



BAZI MİKORNA'LARIN APOPTOTİK SÜREÇTEKİ ROLÜ

Yüksek Lisans Tezi

Burcu AKYILDIZ

Eskişehir, 2022

BAZI MİKRORNA'LARIN APOPTOTİK SÜREÇTEKİ ROLÜ

Burcu AKYILDIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zerrin SELLER

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2022

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2104S013 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Burcu AKYILDIZ'ın "Bazı MikroRNA'ların Apoptotik Süreçteki Rolü" başlıklı tezi 02.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Zerrin SELLER	
Üye	: Prof. Dr. İlknur DAĞ	
Üye	: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

BAZI MİKRORNA'LARIN APOPTOTİK SÜREÇTEKİ ROLÜ

Burcu AKYILDIZ

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Prof. Dr. Zerrin SELLER

Dünya genelinde kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedeni olarak ikinci sırada yer almaktadır. Günümüzde aktif olarak kanser tedavisinde uygulanan yöntemlerden birçoğu kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelere de zarar vermesinden dolayı yeni araştırmalar kanser tanısında ve tedavisinde hedef molekül olarak kullanılabilecek yeni biyobelirteçlerin keşfedilmesine yöneliktir.

Bu tez kapsamında hsa-miR-455-3p'nin Wnt/ β -katenin sinyal yolu üzerindeki etkisine bakılarak, β -katenin inhibitörü (cardamonin) varlığında ve yokluğunda hsa-miR-455-3p'nin SKOV-3 hücrelerinde göç, proliferasyon ve apoptotik etkileri incelenmiştir. Cardamonin ile inkübe edilen SKOV-3 hücrelerinin farklı dozlarda hsa-miR-455-3p transfeksiyonu sonrasında hücre proliferasyon ve göç oranları gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar; miRNA transfeksiyonu ve cardamonin uygulaması yapılan hücre grubundaki göç ve proliferasyon oranlarının diğer hücre gruplarına kıyasla anlamlı bir azalışın olduğunu göstermiştir. Akridin oranj/Etidyum bromür boyama sonuçları, hsa-miR-455-3p transfeksiyonu yapılan hücre grubu ile inhibitör uygulanan hücre grubunda apoptotik hücre sayısında belirgin bir artış olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, yapılan kombine hsa-miR-455-3p ekspresyonunun uyarılması ve β -katenin inhibisyonu sonrasında, SKOV-3 ovaryum hücrelerinin göç ve hücre proliferasyonunun inhibe edildiği ve bu kombine uygulamanın hücre apoptozu üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, hsa-miR-455-3p'nin β -katenin aktivasyonunun baskılanması ile birlikte SKOV-3 hücreleri üzerine anti-kanser etki gösterdiği görülmektedir. Bu sonuçlar, hsa-miR-455-3p'nin sinyal yolları üzerindeki etki mekanizmasının tam olarak belirlenmesi ile birlikte mortalite oranı yüksek olan yumurtalık kanserinde tedaviye yönelik ilaç geliştirme açısından fayda sağlayabilecektir.

Anahtar Sözcükler: hsa-miR-455-3p, Yumurtalık kanseri, β -katenin, Apoptoz.

ABSTRACT

THE ROLE OF SOME MIRNAS IN THE APOPTOTIC PROCESS

Burcu AKYILDIZ

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2022

Supervisor: Prof. Dr. Zerrin SELLER

Worldwide, cancer is the second leading cause of death after cardiovascular diseases. Since many of the methods actively used in cancer treatment today damage healthy cells as well as cancerous cells, new research is aimed at discovering new biomarkers that can be used as target molecules in the diagnosis and treatment of cancer.

In this thesis, migration, proliferation and apoptotic effects of hsa miR-455-3p on SKOV-3 cells in the presence and absence of β -catenin inhibitor (cardamonin) were examined by looking at the effect of hsa-miR-455-3p on the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Cell proliferation and migration rates were investigated by real-time cell analysis system after different doses of hsa-miR-455-3p transfection of SKOV-3 cells incubated with cardamonin. Obtained results; showed that there was a significant decrease in migration and proliferation rates in the cell group treated with miRNA transfection and cardamonin compared to other cell groups. Acridine orange/Ethidium bromide staining results showed a significant increase in the number of apoptotic cells in the hsa-miR-455-3p transfected cell group and the inhibitor applied cell group.

As a result, it was determined that the migration and cell proliferation of SKOV-3 ovarian cells were inhibited after the stimulation of hsa-miR-455-3p expression and inhibition of β -catenin, and this combined application had a stimulating effect on cell apoptosis. It appears that hsa-miR-455-3p has an anti-cancer effect on SKOV-3 cells by suppressing β -catenin activation. These results, together with the exact determination of the mechanism of action of hsa-miR-455-3p on signaling pathways, may provide benefits in terms of drug development in ovarian cancer with a high mortality rate.

Keywords: hsa-miR-455-3p, Ovarian cancer, β -catenin, Apoptosis.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım ve çalışma sürecim boyuncaengin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, olumlu tavır ve davranışlarıyla beni cesaretlendirip her konuda yol gösterici olan ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Zerrin SELLER’e

Araştırmamın uygulama aşamasında güler yüzüyle akademik ve deneysel bilgi ile tecrübesini benimle paylaşıp bana yardımcı olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Seda Mehtap SARI KILIÇASLAN’a

Hayatım boyunca her zaman maddi ve manevi yanımda olduğunu bildiğim, aldığım her kararda ve yaptığım her çalışmada beni destekleyen sevgili babam Enkar AKYILDIZ’a, sevgili annem Emine AKYILDIZ’a ve sevgili kardeşim Burak AKYILDIZ’a

Yüksek lisans yapmamda beni teşvik eden ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili teyzem Fermin ÇELİK’e, sevgili eniştem Oktay ÇELİK’e ve sevgili kızları Zeynep ÇELİK ve Aymila ÇELİK’e

Her zaman ve her koşulda yanımda olduğunu hissettiren, inancımı ve kararlılığımı kaybetmemem konusunda beni teşvik eden, zorlandığım her konuda manevi desteğini esirgemeyen ve başarabileceğime olan inancını benimle birlikte kaybetmeyen çok sevgili arkadaşım Serkan KARSLI’ya

Sonsuz şükranlarımı sunmaktan büyük mutluluk duyarım.

Burcu AKYILDIZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kanserde genler	6
2.2. Yumurtalık Kanseri	7
2.2.1. Yumurtalık kanserinin alt tipleri.....	7
2.2.2. Risk faktörleri	8
2.2.2.1. Genetik eğilim / aile geçmişi	8
2.2.2.2. Yumurtlama.....	9
2.2.2.3. Endometriozis	9
2.2.2.4. Vücut ölçüsü ve fiziksel aktivite.....	9
2.2.2.5. Alkol ve sigara	9
2.2.3. Yumurtalık kanserinde etkili olan genler	10
2.2.4. Klinik bulgular.....	11

2.2.5. Tedavi yöntemleri.....	12
	<u>Sayfa</u>
2.3. β -Katenin.....	13
2.3.1. Yapısı ve işlevleri	13
2.3.2. Wnt/ β -katenin sinyal mekanizması.....	14
2.3.3. Hücre-hücre bağlanmasındaki rolü	15
2.3.4. Wnt/ β -katenin ve kanser	16
2.3.5. Wnt/ β -katenin ve yumurtalık kanseri	16
2.3.5.1. Yumurtalık kanseri Wnt/ β -katenin sinyal yolunda meydana gelen değişimler	17
2.3.6. Cardamonin ile β -katenin inhibisyonu	17
2.4. Apoptoz	18
2.4.1. Apoptozun düzenlenmesi	19
2.4.2. İçsel apoptotik yolak	19
2.4.3. Dışsal apoptotik yolak.....	20
2.4.4. Apoptoz ve yumurtalık kanseri.....	20
2.5. MikroRNA (miRNA)	21
2.5.1. Tanımı.....	21
2.5.2. miRNA biyogenezi	22
2.5.3. miRNA ve apoptoz.....	24
2.5.4. miRNA ve kanser	25
2.5.4.1. Yumurtalık kanserinde miRNA'lar	27
2.5.5. Wnt/ β -katenin sinyal yolunda miRNA'lar	27
2.6. miR-455 ve Etki Mekanizması	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM	31
3.1. Hücre Hattı	31
3.2. Materyaller	31

3.2.1. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler	31
	<u>Sayfa</u>
3.2.2. Ekipmanlar	32
3.2.3. Kullanılan ticari kitler	33
3.2.4. Kullanılan bilgisayar programları	33
3.3. Metodlar	33
3.3.1. Kullanılan maddelerin hazırlanması	33
3.3.1.1. Cardamonin bileşiğinin çözündürülmesi ve hazırlanması.....	33
3.3.1.2. miR-455'in stok konsantrasyonunun hazırlanması	33
3.3.2. Hücre kültürü	34
3.3.3. Sitotoksikite Belirleme Testi.....	34
3.3.3.1. MTT yöntemi ile Cardamoninin IC ₅₀ dozunun belirlenmesi .	34
3.3.4. Hücrelere miRNA'nın transfekte edilmesi ve BLOCK-iT Alexa-Fluor Kırmızı Floresan Kontrolü ile görüntüleme yapılması	35
3.3.5. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) ile hücre göçünün kantitatif olarak belirlenmesi	35
3.3.6. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) ile hücre proliferasyonunun kantitatif olarak belirlenmesi	36
3.3.7. Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) boyama ile apoptozun belirlenmesi	37
3.3.8. İstatistiksel analiz	37
4. BULGULAR VE SONUÇLAR.....	38
4.1. Sonuçlar	38
4.1.1. Cardamonin bileşiğinin SKOV-3 kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	38
4.1.2. hsa-miR-455-3p transfeksiyonu ve BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan kontrolü ile görüntülenmesi.....	40

4.1.3. Cardamonin inhibitörünün ve hsa-miR-455-3p transfeksiyonun hücre göçü üzerine etkisi	44
<u>Sayfa</u>	
4.1.4. Cardamonin inhibitörünün ve hsa-miR-455-3p transfeksiyonunun hücre proliferasyonu üzerine etkisi.....	47
4.1.5. Akridin oranj/etidyum bromür boyama ile apoptozun belirlenmesi .	52
5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER.....	57
KAYNAKÇA.....	62
EKLER.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	78

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler.....	31
Tablo 3.2. Ekipmanlar.....	32
Tablo 3.3. Kullanılan ticari kitler.....	33
Tablo 3.4. Kullanılan bilgisayar programları.....	33
Tablo 4.1. Cardamonin bileşiminin SKOV-3 hücre hattındaki 24 ve 48 saatlerdeki IC ₅₀ ve IC ₂₀ konsantrasyon değerleri.....	38
Tablo 4.2. Cardamonin konsantrasyonlarına göre 24 ve 48 saatteki ortalama $\pm$ SEM değerleri.....	39
Tablo 4.3. 24 saat BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan ile transfeksiyon işlemi sonrasında SKOV-3 hücrelerinin 20 $\times$ ve 40 $\times$ görüntülerindeki hücre sayımı ile hesaplanan transfeksiyon verimliliği.....	42
Tablo 4.4. 72 saat BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan ile transfeksiyon işlemi sonrasında SKOV-3 hücrelerinin 20 $\times$ ve 40 $\times$ görüntülerindeki hücre sayımı ile hesaplanan transfeksiyon verimliliği.....	42
Tablo 4.5. SKOV-3 hücrelerine ait AO/EB boyama sonucunda elde edilen canlı ve apoptotik hücre sayısı (%).....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı 2020 yılı tahmini yeni kanser ve ölüm vakaları	1
Şekil 2.1. Kansere neden olan hücrelerde meydana gelen değişiklikler	5
Şekil 2.2. Wnt β -katenin sinyal yolu mekanizması	14
Şekil 2.3. Cardamonin moleküler yapısı	18
Şekil 2.4. miRNA biyogenezi.....	23
Şekil 4.1. Cardamonin bileşiğinin MTT testi ile SKOV-3 hücrelerinde 24 ve 48 saat sonrasındaki canlılık (%) oranları.	39
Şekil 4.2. SKOV-3 hücreleri farklı konsantrasyonlardaki BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan ile 24 saat transfeksiyonu.....	41
Şekil 4.3. SKOV-3 hücreleri farklı konsantrasyonlardaki BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan ile 72 saat transfeksiyonu.....	41
Şekil 4.4. hsa- miR-455-3p transfekte edilmiş SKOV-3 hücrelerinin 24 ve 72 saatteki ışık mikroskobu görüntüleri	43
Şekil 4.5. SKOV-3 hücre göçünün normalize hücre indeksi değerleri.	45
Şekil 4.6. SKOV-3 hücrelerinin CIM-plakalarda cardamonin varlığında ve hsa-miR-455-3p transfeksiyonu sonrasında hücre göçü oranları.....	45
Şekil 4.7. SKOV-3 hücrelerinin CIM-plakalarda hsa-miR-455-3p uygulama gruplarının normalize CI ve zamana karşı grafiği	46
Şekil 4.8. SKOV-3 hücrelerinin E-plakalarda cardamonin ve hsa-miR-455-3p uygulaması ile hücre proliferasyonu üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.9. SKOV-3 hücrelerine cardamonin inhibitörü ve hsa-miR-455-3p transfeksiyon uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine etkisi.....	48

Şekil 4.10. IC ₅₀ ve IC ₂₀ dozlarında cardamonin uygulanmış E-plakalarda SKOV-3 hücrelerinin 20× büyütmede ışık mikroskobu görüntüleri.....	50
Şekil 4.11. Cardamonin varlığında ve hsa-miR-455-3p transfeksiyonu uygulanmış E-plakalarda SKOV-3 hücrelerinin inkübasyon sürelerinin 20× büyütme ışık mikroskobu görüntüleri.....	52
Şekil 4.12. Cardamonin varlığında ve miRNA-455-3p transfeksiyon uygulamasından 24 saat sonra AO/EB ile boyanmış SKOV-3 hücrelerinde canlı ve apoptotik hücre görüntüleri.....	53
Şekil 4.13. Cardamonin varlığında ve miRNA-455-3p transfeksiyon uygulamasından 48 saat sonra AO/EB ile boyanmış SKOV-3 hücrelerinde canlı ve apoptotik hücre görüntüleri.....	54
Şekil 4.14. Cardamonin varlığında ve miRNA-455-3p transfeksiyon uygulamasından 72 saat sonra AO/EB ile boyanmış SKOV-3 hücrelerinde canlı ve apoptotik hücre görüntüleri.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
κ	: Kappa
μM	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre
AGO	: Argonaute
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AKT	: Serin/treonin protein kinaz
Anova	: Varyans analizi
AO	: Akridin oranj
Apaf-1	: Apoptoz proteaz aktive edici faktör-1
APC	: Adenomatöz poliposis koli
AXIN	: Protein
Bak	: Bcl2 antagonisti
Bax	: Bcl2 ile ilişkili X, apoptoz düzenleyicisi
Bcl2	: Bcl2 apoptoz düzenleyicisi
Bcl-w	: Bcl2 protein aile üyesi
Bcl-xl	: Bcl2 protein aile üyesi
Bim	: Apoptoz düzenleyicisi
BRAF	: Proto-onkogen
BRCA1/2	: Meme ve yumurtalık kanserine yatkınlık genleri
CDK4	: Sikline bağımlı protein kinaz 4
CHEK2	: Kontrol noktası kinaz 2
CI	: Hücre indeksi
CK1	: Kazein kinaz 1
CK1 α	: Kazein kinaz 1 alfa
CRC	: Kanser kök hücreleri
CTNNB1	: Katenin beta 1
DD	: Ölüm alanı
DED	: Ölüm etki alanı
DGCR8	: Drosha ve DiGeorge sendromu kritik bölge 8

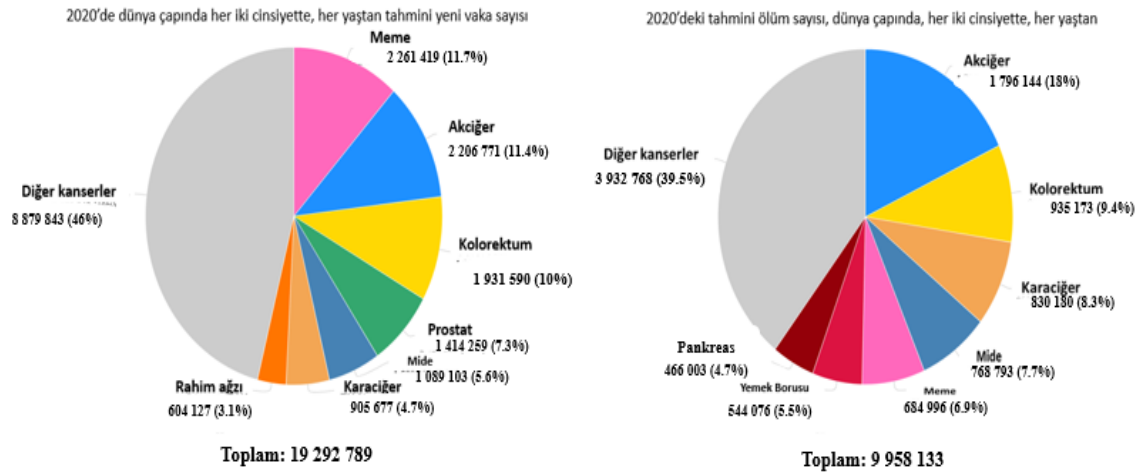
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimelsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR5	: Transmembran reseptörü
DVL	: Dishevelled
E2F	: Transkripsiyon faktörü
EB	: Etidyum bromür
EMT	: Epitel mezenkimal geçiş
FADD	: Fas reseptörü ile ilişkili ölüm alanı
Fas	: Hücre yüzeyi ölüm reseptörü
FasL	: Fas ligandı
FBS	: Fetal bovine serum
Fzd	: Frizzled
GSK-3 β	: Glikojen sentaz kinaz-3 beta
HGSOC	: Yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri
IAP	: Apoptoz protein inhibitörü
IC ₂₀	: Maksimum inhibisyonun %20'sini oluşturan doz
IC ₅₀	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan doz
kDa	: Kilodalton
KRAS	: Proto-onkogen
LEF	: Lenfoit güçlendirici faktör
LGSOC	: Düşük dereceli seröz yumurtalık kanseri
LRP5/6	: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilgili protein 5/6
M7G	: Yedi metilguanozin başlığı
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
miRNA	: mikroRNA
mM	: Milimolar
MOMP	: Mitokondriyal dış membran geçirgenliği
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid
Myc	: Proto-onkogen
NF- κ B	: Nükleer faktör-kappa B
NICD	: Notch1 hücre içi alanı
nM	: Nanomolar

Notch1	: Translasyona bağlı Notch homolog 1
p53	: p53 proteini
PARP	: Poli-ADP-Riboz-Polimeraz
pri-miRNA	: Birincil miRNA
pre-miRNA	: Öncü miRNA
PTEN	: Fosfotaz ve tensin homologu
Puma	: BH3 ile etkileşen ölüm alanı antagonisti
RAD51	: DNA onarım proteini
RAS	: G-proteini türünde bir proto-onkogen
RB	: Retinoblastoma protein
RISC	: RNA ile indüklenen susturucu kompleks
RNA	: Ribonükleik asit
RTCA	: Gerçek Zamanlı Hücre Analizi
SEM	: Standart ortalama hata
SKOV-3	: İnsan yumurtalık kanseri hücre hattı
Smac/Diablo	: IAP bağlayıcı mitokondriyal protein
SNP	: Tek nükleotit polimorfizmleri
STAT3	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
TCF	: Tümör hücresi faktörü
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNFR	: Transmembran reseptörü
TRADD	: TNF ile ilişkili ölüm alanı
TRBP	: Trans-aktivasyon yanıtı RNA bağlayıcı protein
UTR	: Çevrilmeyen bölgeler
XIAP	: X'e bağlı apoptoz inhibitörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, büyüme özellikleri bozulmuş, kontrolsüz bir şekilde çoğalan ve apoptotik aktivitelerini kaybetmiş hücrelerin meydana getirdiği bir hastalıktır. Bu hastalık, somatik genetik hastalıkların en yaygın ve aynı zamanda da en komplike olanıdır (Yokuş ve Çakır,2012).

Birçok ülkede kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm sebebi olarak kanser karşımıza çıkmaktadır. Genel olarak, dünya genelinde kanser insidansı hızlı bir şekilde artış göstermekte (Sung vd., 2021) ve nüfusun büyümesi, yaşlanması ve kanser riskinin artmasına neden olacak şekilde yaşam tarzının benimsenmesi ölüm oranlarını da büyük ölçüde artırmaktadır. Şekil 1.1.'de Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın 2020 yılı dünya kanser istatistiklerinin grafiği gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı 2020 yılı tahmini yeni kanser ve ölüm vakaları (<http-1>).

Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın dünya kanser istatistiklerine göre, 2020'de her iki cinsiyette ve her yaşta teşhis edilen tahmini yeni kanser vakası 19.3 milyon olarak belirlenmiş ve en fazla görülen kanser tiplerinden olan meme kanseri ilk sırada yer alırken ikinci sırada akciğer kanseri olduğu gösterilmiştir. Yine her iki cinsiyet ve her yaşta ölüm sayısı yaklaşık 10 milyon olarak belirlenmiş ve ölüm oranı en yüksek olan akciğer kanseri, kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olmaya devam etmiştir (Şekil 1.1).

Kanser artış hızının bu şekilde devam etmesi durumunda, dünya nüfusunun artış göstermesine ve nüfustaki yaşlanmanın meydana gelmesine bağlı olarak, 2040 yılında 2020'ye karşılık gelen tahmini vaka sayısının %47 oranında artacağı tahmin edilmektedir. Düşük insani gelişme endeksli ülkelerde bu oranın %95, orta insani gelişme endeksli ülkelerde ise %64 oranında olacağı tahmin edilmiştir (Sung vd., 2021).

Kanseri tedavi etmek amacıyla günümüzde uygulanan birçok yöntem ve kemoterapötik ilacın, kanserli hücrelere zarar verdiği gibi aynı zamanda sağlıklı dokulara da zarar vermesi nedeniyle son yıllarda yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve tanıda fayda sağlayacak yeni hedef moleküllerin keşfine yönelik bilimsel çalışmaların sayısında önemli artış olmuştur. Bu tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde hedef molekül olarak mikroRNA'ların (miRNA'ların) son yıllarda ön plana çıktığı ve bu alanda yapılan çalışmaların her geçen gün artış gösterdiği bilinmektedir.

miRNA'lar kısa kodlanmayan RNA'lar olarak bilinmektedir ve ilk kez *Caenorhabditis elegans*'ta (*C.elegans*) keşfedilmiştir (MacFarlane ve Murphy, 2010). Transkripsiyon sonrasında gen ekspresyonunun düzenlenmesinde modülatör olarak işlev göstermektedir. Buna bağlı olarak da hücre büyümesi, hücre farklılaşması, hücre bölünmesinin düzenlenmesi ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte rol oynamaktadır. Onkogenik ve tümör baskılayıcı olarak iki gruba ayrılabilen miRNA'ların değişmiş ekspresyon düzeyleriyle kanserde invazyon, metastaz ve ilaca direnç gibi olaylarla yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir (Khan vd., 2019).

Yapılan çalışmalarla birçok kanser türünde olduğu gibi yumurtalık kanserinde de miRNA'ların anormal ekspresyon sergilediği gözlenmiştir. Aynı zamanda yumurtalık kanseriyle ilgili Wnt/ β -katenin gibi sinyal yollarının ekspresyonunu da miRNA'ların modüle ettiği belirlenmiştir (Ghafouri-Fard vd., 2020).

miRNA'ların tedavi amacıyla kullanılabilmesi ve işlevsel olarak öneminin anlaşılabilmesi için gen ifadelerinin farklı düzeylerde nasıl düzenlendiğinin tespit edilmesi gerekmektedir. Yumurtalık kanserine karşı olarak önemli ölçüde tedavi stratejileri bulunmasına rağmen ölüm oranının yüksek olması hastalığın erken evrede tespit edilemiyor olmasından kaynaklanmaktadır. Dünya üzerinde her yıl birçok kadına yumurtalık kanseri tanısı konduğu günümüzde miRNA'lar sadece hastalığın tanı, prognoz ve erken teşhis edilmesinden değil moleküler esaslı tedaviler için de önemli bir

biyolojik belirteç olabileceği düşünölmektedir. Bunlara bağlı olarak da yumurtalık kanserinde etkili ve spesifik olan miRNA'ların tespit edilmesi ve hangi hücrese1 yolaklarda hangi işleve sahip olduklarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında mimik-hsa-miR-455-3p transfeksiyonu ile elde edilmiş transfekte SKOV-3 hücrelerinin β -katenin inhibitörü cardamonin ile farklı zaman aralıklarında muamele edilmesinden sonra gerçek zamanlı hücre analiz yöntemi ile hücre göç oranının ve hücre proliferasyon düzeylerinin belirlenmesi, akridin/oranj boyama yöntemi ile morfolojik değişimlerin ve apoptotik hücre oranlarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.



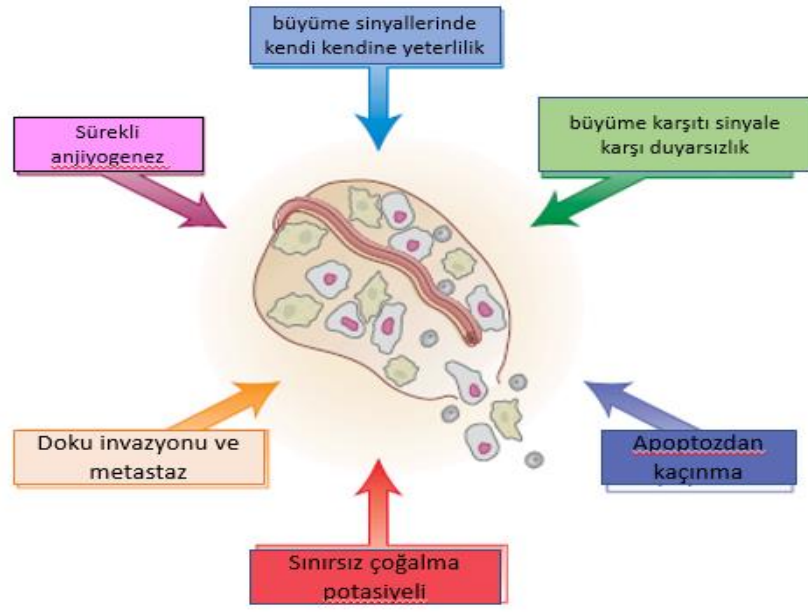
2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Kanser

Normal gelişim sırasında, vücuttaki genetik sistemler büyüme ve ölüm sinyallerine yanıt olarak hücre yaşamı ve ölümü arasındaki dengeyi düzenlemektedir. Kanserde genellikle bu dengeyi kontrol eden mekanizmalarda meydana gelen hatalarda ortaya çıkmaktadır (Lodish vd., 2003). Kanseri vücuttaki hücre veya hücre grubunun kalıtsal veya çevresel faktörlere bağlı olarak kontrol edilemeyecek şekilde çoğalmasıyla meydana gelmektedir. En ayırt edici özelliklerinden bir tanesi değişen metabolizmasıdır. Enerji üretiminde yer alan metabolik yollar tümörün büyüme gereksinimlerini karşılayarak hızla bölünen kanser hücrelerinin büyümesini desteklerken, tümörün ilerlemesini ve metastatik yayılmasını azaltan metabolik sinyalleşmeyi de azaltmaktadır (Nagarajan vd., 2016).

Bir hücrenin kanserleşme sürecine onkogenezi veya karsinogenezi denmektedir ve bu kanser oluşum sürecinin faktörlerin etkisi altında olduğu bilinmektedir. Çoğu kanser tipi, genlerin karsinogen maddeler tarafından değiştirilmesi ya da genlerin onarılmasında ve kopyalanmasında meydana gelebilecek hatalar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Genetik olarak hasarlı hücreler bölündüğünde bu hasar yavru döllere iletilmektedir. Ancak nadiren de olsa tek bir gendeki hasar kanserin başlamasına neden olmaktadır (Lodish vd., 2003).

