

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2018-YL-011

HT-29 İNSAN KOLOREKTAL KANSER HÜCRE
HATTINDA EMODİN'İN MİR-25 İFADESİNE
ETKİSİ

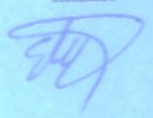
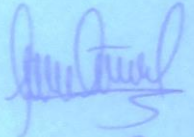
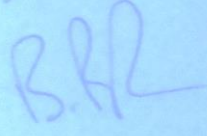
İlkem CEYLAN

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Celal ÜLGER

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi İlkem CEYLAN tarafından hazırlanan HT-29 İnsan Kolorektal Kanseri Hücresi Hattında Emodin'in MiR-25 İfadesine Etkisi başlıklı tez, 18.01.2018 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof.Dr. Elif DEMİRKAN	Uludağ Üniversitesi	
Üye : Prof.Dr. Celal ÜLGER	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Prof.Dr. Bülent BOZDOĞAN	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu (tezin türü) tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla(tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY

Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

18/01/2018

İlkem CEYLAN

ÖZET

HT-29 İNSAN KOLOREKTAL KANSER HÜCRE HATTINDA EMODİN'İN MİR-25 İFADESİNE ETKİSİ

İlkem CEYLAN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Celal Ülger

2018, 74

Kanser anormal gen ifadesine bağlı olarak kontrolsüz hücre bölünmesi, apoptoz inaktivasyonu, metastaz, angiogenez gelişimi ile karakterizedir. Kolorektal kanserler ölüm oranları bakımından üst sıralarda yer almaktadır. Antikanser özellikleri gösteren birçok bileşik yaygın olarak kullanılmaktadır. Rheum türlerinin kök ve toprak altı gövdelerinde bulunan aktif bir antrakinon bileşiği olan Emodin (1,3,8-trihidroksi-6-metilantraquinon) tümör büyümesini engelleyici özellik göstermektedir. Hücre gen ifadesindeki değişikliklerle yakından ilişkili olan kanserlerde, bu amaçla birçok gen ifadesine etkili kimyasal ve bunların etki mekanizmaları açıklığa kavuşturulmuştur. Mikro RNA (miRNA) gen ifadesi düzenlenmesinde yer alan diğer bir önemli moleküldür. MiRNA moleküllerinin çeşitli kanser türlerindeki ifade farklılığı bazı hücresel mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir. MikroRNA-25 (miR-25) hem onkogen hem de tümör baskılayıcı olarak hücrelerde işlev görmektedir. Bu çalışmada, bir kolorektal kanser hücre hattı olan HT-29 hücrelerinde, emodinin miR-25 ifadesine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Hücre kültürü yapılarak hücre proliferasyonu ve apoptoz için uygulanacak kimyasalın süre ve dozları belirlenmiştir ve miR-25 ifadesine bakılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda IC50 ve AP50 değeri 55µM olarak saptanmıştır. Emodinin hücre döndüsünde *siklin D1* üzerinden bir etkisi bulunmamaktadır. Emodin miR-25 ifadesini artırmakta ve *survivin* ifadesini baskılayarak da apoptozu indüklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, miR-25, Emodin, HT-29, *Survivin*, Apoptoz.

ABSTRACT

THE EFFECT OF EMODIN ON MIR-25 EXPRESSION IN HT-29 HUMAN COLORECTAL CANCER CELL LINE

İlkem CEYLAN

M. Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Celal Ülger

2018, 74

Cancer is characterized by uncontrolled cell division, inactivation of apoptosis, metastasis, and development of angiogenesis depending on abnormal gene expressions. Compared with other types of cancer, colorectal cancer is at the top considering mortality. Many compounds which have anticancer properties are widely used. Emodin (1,3,8-trihidroksi-6-metilantraquinon), which is located into root and rhizome of Rheum species and is an active compound for anthraquinone, exhibits obstructing tumor growth. For this purpose, many chemicals affecting gene expression and their impact mechanisms are enlightened in cancers related closely to modifications of cell gene expressions. Another crucial molecule is micro RNA (miRNA) for organizing gene expression. Differences of miRNA expression in various cancer types are linked with some cellular mechanisms. MicroRNA-25 (miR-25) takes charge as both oncogene and tumor suppressor in cells. In this study, we aimed to investigate the effect of emodin on miR-25 expression in HT-29 which is a cell line of colorectal cancer. For this purpose, we used cell culture to determine duration and dose of chemicals for cell proliferation and apoptosis. Then, we assessed expression of miR-25. As a result of the data, IC₅₀ and AP₅₀ were determined as 55 µM. There is no effect of emodin on the *cyclin D1* in the cell cycle. Emodin increases expression of miR-25 and also induces apoptosis by suppressing the expression of *survivin*.

Key Words: Cancer, miR-25, Emodin, HT-29, *Survivin*, Apoptosis.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans sürecim boyunca bilgi birikimi ve desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof.Dr. Celal ÜLGER'e,

FEF-15020 numaralı proje kapsamında yapmış olduğum tezi desteklemelerinden dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi'ne,

Hücre kültürü çalışmalarında laboratuvarını ve cihazlarını paylaşan değerli hocalarım Prof.Dr. Bülent BOZDOĞAN, Prof.Dr. Serhan SAKARYA'ya ve REDPROM ekibine,

Tez çalışmamda laboratuvar ve cihazlarını paylaşan TARBIYOMER'e,

İhtiyaç duyduğum her an kapılarını çekinmeden çalabildiğim bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof.Dr. Oğuz TÜRKOZAN ve Prof.Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK'e

Laboratuvar konusunda tüm bilgilerini benimle paylaşan her konuda bana yol gösteren manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen can dostum Arş. Gör. Burcu AYHAN ŞAHİN'e

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen yeri geldiğinde bir abla sıcaklığı gösteren arkadaşım Dr. Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL'e,

Tüm eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve her konuda beni destekleyen canım annem Merdiye CEYLAN ve canım babam Mehmet Arif CEYLAN'a,

Bir kardeşin her zaman yanımda iyi ki abim var diyebilmesini sağlayan abim Muzaffer CEYLAN'a, her konuda fikirlerine güvendiğim ablam Serap CEYLAN'a ve evimizin neşesi canım yeğenim İpek CEYLAN'a,

Tez çalışmam süresince her türlü nazımı çeken, en zor zamanımda bana güç ve cesaret veren yol arkadaşım Kamil CANDAN'a

Teşekkür ederim.

İlkem CEYLAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxiii
1 . GİRİŞ	1
1.1 . Kanser	3
1.1.1. Kolorektal Kanser	4
1.2. Bitkisel Tedaviler	4
1.2.1. Emodin	5
1.3. Mikro RNA'lar.....	6
1.3.1. Mikro RNA-25	8
1.4. Apoptoz.....	9
1.4.1. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	11
1.4.1.1. HO/PI Boyama.....	12
1.5. Hücre Proliferasyonu – MTT	12
1.6. Hücre Döngüsü.....	12
1.6.1. Siklinler	13

1.7. RT-PCR (Real Time-PCR, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	14
1.8. Western Blot.....	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	17
3 . MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Hücre Kültürü.....	21
3.1.1. Hücrelerin Çözülmesi.....	21
3.1.2. Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması	22
3.1.3. Hücrelerin Thoma Lamı'nda Sayımı	22
3.1.4. Hücrelere Uygulanacak Emodin'in Hazırlanışı ve Uygulanması.....	22
3.2. MTT Proliferasyon Testi	23
3.2.1. Hücrelerin Plakalara Ekimi	23
3.2.2. MTT Proliferasyon Testi	23
3.2.3. Elde Edilen Absorbans Değerlerinin Analizi	24
3.3. Muse™ Canlılık Testi	24
3.3.1. Muse™ ile ölçüm ve analiz.....	25
3.4. Apoptozun Belirlenmesi.....	26
3.4.1. Apoptoz ve Nekroz Yöntemi.....	26
3.4.2. Hoechst 33258 / Propidium Iodide (HO/PI) boyalarının hazırlanışı ...	26
3.4.3. Hücrelerin Plakalara Ekimi ve Apoptozun Belirlenmesi.....	26
3.4.4. Boyanan Hücrelerin Mikroskop Altında Görüntülenmesi ve Analizi .	27

3.5. Muse™ ile Hücre Döngüsü Analizi	27
3.5.1. Hücrelerin Plakalara Ekimi ve Hücre Döngü Analizi	27
3.5.2. Muse™ ile Hücre Döngüsü Analizi	28
3.6. RNA İzolasyonu.....	29
3.6.1. Hücrelerin RNA İzolasyonu İçin Plakalara Ekimi Ve Uygulama Yapılması	29
3.6.2. TRizol® İle RNA İzolasyonu.....	29
3.7. cDNA Sentezi.....	29
3.8. Real Time PCR (RT-PCR).....	30
3.9. Protein İzolasyonu.....	31
3.9.1. Protein İzolasyonu İçin Hücrelerin Plakalara Ekimi ve Uygulama Yapılması	31
3.9.2. Protein İzolasyonu.....	31
3.10. MikroRNA-25 İnhibitör Transfeksiyonu.....	32
3.10.1. Anti-miR-25 Transfeksiyonu	32
3.10.2. cDNA sentezi ve Real Time PCR	33
3.11. Western Blot.....	34
3.11.1. Ayırıştırıcı ve Yükleme Jelinin Hazırlanması	34
3.11.2. Proteinlerin Jele Yüklmesi ve Yürütülmesi.....	35
3.11.3. Jelde Yürüyen Örneklerin Membrana Transferi.....	36
3.11.4. Transfer Sonrası Membran ve Antikor Uygulanması	37
3.11.5. Membran Görüntüleme ve Veri Analizi.....	39

4 . BULGULAR	40
4.1. MTT Proliferasyon ve Muse™ Canlılık Testi.....	40
4.2. Apoptoz	43
4.3. Muse™ Hücre Döngüsü Analizi	45
4.4. Real Time PCR Bulguları.....	46
4.4.1. Emodin Uygulaması Sonrası miR-25 İfadesi	46
4.4.2. Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası miR-25 İfadesi.....	46
4.4.3. Emodin Uygulaması Sonrası İlgili Genlerin mRNA İfadeleri	47
4.4.4. Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası Genlerin mRNA İfadeleri.....	48
4.5. Western Blot Analizleri.....	50
4.5.1. Emodin Uygulaması Sonrası Protein İfadesi.....	50
4.5.2. Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası Protein İfadesi	51
5 .TARTIŞMA VE SONUÇ.....	52
6 .KAYNAKÇA	58
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER DİZİNİ

μl : Mikrolitre

μM : Mikromolar

dk : Dakika

Lt : Litre

ml : Mililitre

mM : Milimolar

nM : Nanomolar

$^{\circ}\text{C}$: Santigrat

KISALTMALAR DİZİNİ

3'-UTR	: 3'-Transle Edilmeyen Bölge
Anti-miR-25	: MikroRNA-25 İnhibitörü
AP	: Alkalen Fosfataz
BCIP	: 5-bromo-4-kloro-3'indolilfosfat p-toluidin Tuzu
BSA	: Sığır Serum Albümini
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilendiamintetra Asetik Asit
FBS	: Fetal Sığır Serum
miRNA/miR	: mikroRNA
mRNA	: Haberci RNA
PBS	:Tuz Fosfat Tamponu
PIC	: Proteaz İnhibitör Kokteyli
PMSF	: Fenilmetansülfonilflorit
PVDF	: Polivinilidindiflorit
RNA	: Ribonükleik asit
RISC	: RNA ile uyarılan sessizleştirme kompleksi
RT	: Revers Transkripsiyon
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TBS	: Tris Tuz Tamponu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Emodin, 1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone	6
Şekil 1.2 MikroRNA yolağı	7
Şekil 1.3 MikroRNA-106b-25 üyelerinin kromozomal bant 7q22.1 üzerindeki genomik lokalizasyonu.....	9
Şekil 1.4 Apoptoz.....	10
Şekil 3.1 HT-29 hücre hattı mikroskop görüntüsü (10X)	21
Şekil 3.2 Artan konsantrasyonlarda MTT uygulaması ve formozan kristallerinin DMSO eklendikten sonraki plaka görüntüsü	24
Şekil 3.3 Muse™ canlılık testi uygulaması.....	25
Şekil 3.4 HO/PI uygulaması yapılmış hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)	27
Şekil 3.5 Muse™ hücre döngüsü analizi.....	28
Şekil 3.6 Dikey elektroforez tankı.....	35
Şekil 4.1 MTT yöntemi ile 24. saatteki hücre canlılığı	40
Şekil 4.2 MTT yöntemi ile 24.saat için elde edilen eğim grafiği.	41
Şekil 4.3 MTT yöntemi ile 48. saatteki hücre canlılığı.....	41
Şekil 4.4 MTT yöntemi ile 48.saat için elde edilen eğim grafiği	42
Şekil 4.5 Muse™ canlılık testi sonucu elde edilen uygulanan dozlardaki % canlı hücre.....	42
Şekil 4.6 Muse™ yöntemi ile 48. saat için elde edilen eğim grafiği.....	43
Şekil 4.7 Emodin uygulanan hücrelerde 48. saat konsantrasyona bağlı apoptoz oranları	44

Şekil 4.8 AP50 dozunun belirlendiği doza bağlı apoptik hücre dağılım grafiği ...	44
Şekil 4.9 Emodin uygulaması sonucu elde edilen 24. saat ortalama % hücre geçişi	45
Şekil 4.10 Emodin uygulaması sonucu elde edilen 48. saat ortalama % hücre geçişi	45
Şekil 4.11 Emodin uygulaması sonucu miR-25 ifadesinin zamana bağlı olarak değişimi	46
Şekil 4.12 Anti-miR-25 uygulaması sonrası 48. saatte hücredeki miR-25 ifade değişimi	47
Şekil 4.13 Emodin uygulaması sonucu elde edilen <i>siklin D1</i> mRNA ifadesi	47
Şekil 4.14 Emodin uygulaması sonucunda elde edilen <i>survivin</i> mRNA ifadesi ...	48
Şekil 4.15 Anti-miR-25 uygulaması sonucu <i>siklin D1</i> mRNA ifadesi.....	49
Şekil 4.16 Anti-miR-25 uygulaması sonucu <i>survivin</i> mRNA ifadesindeki değişim	49
Şekil 4.17 Emodin uygulaması sonucu Siklin D1 protein ifadesi değişimi	50
Şekil 4.18 Anti-miR-25 uygulaması sonucu Siklin D1 protein ifadesi değişimi ..	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 mRNA çalışmalarında Real Time PCR (RT-PCR) için kullanılan primerler.....	30
Çizelge 3.2 miRNA çalışmalarında cDNA sentezi ve RT-PCR için kullanılan primerler.....	33
Çizelge 3.3 Ayırma jeli içerikleri.....	34
Çizelge 3.4 Yükleme jeli içerikleri	35
Çizelge 3.5 1X yürütme tamponu içerikleri	36
Çizelge 3.6 Protein yükleme boyası içerikleri.....	36
Çizelge 3.7 Transfer tamponu içerikleri.....	37
Çizelge 3.8 10X TBS stok çözeltisinin içerikleri.....	38
Çizelge 3.9 Bloklama sütü içerikleri	38
Çizelge 3.10 1X TBS – Tween 20 içerikleri	38
Çizelge 3.11 Sığır Albumini (BSA) içerikleri.....	38

1. GİRİŞ

Kanser genel olarak kontrolsüz hücre bölünmesi olarak tanımlanır. Malign tümör olarak bilinen tümörler vücudun diğer bölgelerine de yayılım gösteren anormal hücre büyümesidir (WHO, 2014). Tüm tümörler malign değildir ve iyi huylu tümörler vücudun diğer bölgelerine yayılmazlar (National Cancer Institute, 2014). Kanser her yıl milyonlarca kişinin yaşamını etkileyen ölümcül bir hastalıktır (American Cancer Society, 2013). Oldukça ölümcül olan AIDS, verem ve sıtma gibi hastalıkların toplamından daha yüksek ölüm oranına sahiptir. 2012 yılında dünyada 14,1 milyon vaka ortaya çıkmıştır ve yaklaşık olarak dünyada 8,2 milyon kişinin ölümüne sebep olmuştur. Erkeklerde görülen en yaygın kanser türleri akciğer, prostat, kolorektal ve mide kanseriyken, kadınlarda, en yaygın türleri meme, kolorektal, akciğer ve serviks kanserleridir (World Cancer Report, WHO, 2014). Sağlık Bakanlığı'nın hazırladığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2010 verilerine göre Türkiye'de kanser türleri arasında görülme sıklığı bakımından bayanlarda meme, tiroit, kolorektal ve mide kanserleri ilk dört sırayı alırken erkeklerde bu sıralama akciğer, prostat, mesane ve kolorektal kanserler şeklindedir (Anonim, 2010).

Kolorektal kanser, meme, prostat ve akciğer kanserinden sonra görülme sıklığı bakımından dördüncü sırada yer almaktadır. Kolorektal kanserin görülme sıklığı farklı coğrafyalarda farklı yörelerde yaşayan toplumlarda değişiklik göstermektedir, bu farklılık beslenme ve çevresel faktörlerin değişik olmasından kaynaklanabilmektedir. Hastalık genellikle 60-75 yaşları arasında ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda teşhisde kullanılan yöntemlerin gelişmesi, tarama programlarının uygulanmaya başlaması, cerrahi teknikler, radyoterapi, kemoterapi gibi yöntemlerin kullanılmasıyla kolorektal kanserin erken dönemde teşhisine ve ölüm oranının azalmasına yol açmıştır (Dobrucalı, 2003).

Kanser tedavisinde kullanılan bazı bileşikler uzun yıllar geleneksel tedavilerde kullanıldıkları için doğal olarak bulunan bazı organizmalardan elde edilmiştir. Bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilen doğal ürünler antikanser ilaç olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (Schwartzmann vd., 2002). Emodin (*1,3,8-trihidroxy-6-methylanthraquinone*), Çin'de geleneksel tedavilerde yaygın olarak kullanılan ravent (*Rheum palmatum*) bitkisinden izole edilen aktif bir bileşendir (Srinivas vd., 2003). Çin bitkisel tedavisinin en iyi bilinen ilaçlarından biridir ve kabızlık, gastrointestinal kanama ve ülserin rahatlatıcı tedavisinde kullanılır.

