



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞAL ANTİSENSE TRANSKRİPTLERİN KANSERDEKİ ROLLERİ

Esra BOZGEYİK

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

Gaziantep
2017

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOĞAL ANTİSENSE TRANSKRİPTLERİN KANSERDEKİ
ROLLERİ**

Esra BOZGEYİK

Tez Savunma Tarihi:
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr.Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Doç. Dr. Can Demirel
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı V.

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi İmzası

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

Prof. Dr. Ramazan Bal

Doç. Dr. Zafer Çetin

Yrd. Doç. Dr. Elif Pala

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Esra BOZGEYİK

20.02.2017

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince akademik hayatımın gelişmesinde büyük katkılar sağlayan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Ahmet ARSLAN'a,

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışma sürecinde bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK'a,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bilgi ve önerilerini esirgemeyen kıymetli Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Deneyisel aşamalarda yardımlarını/desteklerini esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım Uzman Dr. Demet Taşdemir ve Kaiffee Arman'a,

Laboratuvarda birlikte çalıştığımız değerli arkadaşlarım, Ebru Temiz, Seçil Eroğlu, Meltem Koruk, Zekiye Altan, Yunus Şahin, Murat Korkmaz, Seçil Demiral ve Zeynep Ulukütük'e ve hücre döngüsü ve apoptoz çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Bio. Uğur Aslanyürekli'ye,

Bu tez çalışmasının bütün aşamalarında maddi manevi desteğini esirgemeyen ve sürekli fikir alışverişinde bulunduğum değerli eşim ve meslektaşım Arş. Gör. İbrahim BOZGEYİK'e,

Tez çalışmalarım süresince bunaldığım zamanlarda beni eğlendiren sevgili yeğenlerime,

Bugünlere gelmeme vesile olan, beni yetiştirip büyüten, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli AİLEM'e

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Simge ve Kısaltmalar	v
Şekil Listesi.....	vii
Tablo Listesi	xi
Özet.....	1
Abstract.....	2
1 . Giriş ve Amaç	3
2 . Genel Bilgiler.....	8
2.1. Kanser	8
2.2. Kanserin ayırt edici özellikleri.....	9
2.2.1. Çoğalma uyarısının devamlılığı.....	9
2.2.2. Büyüme baskılayıcılardan kaçış	10
2.2.3. Hücre ölümüne karşı direnç	13
2.2.3.1. İçsel Yolak	15
2.2.3.2. Dışsal Yolak.....	16
2.2.4. Ölümsüz çoğalmaya olanak sağlama	16
2.2.5. Anjiyogenezin uyarılması	17
2.2.6. İstila ve metastazın etkinleştirilmesi.....	17
2.2.6.1. Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT)	17
2.2.6.2. Vimentin (VIM).....	19
2.2.7. Diğer ayırt edici özellikler	20
2.3. Kodlanmayan RNA (ncRNA).....	21
2.3.1. Kodlanmayan RNA'ların sınıflandırılması.....	24
2.3.2. Kısa kodlanmayan RNA'lar.....	27
2.3.2.1. Mikro RNA	28
2.3.2.2. siRNA	31
2.3.2.3. piRNA.....	32
2.3.3. Uzun kodlanmayan RNA'lar	33
2.3.3.1. Aşırı korunmuş bölge transkriptleri (T-UCR)	39
2.3.3.2. Yarışmalı endojen RNA (ceRNA).....	40
2.3.3.3. Halkasal intronik RNA (circRNA)	41
2.3.3.4. Doğal antisense transkript (NAT).....	42

2.3.3.5. NAT'ların sınıflandırılması	44
2.3.4. Kodlanmayan RNA'ların işlevleri	45
2.3.4.1. Epigenetik olaylar	46
2.3.4.2. Yazılımsal ve yazılım sonrası düzenlemeler	49
2.4. Bu Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Özellikleri.....	50
3 . Gereç ve Yöntem	53
3.1. İnsan genomundaki NAT'ların belirlenmesinde kullanılan informatik analizler	53
3.2. Hücrelerin Kültür Edilmesi.....	53
3.3. Hücrelerden RNA İzolasyonu.....	55
3.4. Tek Sarmal cDNA Sentezi.....	57
3.5. Primer Tasarımı	58
3.6. Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR).....	58
3.7. Real-Time PCR (qPCR).....	61
3.8. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (MTT Deneyleri).....	62
3.9. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Deneyleri	62
3.10. Apoptoz deneyleri.....	63
3.11. Hücre Döngüsü Deneyleri	63
3.12. Yara iyileşmesi Deneyleri.....	64
3.13. Northern Blot	64
3.14. İstatistiksel Analizler	67
4 . Bulgular	68
4.1. İnsan Genomunda NAT'ların kromozomal olarak gösterilmesi.....	68
4.2. Farklı Doku ve Hücre Hatlarında Gen İfadesinin Değerlendirilmesi	71
4.2.1. VIM ve VIM-AS1 genlerinin doku ve hücrelerdeki ifade seviyeleri	72
4.2.2. BCL2 ve LOC105372161 genlerinin doku ve hücrelerdeki ifade seviyeleri	75
4.2.3. CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin doku ve hücrelerdeki ifade seviyeleri...	77
4.3. Hücre Canlılığı Analizleri ve Kimyasalların Sitotoksisite ve Toksikite Değerlerinin Belirlenmesi.....	79
4.4. 5-FU, 17B, 8A ve Sispilatin Kimyasal Maddelerinin Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	90
4.5. 5-FU, 17B ve 8A Kimyasal Maddelerinin Apoptoz Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	92

4.6. 5-FU, 17B ve 8A Kimyasal Maddelerinin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	101
4.7. 5-FU, 17B ve 8A Kimyasal Maddelerinin Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	108
4.8. 5-FU, 17b ve 8A Kimyasal Maddelerinin NAT'ların İfade Seviyeleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	115
4.9. Etkin Kimyasal Maddelerin NAT'ların İfade Seviyesine Olan Etkisinin Northern Blot İle Belirlenmesi	125
5 . Tartışma	128
6 . Kaynaklar.....	139



SİMGE VE KISALTMALAR

ACTB	Beta-actin geni
AS	Antisense
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCLX _L	B-cell lymphoma-extra large
BH	Bcl-2 homoloji bölgesi
CASP3	Caspase 3
CASP9	Caspase 9
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDKN2B	Siklin bağımlı kinaz 4 baskılayıcısı 2B
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
ceRNA	Competitive endogenous RNA
circRNA	Halkasal intronik RNA
CKI	Siklin bağımlı kinaz baskılayıcısı
CTD	Carboxy-terminal domain
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
Dk	Dakika
ECM	Extracellular matrix
EMB	Embedded transkript
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements Project
FBS	Cenin sığır serum
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
H	Saat
HINCUT	Hypoxia-induced noncoding ultraconserved transcripts
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HTH	Head-to-head transkript
INT	İntronik transkript
lncRNA	Uzun kodlanmayan RNA, long non-coding RNA
lncNAT	Lnc doğal antisense transkript
MET	Mezenkimal-epitelyal geçiş

miRNA	Mikro RNA
miRNAT	miRNA doğal antisense transkript
MRE	miRNA response element
NAT	Doğal antisense transkript
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ncRNA	Kodlanmayan RNA
NHGRI	The National Human Genome Research Institute
PBS	Phosphate-buffered saline
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PI	Propidium iodide
PIWI	P-element-induced wimpy testis
pNAT	Protein doğal antisense transkript
qPCR	Real-Time PCR
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNAi	RNA müdahalesi, RNA interference
RNAPII	RNA Polimeraz II
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
siRNA	Küçük müdahaleci RNA, short interfering RNA
sNAT	Küçük RNA doğal antisense transkript
SR	Serin/arjinin splicing etmenleri
TNM	Tümör, Lenf nodu, Metastaz
TM	Zar geçiş bölgesi, transmembrane domain
TNF	Tumor necrosis factor
tNAT	Transfer RNA doğal antisense transkript
TSIX	TSIX transcript, XIST antisense RNA
TTT	Tail-to-tail transkript
UCR	Ultra conserved region
UTR	Untranslated region
VIM	Vimentin
XIC	X-inactivation center
XIST	X inactive specific transcript (non-protein coding)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Kanserin altı ayırt edici özelliklerinin şematik gösterimi.	9
Şekil 2.2. Hücre döngüsünün evreleri ve bu evrelerde rol oynayan CDK'lar, siklinler ve CDK baskılayıcılarının şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.3. CDKN2B geninin kodlandığı genomik bölgenin gösterilmesi. Ayrıca, CDKN2B proteinin farklı bölgeleri gösterilmiştir.	13
Şekil 2.4. İçsel ve dışsal apoptoz yollarının gösterilmesi.	14
Şekil 2.5. Bcl-2 ailesi üyelerinin gösterilmesi.	15
Şekil 2.6. Kanserde EMT sürecinin şematik gösterimi.	18
Şekil 2.7. Vimentin geninin kodlandığı bölgenin ve protein yapısının gösterilmesi.	19
Şekil 2.8. Genom ve transkriptom analizler neticesinde, gelişmekte olan yeni moleküler yolağın şematik gösterimi.	23
Şekil 2.9. Hipotetik 3 lokustaki çeşitli ncRNA sınıflarının gösterilmesi.	24
Şekil 2.10. miRNA biyogenezinin şematik gösterimi. miRNA geninden RNA Pol II ile pri-miRNA sentezlenir.....	29
Şekil 2.11. LncRNA'ların hücre içerisindeki oluşum mekanizmasına genel bir bakış. .	34
Şekil 2.12. LncRNA moleküllerinin DNA-Protein-RNA ile etkileşimde olarak bazı kanser süreçlerine etkileri gösterilmiştir	39
Şekil 2.13. Doğal antisense transkriptlerin genomik yerleşimi.	43
Şekil 2.14. Doğal antisense transkriptlerin sınıflandırılması.....	45
Şekil 2.15. ncRNA'ların işlevlerinin şematik gösterimi.....	46
Şekil 2.16. X kromozomu etkisizleştirme modeli.	47
Şekil 2.17. NcRNA'lar tarafından düzenlenen kromatin yeniden şekillenmesinin iki modeli.	48
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hücrelerin morfolojik görüntüleri	54
Şekil 4.1. İnsan genomundaki NAT'lar gösterilmiştir..	69
Şekil 4.2. miRNA, sRNA ve tRNA transkriptlerinin genomdaki aynı yönlü ve karşıt yönlü transkriptlerinin sayısı gösterilmiştir..	70
Şekil 4.3. Çalışmada kullanılan genlerin farklı doku ve hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin $2^{-\Delta C_t}$ değerleri kullanılarak oluşturulan heat-map grafiği.	72
Şekil 4.4. VIM, VIM-AS1 ve GAPDH genlerinin farklı dokulardaki ifade seviyeleri gösterilmiştir.	73

Şekil 4.5. VIM, VIM-AS1 ve GAPDH genlerinin farklı hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin gösterilmesi.	74
Şekil 4.6. BCL2, LOC105372161 ve GAPDH genlerinin farklı insan dokularındaki ifade seviyeleri gösterilmiştir.....	75
Şekil 4.7. BCL2, LOC105372161 ve GAPDH genlerinin farklı hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin gösterilmesi.	76
Şekil 4.8. qPCR yöntemi ile CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin farklı dokulardaki ifade seviyeleri gösterilmiştir.....	77
Şekil 4.9. CDKN2B, CDKN2B-AS1 ve GAPDH genlerinin farklı hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin gösterilmesi.	78
Şekil 4.10. BESA2B hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi... 79	79
Şekil 4.11. BEAS2B hücrelerinde 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarının doza bağlı olarak hücre ölümü üzerine etkisi.	79
Şekil 4.12. BEAS2B hücrelerinde 17B ve 8A kimyasal maddelerinin LDH etkinlikler 80	80
Şekil 4.13. A549 hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.	81
Şekil 4.14. A549 hücre hattında kimyasal maddelerin hücre canlılığına etkisi.	81
Şekil 4.15. A549 hücre hattında 17B ve 8A kimyasal maddelerinin LDH etkinlikleri.. 82	82
Şekil 4.16. CRL4010 hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.. 83	83
Şekil 4.17. CRL4010 hücre hattında kimyasal maddelerin hücre canlılığına etkisi..... 83	83
Şekil 4.18. CRL4010 hücrelerinde 17B ve 8A kimyasallarının LDH etkinlikleri..... 84	84
Şekil 4.19. MCF7 hücre hattında kimyasal maddelerin doza bağımlı olarak hücre canlılığına etkisi.	84
Şekil 4.20. MCF7 hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.	85
Şekil 4.21. MCF7 meme kanseri hücre hattında 17B ve 8A kimyasal maddelerinin LDH etkinlikleri.	85
Şekil 4.22. SKBR3 hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.	86
Şekil 4.23. SKBR3 hücre hattında kimyasal maddelerin hücre canlılığına etkisi.	86
Şekil 4.24. SKBR3 meme kanseri hücre hattında 8A kimyasalının LDH etkinliği.	87
Şekil 4.25. MDA-MB-231 hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.....	88
Şekil 4.26. MDA-MB-231 hücre hattında kimyasallarının hücre canlılığına etkisi.....	88
Şekil 4.27. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında 17B kimyasalının LDH etkinlikleri.	88

Şekil 4.28. U2OS hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.....	89
Şekil 4.29. U2OS hücre hattında kimyasal maddelerin hücre canlılığına etkisi.	89
Şekil 4.30. A549 hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddelerinin morfoloji üzerine etkisi.....	91
Şekil 4.31. MCF7 hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddelerinin hücre morfolojisine etkisi.	91
Şekil 4.32. MDA-MB-231 hücre hattında 5-FU ve 17B kimyasallarının hücre morfolojisi üzerine etkisi.	91
Şekil 4.33. SKBR3 hücre hattında 5-FU ve 8A kimyasal maddelerinin hücre morfolojileri üzerine etkisi.....	92
Şekil 4.34. U2OS osteosarkom hücre hattında 5-FU, 8A ve 17B kimyasal maddelerinin hücre morfolojileri üzerine etkileri.	92
Şekil 4.35. A549 hücre hattında, muamele edilmemiş,	93
Şekil 4.36. MCF7 hücre hattında etkin dozları verilen kimyasalların apoptoz üzerine etkisi.....	95
Şekil 4.37. MDA-MB-231 hücre hattında 5-FU ve 17B kimyasal maddelerinin apoptoz üzerine etkisi.....	96
Şekil 4.38. SKBR3 hücre hattında 5-FU ve 8A kimyasal maddelerinin apoptoz üzerine etkisi.....	97
Şekil 4.39. U2OS hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddelerinin apoptoz üzerine etkisi.	99
Şekil 4.40. A549 hücre hattında 5-FU, 17 ve 8A kimyasallarının hücre döngüsü üzerine etkisi.....	101
Şekil 4.41. MCF7 hücre hattında, 5-FU, 17B ve 8A kimyasalları ile maruziyet sonrasında hücre döngüsü üzerine etkileri.....	103
Şekil 4.42. MDA-MB-231 hücre hattında, 5-FU ve 17B kimyasallarının hücre döngüsü üzerine etkisi.....	104
Şekil 4.43. SKBR3 hücre hattında 5-FU ve 8A kimyasallarının hücre döngüsü üzerine etkisi.....	105
Şekil 4.44. U2OS hücre hattında, 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddelerinin hücre döngüsü üzerine etkileri.....	107
Şekil 4.45. BEAS2B hücrelerine 5-FU, 17B ve 8A kimyasalların etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.	109

Şekil 4.46. A549 hücrelerine 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasalların etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.	110
Şekil 4.47. CRL4010 normal meme epitel hücre hattında 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasalların etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir..	111
Şekil 4.48. MCF7 meme kanseri hücre hattında 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasalların etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir..	112
Şekil 4.49. SKBR3 meme kanseri hücre hattında 5-FU, 8A ve Sisplatin kimyasalların etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.	113
Şekil 4.50. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında 5-FU ve 17B kimyasalların etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.	114
Şekil 4.51. U2OS osteosarkom hücre hattında 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasalların etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.	115
Şekil 4.52. A549 hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddeleri maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre, VIM, CDKN2B ve BCL2 genleri ve VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161 NAT'larının ifade seviyeleri gösterilmiştir.	116
Şekil 4.53. MCF7 hücre hattında, 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddeleri maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre, VIM, CDKN2B ve BCL2 genleri ve VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161 NAT'larının ifade seviyeleri gösterilmiştir.	119
Şekil 4.54. MDA-MB-231 hücre hattında 5-FU ve 17B kimyasal maddeleri maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre, VIM, CDKN2B ve BCL2 genleri ve VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161 NAT'larının ifade seviyeleri gösterilmiştir.	120
Şekil 4.55. SKBR3 hücrelerinde, 5-FU ve 8A kimyasal maddeleri maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre, VIM, CDKN2B ve BCL2 genleri ve VIM-AS1, CDKN2B AS1 ve LOC105372161 NAT'larının ifade seviyeleri gösterilmiştir.....	122
Şekil 4.56. U2OS osteosarkom hücre hattında, 5-FU, 8A ve 17B kimyasal maddeleri maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre, CDKN2B geni ve CDKN2B-AS1 ve geninin ifade seviyeleri gösterilmiştir.....	123
Şekil 4.57. LOC105372161 transkriptinin 8A ile maruz bırakılan A549 hücre hattında ifadesinin Nothern Blot yöntemi ile gösterilmiştir.	125
Şekil 4.58. 8A kimyasal maddesinin hücredeki apoptoz yolağı üzerine etkisinin şematik gösterimi.	126

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Uzunluklarına göre bazı ncRNA'ların sınıflandırılması.....	25
Tablo 2.2. Bazı ölçütlere göre ncRNA sınıflandırılması.....	26
Tablo 2.3. Kansere gelişiminde bazı miRNA'ların işlevleri.....	31
Tablo 2.4. Kansere ile ilişkilendirilmiş piRNA molekülleri.....	33
Tablo 2.5. Kanserde onkogenik özellik gösteren bazı lncRNA'ların gösterilmesi.....	35
Tablo 2.6. Bazı lncRNA'ların kanserdeki işlevlerinin gösterilmesi	37
Tablo 2.7. Birçok ökaryot türlerinde genom çapında doğal antisense transkriptleri	43
Tablo 2.8. Antisense düzenleyici etkilerinin iyi karakterize edilmiş örnekleri.....	44
Tablo 2.9. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve özellikleri.	51
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri	54
Tablo 3.2. Hücre kültüründen elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve kirliliklerinin gösterilmesi.....	56
Tablo 3.3. RNA panelinde bulunan doku türleri.....	56
Tablo 3.4. cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin oranları.	57
Tablo 3.5. cDNA sentezi tepkime koşulları	57
Tablo 3.6. Çalışmada çalışılacak ilgili genlerinin ifade seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizilimlerinin özellikleri.....	59
Tablo 3.7. RT-PCR bileşen ve miktarları.....	60
Tablo 3.8. RT-PCR tepkime koşulları.....	60
Tablo 3.9. qPCR için tepkime bileşenleri ve miktarları.	61
Tablo 3.10. qPCR için tepkime koşulları.	61
Tablo 3.11. Northern Blot deneylerinde kullanılan kimyasallar ve içerikleri.....	66
Tablo 4.1. İnsan genomundaki NAT çeşitlerinin sayısı ve türelere göre dağılımı gösterilmiştir.	71
Tablo 4.2. Hücrelere verilen kimyasalların MTT deneyleri sonrasında hesaplanan IC ₅₀ dozları gösterilmiştir.	90
Tablo 4.3. 17B ve 8A kimyasalları ile maruz bırakılan hücrelerdeki LDH etkinlikleri gösterilmiştir.	90
Tablo 4.4. A549, MCF7, U2OS, MDA-MB-231 ve SKBR3 hücrelerinde etkin dozların apoptoz üzerine etkisi gösterilmiştir.	100
Tablo 4.5 A549, MCF7, U2OS, MDA-MB-231 ve SKBR3 hücrelerinde etkin dozların	

hücre döngüsü üzerine etkisi gösterilmiştir.	108
Tablo 4.6. A549, MCF7, MDA-MB-231, SKBR3 ve U2OS hücrelerine 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarının maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre NAT'ların ifade seviyelerindeki değişimler.	124



ÖZET

DOĞAL ANTİSENSE TRANSKRİPTLERİN KANSERDEKİ ROLLERİ

Esra BOZGEYİK

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

Şubat 2017, 160 sayfa

Kanser, hasarlı hücrelerin hayatta kalması ve düzensiz hücre çoğalması sonucu oluşan genetik bir hastalıktır. Yeni kanser vakalarının ve kansere bağlı ölümlerin artması ile kanser tanı/tedavisine yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada bazı doğal antisense transkriptlerin (natural antisense transcript, NAT) kanserdeki rollerinin belirlenmiştir. Ayrıca, henüz etkinliği belirlenmemiş 8A ve 17B tiyosemikarbazon türevi kimyasal bileşiklerin kanser hücrelerindeki etkinliği ve etkin dozlarının NAT'ların ifade seviyeleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmamızda ilk olarak insan doku örneklerinde ve kanser hücre hatlarında NAT'ların ifade seviyeleri belirlenmiştir ve antisense transkriptlerin protein kodlayan genlere kıyasla değişik ve özgül ifade paternine sahip olduğu görülmüştür. 5-FU anti-kanser ilacı, 17B ve 8A tiyosemikarbazon türevlerinin anti-kanser etkileri MTT deneyleri ile belirlenmiştir. Bu kimyasalların etkin dozları apoptoz ve hücre döngüsü üzerine etkileri Flow sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. MCF7 ve U2OS hücrelerinin 17B ve 8A kimyasallarıyla muamele edilmesi ile apoptotik hücre grubunun arttığı bulunmuştur. Ayrıca, hücrelerde 17B maddesinin hücre döngüsünü G0/G1 fazında, 8A'nın ise S fazında durduğu bulunmuştur. Hücre göçü deneylerinde, 17B ve 8A kimyasalları ile muamele edilen hücrelerde normale kıyasla daha yavaş göç olduğu gösterilmiştir. 17B maddesinin NAT'ların ifade seviyesini bazı hücrelerde azalttığı bazılarında arttırdığı bulunurken, 8A kimyasalının ise tüm hücrelerde maruziyet süresine göre NAT'ların ifadesinde artış olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, 17B ve 8A kimyasallarının doğal antisense transkriptlerin ve ilgili genlerin ifade seviyelerini değiştirerek yeni bir anti-kanser ilacı olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antisense transkript, Anti-kanser ilacı, Apoptoz, Hücre döngüsü, Kanser, LncRNA

ABSTRACT

THE ROLES OF NATURAL ANTISENSE TRANSCRIPTS IN CANCER

Esra BOZGEYIK

Ph.D. Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ecir Ali CAKMAK

February 2017, 160 pages

Cancer is a genetic disease that results from the survival of damaged cells and uncontrolled cell proliferation. The number of studies is increasing in parallel to increasing numbers of new cancer cases and cancer-related deaths. Accordingly, in this study, the role of some natural antisense transcripts (NATs) in cancer was assessed. The anticancer activities 17B and 8A thiosemicarbazone derivatives, which is not yet determined, and their effects on the expression of NATs and regarding protein-coding genes is also evaluated. Firstly, expressions of NATs in various normal human tissues and cancer cells were determined and NATs had specific expression patterns compared to their potential target genes. Moreover, MTT cell viability assay was used to investigate anti-proliferative activities of well-known cancer drug 5-FU, and 17B and 8A and active doses were calculated accordingly. Also, the effects of these chemicals on induction of apoptosis and cell-cycle were determined by flow cytometry. 17B and 8A were induced apoptosis in MCF7 and U2OS cancer cells. Interestingly, 17B and 8A were interfered with the cell-cycle by causing arrest at G0/G1 and S phases, respectively. Consistently, slower rate of migration was observed in cells treated with 17B and 8A chemicals. Additionally, while 17B reduced the level of expression of NATs in some cells but increased it in some, 8A was found to induce expression of NATs in all cells in a time-dependent manner. Consequently, these findings strongly suggest that 17B and 8A can be novel anti-cancer agents by altering expression of NATs and regarding target genes.

Key Words: Antisense transcript, Anti-cancer drug, Apoptosis, Cancer, Cell Cycle, LncRNA

1 . GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser çağımızın önde gelen ölümcül sağlık problemlerindedir ve dünya çapında yaygın bir şekilde görülmektedir (1). Amerika Birleşik Devletleri 2016 yılı kanser istatistiklerine göre, 1,6 milyon insanda kanser teşhis edilirken, neredeyse yarım milyon insan kansere bağlı olarak hayatını kaybetmiştir (1). Ülkemizde de kanser en önemli sağlık problemleri arasında gösterilmekte ve maddi ve manevi kayıplara neden olmaktadır. Türkiye Kanser Daire Başkanlığı tarafından yayınlanan 2013 yılı Türkiye kanser istatistikleri verilerine göre, ülkemizde görülen yeni kanser vakalarının ve kansere bağlı ölümlerin sayısı giderek artmaktadır. Ancak bu veriler diğer gelişmiş ülkelere kıyasla daha düşüktür (www.kanser.gov.tr).

Moleküler bir hastalık olarak kanser, hasarlı hücrelerin hayatta kalması ve düzensiz hücre çoğalması sonucu oluşan genetik bir hastalıktır. Normal hücreler, hücre bölünmesi, farklılaşması ve hücre ölümünü düzenli ve verimli bir şekilde gerçekleştirebilmek için birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Birçok düzenleyici etmen, genlerin aktif veya inaktif olmasında rol alarak hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının kontrolünü sağlamaktadır. Hücre döngüsü, farklılaşması gibi süreçlerde rol oynayan onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen bozukluklar kanserin moleküler temelini oluşturmaktadırlar (2). Hanahan ve ark. kanser hücrelerini normal hücrelerden farklı kılan altı tane ayırt edici özelliğini sıralamışlardır. Bu ayırt edici özellikler; çoğalma sinyalinin sürekliliği, büyüme baskılayıcılarından kaçış, hücre ölümüne karşı direnç, artmış telomeraz aktivitesi ve ölümsüz çoğalmaya olanak sağlama, anjiyogenezin uyarılması, istila ve metastaz etkinleşmesi olarak sıralanmaktadır (2). Bunun yanı sıra, bağışıklık sisteminden kaçış, genomik kararsızlığın artması, enerji metabolizmasında yeniden düzenlenmeler ve tümör teşvik edici yangı kanserin diğer ayırt edici özellikleri arasında sıralanmaktadır (2).

Daha önceleri yalnızca protein kodlayan genlerde meydana gelen bozuklukların kanser gelişimine sebep olduğu düşünülmekteydi. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalar

protein kodlayan genlerin yanı sıra birçok işlevsel RNA molekülünün tanımlanmasına olanak sağlamış ve bu RNA transkriptlerinin de kanser oluşumu ve ilerlemesinde önemli etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur (3-6). Yeni tanımlanan bu işlevsel RNA transkriptlerinin protein kodlama özellikleri olmadığı için kodlanmayan RNA (non-coding RNAs)'lar olarak adlandırılmışlardır. Kodlanmayan RNA'ların sınıflandırılması için birçok farklı sınıflandırma yöntemi ileri sürülmüştür. ncRNA transkriptlerinin birçoğu genellikle birden çok kategoride yer alabilir ve bu nedenle ncRNA sınıfların net kategorizasyonu epeyce zordur. Fakat ncRNA'lar bazı özelliklerine göre kendi içinde farklı gruplara ayrılırlar. Klasik olarak, kısa kodlanmayan RNA, <200 nt; uzun kodlanmayan RNA >200nt olarak uzunluklarına göre sınıflandırılmaktadırlar. İşlevlerine göre; hücrede sürekli ifade edilen ribozomal RNA, taşıyıcı RNA gibi ncRNA'lar, mikroRNA (miRNA), uzun kodlanmayan RNA (long non-coding RNA, lncRNA) gibi düzenleyici RNA'lar olarak sınıflandırılırlar. Hücre içindeki yerleşimlerine göre, küçük çekirdek RNA (small nuclear RNA, snRNA), küçük çekirdekçik RNA (small nucleolar RNA, snoRNA), sitoplazmada yerleşik piwi-etkileşimli RNA (cytoplasm-located piwi-interacting RNA, piRNA), küçük müdahaleci RNA (short interfering RNA, siRNA) gibi ncRNA sınıflarına ayrılır. Bunların yanı sıra diğer ncRNA sınıfları, özendirici bölge ilişkili RNA (promoter-associated RNA, PAR) ve artırıcı RNA (enhancer RNA, eRNA) olarak da alt gruplara ayrılabilir (5, 7-13).

Birçok lncRNA, RNA polimeraz II tarafından sentezlenmektedir ve poliadenilasyona, kesilime (splicing) uğrayabilmekte ve 5' başlık eklenebilmektedir. Bu transkriptler hücresel işlevlerine göre çekirdekte veya sitoplazmada yerleşik olabilmektedir (5, 6). Ayrıca, lncRNA'lar genel olarak beş ayrı grupta kategorize edilir: (i) protein kodlayan genlerin antisense sarmalından transkripte olan lncRNA'lar, (ii) protein kodlayan genlerin intronlarını içerecek şekilde bulunan transkriptler, (iii) protein kodlayan genlerin özendirici bölgeleri (promoter) ile ilişkili ve 5' UTR ve 3' UTR ile ilişkili olan transkriptler, (iv) protein kodlayan genlerdeki dizilerden bağımsız olan transkriptler, (v) protein kodlayan genlerin dışında kalan bölgelerden transkripte olan transkriptlerdir (intergenik ncRNA). Öte yandan, ncRNA'lar işlevlerine, hücredeki yerleşimine, transkripte edildikleri bölgelere göre de sınıflandırılabilirler (5, 6, 14, 15). Protein kodlayan genlerin antisense ipliğinden sentezlenen transkriptlere doğal antisense

transkript (natural antisense RNA, NATs, asRNA) denilmektedir. Bu transkriptler, kendi içinde transkriptin yönüne ve yerleşimine bağlı olarak 5' uç kısmında örtüşen bölgeler içeren (head-to-head, HTH), 3' uç kısmında örtüşen bölgeler içeren (tail-to-tail, TTT), bir transkriptin tamamen diğerinin içerisinde olması (embedded, EMB) ve intronik (intronic, INT) bölgelerde olan transkriptler şeklinde alt gruplara ayrılabilir. Bununla beraber, NAT'ların, aynı kökenli genlerin düzenlenmesinde ve kanserdeki rolleri tam anlamıyla açık değildir (14-16).

Kodlanmayan RNA'lar arasında ilk tanımlanan ncRNA ailesi miRNA'lardır. MiRNA'lar ortalama 22 nükleotid uzunluğunda protein kodlama özelliği olmayan ve gen ifadesini yazılım sonrasında negatif yönde düzenleyen RNA molekülleridir. 2000'li yılların başında büyük ilgi odağı haline gelmişlerdir ve miRNA'ların biyolojik süreçlerdeki rollerini ortaya koyan binlerce makale yayınlanmıştır. MiRNA'ların tanımlanması gen düzenlenmesine yepyeni bir boyut kazandırmıştır ve bilim adamlarının RNA dünyasına bakış açılarını büyük oranda değiştirerek, çalışmaların kodlanmayan RNA'lar üzerine yoğunlaşmasına sebep olmuştur. Şüphesiz bu etkinin sebepleri arasındaki en büyük etmen miRNA'ların kanser oluşumunda ve ilerlemesinde oynadığı roller olmuştur. Calin ve arkadaşları, miRNA'ların insan kanserlerinde aktif rol oynadığını ve kansere sebep olduğunu gösteren ilk çalışmayı yapan gruptur (17, 18). Daha sonraları, diğer kodlanmayan RNA'ların tanımlanması ile birlikte, lncRNA'ların hücrede birçok olayda yer aldığı gösterilmiş ve bu transkriptlerin değişik ifadelenmesi kanserin de içinde bulunduğu birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (10, 19). LncRNA'ların değişken ifade göstermesi tümör baskılayıcı ve/veya onkogenlere etki ederek birçok kanser türünün gelişiminde rol oynadıkları gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, kanserde bazı lncRNA'lar onkogenik (OncoLnc) özellik gösterirken bazıları ise tümör baskılayıcı özellik gösterebilmektedir. Örneğin; GAS5 (20), LOC285194 (21) gibi lncRNA moleküllerinin tümör baskılayıcı özellikleri bulunurken, HOTAIR (22, 23), CCAT1 (24, 25), MALAT1 (26, 27) gibi lncRNA'ların ise onkogenik özellik taşıdıkları bulunmuştur. Ayrıca, lncRNA molekülleri bazı tümör dokularında anormal ifade şekli gösterirken bazı insan dokusu ve kanser hücre hatlarında değişik ifade gösterdiği bulunmuştur (8).

Son yıllarda yapılan geniş kapsamlı kanser çalışmalarına rağmen halen kanser gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan birçok moleküler mekanizma aydınlatılamamıştır. Özellikle yeni tanımlanan birçok lncRNA molekülünün kanser gelişimine olan katkısı halen araştırılmaya açık bir konudur. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında VIM-AS1, CDKN2B-AS ve LOC105372161 gibi bazı doğal antisense transkriptlerin kanser süreçlerinde aldığı rollerin ortaya konulması amaçlanmıştır. İlgili NAT genleri ve ilişkili olabileceği karşı sarmalından sentezlenen VIM, CDKN2B ve BCL2 protein kodlayan genler kanserin önemli ayırt edici özelliklerinde oynadıkları roller sebebiyle seçilmiştir. Bu tez çalışmasında kanser süreçleri ile ilişkilendirilmiş genlerin işlevleri şu şekildedir.

Vimentin, 10. kromozom üzerinde, 10p13 bölgesinde yerleşik olan VIM geninden kodlanan mezenkimal hücrelerde ifade edilen bir ara iplikçik proteindir ve sitoplazmada yerleşiktir. Vimentin, organellerin sitoplazmadaki yerleşiminde, hücrenin esnekliğinde ve hücre içi trafikte önemli rol oynayan bir proteindir. Yapılan çalışmalarda VIM geninin birçok epitel kaynaklı kanser türlerinde aşırı ifade edildiği bulunmuştur. Kanserde aşırı VIM ifadesi, tümör büyümesi, istila ve zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir (28). Diğer yandan, CDKN2B proteini, 9. kromozom üzerinde 9p21 bölgesinde yerleşik CDKN2B geninden kodlanmaktadır. CDKN2B siklin bağımlı kinaz baskılayıcısıdır (CKI). Bu baskılayıcı proteinlerden CDKN2B (p15) G0/G1 fazında CDK4 ve CDK6'yı bağlayarak siklin-CDK karmaşımını (complex) engeller (29).

Bunun yanı sıra, içsel apoptoz yolağının düzenlenmesinde Bcl-2 ailesi proteinleri görev alırlar. Yapılan çalışmalar sonucunda 25 tane Bcl-2 ailesi proteini tanımlanmıştır. Bu proteinler hücre içerisinde mitokondri, düz endoplazmik retikulum ve perinükleer zarlarda yerleşiktir. BCL2 geni Bcl-2 protein ailesinden anti-apoptotik bir proteindir. BCL2, 18 kromozom üzerinde 18q21.3 bölgesinde yerleşik BCL2 geninden kodlanan bir proteindir. Birçok kanser çeşidinde aşırı ifade edildiği rapor edilmiştir (30, 31).

Dolayısıyla, bu doğal antisense transkriptlerin, kanser gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı bilinen protein kodlayan genler ile olan ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Dahası bilinen kanser ilaçlarından 5-FU'nun bu NAT'lar ve ilişkili olabileceği protein kodlayan genler üzerine olan etkileri araştırılmıştır. 5-FU'nun yanı

sıra, anti-kanser aktiviteleri henüz belirlenmemiş ancak hücre çoğalmasını baskılaması ile bilinen tiyoksemikarbazon türevli kimyasallar (8A ve 17B) bu çalışmaya dâhil edilmiştir. Tiyoksemikarbazon türevleri DNA ve RNA sentezini engelleyerek anti-kanser etkinliği gösterebilmektedir. Bu etkiyi ribonükleotitleri deoksiribonükleotitlere indirgeyen ribonükleotit redüktazı (RR) baskılayarak yaparlar. RR enzimi, hücre bölünmesinde ve tümör gelişiminde önemli işlevleri olan bir moleküldür (32). Bunun yanı sıra, tiyoksemikarbazon türevleri topo II-DNA karmaşımındaki tiyol kalıntıları alkillenerek bu karmaşımı kararsız hale getirir ve anti-kanser etkisi gösterirler (33). Dolayısıyla, apoptoz, hücre döngüsü, hücre göçü gibi kanser süreçlerinin yanı sıra seçilen NAT'lar ve ilişkili olabileceği protein kodlayan genler üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bütün bunların yanında hücrelerin kimyasallar ile muamelesi sonucunda, apoptozun önemli belirteçlerinden olan kaspaz etkinliği ve BCL-2 gen ailesi üyelerinden bazı genlerin gen ifade seviyeleri test edilmiştir.

2 . GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, günümüzün en önemli sağlık problemlerinin başında gelmektedir ve dünya genelinde sıkça görülen bir hastalıktır. Ayrıca kansere bağlı ölümler giderek artmaktadır (1). 2016 yılı kanser istatistiklerine göre, ABD’de, yaklaşık 1,6 milyon insanda yeni kanser vakası teşhis edilirken kansere bağlı olarak yaklaşık yarım milyon insan hayatını kaybetmiştir (1). Yeni kanser vakalarında; kadınlarda %29 oranla meme kanseri, erkeklerde ise %21 oranında prostat kanseri başta gelmektedir. Bununla beraber, kansere bağlı ölümlere, kadınlarda ve erkeklerde sırasıyla % 26 ve %27 oranla akciğer kanseri neden olmaktadır (1).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 2013 yılında toplam 174 bin kişiye kanser teşhisi konulmuştur ve bu oran diğer gelişmiş ülkelere kıyasla daha düşük seviyededir. Cinsiyete göre kanser görülme oranı, 103,070 erkek ve 71,233 kadın şeklindedir. Erkeklerde en sık prostat ve akciğer kanseri görülürken, kadınlarda meme kanseri en sık görülen kanser çeşididir (www.kanser.gov.tr).

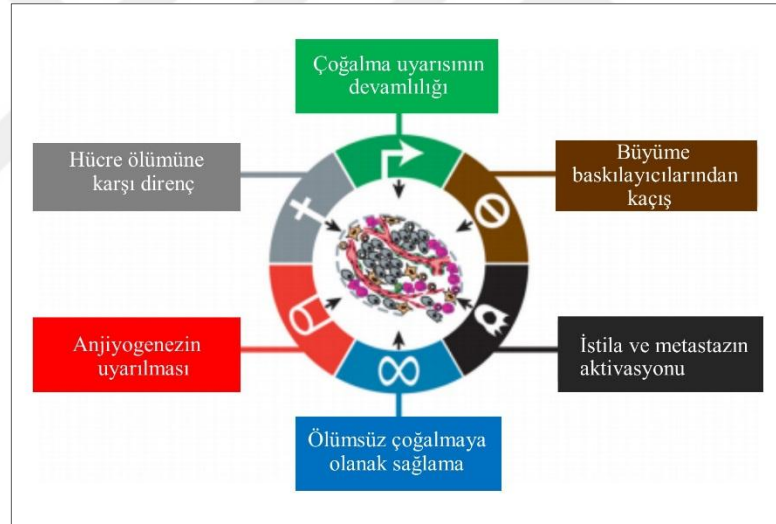
Kanser, hasarlı hücrelerin hayatta kalması ve düzensiz hücre çoğalması sonucu oluşan genetik bir hastalıktır. Normal hücreler, hücre bölünmesi, farklılaşması ve hücre ölümünü düzenli ve verimli bir şekilde gerçekleştirebilmek için birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Birçok düzenleyici etmen, genlerin aktif veya inaktif olmasında rol alarak hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının kontrolünü sağlamaktadır. Hücre döngüsü, farklılaşması gibi süreçlerde rol oynayan onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen bozukluklar kanserin moleküler temelini oluşturmaktadır (2).

Kanser, bir seri genetik bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Bu tür genetik bozukluklar, etkilenen genlerin işlevlerinin düzensizliği ile sonuçlanır. Bu tür işlevsel bozukluklar,

onkogenlerin etkinleşmesi ve/veya tümör baskılayıcı genlerde olan işlev kaybı sonucunda oluşmaktadır (34).

2.2. Kanser ayırt edici özellikleri

Kanser gelişiminin çok aşamalı bir süreçte olduğu gösterilmiştir ve kanserin ayırt edici özellikleri genel olarak altı grupta değerlendirilmiştir (2). Kanser ayırt edici özellikleri; çoğalma sinyalinin sürekliliği, büyüme baskılayıcılarından kaçış, hücre ölümüne karşı direnç, artmış telomeraz aktivitesi ve ölümsüz çoğalmaya olanak sağlama, anjiyogenezin uyarılması, istila ve metastaz etkinleşmesi olmak üzere altı ana grupta değerlendirilmektedir (2). Bunun yanı sıra, bağışıklık sisteminden kaçış, genomik kararsızlığın artması, enerji metabolizmasında yeniden düzenlenmeler ve tümör teşvik edici yangı kanserin diğer ayırt edici özellikleri arasında sıralanmaktadır (2). Kanser ayırt edici özellikleri aşağıdaki gibi özetlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kanser ayırt edici özelliklerinin şematik gösterimi (2).

2.2.1. Çoğalma uyarısının devamlılığı

Kanser hücrelerinin en önemli ayırt edici özelliklerinden birisi sürekli olarak çoğalabilme yeteneklerinin olmasıdır. Normal hücreler, hücre sayısını dengede tutabilmek ve normal doku yapısının ve işlevinin korunması için büyüme teşvik edici

etmenlerin üretimini ve salınımını dikkatli bir şekilde kontrol ederler. Kanser hücrelerinde ise bu durum farklıdır (35, 36). Kanser hücrelerinde büyüme teşvik edici uyarıların düzensiz olduğu görülmüştür. Kanser hücreleri, çoğalma uyarısının devamlılığını birçok yönden sağlayabilmektedirler.

Otokrin uyarı iletimi: Kendi büyüme etmenlerini salgılayabilirler ve böylelikle salgıladıkları büyüme etmenlerine kendi almaçları ile cevap verebilirler (2).

Parakrin uyarı iletimi: Kanserli hücreler, tümör mikro çevresindeki hücelere uyarılar göndererek normal hücrelerin birçok büyüme etmenini salgılamasına olanak sağlayabilirler. Böylece, normal hücrelerden salgılanan büyüme etmenleri kanser hücrelerinin büyümesine katkı sağlayabilir (37).

Dışarıdan herhangi bir uyarı olmadan kanser hücrelerini büyümelerini iki yolla tetikleyebilirler: Birincisi, sinyal yolağının etkinleşmesi, ikincisi ise geri besleme (feed-back) mekanizmasının bozulması ile uyandırılır (38).

2.2.2. Büyüme baskılayıcılardan kaçış

Kanser hücreleri tümör baskılayıcı genlerden kaçmanın bir yolunu bulmalıdır. En çok bilinen tümör baskılayıcı genler TP53 ve RB'nin hücre döngüsü üzerinde önemli rolleri bulunmaktadır. RB geninde meydana gelen mutasyonlar, bu genin işlevinde bozukluklara sebep olmakta ve dolayısıyla RB aracılı hücre döngüsü kontrolünün kaybına neden olmaktadır. Bu durum, hücre çoğalmasının devamlılığına olanak sağlamaktadır (39). RB geni, çoğunlukla dış etmenlere karşı büyüme baskılayıcı etki gösterirken TP53 geni, genellikle iç etmenlere karşı baskılayıcı etki gösterir (39). Eğer, genomda oluşan hasar fazla veya tamir edilemezse veya hücrede nükleotid seviyeleri, büyüme teşvik edici etmenler, glikoz, oksijen seviyesi normal değilse TP53 proteini, hücre döngüsü bütün sıkıntılar normale dönünceye kadar durdurur (39, 40). Dahası, düzeltilmesi mümkün olmayan DNA hasarlarında TP53 proteini apoptozu tetikleyebilir (40). Normal hücreler, hücre sayısının dengede tutulabilmesi için hücre döngüsünü de düzenlerler ve hücre döngüsünü birçok süreçte kontrol ederler. Ancak, kanser hücrelerinde böyle bir durum söz konusu değildir. Hücre döngüsü kontrol noktalarında kritik görevleri olan genlerde (p53, RB1 gibi) olan mutasyonların döngünün kontrolünü

sağlayamaz ve genomik kararsızlık artar. Böylece kanser hücreleri sürekli bölünebilme yeteneği kazanırlar.

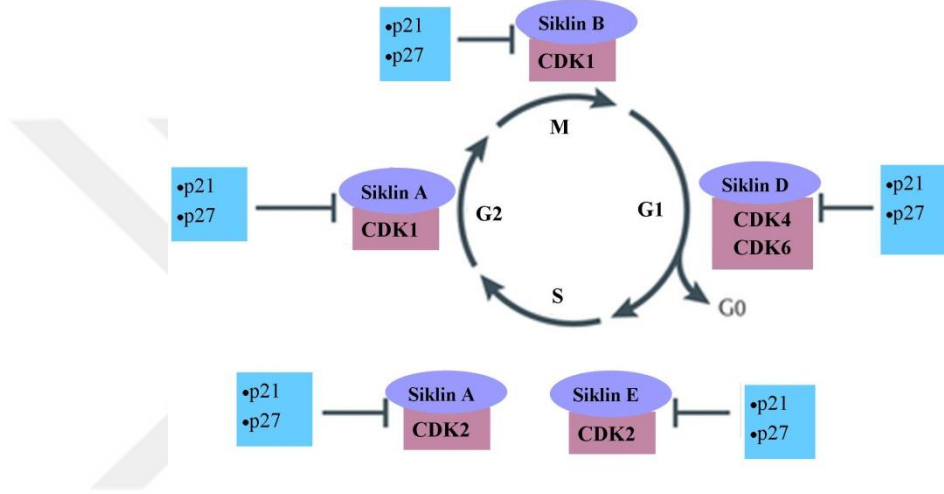
2.2.2.1. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, çoğalmak için uyarılan bir hücrede gerçekleşen bir seri biyokimyasal olaylar ve şekilsel değişimlerin olduğu bir süreçtir. Hücre bölünmesinde temel amaç, bir sonraki nesillere genetik bilginin sorunsuz olarak aktarılmasıdır. Bu durumu sağlamak için, hücre içerisinde birçok hücre döngüsünü düzenleme mekanizması bulunmaktadır. Hücre döngüsü süreci, DNA sentez (S) ve mitoz (M) evrelerinin tekrarı şeklindedir. Her iki evre arasına döngüsel olarak değişken bir süre beklemektedir. M ve S evrelerin arasındaki döneme G1 (Gap1), S ve M evreleri arasındaki döneme ise G2 denilmektedir. Sürekli bölünen hücrelerde mitozdan sonra döngü G1–S-G2 (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde tekrarlanır. Bu süreçte hücre uyarımı ve büyüme meydana gelmekte veya bölünme uyarısı almadıkları sürece dinlenme evresi G0'da durmaktadırlar. G1, S, G2 evreleri (interfaz) hücre döngüsünün % 90'nını kapsar ve 16-24 saat sürerken, mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir (41).

G1 evresinde hücreler, büyümeyi tetikleyici uyarılar alır ve DNA sentezi için hazırlık yapılı, RNA ve protein sentezi olur. Bu evrede, hücrenin bölünmesi, farklılaşması ve ölmesi gibi hayati kararlar verilir. S evresinde DNA iki katına çıkar ve bu evrenin sonunda her kromozom birbirine bağlı iki eş kromatidden oluşur. G2 evresinde, DNA kromatin proteinleri ile yoğunlaşır, paketlenir. M evresinde kardeş kromatidler düzgün bir şekilde bir hizaya gelirler ve ardından çeşitli aşamalardan sonra (profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez) hücrenin ikiye bölünmesi gerçekleşir (42, 43).

Hücre döngüsü, G1/S, G2/M ve metafaz-anafaz geçişleri gibi çeşitli kontrol noktaları ile kontrol edilmektedir. Bu kontrol noktalarında döngünün kaderi belirlenir (44). Hücre döngüsü kontrolü genel olarak protein kinazlar, siklinler ve siklin bağımlı kinaz baskılayıcıları (CKI) tarafından sağlanır. Protein kinazlar hedef proteinlerin fosforillenmesi sağlarken, siklinler hücre döngüsünün işlerliğini kontrol ederler. Siklinlerin periyodik yapım/yıkımları ve dolayısıyla ilişkide bulundukları siklin bağımlı kinazların (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25) işlevlerinin

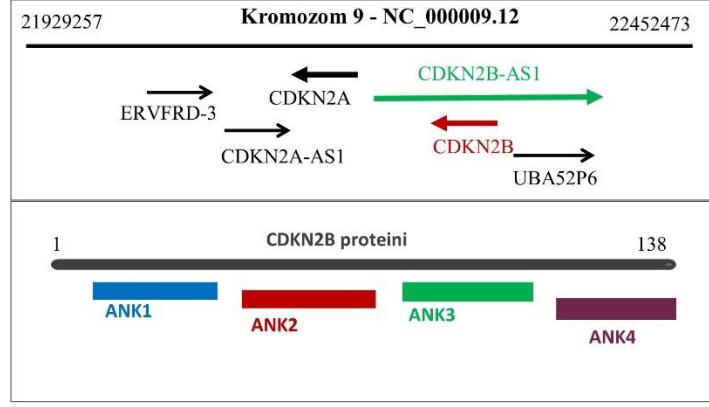
düzenlenmesini sağlar. Siklin bağımlı kinazlar kendi başlarına bulunduklarında işlevsizdirler, ancak siklinlere bağlandıklarında etkinleşir ve böylece işlevsel siklin-CDK bileşenleri oluşur. CKI'lar; siklinleri, CDK'ları veya siklin-CDK karmaşımını doğrudan etkileyerek CDK'ların işlevini baskırlar (Şekil 2.2) (29). CKI'lar etkiledikleri CDK ve mekanizmalarına göre iki alt gruba ayrılırlar. INK ailesinde, p15, p16, p18, p19 olmak üzere 4 tane CKI bulunmaktadır ve bunlar G1 fazında CDK4 ve CDK6'yı bağlayarak siklin-CDK karmaşımını engeller (43). CIP/KIP ailesinde, p21, p27, p57 CKI'ları siklin-CDK karmaşımını engeller (29).



Şekil 2.2. Hücre döngüsünün evreleri ve bu evrelerde rol oynayan CDK'lar, siklinler ve CDK baskılayıcılarının şematik gösterimi (45).

2.2.1.2. Siklin bağımlı kinaz 4 baskılayıcısı 2B (P15, CDKN2B)

CDKN2B proteini, 9. kromozom üzerinde 9p21 bölgesinde yerleşik CDKN2B geninden kodlanmaktadır. CDKN2B geni iki tane splice varyant içermektedir ve bunların iki tane protein izoformu mevcuttur. CDKN2B, mRNA varyant 1 (NM_004936.3) 2 tane ekzon içermektedir ve 3861 nükleotid (nt) uzunluğundadır. Bu varyanttan sentezlenen protein izoformu, izoform 1 (NP_004927.2) 138 amino asit (aa) uzunluğundadır. İkinci varyant (NM_078487.2) 2 ekzon içermekte olup 3984 nt uzunluğundadır ve protein izoformunu (NP_511042.1) 78 aa oluşturmaktadır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1030>) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. CDKN2B geninin kodlandığı genomik bölgenin gösterilmesi. Ayrıca, CDKN2B proteinin farklı bölgeleri gösterilmiştir.

Normal hücreler kültür kabında çoğalmayı hücre-hücre etkileşimi sayesinde kontrol altında tutarlar. Ancak, kanser hücreleri yeterli çoğunluğa erişseler bile çoğalmaya devam ederler. Bu olayın aydınlatılması için iki mekanizma açıklanmıştır. Birincisi, NF2 gen ürünü olarak bilinen Merlin, hücre yüzeyi yapışma molekülleri ile etkileşime girerek hücreler arası bağlantıların engellenebileceği (contact inhibition) öne sürülmüştür (46). İkinci mekanizma ise, tümör baskılayıcı etki gösteren epitel polarite proteini LKB1 ile sağlanmaktadır. LKB1, epitelyal yapının düzenlenmesinde ve doku bütünlüğünün korunmasında önemli görevleri olan bir proteindir (47).

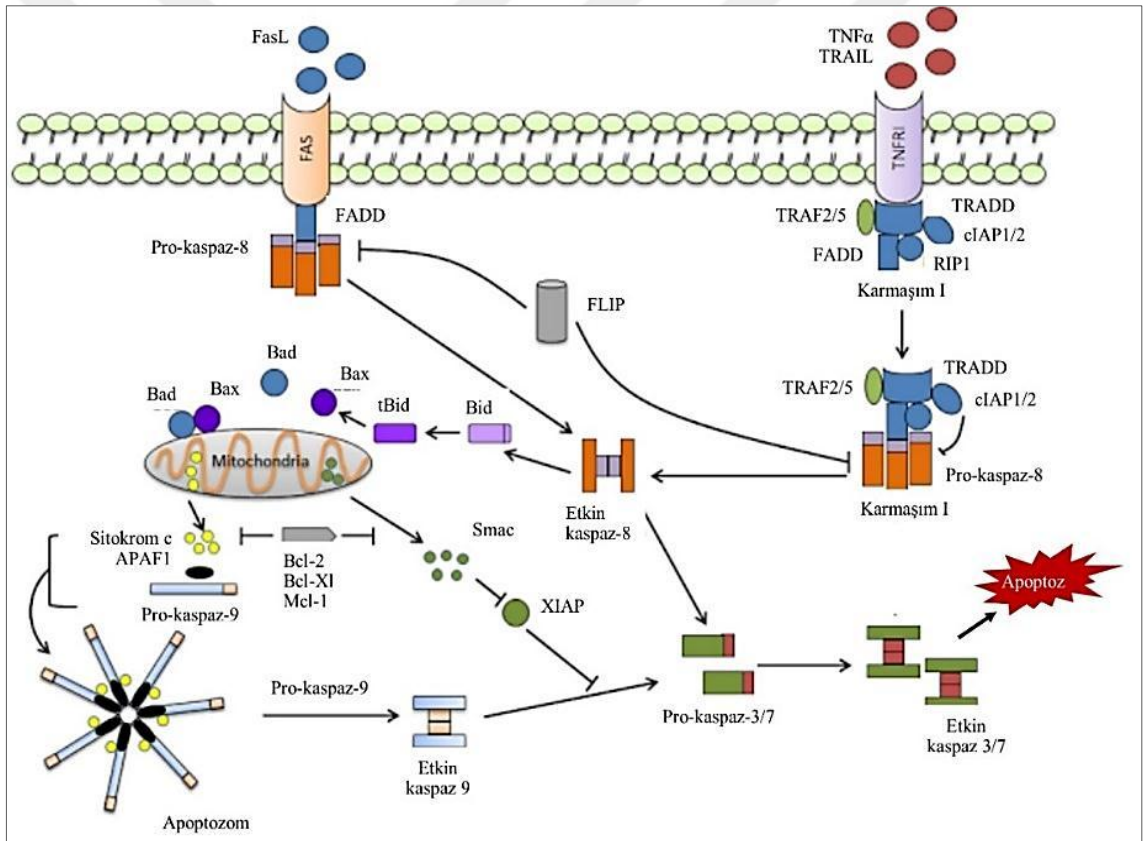
2.2.3. Hücre ölümüne karşı direnç

Normal hücreler apoptoz ile kanser gelişimine karşı doğal bir savunma mekanizması geliştirmişlerdir (48, 49). Tümör hücreleri apoptozu sınırlamak ve apoptozdan kaçmak için birçok yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerden en iyi açıklanmış olanı TP53 etkinliğinin kaybıdır (50). Ayrıca, tümör hücreleri TP53 kaybında olduğu gibi anti-apoptotik proteinlerin aşırı ifadenmesi ile apoptozdan kaçabilirler (50, 51).

Apoptozun yanı sıra, normal hücrelerde düşük seviyelerde etkin olan fakat besin yokluğu gibi stres durumlarında güçlü bir biçimde uyarılan fizyolojik bir cevap olan otofaji de programlı hücre ölümüdür (52). Otofaji, kendini yeme olarak bilinen lizozomal yıkım mekanizmasıdır. Hücrenin sağkalımı, büyümesini ve hemeostasını

sağlamak için hücre içerisindeki proteinleri veya zarar görmüş organelleri çift zarlı bir kesecik içerisinde alarak lizozoma taşır ve yıkılmalarını sağlar (52-54).

Apoptoz bir çeşit programlı hücre ölümüdür ve kendine özgü yapısal özellikler ile karakterizedir. Apoptotik hücrelerde, hücre zarının buruşuk olması, kromatin yoğunlaşması, hücre iskeletinde bozukluklar ve DNA'nın parçalara ayrılması kaçınılmaz bir durumdur. Apoptoz hücre içerisinde çeşitli yollarla olabilmektedir. Genel anlamda, içsel (intrinsic) ve dışsal (extrinsic) olmak üzere iki tane ana apoptoz yolu mevcuttur ve her iki yolak da kaspaz etkinliğine bağlı olarak ilerler (Şekil 2.4).

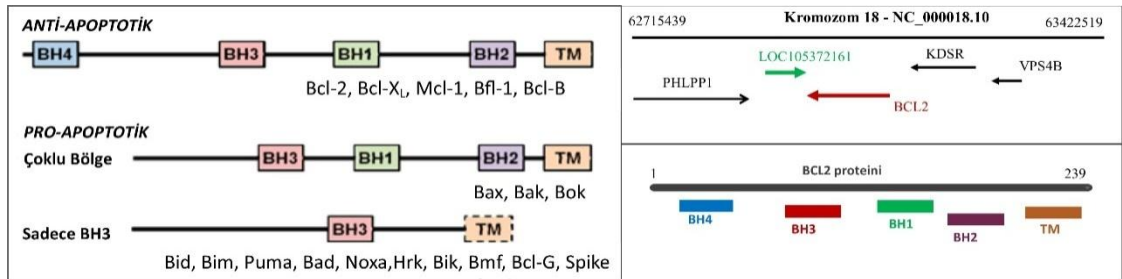


Şekil 2.4. İçsel ve dışsal apoptoz yollarının gösterilmesi. Dışsal yolak, ölüm almaçlarının (TRAIL, TNFα, Fas) pro-kaspaz 8'i etkin hale getirmesi ile başlar. İçsel yolda ise, mitokondriden sitokrom c'nin salınması ile pro-kaspaz 9 etkinleşir ve apoptoz silsilesi başlar. İçsel ve dışsal yolda uyarılan kaspaz 8 ve 9'un etkinleşmesi ile etkileyici (effector) kaspazlar etkin hale gelir ve apoptoz gerçekleşir (55).

2.2.3.1. İçsel Yolak

İçsel yolak, DNA hasarı, büyüme etmenlerinin yoksunluğu, hipoksi, aşırı kalsiyum yüklenmesi ve bazı ilaçlar tarafından uyarılarak etkin hale gelen bir yoldur. Bu yolak Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenir. Bu proteinler hücre içerisinde, mitokondri, düz endoplazmik retikulum ve perinükleer zarlarda yerleşiktir (56). Bcl-2 ailesi anahtar düzenleyiciler olarak t(14:18) kromozom translokasyonları hariç birçok kötü huylu kanser türlerinde aşırı ifade edilmektedir. Günümüze kadar 25 tane Bcl-2 ailesi proteini tanımlanmıştır. Bcl-2 ailesi proteinleri iki ana gruba ayrılmaktadır: pro-apoptotik proteinler, anti-apoptotik proteinler (Şekil 2.5). Pro-apoptotik üyeler Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk proteinlerinden oluşmaktadır. Anti-apoptotik üyeleri ise; Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1 proteinleri oluşturmaktadır (30). Anti-apoptotik Bcl-2 üyeleri sitokrom c salınımını engelleyerek apoptozu baskımlarken, pro-apoptotik üyeler apoptozu teşvik eder (31).

Apoptotik uyaran durumunda, dış mitokondri zarı geçirgen hale gelir ve sitokrom c'nin salınımına neden olur. Sitoplazmaya salınan sitokrom c, ilk olarak APAF1 (Apoptotic protease activating factor 1) ile etkileşime geçer ve pro-kaspaz 9'un etkin hale gelmesine yol açar. Etkin pro-kaspaz 9, kaspaz 3/7 gibi etkileyici kaspazları etkin hale getirir ve kaspaz silsilesini başlatarak apoptozu neden olur. Kaspazların etkinleşmesi ile nükleer lamin ve çekirdek parçalanır, hücre programlı bir biçimde ölür (57).



