :400 nm λ_{em} :505 nm) değerleri kullanıldı. Bu noktada alınan değerler kaydedildi. Bu değerler ile kaspaz 3 aktivite analizleri gerçekleştirildi.

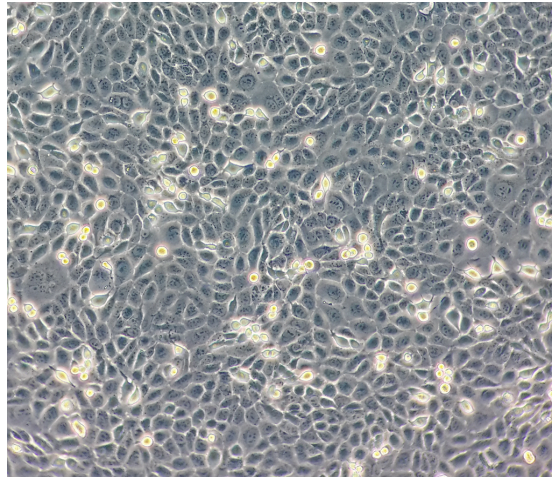
3.2.15. İstatistiksel Analiz

İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P < 0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.

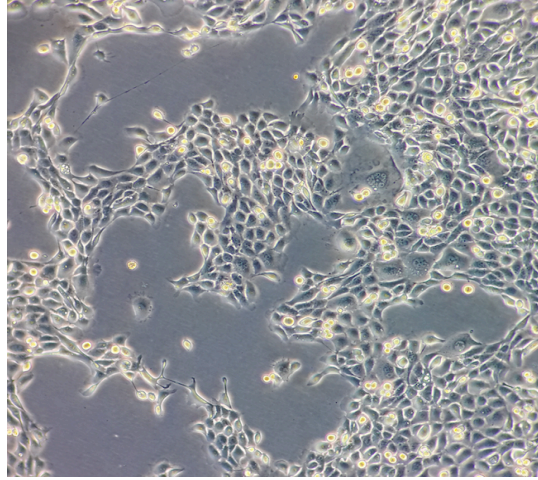
4. SONUÇLAR

4.1. UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B Baş Boyun Kanseri Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi ve Morfolojileri

UT-SCC-74A baş boyun kanseri ve metastazı UT-SCC-74B hücre hatları uygun koşullarda kültüre edilmiştir. Bunlardan şekil 9’da görülen UT-SCC-74A hücreleri bulunduğu yüzeye daha çok yayılan ve nispeten yuvarlak görünümlü hücrelerdir. Şekil 10’da görülen UT-SCC-74B hücreleri ise daha çok koloni oluşturan ve çekirdek görünümlü hücrelerdir. Her iki hücre grubunun da kültürü sonunda hücreler ekildikleri yüzeye çabuk bir tutunma göstermiş, genel olarak %99 canlılık oranında ve çoğalmaları açısından hızlı bir profil çizmişlerdir. UT-SCC-74B hücre hattı UT-SCC-74A’ya göre belli bir zamandan sonra daha fazla çoğalmıştır. Aynı zamanda eşit sayıda ekilen iki hücre grubunda tam doluluğa ulaştığı zaman UT-SCC-74B hücreleri mediumlarını daha çabuk tüketmiş bu da ortaya daha sarı renkli medium olarak çıkmıştır. Bu durumların sebebi UT-SCC-74B hücre hattının metastatik karakterinden dolayıdır.



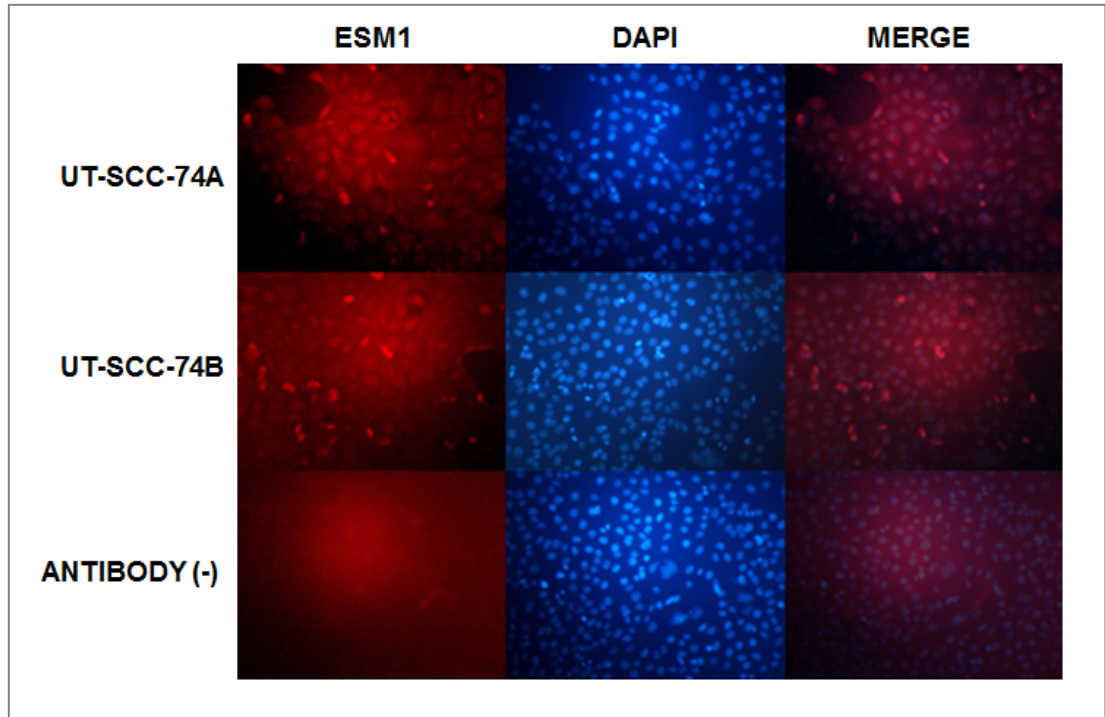
Şekil 9. UT-SCC-74A Baş Boyun Kanseri Hücrelerinin Invert Mikroskop Altındaki Görüntüsü



Şekil 10. UT-SCC-74B Baş Boyun Kanseri Hücrelerinin Invert Mikroskop Altındaki Görüntüsü

4.2. ESM1 Ekspresyonunun ImmunoFloresan Boyama ile Gösterilmesi

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarında ESM1 geni ekspresyonu ESM1 genine spesifik antikor kullanılarak gösterilmiştir. Çalışmada hücre çekirdeklerini boyamak için DAPI boyası kullanılmıştır. Her iki hücre hattı da uygun boyama işlemleri içerisinde birinci antikor olarak anti-ESM1 antikorunu, 2. Antikor olarak da Alexa Fluor® 546 kullanılmıştır. Negatif kontrol için UT-SCC-74A hücre hattına tüm boyama işlemleri uygulanmış, antikor uygulanmamıştır. Boyama işlemi tamamlanan hücreler immunofloresan mikroskop altında görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucunda şekil 11’de de görüldüğü gibi ESM1 geni UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarında ekprese olurken, negatif kontrol grubunda ise ekspresyon gözlenmemiştir. Ayrıca görüntüler eş çekirdek boyama görüntüleri ile birleştirilerek (merge) boyama alanları doğrulanmıştır.



Şekil 11. UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B Hücre Hatlarında ESM1 Ekspresyonunun Immunofloresan Boyama İle Gösterilmesi

4.3. RNA İzolasyonu Ölçüm Sonuçları

Gradient PCR ve kantitatif Real Time PCR çalışmalarında kullanılacak cDNA'lar için UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. 12'lik well platelere ekilen hücrelere ESM1-siRNA, Non-Targeting-siRNA ve GAPDH-siRNA transfekte edilmiş ve transfeksiyondan 48 saat sonra RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'lar NanoDrop 2000c cihazında ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları ise UT-SCC-74A için şekil 12'de, UT-SCC-74B için ise şekil 13'de verilmiştir. Sonuçlar nükleik asit konsantrasyonu (Nucleic Acid. Conc.) ve 260/280 değerlerine göre değerlendirilmiştir. Kontrol amaçlı uygulanan, sadece DharmaFECT (transfeksiyonda kullanılan dozda) ve uygulama yapılmayan kontrol grupları da hücre morfolojilerinde değişiklik oluşturmamakla birlikte, RNA sonuçları uygulama yapılan gruplara yakın değerlerde çıkmıştır.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230
8	Blank	biospec	9/9/2014 10:48:51 AM						
10	UTC-SCC-74A ESM1-1 25nM	biospec	9/9/2014 10:50:23 AM	399.2	ng/µl	9.980	5.222	1.91	0.87
11	UTC-SCC-74A ESM1-2 25nM	biospec	9/9/2014 10:50:57 AM	484.6	ng/µl	12.115	6.367	1.90	1.00
12	UTC-SCC-74A ESM1-3 25nM	biospec	9/9/2014 10:51:49 AM	429.5	ng/µl	10.738	5.627	1.91	0.89
13	UTC-SCC-74A NT-1 25nM	biospec	9/9/2014 10:52:48 AM	414.0	ng/µl	10.350	5.371	1.93	0.92
14	UTC-SCC-74A NT-2 25nM	biospec	9/9/2014 10:53:29 AM	509.8	ng/µl	12.745	6.878	1.85	1.03
15	UTC-SCC-74A NT-3 25nM	biospec	9/9/2014 10:54:06 AM	426.6	ng/µl	10.666	5.606	1.90	0.90
16	UTC-SCC-74A GAPDH-1 25nM	biospec	9/9/2014 10:54:50 AM	461.6	ng/µl	11.540	6.041	1.91	0.97
17	UTC-SCC-74A GAPDH-2 25nM	biospec	9/9/2014 10:55:34 AM	487.3	ng/µl	12.183	6.433	1.89	0.99
18	UTC-SCC-74A GAPDH-3 25nM	biospec	9/9/2014 10:56:13 AM	376.5	ng/µl	9.414	4.935	1.91	0.84
19	UTC-SCC-74A DHARMAFECT-1 25nM	biospec	9/9/2014 10:56:56 AM	442.1	ng/µl	11.053	5.814	1.90	0.94
20	UTC-SCC-74A DHARMAFECT-2 25nM	biospec	9/9/2014 10:57:45 AM	326.1	ng/µl	8.153	4.284	1.90	0.71
21	UTC-SCC-74A DHARMAFECT-3 25nM	biospec	9/9/2014 10:58:20 AM	394.2	ng/µl	9.855	5.159	1.91	0.83
22	DEPC-T-WATER	biospec	9/9/2014 10:58:54 AM	-3.8	ng/µl	-0.095	-0.110	0.87	-0.53
23	UTC-SCC-74A ESM1-1 50nM	biospec	9/9/2014 10:59:47 AM	346.2	ng/µl	8.654	4.402	1.97	1.39
24	UTC-SCC-74A ESM1-2 50nM	biospec	9/9/2014 11:00:24 AM	389.1	ng/µl	9.729	5.015	1.94	1.14
25	UTC-SCC-74A ESM1-3 50nM	biospec	9/9/2014 11:00:57 AM	378.3	ng/µl	9.457	4.943	1.91	1.00
26	UTC-SCC-74A NT-1 50nM	biospec	9/9/2014 11:01:38 AM	446.9	ng/µl	11.171	5.812	1.92	0.99
27	UTC-SCC-74A NT-2 50nM	biospec	9/9/2014 11:02:16 AM	407.7	ng/µl	10.192	5.378	1.90	0.88
28	UTC-SCC-74A NT-3 50nM	biospec	9/9/2014 11:02:58 AM	470.7	ng/µl	11.768	6.221	1.89	0.99
29	UTC-SCC-74A GAPDH-1 50nM	biospec	9/9/2014 11:03:40 AM	363.3	ng/µl	9.084	4.734	1.92	0.86
30	UTC-SCC-74A GAPDH-2 50nM	biospec	9/9/2014 11:04:16 AM	485.8	ng/µl	12.145	6.437	1.89	1.01
31	UTC-SCC-74A GAPDH-3 50nM	biospec	9/9/2014 11:04:54 AM	463.8	ng/µl	11.596	6.096	1.90	0.97
32	UTC-SCC-74A CONTROL-1	biospec	9/9/2014 11:05:31 AM	422.4	ng/µl	10.559	5.408	1.95	1.28
33	UTC-SCC-74A CONTROL-2	biospec	9/9/2014 11:06:04 AM	296.0	ng/µl	7.400	3.820	1.94	0.81
34	UTC-SCC-74A CONTROL-3	biospec	9/9/2014 11:06:36 AM	417.2	ng/µl	10.429	5.451	1.91	0.88

Şekil 12. UT-SCC-74A Hücrelerinden Transfeksiyon Sonrası İzole Edilen Total RNA'ların Ölçüm Sonuçları

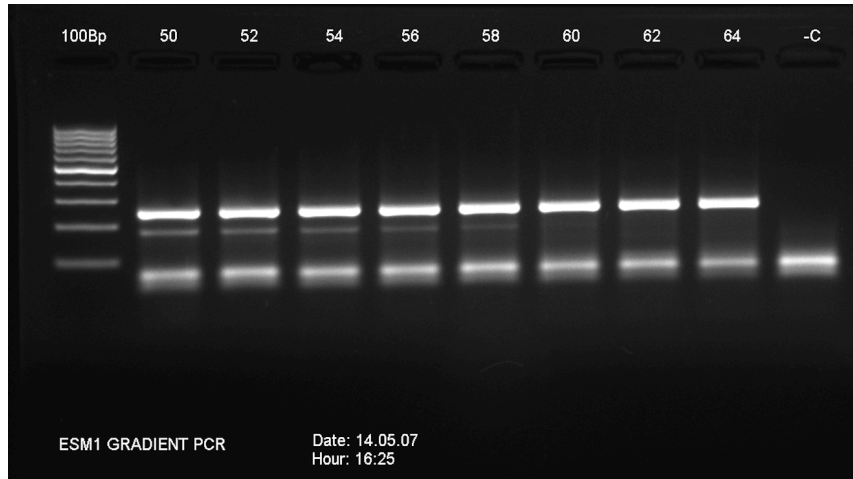
#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230
31	Blank	biospec	9/11/2014 4:02:25 PM						
33	UTC-SCC-74B ESM1-1 25nM	biospec	9/11/2014 4:04:34 PM	265.5	ng/µl	6.638	3.681	1.80	0.49
34	UTC-SCC-74B ESM1-2 25nM	biospec	9/11/2014 4:05:29 PM	350.5	ng/µl	8.763	4.731	1.85	0.68
35	UTC-SCC-74B ESM1-3 25nM	biospec	9/11/2014 4:06:08 PM	516.9	ng/µl	12.924	7.238	1.79	0.71
36	UTC-SCC-74B NT-1 25nM	biospec	9/11/2014 4:06:50 PM	608.7	ng/µl	15.218	8.528	1.78	0.66
37	UTC-SCC-74B NT-2 25nM	biospec	9/11/2014 4:07:31 PM	556.4	ng/µl	13.909	7.527	1.85	0.96
38	UTC-SCC-74B NT-3 25nM	biospec	9/11/2014 4:08:15 PM	553.7	ng/µl	13.843	7.572	1.83	0.71
39	UTC-SCC-74B GAPDH-1 25nM	biospec	9/11/2014 4:09:23 PM	657.7	ng/µl	16.442	9.198	1.79	0.57
40	UTC-SCC-74B GAPDH-2 25nM	biospec	9/11/2014 4:10:10 PM	655.8	ng/µl	16.396	9.175	1.79	0.59
41	UTC-SCC-74B GAPDH-3 25nM	biospec	9/11/2014 4:10:50 PM	684.6	ng/µl	17.114	9.358	1.83	0.70
42	UTC-SCC-74B DHARMAFECT-1	biospec	9/11/2014 4:11:41 PM	486.3	ng/µl	12.157	6.756	1.80	0.74
43	UTC-SCC-74B DHARMAFECT-2	biospec	9/11/2014 4:12:24 PM	628.4	ng/µl	15.709	8.434	1.86	0.87
44	UTC-SCC-74B DHARMAFECT-3	biospec	9/11/2014 4:13:12 PM	589.0	ng/µl	14.725	8.063	1.83	0.75
48	DEPC-T-WATER	biospec	9/11/2014 4:16:15 PM	-0.3	ng/µl	-0.007	-0.015	0.45	0.38
49	UTC-SCC-74B ESM1-1 50nM	biospec	9/11/2014 4:17:09 PM	513.5	ng/µl	12.837	7.316	1.75	0.57
50	UTC-SCC-74B ESM1-2 50nM	biospec	9/11/2014 4:17:53 PM	721.7	ng/µl	18.043	10.542	1.71	0.53
51	UTC-SCC-74B ESM1-3 50nM	biospec	9/11/2014 4:18:32 PM	736.6	ng/µl	18.415	10.160	1.81	0.75
52	UTC-SCC-74B NT-1 50nM	biospec	9/11/2014 4:19:23 PM	712.1	ng/µl	17.803	10.066	1.77	0.59
53	UTC-SCC-74B NT-2 50nM	biospec	9/11/2014 4:20:06 PM	685.8	ng/µl	17.146	9.644	1.78	0.60
54	UTC-SCC-74B NT-3 50nM	biospec	9/11/2014 4:20:41 PM	711.8	ng/µl	17.795	9.710	1.83	0.80
55	UTC-SCC-74B GAPDH-1 50nM	biospec	9/11/2014 4:21:24 PM	458.1	ng/µl	11.453	5.982	1.91	1.29
56	UTC-SCC-74B GAPDH-2 50nM	biospec	9/11/2014 4:22:00 PM	515.8	ng/µl	12.894	6.817	1.89	1.45
57	UTC-SCC-74B GAPDH-3 50nM	biospec	9/11/2014 4:22:39 PM	598.5	ng/µl	14.963	8.063	1.86	1.15
58	UTC-SCC-74B CONTROL-1	biospec	9/11/2014 4:23:31 PM	780.8	ng/µl	19.519	11.298	1.73	0.45
59	UTC-SCC-74B CONTROL-2	biospec	9/11/2014 4:24:04 PM	735.8	ng/µl	18.395	10.629	1.73	0.51
60	UTC-SCC-74B CONTROL-3	biospec	9/11/2014 4:24:40 PM	762.6	ng/µl	19.066	11.097	1.72	0.48