Emodin apoptozis indüksiyonu, hücre döngüsünü durdurma, anti-proliferasyon, anti-anjiogenez ve anti-oksidasyon veya bunların kombinasyonu üzerinde çeşitli biyolojik aktiviteye sahiptir (Chun-Guang vd., 2010).

Tedavi amaçlı kullanılan bileşiklerin birçoğunun hedefleri kanser ile ilişkili bazı genlerin ifadelerinin düzenlenmesini hedefler. Bu amaçla birçok kimyasal ve bunların ilgili hedefleri son derece önemlidir. Bunlardan birisi de mikroRNAlardır (miRNA, miR). Yaklaşık yirmi yıllık keşfedilme tarihi olan mikroRNA'lar oldukça yoğun çalışılan molekül gruplarıdır (Nana-Sinkam ve Croce, 2013). MiRNA'lar hem tek hücreli hem de çok hücreli ökaryotlarda bulunan 18-27 nükleotit uzunluğunda kodlanmayan küçük RNA'ların bir sınıfıdır (Huang vd., 2013). Bu endojen inhibitörler ya hedef mRNA'yı yıkarak ya da protein sentezini engelleyerek gen ifadesini düzenler. MiRNA'lar birçok biyolojik işlemde önemli rol oynarlar. Bu işlemler arasında embriyo gelişimi, farklılaşma, bağışıklığın düzenlenmesi, hastalık gelişimi (onkogen aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu gibi), hücre döngüsü düzenlenmesi ve metabolizma yer alır ve bu olayları transkripsiyonel veya posttranskripsiyonel olarak kontrol edebilir (Calin vd., 2004; Yan ve Marr, 2005; Huppi vd., 2007; Erson ve Petty; 2008; Selcuklu vd., 2009). Şu an aydınlatılması gereken en önemli durum normal fizyolojik koşullarda ve hastalık durumunda miRNA'ların fonksiyonlarının anlaşılmasıdır. Normal gelişim ve hücrel homeostaside kritik rolünün olması, miRNA aktivitesinin anormal olması durumunda insan hastalık patolojilerine katkıda bulunuyor olmasını mümkün kılar (Esau ve Monia, 2007).

Kanser ile ilişkili olarak bazı miRNA'lar çalışılmıştır. Hastalık durumunda kontrolü bozulan mikro RNA'lar içinde miR-25 çeşitli kanser tiplerinde değişik seviyelerde ifade olur (Razumilava vd., 2012). Yapılan çalışmalarda miR-25'in bazı kanserlerde ifadesinin arttığı (Poliseno vd., 2010; Razumilava vd., 2012), hücre döngüsünü G2/M aşamasında yakaladığı (Esposito vd., 2012), hücre bölünmesini inhibe ettiği (Li vd., 2012) ve antitümör etki gösterdiği (Anton vd., 2011) belirlenmiştir. MiRNA'lar kolorektal kanserin ilerlemesinde ve metastazında önemli rol oynamaktadır. Kolorektal kanser hücreleriyle şimdiye kadar çok sayıda miRNA çalışılmış ve normal hücrelerle karşılaştırıldığında bu miRNA'ların ifadesinde artış veya azalış görülmüştür. Birbirinden bağımsız yapılan çalışmalarda miR-20a, miR-21, miR-25, miR-31, miR-93, miR-106, miR-183, miR-203 miR-1, miR-126, miR-30a, miR-143, miR-145, miR-191 ve miR-192 ifadelerinde değişiklik saptanmıştır (Corte vd., 2012).

Bu çalışmada emodin'in bir kolorektal kanser hücre hattı olan HT-29 hücrelerine ve bu hücrelerdeki miR-25 gen ifadesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca miR-25 ifadesinin apoptoz ve hücre bölünmesi ile ilişkili bazı genlerin mRNA ve protein düzeyinde ifadelerine etkisi belirlenmiştir.

1.1. Kanser

Kanser organizmalarda çeşitli organ ve dokularda hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan 100'den fazla hastalık grubudur. Çok çeşitli kanser tipleri olmasına rağmen, hepsi anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile başlar. Tedavi edilmez ise ciddi rahatsızlıklara, hatta ölüme dahi neden olabilir.

Bütün kanser tipleri vücudun temel yaşam ünitesi olan hücrelerimizden gelişirler. Vücudumuzdaki sağlıklı hücreler bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ancak, kas ve sinir hücrelerinde bu özellik bulunmaz. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Yaşamın ilk yıllarında hücreler daha hızlı bölünürken, erişkin yaşlarda bu hız yavaşlar. Fakat hücrelerin bu yetenekleri sınırlıdır, sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre ne kadar bölüneceğini ve gerektiğinde de kontrollü bir şekilde ölüme gideceğini bilir. Buna apoptoz yani hücrenin programlı ölümü denir. Normalde vücudun sağlıklı ve düzgün çalışması için hücrelerin kontrollü bir şekilde büyümesi, bölünmesi ve daha çok hücre üretmesine gereksinimi vardır. Bazen buna rağmen süreç doğru yoldan sapar, yeni hücrelere gerek olmadan hücreler bölünmeye devam eder. Kontrolün kaybedildiği kanser hücreleri, bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Bu hücreler tümör dokusu oluştururlar.

Tümörler iyi huylu veya kötü huylu olabilirler. İyi huylu tümörler benign tümörler olarak da adlandırılır ve bulundukları bölgede gelişirler. Uzun süre hayati tehlike oluşturmadan varlıklarını sürdürebilirler. Bunlar sıklıkla uzaklaştırılır ve çoğu zaman tekrarlamazlar. Kötü huylu (malign) tümörlerdeki hücreler anormaldirler ve kontrolsüz ve düzensiz bölünürler. Bu tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştuğu tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Daire Başkanlığı, 2017).

1.1.1. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser insidans ve mortalitesi dünya çapında belirgin değişiklik göstermektedir (Edwards vd., 2010). Dünya çapında yaklaşık bir milyon kolorektal kanser tanısı konulurken, 500 bin hasta kolorektal kanseri nedeniyle kaybedilmektedir (Winawer ve Sherlock, 2007). En yüksek insidanslar Kuzey Amerika, Avustralya, Kuzey ve Batı Avrupa'da iken gelişmekte olan ülkelerde özellikle Asya ve Afrika'da düşük orandadır (Chan ve Giovannucci, 2010). Ölüm oranları ise gelişmiş bölgelerde, az gelişmiş bölgelere göre daha düşüktür (International Agency for Research on Cancer, 2014a). Bu coğrafi farklılık, diyet, çevresel faktörlere ve genetik yatkınlığa bağlı gibi gözükmektedir (Wei vd., 2004). Kendiliğinden oluşan kolorektal kanser için yaş en büyük risk faktörüdür. 40 yaşın altında kolorektal kanser nadirken, 40-50 yaş sonrası insidans artmaya başlamaktadır (Edwards vd., 2010).

Kolorektal kanserin etiyojisi çok faktörlü olmasına rağmen, proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin genetik ve epigenetik değişiklikleri tümör gelişiminin temel mekanizması olmaya devam etmektedir. Bu anormallikler, hücre proliferasyonu, apoptoz, metastaz, anjiyogenez, çoklu ilaç direnci ve genetik stabilitenin korunması da dahil olmak üzere tümör gelişiminin birçok yönünü etkileyen onkoproteinlerin anormal ifadesi veya işlevine neden olmaktadır (Harris vd., 2010).

2013 yılında yapılan istatistiklere göre kolorektal kanser, erkeklerde akciğer ve prostatın sonra, kadınlarda ise meme ve tiroitten sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Uluslararası kanser ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre kolorektal kanser erkeklerde üçüncü sırada yer alırken, kadınlarda ise ikinci sırada görülmektedir (Sağlık Bak., 2016). Genel olarak gelişmekte olan kolorektal kanserinin yaşam boyu riski erkeklerde kadınlara göre daha fazladır (American Cancer Society, 2016)

1.2. Bitkisel Tedaviler

İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanlar, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır. Deneme yanılma yoluyla elde edilen bu bilgiler, çağlar boyunca kullanım şekillerindeki bazı değişiklik ve gelişmelerle günümüze kadar ulaşmıştır. Hitit yazıtlarında, Mısır

papirüslerinde, ilkçağlardan kalan kitaplarda hep tıbbi bitkilerin yerel adları ve kullanım şekilleri verilmiştir. Bitkilerden en çok gıda ve tedavi edici olarak yararlanılmakla beraber, yakıt, yapı malzemesi, süs eşyası yapımı, boyar madde ve büyü, nazar gibi inançsal amaçlı vb. kullanımlar da yaygındır.

Halk ilaçlarıyla tedavi geçmişte olduğu gibi günümüzde de geçerliliğini sürdürmekte ve dünya üzerinde özellikle modern sağlık hizmetlerinin yeterli olmadığı alanlarda halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Tıbbi bitkiler tedavi edici etkilerini, sentezledikleri biyolojik olarak aktif kimyasal bileşikler aracılığıyla gösterirler. Bitkilerden elde edilen saf etken maddelerin kullanımları oldukça yaygındır. Günümüzde tedavi alanında efedrin, essin, digitoksin, kinin, kokain, reserpin, salisin, senne antrakinonları gibi ilaç etken maddeleri kullanılmaktadır (Kendir ve Güvenç, 2010).

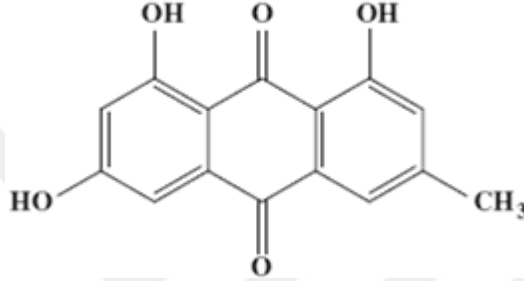
Tedaviler kimyasal ilaçlarla yapılmakla birlikte son zamanlarda doğal ürünlerin antitümör özellikleri üzerine yoğunlaşmıştır. Çünkü bu maddeler daha az yan etkiye sahip olmakla birlikte kimyasal olarak sentezlenmiş ilaçlara göre daha uzun süre kullanım için uygundur (Wang vd., 2010, Ma vd., 2012).

1.2.1. Emodin

Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methyl-anthraquinane) (Şekil 1.1), çok yaygın kullanılan *Rheum palmatum* L.'nin ve Rhamnaceae, Leguminaceae, Liliaceae gibi bitki köklerinde ve rizomlarında bulunan bir antrakinon türevidir. Emodin, Çin otlarının önemli bir bileşenidir ve yapısal olarak antrasikline benzemektedir. Kanser hücrelerinin DNA'larının arasına girebilen daunorubicin ve mitoxontron gibi aynı trisiklik düzlemsel kromofor iskeletine sahiptir (Xing vd., 2015).

Farmakolojik çalışmalar emodin ve emodin türevlerinin, anti-inflamatör, antibakteriyel ve antikanser gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlar gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Wei vd., 2013). Emodin, lösemi (Muto vd., 2007, Chun-Guang vd., 2010), akciğer (Lai vd., 2009; Ko vd., 2010; Lin vd., 2012), kolon (Damodharan vd., 2011; Ma vd., 2012), safra kesesi (Wang 2010; Li vd., 2012; Li vd., 2013), pankreas (Liu vd., 2012), meme (Huang vd., 2009; Wang vd., 2010), servikal (Yaoxian vd., 2013) kanserleri ve hepatik karsinom hücreleri (Cha vd., 2005; Cai vd., 2008; Hsu vd., 2010) olmak üzere geniş kapsamlı bir baskılayıcı ajan olduğu ispat edilmiştir.

Emodin'in çoğu çalışmada, çeşitli kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği görülmüştür (Chen vd., 2002; Su vd., 2005) ve hücre apoptozu, onkogeneze, hücre proliferasyonu, kanser hücresi invazyonu ve metastazın kontrolü ile ilgili genleri düzenlediği görülmüştür (Kim vd. 2005; Cha vd.; 2005, Huang vd., 2006; Kwak vd., 2006; Muto vd., 2007).



Şekil 1.1 Emodin, 1,3,8-trihidroksi-6-metilantraquinon (Chen vd., 2014)

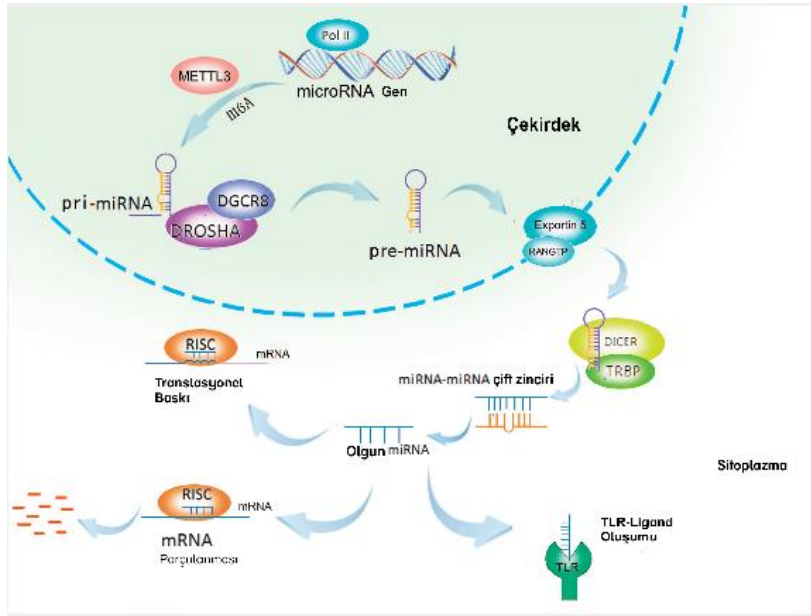
1.3. Mikro RNA'lar

MikroRNA'lar, transkripsiyonel baskı ve haberci RNA (mRNA) yıkımı ile endojen gen ifadesini düzenleyen, yüksek oranda korunmuş, tek zincirli, kodlanmayan küçük RNA moleküllerinin bir sınıfıdır (Bartel 2009, Shukla, 2011).

Elde edilen veriler, miRNA ifadesinin insan kanserlerinde, miRNA genlerinin amplifikasyonu veya delesyonu, miRNA'ların anormal transkripsiyon kontrolü, düzensiz epigenetik değişiklikler, miRNA biyogenez mekanizmasındaki kusurlar gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla düzensizleştiğini göstermiştir. MikroRNA'lar belirli koşullar altında onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak işlev görebilirler. Düzensiz miRNA'lar; proliferatif sinyali sürdürme, büyümeyi engelleyicilerden kaçma, hücre ölümüne direnç, invazyon ve metastaz aktivasyonu, anjiyogenez indüksiyonunu içeren kanser özelliklerini etkilediği gösterildi. Artan sayıda çalışma, miRNA'ları, kanser teşhisi, prognozu ve terapötik hedefleri veya araçları için potansiyel biyolojik belirteç olarak ortaya koymaktadır (Peng ve Croce 2016). İlk miRNA *lin-4*, *Caenorhabditis elegans*'da Ambros ve meslektaşları tarafından keşfedildi (Lee vd., 1993). Bu miRNA, LIN-14 proteininin ifadesini düzenleyerek gelişmeyi etkiler ve protein kodlamaz. 2001 yılında üç bağımsız çalışma grubu tarafından hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda miRNA'ların bol miktarda olduğu bulundu. miRNA aracılı post-transkripsiyonel düzenlemenin türler arasında genel bir düzenleyici fonksiyonu olduğu bulunmuş, bu da bazı

miRNA'ların oldukça korunduğunu ortaya koymuştur (Lagos vd., 2001; Lau vd., 2001; Lee ve Ambros, 2001). Birçok miRNA'nın işlevi halen bilinmemekle birlikte 2578 olgun miRNA dizisine işlenen toplam tanımlanmış 1872 insan miRNA öncü geni vardır (Peng ve Croce, 2016).

MikroRNA sentezi 3' poliadenillenmiş ve 5' başlıklanmış 5'→3' yönünde büyük primer transkriptte (pri-miRNA) transkribe edilen gen ile başlar. Transkripsiyon tipik olarak RNA polimeraz II aracılığıdır, ancak bazı pri-miRNA'lar RNA polimeraz III tarafından üretilir (Lee vd., 2004; Borchert vd., 2006.). Pri-miRNA'lar daha sonra RNA bağlayıcı protein DGCR8 ve tip III RNaz Drosha'dan oluşan bir mikro işlemci kompleksi tarafından kırılarak pre-miRNA adını alan ~85 nükleotitlik stem-loop (sap-ilmek) yapısını alırlar. Çekirdekten sitoplazmaya Ran/GTP/Exportin 5 kompleksine aktarıldıktan sonra pre-miRNA'lar başka bir RNaz III enzimi Dicer tarafından ~20-22 nükleotid uzunluğunda miRNA/miRNA çift zincirine işlenir. Çift zincir çözüldükten sonra olgun miRNA, RNA ile uyarılan sessizleştirme kompleksine (RISC) dahil edilir ve RISC'i hedef mRNA'ya yönlendirir (Macfarlane ve Murphy, 2010) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 MikroRNA yolu (Peng ve Croce, 2016)

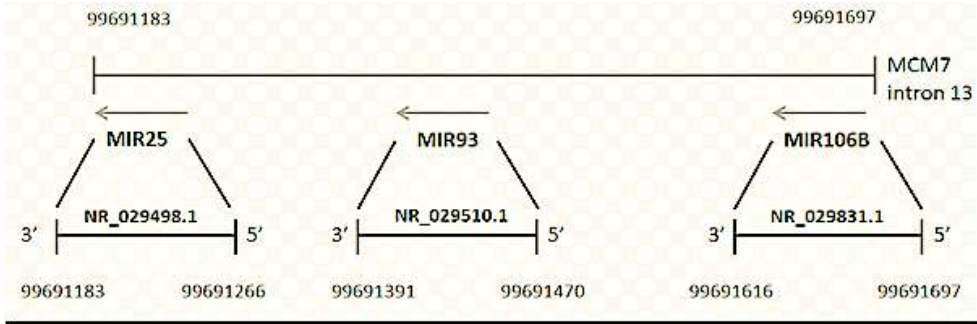
MikroRNA ve hedeflenen mRNA transkript arasındaki tamamlayıcılığa bağlı olarak mRNA kırılması, parçalanması veya translasyonel baskı yoluyla gen

sessizleştirmesine aracılık eder. Buna ek olarak, miRNA'lar Toll benzeri reseptör (TLR) ile doğrudan bağlanmaya yönelik ligandlar olarak işlev görebilirler ve akış aşağı sinyal yollarını tetikler. Normal hücrelerle kanserli hücrelerin miRNA ifadesi karşılaştırıldığında, genomik miRNA kopya sayısı ve bulunduğu gen bölgesinde meydana gelen değişikliklerden dolayı kanserli hücrelerdeki miRNA ifadesi anormaldir (Peng ve Croce, 2016).