Şekil 2.5. Bcl-2 ailesi üyelerinin gösterilmesi. Anti-apoptotik genlerde 4 tane Bcl-2 homoloji (BH) bölgesi ve 1 tane zar geçiş (TM, transmembrane domain) bölgesi bulunmaktadır. Pro-apoptotik Bcl-2 genlerinin ise 3 BH ve 1 TM bölgesi ile sadece BH3 ve TM bölgesinin olduğu iki alt grubu mevcuttur (sol) (58). BCL2 geninin kromozomal yerleşkesi gösterilmiştir (sağ).

BCL2 proteini, 18. kromozom üzerinde 18q21.3 bölgesinde yerleşik BCL2 geninden kodlanmaktadır. BCL2'nin, iki tane splice varyantı bulunmaktadır ve bu varyantlardan iki tane protein izoformu sentezlenmektedir. BCL2 transkript variant 1 (alfa), 3 ekzon içermektedir ve 6492 nt uzunluğundadır (NM_000633.2). Bu varyanttan sentezlenen protein alfa izoformu (NP_000624.2) 239 aa uzunluğundadır. BCL2 transkript variant 2 (beta), 2 ekzon içermektedir ve 1206 nt uzunluğundadır (NM_000657.2). Bu varyanttan sentezlenen protein beta izoformu (NP_000648.2) 205 aa uzunluğundadır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/596>) (Şekil 2.5).

2.2.3.2. Dışsal Yolak

Dışsal yolak, hücre yüzeyinde bulunan ölüm almaçlarının aracılığı ile tetiklenir. Ölüm almaçları, TNF (Tumor Necrosis Factor) almaç gen süper ailesinin üyeleridir. TNF almaç ailesinin üyeleri, hücre dışı sistein zengin bölgesi ve “ölüm bölgesi (death domain)” olarak adlandırılan 80 aa'lık sitoplazmik bölgeden oluşur (59). Ölüm bölgesi, hücre içi uyarı ileti yollarına hücre yüzeyinden ölüm sinyalini taşımada kritik rol oynamaktadır. En iyi bilinen ölüm almaçları ve ekleri (ligand), FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5 şeklindedir. Ölüm almaçlarının uyarılması ile pro-kaspaz 8 etkin hale gelir ve içsel yolakta olduğu gibi etkileyici kaspazları etkin hale getirerek kaspaz silsilesini başlatır, böylelikle, apoptoz gerçekleşir (60, 61).

2.2.4. Ölümsüz çoğalmaya olanak sağlama

Kanser hücrelerinin mikroskobik tümörleri oluşturabilmeleri için limitsiz bir şekilde çoğalabilmeleri gerekmektedir. Normal vücut hücreleri belirli sayıda büyüme-bölünme döngüsü geçirirken kanser hücreleri bu kuralı yok sayarlar. Normal hücrelerde bu kuralı sağlayan iki nokta vardır. Birincisi, hücrelerin yaşlanması, ikincisi ise yaşlanma sonucunda ölüme gitmesidir (2). Yapılan çalışmalar telomerlerin hücre ölümsüzlüğünde rollerinin olduğunu göstermektedir. Telomerler, birçok ardışık hekzanükleotid tekrarlarından oluşur. Ölümsüz olmayan hücrelerde her hücre bölünmesinde kısalır ve sonunda DNA uçlarını koruma yeteneklerini kaybederler. Telomeraz, özel bir DNA polimeraz enzimidir. Bu enzim telomer uçlarının uzamasından sorumludur. Telomeraz etkinliği ölümlü hücrelerde yok denecek kadar azdır. Ancak, kanser hücreleri gibi

ölümsüz hücrelerde önemli derecede etkin olan bir enzimdir. Artmış telomeraz etkinliği yaşlanma ve apoptoza karşı bir direnç oluşturmaktadır ve buna ters bir şekilde telomeraz etkinliğinin baskılanması telomer kısaltmalarını sağlayarak yaşlanmaya ve hücre ölümüne neden olmaktadır (2, 62).

2.2.5. Anjiyogenezin uyarılması

Normal dokular gibi tümörler de besin ve oksijen alınımına ve metabolik atıkları ve karbondioksiti uzaklaştırma ihtiyacı duyarlar. Anjiyogeneze ile oluşan tümör ilişkili damarlar bu ihtiyaçların karşılanmasını sağlarlar (63). Yetişkinlerde damar oluşumu, yara iyileşmesi, menstrual döngü gibi fizyolojik süreçlerde geçici olarak etkin hale gelirken, tümör dokularında neredeyse her zaman etkindir. Bu durum, oluşan tümörlerin beslenmesinde önemli rol oynamaktadır. En iyi bilinen anjiyogeneze tetikleyicisi VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A) iken anjiyogeneze baskılayıcısı TSP-1 (Thrombospondin 1)'dir. VEGFA geni, embriyonik ve postnatal gelişim sürecinde yeni damar oluşumundan sorumlu bir gendir. VEGF gen ifadesi hipoksik ve anjiyogenik uyarılara karşı artabilir ve diğer proanjiyogenik faktörlerin uyarılmasına da sebebiyet verebilir (64-66).

Tümörlerde oluşan damarlar düzensiz bir şekilde olduğundan normal yerleşimden farklıdır. Tümör damarlaşması, gelişmemiş kapiller oluşumu, aşırı damar dallanması, bozuk ve gelişmemiş damarlar, düzensiz kan akışı, mikro kanama, sızdırma, artmış endotel hücre çoğalması ve apoptoz ile karakterize bir süreçtir.

2.2.6. İstila ve metastazın etkinleştirilmesi

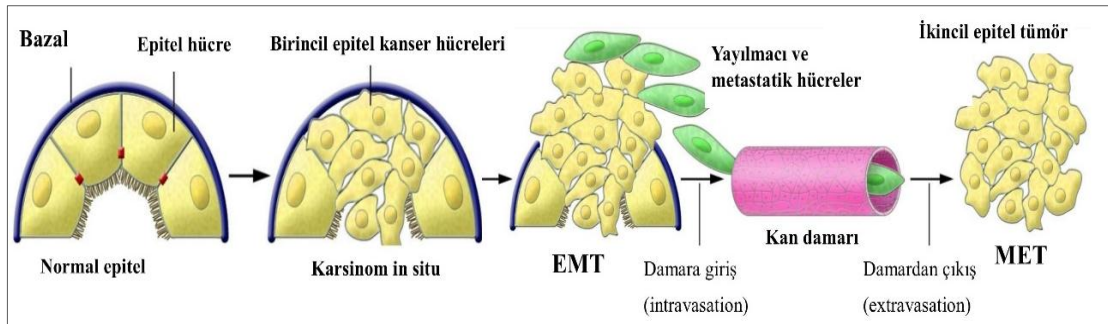
Kanser hücreleri, istila ve metastaz yapabilmeleri için morfolojik değişim geçirmeli, diğer hücrelerle olan bağlantılarını ve hücre dışı ortam ile olan bağlantılarını değiştirmelidirler. Kanser hücrelerine bu süreçte epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) aracılık eder.

2.2.6.1. Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT)

Epitelyal mezenkimal geçiş, epitel kaynaklı hücrelerin, yayılmacı, apoptoza direncinin artırıcı ve ECM (ExtraCellular Matrix) bileşenlerinin ciddi derece yükseldiği

mezenkimal hücre fenotipi kazanması için bir takım biyokimyasal olayların olduğu, bazal zar ve bazal yüzey arasında normal etkileşimin olduğu biyolojik bir süreçtir (67). EMT, hücre iskeleti düzenlenmesi ve E-cadherin gibi hücre yapışma moleküllerinin düşük ifade edilmesi ile karakterize bir süreçtir (67). EMT'nin başlatılması için bir dizi moleküler mekanizmanın etkin hale gelmesi ve bazı özgül yazılım etmenlerinin etkinleşmesi gerekmektedir (68). Örneğin; hücreler arası bağlantı proteinlerinin kaybı (E-cadherin, N-cadherin, P-cadherin), matriks yıkım enzimlerinin üretilmesi (metaloproteinazlar, kathepsin proteazlar), artmış hücre hareketliliği, programlı hücre ölümüne karşı artmış direnç, epitel hücre morfolojisinden mezenkimal hücre morfolojisine geçiş sıralanabilmektedir (2, 67).

EMT, embriyonik gelişim sürecinde, yara iyileşmesi gibi özel koşullarda normal olarak gerçekleşen biyolojik bir süreçtir. EMT normal bir süreç gibi görünse de, kanser ile ilişkili yapılan çalışmalarda, kanserin yayılmasında önemli rol oynayan istila, metastaz ve anjiyogenez gibi süreçlere aracılık ettiği bildirilmiştir (2, 67, 69). EMT'nin göstergesi olarak birçok moleküler belirteç tanımlanmıştır ve bunlardan en önemlisi E-cadherin'dir. E-cadherin en iyi bilinen epitel hücre belirtecidir ve EMT sürecinde çoğunlukla düşük ifade edilmektedir veya kaybolmaktadır. E-cadherin kaybı epitel hücrelerin göç kapasitesi kazanması ile doğrudan ilişkilidir (70). Mezenkimal hücre belirteçlerinden Snail, Slug, ZEB1, ve Twist E-cadherin ifadesini baskılamaktadır. Öte yandan, mezenkimal hücre belirteci olan vimentin ve fibronektin hücrelere esnek bir yapı sağlayarak hücrelerin göçüne olanak sağlamaktadır (2, 67, 70).



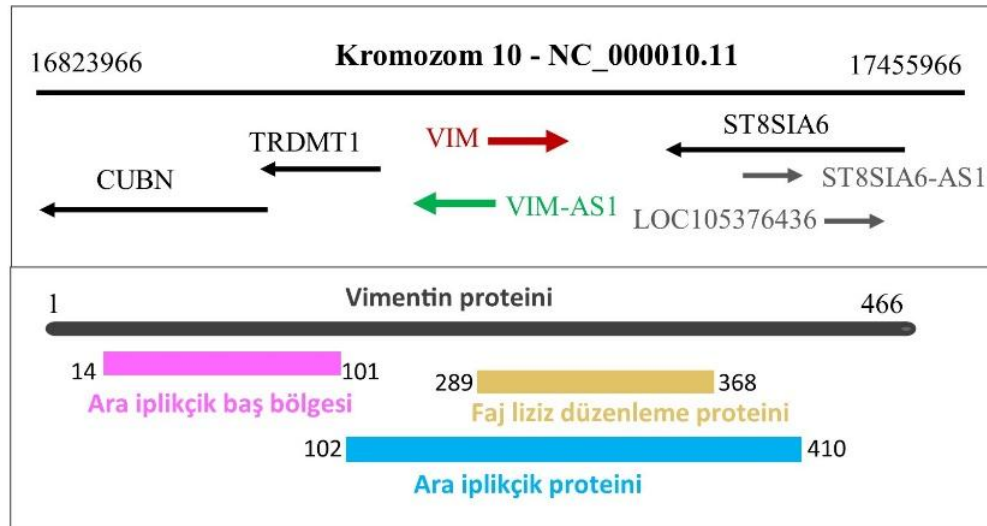
Şekil 2.6. Kanserde EMT sürecinin şematik gösterimi. Normal epitel hücresi, birincil dokudan koparak mezenkimal hücre özelliği kazanır. Hareketli bu hücre kan damarlarından geçerek başka bir dokuda/bölgede yeniden yerleşerek çoğalmaya başlar (67).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, kanser hücrelerinin uzak doku bölgelerine göç etmek için EMT sürecini tekrar etkinleştirdiklerini göstermiştir. EMT'nin etkinleşmesi ile kanser epitel hücrelerinin göç kapasitesi artmakta ve bu hücrelerin tümör mikroçevresinden koparak yeni oluşan damarlar sayesinde dolaşıma katılır ve metastaza aracılık ederler (Şekil 2.6). Dolayısıyla, kanserde EMT'nin hedeflenmesi ve EMT sürecinin baskılanması istilanın ve metastazın durdurulması açısından son derece önemlidir (2, 67, 70).

2.2.6.2. Vimentin (VIM)

Vimentin proteini, mezenkimal hücrelerde ifade edilen bir ara iplikçik proteinidir ve sitoplazmada yerleşiktir. Ara iplikçikler genellikle yapısal olarak kararlı olsalar da Vimentin için durum farklıdır. Vimentin, organellerin sitoplazmadaki yerleşiminde, hücrenin esnekliğinde ve hücre içi trafikte (kolesterol taşınımı) önemli rol oynayan bir proteindir.

Vimentin proteini, 10. kromozom üzerinde, 10p13 bölgesinde yerleşik olan VIM geninden kodlanır. VIM geninin 10 tane ekzon bölgesi bulunmaktadır (NM_003380.3, mRNA uzunluğu: 2136 nt) ve bunların 9 tanesi protein kodlamaya (NP_003371.2, aa:466, 57 kDa) katılmaktadır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7431>) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Vimentin geninin kodlandığı bölgenin ve protein yapısının gösterilmesi.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, VIM geninin, birçok epitel kaynaklı kanser türlerinde aşırı ifade edildiği bulunmuştur. Kanserde aşırı VIM ifadesi, tümör büyümesi, istila ve zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir. 57 kDa olan Vim proteini, EMT sürecinde önemli bir mezenkimal hücre belirtecidir (28). EMT, epitel hücrelerde Vimentin ara iplikçığı ile karakterizedir, normal durumda yalnızca keratin ara iplikçığı ifade edilir. EMT'nin tersi olan MET'te (Mesenchymal–Epithelial Transition) ise hücreler tekrardan epitel hücre özelliği kazanmaya başlar, VIM ifadesi düşer ve hücre hareketliliği azalır (28, 68).

2.2.7. Diğer ayırt edici özellikler

Kanserin ana ayırt edici özelliklerinin yanı sıra başka ayırt edici özellikleri de mevcuttur. Bunlar arasında; enerji metabolizmasındaki yeniden düzenlenmeler ve bağışıklık sistemi hücrelerinden kaçış yer almaktadır. Diğer yandan, kanser hücrelerinin etkinleşen özellikleri arasında genomik kararsızlık ve tümör teşvik edici yangı sayılabilir.

Enerji programında yeniden düzenlenmeler: Kanser hücreleri sürekli çoğalabilmek için enerji metabolizmasında da yeniden düzenleme yapabilirler. Normal hücreler oksijen varlığında, glikozu metabolize ederek oksidatif fosforilasyon yaparlar, oksijen yokluğunda ise glikolize dayalı bir enerji metabolizması öne çıkar ve çok az oranda pürüvat molekülü mitokondriye aktarılır. Ancak, kanser hücreleri, oksijen varlığında da glikolize dayalı mekanizmayı kullanırlar. Bu durumda kanser hücreleri glikoliz sayesinde 18 kat daha az verimli bir yolu seçerler. Aradaki bu farkı kapatmak için glikoz taşıyıcılarının ifadesinde özellikle GLUT1 ifadesinde ciddi bir şekilde artış görülür. Kanser hücrelerinin bu etkin glikoz alımı kanser yayılımının tespitinde kullanılan bir metot olan PET (Pozitron Emisyon Tomografisi) taramasının temelini oluşturmaktadır. Glikolize dayalı bu enerji metabolizmasına “Wargburg etkisi” denilmektedir.

Bağışıklık sisteminden kaçış: Bağışıklık tarama (immun surveillance) teorisine göre hücreler ve dokular sürekli olarak bağışıklık sistemi tarafından gözetim altında tutulmaktadır. Dolayısıyla, bağışıklık sistemi kanser hücrelerini tanımak ve ortadan kaldırmak ile görevli hücreleri barındırmaktadır. Bu teoremden yola çıkarak, solid

tümörlerin bağışıklık sisteminden gizlendiği ya da bağışıklık sistemi tarafından ölümü sınırladığı öne sürülmektedir. Bazı kanser türlerinin bağışıklık yetmezliği çeken bireylerde aniden artış göstermesi tümörlerde bozuk bağışıklık cevabına kanıt olarak gösterilebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, bağışıklık sisteminin tümör oluşumunu ve ilerlemesini önemli derecede önlediği göstermiştir. Sitotoksik T lenfositleri, yardımcı T lenfositleri ve doğal öldürücü (naturel killer, NK) hücrelerde meydana gelen yetmezlikler tümör görülme sıklığının artmasına neden olabilir.

Tümör teşvik edici yangı: Bazı tümör dokularında bağışıklık sistemi hücrelerinin varlığı uzun yıllardır bilinmektedir. Bağışıklık sistemi hücreleri bu dokulara sızarak neoplastik olmayan dokularda eşzamanlı yangısal durumlar ortaya çıkarabilir. Yapılan çalışmalar, tümör dokularının farklı yoğunluklarda bağışıklık sistemi hücre topluluğu içerdiği gösterilmiştir. Önceleri, bu gelişen bağışıklık cevabın tümör hücrelerini ortadan kaldırmak için gelişen doğal bir savunma mekanizması olduğu düşünülmekteydi. Ancak, yapılan çalışmalar bu durumun bağışıklık sisteminden bir kaçış olduğunu göstermiştir. Tümör ilişkili yangının tümör oluşumunu arttırdığı öne sürülmüştür. Ayrıca, bağışıklık sistemi hücreleri yakındaki kanser hücreleri için aktif mutajenik kimyasallar, özellikle serbest oksijen radikalleri salgılayabilirler.

Genomik kararsızlık ve mutasyon: Kanser hücreleri artmış genomik kararsızlığa sahiptir. Kanserli hücreler mutajenik ajanlara karşı artmış duyarlılık gösterirler. Çünkü genomun bütünlüğünü ve doğruluğunu denetleyen sistemlerde hasarlar bulunmaktadır. Normal denetleyici ve düzenleyici mekanizmalar zarar görmüş hücreleri yaşlanmaya veya apoptoza götürürken, kanser hücrelerinde bu olay söz konusu değildir.

2.3. Kodlanmayan RNA (ncRNA)

İnsan genom projesinin (Human Genome Project) tamamlanması ile insan genomunun neredeyse tamamı dizilenmiştir. İnsan genomunun yaklaşık %2’lik kısmı protein kodlayan bölgeyi içerirken diğer kısımlar “çöp (junk) DNA” olarak bilinmekteydi. Amerikan Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü (The National Human Genome Research Institute, NHGRI), 2007 yılında insan genom dizisinde tüm işlevsel unsurları belirlemek için, ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements Project) projesi adında bir

kamu araştırma konsorsiyumu başlattı (71). Bu projenin temel amaçlarından birisi, insan genomundan kodlanan ancak protein ürünü olmayan kodlanmayan RNA'ların (ncRNA) tanımlanmasıdır (71). Bu transkriptlerin daha önceleri genomda yazılımsal olarak sessiz olan bölgelerin protein kodlayan bölgelerde ve genomun diğer bölgelerinden transkripte oldukları bildirilmiştir (71).

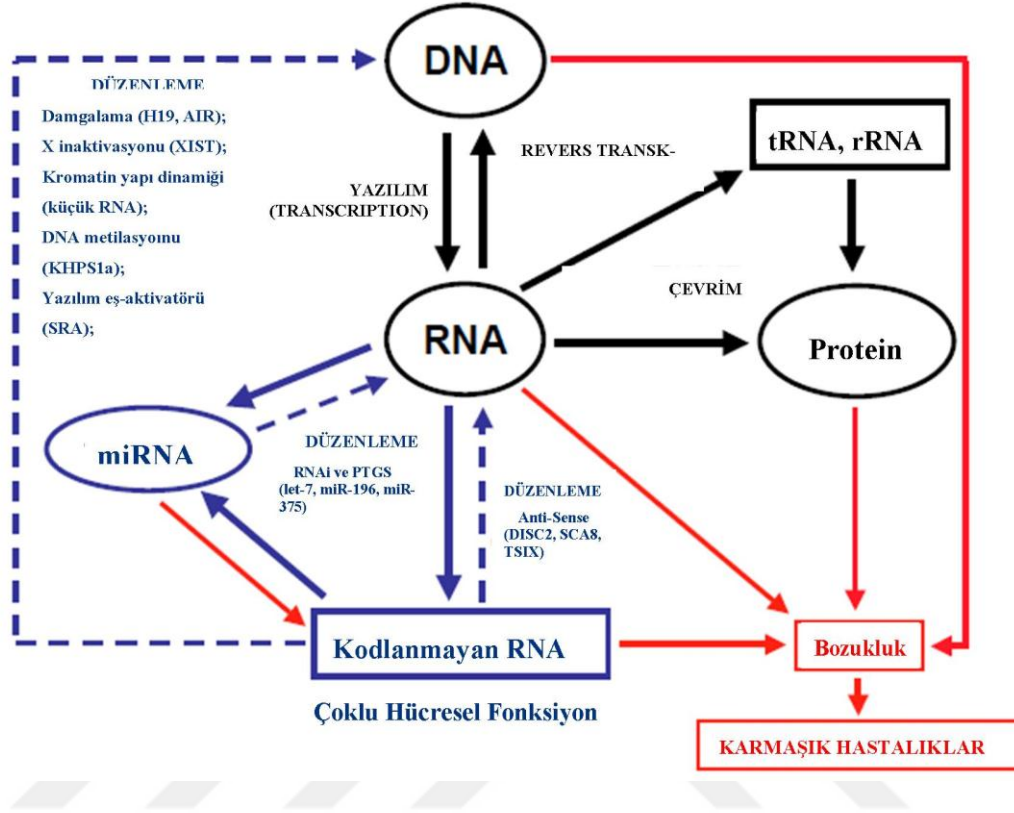
Yaklaşık yirmi yıl öncesine kadar, RNA çeşitleri tRNA, rRNA, snRNA gibi birkaç tane ile sınırlı ve bu RNA'ların proteinlerin işlenmesine ve sentezinde yardımcı olan elemanlar olarak bilinmekteydi. Günümüzde, RNA'lar artık, protein kodlayan RNA (mRNA) ve kodlanmayan RNA olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (4). Yapılan laboratuvar ve biyoinformatik çalışmalar ile ncRNA'ların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (72).

Daha önceleri yardımcı moleküller olarak bilinen ncRNA'ların, ökaryot hücrelerde moleküler mekanizmaların düzenlenmesinde kritik rollerinin olduğu gösterilmiştir. RNA molekülleri, karmaşık üçüncül yapıları nedeniyle proteinlerin seçkin bölgelerine bağlanarak onların düzenlenmesinde birçok rolleri olabilen çok yönlü moleküllerdir (3). Dahası, bu RNA molekülleri farklı proteinler ile ribokompleks oluşturarak ve özel DNA ve/veya RNA dizilimlerine bağlanarak birçok farklı moleküler yollarda gen ifadesinin düzenlenmesinde görev almaktadırlar (73).

Normal hücrelerde çeşitli fonksiyonları atfedilen ncRNA'ların, değişik ifade paternine sahip oldukları bildirilmiştir. İşlevsel bu RNA molekülleri birçok moleküler olaylarda etkin oldukları gösterilmiştir. Örneğin; X-etkisizleşmesi, kromatin yapının, genomik damgalanma ve DNA metilasyonu gibi birçok epigenetik olaylarda, embriyonik gelişim, yazılımsal ve yazılım sonrası gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli işlevlerinin olduğu bildirilmiştir (4, 5, 73).

Memeli hücrelerinde ilk tanımlanan lncRNA, genomik damgalanmada görevli olan H19 RNA genidir. Bunun takiben X kromozomu etkisizleştirilmesinde temel sorumlu olan XIST lncRNA genidir. Kısa ncRNA'lardan ise ilk keşfedilen lin-4 miRNA molekülüdür. Bu işlevsel moleküllerin keşfinden sonra, bu alanda yapılan çalışmalarda

ciddi bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu moleküllerin birçok hastalıkla ilişkilerinin olduğu gösterilmiştir (9, 74).

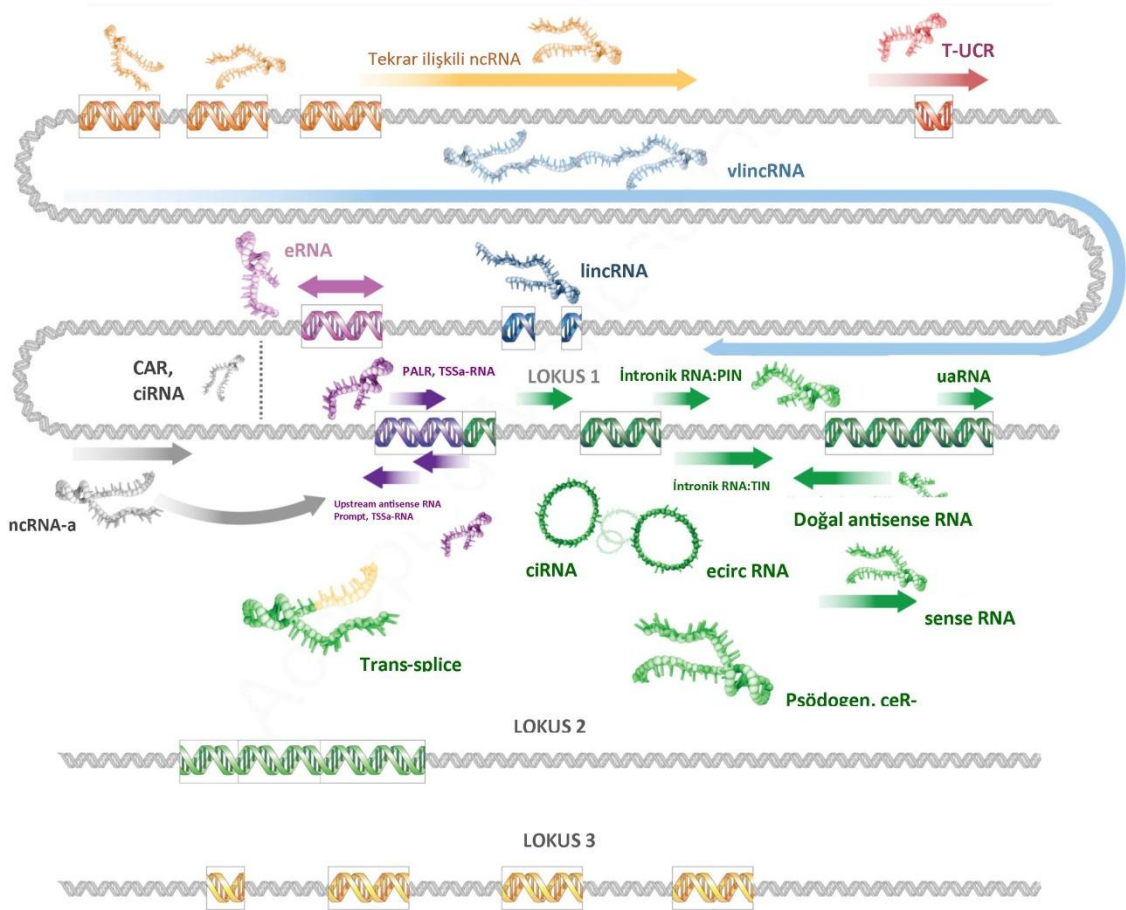


Şekil 2.8. Genom ve transkriptom analizler neticesinde, gelişmekte olan yeni moleküler yolağın şematik gösterimi. Ökaryot hücrelerde ncRNA'ların moleküler düzenlenme ve etkileşimlerdeki önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir. Bu moleküler model ncRNA'ların karmaşık hastalıklardaki ve moleküler bozukluklardaki önemini göstermektedir (5).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda çağımızın en sık karşılaşılan hastalıklarından biri olan ve nedeni halen tam olarak bilinmeyen kanserde bu transkriptlerin etkili olabileceğini düşündürmektedir. Araştırmacılar tarafından kodlanmayan RNA sınıfı, bu RNA'ların fonksiyonları, çeşitleri ve kanser türleri ile olan bağlantıları ilgi çekici bir konu olmuştur. Kodlanmayan RNA'ların tanımlanması ve işlevlerinin belirlenmesi ile önümüzdeki yıllarda gen düzenlenmesi, kromozom organizasyonu ve epigenetik mekanizmalar gibi birçok moleküler mekanizmalar aydınlatılabileceklerdir (Şekil 2.8) (75).

2.3.1. Kodlanmayan RNA'ların sınıflandırılması

Kodlanmayan RNA'lar bazı özelliklerine göre kendi içinde farklı gruplara ayrılmaktadırlar. NcRNA transkriptlerinin birçoğu genellikle birden çok kategoride yer alabilir, bu nedenle ncRNA sınıflarının net kategorizasyonu epeyce zordur (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Hipotetik 3 lokustaki çeşitli ncRNA sınıflarının gösterilmesi. Lokus 1'de protein kodlayan gen yeşil olarak, Lokus 3'te ise sarı olarak gösterilmiştir. Lokus 2'de psödogen kodlanmaktadır. Lokus 1'deki genin düzenleyici elemanları pembe (arttırıcı) ve mor (özendirici bölge) olarak gösterilmiştir (11).

Klasik olarak, kısa kodlanmayan RNA, <200 nt; uzun kodlanmayan RNA >200nt olarak uzunluklarına göre ayrılırlar. İşlevlerine göre; hücrede sürekli ifade edilen ribozomal RNA, taşıyıcı RNA gibi ncRNA'lar, mikroRNA (miRNA), uzun kodlanmayan RNA

(long non-coding RNA, lncRNA) gibi düzenleyici RNA'lar olarak sınıflandırılırlar. Hücre içindeki yerleşimlerine göre, küçük çekirdek RNA (small nuclear RNA, snRNA), küçük çekirdekçik RNA (small nucleolar RNA, snoRNA), sitoplazmada yerleşik piwi-etkileşimli RNA (cytoplasm-located piwi-interacting RNA, piRNA), küçük müdahaleci RNA (short interfering RNA, siRNA) gibi ncRNA sınıflarına ayrılır. Bunların yanı sıra diğer ncRNA sınıfları, özendirici bölge ilişkili RNA (promoter-associated RNA, PAR) ve arttırıcı RNA (enhancer RNA, eRNA) olarak da alt gruplara ayrılabilir (5, 7-13, 76). Bazı ncRNA'lar Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Uzunluklarına göre bazı ncRNA'ların sınıflandırılması (77, 78).

Sembol	ncRNA	İşlevleri
Kısa kodlanmayan RNA, <200 nt		
miRNA	Mikro RNA	Gen ifadesinin düzenlenmesinde
tRNA	Taşıyıcı RNA	Protein sentezinde
siRNA	Kısa müdahaleci RNA	Gen susturmada
snRNA	Küçük çekirdek RNA	Gen düzenlemesi gibi çeşitli süreçlerde
snoRNA	Küçük çekirdekçik RNA	RNA'nın çekirdekte modifikasyonunda görevlidir
rRNA	Ribosomal RNA (5S ve 5.8S)	Protein sentezinde
PASR	Özendirici bölge ilişkili küçük RNA	Modifiye 5' uçlar ve kısa keplenmiş transkriptlerden oluşur
YRNA	Y RNA	DNA tıpkıyapımında
piRNA	Piwi-etkileşimli RNA	Yazılımsal gen susturma ile ilişkilendirilmiştir.
Uzun kodlanmayan RNA, >200 nt		
lncRNA	Uzun kodlanmayan RNA	Gen ifadesinin düzenlenmesinde
rRNA	Ribosomal 18S ve 28S RNA	Protein sentezinde
aRNA	Antisense RNA	Gen ifadesinin düzenlenmesinde
PALR	Özendirici bölge ilişkili lncRNA	Gen ifadesinin düzenlenmesinde
lincRNA	Uzun intergenik ncRNA	Gen ifadesinin düzenlenmesinde
NAT	Doğal antisense RNA	Protein kodlayan genlerin düzenlenmesinde
T-UCR	Aşırı korunmuş bölgede transkripte olan ncRNA	
ceRNA	Yarışmalı endojen RNA	
ciRNAs	Halkasal intronik lncRNA	

NcRNA'ları, transkriptlerin boyutuna, hücresel ve genomik yerleşiminin yanı sıra işlevlerine göre de sınıflandırmak mümkündür (Tablo 2.2). ncRNA'lar protein kodlayan genler ile olan benzerliklerine, bu genler ile ilişkilerine, işlevi bilinen DNA elemanları ile ilişkilerine, çeşitli biyokimyasal yollardaki işlevlerine, hücre içi yapılanmalarına,

farklı biyolojik süreçlerdeki ifadelerine ve dizilim ve/veya yapı korunurluğuna göre de alt gruplara ayrılabilir (11).

Tablo 2.2. Bazı ölçütlere göre ncRNA sınıflandırılması (11).

Sınıf	Kısaltma	Özgül örnek
Transkriptin uzunluğuna göre sınıflandırma		
Uzun kodlanmayan RNA	lncRNA	
Uzun intergenik kodlanmayan RNA	lincRNA	ANRIL, H19, HOTAIR, XIST, lincRNA-p21
Çok uzun intergenik kodlanmayan RNA	vlincRNA	HELLP transkript, vlinc-21, vlinc-185
Makro RNA		Airn, KCNQOT1, Lncat
Özendirici bölge ilişkili uzun RNA	PALR	
Protein kodlayan genler ile ilişkilerine göre sınıflandırma		
İntronik RNA; kararlı intronik dizisi, tamamen intronik RNA, kısmen intronik RNA	sisRNA, TIN, PIN	
Halkasal intronik RNA	ciRNA	
Sense RNA		
Doğal antisense RNA	NAT	BACE1-AS, aHIF, Tsix, VIM-AS1, CDKN2B-AS1
Ayna antisense		Globin antisense
Ekzonik halkasal RNA	ecircRNA	cANRIL
Kimerik RNA, trans-splice RNA		
3'UTR'den yapılan bağımsız RNA	uaRNA	
Kromatin ilişkili RNA	ciRNA	
Yazılım başlama bölgesi ilişkili RNA	TSSa-RNA	
İşlevi bilinen diğer DNA elemanları ile ilişkilerine göre sınıflandırma		
Arttırıcı ilişkili RNA	eRNA	
Özendirici bölge ilişkili uzun RNA	PALR	
Upstream antisense RNA	uaRNA	
Özendirici bölge upstream transkriptler	PROMPT	
Telomerik tekrar içeren RNA	TERRA	
Protein kodlayan genlere benzerliklerine göre sınıflandırma		
mRNA benzeri kodlanmayan RNA	mincRNA	
Uzun intergenik kodlanmayan RNA	lincRNA	
Biyokimyasal yollardaki ilişkilerine göre sınıflandırma		
Nrd1-unterminated transcript	NUT	
miRNA öncül transkript		H19
piRNA öncül transkript		
Kriptik kararsız transkript	CUT	
Özendirici bölge upstream transkriptler	PROMPT	
Xrn1-sensitive unstable transcript	XUT	
Kararlı karakterize edilmemiş transkript	SUT	

Tablo 2.2. devamı. Bazı ölçütlere göre ncRNA sınıflandırılması (11).

Sınıf	Kısaltma	Özgül örnek
İşlevlerine göre sınıflandırma		
Arttırıcı benzeri işlev gösteren lncRNA miRNA öncül transkript piRNA öncül transkript	ncRNA-a	ncRNA-a7 H19
Yarışmalı endojen RNA	ceRNA	PTENP1, KRASP1
Dizilim ve yapı korunurluğuna göre sınıflandırma		
Aşırı korunmuş bölgede transkripte olan RNA	T-UCR	UCR106
Hipoksi ilişkili aşırı korunmuş bölgede transkripte olan RNA	HINCUT	
Uzun intergenik kodlanmayan RNA	lincRNA	HOTAIR, HOTTIP
Farklı biyolojik durumlarda ifade edilmelerine göre sınıflandırma		
Uzun stres ile uyarılan kodlanmayan transkript	LSINCT	
Hipoksi ilişkili aşırı korunmuş bölgede transkripte olan RNA	HINCUT	
Non-Annotated Stem Transcript	NAST	
Hücre içi yapılarına göre sınıflandırma		
Kromatin ilişkili RNA	CAR	
Kromatin bağlantılı RNA	ciRNA	
Nükleer cisimcikler ile ilişkili RNA		
PRC2 ilişkili RNA		

2.3.2. Kısa kodlanmayan RNA'lar

Kodlanmayan RNA'lar ilişkili yapılan çalışmaların giderek artmasıyla birçok ncRNA tanımlanmıştır ve bu moleküllerin işlevleri aydınlatılmaya devam etmektedir. NcRNA'ların büyük bir kısmı kısa düzenleyici RNA'lardan oluşmaktadır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde sorumlu olan bu kısa RNA molekülleri yazılım sonrası RNA susturumu veya RNA müdahalesi (RNAi, RNA interference) ile gen susturumunu sağlayan moleküllerdir (6). RNAi mekanizması önceleri hücrelerin yabancı elemanlara karşı bir savunma mekanizması olarak bilinmekteydi. Ancak, günümüzde gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apoptoz gibi önemli süreçlerin düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir (79).

Kısa kodlanmayan RNA molekülleri sentezlenirken, ncRNA'nın türüne göre başlangıç molekülü endojen ve ekzojen kaynaklı olabilir. İlk olarak çift zincirli RNA molekülleri oluşur. miRNA moleküllerinde ilk kesilim RNaz III grubu endonükleaz olan Drosha

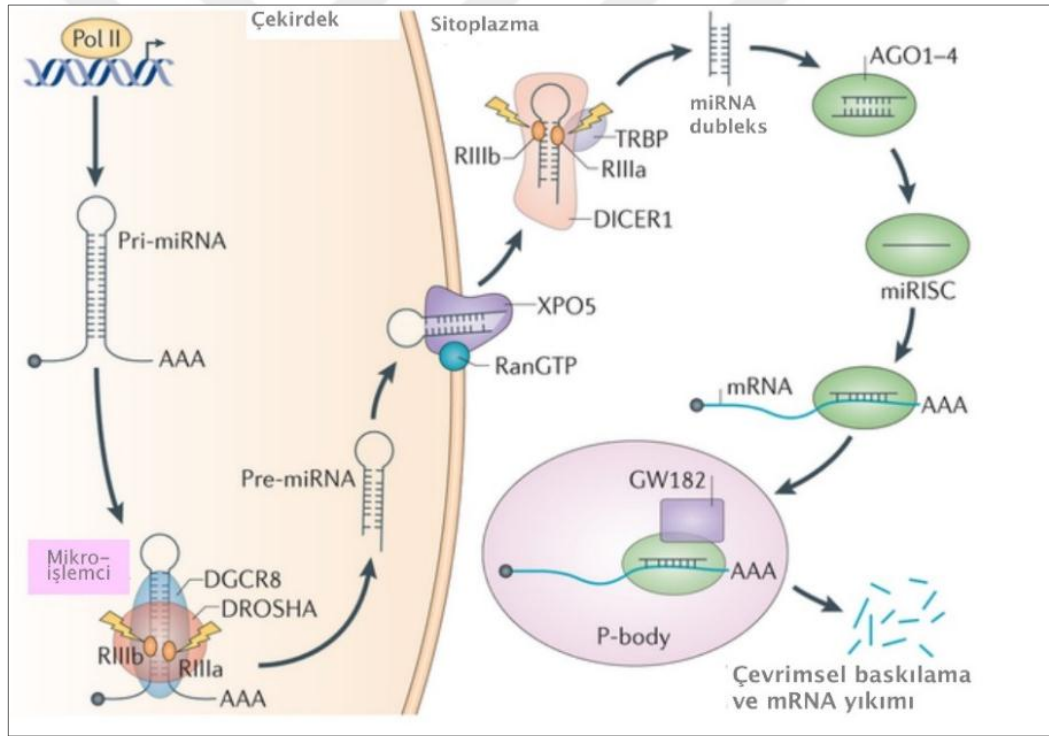
enzimi ile çekirdekte gerçekleştirilir ve daha sonra sitoplazmada RNaz III enzimi Dicer enzimi ile kesilim yapılır (80, 81). Kısa kodlanmayan RNA'lar Dicer enzimi ile kesilimine göre de ikiye ayrılır: Dicer bağımlı kesilim ve Dicer bağımsız kesilim. Dicer bağımlı kesilimde miRNA, siRNA ve bazı snoRNA molekülleri bulunurken, diğer grupta piRNA'lar bulunur (6, 82). Filogenetik analizler sonucunda Argonaute proteinleri ailesinin, Argonaute tabanlı AGO1 ve PIWI tabanlı PIWI alt gruplarından oluştuğu gösterilmiştir. Dahası, miRNA, siRNA molekülleri AGO etkileşimli olurken piRNA moleküllerinin ise PIWI proteinleri ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir (83).

2.3.2.1. Mikro RNA (miRNA)

MikroRNA'lar ilk olarak Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ta tanımlanmıştır ve ilk tanımlanan miRNA lin-4'tür (84). Küçük, protein kodlama kapasitesi olmayan bu moleküllerin gen ifadesini yazılım sonrası düzenleyici elemanlarından olduğu gösterilmiştir. MiRNA'ların keşfedildiklerinden bu yana birçok biyolojik süreçlerde etkin rol oynadıkları ispatlanmıştır ve bu düzenleyici moleküller birçok hastalığın patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (85, 86). Gen klonlama, yüksek teknoloji dizileme, mikrodizin ve RNA dizileme gibi yüksek teknoloji yöntemler ile birçok miRNA tanımlanmıştır ve bunların büyük bir kısmı kanser ile ilişkilendirilmiştir. İşlevsel miRNA genleri insan genomunun yaklaşık %1-2'lik kısmını oluşturmaktadır. Dahası, protein kodlayan genlerin neredeyse %50'sinin bu RNA molekülleri tarafından düzenlediği bildirilmiştir (85, 87). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, tanımlanan binlerce miRNA genlerinin en fazla 1. kromozomda yerleşik olduğu ve en az da Y kromozomunda olduğu gösterilmiştir (18).

MiRNA'lar ~22 nükleotid uzunluğunda olgun hale gelebilmek için hücre içerisinde bazı süreçlerden geçerler (85, 88, 89). İlk olarak, çekirdekte ilgili genomik bölgeden RNA Polimeraz II tarafından miRNA birincil transkripti (primary miRNA) oluşur (89). Yaklaşık 1 kb uzunluğunda olan bu birincil miRNA transkripti pri-miRNA olarak adlandırılmaktadır. Oluşan pri-miRNA'lar 5' uç 7 metil guanozin başlık, 3' poliadenozin kuyruk ile mRNA'lara benzerlik gösterirler. Pri-miRNA'nın saç tokası (hairpin) şeklindeki yapısı RNA'ya bağlanan bir protein olan DGCR8 (DiGeorge critical region 8) ile birlikte etki gösteren çift zincir RNA özgül ribonükleaz (Double

strand-RNA-spesific ribonuclease, RNaz III) olan Drosha ile çekirdekte ilk kesilime uğrar (90, 91). Bu kesilim sonrasında 70-100 nükleotid uzunluğunda öncül miRNA'lar (precursor miRNA, pre-miRNA) oluşur. Oluşan pre-miRNA'lar, çekirdek taşıyıcı karmaşımı olan Exportin-5-Ran GTP aracılığıyla sitoplazmaya taşınır (92). Sitoplazmaya taşınan bu öncü molekül ikinci bir kesilime uğrar. Sitoplazmadaki bu kesilim diğer bir RNaz III enzimi olan Dicer tarafından katalizlenir (87, 93). Dicer enzimi çift iplikli RNA'ya bağlanan bir protein olan TRBP (transactivating response RNA-binding protein) ile birlikte çalışır ve kesilim sonucunda yaklaşık 22 (17-24 nt) nükleotid uzunluğunda çift iplikli miRNA'lar elde edilir (94). Bazı termodinamik özelliklere göre çift iplikten birisi seçilerek Argonaute (AGO) proteini ve RISC (RNA-Induced Silencing Complex) karmaşımı ile birlikte hedef genin 3' UTR bölgesine tamamlayıcı olarak bağlanarak bu genin baskılanmasını sağlar (Şekil 2.10) (95).



Şekil 2.10. miRNA biyogenezinin şematik gösterimi. miRNA geninden RNA Pol II ile pri-miRNA sentezlenir. Saç tokası şeklindeki pri-miRNA Drosha, DGCR8 içeren mikroişlemci ile ilk kesilime uğrar, 70-100 nt uzunluğunda pre-miRNA oluşur. Pre-miRNA Exportin 5 ile sitoplazmaya taşınır ve Dicer enzimi ile ikinci kesilime uğrar. Oluşan miRNA ikilisinden (dublex) birisi seçilir ve AGO proteinleri ve RISC karmaşımı ile hedef gene kısmi tamamlayıcı olarak bağlanır ve çevrimin baskılanmasına veya mRNA yıkımına neden olur (95).

Olgun miRNA molekülleri 5' uçlarında bulunan 2. ve 7. nükleotidleri arasındaki altı nükleotidlik tamamlayıcı dizileri aracılığıyla hedef mRNA'ya bağlanır. Tamamlayıcı diziler içeren bu bölgeye “seed” denilmektedir ve bu bölgenin hedefi baskılamak için yeterli olduğu gösterilmiştir (96). Seed bölgesi, 4 farklı şekilde mRNA'ya tamamlayıcı olarak bağlanır (88, 96).

6 mer bölge: seed bölgesindeki 6 nükleotidlik eşleşme oluşur.

7 mer-A1 bölge: seed bölgesinde nükleotid eşleşmesi ve miRNA'nın ilk nükleotidinin karşısına Adenin gelmesi

7 mer-m8 bölge: seed bölgesindeki eşleşmeye ek olarak miRNA'nın 8. nükleotidinde eşleşme olması

8 mer bölge: seed bölgesindeki nükleotit eşleşmesi ile miRNA'nın 8. nükleotidinde eşleşme olması ve 1.nükleotitinin karşısına Adenin gelmesi

MiRNA'lar, çoğalma, hücre döngüsü, apoptoz, farklılaşma, göç ve istila gibi birçok biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. Kanserde miRNA molekülleri değişken ifade seviyesine sahip olabilirler. Hücre çoğalmasındaki rolü henüz aydınlatılan bu moleküllerin düzensiz ifade edilmesi ile bu yolların bozulmasına dolayısıyla kanser oluşumunda etkili oldukları birçok çalışmada gösterilmiştir (17, 97). Kanserde miRNA'lar, tümör dokularında düşük ifade edilen ve kanser oluşumunu engelleyen tümör baskılayıcı miRNA'lar (tsmiR) ve tümör dokularında aşırı ifade edilen onkogenik miRNA'lar (oncomiR) olmak üzere iki gruba ayrılır (98). Tablo 2.3'te kanser ilişkili bazı miRNA'lar ve bunların işlevleri gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Kanser gelişiminde bazı miRNA'ların işlevleri (99).

*TB: Tümör baskılayıcı, OG: Onkogen

mikroRNA	Genomik yerleşim	Kanserde ifade seviyesi	Deneyisel veri	İşlevleri*
miR-15a, miR-16-1	13q14	KLL'de düşük ifade	BCL2 düzenlenmesi	TB
Let-7a-2	11q24	Akciğer kanserinde düşük ifade	RAS düzenlenmesi	TB
miR-155	21q21	KLL, akciğer kanseri, meme kanseri, lenfoma da yüksek ifade	Pre-B lenfoma ve lösemiye tetikler	OG
miR-17-92 sınıfı	13q14	Lenfoma ve akciğer kanserinde yüksek ifade	c-MYC ile ilişkili	OG
miR-21	17q23	Pankreas, glioblastom ve meme kanserinde yüksek ifade	Glioblastomda anti-apoptotik etki	OG
miR-106a	Xq26	Akciğer, mide ve prostat kanserinde yüksek ifade	RB1'in baskılanması	OG
miR-372-373	19q13	Testis kanserinde yüksek ifade	P53 işlevinin nötralizasyonu	OG
miR-142	17q22	Lenfoma	MYC ifadesinin arttırılması	OG

MiRNA'lar ile ilişkili yapılan çalışmalar bir miRNA'nın bir mRNA'yı hedef alabileceği gibi birçok mRNA'yı hedef alabileceğini göstermektedir. Buradan yola çıkarak bir miRNA'nın çift yönlü işlevi olabileceği öne sürülmüştür. Bir tümör dokusunda yüksek ifade edilip tümör baskılayıcı bir geni düzenleyebilirken, başka bir dokuda düşük ifade edilip bir onkogenin pozitif yönde düzenlenmesine yardımcı olabilir.

2.3.2.2. Küçük Müdahaleci RNA (siRNA)

Memeli canlılar ve diğer canlılardaki gen susturma mekanizmasının başlangıcı genel anlamda benzerlik göstermektedir. Uzun dsRNA (sentetik dsRNA'lar ya da çekirdek kaynaklı pre-miRNA), kısa dsRNA parçalarına ayrılır ve sonrasında bu parçalar bir protein karmaşımı ile birlikte hedef mRNA'nın tanınip yıkılması için rehber dizilim olarak kullanılırlar (100, 101). Genel olarak gen susturma yollarının ortak özelliği dsRNA tarafından başlatılıp Dicer tarafından kesilime uğrayarak olgun küçük RNA molekülleri elde edilmesidir (6). Dicer endonükleaz enzimi, farklı kaynaklardan elde edilen siRNA'yı 21-25 nt uzunluğundaki siRNA ikilisine ayırır (100). Oluşan siRNA ikilileri RISC karmaşımı ile tanınır ve helikaz etkinliği ile çift iplikler ayrılır. İpliklerden birisi kılavuz görevi görür diğeri mRNA ile tamamlayıcı yapı oluşturarak hedef genin yıkılmasını sağlar (100-102).

Yapılan çalışmalar neticesinde, siRNA moleküllerinin kendilerine özgü 3' uçlarında iki nükleotidlik çıkıntılarının (overhang) olduğu, fosforillenmemiş hidroksil gruplarının bulunduğu ve bu özelliklerin yolaktaki diğer bileşenleri tanımda hayati role sahip olduğunu göstermiştir (103-105). Sentezlenen siRNA'nın hangi iplikçiğinin RISC karmaşımına ekleneceğini ve hangisinin yıkılacağını 5' uçlarının kararlılığı belirler. 5' ucta GC baz eşleşmesi ile başlayan iplikten ziyade AU baz eşleşmesi ile başlayan iplik tercih edilir. Daha az kararlı olan 5' uç RISC karmaşımı tarafından seçilir. Endojen ve ekzojen kaynaklı siRNA'lar ile yapılan çalışmalarda, işlevsel zincirin 5' uçtan sonra yaklaşık 9-14 nükleotidlik bölgenin daha az kararlı olduğu gösterilmiştir. Bu kararsızlık, zincirin helikaz tarafından birbirinden ayrılması için gerekli olduğunu ve süreci kolaylaştırdığı öne sürülmektedir (81, 104, 106).

2.3.2.3. Piwi-etkileşimli RNA (piRNA)

PiRNA'lar omurgalı canlılarda küçük kodlanmayan RNA sınıfının bir üyesidir (107). Bu küçük RNA molekülleri Argonaute protein ailesinin üyesi olan PIWI (P-element-induced wimpy testis) proteinleri ile ilişkilidir. Genellikle 25-33 nt uzunluğunda olan piRNA'lar spermatogenez sürecinde önemli roller üstlenmektedir. Ayrıca, piRNA moleküllerinin kanser biyolojisinde de etkili olduğu gösterilmiştir (108, 109). piRNA'ların oluşumu miRNA ve siRNA gibi diğer kısa ncRNA'lardan farklı olarak Dicer bağımsız mekanizma ile gerçekleşir (82, 110, 111). PiRNA'lar genomda transpozonlardan ve tekrarlayan dizi elementlerinden türerler. *Drosophila* yumurtalarında, piRNA'ların büyük bir çoğunluğu retrotranspozon dizilimlerine zengin olan perisentromerik ve telomerik kısımlardan türediği bildirilmiştir (112). Birçok piRNA retrotranspozon diziliminin antisense ipliğinden sentezlenir ve bu RNA'lar tercihen Piwi and Aubergine (Aub) proteinleri ile ilişkilidir. Diğer yandan sense iplikten sentezlenen piRNA'lar tercihen Argonaute 3 (Ago3) proteinleri ile ilişkilendirilmiştir (111, 112).

İnsan kanserlerinde piRNA'ların önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir ve birçok çalışmada piRNA'ların kanserde aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (113). Örneğin; piR-651'in mide ve kolon kanseri dokularında aşırı ifade edildiği bildirilmiştir (108). Berrak hücreli renal kanserde (Clear cell renal cell cancer, ccRCC) piR-57125 metastatik

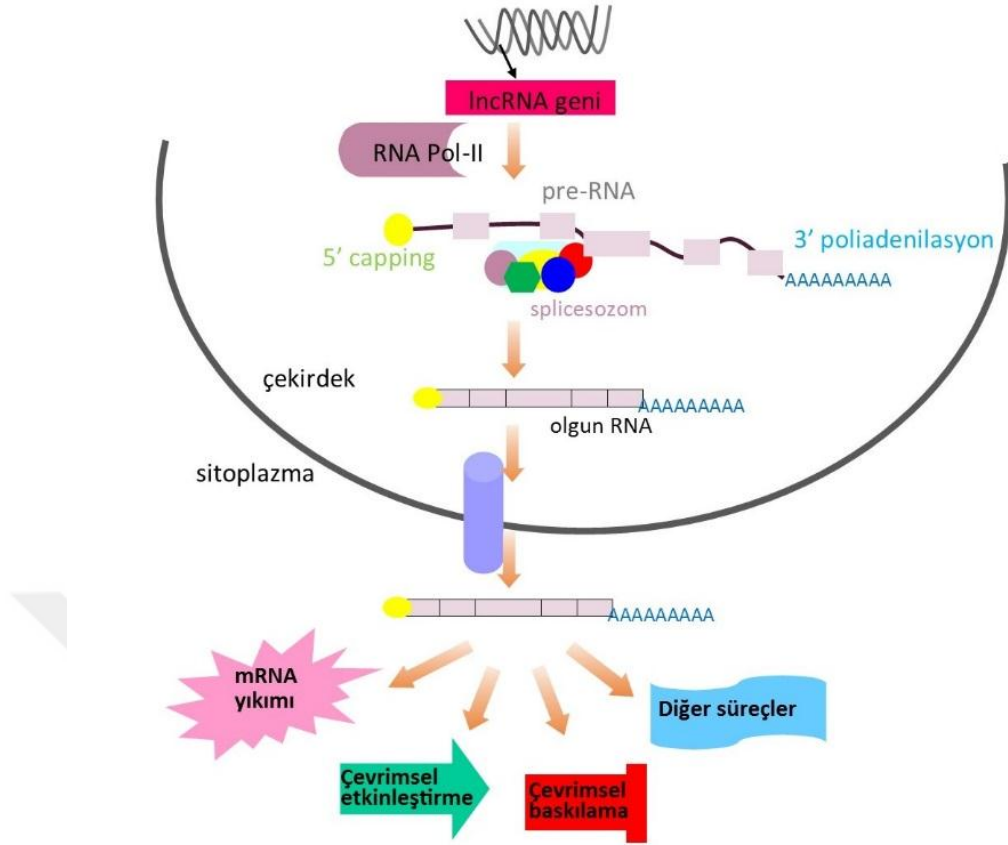
tümörlerde düşük ifade seviyesine sahip iken, piR-30924 ve piR-38756 ifade seviyeleri metastatik tümörlerde artmıştır (114). Kanseri ile ilişkilendirilmiş bazı piRNA'lar Tablo 2.4'te gösterilmiştir. PiRNA ve PIWI ailesi proteinleri, somatik kök hücre ve birçok kanser türü ile ilişkilendirilmiştir ve bu moleküllerin kanser gelişimini düzenleyici elemanlar olacağı öne sürülmektedir (115).

Tablo 2.4. Kanseri ile ilişkilendirilmiş piRNA molekülleri.

piRNA	Kanser türü	Kaynak
piR-823, piR-651	Mide kanseri	(108, 116)
piR-932	Meme kanseri	(117)
piR-52681, piR-60152 ve yaklaşık 197 tane piRNA, piRABC (piRNA DQ594040 associated with bladder cancer)	Mesane kanseri	(118)
piR-015551, piR-651	Kolon kanseri	(108, 119)
piR-30924, piR-30924, piR-38756	ccRCC	(114)

2.3.3. Uzun kodlanmayan RNA'lar

LncRNA'lar genel olarak 200 nükleotidden daha büyük olan RNA molekülleri olarak tanımlanmaktadır. LncRNA'ların büyük bir kısmı RNA polimeraz II tarafından sentezlenir poliadenilasyona uğrar. Ayrıca, lncRNA'lar ekzon ve intron içerebilirler ve splicing mekanizması ile alternatif kesilime uğrayabilirler. Ancak, tek ekzon olarak sentezlenen lncRNA'lar da mevcuttur. Bunun yanı sıra protein kodlayan transkriptler gibi 5' başlık modifikasyonları da bulunabilmektedir. Daha sonra transport proteinleri ile sitoplazmaya taşınabilirler (Şekil 2.11). Bu uzun kodlanmayan RNA transkriptleri hücresel işlevlerine göre çekirdekte veya sitoplazmada yerleşik olabilmektedir (10, 19).



Şekil 2.11. LncRNA'ların hücre içerisindeki oluşum mekanizmasına genel bir bakış. Genel olarak lncRNA molekülleri RNA Pol II tarafından yazılıma uğrar. mRNA'lar gibi çekirdekte 5' başlık, 3' poliadenilasyon ve kesilime uğrayabilmektedirler. Sitoplazmaya taşınarak birçok durumda etkin rol oynayabilirler.

Bununla beraber, lncRNA'ların birçok türleri bulunabilir: boyutları küçük olabileceği gibi yüzlerce kilobaz uzunluğunda olabilirler, splice veya unsplice türleri bulunabilir, lineer veya üçüncül yapıda olabilirler ve DNA, protein ve diğer RNA molekülleri ile etkileşimde olup onların düzenlenmesinde rol oynayabilirler (120). Ayrıca, lncRNA'lar gen ifadesinin düzenlenmesi, kromatin modifikasyonlarının düzenlenmesi, mRNA çevriminin düzenlenmesi ve protein işlevlerinin düzenlenmesi gibi birçok yönden etki etmektedir (9). Böylelikle, lncRNA'lar protein kodlayan genler gibi kanserde tümör baskılayıcı, onkogenik ve çift yönlü işlevlere (dual function) sahip olabilirler. Yapılan çalışmalar, lncRNA'ların işlevsel moleküller olduğu ve bunun yazılımsal bir seçim olabileceğini göstermiştir (12).

Tablo 2.5. Kanserde onkogenik özellik gösteren bazı lncRNA'ların gösterilmesi (8).