Çoklu genlerde oluşan mutasyonlar giderek daha hızlı çoğalan hücrelerin oluşmasına ve sonunda hücre gruplarının bir tümöre dönüşmesine neden olmaktadır. Bazen bu birincil tümörlerden gelen hücreler yeni bölgelere göç etmekte (metastaz) ve en büyük sağlık etkisine sebep olan ikincil tümörleri oluşturmaktadır (Lodish vd., 2003). Şekil 1.2.'de kansere neden olan değişiklikler gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Kansere neden olan hücrelerde meydana gelen değişiklikler (Lodish vd., 2003)

Şekil 2.1.'de gösterildiği gibi, agresif kanser fenotipinin ortaya çıkmasında bazı hücresel özelliklerin değişmesi gerekmektedir. Bu özellikler, anjiyogenezin oluşması, apoptozdan kaçınma, büyüme karşıtı sinyallere karşı oluşan duyarsızlık, sınırsız çoğalma potansiyeli, büyüme sinyallerindeki kendi kendine yetebilirlik ve doku invazyonu sonrası metastaz olarak sayılmaktadır (Lodish vd., 2003).

Metastaz genellikle hematojen yayılma şeklinde tanımlanmaktadır. Bununla birlikte ikincil tümörler, vücut boşlukları veya lenfatikler yoluyla yayılma göstermektedir. Kanserli hücreler sağlıklı hücrelere göre mutasyonlara ve fenotipik kaymalara daha yatkındırlar. Buna bağlı olarak tümör hücreleri, belirli dokulardan bazal metabolizmalara veya endotelial hücrelere seçici olarak bağlanabilir ve daha kolay istila edebilmektedir. Metastazı kontrol eden genler, tümör oluşumunu etkilemeden metastazı inhibe ederler. Bu genlere örnek olarak; kadherin 11, kaspaz 8, bağ doku büyüme faktörü ve gelsolin verilebilir. Bu baskılayıcıların varlığı, metastatik potansiyelin kanser hücrelerine tamamen bağlı olmasına karşı çıkmaktadır (Eccles ve Welch, 2007).

Çevresel olarak maruz kaldığımız birçok etken de kansere sebebiyet vermektedir. İlaçlar, bazı alfatoksinler, yağlı yiyeceklerin yanı sıra sigara, alkol, kömür tozu ve

asbestos gibi kimyasallar ve radyasyon, güneş ışığı, mekanik darbeler ve ısı gibi fiziksel etkenler bu çevresel faktörlere örnek gösterilebilmektedir (Yokuş ve Çakır, 2012).

2.1.1. Kanserde genler

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler dahil olmak üzere genlerde meydana gelen belirli mutasyonlar kanserin nedeni olarak tanımlanmaktadır ve kanser genetiği de değişen protein ekspresyonları ve anormal gen ekspresyonlarına odaklanmıştır (Park ve Han, 2019).

Biyolojik sürecin anahtar düzenleyici faktörü olan proto-onkogenler (Kontomanolis vd., 2020), hücrelerin sinyal iletim mekanizmasında görevli pek çok proteinin sentezinden ve ayrıca hücre büyümesi, çoğalması ile farklılaşmasını kontrol ederek aynı zamanda apoptozun baskılanmasında işlev gösteren proteinlerin sentezinden sorumludurlar (Yokuş ve Çakır, 2012).

Bu genler hatalı ifade edildiğinde ya da mutasyona uğradığı durumda onkogenik hale gelmektedir. Proto-onkogenlerin onkogen aktivasyonuna neden olan genetik değişiklikler nokta mutasyonu, kromozomal translokasyonlar, amplifikasyon artışı şeklindedir. Bugüne kadar yaklaşık 50 ila 60 onkogen tanımlanmıştır. Hücrenin bölünmesini uyaran sinyallerin hücre zarından çekirdeğe geçişini sağlayan G-proteini türünde bir proto-onkogeni (RAS) insan tümörlerinde mutasyona uğramıştır. Tirozin kinazı kodlayan proto-onkogen (BRAF), transkripsiyon faktörü (Myc), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), serin/treonin protein kinaz (AKT), sikline bağımlı protein kinaz 4 (CDK4) onkogenlere örnek olarak verilebilmektedir (Kontomanolis vd., 2020).

Normal hücrelerde kanser gelişimini engellemek için tümör baskılayıcı genler de bulunmaktadır. Bu genlerin inaktive olması ya da meydana gelebilecek bir mutasyon kansere sebebiyet vermektedir. Retinoblastoma protein (RB), hücre döngüsünün ilerlemesinde gerekli olan genlerin ekspresyonunu uyarmaktadır ve E2F transkripsiyon faktörlerini baskılayıp G1-S faz geçişini düzenlemektedir (Kontomanolis vd., 2020).

2.2. Yumurtalık Kanseri

Yumurtalık kanseri her yıl dünya genelinde yaklaşık 313.959 yeni kanser vakası ve yaklaşık 207.252'lik bir ölüm sayısı ile jinekolojik maligniteler içinde kanser ölümlerinin önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır. 2020 verilerine göre yumurtalık kanserinde insidans ve ölüm sayısının en yüksek olarak Çin'de olduğu tespit edilmiştir ve onu takiben sırasıyla Hindistan ve Amerika izlemektedir. Ülkemizde ise yumurtalık kanserinde bilinen 4059 yeni vaka sayısı ve 2730 ölüm sayısı belirlenmiştir (http-1).

Yumurtalık kanseri, fallop tüpünde ve yumurtalık yüzeyinde yer alan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla oluşan bir kanser türüdür. Yumurtalık kanserinin büyük bir kısmı yüzey epitel tipinde olan karsinomlardır (Wang vd., 2005).

Yumurtalık kanserinde ölüm oranlarının bu kadar yüksek olmasının nedenlerinin başında III. ve IV. evrede teşhis edilmesi yani hastalığın klinik bulgularının genellikle geç evrelerde ortaya çıkması ile erken teşhis edilememesi gelmektedir (Elsherif vd., 2019). %80'den fazla epitelyal yumurtalık vakası, tümörün periton boşluğuna ve üst karın organlarına yayıldığı aşamada teşhis edilmektedir (Kuroki ve Guntupalli,2020). Bu nedenle 5 yıllık sağkalım oranı evre I hastalığı olanlarda %75 iken, evre IV hastalığı olanlarda bu oran %15'e düşmektedir. Yani hayatta kalma durumu büyük ölçüde tanıdaki hastalığın evresine bağlı bulunmaktadır (Elsherif vd., 2019).

2.2.1. Yumurtalık kanserinin alt tipleri

Yumurtalık kanseri tek bir hastalık değil, ayırt edilebilen moleküler, genetik ve morfolojik özellikleriyle sınıflara ayrılan heterojen bir tümör grubundan oluşmaktadır (Smolle vd., 2013). Bu kanser türü histolojik farklılaşmalara göre üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar epitelyal, germ hücreli tümör ve özel stromal hücreli tümörler şeklindedir (Kroeger ve Drapkin, 2017). Bunların her biri iyi huylu ya da kötü huylu neoplazmalara neden olmaktadır. Epitelyal yumurtalık kanseri yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %90 kadarını oluşturmaktadır ve epitelyal yumurtalık kanseri de kendi içinde yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri (HGSOC), berrak hücreli kanser, müsinöz kanser, düşük dereceli seröz yumurtalık kanseri (LGSOC) ve endometrioid kanser olarak alt tiplere ayrılmaktadır (Elsherif vd., 2019).

Epitelyal yumurtalık kanseri moleküler genetik anormalliklere ve klinik davranışlara göre tip I ve tip II epitelyal tümörler ayırmaktadır (Toss vd., 2015). Tip I

tümörler, yavaş bir şekilde daha uzun bir sürede gelişme göstermekte ve rutin muayeneler sırasında tesadüfen saptanmaktadır (Smolle vd., 2013). Endometrioid kanseri, berrak hücreli kanseri, LGSOC, Brenner tümörleri ve müsinöz kanseri tip I epitelyal yumurtalık kanseri içinde yer almaktadır (Elsherif vd., 2019). Ayrıca tip I tümörler, genetik olarak daha stabildirler ve en sık görülen mutasyonları β -katenin, KRAS, BRAF ve PTEN'dir (Toss vd., 2015).

Tip II tümörler, agresiftir ve ileriki evrelerde teşhisi yapılmaktadır. Epitelyal tümörlerin yaklaşık %70'lik kısmını tip II tümörler oluşturmaktadır. Aynı zamanda yüksek genomik kararsızlığa sahip tümörlerdir. HGSOE, yumurtalık karsinosarkomu, farklılaşmamış karsinomlar ve yüksek dereceli endometrioid karsinom tip II tümörler içinde yer almaktadır (Elsherif vd., 2019). Tip II tümöre sahip olan hastaların yaklaşık %95'inde mutasyona uğrayan gen p53 genidir (Toss vd., 2015).

2.2.2. Risk faktörleri

Kadınlarda yumurtalık kanseri riski, genel popülasyonda %1.3 - %1.9 oranında iken BRCA1 geninde meydana gelen mutasyon sonucunda bu kansere yakalanma riski %45 olarak değişmektedir (Menon vd., 2018).

2.2.2.1. Genetik eğilim / aile geçmişi

Yumurtalık kanseri riskinin yaşam tarzı, üreme gibi faktörlerle ilişkili olduğu düşünülse de, risk faktörleri arasında en güçlü olan faktör aile öyküsüdür (Andrews ve Mutch, 2017). Yani ailede yumurtalık kanseri öyküsünün olması riskin arttığını göstermektedir. Kalıtsal koşullar yumurtalık kanserinin %5-25 kadarını oluşturmaktadır (Menon vd., 2018). Kalıtsal kanserlerin büyük oranda BRCA genlerindeki mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Bu genle alakalı mutasyonların çoğu yüksek dereceli seröz tümörlere neden olmaktadır. Yine DNA uyumsuzluğu onarımında rol oynayan genlerde mutasyonun meydana gelmesiyle oluşan Lynch Sendromu (LS) da yumurtalık kanseri riskini artırmaktadır (Andrews ve Mutch, 2017). Ayrıca birinci derece akrabada yumurtalık kanseri tanısı varsa bu kişilerde yumurtalık kanserine yakalanma riski 3 kat fazla olmaktadır (Elsherif vd., 2019).

2.2.2.2. Yumurtlama

Yumurtalık kanserinin yumurtlama ve adet döngüsü ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bir kadında tamamlanan daha fazla sayıdaki yumurtlama döngüsü, yumurtalık kanseri riskinin çok daha fazla olduğunu göstermektedir. Bunun nedeninin ovulasyon sırasında fallop tüplerinin proinflatuar yanıtının olabileceği düşünülmektedir. Bu durumda adet döneminin erken başlaması, gebelik, doğum kontrol kullanımı ve emzirme gibi ovulasyonu kesintiye uğratan faktörlerin yumurtalık kanseri riskini azaltacağı bilinmektedir (Stewart vd., 2019).

2.2.2.3. Endometriozis

Endometriozis ile ilişkili olan yumurtalık kanseri daha çok genç yaştaki kadınlarda gelişim gösterme eğilimine sahiptir (Stewart vd., 2019). Yapılan bir vaka-kontrol çalışmasında endometriozis sonrası ekzojenin ya da hiperöstrojenizmin yumurtalık kanserinin başlamasında etkili bir risk faktörü olduğunu belirtmiştir (Zanetta vd., 2000). Genel olarak daha iyi prognoz gösterdiği bilinmektedir. Ancak lezyonların alınmasının yumurtalık kanseri gelişimini azaltacağına yönelik bir kanıt bulunmamıştır (Stewart vd., 2019).

2.2.2.4. Vücut ölçüsü ve fiziksel aktivite

Yapılan araştırmalarda vücut ölçüsü ile yumurtalık kanseri arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada obezitenin yumurtalık kanseri üzerinde ölüm riskini artırarak hayatta kalma durumunu azalttığı belirlenmiştir (Bandera vd., 2017). Vücutta yağlanma ve periferik dokularda androjen dönüşümündeki artış durumu yumurtalık kanseriyle ilişkilidir (Momenimovahed vd., 2019). Yapılan başka bir çalışmada obez kişilerin hormonal mekanizmasının hem yumurtalık kanseri riskini artırıp hem de ölüm oranında bir artışa neden olduğu belirtilmiştir (Leitzmann vd., 2009).

2.2.2.5. Alkol ve sigara

Yüksek miktarlarda alkol tüketimi, üreme sorunları ve menstrüel anormalliklere neden olmaktadır. Buna rağmen alkolün yumurtalık kanseri riskini artırdığına dair çok az kanıt bulunmaktadır (Andrews ve Mutch, 2017).

Sigara kullanımında menapoz öncesi ve sonrası dönemde içilmesinin yumurtalık kanseri riskini etkilemediği düşünülmektedir. Ancak yapılan bir çalışmada müsinöz

tümör riskini belli ölçüde artırmasına rağmen diğer over kanseri türlerinde ilişkisi olmadığı belirlenmiştir (Marchbanks vd., 2000).

2.2.3. Yumurtalık kanserinde etkili olan genler

Kalıtsal yumurtalık kanserinin yaklaşık olarak %23 yani beşte birinden fazlası kalıtsal koşullardan oluşmaktadır. Bu kanser türünün yaklaşık %65-85’inde gözlenen anormallikler BRCA genlerinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Toss vd., 2015).

BRCA1 ve BRCA2, homolog rekombinasyon yolu ile DNA onarımını düzenleyen ve genomun bütünlüğünü korumasında büyük bir role sahip olan proteinlerdir (Kroeger ve Drapkin, 2017). Aynı zamanda bu genler apoptoz ve hücre döngüsü kontrolü içinde hayati önem taşımaktadır. Yumurtalık kanseri için yaşam boyunca oluşan riskler BRCA1 mutasyonlu kadınlarda %35-46 arası iken, bu oran BRCA2 mutasyonu kadınlarda %13-23 arası ve Lynch Sendromlu kadınlarda %3-20 arasında değişmektedir (Elsherif vd., 2019).

BRCA1 ve BRCA2 genleri 1990’lı yılların başında tanımlanmış ve sırasıyla 17q ve 13q kromozomlarında yer aldığı belirlenmiştir. Oldukça büyük ve seksen bin baz çiftini kapsayan genlerdir (Andrews ve Mutch, 2017). BRCA genlerindeki mutasyonlar tüm HGSOc’lerin %15-20’sini oluşturur ancak BRCA ağındaki homolog rekombinasyon ve işlev bozukluğu HGSOc’nin yaklaşık yarısının homolog rekombinasyona dahil olan genlerde meydana gelen değişiklikleri barındırmasıyla birlikte daha yaygın hale geldiği bilinmektedir (Kroeger ve Drapkin, 2017).

Bu genlerin mutasyonu olan kadınlarda alt tipler arasında en fazla yüksek dereceli seröz adenokarsinom görülmektedir. BRCA1 ve 2 germ hattı mutasyonlarına sahip kadınlarda teşhis edilme durumu ileri evrelerde gözlenmekte, ancak ileri evrede gözlenmesine rağmen tedaviye daha iyi yanıt verildiği bilinmektedir. Bunun yanında tedaviye karşı kazanılan direnç hem sporadik HGSOc hem de kalıtsal HGSOc için tipik bir durumdur. HGSOc’nin dört moleküler alt tipi tanımlanmıştır. Bunlar C1/mezenkimal, C2/immünoreaktif, C3/4/farklılaşmış ve C5/proliferatiftir. BRCA1 ile ilişkili olan kanserlerin C2’ye ait olma olasılığı daha yüksek iken BRCA2 tümörleri bunlardan ayırt edilememektedir (Andrews ve Mutch, 2017).

Yüksek dereceli seröz yumurtalık kanserinin ayırt edici özelliklerinden biri, tümör baskılayıcı gen olan p53'teki evrensel mutasyonların varlığıdır. p53 geninin en yaygın mutasyon bölgesi, DNA bağlama alanıdır ve bu genin mutasyonu fallop tüpü salgı hücrelerinin transformasyonunda bilinen ilk molekül olaydır (Kroeger ve Drapkin, 2017).

Li-Fraumeni Sendromu bu genin mutasyonları ile meydana gelen otozomal dominant kanser sendromudur. p53 stres sinyallerine yanıt olarak aktif hale gelmektedir ve apoptoz, hücre proliferasyonu ile ilgili transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. İnsan kanseri arasında en sık mutasyona uğrayan gen olarak bilinmektedir ve epitelyal yumurtalıkta bu oran %47 civarındadır. p53 mutasyonlarında gelişen tümörler, daha kötü hayatta kalma oranı, radyasyona ve kemoterapiye karşı yüksek direnç ile fazla nüks oranı ile karakterize olan tümörlerdir (Toss vd., 2015).

Yumurtalık tümörü vakalarının çoğundaki genetik anormallikler büyük oranda BRCA genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda uyumsuz onarım genleri, çift zincir kırıklarının onarılmasında yer alan DNA onarım proteini (RAD51 rekombinaz), kontrol noktası kinaz 2 (CHEK2) ve p53 geni kalıtsal yumurtalık kanserinde mutasyona uğramış diğer genlerdir. Kalıtsal yumurtalık tümörjenez mekanizmasına en az 16 genin dahil olduğu bilinmekte, ancak bazı mutasyonlar hala belirsizliğini korumaktadır (Toss vd., 2015).

2.2.4. Klinik bulgular

Yumurtalık kanseri semptomlarının her geçen gün farkındalığının artmasına rağmen, semptomların öngörücü değeri düşük olabilmektedir. Genel popülasyona bakıldığında kadınlar arasında yumurtalık kanseri riskleri ve semptomları hakkında farkında olma durumu oldukça düşüktür. Yumurtalık kanseri olanların tanıdan en az birkaç ay önce semptom göstereceği düşünülmektedir (Gajjar vd., 2012).

Yumurtalık kanseri semptomlarını belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda en yaygın semptom şişkinlik veya artan karın boyutu ile karın veya pelvik ağrı belirtilmiştir (Dilley vd., 2020). Yumurtalık kanserini teşhis etmek adına yapısal, gastrointestinal ve abdominal semptomlara eşit önem verilmesi gerektiği önerilmektedir. Goff ve arkadaşlarının (2000) geliştirdiği semptom indeksine göre dört semptomun önemli olduğu kabul edilmiştir ve bunlar karın boyutunda artış/şişkinlik, karın/pelvik ağrısı, yeme güçlüğü ve hızlı doyma hissi ile acil ve sık şekilde idrara çıkma isteğidir. Ayrıca

vajinal kanama, değişen bağırsak alışkanlıkları, vajinal akıntı ve hazımsızlık diğer semptomlar arasında yer almaktadır (Gajjar vd., 2012). Semptomlara bakıldığında kadınların yarısından fazlasının karın semptomları şeklinde şikâyet gösterdiği bilinmektedir (Dilley vd., 2020).

2.2.5. Tedavi yöntemleri

Yumurtalık kanseri tedavisi şu anda geleneksel olarak öncelikle etkilenen dokunun cerrahi işlemle küçültülmesi ya da alınması ve sonrasında uygulanan kemoterapi işlemidir (Stewart vd., 2019). Ancak uygulanan bu tedavilere rağmen nüks oranı oldukça yüksektir. Nedeni ise vakaların %70'lik kısmının geç evrede teşhis edilmesidir. Meydana gelen olumsuz prognoz da kemoterapi direncinin erken gelişiminden kaynaklanmaktadır. Çoğu hastanın hayatını kaybetmesi durumu da nüks yüzünden olmaktadır (Smolle vd., 2013).

BRCA1/2 genlerindeki mutasyonla ilişkili kanserleri olan hastalar, tanımlanabilen germ hattı mutasyonu olmayan hastalara göre daha uzun sağkalıma sahip olma eğilimi göstermektedir. Bu kanserlerin, DNA hasarına yol açan platin bazlı kemoterapiye daha duyarlı olduğu bulunmuştur (Andrews ve Mutch, 2017). Cerrahi işlemlerden önce tümör yükünü azaltmak amacıyla neoadjuvan tedavisi uygulanmaktadır. Paklitaksel ve karboplatin kombinasyonu yumurtalık kanseri için birincil kemoterapi tedavisi olarak kalmaktadır (Stewart vd., 2019).

Son zamanlarda alternatif onarım yollarını bloke eden Poli-ADP-Riboz-Polimeraz (PARP) inhibitörleri adı verilen ilaçlar geliştirilmiştir (Andrews ve Mutch, 2017). PARP inhibitörleri baz eksizyon onarımını bloke ederek DNA tek zincir kırıklarının birikmesine yol açmaktadır. Normal hücrede bu zincir kırıkları tümör baskılayıcı BRCA1/2 sayesinde onarılmaktadır. Bunların yokluğunda ise hücre ölümü gözlenmektedir. Bu yüzden PARP inhibitörleri işlevsiz DNA onarımı olan tümör tedavisi için uygun ilaçlardır (Smolle vd., 2013).

Sitoredüktif cerrahisi sonrasında gelişme gösteren epitelyal kanserleri olan hastalar için intraperitoneal tedavi uygulanmaktadır. Bu yöntem, hasta sağkalımını artırmak amacıyla umut vaat eden bir yöntem olarak bilinmektedir. Tedavide, karın duvarında küçük bir kesi atılır ve kateter deri altı dokusundan geçirilerek kemoterapötik ilaçlar kaviteye yerleştirilmektedir. İlk evre hastalarda bu ameliyatın yapılması önerilmektedir. Bu ameliyattan sonra ise kemoterapi verilmesi önerilmektedir (Stewart vd., 2019).

Tümörlerin immünolojik olarak yıkılması tümör reddini ortaya çıkarmak için kritik noktada modüle edilebilen ve hedeflenen koordineli bir süreci oluşturmaktadır. Yumurtalık kanseri kanser immünoterapisinin başarılı olarak uygulanmasındaki engel, immünosupresif tümör mikroortamıdır. İmmünoterapi ile hastalarda çok sayıda tümöre özgü T hücresi üretilmesine karşın, bu T hücreleri tümör hedeflerini kolayca yok edebilmektedir (Odunsi, 2017).

Yumurtalık kanseri heterojen doğası nedeniyle farklı tümör moleküllerini hedefleyen tedavilere verilen yanıtlarda bireyler arasında farklılık göstermektedir. Sonuçta yumurtalık kanseri hastalarında daha fazla bireysel tedavilerin uygulanmasını kolaylaştırmak için hastalığın gelişmesi ve tedavi müdahalesinde belirli moleküllerin rollerinin deşifre edilmesi, birçok fenotipik araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir (Yang vd., 2020).

2.3. β -Katenin

2.3.1. Yapısı ve işlevleri

β -katenin, 96 kDa ağırlığında ve 782 aminonasitten oluşmuş bir proteindir. Yapısında on iki adet korunmuş tekrar bölgesi bulunmaktadır. α -heliks şeklinde olan üç boyutlu konformasyonu pozitif yüklü oluklardan oluşmaktadır. Aynı zamanda β -katenin birçok biyomolekül içinde bağlanma bölgesine sahip bir proteindir. CTNNB1 geni tarafından β -katenin proteini kodlanmaktadır. Hücre adezyonunda görevli E-kaderin ile hücre iskelet elemanlarından α -aktin arasında köprü görevi görmektedir (Dönmez vd., 2011).

Wnt, hem β -katenin bağımlı (kononik Wnt) hem de β -katenin bağımsız (kanonik olmayan Wnt) sinyal yollarını düzenlemede sorumlu β -kateninin baş düzenleyicisi olarak bilinmektedir (Shang vd., 2017). Sistein bakımından zengin glikoprotein olan Wnt'ler, hücre dışı matrikse salgılanan ve hücreler ile reseptör aracılı sinyalleşmeyi de aktive edebilmektedir (Pai vd., 2017).

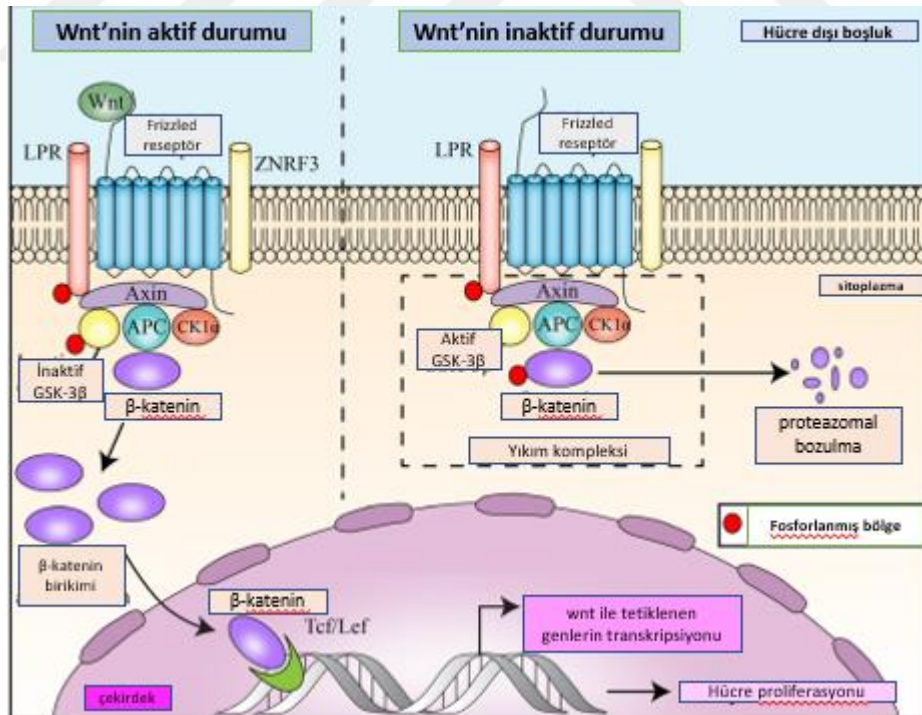
Wnt/ β -katenin sinyali, genetik stabilite, çoğalma, göç, farklılaşma, kök hücre yenilenmesi ve apoptoz gibi temel hücresel işlevleri düzenlemektedir. Bu sinyal yolunun aktivasyonu için β -katenin temel bir bileşendir (Pai vd., 2017). Bu yolun anormal aktivasyonu çekirdekte β -katenin birikimine neden olur ve c-Myc gibi birçok onkogenin transkripsiyonunu düzenlemektedir. Bu durumun sonucunda da yumurtalık kanseri,

akciğer kanseri, kolon kanseri ve pankreas kanseri gibi birçok kanserin karsinogenezinin neden olmaktadır (Shang vd., 2017).

2.3.2. Wnt/ β -katenin sinyal mekanizması

Wnt ligandlarının olması durumunda β -katenin sinyali aktif hale gelmektedir (Nguyen vd., 2019). Bir Wnt sinyali olmadığı durumda sitoplazmik serbest β -katenin seviyeleri düşük tutulmaktadır (Valenta vd., 2012).

Bu sinyal mekanizması Wnt proteininin hücre zarına ulaşarak burada bulunan Frizzled (Fzd) transmembran reseptörü ve düşük yoğunluklu lipoprotein ile ilgili reseptörler 5 ve 6 (LRP5/6) bağlanması ile başlamaktadır (Dönmez vd., 2011). Wnt, reseptörün sistein bakımından zengin alanına bağlanmakta (Pai vd., 2017) ve bu bağlanma β -katenin yıkım kompleksinin inhibisyonuna neden olan birçok moleküler olayı başlatmaktadır (Valenta vd., 2012). Sinyal mekanizması Şekil 2.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Wnt β -katenin sinyal yolu mekanizması (Pai vd., 2017).