Son çalışmalar, miRNA'ların ifadesinin meme, kolon, akciğer, pankreas kanserleri ve kronik lenfositik lösemi gibi çeşitli insan kanserlerinde düzensiz olduğunu göstermiştir (Volinia vd., 2006). İnsan kolorektal kanserinde değişken ifadelili çoklu miRNA'lar tespit edilmiştir. Yapılan bazı çalışmalar miR-21, miR-31, miR-135, miR-17-92 kümesi ve miR-196a'nın aşırı ifade olduğu ve onkogenik rol oynadığı, miR-34, miR-195 ve miR-365'in ifadesinin ise düştüğünü göstermiştir. Bu miRNA'ların tümör baskılayıcı rolünü göstermiştir (Bandres vd., 2006, Motoyoma vd., 2009, Schimanski vd., 2009, Liu vd., 2010, Schee vd., 2012, Nie vd., 2012,). Bu sonuçlar, miRNA'ların kolorektal kanser de dahil olmak üzere insan kanserlerinde çeşitli ve önemli rol oynadığını göstermektedir. Çünkü; miRNA'ların ifade profili belirli bir miRNA'nın işlevsel ve klinik anlamı, miRNA ve etkili kanser yönteminin fonksiyonu ile ilgili klinik açıdan anlamlı bilgiler sağlayabileceğini ortaya koyarak, dokuya özgü olduğunu göstermiştir (Li vd., 2013).

1.3.1. Mikro RNA-25

MikroRNA-25, ~22 nükleotid uzunluğunda, kromozom 7q22.1 üzerindeki *Mcm7* (mini kromozom bakım kompleksi bileşen 7) geninin intron 13'ünde bulunan miR-106b, miR-93 ve miR-25'i içeren miR-106b-25 kümesinin bir üyesidir (Petrocca vd., 2008) (Şekil 1.3). Kolon kanserinde miR-106b-25 kümelenmesinin ifadesi ve kesin işlevi hakkında çok az şey bilinmesine rağmen, miR-93'ün kolon kanseri kök hücrelerinin proliferasyonunu ve koloni oluşumunu baskılayabileceği bulunmuştur (Yu vd., 2011). 2011 yılında yapılan çalışmada, miR-25'in insan kolon kanseri hücre hatlarının seçimi sırasında hücre yaşayabilirliğini inhibe edebileceği gözlemlenmiştir (Anton vd., 2011).



Şekil 1.3 MikroRNA-106b-25 üyelerinin kromozomal bant 7q22.1 üzerindeki genomik lokalizasyonu (atlasgeneticsoncology.org)

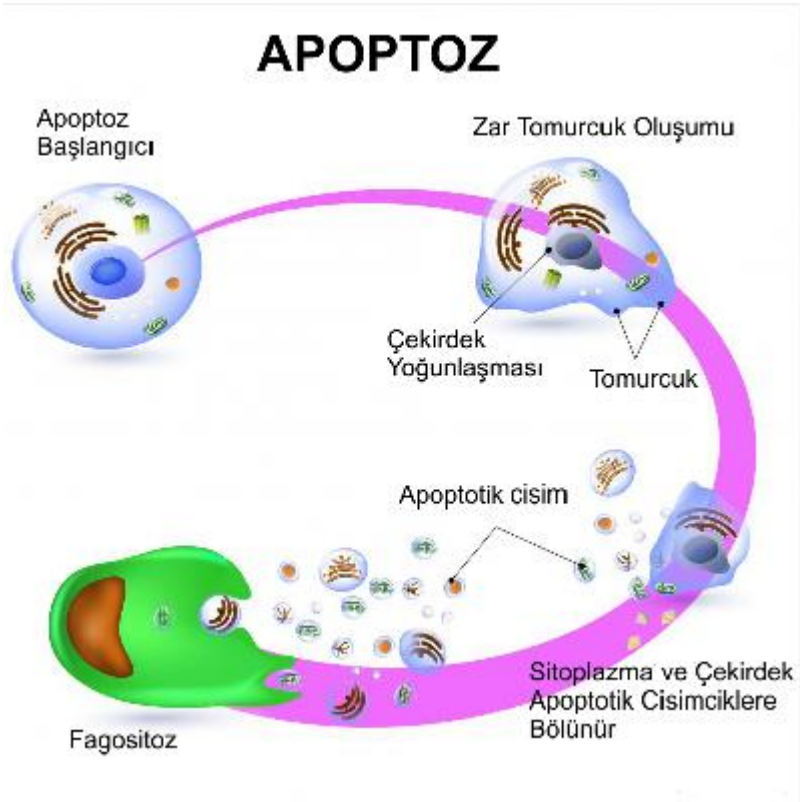
Kolon, gastrik, prostat ve yumurtalık kanser dokularında miR-25'in ifade edildiği, hücre proliferasyonuna, apoptozise ve migrasyona katıldığına ve prognoz ile yakından ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır (Leite vd., 2011; Zhng vd., 2012; Li vd., 2013; Marchi vd., 2013).

1.4. Apoptoz

Apoptoz, anormal hücrelerin bir organizmadan uzaklaştırıldığı, genetik olarak düzenlenmiş bir hücre ölüm şekli olup, çok hücreli organizmaların normal gelişimini ve doku homeostazını sağlar (Reed, 2003). Apoptotik hücre ölümüne, kompleks biyokimyasal olaylar serisi ve kesin morfolojik değişiklikler eşlik eder. Bunlar; hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması, zar tomurcuklanması ve zara bağlı apoptotik cisimlerin ortaya çıkışıdır (Wylli vd., 1981) (Şekil 1.4).

Apoptoz sürecinde Bax yolağı ve Fas yolağı olarak birbiriyle ilişkili iki yolak etkindir; İki yolağında son noktası kaspazların aktivasyonudur. APO-1 veya CD95 olarak da bilinen Fas tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesine üye olan bir hücre zar proteinidir. Fas yolağında parakrin ya da otokrin olarak üretilen bir fas ligandı fas reseptörüne bağlanır ve bu reseptörün hücre içi ölüm bölümü daha sonra kaspaz 8'i aktive edecek olan adaptör proteinlerin eşleşmesini yapar. Kaspaz 8 hücre yıkımını başlatmak için diğer kaspazları aktifleştirir. Bax yolağında ise bax kanal proteini mitokondri zarına bir kaspaz aktivatörü olan sitokrom c kaçacağını kolaylaştırmak için girer ve süreç diğer kaspazların aktivasyonu ile hücre yıkımına kadar ilerler. Kaspazlar iki DNA tamir enzimini; poli-ADP-riboz polimeraz ve DNA

protein kinaz'ı yıkar ve kromatinde sınırlanamayan kırılmalar oluşur (Golias vd., 2004; Kierszenbaum ve Tres, 2006; Aktuğ vd., 2014).



Şekil 1.4 Apoptoz (<http://www.wisegeek.org/what-is-apoptosis.htm#>)

1.4.1. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

- ☐ Işık mikroskobu (Hematoksilen, Giemsa boyama)
- ☐ Floresan mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop (Propidium İyodür, Hoechst Boyası)
- ☐ Elektron mikroskobu
- ☐ Faz Kontrast mikroskobu

İmmünohistokimyasal Yöntemler

- ☐ Anneksin V yöntemi
- ☐ TUNEL yöntemi
- ☐ M30 yöntemi
- ☐ Kaspaz-3 yöntemi

Biyokimyasal Yöntemler

- ☐ Agaroz jel elektroforezi (DNA Fragmentasyonu)
- ☐ Western Blotlama (Substrat kırılmaları, aktif kaspazın belirlenmesi, sitokrom-c salınması)
- ☐ Flow (Akış) sitometrisi

İmmunolojik Yöntemler

- ☐ ELISA (DNA fragmentasyonu, M30 düzeyi)
- ☐ Florimetrik Yöntem (Kaspaz aktivasyonu)

Moleküler Biyoloji Yöntemleri

- ☐ DNA çipleri (Coşkun ve Özgür, 2011)

1.4.1.1. HO/PI Boyama

Canlı, nekrotik ve apoptotik tüm hücrelerin ayrımını yapabilmek için kullanılan floresan mikroskopi yönteminde, floresan boyaların (Hoechst boyası, Propidium İyodür, DAPI vb.) DNA'ya bağlanması sayesinde hücre çekirdeği görünür hale gelir ve böylece canlı, nekrotik ve apoptotik hücre ayrımı yapılır. Hoechst ile canlı veya apoptoza uğrayan tüm hücreleri boyarken, propidium iyodür ile sadece apoptotik hücreler boyanabilmektedir. Boyanan hücreler sayesinde, hücrelerin apoptoza uğradığı veya canlı olduğu belirlenmektedir (Güleş ve Eren., 2008).

1.5. Hücre Proliferasyonu – MTT

Hücrelerin proliferasyonu veya çoğalması hücre bölünmesi üzerinden gerçekleşmektedir. Hücre proliferasyon ölçüm testlerinde, floresan veya radyoaktif ışığa gösteren nükleotid analoglarının yeni sentezlenen DNA zincirine eklenme hızının izlenmesi, bölünme döngüsüne giren hücrelerde metabolik aktivitelerinde görülen artışın ölçülmesi, proliferasyon hücre çekirdek antijeni gibi hücre döngüsü ile ilgili faktörlerin hücre içindeki miktarlarındaki değişiklikler ve hücre bölünmesi için kullanılan ATP miktarının ölçümü kullanılmaktadır (Marcussen ve Larsen, 1996; Rode., 2008). Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı proliferasyon testlerinden biri olan MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) yönteminde, sarı renkli tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Bu yöntemde, proliferasyona uğrayan hücrelerde artan dehidrojenaz enzim aktivitesi tetrazolyumu kullanarak formazana (mor) dönüştürür daha sonra formazan DMSO ile çözünür hale getirilerek absorbans değeri spektrofotometrede ölçülür. Hücre proliferasyonu ile oluşan formazan kristalleri arasında doğru bir orantı bulunmaktadır ve dolayısıyla da ölçülen absorbans miktarıda bu orana göre artmakta ya da azalmaktadır (Terzioğlu vd., 2013).

1.6. Hücre Döngüsü

İki hücre ortaya çıkarmak üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasındaki aralık hücre döngüsü olarak tanımlanır. Hücre döngüsü, geleneksel olarak iki aşamaya ayrılır; 1-İnterfaz ve 2-Mitoz (M fazı olarak da bilinir). İnterfazın en belirgin olayı çekirdekte S fazında gerçekleşen replikasyondur ve DNA iki katına çıkar. S fazı, G1 fazı adı verilen bir evrenin ardından gelir. Mitozdan önce G2 evresi gelir ki, burada hücre, mitozla başlamadan önce DNA miktarının iki katına çıkarıldığından

emin olmak ister. G1 ve G2 fazlarının diğeri bir önemi de mitoz öncesi ve sonrası hücreye büyümek için zaman kazandırmalarıdır. Hücre bölünmesine hazırlık aşamasında hücre kütlesinin iki katına çıkarılması için hücrenin büyümesi gerekir. G1 aşamasındaki hücreler ya DNA çoğalması için S fazına girerler ya da girmezler. Eğer bir hücre S fazına girmezse G0 (G sıfır) fazı denen ve tekrar hücre döngüsüne dönmeyen önce günlerce, aylarca, hatta yıllarca kalacağı bir dinlenme dönemine girer. Hücrelerin, hücre döngüsünün değişik evrelerinden sistemli bir şekilde geçmeleri siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve onların inhibitörleri tarafından denetlenir. CDKlar (siklin bağımlı kinazlar) hücre döngüsünün bir sonraki evresine geçebilmesi için gerekli olan kritik hedef proteinleri fosforile ederek bu döngünün devamını sağlarlar. Hücre döngüsü esnasında devamlı ifade edilirler fakat inaktif formlarında ‘Siklin’ adındaki protein ailesine bağlanarak fosforile olurlar ve aktif hale gelirler (Sherr, 2000; Senderowicz ve Sausville, 2000; Joyce vd., 2001; Golias vd., 2004).

1.6.1. Siklinler

Siklinler; CDK’lardan farklı olarak, hücre döngüsünün belirli evrelerinde sentez edilirler. Fonksiyonları CDK’ları aktive etmektir. Fonksiyonlarını yerine getirdikten sonra siklin düzeyi hızla düşmektedir. On beşten fazla siklin tanımlanmıştır; hücre döngüsünde sırasıyla siklin D, E, A, ve B ortaya çıkıp, bir veya birden fazla CDK’a bağlanırlar. Siklin D; hücre döngüsünde düzeyi ilk artan siklindir. G1’in ortasında ortaya çıkar ve S evresinde yok olur 3 formu bulunur: D1, D2 ve D3.

Siklin D, hücre döngüsünün G1 evresinde CDK4’e bağlanarak onu aktive ederek siklin D-CDK4 kompleksini şekillendirir. Bu kompleksin hücre döngüsünde kritik bir rolü bulunur; retinoblastoma proteinini (Rb) fosforiller. Rb’nin fosforilasyonu, hücre döngüsü için moleküler bir anahtar gibi fonksiyon görür. Rb hipofosforile formunda transkripsiyon faktörü E2F ile sıkı bir kompleks oluşturarak hücrelerin replikasyonunu engeller. Rb’nin fosforilasyonu ise kompleksin ayrılmasına ve E2F üzerindeki transkripsiyon aktivite engelini ortadan kalkmasına neden olur.

Siklin E iki izoformu bulunur; E1 ve E2; S-evresinde CDK2 ile aktif bir kompleks oluşturur. Bazı fonksiyonları siklin E-CDK1 kompleksi tarafından üstlenilebilmektedir. Her iki siklin E izoformunun eksikliğinde dinlenen hücreler hücre döngüsüne geçemezler. Siklin E-CDK2; hücre döngüsünün S

evresine ilerleyebilmesi ve DNA replikasyonunun başlayabilmesi için siklin E ve CDK2 arasında aktif bir kompleksin oluşması gerekir. Bunun için aktif E2F'ye ihtiyaç vardır. Aktif E2F, siklin E'nin ve DNA replikasyonu için gerekli polimerazın transkripsiyonunu artırır; DNA sentezi uyarılır. Hücre döngüsündeki bir sonraki karar verme noktası G2/M geçiştir. Bu geçiş, E2F'nin transkribe ettiği siklin A ve onun oluşturduğu siklin A-CDK2 kompleksi tarafından sağlanır. Bu kompleks mitotik profazdaki olayları düzenler. Profazın ötesine geçiş sağlayan en önemli aracı siklin B-CDK1 kompleksidir. Siklin B-CDK1 kompleksi bir protein fosfataz (Cdc 25) tarafından aktive edilir. Aktive edildikten sonra erken profaz evresinde çekirdek içinde birikmeye başlar. Siklin B-CDK1 aktivasyonu çekirdek zarının çözülmesine neden olur ve mitozu başlatır (Dulic vd., 1992; Senderowicz, 2000; Joyce vd., 2001; DiPaola, 2002; Gutierrez vd., 2002; Alberts ve Bray, 2004; Golias, 2004; Kierszenbaum, 2006).

1.7. RT-PCR (Real Time-PCR, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Real-time PCR yöntemi çeşitli amaçlarla nükleik asitlerin kalitatif veya kantitatif olarak saptanabilmesi amacıyla kullanılabilmektedir. Real-time PCR yöntemini, daha önceden geliştirilmiş olan standart PCR yönteminden ayıran iki önemli özellik vardır: Birincisi, real-time-PCR yönteminde termal döngü cihazıyla birleştirilmiş bir optik okuma sisteminin kullanılmasıdır. İkincisi ise, PCR işlemi sırasında amplifikasyonu bilgisayar ekranına yansıtacak bir probun veya problemlerin bulunması gereğidir. Bu nedenle özellikle uygun prob seçimi, RT-PCR işleminin verimliliğini etkileyen en önemli basamaklardan biridir. Probun işlevi, cihaz içerisinde gerçekleştirilmiş olan çoğaltma işleminin, gözle görülür hale getirilmesidir. Problemler, floresan denem ve belirli dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında floresan ışımaya yayabilme özelliğine sahip sentetik oligonükleotidlerdir. Genel olarak bakıldığında prob dizileri, PCR tüpü içerisinde çoğaltma işlemi gerçekleşirken, çoğaltılmış olan hedef cDNA zincirlerine bağlanarak floresan ışımaya oluşmasına neden olurlar. Prob, tek zincirli hedef DNA üzerinde komplementer olduğu bölgeye bağlandıktan sonra, real-time PCR cihazının ışık kaynağı, PCR tüpü içine uyarıcı kısa dalga boylu ışık gönderir. Kısa dalga boylu ışığın absorpsiyonu sonrasında, uzun dalga boylu ışık salınımı oluşur. Böylece gerçekleşen floresan ışımaya, cihaz tarafından algılanır. PCR tüpü içerisinde ne kadar çok hedef DNA varsa o kadar çok prob bağlanacak ve floresan ışımaya miktarı da o derecede fazla olacaktır. Real-time PCR işlemi ile çoğaltılmış olan hedef dizilerin görüntülenebilmesi amacıyla kullanılan çeşitli

problar mevcuttur. Buradaki temel amaç, çoğaltılmış olan PCR ürünleriyle, kullanılan probun etkileşime girmesinin sağlanmasıdır. Bunun sonucunda hedef cDNA'ya floresan veren boyaların bağlanmasıyla DNA kantitasyonu mümkün olabilmektedir. Real-time PCR yönteminde floresan kimyası, iki sınıf altında incelenebilir: Jenerik (genel) yöntemler ve zincire özgül yöntemler. Jenerik yöntemlerde cDNA'ya özgül olmadan bağlanan problar kullanılır. Bir başka deyişle bu yöntemde kullanılan problar PCR tüpü içerisindeki her çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan oluşmasına neden olurlar. Zincire özgül yöntemlerde kullanılan problar ise, primer bağlanma bölgeleri arasındaki hedef cDNA'nın komplementer bir bölgesine bağlanarak floresan ışımaya neden olurlar. Bu yöntemlerin avantajı, primer-dimer bağlanması gibi özgül olmayan çoğaltma ürünlerinin floresan ışımayla sonuçlanmamasıdır. Bu nedenle özgüllükleri daha yüksektir ve daha iyi sinyal oluşumu sağlarlar.

cDNA'ya özgül olmadan bağlanan özel boyalar prob görevi görürler. Bu amaçla en sık kullanılan boya molekülleri "SYBR Green I" ve "SYBR Gold"dur. Bu boyaların çift zincirli DNA arasına girerek bağlanması sonucunda 20-100 katlık bir floresan ışıma artışı olur ve bu ışıma real-time PCR cihazı tarafından algılanır. Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef cDNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle cDNA'ya bağlanan "SYBR green" miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarında artış gözlenir. Floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısına, Ct (eşik döngüsü) adı verilmektedir. Bu değer, orijinal şablondaki başlangıç kopya sayısını temsil eder ve deney sonuçları hesaplamak için kullanılır (Heid vd., 1996). Ancak floresan artışı her zaman özgül amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü ortamda hedef cDNA bulunmadığı durumlarda "SYBR green", primerlerin kendi aralarında gerçekleşebilecek bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda bu yapılara katılarak floresan oluşumuna neden olabilmektedir. Böyle durumlarda elde edilen floresan ışımının istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile gerçekleştiği, yoksa primer dimer oluşumu ile ortaya çıkmış özgül olmayan bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılır. Her çift sarmal cDNA kendine özgü "melting temperature, Tm" (çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PCR amplifikasyonu sonrasında sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresan miktarı kaydedilir. Çift sarmal

cDNA zincirleri birbirlerinden ayrılmaya başlayınca “SYBR green” boyası serbest kalır ve floresan miktarı azalmaya başlar (Alp, 2012).