OncoLnc	Genomik yerleşim	lncRNA türü	OncoLnc	Genomik yerleşim	lncRNA türü
MALAT1	11q13.1	lncRNA	ANRIL	9p21.3	NAT, asRNA
CCAT1	8q24.21	lncRNA	SUMO1P3		Psödogen
CCAT2	8q24.21	lncRNA	ncRAN	17q25.1	lncRNA
CCAT1-L	8q.24	lncRNA	SchLAP1	2q31.3	lincRNA
HOTAIR	12q13.13	lincRNA, asRNA	PCAT1	8q24.21	lncRNA
HOTTIP	7p15.2	NAT, asRNA	PCAT5	10p11.21	lincRNA
H19	11p15.5	miRNA öncül transkript	PCA3	9q21.2	Overlap lncRNA
CAHM	Chr:6	lncRNA	PCGEM-1	2q32	lincRNA
XIST	Xq13.2	lncRNA	CTBP1-AS	4p16.3	asRNA
TUG1	22q12.2	lncRNA	HULC	6p24.3	lncRNA
CNDRE	16q12.2	lncRNA	HNF1A-AS	12q24.31	asRNA
UCA1	19p13.12	lncRNA	AFAP1-AS1	4p16.1	asRNA
LncRNA-ATB		lncRNA	LINC01207	4q32	lincRNA
LincRN-RoR	18q21.31	lincRNA	SOX2OT	3q26.33	Overlap lncRNA
Loc554202	9p21.3	miRNA öncül transkript	LINC00635	3q13.12	lincRNA
LINC00472	6q13	lincRNA	HIF1A-AS1	14q23.2	NAT, asRNA
BCAR4	16p13.13	NAT, asRNA	DLX6-AS1	7q21.3	NAT, asRNA
SPRY4-IT1	5q31.3	lncRNA	RGMB-AS1	5q21.1	NAT, asRNA
LSINCT5	5p15.33	lncRNA	LINC01133	1q23.2	lincRNA
GHE1	7q36.1	lncRNA	AK001796	2q13	miRNA öncül transkript
MALAT2		lncRNA	BCYRN1	2p21	lincRNA
PVT1	8q24	lncRNA	SNHG1	11q12.3	snoRNA öncül transkript
SCAL1	5q14.3	lincRNA	DANCR	4q12	lncRNA
ZFAS1	20q13.13	NAT, asRNA	OR3A4	17p13.3	Psödogen
PANDAR	6p21.2	NAT, asRNA	GAS5	1q25	snoRNA konak geni

Yapılan çalışmalar sonucunda lncRNA'ların hücrel birçok olayda yer aldığı gösterilmiş ve bu transkriptlerin değişik ifadenmesi kanserin de içinde bulunduğu birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (12). lncRNA'ların değışken ifade göstermesi tümör baskılayıcı ve/veya onkogenelere etki ederek birçok kanser türünün gelişimde rol oynadıkları gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, kanserde bazı lncRNA'lar onkogenik (OncoLnc) özellik gösterirken bazıları ise tümör baskılayıcı özellik gösterebilmektedir (Tablo 2.5). Örneğin; GAS5 (20), LOC285194 (21) gibi lncRNA moleküllerinin tümör baskılayıcı özellikleri bulunurken, HOTAIR (22, 23), CCAT1 (24, 25), MALAT1 (26,

27) gibi lncRNA'ların ise onkogenik özellik taşıdıkları bulunmuştur. Ayrıca, lncRNA molekülleri bazı tümör dokularında anormal ifade şekli gösterirken bazı insan dokusu ve kanser hücre hatlarında değişik ifade gösterdiği bulunmuştur (121).

lncRNA'ların, kanser gelişimi, metastaz, istila, göç gibi birçok kanser sürecinde etkin rol oynadıkları gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, lncRNA'ların düzensiz ifadesinin kanser hücrelerinin büyümesine katkı sağladığını göstermiştir. Örneğin; prostat kanserinde çok yüksek derecede ifade edilen PCAT-1 lncRNA'sının hücre çoğalmasını uyaran bir molekül olduğu bulunmuştur (122). Buna ek olarak prostat kanserine özgül olan ve aşırı ifade seviyesi gösteren PCGEM-1'in de hücre çoğalmasını uyardığı bildirilmiştir (123, 124). HOTAIR, MALAT1, ncRAN ve CCAT1 gibi lncRNA molekülleri de kanser hücrelerinin de çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir. Bunun aksine, 1q25 kromozomal bölgeden kodlanan 630 nt uzunluğundaki GAS5 (Growth arrest specific transcript 5), büyüme faktörlerinin yokluğunda ve açlık durumunda yüksek ifade seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bu lncRNA'nın bazı kanser türlerinde düşük ifade gösterdiği ve tümör baskılayıcı bir molekül olduğu bulunmuştur. Dahası, GAS5'in aşırı ifadesi apoptozu teşvik ettiği ve hücre döngüsünü yavaşlattığı gösterilmiştir (125, 126).

Yakın tarihe kadar, bazı lncRNA moleküllerinin metastaz ve istila gibi kanser süreçlerinde rol aldığı bildirilmiştir. Bunun en iyi tanımlanmış örneği, MALAT1'dir. MALAT1, çekirdekteki beneklerde (nuclear speckles) ve çekirdek içinde yerleşik olan öncül-mRNA moleküllerinin splicing mekanizmasında önemli düzenleyici rollerinin olduğu bildirilmiştir (127). MALAT1'in, birçok kanser türünde düzensiz ifade edildiği gösterilmiştir. Örneğin, MALAT1 kolorektal kanserinde hücre çoğalmasını, göçü ve istilayı teşvik ettiği ve bu lncRNA'nın susturulmasının tümör büyümesini ve metastazı baskıladığı bulunmuştur (26, 127, 128).

İstila ve metastaz ile ilişkilendirilmiş diğer bir lncRNA ise HOTAIR'dır. HOTAIR, HOXC gen sınıfından kodlanan bir ncRNA transkriptidir. HOTAIR, HOXD bölgesinde PRC2 ile etkileşerek yaklaşık 40 kb'lık bölgenin susturulmasından sorumludur. Aynı zamanda LSD1/CoREST/REST histon düzenleyici karmaşım ile etkileşimde olduğu bulunmuştur ve böylelikle lncRNA'ların iskele (scaffold) görevi yaptıkları ortaya

çıkıştır (129, 130). Örneğin, kolon kanseri hücre hatlarında yüksek HOTAIR ifade seviyesi, tümör istilası, lenf nodu metastazı, histolojik farklılaşma ve ileri tümör evresi ile ilişkilendirilmiştir (22). Buna ek olarak EMT ile ilişkilendirilmiş 8q24 bölgesinde yerleşik olan, 2600 nt uzunluğunda CCAT1 (Colorectal Cancer Associated Transcript 1) lncRNA molekülü belirlenmiştir. Bu lncRNA molekülü istila ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir (25). Tablo 2.6'da farklı kanser türleri ile ilişkilendirilmiş lncRNA'lar ve bu moleküllerin işlevleri gösterilmiştir.

LncRNA'ların büyük bir kısmı hücre çekirdeğinde yerleşiktir. Çekirdekte bulunan lncRNA'lar kromatin yeniden düzenlenmesi, mRNA kararlılığı, splicing, poliadenilasyon ve 5' başlık gibi yazılım sonrası süreçlerde protein kodlayan genlere etki edebilirler (131). Ayrıca, çekirdek içerisindeki cisimciklerde bazı lncRNA molekülleri yerleşik olabilmektedir. Örneğin; çekirdek paraspeckles'larda yerleşik olarak bulunan NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) gen ifadesinin düzenlenmesinde görev yapmaktadır. Dahası, NEAT1 ifadesi kolorektal kanserli hastalarda tümör farklılaşması, istila, metastaz ve TNM evleri ile ilişkilendirilmiştir (132). Diğer bir örnekte, birçok insan dokusunda ifade edilen 53-61 nt uzunluğunda tRNA-benzeri küçük sitoplazmik RNA'nın öncüsü olan MALAT1 verilebilir. MALAT1 yazılımı yapıldıktan sonra, RNAas P ile veya poliadenilasyon ile kesilime uğrar. Poliadenilasyon sinyali ile kesilime uğramış MALAT1 transkripti yaklaşık 7 kb uzunluğundadır ve bu türü çekirdekte düşük ifadelanmaktadır. RNase P ile kesilen türünde ise, 3' uç ~6.7 kb MALAT1 transkripti ve 5' uç mascRNA (MALAT1-associated small cytoplasmic RNA) transkripti oluşur. Oluşan mascRNA sitoplazmaya salınır, ~6.7 kb MALAT1 transkripti ise çekirdek speckles'lara salınır (133).

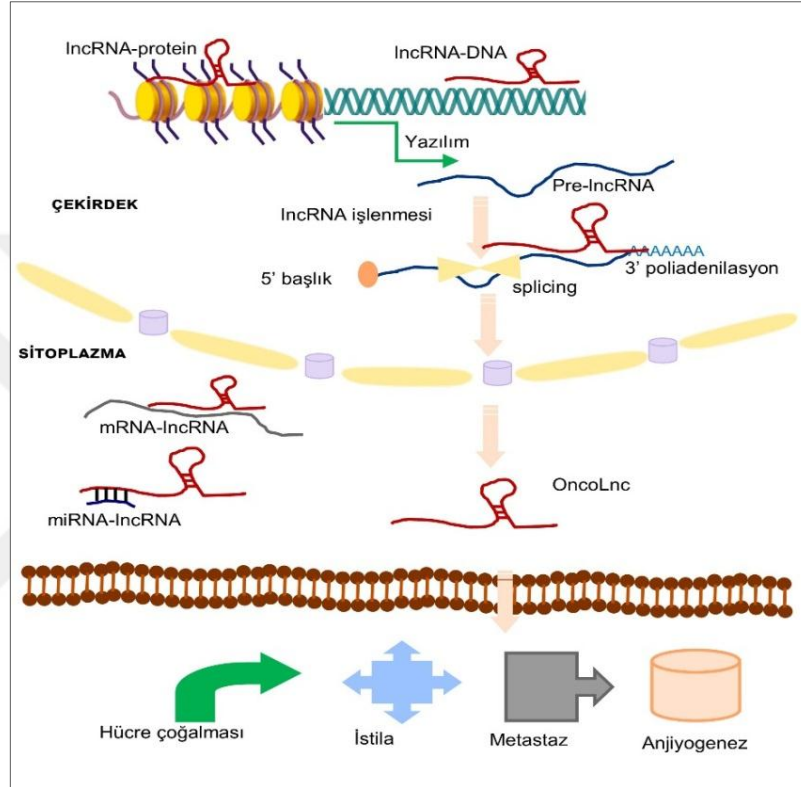
LncRNA'lar, DNA, protein ve diğer RNA molekülleri ile etkileşimde olabilirler (Şekil 2.12). LncRNA'lar histon düzenleyici karmaşık elemanları ile birleşerek DNA üzerine etki edebilmektedirler. Örneğin; HOTAIR transkripti dsDNA bölgelerinde hedef gen bölgesinin yerine geçerek H3K27 metilasyonu aracılığı ile hedef genin baskılanmasına neden olur. Bunun yanı sıra DNA ile etkileşimli olan lncRNA'lar, yazılım etmenlerini etkinleştirerek, genlerin özendirici bölgelerindeki metilasyonu engelleyerek (demetilasyon) ve yazılım etmenlerini baskılayarak mRNA yazılımına etki edebilirler (134-136).

Tablo 2.6. Bazı lncRNA'ların kanserdeki işlevlerinin gösterilmesi (8).

lncRNA	Kanserdeki işlevi	Kanser türü
MALAT1	MALAT1 birçok kanser türünde aşırı ifade olan bir onkogenik lncRNA'dır. Kanser hücrelerinde metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanı sıra tümör büyümesi, hücre çoğalması gibi kanser süreçleri ile de ilişkilidir.	Kolon, meme, mide, karaciğer, akciğer, prostat, böbrek, mesane, rahim kanseri, osteosarkom
CCAT1	CCAT1 geni 8q24 bölgesinde "genomic desert" kodlanan ve başta kolorektal kanser olmak üzere birçok kanser türü ilişkilendirilmiştir.	Kolon, meme, mide, karaciğer, safra kesesi kanseri
CCAT2	MYC ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, WNT uyarı ileti yolağında etkin rolü vardır ve CCAT2 ifadesi bazı kanser türlerinde yüksek risk faktörüdür.	Kolon, meme, mide, karaciğer, akciğer kanseri
ANRIL	Çeşitli insan tümörlerinde ANRIL seviyesi yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca yüksek ANRIL ifadesi, kanser hücre çoğalması, istila, göç ve apoptoz ile ilişkilendirilmiştir.	Kolon, mesane, rahim, karaciğer, safra kesesi, akciğer kanseri
HOTAIR	HOTAIR çeşitli kanser türleri için prognostik belirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.	Meme, mide, karaciğer, kolon, safra kesesi, pankreas, akciğer kanseri
HOTTIP	HOTTIP, HOXA sınıfının 5' ucunda yerleşik bir lncRNA molekülüdür. HOTTIP birçok kanser türünde yüksek ifade seviyesinde olduğu bulunmuştur.	Kolon, akciğer, pankreas, karaciğer kanseri, osteosarkom
H19	H19 genomik damgalanma ile ilişkilendirilmiş ilk ncRNA'dır. Embriyonik gelişimde maternal allelden yazılır. H19'un tümör gelişiminde önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir.	Kolorektal, mide, akciğer, özofagus kanseri
NcRAN	Birçok kanser çeşidinde yüksek ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur.	Kolorektal, mesane kanseri, nöroblastoma
UCA1	İlk olarak mesane hücrelerinde tanımlanmıştır ve hücre çoğalması, apoptoz, metastaz ve istila gibi kanser süreçlerinde etkili olduğu gösterilmiştir.	Mesane, mide, meme, rahim, kolon, akciğer kanseri, melanoma
PVT1	PVT1 birçok kanserli dokuda yüksek ifade edildiği bulunmuştur ve hücre çoğalması ile ilişkilendirilmiştir.	Mide, yumurtalık, meme, akciğer, karaciğer, pankreas, tiroid kanseri
PCAT-1	Prostat kanseri ve birçok kanser türünde hücre çoğalmasını teşvik ettiği gösterilmiştir.	Prostat, kolorektal, akciğer, karaciğer kanseri
PCA3	Prostat kanserinde sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, prostat kanseri teşhis ve tedavisinde kullanılmaktadır.	Prostat kanseri
HULC	HULC aşırı ifadelmesi, hücre çoğalmasını ve tümör büyümesini arttırmaktadır. Ayrıca, birçok tümörde uzak metastaz, sağkalım ve tümör büyüklüğü gibi klinik bulgular ile ilişkilendirilmiştir.	Karaciğer, pankreas, mide kanseri, osteosarkom

Ayrıca, lncRNA molekülleri, diğer RNA molekülleri ile etkileşime girebilirler. Protein kodlayan genlerin antisense sarmalından transkripte edilerek (natural antisense

transcript, NAT) ilgili genin düzenlenmesinde rol oynarlar (14, 15). Buna ek olarak, bazı lncRNA molekülleri miRNA (H19, ANRIL, Loc554202, AK001796), snoRNA (SNHG1) gibi küçük ncRNA'ların öncül transkripti olabilirler (137-140). Proteinler ile etkileşime girerek o proteinin düzenlenmesinde görev alabilen lncRNA'lar da mevcuttur. Örneğin, MYC geninin düzenlenmesinde CCAT1, CCAT2, CCAT1-L, PCAT1 ve PVT1 lncRNA molekülleri rol oynamaktadır (141-143).



Şekil 2.12. LncRNA moleküllerinin DNA-Protein-RNA ile etkileşimde olarak bazı kanser süreçlerine etkileri gösterilmiştir (8).

2.3.3.1. Aşırı korunmuş bölge transkriptleri (T-UCR)

Aşırı korunmuş bölgeler (ultra conserved regions, UCRs) 200 nt'den uzun ve 481 segmentten oluşan ve insan, sıçan ve fare genomunda neredeyse %100 korunmuş bölgelerdir (144). UCR'lar genomda hem içte (intragenik) hemde genler arasında (intergenik) bölgelerde bulunabilir. T-UCR'lerin sınıflandırılması yapılırken ncRNA'lar gibi net bir kategorizasyon yapılamamaktadır. Ancak, intergenik, intronik, ekzonik,

kısmi ekzonik ve ekzon-içeren transkript olmak üzere 5 farklı alt grupta değerlendirilebilir (145). UCR transkriptlerinin ifade şekli dokuya özgül veya yaygın olabilmektedir. Yapılan çalışmalar, T-UCR'lerin bazı kanser tiplerinde farklı ifade edildikleri bildirilmiştir. Kanserde T-UCR'lerin ifadesinin düzenlenmesi iki yolla olmaktadır. Birincisi, T-UCR'ler miRNA'lar etkileşime geçerler ve T-UCR:miRNA çifti oluşturabilirler. İkincisi ise, özendirici bölgedeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu ile olur. Bazı T-UCR transkriptlerinin kendi genlerinin özendirici bölgesindeki CpG adacıkları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (146, 147).

Calin ve arkadaşları (146), kolorektal kanserli hastalarda 61 tane UCR transkriptinin farklı ifade şekline sahip olduğu göstermiştir. Bu T-UCR'lerden 2 tanesi düşük ifade gösterirken 59 tanesinin yüksek ifade seviyesinde olduğu bulunmuştur. Ayrıca, yerleşim tipine göre olası ekzonik bölgede, uc.73, uc.111, uc.134, uc.230 ve uc.339 transkriptlerinin kolorektal kanserli dokularda yüksek seviyede olduğu bulunmuştur. Bununla beraber, ekzonik bölgede; uc.292, uc.341, uc.420 transkriptleri ve ekzonik bölge dışındaki (non-exonic) bölgede, uc.112, uc.206, uc.388 ve uc.399 transkriptlerinin de yüksek seviyede olduğu bulunmuştur.

Hipoksik koşullar altında hücrelerde, anjiyogenez, istila, metastaz ve sağkalım yollarını düzenleyen genler karmaşık bir süreçte tabi tutulurlar. Hipoksi koşullarında değişken ifadelen T-UCR'lere HINCUT (hypoxia-induced noncoding ultraconserved transcripts) denilmektedir. Hipoksi ile uyarılmış uc.63, uc.73, uc.106, uc.134 ve uc.475 gibi T-UCR transkriptleri birçok kanser hücresinde tanımlanmıştır. Bu transkriptlerden uc.475 (HINCUT-1) konak protein kodlayan geninin (O-linked N-acetylglucosamine transferase) intronik bölgesinden sentezlenmiştir. Bu gen epitel kaynaklı kanser türlerinde aşırı ifade göstermektedir ve uygun hipoksi koşullarında hücre çoğalmasını desteklediği bulunmuştur (148).

2.3.3.2. Yarışmalı endojen RNA (ceRNA)

MiRNA'lar hedef geni baskılamak için hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesinde miRNA sorumlu elementlere (MREs, miRNA response elements) bağlanır ve böylelikle hedef genin baskılanmasına neden olur (88). Bazı araştırmacılar, RNA moleküllerinin kendi aralarında etkileşimde olduğunu ve bu iletişimi de "miRNA-aracılı dil, (miRNA-

mediated language)” ile kurduklarını savunmaktadırlar (149). Hedef genin 3’UTR bölgesinde bulunan MRE’ler miRNA havuzundan bazı miRNA’ların bu bölgelere bağlanarak hedefin düzenlenmesini sağlamaktadırlar. mRNA ifadesinin artması MRE’lerin artmasını sağlayarak hedef olabilecek miRNA’ların da artmasına olanak tanıyacaktır. RNA moleküllerinin içinde bulunduğu bu süreç yarışmalı endojen RNA (competitive endogenous RNAs, ceRNAs) olarak bilinmektedir (76, 150).

İlk tanımlanan lncRNA molekülü olan HULC (highly up-regulated in liver cancer) lncRNA’sının ceRNA aracılı miR-372’yi baskıladığı bulunmuştur ve PRKACB’nin çevrimsel baskılanmasına neden olduğu gösterilmiştir (151). Tay ve arkadaşları (152), bazı protein kodlayan genlerin miRNA bağımlı bir biçimde PTEN ifade seviyesini düzenlediğini göstermişlerdir. Dahası psödogen olan PTENP1’in de aynı miRNA moleküllerine bağlandığı bildirilmiştir. Bununla beraber, IGF1R, ROCK2 ve RAP1B gibi onkogenik proteinlerin miR-139-5p’nin direk hedefi olduğu ve hücre çoğalmasını düzenlediği bildirilmiştir (153).

2.3.3.3. Halkasal intronik RNA (circRNA)

CircRNA’lar önceleri RNA splicing hatası olarak düşünülmekteydi. Ancak, geliştirilen yüksek ölçekli dizileme teknolojileri ve biyoinformatik teknikler kullanılarak elde edilen verilerde bu moleküllerin düzenleyici moleküller olduğu tanımlanmıştır. CircRNA’lar bir tür düzenleyici ncRNA türüdür ve 3’ kuyruk ve 5’ baş bölgesi kovalent bağ ile bağlanmıştır ve halkasal yapı şeklini almıştır (154). Daha önceleri yapılan çalışmalarda circRNA’ların alternatif splicing düzenlenmesinde veya yazılımda önemli rollerinin olabileceği öne sürülmüştür (155). circRNA’lar esas olarak protein kodlayan genlerin ekzonik bölgelerinden kodlanırlar. Ancak, bu ncRNA’lar intronik, intergenik, UTR-bölgesi ve bilinen transkriptlerin antisense sarmalından da transkripte edilebilirler (156). Ayrıca, düzenleyici ncRNA sınıfı olan circRNA’lar miRNA’lar ile de etkileşime girerek miRNA’nın hedef genini düzenlemesinde yardımcı olabilirler (156).

Yapılan çalışmalarda circRNA’lar bazı hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Burd ve arkadaşları (157), INK4A-ARF bölgesinin antisense sarmalından kodlanan bir halkasal antisense ncRNA (cANRIL) tanımlamışlardır. Buna ek olarak, hsa-circ-002059’in mide kanserinde düşük ifade edildiği bulunmuştur ve mide kanseri teşhisinde yeni bir

biyobelirteç olabileceği savunulmuştur (158). Diğer bir çalışmada ise, hsa_circ_0001649'un karaciğer kanserinde anlamlı bir şekilde düşük ifade edilmekte olduğu bulunmuştur ve bu düşük ifade seviyesinin tümör boyutu ile anlamlı bir ilişim göstermekte olduğu bildirilmiştir (159). Kolorektal kanseri dokularında, halkasal RNA'ların lineer olanlara oranı normal dokulardakine kıyasla düşük bulunmuştur (160).

2.3.3.4. Doğal antisense transkript (NAT)

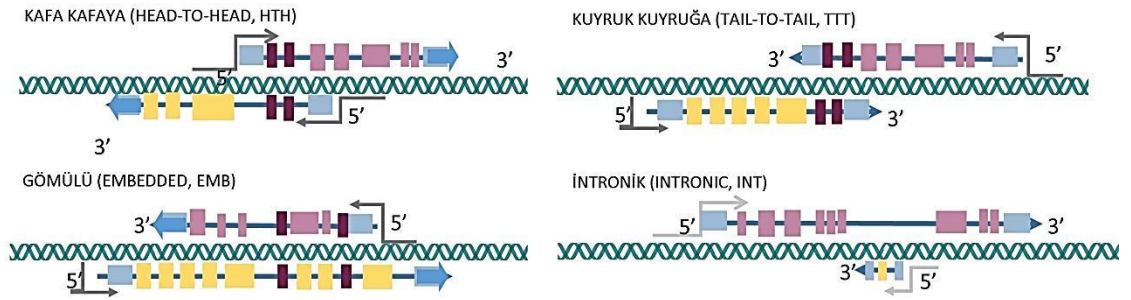
Doğal antisense transkriptler (NAT), diğer transkriptler ile tamamlayıcı diziler içeren endojen RNA molekülleridir. NAT'lar *cis*-NAT ve *trans*-NAT olmak üzere kendi içinde iki alt gruba ayrılır. Cis-NAT, aynı genomik bölgede kodlanan transkriptin karşı sarmalından transkripte edilir ve cis-NAT çiftleri tam bir tamamlayıcılık (üst üste gelen bölgeler içerir) gösterirler. Trans-NAT'lar ise, farklı genomik bölgelerden transkripte edilirler ve eksik uyum gösterirler. Ancak, trans-NAT'lar karmaşık düzenleme ağındaki birçok sense transkripti hedefleyebilir (161, 162). Cis-NAT'lar ilk olarak 1976 yılında virüslerde keşfedilmiştir. Ardından prokaryotlarda ve 1997 yılında ökaryot canlılarda tanımlanmıştır (163). Birçok ökaryot canlılardaki NAT transkriptleri Tablo 2.7'de gösterilmiştir.

NAT'lar genomdaki yerleşimine ve diğer transkriptle üst üste gelme (overlap) derecesine göre alt gruplara ayrılır (Şekil 2.13). 5' uç kısmında örtüşen bölgeler içeren NAT'lar HTH (head-to-head), 3' uç kısmında örtüşen bölgeler içeren NAT'lar TTT (tail-to-tail), bir transkriptin tamamen diğerinin içerisinde olan gömülü -EMB- NAT'lar (embedded) olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar (161). Ancak diğer bir araştırmaya göre, intronik bölgede olan NAT'ların da bu sınıfa dâhil edildiği savunulmuştur (7). Neredeyse tüm genom-çapı çalışmalarında TTT transkriptlerin en yaygın NAT'lar olduğu gösterilmiştir.

Tablo 2.7. Birçok ökaryot türlerinde genom çapında doğal antisense transkriptleri (161).

Tür	Üst üste gelen transkript	Toplam transkript	Yüzde (%)
İnsan	5880	26741	22
Fare	12519	43553	29
Sıçan	548	11332	5
Tavuk	356	7390	5
<i>Drosophila</i>	2054	13379	15
<i>Arabidopsis</i>	2680	29993	9
Nematode	76	14406	0.5
Maya	610	7598	8

NAT'ların, hedeflediği genleri, yazılım, mRNA işlenmesi, splicing, kararlılık, hücresel taşıma ve proteine çevrim gibi birçok düzeyde düzenleyebildiği öne sürülmüştür. Örneğin; X kromozomu etkisizleşmesinden sorumlu olan Xist lncRNA molekülü diğer bir lncRNA molekülü olan Xist'in karşı sarmalından transkripte edilen Tsix tarafından düzenlenmektedir.



Şekil 2.13. Doğal antisense transkriptlerin genomik yerleşimi. Protein kodlayan genlerin 5' ucu ile örtüşen bölgeler içeren HTH transkripti, 3' ucu ile örtüşen bölgeler içeren TTT transkripti, gömülü EMB transkripti ve intronik INT transkript.

Sense-antisense seviyelerinin hem pozitif hem negatif ilgileşim göstermesi, bunların etki mekanizmalarının farklı olabileceğini düşündürmektedir. NAT'ların etki mekanizmaları tam anlamıyla açık olmasa da bazı mekanizmalar ile hedefi düzenlediği ortaya atılmıştır (Tablo 2.8). Bu düzenleme mekanizmaları, yazılımsal müdahale, RNA maskelenmesi, çift-zincir RNA bağımlı mekanizmalar ve kromatin yeniden şekillendirilmesi şeklinde sıralanabilir. Her mekanizmadaki sense ve antisense ifade

modeli ilişkileri farklılık göstermektedir. Bazı mekanizmalarda, sense ve antisense transkriptlerin ifadesi eş bir şekilde değişkenlik gösterirken, bazen de zıt bir şekilde görülebilir.

Tablo 2.8. Antisense düzenleyici etkilerinin iyi karakterize edilmiş örnekleri (161).

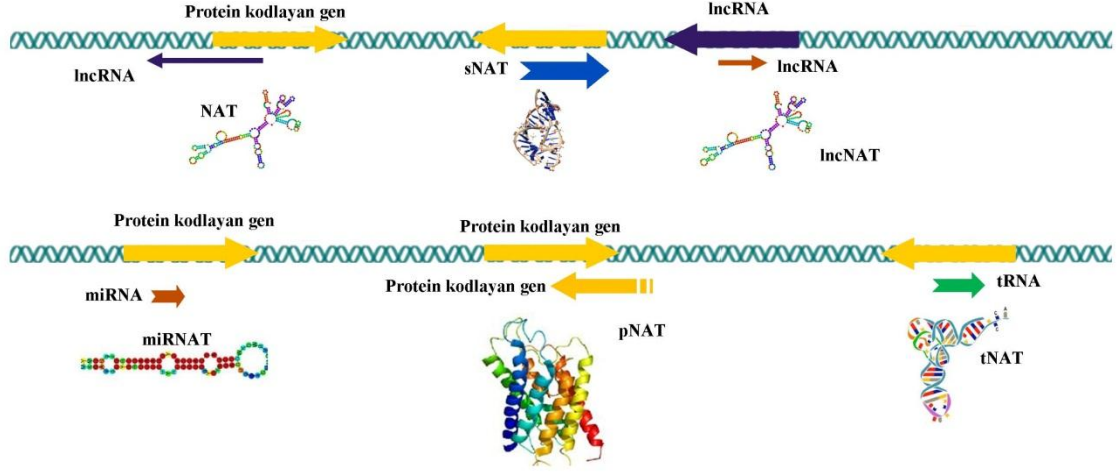
Mekanizma	Örnek
Yazılımsal müdahale	Mayalarda, art arda organize olan GAL10 ve GAL7 genleri, yakınsak müdahale yönünden tekrardan düzenlenmiştir. Yazılımın başlaması normal fakat hemen sonrasında iki transkript üst üste gelerek uzamayı engeller ve mRNA seviyesi ciddi derece azalır.
RNA maskeleme	RevErb örtüşmesi erbA ile olur ve splicing düzenleyici cis-elementleri maskeleyerek splicingi engeller. Yapay antisense RNA'lar ErbA2 ile tamamlayıcı yapı oluşturarak <i>in vitro</i> ErbA2'nin splicingini engellediği gösterilmiştir.
dsRNA bağımlı mekanizma	<i>Drosophila melanogaster</i> testisinde uydu tekrarlarının baskılanması erkek üretkenliği için gereklidir. Uydu tekrarlarının susturulması, homolog Su (Ste) ardışık tekrarları aracılığı ile olmaktadır. Baskılayıcı tekrarların iki zinciri de transkripte edilir ve sense-antisense ikilisi oluşur. Bu ikili, uydu tekrarlarını susturmak için 25-27 nt uzunluğundaki küçük parçalara ayrılır.
Metilasyon üzerine etki	Sphk1/Khps1 HTH çiftinin, antisense kaynaklı metilasyon geçirdiği gösterilmiştir. İnsan hemoglobin 2 geninin antisense kaynaklı metilasyonu ile talesemiye neden olduğu gösterilmiştir.

NAT transkriptleri birçok kanser çeşidinde de çalışılmıştır ve kanserde değişik ifade gösterdikleri bulunmuştur. Örneğin; aHIF, HIF1A geninin antisense sarmalından kodlanan bir NAT'tır. Berrak hücreli renal kanserde aşırı ifade edildiği bulunmuştur ve normal hücrelerde gen ifadesinin kontrolünde önemli görevleri olabileceği savunulmuştur (164). Benzer şekilde, AS1DHRS4, DHRS4 gen sınıfının *cis* ve *trans* olarak susturulmasında etkin bir HTH doğal antisense transkripti olduğu gösterilmiştir (165). Dahası, NAT'ın Snail aracılı EMT'de Zeb2/Sip1 gen ifadesini düzenlediği bildirilmiştir (16).

2.3.3.5. NAT'ların sınıflandırılması

NAT'lar bugüne kadar, sadece protein kodlayan genlerin karşı sarmalından kodlanan kodlanmayan transkriptler olarak tanımlanmaktaydı. Ancak, bu tez çalışmasında NAT terimi biraz daha geniş anlamda tanımlanmıştır. İnsan genomu incelendiğinde, protein kodlayan genlerin karşı sarmalından ve birbirleri ile örtüşen bölgeleri olan bir diğer proteinin de ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra, bir lncRNA transkriptinin karşı sarmalından sentezlenen ve protein kodlama kapasitesi bulunmayan

bir başka transkriptin de birbirleri ile ilişkili oldukları gösterilmiştir. Bu temel bilgiler ışığında, bu tez çalışması ile birlikte NAT'ların sınıflandırılması yepyeni bir boyut kazanmıştır.



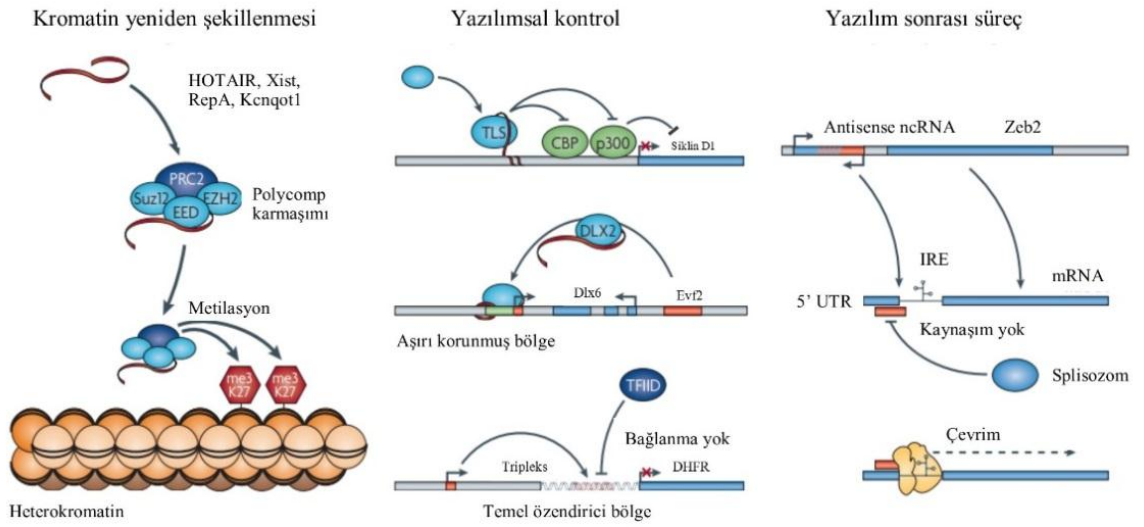
Şekil 2.14. Doğal antisense transkriptlerin sınıflandırılması.

İki proteinin karşılıklı ipliklerden sentezlenmesi ve örtüşen genomik bölgelerinin bulundurulması durumunda bu proteinlere protein doğal antisense transkriptleri (pNAT) olarak sınıflandırılmıştır. Bunu takiben, iki lncRNA molekülünün karşıt sarmallarda ve örtüşen bölgelerinin olması durumunda bu transkriptlere lncNAT denilmiştir. Benzer şekilde, miRNA, scnRNA, snoRNA, tRNA gibi diğer küçük RNA çeşitleri de bu şekilde sınıflandırılmıştır. Bir transkriptin karşı sarmalından kodlanan miRNA miRNAT olarak adlandırılırken, tRNA kodlanması durumunda tNAT olarak isimlendirilmiştir. Aynı şekilde diğer küçük RNA moleküllerinin karşıt sarmalda olması durumunda bu moleküller sNAT olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.14).

2.3.4. Kodlanmayan RNA'ların işlevleri

Kodlanmayan RNA molekülleri hücre içerisinde birçok süreçlerde görev alabilirler. NcRNA'lar kromatin düzenleyici karmaşımları genomun çeşitli bölgelerine katalitik etkinliklerini düzenlemek üzere bir araya getirebilirler ve böylelikle kromatin yeniden

şekillenmesinde görev alırlar. HOTAIR, Xist, RepA ve Kcnqot1, gibi ncRNA'lar HOX D bölgesine Polycomb karmaşımını toplayarak H3K27 metilasyonunu sağlayarak heterokomatin oluşumuna ve genin baskılanmasını sağlar (13, 166, 167). Bunun yanı sıra yazılım ve yazılım sonrası süreçlerde de ncRNA'ların önemli işlevleri gösterilmiştir. ncRNA'lar çeşitli mekanizmalar ile yazılımın düzenlenmesine katkıda bulunabilirler (13). Dahası, bir antisense ncRNA, protein kodlayan genin 5' UTR kaynaşım bölgesini baskılayarak intron korunmasını sağlar. Dolayısıyla, yazılım sonrası süreçlerin de düzenlenmesinde görev alabilirler (Şekil 2.15).



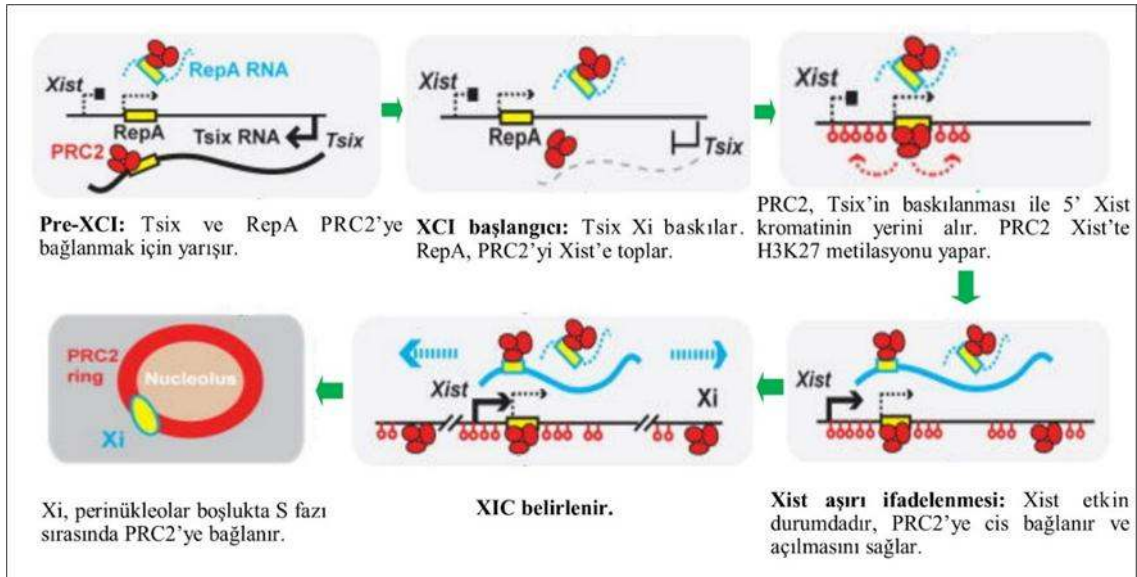
Şekil 2.15. ncRNA'ların işlevlerinin şematik gösterimi. ncRNA'lar kromatin yeniden şekillenmesinde, yazılımsal kontrolde ve yazılım sonrası süreçlerde birçok role sahip moleküllerdir (13).

2.3.4.1. Epigenetik olaylar

Kromatin yapısında düzenlemeler, X kromozomu etkinsizliği, genomik damgalanma ve DNA metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonlarda birçok ncRNA'nın etkili olduğu tanımlanmıştır.

X kromozomu etkinsizliği, dişi memeli hücrelerinde bulunan iki tane X kromozomundan birisinin etkin olmadığı durumdur. Bu etkinsizleştirme, dişi ve erkek bireylerin hücrelerinde X kromozomundan kodlanan genlerin eşit olması için gerekli bir

mekanizmadır (dozaj telafisi). Etkinsizleştirme mekanizmasında ilk olarak, X kromozomundan birisi baskılayıcı heterokromatin ile paketlenerek ve bu kromozomun üzerinde bulunan genlerin ifade edilmesi önlenerek dozaj telafisi sağlanmış olacaktır (168, 169). X kromozomu etkinsizliği bir ncRNA olan ~17 kb uzunluğunda Xist aracılığıyla XIC'te (X-inactivation center) olur (168). Xist bölgesinin içsel kodlanmayan transkripti olan RepA, PRC2'yi direkt hedef alarak X kromozomunu sessizleştirmeye başlar. İlk olarak RepA, RNA bağlayıcı alt birimi olan Ezh2 ile PRC2'yi toplar. Etkin olan X kromozomunda bu olay antisense transkript Tsix tarafından baskılanır (Şekil 2.16) (167).

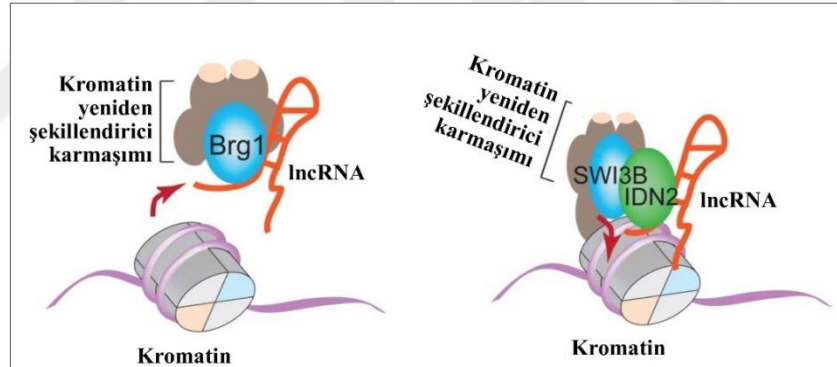


Şekil 2.16. X kromozomu etkinsizleştirme modeli. XIC'de PRC2'ye bağlanmak için RepA ve Tsix yarışır ve Xi Xist aşırı ifadenir. Etkin olan X kromozomunda ise Tsix görev alır (167).

NcRNA'lar kromatin yapılarının düzenlenmesinde, birçok farklı proteinlerin bir araya getirilmesi ile birlikte etkin rol oynamaktadırlar. NcRNA molekülleri, RNA sentez bölgesinin yakınındaki komşu genler üzerine etki ederek "*cis etki*" kromatin düzenlenmesiyle etki gösterirler. Bunun yanı sıra, farklı bir kromozom veya uzak bir bölgede kodlanan genleri düzenleyerek "*trans etki*" gösterebilirler (170). NcRNA'lar, genetik bilgiyi depolayan histonlar veya DNA ile kovalent değişimleri katalizleyen

kromatin-değiştirici enzimler ile etkileşime girerler (77, 171). Bu işlevsel RNA molekülleri, Polycomb Repressive Complex (PRC), MLL/TrxG karmaşımı, histon demetilaz LSD1, DNA metiltransferaz DNMT1 ve DNA demetilasyon düzenleyicisi (DNA demethylation regulator GADD45a) gibi birçok histon/DNA- değiştirici enzimler ile ilişkilidir (130, 134, 171-173).

NcRNA'lar kromatin yapılarının düzenlenmesinde iki mekanizma ile aracılık ederler (şekil 2.17) (78). Birincisi, ncRNA'lar kromatin-değiştirici enzimler ile kovalent olarak etkileşime girerek düzenleme yapabilirler. Örneğin; TARID (TCF21 antisense RNA inducing demethylation) lncRNA molekülü, GADD45A ile bağlanarak kanser hücrelerinde gen ifadesinin düzenlenmesinde özgül gen bölgelerinin DNA demetilasyon mekanizmasına doğrudan etki gösterebilir (134). İkincisi ise, ncRNA'lar kromatin-değiştirici karmaşıma ve karmaşımın yapısına veya işlevine etki göstererek düzenleme yapabilirler. Bu duruma ise, X kromozomu etkinsizleştirilmesinde işlevi olan Xist lncRNA molekülü örnek olarak verilebilir.



şekil 2.17. NcRNA'lar tarafından düzenlenen kromatin yeniden şekillenmesinin iki modeli. Sol taraftaki modelde, ncRNA molekülü doğrudan karmaşıma etki edebilir. Sağ taraftaki modelde ise, ncRNA'lar karmaşımın yapısına ve işlevine etki ederek düzenlenmeye katkı sağlarlar (78).

DNA ve histon yapısındaki kovalent değişimler, kromatin ve gen ifadesinin düzenlenmesinde nükleozom yoğunluğunun ve pozisyonun yeniden düzenlenmesini etkiler. Ayrıca, ncRNA'ların nükleozom yeniden şekillenmesindeki rolleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, ncRNA'ların ATP bağımlı kromatin yeniden şekillendirici etmenleri aracılığı ile gen ifadesinin ve nükleozom yeniden şekillenmesinin düzenlenmesinde görev aldığı gösterilmiştir (77).

2.3.4.2. Yazılımsal ve yazılım sonrası düzenlemeler

Özendirici bölgenin ve arttırıcıların (enhancer) yaygın transkripsiyonu yazılımın düzenlenmesinde lncRNA moleküllerinin işlevini ortaya koymaktadır. LncRNA'lar, yazılımsal düzenlemelerde *cis* veya *trans* etki göstererek protein kodlayan genlerin negatif veya pozitif düzenlenmesinde rol oynayabilirler (174). *Trans* etki göstererek düzenlemeye en önemli örnek, lncRNA'lar RNAPII'nin etkinliğini doğrudan etkileyerek hücrede genel yazılıma etki edebilirler. Diğer bir örnek ise, 331 nt uzunluğunda 7SK lncRNA molekülü, RNAPII'nin CTD (carboxy-terminal domain) bölgesini fosforilleyen PTEF β yazılım etmenini engelleyerek yazılımsal uzamayı (transcription elongation) baskılayabilir (175). *Cis* etkiye ise, en iyi örnek X kromozomu etkisizleştirilmesinde görevli olan Xist lncRNA molekülü verilebilir. Xist, XIC bölgesine direk etki göstererek kromozomun sessizleşmesini sağlar (168).

LncRNA'lar yazılım aracılı susturmada (transcription-mediated silencing, transcriptional interference) da görev alabilirler. Transkriptte olan bir gen başka bir genin yazılım etkinliğini *cis* etki ile baskılayabilir (176). Aynı zamanda lncRNA'lar yazılımsal müdahale ile özendirici bölgedeki nükleozomların yeniden konumlanmasında, özendirici bölge DNA metilasyonunda ve özendirici bölge histon düzenlenmesinde etkili olabilmektedir (174).

LncRNA'lar yazılım etkinliğinin düzenlenmesinde kofaktör olarak görev yapabilirler. Örneğin; Evf2, yazılım etmeni DIX2'in komşu genlerinin ifadesini uyarmak için aynı arttırıcıya bağlanmasına teşvik eder (177). Dahası lncRNA'lar, özendirici bölge seçeneğini arttırmak için, başlangıç karmaşımı ile etkileşerek RNAPII'nin etkinliğini düzenleyebilirler. DHFR bölgesinin yukarı (upstream) bölgesinden kodlanan ncRNA, DHFR'nin ana özendirici bölgesinde yazılımsal kofaktör TFIID'nin bağlanmasını engellemek amacıyla üçlü yapı (triplex) oluşturur (178).

Yazılım sonrası düzenlemelerde, MALAT1 lncRNA molekülü, serin/arjinin splicing etmenlerini (SR) düzenleyerek alternatif kesilimin kontrolünde görev alır (127). Buna ek olarak, siRNA aracılığıyla RISC karmaşımının mRNA'yı hedeflemesindeki gibi ncRNA'ların bağlanması, proteini etkileyen bileşenlerin mRNA transkriptinin hedeflenmesi ile etki edebilir (179).

2.4. Bu Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Özellikleri

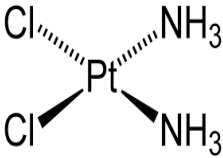
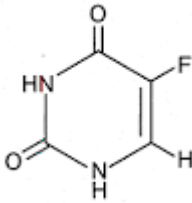
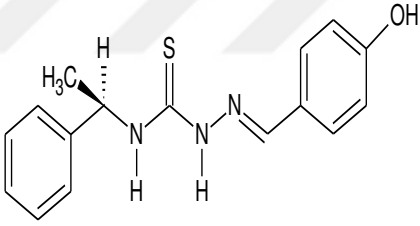
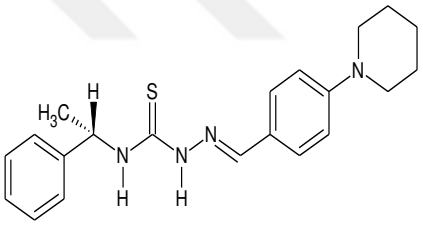
Bu çalışmada anti-kanser ilacı olarak bilinen sisplatin ve 5-Fluorourasil (5-FU) kullanılmıştır. Bunlara ek olarak anti-kanser ilacı olma potansiyeli yüksek olan karakterizasyonu yapılmış 8A ve 17B kimyasal maddeleri kullanılmıştır. Tablo 2.9'da kimyasallar ve özellikleri gösterilmiştir.

Sisplatin (cis-diammine-dichloroplatinum(II)) mesane, testis, ovaryum, akciğer kanseri gibi birçok kanser çeşidinin tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Ayrıca, sisplatin ilk platin bazlı anti-kanser ilacıdır (180, 181). Platin (II) molekülleri, iki amin grubu ve iki reaktif "bırakma" klorid (sisplatin) grupları ile birlikte bulunur (182). Ek olarak, platin kararsız durumdaki DNA'ya kovalent olarak bağlanır. Oluşan bu DNA-platin bağlantısı sadece nükleotid kesip-çıkarma yolağı (nucleotide excision (NER) pathway) ile tamir edilebilir (182).

5-Fluorourasil yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarından birisidir. Meme, kolon ve cilt kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu madde, hücrelerde thymidilate sentetaz enzimine bağlanarak etki gösterir. 5-FU; kolorektal kanser, meme, akciğer ve gastrointestinal kanserler gibi birçok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (183, 184).

Kullanılan diğer kimyasallar (8A ve 17B) tiyosemikarbazon türevi bileşiklerdir. Yapılan araştırmalarda, tiyosemikarbazon türevlerinin birçok kanser çeşidinde tedavi amaçlı kullanıldığı gösterilmiştir.

Tablo 2.9. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve özellikleri.

Bilinen Anti-kanser ilacı		
Özellik	Sisplatin	5-Fluorourasil
Kimyasal yapı		
Kimyasal adı	cis-diamminedichloridoplatinum(II)	2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione, 5-fluoro-
Moleküler ağırlığı	300.01 g/mol	130.077 g/mol
Kimyasal formülü	Cl ₂ H ₆ N ₂ Pt	C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂
Renk	Beyaz	Beyaz
Çözünürlük	DMSO	DMSO
Etkinliği henüz bilinmeyen tiyosemikarbazon türevi bileşikler		
	8A	17B
Kimyasal yapı		
Kimyasal adı	(R)-(-)-2-(4-hidroksibenzilidin)-N-(1-feniletil)hidrazinkarbotiyoamid	(S)-(+)-2-[(4-piperidin-1-il)benzilidin]-N-(1-feniletil)hidrazinkarbotiyoamid
Moleküler ağırlığı	299.30 g/mol	366.52 g/mol
Kimyasal formülü	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ OS	C ₂₁ H ₂₆ N ₄ S
Renk	Sarı	Sarı
Çözünürlük	DMSO	DMSO

Tiyosemikarbazon türevli kimyasal maddeler DNA ve RNA sentezini engelleyerek anti-kanser etkinliği gösterebilmektedir. Tiyosemikarbazon türevleri, ribonükleotitleri deoksiribonükleotitlere indirgeyen ribonükleotit redüktazın (RR) bilinen en güçlü baskılayıcılarıdır ve bu sebepten dolayı nükleik asit sentezini engellemektedirler (32). RR enzimi, hücre bölünmesinde ve tümör gelişiminde önemli işlevleri olan bir moleküldür. RR enzimi, politiyolleri içeren R1 büyük alt birim, protein olmayan binükleer Fe(II) ile serbest tirozil radikali içeren R2 küçük alt birimlerinden oluşmaktadır. Enzimin etkin bölgesi R1 ve R2 alt birimlerinden oluşur (33, 185). Son yıllarda yapılan anti-kanser çalışmalarında RR'nin etkinliğinin artması normal hücrelerin dengesinin bozulmasına ve kanserli hücrelerin ise metastazının artmasına neden olduğu bildirilmiştir (186). RR baskılayıcısı olan tiyoksemikarbazon türevli bileşikler DNA sentezini ve tamirini engelleyerek antineoplastik etki gösterirler (187).

Tiyosemikarbazon türevlerinin etkinliğini belirlemek için yapılan anti-kanser çalışmalarında, 3-aminopiridin-2-karboksaldehit tiyosemikarbazon (3-AP, Triapin) ve 3-aminopiridin-4-metil-2-karboksaldehit tiyosemikarbazonu (3-AMP) sentezlenmiştir. Sentezlenen bu bileşiklerin L-1210 lösemi hücre hatlarında etkin potansiyelinin olduğu gösterilmiştir (33). Finch ve ark. (188), Triapinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları neticesinde antineoplastik ajan olarak klinik potansiyelinin olduğunu rapor etmişlerdir.

Bir tiyosemikarbazon türevi olan Triapin hasarlı DNA'yı hedef alarak etki eden bir kimyasaldır. Bunun yanı sıra, tiyosemikarbazon türevleri topo II-DNA karmaşımındaki tiyol kalıntılarının alkilleyerek bu karmaşımı kararsız hale getirir ve anti-kanser etkisi gösterirler (33, 185). Bu maddeler serbest elektron çifti veya negatif yük taşıyan nükleofilik merkezlerle tepkimeye girebilen elektrofilik alkil katyonu üreterek DNA'ya bağlanırlar. Böylece, DNA ile kovalent bağ yapılmış olur DNA tıpkı yapımı engellenmiş olur. Dolayısıyla, DNA hasar görür, hasar giderilmezse hücre döngüsü engellenir ve hücre ölür (33, 185).

Bu çalışmada kullanılan anti-kanser ilacı olma potansiyeli yüksek olan 8A ve 17B tiyosemikarbazon türevleri daha önceden akciğer, meme, mide ve serviks kanserli hücre hatlarında hücre canlılığı değerlendirilmiş olup literatürde herhangi başka bir çalışma bulunmamaktadır (189).

3 . GEREÇ ve YÖNTEM

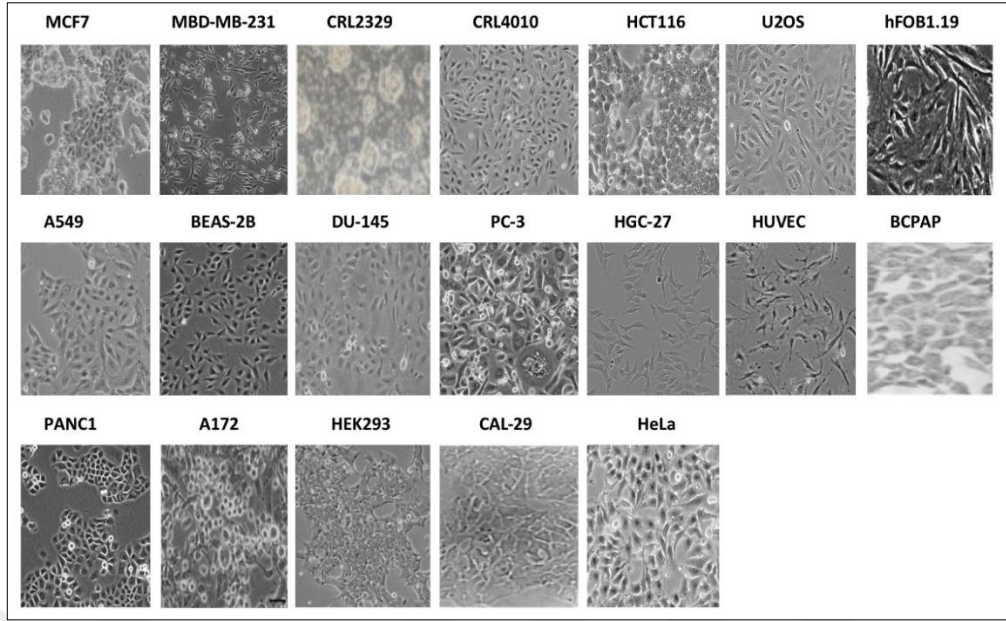
3.1. İnsan genomundaki NAT'ların belirlenmesinde kullanılan informatik analizler

Bu tez çalışmasında, NCBI veri tabanında GRCh38.p7 Primary Assembly'e göre "Gene" ara yüzünde Şubat 2017 tarihine kadar yayınlanmış (tanımlanmış) kromozomlar üzerindeki NAT'lar belirlenmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). NCBI veri tabanının yanı sıra, Ensembl (<http://www.ensembl.org>) ve Genome Browser (#HumanCRCh38/hg38, <https://genome.ucsc.edu/>) veri tabanlarında NAT transkriptleri belirlenmiştir.

NAT, protein kodlayan genin karşı sarmalından kodlanan transkript olarak tanımlanmaktaydı. Ancak, bizim araştırmalarımıza göre NAT, protein kodlayan genin karşı sarmalından kodlanan protein, lncRNA, miRNA, snoRNA, tRNA gibi diğer RNA moleküllerini de içermektedir. Buna benzer olarak bir lncRNA'nın karşı sarmalından kodlanan lncRNA, miRNA, snoRNA ve tRNA molekülleri de NAT olarak adlandırılabilir.

3.2. Hücrelerin Kültür Edilmesi

Bu tez çalışmasında ilk olarak elimizde mevcut olarak bulunan farklı kanser hücre hatları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan hücreler Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Hücreler %10 cenin sığır serum (fetal bovine serum, FBS) içeren DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) besi yeri içerisinde çoğaltılmıştır. Ayrıca, kullanılan besi yeri içerisine 50 U/ml penisilin/streptomisin eklenmiştir. Kanser hücre hatları, karbondioksit inkübatöründe %5'lik CO₂'li ortamda ve 37°C sıcaklıkta kültür edilmiştir (Şekil 3.1). Kültür kaplarındaki hücre yoğunluğu yaklaşık % 80-90 olduğunda hücreler tripsin ile muamele edilerek kaldırılmıştır. Sonrasında tripsinin etkisini nötralize etmek için besi yeri eklenmiştir ve flakon tüplere konulmuştur. Tüpler, 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırılıp ve pellet kısım RNA izolasyonu için kullanmaya hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hücrelerin morfolojik görüntüleri (bu görüntüler <http://www.atcc.org/> internet sitesinden alınmıştır).

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri

No	Hücre İsmi	Hücre tipi	Hücre özellikleri
1	MCF7	Epitel	Meme, meme bezi ve metastatik bölgeden türevli doku, Adenokarsinom
2	MDA-MB-231	Epitel	Meme bezi, meme; metastatik bölgeden türevli doku, Adenokarsinom
3	CRL2329	Epitel	Meme Bezi / Dukt, TNM evre IIB, Grade 2, Primer duktal karsinom
4	CRL-4010	Epitel	Meme, meme bezi epiteli, normal hücre
5	HCT116	Epitel	Kolon, kolorektal karsinom
6	U2OS	Osteoblast	Kemik, osteosarkom
7	hFOB1.19	Osteoblast	Kemik, SV40 büyük T antijeni transfekte edilmiş, normal hücre
8	A549	Epitel	Akciğer, karsinom
9	BEAS-2B	Epitel	Akciğer/bronş, normal hücre
10	DU-145	Epitel	Prostat, metastatik bölgeden türevli doku, karsinom
11	PC-3	Epitel	Prostat, metastatik bölgeden türevli doku, Grade IV, Adenokarsinom
12	HGC-27	Epitel	Mide, metastatik bölgeden türevli doku, farklılaşmamış karsinom
13	HUVEC	Endotel	Göbek bağı endotel hücresi, Normal
14	BCPAP	Epitel	Zayıf farklılaşmış papiller tiroid karsinomdan (PTC) türevli PTC
15	PANC-1	Epitel	Pankreas/Dukt, karsinom
16	A-172	Nöron	Beyin, Glioblastom
17	HEK293	Epitel	Embriyonik böbrek hücresi
18	Cal-29	Epitel	Mesane transizyonel hücreli karsinom
19	HeLa	Epitel	Serviks, adenokarsinom

3.3. Hücrelerden RNA İzolasyonu

Hücrelerden RNA izolasyonu, Roche firmasına ait High Pure RNA Isolation Kit (#11828665001) kullanılarak yapılmıştır.

RNA eldesi protokolü aşağıdaki gibidir;

İlk olarak, hücreler tripsin ile flasktan kaldırılır ve 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edilir ve sonrasında süpernatant kısım atılır.

Santrifüj edilen pelletler üzerlerine 200 µl PBS ilave edilerek yeniden süspansiyon haline getirilir.

400 µl Lysis Binding Buffer eklenerek 30 sn vorteklenir.

Hücrelerin içerisinde olduğu karışım filtreli tüplere alınarak 10000 rpm’de 15 sn santrifüj edilir, santrifüjün ardından toplama tüpleri değiştirilir.

Her bir örnek için 10 µl DNase ve 90 µl DNase Incubation Buffer olmak üzere toplam 100 µl’lik enzim karışımı eklenir ve 30 dakika oda sıcaklığında kapakları kapalı bir şekilde inkübasyona bırakılır.

500 µl Wash Buffer I ilave edilip, 10000 rpm’de 15 sn santrifüj edilir, santrifüjün ardından toplama tüpleri değiştirilir.

500 µl Wash Buffer II ilave edilip, 10000 rpm’de 15 sn santrifüj edilir, santrifüjün ardından toplama tüpleri değiştirilir.

300 µl Wash Buffer II ilave edilip, 2 dk maksimumu hızda (14000 rpm) santrifüj edilir.

Son olarak filtreler 1,5 ml’lik eppendorf tüplere alınarak üzerine 50 µl Elution Buffer ilave edilir, 1 dk oda sıcaklığına beklenir ve 1 dk 10000 rpm’de santrifüj edilir.

Elde edilen RNA’lar kullanım sürecine kadar -80 °C sıcaklıkta muhafaza edilir.

Aynı zamanda bir miktar RNA kullanılarak RNA konsantrasyonu ve kalitesi tayini yapılır. Bu işlem NanoDrop ND-1000 Spectrophometer cihazında spektrofotometrik ölçüm ile yapılmaktadır.