Şekil 13. UT-SCC-74B Hücrelerinden Transfeksiyon Sonrası İzole Edilen Total RNA'ların Ölçüm Sonuçları

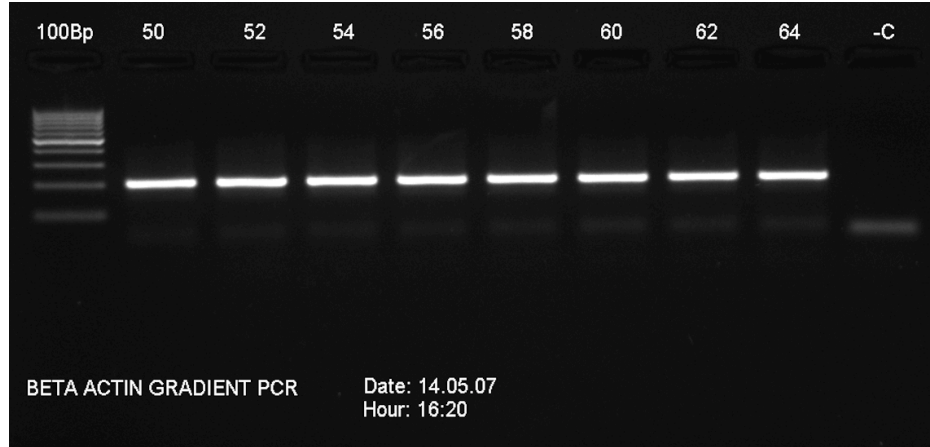
4.4. Gradient PCR ile Primerlerin Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Kantitatif Real Time PCR çalışmalarına geçmeden önce kullanılacak primerlerin bağlanma sıcaklıkları gradient PCR ile belirlenmiştir. ESM1, GAPDH, ve Beta Actin genleri için 50-64 °C arası sıcaklıklarda PCR yapılmış ve PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

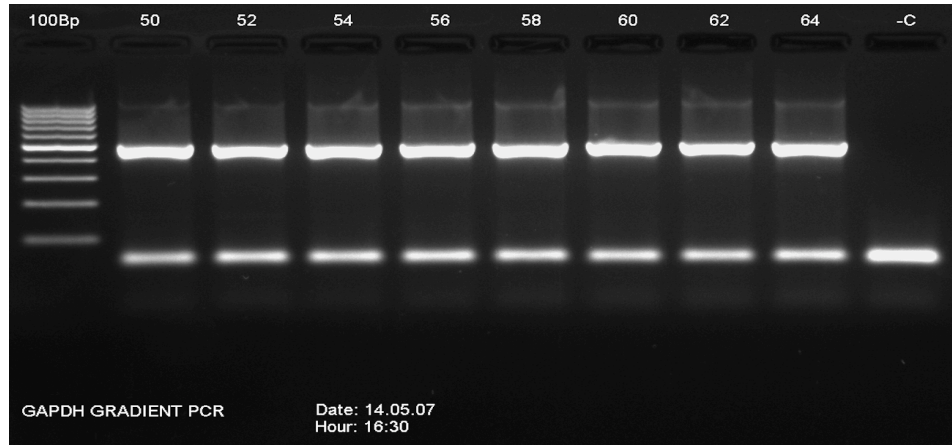
Şekil 14'de görüldüğü üzere ESM1 primerleri 50-64 °C arası tüm sıcaklıklarda bağlanmış ve 246 bazlık doğru bölgede amplifikasyon gerçekleşmiştir. Şekil 15'de Beta Actin primerleri 50-64 °C arası tüm sıcaklıklarda bağlanmış 204 bazlık doğru bölgede amplifikasyon gerçekleşmiştir. Şekil 16'de GAPDH primerleri 50-64 °C arası tüm sıcaklıklarda bağlanmış ve 496 bazlık doğru bölgede amplifikasyon gerçekleşmiştir. Jel görüntülerine göre sonuçlar değerlendirilmiş ve her bir primer için optimal bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir. Buna göre ESM1, GAPDH ve Beta Actin için 58 °C seçilmiştir.



Şekil 14. ESM1 Geni İçin Yapılan Gradient PCR Çalışmasının Agaroz Jel Görüntüsü



Şekil 15. Beta Actin Geni İçin Yapılan Gradient PCR Çalışmasının Agaroz Jel Görüntüsü



Şekil 16. GAPDH Geni İçin Yapılan Gradient PCR Çalışmasının Agaroz Jel Görüntüsü

4.5. GAPDH Kantitatif Real Time PCR ile Hücrelerin Transfeksiyon Etkinliklerinin Saptanması

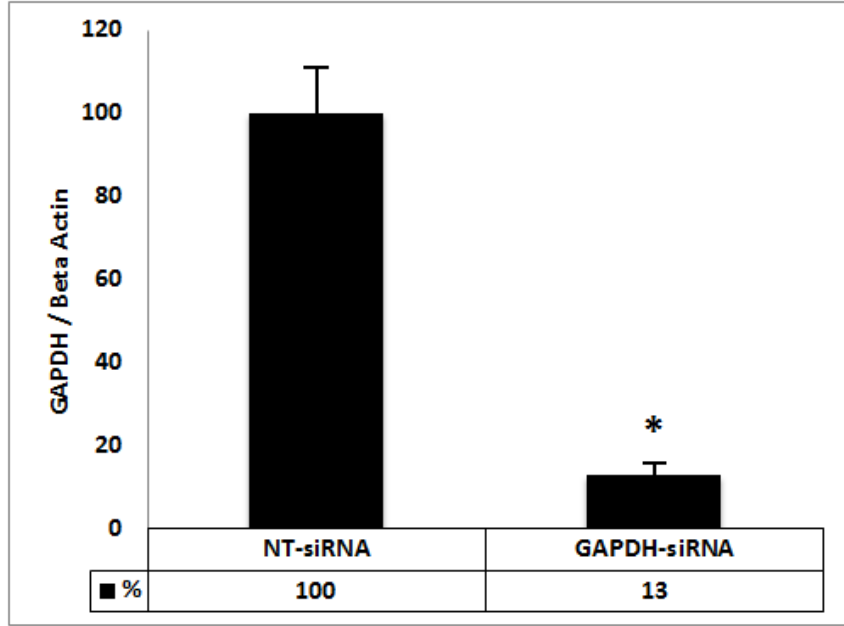
UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarının transfeksiyon etkinliklerinin saptanması için, house keeping bir gen olan GAPDH, bu hücrelerde GAPDH-siRNA ile baskılanmış ve akabinde kantitatif real time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. GAPDH genini hücrelerde baskılama oranı, hücrelerin transfeksiyon etkinliğini

gösteren, bu yolla hücrelerin maksimum oranda ne kadar baskılanabileceğini belirten bir yöntemdir. Bunun için hücrelere 25 ve 50 nM dozlarda GAPDH-siRNA ve Non-Targeting-siRNA transfekte edilmiş, transfeksiyondan 48 saat sonra alınan RNA'lar cDNA formuna çevrilmiş ve son olarak bu cDNA'lar ile kantitatif real time PCR analizlerine geçilmiştir. Çalışmada normalizasyon için Beta Actin değerleri kullanılmıştır.

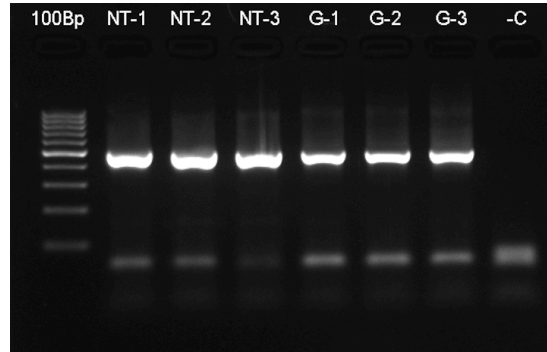
4.5.1. UT-SCC-74A Hücre Hattında GAPDH-siRNA Etkinliğinin Gösterilmesi

UT-SCC-74A hücre hattına 25 ve 50 nM dozlarda GAPDH-siRNA ve Non-Targeting-siRNA transfeksiyonu sonucu GAPDH genini baskılama oranı kantitatif real time PCR ile gösterilmiştir. Sonuçlar Rotor Gene Software 2.0.2. programında analiz edilmiştir. GAPDH sonuçları Beta Actin sonuçlarına oranlanmış ve GAPDH geninin baskılama oranı bulunmuştur. Aynı zamanda kantitatif real time PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek, doğru bölgenin amplifiye olup olmadığı ve negatif kontrolde herhangi bir bant olup olmadığı gözlemlenmiştir.

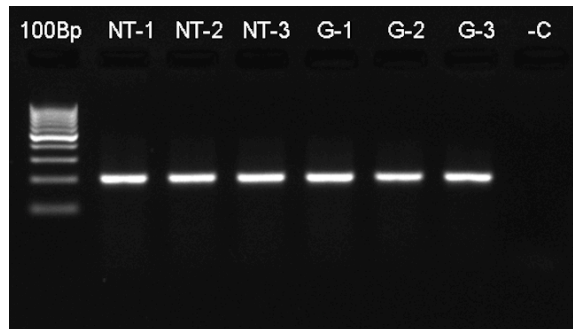
Şekil 17'de 25 nM GAPDH-siRNA transfeksiyonunun UT-SCC-74A hücre hattı üzerindeki GAPDH genini baskılama sonucu gösterilmiştir. Buna göre GAPDH geni UT-SCC-74A hücre hattında kontrole göre %87 oranında anlamlı şekilde baskılanmıştır. Ayrıca şekil 18'de GAPDH, şekil 19'da da Beta Actin PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüleri verilmiştir. Görüntülere göre GAPDH ve Beta Actin genleri doğru bölgede amplifiye olmuş ve negatif kontrollerinde de herhangi bir amplifikasyon söz konusu olmamıştır.



Şekil 17. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 25 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi (* p<0.01)

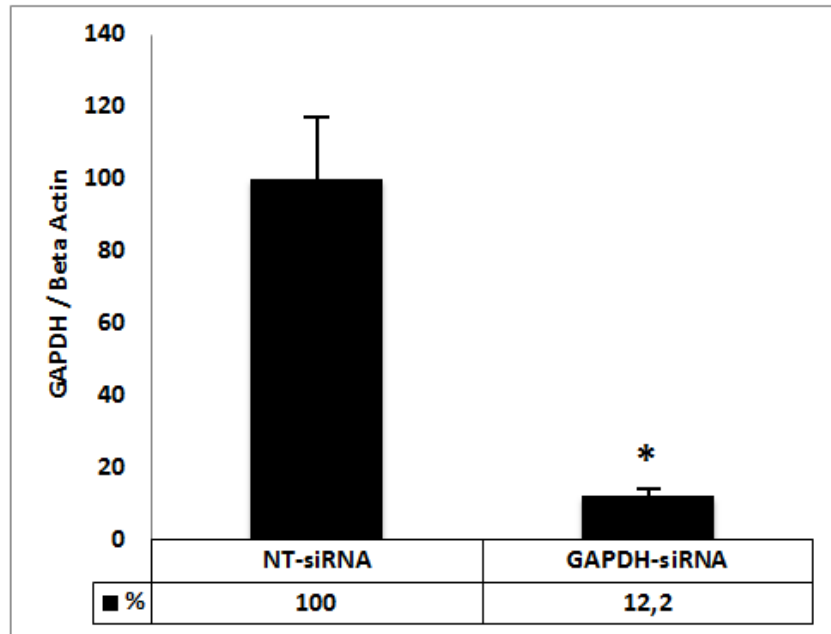


Şekil 18. GAPDH Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

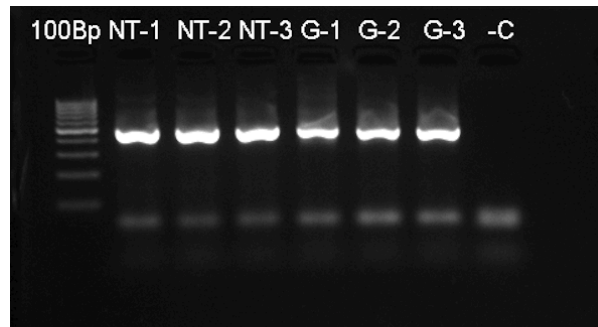


Şekil 19. Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

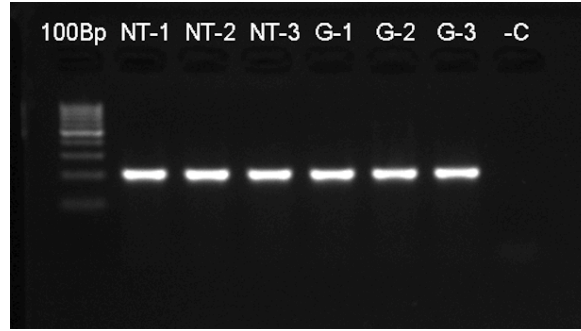
Şekil 20’de de 50 nM GAPDH-siRNA transfeksiyonunun UT-SCC-74A hücre hattı üzerinde GAPDH genini baskılama sonucu gösterilmiştir. Buna göre GAPDH geni UT-SCC-74A hücre hattında kontrole göre %88 oranında anlamlı şekilde baskılanmıştır. Ayrıca şekil 21’de GAPDH, şekil 22’de de Beta Actin PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüleri verilmiştir. Görüntülere göre GAPDH ve Beta Actin genleri doğru bölgede amplifiye olmuş ve negatif kontrollerinde de herhangi bir amplifikasyon söz konusu olmamıştır.



Şekil 20. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 50 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi (* p<0.01)



Şekil 21. GAPDH Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

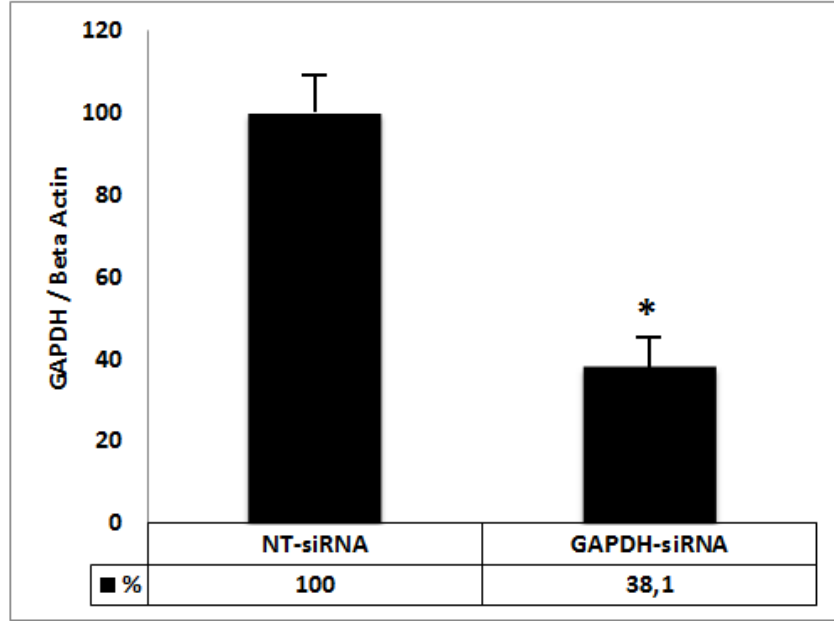


Şekil 22. Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

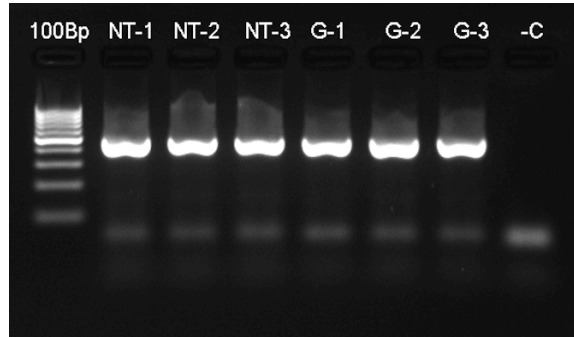
4.5.2. UT-SCC-74B Hücre Hattında GAPDH-siRNA Etkinliğinin Gösterilmesi

UT-SCC-74B hücre hattına 25 ve 50 nM dozlarda GAPDH-siRNA ve Non-Targeting-siRNA transfeksiyonu sonucu GAPDH genini baskılama oranı kantitatif real time PCR ile gösterilmiştir. Sonuçlar Rotor Gene Software 2.0.2. programında analiz edilmiştir. GAPDH sonuçları Beta Actin sonuçlarına oranlanmış ve GAPDH geninin baskılama oranı bulunmuştur. Aynı zamanda kantitatif real time PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek, doğru bölgenin amplifiye olup olmadığı ve negatif kontrolde herhangi bir bant olup olmadığı gözlemlenmiştir.