1.8. Western Blot

Western blot yöntemi, moleküler biyolojide, bir protein solüsyonunda, aranan bir proteinin olup olmadığını ve varsa ne kadar olduğunu anlamak için kullanılan bir yöntemdir. 4 aşamadan oluşmaktadır öncelikle, hücre veya doku lizati elde edilir, bir membrana aktarılır, birinci ve ikinci antikor kullanılarak hedef protein işaretlenir ve uygun ortamda görüntüleme işlemi yapılır (Mahmood ve Yang, 2012). Hücre veya doku örneğinden lizatlar elde edilerek hazırlanan SDS-PAGE jel elektroforezinde yürütülür. SDS (sodyum dodesul sülfat) oligomerik proteinleri alt birimlerine ayıran bir deterjandır. Bu deterjan polipeptidlere bağlanarak bir kompleks oluşturur ve bu oluşan kompleks polipeptidlerin negatif yüklü kalmalarını sağlarken, PAGE (poliakrilamid jel elektroforez), elektriksel çekim kuvveti kullanılarak proteinleri boyutlarına göre ayırmak için kullanılan ortamdır. Eksi yüke sahip proteinler elektrik akımı ile jelde molekül büyüklüklerine göre ayrılır. Jel üzerindeki proteinler ıslak sistem, yarı kuru sistem ve kuru sistem olmak üzere üç farklı yöntemle membrana aktarılır. Kullanılan membran genellikle nitroselüloz veya poli-viniliden florür (PVDF) yapıdadır. Anlamlı bir sonuç elde etmek için, antikorlar membranda yalnızca ilgilen proteinlere bağlanmalıdır. Antikorların özgün olmayan bağlanmalarını azaltmak için etkileşimsiz protein ya da iyonik olmayan deterjanlar kullanılarak membranın boş kısımları bloklanır. Bloklama ajanının membrana antikordan daha yüksek afinite göstermesi gereklidir. En yaygın kullanılan bloklama ajanları sığır serum albumin (BSA, %0.2-5), yağ içermeyen süt tozu, kazein, jelatin ve Tween 20'nin seyreltilmiş solüsyonlarıdır. Bloklamadan sonra ilgilenilen proteine özgü primer antikor ile membran inkübe edilir. Bağlanmayan primer antikor yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra konjuge enzim ya da boya içeren sekonder antikor ile membran inkübe edilerek, primer antikora bağlı sekonder antikor kompleksi oluşturulur. Ortamda bağlanmadan kalan ve yüksek oranda özgül olmayan sinyal veya düşük oranda özgül sinyal verilmesine neden olan antikorların ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla TBS-Tween 20 (TBST) ya da PBS-Tween 20 (PBST) solüsyonları kullanılır. Membran üzerinde özgül bağlamaları tespit etmek için sekonder antikora konjuge enzimle (horseradish peroksidaz ya da alkalin fosfat) reaksiyona giren bir substrat sinyal oluşturur ve böylece membran üzerinde bantların görünürlüğü sağlanmaktadır (Karaaslan, 2008).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son yıllarda bitkilerden elde edilen bileşiklerin kanser hücreleri üzerine etkisinin araştırılması sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Örneğin, Taxol/Paclitaxel meme kanseri başta olmak üzere birçok kanser türlerinde kullanılan (*Taxus brevifolia*) bitkisinden elde edilen bir kimyasaldır. Vinblastine ise 1950’li yıllarda keşfedilmiş ve birçok formdaki lösemi tedavisinde kullanılmış ilk ilaçtır. *Camptotheca acuminata* ağacından sentezlenen bir kimyasal olan Topotecan, alkaloidinin bir analogudur yumurtalık ve akciğer kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Epipodofilotoksin’in yarı sentetik bir türevi olan etoposide *Podophyllum peltatum* bitkisinden elde edilmiştir (Kong vd., 2003). Ravent (*Polygonum cuspidatum*) bitkisinde bulunan bir bileşik olan emodin, birçok proliferatif hastalığın tedavisinde kullanıldığı gibi, aynı zamanda anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-ülserojenik, anti-enflamatuvar ve immün baskılayıcı özelliklere sahiptir (Srivinas vd., 2003).

Lu ve arkadaşları (2008), emodinin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) reseptör sinyalini engelleyerek kanser hücre büyümesini inhibe ettiğini ve emodinin kolon kanseri anjiyogenezisinde potansiyel bir inhibitör olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

In vitro çalışmalar boyunca emodin ile indüklenen LS1034 kolon kanseri hücrelerinde, hücre morfolojik değişikliklere, canlılık yüzdesinde artışa, G2/M fazında tutulmaya ve mitokondriyal zar potansiyel kaybına neden olmuştur. LS1034 hücrelerine emodin uygulandığında kaspaz-9, sitokrom-c ve Bax/Bcl2 protein seviyesi artmıştır. Çalışmalar, LS1034 kolon kanseri hücrelerinde emodinin ROS ve Ca^{+2} salınımını indüklediğini, anti ve pro-apoptotik protein düzeylerini değiştirdiğini, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna, kaspaz-9 ve kaspaz-3’ün aktivasyonuna yol açtığını ve bunun da apoptoza neden olduğunu belirtmektedir. *In vivo* çalışmalarda, LS1034 hücrelerinde emodin etkin bir şekilde tümör büyümesini baskıladığı, fakat *in vitro* çalışma gibi mitokondriyal fonksiyon bozukluğu yoluyla tümör inhibisyonuna neden olup olmadığı belirlenememiştir (Ma vd., 2012).

Han ve arkadaşları (2012), emodinin kolon kanser hücre hattı DLD-1’de PRL-3’ün fosfatase aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği PRL-3 ile indüklenen tümör hücrelerini ve metastazını doza bağlı olacak şekilde bloke ettiğini bulmuştur.

Bir başka çalışmada, HCT116 kolon kanseri hücrelerinde emodin ile indüklenen apoptozda reaktif oksijen türlerinin rolü ve sinyal yolağı üzerine etkileri araştırılmıştır. HCT116 hücrelerinde emodinin, mitokondriyal apoptozisi başlattığı görülmüştür. Emodin oksidatif strese yanıt olarak ROS'u arttırdığı ve p53'ün aşırı ifadesini tetiklediği görülmüştür (Xie vd., 2014).

Emodinin insan karaciğer kanser hücre hattı HepG2'de apoptozu indüklediği ve G1 fazında hücreleri tuttuğu gözlenmiştir. Emodin uygulaması sonucunda HepG2 hücrelerinde Bax protein seviyesinde herhangi bir değişiklik görülmezken apoptoz üzerinde ki Bcl-2 etkileri azalmış, p53 ifadesi artmıştır (Yu vd., 2013).

Lin ve arkadaşlarının (2012) yapmış olduğu çalışmada, emodinin pankreas kanser hücrelerinin büyümesini ve anjiyogenezisini olası bir NF- κ B (nükleer faktör kappa B) tutulum mekanizması ile inhibe edip etmediği amaçlanmıştır. Emodin uygulaması sonucunda pankreas kanser hücrelerinin bir primidin analogu olan gemsitabinle indüklenen büyümesinin engellediği ve apoptozisi arttırdığı bulunmuştur.

Guo ve arkadaşlarının (2013) yapmış olduğu bir başka çalışmada, antikanser etki gösteren curcimin ile emodin ikilisinin, meme kanser hücrelerinde proliferasyonu, apoptozu ve invazyonu benzer olarak inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca, miR-34a'nın bu ikili tarafından ifadesinin arttığı görülmüştür.

Emodinin insan rahim ağzı kanseri HeLa hücre hattının apoptoz üzerinde ki etkisini araştırmak ve ilgili mekanizmaları tanımlamak için Yaoxian ve arkadaşları tarafından (2013) yılında bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda emodinin dahili mitokondriyal ve harici ölüm reseptörü yoluyla apoptozu indükleyerek HeLa hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür.

2013 yılında yapılan çalışmada, *survivin* hedefli shRNA (small hairpinRNA) ve emodin ikilisinin etkisi, yumurtalık kanserine karşı araştırılmıştır ve bu ikili kombinasyonun uygulamasının, hücre proliferasyonunu ve invazyonunu azaltarak apoptozu indüklediği, in vitro olarak büyük antitümör etkiye yol açtığı bulunmuştur (Xue vd., 2013)

Emodinin, akciğer hastalıkları tedavisi ile ilgili olarak, farelerde bleomisine bağlı fibrozis gelişimine karşı koruyucu bir etkisi olduğu ve akciğer kanserine karşı potansiyel bir ilaç olabileceği saptanmıştır (Chen vd., 2009 ve Shrimali vd., 2013).

Emodin, baş ve omuz skuamoz hücreli karsinoma hücrelerinde TWIST1 ifadesini direkt olarak baskılamış, E-cadherin mRNA ve protein ifadesini düşürmüş, vimentin mRNA ve protein ifadesini arttırmıştır. Ayrıca emodin, E-cadherin promotoruna TWIST1 bağlanmasını inhibe ederek, E-cadherin transkripsiyon aktivitesini bastırdığı görülmüştür. Emodin, β -katenin ve Akt yollarını inhibe ederek TWIST1 kaynaklı epitel mekanizmal geçişi (EMT) baskılamıştır. Ayrıca emodin *in vivo* ortamda da TWIST1 kaynaklı invazyonu önemli ölçüde durdurmuştur (Way vd., 2014)

Bcl-2 ailesinin pro ve anti apoptotik üyelerinin karşıt faaliyetleri mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol eder. Pro-apoptotik sinyal dengesinin bozulması, mitokondriyal intermembran boşluğa ait sitokrom c'nin salınmasına ve daha sonra kaspaz-9'a bağımlı apoptotik yolağın aktivasyonuna neden olur (Qiao vd.,2009). MikroRNA düzensizliği, kolon kanserinde Bcl-2 ailesi üyelerinin ifadesini değiştirerek apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Kolon kanseri dokularında miR-195 ifadesi düşmüştür. miR-195 anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2'yi hedefler ve kolorektal kanser hücre hatları olan HT-29 ve LoVo'da apoptozu indükler (Liu vd., 2010).

Çalışmalar, kanserlerde miRNA'ların potansiyel rollerine dikkat çekmiştir ve miRNA'ların anormal bir şekilde ifadesi kanser kaynaklı genleri ve kanser patogenezinde rol alan yolları düzenleyerek tümörün oluşması ve ilerlemesi ile ilişkili olabileceğini öngörmüştür.

Zhang ve arkadaşları (2012) hem yumurtalık kanseri klinik örnekleri hem de hücre hattı ile çalışarak miR-25 ifadesine bakmışlar ve miR-25 ifadesinin oldukça yüksek olduğunu görmüşlerdir. MikroRNA-25'in aşırı ifadesi proliferasyonu arttırmıştır. Susturma ile miR-25 ifadesini düşürmüş ve böylece önemli ölçüde apoptozu arttırmışlardır. Bu sonuçlar, miR-25'in yumurtalık kanserinde proliferasyonun ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu ortaya koymuştur.

Kromozom X üzerinde yer alan bir gen kümesinden türemiş miR-221, hücre çoğalma döngüsünü düzenleyerek tümör gelişiminde rol oynamaktadır (Zhou vd., 2012). Xue ve arkadaşları (2013), miR-221'in kolorektal kanser hücrelerinin radyasyona duyarlılığı ve altta yatan mekanizmalar üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Pre-miR-221'in kolorektal kanser hücrelerine transfeksiyonu

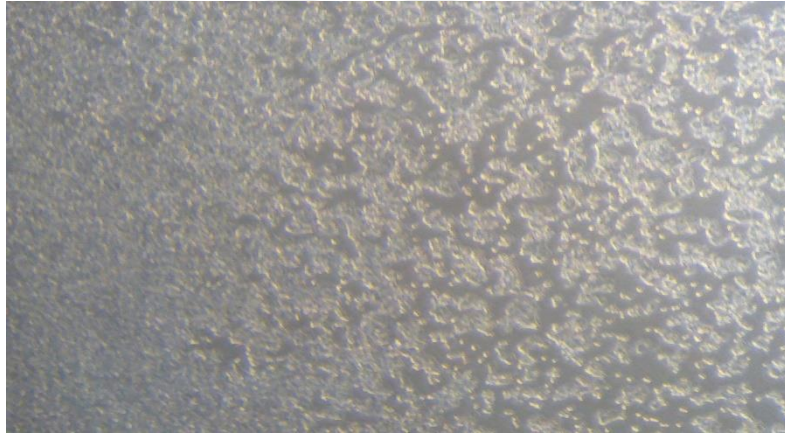
sonrası miR-221'in ifadesinde artış görülürken, miR-221'in susturulması sonrasında gen ifadesinde düşüş olduğu görülmüştür.

Zhau ve arkadaşları (2014), kolorektal kanserli doku ve hücrelerde ANGPTL2 (Angioprotein- like protein 2)'nin ifade düzeyine bakmışlar ve yüksek oranda ifade edildiğini ve kanserin metastatik ilerlemesi ile aşamalı olarak arttığını göstermişlerdir. Kolorektal hücresi olan SW620 ve HCT-116 hücrelerinin invazyon ve migrasyonunda ANGPTL2 ve miR-25'in rolleri, transwell deneyleri ve yara analizleri kullanarak araştırmışlardır. ANGPTL2 siRNA, SW620 ve HCT-116 hücrelerine transfer edilmiş ve ifade düzeyinin hem mRNA hem de protein seviyesinde önemli ölçüde düştüğü görülmüştür. ANGPTL2'nin ifadesinin düşmesi, kolorektal kanser hücrelerinin istilasını ve metastazını bastırmıştır. MiR-25'in kolorektal kanserde biyolojik rollerini doğrulamak için pre-miR-25 ve anti-miR-25 SW620 ve HCT-116 hücrelerine transfekte edilmiştir. Pre-miR-25 indüksiyonu hücrelerde miR-25 ifadesini önemli ölçüde artırarak koloni oluşumu ve metastazı önemli ölçüde azaltırken, miR-25'in susturulmasıyla ifade düzeyi önemli derecede azaldığı ve koloni oluşumu ve metastazı önemli derecede arttırdığı görülmüştür. miR-25'in düşük ifadesi ile ANGPTL2'nin yüksek ifadesinin bir arada bulunması karşılıklı bir potansiyel düzenleyici korelasyona işaret ettiğini görmüşlerdir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Yapılan bu çalışmada 44 yaşındaki kadın kolorektal adenokarsinoma hastasından eksplant kültür yöntemiyle alınan HT-29 hücre hattı (Şekil 3.1) Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü Hücre Bankası Hücre kültür koleksiyonundan (HÜKÜK) temin edilmiştir. HT-29 (ATCC® HTB-38TM) hücreleri, %10 Fötal Sığır Serum (FBS), %10 Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep), 0.1 mM esansiyel olmayan amino asit içeren RPMI-1640 besi yeri içerisinde büyütülmüştür. Hücreler temel hücre kültür yöntemleri kullanılarak çoğaltılmış, pasajlanmış ve stoğa kaldırılmıştır. Stok olarak hazırlanan hücreler sıvı azot içinde saklanmıştır.



Şekil 3.1 HT-29 hücre hattı mikroskop görüntüsü (10X)

3.1.1. Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı azot içerisinde saklama tüplerinde bulunan HT-29 hücreleri sıvı azot içerisinden çıkartılıp alkollenip biyolojik güvenlik kabini (Nuve) içerisine alınmıştır. Tüplerin kapağı hafifçe açılarak havası çıkartılmıştır. Hücreler hızlı bir şekilde içerisinde 37°C’de su bulunan beherde çözündürülüp 15 ml’lik santrifüj tüpü içerisine alınarak üzerine 4 ml besi yeri eklenmiştir ve 800 rpm’de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak üzerine 2 ml 1X PBS eklenmiş hücreler homojenize hale getirilerek tekrar 800 rpm de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Süre sonunda süpernatant dikkatli bir

şekilde pipetle uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine oda sıcaklığında bulunan besi yerinden 5 ml eklenerek 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücre kültür kapları 37°C, %5 CO₂ içeren büyüme ortamında (Nuair DH Autoflow NU-5500) inkübasyona bırakılmıştır.