Bağlanma sonrasında hücre zarında başlamış olan sinyalin sitozole aktarımı gerekmektedir. Bu aktarım işlemi iki basamakta gerçekleşmektedir. Basamaklardan biri Dishevelled (DVL) proteininin fosforillenmesi iken ikinci basamakta LRP5/6 reseptörünün fosforillenmesini oluşturmaktadır. Bu fosforillenme reaksiyonları reseptörlerde meydana gelen konformasyonel değişimlerin etkisinden meydana gelmektedir. Bu şekilde sinyal hücre zarından sitozole aktarılmış olmaktadır ve bu sinyalin hedefi artık yıkıcı komplekstir.

Yıkıcı kompleks β -katenin yıkımından sorumlu olan bir komplekstir ve Wnt sinyalinin başlaması durumunda inaktif hale geçmektedir. İnaktif hale geçen ve dağılan yıkıcı kompleksin β -katenin fosforileme durumu da ortadan kalkmaktadır. Fosforillenmemiş β -kateninin bir kısmı hücre zarında hücre bağlantılarında görev alırken bir kısmı da sitoplazmada birikme göstermektedir. Biriken bu β -kateninler çekirdeğe girmekte ve oluşan sinyali çekirdeğe ulaştırmaktadır (Dönmez vd., 2011). Çekirdeğe girdikten sonra β -katenin T hücresi faktörü (TCF)/ lenfoit güçlendirici faktörler (LEF) üyeleri ile bir kompleks oluşturmakta ve Groucho denilen transkripsiyonel baskılayıcının yerine geçmektedir. Aktif olan bu β -katenin/TCF kompleksi sonrasında hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatabilmektedir (Nguyen vd., 2019).

Sinyalin inaktif durumunda ise Wnt, reseptörlere bağlanma gösterememektedir ve buna bağlı olarak da DVL proteini ile LRP5/6 reseptörü fosforillenmemektedir. Böylece yıkıcı kompleks inaktif duruma geçememekte ve aktif formda kalmaktadır. Kompleks β -katenine sıkıca bağlanmıştır. Bu kompleks adenomatöz poliposis koli (APC), AXIN, glikojen sentaz kinaz -3β (GSK- 3β) ve kazein kinaz 1 (CK1) biyomoleküllerinden oluşmaktadır.

Bağlanma sonrasında önce CK1 α enzimi ile sonra GSK- 3β enzimi tarafından β -katenin fosforillenmesi gerçekleşmektedir. Bu fosforillenme işlemi yıkım için bir etiket görevi görmektedir. Buna bağlı olarak parçalanmış β -katenin çekirdeğe giriş yapamaz ve sinyal yolu inhibisyonu gerçekleşmiş olur. (Dönmez vd., 2011).

2.3.3. Hücre-hücre bağlanmasındaki rolü

β -katenin hücreSEL farklılaşma ve çoğalmadan sorumlu olan genlerin transkripsiyonunu aktive etmekte ve Wnt sinyal yolunda etkisi bulunmaktadır (Brembeck vd., 2006). Bir Wnt uyarının olmaması durumunda β -katenin hücre-hücre bağlantılarının

bir bileşeni şeklinde zarın sitoplazmik kısmında yer almaktadır (Valenta vd., 2011). β -katenin zarda E-kaderin aracılı hücre yapışmasını kontrol etmekte ve bu bağlantı moleküllerinin aktin hücre iskeleti ile etkileşiminde aracı görevine sahip olmaktadır. Bu iki işlevi de regüle edebilmekte ve bu sayede hücre-hücre bağlantısının kaybına ve Wnt hedef genlerinin artan transkripsiyonuna neden olmaktadır (Brembeck vd., 2006).

β -katenin ve kaderin etkileşimi yapıcıdır ve tek izole edilmiş hücrede bile yapışma göstermeden bağımsız olarak meydana gelmektedir. Oldukça dinamik olan bu kaderin-katenin kompleksinin, kaderin aracılı hücre bağlanma kaybı göstermesi durumunda β -katenin salınımı ve buna bağlı olarak da sinyalleme aktivitesi desteklenmektedir (Valenta vd., 2011).

2.3.4. Wnt/ β -katenin ve kanser

Wnt/ β -katenin sinyal yolunun deregüle olması , çeşitli kanser türlerinin başlayıp ilerlemesi ile ilişkisi bulunmaktadır (Zhang ve Wang, 2020). Yine Wnt reseptörlerinin anormal olarak aktive olması, akciğer, meme, kolon ve kemik iliği gibi çok fazla dokuda tümör oluşumunu tetiklemektedir. Bu sinyal çoğu durumda göçü ve hücre istilasını artırarak tümörün metastaz göstermesini teşvik etmede, hücre göçünü engelleyip daha düşük proliferasyon indeksi de sağlamaktadır. Wnt/ β -kateninin bu durumu aslında karmaşıklığı daha da artırmaktadır. Wnt/ β -katenin sinyalleşmesi tümör immünolojisinin düzenlenmesine de katkı sağlamaktadır (Shang vd.,2017).

β -katenin sinyalinin aktive olması, çeşitli tümörlerin oluşumunda rol oynamaktadır ve aktive olmuş β -katenin formu farklı hücre tiplerinde hücre göçünü indüklemektedir (Müller vd., 2002). Karsinogenezde β -kateninin artış gösteren transkripsiyonel aktivitesi, E-kadherin aracılı hücre yapışması kaybıyla ilişkilendirilmektedir. β -katenin ve E-kadherin etkileşiminde meydana gelen kayıp, epitelyalden mezankimal geçişi teşvik ederek β -katenin transkripsiyonel aktivitesini artırarak sonuçta hücre göçünü artırabilmektedir (Debelec-Butuner vd., 2014).

2.3.5. Wnt/ β -katenin ve yumurtalık kanseri

Wnt/ β -katenin sinyal yolu tüm yumurtalık kanseri alt tipleri ve kanser kök hücrelerinde (CRC) karsinogenezde aktif role sahip bulunmaktadır. Yapılmış araştırmalar yumurtalık kanserinde kanser kök hücrelerinin metastaz ve tümör nüksüyle ilişkili olduğunu göstermektedir. β -katenin genindeki mutasyonları sıklıkla, endometrioid

yumurtalık karsinomları barındırmaktadır. Diğer alt tiplerinde ise nadir olarak görülmektedir. Wnt/ β -katenin hedef genleri tümör progresyonunda erken dönemde aktif hale gelen ‘stemness/proliferasyon grubu’ ve geç evre tümörlerde eksprese ‘EMT/yayılım grubu’ şeklinde iki grup altında toplanmaktadır. Bu hedef genler hücre proliferasyonu ve apoptozu düzenleyerek kanserin başlayıp devam etmesine neden olmaktadır (Arend vd., 2013).

2.3.5.1. Yumurtalık kanseri Wnt/ β -katenin sinyal yolunda meydana gelen değişimler

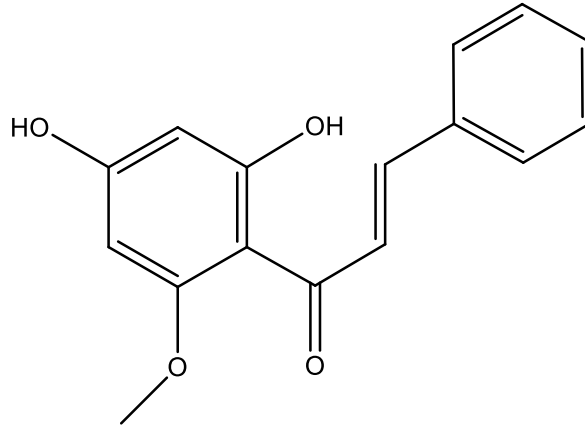
Epitelyal yumurtalık kanserinde yer alan Wnt/ β -katenin sinyal yolunda meydana gelen en yaygın genetik değişiklik β -katenin geni olan CTNNB1’de görülmektedir. Bu gende oluşan mutasyonlar β -katenin birikmesine ve hedef genlerin transkripsiyonunun artmasına neden olmaktadır (Nguyen vd., 2019). Bunlar dışında yıkım kompleksinde de AXIN, APC, GSK-3 β bileşenlerinde çeşitli mutasyonlar tespit edilmiştir. β -katenin bozunması için önemli olan bu yıkım kompleksi bileşenlerinin işlevsel olmayan hale gelmesi hiperaktif β -katenin sinyaline neden olmakta ve buna bağlı olarak da onkogenezi yönlendirdikleri bilinmektedir (Nguyen vd., 2019).

Wnt ligandları olan Fzd ve LRP5/6’da meydana gelen mutasyonlarda Fzd ligandının Fzd 1 ve Fzd 5 olan iki alt tipinin epitelyal yumurtalık kanserinde arttığı belirlenmiştir (Arend vd., 2013).

Wnt/ β -katenin sinyali, bazı reseptörleri için Wnt ligandları ile rekabet halinde olabilmekte ve Wnt aktivasyonunu engelleyecek negatif düzenleyiciler tarafından kontrol edilmesi sağlanmaktadır. Bu düzenleyicilerin gösterdiği anormal seviyeler, Wnt/ β -katenin aktivite düzensizliği ve epitelyal yumurtalık kanseri gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Nguyen vd., 2019).

2.3.6. Cardamonin ile β -katenin inhibisyonu

Alpinia türünden ekstrakte edilmiş cardamonin bir kalkondur ve kimyasal olarak (E)-2',4'-hidroksi-6'-metoksi kalkon olarak bilinmektedir. Molekül formülü C₁₆H₁₄O₄’tür. Kalkonlar pek çok bitki yaprağında, kökünde ve meyvesinden bulunmaktadır (Ramchandani vd., 2020). Bu da diyetle halihazırda bulunmuş bitkilerden doğal olarak meydana gelme avantajını göstermektedir (Gonçalves vd., 2014). Şekil 2.3.’te cardamoninin moleküler yapısı verilmiştir.



Şekil 2.3. Cardamonin moleküler yapısı

Cardamonin patojenleri hedefleyip bağışıklık sistemini modüle etmede görevli bir kalkondur. Cardamonin yumurtalık kanseri, meme, akciğer, lösemi, kolon ve mide gibi birçok insan kanserinde etkili olduğu araştırmalar sonucunda belirlenmiştir (Ramchandani vd., 2020; Lu vd., 2018; Shrivastava vd., 2017; Zhou vd., 2019). Yumurtalık kanserinde cardamoninin, apoptozu indüklediği ve mTOR, Bcl-2 ve survivin seviyelerini azaltarak SKOV-3 ve A2780 hücre hatlarında anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Yine G2/M fazındaki hücre döngüsünün durmasına neden olmuş ve sisplatin ile tedavide daha güçlü bir kanser önleyici olduğu kanıtlanmıştır (Niu vd., 2018).

Cardamoninin Wnt/ β -katenin, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT-3) ve NF- κ B gibi sinyal yollarını hedefleyip anti-tümör aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu yolların zayıflatılmış olması kemoterapötik ajanlarla veya tek başına hücre döngüsünü durdurup hücre ölümüne neden olmaktadır (Ramchandani vd., 2020).

2.4. Apoptoz

Vücutta hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında belli bir denge bulunmaktadır. Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz, istenmeyen, yaşlanmış ve zararlı olan hücrelerin programlı olarak öldürülmesini esas alan bir ölüm şeklidir (Kaya vd., 2012).

Apoptoz mekanizması oldukça karmaşık ve pek çok sinyal yolunu içeren bir mekanizmadır (Pistritto vd., 2016). Bu mekanizma hücre tipi ve uyarana göre farklılık gösterebilmektedir. Apoptozu etkileyen hücre içi uyarılar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve büyüme faktörleri iken, diğer uyarılar sitokinler, hücre içi kalsiyum

miktarında artış, tümör nekroz faktör (TNF), Fas/FasL aktif olması ve p53 geninin aktif olmasıdır (Tomatır, 2003).

Apoptotik hücreler morfolojik olarak hücre dışı kısımda fosfotidilserinin (PS) zara maruz kalması durumu, plazma zarında meydana gelen tomurcuklanma, kromotin yoğunlaşması, DNA parçalanması ve sitoplazmik hücre büzülmesi göstermektedir. Plazma zarı ise toplam süreç boyunca sağlam olarak kalmaktadır. Genellikle de apoptotik cisimcikler oluşmadan önce fagositik hücreler apoptotik hücreleri yutmaktadır (Pistritto vd.,2016).

2.4.1. Apoptozun düzenlenmesi

Apoptozun düzenlenmesinde Bcl-2 ailesi, kaspazlar, p53, kalsiyum ve sitokrom c gibi proteinlerin büyük rol oynadığı bilinmektedir. Hem içsel hem de dışsal apoptotik yolu düzenleyen proteinler kaspazlardır (Goldar vd., 2015). Kaspazlar olarak bilinen sistein proteazları spesifik olarak aspartat kalıntılarında susbtrat proteini parçalamaktadır. Başlatıcı ve efektör olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Başlatıcı apoptotik kaspazlar (kaspaz-2, 8, 9) dimerizasyon ile indüklenen aktivasyon için gerekli adaptör protein ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşim bir kez olduğunda başlatıcı kaspazlar efektör kaspazları parçalamaktadır. Efektör kaspazların (kaspaz-3, 6, 7) dimerizasyon kaynaklı aktive olmada adaptör proteinlere ihtiyaçları yoktur. Aktive olmuş efektör kaspazlar bir dizi protein substratını parçalayarak hücresel bileşenlerin sonrasında parçalanmasına neden olmaktadır (Matsuura vd., 2016).

2.4.2. İçsel apoptototik yolak

Bu yolak farklı stres koşullarına yanıt olarak mitokondriyal düzeyde hücre içi sinyallerle sağlanmaktadır. İçsel apoptotik yolun başlamasındaki tetikleyiciler, hipoksi onarımı olmayan genetik hasarlar, oksidatif stres ve yüksek sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarıdır (Pistritto vd., 2016).

Mitokondriden sitokrom c salınması ile ve mitokondriyal dışı membran geçirgenliğini (MOMP), apoptoz proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve başlatıcı kaspaz-9 ile apoptozom oluşumunu ve sonrasında da kaspaz-3'ün aktivasyonunu içeren bir yoldur. Sitokrom c salınması Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W gibi apoptotik üyeler ile negatif düzenlenirken, Bak, Bax, Bim, Puma gibi pro-apoptotikler tarafından pozitif

düzenlenmektedir. Bax ve Bak apoptozun merkezi efektörleridir (Carneiro ve El-Deiry, 2020).

Apoptotik uyarılmanın ardından Bax ve Bak aktif hale geçer ve dış mitokondriyal membrana girip sitokrom c, SMAC/DIABLO, apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi proteinlerin salınımına sebep olmaktadır. Sonrasında sitozolde Apaf-1 ile etkileşime girmekte ve apoptozom denilen kompleksi oluşturmaktadır. Apoptozom oluşumu da kaspaz-9 aktivasyonuna neden olarak sonrasında kaspaz-3 aktive edilmektedir. Böylece yıkıma neden olan kaspaz kaskadı başlatmaktadır (Goldar vd., 2015).

2.4.3. Dışsal apoptotik yolak

İkinci bir ölüm yolu olan dışsal apoptotik yolda ölüm reseptörleri olarak bilinen hücre zarı proteinleri ile apoptozu başlatmaktadır (Carneiro ve El-Deiry, 2020). Ölüm reseptörleri, apoptozu indükleme sinyalinde büyük öneme sahip ölüm alanı (DD) olarak adlandırılan hücre içi protein-protein etki alanı oluşmaktadır (Pistritto vd., 2016).

Fas Ligandı (Fas-L), TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) ve tümör nekroz faktörü (TNF) transmembran reseptörlerinin (FAS, TNFR, DR5) hücre dışı alanına bağlanmaktadır. Ligandın reseptöre bağlanması ile ölüm reseptörleri hücre içi ölüm alanı yoluyla TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanına (FADD) karşılık gelen protein motifi ile bağlanma göstermektedir. Bu proteinler başka bir protein etkileşim alanı olan ölüm etki alanına (DED) sahiptir (Goldar vd., 2015).

FADD'ın DED bölgesi ile etkileşime giren prokaspaz-8 de bu DED alanını içermektedir. Pro-kaspaz-8'in aktive olabilmesi için ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşmaktadır ve sonrasında kaspaz-8 aktif hale geçmektedir. Bu aktivasyon sonrası da hücre içi yapıların ve çekirdeğin hasar görmesi yoluyla hücre ölümüne neden olacak efektör kaspazlar aktive edilmektedir. (Goldar vd., 2015).

2.4.4. Apoptoz ve yumurtalık kanseri

Korunmuş apoptotik süreçlere rağmen kanserli hücreler pro-apoptotik hücre ölümü bileşenlerini inaktif hale getirip anti-apoptotik molekülleri değiştirerek apoptozu inhibe etmek amaçlı mekanizmalar geliştirmektedir (Binju vd., 2019).

Pro-apoptotik proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişiklikler kemosenzitivite ve kemorezistans olarak yumurtalık kanseri bazlı çalışmaların ortak

noktası olmaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 aile üyeleri tarafından kanser hücreleri, hayatta kalma mekanizmalarına aracılık edip tümör ilerlemesine izin vermektedir. Bcl-2 yumurtalık kanseri hücrelerinde ilaç direncini artırma ve hayatta kalma ile tanımlanmaktadır. Yumurtalık kanseri patolojisinde IAP yapılan çalışmalarla belirgin hale gelmiştir. Apoptozu düzenleyen IAP ailesinden X'e bağlı apoptoz inhibitörü (XIAP) bu düzenlemeyi kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'u inhibe ederek gerçekleştirmektedir (Al-Alem vd., 2019).

Yumurtalık kanserinde IAP'ların deregüle edildiği ve yumurtalık kanserinde XIAP'ın kemo-direncinde rol oynadığı belirlenmekte ve buna bağlı olarak da XIAP'ın inhibe olmasının, platine direnç gösteren yumurtalık kanseri hücrelerinde in vitro ve in vivo olarak artan apoptoza yol açan bir mekanizma olduğu bilinmektedir (Binju vd., 2019).

Küçük molekülü inhibitör olan TW-37'nin Bcl-2 üzerindeki inhibitör etkisi olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada yumurtalık kanserinde sisplatin ile uyarılmış olan apoptozu artırmada etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve SKOV-3 hücrelerinde yüksek Bcl-2 seviyelerine sahip hücrelerde kombine sisplatin ve TW-37'nin tedaviden sonra hücre büyümesini önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir (Wang vd., 2015).

2.5. MikroRNA (miRNA)

2.5.1. Tanımı

Enerji metabolizmasını yöneten temel mekanizmalardan birisi gen ekspresyonunun transkripsiyonel düzenlenmesidir. Bu düzenlemeye katılan ve mikroRNA (miRNA) olarak adlandırılan birçok RNA sınıfı bulunmaktadır (Wei ve Wong, 2013). Ökaryotik DNA'ların %90'lık bir kısmı RNA'ya transkribe olmakta (Güzelgöl ve Aksoy, 2015) ve yaklaşık %1.5 kadarı protein kodlanmasından sorumlu bulunmaktadır (Karaarslan ve Serin, 2016). Proteine çevrilmesi olmayan RNA'lar kodlamayan RNA'lar olarak adlandırılmaktadır. Kodlamayan RNA'lar düzenleyici ve yaşam için gerekli kodlanmamış RNA olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yaşam için gerekli olanlar tüm dokularda bulunup bu dokularda birçok işlevi gerçekleştirirken, gen ifadesini düzenleyen kodlamayan RNA'larda nükleotit sayısına göre kısa ve uzun kodlamayan RNA'lar olarak ikiye ayrılmaktadır (Güzelgöl ve Aksoy, 2015). Şimdiye kadar yaklaşık olarak 2500 insan miRNA'sı bulunmuştur (Kim ve Croce, 2021).

Kısa kodlamayan RNA sınıfında yer alan miRNA'lar, *Caenorhabditis elegans*'ta (*C.elegans*) 1993 yılında Lin-4 adıyla yapılan çalışma sonucunda keşfedilmiştir (Lee vd., 1993). Yaklaşık 18-25 nükleotit uzunluğunda, mesajcı RNA (mRNA) bozunmasını teşvik edip ya da mRNA translasyonunu inhibe edip, transkripsiyon sonrasında gen ekspresyonunu modüle etme yeteneğine sahip RNA'lardır (de Sousa vd., 2019).

miRNA'lar insan genomunda X kromozomu üzerinde kümelenmiş şekilde ya da tek olarak lokalize olmuşlardır. Y kromozomu üzerinde miRNA tespit edilmemiştir (Çınar ve Dursun, 2016). miRNA'lar insan genomunun %1-5'lik kısmını oluşturmakta ve protein kodlayan genlerin de yaklaşık %30 kadarını düzenlediği bilinmektedir (MacFarlane ve Murphy, 2010). miRNA'lar ağırlık olarak toplam RNA miktarının yaklaşık %0.01'ini temsil etmektedir. Toplam RNA miktarlarında bu kadar küçük bir kısmı oluştururken miRNA'ların sayı olarak çok olmasının nedeni mRNA'lara göre miRNA'ların daha düşük molekül ağırlığına sahip olup daha az çeşitli olmalarından kaynaklanmaktadır (Pritchard vd., 2015).

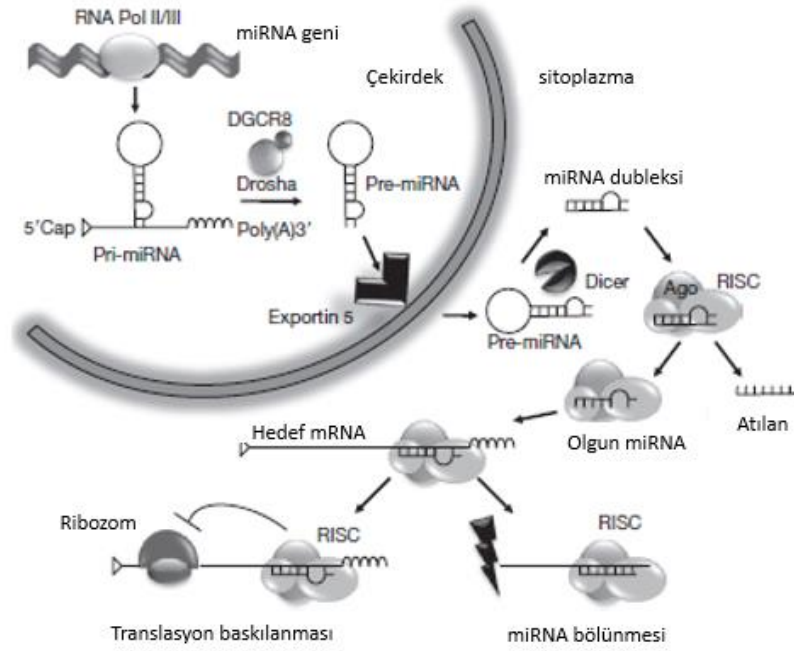
miRNA'lar tarafından gerçekleştirilen düzenleme hücre ya da organa özgüdür ve organizmanın metabolik durumu ve stresine bağımlı, aynı zamanda ekspresyon seviyeleri ile de ilişkilidir. Bu biyolojik özellikler miRNA'ların sadece ekspresyonlarını değil, ayrıca biyoyararlanım ve aktivitelerini de göstermektedir (de Sousa vd., 2019).

Bu nedenle miRNA'ların gelişim, apoptoz, bağışıklık tepkisi ve hücre farklılaşması gibi birçok biyolojik süreçte rol oynadığı bilinmektedir (Wei ve Wong, 2013).

miRNA'ların bir diğer önemli özelliği ise yüzlerce mRNA'yı tek bir miRNA hedefleyebilmekte ve bu şekilde tüm protein ağları düzenlenebilmektedir. Ya da tam tersi bir mRNA birkaç miRNA tarafından hedeflenebilmektedir. Bu durumlara göre sonuçta miRNA'lar ve diğer faktörler belirli mRNA'da bağlanma bölgesi için rekabet gösterebilmektedir (de Sousa vd., 2019).

2.5.2. miRNA biyogenezi

İnsanda miRNA biyogenezi, hem nükleus hem de sitoplazmada gerçekleşen iki aşamalı bir süreçtir. miRNA geni önce öncü miRNA'ya sonrasında da miRNA dubleksine işlenecek olan birincil miRNA üretimi için kopyalanmaktadır (MacFarlane ve Murphy, 2010). Şekil 2.4.'te miRNA biyogenezi gösterilmektedir.



Şekil 2.4. miRNA biyogenezi (Wei ve Wong, 2013)

Birincil miRNA'nın (pri-miRNA) Dicer'e bağımlı öncü miRNA (pre-miRNA) dönüşümü çekirdekte gerçekleşmektedir. pre-miRNA'nın olgun miRNA'ya dönüşmesi ve RNA ile indüklenen susturucu kompleks (RISC) ile miRNA'nın birleşmesi olayları da sitoplazmada gerçekleşmektedir.

RNA polimeraz II veya III tarafından başlatılan transkripsiyon ile (Wei ve Wong, 2013) pri-miRNA sentezlenmektedir. pri-miRNA'ların 5' ucunda yedi metilguanozin (M7G) başlığı ve 3' ucunda ise poliA kuyruğu yer alır ve tek iplikli bir yapıya sahiptir (Güzelgöl ve Aksoy, 2015). pri-miRNA tamamlayıcı bölgesi bir firkete halkası meydana getirmektedir (Wei ve Wong, 2013). Bu işlem mikroişlemci kompleks tarafından yapılmaktadır ve 70 nükleotit uzunluğunda bir ya da birden fazla pre-miRNA'ya dönüşüm gerçekleşir. Bu kompleks Drosha ve DiGeorge sendromu kritik bölge 8 (DGCR8) olarak isimlendirilen protein alt birimlerinden oluşmaktadır. Drosha katalitik alt birim şeklinde fonksiyon gösterirken, DGCR8 RNA yapısını tanımaktadır (Çınar ve Dursun, 2016).

Olgun miRNA'ya dönüşüm için pre-miRNA'lar nükleer transport reseptör olan Exportin 5 ile çekirdekten sitoplazmaya taşınmaktadır. Sitoplazmada RNAaz III ailesinde

yer alan Dicer enzimi trans-aktivasyon yanıtı RNA bağlayıcı protein (TRBP) veya protein kinaz R'nin protein aktivatörü (PACT) ile birleşerek firkete halkası kesilmektedir (Güzelgöl ve Aksoy, 2015).

Dicer enziminin pre-miRNA yapısında yer alan 3' çıkıntıya bağlanabildiği helikaz domain, PAZ domain ve çift zincir RNA bağlayan RNA domain, iki ribonükleaz III katalitik domaini gibi domainler yer almaktadır. Bu sayede Dicer pre-miRNA'yı tanır ve pre-miRNA gövdesi iki Dicer katalitik domain bölgesi olan RIIIDa ve RIIIDb ile etkileşerek miRNA dubleksi helikaz domaini ile açılmaktadır.

Açılan ipliklerden biri tamamlayıcı, biri ise kılavuz ipliklidir. Tamamlayıcı iplik yıkıma uğrarken kılavuz iplik RNA baskılanmasında fonksiyon göstermektedir. miRNA kesimine öncülük eden yapı ise RISC, Argonaute (AGO), TRBP ve PACT proteinlerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Bu kompleks hedef mRNA ile olgun miRNA'yı bir araya getirmede kullanılmaktadır. Kılavuz iplik RISC kompleksine girer ve hedef mRNA'ya ilerler. Hedef mRNA, 3' UTR bölgesi olgun miRNA'nın 5'ucuyla etkileşmektedir. Hedef mRNA'ya miRNA'lar ya tam olarak ya da kısmi olarak eşleşme göstermektedir. Kısmi eşleşme durumunda hedef mRNA translasyonel olarak baskılanırken tam eşleşmede hedef mRNA degrade olmaktadır (Çınar ve Dursun, 2016).

miRNA biyogenezi, hücre ve çevrelerinin fizyopatolojik durumuna duyarlı olarak hücresel foksiyonun kontrolü dahilinde çok daha sıkı ve karmaşık şekilde düzenlenen süreçler şeklinde görünmektedir. DNA düzeyinde, tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) histonların asetilasyon veya metilasyon mekanizmaları ile epigenetik olarak transkripsiyon kontrolü miRNA'ların düzenlenmesinin ilk seviyesini oluşturmaktadır (de Sousa vd., 2019).