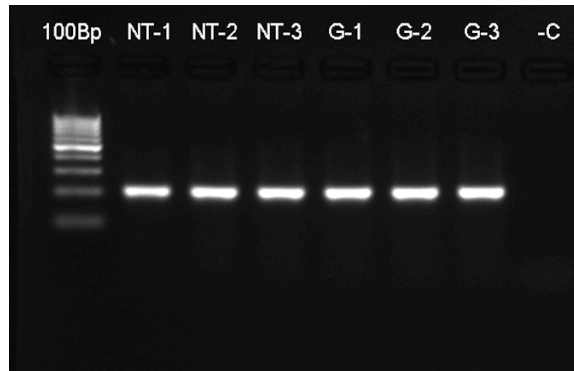
Şekil 23'de 25 nM GAPDH-siRNA transfeksiyonunun UT-SCC-74B hücre hattı üzerinde GAPDH genini baskılama sonucu gösterilmiştir. Buna göre GAPDH geni UT-SCC-74A hücre hattında kontrole göre %62 oranında anlamlı şekilde baskılanmıştır. Ayrıca şekil 24'de GAPDH, şekil 25'de de Beta Actin PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüleri verilmiştir. Görüntülere göre GAPDH ve Beta Actin genleri doğru bölgede amplifiye olmuş ve negatif kontrollerinde de herhangi bir amplifikasyon söz konusu olmamıştır.



Şekil 23. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 25 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi (* p<0.01)

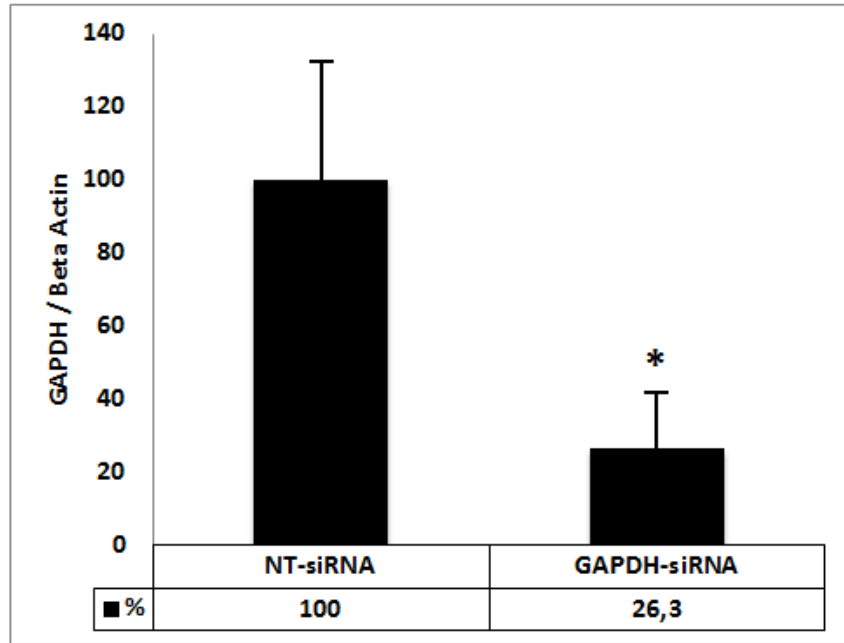


Şekil 24. GAPDH Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

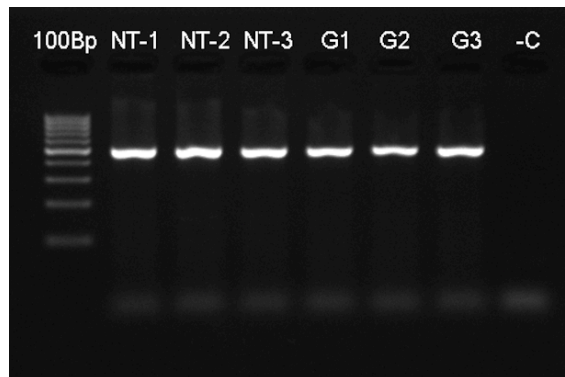


Şekil 25. Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

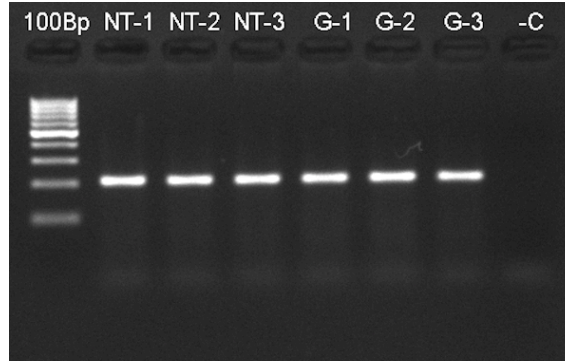
Şekil 26'da 50 nM GAPDH-siRNA transfeksiyonunun UT-SCC-74B hücre hattı üzerinde GAPDH genini baskılama sonucu gösterilmiştir. Buna göre GAPDH geni UT-SCC-74A hücre hattında kontrole göre %74 oranında anlamlı şekilde baskılanmıştır. Ayrıca şekil 27'de GAPDH, şekil 28'de de Beta Actin PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüleri verilmiştir. Görüntülere göre GAPDH ve Beta Actin genleri doğru bölgede amplifiye olmuş ve negatif kontrollerinde de herhangi bir amplifikasyon söz konusu olmamıştır.



Şekil 26. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 50 nM GAPDH-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi (* p<0.01)



Şekil 27. GAPDH Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü



Şekil 28. Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

4.6. Kantitatif Real Time PCR ile ESM1 Geninin mRNA Düzeyinde Baskılama Düzeylerinin Gösterilmesi

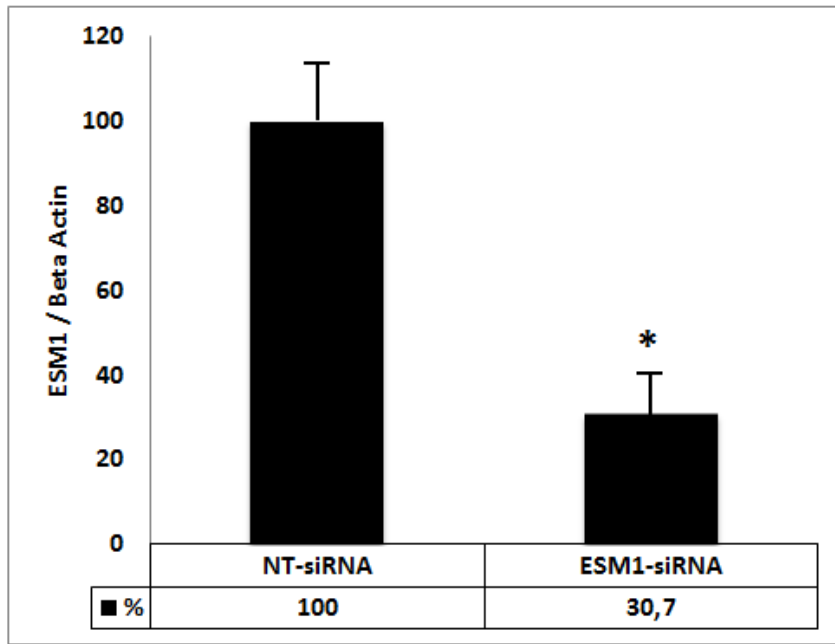
UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarında ESM1 geninin ESM1-siRNA kullanılarak baskılandığını mRNA düzeyinde göstermek için kantitatif real time PCR analizleri yapılmıştır. Daha ileri moleküler analizlere geçmeden önce hem kullanılan ESM1-siRNA etkinliğini görmek, hem de ESM1 geninin baskılama düzeyini rakamsal olarak ortaya koymak açısından kantitatif real time PCR analizleri önemli bir adımdır. Bu bağlamda hücrelere 25 ve 50 nM ESM1-siRNA ve Non-Targeting-siRNA transfekte edilmiş, transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerden RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'lar cDNA formuna çevrilmiş ve bu cDNA'lar ile kantitatif real time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Normalizasyon Beta Actin değerleri ile yapılmıştır.

4.6.1. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1 Geninin mRNA Düzeyinde Baskılama Düzeyinin Gösterilmesi

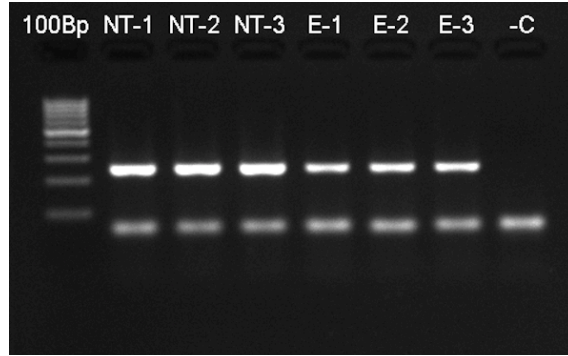
UT-SCC-74A hücre hattına 25 ve 50 nM dozlarda ESM1-siRNA ve Non-Targeting-siRNA transfeksiyonu sonucu ESM1 genini baskılama oranı kantitatif real time PCR ile gösterilmiştir. Sonuçlar Rotor Gene Software 2.0.2. programında analiz edilmiştir. ESM1 sonuçları Beta Actin sonuçlarına oranlanmış ve ESM1 geninin

baskılama oranı bulunmuştur. Aynı zamanda kantitatif real time PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek, doğru bölgenin amplifiye olup olmadığı ve negatif kontrolde herhangi bir bant olup olmadığı gözlemlenmiştir.

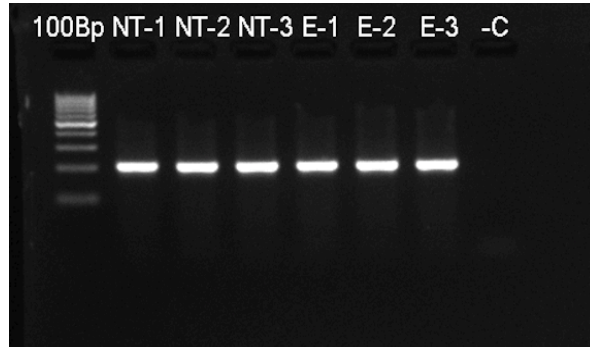
Şekil 29'da 25 nM ESM1-siRNA transfeksiyonunun UT-SCC-74A hücre hattı üzerinde ESM1 genini baskılama sonucu gösterilmiştir. Buna göre ESM1 geni UT-SCC-74A hücre hattında kontrole göre %70 oranında anlamlı şekilde baskılanmıştır. Ayrıca şekil 30'da ESM1, şekil 31'de de Beta Actin PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüleri verilmiştir. Görüntülere göre ESM1 ve Beta Actin genleri doğru bölgede amplifiye olmuş ve negatif kontrollerinde de herhangi bir amplifikasyon söz konusu olmamıştır.



Şekil 29. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 25 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi (* p<0.01)

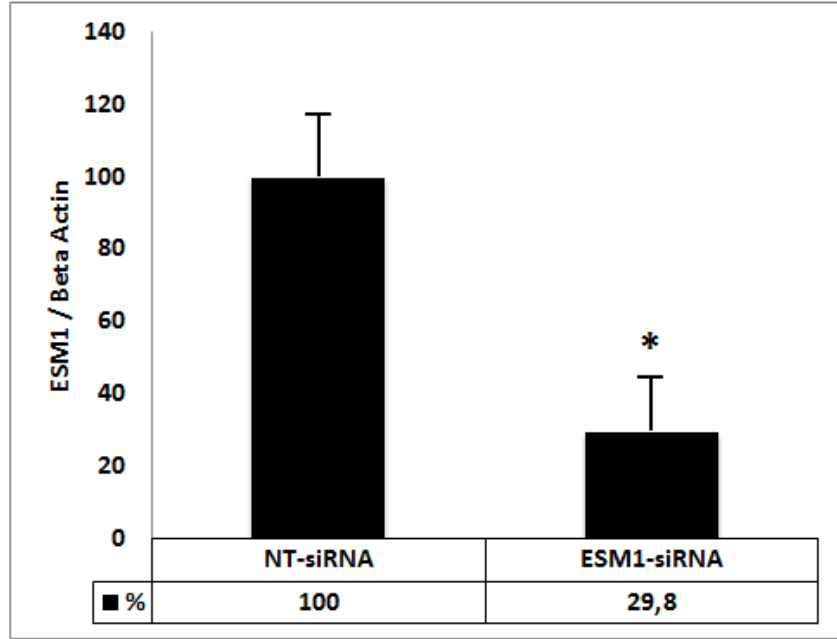


Şekil 30. ESM1 Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

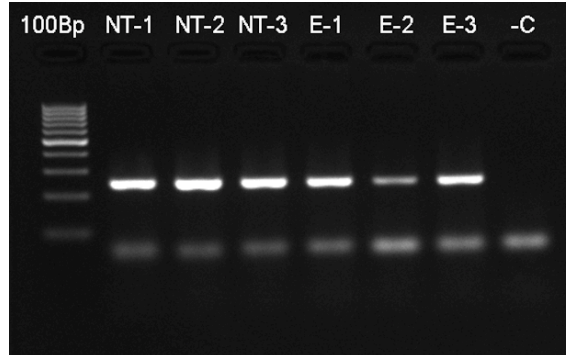


Şekil 31. Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

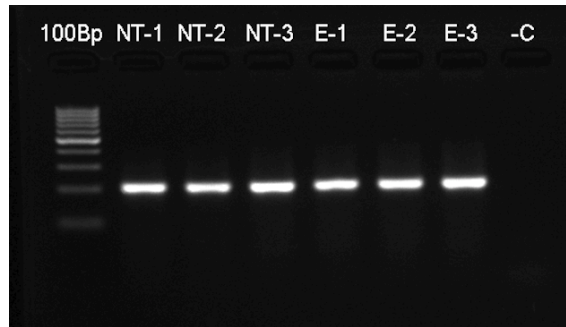
Şekil 32’de 50 nM ESM1-siRNA transfeksiyonunun UT-SCC-74A hücre hattı üzerinde ESM1 genini baskılama sonucu gösterilmiştir. Buna göre ESM1 geni UT-SCC-74A hücre hattında kontrole göre %70 oranında anlamlı şekilde baskılanmıştır. Ayrıca şekil 33’de ESM1, şekil 34’de de Beta Actin PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüleri verilmiştir. Görüntülere göre ESM1 ve Beta Actin genleri doğru bölgede amplifiye olmuş ve negatif kontrollerinde de herhangi bir amplifikasyon söz konusu olmamıştır.