Ölçüm yapılan hücrelerin yoğunluğu ve kirlilik dereceleri Tablo 3.2.’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Hücre kültüründen elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve kirliliklerinin gösterilmesi

No	Hücre ismi	ng/µl	260/280	No	Hücre ismi	ng/µl	260/280
1	MCF7	1502	2,07	11	PC-3	664,1	2,07
2	MDA-MB-231	437	2,02	12	HGC-27	926	2,09
3	CRL2329	1577,4	2,06	13	HUVEC	531,4	2,07
4	CRL-4010	900	2,06	14	BCPAP	458	2,01
5	HCT116	1451	2,05	15	PANC-1	344	2,03
6	U2OS	562	2,05	16	A-172	1646	2,07
7	hFOB1.19	343,6	2,02	17	HEK293	836	2,06
8	A549	258	2,07	18	Cal-29	1230	2,04
9	BEAS-2B	103,7	2,10	19	HeLa	256,3	2,08
10	DU-145	425	2,02				

Hücre kültür örneklerinden elde edilen RNA'lar haricinde ticari olarak aldığımız 20 farklı normal insan dokusundan elde edilen RNA örneklerinde de çalışmada kullanılan genlerin ifade seviyeleri belirlenmiştir (#636643, Human Total RNA Master Panel II, Clontech Laboratories). Kullanılan bu doku RNA panelinde doku çeşitliliği Tablo 3.3'te gösterilmiştir. Bu paneldeki her bir RNA örneğinin konsantrasyonu 1 µg/µl'dir.

Tablo 3.3. RNA panelinde bulunan doku türleri

No	Doku	No	Doku
1	Kalp	11	Prostat
2	Kemik iliği	12	İskelet kası
3	Beyin, serebellum	13	Dalak
4	Beyin (tüm)	14	Tiroid bezi
5	Fetal beyin	15	Timus
6	Fetal karaciğer	16	Uterus
7	Böbrek	17	Kolon
8	Karaciğer	18	İnce bağırsak
9	Akciğer	19	Mide
10	Plasenta	20	Adrenal Bez

3.4. Tek Sarmal cDNA Sentezi

Hücre kültüründen elde edilen RNA ve doku RNA örneklerinden tek sarmal cDNA sentezi Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1681) ile yapılmıştır. cDNA sentez reaksiyonu üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez protokolü Tablo 3.4'te gösterildiği gibidir. Ayrıca, tepkimeye girecek RNA örneklerinin miktarının standart olması için eşit konsantrasyonda RNA kullanılmıştır. Toplam hacimde 1,5 µg olacak şekilde RNA konsantrasyonları hesaplanmıştır ve RNA-dH₂O oranı ayarlanmıştır.

Tablo 3.4. cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin oranları.

Bileşen	Miktar
Random Hexamer Primer, (100 µM)	1 µl
10 mM dNTP karışımı	1 µl
nükleaz içermeyen distile su	*
RNA	**
Toplam	15 µl
5X RT Tampon (250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	4 µl
Maxima H Minus Enzim karışımı	1 µl
Toplam karışım	20 µl

* Tablo 3.3'deki RNA miktarlarına göre toplam karışımdaki RNA miktarları 1,5 µg/µl olacak şekilde her örnek için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

** Toplam karışım 15 µl olacak şekilde RNA miktarlarına göre nükleaz içermeyen distile su eklenmiştir.

Karışımları hazırlanan örnekler Sensquest PCR cihazında tabloda gösterilen şartlarda tepkime gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. cDNA sentezi tepkime koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre
İlk inkübasyon	25	10 dk
Enzim aktivasyonu	50	30 dk
Enzim inaktivasyonu	85	5 dk

Elde edilen tek sarmal cDNA örneklerinin dondurulup çözündürölme işlemi sonucunda oluşabilecek bozulmayı önlemek amacıyla örnekler 0,2 ml'lik PCR tüplerine belirli miktarlarda bölünmüştür ve çalışma sürecine kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.5. Primer Tasarımı

Gen ifadesi primerleri, genin ifade edilip edilmediğini anlamak için kodlanan bölgelerin herhangi bir bölgesinde tasarlanabilmektedir. Ancak RNA eldesi yapılırken DNA bulaşığı kaçınılmaz bir durumdur. Elde edilen RNA örneklerindeki DNA bulaşığını gidermek için primerler ekzon-ekzon bağlanma bölgelerine tamamlayıcı olarak tasarlanmıştır. Böylece elde ettiğimiz RNA içerisinde DNA bulaşığı bulunsan bile bu durum ilgili bölgenin ifade seviyesini etkilemeyecektir.

Çalışmada kullanılan primerler, NCBI veritabanında yer alan “Gene” arayüzü (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) kullanılarak tasarlanmıştır. Ayrıca, referans gen (housekeeping gene) olarak Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ve Beta aktin (ACTB) genleri kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin ileri ve geri primer dizilimleri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün uzunlukları gibi primer özellikleri Tablo 3.6.'da gösterilmiştir.

3.6. Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR)

Primer optimizasyonu ve RT-PCR koşulları

Her primer için uygun bağlanma sıcaklığı ve bileşen oranlarının (primer yoğunluğu, MgCl₂, dNTP) belirlenmesi için iyileştirme (gradient) deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler neticesinde en uygun şartlar belirlenerek RT-PCR deneyleri bu koşullarda yapılmıştır. Bu bağlamda; primer çiftlerine özgü şartlar aşağıdaki gibi özetlenmiştir. Örneğin; VIM geni için RT-PCR bileşenleri ve tepkime koşulları Tablo 3.7. ve 3.8'deki gibidir.

Tablo 3.6. Çalışmada çalışılacak ilgili genlerinin ifade seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizilimlerinin özellikleri * F:Forward “ileri” primer, R:Reverse “geri” primer

Primer Adı	Primer dizilimi	Ürün boyutu (bp)	Tm (°C)
CDKN2B-AS1-F	GCACTATGGTATGGAAGGTGCT	187	60,16
CDKN2B-AS1-R	TCTTGCCATGTGAGAGAAGC		57,89
CDKN2B-F	TACGGCCAACGGTGGATTAT	218	59,17
CDKN2B-R	CATCATCATGACCTGGATCGC		58,93
BCL2-F	ATAACGGAGGCTGGGATGC	149	59,55
BCL2-R	TCACTTGTGGCCCAGATAGG		59,09
LOC105372161-BCL2-F	GGCTCAGTGGCTGCAGTTAT	166	60,39
LOC105372161-BCL2-R	GCCTCCGTTGAGGTTGTTGA		60,53
VIM-F	AAATGGCTCGTCACCTTCGT	119	59,97
VIM-R	AGGCAGAGAAATCCTGCTCTC		59,51
VIM-AS1-F	AGCAGCAAATACCACAGTCC	126	58,17
VIM-AS1-R	TTCTGATCACCACGAGTCCA		58,37
BCLX _L -F	TCAGCCACCATTGCTACCAG	197	60,04
BCLX _L -R	CCAAGGAGCTGGTTTAGGGG		60,03
BAX-F	GTCGCCCTTTTCTACTTTGCC	154	59,80
BAX-R	TGGTCACGGTCCAACCACC		62,11
CASP3-F	CTCTGGTTTTTCGGTGGGTGT	288	60,18
CASP3-R	TGAGGTTTGCTGCATCGACA		60,25
CASP9-F	TCAGGCCCCATATGATCGAG	499	58,73
CASP9-R	ACCATGAAATGCAGCGAGGA		60,04
CDKN1B-F	GGCCTCAGAAGACGTCAAAC	370	58,85
CDKN1B-R	TCTTCATACCCCGCTCCACG		61,67
CDK2-F	AAATCCTCCTGGGCTGCAAA	145	59,89
CDK2-R	CCCAGAGTCCGAAAGATCCG		59,90
TP53-F	TTTTCCCCTCCCATGTGCTC	223	59,96
TP53-R	GCTCGACGCTAGGATCTGAC		60,04
GAPDH-F	GGTCCACCACCCTGTTGCTGT	456	62,3
GAPDH-R	AGACCACAGTCGATGCCATCAC		59,4
ACTB-F	CGCCATCCAGGCTGTGCTGT	293	65,55
ACTB-R	TCCCTGCCAGATCCAGGCGT		65,65

Tablo 3.7. RT-PCR bileşen ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
Saf su	15,875
10X PCR tamponu	2,5
25 mM MgCl ₂	1,5
2 mM dNTPs	1,5
İleri primer (F) 10 pM	0,75
Geri primer (R) 10 pM	0,75
5 U/µl Taq polimeraz	0,125
cDNA	2
Toplam hacim	25*

*Her tepkime yarım ölçü (toplam 12,5 µl) şeklinde yapılmıştır.

Tablo 3.8. RT-PCR tepkime koşulları

	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Tekrar sayısı
İlk Denaturasyon	95	05:00	1
Denaturasyon	95	00:30	
Bağlanma	60	00:30	30
Polimerizasyon	72	00:30	
Uzama	72	10:00	1
	+4	∞	

Sonuçların Agaroz jelde görüntülenmesi

Uygun tepkime koşullarında elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde görüntülenmiştir. Yüzde 1,5'lik (1,5 g agaroz/100 ml distile su) agaroz jelde, elde edilen PCR ürünleri elektrik akımı verilerek yürütülmüştür. Agaroz jelde yürütülen PCR ürünlerinin büyüklükleri aynı jele yüklenen DNA belirteçleri (marker) ile tespit edilmiştir. Bu şekilde primerlerin doğru yere bağlanıp bağlanmadığı tespit edilmiştir. Örnekler 140V, 400 mA'de 40 dk boyunca yürütülmüştür. UV ışığı altında kontrol edilip Fusion V görüntüleme cihazında resimleri çekilmiştir.

3.7. Real-Time PCR (qPCR)

Doku ve hücre kültürü örneklerinde ilgili genlerin ifadesini belirlemek için qPCR deneyleri yapılmıştır. qPCR, Rotor Gene Q (QIAGEN,) Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Cihaza uygun malzemeler kullanılarak tepkimeler gerçekleştirilmiştir. qPCR, Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (#K0221) ile üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda yapılmıştır (Tablo 3.9 ve Tablo 3.10). Ayrıca, qPCR için kullanılan terimler MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) standartlarına uygun olarak yazılmıştır (190).

Tablo 3.9. qPCR için tepkime bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar (µl)
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)*	6,25
10 pM F primeri	0.4
10 pM R primeri	0.4
Nükleaz içermeyen distile su	4,45
cDNA (≤500 ng)	1
Toplam	12,5

*Son konsantrasyonda 2,5 mM MgCl₂ içermektedir.

Tablo 3.10. qPCR için tepkime koşulları.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Tekrar sayısı
UDG - ön muamele	50	02:00	1
İlk denatürasyon	95	10:00	1
Denatürasyon	95	00:15	40
Bağlanma	60	00:30	40
Uzama	72	00:30	40
Melting Curve	55-95	Dakikada 1 derece artarak	

3.8. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (MTT Deneyleri)

Hücre canlılığını değerlendirmek için, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromidin'in (MTT) canlı hücreler tarafından alınarak mitokondriyal enzimlerce indirgenmesi esasına dayanan bir boyama tekniği kullanılmıştır. Hücreler 24 kuyucuklu kaplara ekilir ve %80-90 yoğunluğa ulaştınca kimyasal ile maruz bırakılır. Kimyasallar 25, 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Kimyasallar maruz bırakıldıktan 24 saat sonra hücreler HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ile yıkanır ve 1 mg/ml olarak hazırlanan MTT boyasına maruz bırakılır ve 45-60 dk 37 °C'de inkübe edilir. Sonrasında üstü dökülür ve 500 μ l DMSO eklenip karıştırılır ve 96 kuyucuklu kaplara 100 μ l olacak şekilde transfer edilir. Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) ile 550 nm'de okutulur.

3.9. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Deneyleri

Laktat dehidrogenaz (LDH), piruvat ve laktatın karşılıklı dönüşümünü katalizleyen oksiredüktaz bir enzimdir. LDH sonucu, hücrelerdeki toksisiteyi göstermektedir. LDH deneyleri Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (#MAK066, Sigma-Aldrich) ile üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda yapılmıştır.

MTT deneyleri sırasında kimyasala maruz bırakılan hücrelerin süpernatant kısımları toplanarak bu örneklerden LDH testi yapılmıştır. İlk olarak, her örnek için 48 μ l LDH Assay Buffer ve 2 μ l LDH Substrate Mix ile toplamda 50 μ l karışım hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu kaplara ilk önce 50 μ l örnekler konulmuştur ardından üstüne hazırlanan karışımdan 50 μ l eklenmiştir. Çalkalayıcıda karıştırılarak 450 nm dalga boyunda ilk okuma gerçekleştirilmiştir. Okumalar standartlar ve pozitif kontrol referans alınarak her 5 dk da bir tekrarlanmıştır. Bekleme sürelerinde ise 37 °C'de etüvde tutulmuştur. Pozitif kontrolü geçen ilk sürede deney bitirilmiştir. LDH deneyleri, SF ve DMSO grubu, MTT ile belirlenen etkin doz, bir yoğun konsantrasyon olan doz olarak yapılmıştır. Karşılaştırmalar yapılırken SF ve DMSO grubuna göre etkin dozdaki LDH etkinliği kıyaslanmıştır. Ayrıca, bir üst yoğun dozun LDH etkinliği de gösterilerek o dozun ilgili hücre için uygun olmadığı tespit edilmiştir.

LDH etkinliğini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{LDH etkinliği} = \frac{B \times \text{Örnek sulandırma katsayısı}}{\text{Tepkime zamanı} \times \text{Hacim}}$$

B: İlk ve son okuma arasındaki NADH miktarı

Tepkime zamanı: ilk okuma ve son okuma arasındaki fark (dk)

Hacim: Örnek hacmi (ml)

Örnek sulandırma katsayısı: 50 µl örnek 50 µl karışım kullanıldığından katsayı 1'dir.

3.10. Apoptoz deneyleri

Hücreler 6 kuyucuklu kaplara 1×10^6 olacak şekilde ekilir ve etkin dozları belirlenen kimyasallar hücelere verilir ve 24 saat sonra hücelere tripsin ile kaldırılır. Kaldırılan hücreler santrifüj edilir ve soğuk (+4 °C'de muhafaza edilen) HBSS ile yıkanır ve tekrar santrifüj edilir. Apoptoz deneyleri için Annexin V-FITC Early Apoptosis Detection Kit (Cell Signaling Technology, #6592) kullanılmıştır. Üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda deneysel aşamalar gerçekleştirilmiştir. Apoptoz deneylerinde ilk olarak kaldırılan ve HBSS ile yıkanan hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilir ve üst kısım uzaklaştırılır. 1X Annexin V Binding Buffer'den 500 µl ile hücreler süspanse edilir. Tekrar 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilir ve üst kısım uzaklaştırılır. Her bir örnek için 12,5 µl PI (propidium iodide) ve 1 µl Annexin V karışımı hazırlanarak toplamda 13,5 µl'lik karışım hücreler üzerine eklenir. Buz üzerinde karanlık ortamda 15 dk bekletilir. Son olarak üzerine 140 µl 1X Annexin V Binding Buffer eklenir ve Beckman Coulter marka Flow sitometri cihazında okuma yapılır.

3.11. Hücre Döngüsü Deneyleri

Hücreler 6 kuyucuklu kaplara 1×10^6 olacak şekilde ekilir ve etkin dozları belirlenen kimyasallar hücelere verilir ve 24 saat sonra hücelere tripsin ile kaldırılır. Kaldırılan hücreler santrifüj edilir ve HBSS ile yıkanır ve tekrar santrifüj edilir. Hücreler %70'lik soğuk etil alkol ile 1-12 saat fikse edilmiştir. Sonrasında, hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek etanol uzaklaştırılmıştır. 1 ml 1X PBS ile tekrar yıkanır ve 1500

rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst kısım atılır ve 200 µl Guava® Cell Cycle Reagent (Guava Technologies, #4500-0220) ile hücreler iyice karıştırılmıştır. Sonrasında 30 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilip ve Beckman Coulter marka Flow sitometri cihazında okuma gerçekleştirilmiştir.

3.12. Yara iyileşmesi Deneyleri

Hücreler 6 kuyucuklu kaplara ekilir. Muamele edilecek maddeler verilir ve 24 saat sonrasında HBSS ile yıkanır. Yara iyileşmesi deneyleri için hücrelerin kabın tabanında tek katman (monolayer) olarak çoğalmasına dikkat edilmelidir. 100 µ'lik uç ile kuyucuğun ortasında düz bir çizgi çizilir. Sonrasında iki kez daha HBSS ile yıkanır ve 0. saat görüntüsü alınır. Her 24 saatte bir boşluk birleşinceye kadar görüntü alınır. Analizler ImageJ programı kullanılarak yapılır. ImageJ programında 24 saatlik süreçlerde alınan görüntülerdeki boşluğun uzunluğu ölçülür ve aralarındaki farklar belirlenir. Bu farklılıklar ve geçen zamana göre değerlendirmeler yapılır.

3.13. Northern Blot

Northern Blot, bir RNA örneğindeki gen ifadesinin belirlenmesi, gen tespiti gibi durumlarda kullanılan bir yöntemdir. Northern Blot yöntemi, RNA örneklerinin büyüklüklerine göre elektroforez ayrılması ve hedef dizinin tamamlayıcısı olan probe ile hibridizasyon süreçlerine dayanmaktadır. Bu yöntem, aşağıdaki gibi bazı aşamalardan oluşmaktadır.

Agaroz jelde örneklerin yürütülmesi: Northern Blot'ta ilk olarak formaldehid içeren % 0,9'luk agaroz jel hazırlanır. Agaroz jele, 14 µl RNA örneği, 28 µl yükleme tamponu ve 8 µl yükleme boyası ile birlikte hazırlanır. RNA'ların ikincil yapılarının ayrılmasını sağlamak için 65 °C'de 10 dk inkübe edilir. Eş zamanlı olarak jele 60V'da 5 dk ön yürütme yapılır. İnkübasyonu tamamlanan örnekler jele yüklenir ve 60V'da 2-2:30 saat yürütülür.

Jelden membrana aktarma: Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra kapiller aktarma düzeneği hazırlanarak pozitif yüklü naylon membrana RNA'lar aktarılır. Bu işlem için sandviç modeli kullanılır. Geniş bir kabın içerisine 20X SSC tamponu konulur ve

Vatman kâğıdı bu çözelti ile ıslatılır. Sonrasında üstüne sırasıyla jel, membran, vatman kâğıdı (çoklu) ve peçete (çoklu) konulur. En üstüne de dengeyi bozmayacak şekilde bir ağırlık konulur ve bir gece boyunca membrana aktarılma işlemi yapılır. Ertesi gün, aktarma işlemi sonrasında membran 5X SSC tampon ile 3 defa yıkanır ve UV ışığı altında 1 dk boyunca crosslink yapılır. Aynı zamanda membran ve jelin aktarım sonrasında UV altında görüntüsü alınır. Membran prop muamelesine kadar +4 °C’de bekletilir.

Probun hazırlanması: Prob için, North2South Biotin Random Prime Labeling Kit (#17075) kullanılmıştır. Arındırılmış (purification) 100 ng/μl PCR ürünü, heptanükleotid karışımı ve dH₂O eklenerek 99 °C’de 5 dk kaynatıldı (denatürasyon için). Hemen ardından -80 °C’de muhafaza edilen etil alkol içine daldırıldı. Donan karışım +4 °C’de eriyene kadar bekletildi. Eriyen karışıma, buzun üzerinde 5X dNTP karışımı, 10X reaksiyon tamponu, 1μl Klenow fragmenti ilave edildi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Sonrasında, enzimi etkinsizleştirmek amacıyla üzerine 500 mM EDTA konuldu.

Arındırma protokolü; işaretlenmek istenilen bölge ilk olarak PCR ile çoğaltılıp ve doğruluğu agaroz ile kontrol edildi. High Pure PCR Purification Kit (#11732668001, Roche) ile üretici firmanın tavsiyelerine göre arındırma işlemi yapılır. 100 μl PCR ürünü için 500 μl bağlanma çözeltisi eklenir ve 1 dk maksimum hızda santrifüj edilir. Yıkama çözeltisi ile iki kez yıkanır ve sulandırılır. En son olarak NanoDrop’ta ölçüm yapılır ve prop hazılamak için uygun hale getirilir.

Bağlanmayan nükleotidleri uzaklaştırmak için etanol ile çöktürme: Karışımın üzerine 5M amonyum asetat ve 110 μl soğuk %100’lük etanol koyularak -20 °C’de 15 dk bekletilmiştir. Soğutmalı santrifüjde en yüksek devirde (14 000 rpm) 45 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. 200 μl soğuk %70’lik etanol eklenip, 14000 rpm’de 30 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantı atıldı, alkolün uçması için beklenildi ve pellet 100 μl 1X TE’de çözülerek -20 °C’de saklanmıştır.

Hibridizasyon: Membran 50’lik falkon tüpün içine koyuldu, 5 ml oda ısısına gelmiş hibridizasyon tamponu eklenmiştir ve 55 °C’de 30 dk ön-hibridizasyon yapılmıştır.

Hazırlanan prop 99,9 °C’de 10 dk kaynatıldı ve ardından 5 dk buzda bekletilmiştir. Ardından prob falkon tüpünün içine hibridizasyon tamponun üstüne ilave edilmiştir. 55 °C’de bir gece bekletilmiştir.

Kemilüminesan tespit etme: Kemilüminesan tespit etmek için, Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit (#89880) kullanılmıştır. 22,5 ml stringency tampon üzerine 22,5 ml ddH₂O toplam 45 ml olacak şekilde hazırlanarak 55 °C’ye getirilmiştir. Membran 15 ml’den 3 defa 15’er dakika bu tampon ile yıkanmıştır. 15 dakika önceden oda ısısına getirilmiş blocking tampon konulup, süre sonunda 50 µl Streptavidin-HRP konjugatı bu tampona ilave edilerek 15 dakika daha çalkalanmıştır. 7,5 ml üzerine 22,5 ml dH₂O olacak şekilde 1X yıkama tamponu hazırlanıp, 15 ml’den 5’er dakika bekleyerek 4 defa yıkama işlemi yapılmıştır. 15 ml Substrate Equilibration tamponu eklendi ve 5 dakika çalkalanmıştır. 4 ml Luminol/Enhancer Solüsyonu ve 4 ml Stable Peroxide Solüsyonu ile 8 ml’lik karışım hazırlanmıştır. Membranın her tarafına emdirilerek 5 dakika bekletilmiştir ve Fusion V görüntüleme cihazında kemilüminesan görüntü alınmıştır.

Tablo 3.11. Northern Blot deneylerinde kullanılan kimyasallar ve içerikleri

Tampon ve çözeltiler	İçerik
0,9’luk agaroz jel	0.45 gr agaroz 42,5 ml DEPC’li su 5 ml 10X Northern Buffer 2,5 ml Formaldehit
DEPC içeren distile su	1000 µl DEPC, 1000 ml ddH ₂ O
10X Northern Tamponu	200mM MOPS 0.25M EDTA 3M Sodyum asetat
1.5X Yükleme Tamponu	750 µl formamid 150 µl 10X Northern Tamponu 25 µl ddH ₂ O
20X SSC Tamponu	3M NaCl 0.3M Sodyum Sitrat
5X SSC Tamponu	4:1 oranında 20X SSC tamponu:ddH ₂ O
10X TE Tamponu	1M Tris-HCl (10 ml) 0.5M EDTA (2ml) 88 ml ddH ₂ O
Yükleme Boyası	3.5 ml %100 gliserol 0.001 g bromofenol mavisi 1ml 10X Northern Tamponu 5.5 ml DEPC ddH ₂ O

3.14. İstatistiksel Analizler

Öncelikle, elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlılık derecelerini belirlemeden önce D'Agostino & Pearson omnibus normality test, Shapiro-Wilk normality test ve Kolmogorov-Smirnov test kullanılarak normalite testi yapılmıştır. Bütün sonuçlar için p değeri; $p < 0,05$ olanlar anlamlı kabul edilmiştir. Dahası, grafikler üzerinde gösterilen yıldızların sayısı anlamlılık derecesini göstermektedir: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Gen ifadesi sonuçları değerlendirilirken $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır. Bu çalışmada referans gen olarak GAPDH ve ACTB genleri kullanılmıştır.

($\Delta Ct = \text{Hedef gen} - \text{Referans Gen}$)

Bu formül ile hesaplanan veriler GraphPad Prism 6.02 programında analiz edilmiştir. Ayrıca, meme kanseri, akciğer kanseri ve osteosarkom hücreleri gibi kontrol hücresi olan kanser hücreleri için fold change analizi kullanılmıştır. Böylelikle katlı değişimleri gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, kimyasal ile muamele edilmiş ve edilmemiş hücrelerdeki genlerin ifade seviyeleri analiz edilirken fold change kullanılmıştır. Gen ifadesi seviyelerini negatif ve muamele edilmemiş kontroller ile kıyaslamak için Wilcoxon testi kullanılmıştır.

MTT deneylerinde, spektrofotometreden 550 nm'de ölçülen OD değerlerinin ortalaması alınmıştır ve GraphPad Prism 6.02 programında grafikleri çizilmiştir. Karşılaştırmalar SF ve DMSO grubuna göre yapılmıştır ve etkin dozlar belirlenmiştir. MTT deneylerinde tek yönlü varyans analizlerinden (One-way analysis of variance, ANOVA) Dunnett's çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

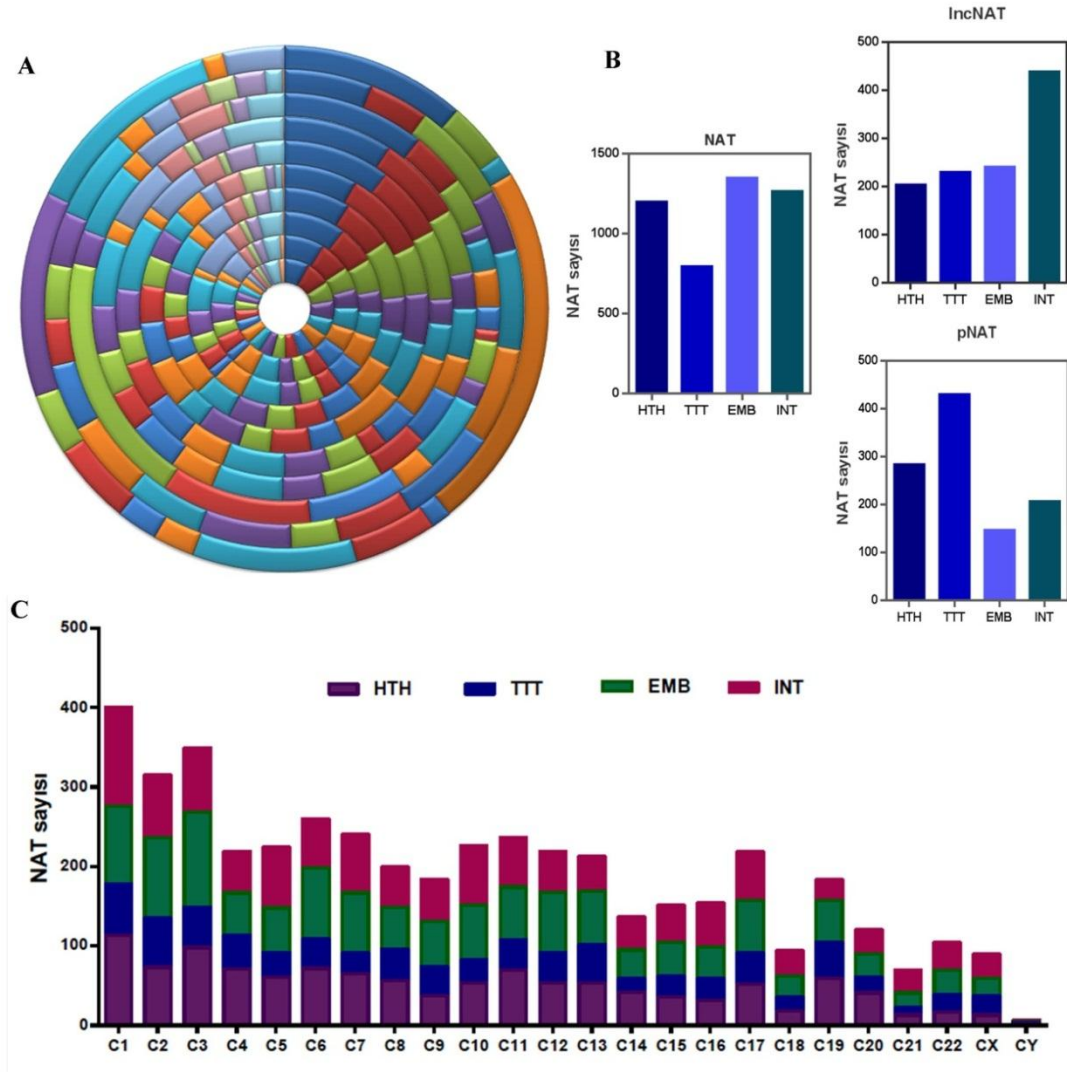
Apoptoz ve hücre döngüsü deneylerinde farklı fazlarda olan % hücre grupları düzenlenmiştir ve gruplar arasındaki karşılaştırmalar için t-testi veya non-parametric Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Yara iyileşmesi deneylerinde SF ve DMSO grubuna kıyasla kimyasal ile maruz bırakılan hücrelerin göç etme kapasitelerinin anlamlılık derecelerini belirlemek için t-testi veya non-parametric Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

4 . BULGULAR

4.1. İnsan Genomunda NAT'ların kromozomal olarak gösterilmesi

Bu tez çalışmasında, NCBI veri tabanında GRCh38.p7 Primary Assembly'e göre Şubat 2017 tarihine kadar yayınlanmış, kromozomlar üzerindeki NAT'lar belirlenmiştir. Daha önceleri NAT, protein kodlayan genin karşı sarmalından kodlanan transkript olarak tanımlanmaktaydı. Ancak, bizim araştırmalarımıza göre NAT, protein kodlayan genin karşı sarmalından kodlanan protein, lncRNA, miRNA, snoRNA, tRNA gibi diğer RNA moleküllerini de içermektedir. Buna benzer olarak bir lncRNA'nın karşı sarmalından kodlanan lncRNA, miRNA, snoRNA ve tRNA molekülleri de NAT olarak adlandırılabilir. Örneğin; X kromozomunda XIC bölgesinden yazılımı gerçekleşen XIST lncRNA molekülünün karşı sarmalından TSIX lncRNA geni kodlanmaktadır ve bu iki lncRNA molekülü arasında ilişki olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (168, 169, 179). Benzer olarak, 19. kromozomdan kodlanan WDR83 proteini ve bunun karşı sarmalından kodlanan DHPS proteininin birbirleri ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir (191).

Yapılan informatik araştırmalar neticesinde farklı sınıflarda bulunan NAT'ların 24 kromozomdaki sayıları ve alt türleri hesaplanmıştır (Tablo 4.1, Şekil 4.1). Bilindiği üzere 1. kromozom, en uzun ve üzerinde en fazla gen kodlanan kromozomdur. Bizim sonuçlarımızda da en fazla NAT sayısı 1. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Kromozomlardan kodlanan genlerin oranına göre NAT oranı arasında doğru bir ilişki olduğu görülmektedir. Buna karşın, Y kromozomu en az gen kodlanan kromozomdur ve bu kromozomdaki NAT oranı da oldukça düşüktür. İnsan genomunda, NAT'larda en fazla EMB alt türü görülürken lncNAT'larda INT alt türü, pNAT'larda da TTT alt türü görülmektedir (Şekil 4.1).

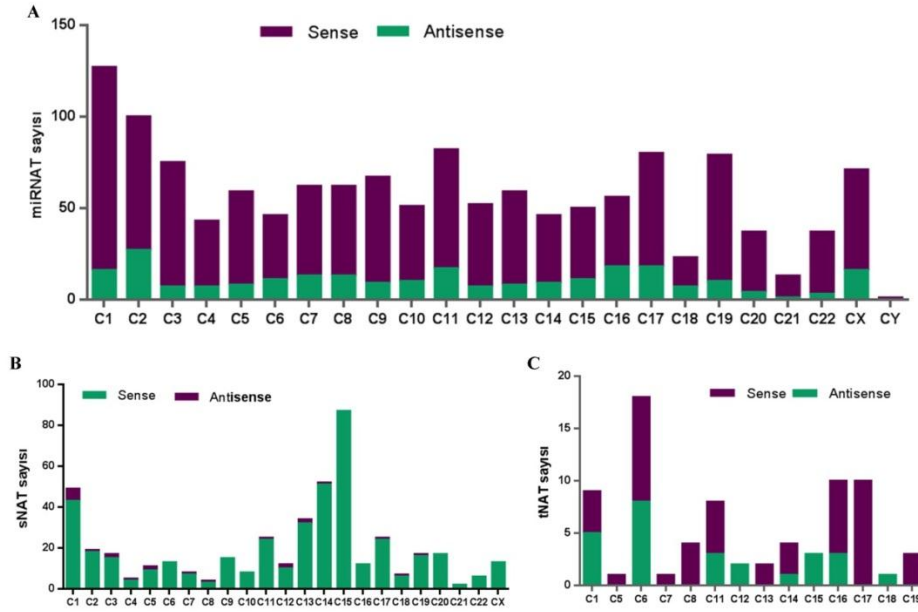


Şekil 4.1. İnsan genomundaki NAT'lar gösterilmiştir. **A.** NAT, lncNAT, pNAT, miRNA, tNAT, snoNAT olmak üzere bütün kromozomlardaki NAT çeşitleri gösterilmiştir. **B.** Genomda, NAT, lncNAT ve pNAT'ların alt türlerinin sayısı gösterilmiştir. **C.** 1- 22 ve X, Y kromozomlarında NAT'ların kromozomal sayısı ve türleri gösterilmiştir.

İnsan genomunda, miRNA, tRNA, scnRNA, snRNA ve snoRNA gibi küçük RNA molekülleri ile aynı yönlü ve/veya karşıt yönlü olarak sentezlenen transkriptler bulunmaktadır. Bunlara en yaygın örnek miRNAHG (micro RNA Host Gene) olarak adlandırılan miRNA'ların kodlandığı öncül transkript ve küçük RNA'ların türevlendiği ribozomal RNA genlerinin kodlandığı transkriptler verilebilir. Transkript ilk olarak

uzun şekilde kodlanır (protein kodlayabilir veya kodlayamaz) ve sonrasında bu transkriptin intron/ekzon bölgesinden küçük RNA molekülleri türevlenir. Bu çalışmada, insan genomunda, küçük RNA moleküllerini kodlayan transkriptlerin sense ve antisense sarmalından sentezlenen RNA transkriptleri belirlenmiştir ve kromozomal olarak gösterilmiştir (Şekil 4.2).

İnsan kromozomlarındaki miRNA'ların aynı yönlü transkriptlerin intronik/ekzonik bölgelerinden -sense transkript- yazıldığı görülmüştür. Ancak genomda bunun aksi olan antisense miRNA'ların olduğu durumda mevcuttur. Bunun yanı sıra, genomda diğer küçük RNA moleküllerinin sense transkript oranları antisense transkript oranlarına göre fazla olduğu gösterilmiştir. Ancak diğer küçük RNA sınıfı olan tRNA'larda durum biraz daha farklıdır. MiRNA'lar ve sRNA'lar hemen hemen tüm kromozomlarda transkripte edilirken tRNA'lar tüm kromozomlardan transkripte edilmemektedir. Bunun yanı sıra, tRNA transkriptlerinin diğer transkriptler ile örtüşen bölgeler içeren sense-antisense oranı neredeyse aynıdır.



Şekil 4.2. miRNA, sRNA ve tRNA transkriptlerinin genomdaki aynı yönlü ve karşıt yönlü transkriptlerinin sayısı gösterilmiştir. **A.** miRNAT'ların kodlanan bölgede örtüşen dizileri olan sense ve antisense transkript sayısını göstermektedir. **B.** sNAT'ların kodlanan bölgede örtüşen dizileri olan sense ve antisense transkript sayısını göstermektedir. **C.** tNAT'ların kodlanan bölgede örtüşen dizileri olan sense ve antisense transkript sayısını göstermektedir.

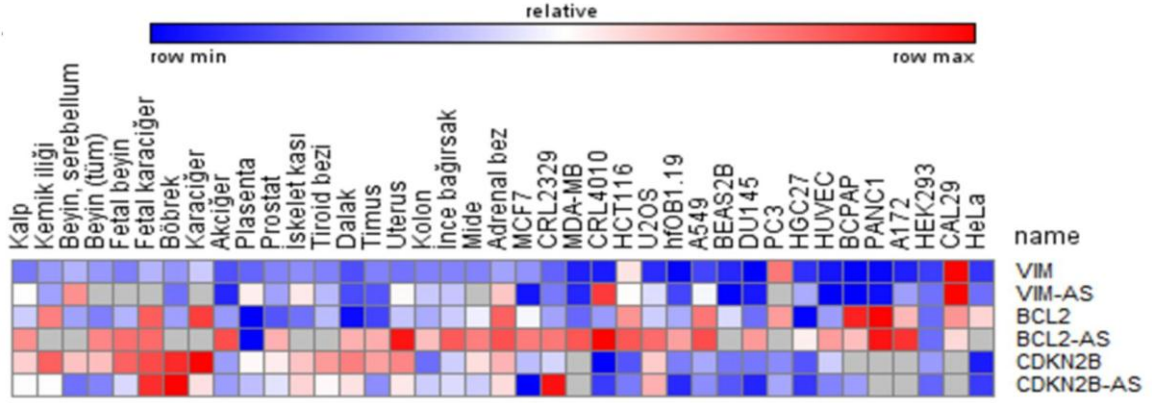
NAT'ları detaylı bir şekilde inceledikten sonra, kanser süreçlerinde önemli rollerinin olduğu bilinen VIM, BCL2 ve CDKN2B genlerinin ve bunların karşı sarmalından sentezlenen transkriptlerden HTH, TTT ve EMB olmak üzere üç tane seçilmiştir. Bundan sonraki aşamalara seçilen genler üzerinden devam edilmiştir.

Tablo 4.1. İnsan genomundaki NAT çeşitlerinin sayısı ve türelere göre dağılımı gösterilmiştir.

NAT çeşidi	NAT alt türü			
	HTH	TTT	EMB	INT
NAT	1199	795	1349	1266
lncNAT	204	230	241	439
pNAT	284	430	147	207
	Antisense		Sense	
miRNAT	250		1128	
sNAT	22		435	
tNAT	26		50	

4.2. Farklı Doku ve Hücre Hatlarında Gen İfadesinin Değerlendirilmesi

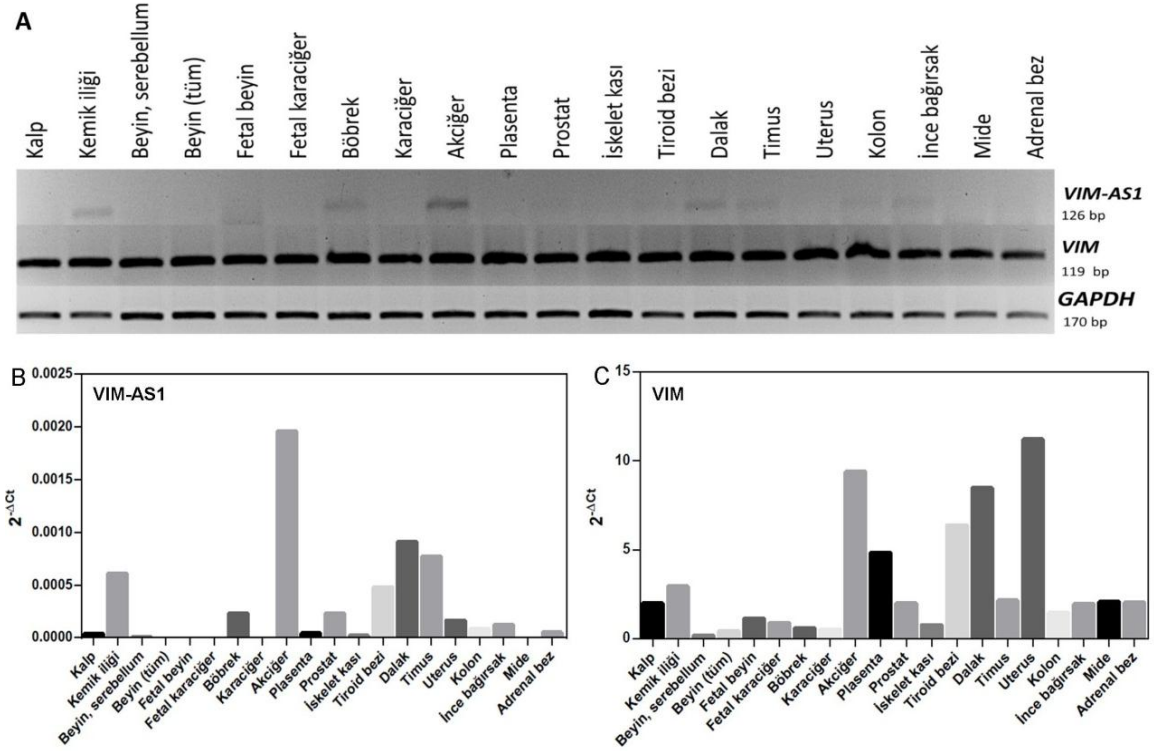
Yirmi tane normal insan dokusu ve 19 tane hücre hattından elde edilen örneklerde, VIM, VIM-AS1, CDKN2B, CDKN2B-AS1, BCL2 ve LOC105372161 genleri için gen ifade analizi yapılmıştır. Bu bağlamda, protein kodlayan genlerin ve antisense ipliğinden kodlanan lncRNA'ların gen ifade seviyeleri gösterilmiştir. Yapılan deneyler neticesinde genel olarak protein kodlayan genler, çalışmada kullanılan bütün doku ve hücre hatlarında ifade gösterirken antisense iplikten kodlanan lncRNA'ların dokuya ve hücre hatlarına spesifik gen ifadesi gösterdiği bulunmuştur. RT-PCR ve qPCR yöntemlerinde çalışılan 20 farklı insan dokusunda ve 19 tane hücre hattında VIM, VIM-AS1, CDKN2B, CDKN2B-AS1, BCL2 ve LOC105372161 genlerinin ifade sonuçları aşağıdaki gibidir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Çalışmada kullanılan genlerin farklı doku ve hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin $2^{-\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak oluşturulan heat-map grafiği.

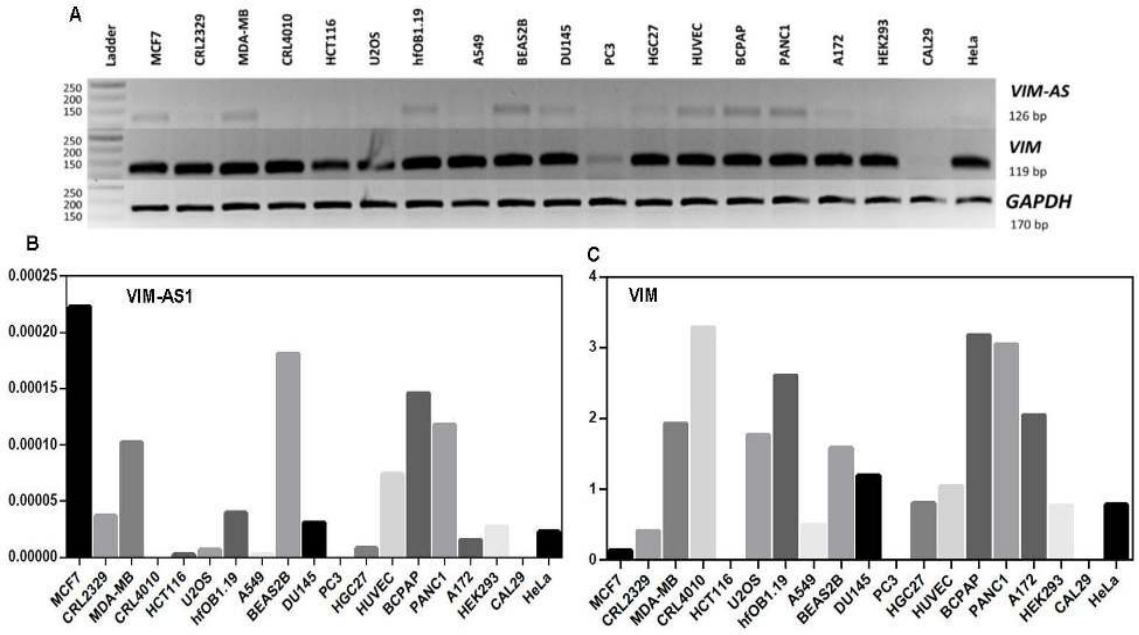
4.2.1. VIM ve VIM-AS1 genlerinin doku ve hücrelerdeki ifade seviyeleri

RT-PCR yöntemi ile yapılan çalışmalar neticesindeki VIM ve VIM-AS1 genlerinin doku ve hücrelerdeki ifadesi Şekil 4.4 ve 4.5'te gösterilmiştir. RT-PCR sonucuna göre VIM geninin tüm dokularda yüksek ifade seviyesine sahip olduğu görülürken, VIM-AS1'in bazı dokularda ifade edildiği bazılarında ise ifade edilmediği görülmektedir. Örneğin; akciğer dokusunda en yüksek ifade edilen VIM-AS1, kalp, beyin, karaciğer, mide, adrenal bez gibi dokularda neredeyse hiç ifade edilmemektedir. Benzer şekilde qPCR sonucuna göre, VIM-AS1 en yüksek akciğer, dalak ve timus dokularında ifade edilirken, beyin, karaciğer ve mide gibi dokularda bu genin ifadesi yoktur. Ayrıca, VIM geninin tüm dokularda ifade edildiği qPCR yöntemi ile de doğrulanmıştır. Bu genin, uterus ve akciğer dokularında en yüksek ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.4. VIM, VIM-AS1 ve GAPDH genlerinin farklı dokulardaki ifade seviyeleri gösterilmiştir. **A.** RT-PCR yöntemi ile VIM, VIM-AS1 ve GAPDH genlerinin ifade seviyelerinin gösterilmesi. **B.** qPCR sonucunda, VIM-AS1 geninin ifade seviyesi **C.** qPCR sonucunda, VIM geninin ifade seviyesi.

Hücre kültür örneklerindeki VIM ve VIM-AS1 ifade sonuçlarında da VIM geninin ifade seviyesi tüm hücrelerde yüksek iken, VIM-AS1 doku örneklerinde olduğu gibi bazı hücrelerde özgüllük göstermektedir. RT-PCR sonucunda, CRL4010, HCT116, CAL29 hücrelerinde VIM-AS1 ifadesi görülmezken hfOB1.19, BEAS2B, BCPAP, PANC1 gibi hücrelerde ifadesi en yüksek seviyededir. Buna paralel olarak qPCR sonucunda, en yüksek VIM-AS1 ifadesi BEAS2B, MCF7 ve BCPAP hücrelerinde görülürken, CRL4010, PC3 ve CAL29 hücrelerinde VIM-AS1 ifadesi yoktur. Bununla beraber hücrelerdeki VIM ifadesi dokudaki VIM ifadesine göre değişiklik göstermektedir. CAL29, HCT116 ve PC3 hücre hatlarında VIM ifade seviyesi en düşük olarak bulunmuştur, bunun aksine VIM geni, CRL4010, BCPAP ve PANC1 hücre hatlarında en yüksek seviyede ifade göstermektedir.

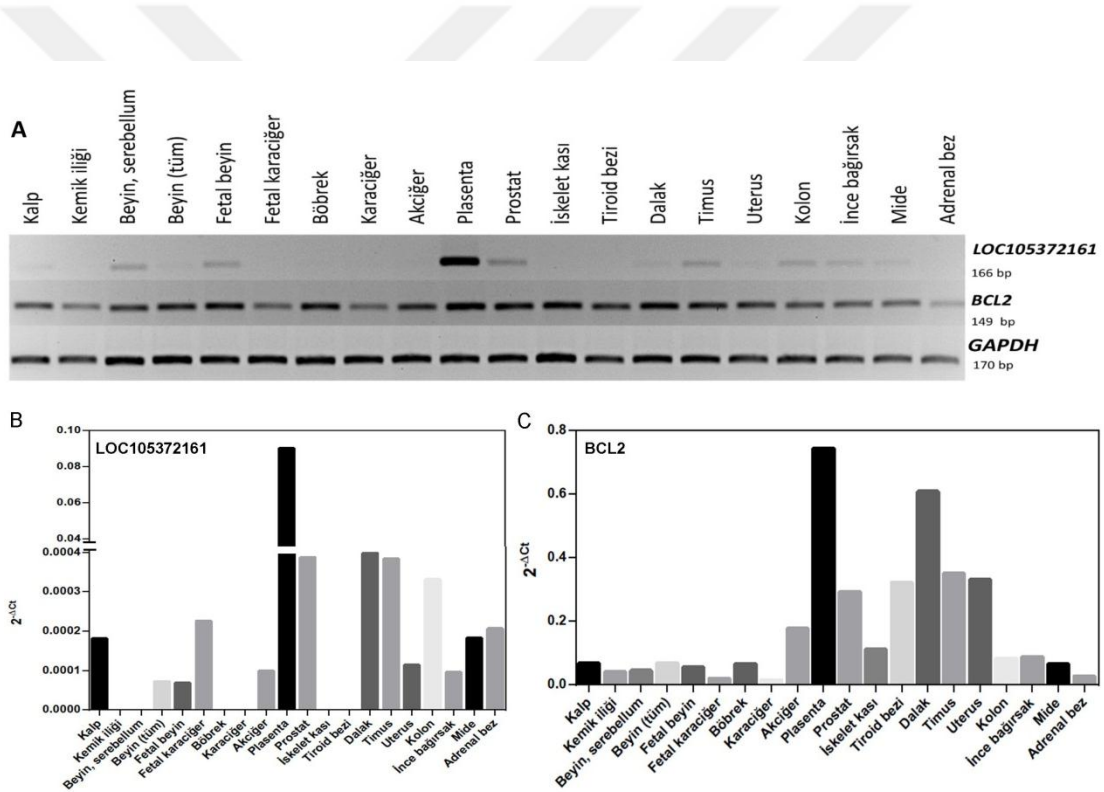


Şekil 4.5. VIM, VIM-AS1 ve GAPDH genlerinin farklı hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin gösterilmesi. **A.** RT-PCR yöntemi ile VIM, VIM-AS1 ve GAPDH genlerinin ifade seviyelerinin gösterilmesi. **B.** qPCR sonucunda, VIM-AS1 geninin ifade seviyesi **C.** qPCR sonucunda, VIM geninin ifade seviyesi.

Aynı kökenli olan hücre/doku grupları değerlendirildiğinde; normal meme hücresi olan CRL4010'a kıyasla MCF7, CRL2329, ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında VIM geninin ifade seviyesi düşük bulunurken VIM-AS1 geninin ifade seviyesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun aksine U2OS ve A549 hücrelerinde normal hücrelere kıyasla VIM-AS1 ifadesinde düşüş bulunmuştur. Ayrıca, VIM-AS1 geninin normal akciğer dokusunda diğer normal insan dokularına kıyasla ifade seviyesi oldukça yüksektir. Dahası, normal akciğer epitel hücresi BEAS2B hücre hattında VIM-AS1 geninin ifade seviyesinin yüksek akciğer kanseri A549 hücre hattında bu lncRNA molekülünün ifade seviyesi ciddi derecede azalmıştır. Buna ek olarak, beyin (serebellum) ve tüm beyin dokularında VIM-AS1 geninin ifade seviyesi hiç görülmezken A172 glioblastoma hücre hattında bu genin ifadesinin olduğu bulunmuştur. Böylelikle VIM-AS1 bazı kanser türlerinin oluşumunda ve/veya ilerlemesinde önemli bir düzenleyici molekül olabilir.

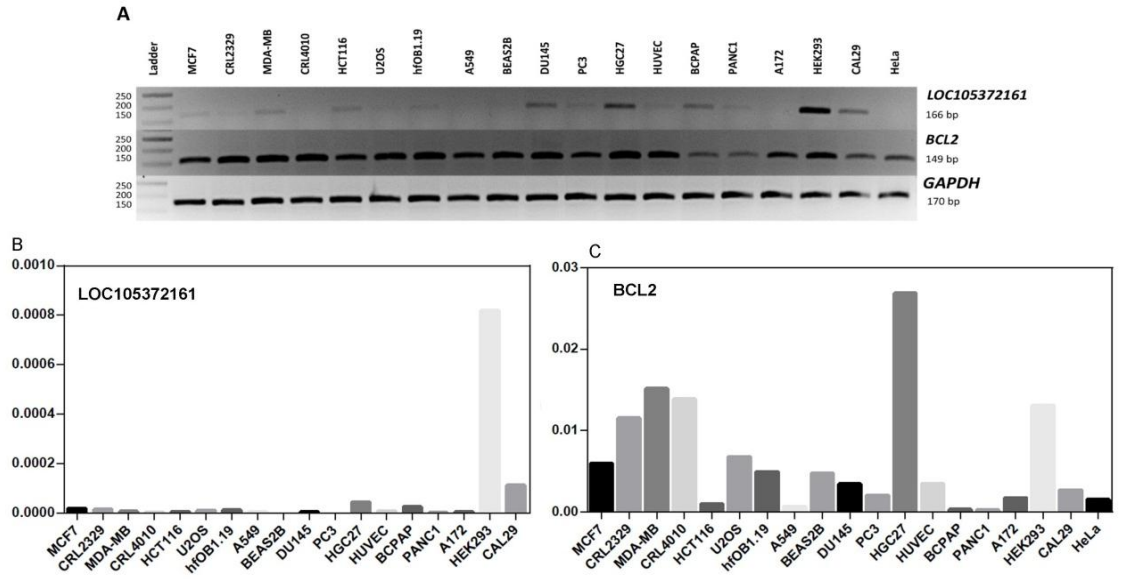
4.2.2. BCL2 ve LOC105372161 genlerinin doku ve hücrelerdeki ifade seviyeleri

BCL2 ve antisense ipliğinden sentezlenen LOC105372161 genlerinin doku ve hücrelerdeki ifadesi Şekil 4.6 ve 4.7’te gösterilmiştir. RT-PCR sonucuna göre BCL2 geni, tüm dokularda ifade gösterip bu ifadenin doku türüne göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bununla birlikte, LOC105372161 geninin ise dokuya göre farklı ifade paternine sahip olduğu bulunmuştur. BCL2, plasenta, dalak ve iskelet kası dokularında en yüksek ifade seviyesine sahip iken, kemik iliği, karaciğer ve adrenal bez gibi dokularda daha düşük ifade seviyesinde olduğu bulunmuştur. Bununla beraber, LOC105372161 en çok plasenta, prostat, dalak, timus dokularında ifade edilirken; kalp, kemik iliği, böbrek, tiroid bezi gibi dokularda neredeyse hiç ifade edilmediği bulunmuştur.



Şekil 4.6. BCL2, LOC105372161 ve GAPDH genlerinin farklı insan dokularındaki ifade seviyeleri gösterilmiştir. **A.** RT-PCR yöntemi ile BCL2, LOC105372161 ve GAPDH genlerinin ifade seviyelerinin gösterilmesi. **B.** qPCR sonucunda, LOC105372161 geninin ifade seviyesi **C.** qPCR sonucunda, BCL2 geninin ifade seviyesi.

Doku profiline benzer şekilde hücre kültürü örneklerinde de BCL2 ve LOC105372161 genlerinin ifade seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, LOC105372161 en yüksek HEK293, CAL29, DU-145 hücre hatlarında ifade seviyesi göstermektedir. Aksine, CRL4010, A172, HeLa gibi hücre hatlarında en düşük ifade seviyesinde olduğu veya hiç ifade edilmediği bulunmuştur. Bununla beraber, BCL2 geni en yüksek HGC27 ve HEK293 hücrelerinde ifade edilirken; en düşük BCPAP, PANC1 ve CAL29 hücrelerinde ifade edilmektedir (Şekil 4.7).

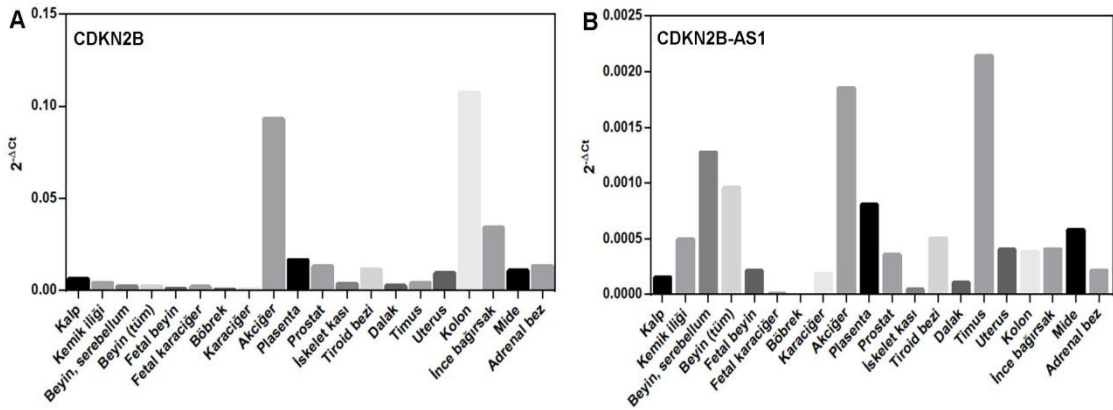


Şekil 4.7. BCL2, LOC105372161 ve GAPDH genlerinin farklı hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin gösterilmesi. **A.** RT-PCR yöntemi ile BCL2, LOC105372161 ve GAPDH genlerinin ifade seviyelerinin gösterilmesi. **B.** qPCR sonucunda, LOC105372161 geninin ifade seviyesi **C.** qPCR sonucunda, BCL2 geninin ifade seviyesi.

Aynı kökenli olan hücre/doku grupları değerlendirildiğinde; BCL2 geni ve karşı sarmalından sentezlenen LOC105372161 geni arasında bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır. BCL2 geni normal meme hücresi olan CRL4010'a kıyasla diğer meme kanseri hücrelerinde değişiklik gösterirken, LOC105372161 geninin ifade seviyesi kanserli hücrelerde artış göstermektedir. Buna ek olarak normal prostat dokusunda LOC105372161 geninin ifade seviyesi diğer insan dokularına kıyasla yüksek bulunurken DU-145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarında bu genin ifade seviyesi oldukça düşüktür.

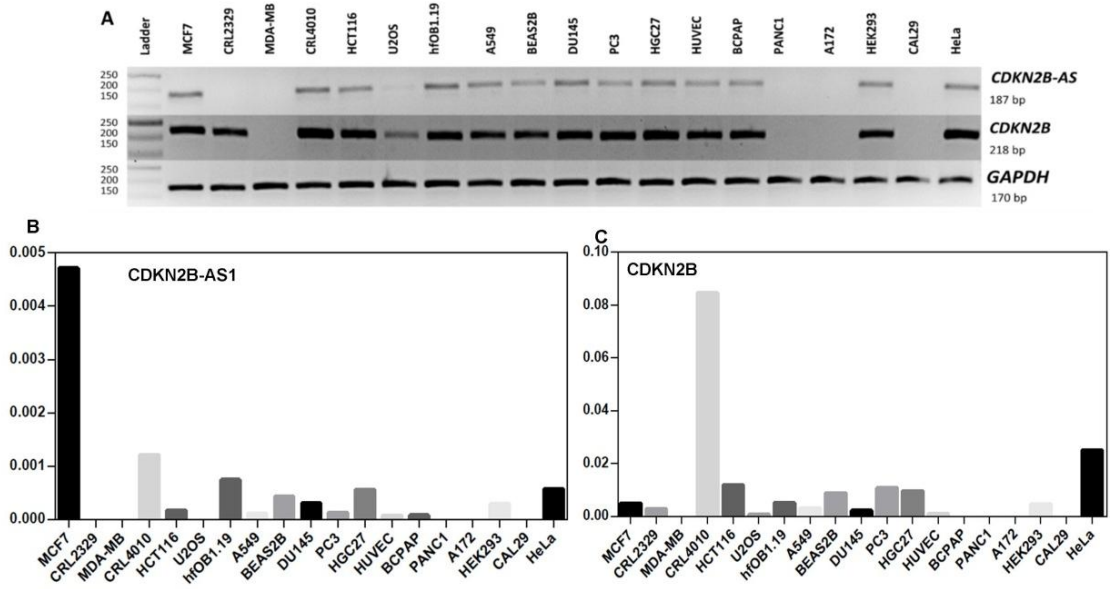
4.2.3. CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin doku ve hücrelerdeki ifade seviyeleri

CDKN2B-AS1 ve bu genin iç kısmından ve ters yönde sentezlenen protein kodlayan CDKN2B geninin qPCR yöntemi ile çeşitli insan dokularında ve hücre hatlarında gen ifade seviyeleri değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda, CDKN2B geni en yüksek akciğer, kolon ve ince bağırsak hücrelerinde ifade edildiği bulunmuştur ve bunun yanı sıra böbrek, karaciğer ve fetal beyin dokularında ise çok daha düşük bir ifade seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.8) Buna ek olarak, CDKN2B-AS1 kodlanmayan RNA geni ise timus, akciğer ve serebellum dokularında aşırı ifade edilmiş olarak bulunurken böbrek, fetal karaciğer ve dalak gibi dokularda düşük ifade edildiği bulunmuştur.