2.5.3. miRNA ve apoptoz

Apoptozun birçok miRNA tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Bu hedef mRNA üzerine hareket ederek gen ekspresyonunu kontrol etme şeklinde gerçekleşmektedir ve bu da translasyonel baskılama ya da mRNA bozunmasıyla sonuçlanmaktadır (Su vd., 2015).

miRNA'lar apoptotik sinyallemede rol oynayan bir veya daha fazla mRNA'yı hedefleyebilmektedir. Aynı zamanda bazı miRNA'lar pro-apoptotik olarak hareket

ederken bazı miRNA'lar da anti-apoptotik olarak hareket etmektedir. İnsan tümörlerinde pro-apoptotik miRNA'ların azalan ekspresyon düzeyleri veya anti-apoptotik miRNA'ların artan ekspresyon düzeyleri, kemorezistans ve apoptoz eşiği ile ilişkilendirilmiştir (Lima vd., 2011).

Kanser gelişiminde, apoptozun düzenlenmesinde birçok miRNA'nın kritik öneme sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Li vd., 2012). Örneğin miR-27a/b ve miR-23a/b'nin apoptozom kompleksinde yer alan Apaf-1'i hedeflediği ve bu sayede nöronların apoptoza olan duyarlılığını değiştirdiği belirlenmiştir (Chen vd., 2014). Yine miR-24'ün XIAP hedefleyip kanser hücresinde apoptoza direnç göstermesini sağlamakta etkili olduğu belirlenmiştir (Xie vd., 2013).

Yine içsel apoptotik yolda miR-492 ile yapılan çalışmada, bu miRNA'nın doğrudan Bcl-XL'yi hedeflediği ve apoptozu uyararak kolorektal kanser hücrelerinin yaşayabilir olmasını önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır (Nakano vd., 2010).

Dışsal apoptotik yolda ise yapılan bir çalışmada, miR-185 ile transfekte edilen SKOV-3 yumurtalık kanseri hücre hattının TRAIL aracılı apoptoza kontrol hücrelerine kıyasla daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Imam vd., 2010). Ölüm reseptörü olan CD95'in tümör progresyonu sırasında aşağı regüle edildiği ve bu durumda apoptotik hücre ölümüyle sonuçlandığı bilinmektedir. Aynı şekilde miR-200 ailesinin ekspresyonunda kanser hücrelerinde aşağı regüle edildiği belirlenmiştir (Peter, 2019).

Sonuçta dokularda spesifik miRNA ekspresyonlarının fizyolojik modülasyonu ile apoptozu ve ER stresi durumunda hücrenin kaderini belirlemede bu yapının önemli olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.

2.5.4. miRNA ve kanser

Kanser gelişimine miRNA'ların katılması tümör hücresinin dönüşümünden metastaza ve tedaviye dirence kadar pek çok ana yol içermektedir (Pileczki vd., 2016). Ayrıca çoklu mRNA'ları hedefleme yetenekleri, sınırsız replikasyon potansiyeli, proliferatif sinyallerde kendi kendine yetebilme gibi kanser belirtilerine miRNA'lar dahil olmaktadır (Kim ve Croce, 2021).

Kanserle ilişkili miRNA'lar hedeflerinde genlerin tümör oluşumundaki rollerine göre 2 gruba ayrılmaktadır. Bunlar onkogenik miRNA'lar ve tümör baskılayıcı

miRNA'lardır (Çınar ve Dursun, 2016). Onkogenik miRNA'lar tümör baskılayıcı genlerin susturulması ve metastazını teşvik ederek kanserin ilerlemesinde büyük bir role sahipken, tümör baskılayıcı miRNA'lar onkogenleri kodlayan ve onkogenik mRNA'ların çevirisini bastırarak mRNA'ları hedeflemekte ve tümör ilerlemesini inhibe etmektedir (Mollaei vd., 2018).

miRNA ekspresyonunda meydana gelen değişimlerin nedenleri translokasyon, amplifikasyon ve delesyon gibi genomik anomaliler olabilmektedir (Çınar ve Dursun, 2016). Kanserde miRNA düzensizliği ile ilgili olarak ilk kez 2002 yılında kronik lenfositik lösemide miR-15 ve miR-16'da oluşmuş bir kümenin tanımlandığı bildirilmiştir ve bu miRNA'lar Bcl-2 genini hedefleyip apoptotik bir yanıt oluşturmuşlardır (Calin vd., 2002).

Normal fizyolojik miRNA'lar geri besleme devrelerinin bir parçasıdır ve tamponlama etki aracılığı ile de biyolojik süreçlerin daha sağlıklı ve sağlam olmasını sağlamaktadır. Bundan dolayı fizyolojik açıdan optimal sınırlardan farklı olarak eksprese edilen proteinlerin üretimini azaltarak gen ekspresyonunun kesinliğini artırmaktadır (Jansson ve Lund, 2012).

Epitelyal mezankimal geçiş (EMT) düzenleyicisi olarak miR-200 ailesi ZEB1/2 gibi EMT indükleyen faktörü baskılayarak kanser metastazı ve istilasını inhibe ettiği yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir (Kim vd., 2011).

Onkogenik transkripsiyon faktörü olan Myc, birçok miRNA'nın promotör bölgesini bağlamaktadır ve miR-17-92 kümesi Myc'yi yukarı regüle etmekten sorumlu miRNA kümesi olsa da (Dews vd., 2006), Myc'nin aktivitesindeki ana etki, miRNA ekspresyonunu bastırmaktır (Chang vd., 2009). miR-21 geni de onkogenik miRNA'lar arasındadır. Bu miRNA başta meme, akciğer, mide, kolon olmak üzere tüm kanserlerde aşırı eksprese ettiği bilinmektedir (Hayes vd., 2014).

p53 transkripsiyonel kontrolü altında olan miRNA'larda bulunmaktadır. p53 hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesinde büyük bir role sahiptir. p53 tarafından miR-34 indüksiyonu hücre büyümesinde negatif düzenleme göstermiştir (Janssons ve Lund, 2012). Bu sonuçlarda yola çıkarak proliferatif hastalıklardan biri olan kanserin oluşumu ve metastazında miRNA'ların onkogenik hemde tümör baskılayıcı olarak büyük bir öneme sahip olduğu görülmektedir.

2.5.4.1. Yumurtalık kanserinde miRNA'lar

Hem *in vitro* hem de *in vivo* yapılan çalışmalar yumurtalık kanserinde miRNA'ların anormal ekspresyonlar gösterdiğini belirtmektedir. Bu anormal ekspresyon, bu hücreleri normal yumurtalık hücresi örneklerinden ayırmaktadır. Aynı zamanda lenfovasküler, histotip ve organ invazyonu yumurtalık yüzeyinin tutulumu ile de ilişkilendirilmektedir (Ghafouri-Fard vd., 2020).

Birçok miRNA yumurtalık kanserinde farklı roller üstlenmektedir. Yumurtalık kanserinde miR-200, miR-200a ve miR-200b normal dokulara göre daha yüksek ekspresyon gösterirken, miR-140 ve miR-145 kanserli dokularda daha düşük ekspresyon göstermektedir (Chen vd., 2019).

Yine miR-145 ve miR-16, yumurtalık kanseri dokularında aşağı regüle edilmektedir (Chen vd., 2019).

miR-221-3p ise epitelyal yumurtalık kanserinin göçünü ve proliferasyonunu bastırmak adına ARF4'ü hedefleyerek yumurtalık kanserinde tümör baskılayıcı role sahip olduğu belirlenmiştir (Wu vd., 2017).

Yumurtalık kanseri dokularını değerlendirmek amacıyla yapılmış bir çalışmada miR-155 ekspresyonunun yukarı regüle edildiği ve onkogenik etki gösterdiği belirlenmiştir (Iorio vd., 2007).

2.5.5. Wnt/ β -katenin sinyal yolunda miRNA'lar

Birçok metastatik kanser hücresinde Wnt/ β -katenin sinyalinin, aşağı ya da yukarı regülasyonuna sebep olan miRNA'lardan etkilendiği bilinmektedir (Lei vd., 2020). Yapılan çalışmalar sonucunda kanser gelişiminde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının ve miRNA gen regülasyonu arasında ilişki olduğu belirlenmiştir.

Kanserde miRNA'nın düzensizlik göstermesi Wnt sinyalinin aktivitesini uyarmaktadır. miRNA'lar ligand/reseptör ile ilişkili proteinleri, Wnt yolu transkripsiyon faktörlerini, β -katenin etkileşen kompleksini ve çoklu Wnt sinyal yolu bileşenlerini hedefleyerek Wnt yolunu birden çok seviyede bastırabilmektedir ya da aktive edebilmektedir.

Ayrıca Wnt aktivasyonu, β -kateninin TCF/LEF'e bağlanma göstermesi sonrasında miRNA ekspresyonu artış göstermektedir ve β -kateninin bu bağlanma sonrasında hücre proliferasyonunu, kanser hücresi metastazını, hücre göçünü ve kemo direnci destekleyen aşağı akış gen ekspresyonlarını etkin hale getirerek sinyale dönüşmesini sağlamaktadır. β -katenini modüle edip Wnt sinyal yolunu baskılama yeteneğine sahip birçok miRNA bulunmaktadır (Peng vd., 2017).

miR-200a E-kaderini baskılayabilen proteinler olan ZEB1/2'nin mRNA'larını hedefleyerek β -katenine bağlanabilmek amacıyla E-kaderin miktarını artırıp hücre oluşumunu da indüklediği belirlenmiştir (Korpall vd., 2008). Yapılan başka bir çalışmada mide kanserinde miR-630'un Wnt/ β -katenin sinyal yolağını aktive edip mide kanseri EMT'sini inhibe ettiği belirtilmiştir (Li vd., 2018).

Yumurtalık kanserinde de Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerinde etkili olan miRNA'lar bulunmaktadır. Örneğin; yumurtalık kanserinde miR-338-3p Wnt/ β -katenin sinyalini azaltarak kanserin büyümesini ve metastazını baskılayabileceğini göstermiştir (Zhang vd., 2019). Yine miR-214'ün aşırı ekspresyonu yumurtalık kanseri hücresinde β -katenin, c-Myc ekspresyonlarını baskılamıştır ve bu da miR-214'ün β -katenin yolunu hedefleyerek tümör baskılayıcı role sahip olduğunu göstermektedir (Liu vd., 2018).

Yapılan başka bir çalışma ise, glikojen fosforilaz B'nin (PYGB) miR-133a-3p tarafından düzenlendiği ve miR-133a-3p, PYGB'nin 3' ucuna doğrudan bağlanma gösterdiği ve miR-133a-3p'nin kanserli hücrelerde göç, proliferasyon ve istila durumunu baskıladığını göstermiştir (Zhou vd., 2019).

2.6. miR-455 ve Etki Mekanizması

miR-455, birçok türde eksprese edilebilen ve çok yüksek oranda korunmuş RNA sınıfıdır. Öncü dizisi insan kollajen tip XXVII alfa 1 zinciri (COL27A1) geni tarafından kopyalanmaktadır. İnsanda iki şekilde ifade edilmektedir. Bunlar miR-455-3p ve miR-455-5p'tir. miR-455 adipogenez, Alzheimer hastalığı, preeklampsi ve amiotrofik lateral skleroz gibi birçok hastalık üzerinde etkiliyken özellikle kanser üzerindeki etkisi oldukça önemlidir (Kumar ve Reddy, 2019).

Yapılan çalışmalarda miR-455'in ektopik ekspresyon sergilemesi sonucu mide, pankreas ve yumurtalık gibi birçok kanser türünde hücre göçüyle ilişkili olduğu

belirlenmiştir (Yamada vd.,2018). Hücre göçü, metastaz ve tümör invazyonu sırasında meydana gelen karmaşık bir süreçtir (Baczynska vd., 2016). miR-455'in yukarı regülasyonu ile farklı kanser türlerinde hücre göçünü inhibe ettiği ve tümör baskılayıcı rol üstlendiği tespit edilmiştir.

Pankreas kanserinde yapılan bir çalışmada DLEU 2'nin doğrudan miR-455'e bağlandığı ve bu bağlanma sonrasında da hücre büyümesi ve hücre istilasını önemli ölçüde baskıladığı belirlenmiştir (Xu vd., 2019). Yine meme kanserinde yapılan başka bir çalışmada, üçlü negatif meme kanserinde miR-455'in yüksek seviyede ifade edildiği belirlenmiş ve miR-455-3p etoposid ile indüklenen EI24 genine bağlanarak hücre proliferasyonunu, hücre göçünü ve hücre istilasını desteklediğini göstermiştir (Li vd., 2017).

Epitelyal yumurtalık kanserinde yapılan bir çalışmada ise miR-455'in doğrudan Notch1 genini hedeflediği belirlenmiş ve Notch1'in ifadesinin düzenlenmesiyle de epitelyal yumurtalık kanserinde proliferasyonu ve invazyonu modüle edip tümör baskılayıcı olduğu tespit edilmiştir (Xu vd., 2017).

Doku homeostazını sağlamada önemli bir sinyal yolu olan Notch'nin dört tane memeli reseptörü (Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4) ve beş tane ligandı (Delta 1, Delta 3, Delta 4, Jagged1 ve Jagged 2) tanımlamıştır (Balint vd., 2005). Tüm Notch reseptörleri, ankirin tekrarları, C-terminal PEST alanı ve bir RAM alanında oluşan hücre içi bölgeye ve epidermal büyüme faktörü benzeri tekrarlardan oluşmuş bir dış alana sahiptir. (Ishiguro vd., 2017). Notch sinyali, hücre içi alanın bölünmesi, çekirdeğe transloke olmasını ve hemen ardından hedef gen transkripsiyonunun aktivasyonunu belirtmektedir. Notch reseptörü ligand bağlanması ile metaloproteaz aracılı bölünmeye daha duyarlı hale gelebilmektedir (Balint vd., 2005).

Wnt ve Notch sinyal yolları ayrıca hücre bölünmesinin polaritesi, hücre büyümesi ve hücre kaderi gibi biyolojik süreçlerde de yer almaktadır. Wnt sinyal yolunda yer alan β -katenin Notch1 hücre içi alanının (NICD) seviyesini ve transkripsiyonel aktivitesini düzenleyebilme yeteneğine sahiptir. Notch1 ve NICD ile bağlanan β -katenin ubiquitin bağımlı mekanizma ile rekabet ederek Notch1 ve NICD seviyelerini yükseltmektedir (Jin vd., 2009).

Glikojen sentaz kinaz 3 β ve presenilin sitoplazmik seviyede Wnt ve Notch sinyallemesini karşılamak için hareket eden proteinlerdir (Jin vd., 2009). Presenilinler, zar düzleminde Notch proteinleri ve amiloid öncü proteinleri (APP) parçalamaktan sorumlu moleküler mekanizmanın bir parçasını oluşturmakta ve Wnt/ β -katenin sinyal yolunun düzenlenmesine katılmaktadırlar (Strooper ve Annaert, 2001).

Yumurtalık kanseri hücrelerinin işlevlerinde β - katenin sinyallemesinin yer alarak Notch ile etkileştiği bilinmektedir. Notch ve Wnt sinyal yollarının inhibe olması durumunda hücre proliferasyonunun bozulduğu belirtilmektedir. β - katenin ve Notch sinyali için DAPT inhibitörü kullanılmış ve hücre çoğalması ile Wnt / β -katenin sinyal yolu aynı ölçüde azalmaktadır. Sonuçta yumurtalık kanserinde Notch ve β -katenin sinyalleri hücre göçünü ve proliferasyonunu sağlamak için birlikte çalıştıkları ve ayrıca Wnt sinyalinin olmadığı durumda Notch ligandının yukarı regüle edilerek bu durumları kısmen başarabildiği belirlenmiştir (Bocchicchio vd., 2019).

Yumurtalık kanserinde miR-455'in doğrudan Notch1 genini hedefleyip bu genin düzenlenmesiyle de tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı bilinmekle birlikte Wnt/ β -katenin yolu üzerindeki uyarıcı ve baskılayıcı etkisi henüz bilinmediğinden, bu tez çalışmasında miR-455 transfekte edilen SKOV-3 hücre hattında Wnt/ β -katenin yolunun hücre göçü, hücre proliferasyonu ve hücre apoptozu üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Hücre Hattı

SKOV-3 (İnsan ovaryum adenokarsinoma) hücre hattı Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.2. Materyaller

3.2.1. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler

İsim	Şirket
25 ve 75 cm ² 'lik hücre kültür flakları	Nest, Çin
24 ve 96 kuyulu plakalar	Sarstedt, Almanya
CIM-Plaka	Roche, San Diego, CA
E-Plaka	Roche, San Diego, CA
Cardamonin	Santa Cruz, ABD
hsa-miR-455-3p	Sigma-Aldrich, Almanya
MTT Boyası (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Applchem, Almanya
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, Almanya
Fetal Sığır Serumı (FBS)	Sigma-Aldrich, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich, Almanya
Tripsin	Sigma-Aldrich, Almanya
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Almanya
Etil alkol	Detsan, Türkiye
Opti-MEM	Gibco, USA
Etidyum bromür	Sigma-Aldrich, Almanya
Akridin oranj	Sigma-Aldrich, Almanya

3.2.2. Ekipmanlar

Tablo 3.2. Ekipmanlar

Ekipmanlar	Şirket
Steril CO ₂ inkübatörü	Hera Cell 240 Thermo Scientific, Almanya
Otoklav	ALP, Japonya
Soğutmalı santrifüj	Heraheus, Almanya
Floresan mikroskop	Leica DMI 4000B, Almanya
Azot tankı	Taylor Wharton, Almanya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik No Frost, Türkiye
Distile su cihazı	Nüve, Türkiye
Hassas terazi	Ohaus, İsviçre
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Laminar kabin	Heal Force, Çin
Sterilizatör	Nüve FN 500, Türkiye
Su banyosu	Nüve BM 302, Türkiye
Vorteks	Yellowline, Belçika
DNA/RNA UV kabini UVT-B-AR	Biosan, Türkiye
xCELLIGENCE Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi	Roche, Almanya
Dondurucu (-80°C)	New Brunswick Scientific, ABD
Etüv	Nüve, Türkiye
Çalkalayıcı	Biometra WT17, Almanya
Enzim bağlı immunosorbent yöntem okuyucu (ELISA)	BioTek Elx800, US
pH metre	Thermo Scientific, Singapore

3.2.3. Kullanılan ticari kitler

Tablo 3.3. *Kullanılan ticari kitler*

İsim	Şirket
Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon kiti	Invitrogen, ABD

3.2.4. Kullanılan bilgisayar programları

Tablo 3.4. *Kullanılan bilgisayar programları*

İsim	Şirket
ChemDraw Ultra 12.0	PerkinElmer, Amerika Birleşik Devletleri
Graphpad Prism 8	Amerika Birleşik Devletleri
RTCA Software 2.0	Roche, Almanya
BioTek Gen5 Data Analysis Software	BioTek, US

3.3. Metodlar

3.3.1. Kullanılan maddelerin hazırlanması

3.3.1.1. Cardamonin bileşiğinin çözündürülmesi ve hazırlanması

Ana stok çözelti konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde cardamonin maddesinin tartımı hassas terazide yapılmıştır ve tartılan cardamonin miktarı saf DMSO (dimetilsülfoksit) içinde çözündürülmüştür. Daha sonraki ara stok konsantrasyonları (10 mM ve 1 mM) %10 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde hazırlanmıştır. Etkili konsantrasyonu belirleme çalışmaları için 5-100 μ M/ml cardamonin konsantrasyonları %10 FBS'li DMEM besiyerinde hazırlanarak kullanılmıştır. Çözücü konsantrasyonu en yüksek %0.1 olarak alınmıştır.

3.3.1.2. miR-455'in stok konsantrasyonunun hazırlanması

20 μ M'lık stok solüsyon için 5 nmol mimiğe, 250 μ L nükleaz içermeyen su eklenmiş ve düzgün bir karışım sağlanması amacıyla çözelti vortekste kısa bir süre karıştırılmıştır. Deneylerde 2 μ M mimik konsantrasyonu kullanılmıştır.

Kullanılan miRNA en fazla 3 kere dondurulup çözündürülebildiğinden kullanım kolaylığı sağlamak için nükleaz içermeyen ependorf tüplerine, her bir tüpte 10 µL miRNA mimik solüsyonu olacak şekilde bölünmüştür. Hazırlanmış ependorf tüpleri -20°C’de saklanmıştır.

3.3.2. Hücre kültürü

SKOV-3 hücreleri %10 fetal sığır serumu, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin içeren DMEM besiyerinde %5 CO₂’li inkübatörde 37 °C’de kültür ortamında tutulmuş ve çoğalması sağlanmıştır. Kültür kabı %80 oranında hücre yoğunluğuna ulaştığında (~2-3 gün) 1× tripsin solüsyonu ile 1:3 ile 1:6 oranlarında alt kültürlerle alınarak hücrelerin büyümesi sağlanmıştır.

3.3.3. Sitotoksosite Belirleme Testi

3.3.3.1. MTT yöntemi ile Cardamoninin IC₅₀ dozunun belirlenmesi

Sitotoksosite, canlı hücrelerdeki toksik etkiyi ifade eden bir kavramdır. Toksik etkisi olduğu düşünülen bir maddenin, uygun olan hücre kültürü ortamında, hücre çoğalma oranını değerlendirmek ve hücresel metabolizmadaki değişiklikleri belirlemek amacıyla analizleri yapılmaktadır.

MTT yöntemi, hücre canlılığını, hücre proliferasyonunu ve sitotoksiteyi belirlemek için sıkça tercih edilen analiz yöntemlerinden biridir. Bu analiz yönteminde MTT (3-4,5- dimethylthiazol-2)-2,-5diphenyltetrazolium bromide) boyasında bulunan tetrazolyum halkası, aktif mitokondriyal fonksiyona sahip hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile formazana dönüşür ve mor renk değişimi canlı hücreler tarafından gözlenebilmektedir. Ölü hücreler ise bu aktif mitokondriyal fonksiyona sahip olmadıklarından indirgeme özelliklerini kaybetmektedir ve renk değişimi gözlenmemektedir.

Hücreler 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 1×10⁴ hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda besin ortamı değiştirilerek hücrelere 5-100 µM/ml konsantrasyon aralığında cardamonin inhibitör uygulaması 24 ve 48 saat süre ile yapılmıştır. Analiz sürelerinin sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası hücrelere ilave edilmiş ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda besi yeri uzaklaştırılmış ve oluşan formazan kristalleri çözmek için 100 µL DMSO eklenmiştir. Karanlık ortamda plakalar yaklaşık 10 dakika lineer çalkalayıcıda

karıştırılmıştır. Son olarak spektrofotometrik mikroparka okuyucuda 540 nm dalga boyunda okuması yapılmıştır. Okuma sonucunda belirlenmiş olan absorbans değerleri hücre canlılık değerleri olarak kabul edilmiştir. Hücrelerin %50 inhibisyonunu gösteren değer IC₅₀ değeri olarak kabul edilmiştir ve Graphpad Prism 8 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.4. Hücrelere miRNA'nın transfekte edilmesi ve BLOCK-iT Alexa-Fluor

Kırmızı Floresan Kontrolü ile görüntüleme yapılması

Hücredeki spesifik miRNA'nın ekspresyon seviyesinin stimüle edilmesi amacı ile hücreler endojen miRNA moleküllerini taklit etmek amacıyla tasarlanmış hsa-miR-455-3p'nin mimiği ile transfekte işlemine tabi tutulmuşlardır.

Transfeksiyon ve görüntüleme için 24'lük plakalar kullanılmıştır. Birinci gün her bir kuyuda 4.5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra hücreler %60-80 yoğunluğa ulaştığından mimiği hsa-miR-455-3p'nin transfeksiyonu yapılmıştır. Transfeksiyon için Lipofectamin RNAiMAX Transfeksiyon Kiti (Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. İki ayrı ependorf tüpü alınmış ve birinde Opti-MEM ortamında kit prosedürüne uygun miktarlarda Lipofectamin RNAiMAX seyreltilirken bir diğerinde yine Opti-MEM ortamında hsa-miR-455-3p seyreltilmiştir. Sonrasında RNA içeriği ile lipofectamin RNAiMAX içeriği karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücrelere miRNA-lipit kompleksi ilave edilerek 3 gün inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Transfeksiyondan 24 saat sonra medium ortamı PBS ile değiştirilerek BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan kontrolü ile miRNA transfeksiyon verimliliği floresan mikroskopunda N2.1 filtre ile gözlemlenmiştir.

3.3.5. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) ile hücre göçünün kantitatif olarak belirlenmesi

Deney için xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA) cihazı kullanılmıştır. RTCA cihazı ile temel hücre kültürü ortamında son derece hassas empedans teknolojisi ile migrasyon (göç), proliferasyon ve sitotoksosite gibi hücre bazlı testlerin gerçek zamanlı analizi yapılmaktadır.

Cardamonin inhibitör varlığında ya da yokluğunda hsa-miR-455-3p transfekte edilmiş SKOV-3 hücrelerinin göç yeteneği kantitatif olarak test edilmiştir. Deneyler

inkübatör ortamında gerçekleştirilmiş ve bu sayede *in vitro* ortamda üretilmiş olan hücre yanıtlarından sürekli ve tam olarak veri profili elde edilmiştir. Deneyin birinci günü CIM-Plaka'nın her iki bölümüne %10 FBS içeren DMEM besi ortamı eklenerek cihaza yerleştirildikten sonra bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Deneyin başlatılmasından 24 saat sonra, 18.07 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (IC_{50}) ve 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (IC_{20}) cardamonin konsantrasyonları hücre gruplarına eklenmiştir ve hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra inhibitörlü besi ortamı uzaklaştırılarak hücreler serumsuz ve antibiyotiksiz besi ortamına alınmış ve hsa-miR-455-3p mimik transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. hsa-miR-455-3p transfeksiyon aşamaları Lipofektamin RNAiMAX transfeksiyon kitindeki talimatlara uyarak yukarıda anlatıldığı gibi (Başlık: 3.3.4.) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kantitatif sonuçlar RTCA Software cihazından normalize hücre indeksinin zamana karşı verilmiş grafikleri olarak alınmıştır. Deneyler üç bağımsız deney şeklinde yapılmıştır ve elde edilen bir deney sonucu tezin “Bulgular ve Sonuçlar” kısmında verilmiş olmakla birlikte tekrar deney sonuç grafikleri EK-1a ile EK-1b’de verilmiştir.

3.3.6. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) ile hücre proliferasyonunun kantitatif olarak belirlenmesi

RTCA cihazı kullanılarak yapılan deneyde cardamonin inhibitörü varlığında ya da yokluğunda hsa-miR-455-3p mimik ile transfekte edilmiş SKOV-3 hücrelerinin proliferasyon düzeyleri araştırılmıştır. E-plakalara 8×10^3 hücre ekimi yapıldıktan sonra 18.07 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (IC_{50}) ve 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (IC_{20}) cardamonin hücre gruplarına eklenmiş ve hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde, inhibitör hücrelerden uzaklaştırılmış ve hücre grupları mimik hsa-miR-455-3p ile Lipofectamine RNAiMax transfeksiyon kiti kullanılarak transfeksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Transfeksiyon sonrasındaki hücrelerin besi ortamları değiştirilmiş ve iki gün daha inkübasyona bırakılarak cihazdan hücre indeks ölçümleri alınmıştır. 120 saat boyunca her 15 dakikada bir hücre indeks ölçümü alınmıştır. Her uygulama sonrası hücreler ışık mikroskobu altında gözlenmiş ve bağımsız yapılan üç deney tekrarından birinin ışık mikroskobundaki hücre görüntüleri ve RTCA kantitatif sonuçları tezin “Bulgular ve Sonuçlar” kısmına eklenmiştir. Diğer RTCA tekrar deney sonuç grafikleri EK-2a EK-2b’de verilmiştir.