Şekil 32. UT-SCC-74A Hücreleri Üzerinde 50 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi (* p<0.01)



Şekil 33. ESM1 Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

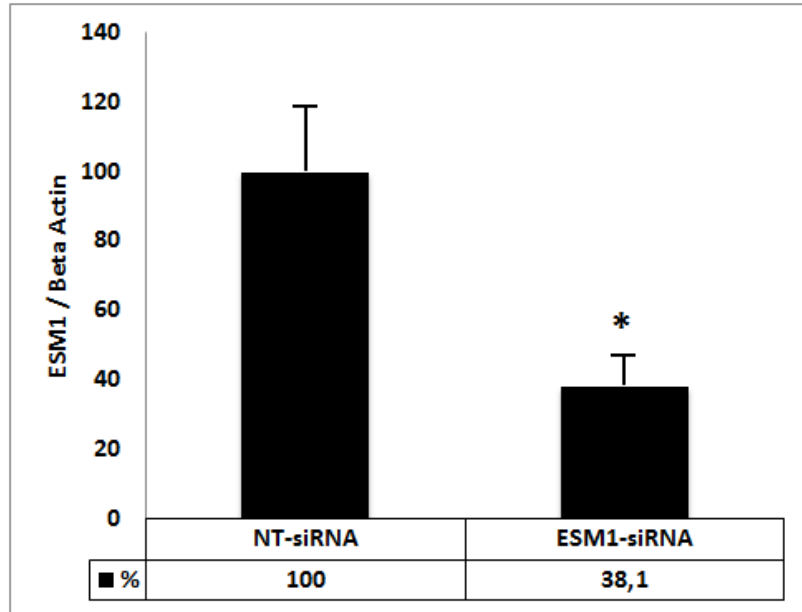


Şekil 34. Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

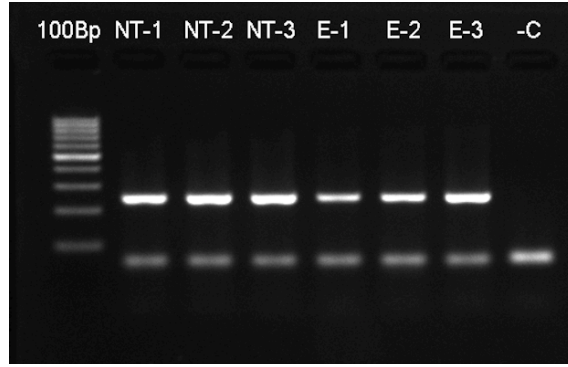
4.6.2. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1 Geninin mRNA Düzeyinde Baskılama Düzeyinin Gösterilmesi

UT-SCC-74B hücre hattına 25 ve 50 nM dozlarda ESM1-siRNA ve Non-Targeting-siRNA transfeksiyonu sonucu ESM1 genini baskılama oranı kantitatif real time PCR ile gösterilmiştir. Sonuçlar Rotor Gene Software 2.0.2. programında analiz edilmiştir. ESM1 sonuçları Beta Actin sonuçlarına oranlanmış ve ESM1 geninin baskılama oranı bulunmuştur. Aynı zamanda kantitatif real time PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek, doğru bölgenin amplifiye olup olmadığı ve negatif kontrolde herhangi bir bant olup olmadığı gözlemlenmiştir.

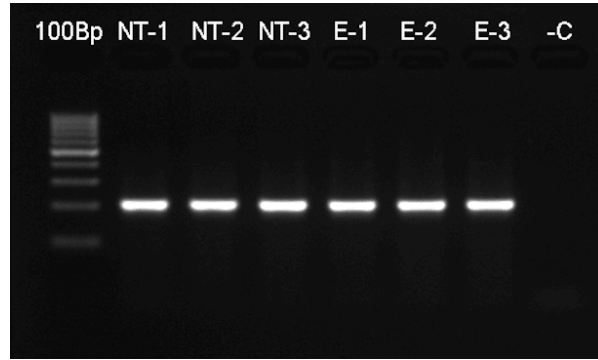
Şekil 35'de 25 nM ESM1-siRNA transfeksiyonunun UT-SCC-74B hücre hattı üzerinde ESM1 genini baskılama sonucu gösterilmiştir. Buna göre ESM1 geni UT-SCC-74A hücre hattında kontrole göre %62 oranında anlamlı şekilde baskılanmıştır. Ayrıca şekil 36'da ESM1, şekil 37'de de Beta Actin PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüleri verilmiştir. Görüntülere göre ESM1 ve Beta Actin genleri doğru bölgede amplifiye olmuş ve negatif kontrollerinde de herhangi bir amplifikasyon söz konusu olmamıştır.



Şekil 35. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 25 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi (* p<0.01)

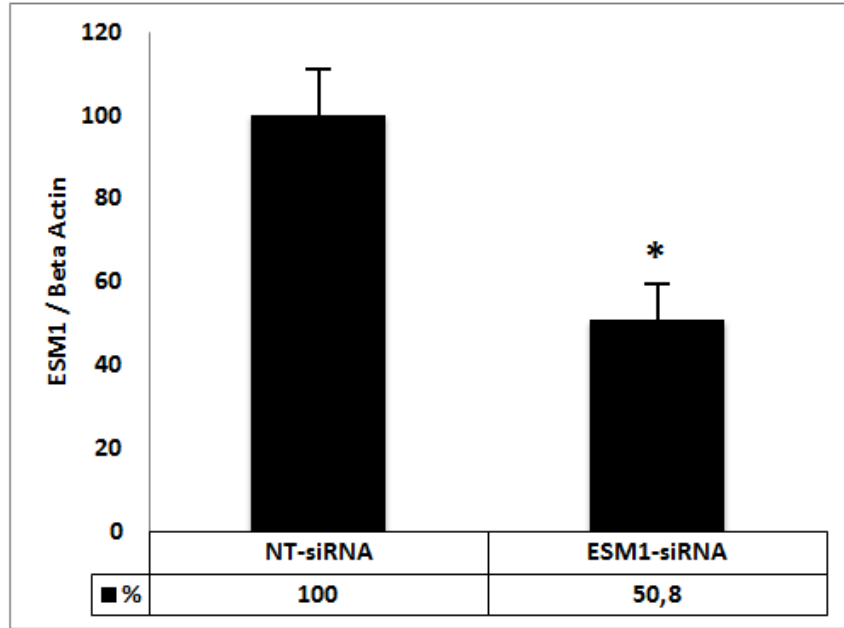


Şekil 36. ESM1 Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

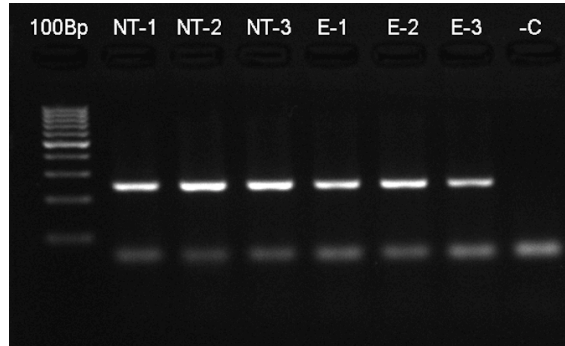


Şekil 37. Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

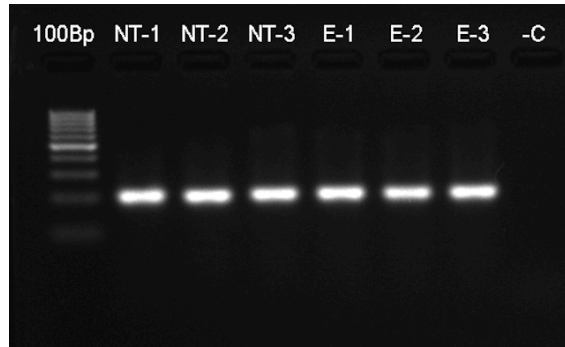
Şekil 38’de 50 nM ESM1-siRNA transfeksiyonunun UT-SCC-74B hücre hattı üzerinde ESM1 genini baskılama sonucu gösterilmiştir. Buna göre ESM1 geni UT-SCC-74A hücre hattında kontrole göre %50 oranında anlamlı şekilde baskılanmıştır. Ayrıca şekil 39’da ESM1, şekil 40’da da Beta Actin PCR ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüleri verilmiştir. Görüntülere göre ESM1 ve Beta Actin genleri doğru bölgede amplifiye olmuş ve negatif kontrollerinde de herhangi bir amplifikasyon söz konusu olmamıştır.



Şekil 38. UT-SCC-74B Hücreleri Üzerinde 50 nM ESM1-siRNA Etkinliğinin Kantitatif Real Time PCR ile Gösterimi (* p<0.05)



Şekil 39. ESM1 Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

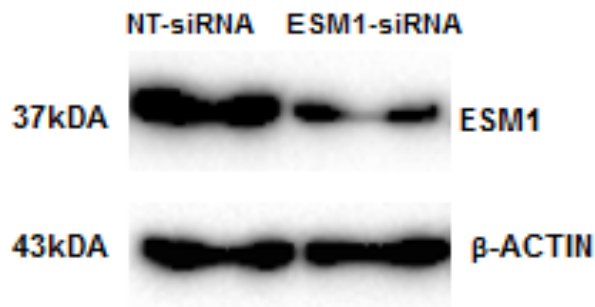


Şekil 40. Beta Actin Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

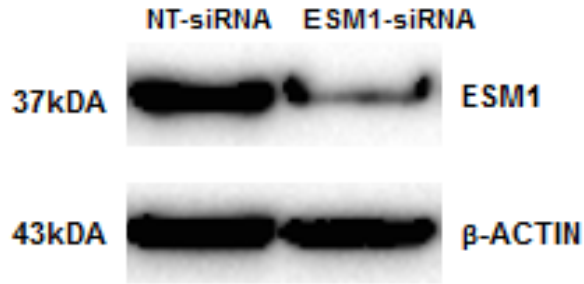
4.7. Western Blot ile ESM1 Geninin Protein Düzeyinde Baskılama Düzeylerinin Gösterilmesi

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarında ESM1 geninin protein seviyesinde baskılanması Western Blot analizleri ile gösterilmiştir. Kullanılan siRNA'nın hücrelerde hedef geni protein düzeyinde bloke etmesi ileri moleküler analizler için önemlidir. Bunun için hücrelere ESM1-siRNA ve Non-Targeting-siRNA transfekte edilmiş, transfeksiyondan 72 saat sonra protein izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen proteinler SDS-PAGE yöntemiyle blotlanmış ve protein ekspresyonları gösterilmiştir.

Western blot analizlerinde ESM1 geninin ekspresyonunu gözlemlemek için anti-ESM1 antikoruna, normalizasyon için ise Beta Actin antikoruna kullanılmıştır. UT-SCC-74A için şekil 41'de ESM1 ve Beta Actin'in protein ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. Bu sonuca göre; ESM1 geninin bu hücre hattında kontrole göre baskılandığı gözlemlenmiştir. Aynı şekilde UT-SCC-74B için de şekil 42'de ESM1 ve Beta Actin'in protein ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. 74A'da olduğu gibi bu hücre hattında da ESM1 kontrole göre protein seviyesinde baskılanmıştır.



Şekil 41. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1-siRNA Etkinliğinin Western Blot ile Gösterimi



Şekil 42. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1-siRNA Etkinliğinin Western Blot ile Gösterimi

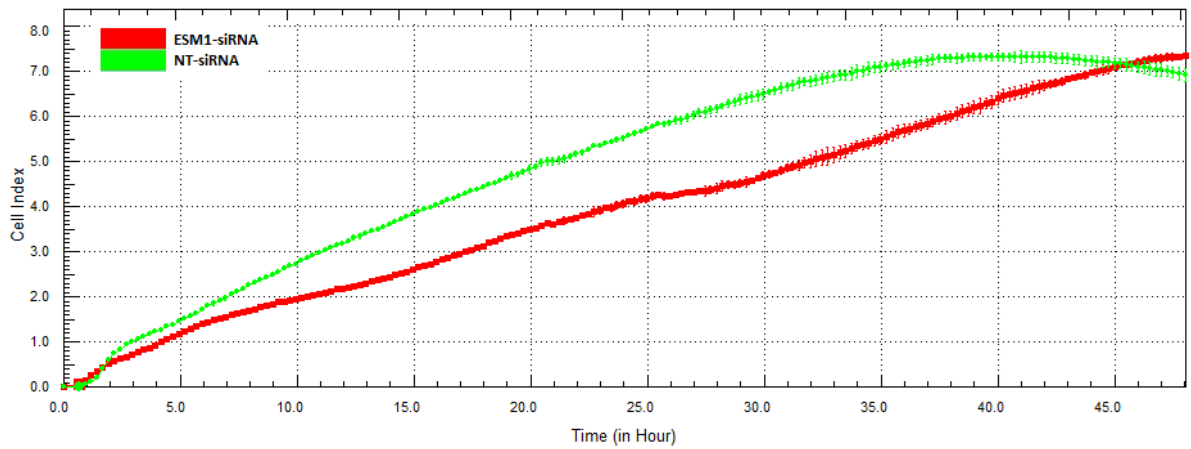
4.8. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyon Analizleri

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarının proliferasyonu üzerine ESM1 geninin etkilerini gözlemlemek amacıyla xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılmıştır. xCELLigence serisinin RTCA-DP modelinin kullanıldığı çalışmada, hücrelere 25 nM ESM1-siRNA ve Non-Targeting-siRNA transfekte edilmiş, transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler sisteme ait özel E Plate-16'lara aktarılarak analiz başlatılmıştır. Analizlerde her grup 6'lı şekilde yapılmış, grafik sunumunda 6 kuyucuğun ortalamaları alınarak aktarılmış ve error barları her 15 dk için sistem tarafından otomatik olarak eklenmiştir. 48 saat boyunca 15 dk'da bir alınan ölçümler Cell Index değeri olarak kaydedilmiş, sonuç değerlendirme ve istatistik analizleri de bu değerlere göre yapılmıştır.

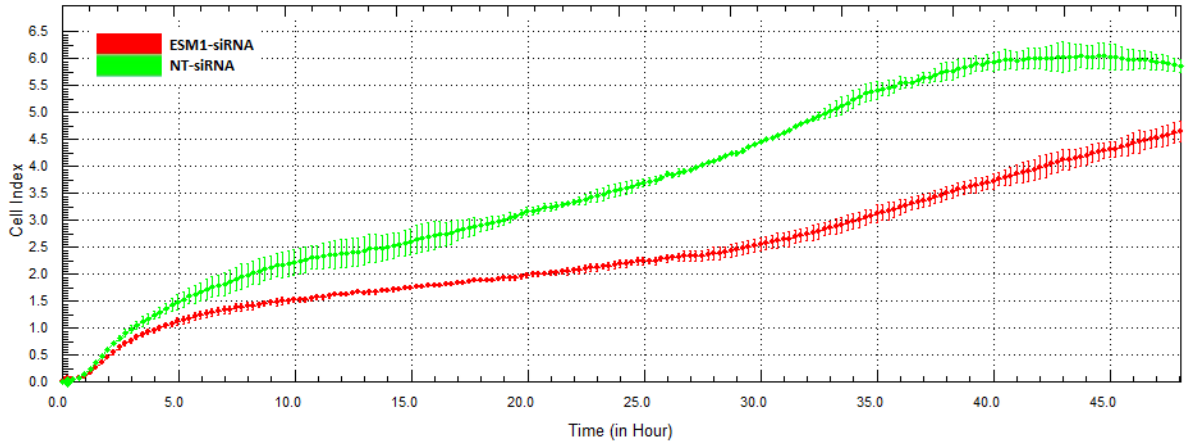
UT-SCC-74A baş boyun kanseri hücreleri üzerinde 48 saat süren deneyde iki grup arasındaki fark gerçek zamanlı olarak gözlemlenmiştir. Şekil 43'de görüldüğü gibi hücre ekiminden 3 saat sonra iki grup arasında fark oluşmaya başlamış, 24 ve 36. saatlerde istatistiki olarak anlamlı bir şekilde farklılık oluşmuştur. ESM1 geninin baskılandığı hücreler, baskılanmadığı gruba göre daha az çoğalmıştır. Sonuç olarak

ESM1'in anlamlı bir şekilde ekprese olmadığı baş boyun kanseri hücrelerinde büyüme yavaşlamıştır.

UT-SCC-74B metastaz formunda da 48 saat süren deneyde iki grup arasındaki fark gerçek zamanlı olarak gözlemlenmiştir. Şekil 44'de görüldüğü gibi hücrelerin ekiminden 4 saat sonra fark oluşmaya başlamış ve 24, 36 ve 48. Saatler de de istatistiki olarak anlamlı bir farklılık oluşmuştur. ESM1 geninin baskılandığı metastatik hücreler, baskılanmadığı gruba göre daha az çoğalmıştır. Kanser sürecinde tedavinin en zorlayıcı kısımlarından olan metastaz düşünüldüğünde, moleküler bir yaklaşımla ESM1 geninin metastaz kabiliyetine sahip baş boyun kanseri hücreleri üzerindeki baskılayıcı etkisinin gözlemlenmesi alternatif ve destekleyici genetik tedaviler açısından önemlidir.



Şekil 43. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin xCELLigence Sistemi ile Gösterimi



Şekil 44. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin xCELLigence Sistemi ile Gösterimi

4.9. XTT Testi ile Hücre Proliferasyon Analizleri

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarının proliferasyonu üzerine ESM1 geninin etkilerini gözlemlemek amacıyla ve de xCELLigence ile yapılan proliferasyon sonuçlarını valide etmek için XTT analizi yapılmıştır.