3.1.2. Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması

İnkübasyona bırakılan hücrelerin iki günde bir olacak şekilde besi yerleri değiştirilmiştir. Besi yeri değiştirirken öncelikle kültür kabı içerisinde bulunan besi yeri uzaklaştırılmıştır. 25 cm²'lik hücre kültür kabı içerisine 1 ml, 75 cm²'lik hücre kültür kabı içerisine 3 ml 1X PBS eklenerek hücreler yıkanmış, 1X PBS pipetle ortamdan uzaklaştırılarak 25 cm²'lik hücre kabına 5 ml, 75 cm²'lik hücre kabına 13 ml taze besi yeri eklenerek inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler, hücre kültür kaplarının yüzeyini kapladıktan sonra pasajlanmıştır. Hücreler iki kez 1X PBS ile yıkanmış ve PBS ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin hücre kültür kabının yüzeyinden kalkması için 25 cm²'lik kültür kabı için 1ml, 75 cm²'lik kültür kabına 2 ml Tripsin-EDTA eklenmiştir ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatör içerisinde 5 dk inkübasyon bırakılmıştır. Süre sonunda hücre kültür kaplarının içerisine Tripsin-EDTA'nın beş katı olacak şekilde taze besi yeri eklenerek 15 ml'lik santrifüj tüplerinin içerisine alınarak 800 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant pipetle uzaklaştırılarak pelet üzerine taze besi yeri eklenip yeni hücre kültür kaplarına aktararak inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler deneylerde kullanılmak üzere çoğaltılmıştır.

3.1.3. Hücrelerin Thoma Lamı'nda Sayımı

Hücreler 3.1.2 de anlatıldığı gibi kültür kaplarından kaldırılmıştır ve hücre peleti yoğunluğuna göre 5 ml ile 10 ml arasında taze besi yerinde çözülmüştür. Hücreler Triphan blue içerisinde 1:5 oranında seyreltilerek Thoma Lamı'na yayılmış ve sayımı yapılmıştır.

3.1.4. Hücrelere Uygulanacak Emodin'in Hazırlanışı ve Uygulanması

Çalışmada kullanılan emodin (Sigma-Aldrich, Almanya) toz halde temin edilmiştir. Emodin çözeltisi hazırlanırken çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. Emodin stok çözeltisi konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde hazırlanmış ve besi yeri ile seyreltilerek belirlenen dozlarda kullanılmıştır. Stok emodin çözeltisi -20°C'de saklanmıştır.

3.2. MTT Proliferasyon Testi

3.2.1. Hücrelerin Plakalara Ekimi

Çalışma, 48 kuyucuklu plakalarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Her bir kuyucukta 400 µl besi yeri içerisinde 10.000 hücre olacak şekilde hücreler, 3.1.3’de anlatıldığı gibi sayılarak ekim yapılmıştır ve gece boyu etüvde inkübasyona bırakılmıştır (Plakalara uygulama ve kontrol grubu haricinde bir de blank grubu olacak şekilde ekim yapılmıştır). Emodin çalışmada belirlenen konsantrasyonlarda hücrelere uygulanmıştır.

3.2.2. MTT Proliferasyon Testi

Plakalara ekim yapılan hücreler bir gece inkübasyona bırakılmış ve ertesi günü bir blank, iki kontrol, yedi deney grubu olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Emodinin 1 ve 100 µM arasındaki konsantrasyonlarda uygulamaları yapılmıştır. Emodin uygulaması için seçilen konsantrasyonlar 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM dır. Kontrol gruplarından birincisine hiçbir madde uygulaması yapılmazken, ikinci kontrol grubuna emodin’in çözülmesinde kullanılan DMSO’dan, en yüksek emodin dozuyla (80 µM) aynı miktarda eklenmiştir. Blank grubu, kuyucuk içerisinde sadece besiyeri vardır ve MTT ile reaksiyona girip girmediğini kontrol etmek için kullanılmıştır. Emodinin etkisi 24. ve 48. saatlerde gözlemlenmiştir.

24. ve 48. saatler sonunda, taze olarak hazırlanan MTT (Sigma-Aldrich, Almanya) 5mg/ml olacak şekilde tartılmıştır ve 1X PBS içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan MTT filtreden (0,22 µm) geçirilerek her bir kuyucuğa 40 µl eklenerek 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde her kuyucuktan hücrelere zarar vermeyecek şekilde pipetle besi yeri uzaklaştırılmış ve üzerlerine 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Plakalar 15 dk. etüvde bekletilerek formazon kristallerinin iyice çözülmesi sağlanmıştır (Şekil 3.2). Süre sonunda plakalar çoklu plaka okuyucu (Thermo Labsystem Multi-Scan Spectrum) ile test 560nm, referans 620nm dalga boyunda olacak şekilde tüm kuyucuklar için absorbans değerleri okunmuştur.



Şekil 3.2 Artan konsantrasyonlarda MTT uygulaması ve formozan kristallerinin DMSO eklendikten sonraki plaka görüntüsü

3.2.3. Elde Edilen Absorbans Değerlerinin Analizi

Elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak blank ortalamasından çıkartılmıştır ve formazan kristallerinden kaynaklanan asıl absorbans değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalarda kontrol grubu olarak DMSO kontrol verileri kullanılmıştır. DMSO kontrol absorbans ortalamaları, blank ortalamasından çıkartılmış 100 ile çarpılarak yüzde proliferasyon değeri hesaplanmıştır. Tüm uygulama yapılmış dozların ortalamasından blank ortalaması çıkartılmış 100 ile çarpılarak DMSO kontrol grubunun absorbans değerine bölünmüştür. Elde edilen veriler Windows Excel programına girilerek grafikler elde edilmiştir.

3.3. Muse™ Canlılık Testi

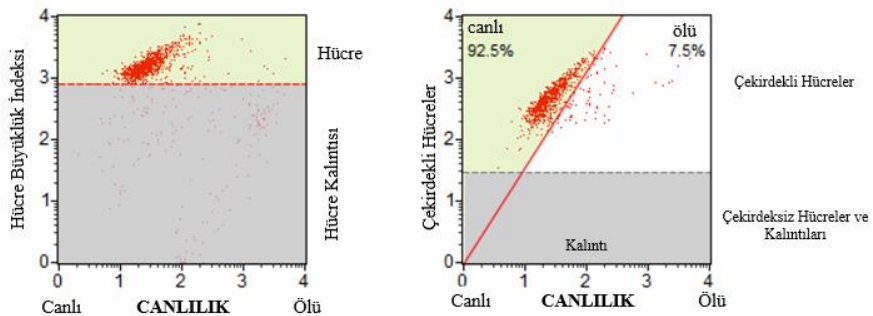
Çalışmada 6 kuyucuklu plakalarda 200.000 hücre olacak şekilde kısım 3.1.3 de anlatıldığı gibi sayım yapılarak ekim yapılmıştır. Uygulama dozu olarak MTT testinde çalışılan dozlar kullanılmıştır. Kontrol grubu blank olarak kullanılmıştır. Kısım 3.2.2 de emodin'in uygulanışında anlatıldığı gibi dozlar hazırlanmış plakalara ilave edilerek inkübasyona bırakılmıştır. 24. ve 48. saatler sonunda emodin'in etkisi gözlemlenmiştir.

24 saat sonunda plaka içerisindeki besi yerleri deney gruplarına göre hazırlanmış 15 ml'lik toplama tüplerinin içerisine konulmuştur. Kuyucuk içerisine 1ml 1X PBS eklenerek hücreler yıkanmış ve PBS pipetle dikkatlice çekilerek hücreler üzerinden uzaklaştırılmıştır. Hücreleri plaka içerisinden kaldırmak için herbir kuyucuğa 500µl

tripsin-EDTA eklenerek 5 dk 37°C’de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucuklara eklediğimiz tripsin-EDTA’nın 5 katı kadar besi yeri eklenerek kaldırılan hücreler toplama tüplerine aktarılmıştır. İçerisinde hücrelerin toplandığı 15 ml’lik toplama tüpleri 4°C’de, 800 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan üst faz dikkatlice uzaklaştırılmış ve pelet üzerine hücre yoğunluğuna göre yaklaşık 1 ml besi yeri eklenerek hücre resüspanse hale getirilmiştir. Aynı işlem 48. saat uygulaması için tekrarlanmıştır.

3.3.1. Muse™ ile ölçüm ve analiz

Hücre yoğunluğuna göre dilüsyon faktörü ve cihazın belirli sürede çekeceği hücre sayısı belirlenmiştir. Belirlenen dilüsyon faktörüne göre Muse™ sayım ve canlılık (EMD Millipore Corporation, Hayward, CA 94545) kiti ile hücreler seyreltilmiş 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 3 tekrarlı olacak şekilde cihazda ölçüm yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Muse™ canlılık testi uygulaması

Elde edilen verilerin ortalamaları alınmıştır. DMSO kontrol grubunun ortalama değerinden, blank grubunun ortalama değeri çıkartılmıştır. Elde edilen değer 100 ile çarpılarak bu farka ($\text{DMSO kontrol ort.} - \text{Blank ortalama}$) bölünmüştür. Diğer uygulama dozlarının ortalamasından da blank ortalaması çıkartılmış ve DMSO kontrol grubunun absorbands değerine bölünmüştür. Elde edilen veriler Windows Excel programına girilerek grafik elde edilmiştir. Hem 24 hem de 48 saat uygulamaları için hesaplamalar ayrı ayrı yapılmıştır.

3.4. Apoptozun Belirlenmesi

3.4.1. Apoptoz ve Nekroz Yöntemi

Hücrelerin canlılığında görülen azalmanın nedenini bulmak için apoptoz yöntemi kullanılmıştır. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi için Hoechst 33258/Propidium Iodide (HO/PI) yöntemi uygulanmıştır.

3.4.2. Hoechst 33258 / Propidium Iodide (HO/PI) boyalarının hazırlanışı

Hoechst 33258 10 mg/ml, Propidium Iodide 1 mg/ml olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hoechst 33258 stok çözeltisinden 100 µl alınarak 10 ml'ye tamamlanmıştır. Propidium Iodide stok çözeltisinden de 100 µl alınarak 100 ml'ye tamamlanmıştır. Her iki sulandırılan boya 1:1 oranında karanlık ortamda karıştırılarak hücrelere uygulanmaya hazır hale getirilmiştir.

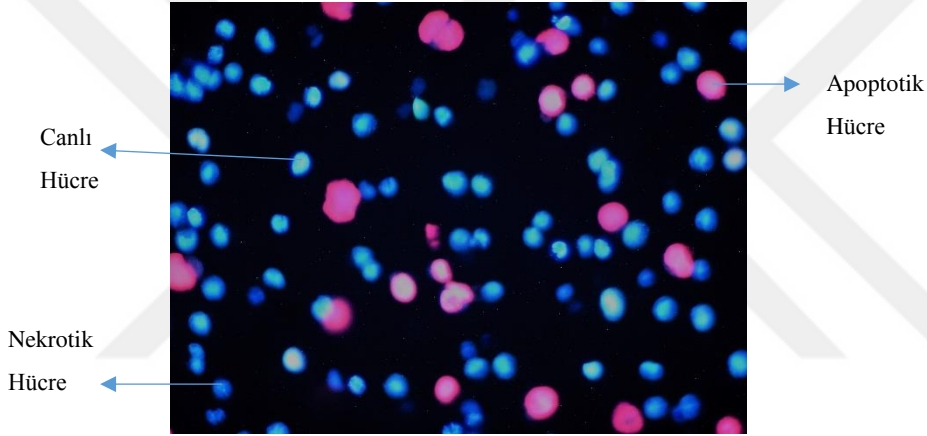
3.4.3. Hücrelerin Plakalara Ekimi ve Apoptozun Belirlenmesi

Hücreler her bir kuyucukta 70.000 hücre olacak şekilde sayılarak 48 kuyucuklu plakalara 2 kontrol, 6 uygulama grubu olmak üzere toplamda 24 kuyucuk içerisine ekilmiştir. Uygulama üç tekrarlı olarak, 24 ve 48 saatlik süreler için iki ayrı plaka içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin plakalara ekimi yapıldıktan sonra emodin uygulaması kısım 3.1.4'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. 24 ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılan plakalardan süre sonunda hücreler şu şekilde toplanmıştır: kuyucukların içerisinden besiyeri dikkatli bir şekilde pipetle uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 1X PBS eklenmiş ve hücreler yıkanmıştır. PBS ortamdan uzaklaştırılmış ve kuyucukların içerisine 100 µl Tripsin-EDTA eklenerek 5 dk etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde kuyucukların her birine 500 µl taze besi yeri eklenerek Eppendorf tüpler içerisine toplanarak 5 dk 800 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan üst faz pelete zarar vermeden dikkatlice ortamdan uzaklaştırılmıştır ve pelet üzerine 50 µl besi yeri eklenerek hücreler homojenize edilmiştir. Her bir eppendorf tüp içerisine kısım 3.4.2 de anlatılan HO/PI boya karışımından 5 µl eklenerek, 1 saat 37°C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

3.4.4. Boyanan Hücrelerin Mikroskop Altında Görüntülenmesi ve Analizi

24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonunda her örnekten 15 µl alınarak lam üzerine damlatılmış hücrelerin çökmesi için 1-2 dk beklenilmiştir ve floresan ışık mikroskop (Olympus BX51) altında DAPI filitresi ve UV ışığı ile hücreler gözlemlenerek fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflardaki canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler sayılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 HO/PI uygulaması yapılmış hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)

Sayımı yapılan hücrelerden, toplam canlı hücre sayısı 100 ile çarpılmış elde edilen sonuç toplam hücre sayısına bölünerek canlı hücre yüzdesi belirlenmiştir. Aynı hesaplamalar apoptotik ve nekrotik hücreler için de yapılarak hücre yüzdeleri bulunmuştur.

Elde edilen verilerin grafikleri GraphPad 5.0 programında çizilmiştir.

3.5. Muse™ ile Hücre Döngüsü Analizi

3.5.1. Hücrelerin Plakalara Ekimi ve Hücre Döngü Analizi

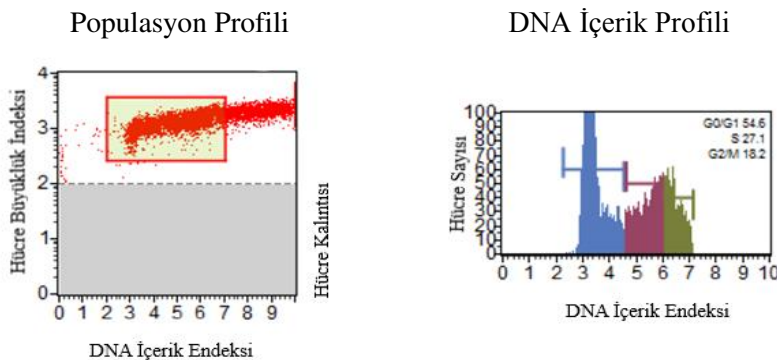
Hücreler 25 cm²'lik hücre kültür kaplarında 500.000 hücre olacak şekilde sayılarak ekilmiştir. 2 kontrol, 4 uygulama dozu olacak şekilde emodin uygulaması 24. ve 48. saatler için yapılmıştır.

24 saat sonunda hücreler önce kısım 3.1.2'de anlatıldığı gibi yüzeyden kaldırılarak hücre yoğunluğuna göre yaklaşık 1 ml 1X PBS içerisinde çözülmüştür. 300 xg'de 5

dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan üst faz dikkatli bir şekilde pipetle uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 1ml 1X PBS eklenerek tekrar 300 xg'de 5 dk santrifüj yapılarak 1,5 ml'lik Eppendorfların içerisinde yaklaşık 50 µl kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılmıştır ve hücre içinde kalan PBS ile resüspanse hale getirilmiştir. İçerisinde taze hazırlanmış 1 ml %70'lik soğuk etanol bulunan 1,5 ml'lik Eppendorflar düşük hızda vortekslenirken hücre süspansiyonu damla damla içlerine damlatılarak -20°C'de 3 saat bekletilmiştir. Süre sonunda oda sıcaklığında 300 xg'de 5 dk santrifüj yapılarak oluşan üst faz dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 250 µl 1X PBS eklenerek 300 xg'de 5 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda üst faz uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 200 µl Muse™ Hücre Döngüsü Reaktif (EMD Millipore Corporation, Hayward, CA 94545) kitinden eklenerek oda sıcaklığında 30 dk boyunca karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarılarak cihazda ölçüme hazırlanmıştır. Aynı işlemler 48 saat uygulaması için de tekrarlanmıştır.

3.5.2. Muse™ ile Hücre Döngüsü Analizi

Ölçüm cihazında (Muse™ hücre analiz cihazı), DNA içerik profili ve populasyon profili ayarlanarak hazırlanan hücrelerin her bir uygulama dozu 3 tekrarlı olacak şekilde ölçülmüştür (Şekil 3.5). Ölçüm verilerinin ortalamaları alınarak Windows Excel programında grafik haline getirilmiştir. Populasyon profili ayarlanırken öncelikle boyanmayan parçalanmış hücreleri dışarda bırakacak şekilde alan seçilip DNA içerik profili ayarlanır. Profildeki mavi renk G0/G1 fazını, mor renk S fazını ve yeşil renk G2/M fazında tutunan hücre miktarını göstermektedir.



Şekil 3.5 Muse™ hücre döngüsü analizi

3.6. RNA İzolasyonu

3.6.1. Hücrelerin RNA İzolasyonu İçin Plakalara Ekimi Ve Uygulama Yapılması

Hücreler altı kuyucuklu hücre ekim plakalarında 200.000 hücre olacak şekilde kısım 3.1.3’de anlatıldığı gibi sayılarak ekimi yapılmıştır. Hücrelere 2 kontrol ve belirlenen sitotoksik olmayan uygulama dozu (55 μ M) uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

3.6.2. TRizol® İle RNA İzolasyonu

İnkübasyon süreleri sonunda hücre ekim plakalarının içerisinde besiyeri dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak üzerlerine 500 μ l TRizol® reaktifi (Ambion) eklenmiş ve 2 ml’lik eppendorf tüpler içerisinde hücreler toplanmıştır. Eppendorf tüpler içerisinde homojenize edilerek hücre lizatları -80°C’ye kaldırılmıştır. Tüm uygulama saatleri toplandıktan sonra hücreler -80°C’den çıkartılarak oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Eppendorf içerisinde çözünen hücrelerin üzerlerine 100 μ l kloroform eklenip 15 sn tüpler alt-üst edilerek 2-3 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 12.000 xg’de 15 dk +4°C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı faz dikkatlice yeni bir eppendorf tüp içerisine alınmıştır. Üzerlerine 0,5 μ l glikojen (20 μ g/ μ l) ve 250 μ l isopropanol eklenerek karıştırılmış ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda oda sıcaklığında 12.000 xg’de 10 dk santrifüj yapılarak oluşan üst faz dikkatlice pipetle ortamdan uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 500 μ l %75’lik etanol (DEPcli su içinde, +4°C) eklenip kısa bir süre karıştırılarak 4°C de 7.500 xg’de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Oluşan üst faz pelete zarar vermeden dikkatlice ortamdan uzaklaştırılmış, eppendorf tüplerin ağzı açık kalacak şekilde 5-10 dk boyunca pelet kurumaya bırakılmıştır. Süre sonunda pelet üzerine yaklaşık 30 μ l RNaz-içermeyen steril distile su eklenerek 60°C’de 15 dk boyunca inkübasyona bırakılmış ve Nanodrop (ThermoFisher Scientific, USA) spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülerek -80°C’ye kaldırılmıştır.