3.3.7. Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) boyama ile apoptozun belirlenmesi

Bu yöntem ile canlı ve apoptotik hücreler arasında ayırım yapılabilmekte ve nükleus ile hücre membranındaki apoptoza bağlı olarak meydana gelen değişiklikler hakkında bilgi alınmaktadır. EB, membran bütünlüğü bozulan hücreleri boyarken, AO ise hem apoptotik hem de canlı hücreleri boyayabilmektedir. Canlı hücreler yeşil renk ile boyanma gösterirken erken apoptotik olan hücreler yeşil renkli fakat nükleuslarda nükleer fragmantasyon ve kromotin kondensasyonu göstermektedirler. Geç apoptotik dönemde olan hücreler ise EB ile turuncu renge boyanmış olarak görülmektedir (Avcı vd., 2013).

24 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 4.5×10^4 hücre ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 18.07 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (IC_{50}) ve 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (IC_{20}) cardamonin inhibitör dozları hücreye verilmiş ve tekrar 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu sürenin de sonunda mimik hsa-miR-455-3p transfeksiyonu Lipofectamine RNAiMax transfeksiyon kiti kullanılarak yapılmıştır. Transfeksiyonun 24 saat sonrasındaki apoptotik hücreleri belirlemek için 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EB ve 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AO boyları hazırlanmıştır. Aynı konsantrasyonda hazırlanmış olan boylar 1:1 oranında karıştırılarak her bir kuyuya eklenmiş ve 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda iki kez PBS ile yıkıma yapılarak en son yine PBS ortamında floresan mikroskopta FITC filtresi ile hücrelerin görüntülenmesi yapılmıştır.

3.3.8. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz tek yönlü Anova ve çift kuyruklu Student T-testi kullanılarak Graphpad Prism 8.0 programında yapılmıştır. Üç bağımsız tekrarın sonuçları ortalama $\pm$ standart ortalama hata (SEM) olarak belirtilmiştir ve 0.05'ten küçük olan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE SONUÇLAR

4.1. Sonuçlar

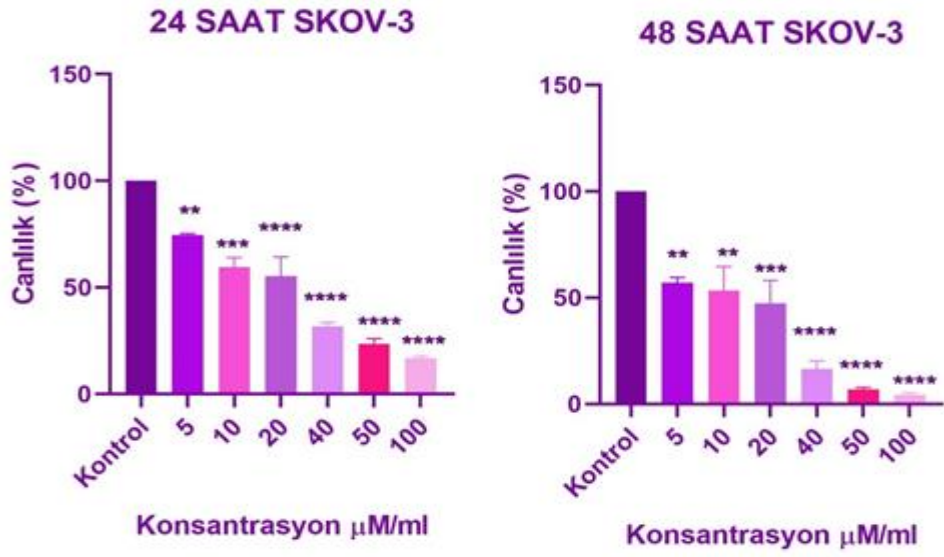
4.1.1. Cardamonin bileşiğinin SKOV-3 kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

SKOV-3 hücreleri farklı konsantrasyonlarda cardamonin (5, 10, 20, 40, 50, 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$) ile 24 ve 48 saat inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Daha sonra hücre ortamına MTT boyası eklenerek 3 saat süre ile 37°C 'de inkübasyona bırakılmışlardır. Süre bitiminde oluşan formazan tuzları DMSO ile çözündürülerek, ELISA Reader cihazında renk değişim şiddeti 540 nm λ her bir kuyunun okuması yapılmıştır. Hücre canlılığı, kontrol hücre grubu %100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Cardamoninin 24 ve 48 saatteki IC_{50} ve IC_{20} değerleri Graphpad Prism8 programı ile belirlenmiştir. Üç bağımsız deney ve her bir deney ise n=3 tekrarlı şekilde yapılmıştır. İstatistiksel analiz one-way ANOVA ile kontrol grubuyla kıyaslama yapılarak elde edilmiştir. SKOV-3 hücrelerinde cardamonin ile 24 ve 48 saatlerdeki IC_{50} ve IC_{20} değerleri Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Cardamonin bileşiğinin SKOV-3 hücre hattındaki 24 ve 48 saatlerdeki IC_{50} ve IC_{20} konsantrasyon değerleri

Saatler	IC_{50}	IC_{20}
24 Saat	18.07 $\mu\text{M}/\text{ml}$	5 $\mu\text{M}/\text{ml}$
48 Saat	10.35 $\mu\text{M}/\text{ml}$	2.99 $\mu\text{M}/\text{ml}$

Cardamonin bileşiğine 24 ve 48 saat maruz bırakılan SKOV-3 hücrelerinin % canlılık değerleri hesaplanmış ve bu değerlerin istatistiksel olarak kontrol grubuyla karşılaştırılması Şekil 4.1.'de grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Cardamonin bileşiğinin MTT testi ile SKOV-3 hücrelerinde 24 ve 48 saat sonrasındaki canlılık (%) oranları. Canlılık verileri ortalama $\pm$ SEM'dir. (Her zaman diliminde ve her konsantrasyon grubunda $n=3$). Analiz tek yönlü Anova ile ** $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$. Grafik üç bağımsız deney ortalamasını göstermektedir.

Ayrıca 24 ve 48 saatlerdeki cardamonin dozlarına bağlı hücre canlılığının (%) sayısal verisi Tablo 4.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.2. Cardamonin konsantrasyonlarına göre 24 ve 48 saatteki ortalama $\pm$ SEM değerleri

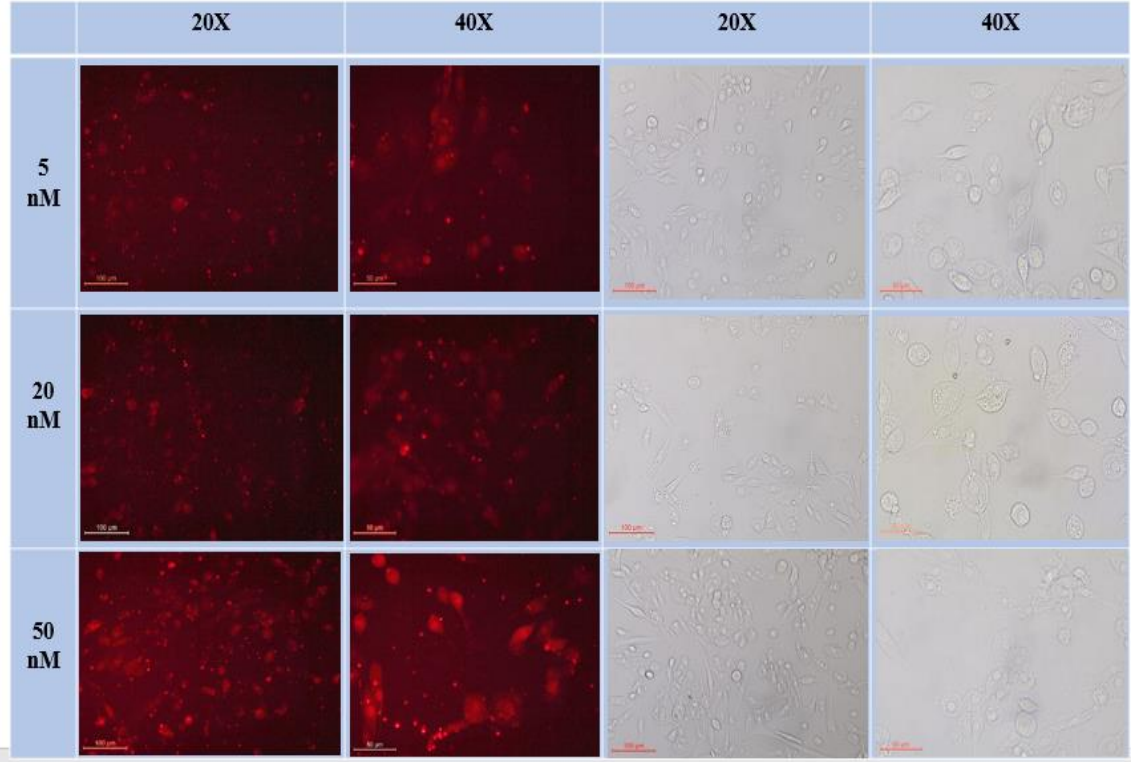
Cardamonin Konsantrasyonları (μM)	24 Saatteki Ortalama $\pm$ SEM	48 Saatteki Ortalama $\pm$ SEM
0	100	100
5	74.65 $\pm$ 0.7101	56,89 $\pm$ 2,514
10	59,45 $\pm$ 4,442	53,23 $\pm$ 11,33
20	55,16 $\pm$ 9,153	47,30 $\pm$ 10,78
40	31,66 $\pm$ 1,910	16,56 $\pm$ 3,622
50	23,38 $\pm$ 2,524	6,638 $\pm$ 1,123
100	16,68 $\pm$ 1,137	4,343 $\pm$ 0,8281

Yapılan MTT testinde SKOV-3 hücrelerinin cardamonine 24 saatlik maruz bırakılması sonucunda hücre canlılık değerleri doza bağlı olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Test edilmiş cardamonin konsantrasyonları ($\geq 40 \mu\text{M}$) aralığında 24 saatlik zamanda hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü tespit edilmiştir. SKOV-3 hücrelerinin cardamonin ile 24 saat inkübasyonu sonrasında IC_{50} dozu $18.07 \mu\text{M/ml}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1.). Kontrol grubuna göre kıyaslama yapıldığında tüm konsantrasyon aralıkları istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p < 0,05$).

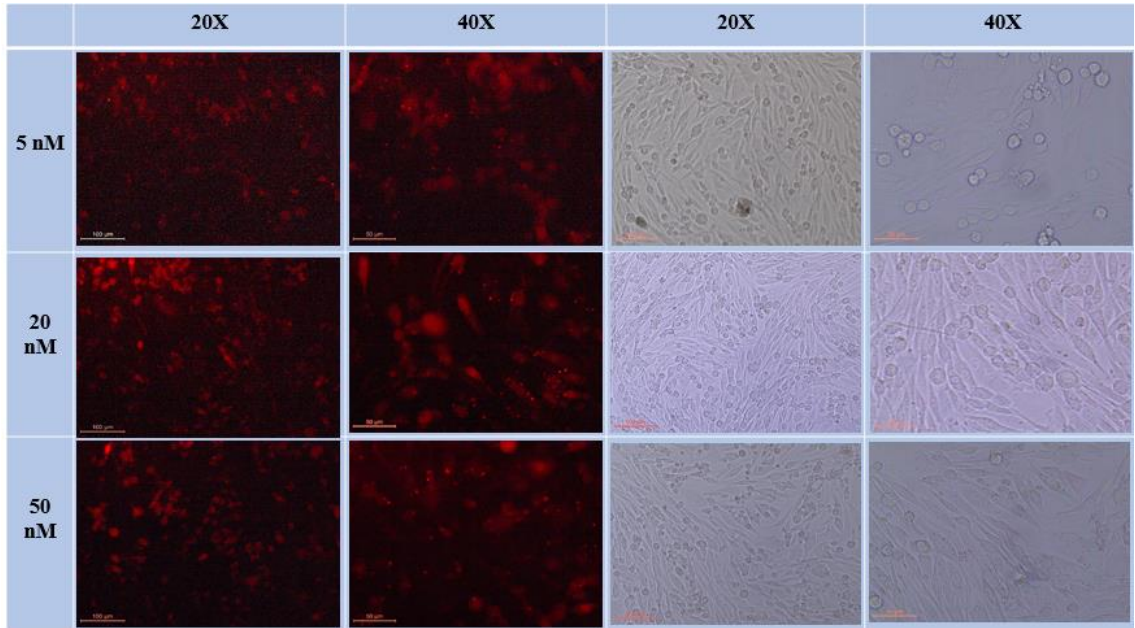
48 saatlik cardamonine maruz bırakılması sonucunda da 24 saatlik uygulama sonucunda olduğu gibi benzer olarak hücre canlılığında konsantrasyon artışına bağlı şekilde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Özellikle $20 \mu\text{M}$ cardamonin uygulaması sonrasında SKOV-3 hücre canlılığı $47,30 \pm 10,78$ olarak bulunmuştur ve konsantrasyonunun $100 \mu\text{M}$ 'a çıkarılması ile hücre canlılığında $4,343 \pm 0,8281$ 'ye düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.1. ve Tablo 4.2.). 48 saat cardamonin ile inkübasyon sonrasında SKOV-3 hücreleri üzerine IC_{50} konsantrasyonunun $10.35 \mu\text{M/ml}$ olduğu bulunmuştur (Tablo 4.1.). Kontrol grubuna göre yapılan kıyaslamada da tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş belirlenmiştir ($p < 0,05$).

4.1.2. hsa-miR-455-3p transfeksiyonu ve BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan kontrolü ile görüntülenmesi

SKOV-3 hücrelerinin 24'lük plakalara ekimi yapıldıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sonrasında Lipofectamine RNAiMax transfeksiyon kiti ile bir plakaya hsa-miR-455-3p, diğer plakaya aynı hsa-miR-455-3p konsantrasyonlarında Alexa-Fluor kırmızı floresan kontrolü paralel olarak transfekte edilmiş ve hücreler 24 veya 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonrası Alexa-Fluor ile transfekte edilen kontrol hücre grubu $1 \times \text{PBS}$ ortamına alınmış ve floresan mikroskobu N2.1 filtresi ile transfeksiyon verimliliği kırmızı boyayı içine almış olan hücreler sayılarak hesaplanmıştır. Alexa-Fluor Red ile boyanmış 24 veya 72 saatteki N2.1 filtre ve ışık hücre görüntüleri sırasıyla Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.2. SKOV-3 hücreleri farklı konsantrasyonlardaki BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan ile 24 saat transfeksiyonu. Görüntülere 20× veya 40× büyütmede hem floresan mikroskobu hem de ışık mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir.



Şekil 4.3. SKOV-3 hücreleri farklı konsantrasyonlardaki BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan ile 72 saat transfeksiyonu. Görüntüler 20× veya 40× büyütmede hem floresan mikroskobu hem de ışık mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir.

Görüntüleme işleminden sonra BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan boyasını absorbe eden hücrelerde transfeksiyon işleminin gerçekleştiği kabul edilmiştir ve transfeksiyonun olduğu hücreler sayılarak, toplam hücre sayısına bölünüp 100 ile çarpıldıktan sonra transfeksiyon verimliliği (%) hesaplanmıştır. Hem 20× hem de 40× görüntülerde hücrelerdeki transfeksiyon verimliliği Tablo 4.3. ve Tablo 4.4.'te belirtilmiştir.

$$\text{Transfeksiyon verimliliği (\%)} = \frac{\text{Transfekte olan hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100 \quad (4.1)$$

Tablo 4.3. 24 saat BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan ile transfeksiyon işlemi sonrasında SKOV-3 hücrelerinin 20× ve 40× görüntülerindeki hücre sayımı ile hesaplanan transfeksiyon verimliliği

Konsantrasyon (nM)	20× Görüntü Transfeksiyon Verimliliği	40× Görüntü Transfeksiyon Verimliliği
5	%25	%37.93
20	%40.57	%41.66
50	%70.96	%77.27

Tablo 4.4. 72 saat BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan ile transfeksiyon işlemi sonrasında SKOV-3 hücrelerinin 20× ve 40× görüntülerindeki hücre sayımı ile hesaplanan transfeksiyon verimliliği

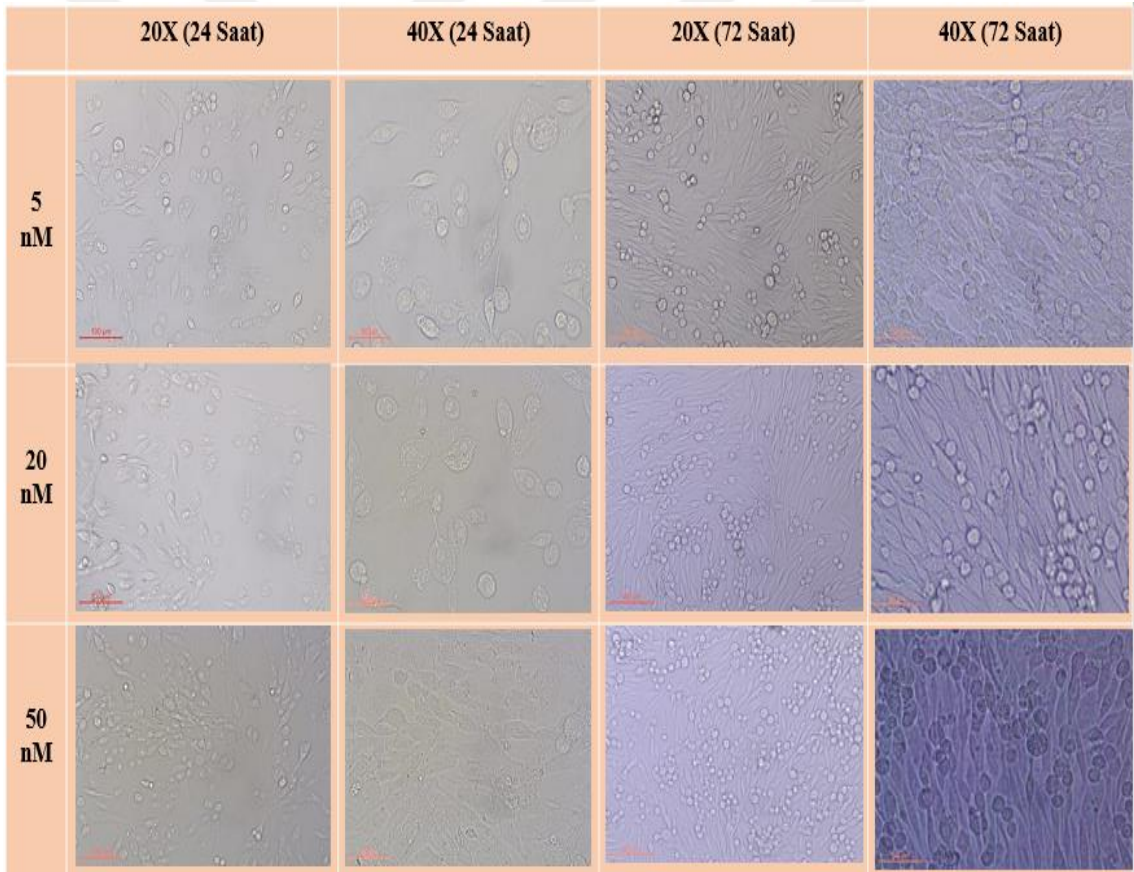
Konsantrasyon (nM)	20× Görüntü Transfeksiyon Verimliliği	40× Görüntü Transfeksiyon Verimliliği
5	%25	%39.28
20	%42.35	%40
50	%62	%78

SKOV-3 hücrelerinin 24 saat boyunca 5nM konsantrasyonunda BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan boyası ile transfeksiyonu sonrasında transfeksiyon verimliliği 25 iken, konsantrasyonun 20 nM çıkarılması ile verimlilik yüzdesi 40.57 bulunmuştur (Tablo 4.3.). Test edilen en yüksek konsantrasyonda (50 nM) ise, transfeksiyon verimliliği % 70.96 olarak bulunmuştur. SKOV-3 hücrelerinin BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı

floresan boyası ile transfeksiyon verimliliği konsantrasyona bağı olarak artış göstermiştir (Tablo 4.3. ve Tablo 4.4.).

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek transfeksiyon verimliliğine ulaşılan 50 nM konsantrasyon, mimik hsa-miR-455-3p'nin SKOV-3 hücrelerine transfeksiyonu için seçilmiş olup, 50 nM hsa-miR-455-3p ile hücreler transfekte edildikten sonra hücre göç oranı, hücre proliferasyonu ve erken apoptoz hücre sayısı belirlenmiştir.

hsa-miR-455-3p transfekte edilmiş SKOV-3 hücrelerinin morfolojik değişimlerinin belirlenmesi için ışık mikroskobuyla görüntüleme yapılmıştır. Görüntüler 20× ve 40× büyütme ile gösterilmiştir. hsa-miR-455-3p transfekte edilmiş hücrelerin görüntüleri Şekil 4.4.'te verilmiştir.

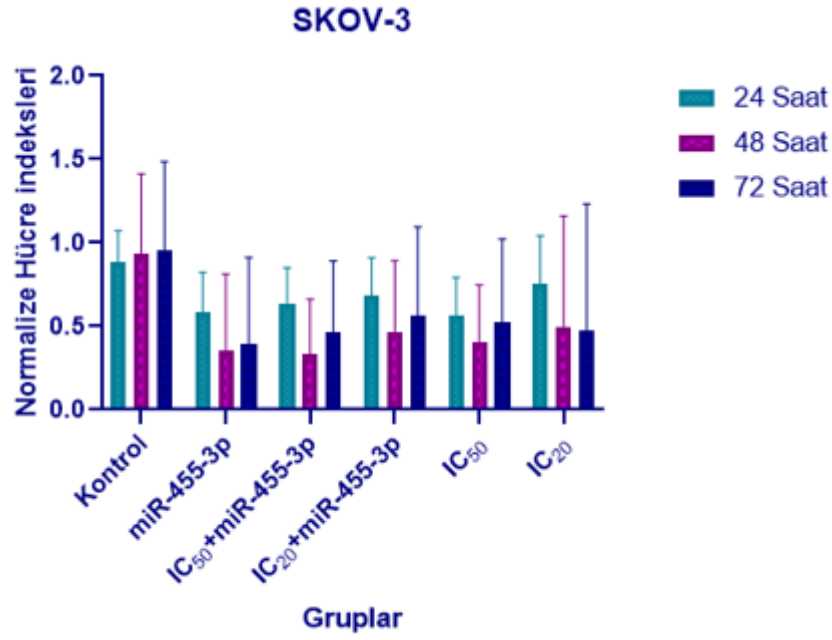


Şekil 4.4. hsa- miR-455-3p transfekte edilmiş SKOV-3 hücrelerinin 24 ve 72 saatteki ışık mikroskobu görüntüleri (20× ve 40×).

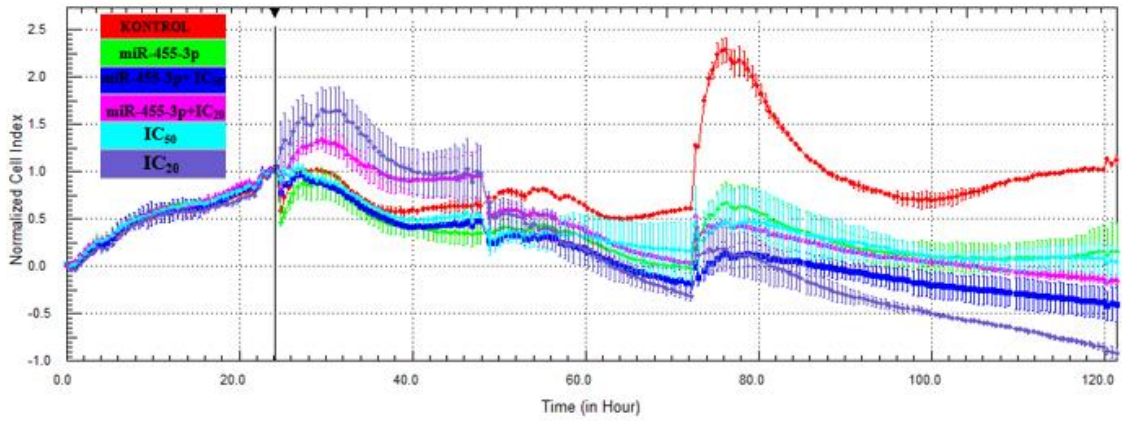
hsa-miR-455-3p transfekte edilmiş ışık mikroskobu görüntülerine bakıldığında hsa-miR-455-3p transfeksiyonu SKOV-3 yumurtalık kanseri hücrelerinde tüm konsantrasyon değerlerinde ve her iki zaman diliminde de herhangi bir morfolojik değişikliğe neden olmadığı, hücrelerin morfolojilerini koruduğu gözlenmiştir (şekil 4.4.).

4.1.3. Cardamonin inhibitörünün ve hsa-miR-455-3p transfeksiyonun hücre göçü üzerine etkisi

SKOV-3 hücrelerinin g   yeteneği üzerine  -kateninin ve hsa-miR-455-3p miRNA'nın aşırı ekspresyonunun rolünün belirlenmesi amacı ile hücreler öncellikle 24 saat cardamonin ile (18.07  M/ml (IC₅₀) ve 5  M/ml (IC₂₀)) RTCA sisteminde inkübasyona bırakılmışlardır. Daha sonra cardamonin ile muamele edilen ya da edilmeyen hücreler mimik hsa-miR-455-3p miRNA ile transfekte edilmişlerdir. Deney ve kontrol hücre gruplarının g   yetenekleri 72 saat boyunca RTCA sisteminde gözlemlenmiştir ve plakaların tabanında yer alan altın elektrotlardaki elektrik empedansında meydana gelen değişimlerin ölçümü alınmıştır. Bu empedans, yayılım göstermiş olan hücrelerin sayısını hesaplayan hücre indeksi (CI) değeri şeklinde ifade edilmiştir. Analiz sonuçları RTCA Software programında normalize edilmiş ve CI değerleri belirlenmiştir. Kontrol hücre grubuna inhibitör ya da transfeksiyon uygulaması yapılmamış olup, sadece hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Veri grafikleri Graphpad Prism 8 programı kullanılarak elde edilmiştir. İstatistiksel analizlerde kontrol grubuna göre kıyaslama tek yönlü Anova, ikili karşılaştırmalar student-t test ile yapılmıştır. şekil 4.5.'te normalize hücre indeksi değerlerinin 24, 48 ve 72 saat için birleştirilmiş grafiği ve şekil 4.6.'da RTCA cihazından alınan hücre g  n n normalize CI değerinin zamana karşı grafiği verilmiştir.



Şekil 4.5. SKOV-3 hücre göçünün normalize hücre indeksi değerleri.

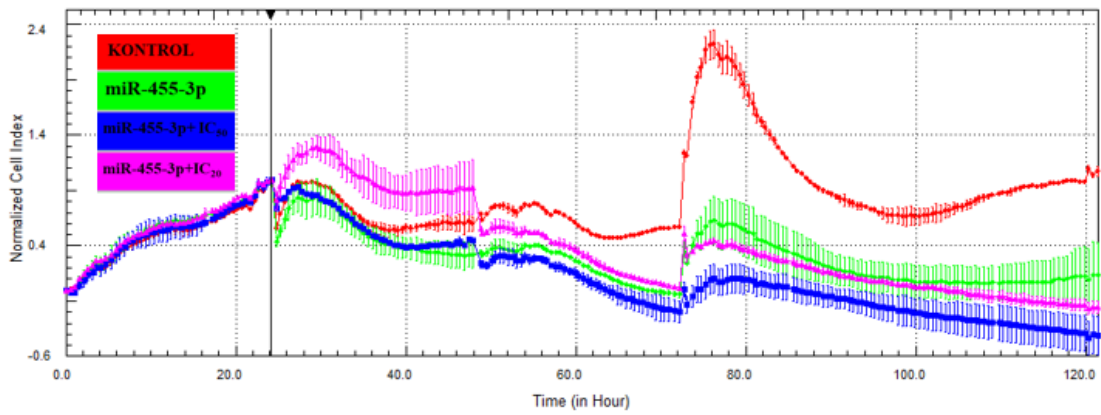


Şekil 4.6. SKOV-3 hücrelerinin CIM-plakalarda cardamonin varlığında ve hsa-miR-455-3p transfeksiyonu sonrasında hücre göçü oranları. Deneyler üç bağımsız tekrar şeklinde ve her bir deneyde n=2 olarak yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, SKOV-3 hücrelerinin 18.07 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (IC₅₀) cardamonin ile muamelesi sonrasında hücre göç oranının kontrol hücre grubuna göre %50 oranında inhibe edildiğini göstermiştir. Cardamonin konsantrasyonu 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (IC₂₀)'ye düşürüldüğünde ise, hücre göçünde %40 oranında bir inhibisyonun gerçekleştiği tespit

edilmiştir (Şekil 4.5.). Buna göre, sitotoksik olmayan (5 μ M/ml) cardamonin konsantrasyonu ile β -kateninin inhibe edilmesi, SKOV-3 hücrelerinin göç yeteneğini de anlamlı bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir.