Şekil 4.8. qPCR yöntemi ile CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin farklı dokulardaki ifade seviyeleri gösterilmiştir. **A.** CDKN2B geninin ifade seviyesi **B.** CDKN2B-AS1 geninin ifade seviyesi

Hücre kültürü örneklerinde CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin RT-PCR ve qPCR yöntemleri sonucunda gen ifade seviyeleri kıyaslanmıştır. CDKN2B geni, diğer çalışılan protein kodlayan genlerin aksine, MDA-MB-231, PANC1, A172 ve CAL29 hücrelerinde ciddi bir şekilde ifade seviyesi düşük bulunurken, CRL4010, HGC27 ve HeLa hücrelerinde aşırı ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur. CDKN2B-AS1 ifadesi ise CDKN2B hücreleri ile benzer ifade paterni göstermektedir. Farklı olarak ise, CDKN2B-AS1 geni CRL2329 ve U2OS hücrelerinde de düşük ifade göstermektedir. Bunun yanı sıra CDKN2B ifadesine kıyasla CDKN2B-AS1 ifadesi çalışılan hücrelerde daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.7).

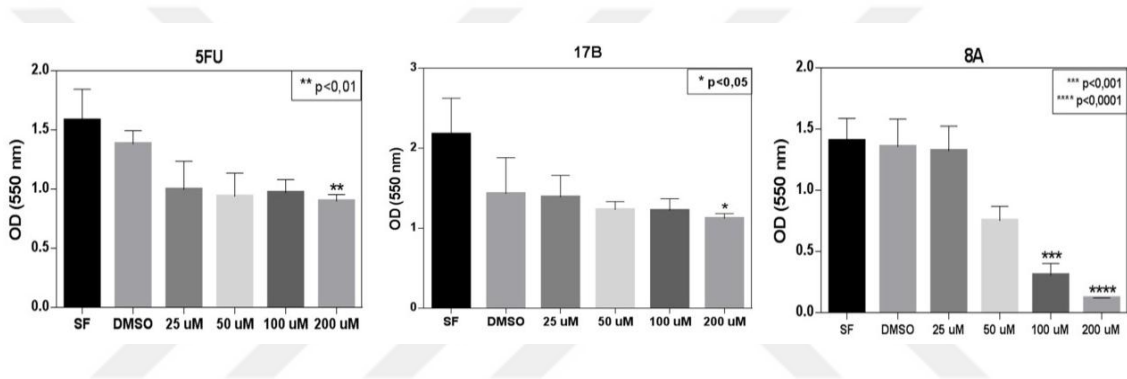


Şekil 4.9. CDKN2B, CDKN2B-AS1 ve GAPDH genlerinin farklı hücre hatlarındaki ifade seviyelerinin gösterilmesi. **A.** RT-PCR yöntemi ile CDKN2B, CDKN2B-AS1 ve GAPDH genlerinin ifade seviyelerinin gösterilmesi. **B.** qPCR sonucunda, CDKN2B-AS1 geninin ifade seviyesi **C.** qPCR sonucunda, CDKN2B geninin ifade seviyesi.

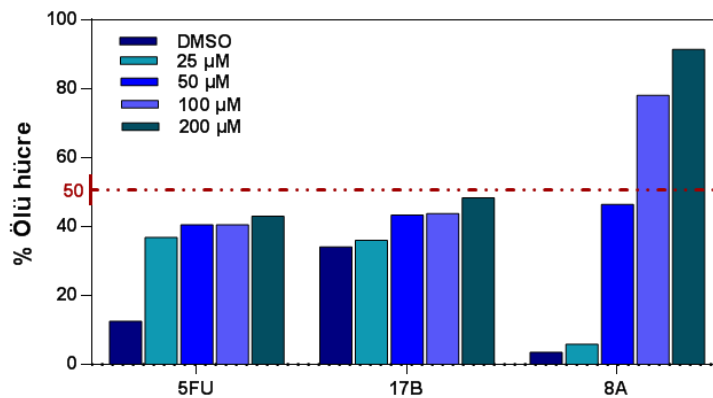
CDKN2B ve CDKN2B-AS1 gibi EMB transkriptlerin birlikte ifade edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, CDKN2B geni, CRL4010, HeLa gibi hücre hatlarında yüksek ifade edilirken aynı şekilde CDKN2B-AS1 geni de yüksek ifade edilmiştir. Bunun aksine, MDA-MB-231, A172, CAL29 hücrelerinde ise CDKN2B ve CDKN2B-AS1 gen ifade seviyelerinin hiç olmaması aralarında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir. U2OS osteosarkom hücrelerinde hFOB1.19 normal hücre ile kıyaslandığında CDKN2B ve CDKN2B-AS1 ifade seviyeleri benzer şekilde düşüş göstermiştir. Bunun yanı sıra, normal kolon dokusu ile HCT116 hücre hattındaki bu genlerin ifade seviyeleri karşılaştırıldığında ise, birbirlerine paralel olarak bir azalma gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, normal akciğer dokusunda CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyeleri diğer dokulara oranla oldukça yüksek bulunmuştur. Normal akciğer hücresi BEAS2B'ye kıyasla A549 akciğer kanseri hücre hattında bu genlerin ifade seviyelerinin yüksek olduğu gösterilmiştir.

4.3. Hücre Canlılığı Analizleri ve Kimyasalların Sitotoksisitetlerinin ve Toksisite Değerlerinin Belirlenmesi

BEAS2B hücre hattında, 5-FU, 8A, 17B maddelerinin hücre canlılığı üzerinde etkisi MTT deneyleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). 5-FU ve 17B kimyasalları çalışılan dozlarda etki göstermezken 8A kimyasalının 100 μ M ve 200 μ M'lık konsantrasyonlarının BEAS2B hücreleri için toksik olduğu gösterilmiştir. MTT deney verilerinden yola çıkılarak, hücrelerin yarısını öldüren etkin doz IC50 (lethal dose, IC50) değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.2). Bunun yanı sıra, 17B ve 8A kimyasallarının etkin dozlarının ve etkin dozun bir üst konsantrasyondaki dozların MTT deneyleri yapılan hücrelerde LDH etkinlikleri belirlenmiştir (Tablo 4.3).

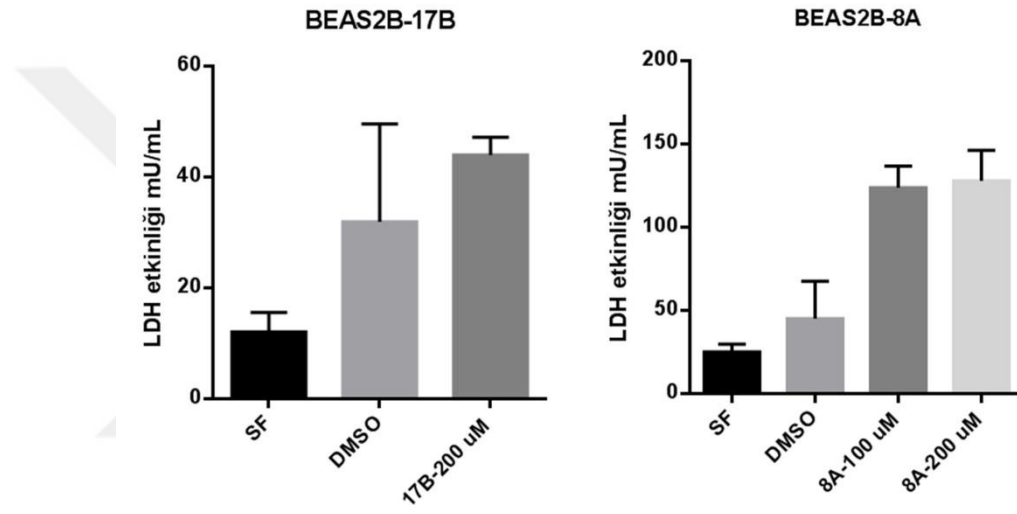


Şekil 4.10. BEAS2B hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.11. BEAS2B hücrelerinde 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarının doza bağlı olarak hücre ölümü üzerine etkisi.

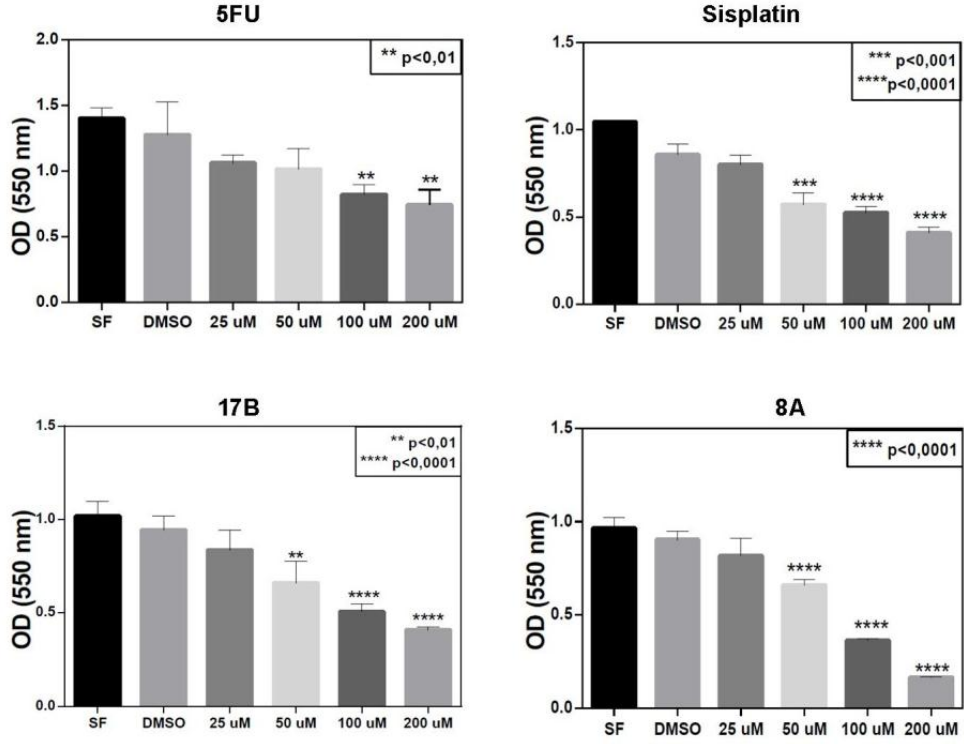
BEAS2B hücre hattında 17B ve 8A kimyasal maddelerinin toksisiteleri LDH deneyleri ile gösterilmiştir. Şekil 4.12’de BEAS2B hücrelerinde bu kimyasalların LDH etkinlikleri gösterilmiştir. 17B kimyasalının en yüksek dozunda 50 mU/mL LDH etkinliği görülmektedir. 8A kimyasalı 200 μ M konsantrasyonda bütün hücrelerde toksik olduğundan bu kimyasalın 100 μ M ev 200 μ M dozlarındaki LDH etkinliği gösterilmiştir. 100 μ M dozda, 120 mU/mL LDH etkinliğine sahip iken, 200 μ M dozda 130 mU/mL LDH etkinliği gösterdiği bulunmuştur.



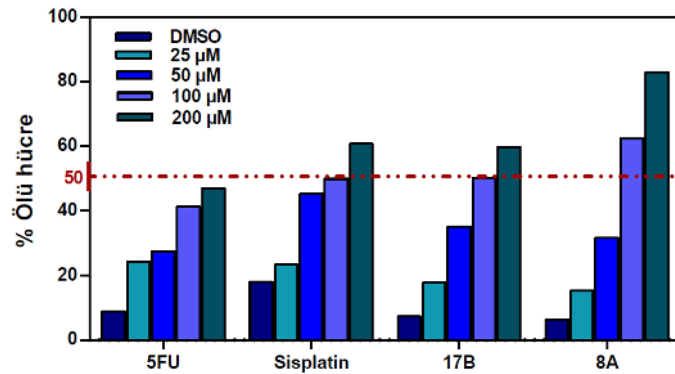
Şekil 4.12. BEAS2B hücrelerinde 17B ve 8A kimyasal maddelerinin LDH etkinlikleri.

A549 hücre hattında, 5-FU, 8A, 17B ve Sisplatin maddelerinin hücre canlılığı üzerinde etkisi MTT deneyleri ile belirlenmiştir. Hücrelerin yaklaşık olarak yarısını öldüren etkin dozlar belirlenmiştir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14). 5-FU verilen A549 hücrelerinde etkin dozun 200 μ M olduğu belirlenmiştir, diğer dozların da öldürücü etkisinin olduğu gösterilmiştir fakat bu istatistiksel olarak anlamlı değildir. A549 hücrelerine sisplatin verildiğinde etkin doz 100 μ M olarak bulunmuştur. 25 ve 50 μ M dozları etkin değildir ve bunun yanı sıra 200 μ M dozunun toksik olduğu gösterilmiştir. 17B kimyasal maddesi verilen A549 akciğer kanseri hücresinde, etkin doz 100 μ M olarak

belirlenmiştir. Aynı şekilde 8A maddesi verilen hücrede etkin doz 100 μ M olarak bulunmuştur ve 17B’de olduğu gibi 200 μ M dozunun toksik olduğu gösterilmiştir.

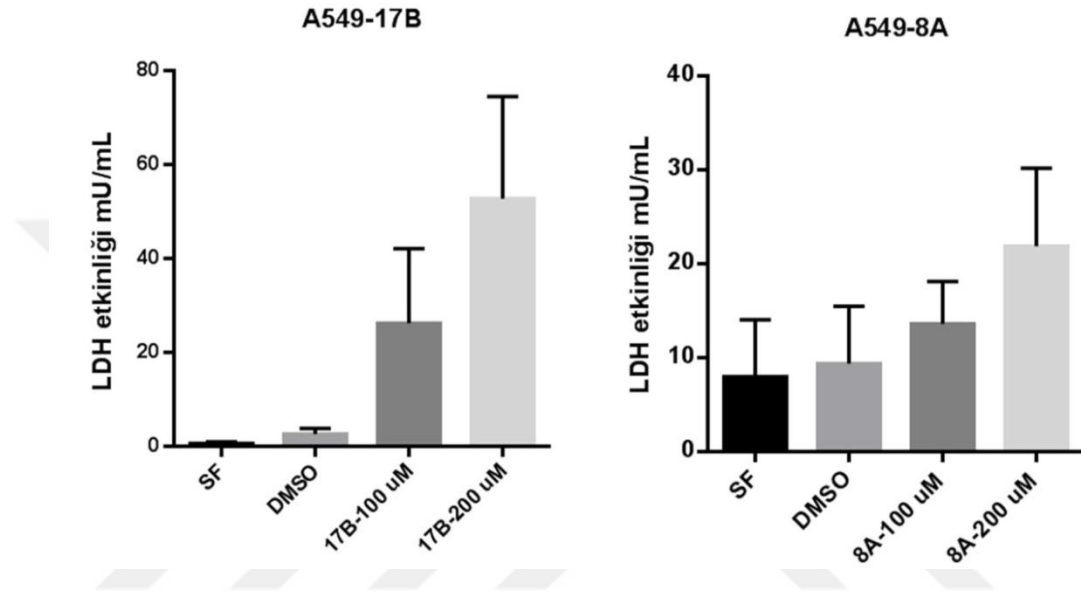


Şekil 4.13. A549 hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.



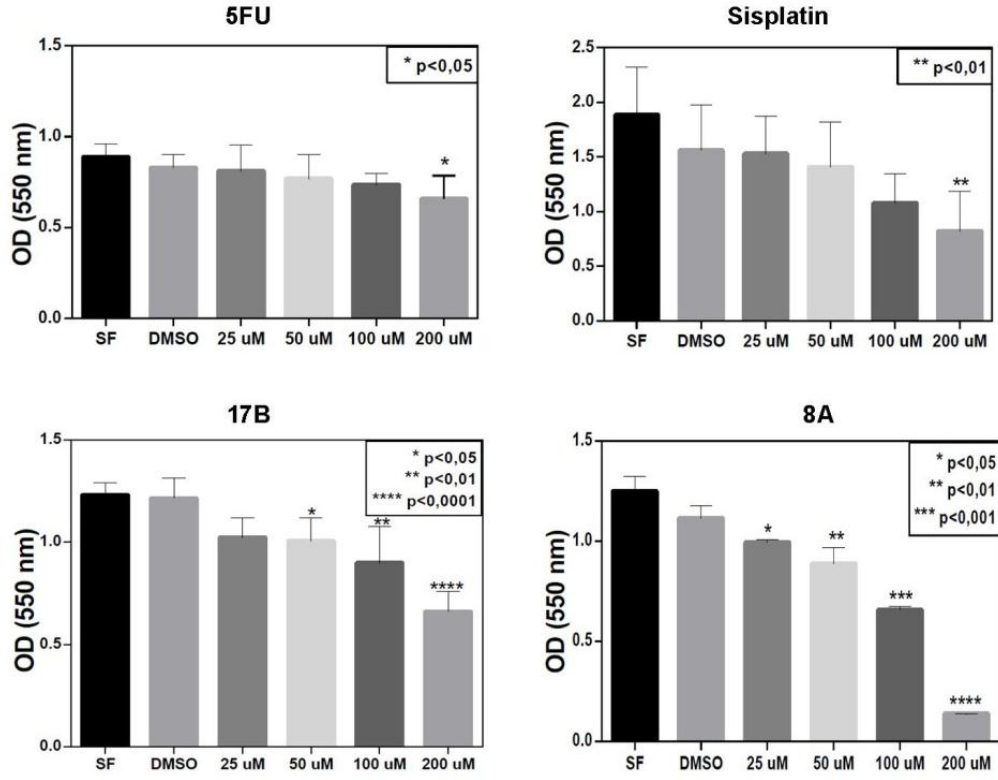
Şekil 4.14. A549 hücre hattında kimyasal maddelerin hücre canlılığına etkisi.

A549 hücre hattında etkin dozları 100 μ M olarak bulunan 17B ve 8A kimyasallarının LDH etkinlikleri belirlenmiştir (Şekil 4.15). 17B kimyasalının etkin dozun bir üst dozunun (200 μ M) etkin doza kıyasla daha fazla LDH etkinliğine sahip olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak 8A kimyasalı ile maruz bırakılan A549 hücre hattında etkin dozun ortalama 15 mU/mL LDH etkinliğinde olduğu bulunmuştur ve 200 μ M dozun ise etkin doza göre daha yüksek LDH etkinliğine sahip olduğu gösterilmiştir.

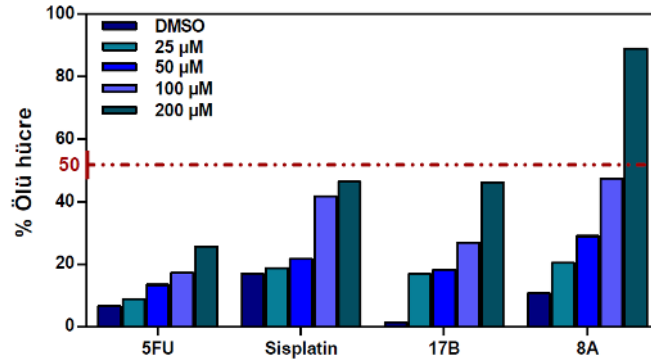


Şekil 4.15. A549 hücre hattında 17B ve 8A kimyasal maddelerinin LDH etkinlikleri.

CRL4010 hücre hattında; 5-FU, 8A, 17B ve Sisplatin maddelerinin hücre canlılığı üzerinde etkisi MTT ve LDH deneyleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). CRL4010 normal meme epiteli hücre hattında verilen kimyasalın seçilen aralıkta etkin olmadığı bulunmuştur. Fakat diğer deney sonuçlarında da olduğu gibi 8A maddesinin 200 μ M dozu CRL4010 hücreleri için de toksik olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.17).



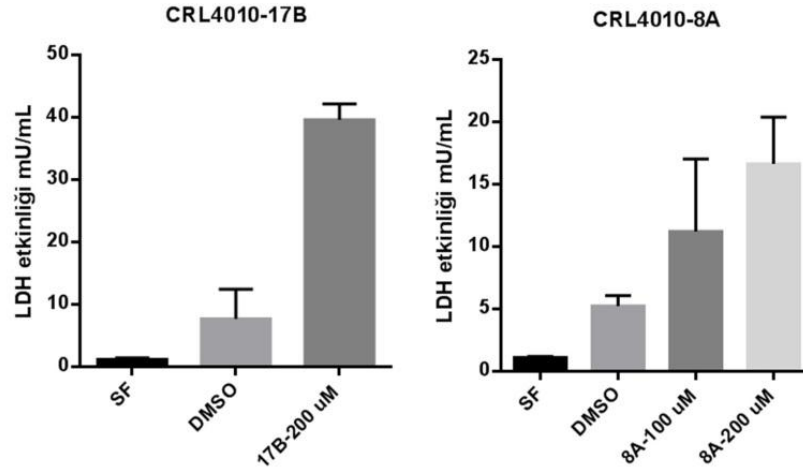
Şekil 4.16. CRL4010 hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.17. CRL4010 hücre hattında kimyasal maddelerin hücre canlılığına etkisi.

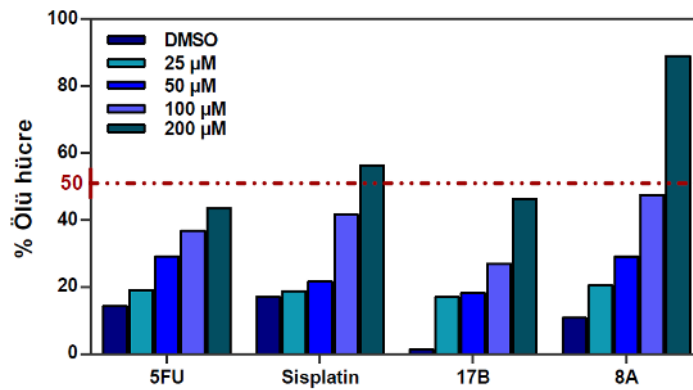
CRL4010 hücre hattında, 17B kimyasalının 200 µM dozunun 40 mU/mL LDH etkinliğine sahip olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda, 8A kimyasalının sırasıyla 100

μM dozunun 12 mU/mL, 200 μM dozunun ise 18 mU/mL LDH etkinliği gösterdiği bulunmuştur (şekil 4.18).

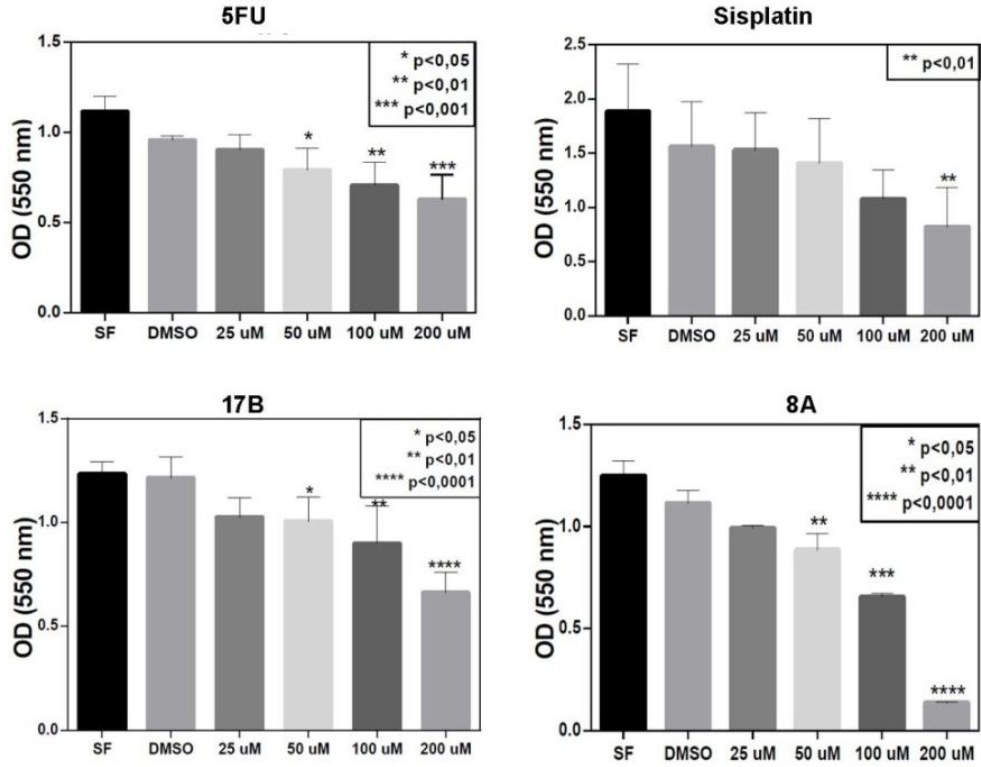


şekil 4.18. CRL4010 hücrelerinde 17B ve 8A kimyasal maddelerinin LDH etkinlikleri.

MCF7 hücre hattında; 5-FU, 8A, 17B ve Sisplatin maddelerinin hücre canlılığı üzerinde etkisi MTT deneyleri ile belirlenmiştir (şekil 4.19 ve şekil 4.20). MCF7 hücre hattına 5-FU kimyasal maddesi verildiğinde etkin doz 200 μM olarak bulunmuştur, bunu takiben sırasıyla, Sisplatin, 17B ve 8A kimyasallarına maruz bırakıldığında ise etkin dozlar 200 μM , 200 μM ve 100 μM şeklinde-dir. 8A kimyasalının 200 μM konsantrasyonunun MCF7 hücresi için oldukça toksik olduğu gösterilmiştir.

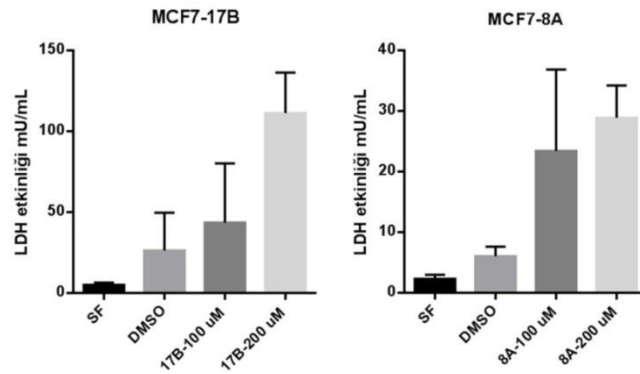


şekil 4.19. MCF7 hücre hattında kimyasal maddelerin doza bağımlı olarak hücre canlılığına etkisi.



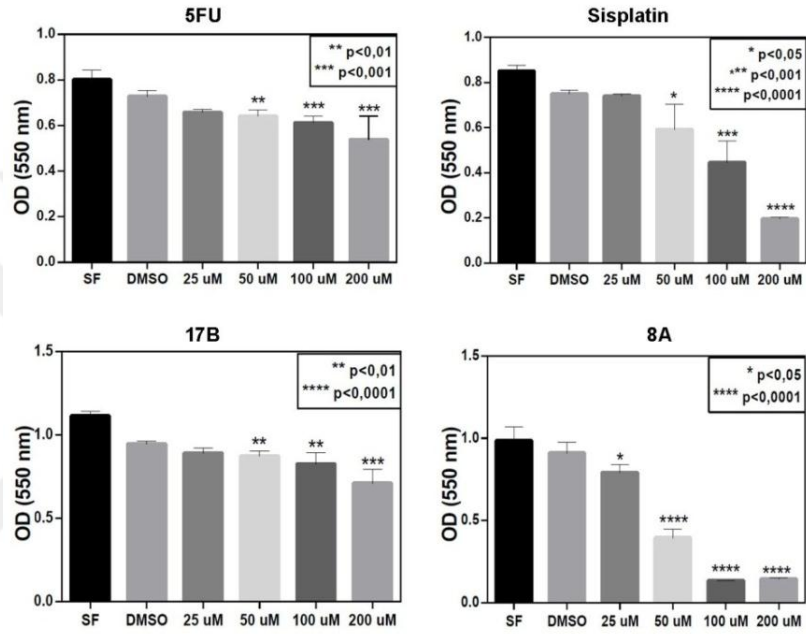
Şekil 4.20. MCF7 hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.

17B ve 8A kimyasallarının etkin doz ve daha yoğun konsantrasyonlarda maruz bırakılan MCF7 hücrelerinde LDH etkinlikleri belirlenmiştir (Şekil 4.21). 17B kimyasalı ile maruz bırakılan MCF7 hücrelerinde LDH etkinliği 200 μ M dozda 100 μ M doza göre oldukça artmıştır. Bunun yanı sıra, 8A kimyasalının muamelesi sonrasındaki LDH etkinliği 100 μ M ve 200 μ M konsantrasyonlarda artış göstermiştir, ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

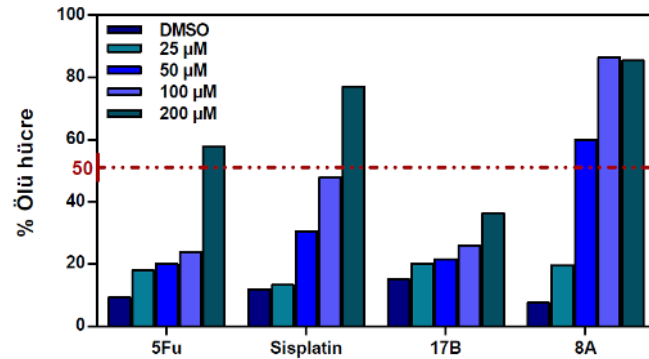


Şekil 4.21. MCF7 meme kanseri hücre hattında 17B ve 8A kimyasal maddelerinin LDH etkinlikleri.

SKBR3 hücre hattında; 5-FU, 8A, 17B ve Sisplatin maddelerinin hücre canlılığı üzerinde etkisi MTT deneyleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23). SKBR3 hücre hattında 17B kimyasal maddesi seçilen aralıkta etki göstermezken 8A kimyasalı 50 μ M konsantrasyonunda etkindir. Bunun yanı sıra, 5-FU anti-kanser ilacı 200 μ M konsantrasyonunda etki gösterirken diğer bir kanser ilacı olan Sisplatin 100 μ M dozda etki göstermiştir ve tüm kimyasalların (17B hariç) 200 μ M dozu SKBR3 hücresi için toksik olduğu gösterilmiştir.

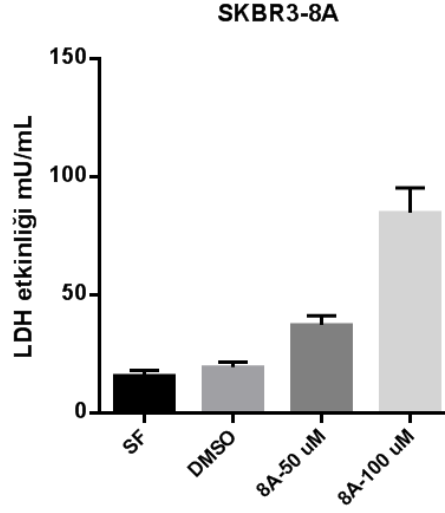


Şekil 4.22. SKBR3 hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.23. SKBR3 hücre hattında kimyasal maddelerin hücre canlılığına etkisi.

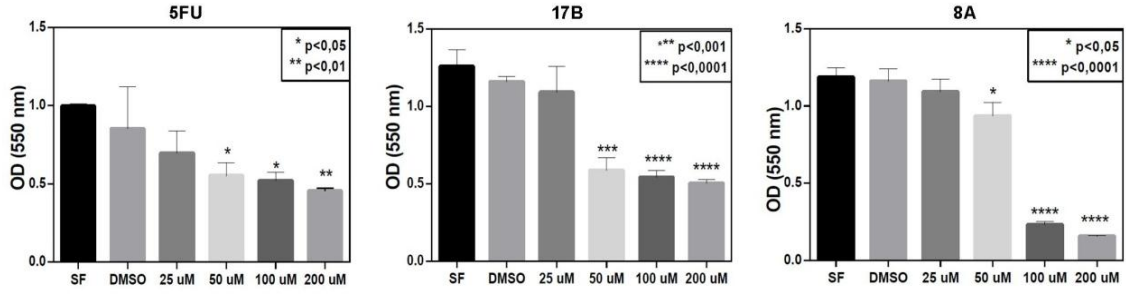
SKBR3 hücre hattında etkin olan 8A kimyasalının etkin dozunun ve bir üst dozunun LDH etkinliği gösterilmiştir (Şekil 4.24). 8A kimyasalı ile maruz bırakılan SKBR3 hücre hattında 50 μ M etkin dozun ve 100 μ M toksik dozun LDH etkinlikleri sırasıyla, 40 mU/mL ve 80 mU/mL'dir.



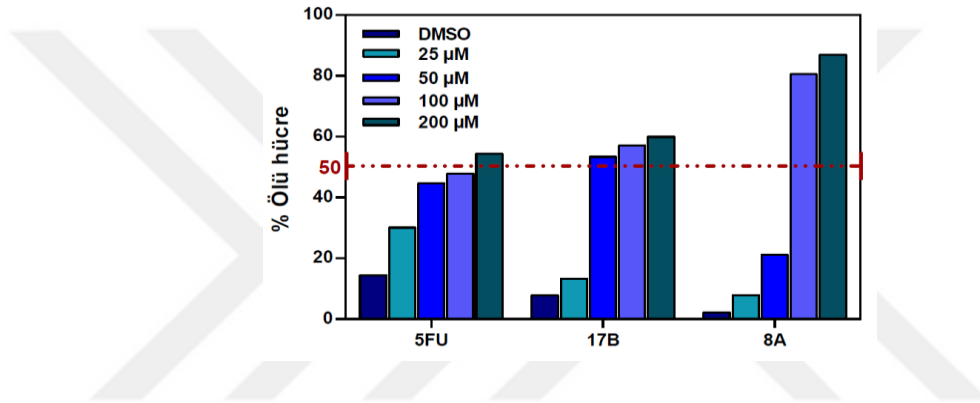
Şekil 4.24. SKBR3 meme kanseri hücre hattında 8A kimyasalının LDH etkinliği.

MDA-MB-231 hücre hattında; 5-FU, 8A, 17B maddelerinin hücre canlılığı üzerinde etkisi MTT deneyleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26). 5-FU maddesi MDA-MB-231 hücresi için 200 μ M dozda etkin iken, 17B maddesi 100 μ M konsantrasyonda etkili olarak bulunmuştur. 8A kimyasalının 100 ve 200 μ M dozları bu hücre hattı için toksik doz olarak belirlenmiştir, ancak 50 μ M dozunun da etkili olmadığı görülmüştür. Bundan sonraki çalışmalara bu nedenle, MDA-MB-231 hücre hattında 8A kimyasal maddesi ile devam edilememiştir.

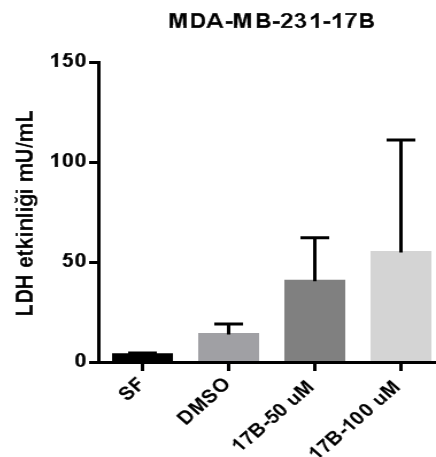
17B kimyasalının MDA-MB-231 hücrelerinde LDH etkinlikleri, 50 μ M etkin dozda ve 100 μ M toksik dozda değerlendirilmiştir (Şekil 4.27). 50 μ M dozun yaklaşık 35 mU/mL LDH etkinliğine sahip olduğu görülürken 100 μ M dozun ise 62 mU/mL LDH etkinliği gösterdiği bulunmuştur.



Şekil 4.25. MDA-MB-231 hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.

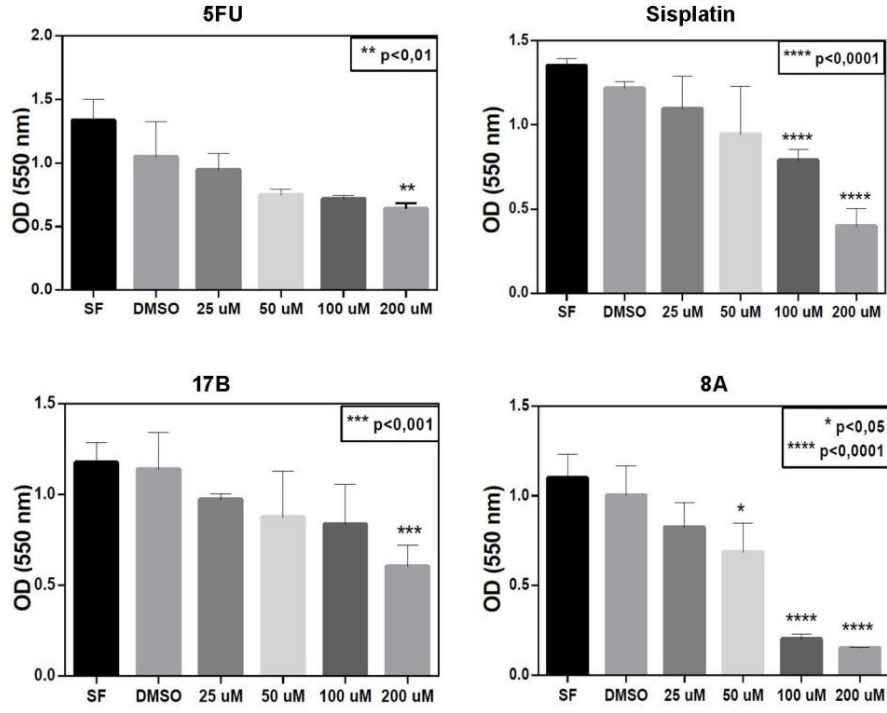


Şekil 4.26. MDA-MB-231 hücre hattında kimyasal maddelerin hücre canlılığına etkisi.

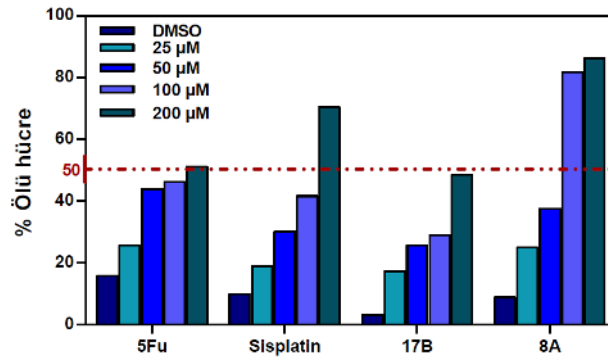


Şekil 4.27. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında 17B kimyasalının LDH etkinlikleri.

U2OS hücre hattında; 5-FU, 8A, 17B ve Sisplatin maddelerinin hücre canlılığı üzerinde etkisi MTT deneyleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.28 ve Şekil 4.29). U2OS hücre hattında, 5-FU kimyasal maddesi 200 μ M dozda etki gösterirken diğer bir anti-kanser ilacı olan Sisplatin 100 μ M dozda etki göstermiştir. Bunu takiben, 17B ve 8A kimyasal maddeleri sırasıyla 200 μ M ve 50 μ M dozlarında etkin olarak bulunmuştur.



Şekil 4.28. U2OS hücrelerine verilen kimyasalların hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.29. U2OS hücre hattında kimyasal maddelerin hücre canlılığına etkisi.

Tablo 4.2. Hücelere verilen kimyasalların MTT deneyleri sonrasında hesaplanan IC₅₀ dozları gösterilmiştir.

Hücre Madde	BEAS2B	A549	CRL4010	MCF7	SKBR3	MDA- MB-231	U2OS
5-FU	229,3	191,8	447,8	223,1	180,82	143,5	198,2
Sisplatin	X	102,4	202,6	163,4	116,2	X	128,3
17B	205,5	99,8	213,4	213,4	335,6	75,6	203,7
8A	85,7	79,8	102,2	102,28	48,7	68,7	62,3

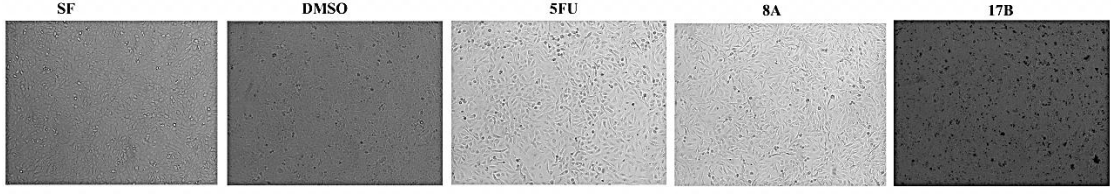
Tablo 4.3. 17B ve 8A kimyasalları ile maruz bırakılan hücrelerdeki LDH etkinlikleri gösterilmiştir.

Hücre	17B				8A			
	SF	DMSO	Etkin Doz	Yüksek Doz	SF	DMSO	Etkin Doz	Yüksek Doz
BEAS-2B	12,06	31,9375	X	43,96	25,05	45,15	123,67	127,89
A549	0,64	2,64	26,23	52,79	9,38	7,98	13,63	21,87
CRL- 4010	1,18	7,69	X	39,61	1,12	5,24	11,21	16,63
MCF7	5,03	26,27	43,52	111,34	2,33	6,05	23,41	28,87
SKBR3		Etkin Değil			15,85	84,86	19,49	37,33
MDA- MB-231	3,97	14,05	40,68	55,05		Etkin Değil		

4.4. 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin Kimyasal Maddelerinin Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

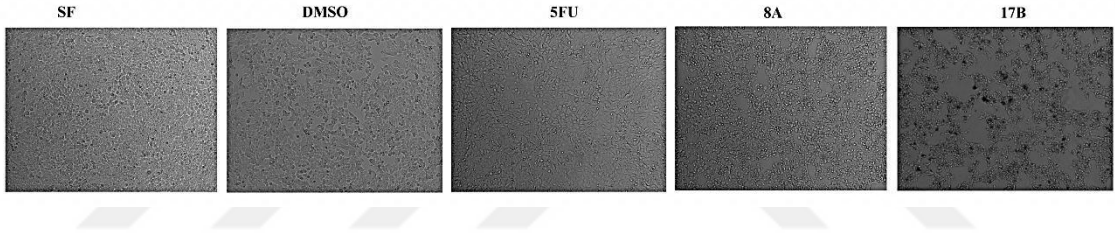
Etkin dozları belirlenen kimyasal bileşiklerin apoptoz, hücre döngüsü ve yara iyileşmesi deneyleri yapılan A549, MCF7, SKBR3, MDA-MB-231 ve U2OS hücrelerinde morfoloji üzerine etkilerine bakılmıştır. Kimyasal maddelerin kanser hücrelerinin morfolojilerini değiştirdiği gösterilmiştir.

Etkin dozları belirlenen kimyasalların A549 hücrelerinde morfoloji üzerine etkileri gösterilmiştir. Etkin dozların hücre morfolojisi üzerinde ciddi bir etkisinin olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.30). SF ve DMSO ile karşılaştırıldığında 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddeleri akciğer kanseri hücre hattının morfolojisinde değişikliğe sebep olmuştur.



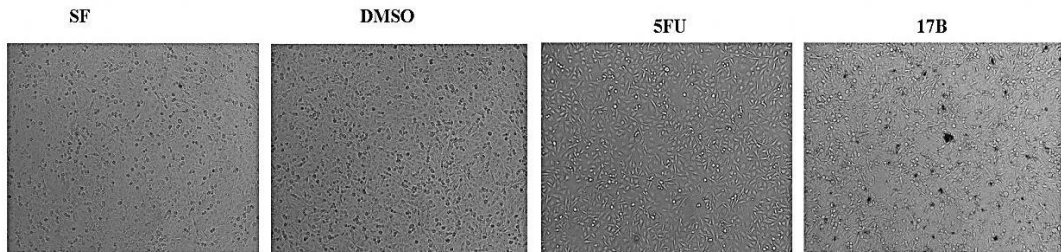
Şekil 4.30. A549 hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddelerinin morfoloji üzerine etkisi.

MCF7 hücrelerinde etkin dozları belirlenen kimyasalların morfoloji üzerine etkileri Şekil 4.31’de gösterilmiştir. Anti-kanser ilacı olan 5-FU kimyasalının ve potansiyel anti-kanser ilacı olma ihtimali olan 17B ve 8A maddelerinin MCF7 hücrelerinin morfolojileri üzerinde etkili olduğu görülmektedir.



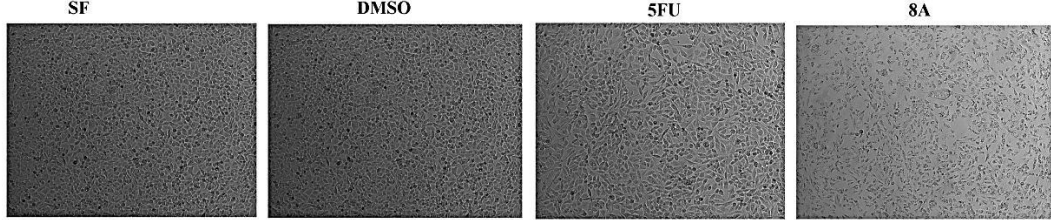
Şekil 4.31. MCF7 hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddelerinin hücre morfolojisine etkisi.

MTT deneyleri ile etkin dozları belirlenen kimyasalların MDA-MB-231 hücre hattında morfoloji üzerine etkileri gösterilmiştir (Şekil 4.32). SF ve DMSO verilen hücrelere kıyasla 5-FU ve 17B verilen hücrelerin morfolojileri arasında farklılıklar olduğu gösterilmiştir.



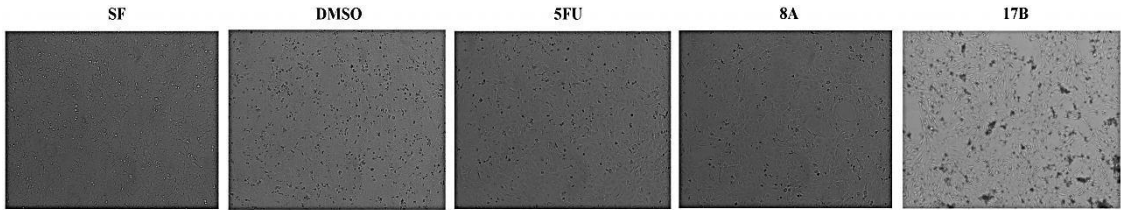
Şekil 4.32. MDA-MB-231 hücre hattında 5-FU ve 17B kimyasallarının hücre morfolojisi üzerine etkisi.

SKBR3 hücre hattında, 200 μ M 5-FU etkin dozu ile 50 μ M 8A maddesinin etkin dozlarının hücre morfoloji üzerine etkileri gösterilmiştir. SF ve DMSO örneklerinde hücreler normal morfolojiye sahip iken kimyasal verilen hücrelerde ciddi değişimler görülmüştür (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. SKBR3 hücre hattında 5-FU ve 8A kimyasal maddelerinin hücre morfolojileri üzerine etkisi.

Etkin dozları belirlenen 5-FU, 17B ve 8A kimyasalların U2OS hücre hattında morfoloji üzerine etkileri gösterilmiştir (Şekil 4.34). SF ve DMSO örnekleri normal morfolojilere sahip iken 5-FU, 8A ve 17B verilen hücrelerin morfolojilerinde değişimler görülmüştür.

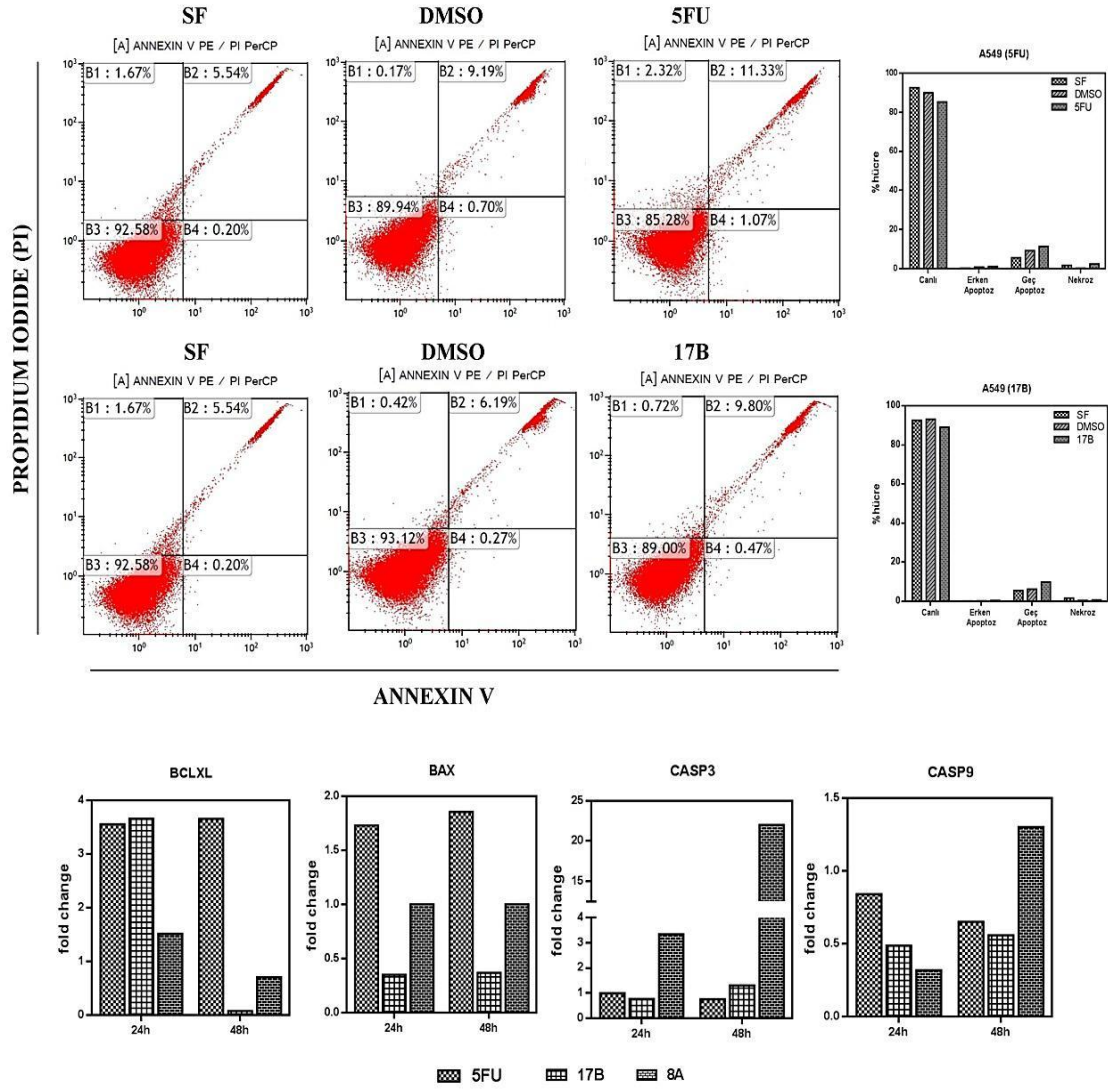


Şekil 4.34. U2OS osteosarkom hücre hattında 5-FU, 8A ve 17B kimyasal maddelerinin hücre morfolojileri üzerine etkileri.

4.5. 5-FU, 17B ve 8A Kimyasal Maddelerinin Apoptoz Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

A549 hücre hattında, kimyasalların etkin dozlarının apoptoz üzerine etkisi Anneksin V ve PI boyaması ile belirlenmiştir. SF ve DMSO ya göre karşılaştırıldığında, 5-FU ve

17B kimyasalların etkin dozlarının geç apoptotik hücre oranını arttırdığı bulunmuştur. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.35).



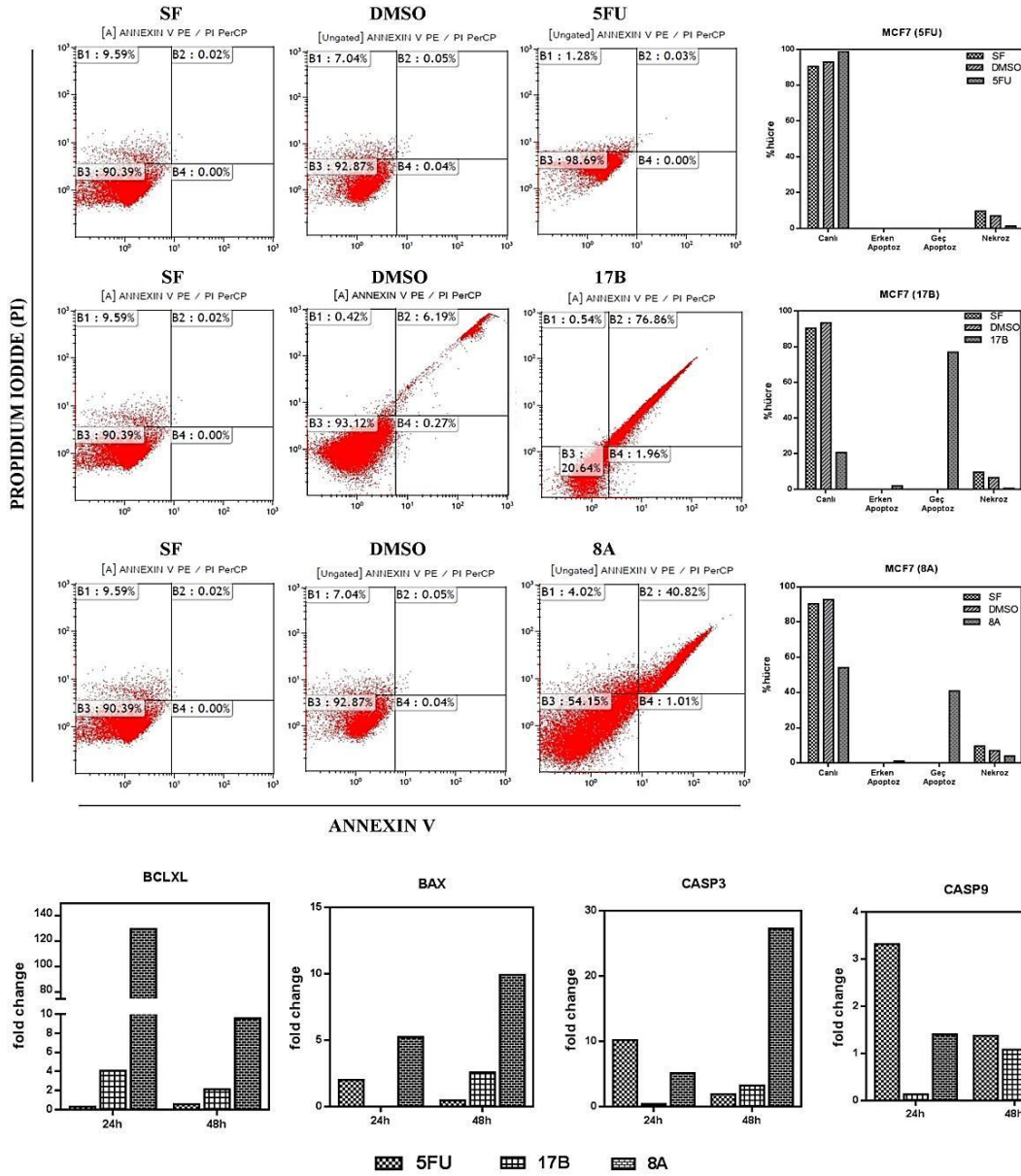
Şekil 4.35. A549 hücre hattında, muamele edilmemiş, DMSO ve kimyasala maruz bırakılmış durumlarda apoptoz seviyeleri. Kimyasala maruz bırakılan hücrelerde, apoptoz sürecinde rol oynayan BCLXL, BAX, CASP3 ve CASP9 genlerinin maruziyet süresine göre ifade seviyeleri kıyaslanmıştır.

Bunun yanı sıra, birçok kanser türünde aşırı ifadenilmiş olarak bildirilen BCLXL geninin 5-FU verilen A549 hücre hattında maruziyet süresine bağlı olarak anlamlı bir değişiklik gösterilmemiştir. Ancak, 17B ve 8A kimyasalları verilen hücrelerde DMSO

ve SF'e kıyasla anlamlı değişim olduğu gösterilmiştir. Kimyasal ile maruziyet süresine göre BCLX_L geninin ifade seviyesi düşük olarak bulunmuştur. Pro-apoptotik bir gen olan BAX geninin de kimyasal verilen hücrelerde 24 ve 48 saatlik muameleler sonrasında ifade seviyesinde değişimler olduğu bulunmuştur. Kimyasal ile 24h muamele süresine göre 48h'lik maruziyet sonrasında BAX geninin ifade seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Dahası 8A kimyasalı verilen A549 hücre hattında CASP3 ve CASP9'un kimyasal ile muamele süresine göre ciddi şekilde arttığı gösterilmiştir (şekil 4.35 alt kısım).

MCF7 hücre hattında, 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddelerinin etkin dozlarının apoptoz üzerine etkisine bakılmıştır (şekil 4.36). 5-FU verilen MCF7 hücresinde DMSO ve SF'e kıyasla bir fark görülememiştir. Fakat 17B kimyasalı verilen hücrelerde geç apoptotik hücre popölasyonunda DMSO ve SF'e kıyasla anlamlı derecede artış göstermiştir ve erken apoptotik hücre popölasyonunda da artış olduğu gösterilmiştir (%70). Bunun yanı sıra, 8A kimyasal maddesinin etkin dozunun verildiği MCF7 hücrelerinde geç apoptotik hücre popölasyonu SF ve DMSO verilen hücrelerdekine kıyasla ciddi şekilde artmıştır (%40).