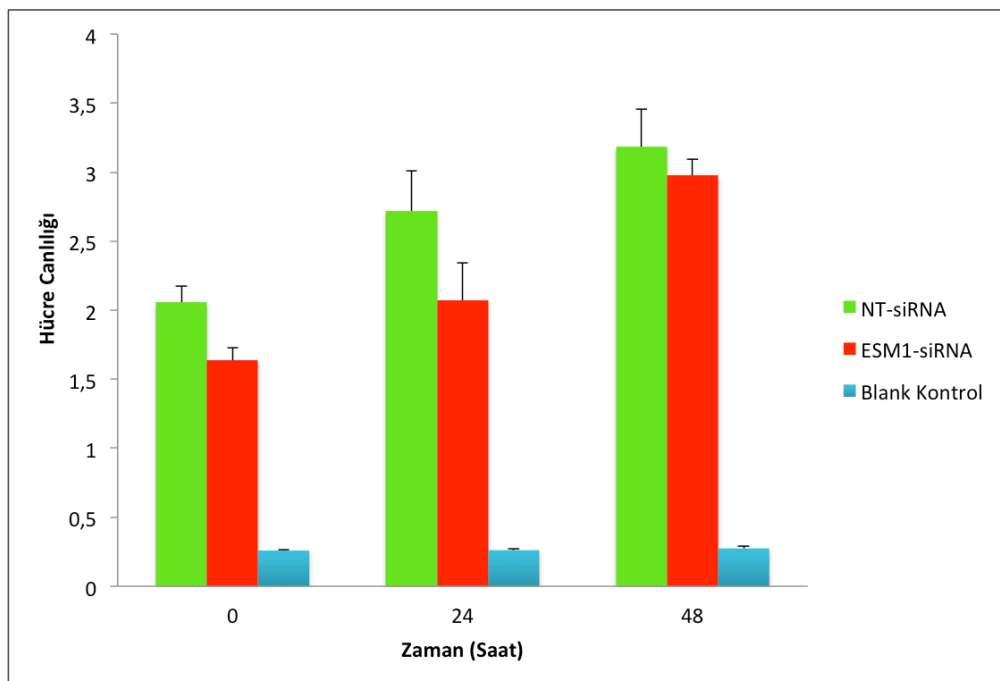
Bunun için hücelere 25 nM ESM1-siRNA ve Non-Targeting-siRNA transfekte edilmiş, transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler 96'lık well platalere aktarılarak analiz başlatılmıştır. Analizlerde her grup 6'lı şekilde yapılmış, grafik sunumuna 6 kuyucuğun ortalamaları alınarak aktarılmış ve error barları grafiklere eklenmiştir. Hücre ekiminden sonra 0, 24 ve 48. Saatler için 3 ayrı well plate ile ölçümler yapılmıştır. Sonuç ve istatistik analizleri de bu değerler ile hesaplanmıştır.

UT-SCC-74A baş boyun kanseri hücreleri üzerinde 48 saat süren deneyde iki grup arasındaki fark XTT değerleri baz alınarak gözlemlenmiştir. Şekil 45'de görüldüğü gibi hücre ekiminden 24 saat sonra (0) iki grup arasında fark oluşmaya başlamış, 24 ve 48. saatlerde istatistiki olarak anlamlı bir şekilde farklılık oluşmuştur. ESM1 geninin baskılandığı hücreler, baskılanmadığı gruba göre daha az

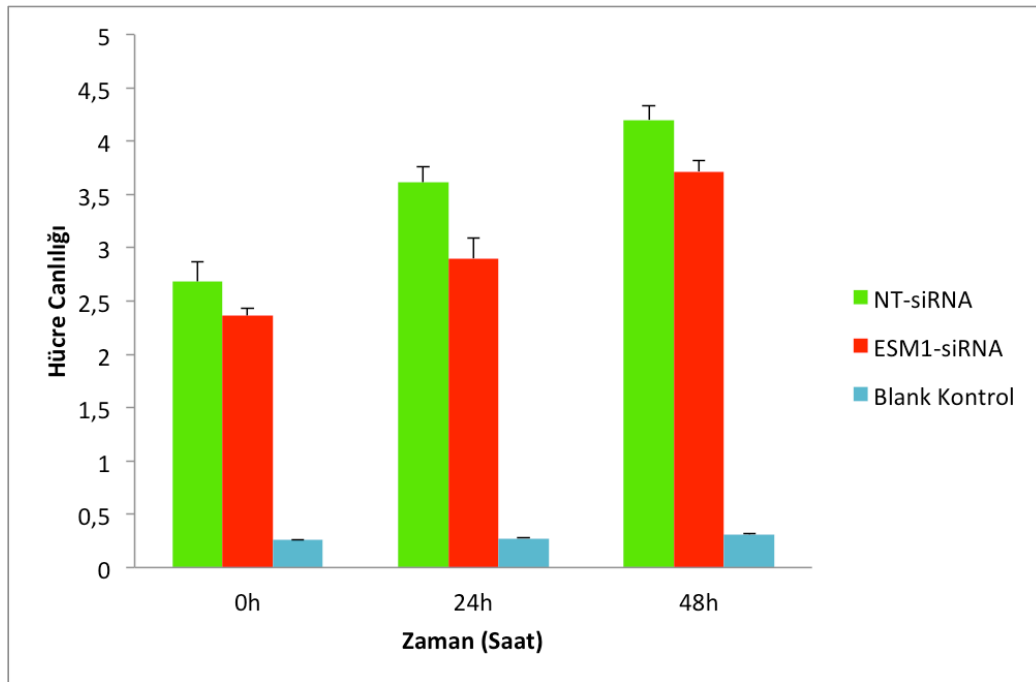
çoğalmıştır. Sonuç olarak ESM1'in anlamlı bir şekilde ekprese olmadığı baş boyun kanseri hücrelerinde büyüme yavaşlamıştır.

UT-SCC-74B metastaz formunda da 48 saat süren deneyde iki grup arasındaki fark XTT değerleri baz alınarak gözlemlenmiştir. Şekil 46'da görüldüğü gibi hücrelerin ekiminden 24 saat sonra (0) fark oluşmaya başlamış ve 24 ve 48. saatler de de istatistiki olarak anlamlı bir farklılık oluşmuştur. ESM1 geninin baskılandığı metastatik hücreler, baskılanmadığı gruba göre daha az çoğalmıştır.

Sonuç olarak XTT analiz sonuçları xCELLigence analiz sonuçları ile uyumlu çıkmış ve sonuçlar birbirini valide etmiştir.



Şekil 45. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin XTT Testi ile Gösterimi



Şekil 46. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin XTT Testi ile Gösterimi

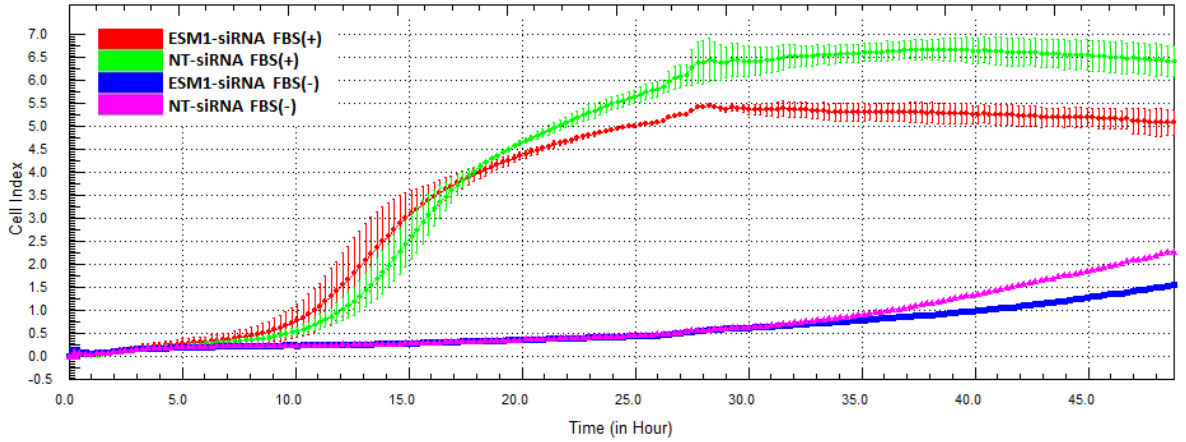
4.10. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Migrasyon Analizleri

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarının migrasyonu üzerine ESM1 geninin etkilerini gözlemlemek amacıyla xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılmıştır. Migrasyon analizleri için de xCELLigence serisinin RTCA-DP modeli kullanılmıştır. 25 nM ESM1-siRNA ve Non-Targeting-siRNA hücrelere transfekte edilmiş, transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler migrasyon çalışmaları için özel CIM Plate-16'lara aktarılmıştır. Chemoattractant olarak %10 FBS içeren medium kullanılan çalışmada cihaz her 15 dk'da bir ölçüm alacak şekilde 48 saate ayarlanmıştır. Hücrelerin göç hareketlerini elektronik impedans ile ölçen cihaz iki grup arası farklılığı eş zamanlı olarak göstermiştir. Negatif kontroller için ise chemoattractant olarak FBS içermeyen medium kullanılmıştır. Analizlerde her grup 3'lü şekilde yapılmış, grafik sunumunda 3 kuyucuğun ortalamaları alınarak

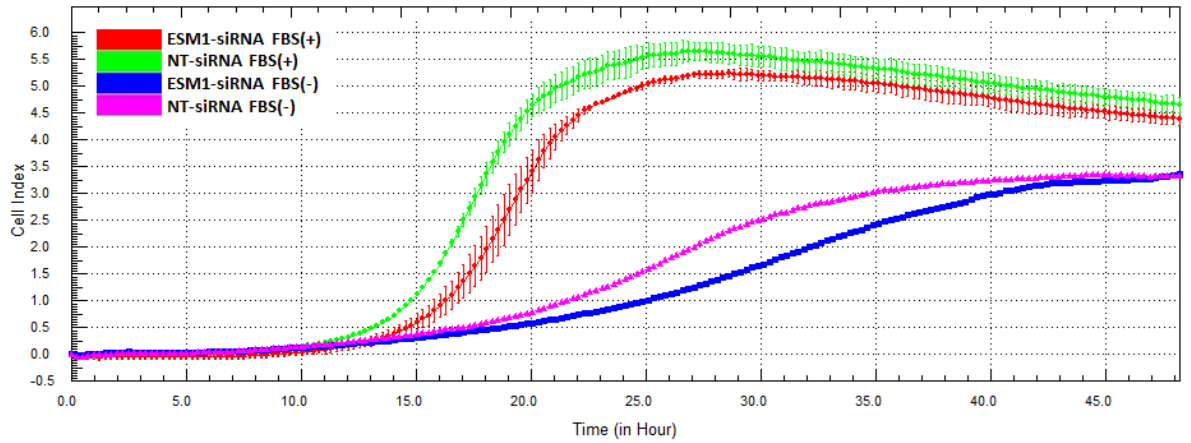
aktarılmış ve error barları her 15 dk için sistem tarafından otomatik olarak eklenmiştir.

UT-SCC-74A baş boyun kanseri hücreleri için şekil 47’de de görüldüğü gibi hücreler cihaza aktarıldıktan 20 saat sonra ESM1-siRNA transfekte edilen hücreler ile kontrol grubu arasında fark oluşmaya başlamış ve bu fark 48. Saate kadar sürmüştür. Aradaki farkın istatistiki değerlendirmesinde de 24, 36 ve 48. saatlerde oluşan fark anlamlı çıkmıştır ($p<0.05$). Sonuç olarak ESM1 geninin baskılanması durumunda baş boyun kanseri hücrelerinin migrasyon yetenekleri azalmıştır. FBS (-) kontrollerde hücre göçü 35. Saate kadar neredeyse hiç olmamış, 35. Saatten sonra hücrelerin çoğalması sebebiyle az bir miktar artmıştır.

UT-SCC-74B metastaz formunda ise şekil 48’de de görüldüğü gibi hücreler cihaza aktarıldıktan 10 saat sonra ESM1-siRNA transfekte edilmiş hücreler ile kontrol grubu arasında bir miktar fark oluşmuş, bu fark 28. Saatten sonra kapanmıştır. 10 ile 28. Saatler arasında bir fark oluşsa da bu fark istatistiki olarak anlamlı çıkmamıştır ($p>0.05$). FBS(-) kontrollerde de UT-SCC-74A’ya nazaran migrasyon değerleri daha yüksek çıkmıştır. Bu da UT-SCC-74B hücrelerinin yüksek metastatik kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. 74A hücrelerine göre daha agresif olan 74B hücreleri chemoattractanta daha hızlı ve çok göç etmişlerdir. Sonuç olarak ESM1 geninin ekspresyonunun anlamlı şekilde baskılandığı baş boyun kanserine ait metastatik hücrelerde ESM1-siRNA transfeksiyonu yapılan hücreler kontrole göre bir miktar daha az göç etmiştir. Bu etki hücrelerin metastatik kabiliyetinden dolayı belli bir süre sonra azalmıştır.



Şekil 47. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Migrasyonuna Olan Etkisi



Şekil 48. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Hücre Migrasyonuna Olan Etkisi

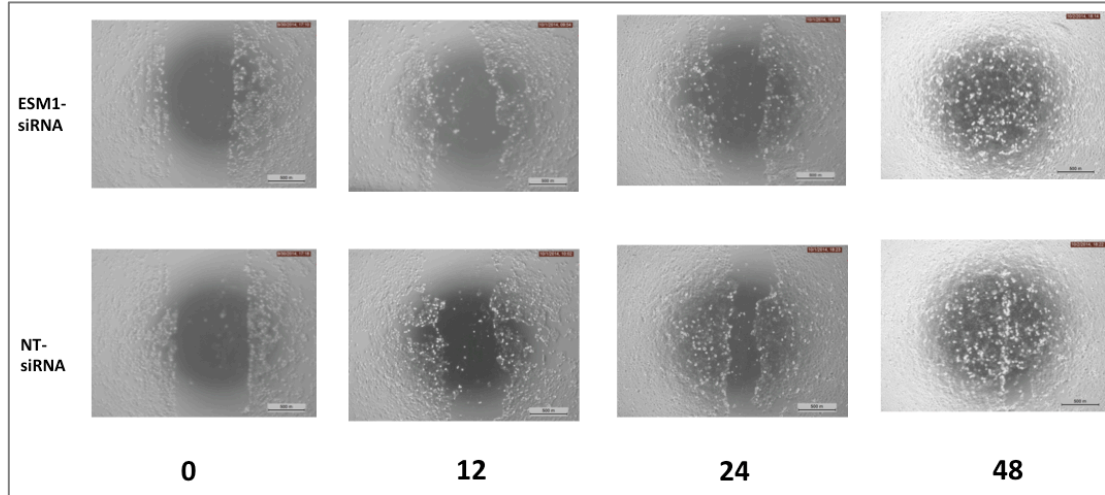
4.11. In Vitro Scratch Assay ile Hücre Migrasyon Analizleri

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarının migrasyonu üzerine ESM1 geninin etkilerini gözlemlemek amacıyla ve aynı zamanda xCELLigence migrasyon analiz sonuçlarını valide etmek için in vitro scratch assay yapılmıştır.

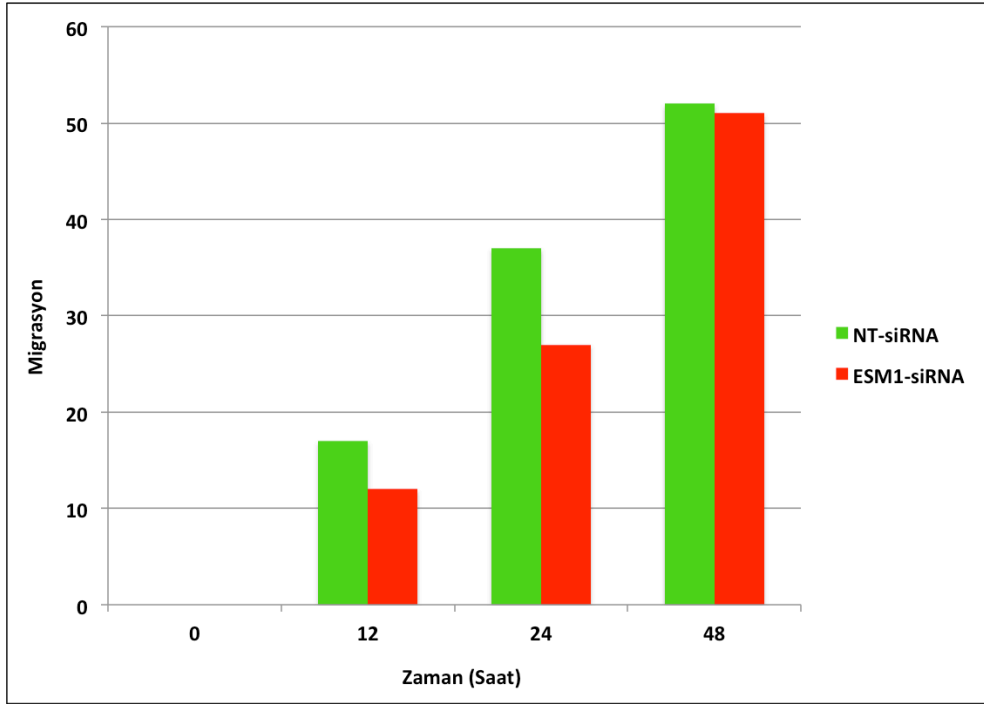
UT-SCC-74A baş boyun kanseri hücreleri için şekil 49'da da görüldüğü gibi hücreler üzerinde çizik oluşturulduktan sonra ESM1-siRNA transfekte edilen hücreler ile kontrol grubu arasında fark oluşmaya başlamış ve bu fark 48. Saate kadar sürmüştür. Sonuç olarak ESM1 geninin baskılanması durumunda baş boyun kanseri hücrelerinin migrasyon yetenekleri azalmıştır.