SKOV-3 hücrelerinin mimik hsa-miR-455-3p miRNA ile transfeksiyonu sonrasında cardamonin varlığında ve yokluğunda hücre göç oranı Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



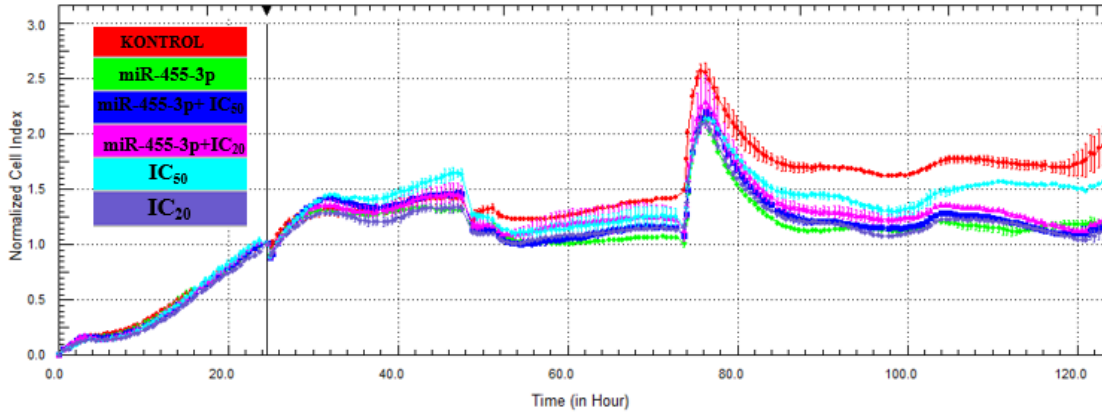
Şekil 4.7. SKOV-3 hücrelerinin CIM-plakalarda hsa-miR-455-3p uygulama gruplarının normalize CI ve zamana karşı grafiği

SKOV-3 hücreleri IC₅₀ (18.07 μ M/ml) ya da IC₂₀ (5 μ M/ml) cardamonin ile 24 saat muamele sonrasında mimik hsa-miR-455-3p miRNA ile transfekte edildikten sonra hücre göç oranı tespit edilmiştir (Şekil 4.7.). Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra transfekte ve cardamonin uygulanmış deney hücre gruplarında hücre göçü %80 oranında inhibe olmuştur.

Transfeksiyondan sonraki 48 ve 72 saatlerde ise kontrol hücre grubu dışında kalan deney hücre gruplarında göç oranı negatif değerlere düşmüştür. Elde edilen sonuçlar, SKOV-3 hücrelerinin göç oranlarında inhibisyon gözlenmiş olmasına rağmen istatistiksel analizler deney hücre gruplarının varyansları arasında anlamlı bir farkın olmadığı ($p > 0.05$) tespit edilmiştir.

4.1.4. Cardamonin inhibitörünün ve hsa-miR-455-3p transfeksiyonunun hücre proliferasyonu üzerine etkisi

SKOV-3 hücre hattı E-plaka üzerine ekilmiş ve 24 saat hücre tutunmasını sağlamak için RTCA sisteminde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler 18.07 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (IC_{50}) ve 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (IC_{20}) cardamonin ile 24 saat muamele edilmişlerdir. Daha sonra, cardamonin ile muamele edilen ya da edilmeyen hücre grupları mimik hsa-miR-455-3p miRNA ile transfekte edilmiş ve sonraki üç gün süre ile RTCA’da CI değerleri ölçülmüştür. Deneyin analiz sonuçları RTCA software programında cardamonin eklenmiş süreye göre normalize edilip CI değerleri tespit edilmiştir. Kontrol hücre grubuna transfeksiyon veya inhibitör uygulaması yapılmamıştır. Kontrol grubu %100 kabul edilerek 24, 48, 72 ve 96 saatlere göre alınmış CI değerlerinden hücre proliferasyon oranları hesaplanmıştır. Sonuçlar üç bağımsız deney şeklinde ve her deneyde iki kuyunun ortalaması alınarak verilmiştir. RTCA cihazından alınan normalize CI’e karşı zaman grafiği Şekil 4.8.’de verilmiştir.

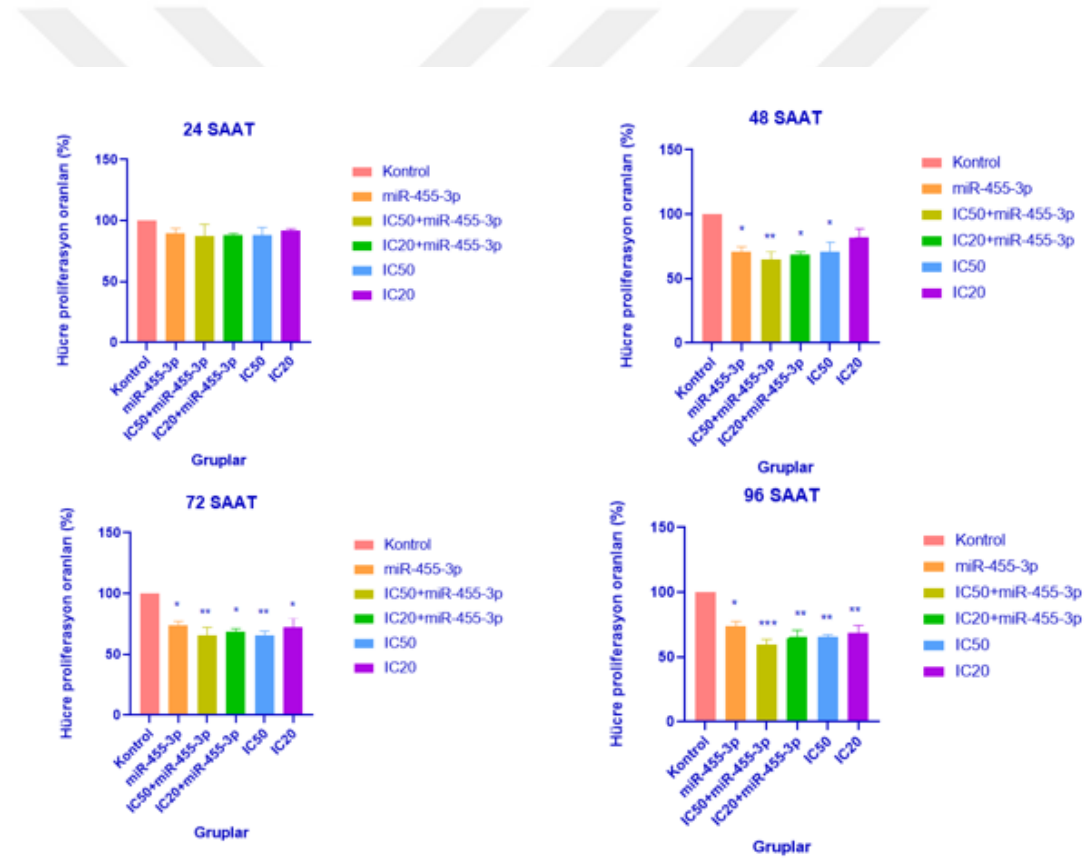


Şekil 4.8. SKOV-3 hücrelerinin E-plakalarda cardamonin ve hsa-miR-455-3p uygulaması ile hücre proliferasyonu üzerine etkisi.

RTCA software programında cardamonin eklenen süreye göre elde edilen veriler normalize edilmiş ve hücre indeksine karşı zaman grafiği çizilerek elde edilmiştir. Şekil 4.8.’de görüldüğü gibi cardamonin uygulanan ve mimik hsa-miR-455-3p miRNA transfeksiyonu yapılan hücre gruplarının proliferasyon düzeyleri (miR-455-3p transfekte hücre grubunun CI: 1.1988, cardamonin varlığında IC₅₀+hsa-miR-455-3p transfekte hücre grubunun CI: 1.1580, cardamonin varlığında IC₂₀+hsa-miR-455-3p transfekte hücre grubunun CI: 1.2181, cardamonin varlığında IC₅₀ CI:1.5488, cardamonin

varlığında IC₂₀ CI: 1.1108) kontrol hücre grubuna (CI: 1.8746) göre düşük seviyede ölçülmüştür. Özellikle 48. saat ve sonrasında elde edilen bulgular, hsa-miR-455-3p transfekte edilen ve cardamoninin varlığında (cardamonin varlığında IC₅₀+hsa-miR-455-3p transfekte hücre grubunun proliferasyon oranı=65.03, cardamonin varlığında IC₂₀+hsa-miR-455-3p transfekte hücre grubunun proliferasyon oranı=68.5) kombine uygulanmasının kontrol hücre grubuna göre hücre proliferasyon oranında önemli derecede düşüş gözlenmiştir.

İstatistiksel analiz ve hücre proliferasyon oranlarına göre grafik çizimi Graphpad Prism 8 programında yapılmış ve Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. SKOV-3 hücrelerine cardamonin inhibitörü ve hsa-miR-455-3p transfeksiyon uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine etkisi. Hücre proliferasyon oranları ortalama $\pm$ SEM'dir. Analiz tek yönlü Anova ile * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

24 saat cardamonin uygulaması sonrasında hücre proliferasyon oranı cardamonin konsantrasyona (IC₅₀ cardamonin varlığında hücre proliferasyon oranı= 88.29 ve IC₂₀

cardamonin varlığında hücre proliferasyon oranı= 91.5) bağlı olarak kısmen düşüş göstermiştir. Ancak, elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kontrol hücre grubuna göre (CI: 1.4064) SKOV-3 hücrelerinin mimik hsa-miR-455-3p miRNA ile transfeksiyonu sonrasında hücre proliferasyonunda (CI: 1.0609) önemli düzeyde bir düşüş gözlenmiştir. Mimik hsa-miR-455-3p miRNA'nın transfeksiyonu sonrasında hücre proliferasyon oranı kontrol grubuna göre %30 oranında bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.9.).

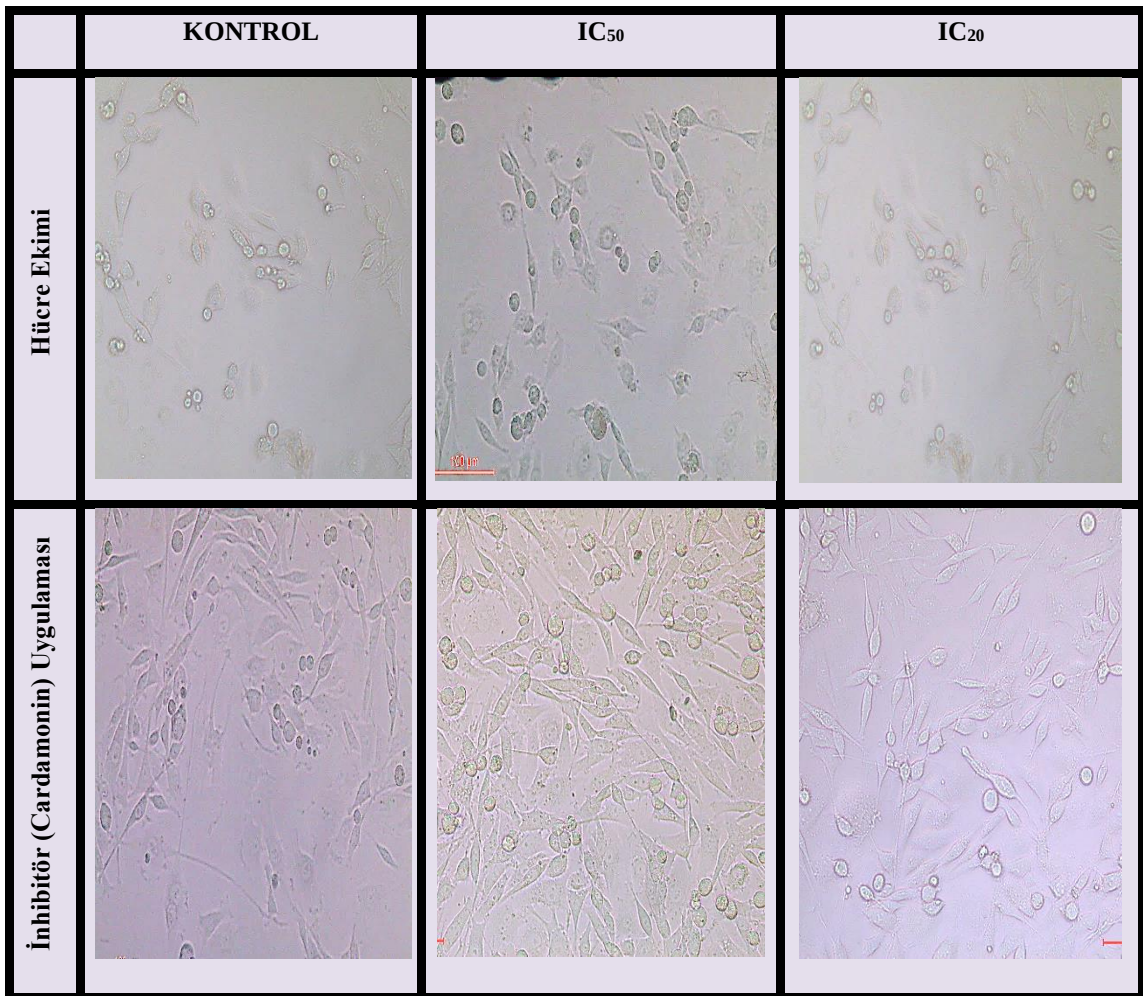
Kombine farklı dozlarda cardamonin IC₅₀ ve IC₂₀ ve mimik hsa-miR-455-3p miRNA transfeksiyonu yapılmış hücre grubunun proliferasyon düzeyinde konsantrasyonuna bağımsız bir şekilde %35 oranında bir düşüş tespit edilmiştir. Aynı şekilde, cardamonin uygulaması yapılmış ancak mimik hsa-miR-455-3p miRNA ile transfekte edilmemiş SKOV-3 hücrelerinin proliferasyon oranı %25 oranında azalmıştır (p<0,05). İstatistiksel analizde student t-testi ile grupların ikili karşılaştırmaları yapıldığında varyansı kıyaslayan F testi 0.05'ten büyük olduğu için kıyaslanan ikili grupların eşit standart sapmaya sahip olması istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını göstermiştir.

Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra, deney hücre gruplarının proliferasyon oranları (miR-455-3p ile transfekte edilen hücrelerin proliferasyon oranı= 73.98, cardamonin IC₅₀+hsa-miR-455-3p ile transfekte edilen hücrelerin proliferasyon oranı=65.55, cardamonin IC₂₀+hsa-miR-455-3p ile transfekte edilen hücrelerin proliferasyon oranı=68.61, cardamonin IC₅₀ hücrelerinin proliferasyon oranı= 65.34, cardamonin IC₂₀ hücrelerinin proliferasyon oranı= 72.50) kontrol hücre grubuna göre belirgin bir azalma göstermektedir (p<0,05). Cardamonin ve mimik hsa-miR-455-3p ekspresyonu SKOV-3 hücre proliferasyonu üzerine potent bir inhibitör etkisi göstermiştir.

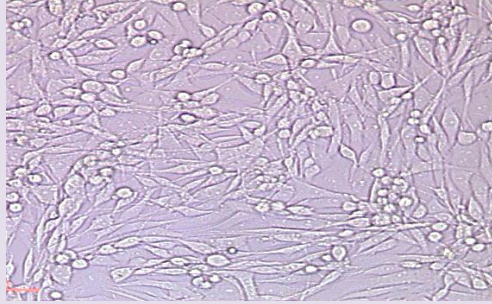
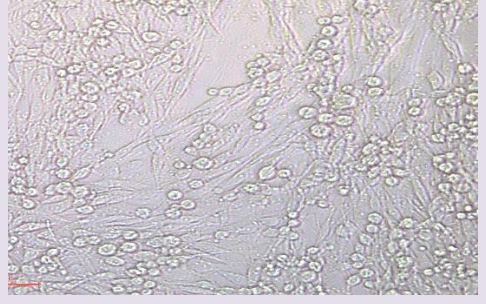
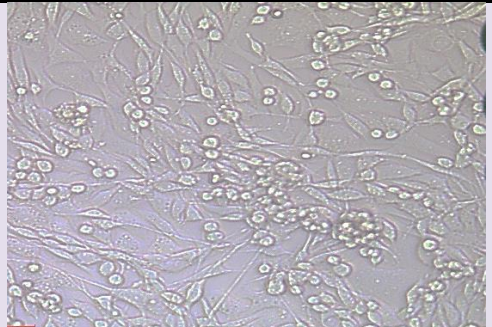
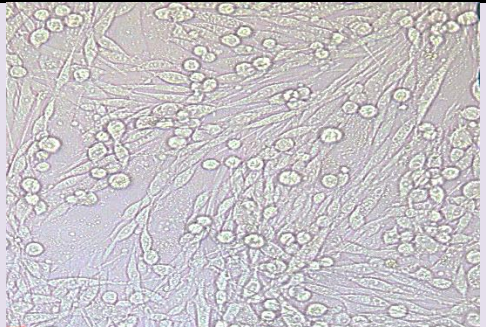
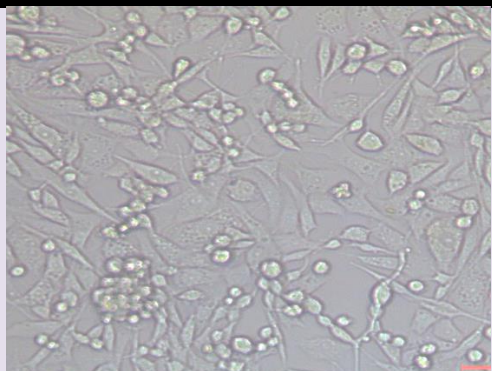
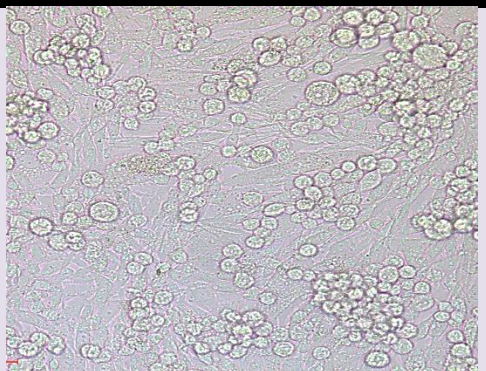
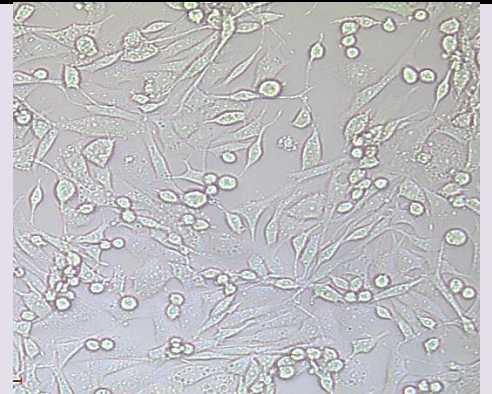
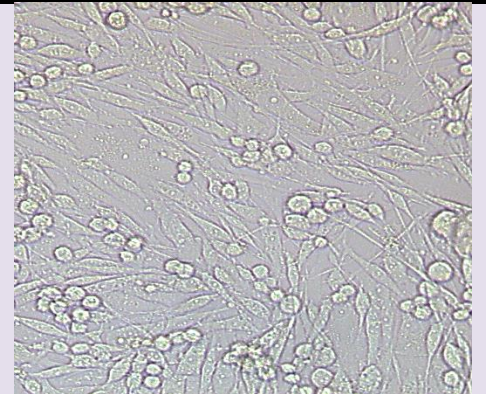
Transfeksiyon işleminden 72 saat sonra ise, hsa-miR-455-3p transfekte edilmiş hücrelerin proliferasyon oranı 73.92 olarak bulunurken kontrol hücre grubunun proliferasyon oranına kıyasla %27 oranında bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.9.). Cardamonin varlığında ve hsa-miR-455-3p transfekte edilmiş hücre grubunun proliferasyon oranı %60 seviyelerindedir. Yalnızca SKOV-3 hücrelerinin cardamonin ile muamele edilmesi hücre proliferasyon oranında %30-35 oranında bir azalmaya neden olmuştur (p<0,05).

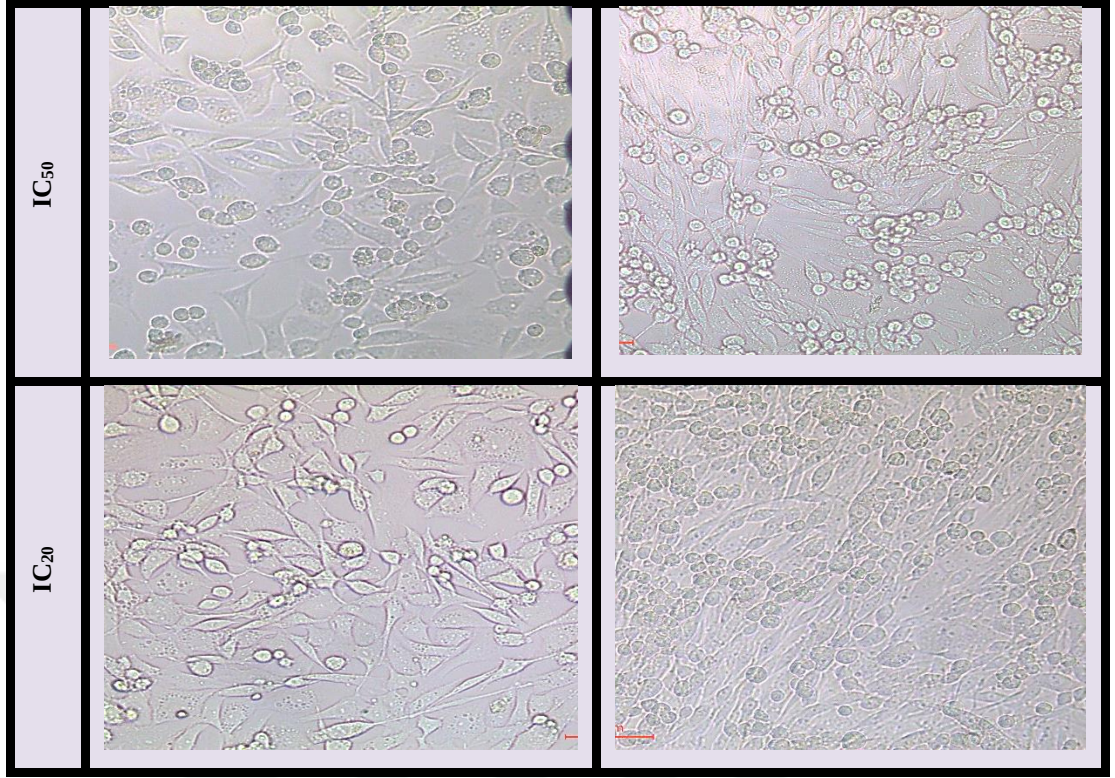
SKOV-3 hücrelerinin hem hücre göçü hem de proliferasyon oranları yalnızca cardamonin ve mimik hsa-miR-455-3p miRNA ile transfekte edilen hücre gruplarında önemli düzeyde düşüş gözlenmiştir. Kombine uygulama diğer hücre gruplarına kıyasla SKOV-3 kanser hücreleri üzerine potent inhibitör etki göstermiştir.

Her uygulanan işlemten 24 saat sonra her deney hücre grubundan ışık mikroskobu görüntüleri alınmıştır. 20× büyütmede görüntüleme yapılmıştır. Görüntüler Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.10. IC₅₀ ve IC₂₀ dozlarında cardamonin uygulanmış E-plakalarda SKOV-3 hücrelerinin 20× büyütmede ışık mikroskobu görüntüleri (Uygulamanın 24. ve 48. saatleri gösterilmiştir.)

	Transfeksiyon Sonrası 1.Gün	Transfeksiyon Sonrası 3.Gün
Kontrol		
MiR-455-3p		
IC ₅₀ +miR-455-3p		
IC ₂₀ +miR-455-3p		



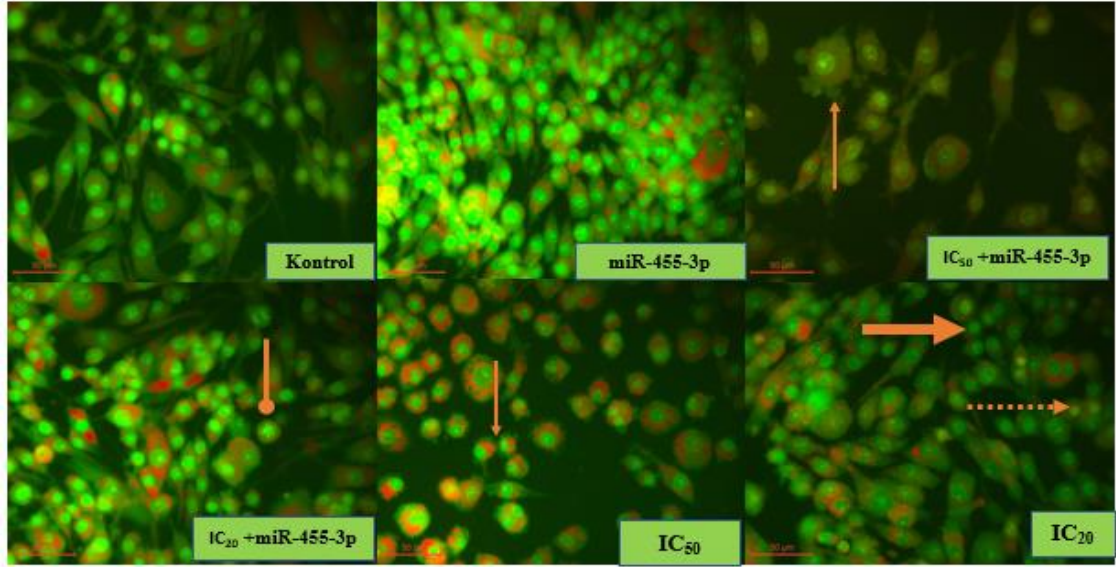
Şekil 4.11. Cardamonin varlığında ve hsa-miR-455-3p transfeksiyonu uygulanmış E-plakalarda SKOV-3 hücrelerinin inkübasyon sürelerinin 20× büyütme ışık mikroskobu görüntüleri

Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.'de gösterildiği gibi transfeksiyon uygulanmış hücrelerin kontrol grubuna ve sadece inhibitör uygulamasına kıyasla hücre sayısında bir azalma olduğu görülmektedir. Hem cardamonin varlığında hemde hsa-miR-455-3p transfekte edilmiş SKOV-3 hücre sayısının diğer tüm deney hücre gruplarına ve kontrol hücre grubuna göre daha az olduğu görülmektedir. Transfeksiyonun 72. saatinde ise, hücre proliferasyonundaki azalmanın transfeksiyonun 24. saatine kıyasla görüntülerde çok daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu görüntülerde transfeksiyonun üçüncü gününde gözlenen proliferasyondaki yaklaşık %40 oranındaki azalmayı destekler niteliktedir.