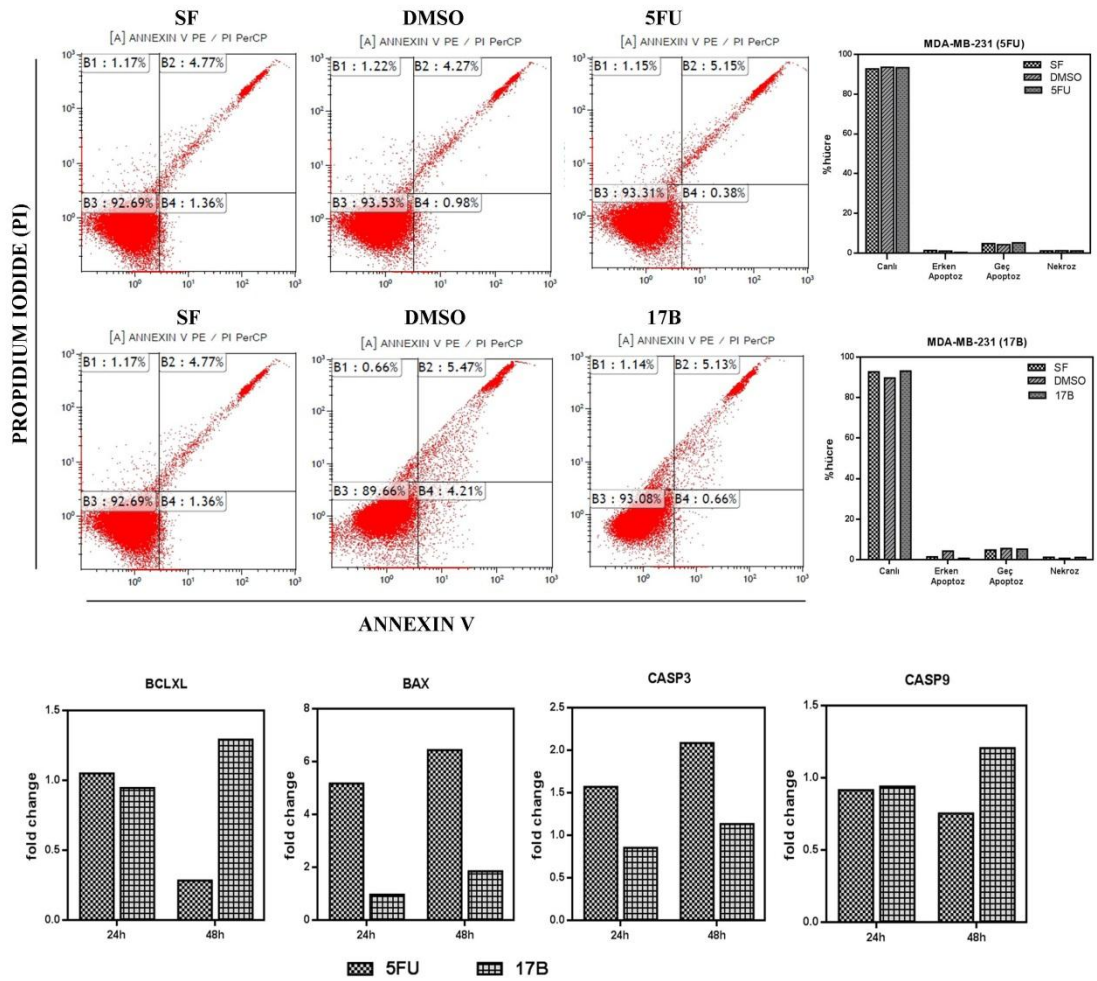
Apoptoz sürecinde önemli genlerin ifade seviyeleri kimyasal maruziyet süresine ve kimyasal çeşidine göre ifade seviyeleri şekil 4.36'da gösterilmiştir. 8A kimyasalı verilen hücre hattında BCLX_L geninin ifade seviyesi 24 saate kıyasla 48 saatlik muamele sonrasında anlamlı bir şekilde azalmaktadır (yaklaşık 12 kat). Bunun yanı sıra, 17B kimyasalı ile maruz bırakılan MCF7 hücrelerinde BCLX_L geninin ifade seviyesi maruziyet süresine göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. Diğer taraftan, BAX geninin de 5-FU ve 8A verilen hücrelerde maruziyet zamanına bağlı olarak değişim gösterdiği bulunmuştur. 17B ve 8A kimyasal bileşikleri ile maruz bırakılan MCF7 hücrelerinde maruziyet süresine kıyasla BAX geninin ifade seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir ve bu değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır. Aynı zamanda 8A ile muamele edilen hücrelerde CASP3'ün ifade seviyesi maruziyet zamanına kıyasla anlamlı bir şekilde artış göstermektedir. MCF7 hücrelerine etkin dozları verilen 17B ve 5-FU kimyasallarının CASP3 ve CASP9 genleri üzerinde de muamele edilmemiş hücelere kıyasla değişim olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.36. MCF7 hücre hattında etkin dozları verilen kimyasalların apoptoz üzerine etkisi. Maruz bırakılan MCF7 hücrelerinde zamana kıyasla BCLXL, BAX, CASP3 ve CASP9 genlerinin ifade seviyeleri karşılaştırılmıştır.

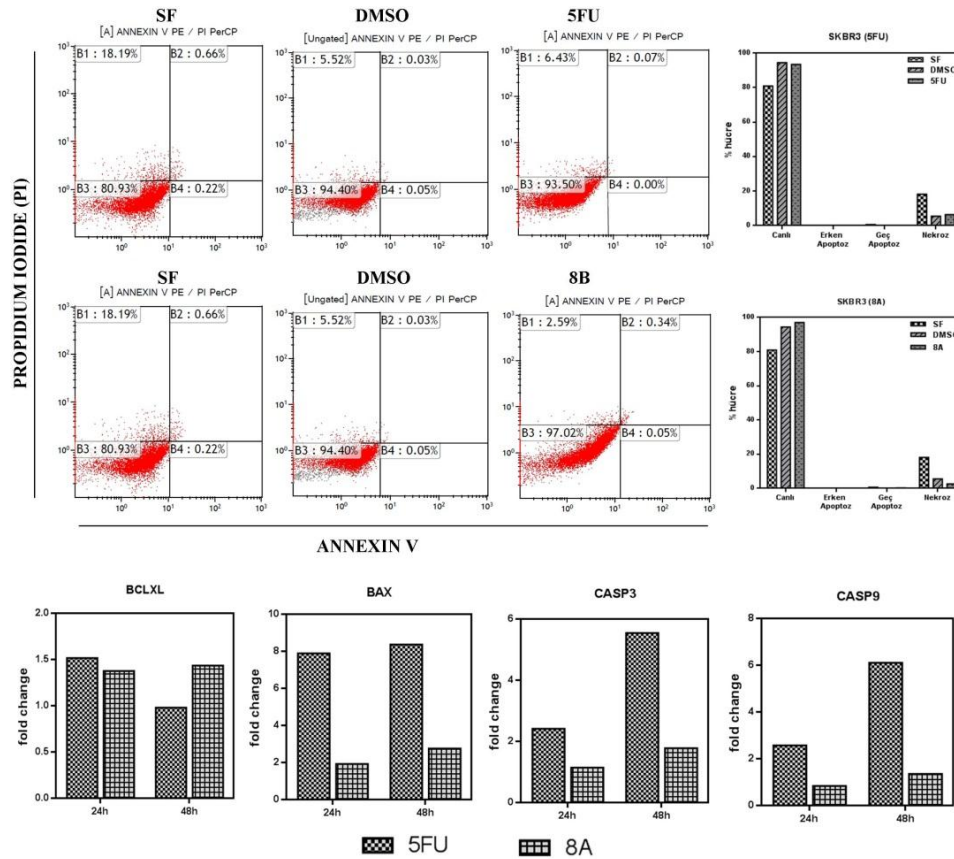
MDA-MB-231 hücre hattındaki 5-FU ve 17B kimyasallarının sırasıyla 200 μ M ve 100 μ M'lık etkin dozlarının apoptoz üzerine etkisi gösterilmiştir (Şekil 4.37). 5-FU ve 17B verilen hücrelerde geç apoptotik hücre grubunda artış olduğu görülmüştür, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bunun yanı sıra, 5-FU ve 17B verilen

hücrelerde nekrotik hücre grubunda da bir değişim vardır ancak, bu değişim de istatistiksel olarak anlamlı değildir. BCLXL, BAX, CASP3 ve CASP9 genlerinin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ifade değişimleri gösterilmiştir. Kimyasal ile maruz bırakılan ve muamele edilmeyen hücrelerde, BCLXL genin ifade seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak, BAX geninin ifade seviyesi, 5-FU verilen hücrelerde 24. saatte 4 kat, 48. saatte ise 7 kat artış göstermiştir. Öte yandan, kimyasala maruz bırakılan MDA-MB-231 hücre hattında CASP3 ve CASP9'un ifadesinde değişimler görülmüştür, lakin bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.37 alt kısım).



Şekil 4.37. MDA-MB-231 hücre hattında 5-FU ve 17B kimyasal maddelerinin apoptoz üzerine etkisi. Apoptoz sürecinde önemli rolleri olan BCLXL, BAX, CASP3 ve CASP9 genlerinin kimyasal maruziyetine ve maruziyet süresine göre ifade değişimleri gösterilmiştir.

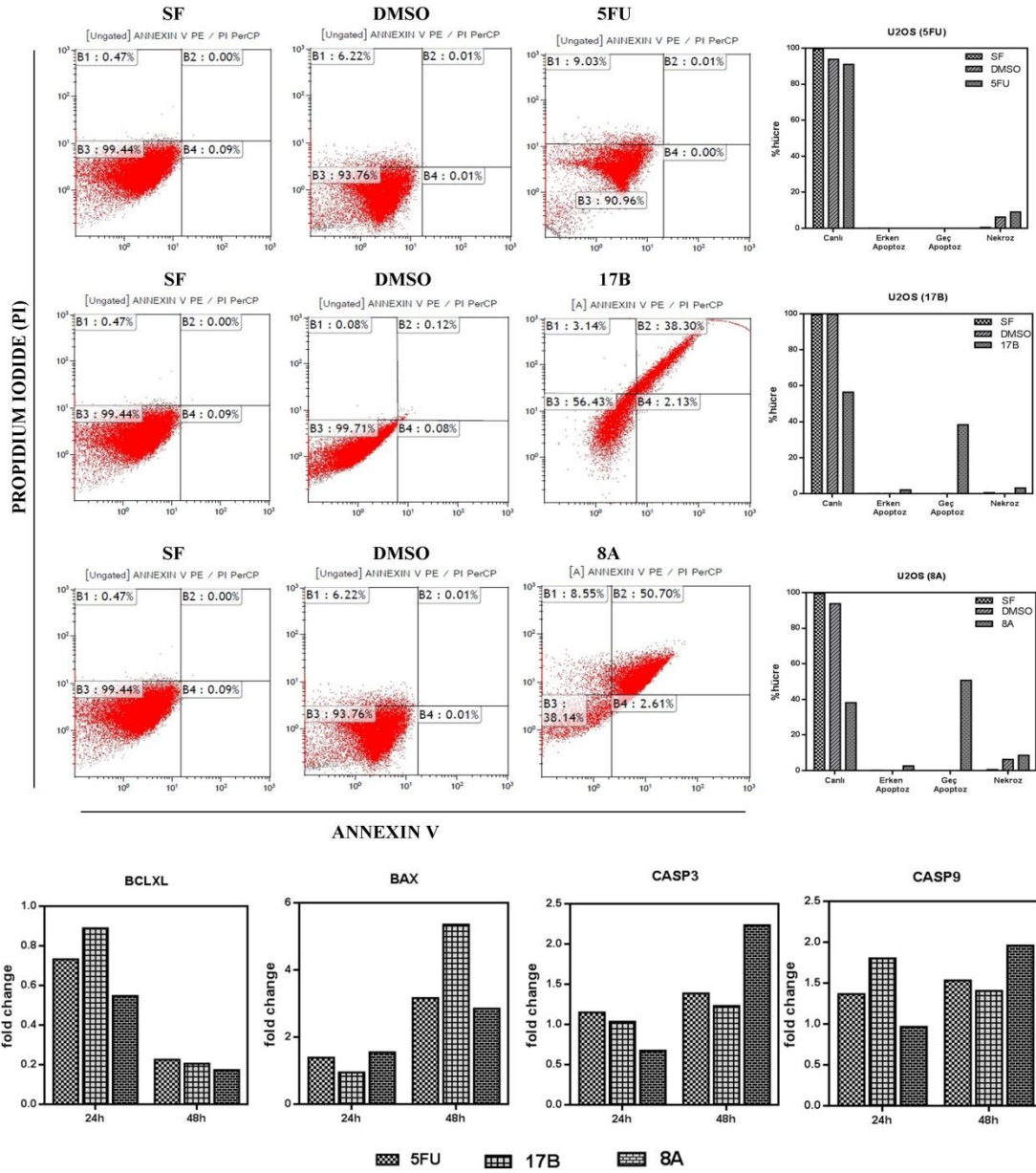
SKBR3 meme kanseri hücre hattında, etkin dozları verilen 5-FU ve 8A kimyasallarının apoptoz üzerine etkisi gösterilmiştir. SKBR3 hücre hattına verilen 5-FU ve 8A kimyasalının apoptoz üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.38). 5-FU ve 8A verilen kimyasalların apoptoz sürecinde önemli işlevleri olan BCLXL, BAX, CASP3 ve CASP9 genlerinin ifade seviyesinde değişimler olduğu gösterilmiştir. BCLXL geni 5-FU verilen SKBR3 hücre hattında 48. saatte, DMSO ve SF'e kıyasla azaldığı bulunmuştur. Bunun yanı sıra, BAX geninin ifade seviyesindeki değişimler maruziyet zamanına göre artış göstermiştir. Kimyasalın maruziyet süresi ile BAX geninin ifade değişimi arasında doğru bir ilişki olduğu bulunmuştur. Ayrıca, CASP3 ve CASP9 genlerinin ifade seviyeleri maruziyet zamanına göre değişim göstermektedir. Kimyasala maruziyet arttıkça CASP3 ve CASP9 genlerinin ifade seviyeleri de artış göstermektedir.



Şekil 4.38. SKBR3 hücre hattında 5-FU ve 8A kimyasal maddelerinin apoptoz üzerine etkisi. Apoptoz sürecinde önemli rolleri olan BCLXL, BAX, CASP3 ve CASP9 genlerinin kimyasal maruziyetine ve maruziyet süresine göre ifade değişimleri gösterilmiştir.

U2OS osteosarkom hücre hattında, 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarının apoptoz üzerine etkisi gösterilmiştir (Şekil 4.39). 5-FU anti-kanser ilacının 200 μ M etkin dozu verilen U2OS hücrelerinde SF ve DMSO'ya kıyasla apoptotik hücre popülasyonunda herhangi anlamlı bir değişim söz konusu değildir. Fakat 17B ve 8A kimyasalları verilen hücrelerde, özellikle geç apoptotik hücre grubunda SF ve DMSO'ya göre anlamlı değişimler olduğu bulunmuştur. Bu değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$). 17B ile muamele edilen U2OS hücre hattında geç apoptotik hücre popülasyonu SF ve DMSO grubuna karşı % 38 oranında artış göstermiştir. Bunun yanı sıra, 8A ile muamele edilen U2OS hücre hattında ise SF ve DMSO grubuna kıyasla % 50 oranında daha fazla geç apoptotik hücre grubu olduğu bulunmuştur. Benzer olarak erken apoptotik hücre grubunda da değişim görülmektedir, ama bu değişim anlamlı değildir.

Apoptoz sürecinde etkili olduğu bilinen BCLX_L, BAX, CASP3 ve CASP9 genlerinin kimyasal ile maruz bırakıldıktan sonra U2OS hücre hattında ifade seviyesinde değişimler olduğu gösterilmiştir. 5-FU ile muamele edilen hücrelerde BCLX_L geninin ifade seviyesi maruziyet süresine kıyasla azalırken, BAX geninin ifade seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, CASP3 ve CASP9'un 5-FU ile maruziyet süresine göre U2OS hücrelerinde arttığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, 17B verilen hücrelerde BCLX_L geninde 48. saatte, 24. saat maruz bırakılmış ve maruz bırakılmamış duruma göre yaklaşık iki kat azaldığı bulunmuştur. Bunun yanı sıra, 8A ile maruz bırakılan hücrelerde ise BCLX_L geninin ifade seviyesi maruziyet süresine göre azalmıştır ve neredeyse yarıya düşmüştür. Ayrıca, 5-FU, 17B ve 8A ile maruz bırakılan U2OS hücrelerindeki BAX geninin ifade seviyesi maruziyet süresi ile anlamlı derecede artış gösterdiği bulunmuştur. 17B ile 48 saat maruz bırakılan hücrelerdeki BAX geninin ifade seviyesi, 24 saat maruziyet sonrasına göre yaklaşık 3 kat arttığı gösterilmiştir. Benzer olarak, 8A ile maruz bırakılan hücrelerde ise 24 saat maruziyet süresine kıyasla 48 saat maruz bırakılan hücrelerde BAX geninin ifade seviyesinin yaklaşık iki katına çıktığı gösterilmiştir. Apoptotik hücre popülasyonu fazla olarak bulunan, 17B kimyasalı ile maruz bırakılan hücrelerde CASP3 ve CASP9 genlerinin ifade seviyelerinin önemli derecede artış gösterdiği bulunmuştur. Bununla beraber, 8A kimyasalı ile maruz bırakılan U2OS hücre hattında maruziyet süresine kıyasla CASP3 ve CASP9'un ifade seviyesinde artış olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.39. U2OS hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddelerinin apoptoz üzerine etkisi. Apoptoz sürecinde önemli rolleri olan BCLXL, BAX, CASP3 ve CASP9 genlerinin kimyasal maruziyetine ve maruziyet süresine göre ifade değişimleri gösterilmiştir.

A549, MCF7, U2OS, MDA-MB-231 ve SKBR3 hücrelerinde etkin dozları verilen kimyasalların apoptoz etkileri özet şeklinde Tablo 4.4.'te gösterilmiştir. U2OS ve MCF7 hücrelerinde 17B ve 8A kimyasallarının apoptoz üzerine etkili olduğu bulunmuştur. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ifade seviyeleri kimyasal

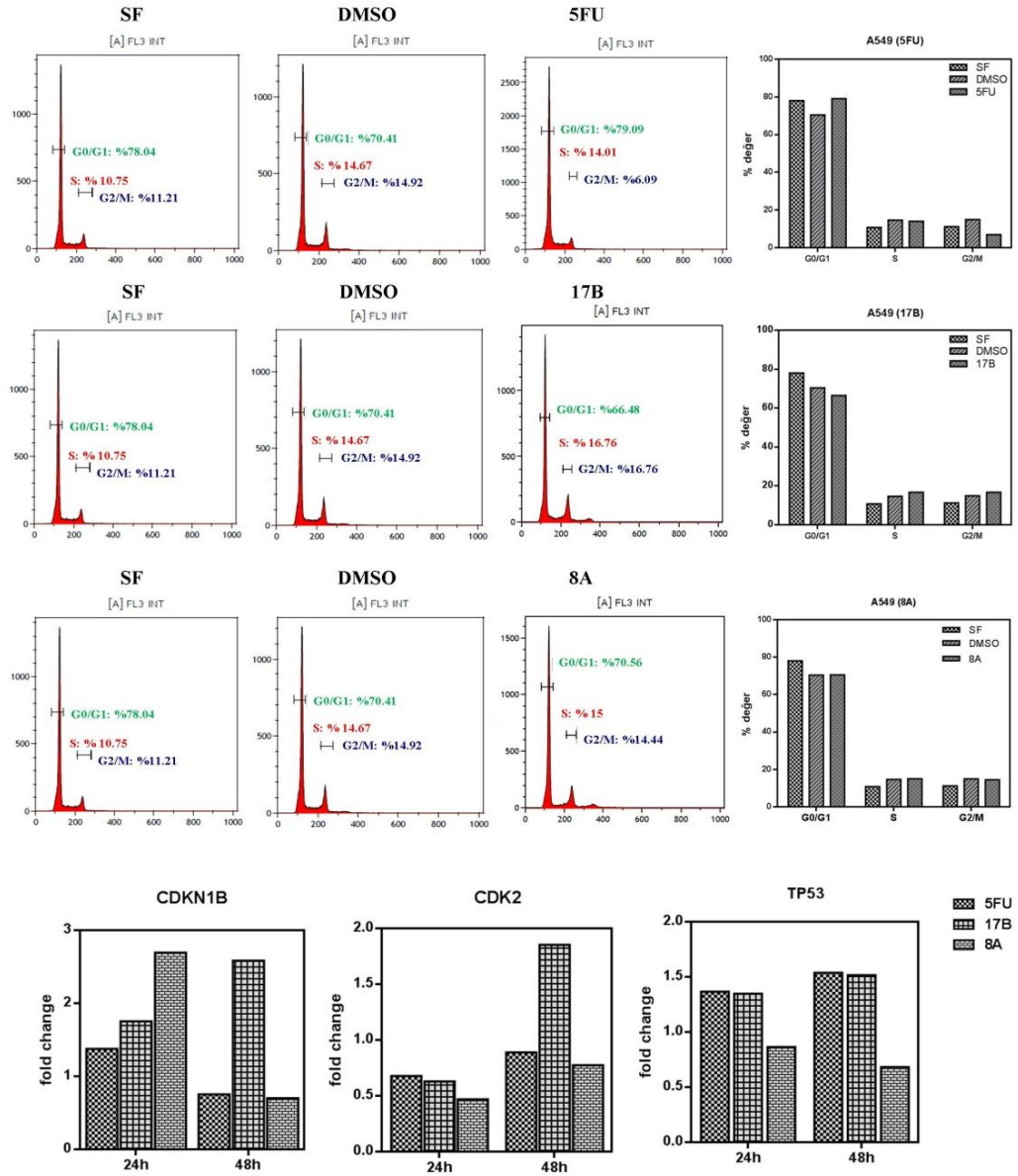
maruziyet süresine göre değişim göstermektedir. Genel olarak, anti-apoptotik BCLX_L geninin ifade seviyesi 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddesi ile maruziyet süresine göre düşüş göstermektedir. Bunun aksine, pro-apoptotik BAX geninin ifade seviyesi kimyasal ile maruziyet süresine göre artış gösterdiği bulunmuştur. Diğer yandan, kaspaz genlerinin (CASP3, CASP9) ifade seviyelerinin de çalışılan hücrelerde kimyasal ile maruziyet süresine göre artmakta olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.4. A549, MCF7, U2OS, MDA-MB-231 ve SKBR3 hücrelerinde etkin dozların apoptoz üzerine etkisi gösterilmiştir.

Apoptotik Süreç	Muamele Edilen Kimyasallara Göre Apoptoz Süreçleri								
U2OS	SF	DMSO	5-FU	SF	DMSO	17B	SF	DMSO	8A
Canlı	99,44	93,76	90,96	99,44	99,71	56,43	99,44	93,76	38,14
Erken Apoptoz	0,09	0,01	0	0,09	0,08	2,13	0,09	0,01	2,61
Geç Apoptoz	0	0,01	0,01	0	0,12	38,3	0	0,01	50,7
Nekroz	0,47	6,22	9,03	0,47	0,08	3,14	0,47	6,22	8,55
MCF7	SF	DMSO	5-FU	SF	DMSO	17B	SF	DMSO	8A
Canlı	90,39	92,87	98,69	90,39	93,32	20,64	90,39	92,87	54,15
Erken Apoptoz	0	0,04	0	0	0	1,96	0	0,04	1,01
Geç Apoptoz	0,02	0,05	0,03	0,02	0,06	76,86	0,02	0,05	40,82
Nekroz	9,59	7,04	1,28	9,59	6,62	0,54	9,59	7,04	4,02
SKBR3	SF	DMSO	5-FU	SF	DMSO	17B	SF	DMSO	8A
Canlı	80,93	94,4	93,5				80,93	94,4	97,02
Erken Apoptoz	0,22	0,05	0		Etkin Değil		0,22	0,05	0,05
Geç Apoptoz	0,66	0,03	0,07				0,66	0,03	0,34
Nekroz	18,19	5,52	6,43				18,19	5,52	2,59
MDA-MB-231	SF	DMSO	5-FU	SF	DMSO	17B	SF	DMSO	8A
Canlı	92,69	93,53	93,31	92,69	89,66	93,08			
Erken Apoptoz	1,36	0,98	0,38	1,36	4,21	0,66		Etkin Değil	
Geç Apoptoz	4,77	4,27	5,15	4,77	5,47	5,13			
Nekroz	1,17	1,22	1,15	1,17	0,66	1,14			
A549	SF	DMSO	5-FU	SF	DMSO	17B	SF	DMSO	8A
Canlı	92,58	89,94	85,28	92,58	93,12	89			
Erken Apoptoz	0,2	0,7	1,07	0,2	0,27	0,47		Çalışılmadı	
Geç Apoptoz	5,54	9,19	11,33	5,54	6,19	9,8			
Nekroz	1,67	0,17	2,32	1,67	0,42	0,72			

4.6. 5-FU, 17B ve 8A Kimyasal Maddelerinin Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

A549 akciğer kanseri hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarının hücre döngüsü üzerine etkisi PI boyaması yapılarak Flow Sitometri deneyleri ile gösterilmiştir. Hücre döngüsü deneylerinde DNA miktarı baz alınarak hücrenin G0/G1, S ve G2/M fazlarına göre üç farklı popülasyondaki hücre yoğunluğu ölçülmektedir.

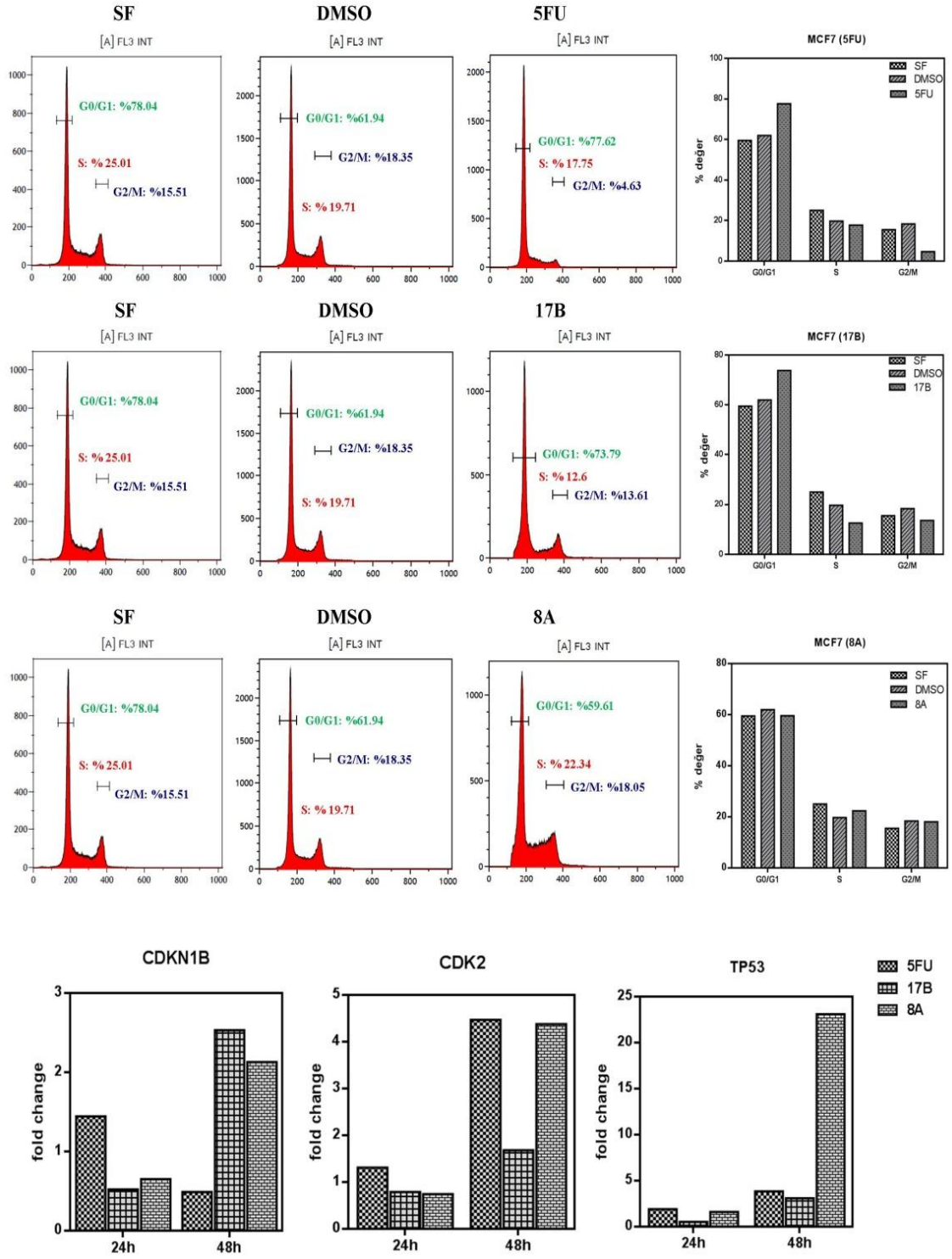


Şekil 4.40. A549 hücre hattında 5-FU, 17 ve 8A kimyasallarının hücre döngüsü üzerine etkisi. Hücre döngüsünde önemli işlevleri olan CDKN1B, CDK2 ve TP53 genlerinin bu kimyasala maruziyet zamanına göre ifade değişimleri gösterilmiştir.

5-FU verilen A549 hücre hattında, etkin doz SF ve DMSO oranına kıyasla G2/M fazındaki hücre miktarı azalırken G0/G1 fazındaki hücre popülasyonunda artış görülmüştür. Buna karşıt olarak, 17B ve 8A verilen A549 hücre hattında, S ve G2/M fazında değişiklik görülmüştür. Ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.40).

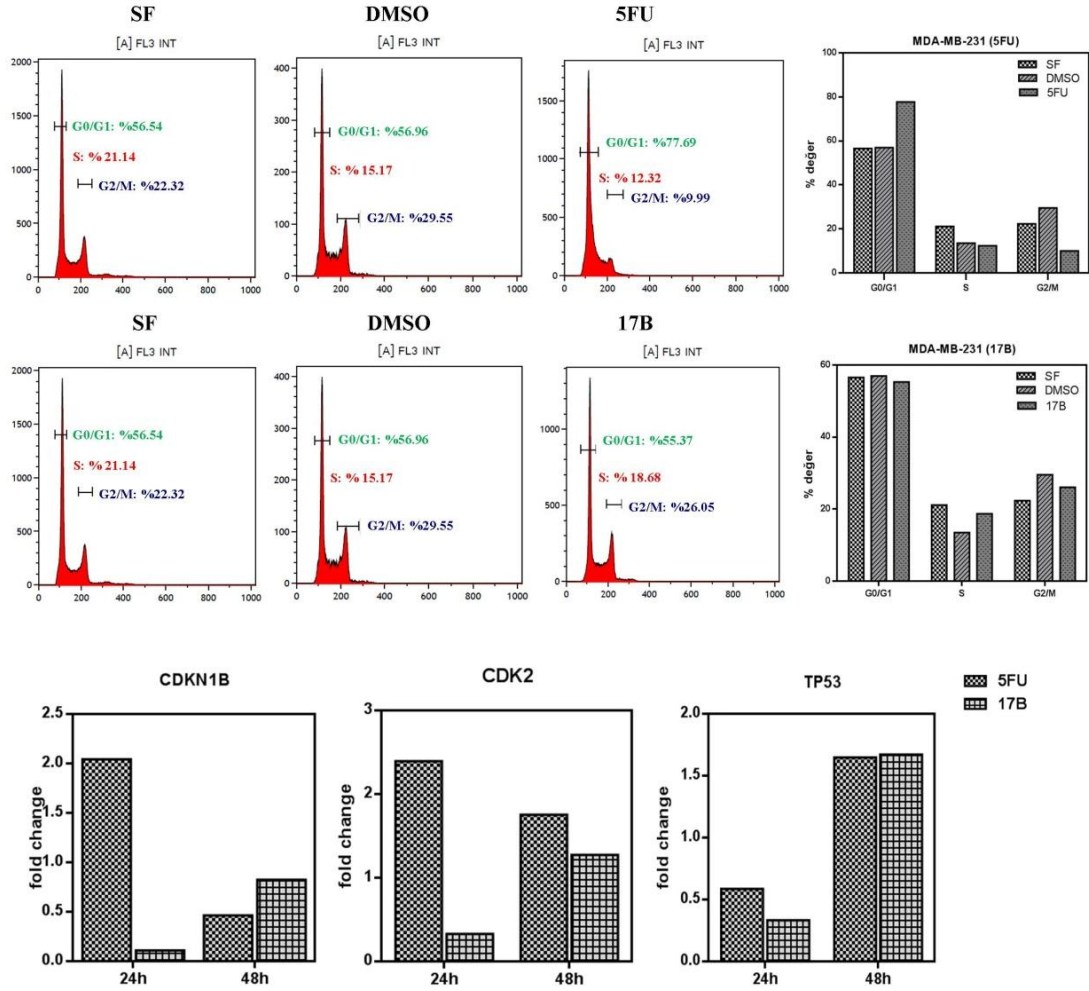
Hücre döngüsü baskılayıcı proteinini kodlayan CDKN1B geninin kimyasal maruziyet süresine göre ifade değişimi gösterilmiştir. 5-FU ve 8A kimyasalları verilen hücrelerde zamanla CDKN1B geninin ifade seviyesi azalırken 17B verilen hücrelerde kontrole kıyasla CDKN1B geninin ifadesinde artış görülmektedir. Benzer olarak CDK2 geninin ifade seviyesinde 24. saate kıyasla 48. saatte ifade seviyesinde anlamlı bir artış görülmüştür. Bunun yanı sıra, TP53 geninin ifade seviyesi kimyasal verilen hücrelerde maruziyet süresine göre anlamlı değişim göstermediği bulunmuştur (Şekil 4.40 alt kısım).

MCF7 hücre hattında, 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddeleri verilerek hücre döngüsü değerlendirilmiştir. 5-FU verilen hücrelerde SF ve DMSO'ya kıyasla, hücreler G0/G1 fazında artarken G2/M fazında azalmıştır. 17B verilen MCF7 hücrelerinde ise, S ve G2/M fazlarında hücre popülasyonunda azalma ve G0/G1 fazında ise artış görülmüştür. Buna karşın 8A kimyasalı verilen hücrelerde, G2/M fazındaki hücre miktarı değişmezken, S fazındaki hücre miktarının arttığı bulunmuştur (Şekil 4.41). CDKN1B geninin, 5-FU verilen MCF7 hücrelerinde maruziyet zamanına göre ifade seviyesinin düştüğü bulunmuştur. Ayrıca, 5-FU ile maruz bırakılan hücrelerde maruziyet süresine kıyasla CDK2 geninin ifade seviyesinin azaldığı bulunmuştur. 17B ve 8A verilen hücrelerde CDKN1B geninin ifade seviyesinde zamana bağlı olarak artış gösterdiği bulunmuştur. Bunun yanı sıra, 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarına maruz bırakılan MCF7 hücrelerinde CDK2 geninin ifade seviyesi maruziyet zamanına göre artış göstermektedir. Kimyasala maruziyet zamanı ve CDK2 geninin ifade seviyesi arasında doğru bir ilgileşim olduğu bulunmuştur. Öte yandan, kimyasala maruz bırakılan MCF7 hücrelerinde TP53 geninin ifade seviyesi de değişiklik göstermektedir. Maruziyet süresi arttıkça, TP53 geninin ifade seviyesi de artış göstermektedir (Şekil 4.41). Özellikle 8A ile maruz bırakılan MCF7 hücrelerinde maruziyet süresine kıyasla TP53 geninin ifade seviyesinin yaklaşık 20 kat arttığı bulunmuştur.



Şekil 4.41. MCF7 hücre hattında, 5-FU, 17B ve 8A kimyasalları ile maruziyet sonrasında hücre döngüsü üzerine etkileri. Hücre döngüsünde önemli işlevleri olan CDKN1B, CDK2 ve TP53 genlerinin bu kimyasala maruziyet zamanına göre ifade değişimleri gösterilmiştir.

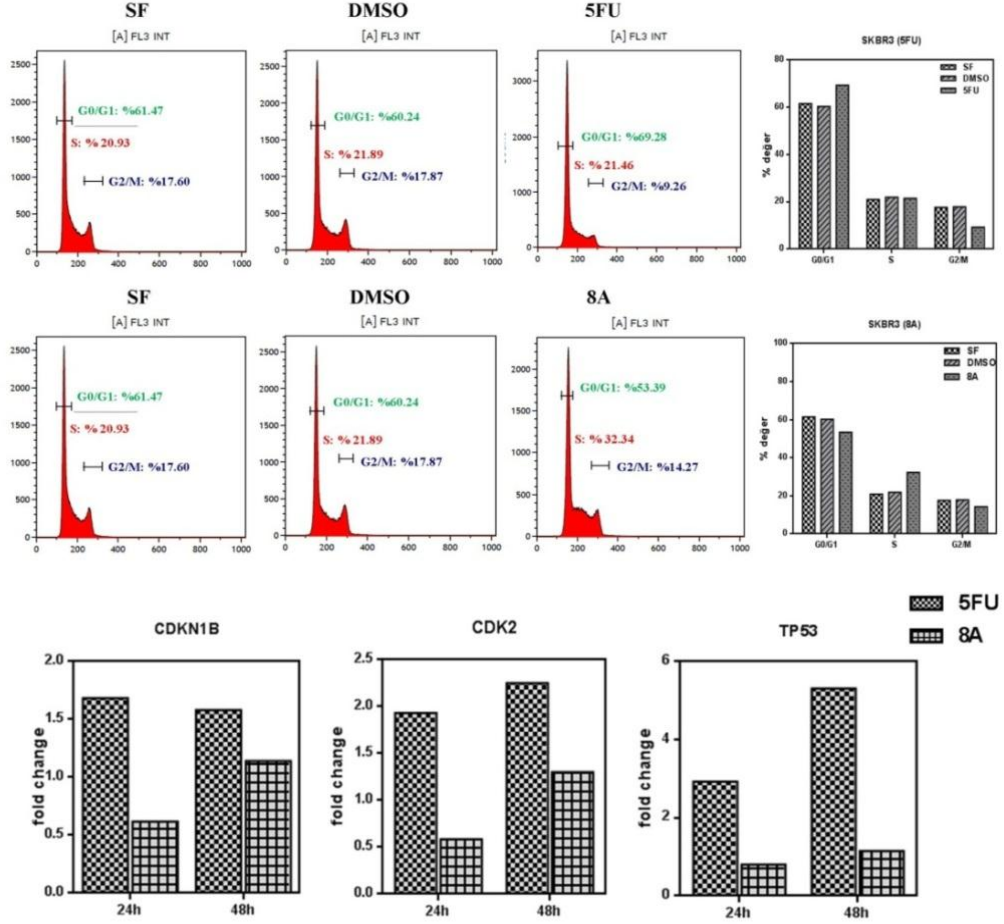
Meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattında, 5-FU ve 17B kimyasal maddelerinin hücrelere verilerek hücre döngüsü üzerine etkilerine bakılmıştır (Şekil 4.42). Bu verilere göre, 5-FU verilen MDA-MB-231 hücre hattında G0/G1 fazındaki hücre miktarı SF ve DMSO'ya kıyasla artış göstermektedir. 17B kimyasalı verilen MDA-MB-231 hücre hattında ise SF ve DMSO'ya kıyasla anlamlı bir değişim bulunamamıştır.



Şekil 4.42. MDA-MB-231 hücre hattında, 5-FU ve 17B kimyasallarının hücre döngüsü üzerine etkisi. Hücre döngüsünde önemli işlevleri olan CDKN1B, CDK2 ve TP53 genlerinin bu kimyasala maruziyet zamanına göre ifade değişimleri gösterilmiştir.

5-FU verilen MDA-MB-231 hücre hattında, CDKN1B geninin ifade seviyesi maruziyet zamanına bağlı olarak düşüş göstermiştir. Ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı

değildir. Benzer olarak, CDK2 geninin ifade seviyesi de kimyasal ile maruziyet süresine göre düşüş göstermektedir. Bunun yanı sıra, 17B ile maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde CDKN1B geninin ifade seviyesi maruziyet süresine kıyasla artış göstermektedir. Benzer olarak, 17B ile maruz bırakılan hücrelerde CDK2 geninin ifade seviyesi de maruziyet süresine göre artmaktadır. 5-FU ve 17B verilen hücrede ise TP53 geninin ifade seviyesi maruziyet zamanına bağlı olarak artış gösterdiği bulunmuştur.



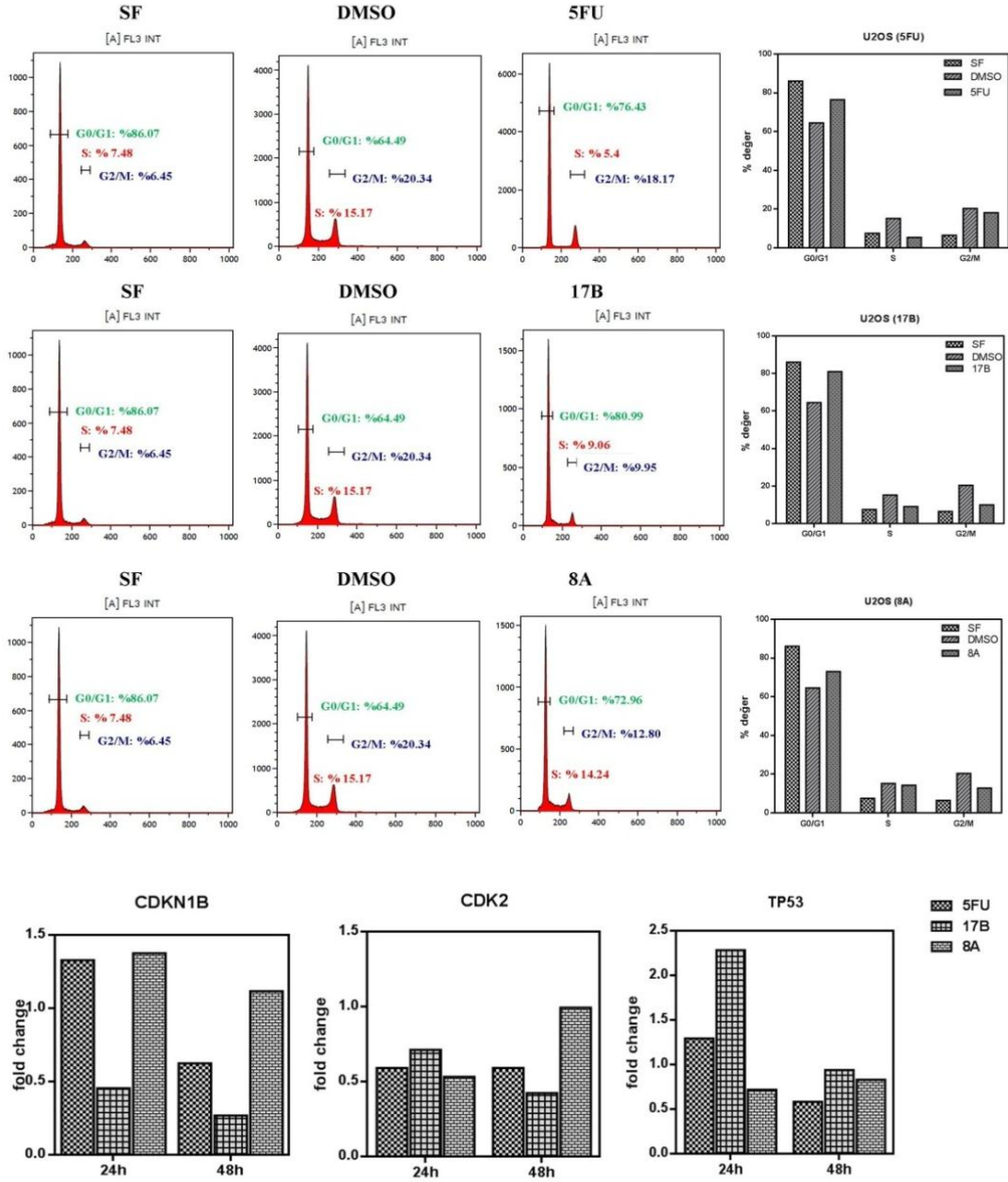
Şekil 4.43. SKBR3 hücre hattında 5-FU ve 8A kimyasallarının hücre döngüsü üzerine etkisi. Hücre döngüsünde önemli işlevleri olan CDKN1B, CDK2 ve TP53 genlerinin bu kimyasala maruziyet zamanına göre ifade değişimleri gösterilmiştir.

SKBR3 hücre hattında, 5-FU ve 8A kimyasallarının hücre döngüsü üzerine etkisi gösterilmiştir (Şekil 4.43). 5-FU verilen SKBR3 hücresinde G0/G1 fazındaki hücre

miktarı SF ve DMSO verilen hücredekine kıyasla artış göstermektedir. Ancak, 8A kimyasalı ile muamele sonrasında S fazındaki hücre miktarının, SF ve DMSO'ya kıyasla fazla olduğu bulunmuştur. 5-FU ve 8A maddesi ile muamele edilen SKBR3 hücresindeki CDKN1B ifadesinde maruziyet zamanına göre ciddi bir değişim görülememiştir. Bunun aksine, 5-FU ile maruz bırakılan hücrelerde CDKN1B geninin ifade seviyesi maruziyet süresine kıyasla azalırken, 8A ile maruz bırakılan SKBR3 hücrelerinde bu genin ifade seviyesi maruziyet süresine göre artış göstermektedir. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir. CDK2 geninin ifade seviyesi kimyasal maruziyet süresine göre artış göstermiştir. 5-FU ile maruz bırakılan hücrelerde maruziyet süresine göre CDK2 geninin ifade seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bununla beraber, 8A ile maruz bırakılan hücrelerde maruziyet süresine kıyasla CDK2 geninin ifade seviyesi anlamlı bir şekilde artmıştır. Bunun yanı sıra, kimyasal maruziyet zamanına göre TP53 geninin ifade seviyesinde artış olduğu bulunmuştur. Özellikle 5-FU ile muamele edilen hücrelerde maruziyet süresine göre TP53 geninin ifade seviyesi anlamlı derecede artmıştır (Şekil 4.43 alt kısım).

U2OS osteosarkom hücre hattında, 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarının hücre döngüsü üzerine etkisi gösterilmiştir (Şekil 4.44). U2OS hücrelerine 5-FU kimyasal maddesi verildiğinde, SF ve DMSO'ya kıyasla G0/G1 fazında hücrelerin yoğunlaştığı görülmektedir. Dolayısıyla S ve G2/M fazındaki hücre yoğunluğu da 5-FU maruz bırakılan hücrede düşüş göstermektedir. Bunu takiben 17B ve 8A verilen hücrelerde SF ve DMSO'ya karşı G0/G1 fazındaki hücre popülasyonu artarken S ve G2/M fazındaki hücre popülasyonunda azalma olduğu bulunmuştur.

5-FU, 17B ve 8A kimyasalları ile maruz bırakılan U2OS hücre hattında, maruziyet süresine göre CDKN1B geninin ifade seviyesinde azalma olduğu gösterilmiştir. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Buna karşın CDK2 genin kimyasal maruziyet süresine göre ifade seviyesinde artış olduğu bulunmuştur. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. TP53 geninin ifade seviyesinin 17B kimyasalı ile maruziyet sonrasında arttığı, 5-FU ve 8A kimyasalları ile maruziyet sonrasında anlamlı bir değişimin olmadığı bulunmuştur.



Şekil 4.44. U2OS hücre hattında, 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddelerinin hücre döngüsü üzerine etkileri. Hücre döngüsünde önemli işlevleri olan CDKN1B, CDK2 ve TP53 genlerinin bu kimyasala maruziyet zamanına göre ifade değişimleri gösterilmiştir.

Özet olarak, 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddelerinin A549, MCF7, MDA-MB-231, SKBR3 ve U2OS hücre hatlarında hücre döngüsü üzerine etkileri değerlendirilmiştir (Tablo 4.5). Buna göre; 5-FU kimyasal maddelerin bütün hücrelerde G0/G1 fazında

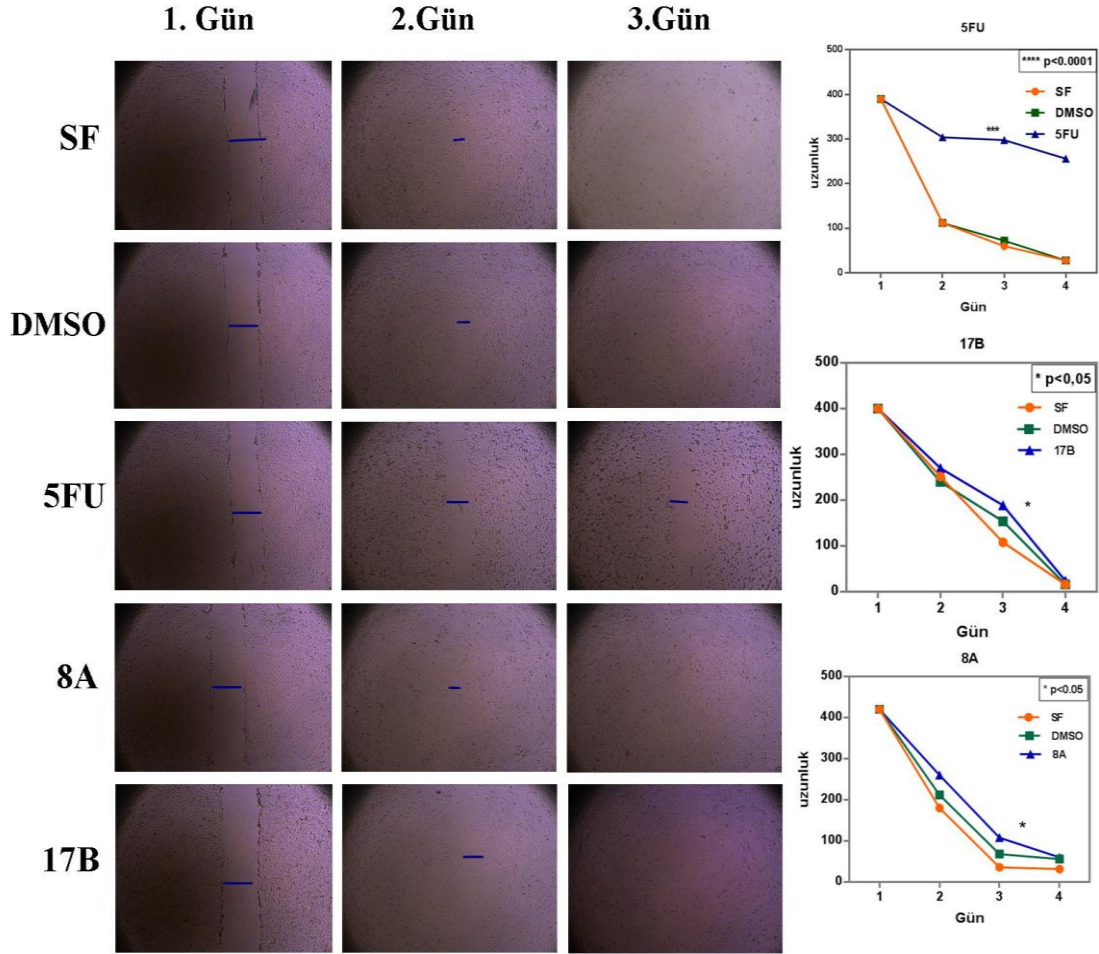
hücre yoğunluğunu arttığı bulunmuştur. Ancak, 17B ve 8A kimyasalı verilen hücrelerde hücre döngüsü farklı hücre gruplarında farklı şekilde etkilenmiştir.

Tablo 4.5 A549, MCF7, U2OS, MDA-MB-231 ve SKBR3 hücrelerinde etkin dozların hücre döngüsü üzerine etkisi gösterilmiştir.

Evre	Muamele Edilen Kimyasallara Göre Hücre Döngüsü Evreleri								
<i>U2OS</i>	SF	DMSO	5-FU	SF	DMSO	17B	SF	DMSO	8A
G0/G1	86,07	64,49	76,43	86,07	64,49	80,99	86,07	64,49	72,96
S	7,48	15,17	5,4	7,48	15,17	9,06	7,48	15,17	14,24
G2/M	6,45	20,34	18,17	6,45	20,34	9,95	6,45	20,34	12,8
<i>A549</i>	SF	DMSO	5-FU	SF	DMSO	17B	SF	DMSO	8A
G0/G1	78,04	70,41	79,09	78,04	70,41	66,48	78,04	70,41	70,56
S	10,75	14,67	14,01	10,75	14,67	16,76	10,75	14,67	15
G2/M	11,21	14,92	6,9	11,21	14,92	16,76	11,21	14,92	14,44
<i>MCF7</i>	SF	DMSO	5-FU	SF	DMSO	17B	SF	DMSO	8A
G0/G1	59,48	61,94	77,62	59,48	61,94	73,79	59,48	61,94	59,61
S	25,01	19,71	17,75	25,01	19,71	12,6	25,01	19,71	22,34
G2/M	15,51	18,35	4,63	15,51	18,35	13,61	15,51	18,35	18,05
<i>SKBR3</i>	SF	DMSO	5-FU	SF	DMSO	17B	SF	DMSO	8A
G0/G1	61,47	60,24	69,28				61,47	60,24	53,39
S	20,93	21,89	21,46	Etkin Değil			20,93	21,89	32,34
G2/M	17,6	17,87	9,26				17,6	17,87	14,27
<i>MDA-MB</i>	SF	DMSO	5-FU	SF	DMSO	17B	SF	DMSO	8A
G0/G1	56,54	56,96	77,69	56,54	56,96	55,27			
S	21,14	13,49	12,32	21,14	13,49	18,68	Etkin Değil		
G2/M	22,32	29,55	9,99	22,32	29,55	26,05			

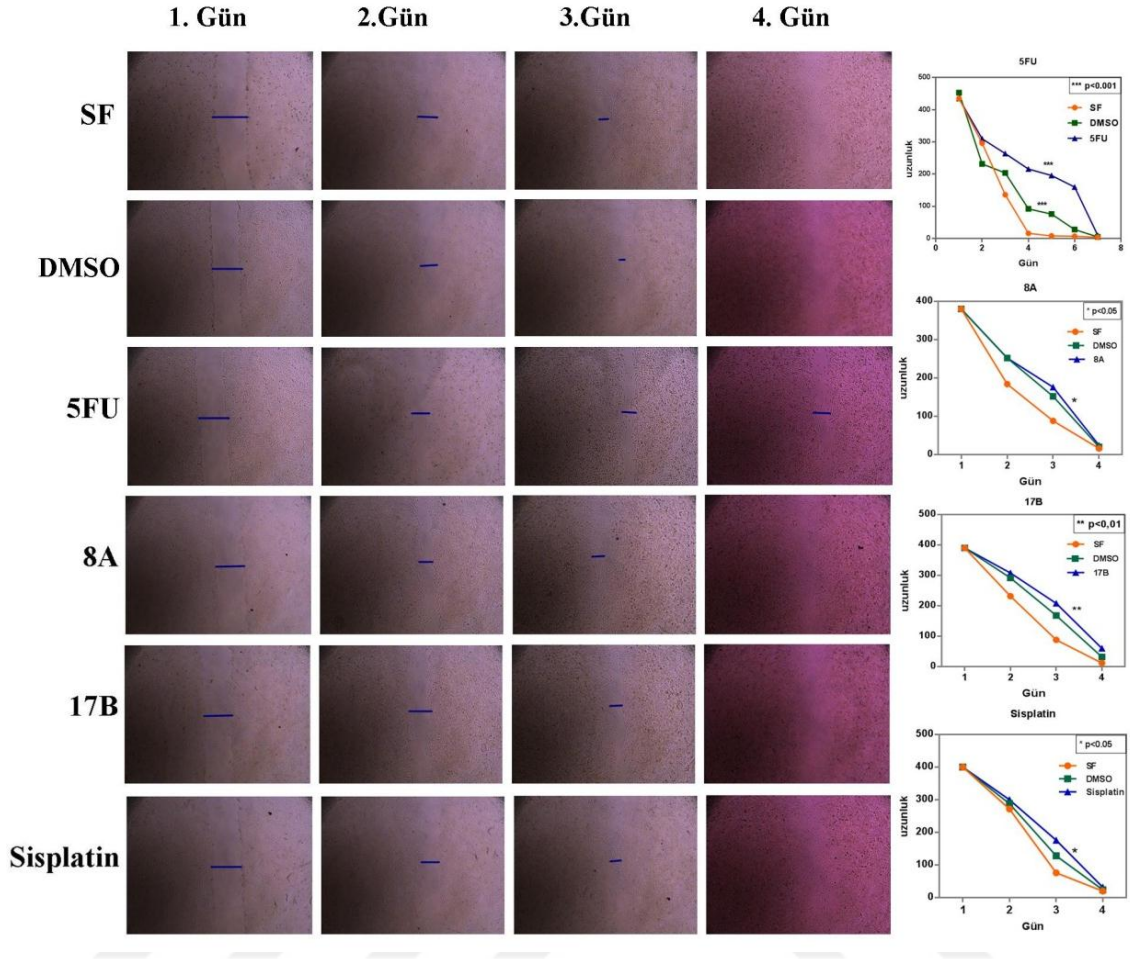
4.7. 5-FU, 17B ve 8A Kimyasal Maddelerinin Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

BEAS-2B hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddelerinin hücreleri etkilemeyen konsantrasyonda yara iyileşmesi üzerine etkileri gösterilmiştir (Şekil 4.45). BEAS2B hücreleri, hücrelerin kaldırıldığı bölgede SF ve DMSO gruplarında ikinci günde tekrar birleşmiştir. Ancak 5-FU verilen BEAS2B hücrelerinde çizilen bölge 7-8 günde kapanmıştır. Buna ek olarak 17B ve 8A verilen hücrelerde çizilen boşluk 4 günden sonra kapanmıştır.



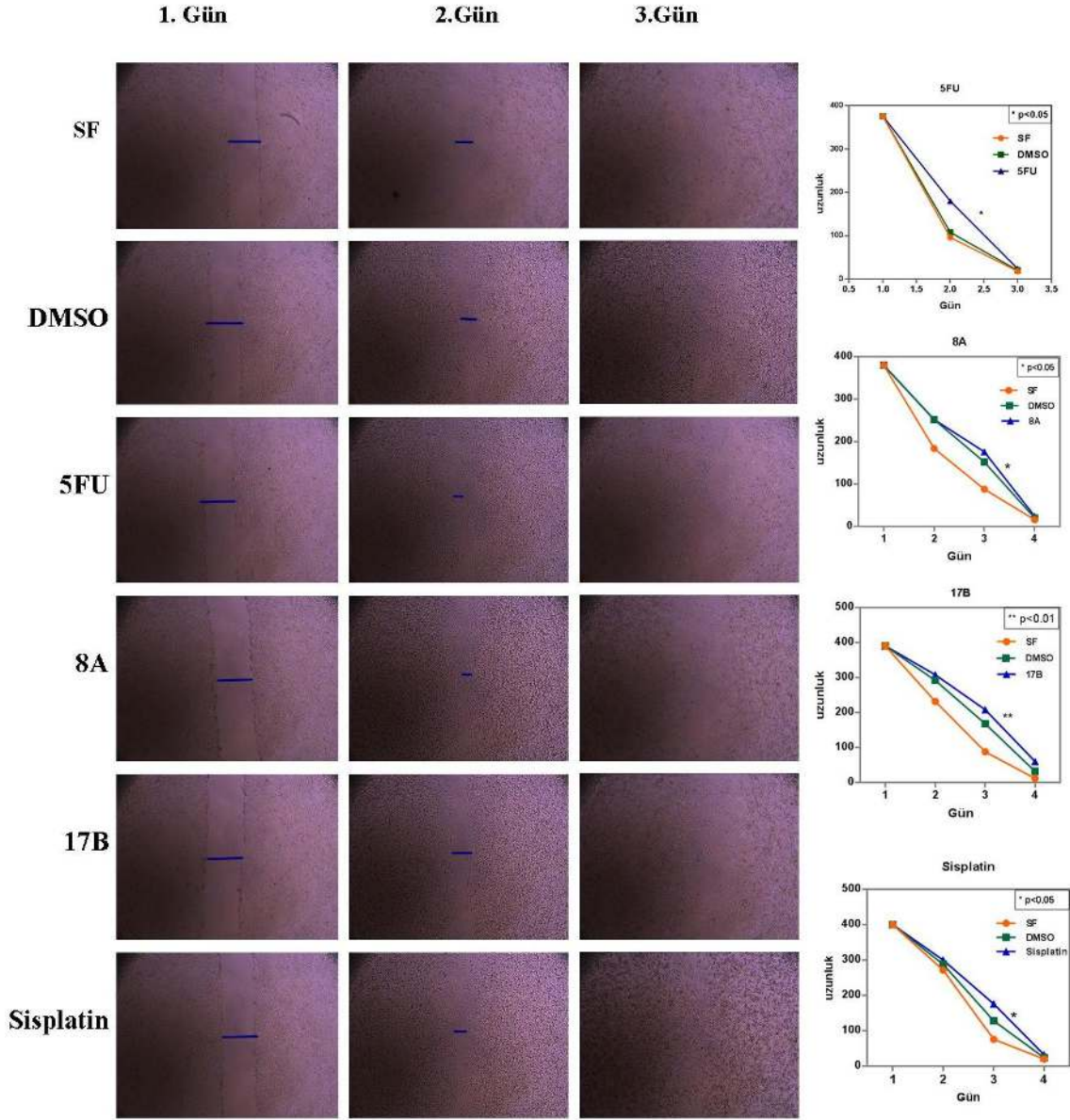
Şekil 4.45. BEAS2B hücrelerine 5-FU, 17B ve 8A kimyasalların etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.

A549 hücre hattında 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasal maddelerinin hücreleri etkilemeyen konsantrasyonda (25 μ M konsantrasyon, hücre canlılığı testinde DMSO'ya en yakın konsantrasyon) yara iyileşmesi üzerine etkileri gösterilmiştir (Şekil 4.46). Buna göre, SF ve DMSO verilen A549 hücre hattında, 3 günde boşluk tamamen dolarken, 5-FU verildiğinde 7. günde, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasalları verildiğinde 4. günde boşluğun kapandığı gözlemlenmiştir. 17B ve 8A kimyasallarının bilinen anti-kanser ilaçları 5-FU ve Sisplatin gibi A549 hücrelerinin göç etme kapasitelerini benzer şekilde etkilediği gösterilmiştir.