3.7. cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA’lardan TaqMan™ Revers Transkripsiyon kiti (Applied Biosystems, 4304134) ile cDNA sentezlenmiştir. İzole edilen RNA miktarları

spektrofotometrede üç tekrarlı olacak şekilde ölçülerek ortalamaları alınmıştır. RNA miktarları 1 µg olacak şekilde hesaplanarak cDNA sentezinde kullanılmıştır.

Tek bir örnek için cDNA sentezi; 5 µl 10X tampon, 11 µl MgCl₂, 10 µl dNTP, 1,25 µl random hekzamer, 1,25 µl oligo d(T), 1 µl RNaz inhibitörü, 1,25 µl revers transkriptaz ve 19,25 µl dH₂O (RNaz içermeyen su) + RNA (1µg) eklenerek toplamda 50 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Hazırlanan karışım 25°C’de 10 dk, 48°C’de 30 dk, 95°C’de 5 dk olacak şekilde ısı döngüleyici (Eppendorf) cihazında inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.8. Real Time PCR (RT-PCR)

Sentezi gerçekleştirilen cDNA örneklerinden çalışma için belirlenen genlerin (*survivin*, *siklinD1*) ifadesine bakmak için RT-PCR yöntemi uygulanmıştır (Çizelge 3.1). Kontrol geni olarak *Gapdh* kullanılmıştır. Bir kontrol, bir uygulama grubu olmak üzere iki gen için 2 ayrı karışım toplam hacim 10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. RT-PCR için SYBR green PCR master mix kullanılmıştır. Her bir örnek için; ifadesine bakılacak gene göre tasarlanmış olan primerlerin her birinden (forward ve reverse) 0,2 µl, SYBR green master mix 5 µl, distile su 3,6 µl ve 1 µl cDNA kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 mRNA çalışmalarında Real Time PCR (RT-PCR) için kullanılan primerler

1. mRNA Çalışmalarında RT-PCR İçin Kullanılan Primerler	
<i>Survivin</i>	(F) : 5’- GCCCAGTGTTCCTTCTGCTT -3’ (R) : 5’- CCGGACGAATGCTTTTTATG -3’
<i>SiklinD1</i>	(F) : 5’- GCTCCTGTGCTGCGAAGT- 3’ (R) : 5’ – TGTTCCTCTCAGACCTCCAG -3’
<i>Gapdh</i>	(F):5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' (R):5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

Hazırlanan karışım 48 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde 9 µl hacimlerde dağıtılmıştır. Her plakada standart grafik için seçilen bir örneğin dilüsyonları (orijinal, 1/8 ve 1/64), negatif kontrol olarak ise distile su kullanılmıştır. Üzerlerine 1 µl elde edilen cDNA'lerden ve negatif kontrol içinde aynı miktarda distile sudan ilave edilerek kuyucukların ağzı yapışkan film ile kapatılmıştır. Plaka 500 rpm de 5 dk +4°C'de santrifüj yapılarak kuyucuğun duvarında kalan sıvıların dibe çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası plaka RT-PCR cihazına yerleştirilerek 95°C'de 10 dk, 95°C'de 15 sn, 60°C'de 1 dk (40 döngü), 95°C'de 15 sn, 60°C'de 1 dk, 95°C'de 15 sn (erime eğrisi) olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda gen ifadesi analizlerini yapabilmek için kontrol geni olarak (*GAPDH*) kullanmış olduğumuz genin Ct değeri ile hedef genin Ct değeri karşılaştırılarak bir ΔCT değeri elde edilmiştir (Wong ve Medrano, 2005) ve bu değer $2^{-\Delta CT}$ formülünde yerine koyularak hedef genin ifadesi sayısal olarak hesaplanmıştır.

3.9. Protein İzolasyonu

3.9.1. Protein İzolasyonu İçin Hücrelerin Plakalara Ekimi ve Uygulama Yapılması

25 cm²'lik hücre kültür kabı içerisinde 2.000.000 hücre olacak şekilde kısım 3.1.3'de anlatıldığı gibi sayım yapılarak hücreler ekilmiştir. Bir kontrol (0. saat) ve bir doz uygulama grubu olmak üzere toplamda 2 gruba 0, 24 ve 48. saatler için kısım 3.1.4'de anlatıldığı gibi belirlenen dozda ilaç uygulaması yapılmıştır.

3.9.2. Protein İzolasyonu

Hücreler uygulama saatleri sonunda kısım 3.1.2'de belirtilen şekilde kültür kaplarından kaldırılarak 1mL 1X PBS içerisinde Eppendorf tüplerin içerisinde toplanmıştır. Toplanan hücreler +4°C, 1.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek oluşan üst faz dikkatli bir şekilde ortamdan uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 2 ml soğuk 1X PBS eklenerek resüspanse hale getirilmiştir. Resüspanse hücreler +4°C 1.000 rpm de 3 dk santrifüj edilmiştir ve bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Santrifüj sonunda üst faz dikkatlice ortamdan uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 100 µl lizis tamponu, 2,5 µl PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), 2,5 µl PIC (Protease Inhibitor Coctail) eklenmiştir. 10.000 xg'de 20 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan üst faz yeni bir eppendorf tüp içerisine alınarak spektrofotometrede absorbens ölçümleri yapıldıktan sonra -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.10. MikroRNA-25 İnhibitör Transfeksiyonu

Hücreler uygulamadan bir gün önce 24 kuyucuklu hücre ekim plakalarında 40.000 hücre olacak şekilde kısım 3.1.3'de anlatıldığı gibi sayım yapılarak ekilmiştir. Susturmanın en etkili olduğu dozu bulmak için 5-40 pmol arası, anti-miR-25 inhibitörü ve negatif kontrolü için uygulama yapılmıştır. 24 ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılıp etkisi gözlemlenmiştir. Her bir tranfeksiyon örneği için miRNA-Lipofektamin 2000 karışımının hazırlanışı; Anti-miR-25 uygulama dozlarına göre serumsuz besi yeri içerisinde (Opti-Mem) toplamda 25 µl olacak şekilde seyreltilmiştir.

Anti-miR-25'in hücre içerisine girmesini sağlayan Lipofektamin 2000 (ThermoFisher Scientific) serumsuz besi yeri içerisinde (Opti-Mem) toplamda 25 µl olacak şekilde hazırlanarak 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Hazırlanan anti-miR-25 ve Lipofektamin 2000 karışımları 1 ml'lik bir Ependorf tüp içerisinde karıştırılarak oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Süre sonunda her bir kuyucuğa toplamda 50 µl olacak şekilde 450 µl serumsuz besi yeri içerisinde uygulama yapılmıştır. 8 saat 37°C'de CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde serumsuz besi yeri ortamdan uzaklaştırılarak taze besi yeri eklenilmiştir 24 ve 48 saat sonunda hücreler toplanmıştır.

Anti-miR-25 için hazırlanan karışım negatif kontrol içinde aynı şekilde hazırlanarak uygulama yapılmıştır.

3.10.1. Anti-miR-25 Transfeksiyonu

200.000 hücre kısım 3.1.3'de anlatıldığı gibi sayılarak 6 kuyucuklu plakalara 1 kontrol (uygulama yapılmamış), 1 anti-miR-25 ve negatif kontrolü, olmak üzere 3 grup şeklinde 0, 24 ve 48 saatler için ekilmiştir. Uygulama yapılmayan kontrol grubu 0. saat olarak kabul edilmiştir. Bir gün sonra, kuyucukların içerisindeki besi yeri uzaklaştırılarak hücreler 1X PBS ile 2 kere yıkanmıştır. Anti-miR-25 – Lipofektamin 2000 karışımı kısım 3.10 da anlatıldığı gibi hazırlanarak her bir kuyucukta toplamda 250 µl olacak şekilde 2.250 µl serumsuz besi yeri ortamının içerisine uygulanmıştır. 8 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda ortamdan besi yeri uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine taze RPMI 1640 besi yeri eklenmiştir. 24 ve 48. saatlerde hücreler toplanmıştır.

Bu uygulama hem RNA hem de protein izolasyonu için 2 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

3.10.2. cDNA sentezi ve Real Time PCR

Kısım 3.10.1 de tarif edilen uygulama sonunda toplanan hücrelerden kısım 3.6.2’de anlatıldığı gibi total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA’ların spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülerek cDNA sentezi için kullanılmıştır. cDNA sentezi için TaqMan™ MicroRNA revers transkripsiyon kiti (Applied Biosystems, 4366596) kullanılmıştır. cDNA sentezinde 5X hsa-miR-25 (000403; Thermo Fisher Scientific) ve kontrol geni olarak da 5X *RNU6B* (001093; Thermo Fisher Scientific) primerleri (Çizelge 3.2) kullanılarak 2 ayrı karışım hazırlanmıştır. Her bir örnek için; 0,075 µl 100 mM dNTP, 0,75 µl 10X revers transkripsiyon tamponu, 0,095 µl RNaz inhibitörü, 1,5 µl 5X multiscibe revers transkriptaz (50 U/µl), 2,08 µl dH₂O, 2,5 µl RNA (1-10 ng/µl) olacak şekilde hazırlanarak toplamda 7,5 µl’lik karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım termal döngüleyicide 16°C’de 30 dk, 42°C’de 30 dk, 85°C’de 5 dk reaksiyon yapılarak cDNA’lar elde edilmiştir.

Çizelge 3.2 miRNA çalışmalarında cDNA sentezi ve RT-PCR için kullanılan primerler

2. miRNA Çalışmalarında cDNA Sentezi ve RT-PCR için Kullanılan Primerler	
<i>Hsa-miR-25</i> (5X-20X)	5'-CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA-3'
<i>RNU6B</i> (5X-20X)	5'-CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAG CGTCCATATTTTT-3'

Elde edilen cDNA örneklerinden, miR-25 gen ifadesine bakmak için RT-PCR yapılmıştır. Kontrol geni olarak *RNU6B* kullanılmıştır. Bir kontrol, bir uygulama grubu olmak üzere iki gen için 2 ayrı karışım toplam hacim 10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. RT-PCR için TaqMan™ universal PCR master mix II (2X, 4440041) kullanılmıştır. Her bir örnek için; 0,5 µl TaqMan™ small RNA testi (20X, 000403), 5 µl TaqMan™ universal PCR master mix II (2X), 3,5 µl dH₂O, 1 µl cDNA kullanılmıştır.

48 kuyucuklu plakalarda 3 tekrarlı olacak şekilde 0., 24. ve 48. saat sonuçları için anti-miR-25 uygulanmış grup, ve anti-miR-25'in negatif kontrol grubu olmak üzere 16 kuyucuk miR-25 geni için, 16 kuyucuk *RNU6B* geni için kullanılmıştır. Hazırlanan plaka RT-PCR cihazında 50°C'de 2 dk, 95°C'de 10 dk, 40 döngü 95°C'de 15 sn, 60°C'de 60 sn'lik reaksiyon koşullarında inkübe edilmiştir.

3.11. Western Blot

3.11.1. Ayırıştırıcı ve Yükleme Jelinin Hazırlanması

Kısım 3.9.2'de anlatıldığı gibi izole edilen proteinler SDS-PAGE yapılarak yürütülmüştür. Öncelikle çizelge 3.3' de belirtilen miktarlara göre ayırma jeli %12,5 olacak şekilde hazırlanmıştır. İki cam alkol ile temizlenerek 1 mm'lik aralayıcı (spacer) ile camlar üst üste gelecek şekilde birleştirilerek jel dökme aparatına konulup sıkıştırılmıştır. Hazırlanan jel bu iki cam arasına pipet yardımıyla dökülmüş ve jelin üzerinin kurumaması için distile su ile kapatılarak yaklaşık 45 dk polimerleşmeye bırakılmıştır. Süre sonunda jel üzerindeki distile su uzaklaştırılarak çizelge 3.4'de miktarları verilen yükleme jeli %4'lük olacak şekilde hazırlanıp polimerleşen jelin üzerine pipet yardımıyla dökülmüştür. 1 mm'lik kuyucuklar oluşturmak için taraklar yerleştirilmiş ve yaklaşık 45 dk polimerleşmesi beklenilmiştir. Jel hazırlanırken APS (Amonyum persülfat) ve TEMED karışımının içerisine en son eklenmiştir.

Çizelge 3.3 Ayırma jeli içerikleri

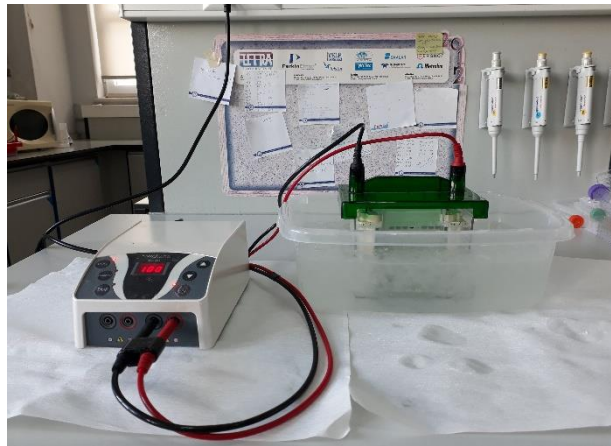
3. Ayırma Jeli %12,5	
Akrilamit:Bisakrilamit (30:0.8)	3,1 ml
1 M Tris-HCl pH:8.8	3 ml
%20 SDS	38 µl
Distile su	1,3 ml
% 10 APS	36 µl
TEMED	5 µl

Çizelge 3.4 Yükleme jeli içerikleri

4. Yükleme Jeli %4	
Akrilamit:Bisakrilamit (30:0.8)	660 µl
1 M Tris-HCl pH:6.8	630 µl
%20 SDS	25 µl
Distile su	3,6 ml
%10 APS	25 µl
TEMED	5 µl

3.11.2. Proteinlerin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Polimerleşen jeller dikey elektroforez tankına (Şekil 3.6) yerleştirilerek üzerine 1X yürütme tamponu (Çizelge 3.5) eklenmiştir. Jellerin üzerinden taraklar dikkatlice çıkartılmış ve oluşan kuyucukların içerisi tampon ile çoklu pipetaj yapılarak iyice temizlenmesi sağlanmıştır. Kısım 3.9.2 de tarif edildiği şekilde izole edilen her bir protein 100 µg/µl olacak şekilde eşit hacimde protein yükleme boyası (Çizelge 3.6) ile karıştırılarak 98°C’de 3 dk denatürasyon için bekletilmiştir.



Şekil 3.6 Dikey elektroforez tankı

Süre sonunda ilk kuyucuğa protein belirteci yüklenmiş ve diğer kuyucuklara sırasıyla diğer örnekler yüklenmiştir. Tankın kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlanmış ve akım, örnekler yükleme jelinde yürürken 100 voltta, ayrıştırıcı jele geçtiğinde 200 volta yükseltilerek protein belirteci iyice açılana kadar yürütülmüştür (yaklaşık 1,5 saat).

Çizelge 3.5 1X yürütme tamponu içerikleri

5. 1X Yürütme Tamponu (1 L için)	
Tris	3,03 gr
Glisin	14,4 gr
SDS	1 gr
Distile su	1 L 'ye tamamlanır

Çizelge 3.6 Protein yükleme boyası içerikleri

6. Protein Yükleme Boyası	
1 M Tris-HCl pH:6.8	2,4 ml
%20 SDS	3 ml
% 100 Gliserol	3 ml
β- merkaptoetanol	1,6 ml
Bromfenol mavisi	0,006 gr
Toplam	10 ml

3.11.3. Jelde Yürüyen Örneklerin Membrana Transferi

Elektroforez sonrasında jel dikkatli bir şekilde camların arasından çıkartılarak üstte kalan yükleme jeli ayrıştırma jelinden uzaklaştırılmış ve jel transfer tamponunun (Çizelge 3.7) içerisine konulmuştur. Transfer için kullanılacak olan sünger, filtre kâğıdı da transfer tamponunun içerisine konularak iyice ıslanması sağlanmıştır. Membran, aktifleşmesi için önce saf metanol içerisine bekletilmiş kullanılacağı zaman transfer tamponu içersine alınmıştır. Sandviç aparatında sırasıyla sünger, filtre kâğıdı, membran, jel, filtre kâğıdı ve sünger aralarında hava kabarcığı kalmayacak şekilde üst üste koyularak aparat kapatılmıştır. Sandviçin kurulumu akım yönüne göre ayarlanarak doğru renk kodları eşleşecek şekilde yerleştirmiş, tank içerisine transfer tamponu ve buz aküsü konularak kapağı kapatılmıştır.

Elektrotlar güç kaynağına bağlanmış akım 100 volta ayarlanarak bir saat transfer olması beklenilmiştir.