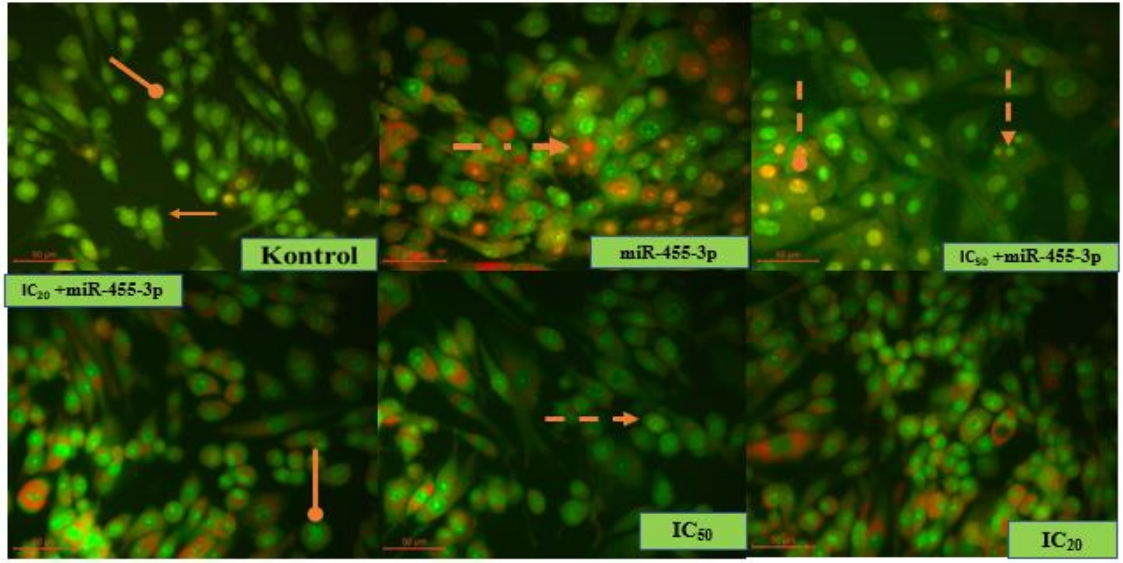
4.1.5. Akridin oranj/etidyum bromür boyama ile apoptozun belirlenmesi

Apoptotik hücreler akridin oranj/etidyum bromür boyama yöntemi ile yapılmıştır. SKOV-3 hücreleri 24 kuyulu plakalara ekildikten 24 saat sonra IC₅₀ (18.07 µM/ml) ya da IC₂₀ (5 µM/ml) cardamonin hücre ortamına eklenmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde, cardamonin içeren besi yeri hücrelerden uzaklaştırılarak, mimik hsa-miR-455-3p miRNA ile hücreler 24, 48 veya 72 saat transfekte edilmişlerdir. Her inkübasyon süresi sonrasında

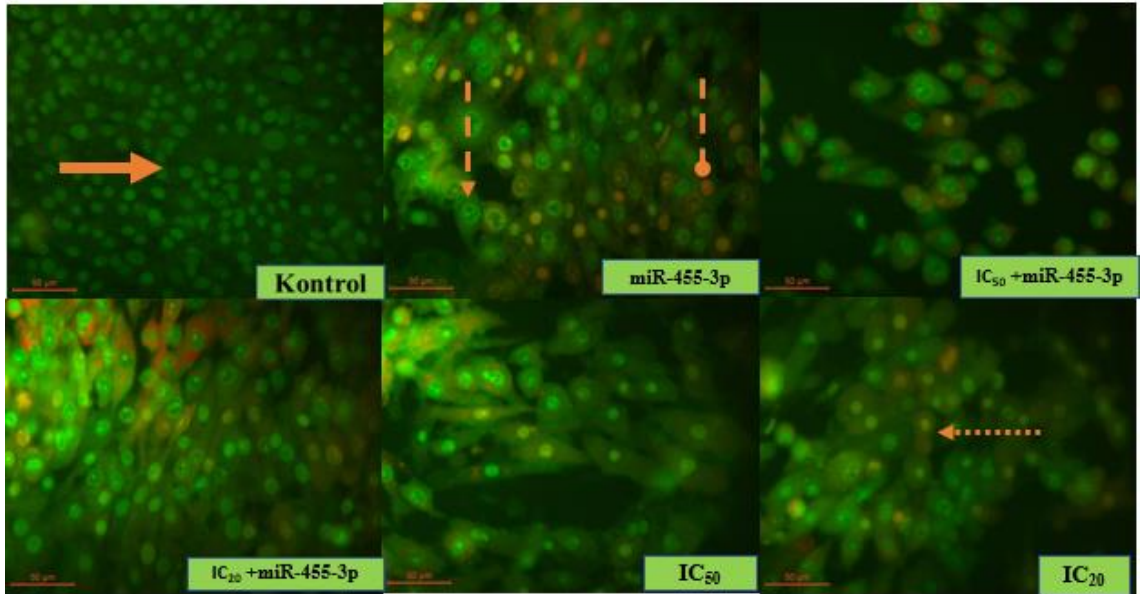
hücreler 1:1 oranında hazırlanan akridin oranj + etidyum bromür boya karışımı (AO/EB) ile (50 µg/ ml etidyum bromür ile 100 µg/ ml akridin oranj) 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra floresan mikroskopta (Leica DMI 4000B, Almanya) FITC filtresi kullanılarak görüntüleme işlemi yapılmıştır. Şekil 4.12.-4.14.'de zamana bağlı olarak SKOV-3 hücrelerinde meydana gelen apoptotik değişimler verilmiştir.



Şekil 4.12. Cardamonin varlığında ve miRNA-455-3p transfeksiyon uygulamasından 24 saat sonra AO/EB ile boyanmış SKOV-3 hücrelerinde canlı ve apoptotik hücre görüntüleri (Kalın ok: canlı hücre, noktalı ok: apoptotik hücre, düz ok: membran kabarması, oval uçlu ok:kromotin kondensasyonunu göstermektedir)



Şekil 4.13. Cardamonin varlığında ve miRNA-455-3p transfeksiyon uygulamasından 48 saat sonra AO/EB ile boyanmış SKOV-3 hücrelerinde canlı ve apoptotik hücre görüntüleri (düz ok: membran kabarması, oval uçlu ok:kromotin kondensasyonu, kesikli ok: erken apoptoz, noktali ve kesikli ok: nekroz, kesikli ve oval uçlu ok: geç apoptotik hücreyi göstermektedir)



Şekil 4.14. Cardamonin varlığında ve miRNA-455-3p transfeksiyon uygulamasından 72 saat sonra AO/EB ile boyanmış SKOV-3 hücrelerinde canlı ve apoptotik hücre görüntüleri (kalın ok: canlı hücre, noktali ok: apoptotik hücre, kesikli ok: erken apoptotik hücre ve kesikli ve oval uçlu ok: geç apoptotik hücreyi göstermektedir)

Yapılan hücre sayımları sonrasında cardamonin varlığında ve miRNA-455-3p transfeksiyonu uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonraki canlı ve apoptotik hücreler yüzde olarak hesaplanmıştır. Tablo 4.5.'de bu yüzde oranları verilmiştir.

Tablo 4.5. SKOV-3 hücrelerine ait AO/EB boyama sonucunda elde edilen canlı ve apoptotik hücre sayısı (%)

Gruplar	24. SAAT		48.SAAT		72.SAAT	
	Canlı Hücre(%)	Apoptotik Hücre (%)	Canlı Hücre(%)	Apoptotik Hücre (%)	Canlı Hücre(%)	Apoptotik Hücre (%)
Kontrol	%82.5	%17.5	%91.58	%8.42	%94.74	%5.26
miR-455-3p	%58.32	% 41.68	%55.76	%44.24	%53.9	%46.1
IC₅₀+miR-455-3p	%37	%63	%63	%37	%44.5	%55.5
IC₂₀+miR-455-3p	%68.5	%31.5	%66.7	%33.3	%49.4	%50.6
IC₅₀	%16.67	%83.33	%57.9	%42.10	%52.3	%47.7
IC₂₀	%65	%35	%62	%38	%40.9	%59.1

SKOV-3 hücrelerinin AO/EB boyama görüntüleri ve bu görüntülerden elde edilen canlı veya apoptotik (erken apoptotik + geç (nekrotik) apoptotik) hücre sayıları (Tablo 4.5.) değerlendirildiğinde kontrol hücre grubunun 24 saat inkübasyon sonrasında apoptotik hücre oranı %17.5 olarak en yüksek değere ulaşmış olup, inkübasyon süresinin uzaması ile apoptotik hücre sayısında (48 saat sonra %8.42 ve 72 saat sonra %5.26) azalma görülmüştür. 24 saat inkübasyon sonrasında, (18.07 μ M/ml) IC₅₀ cardamonin varlığında ve hsa-miR-455-3p ile transfekte edilmiş hücre grubundaki apoptotik hücre sayısı %63 olarak diğer gruplara kıyasla daha yüksek olarak bulunmuştur. Ancak, en yüksek apoptotik hücre sayısı %83.33 ile sadece (18.07 μ M/ml) IC₅₀ cardamonin uygulaması sonrasında tespit edilmiştir. Hücre morfolojilerine bakıldığında özellikle hücrelerin membranlarında meydana gelen bir değişiklik olan membran kabarması ve hücre çekirdeğinde meydana gelen kromatin kondensasyonu gözlenmiştir (Şekil 4.12.-14.).

48 saat inkübasyon süresi sonrasında tüm deney hücre gruplarının apoptotik hücre sayılarında bir miktar düşüş olmasına rağmen sürenin 72 saatte çıkarılması ile cardamoninin düşük konsantrasyonu (5 $\mu\text{M}/\text{ml}$) zaman bağılı olarak apoptotik hücre sayısında artışa (%59.1) neden olmuştur. Bununla birlikte (18.07 $\mu\text{M}/\text{ml}$) IC_{50} cardamonin varlığında ve hsa-miR-455-3p ile transfekte edilmiş hücre grubunda ise % 55.5 oranında apoptotik hücre sayısı belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz öncül apoptotik hücre verileri özellikle IC_{50} dozunda cardamonin varlığındaki hücre grubunda yüksek oranda hücrelerin apoptoza gittiğini göstermektedir. Yine cardamonin varlığında ve hsa-miR-455-3p ile transfekte edilmiş hücre grubunda ise apoptotik hücre sayısı %50'nin üzerinde bulunmuştur. Ancak, apoptotik hücrelerin daha ileri deneysel çalışmalar ile karakterize edilmesi gerekmektedir.

5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Küresel anlamda, yumurtalık kanseri jinekolojik kanserler arasında mortalitesi en yüksek kanserlerden birisidir. Bu kanser türünde mortalitenin bu kadar yüksek olmasının nedenlerinin başında geç evrede teşhis edilmesi gelmektedir. Günümüzde birçok tedavi yumurtalık kanseri için aktif olarak kullanılmaktadır. Bu tedaviler tam bir iyileşme için değil yaşam süresini uzatmak için kullanılan tedavilerdir. Ayrıca tedavilerde kullanılan ilaçların birçoğu kanserli hücrelerin yanında sağlıklı olan hücrelere de sitotoksik etki yarattığından tedavilerde yeni biyobelirteçlerin kullanılması için yapılan çok sayıda bilimsel araştırma devam etmektedir.

Bu biyobelirteçlerden biri olan miRNA'lar, mRNA'ların translasyonunu yönetmekte ve transkripsiyon sonrasında gen ekspresyonunu düzenlemektedir (Khan vd., 2019). Hücre bölünmesi ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte yer alan miRNA'lar onkogenik ve tümör baskılayıcı olarak iki gruba ayrılmaktadır. Epitelyal yumurtalık kanserinde tümör baskılayıcı olarak yer alan miR-455'in Notch1 geninin doğrudan hedefi olduğu belirlenmiş ve bu genin ekspresyonunun düzenlenmesiyle de epitelyal yumurtalık kanserinde hücre proliferasyonu ve invazyonunu düzenlemede tümör baskılayıcı olarak rolü doğrulanmıştır (Xu vd., 2017).

Bu tez çalışmasında hsa-miR-455-3p'nin Wnt/ β -katenin yolu üzerindeki baskılayıcı ya da uyarıcı etkisini araştırmak amacıyla β -katenin inhibitörünün varlığı ve yokluğunda hsa-miR-455-3p transfekte edilmiş SKOV-3 hücrelerinde hücre göçü, proliferasyonu ve apoptoz oranlarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda öncelikle β -katenin inhibitörü olan cardamoninin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla SKOV-3 hücrelerine MTT testi uygulanmış ve IC₅₀ ile IC₂₀ dozları belirlenmiştir. Daha sonrasında mimik hsa-miR-455-3p ile SKOV-3 hücreleri transfekte edilerek miRNA-455-3p'nin ekspresyon seviyesi stimüle edilmiştir. Cardamonin varlığında ve yokluğunda ya da hsa-miR-455-3p ile transfekte edilen ya da edilmeyen hücre grup modelleri oluşturularak hücre göçü oranları, hücre proliferasyonu ve erken/geç apoptotik hücre sayıları belirlenmiştir.

Yapılan literatür taraması sonrasında, 2018 yılında Shi ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada cardamoninin mTOR inhibisyonu ve otofaji üzerindeki mekanizması araştırılmış ve SKOV-3 hücrelerinde hücre canlılığı testi yine

konsantrasyona ve zamana bağılı olarak SKOV-3 hücre canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Shi vd., 2018).

SKOV-3 hücrelerinde cardamonin tarafından indüklenen proliferasyon inhibisyonu ve otofajide DAP1'in etkinliği araştırılmış ve cardamonin ile yapılan hücre canlılığının tespitinde konsantrasyona bağılı bir şekilde önemli ölçüde inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir (Nie vd., 2020).

2020 yılında yapılan bir çalışmada ise, cardamonin inhibitörü varlığında hücre döngüsü paternleri ve yumurtalık kanseri hücrelerinde apoptotik tepkileri değerlendirilmiş ve SKOV-3 hücrelerinde cardamonin dozuna bağılı olarak önemli ölçüde inhibisyona neden olduğu tespit edilmiş ve 24 saat sonrasında cardamonin IC₅₀ değeri 32.84 µM, 48 saat sonra ise 8.10 µM olarak belirtilmiştir (Ruibin vd., 2020).

Bu çalışmada, SKOV-3 hücreleri üzerine cardamoninin 24 saat sonrasında IC₅₀ değeri 18.07 µM ve 48 saat inkübasyon sonrasında IC₅₀ değeri 10.32 µM olarak hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar özellikle 48 saatteki IC₅₀ dozu literatürde yer alan çalışmalar ile örtüşmektedir.

Golgi proteini 73'ün hepatosellüler kanserde proliferasyon ve apoptotik etkisine bakıldığı bir çalışmada golgi proteini 73'e karşı sentezlenen gizli RNAi transfeksiyonu yapılmış ve transfeksiyon verimliliği BLOCK-iT Alexa-Fluor Kırmızı Floresan ile doğrulanmıştır. Bu çalışmada transfeksiyon verimliliğinin en yüksek olduğu konsantrasyon değeri yapılan diğer deneysel aşamalarda kullanılmıştır. Aynı zamanda transfeksiyon sonrası hücre morfolojisi incelenmiş ve hücrelerin üzerinde siRNA'ların bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir (Zhang vd., 2014).

Yine 2016 yılında Jurcevic ve diğerleri endometriyal adenokarsinomunda belirledikleri miRNA kümesinin farklı ekspresyonlarını doğrulamak ve miR-34a'nın DLL1 ve Notch1 genlerindeki düzenleyici etkisini incelemek için yaptığı çalışmada miR-34a için transfeksiyon verimliliği belirlemede BLOCK-iT Alexa-Fluor Kırmızı Floresan kontrolü kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında da üç farklı konsantrasyonda miR-455-3p'nin transfeksiyon verimliliği ile paralel olarak aynı konsantrasyonda BLOCK-iT Alexa-Fluor Kırmızı Floresan kontrolünün transfeksiyonu yapılarak tespit edilmiştir. Alexa dizisi, herhangi bir

gene homoloji göstermediğinden ve hücreye girişinden kaynaklı hücresel olayları indüklediğinden tercih edilmiştir. Transfeksiyon verimliliğinin en yüksek olduğu konsantrasyon 50 nM olarak tespit edilmiştir. SKOV-3 hücrelerinin transfeksiyon sonrası hücre morfolojilerine bakıldığında morfolojik olarak herhangi bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir.

Yapılan araştırmalar sonucunda miR-455-5p ile miR-455-3p'nin ektopik ekspresyon ile birçok kanser türünün göç ve proliferasyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Yamada vd., 2018).

Ning ve diğerlerinin 2017 yılında yayınladığı çalışmada insan mide kanserinde miR-455'in yukarı regülasyonu sonucu hücre göçünü önemli ölçüde inhibe ettiği ve aşağı regülasyonu ile de hücre göçünü desteklediği belirlenmiştir (Ning vd., 2017).

Yine pankreas kanserinde miR-455'in etkisine bakıldığı bir çalışmada miR-455-3p'nin TAZ yoluyla Wnt/ β -katenin sinyalini kısıtladığı ve tümör baskılayıcı olarak işlev gösterdiği belirlenmiştir. Bu miRNA'nın aşırı ekspresyonunun hücre göçü ve EMT'yi inhibe ettiği, TAZ'ın aşırı ekspresyon göstermesi ile de miR-455-3p'nin etkisini tersine çevirdiği belirlenmiştir (Zhan vd., 2020).

SKOV-3 hücrelerinde miR-455-3p'nin translipoprotein 4'ü hedeflediği ve bu hücre hattında hücre göçü, proliferasyonu ve EMT'yi inhibe ettiğini gözlenmiştir. Normal ve yumurtalık kanseri hücrelerini kıyaslama yaparak yumurtalık kanserinde yağ asidi bağlayıcı protein 4'ün ekspresyonunu artırarak miR-455-3p'nin ekspresyonunu azalttığını belirlenmiştir. Ayrıca miR-455-3p'nin aşırı eksprese edilmesiyle SKOV-3 hücre hattında hücre göçünün önemli ölçüde inhibe edildiği gösterilmiştir (Tingting vd., 2019).

Bu tez çalışmasında ise, cardamonin inhibitörü ve/veya miR-455-3p'nin yumurtalık kanseri üzerindeki metastatik etkisini belirlemek için RTCA sistemi ile hücre göç oranı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, cardamonin varlığında ve miR-455-3p transfekte edilmiş kombine hücre grubunda 24 saat inkübasyon sonrasında hücre göç oranının diğer tüm hücre gruplarına göre daha yüksek oranda inhibe olduğu tespit edilmiştir. Zamana bağlı olarak hücre göç oranının inhibisyon düzeyinde artış olduğu belirlenmiştir.

miRNA'ların yumurtalık kanserinde hücre proliferasyonu üzerinde inhibe edici etkisini gösteren birçok yayın bulunmaktadır.

Bunlardan biri olan An ve diğerlerinin 2020 yılında miR-454'ün yumurtalık kanserindeki rolünü araştırmak için yaptıkları çalışmada E2F6'nın miR-454'ün hedeflediği olduğu, OVCAR3 ile SKOV-3 hücrelerinde bu miRNA'nın aşırı eksprese edilmesinin hücre proliferasyonunu inhibe edip apoptozu desteklediği bulunmuştur. Ek olarak yumurtalık kanserinde Wnt/ β -katenin ve Akt/mTOR sinyal yollarının miR-454 tarafından inhibe edildiği belirlenmiştir (An vd., 2020).

Yine Yang ve diğerlerinin 2019 yılındaki bir çalışmasında miR-802'ye bağlı epitelyal yumurtalık kanseri patogenezi araştırılmış ve CCK8 tahlili ile SKOV-3 ve OVCAR3 hücre hatlarının negatif kontrole kıyasla miR-802'nin aşırı ekspresyonunun proliferasyonu inhibe ettiği belirlenmiştir. Bunun yanında bu miRNA'nın aşırı ekspresyonunun apoptoz hızını da arttırdığı görülmüştür (Yang vd., 2019).

miR-455'in Notch1 genini hedeflediği bilinmektedir. miR-455 transfeksiyonu OVCAR-3, CAO-3 hücrelerine yapılarak miR-455 ekspresyonunun yukarı regülasyonu sağlanmış ve bu sayede hücre çoğalmasını engellediği saptanmıştır (Xu vd., 2017).

Bu tez çalışmasında ise cardamonin inhibitörü ve miR-455-3p'nin hücre proliferasyonu etkisi RTCA sistemi ile araştırılmış olup, sadece mimik miR-455-3p ile transfekte edilmiş hücre grubu ya da cardamonin uygulanmış hücre grubuna kıyasla cardamonin varlığında ve mimik miR-455-3p ile transfekte edilen kombine hücre grubunda proliferasyonun yüksek oranda baskılandığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, cardamonin varlığında ve miR-455-3p'nin ekspresyonunun uyarılması SKOV-3 hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkiye sahip olarak ovaryum kanserine yönelik alternatif bir tedavi yönteminin geliştirilmesi için umut verici ön bir çalışma olduğunu göstermektedir.

miRNA transfeksiyonu ile birlikte kanserli hücrelerde apoptotik oranın belirlenmesinde ve apoptozla bağlı olarak hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikleri belirlemek için birçok çalışmada AO/EB boyama tercih edilmiştir.

Tao ve diğerlerinin 2019'da bu alanda yaptıkları bir çalışmada miR-92a'nın mide karsinom hücrelerinde apoptoz katkıda bulunduğunu göstermiş ve miR-92a inhibitör-

negatif kontrol ve inhibitör ile transfekte edilmiş SGC7901 hücrelerinin AO/EB ile boyanması sağlanmıştır. miR-92a inhibitör grubu %50'nin üzerinde apoptotik hücre oranına sahip iken ve inhibitör-negatif kontrol grubu ise %5'ten daha az bir apoptotik orana sahip olduğu belirlenmiştir (Tao vd., 2019).

Yine 2021 yılında Wei ve diğerleri tarafından miR-101'in yumurtalık kanserinde terapötik potansiyeli ve rolü araştırılmıştır. OVACAR-3 hücrelerinde miR-101 transfeksiyonunun hücre canlılığında önemli ölçüde düşüşe neden olmuştur. Bunun altında yatan mekanizmayı anlamlandırmak için hücrelere negatif kontrol ve miR-101 transfekte edilerek AO/EB boyama yapılmış ve aşırı eksprese miR-101'in apoptotik hücre ölümünün aktivasyonuna yol açtığı gözlenmiştir. Ayrıca Annexin V/PI boyama ile apoptotik hücre yüzdeleri hesaplanmıştır. Sonuçlar kesin anlamda miR-101'in apoptozu tetiklediğini göstermiştir (Wei vd., 2021).

Bizim çalışmamızda SKOV-3 hücre hattında cardamonin ve/veya miR-455-3p'nin AO/EB boyama ile apoptotik hücre oranı üzerine etkileri belirlenmiştir. Cardamonin varlığında ya da yokluğunda ve miR-455-3p ile transfekte edilen ya da edilmeyen hücre gruplarında oluşan apoptotik hücreleri hem floresan mikroskop ile görüntülenmiş hem de hücre sayımı yapılmıştır. SKOV-3 hücrelerinde transfeksiyon ile miR-455-3p ekspresyonunun uyarılmasının apoptotik hücre oranında bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. Cardamonin ve miR-455-3p transfeksiyonunun beraber uygulandığı hücre grubunda ise apoptotik hücre oranında diğer hücre gruplarına kıyasla daha fazla artış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre cardamonin varlığında miR-455-3p'nin transfeksiyonu SKOV-3 hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskıladığı ve apoptozu tetiklediği belirlenmiştir.

Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar; cardamonin uygulaması ile birlikte miR-455-3p'nin ekspresyonunun uyarılmasının SKOV-3 hücreleri üzerinde anti-kanser etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bundan dolayı kombine uygulamanın SKOV-3 hücreleri ovaryum kanserinde terapötik bir hedef olabilme potansiyeli bulunmaktadır. Bu hipotezin desteklenebilmesi için miR-455-3p'nin inhibitörü varlığında hücre proliferasyonu ve apoptotik hücrelerin oranının araştırılması ve bununla birlikte apoptotik mekanizmanın belirlenmesi gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- Al-Alem, L.F., Baker, A.T., Pandya, U.M., Eisenhauer, E.L. Rueda, B.R. (2019). Understanding and Targeting Apoptotic Pathways in Ovarian Cancer. *Cancers*, 11 (11). Article number: 1631.
- An, Y., Zhang, J., Cheng, X., Li, B., Tian, Y., Zhang, X., Zhao, F. (2020). miR-454 suppresses the proliferation and invasion of ovarian cancer by targeting E2F6. *Cancer Cell International*, 20. Article number: 237.
- Andrews, L. and Mutch, D.G. (2017). Hereditary Ovarian Cancer and Risk Reduction. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 41, 31-48.
- Arend, R.C., Londoño Joshi, A.I., Straughn, J.M., Buchsbaum, D.J. (2013). The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: A review. *Gynecologic Oncology*, 131 (3), 772-779.
- Avcı, Ç.B., Süslüer Yılmaz, S., Şığva Doğan, Ö., Söğütlü, F., Dünder, M., Gündüz, C. (2013). Rapamisinin prostat kanseri hücre hatlarındaki etkisi. *Ege Tıp Dergisi*, 52 (1), 7-14.
- Baczynska, D., Bombik I. and Malicka-Błaszkiwicz, M. (2016). β -Catenin Expression Regulates Cell Migration of Human Colonic Adenocarcinoma Cells Through Gelsolin. *Anticancer Research*, 36 (10), 5249-5256.
- Balint, K., Xiao, M., Pinnix, C.C., Soma, A., Veres, I., Juhasz, I., Brown, E.J., Capobianco, A.J., Herlyn, M., Liu, Z. (2005). Activation of Notch1 signaling is required for β -catenin-mediated human primary melanoma progression. *Journal of Clinical Investigation*, 115 (11), 3166-3176.
- Bandera, E.V., Lee, V.S., Qin, B., Rodriguez-Rodriguez, L., Bethan Powell C. Kushi L.H., (2017). Impact of body mass index on ovarian cancer survival varies by stage. *British Journal of Cancer*, 117 (2), 282–289.
- Binju, M., Amaya Padilla, M.A., Wan, G., Gunosewoyo, H., Rahmanto, Y.S., Yu, Y. (2019). Therapeutic Inducers of Apoptosis in Ovarian Cancer. *Cancers*, 11 (11). Article number: 1786.

- Bocchicchio, S., Tesone, M. and Irusta, G. (2019). Convergence of Wnt and Notch signaling controls ovarian cancer cell survival. *Journal of Cellular Physiology*, 234 (12), 22130-22143.
- Brembeck, F.H., Rosário, M., and Birchmeier, W. (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16 (1), 51-59.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C.M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (24), 15524-15529.
- Carneiro, B.A. and El-Deiry, W.S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17 (7), 395–417.
- Chang, T.C., Zeitels, L.R., Hwang, H.W., Chivukula, R.R., Wentzel, E.A., Dews, M., Jung J., Gao, P., Dang, C.V., Beer, M.A., Tikhonenko, A.T., Mendell, J.T. (2009). Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (9), 3384-3389.
- Chen, S.N., Chang, R., Lin, L.T., Chern, C.U., Tsai, H.W., Wen, Z.H., Li, Y.H., Li, C.J., Tsui, K.H. (2019). MicroRNA in Ovarian Cancer: Biology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16 (9).
- Chen, Q., Xu, J., Li, L., Li, H., Mao, S., Zhang, F., Zen, K., Zhang, C.Y., Zhang, Q. (2014). MicroRNA-23a/b and microRNA-27a/b suppress Apaf-1 protein and alleviate hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Cell Death & Disease*, 5.
- Çınar, İ. ve Dursun H.G. (2016). miRNA Biyogenezi ve Kanser Patogenezindeki Fonksiyonu. *Sakarya Tıp Dergisi*, 6 (2), 64-71.