UT-SCC-74B metastaz formunda da için şekil 50'de de görüldüğü gibi hücreler üzerinde çizik oluşturulduktan sonra ESM1-siRNA transfekte edilen hücreler ile kontrol grubu arasında fark oluşmaya başlamış ve bu fark 48. Saate kadar sürmüştür. 74B grubunda kapanma hızı 74A grubuna göre daha hızlı ve fazla olmuştur.

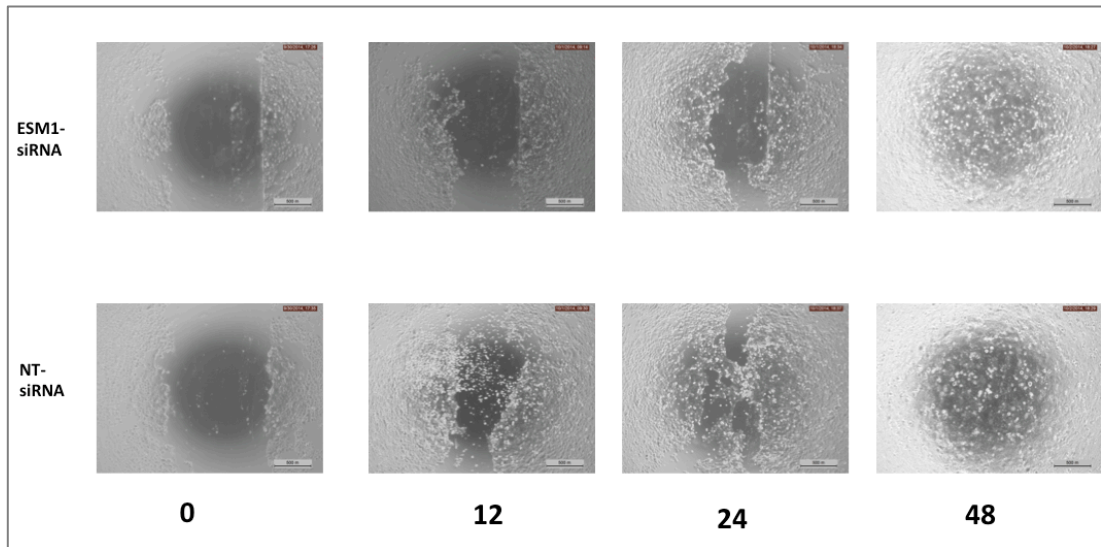
Sonuç olarak Scratch Assay analiz sonuçları xCELLigence analiz sonuçları ile uyumlu çıkmış ve sonuçları birbirini valide etmiştir.



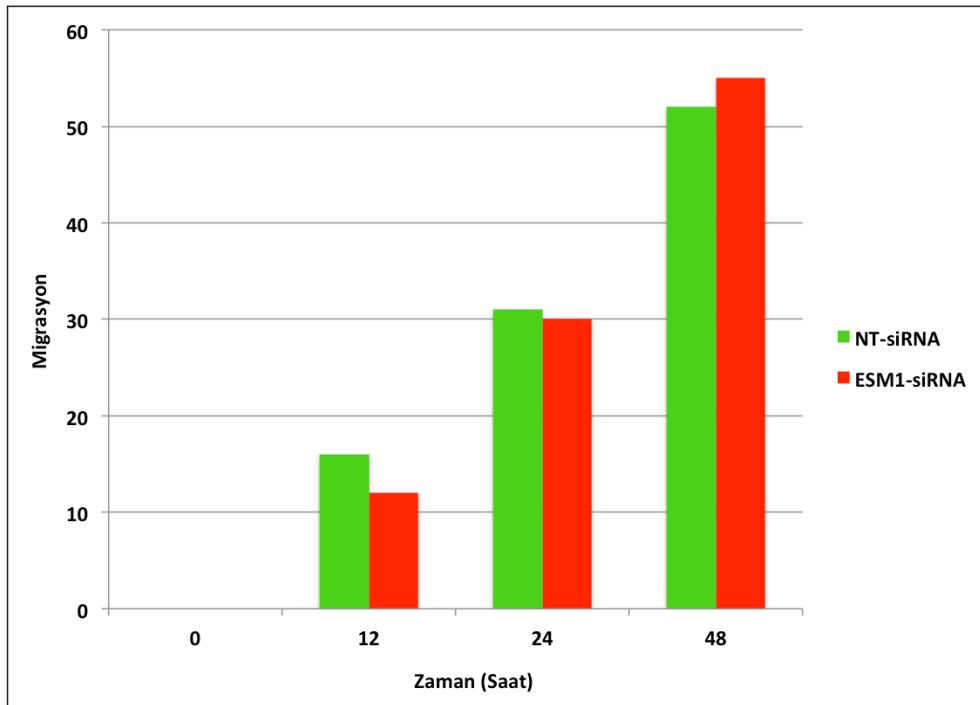
Şekil 49. UT-SCC-74A Hücreleri ile Yapılan In Vitro Scratch Assay 0, 12, 24 ve 48. Saatlerdeki Mikroskop Görüntüleri



Şekil 50. UT-SCC-74A Hücreleri ile Yapılan In Vitro Scratch Assay Mikroskop Görüntülerinin Image J Analiz Sonuçları



Şekil 51. UT-SCC-74B Hücreleri ile Yapılan In Vitro Scratch 0, 12, 24 ve 48. Saatlerdeki Assay Mikroskop Görüntüleri



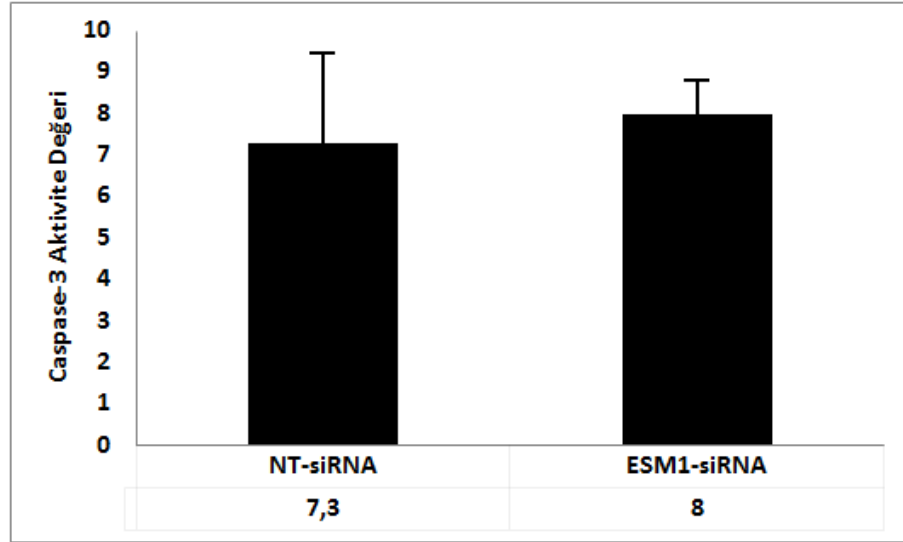
Şekil 52. UT-SCC-74B Hücreleri ile Yapılan In Vitro Scratch Assay Mikroskop Görüntülerinin Image J Analiz Sonuçları

4.12. Kaspaz 3 Aktivite Analizi

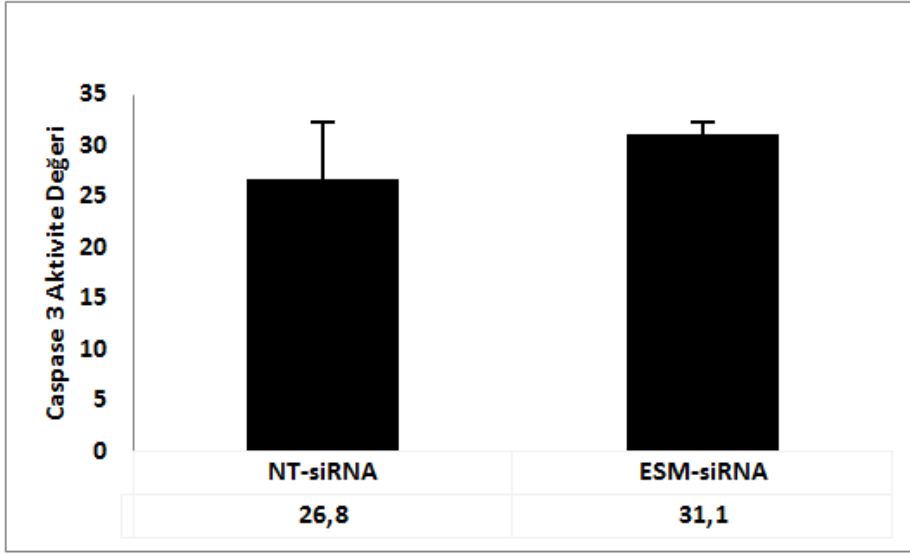
UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücrelerinde siRNA uygulaması ardından hücrelerdeki kaspaz 3 aktivitesi ticari bir kit kullanılarak ölçülmüştür. 25 nM ESM1-siRNA ve Non-Targeting-siRNA hücelere transfekte edilmiş ve transfeksiyondan 48 saat sonra kaspaz 3 aktivite analizlerine başlanmıştır.

ESM1 geninin hücrelerde baskılanması sonrası proliferasyondan gözlenen farklılıkta apoptozun en önde gelen markerlarından kaspaz 3'ün rolünün olup olmadığı araştırılmış ve sonuç olarak hem UT-SCC-74A hem de UT-SCC-74B hücrelerinde kaspaz 3 aktivitesi ESM1-siRNA uygulanmış hücrelerde kontrole göre değişmemiştir. Sonuç olarak hücrelerde proliferasyonda oluşan farklılık açısından programlı bir ölüm olmadığı söylenebilir. Aynı zamanda bu analiz sonucuyla hücrelerde herhangi bir toksisite sonucu apoptoz kaynaklı ölüm meydana gelmediği de görülmüştür.

Şekil 51’de UT-SCC-74A hücrelerine ait kaspaz 3 aktivite analiz sonuçları şekil 52’de de UT-SCC-74B hücrelerine ait kaspaz 3 aktivite analiz sonuçları görülmektedir. Yukarıda bahsedildiği gibi gruplar içinde istatistiki olarak bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücreleri kıyaslandığında UT-SCC-74B hücrelerinin caspase-3 aktivite değerleri UT-SCC-74A’ya göre yaklaşık olarak 3 kat yüksek çıkmıştır.



Şekil 53. UT-SCC-74A Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisinin Gösterimi ($p>0.05$)



Şekil 54. UT-SCC-74B Hücre Hattında ESM1-siRNA Uygulamasının Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkisinin Gösterimi ($p>0.05$)

5. TARTIŞMA

Baş boyun kanserleri dünya genelinde insidansı yüksek olan ve tedavisi zor kanserlerdir. Tedavinin zorluğundaki en önemli faktör tanının erken konulamamasıdır. Aynı zamanda baş boyun kanserlerinde tümörlerin agresif oluşumu ve metastaz yapma kabiliyeti de sağ kalım oranlarını oldukça düşürmektedir. Tıp ve teknoloji alanındaki gelişmeler tedavi standartlarını yükseltse de baş boyun kanserlerinin sebep olduğu ölümlerde son on yılda gözle görülebilir bir değişim olmamıştır. Baş boyun kanserlerinde önde gelen tedavi şekli cerrahidir. Cerrahi tedavi yöntemlerinin etki faktörü her ne kadar yüksek olsa da bir takım dezavantajları da mevcuttur. Bunlar arasında ilk olarak cerrahi müdahale sonrası hastanın organ veya doku kaybı yaşamasıdır. Bununla birlikte özellikle baş boyun kanserlerinde hastaların cerrahi sonrası hayat standartlarında ciddi bozukluklar olabilmektedir. Yutma ve konuşma gibi günlük aktiviteleri yerine getiren bölgelerde oluşan deformasyonlar hastalar için önemli sorunlar doğurmaktadır. Baş boyun kanserlerinde tedavinin agresif yönünü azaltmanın en önemli yolu erken tanıdır. Aynı zamanda tanı sonrası hem cerrahi tedavileri destekleyici hem de hastaların yaşam standartlarını artırıcı yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Son 15 yılda tıbbi biyolojik bilimlerdeki yükseliş moleküler tıpta yeni gelişmelere sebep olmuştur. İnsan genomuyla ilgili bilgimizin artmasıyla kanser üzerinde de moleküler çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle kanserlerde erken tanıyı sağlayacak biomarkerların geliştirilmesi ve bu biomarkerların klinikte kullanımı baş boyun kanseri de dahil birçok kanser türünde etkili tedavi yöntemlerini doğurmaya devam etmektedir.

Genlerin hastalıklardaki fonksiyonlarının ortaya çıkarılması moleküler tedavi yöntemleri için önemli bir basamaktır. Bu fonksiyonların ortaya çıkarılmasında da moleküler biyoloji, biyokimya ve biyoteknoloji gibi alanlarda çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışma alanlarından biri de 2000’li yıllara damga vuran RNA Interference teknolojisi olmuştur. Genlerin in vitro ortamda mRNA düzeyinde işlevlerini baskılayarak ilgili modellerdeki etkileri gözlemlenmiştir. Bu sayede genlerin organizmada etkin olduğu ve olmadığı durumlar karşılaştırılabilmektedir. İlk başlarda RNA Interference sistemine özgü çalışmalar yapılırken, bu sistemin

mekanizmasının hızla çözülmesinden bu yana, RNA Interference bugün için birçok çalışmada moleküler biyolojik bir araç olarak yerini almıştır. Bu çalışmada da RNA Interference teknolojisinin siRNA aracılığıyla gen baskılama şekli kullanılmıştır.

Çalışmamızda hedeflediğimiz gen olan ESM1, kanda serbest halde dolaşan bir proteoglikandır. Proteoglian sınıfına alındıktan sonra endocan ismi de ayrıca verilmiştir. ESM1 geni insan vücudunda birçok doku ve anatomik yapıda eksprese olmaktadır (Bkz. Şekil 8). ESM1'in bu ekspresyon yeteneği araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bugün için ESM1 ile ilgili spesifik 100'ü aşkın makale yayınlanmıştır [138]. Bu yayınlardan 52'si doğrudan kanser türleri ile ilgilidir [139]. Yapılan çalışmalar; ESM1'in tümör oluşumunda, tümör invazyonunda, metastatik süreçte ve anjiyogenezde doğrudan etkili olduğunu göstermiştir. ESM1'in kanserleşme sürecine olan katkısı farklı kanser türlerinde yapılan fonksiyonel çalışmalarla gösterilmiştir. Hepatoselüler, mide, böbrek, akciğer, nazofaringeal, kolorektal kanserlerinde ESM1'in tümör dokularındaki mRNA ve protein seviyeleri belirlenmiş, aynı zamanda hücre hatları üzerinde yapılan çeşitli ileri moleküler analizlerle karsinogenez sürecindeki rolü ortaya çıkarılmıştır [117-132]. Bildiğimiz kadarıyla şu ana kadar baş boyun kanserlerinde ESM1 geni ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamız bu konuda literatürdeki ilk araştırma olmuştur.

Bu çalışmada primer ve metastatik baş boyun kanseri hücre hatlarında ESM1 geni üzerine fonksiyonel analizler yapılmıştır. Çalışmamızın bu noktadaki inovatif yönü analizlerin sadece primer kanser hücre hatlarında değil aynı zamanda metastatik baş boyun kanseri hücre hatlarında yapılması olmuştur. Baş boyun kanserlerinde tümörün yüksek metastaz kabiliyeti ve bu metastazın geç tanısı sağ kalım açısından kritik önem taşımaktadır. ESM1 geninin metastatik formdaki hücreler üzerinde olan etkilerini de gözlemlemek bu süreçteki rolünü belirlemede önemli bir adımdır.

Çalışmamızın ilk adımında UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarında ESM1 ekspresyonunu gözlemlemeye yönelik olarak immunofloresan boyama yapılmıştır. Burada hücrelerde yüksek ESM1 ekspresyonu gözlenmiştir. Bu açıdan

çalışmamız literatürde bir ilk olmuştur. Hem immunofloresan çalışmamız hem de ileride yapılan kantitatif real time PCR ve western blot analizleri ile ESM1'in primer ve metastatik baş boyun kanseri hücre hatlarındaki mRNA ve protein ekspresyonları da gösterilmiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan UT-SCC-74A ve metastatik formu UT-SCC-74B hücrelerinin transfeksiyon etkinlikleri GAPDH siRNA-pool kullanılarak belirlenmiştir. Bilindiği üzere hücre sistemlerinde siRNA etkinlikleri birçok faktöre bağlıdır. Hücrelerin transfeksiyon kabiliyeti, kullanılan transfeksiyon ajanı, kullanılan hücrelerin pasaj durumu, deney esnasında bulunulan şartlar ve deneyi gerçekleştiren araştırmacının kabiliyeti bunlar arasında yer almaktadır. Uygulanan GAPDH siRNA-pool'un hücreler üzerindeki etkileri kantitatif real time PCR ve western blot analizleriyle gösterilmiştir. Sonuçlara göre UT-SCC-74A için %87, UT-SCC-74B için %62 oranında baskılama gerçekleşmiştir. Değerlere bakıldığında multifaktöriyel bir süreçten geçen siRNA transfeksiyon işlemlerinde; hücre hatları üzerinde; bir gen için baskılama düzeyi beklenenin üzerinde olmuştur. Akabinde ESM1 geni için spesifik siRNA-pool'lar hücrelere transfekte edilmiştir. ESM1 siRNA etkisi yine kantitatif real time PCR ve western blot ile gösterilmiştir. Sonuç olarak UT-SCC-74A için %70, UT-SCC-74B için %62 oranında baskılama meydana gelmiştir. Hücreler üzerinde fonksiyonel analizler yapabilmek için %30 gibi baskılama oranları yeterli kabul edildiğinde; çalışmamızda ortaya çıkan oranlar gayet başarılı olmuştur.