Şekil 4.46. A549 hücrelerine 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasallarının etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.

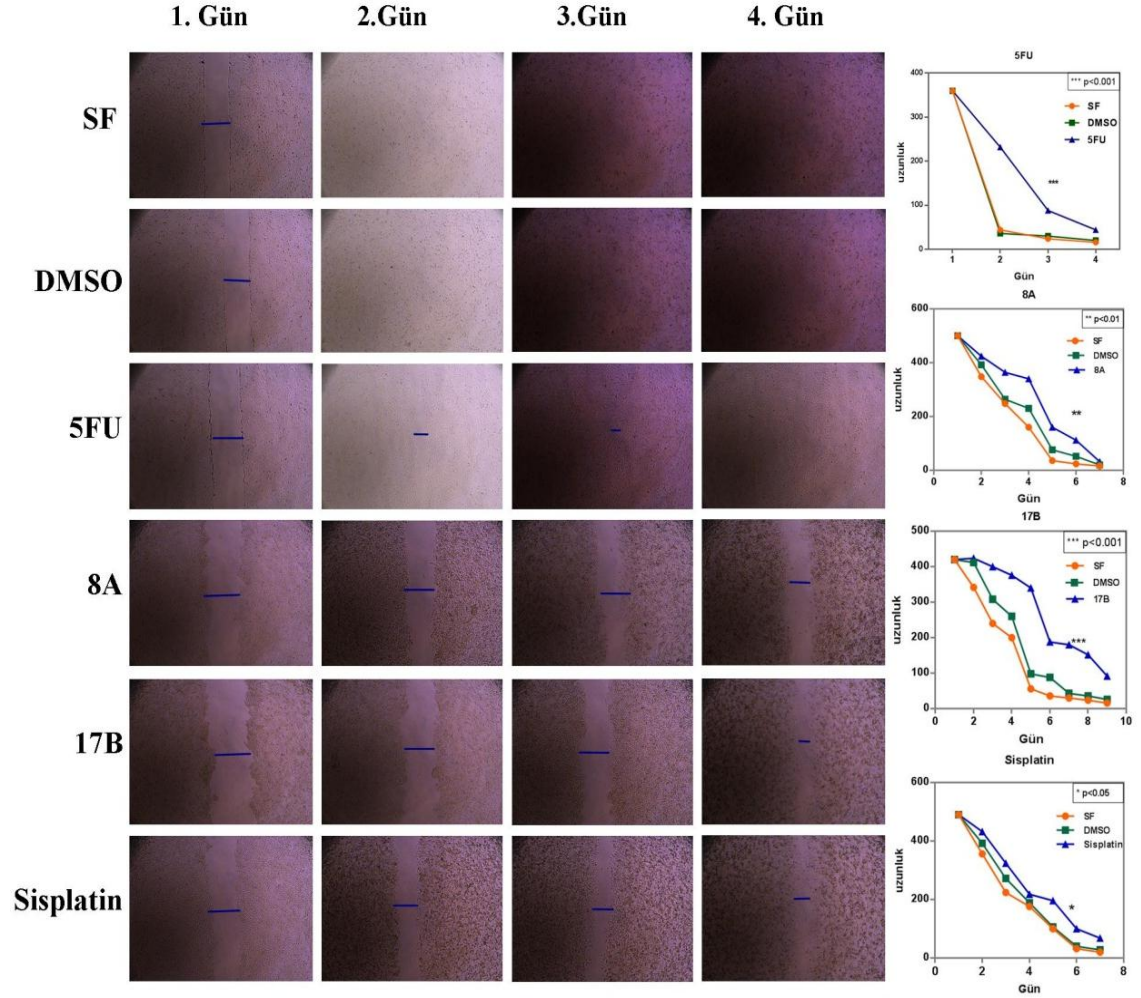
CRL4010 hücre hattında 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasal maddelerinin 25 μ M konsantrasyonunun yara iyileşmesi üzerine etkisine bakılmıştır (Şekil 4.47). SF ve DMSO verilen CRL4010 normal meme epitel hücresinde çizilen alan 48. saatte tamamen dolarken, 5-FU ile maruz bırakıldığında 72. saatte boşluğun tamamen dolduğu görülmüştür. Bununla beraber Sisplatin, 17B ve 8A kimyasalları ile maruz bırakılan CRL4010 hücrelerinde, çizilen kısmın 4. günde birleştiği görülmüştür. 17B ve 8A kimyasallarının Sisplatin anti-kanser ilacı gibi yara iyileşmesi üzerine etkilerinin benzer olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.47. CRL4010 normal meme epitel hücre hattında 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasallarının etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.

MCF7 hücre hattında 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasal maddelerinin 25 μ M etkin olmayan dozda yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir (Şekil 4.48). MCF7 hücrelerinde açılan boşluk SF ve DMSO’da 2. günde kapanmıştır. MCF7 hücre hattında, hücreler 25 μ M 5-FU ile maruz bırakıldığında açılan boşluğun 4 gün sonra kapandığı görülmüştür. Hücreler, 25 μ M konsantrasyonda 8A, 17B ve Sisplatin ile

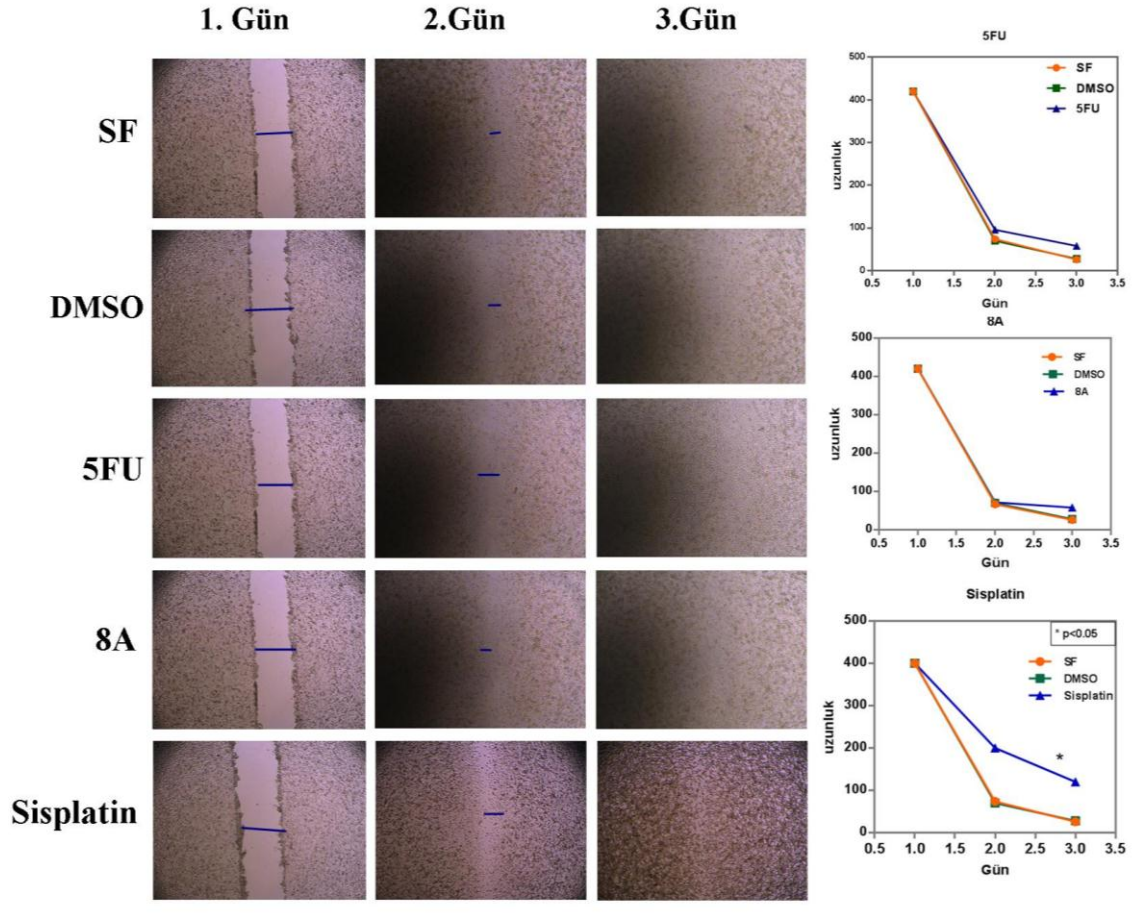
maruz bırakıldığında sırasıyla 7, 9, 7 gün sonra boşluğun tamamen dolduğu gözlemlenmiştir. MCF7 hücrelerinde 17B ve 8A kimyasallarının bilinen diğer anti-kanser ilaçları gibi SF ve DMSO'ya kıyasla hücrelerin göç etme kapasitelerini yavaşlattığı gösterilmiştir.



Şekil 4.48. MCF7 meme kanseri hücre hattında 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasallarının etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.

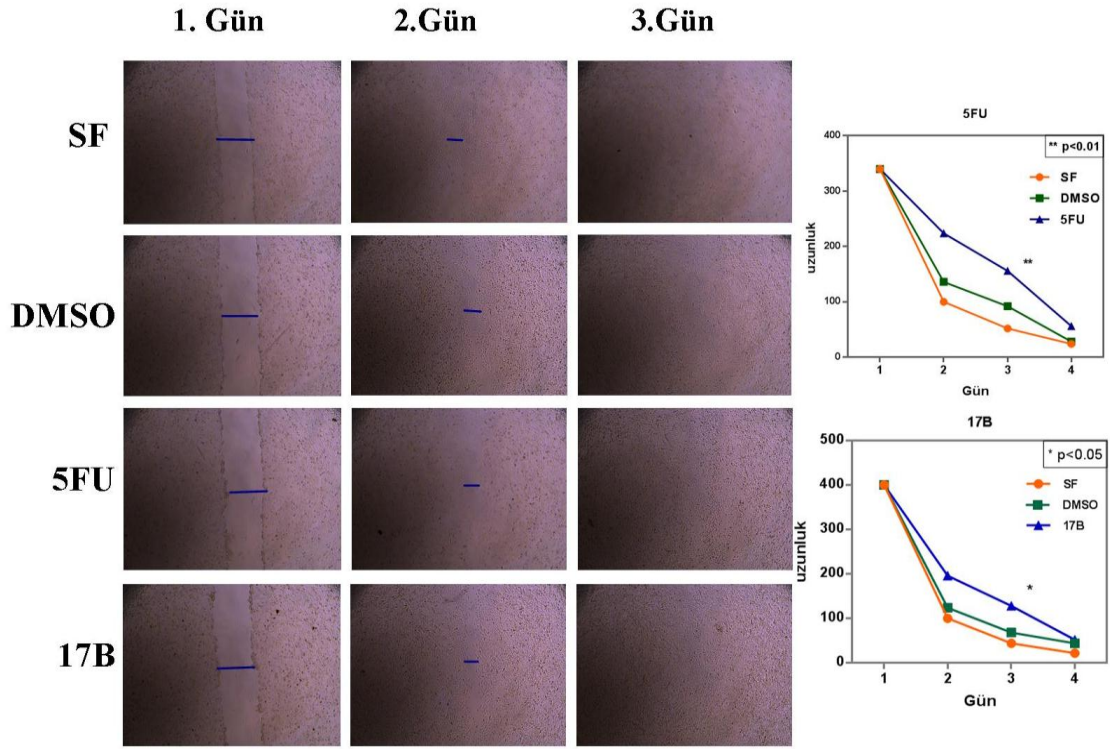
SKBR3 hücre hattında 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasal maddelerinin 25 μ M etkin olmayan dozda yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir (Şekil 4.49). Meme kanseri olan SKBR3 hücreleri normal koşullarda ikinci günde çizilen bölgeyi tamamen doldurmaktadır. Ancak kimyasal verildiğinde bu süre artmıştır. 5-FU, 8A ve Sisplatin

verilen SKBR3 hücreleri üçüncü günde boşluğu doldurmuşlardır. SKBR3 hücrelerinde 8A kimyasalının diğer anti-kanser ilaçları gibi hücrelerin göç etme kapasiteleri üzerine benzer etki gösterdiği bulunmuştur.



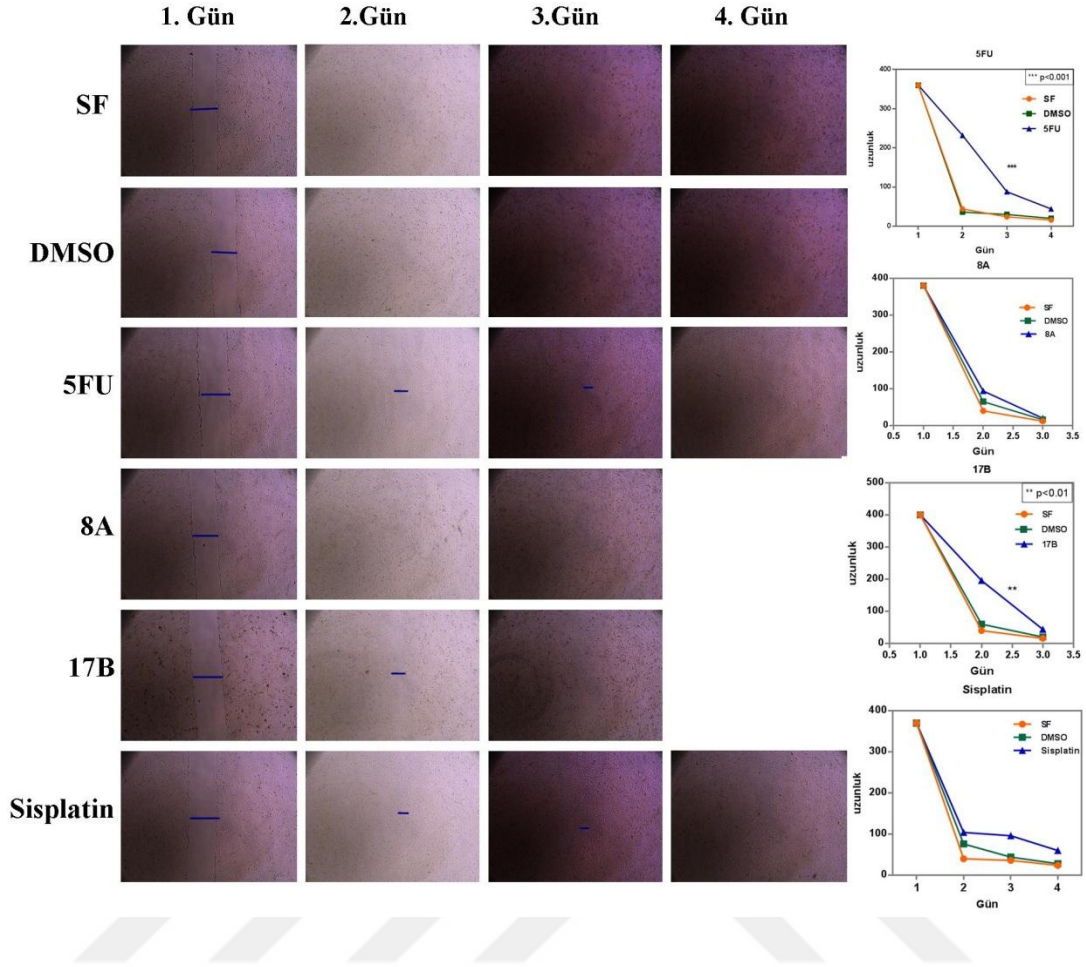
Şekil 4.49. SKBR3 meme kanseri hücre hattında 5-FU, 8A ve Sisplatin kimyasallarının etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattında 5-FU ve 17B kimyasal maddelerinin hücreleri etkilemeyen dozda yara iyileşmesi üzerine etkileri gösterilmiştir (Şekil 4.50). MDA-MB-231 hücreleri normal şartlarda, hücrelerin kaldırıldığı çizilen kısmın 2-3 günde kapandığı görülmüştür. Hücreler 25 μ M 5-FU ve 17B kimyasalları ile muamele edildiğinde 4 günde açılan kısmın tekrar dolduğu görülmüştür. 17B kimyasalının bu hücrede 5-FU gibi hücrelerin yara iyileşmesini yavaşlattığı gösterilmiştir.



Şekil 4.50. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında 5-FU ve 17B kimyasallarının etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.

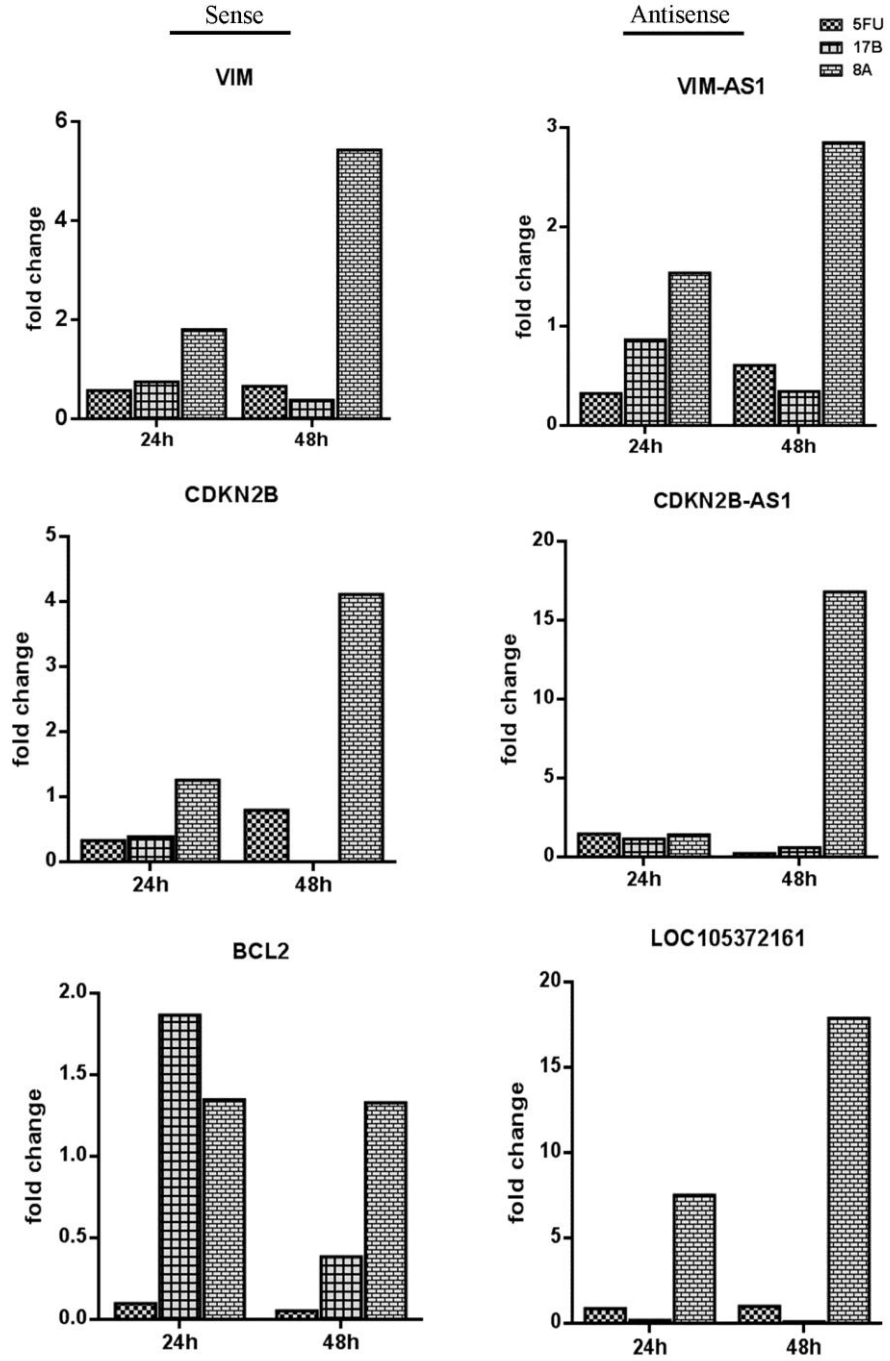
U2OS hücre hattında 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasal maddelerinin hücreleri etkilemeyen konsantrasyonda yara iyileşmesi üzerine etkileri gösterilmiştir (Şekil 4.51). U2OS hücreleri normal koşullarda ikinci günde çizilen boşluk kapanırken, kimyasal ile maruz bırakıldığında aynı boşluğun kapanma süresi artmıştır. Hücreler 25 μ M 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddeleri ile maruz bırakıldığında aynı boşluk 3 günde kapanırken 25 μ M Sisplatin ile maruz bırakıldığında 4 günde kapandığı görülmüştür. Anti-kanser etkinliği henüz bilinmeyen 17B ve 8A kimyasallarının U2OS hücre hattında 5-FU ve Sisplatin gibi hücrelerin göç etme kapasitelerini yavaşlattığı bulunmuştur.



Şekil 4.51. U2OS osteosarkom hücre hattında 5-FU, 17B, 8A ve Sisplatin kimyasallarının etkin olmayan dozlarının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir.

4.8. 5-FU, 17b ve 8A Kimyasal Maddelerinin NAT'ların İfade Seviyeleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

A549 hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarının etkin dozları hücrelere verilerek tekrar RNA izolasyonu yapılmıştır ve NAT'ların ifade seviyeleri gösterilmiştir (Şekil 4.52). İlginç bir şekilde 8A verilen A549 hücre hattında 48 saat maruziyette VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161'in ifade seviyelerinde anlamlı bir şekilde artış olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.52. A549 hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddeleri maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre, VIM, CDKN2B ve BCL2 genleri ve VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161 NAT'larının ifade seviyeleri gösterilmiştir.

5-FU ile maruz bırakılan A549 hücre hattında VIM ifade seviyesinde maruziyet süresine göre bir değişim görülmezken, VIM-AS1 lncRNA molekülünün ifadesinde

artış olduğu bulunmuştur. A549 hücresi 17B ile maruz bırakıldığında, VIM ve VIM-AS1 genlerinin maruziyet süresine göre ifade seviyelerinin düştüğü bulunmuştur. 8A ile muamele edildiğinde ise; VIM ve VIM-AS1 genlerinin ifade seviyelerinin maruziyet süresiyle birlikte arttığı bulunmuştur. Bu bilgiler ışığında, VIM ve VIM-AS1 genleri arasında pozitif bir ilgileşim olduğu söylenebilir.

A549 hücreleri 5-FU ile muamele edildiğinde, CDKN2B geninin ifade seviyesinde maruziyet süresine göre azalma olduğu bulunmuştur, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Aynı zamanda, CDKN2B-AS1 geninin ifade seviyesinde maruziyet zamanına göre değişim olduğu görülmektedir. Bunun aksine, 17B ile maruz bırakılan A549 akciğer kanseri hücrelerinde CDKN2B geninin ifade seviyesi maruziyet süresi arttıkça azalmaktadır. Aynı şekilde 17B ile muamele edilen A549 hücre hattında CDKN2B-AS1 geninin ifade seviyesinde de maruziyet süresine göre değişim olduğu bulunmuştur. 17B kimyasalı ile muamele süresi ile CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyeleri arasında pozitif yönlü bir ilgileşim olduğu bulunmuştur. A549 hücreleri 8A kimyasal maddesine maruz bırakıldığında, CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinde zamana bağlı olarak değişim görülmüştür. 8A muamele süresi arttıkça ile CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. 8A kimyasalının muamele süresi ile CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyeleri arasında pozitif yönlü bir ilgileşim olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.52).

BCL2 geni ve bu genin karşı sarmalından sentezlenen LOC105372161 lncRNA molekülünün ifade seviyeleri 5-FU, 17B ve 8A kimyasalları ile maruz bırakılan A549 hücre hattında gösterilmiştir. 5-FU ile maruz bırakılan A549 hücre hattında, BCL2 geninin ifade seviyesi maruziyet zamanına bağlı olarak düşüş gösterirken, LOC105372161 geninin ifade seviyesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Aynı zamanda, 17B ile muamele edilen A549 hücre hattında, BCL2 geninin ifade seviyesi maruziyet süresine göre düşüş göstermektedir. Ancak, LOC105372161 geninin ifade seviyesinde maruziyet zamanına göre anlamlı bir farklılık görülemedi. Ayrıca, 8A kimyasalı ile muamele edilen A549 hücre hattında, BCL2 geninin ifade seviyesinin düşerken, LOC105372161 geninin ifade seviyesinin maruziyet zamanına göre ciddi derecede artış göstermektedir (Şekil 4.52). BCL2 ve LOC105372161 genleri arasında

maruziyet süresi ile gen ifade seviyeleri arasında negatif bir ilgileşim olduğu ortaya konulmuştur.

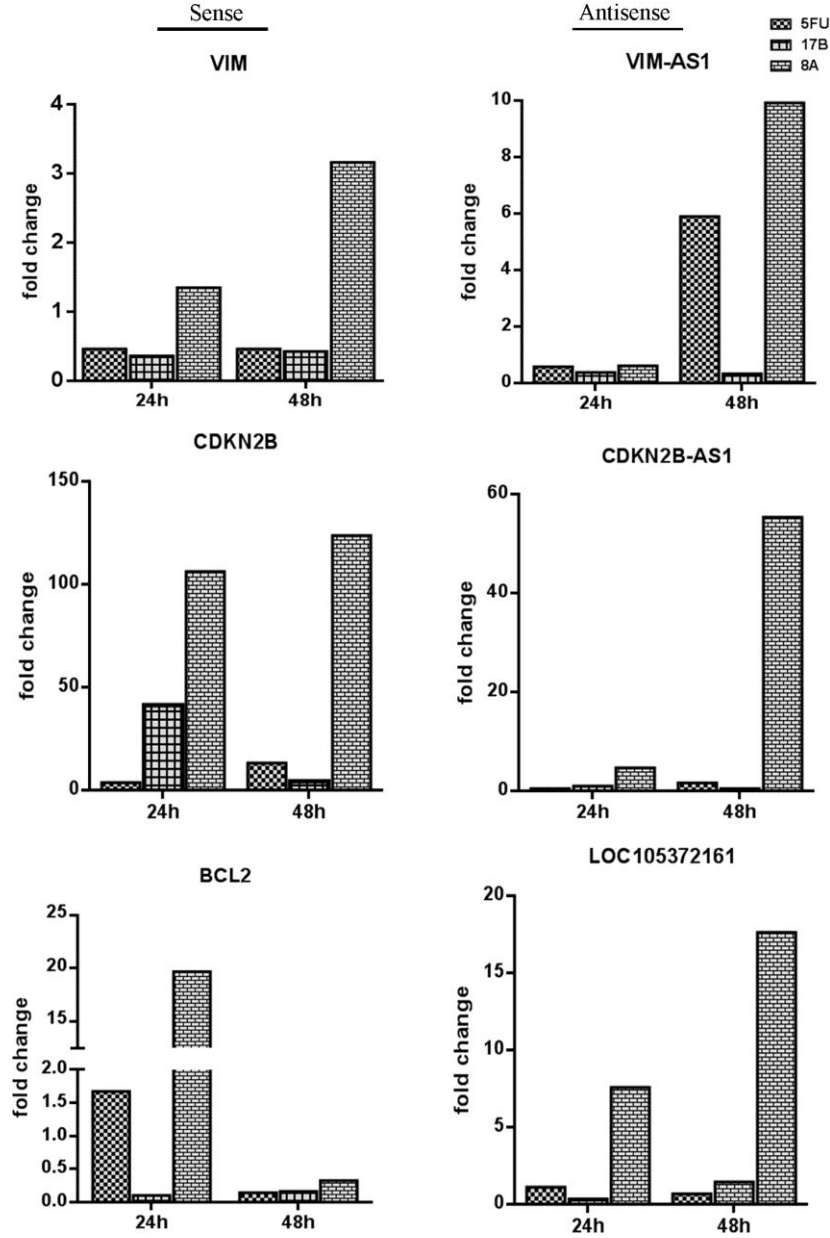
MCF7 hücre hattında, 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarının etkin dozları 24 ve 48 saatlik zaman aralıklarında kaldırılarak RNA izolasyonu yapılmıştır ve NAT'ların ve ilgili genlerin ifade seviyeleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.53).

MCF7 hücrelerinin 5-FU ile 24 ve 48 saat muamele edilmesinden sonra seçilen NAT'ların ifade seviyesinde değişimler olduğu bulunmuştur. 5-FU muamelesi sonrasında VIM geninin ifade seviyesinde anlamlı bir değişim görülmezken, VIM-AS1 geninin ifade seviyesinin maruziyet süresine göre arttığı bulunmuştur. Bunun yanı sıra, 17B ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde, VIM ve VIM-AS1 genlerinin ifade seviyelerinde anlamlı bir değişim görülememiştir. Fakat 8A kimyasalı ile muamele edilen hücrelerde maruziyet zamanına bağlı olarak VIM geninin ifade seviyesinde artış olduğu bulunmuştur ve VIM-AS1 geninin ifade seviyesinin ise neredeyse 10 kat arttığı gösterilmiştir. 8A muamelesi sonrasında maruziyet zamanı ile VIM-AS1 geninin ifade seviyesi arasında pozitif yönlü bir ilgileşim olduğu bulunmuştur (Şekil 4.53).

MCF7 hücrelerinde CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinde, maruziyet zamanına ve maruz bırakılan kimyasala göre değişimler olduğu bulunmuştur. MCF7 hücreleri 5-FU ile muamele edildiğinde, CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bunun aksine, 17B ile muamele edilen hücrelerde maruziyet süresine göre CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinin azaldığı bulunmuştur. Diğer taraftan, 8A ile muamele sonrasında ise, CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinin oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (yaklaşık 100 kat) (Şekil 4.53). MCF7 hücrelerinin muamele edilen kimyasalların maruziyet süresine göre CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinin arasında pozitif yönlü bir ilgileşim olduğu ortaya çıkmıştır.

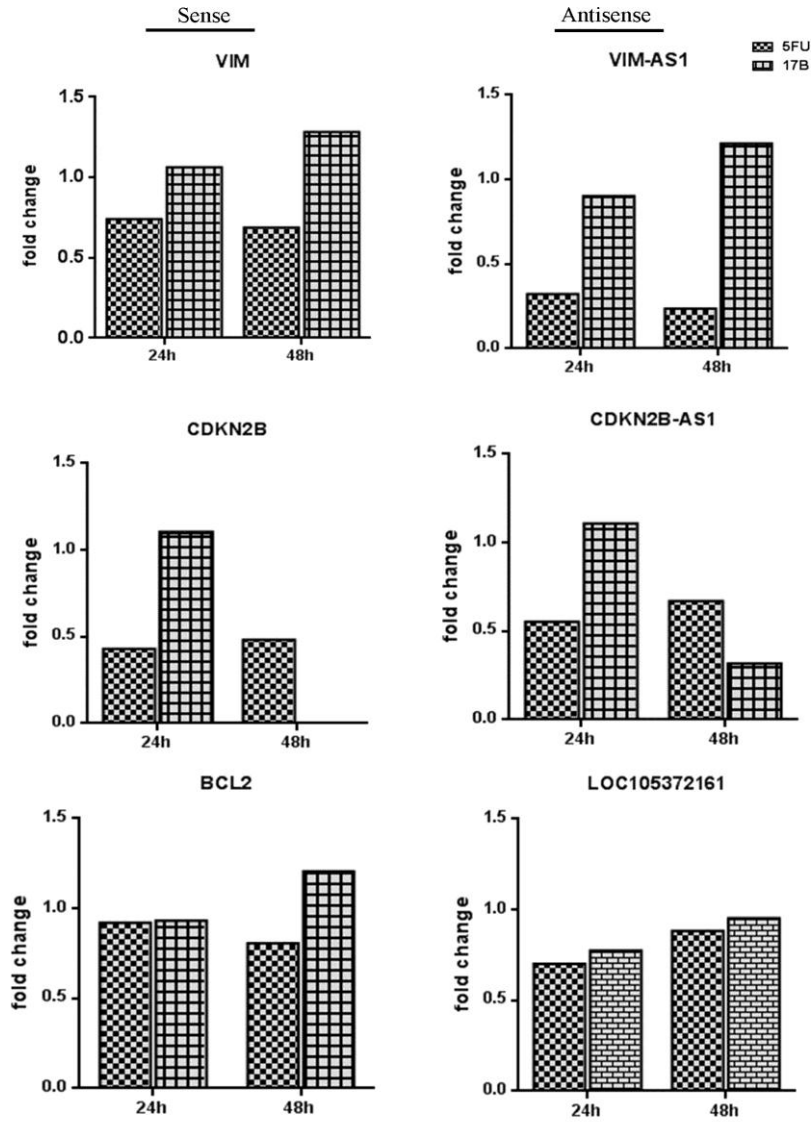
Öte yandan, 5-FU ve 17B ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde maruziyet süresi ile BCL2 ve antisense transkripti olan LOC105372161 genlerinin ifade seviyelerinde herhangi anlamlı bir değişim bulunamamıştır. Ancak, 8A ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde maruziyet zamanına göre BCL2 geninin ifade seviyesi azalırken,

LOC105372161 geninin ifade seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.53). ilginç olarak, 8A ile muamele edildiğinde BCL2 geninin ifade seviyesi maruziyet süresine kıyasla yaklaşık 20 kat azalırken, LOC105372161 geninin ifade seviyesinin ise yaklaşık 3 kat arttığı bulunmuştur. Böylelikle, BCL2 ve LOC105372161 genlerin arasında negatif yönlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.53. MCF7 hücre hattında, 5-FU, 17B ve 8A kimyasal maddeleri maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre, VIM, CDKN2B ve BCL2 genleri ve VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161 NAT'larının ifade seviyeleri gösterilmiştir.

MDA-MB-231 hücreleri 5-FU ve 17B kimyasallarının etkin dozları ile muamele edilerek NAT'ların ifade seviyeleri üzerine etkileri gösterilmiştir (Şekil 4.54). MDA-MB-231 hücreleri 5-FU ile muamele edildiğinde, VIM ve VIM-AS1 genlerinin ifade seviyelerinde düşüş, BCL2 ve LOC105372161 genlerinin ifade seviyelerinde bir değişim olmadığı ve CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinde ise artış olduğu gösterilmiştir. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.54).

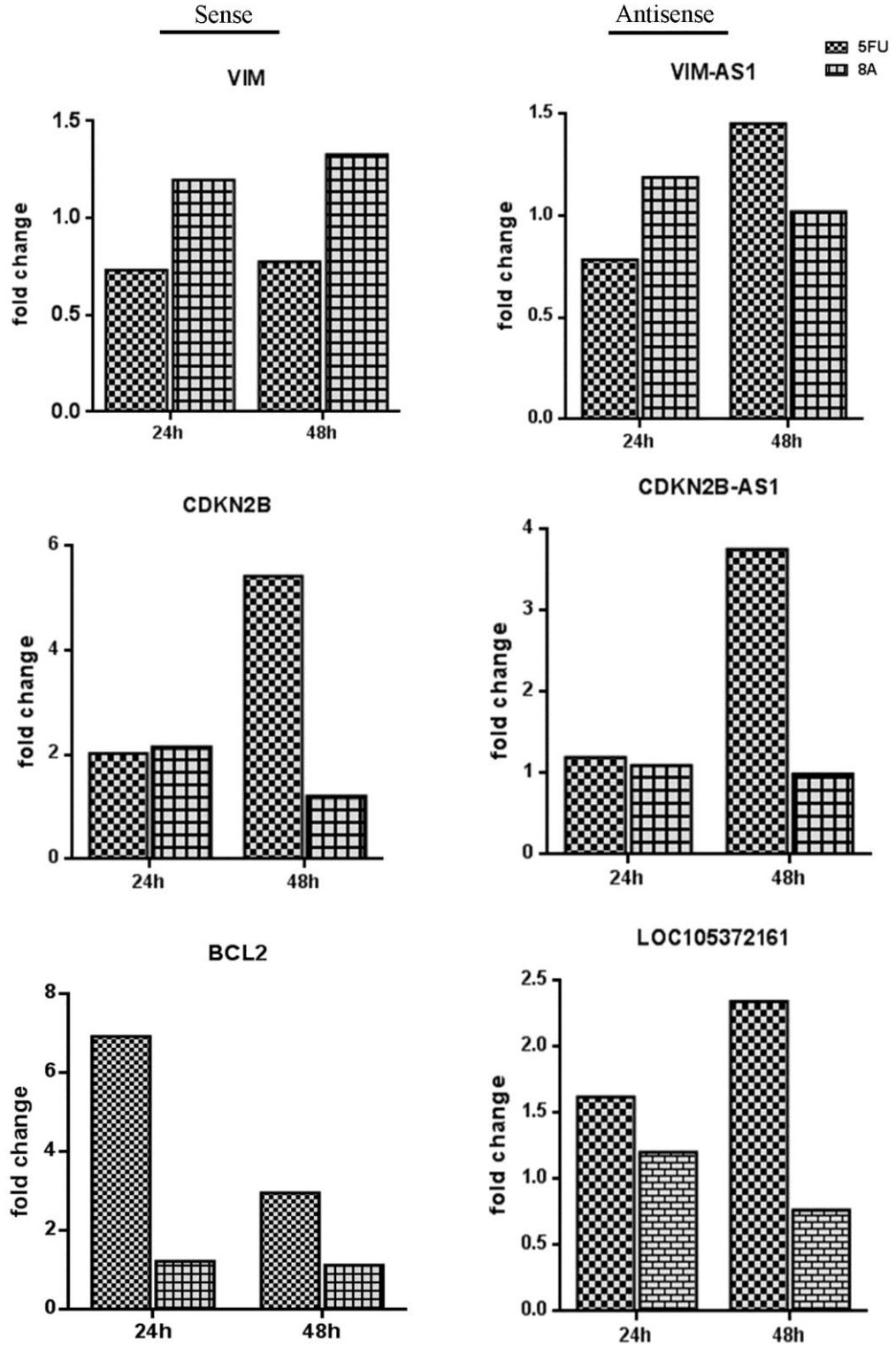


Şekil 4.54. MDA-MB-231 hücre hattında 5-FU ve 17B kimyasal maddeleri maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre, VIM, CDKN2B ve BCL2 genleri ve VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161 NAT'larının ifade seviyeleri gösterilmiştir.

MDA-MB-231 hücreleri 17B kimyasalı ile muamele edildiğinde ise, VIM ve VIM-AS1 genlerinin ifade seviyelerinde düşüş olduğu gösterilmiştir. Bunun aksine CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinde maruziyet süresine kıyasla artış olduğu bulunmuştur. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Buna ek olarak, BCL2 ve LOC105372161 genlerinin ifade seviyelerinde anlamlı bir değişim görülememiştir (Şekil 4.54).

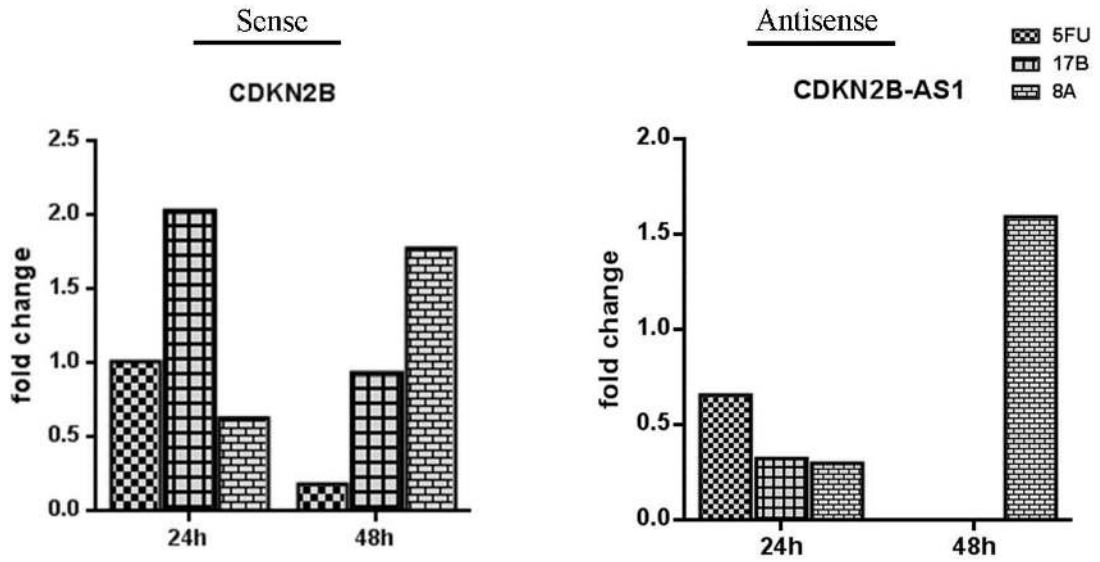
SKBR3 hücrelerinin 5-FU ve 8A kimyasallarının etkin dozları ile muamele edilmesinden sonra VIM, CDKN2B ve BCL2 genleri ve VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161 NAT'larının ifade seviyelerindeki değişimler gösterilmiştir (Şekil 4.55).

SKBR3 hücrelerin 5-FU ile muamele edildiğinde VIM ve VIM-AS1 genlerinin ifade seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir. Dahası, CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyeleri 5-FU ile maruz bırakılan hücrelerde maruziyet zamanına göre artış göstermektedir ve bu değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır. Bunu takiben, 5-FU muamelesi sonrasında BCL2 geninin ifade seviyesi maruziyet süresine kıyasla anlamlı derecede azalma göstermektedir. Aksine, 5-FU muamelesi sonrasında LOC105372161 transkriptinin ifade seviyesinde maruziyet süresine kıyasla artış olduğu gösterilmiştir. SKBR3 hücrelerinin 8A kimyasalı ile 24h ve 48h muamelesi sonrasında, VIM geninin ifade seviyesi düşerken VIM-AS1 geninin ifade seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Ancak, bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bunun yanı sıra, 8A muamelesi sonrasında CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir. Yani, 8A kimyasalının maruziyet süresi ile CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinin arasında negatif yönlü bir ilişki olduğu bulunmuştur. Ek olarak, 8A ile maruz bırakılan hücrelerde CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genleri arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir. İlave, 8A kimyasalı ile maruz bırakılan SKBR3 hücrelerinde BCL2 geninin ifade seviyesi düşerken, LOC105372161 geninin ifade seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.55). Dolayısıyla, BCL2 ve LOC105372161 genleri arasında negatif yönlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.55. SKBR3 hücrelerinde, 5-FU ve 8A kimyasal maddeleri maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre, VIM, CDKN2B ve BCL2 genleri ve VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161 NAT'larının ifade seviyeleri gösterilmiştir.

U2OS hücre hattında 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarının etkin dozlarının CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyeleri üzerine etkileri gösterilmiştir (Şekil 4.56). Bu durumda, 5-FU verilen U2OS hücrelerinde CDKN2B geninin ifade seviyesi düşerken, CDKN2B-AS1 geninin ifade seviyesinin daha fazla düştüğü bulunmuştur. Bunu takiben, 17B kimyasalı ile maruz bırakılan U2OS hücrelerinde CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinin de maruziyet süresine göre düştüğü gösterilmiştir. Bunun aksine, 8A ile muamele edilen hücrelerde CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifade seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, kimyasala maruz bırakılan U2OS hücrelerinde, maruziyet süresi ile CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genleri arasında bir ilişileşim olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.56). Dahası U2OS hücrelerinde, CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genleri arasında pozitif yönlü bir ilişileşim olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 4.56. U2OS osteosarkom hücre hattında, 5-FU, 8A ve 17B kimyasal maddeleri maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre, CDKN2B geni ve CDKN2B-AS1 ve geninin ifade seviyeleri gösterilmiştir.

A549, MCF7, MDA-MB-231, SKBR3 ve U2OS hücrelerine 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarının maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre, VIM, CDKN2B ve

BCL2 genleri ve VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161 NAT'larının ifade seviyeleri Tablo 4.6'da özet olarak gösterilmiştir.

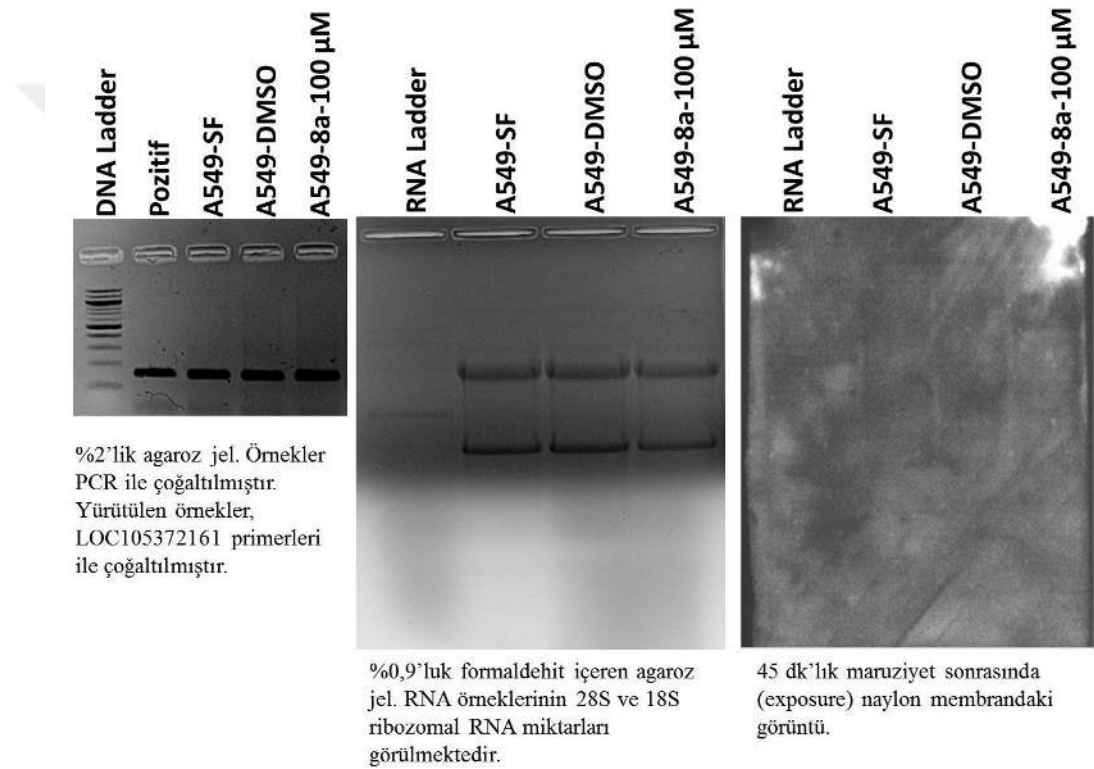
Tablo 4.6. A549, MCF7, MDA-MB-231, SKBR3 ve U2OS hücrelerine 5-FU, 17B ve 8A kimyasallarının maruziyetinden sonra maruziyet süresine göre NAT'ların ifade seviyelerindeki değişimler.

Hücre	NAT					
	VIM	VIM-AS1	BCL2	LOC105372161	CDKN2B	CDKN2B-AS1
5-FU						
A549	Değişmedi	Arttı	Azaldı	Değişmedi	Arttı	Azaldı
MCF7	Değişmedi	Arttı	Azaldı	Değişmedi	Arttı	Arttı
MDA-MB-231	Azaldı	Azaldı	Değişmedi	Değişmedi	Arttı	Arttı
SKBR3	Arttı	Arttı	Azaldı	Arttı	Arttı	Arttı
U2OS			X		Azaldı	Azaldı
17B						
A549	Azaldı	Azaldı	Azaldı	Değişmedi	Azaldı	Azaldı
MCF7	Değişmedi	Değişmedi	Değişmedi	Arttı	Azaldı	Azaldı
MDA-MB-231	Arttı	Arttı	Değişmedi	Değişmedi	Azaldı	Azaldı
U2OS			X		Azaldı	Azaldı
8A						
A549	Arttı	Arttı	Değişmedi	Arttı	Arttı	Arttı
MCF7	Arttı	Arttı	Azaldı	Arttı	Arttı	Arttı
SKBR3	Arttı	Azaldı	Azaldı	Arttı	Azaldı	Azaldı
U2OS			X		Arttı	Arttı

Kimyasal verilen hücrelerde NAT ifadelerindeki değişimler özet olarak, HTH transkript olan VIM ve VIM-AS1 genlerinin ifade seviyelerine kıyasla pozitif yönlü bir ilgileşim olduğu görülmüştür. Ancak SKBR3 hücre hattında olduğu gibi istisnai durumlar da mevcuttur. VIM ve VIM-AS1 genleri arasındaki ilgileşimin daha detaylı olarak anlaşılması için ek deneylere ihtiyaç vardır. Bunun yanı sıra, elde edilen verilere, EMB transkript olan CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin de birlikte transkripte edildiği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında da bunu destekleyen veriler elde edilmiştir. Ancak, TTT transkript olan BCL2 ve LOC105372161 genlerinin hücre çeşidine göre değişiklik gösterdiği ve bu iki gen arasında negatif yönlü bir ilgileşim olduğu bulunmuştur.

4.9. Etkin Kimyasal Maddelerin NAT'ların İfade Seviyesine Olan Etkisinin Northern Blot İle Belirlenmesi

Northern Blot deneyleri, A549 hücrelerine 8A maddesinin etkin dozu verilerek DMSO ve muamele edilmemiş hücrelerdeki LOC105372161 geninin ifade seviyesini belirlemek için yapılmıştır. Hücreler 8A kimyasalı ile 48h muamele edilmiştir. 48 saatlik maruziyet sonrasında hücrelerden RNA yapılarak ilgili genin ifade seviyesi değerlendirilmek istenilmiştir. Northern Blot deneyleri, Gereç Yöntem kısmında detaylı olarak anlatılmıştır.

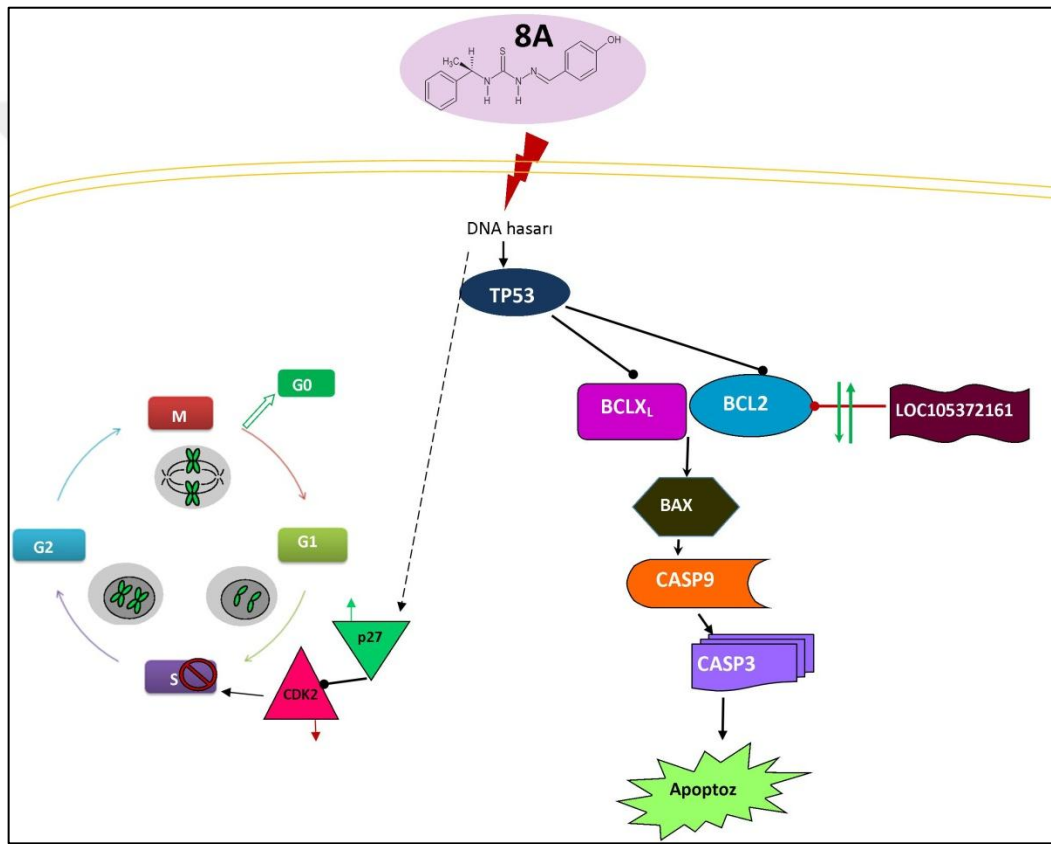


Şekil 4.57. LOC105372161 transkriptinin 8A ile maruz bırakılan A549 hücre hattında ifadesinin Northern Blot yöntemi ile gösterilmiştir.

LncRNA'lar genel olarak, transkriptomda daha düşük ifade edilen moleküller olduğundan çoğaltma yapılmadan hibridizasyon teknikleri ile belirlemek oldukça güçtür. Bizim çalışmamızda da LOC105372161 geninin ifade seviyesinin fazla olduğu

8A kimyasalı verilen A549 hücre hattında bu deney yapılmıştır (Şekil 4.57). Ancak, deney neticesinde LOC105372161 lncRNA molekülü tespit edilememiştir.

Özet olarak, bu tez çalışmasından elde edilen en önemli bulgulardan birisi, 8A kimyasal maddesi ile maruz bırakılan hücrelerde BCL2 geninin ifade seviyesinin düşmesi ve buna karşıt olarak LOC105372161 NAT'ın ifade seviyesinin yükselmesine bağlı olarak apoptozun tetiklenmesidir (Şekil 4.58).



Şekil 4.58. 8A kimyasal maddesinin hücredeki apoptoz yolağı üzerine etkisinin şematik gösterimi. BCL2 geninin ifade seviyesinin düşük olmasında LOC105372161 lncRNA molekülünün etkisi olduğu gösterilmektedir. Ayrıca, 8A kimyasalının CDK2'nin ifade seviyesini düşürerek S fazında hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir.

Bu bağlamda, 8A ile maruz bırakılan hücrede DNA hasarı oluşmakta ve buna bağlı olarak apoptoz yolağı tetiklenmektedir. Bu yolakta BCL2 ve BCLXL gibi anti-apoptotik

genlerin ifade seviyeleri azalırken, pro-apoptotik BAX geninin ifade seviyesi artmaktadır. Ayrıca, kaspazların da etkinliği artarak apoptoz olayı gerçekleşmektedir. Bizim elde ettiğimiz bulgularda ise, BCL2 ve BCLX_L genlerinin ifade seviyeleri 8A ile maruziyet süresine göre azalmaktadır ve BAX ve CASP3-9 genlerinin ifade seviyeleri artmaktadır. Ancak, BCL2'nin karşı sarmalından sentezlenen TTT LOC105372161 antisense transkriptinin ifade seviyesi ciddi olarak artış göstermektedir. Dolayısıyla, LOC105372161 transkripti apoptoz yolağında etkili olan bir lncRNA molekülü olabilir. Ayrıca, 8A kimyasalının hücreyi S fazında durdurduğu gösterilmiştir. Burada etkin olan CDKN1B geninin ifade seviyesinin arttığı ve CDK2 geninin ifade seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Ancak, hücre döngüsü üzerine daha detaylı araştırmalar yapılarak tiyosemikarbazon türevi bu bileşiklerin hücre döngüsü üzerine etkisi net olarak anlaşılabilir.

5 . TARTIŞMA

Karmaşık biyolojik süreçlerin aydınlatılması kodlanmayan RNA moleküllerinin keşfi ile büyük hız kazanmıştır. Yapılan araştırmalar, bu RNA moleküllerinin hücre büyümesi, çoğalması, hücre farklılaşması ve ölümü gibi hayati öneme sahip biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli roller oynadığını göstermiştir. Dahası, bu moleküllerin ifade seviyelerinde meydana gelen bozuklukların başta kanser olmak üzere birçok hastalığın patofizyolojisinde önemli olduğu gösterilmiştir (9). Son yıllarda yapılan kanser araştırmalarında ncRNA'ların önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir. Bu RNA moleküllerinin hücre için hayati öneme sahip süreçlerde etkili oldukları ve etkileri daha önceden kanıtlanmış kanser ile ilişkili genlerin düzenlemesinde görev aldıkları bildirilmiştir (5, 9, 192). Çalışmamızda, doğal antisense transkriptlerden VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161 lncRNA'ların kanser oluşumu ve gelişimindeki rolleri araştırılmıştır. LncRNA transkriptlerinin genel anlamda protein kodlayan genlerin ifade seviyelerine kıyasla düşük ifade gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.3).

Çalışmamızda, insan genomundaki doğal antisense transkriptlerin alt türleri ve çeşitlerine göre günümüze kadar yaklaşık olarak ifade edilen kromozomal miktarları (sayısal olarak) gösterilmiştir. İnsan genomunda en fazla NAT, en fazla gen ihtiva eden 1. kromozomda görülürken, en az NAT ise Y kromozomunda bulunmaktadır. İlk defa bu çalışma ile insan genomundaki NAT'lar ve alt türlerinin kromozomal sayısı gösterilmiştir. İnsan genomunda yaklaşık 7500 tane NAT olduğu bulunmuştur. Bunlardan büyük bir çoğunluğu protein kodlayan genlerin karşı sarmalından sentezlenen lncRNA transkriptlerinden oluşturmaktadır. NAT'ların kendi içinde dağılımları sayısal olarak birbirine yakındır. Ancak en fazla HTH NAT çeşidinin olduğu gösterilmiştir.

İleri teknolojiler kullanılarak yapılan tüm transkriptom ve mikrodizin analizleri neticesinde, insan genomunun yaklaşık %20'lik kısmının sense-antisense çifti olduğu gösterilmiştir (193). Bununla beraber, insan genomunda sense-antisense çiftlerin (bi-

directional) yanında sense-sense çiftlerin (non-bi-directional) de olduğu gösterilmiştir. Antisense transkriptlerin birçok yönden gen ifadesinin düzenlediği öne sürülmüştür (193, 194). Araştırmacılar, hücre içerisinde antisense aracılı düzenlemeyi, transkriptin çekirdek ve sitoplazmada yerleşimine göre hem yazılımsal hem de proteine çevrim sırasında gerçekleştirebileceğini savunmuşlardır (195, 196). İnsan genomundaki bu karmaşık düzenlenmede antisense transkriptlerin etkileri oldukça yüksektir.

Werner ve ark. (197), sense ve antisense RNA problemleri kullanarak bazı antisense transkriptler belirlemişlerdir ve bu antisense transkriptlerin beyin, karaciğer, timüs ve böbrek dokularında özgül ifade edildiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda, VIM-AS1, CDKN2B-AS1 ve LOC105372161 üç alt tip NAT'ın farklı insan dokusu ve normal ve kanserli hücre hatlarında ifade seviyeleri belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada, VIM-AS1'in en fazla akciğer, böbrek ve kemik iliğinde ifade edildiği gösterilmiştir. Normal insan dokularının aksine, akciğer kanseri hücresi olan A549 hücrelerinde VIM-AS1'in ifade seviyesinin anlamlı derecede düştüğü ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar, bu NAT transkriptin kanser oluşumunda ve ilerlemesinde rollerinin olabileceğini göstermiştir. Buna ek olarak, LOC105372161 en fazla plesenta, serebellum, fetal beyin ve prostat dokularında ifade edildiği bulunurken PC3 prostat kanseri hücrelerinde düşük ifade edildiği bulunmuştur. Ancak, DU-145 prostat kanseri hücrelerinde PC3 hücrelerine kıyasla aşırı ifade edildiği bulunmuştur. Bu bulgular ışığında bu kodlanmayan RNA'nın kanserdeki rolü hakkında net bir yorum yapmak mümkün olmamaktadır. Ancak, LOC105372161 transkriptinin BCL2'nin düzenlemesiyle apoptoz yolağında etkili olabileceği gösterilmiştir. Buna ek olarak CDKN2B antisensinin akciğer, timüs ve serebellum dokularında yüksek ifade edildiği bulunmuştur. Bunun aksine A549 akciğer kanseri hücrelerinde BEAS2B akciğer epitel hücrelerine kıyasla düşük ifade edildiği bulunmuştur. Benzer şekilde, U2OS osteosarkom hücrelerinde ifade seviyesinin hfOB1.19 normal osteoblast hücrelerine kıyasla anlamlı olarak düştüğü bulunmuştur. Bu sonuçlar, CDKN2B-AS1 RNA'sının kanser gelişiminde rolünün olabileceğini göstermektedir.