- de Sousa, M.C., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (24). Article number: 6249.
- Debelec-Butuner, B., Alapinar, C., Ertunc, N., Gonen-Korkmaz, C., Yörükoğlu, K., Korkmaz, K.M. (2014). TNF α -mediated loss of β -catenin/E-cadherin association and subsequent increase in cell migration is partially restored by NKX3.1 expression in prostate cells. *Plos One*, 9 (10).
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Sevignani, C., Wentzel, E., Furth, E.E., Lee, W.M., Enders, G.H., Mendell, J.T., Tikhonenko, A.T. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nature Genetics*, 38 (9), 1060-1065.
- Dilley, J., Burnell, M., Gentry Maharaj, A., Ryan, A., Neophytou, C., Apostolidou, S., Karpinskyj, C., Kalsi, J., Mould, T., Woolas, R., Singh, N., Widschwendter, M., Fallowfield, L., Campbell, S., Skates, S.J., McGuire, A., Parmar, M., Jacobs, I., Menon, U. (2020). Ovarian cancer symptoms, routes to diagnosis and survival – Population cohort study in the ‘no screen’ arm of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Gynecologic Oncology*, 158 (2), 316–322.
- Dönmez, H.G., Demirezen, Ş. ve Bektaş, M.S. (2011). WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 25 (3), 189-199.
- Eccles, S.A. and Welch, D.R. (2007). Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *The Lancet*, 369(9574): 1742–1757.
- Elsherif, S.B., Faria, S.C., Lall, C., Iyer, R., Bhosale P.R. (2019). Ovarian Cancer Genetics and Implications for Imaging and Therapy. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 43(6), 835–845.
- Gajjar, K., Ogden, G., Mujahid, M.I., Razvi, K. (2012). Symptoms and Risk Factors of Ovarian Cancer: A Survey in Primary Care. *International Scholarly Research Notices*, Article ID 754197. 6 pages. <https://doi.org/10.5402/2012/754197>. (Erişim tarihi: 19.04.2022).

- Ghafouri Fard, S., Shoorei, H. and Taheri, M. (2020). miRNA profile in ovarian cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 113, 104381.
- Goff, B.A., Mandel, L., Muntz, H.G., Melancon, C.H. (2000). Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer*, 89 (10), 2068-2075.
- Goldar, S., Khaniani, M.S., Derakhshan, S.M., Baradaran, B. (2015). Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (6), 2129-2144.
- Gonçalves, L.M., Valente, I.M., Rodrigues, J.A. (2014). An Overview on Cardamonin. *Journal of Medicinal Food*, 17 (6), 633–640.
- Güzelgöl, F. ve Aksoy, K. (2015). Bir Gen İfade Düzenleyicisi miRNA. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24 (4), 472-493.
- Imam, J.S., Buddavarapu, K., Lee-Chang, J.S., Ganapathy, S., Camosy, C., Chen, Y. Rao, M.K. (2010). MicroRNA-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers. *Oncogene*, 29 (35), 4971-4979.
- Iorio, M.V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C.G., Alder, H., Calin, G.A., Me'nard, S., Croce, C.M. (2007). MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 67 (18), 8699-8707.
- Ishiguro, H., Okubo, T., Kuwabara, Y., Kimura, M., Mitsui, A., Sugito, N., Ogawa, R., Katada, T., Tanaka, T., Shiozaki, M., Mizoguchi, K., Samoto, Y., Matsuo, Y., Takahashi, H., Takiguchi, S. (2017). NOTCH1 activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colon cancer. *Oncotarget*, 8 (36), 60378-60389.
- Jansson, M.D. and Lund A.H. (2012). MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology*, 6, 590-610.
- Jin, Y.H., Kim, H., Ki, H., Yang, I., Yang, N., Lee, K.Y., Kim, N., Park, H., Kim, K. (2009). Beta-catenin modulates the level and transcriptional activity of Notch1/NICD through its direct interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793 (2), 290-299.

- Jurcevic, S., Klinga-Levan, K., Olsson, B., Ejeskär, K. (2016). Verification of microRNA expression in human endometrial adenocarcinoma. *BMC Cancer*, 16. Article number:261
- Karaarslan, Z.Ö. ve Serin, M.S. (2016). Hastalıkların tanı ve tedavi stratejilerinde miRNA ve diğer non-protein-coding RNA'lar. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilim Dergisi*, 9 (3), 159-172.
- Kaya, C., Çalışkan, Y. ve Yönden, Z. (2012). APOPTOZİS. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 3 (11), 26-37.
- Khan, S., Ayub, H., Khan, T., Wahid, F. (2019). MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. *Biochimie*, 167, 12-24.
- Kim, T. and Croce, C.M. (2021). MicroRNA and ER stress in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 75, 3-14.
- Kim, T., Veronese, A., Pichiorri, F., Lee, T.J., Jeon, Y.J., Volinia, S., Pineau, P., Agnès Marchio, Palatini, J., Suh, S.S., Alder, H., Liu, C.C., Dejean, A., Croce, C.M. (2011). p53 regulates epithelial–mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *Journal of Experimental Medicine*, 208 (5), 875–883.
- Kontomanolis, E.N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., Fasoulakis, Z. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research*, 40 (11), 6009-6015.
- Korpai, M., Lee, E.S., Hu, G., Kang, Y. (2008). The miR-200 Family Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-cadherin Transcriptional Repressors ZEB1 and ZEB2. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (22), 14910-14914.
- Kroeger, P.T. and Drapkin, R. (2017). Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 29 (1), 26-34.
- Kumar, S. and Reddy, P.H. (2019). A New Discovery of MicroRNA-455-3p in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 72 (1), 117-130.

- Kuroki, L. and Guntupalli S.R. (2020). Treatment of epithelial ovarian cancer. *The BMJ*, 371. <https://www.bmj.com/content/371/bmj.m3773> (Erişim tarihi: 19.04.2022).
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros V. (1993). The *C.elegans* heterochronic gene Lin-4 endocues small RNAs with anti-sense complementarity to Lin-14. *Cell*, 75 (5), 843-854.
- Lei, Y., Chen, L., Zhang, G., Shan, A., Ye, C., Liang, B., Sun, J., Liao, X., Zhu, C., Chen, Y., Wang, J., Zhang, E., Deng, L. (2020). MicroRNAs target the Wnt/ β -catenin signaling pathway to regulate epithelial-mesenchymal transition in cancer (Review). *Oncology Reports*, 44 (4), 1299-1313.
- Leitzmann, M.F., Koenig, C., Danforth, K.N., Brinton, L.A., Moore, S.C., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., Lacey, J.V. (2009). Body mass index and risk of ovarian cancer. *Cancer*, 115 (4), 812–822.
- Li, C., Hashimi, S.B., Good, D.A., Cao, S., Duan, W., Plummer, P.N., Mellick, A.S., Wei, M.Q. (2012). Apoptosis and microRNA aberrations in cancer. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39 (8), 739-746.
- Li, D., Tian, B. and Jin, X. (2018). miR-630 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) by Regulating the Wnt/ β -Catenin Pathway in Gastric Cancer Cells. *Oncology Research*, 27 (1), 9–17.
- Li, Z., Meng, Q., Pan, A., Wu, X., Cui, J., Wang, Y., Li, L. (2017). MicroRNA-455-3p promotes invasion and migration in triple negative breast cancer by targeting tumor suppressor E2F4. *Oncotarget*, 8 (12), 19455-19466.
- Lima, R.T., Busacca, S., Almeida, G.M., Gaudino, G., Fennell, D.A., Vasconcelos, M.H. (2011). MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. *European Journal of Cancer*, 47 (2), 163-174.
- Liu, Y., Lin, J., Zhai, S., Sun, C., Xu, C., Zhou, H., Liu, H. (2018). MicroRNA-214 Suppresses Ovarian Cancer by Targeting β -Catenin. *Cell Physiol Biochem*, 45 (4), 1654-1662.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L., Darnell, J. (2003). *Molecular cell biology*. (5. Baskı), New York: WH Freeman.

- Lu, S., Lin, C., Cheng, X., Hua, H., Xiang, T., Huang, Y., Huang, X. (2018). Cardamonin reduces chemotherapy resistance of colon cancer cells via the TSP50/NF- κ B pathway in vitro. *Oncology Letters*, 15 (6), 9641–9646.
- MacFarlane, L. and Murphy, P.R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11 (7), 537-561.
- Marchbanks, P.A., Wilson, H., Bastos, E., Cramer, D.W., Schildkraut, J.M., Peterson, H.B. (2000). Cigarette smoking and epithelial ovarian cancer by histologic type. *Obstetrics Gynecology*, 95 (2), 255-260.
- Matsuura, K., Canfield K., Feng, W., Kurokawa, M. (2016). Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 327, 43–87.
- Menon, U., Karpinskyj, C. and Gentry Maharaj, A. (2018). Ovarian Cancer Prevention and Screening. *Obstetrics & Gynecology*, 131 (5), 909-927.
- Mollaei, H., Safaralizadeh, R. and Rostami, Z. (2018). MicroRNA replacement therapy in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 234 (8), 12369-12384.
- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., Salehiniya H. (2019). Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *International Journal of Women's Health*, 11, 287–299.
- Müller, T., Bain, G., Wang, X., Papkoff J. (2002). Regulation of Epithelial Cell Migration and Tumor Formation by β -Catenin Signaling. *Experimental Cell Research*, 280 (1), 119-133.
- Nagarajan, A., Malvi, P. and Wajapeyee, N. (2016). Oncogene-directed alterations in cancer cell metabolism. *Trends Cancer*, 2 (7), 365–377.
- Nakano, H., Miyazawa, T., Kinoshita, K., Yamada, Y., Yoshida T. (2010). Functional screening identifies a microRNA, miR-491 that induces apoptosis by targeting Bcl-XL in colorectal cancer cells. *International Journal of Cancer*, 127 (5), 1072-1080.

- Nguyen, V.H.L., Hough, R., Bernaudo, S., Peng, C. (2019). Wnt/ β -catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis. *Journal of Ovarian Research*, 12. Article number: 122.
- Nie, X., Chen, H., Niu, P., Zhu, Y., Zhou, J., Jiang, L., Li, D., Lin, M., Chen, Z., Shi, D. (2020). DAP1 negatively regulates autophagy induced by cardamonin in SKOV3 cells. *Cell Biology International*, 44 (11), 2192-2201.
- Ning, T., Peng, Z., Li, S., Qu, Y., Zhang, H., Duan, J., Wang, X., Yang, H., Liu, R., Deng, T., Bai, M., Wang, Y., Si, Y., Zhang, L., Wang, X., Ge, S., Zhou, L., Ying, G., Ba, Y. (2017). miR-455 inhibits cell proliferation and migration via negative regulation of EGFR in human gastric cancer. *Oncology Reports*, 38, 175-182.
- Niu, P., Shi, D., Zhang, S., Zhu, Y., Zhou, J. (2018). Cardamonin enhances the anti-proliferative effect of cisplatin on ovarian cancer. *Oncology Letters*, 15 (3), 3991-3997.
- Odunsi, K. (2017). Immunotherapy in ovarian cancer. *Annals of Oncology*, 28 (8), 1-7.
- Pai, S.C., Carneiro, B.A., Mota, J.M., Costa, R., Leite, C.A., Barroso Sousa R., Kaplan, J.B. Chae, Y.K., Giles, F.J. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology*, 10.
- Park, J.W. and Han, J. (2019). Targeting epigenetics for cancer therapy. *Archives of Pharmacal Research*, 42, 159–170.
- Peter, M.E. (2009). Let-7 and miR-200 microRNAs: Guardians against pluripotency and cancer progression. *Cell Cycle*, 8 (6), 843–852.
- Pritchard, C.C., Cheng, H.H. and Tewari, M. (2015). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics*, 13 (5), 358–369.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D’Orazi, G., (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8 (4), 603-619.

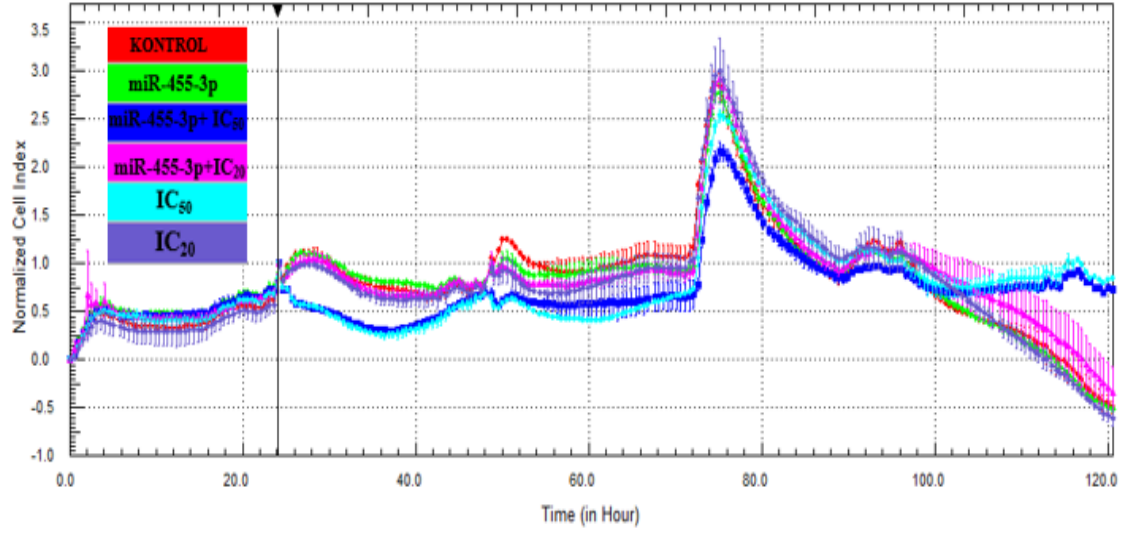
- Ramchandani, S., Naz, I., Dhudha, N., Garg, M. (2020). An overview of the potential anticancer properties of cardamonin. *Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy*, 1, 413–426.
- Ruibin, J., Bo, J., Danying, W., Jianguo, F., Linhui, G. (2020). Cardamonin induces G2/M phase arrest and apoptosis through inhibition of NF- κ B and mTOR pathways in ovarian cancer. *Aging*, 12 (24), 25730-25743.
- Shang, S., Hua, F. and Hu, Z.W. (2017). The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget*, 8 (20), 33972-33989.
- Shi, D., Niu, P., Heng, X., Chen, L., Zhu, Y., Zhou, J. (2018). Autophagy induced by cardamonin is associated with mTORC1 inhibition in SKOV3 cells. *Pharmacological Reports*, 70 (5), 908-916.
- Shrivastava, S., Jeengar, M.K., Thummuri, D., Koval, A., Katanaev, V.L., Marepally, S., Naidu, V.G.M. (2017). Cardamonin, a chalcone, inhibits human triple negative breast cancer cell invasiveness by downregulation of Wnt/ β -catenin signaling cascades and reversal of epithelial-mesenchymal transition. *Biofactors*, 43 (2), 152-169.
- Smolle, E., Taucher, V., Pichler, M., Petru, E., Lax, S., Haybaeck, J. (2013). Targeting Signaling Pathways in Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (5), 9536-9555.
- Stewart, C., Ralyea, C. and Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Seminars in Oncology Nursing*, 35 (2), 151-156.
- Strooper, B.D. and Annaert, W. (2001). Where Notch and Wnt Signaling Meet: The Presenilin Hub. *The Journal of Cell Biology*, 152 (4), 17-20.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q. (2015). MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*, 6 (11), 8474-8490.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J. CLIN.*, 71 (3), 209–249.

- Tao, X.C., Zhang, X.Y., Sun, S.B., Wu, D.Q. (2019). miR-92a contributes to cell proliferation, apoptosis and doxorubicin chemosensitivity in gastric carcinoma cells. *Oncology Reports*, 42 (1), 313-320.
- Tingting, X., Yings, S., Liying W., Yuecheng, Y. (2019). MiR-455-3p inhibits proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer SKOV-3 cells by regulating transmembrane protein 4. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, (6), 306-311.
- Tomatır, A.G. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 23 (6), 499-508.
- Toss, A., Tomasello, C., Razzaboni, E., Contu, G., Grandi, G., Cagnacci, A., Schilder, R.J., Cortesi L. (2015). *BioMed Research International*, Article ID 341723. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/341723/> (Erişim tarihi: 19.04.2022)
- Valenta, T., Hausmann, G. and Basler, K., (2012). The many faces and functions of β -catenin. *The EMBO Journal*, 31 (12), 2714–2736.
- Wang, H., Zhang, Z., Wei, X., Dai, R. (2015). Small-molecule inhibitor of Bcl-2 (TW-37) suppresses growth and enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Journal of Ovarian Research*, 8. Article number: 3.
- Wang, V., Li, C., Lin, M., Welch, W., Bell, D., Wong, Y., Berkowitz, R., Mok, S.C., Bandera C.A. (2005). Ovarian cancer is a heterogeneous disease. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 161, 170–173.
- Wei, M., Jin, H., Yang, S., Li, S., Wang, X., Li, L., Jia, Y., Cui, M. (2021). MicroRNA-101 inhibits growth and metastasis of human ovarian cancer cells by targeting PI3K/AKT. *Archives of Medical Science*, 17 (1), 127–134.
- Wei, Z. and Wong, G.W. (2013). Roles of Micro-RNAs in Metabolism. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 191-194.
- Wu, Q., Ren, X., Zhang, Y., Fu, X., Li, Y., Peng, Y., Xiao, Q., Li, T., Ouyang, C., Hu, Y., Zhang, Y., Wenjuan, Z., Yan, W., Guo, K., Li, W., Hu, Y., Yang, X., Shu, G., Xue, H., Wei, Z., Luo, Y., Yin, G. (2017). MiR-221-3p targets ARF4 and inhibits

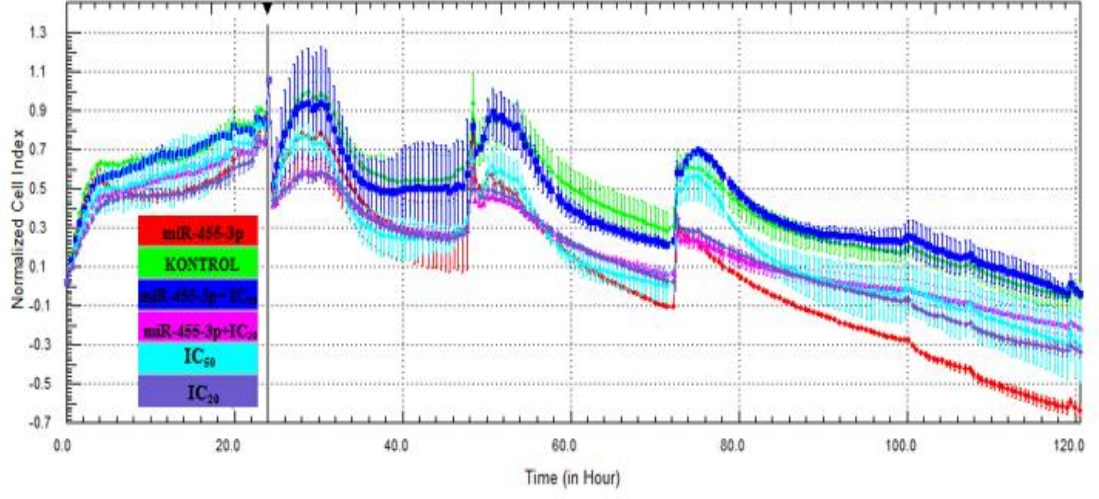
- the proliferation and migration of epithelial ovarian cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497 (4), 1162-1170.
- Xie, Y., Tobin, L.A., Camps, J., Wangsa, D., Yang, J., Rao, M., Witasp, E., Awad, K.S., Yoo, N., Ried, T., Kwong, K.F. (2013). MicroRNA-24 regulates XIAP to reduce the apoptosis threshold in cancer cells. *Oncogene*, 32, 2442–2451.
- Xu, B., Gong, X., Zi, L., Li, G., Dong, S., Chen, X., Li, Y. (2019). Silencing of DLEU2 suppresses pancreatic cancer cell proliferation and invasion by upregulating microRNA-455. 110 (5), 1676-1685.
- Xu, L., Li, H., Su, L., Lu, Q., Liu, Z. (2017). MicroRNA-455 inhibits cell proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer by directly targeting Notch1. *Molecular Medicine Reports*, 16 (6), 9777-9785.
- Yamada, Y., Arai, T., Kojima, S., Sugawara, S., Kato, M., Okato, A., Yamazaki, K., Naya, Y., Ichikawa, T., Seki, N. (2018). Anti-tumor roles of both strands of the miR-455 duplex: their targets SKA1 and SKA3 are involved in the pathogenesis of renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 9 (42), 26638-26658.
- Yang, B., Sun, L. and Liang, L. (2019). MiRNA-802 suppresses proliferation and migration of epithelial ovarian cancer cells by targeting YWHAZ. *Journal of Ovarian Research*, 12 (1).
- Yang, Y., Yang, Y., Yang, J., Zhao, X., Wei X. (2020). Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer: Function and Therapeutic Strategy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. Makale:758.
- Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 1 (2), 7-18.
- Zanetta, G.M., Webb, M.J., Li, H., Keeney, G.L. (2000). Hyperestrogenism: A Relevant Risk Factor for the Development of Cancer from Endometriosis. *Gynecologic Oncology*, 79 (1), 18–22.
- Zhan, T., Zhu, Q., Han, Z., Tan, J., Liu, M., Liu, W., Chen, W., Chen, X., Chen, X., Deng, J., Tian, X., Huang, X. (2020). miR-455-3p Functions as a Tumor Suppressor by

- Restraining Wnt/ β -Catenin Signaling via TAZ in Pancreatic Cancer. *Cancer Management and Research*, 12, 1483–1492.
- Zhang, R., Shi, H., Ren, F., Feng, W., Cao, Y., Li, G., Liu, Z., Ji, P., Zhang, M. (2019). MicroRNA-338-3p suppresses ovarian cancer cells growth and metastasis: implication of Wnt/catenin beta and MEK/ERK signaling pathways. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38 (1).
- Zhang, Y., and Wang, X. (2020). Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 13. Article number: 165.
- Zhang, Y.L., Zhang, Y.C., Han, W., Li, Y.M., Wang, G.N., Yuan, S., Wei, F.X., Wang, J.F., Jiang, J.J., Zhang, Y.U. (2014). Effect of GP73 silencing on proliferation and apoptosis in hepatocellular cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20 (32), 11287-11296.
- Zhou, Y., Jin, Z. and Wang, C. (2019). Glycogen phosphorylase B promotes ovarian cancer progression via Wnt/ β -catenin signaling and is regulated by miR-133a-3p. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 120. Article number: 109449.
- Zhou, X., Zhou, R., Li, Q., Jie, X., Hong, J., Zong, Y., Dong, X., Zhang, S., Li, Z., Wu, G. (2019). Cardamonin inhibits the proliferation and metastasis of non-small-cell lung cancer cells by suppressing the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 30 (3), 241-260.
- http 1: <https://gco.iarc.fr/> Erişim tarihi: (21.04.2022)

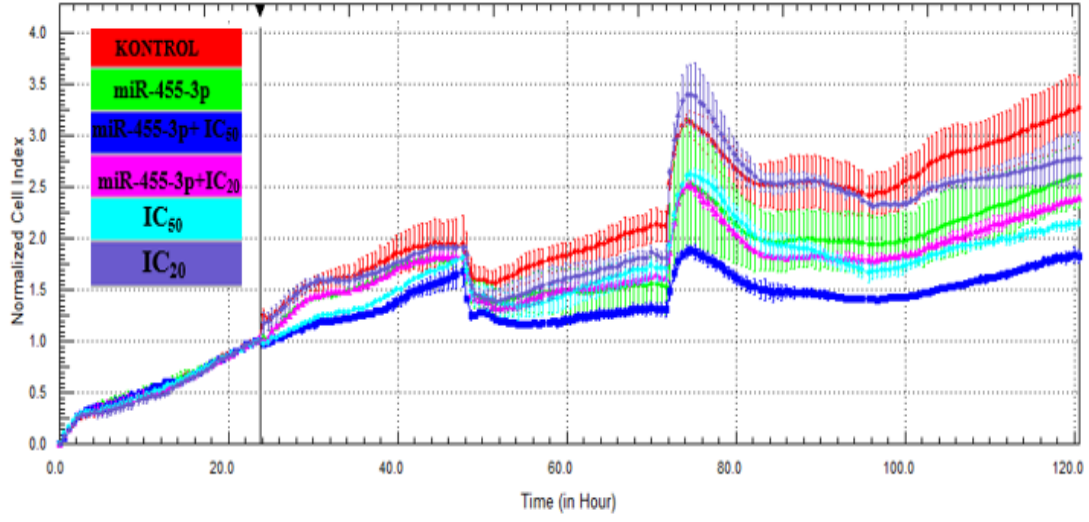
EK-1a. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) Cihazında Yapılan Hücre Göçü Birinci Deney



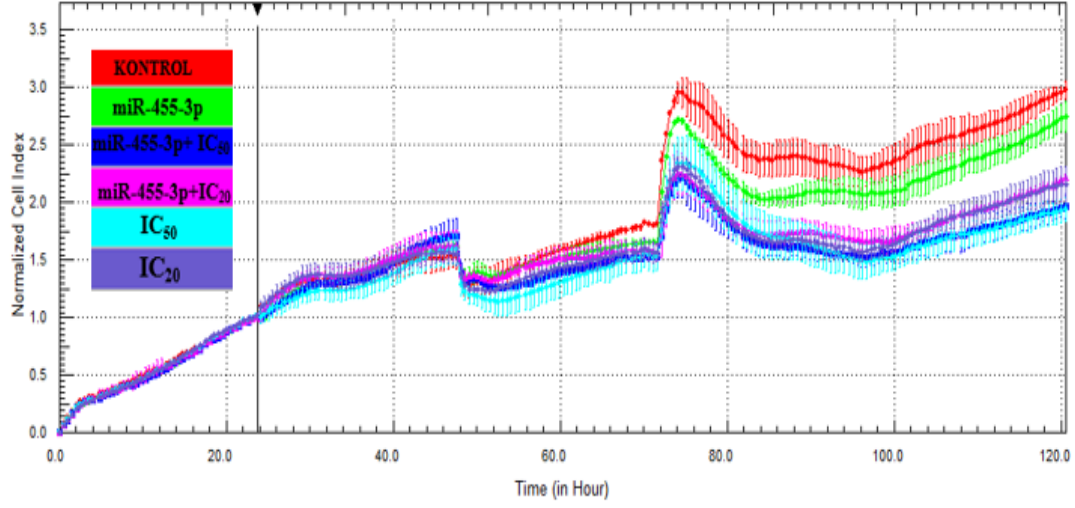
EK-1b. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) Cihazında Yapılan Hücre Göçü İkinci Deney



EK-2a. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) Cihazında Yapılan Hücre Proliferasyonu
Birinci Deney



EK-2b. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) Cihazında Yapılan Hücre Proliferasyonu
İkinci Deney



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı

: Burcu AKYILDIZ

Eğitim:

Lise

: Suzan Mehmet Gönç Lisesi

Lisans

: Kütahya Dumlupınar Üniversitesi / Biyokimya

Mesleki Deneyim:

Ankara Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi/ Biyokimya Anabilim Dalı/ Biyokimya
Araştırma Labotuarı- Stajyer

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi/ Fen-Edebiyat Fakültesi/Sen Research Group-
Araştırmacı

Yayınları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

Şen B., Akyıldız B., Aygün A., Kuyuldar E., Demirkan B., Şen F. (2019). Nanocarbon-supported catalysts for the efficient dehydrogenation of dimethylamine borane. Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering. Pages 615-628.

Aydin Unal F., Burhan H., Karaman N., Arıkan K., Simsek B., Akyıldız B., Şen F. (2019). Fuel cell electrochemistry. Enzymatic Fuel Cells: Materials and Applications: Materials Research Foundations 44, 73-108.