Çizelge 3.7 Transfer tamponu içerikleri

7. Transfer tamponu (10 L için)	
Tris baz	24,5 gr
Glisin	112 gr
Metanol	2 L
Distile su	10 L' y tamamlanır

3.11.4. Transfer Sonrası Membran ve Antikor Uygulanması

Transfer işlemi gerçekleştirildikten sonra membran dikkatlice bir kaba alınıp ve üzerine ponceau S (0,5 g/lt) eklenmiş 1 dk boyunca çalkalayıcıda çalkalanarak proteinlerin transfer olup olmadığına bakılmıştır. Süre sonunda boya dökülerek membrandan boyanın uzaklaşması için membran 10 dk boyunca metanol içerisinde çalkalanmıştır. Bu işlem sonunda metanol ortamdan uzaklaştırılarak ve 5'şer dk 3 tekrar olacak şekilde 1X TBS (Çizelge 3.8) içerisinde yıkanmıştır. Yıkama işlemi bitince membran 1 saat boyunca bloklama sütü (Çizelge 3.9) içerisinde çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Bloklama işleminin ardından 8 dk 1X TBS ve 7 dk 1X TBS + Tween 20 (Çizelge 3.10) içerisinde membran yıkanmıştır. Süre sonunda membran, 3 ml BSA (Çizelge 3.11) içerisinde 6 µl antikor (1:500) bulunan kap içine alınarak +4°C'de gece boyu çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Bu çalışmada Siklin D1 ve kontrol protein olarak β-aktin (cell signaling) antikorları kullanılmıştır. Ertesi sabah membran yeni temiz bir kaba alınarak 5 dk 1X TBS, 10 dk 1X TBS + Tween 20 içerisinde yıkanmıştır. Süre sonunda membran 10 ml bloklama sütü içerisine 10 µl anti-rabbit IgG AP-bağlı antikor (Cell Signaling) eklenmiş çözelti içerisinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda membran 5 dk 1X TBS, 10 dk 1X TBS + Tween 20 içerisinde yıkanmıştır.

Çizelge 3.8 10X TBS stok çözeltisinin içerikleri

8. 10 X TBS Stok Çözeltisi pH:7,6	
Tris	24,2 gr
NaCl	80 gr
Distile su	1 L' y tamamlanır

Çizelge 3.9 Bloklama sütü içerikleri

9. Bloklama sütü	
Süt tozu (az yağlı- yağsız)	25 gr
10 X TBS	50 ml
Tween 20	2,5 ml
Distile su	500 ml'ye tamamlanır

Çizelge 3.10 1X TBS – Tween 20 içerikleri

10. 1X TBS – Tween 20 içerikleri	
1X TBS	100 ml
Tween 20	100 µl

Çizelge 3.11 Sığır Albumini (BSA) içerikleri

11. Sığır Albumini (BSA)	
Sığır Serum Albumini (BSA)	0,15 gr
10 X TBS	300 µl
Tween 20	3 µl
Distile su	3 ml'ye tamamlanır

3.11.5. Membran Görüntüleme ve Veri Analizi

Membran görüntülemesi BCIP (5-bromo-4-Chloro-3 Indolyl phosphate)/NBT (Nitroblue tetrazilium tuzu) substrat kiti (Invitrogen) ile yapılmıştır. BCIP ve NBT solüsyonlarından 1'er ml alınarak 8 ml distile su içerisinde homojen hale getirilerek 0,45 µm filitreden geçirilmiş ve partiküller uzaklaştırılmıştır. Membran üzerine pipet ile uygulama yapıp oda sıcaklığında bekletilerek 10 dk içerisinde görüntülenmiştir.

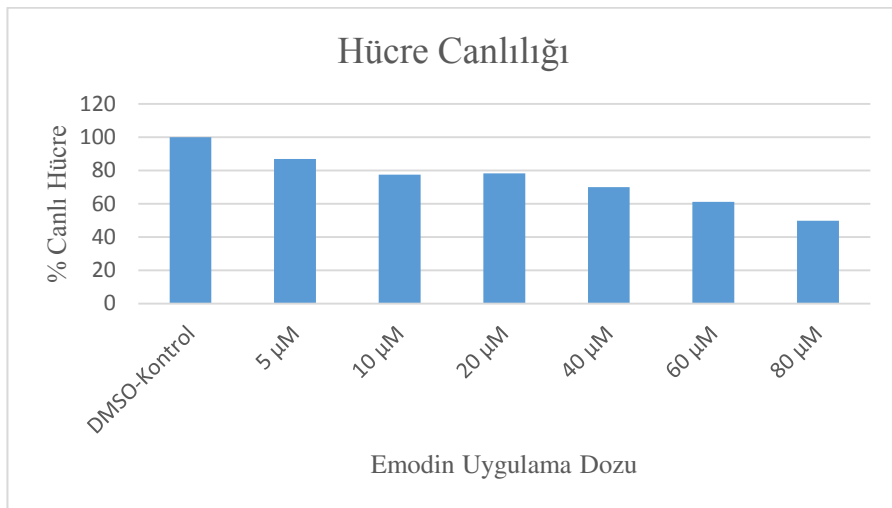
Membran üzerinde elde edilen görüntüler taranarak bilgisayara aktarılmıştır. Image J (imagej.softpedia.com) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir bantın alanı hesaplanarak sayısal değerler elde edilmiştir. Araştırılan genlerin ve referans geninin belirlenen saat dilimlerindeki değerleri elde edilmiştir. Araştırılan genin değeri referans genin değerine bölünmüştür, elde edilen değerler 100 ile çarpılarak kontrol grubunun değerine bölünmüş ve her bir uygulama saati kontrol gene göre bağlı değerler elde edilmiştir. Elde edilen verilere göre grafik çizilmiştir.

4. BULGULAR

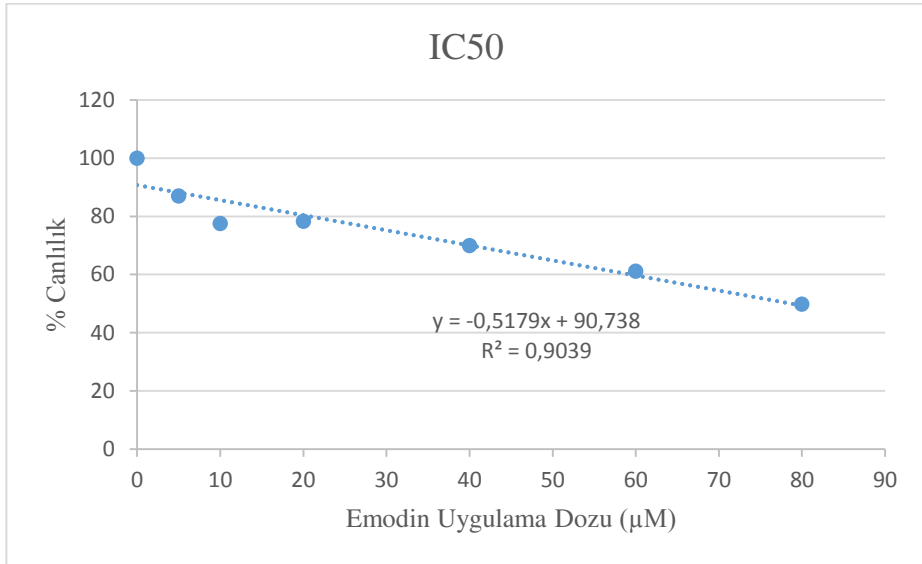
4.1. MTT Proliferasyon ve Muse™ Canlılık Testi

Emodin'in hücre canlılığına etkisini belirlemek için artan konsantrasyonlarda (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M) ve zamanda (24 ve 48 saat) "MTT Proliferasyon Yöntemi" ve "MUSE™ Canlılık Testi" uygulaması sonucunda elde edilen verilerin analizi yapılarak emodin artan konsantrasyonuna bağlı hücre canlılık oranları elde edilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.3). Veriler değerlendirildiğinde elde edilen doza bağlı canlılık oranları için 24 saat ($R^2 = 0,9039$) (Şekil 4.2), 48 saat ($R^2 = 0,9627$) grafiklerinden regresyon model uyumunun iyi olduğunu gösteren 48. saat verilerine göre IC50 (%50 inhibisyon konsantrasyonu) değeri yaklaşık 55 μ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4). 24. saat uygulama verileri aynı deney uygulamaları ve farklı deney uygulamaları arasında kararlılık göstermediği için IC50 hesaplamasında 48 saat verileri kullanılmıştır.

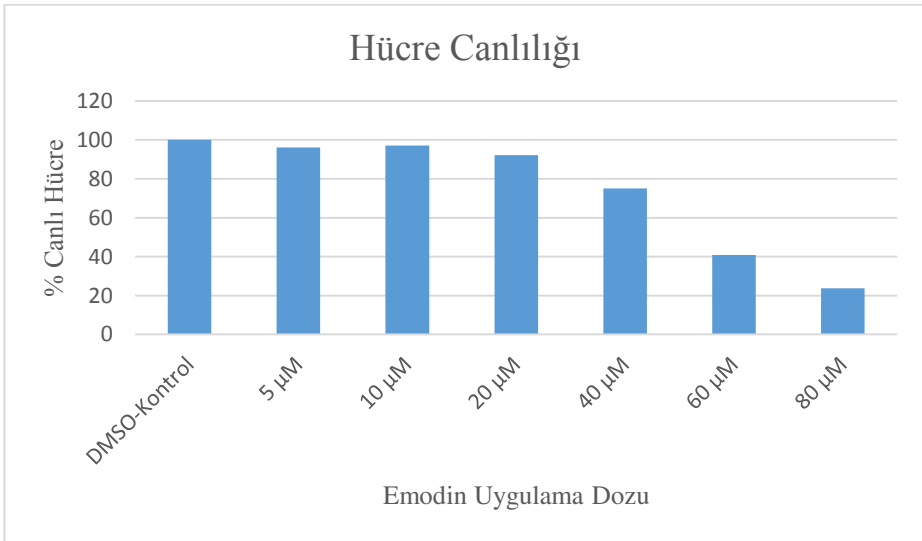
Aynı doz ve süreler için Muse™ canlılık testi de uygulanmıştır. Buna göre elde edilen doza bağlı canlılık oranlarında 24. saat için tekrar edilebilir sonuçlar elde edilemezken 48. saat için doza bağlı canlılık oranları ve eğim grafiği gösterilmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6).



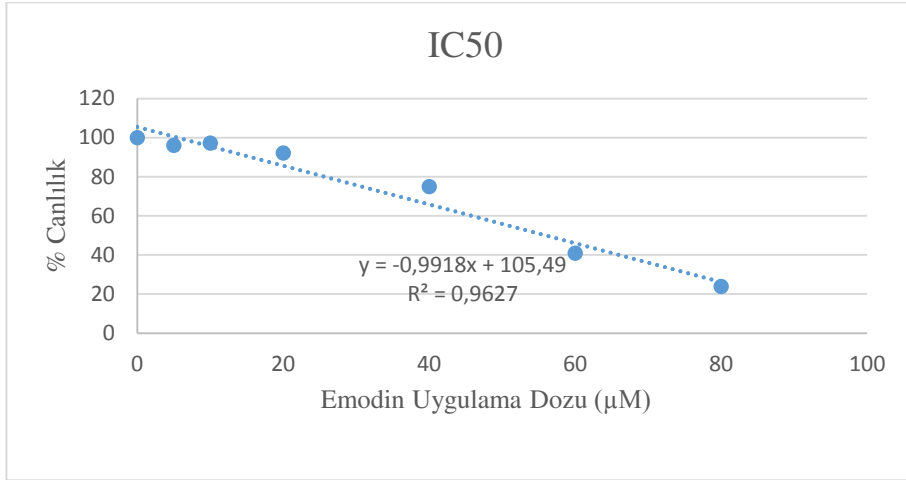
Şekil 4.1 MTT yöntemi ile 24. saatteki hücre canlılığı (Deneyler farklı zamanlarda en az 3 tekrarlıdır)



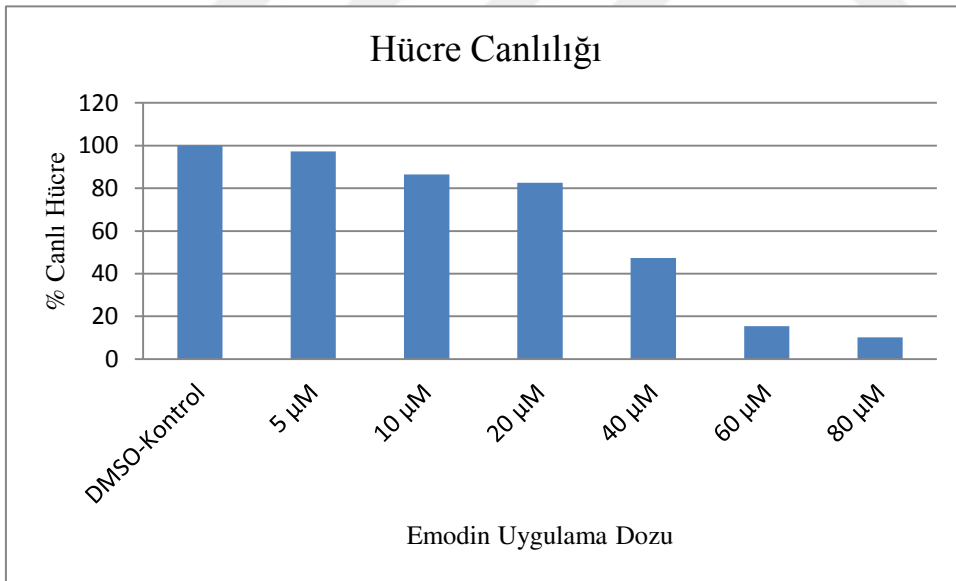
Şekil 4.2 MTT yöntemi ile 24.saat için elde edilen eğim grafiği.



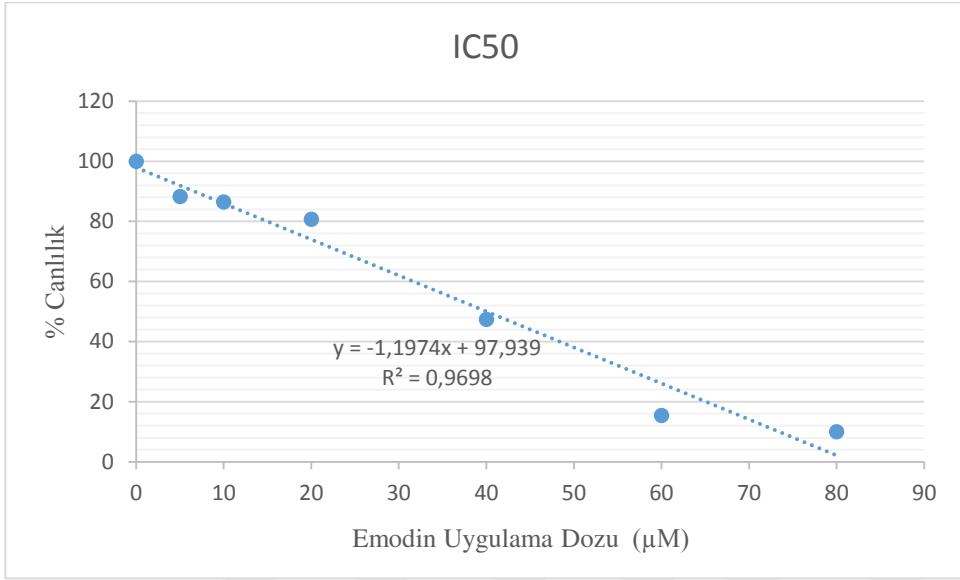
Şekil 4.3 MTT yöntemi ile 48. saatteki hücre canlılığı (Deneyler farklı zamanlarda en az 3 tekrarlıdır)



Şekil 4.4 MTT yöntemi ile 48.saat için elde edilen eğim grafiği (IC50 %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon yaklaşık 55 µM)



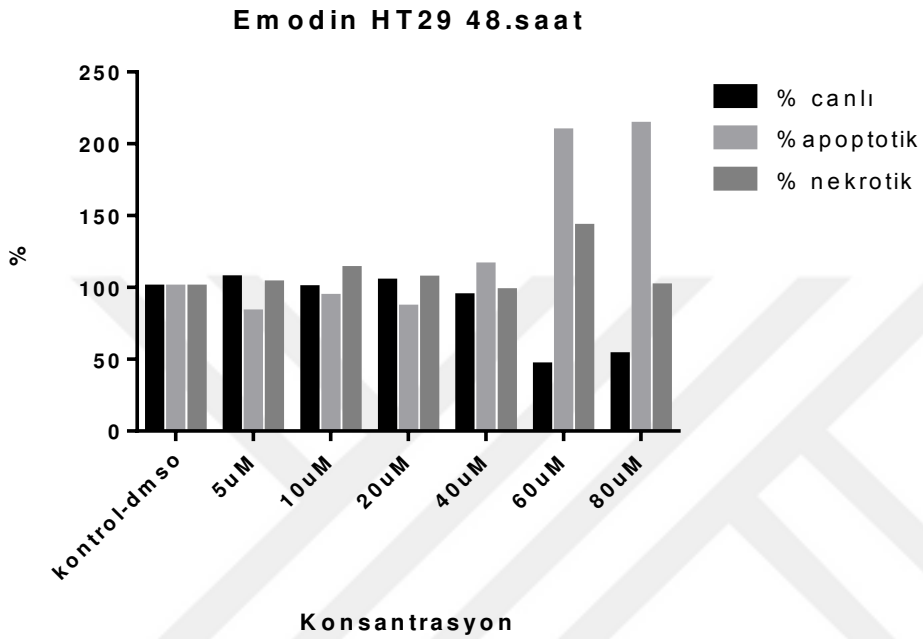
Şekil 4.5 Muse™ canlılık testi sonucu elde edilen uygulanan dozlardaki % canlı hücre (48.saat)



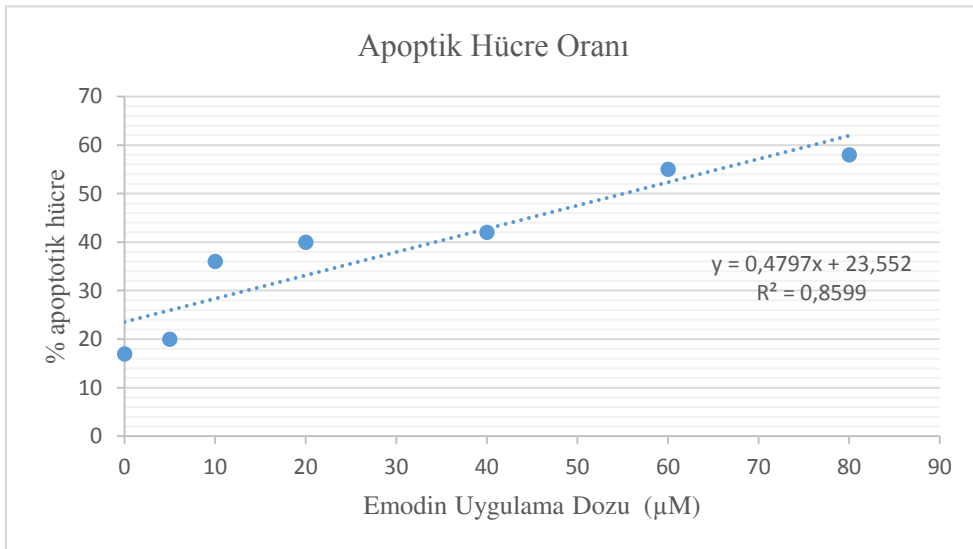
Şekil 4.6 Muse™ yöntemi ile 48. saat için elde edilen eğim grafiği

4.2. Apoptoz

Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi için Hoechst 33258/Propidium Iodide (HO/PI) yöntemi uygulanmıştır. Proliferasyon analizi sonucu belirlenen etkin doz (55 µM) ve zamanda (48. saat) apoptotik hücrelerin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Elde edilen veriler sonucunda çizilen eğim grafiğinde AP50 (hücrelerin %50'sinin apoptoza girdiği konsantrasyon) değeri yaklaşık 55 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8).