Bunun yanı sıra, protein kodlayan gen ile ilgili NAT arasında da pozitif/negatif ilişki olduğu gösterilmiştir. Doku ve hücre profili belirlenen lncRNA genlerinin hangi hücrelerde çalışılacağı belirlenmiştir. VIM; VIM-AS1 NAT transkriptleri için, BEAS2B

ve A549 akciğer normal ve kanser hücreleri, normal meme hücresi CRL4010 ile MCF7, SKBR3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri seçilmiştir. CDKN2B; CDKN2B-AS1 NAT transkriptleri için, BEAS2B ve A549 akciğer normal ve kanser hücreleri, normal meme hücresi CRL4010 ile MCF7, SKBR3 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ve hFOB1.19 normal kemik hücresi ile U2OS osteosarkom hücreleri seçilmiştir. BCL2; LOC105372161 NAT transkriptleri için ise yukarıda belirtilen akciğer ve meme kanserli hücreler ve normal hücreleri tercih edilmiştir.

VIM-AS1 ve henüz isim olarak tanımlanmamış LOC105372161 lncRNA genleri ile ilişkili yapılan herhangi bir çalışma mevcut değildir. Ancak, CDKN2B-AS1 (ANRIL olarak da bilinmektedir) lncRNA transkriptinin çeşitli kanser türlerinde değişik ifadelendiği gösterilmiştir. CDKN2B-AS1'in ifade seviyesinin hem serviks kanseri hücre hattında hemde serviks kanserli dokularda ciddi derece artış gösterdiği bulunmuştur (198). Dahası, CDKN2B-AS1 geninin ifadesinin baskılandığı serviks kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasının, hücre göçünün ve istilasının baskılandığı gösterilmiştir (198). Bunun yanı sıra, osteosarkom dokularda normal dokulara kıyasla ANRIL geninin ifade seviyesinde artış bulunmuştur (199). Ayrıca, U2OS hücrelerinde hipoksi koşullarında ANRIL'in ifade seviyesinin arttığı görülmüştür (199). Bizim çalışmamızda ise normal osteoblast hücre hattı olan hFOB1.19'a kıyasla U2OS osteosarkom hücre hattında CDKN2B-AS1 geninin ifade seviyesinin azaldığı bulunmuştur. Lu ve ark. (200), küçük hücreli akciğer kanserli hastalarda yaptıkları bir çalışmada normal dokuya göre kanserli akciğer dokularında CDKN2B-AS1'in ifade seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca, CDKN2B-AS1'in ifade seviyesinin TNM evresi ve tümör çapı ile pozitif ilişileşim gösterdiği bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise normal akciğer dokusunda CDKN2B-AS1 geninin ifadesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra normal akciğer hücre hattı BEAS2B'ye kıyasla akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücrelerinde CDKN2B-AS1'in ifade seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Mesane kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada, CDKN2B-AS1 geninin ifade seviyesi normal dokuya kıyasla kanserli dokularda anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur (201). Ayrıca, CDKN2B-AS1 susturulmuş T24 ve EJ mesane kanseri hücre hatlarında hücre çoğalmasının baskılandığı, apoptozun arttığı gösterilmiştir (201). Bizim çalışmamızda, CAL29 mesane kanseri hücre hattında CDKN2B ve CDKN2B-AS1 genlerinin ifadesinin ciddi derece düşük olduğu

gösterilmiştir. Yapılan bazı çalışmalar CDKN2B-AS1 (ANRIL) geninin tümör baskılayıcı lncRNA olduğunu gösterirken bazı çalışmalar ise bu geninin kanserli dokularda/hücrelerde ifade seviyesinin artarak onkogenik özellik gösterdiği rapor edilmiştir (138, 198-200, 202). Bizim sonuçlarımıza göre ise, bazı kanserli hücrelerde bu lncRNA geninin ifade seviyesinde artış bulunurken bazılarında ise azalma olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla bu genin kanserde çift yönlü (dual) işlevinin olduğu söylenebilir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, NAT'lar hedeflediği genleri yazılım, mRNA işlenmesi, splicing, kararlılık, hücresel taşıma ve proteine çevrimi gibi birçok düzeyde düzenleyebildiği daha önceden de bahsedilmiştir. En yaygın örnek olarak X kromozomu etkinsizleşmesinden sorumlu olan XIST'in karşıt sarmalından sentezlenen bir diğer lncRNA molekülü TSIX'tir. TSIX lncRNA molekülü XIST'in düzenlenmesinde rol oynamaktadır (168, 169). Bunun yanı sıra, Mahmoudi *ve ark.* (203), p53 geninin 5' UTR bölgesini hedefleyen ve p53'ün düzenlenmesinde görevli olduğu gösterilen endojen Wrap53 lncRNA molekülünü tanımlamışlardır. Wrap53'ün baskılandığı hücrelerde p53'ün ifadesinin azaldığı, Wrap53'ün aşırı ifalendirilmiş hücrelerde ise p53 ifadesinin arttığı bulunmuştur. p53 ile Wrap53 arasında pozitif yönlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir (203-205). Başka bir çalışmada ise, HIF1A geninin 3'UTR bölgesinde kodlanan aHIF doğal antisense transkripti HIF1A'nın düzenlenmesinde önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir (164). Renal kanserde hipoksi koşullarında, aşırı ifadelendiği gösterilmiştir. Dahası, insan malign hastalıklarında doğal antisense transkriptlerin rolleri olduğu gösterilmiştir (164, 206). İlginç olarak son yıllarda kanser metastazı ile ilişkilendirilmiş MALAT1 geninin karşı sarmalından sentezlenen ve TALAM1 olarak isimlendirilen bu antisense transkriptin MALAT1'in düzenlenmesinde pozitif bir etkileşim gösterdiği bulunmuştur (207). Ayrıca, TALAM1 antisense transkripti MALAT1'in hem yazılımsal hem de RNA kararlılığı bakımından düzenlenmesinde görev almaktadır. Ayrıca, NAT transkriptlerinin birçok kanser türünde değişik ifade edildiği gösterilmiştir. Osteosarkom hücrelerinde FGFR3-AS1 geninin FGFR3'ün düzenlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. FGFR3-AS1 osteosarkom dokularında ve hücrelerinde aşırı ifadelendiği gösterilmiştir. Buna ek olarak, FGFR3-AS1'in ifadesinin artması, tümör boyutu, Enneking evrelenmesi, metastaz ve hayatta kalım süresi ile ilişkilendirilmiştir. FGFR3-AS1'in susturulması

hücre döngüsünün ilerlemesini ve çoğalmasını baskıladığı bildirilmiştir (208). Bunun yanı sıra, HCC'da SIRT1-AS1 genindeki tanımlanmış mutasyon ile HCC riskinin azaldığı gösterilmiştir ve mutant SIRT1-AS1 geni hücre çoğalmasını engellediği bulunmuştur (209).

Bu çalışma kapsamında, henüz etkinliği bilinmeyen iki tane anti-kanser ilacı olma potansiyeli yüksek olan tiyosemikarbazon türevlerinin kanser hücrelerinde etkinlikleri belirlenmiştir. İlk olarak farklı konsantrasyonlardaki kimyasal maddeler hücrelere verilerek hücrelerin yarısını öldüren etkin dozları belirlenmiştir. Bu etkin dozların apoptoz ve hücre döngüsü üzerine etkileri gösterilmiştir. Sonrasında bu iki potansiyel anti-kanser ilacının ve 5-FU anti-kanser ilacının etkin dozları ile hücreler muamele edilerek maruziyet zamanına göre NAT'ların ifade seviyeleri değerlendirilmiştir.

Tiyosemikarbazonlar, amin türevlerinin önemli bir sınıfıdır ve özellikle anti-kanser etkinliği gibi birçok farmakolojik etki gösteren kimyasallardır. Tiyosemikarbazonlar, birçok yönden anti-kanser etkinliği gösterebilmektedir. DNA sentezi için gerekli olan ribonükleotid redüktaz enziminin baskılanmasında tiyosemikarbazon türevli ilaçlar kullanılmaktadır (210). Bunun yanı sıra, bu kimyasallar demir şelatasyonu ile anti-kanser etkinliği göstermektedir (211). Ayrıca tiyosemikarbazon türevlerinin DNA topoizomera II karmaşımındaki tiyol kalıntıların (residu) alkilenmesi ile kararlı yapıdaki bu karmaşımı kırarak anti-kanser etkinliği gösterebilmektedir (212, 213). Bizim çalışmamızda ise, daha önceden Tasdemir *ve ark.* (189) tarafından sentezlenen 17B ve 8A tiyosemikarbazon türevlerinin çeşitli kanser hücrelerindeki, hücre canlılığı, apoptoz, hücre döngüsü ve yara iyileşmesi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca, bu kimyasal maddelerin BCL2, CDKN2B ve VIM genlerinin karşı sarmalından sentezlenen ve bu genlerle ilişkili olabilecek antisense transkriptler üzerine etkileri belirlenmiştir.

Bu çalışmada, 17B ve 8A kimyasallarının etkinliğini belirlemede 5-FU ilacı ile kıyaslama yapılmıştır. Antikanser ilacı 5-FU, uygun dozlarda hastaya verildiğinde yan etkileri tolere edilebilen bir ilaçtır. Bilinen anti-kanser ilaçlarına (5-FU ve Sisplatin) karşın, bizim çalışmamızda 17B ve 8A kimyasallarının kanser hücrelerinde IC50 dozları belirlenmiştir. Bu dozların apoptoz, hücre döngüsü üzerine etkileri gösterilmiştir. Etkin

dozlara göre, MCF7 hücrelerinde 5-FU ile muamele sonrasında %0,03 apoptotik hücre popülasyonu görülürken, 17B ve 8A verilen MCF7 hücrelerinde sırasıyla %76 ve %40 apoptotik hücre popülasyonu görülmektedir (Şekil 4.36). MCF7 hücrelerinde bu kimyasalların hücreyi apoptoza götürerek öldürdüğü anlaşılmaktadır. Buna ek olarak, U2OS osteosarkom hücrelerinin 5-FU ile 24 saat maruziyetinden sonra apoptotik hücre grubu %0,01 iken 17B ve 8A verilen hücrelerde sırasıyla %38 ve %50 olarak bulunmuştur (Şekil 4.39). MCF7 hücrelere benzer olarak U2OS hücrelerinde de 17B ve 8A kimyasalları hücreyi apoptoza götürerek öldürmüştür.

Pro-apoptotik bir protein olan Bax ve anti-apoptotik protein olan BCL2'nin mitokondri aracılı apoptozda önemli rollerinin olduğu daha önceden bilinmektedir (31, 56, 58, 60, 214). Kumar *ve ark.* (214) yaptıkları bir çalışmada kolşisin (mikrotübül baskılayıcısı) verilen MIA PaCa-2 pankreas hücrelerinde kolşisin konsantrasyonuna bağlı olarak BCL2 geninin ifade seviyesinin azaldığı, BAX geninin ifade seviyesinin arttığı bulunmuştur. Dahası, yapılan bu çalışmada CASP3 geninin ifade seviyesinin de konsantrasyona bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir (214). Buna ek olarak, Sisplatin verilen HeLa (serviks kanseri) hücrelerinde muamele edilememiş hücrelere kıyasla Bcl2 proteinin ifade seviyesi düşerken Bax proteininin ifade seviyesinin arttığı bulunmuştur (215). Ayrıca, diğer bir çalışmada Sisplatin verilen ovaryan kanseri hücrelerinde maruziyet zamanına göre BCL2 geninin ifade seviyesi azalırken CASP3'ün ifade seviyesinin arttığı gösterilmiştir (216). Buna ek olarak, MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücreleri Sisplatin ile muamele edildikten sonra kesilmiş CASP ifadesinin arttığı bulunmuştur (217). Öte yandan, Metuzumab ile muamele edilen A549 hücrelerinde Bcl2 proteinin ifade seviyesini azaldığı ve Bax proteinin ifade seviyesinin arttığı gösterilmiştir (218). Xing *ve ark.* (219) HepG2 hücrelerinin Lidocaine ile muamele edilmesi BCL2 geninin ifade seviyesini düşürürken, BAX geninin ifade seviyesini arttırdığı ve kaspazların etkinliğinin arttırdığı rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, hücrelerin kimyasal ile maruziyet zamanına göre değişimler gösterilmiştir. Genel anlamda, kimyasal ile maruz bırakılan hücrelerde BCL2 ailesinden olan anti-apoptotik gen BCLX_L'in ifade seviyesinde azalma görülmüştür. Ayrıca, yapılan çalışmaları destekler biçimde BAX geninin ifade seviyesinde artış olduğu gösterilmektedir. Ayrıca, CASP3 ve CASP9 genlerinin ifade seviyelerinin kimyasal ile maruziyet süresine göre arttığı tespit edilmiştir.

Apoptoz analizleri sonucu elde edilen bulguları toparlayacak olursak, 8A kimyasalı ile maruz bırakılan hücrelerde DNA hasarı oluşacağı ve bu hasarın p53 ifadesini arttıracığı kanaatindeyiz. Bulgularımız da bunu destekler biçimde, p53 ifadesi artmıştır ve bunun yanı sıra BCL2, BCLX_L gibi anti-apoptotik genlerin ifade seviyeleri azalırken, pro-apoptotik BAX geninin ve CASP3-9'ün ifade seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Aynı zamanda BCL2'nin düzenlenmesinde etkili olabileceğini ileri sürdüğümüz LOC105372161 RNA molekülünün ifade seviyesi 8A maruziyet süresine kıyasla ciddi derecede artış göstermektedir. Bu veriler bize, LOC105372161'in BCL2'nin ifade seviyesini azaltarak hücreyi apoptoza teşvik etmesine aracılık edebileceğini göstermektedir (Şekil 4.58).

Yapılan çalışmalarda, sentezlenen kimyasalların hücre döngüsünü hangi aşamada baskıladığını belirlemek amacıyla hücre döngüsü analizleri yapılmaktadır. Bu durumda kimyasal ile maruz bırakılan hücreler negatif kontrole kıyasla hücre döngüsünün hangi evresinde (G0/G1, S, G2/M) yığılma olduğuna göre değerlendirilmektedir. Örneğin; kolşisin kimyasal maddesi hücreleri metafazda durduran, mikrotübül polimerizasyonu engelleyen bir anti-kanser ilacıdır (220, 221). Kolşisinin hücreleri G2/M fazında durdurduğu gösterilmiştir (221). Bunun yanı sıra bu tez çalışmasında kullanılan 5-FU kimyasal maddesinin hücreleri G1/S fazında durdurduğu gösterilmiştir (222-225). Bizim yaptığımız çalışmada ise, hücrelerin 5-FU ile muamele edilmesinin ardından G1 fazında hücre grubunun arttığı bulunmuştur. Ancak, A549, MCF7 ve SKBR3 hücrelerinde anlamlı bir fark görülmezken, MDA-MB-231 ve U2OS hücrelerinde bu fazdaki hücre grubunun anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur. Bunun yanı sıra, anti-kanser etkinlikleri belirlenmemiş iki kimyasal maddenin hücre döngüsü üzerine etkileri gösterilmiştir. A549 hücrelerinde hücre döngüsünün fazları arasında DMSO'ya kıyasla anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak, MCF7 hücresi 17B ile muamele edildiğinde G1 fazındaki hücre popülasyonunda artış görülmektedir. Dahası, U2OS hücrelerinde 17B kimyasalı ile muamele sonrasında G1 fazındaki hücre grubunda anlamlı bir artış görülmüştür. Bunun yanı sıra, 8A ile muamele edilen SKBR3 hücrelerinde ise S fazındaki hücre popülasyonu artmıştır.

Yapılan hücre döngüsü analizleri neticesinde, 8A kimyasalı ile muamele edilen hücrelerin S fazındaki hücre popülasyonunun DMSO grubuna kıyasla arttığı

bulunmuştur. Ayrıca, CDK2 geninin ifade seviyesine maruziyet süresine göre artış olduğu ve bazı hücrelerde CDK2 baskılayıcısı olarak bilinen CDKN1B'nin (p27) ifade seviyesinin düşük olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, 8A kimyasalının hücre döngüsünü S fazında durdurduğunu desteklemektedir.

Anti-kanser ilaçlarının tedavisel amaçlarından bir tanesini de hâlihazırda var olan kanser hücrelerinin göç etme kapasiteleri yavaşlatarak tümörün yayılmasını engellenmektedir. Yapılan çalışmalarda anti-kanser ilaçlarının göçünün EMT aracılığı ile yavaşlattığı/baskıladığı gösterilmiştir. Bu bağlamda, manolya bitkisinden izole edilen ve EMT'nin baskılanması gibi birçok farmakolojik süreçte etkili olan Honokiol bileşiğinin insan NSCLC hücrelerinde EMT aracılığıyla hücre göçünü baskıladığı bulunmuştur. Dahası bu bileşik tümör göçünü önleyen bir anti-kanser ilacı olarak önerilmiştir (226). Bunun yanı sıra, çeşitli kanserlerde etkinliği kanıtlanmış, doğal olarak oluşan ve toksik etkisi olmayan bitki bileşiği Luteolin'in, MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında hücre göçünü baskıladığı bildirilmiştir (227). Ek olarak, bu çalışmada da kullanılan Sisplatin anti-kanser ilacının SGC-7901 ve AGS mide kanseri hücrelerinde hücre göçünü baskıladığı gösterilmiştir (228). Bu tez çalışmasında ise, akciğer, meme ve osteosarkom hücrelerinde sisplatinin hücre göçünü (yara iyileşmesini) kontrol gruplarına göre yavaşlattığı bulunmuştur. Ayrıca, hepatoselüler kanserli hastalarda, irinotecan ve paclitakselin yanı sıra 5-FU'nun bu hastalarda hücre göçünü azalttığı gösterilmiştir (229). Bu tez çalışmasında ise, 5FU ile maruz bırakılan akciğer, meme ve osteosarkom hücrelerinde hücre göçünün kontrol grubuna ve muamele edilmemiş hücre grubuna kıyasla yavaşladığı gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar, tiyosemikarbazon türevi bileşiklerinin, hücre döngüsü, apoptoz, otofaji, tümör oluşumu ve büyümesi gibi çeşitli kanser süreçlerinde etkili olduğu göstermektedir (230). Yeni bir demir şelatörü olarak sentezlenen Di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT)'in çeşitli kanserlerde tümör oluşumu ve gelişimini etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, tiyoksemikarbazon türevi bu bileşiğin 143B osteosarkoma hücrelerinde hücre göçünü ve yayılımını baskıladığı bulunmuştur (230). Wangpu ve ark. (231) tarafından yapılan bir çalışmada, yeni sentezlenmiş di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone ve di-2-pyridylketone 4-cyclohexyl-4-methyl-3-thiosemicarbazone tiyoksemikarbazon türevi bileşiklerin HT29 kolon kanseri

ve DU-145 prostat kanseri hücrelerinde N-myc downstream regulated gene-1 (NDRG1) geninin ifadesini arttırarak hücre göçünü ve metastazı baskıladığı gösterilmiştir. Benzer olarak, pterostilbene carboxaldehyde thiosemicarbazone (PTERC-T) bileşiğinin HUVEC hücrelerinde CAM (chick chorioallantoic membrane) deneyleri ile hücre göçünü ve yayılımını baskıladığı gösterilmiştir (232). Bu tez çalışmasında ise 17B ve 8A olarak adlandırılan iki tane tiyosemikarbazone bileşiğinin akciğer, meme ve osteosarkom hücrelerinde hücre göçünü yavaşlattığı bulunmuştur. Dolayısıyla, kimyasal olarak sentezlenmiş ve henüz anti-kanser etkinliği bilinmeyen bu bileşiklerin insan hücrelerinde hücre göçünü yavaşlatıcı etkisinden ötürü yeni bir anti-kanser ajanı olarak değerlendirilebilir. Ayrıca, hücre göçünü yavaşlatıcı etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için, EMT süreci deneyleri yapılabilir ve bu süreçte etkili olan genlerin ifade seviyeleri değerlendirilebilir.

Bu tez çalışmasında, NAT'ların kanser hücrelerinde ve normal insan dokularında değişik ifadelendiği gösterilmiştir. İlginç olarak, 8A kimyasalı ile muamele edilen hücrelerde maruziyet süresi ile NAT'ları ifade seviyesinde ciddi bir şekilde artış gösterilmiştir. Ancak, 17B ile muamele edilen hücrelerde ise bazı hücrelerde maruziyet süresine kıyasla NAT ifade seviyesi düşerken bazılarında ise arttığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, bu tez çalışmasında son yıllarda bilim adamlarının ilgi odağı haline gelen lncRNA sınıfının alt türü olan ve ilgili geninin antisense ipliğinden sentezlenen antisense transkriptlerin ilgili genin düzenlenmesinde önemli rollerinin olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, anti-kanser etkinliği henüz bilinmeyen iki tane tiyosemikarbazone türevlerinin kanserdeki rolleri ve NAT'ların ifade seviyesi ile ilişkileri ortaya konulmuştur.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, NAT'ların yazılımsal müdahale, RNA maskeleyme, dsRNA bağımlı mekanizma ve metilasyon üzerine etkileri olmak üzere birçok biyolojik süreçte yer aldıkları gösterilmiştir (161). Ancak yapılan bu çalışmalar sense-antisense çiftlerinin birbirleri ile olan etkileşimlerini açıklamak için yeterli değildir. İnsan genomunda, henüz etkinlikleri bilinmeyen ve daha önceleri çöp olarak adlandırılan bölgelerden sentezlenen yeni transkriptlerin olduğu gösterilmekte ve bu sayı giderek artmaktadır. Sürekli olarak büyüyen bu transkriptomda gen ifadesinin ve hücresel olayların düzenlenmesi oldukça zordur. Ancak, örtüşen bölgeler içeren ve

birbirleri ile komşu olan genlerin bu karmaşık düzenlemede önemli rollerinin olabileceği düşünülmektedir. Yazılımsal olarak sürekli açık olan bir bölgede bir sarmaldaki genin ifade seviyesi şüphesiz karşı sarmaldaki genleri de etkileyebilmektedir. Antisense transkriptlerin ilgili bölgedeki genleri düzenleyebilmesi için bazı mekanizmalar geliştirmeleri gerekmektedir ve bu konu halen anlaşılamamıştır. Ancak, birkaç mekanizma öne sürülebilir. HTH transkriptlerin birbirleri arasında pozitif veya negatif yönlü etkileşimleri olabilir. Bu tez çalışmasında VIM ve VIM-AS1 genleri arasında hücre türlerine ve maruz bırakılan kimyasal bileşiğe göre pozitif veya negatif bir etkileşim olduğu gösterilmiştir. HTH transkriptler tanım olarak 5' uç kısımlarında örtüşen bölgeler içeren moleküllerdir. Bu moleküllerin birbirlerinin düzenlenmesinde, yazılımın yönünün 5' uçtan 3' uca olduğunu göz önünde bulundurarak, karşı komşu gende olan ifade değişiminin ilgili genin özendirici bölgesinde bazı etkileşimler oluşturarak bu genlerin pozitif veya negatif yönde düzenlenmesinde etkili olabilir. Bunun yanı sıra bizim çalışmamızda da gösterildiği gibi EMB transkriptlerin birlikte ifade edildiği bilinmektedir. Araştırmacılar, yazılımsal olarak zaten açık bu bölgedeki değişimin karşı sarmaldaki genin de ifade seviyesinin değiştirebileceğini düşünmektedirler. Böylelikle EMB transkriptlerde karşı-komşu genlerin etkileşimlerinin pozitif yönlü olabileceğini öne sürmüşlerdir. Buna karşın, TTT transkriptlerin genomda fazla olduğu ve bunlar arasında negatif yönlü etkileşimler olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada ise, BCL2 geni karşı sarmalından sentezlenen ve 3' uç kısımlarında örtüşen bölgeler içeren LOC105372161'in birbirleri ile negatif yönlü ilgileşim gösterdiği bulunmuştur. Hatta LOC105372161 TTT transkripti apoptoz sürecinin düzenlenmesinde önemli rolleri olan ve birçok kanser çeşidinde aşırı ifade edilen BCL2 genini negatif yönde düzenleyerek hücrenin apoptoza gitmesini teşvik ettiği gösterilmiştir. TTT transkriptleri arasındaki bu negatif ilgileşim, yazılım sonrası gen düzenlenmesinde özellikle miRNA'lar ile olan düzenlenmede olduğu gibi, 3' bölgelerinin etkilenmesi ve böylece ilgili genin ifade seviyesinin azalması öne sürülebilir.

Özetle, bu tez çalışmasında antisense transkriptlerin ilgili genin ifade seviyesini negatif veya pozitif yönde düzenleyerek işlevini etkileyebilir. Ayrıca, yeni sentezlenmiş anti-kanser ilaçlarının antisense-sense arasındaki dengeyi değiştirerek kanser hücrelerinde etkili olabileceği gösterilmiştir. Anti--kanser ilaçlarının etkinliklerinin yanı sıra, bu

bileşiklerin antisense transkriptlerin ifade seviyesini etkileyerek kanserde apoptoz, hücre döngüsü ve hücre göçü gibi süreçlerde pozitif/negatif yönlü değişim olabileceğini göstermektedir. Bilim adamlarının ilgi odağı haline gelen uzun kodlanmayan RNA'ların bir sınıf olan NAT'ların daha detaylandırılması gereken mekanizmaları bulunmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen veriler ışığında, bu doğal antisense transkriptlerin hücresel yollaklarda aldıkları rollerin tam olarak anlaşılması için siRNA susturma ve/veya klonlama çalışmaları yapılabilir. Ayrıca, protein kodlayan genlerin Western Blot yöntemi ile ifade seviyelerinin değerlendirilmesi daha anlamlı sonuçlar verecektir. Kanserli hastalardan alınan doku örneklerinde NAT'ların ifade seviyeleri ile hastalık ilişkilendirilebilir. Dahası, ileri transkriptom analizleri yapılarak insan genomundaki sense-antisense transkriptlerin birbirleri ile etkileşimleri belirlenebilir. Ayrıca, apoptoz, hücre döngüsü ve yara iyileşmesi gibi süreçlerde etkileri belirlenen tiyosemikarbazon türevi ilaçların *in vivo* kanser modellerinde çalışılması önerilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular ve öneriler bu alanda yapılacak olan ileriki çalışmalara ışık tutacaktır.

6 . KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 4;144(5):646-74.
3. Szymanski M, Barciszewska MZ, Zywicki M, Barciszewski J. Noncoding RNA transcripts. *J Appl Genet.* 2003;44(1):1-19. 2003.
4. Huttenhofer A, Schattner P, Polacek N. Non-coding RNAs: hope or hype? *Trends Genet.* 2005;21(5):289-97. 2005.
5. Costa FF. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene.* 2005 12;357(2):83-94. 2005.
6. Sana J, Faltejiskova P, Svoboda M, Slaby O. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J Transl Med.* 2012 21;10:103.
7. Balbin OA, Malik R, Dhanasekaran SM, Prensner JR, Cao X, Wu Y-M, Robinson D, Wnag R, Chen G, Beer DG, Nesvizhskii AI, Chinnaiyan AM. The landscape of antisense gene expression in human cancers. *Genome research.* 2015.
8. Bozgeyik E, Bayraktar E, Chavez-Reyes A, Rodriguez-Aguayo C. OncoLncs: Long Non-Coding RNAs with Oncogenic Functions. *Mol Biol.* 2016;5:2.
9. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics.* 2011;12:861-874.
10. Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics.* 2014;15:7-21.
11. Laurent GS, Wahlestedt C, Kapranov P. The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends in Genetics.* 2015;31:239-251.
12. Louro R, Smirnova AS, Verjovski-Almeida S. Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? *Genomics.* 2009;93:291-298.

13. Mercer T.R., Dinger M.E., J.S. M. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10:155-159.
14. Khorkova O, Myers AJ, Hsiao J, Wahlestedt C. Natural antisense transcripts. *Human molecular genetics*. 2014;23:R54-R63.
15. Werner A. Natural antisense transcripts. *RNA biology*. 2005;2:53-62.
16. Beltran M, Puig I, Pena C, Garcia JM, Alvarez ABn, Pena RI, Bonilla FI, Herreros AG. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes & development*. 2008;22:756-769.
17. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer research*. 2006;66:7390-7394.
18. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 2004;101:2999-3004.
19. Shi X, Sun M, Liu H, Yao Y, Song Y. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases. *Cancer letters*. 2013;339:159-166.
20. Yin D, He X, Zhang E, Kong R, De W, Zhang Z. Long noncoding RNA GAS5 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Medical oncology*. 2014;31:1-8.
21. Liu Q, Huang J, Zhou N, Zhang Z, Zhang A, Lu Z, Wu F, Mo YY. LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor suppressor. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(9):4976-87.
22. Svoboda M, Slysikova J, Schneiderova M, Makovicky P, Bielik L, Levy M, Lipska L, Hemmelova B, Kala Z, Protivankova M, Vycital O, Liska V, Schwarzova L, Vodickova L, Vodicka P. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis*. 2014;35:1510-1515.

23. Wu ZH, Wang XL, Tang HM, Jiang T, Chen J, Lu S, Qiu GQ, Peng ZH, Yan DW. Long non-coding RNA HOTAIR is a powerful predictor of metastasis and poor prognosis and is associated with epithelial-mesenchymal transition in colon cancer. *Oncology reports*. 2014;32:395-402.
24. McClelland ML, Mesh K, Lorenzana E, Chopra VS, Segal E, Watanabe C, Haley B, Mayba O, Yaylaoglu M, Gnad F, Firestein R. CCAT1 is an enhancer-templated RNA that predicts BET sensitivity in colorectal cancer. *J Clin Invest*. 2016;11:83265.
25. Nissan A, Stojadinovic A, Mitrani-Rosenbaum S, Halle D, Grinbaum R, Roistacher M, Bochem A, Dayanc BE, Ritter G, Gomceli I, Bostancı EB, Akoglu M, Chen YT, Old LJ, Gure AO. Colon cancer associated transcript-1: a novel RNA expressed in malignant and pre-malignant human tissues. *Int J Cancer*. 2012 1;130(7):1598-606.
26. Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Tidow CM. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2003 11;22(39):8031-41.
27. Yang M-H, Hu Z-Y, Xu C, Xie L-Y, Wang X-Y, Chen S-Y, Li Z-G. MALAT1 promotes colorectal cancer cell proliferation/migration/invasion via PRKA kinase anchor protein 9. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2015;1852:166-174.
28. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(18):3033-46.
29. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9:153-166.
30. Kirkin V, Joos S, Zarnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2004;1644:229-249.
31. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *The Journal of cell biology*. 1994;124:1-6.
32. Li J, Zheng Lm, King I, Doyle TW, Chen SH. Syntheses and Antitumor Activities of Potent Inhibitors of Ribonucleotide Reductase 3-Amino-4-Methylpyridine-

2-Carboxaldehyde-Thiosemicarbazone (3-Amp), 3-Amino-Pyridine-2-Carboxaldehyde-Thiosemicarbazone (3-Ap) and its Water-Soluble Prodrugs. *Current medicinal chemistry*. 2001;8:121-133.

33. Liu MC, Lin TC, Sartorelli AC. Synthesis and antitumor activity of amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. *Journal of medicinal chemistry*. 1992;35:3672-3677.

34. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991 25;64(2):235-48. 1991.

35. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res*. 2008;6(10):1521-33.

36. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*. 2010;25(2):85-101.

37. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):332-7.

38. Amit I, Citri A, Shay T, Lu Y, Katz M, Zhang F, Tarcic G, Siwak D, Lahad J, Hirsch JJ, Amariglio N, Vaisman N, Segal E, Rechavi G, Alon U, Mills GB, Domany E, Yarden Y. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat Genet*. 2007;39(4):503-12.

39. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(9):671-82.

40. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002;2(2):103-12. 2002.

41. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411:342-348.

42. Kearns WG, Liu JM. Cell cycle checkpoint genes and aneuploidy: a short review. *Current Genomics*. 2001;2:171-180.

43. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*. 2003;36:131-149.
44. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell proliferation* 2003;36:165-175.
45. Tetreault M-P, Yang Y, Katz JP. Kruppel-like factors in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2013;13:701-713.
46. Curto M, Cole BK, Lallemand D, Liu CH, McClatchey AI. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol*. 2007;4;177(5):893-903.
47. Hezel AF, Bardeesy N. LKB1; linking cell structure and tumor suppression. *Oncogene*. 2008;24;27(55):6908-19.
48. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*. 1998 28;281(5381):1317-22.
49. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004;18;432(7015):307-15.
50. Junttila MR, Evan GI. p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(11):821-9..
51. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26;26(9):1324-37.
52. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007;15;21(22):2861-73.
53. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;11;132(1):27-42.
54. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(12):961-7.
55. Yong Zhong Xu CK, Mina Youssef and Danuta Radzioch. *New Frontiers in Cancer Chemotherapy — Targeting Cell Death Pathways: Cell Biology - New Insights*, 2016

56. Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood*. 2005;106:408-418.
57. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends in Genetics*. 1995;11:101-105.
58. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*. 2008;27:6398-6406.
59. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104:487-501.
60. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35:495-516.
61. Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, et al. Characterization of 8p21. 3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. 2005;106:3214-3222.
62. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2005;6:611-622.
63. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353-364.
64. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3:401-410.
65. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *European Journal of Cancer*. 1996;32:2413-2422.
66. Kazerounian S, Yee KO, Lawler J. Thrombospondins: from structure to therapeutics. *Cellular and molecular life sciences*. 2008;65:700-712.
67. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112:1776-1784.
68. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:442-454.
69. Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA biology*. 2012;9:703-719.

70. Wu Q, Hou X, Xia J, Qian X, Miele L, Sarkar FH, Wang Z. Emerging roles of PDGF-D in EMT progression during tumorigenesis. *Cancer treatment reviews*. 2013;39:640-646.
71. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007;14:447(7146):799-816.
72. Eddy SR. Computational genomics of noncoding RNA genes. *Cell*. 2002;19:109(2):137-40.
73. Mattick JS. RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet*. 2004;5(4):316-23.
74. Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Molecular cancer*. 2011;10:1.
75. Zaratiegui M, Irvine DV, Martienssen RA. Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell*. 2007;23:128(4):763-76.
76. Ergun S, Oztuzcu S. Oncocers: ceRNA-mediated cross-talk by sponging miRNAs in oncogenic pathways. *Tumour Biol*. 2015;36(5):3129-36.
77. Han P, Li W LC, Yang J, Shang C, Nurnberg ST, Jin KK, Xu W, Lin CY, Lin CJ, Xiong Y, Chien, HC., Zhou B, Ashley E, Bernstein D, Chen PS, Chen HSV, Quertermous T, Chang CP. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature*. 2014;514:102-106.
78. Han P, Chang CP. Long non-coding RNA and chromatin remodeling. *RNA Biol*. 2015;12(10):1094-8. doi: 10.1080/15476286.2015.1063770. Epub 2015 Jul 15. 2015.
79. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):219-30.
80. Lippman Z, Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*. 2004;16:431(7006):364-70.
81. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004;16:431(7006):343-9.
82. Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, Filippov DV, Blaser H, Raz E, Moens CB, Plasterk RHA, Hannon GJ, Draper

- BW, Ketting RF. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell*. 2007;6;129(1):69-82.
83. Seto AG, Kingston RE, Lau NC. The coming of age for Piwi proteins. *Mol Cell*. 2007;8;26(5):603-9. 2007.
84. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843-854.
85. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-297.
86. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clinical chemistry*. 2009;55:623-631.
87. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11:597-610.
88. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215-233.
89. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO*. 2004;23:4051-4060.
90. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 2006;125:887-901.
91. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim NV. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415-419.
92. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 2003;17:3011-3016.
93. Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circulation research*. 2007;101:59-68.

94. Donker RB, Mouillet J-Fo, Nelson DM, Sadovsky Y. The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *Molecular human reproduction*. 2007;13:273-279.
95. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15:321-333.
96. Saito T, Saetrom P. MicroRNAs-targeting and target prediction. *New biotechnology*. 2010;27:243-249.
97. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Molecular oncology*. 2012;6:590-610.
98. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6:259-269.
99. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in molecular medicine*. 2006;12:580-587.
100. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136:642-655.
101. Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004;3:318-329.
102. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409:363-366.
103. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO*. 2001;20:6877-6888.
104. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lahrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 2002;110:563-574.
105. Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Molecular cell*. 2000;6:1077-1087.

106. Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygün Hs, Klippel A, Pronk GJ, Giese K, et al. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic acids research*. 2003;31:2705-2716.
107. Wright MW, Bruford EA. Naming 'junk': human non-protein coding RNA (ncRNA) gene nomenclature. *Human genomics*. 2011;5:1.
108. Cheng J, Guo J-M, Xiao B-X, Miao Y, Jiang Z, Zhou H, Li Q-N. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412:1621-1625.
109. Wang J, Song YX, Ma B, Wang J-J, Sun JX, Chen XW, Zhao JH, Yang YC, Wang ZN. Regulatory roles of non-coding RNAs in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16:19886-19919.
110. Aravin AA, Naumova NM, Tulin AV, Vagin VV, Rozovsky YM, Gvozdev VA. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Current Biology*. 2001;11:1017-1027.
111. Girard AI, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*. 2006;442:199-202.
112. Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*. 2007;128:1089-1103.
113. Ross RJ, Weiner MM, Lin H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature*. 2014;505:353-359.
114. Busch J, Ralla B, Jung M, Wotschovsky Z, Trujillo-Arribas E, Schwabe P, Kilic E, Fendler A, Jung K. Piwi-interacting RNAs as novel prognostic markers in clear cell renal cell carcinomas. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2015;34:1.
115. Sato K, Siomi MC. Piwi-interacting RNAs: biological functions and biogenesis. *Essays in biochemistry*. 2013;54:39-52.
116. Cheng J, Deng H, Xiao B, Zhou H, Zhou F, Shen Z, Guo J. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates in vitro and in vivo tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. *Cancer letters*. 2012;315:12-17.

117. Zhang H, Ren Y, Xu H, Pang D, Duan C, Liu C. The expression of stem cell protein Piwi2 and piR-932 in breast cancer. *Surgical oncology*. 2013;22:217-223.
118. Chu H, Hui G, Yuan L, Shi D, Wang Y, Du M, Zhong D, Ma L, Tong N, Qin C, Yin C, Zhang Z, Wang M. Identification of novel piRNAs in bladder cancer. *Cancer letters*. 2015;356:561-567.
119. Chu H, Xia L, Qiu X, Gu D, Zhu L, Jin J, Hui G, Hua Q, Du M, Tong N, Chen J, Zhang Z, Wang M. Genetic variants in noncoding PIWI-interacting RNA and colorectal cancer risk. *Cancer*. 2015;121:2044-2052.
120. Xie X, Tang B, Xiao Y-F, Xie R, Li BS, Dong H, Zhou JY, Yang SM. Long non-coding RNAs in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;2; 7(5): 5226–5239.
121. Bozgeyik E, Igci YZ, Jacksi MFS, Arman K, Gurses SA, Bozgeyik I, Pala E, Yumrutas O, Temiz E, Igci M. A novel variable exonic region and differential expression of LINC00663 non-coding RNA in various cancer cell lines and normal human tissue samples. *Tumor Biology*. 2016;37(7):8791-8798.
122. Prensner JR, Chen W, Iyer MK, Cao Q, Ma T, Han S, Sahu A. PCAT-1, a long noncoding RNA, regulates BRCA2 and controls homologous recombination in cancer. *Cancer Res*. 2014;15;74(6):1651-60.
123. Petrovics G, Zhang W, Makarem M, Street JP, Connelly R, Sun L, Sesterhenn IA. Elevated expression of PCGEM1, a prostate-specific gene with cell growth-promoting function, is associated with high-risk prostate cancer patients. *Oncogene*. 2004;15;23(2):605-11.
124. Srikantan V, Zou Z, Petrovics G, Xu L, Augustus M, Davis L, Livezey JR, PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;24;97(22):12216-21.
125. Kino T, Hurt DE, Ichijo T, Nader N, Chrousos GP. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal*. 2010;2;3(107):ra8.
126. Mourtada-Maarabouni M, Hedge VL, Kirkham L, Farzaneh F, Williams GT. Growth arrest in human T-cells is controlled by the non-coding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5). *J Cell Sci*. 2008;1;121(Pt 7):939-46.

127. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, Freier SM. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*. 2010;24;39(6):925-38.
128. Ji Q, Zhang L, Liu X, Zhou L, Wang W, Han Z, Sui H. Long non-coding RNA MALAT1 promotes tumour growth and metastasis in colorectal cancer through binding to SFPQ and releasing oncogene PTBP2 from SFPQ/PTBP2 complex. *Br J Cancer*. 2014;12;111(4):736-48.
129. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007;29;129(7):1311-23.
130. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, Shi Y. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*. 2010;6;329(5992):689-93..
131. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*. 2012;22(9):1775-89.
132. Li Y, Chen W, He F, Tan Z, Zheng J, Wang W, Zhao Q. NEAT expression is associated with tumor recurrence and unfavorable prognosis in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2015;29;6(29):27641-50.
133. Wilusz JE, Freier SM, Spector DL. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell*. 2008;28;135(5):919-32.
134. Arab K, Park YJ, Lindroth AM, Schafer A, Oakes C, Weichenhan D, Lukanova A. Long noncoding RNA TARID directs demethylation and activation of the tumor suppressor TCF21 via GADD45A. *Mol Cell*. 2014;21;55(4):604-14.
135. Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, Chow N, Akoulitchiev A. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature*. 2007;8;445(7128):666-70.
136. Nakagawa T, Endo H, Yokoyama M, Abe J, Tamai K, Tanaka N, Sato I. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated

with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;28;436(2):319-24.

137. Ding J, Lu B, Wang J, Shi Y, Lian Y, Zhu Y, Fan Y. Long non-coding RNA *Loc554202* induces apoptosis in colorectal cancer cells via the caspase cleavage cascades. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015;11;34:100.

138. Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, Bieche I. *ANRIL*, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J.* 2011;25(2):444-8.

139. Shi Y, Lu J, Zhou J, Tan X, He Y, Ding J, Tian Y. Long non-coding RNA *Loc554202* regulates proliferation and migration in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;4;446(2):448-53

140. Zhu M, Chen Q, Liu X, Sun Q, Zhao X, Deng R, Wang Y. *lncRNA H19/miR-675* axis represses prostate cancer metastasis by targeting *TGFBI*. *FEBS J.* 2014;81(16):3766-75.

141. He X, Tan X, Wang X, Jin H, Liu L, Ma L, Yu H. C-Myc-activated long noncoding RNA *CCAT1* promotes colon cancer cell proliferation and invasion. *Tumour Biol.* 2014;35(12):12181-8.

142. Ling H, Spizzo R, Atlasi Y, Nicoloso M, Shimizu M, Redis RS, Nishida N. *CCAT2*, a novel noncoding RNA mapping to 8q24, underlies metastatic progression and chromosomal instability in colon cancer. *Genome Res.* 2013;23(9):1446-61.

143. Yang F, Xue X, Bi J, Zheng L, Zhi K, Gu Y, Fang G. Long noncoding RNA *CCAT1*, which could be activated by c-Myc, promotes the progression of gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139(3):437-45.

144. Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D. Ultraconserved elements in the human genome. *Science.* 2004;28;304(5675):1321-5.

145. Peng JC, Shen J, Ran ZH. Transcribed ultraconserved region in human cancers. *RNA Biol.* 2013;10(12):1771-7..

146. Calin GA, Liu CG, Ferracin M, Hyslop T, Spizzo R, Sevignani C, Fabbri M. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell.* 2007;12(3):215-29. 2007.

147. Lujambio A, Portela A, Liz J, Melo SA, Rossi S, Spizzo R, Croce CM. CpG island hypermethylation-associated silencing of non-coding RNAs transcribed from ultraconserved regions in human cancer. *Oncogene*. 2010;29(48):6390-401.
148. Ferdin J, Nishida N, Wu X, Nicoloso MS, Shah MY, Devlin C, Ling H. HINCUTs in cancer: hypoxia-induced noncoding ultraconserved transcripts. *Cell Death Differ*. 2013;20(12):1675-87.
149. Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*. 2011;5;146(3):353-8.
150. Su X, Xing J, Wang Z, Chen L, Cui M, Jiang B. microRNAs and ceRNAs: RNA networks in pathogenesis of cancer. *Chin J Cancer Res*. 2013;25(2):235-9.
151. Wang J, Liu X, Wu H, Ni P, Gu Z, Qiao Y, Chen N. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(16):5366-83.
152. Tay Y, Kats L, Salmena L, Weiss D, Tan SM, Ala U, Karreth F. Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell*. 2011;14;147(2):344-57.
153. Shen K, Mao R, Ma L, Li Y, Qiu Y, Cui D, Le V. Post-transcriptional regulation of the tumor suppressor miR-139-5p and a network of miR-139-5p-mediated mRNA interactions in colorectal cancer. *FEBS J*. 2014;281(16):3609-24.
154. Liu YC, Li JR, Sun CH, Andrews E, Chao RF, Lin FM, Weng SL. CircNet: a database of circular RNAs derived from transcriptome sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D209-15.
155. Qu S, Yang X, Li X, Wang J, Gao Y, Shang R, Sun W. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs. *Cancer Lett*. 2015;1;365(2):141-8.
156. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*. 2013;21;495(7441):333-8.

157. Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS Genet.* 2010;2;6(12):e1001233.
158. Li P, Chen S, Chen H, Mo X, Li T, Shao Y, Xiao B. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer. *Clin Chim Acta.* 2015;15;444:132-6.
159. Qin M, Liu G, Huo X, Tao X, Sun X, Ge Z, Yang J, Jia F, Lei L, Wenxin Q. Hsa_circ_0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark.* 2015;16(1);161-169.
160. Bachmayr-Heyda A, Reiner AT, Auer K, Sukhbaatar N, Aust S, Bachleitner-Hofmann T, Mesteri I, Grunt TW, Zeillinger R, Pils D. Correlation of circular RNA abundance with proliferation--exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues. *Sci Rep.* 2015;27;5:8057.
161. Lapidot M, Pilpel Y. Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *EMBO reports.* 2006;7;1216-1222.
162. Li Y-Y, Qin L, Guo Z-M, Liu L, Xu H, Hao P, Su J, Shi Y, He WZ, Li YX. In silico discovery of human natural antisense transcripts. *BMC bioinformatics* 2006;7:1.
163. Knee R, Murphy PR. Regulation of gene expression by natural antisense RNA transcripts. *Neurochemistry international.* 1997;31:379-392.
164. Thrash-Bingham CA, Tartof KD. aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia. *Journal of the National Cancer Institute.* 1999;91:143-151.
165. Li Q, Su Z, Xu X, Liu G, Song X, Wang R, Sui X, Liu T, Chang X, Huang D. AS1DHRS4, a head-to-head natural antisense transcript, silences the DHRS4 gene cluster in cis and trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109:14110-14115.
166. Kanduri C. Kcnq1ot1: a chromatin regulatory RNA. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(4):343-50.

167. Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*. 2008;31;322(5902):750-6.
168. Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafreniere RG, Xing Y, Lawrence J, Willard HF. The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*. 1992;30;71(3):527-42.
169. Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*. 1996;11;379(6561):131-7.
170. Campos EI, Reinberg D. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet*. 2009;43:559-99.
171. Rinn JL. lncRNAs: linking RNA to chromatin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;1;6(8). pii: a018614.
172. Brockdorff N. Noncoding RNA and Polycomb recruitment. *RNA*. 2013;19(4):429-42.
173. Di Ruscio A, Ebralidze AK, Benoukraf T, Amabile G, Goff LA, Terragni J, Figueroa ME, Pontes LLDF, Jorda MA, Zhang P, Wu M, Dalo F, Melnick A, Leone G, Ebralidze KK, Pradhan S, Rinn JL, Tenen DG. DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature*. 2013;21;503(7476):371-6.
174. Kornienko AE, Guenzl PM, Barlow DP, Pauler FM. Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. *BMC biology*. 2013;11:1.
175. Peterlin BM, Brogie JE, Price DH. 7SK snRNA: a noncoding RNA that plays a major role in regulating eukaryotic transcription. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2012;3:92-103.
176. Shearwin KE, Callen BP, Egan JB. Transcriptional interference crash course. *Trends in Genetics*. 2005;21:339-345.
177. Feng J, Bi C, Clark BS, Mady R, Shah P, Kohtz JD. The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes & development*. 2006;20:1470-1484.

178. Ohno M, Fukagawa T, Lee JS, Ikemura T. Triplex-forming DNAs in the human interphase nucleus visualized in situ by polypurine/polypyrimidine DNA probes and antitriplex antibodies. *Chromosoma*. 2002;111:201-213.
179. Ogawa Y, Sun BK, Lee JT. Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science*. 2008;320:1336-1341.
180. Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2016:1-22.
181. Ho GY, Woodward N, Coward JIG. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016;102:37-46.
182. Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer treatment reviews*. 1998;24:331-344.
183. Lee JJ, Beumer JH, Chu E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2016:1-18.
184. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3:330-338.
185. Ferrari MB, Capacchi S, Pelosi G, Reffo G, Tarasconi P, Albertini R, Pinelli S, Lunghi P. Synthesis, structural characterization and biological activity of helicin thiosemicarbazone monohydrate and a copper (II) complex of salicylaldehyde thiosemicarbazone. *Inorganica Chimica Acta*. 1999;286:134-141.
186. Yu Y, Kalinowski DS, Kovacevic Z, Siafakas AR, Jansson PJ, Stefani C, Lovejoy DB, Sharpe PC, Benhardt PV, Richardson DR. Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. 2009;52:5271-5294.
187. Alvero AB, Chen W, Sartorelli AC, Schwartz P, Rutherford T, Mor G. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone) Induces Apoptosis in Ovarian Cancer Cells. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2006;13:145-152.
188. Finch RA, Liu M-C, Grill SP, Rose WC, Loomis R, Vasquez KM, Cheng YC, Sartorelli. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): a potent

inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. *Biochemical pharmacology*. 2000;59:983-991.

189. Tasdemir D, Karakucuk-Iyidogan A, Ulasli M, Taskin-Tok T, Oruc-Emre EE, Bayram H. Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of novel chiral thiosemicarbazone derivatives as potent anticancer agents. *Chirality*. 2015;27:177-188.

190. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, Hellemans J. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clinical chemistry*. 2013;59:892-902.

191. Su WY, Li JT, Cui Y, Hong J, Du W, Wang YC, Lin YW, Xiong H, Wang JL, Kong X, Gao QY, Wei LP, Fang JY. Bidirectional regulation between WDR83 and its natural antisense transcript DHPS in gastric cancer. *Cell Res*. 2012;22(9):1374-89.

192. Nagano T, Fraser P. No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell*. 2011;145:178-181.

193. Chen J, Sun M, Kent WJ, Huang X, Xie H, Wang W, Zhou G. Over 20% of human transcripts might form sense-antisense pairs. *Nucleic acids research*. 2004;32:4812-4820.

194. Yelin R, Dahary D, Sorek R, Levanon EY, Goldstein O, Shoshan A, Diber A, Biton S, Tamir Y, Khosravi R, Nemzer S, Pinner E, Walach S, Bernstein J, Savitsky K, Rotman G. Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nature biotechnology*. 2003;21:379-386.

195. Kumar M, Carmichael GG. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62:1415-1434.

196. Vanhee-Brossollet C, Vaquero C. Do natural antisense transcripts make sense in eukaryotes? *Gene*. 1998;211:1-9.

197. Werner A, Schmutzler G, Carlile M, Miles CG, Peters H. Expression profiling of antisense transcripts on DNA arrays. *Physiological genomics*. 2007;28:294-300.

198. Zhang D, Sun G, Zhang H, Tian J, Li Y. Long non-coding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of cervical cancer and promotes carcinogenesis via PI3K/Akt pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;85:511-516.
199. Wei X, Wang C, Ma C, Sun W, Li H, Cai Z. Long noncoding RNA ANRIL is activated by hypoxia-inducible factor-1 α and promotes osteosarcoma cell invasion and suppresses cell apoptosis upon hypoxia. *Cancer Cell International*. 2016;16:73.
200. Lu Y, Zhou X, Xu L, Rong C, Shen C, Bian W. Long noncoding RNA ANRIL could be transactivated by c-Myc and promote tumor progression of non-small-cell lung cancer. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:3077.
201. Zhu H, Li X, Song Y, Zhang P, Xiao Y, Xing Y. Long non-coding RNA ANRIL is up-regulated in bladder cancer and regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis through the intrinsic pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;467:223-228.
202. Li Z, Yu X, Shen J. ANRIL: a pivotal tumor suppressor long non-coding RNA in human cancers. *Tumor Biology*. 2016;37:5657-5661.
203. Mahmoudi S, Henriksson S, Corcoran M, Mondez-Vidal C, Wiman KG, Farnebo M. Wrap53, a Natural p53 Antisense Transcript Required for p53 Induction upon DNA Damage. *Molecular cell*. 2016;64:1009.
204. Rao X, Huang D, Sui X, Liu G, Song X, Xie J, Huang D. Overexpression of WRAP53 is associated with development and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014;9:e91670.
205. Saldana-Meyer R, Gonzalez-Buendia E, Guerrero G, Narendra V, Bonasio R, Recillas-Targa F, Reinberg D. CTCF regulates the human p53 gene through direct interaction with its natural antisense transcript, Wrap53. *Genes & development*. 2014;28:723-734.
206. Tasharrofi B, Soudyab M, Nikpayam E, Iranpour M, Mirfakhraie R, Sarrafzadeh S, Geranpayeh L, Azargashb E, Sayad A, Fard SG. Comparative expression analysis of hypoxia-inducible factor- α and its natural occurring antisense in breast cancer tissues and adjacent noncancerous tissues. *Cell biochemistry and function*. 2016;34:572-578.

207. Zong X, Nakagawa S, Freier SM, Fei J, Ha T, Prasanth SG, Prasanth KV. Natural antisense RNA promotes 3'end processing and maturation of MALAT1 lncRNA. *Nucleic acids research*. 2016;44:2898-2908.
208. Sun J, Wang X, Fu C, Wang X, Zou J, Hua H, Bi Z. Long noncoding RNA FGFR3-AS1 promotes osteosarcoma growth through regulating its natural antisense transcript FGFR3. *Molecular biology reports*. 2016;43:427-436.
209. Liu J, Wu W, Jin J. A novel mutation in SIRT1-AS leading to a decreased risk of HCC. *Oncology reports*. 2015;34:2343-2350.
210. da Silva AP, Martini MV, de Oliveira CMA, Cunha S, de Carvalho JoE, Ruiz ALTG, da Silva CC. Antitumor activity of (a)-bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines. *European journal of medicinal chemistry*. 2010;45:2987-2993.
211. Richardson DR, Kalinowski DS, Lau S, Jansson PJ, Lovejoy DB. Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2009;1790:702-717.
212. Kashyap M, Kandekar S, Baviskar AT, Das D, Preet R, Mohapatra P, Satapathy SR, Siddharth S, Guchhait SK, Kundu CH, Banerjee UC. Indenoindolone derivatives as topoisomerase II-inhibiting anticancer agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2013;23:934-938.
213. Yalowich JC, Wu X, Zhang R, Kanagasabai R, Hornbaker M, Hasinoff BB. The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II α . *Biochemical pharmacology*. 2012;84:52-58.
214. Kumar A, Singh B, Mahajan G, Sharma PR, Bharate SB, Mintoo MJ, Mondhe DM. A novel colchicine-based microtubule inhibitor exhibits potent antitumor activity by inducing mitochondrial mediated apoptosis in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Tumor Biology*. 2016;37:13121-13136.
215. Sui Y, Yang Y, Wang J, Li Y, Ma H, Cai H, Liu X, Zhang Y, Wang S, Li Z, Zhang X, Wang J, Liu R, Yan Y, Xue C, Shi X, Tan L, Ren J. Lysophosphatidic acid

inhibits apoptosis induced by cisplatin in cervical cancer cells. *BioMed research international*. 2015;2015.

216. Fedoseienko A, Wieringa HW, Wisman GBA, Duiker E, Reyners AKL, Hofker MH, van der Zee AGJ. Nuclear COMMD1 Is Associated with Cisplatin Sensitivity in Ovarian Cancer. *PLoS One*, 2016;11:e0165385.

217. Al-Bahlani SM, Al-Bulushi KH, Al-Alawi ZM, Al-Abri NY, Al-Hadidi ZR, Al-Rawahi SS. Cisplatin Induces Apoptosis Through the Endoplasmic Reticulum-mediated, Calpain 1 Pathway in Triple-negative Breast Cancer Cells. *Clin Breast Cancer*. 2016;24(16)30566-3.

218. Feng F, Wang B, Sun X, Zhu Y, Tang H, Nan G, Wang L, Wu B, Huhe M, Liu S, Diano T, Hou R, Zhang Y, Zhang Z. Metuzumab enhanced chemosensitivity and apoptosis in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biology & Therapy* 2017 (sayfa numarası henüz almamış).

219. Xing W, Chen D-T, Pan JH, Chen YH, Yan Y, Li Q, Xue RF, Yuan YF, Zeng WA. Lidocaine Induces Apoptosis and Suppresses Tumor Growth in Human Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro and in a Xenograft Model In Vivo. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2017 (sayfa numarası henüz almamış).

220. Habibpour E, Ahmadi S. QSAR Modeling of the Arylthioindole Class of Colchicine Polymerization Inhibitors as Anticancer Agents. *Current computer-aided drug design*. 2017 (sayfa numarası henüz almamış).

221. Kumar A, Sharma PR, Mondhe DM. Potential anticancer role of colchicine-based derivatives: an overview. *Anti-Cancer Drugs*. 2017 (sayfa numarası henüz almamış).

222. Mojardin L, Botet J, Moreno S, Salas M. Chromosome segregation and organization are targets of 5Fluorouracil in eukaryotic cells. *Cell Cycle*. 2015;14:206-218.

223. Mojardin L, Botet J, Quintales L, Moreno S, Salas M. New insights into the RNA-based mechanism of action of the anticancer drug 5-fluorouracil in eukaryotic cells. *PLoS One*, 2013;8:e78172.

224. Parker WB, Cheng YC. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacology & therapeutics*. 1990;48:381-395.
225. Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry*. 1974;13:471-481.
226. Lv XQ, Qiao XR, Su L, Chen SZ. Honokiol inhibits EMT-mediated motility and migration of human non-small cell lung cancer cells in vitro by targeting c-FLIP. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2016;37:1574-1586.
227. Cook MT, Liang Y, Besch-Williford C, Hyder SM. Luteolin inhibits lung metastasis, cell migration, and viability of triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2017;9:9.
228. Ge X, Liu X, Lin F, Li P, Liu K, Geng R, Dai C. MicroRNA-421 regulated by HIF-1 α promotes metastasis, inhibits apoptosis, and induces cisplatin resistance by targeting E-cadherin and caspase-3 in gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7:24466.
229. Shrum B, Costello P, McDonald W, Howlett C, Donnelly M, McAlister VC. In vitro three dimensional culture of hepatocellular carcinoma to measure prognosis and responsiveness to chemotherapeutic agents. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2016;5(3):204-8.
230. Li P, Zheng X, Shou K, Niu Y, Jian C, Zhao Y, Yi W. The iron chelator Dp44mT suppresses osteosarcoma's proliferation, invasion and migration: in vitro and in vivo. *American Journal of Translational Research*. 2016;8:5370.
231. Wangpu X, Lu J, Xi R, Yue F, Sahni S, Park KC, Menezes S. Targeting the metastasis suppressor, N-Myc downstream regulated gene-1, with novel di-2-pyridylketone thiosemicarbazones: Suppression of tumor cell migration and cell-collagen adhesion by inhibiting focal adhesion kinase/paxillin signaling. *Molecular pharmacology*. 2016;89:521-540.
232. Nikhil K, Sharan S, Wishard R, Palla SR, Peddinti RK, Roy P. Pterostilbene carboxaldehyde thiosemicarbazone, a resveratrol derivative inhibits 17 β -Estradiol induced cell migration and proliferation in HUVECs. *Steroids*. 2016;108:17-30.

ÖZGEÇMİŞ

Esra BOZGEYİK 1989 yılında Gaziantep’te doğdu. Lise öğrenimini Şahinbey Atatürk Lisesi’nde tamamladı. Lisans eğitimine 2006 yılında Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü’nde başladı ve 2011 yılında mezun oldu. 2011 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında, “ATP2B4 ve ATP5B Genlerinin Kolorektal Kansere İlişkisinin Araştırılması” isimli tez konusu ile yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2013 yılında, aynı anabilim dalında doktora eğitimine başladı. İngilizce bilmektedir ve evlidir.