Hücre proliferasyon ve migrasyon analizleri kanserde hücrelerin büyüme, çoğalma, yayılma gibi karakterlerini tespit etmede yaygın olarak kullanılan parametrelerdir. Çalışmamızda da baş boyun kanseri hücre hatlarında ESM1 geninin ekspresyonu baskılandıktan sonra proliferasyon ve migrasyon analizleri yapılmıştır.

Proliferasyon analizleri için xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılmıştır. Yukarıda da bahsedildiği üzere siRNA transfeksiyon işlemleri son derece hassas bir süreçtir. xCELLigence sisteminin avantajı ise hücrelere ek hiçbir işaretleme yapmadan proliferasyon analizi yapmasıdır. Aynı zamanda bu

analizleri gerçek zamanlı olarak eş güdümlü çalıştığı bilgisayar ekranına yansıtması da ayrı bir artıdır. Çalışmamız kapsamında ESM1 siRNA ile ESM1 geninin baskılandığı hücreler xCELLigence sistemine aktarılmış ve hücrelerin büyümeleri gözlemlenmiştir. Sonuçlara göre hem UT-SCC-74A hem de UT-SCC-74B hücrelerinde ESM1 ekspresyonunun baskılanması kanser hücrelerinin büyümesini de baskılamıştır. Bildiğimiz kadarıyla; şu ana değin yayınlanan çalışmalarda yapılan proliferasyon analizleri hücrelere ek işaretleme gerektiren testler ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın bu noktadaki inovatif yönü; ESM1 geni ile ilgili yapılan hücre proliferasyon analizlerinin literatürde ilk defa xCELLigence sistemi ile yapılmış olmasıdır. Çalışmamız hücre proliferasyon analizleri kapsamında, xCELLigence analiz sonuçlarını valide etmek için aynı zamanda XTT analizleri de yapılmıştır. Burada da xCELLigence sonuçlarına benzer şekilde ESM1 siRNA uygulanmış hücre grubunun çoğalması kontrole göre daha az miktarda olmuştur.

Migrasyon analizleri için ise yine xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılmıştır. Migrasyon analizlerinin proliferasyon analizlerinden farkı sistemde kullanılan plate türüdür. Bu noktada yine ESM1-siRNA transfekte edilen hücreler sisteme aktarılmış ve chemoattractant olarak kullanılan FBS'e olan hareketleri eş zamanlı olarak gözlemlenmiştir. Proliferasyon analizlerinde olduğu gibi migrasyon analizlerinde de hücrelere hiçbir ek muamele yapmadan ve hücrelerin karakterini etkilemeden siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu noktanın önemi ise hem herhangi bir agar vb. madde kullanmama, hem de göç eden hücrelerin kantitatif olarak ölçümünü elde etmektir. Sonuçlara göre; ESM1-siRNA uygulanmış hücrelerde, hücre göçü anlamlı şekilde baskılanmıştır. Göç süreci eş zamanlı olarak görüntülenmiş, UT-SCC-74B hücre hattında hücrelerin metastatik karakterinden dolayı daha yoğun bir hareket yaşanmıştır. UT-SCC-74A hücre hattında istatistiki olarak anlamlı bir fark oluşurken, UT-SCC-74B hattında oluşmamıştır. Fakat analiz sonucu incelendiğinde UT-SCC-74B hücrelerinde de az da olsa bir fark oluşmuştur. Çalışmamızın bu noktada ortaya koyduğu sonuç, metastatik baş boyun kanseri hücrelerinin hücre göçünde çok agresif bir hareket göstermesi olmuştur. xCELLigence migrasyon analizlerini valide etmek için ayrıca in vitro scratch assay çalışması yapılmıştır. ESM1-siRNA transfeksiyonu yapılmış hücreler üzerinde

boyuna çizikler oluşturularak hücrelerin bu çizikleri kapatma süreleri ve miktarları ile hesaplamalar yapılmıştır. Basit ve ucuz bir yöntem olan scratch assay sonuçlarına göre de hem UT-SCC-74A hem de UT-SCC-74B hücrelerinde ESM1-siRNA transfekte edilen grupların göç yeteneğinde azalma meydana gelmiştir. Hücre migrasyonu embriyonun gelişiminden başlayan ve çok hücreli canlılarda ölüme kadar süren, normal fizyolojide olduğu kadar patolojide de etkili bir faktördür. Yara iyileşmesinde fibroblastların ve endotelial hücrelerin göçü önemlidir. Metastazda da; tümör hücrelerinin farklı bölgelere göç ederek yeni tümör alanları oluşturması bakımından kritik bir mekanizmadır [140]. Çalışmamız migrasyon analiz sonuçlarına göre de ESM1 geninin baskılanması baş boyun kanseri hücre hatlarında hem kanserli hem de metastazlı hücrelerin göç yeteneğinde azaltma meydana getirmiştir. Baş boyun kanseri gibi kontrolü zor, metastaz yeteneği kuvvetli bir kanser türü için ESM1 geninin bu noktadaki etkisi ortaya çıkarılmıştır.

Hücrelerde belirli genlerin ekspresyonlarını baskılamak suretiyle yapılan analizlerde, proliferasyon gibi süreçlerde görülen farkların, herhangi bir hücre ölümü ile meydana gelmemesi gerekmektedir. Hücrenin proliferasyonunun azalması, ölmesiyle değil çoğalmasının yani bölünme hızının azalmasıyla gerçekleştiği takdirde daha değerli olmaktadır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen biyokimyasal değişikliklerde kaspaz grubu önemli rol oynamaktadır. Çalışmamız kapsamında da ESM1-siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve etkinliğin maksimum düzeye çıktığı zaman diliminde kaspaz 3 aktivite analizi yapılmıştır. Sonuçlara göre hem UT-SCC-74A, hem de UT-SCC-74B hücrelerinde ESM1-siRNA ve NT-siRNA grupları arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır. Buradan ESM1'in hücre proliferasyonu üzerindeki etkinin programlı bir hücre ölümü yolundan gerçekleşmediği sonucu çıkmaktadır.

Sonuç olarak; çalışmamız kapsamında ESM1 geninin baş boyun kanseri hücrelerinde ve aynı zamanda bu kanserin metastatik prosesi olan hücreler üzerindeki etkisi ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar ortaya konulurken xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılmış ve etkiler eş zamanlı olarak gözlemlenmiştir. Çalışmamız sonuçları ESM1 geninin baş boyun kanserlerinde

hücrelerin proliferasyon ve migrasyon kinetiklerine olan pozitif etkisini göstermiş, bu hücrelerde ESM1 geni baskılandığında değerlerde azalma meydana gelmiştir. Çalışmamız sonuçlarının 3 şekilde bilim dünyasına ve insan sağlığına ciddi katkılar sağladığını düşünüyoruz. Bunlardan biri ESM1 geninin ileride baş boyun kanser tanısı almış her hastada ekspresyon değerlerine bakılarak tümör davranışının tahmin edilmesi ve buna bağlı muhtemel prognostik bir moleküler marker olarak kullanılmasına yönelik ilk veriler ortaya konulmuştur. Bir diğer önemli faydası da mevcut tedavilerden az yarar gören ve çok agresif cerrahi tedavileri gerektiren baş boyun kanserlerinde ESM1 genini kullanarak gen tedavisinin yolunu açacak olmasıdır. Son olarak da çalışmamız bilim dünyasında bir ilk olduğundan bundan sonraki ESM1 geni ile baş boyun kanseri ilişkili çalışmalar için temel bir zemin oluşturmuştur.

Bundan sonraki aşamada bu değişimlerin hücrelerde hangi yollar aracılığı ile gerçekleştiği ve değişim mekanizmalarını açıklayan analizlere ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- [1] Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1(2), 1.
- [2] Kardinal, C. G., & Yarbrow, J. W. (1979, January). A conceptual history of cancer. In *Seminars in oncology* (Vol. 6, No. 4, pp. 396-408). Elsevier.
- [3] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... & Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1. 0. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase, (11).
- [4] Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(1), 5-29.
- [5] Gultekin, M., & Boztas, G. (2014). Türkiye Kanser İstatistikleri.
- [6] Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., Ezzati, M., & Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*, 366(9499), 1784-1793.
- [7] Hayat, M. J., Howlader, N., Reichman, M. E., & Edwards, B. K. (2007). Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *The oncologist*, 12(1), 20-37.
- [8] Schottenfeld, D., & Fraumeni Jr, J. F. (1982). *Cancer epidemiology and prevention*. Eastbourne, UK; WB Saunders Co.
- [9] Peto, J. (2001). Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 411(6835), 390-395.
- [10] Miller, A. B., Hoogstraten, B., Staquet, M., & Winkler, A. (1981). Reporting results of cancer treatment. *cancer*, 47(1), 207-214.
- [11] World Health Organization. (1979). *WHO handbook for reporting results of cancer treatment*.
- [12] Kawasaki, E. S., & Player, A. (2005). Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1(2), 101-109.
- [13] Gilbert, C. A., & Ross, A. H. (2009). Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *Journal of cellular biochemistry*, 108(5), 1031-1038.

- [14] Ross, J. S., Schenkein, D. P., Pietrusko, R., Rolfe, M., Linette, G. P., Stec, J., ... & Hortobagyi, G. N. (2004). Targeted therapies for cancer 2004. *American journal of clinical pathology*, 122(4), 598-609.
- [15] Reed, J. C. (2003). Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer cell*, 3(1), 17-22.
- [16] Zeppetella, G., & Ribeiro, M. D. (2003). Pharmacotherapy of cancer-related episodic pain. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 4(4), 493-502.
- [17] Mercadante, S. (2012). Pharmacotherapy for breakthrough cancer pain. *Drugs*, 72(2), 181-190.
- [18] Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., ... & Lander, E. S. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286(5439), 531-537.
- [19] Cognetti, D. M., Weber, R. S., & Lai, S. Y. (2008). Head and neck cancer. *Cancer*, 113(S7), 1911-1932.
- [20] Olshan, A. F. (Ed.). (2010). *Epidemiology, pathogenesis, and prevention of Head and Neck Cancer*. New York: Springer.
- [21] Koch, W. M., & Nance, M. (2010). Classification, Clinical Features, and Molecular Genetic Models. In *Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Head and Neck Cancer* (pp. 1-21). Springer New York.
- [22] Szyfter, K., Szymeja, Z., Szyfter, W., Hemminki, K., Banaszewski, J., Jaskuła-Sztul, R., & Louhelainen, J. (1999). Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 445(2), 259-274.
- [23] Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55(2), 74-108.
- [24] Sturgis E. M. (2013) *International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium Head Neck No. 11*
- [25] Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., & Thun, M. J. (2007). Cancer statistics, 2007. *CA: a cancer journal for clinicians*, 57(1), 43-66.
- [26] Ries, L. A. G., Eisner, M. P., Kosary, C. L., Hankey, B. F., Miller, B. A., Clegg, L., ... & Edwards, B. (2007). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004*. National Cancer Institute; Bethesda, MD: 2007. Available at: seer.cancer.gov/csr/1975-2001.
- [27] Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., & Parkin, D. M. (2001). *GLOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence. Version 1.0*.

- [28] Ragin, C. C. R., Modugno, F., & Gollin, S. M. (2007). The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *Journal of dental research*, 86(2), 104-114.
- [29] Llewellyn, C. D., Johnson, N. W., & Warnakulasuriya, K. A. A. S. (2001). Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people—a comprehensive literature review. *Oral oncology*, 37(5), 401-418.
- [30] Llewellyn, C. D., Linklater, K., Bell, J., Johnson, N. W., & Warnakulasuriya, S. (2004). An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral oncology*, 40(3), 304-313.
- [31] Leemans, C. R., Braakhuis, B. J., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(1), 9-22.
- [32] Llewellyn, C. D., Johnson, N. W., & Warnakulasuriya, K. A. A. S. (2004). Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *Journal of oral pathology & medicine*, 33(9), 525-532.
- [33] Ganci, F., Sacconi, A., Blandino, G., Fontemaggi, G., Spriano, G., Covello, R., & Manciooco, V. (2012). Molecular genetics and biology of head and neck squamous cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment. INTECH Open Access Publisher.
- [34] Vaughan, C. W., Homburger, F., Shapshay, S. M., Soto, E., & Bernfeld, P. (1980). Carcinogenesis in the upper aerodigestive tract. *Otolaryngologic clinics of North America*, 13(3), 403.
- [35] Schlecht, N. F., Franco, E. L., Pintos, J., & Kowalski, L. P. (1999). Effect of smoking cessation and tobacco type on the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Epidemiology*, 10(4), 412-418.
- [36] Zhang, Z. F., Morgenstern, H., Spitz, M. R., Tashkin, D. P., Yu, G. P., Hsu, T. C., & Schantz, S. P. (2000). Environmental tobacco smoking, mutagen sensitivity, and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9(10), 1043-1049.
- [37] Balaram, P., Sridhar, H., Rajkumar, T., Vaccarella, S., Herrero, R., Nandakumar, A., ... & Franceschi, S. (2002). Oral cancer in southern India: The influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene. *International journal of cancer*, 98(3), 440-445.
- [38] Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S. C., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., ... & Boffetta, P. (2009). Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer

Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(2), 541-550.

[39] zur Hausen, H., & De Villiers, E. M. (1994). Human papilloma viruses. *Annual Reviews in Microbiology*, 48(1), 427-447.

[40] Ault, K. A. (2006). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 2006.

[41] Munoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24, S1-S10.

[42] Zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2(5), 342-350.

[43] Radosевич, J. A. (2012). *HPV and Cancer*. Springer Science & Business Media.

[44] McKaig, R. G., Baric, R. S., & Olshan, A. F. (1998). Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head & neck*, 20(3), 250-265.

[45] Paz, I. B., Cook, N., Odom-Maryon, T., Xie, Y., & Wilczynski, S. P. (1997). Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Cancer*, 79(3), 595-604.

[46] Öktem, F., Aydın, S., Öz, F., Toprak, M., & Ada, M. (2000). Baş-boyun kanserlerinde Human papilloma virus infeksiyonunun rolü. *KBB ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi*, 8(1), 51-7.

[47] Marur, S., & Forastiere, A. A. (2008, April). Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *In Mayo Clinic Proceedings (Vol. 83, No. 4, pp. 489-501)*. Elsevier.

[48] <http://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet> Alındığı Tarih: 01.05.2015

[49] Knowles, J. E. (1971). Early diagnosis and treatment of head and neck cancer. *The Journal of the Maine Medical Association*, 62(9), 217-218.

[50] Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*, 17(6), 1471-1474.

[51] Mendenhall, W. M., Werning, J. W., & Pfister, D. G. (2011). Treatment of head and neck cancer. DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA: *Cancer: Principles and*

Practice of Oncology. 9th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 729-80.

[52] Bjordal, K., Hammerlid, E., Ahlner-Elmqvist, M., de Graeff, A., Boysen, M., Evensen, J. F., ... & Kaasa, S. (1999). Quality of life in head and neck cancer patients: validation of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire-H&N35. *Journal of Clinical Oncology*, 17(3), 1008-1008.

[53] Hofmann, G. A., Dev, S. B., Dimmer, S., & Nanda, G. S. (1999). Electroporation therapy: a new approach for the treatment of head and neck cancer. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, 46(6), 752-759.

[54] Modjtahedi, H. (2005). Molecular therapy of head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 24(1), 129-146.

[55] Haddad, R. I., & Shin, D. M. (2008). Recent advances in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1143-1154.

[56] Pai, S. I., & Westra, W. H. (2009). Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annual review of pathology*, 4, 49.

[57] Uzun, L., Beder, L. B. (2004) Baş-Boyun Kanserlerinde Gen Tedavisi Uygulamaları

[58] Chen, H. C., Chen, G. H., Chen, Y. H., Liao, W. L., Liu, C. Y., Chang, K. P., ... & Chen, S. J. (2009). MicroRNA deregulation and pathway alterations in nasopharyngeal carcinoma. *British journal of cancer*, 100(6), 1002-1011.

[59] Leonard, J. H., Kearsley, J. H., Chenevix-Trench, G., & Hayward, N. K. (1991). Analysis of gene amplification in head-and-neck squamous-cell carcinomas. *International journal of cancer*, 48(4), 511-515.

[60] Bradford, C. R., Zhu, S., Ogawa, H., Ogawa, T., Ubell, M., Narayan, A., ... & Carey, T. E. (2003). P53 mutation correlates with cisplatin sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma lines. *Head & neck*, 25(8), 654-661.

[61] Poeta, M. L., Manola, J., Goldwasser, M. A., Forastiere, A., Benoit, N., Califano, J. A., ... & Koch, W. M. (2007). TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*, 357(25), 2552-2561.

[62] Boyle, J. O., Hakim, J., Koch, W., van der Riet, P., Hruban, R. H., Roa, R. A., ... & Sidransky, D. (1993). The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Research*, 53(19), 4477-4480.

- [63] Ambrosch, P., Schlott, T., Hilmes, D., & Ruschenburg, I. (2001). p16 alterations and retinoblastoma protein expression in squamous cell carcinoma and neighboring dysplasia from the upper aerodigestive tract. *Virchows Archiv*, 438(4), 343-349.
- [64] Namazie, A., Alavi, S., Olopade, O. I., Pauletti, G., Aghamohammadi, N., Aghamohammadi, M., ... & Srivatsan, E. S. (2002). Cyclin D1 amplification and p16 (MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *The Laryngoscope*, 112(3), 472-481.
- [65] Reed, A. L., Califano, J., Cairns, P., Westra, W. H., Jones, R. M., Koch, W., ... & Sidransky, D. (1996). High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 56(16), 3630-3633.
- [66] Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H., & Forastiere, A. A. (2010). HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The lancet oncology*, 11(8), 781-789.
- [67] Mriouah, J., Boura, C., Pinel, S., Chretien, A. S., Fifre, A., Merlin, J. L., & Faivre, B. (2010). Cellular response to cetuximab in PTEN-silenced head and neck squamous cell carcinoma cell line. *International journal of oncology*, 37(6), 1555-1563.
- [68] Pedrero, J. M. G., Carracedo, D. G., Pinto, C. M., Zapatero, A. H., Rodrigo, J. P., Nieto, C. S., & Gonzalez, M. V. (2005). Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of cancer*, 114(2), 242-248.
- [69] Sok, J. C., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. L., ... & Grandis, J. R. (2006). Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clinical Cancer Research*, 12(17), 5064-5073.
- [70] Smilek, P., Dusek, L., Veselý, K., Rottenberg, J., & Kostrica, R. (2006). Correlation of expression of Ki-67, EGFR, c-erbB-2, MMP-9, p53, bcl-2, CD34 and cell cycle analysis with survival in head and neck squamous cell cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 25(4), 549-555.
- [71] Kalyankrishna, S., & Grandis, J. R. (2006). Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(17), 2666-2672.
- [72] Kyzas, P. A., Stefanou, D., Batistatou, A., & Agnantis, N. J. (2005). Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 131(9), 624-630.

- [73] Mineta, H., Miura, K., Ogino, T., Takebayashi, S., Misawa, K., Ueda, Y., ... & Wennerberg, J. (2000). Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. *British journal of cancer*, 83(6), 775.
- [74] Gunduz, M., Gunduz, E., Rivera, R. S., & Nagatsuka, H. (2008). The inhibitor of growth (ING) gene family: potential role in cancer therapy. *Current cancer drug targets*, 8(4), 275-284.
- [75] Coles, A. H., & Jones, S. N. (2009). The ING gene family in the regulation of cell growth and tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*, 218(1), 45-57.
- [76] Gunduz, M., Ouchida, M., Fukushima, K., Ito, S., Jitsumori, Y., Nakashima, T., ... & Shimizu, K. (2002). Allelic loss and reduced expression of the ING3, a candidate tumor suppressor gene at 7q31, in human head and neck cancers. *Oncogene*, 21(28), 4462-4470.
- [77] Gunduz, M., Nagatsuka, H., Demircan, K., Gunduz, E., Cengiz, B., Ouchida, M., ... & Nagai, N. (2005). Frequent deletion and down-regulation of ING4, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas. *Gene*, 356, 109-117.
- [78] Borkosky, S. S., Gunduz, M., Nagatsuka, H., Beder, L. B., Gunduz, E., Ali, M. A. S., ... & Nagai, N. (2009). Frequent deletion of ING2 locus at 4q35. 1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 135(5), 703-713.
- [79] Cengiz, B., Gunduz, E., Gunduz, M., Beder, L. B., Tamamura, R., Bagci, C., ... & Nagatsuka, H. (2010). Tumor-specific mutation and downregulation of ING5 detected in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 127(9), 2088-2094.
- [80] Gunduz, M., Ouchida, M., Fukushima, K., Hanafusa, H., Etani, T., Nishioka, S., ... & Shimizu, K. (2000). Genomic structure of the human ING1 gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Research*, 60(12), 3143-3146.
- [81] Zamore, P. D. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence. *Nature Structural & Molecular Biology*, 8(9), 746-750.
- [82] Schepers, U. (2006). RNA interference in practice: Principles, basics, and methods for gene silencing in *C. elegans*, *Drosophila*, and mammals. John Wiley & Sons.

[83] Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell Online*, 2(4), 279-289.

[84] Guo, S., & Kemphues, K. J. (1995). Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81(4), 611-620.

[85] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.

[86] Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441), 950-952.

[87] Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., & Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1), 25-33.

[88] Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775), 293-296.

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

[90] Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), 494-498.

[91] Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., ... & Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), 23-34.

[92] Bertil, D. (2006). Advanced information: RNA interference. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine*.

[93] Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 7(4), 147-154.

[94] Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., & Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development*, 15(20), 2654-2659.

[95] Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., & Carthew, R. W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1), 69-81.

[96] Ji, X. (2008). The mechanism of RNase III action: how dicer dices. In *RNA interference* (pp. 99-116). Springer Berlin Heidelberg.

[97] Tijsterman, M., & Plasterk, R. H. (2004). Dicers at RISC: the mechanism of RNAi. *Cell*, 117(1), 1-3.

[98] <http://www.gene-quantification.de/si-rna.html> Alındığı Tarih: 06.05.2015

[99] Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4), 259-269.

[100] http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MiRNA_processing.svg

[101] Hutvagner, G., & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(1), 22-32.

[102] Filipowicz, W. (2005). RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*, 122(1), 17-20.

[103] Kanasty, R. L., Whitehead, K. A., Vegas, A. J., & Anderson, D. G. (2012). Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. *Molecular Therapy*, 20(3), 513-524.

[104] Irfan, M., & Mehmood, S. (2014). RNA Interference: Molecular mechanism and milestone therapeutic applications. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 12(1/2), 11.

[105] Scherr, M., Battmer, K., Winkler, T., Heidenreich, O., Ganser, A., & Eder, M. (2003). Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood*, 101(4), 1566-1569.

[106] Lewis, D. L., Hagstrom, J. E., Loomis, A. G., Wolff, J. A., & Herweijer, H. (2002). Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nature genetics*, 32(1), 107-108.

[107] Giladi, H., Ketzinel-Gilad, M., Rivkin, L., Felig, Y., Nussbaum, O., & Galun, E. (2003). Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Molecular Therapy*, 8(5), 769-776.

[108] Song, E., Lee, S. K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., ... & Lieberman, J. (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature medicine*, 9(3), 347-351.

[109] Vaishnav, A. K., Gollob, J., Gamba-Vitalo, C., Hutabarat, R., Sah, D., & Meyers, R. (2010). Review A status report on RNAi therapeutics. *Silence*, 1, 14-26.

[110] http://www.pfizer.com.tr/sites/tr/arge/pfizer_bilgi_uretir/Pages/YeniIlacGelistirmeSureci.aspx_Alindiği Tarih: 07.05.2015

[111] Lassalle, P., Molet, S., Janin, A., Van der Heyden, J., Tavernier, J., Fiers, W., ... & Tonnel, A. B. (1996). ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20458-20464.

[112] www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ESM1&search=226ee09b58a92552f2cf52f1a47a70b1 Alindiği Tarih: 08.05.2015

[113] Béchar, D., Gentina, T., Delehedde, M., Scherpereel, A., Lyon, M., Aumercier, M., ... & Lassalle, P. (2001). Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48341-48349.

[114] Sarrazin, S., Adam, E., Lyon, M., Depontieu, F., Motte, V., Landolfi, C., ... & Delehedde, M. (2006). Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1765(1), 25-37.

[115] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11082#genomic-regions-transcripts-products_Alindiği Tarih: 08.05.2015

[116] Wellner, M., Herse, F., Janke, J., Gorzelniak, K., Engeli, S., Bechart, D., ... & Sharma, A. M. (2003). Endothelial cell specific molecule-1--a newly identified protein in adipocytes. *Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et metabolisme*, 35(4), 217-221.

[117] Liu, N., Zhang, L. H., Du, H., Hu, Y., Zhang, G. G., Wang, X. H., ... & Ji, J. F. (2010). Overexpression of endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1) in gastric cancer. *Annals of surgical oncology*, 17(10), 2628-2639.

[118] Lv, Z., Fan, Y., Chen, H., & Zhao, D. (2014). Endothelial cell-specific molecule-1: a potential serum marker for gastric cancer. *Tumor Biology*, 35(10), 10497-10502.

[119] Sun, W., Zhang, L., Cheng, X., Wang, X., Xing, X., Du, H., & Ji, J. (2014). [Detection of serum endothelial cell specific molecule 1 in gastric cancer patients and its clinical significance]. *Zhonghua wei chang wai ke za zhi= Chinese journal of gastrointestinal surgery*, 17(1), 51-55.

[120] Huang, G. W., Tao, Y. M., & Ding, X. (2009). Endocan expression correlated with poor survival in human hepatocellular carcinoma. *Digestive diseases and sciences*, 54(2), 389-394.

[121] Xiang, X., Zhao, W. B., & Wang, X. (2009). [Expression of ESM-1 in hepatocellular carcinoma is associated with angiogenesis and tumor invasion]. *Zhonghua gan zang bing za zhi= Zhonghua ganzangbing zazhi= Chinese journal of hepatology*, 17(9), 661-664.

[122] Chen, L. Y., Liu, X., Wang, S. L., & Qin, C. Y. (2010). Over-expression of the Endocan gene in endothelial cells from hepatocellular carcinoma is associated with angiogenesis and tumour invasion. *Journal of International Medical Research*, 38(2), 498-510.

[123] Kang, Y. H., Ji, N. Y., Lee, C. I., Lee, H. G., Kim, J. W., Yeom, Y. I., ... & Song, E. Y. (2011). ESM-1 silencing decreased cell survival, migration, and invasion and modulated cell cycle progression in hepatocellular carcinoma. *Amino acids*, 40(3), 1003-1013.

[124] Ji, N. Y., Kim, Y. H., Jang, Y. J., Kang, Y. H., Lee, C. I., Kim, J. W., ... & Song, E. Y. (2010). Identification of endothelial cell-specific molecule-1 as a potential serum marker for colorectal cancer. *Cancer science*, 101(10), 2248-2253.

[125] Kang, Y. H., Ji, N. Y., Han, S. R., Lee, C. I., Kim, J. W., Yeom, Y. I., ... & Song, E. Y. (2012). ESM-1 regulates cell growth and metastatic process through activation of NF- κ B in colorectal cancer. *Cellular signalling*, 24(10), 1940-1949.

[126] Kim, J. H., Park, M. Y., Kim, C. N., Kim, K. H., Kang, H. B., Kim, K. D., & Kim, J. W. (2012). Expression of endothelial cell-specific molecule-1 regulated by hypoxia inducible factor-1 α in human colon carcinoma: Impact of ESM-1 on prognosis and its correlation with clinicopathological features. *Oncology reports*, 28(5), 1701-1708.

[127] Rennel, E., Mellberg, S., Dimberg, A., Petersson, L., Botling, J., Ameer, A., ... & Gerwins, P. (2007). Endocan is a VEGF-A and PI3K regulated gene with increased expression in human renal cancer. *Experimental cell research*, 313(7), 1285-1294.

[128] Leroy, X., Aubert, S., Zini, L., Franquet, H., Kervoaze, G., Villers, A., ... & Lassalle, P. (2010). Vascular endocan (ESM-1) is markedly overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology*, 56(2), 180-187.

[129] Yu, P. H., Chou, S. F., Chen, C. L., Hung, H., Lai, C. Y., Yang, P. M., ... & Wang, W. B. (2013). Upregulation of endocan by epstein-barr virus latent membrane protein 1 and its clinical significance in nasopharyngeal carcinoma. *PloS one*, 8(12), e82254.

- [130] Grigoriu, B. D., Depontieu, F., Scherpereel, A., Gourcerol, D., Devos, P., Ouatas, T., ... & Lassalle, P. (2006). Endocan Expression and Relationship with Survival in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research*,12(15), 4575-4582.
- [131] Hatfield, K. J., Lassalle, P., Leiva, R. A., Lindås, R., Wendelboe, Ø., & Bruserud, Ø. (2011). Serum levels of endothelium-derived endocan are increased in patients with untreated acute myeloid leukemia. *Hematology*,16(6), 351-356.
- [132] El Behery, M. M., Seksaka, M. A., Ibrahiem, M. A., Saleh, H. S., & El Alfy, Y. (2013). Clinicopathological correlation of endocan expression and survival in epithelial ovarian cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*, 288(6), 1371-1376.
- [133] Scherpereel, A., Depontieu, F., Grigoriu, B., Cavestri, B., Tsicopoulos, A., Gentina, T., ... & Lassalle, P. (2006). Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. *Critical care medicine*, 34(2), 532-537.
- [134] Mihajlovic, D. M., Lendak, D. F., Brkic, S. V., Draskovic, B. G., Mitic, G. P., Mikic, A. S. N., & Cebovic, T. N. (2014). Endocan is useful biomarker of survival and severity in sepsis. *Microvascular research*, 93, 92-97.
- [135] Balta, I., Balta, S., Koryurek, O. M., Demirkol, S., Mikhailidis, D. P., Celik, T., ... & Kurt, Y. G. (2014). Serum endocan levels as a marker of disease activity in patients with Behçet disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 70(2), 291-296.
- [136] Li, S., Wang, L., Wang, C., Wang, Q., Yang, H., Liang, P., & Jin, F. (2012). Detection on dynamic changes of endothelial cell specific molecule-1 in acute rejection after renal transplantation. *Urology*, 80(3), 738-e1.
- [137] Voiosu, T., Bălănescu, P., Benguş, A., Voiosu, A., Baicuş, C. R., Barbu, M., ... & Voiosu, R. (2013). Serum endocan levels are increased in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical laboratory*, 60(3), 505-510.
- [138] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=ESM1> Alındığı Tarih: 10.05.2015
- [139] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=ESM1+cancer> Alındığı Tarih: 10.05.2015
- [140] Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84(3), 359-369.

EKLER**SOLÜSYONLAR****Immunofloresan Boyama****%4'lük Paraformaldehit**

4 gr paraformaldehit

100 mL 1X PBS

2-3 gr NaOH

PH: 8.5

%4'lük Paraformaldehit

1 mL % 37 Formaldehyde Solution

7.25 mL 1X PBS

%10 Triton-X

5 mL Triton-X

45 mL 1X PBS

% 0.5'lik Triton-X

2,5 mL %10 Triton-X

47,5 mL 1X PBS

%1'lik BSA

0.5 gr BSA

50 mL 1X PBS

%0,1'lik Triton

500 µl %10 Triton-X

50 mL 1X PBS

%0,1'lik BSA

0.05 gr BSA

49.95 mL 1X PBS

Agaroz Jel Elektroforezi**10X TBE**

108,8 gr Tris

55 gr Borik Asit

0.5 M 20 mL EDTA

Distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

1X TBE

100 mL 10X TBE

900 mL Distile Su

0.5 M EDTA

186,1 gr EDTA

800 mL Distile Su

20 gr NaOH (EDTA su ile karıştırılırken yavaş yavaş eklenir.)

PH: 8

100 Bp Marker

10 µl 100 Bp Marker

10 µl 3X Loading Dye

80 µl Nuclease Free Water

Western Blot**10X Transfer Buffer**

250 mL Methanol

14.4 gr Glycine

3 gr Trizma

Distile Su ile 1 L'ye tamamlanır.

10X TBS

160 gr NaCl

4.5 gr KCl

60 gr Trizma

MiliQ Su ile 800 mL tamamlanır.

PH: 7.42 (HCl ile ayarlanır.)

PH: 7.42 olduktan sonra miliQ su ile 2L'ye tamamlanır.

TBS-T

1 L 1X TBS

500 µl Tween-20

%30 ACA

58 gr ACA

2 gr N,N,metilen bis ACA

200 mL Distile Su

2 M Tris HCl

72 gr Trizma

250 mL Distile Su

PH: 8.8

0.5 M Tris HCl

6 gr Trizma

80 mL Distile Su

PH: 6.8

%10 APS

25 mg APS

250 µl Distile Su

Taze olarak hazırlanıp, kullanılmalıdır.

%10 SDS

5 gr SDS

50 mL Distile Su

%5 Yağsız Süt Tozu

1.25 gr süt tozu

1X TBS-T ile 50 mL'ye tamamlanır.