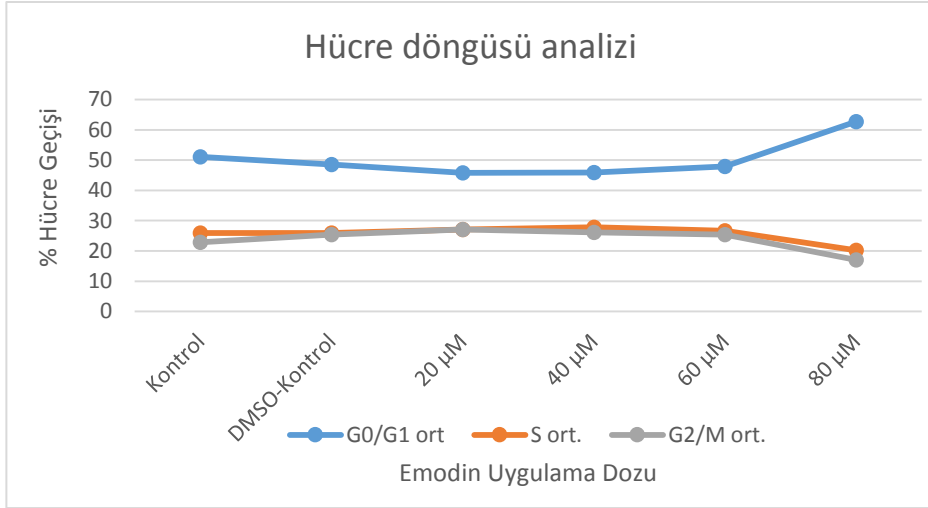
Şekil 4.7 Emodin uygulanan hücrelerde 48. saat konsantrasyona bağlı apoptoz oranları



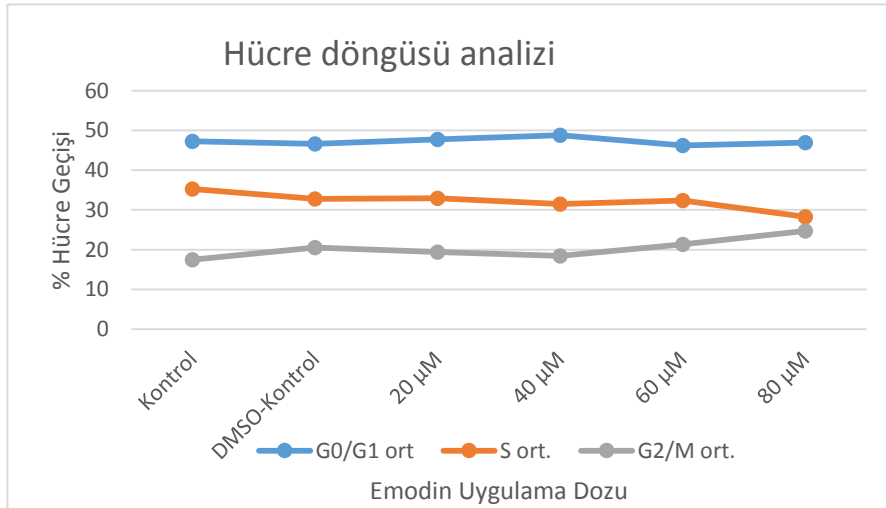
Şekil 4.8 AP50 dozunun belirlendiği doza bağlı apoptik hücre dağılım grafiği (deneyler farklı zamanlarda en az 3 tekrarludur)

4.3. Muse™ Hücre Döngüsü Analizi

Hücrelere proliferasyon ve apoptoz deneyleri sonucu belirlenen etkin dozlarda 24. ve 48. saat için uygulama yapılmıştır (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Fakat elde edilen sonuçlardan IC50 değeri ve altında anlamlı bir değişim görülmemiştir.



Şekil 4.9 Emodin uygulaması sonucu elde edilen 24. saat ortalama % hücre geçişi (deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır)



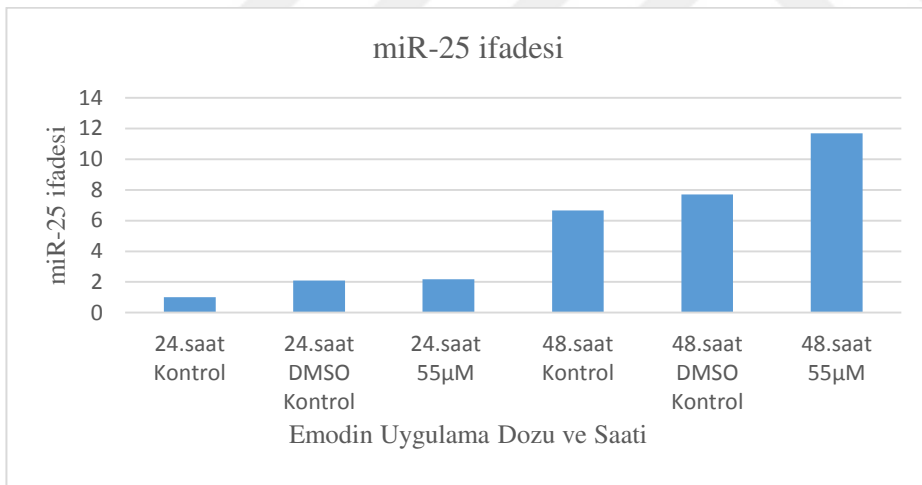
Şekil 4.10 Emodin uygulaması sonucu elde edilen 48. saat ortalama % hücre geçişi (deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır)

4.4. Real Time PCR Bulguları

Çalışma kapsamında belirlenen deney grupları için yapılan uygulamalardan elde edilen hücrelerden total RNA izolasyonu yapılarak, bu örneklerde gen ifadelerine bakılmıştır. Yapılan deneylerde hücrelere 55 μ M emodin, anti-miR-25 ve negatif kontrol uygulamaları yapılmıştır. Elde edilen total RNA'lerden miR-25, *siklin D1* ve *survivin* ifadelerine bakılmıştır.

4.4.1. Emodin Uygulaması Sonrası miR-25 İfadesi

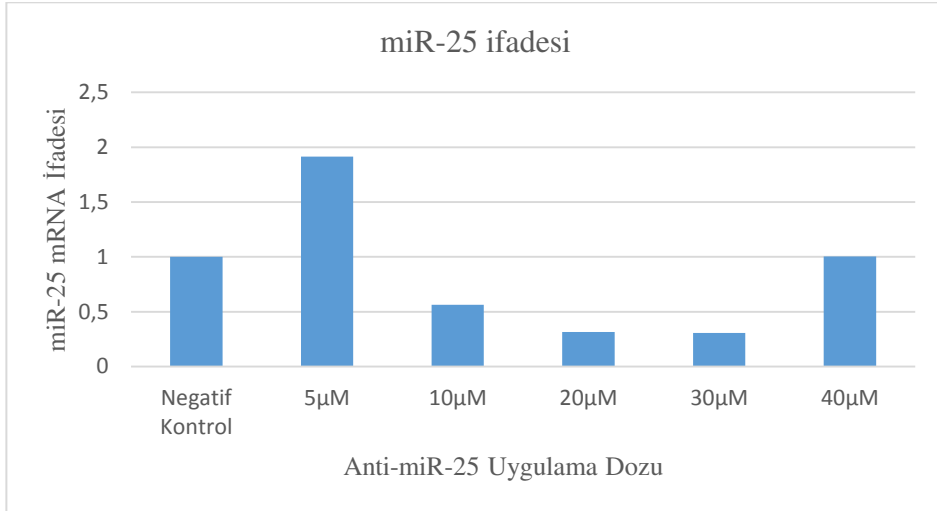
HT-29 hücrelerinde miR-25 ifadesinin zamana ve doza bağlı olarak belirlenmesi için, hücrelere 55 μ M emodin uygulaması yapılarak 0., 24. ve 48. saatlerdeki miR-25 ifadeleri belirlenmiştir (Şekil 4.11). 48. saat sonrasında emodinin miR-25 ifadesini artırdığı saptanmıştır.



Şekil 4.11 Emodin uygulaması sonucu miR-25 ifadesinin zamana bağlı olarak değişimi (deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır)

4.4.2. Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası miR-25 İfadesi

Hücrelere miR-25 ifadesini baskılamak için farklı konsantrasyon (5-10-20-30 ve 40 μ M) ve zamanlarda (24 ve 48 saat) uygulama yapılmıştır. Uygulama sonucunda elde edilen hücrelerden total RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezlenmiş ve miR-25 ifadesine bakılmıştır. MiR-25 ifadesinin en düşük olduğu etkili anti-miR-25 dozunun 30 μ M olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).

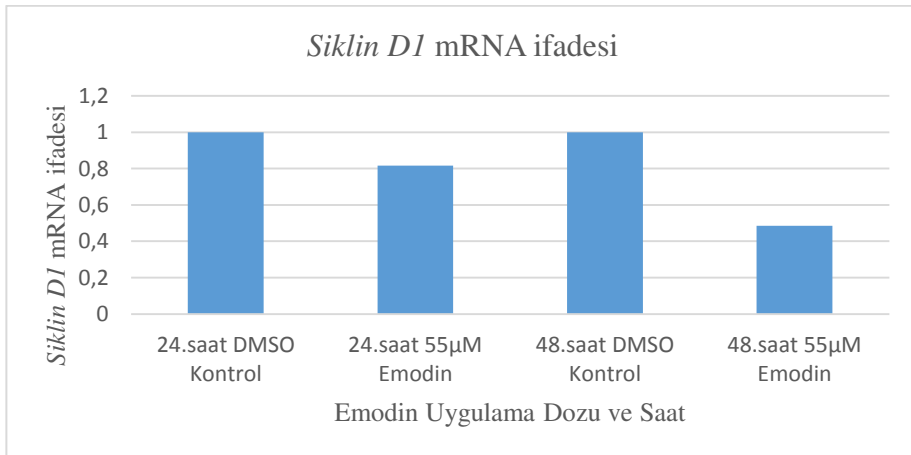


Şekil 4.12 Anti-miR-25 uygulaması sonrası 48. saatte hücredeki miR-25 ifade değişimi (deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır)

4.4.3. Emodin Uygulaması Sonrası İlgili Genlerin mRNA İfadeleri

Siklin D1 gen ifadesi

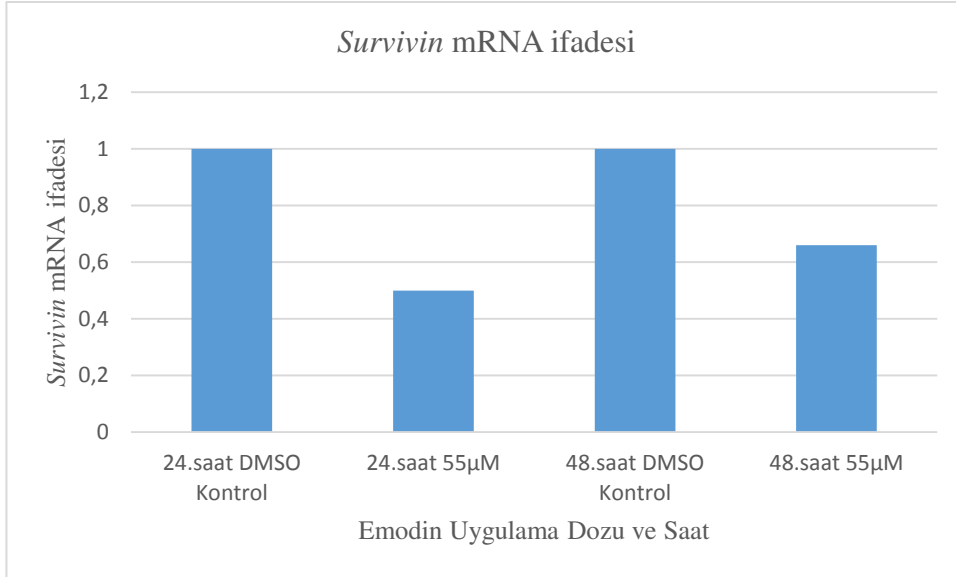
HT-29 hücrelerine 55 µM emodin uygulaması yapılarak elde edilen total RNA'dan *siklin D1* ifadesi belirlenmiştir. Kontrol grubu hücreleriyle karşılaştırıldığında *siklin D1* ifadesinde doza ve zamana bağlı olarak azalma belirlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Emodin uygulaması sonucu elde edilen *siklin D1* mRNA ifadesi (deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır)

***Survivin* gen ifadesi**

HT-29 hücrelerine belirlenen dozda emodin uygulanmış ve kontrol grubu hücreleriyle karşılaştırıldığında *survivin* gen ifadesinde zamana ve doza bağlı olarak azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).



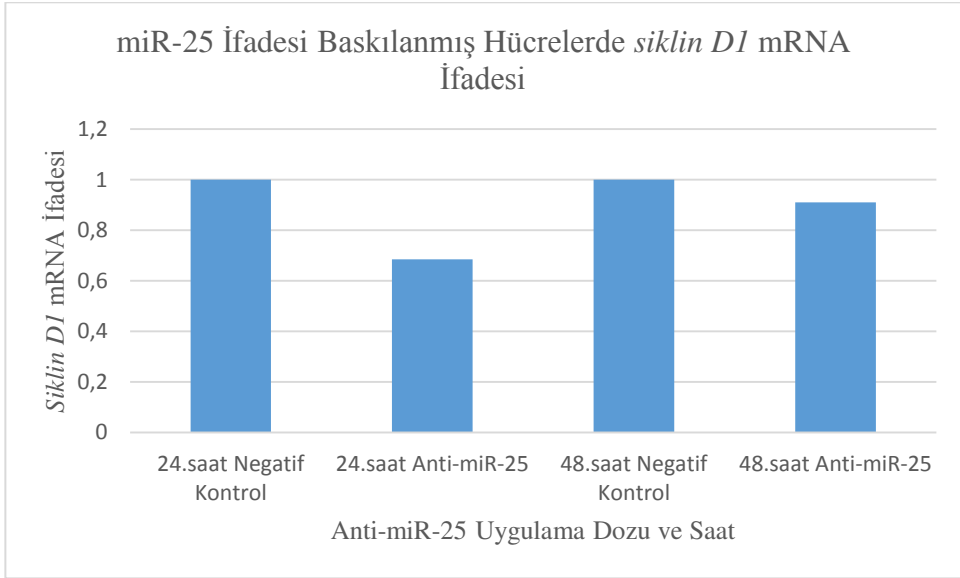
Şekil 4.14 Emodin uygulaması sonucunda elde edilen *Survivin* mRNA ifadesi (deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır)

4.4.4. Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası Genlerin mRNA İfadeleri

Hücrelerde susturma için belirlenen uygun anti-miR-25 transfeksiyon miktarı ile yapılan susturma sonucu hücrelerden total RNA elde edilmiş ve ilgili genlerin ifadeleri belirlenmiştir.

***Siklin D1* ifadesi**

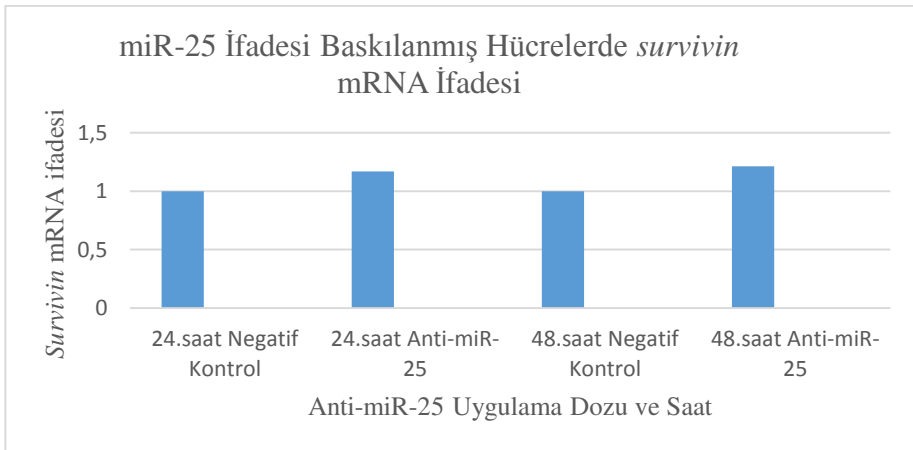
Anti-miR-25 negatif kontrol grubuna karşı miR-25 susturulmasına bağlı *siklin D1* mRNA ifade değişimi Şekil 4.15 gösterilmiştir. Anti-miR-25 uygulaması hem 24. hem de 48. saatlerde *siklin D1* ifadesinde düşüş ortaya koymuştur.



Şekil 4.15 Anti-miR-25 uygulaması sonucu *siklin D1* mRNA ifadesi (deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır).

***Survivin* ifadesi**

Hücrelere anti-miR-25 uygulaması yapılarak anti-miR-25 negatif kontrol grubuna karşı anti-miR-25 uygulama grubunun miR-25 susturulmasına bağlı *survivin* mRNA ifadesi değişimi Şekil 4.16 elde gösterilmiştir. Anti-miR-25 uygulaması hem 24. hem de 48. saatlerde *survivin* ifadesinde artış ortaya koymuştur.



Şekil 4.16 Anti-miR-25 uygulaması sonucu *survivin* mRNA ifadesindeki değişim (deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır)

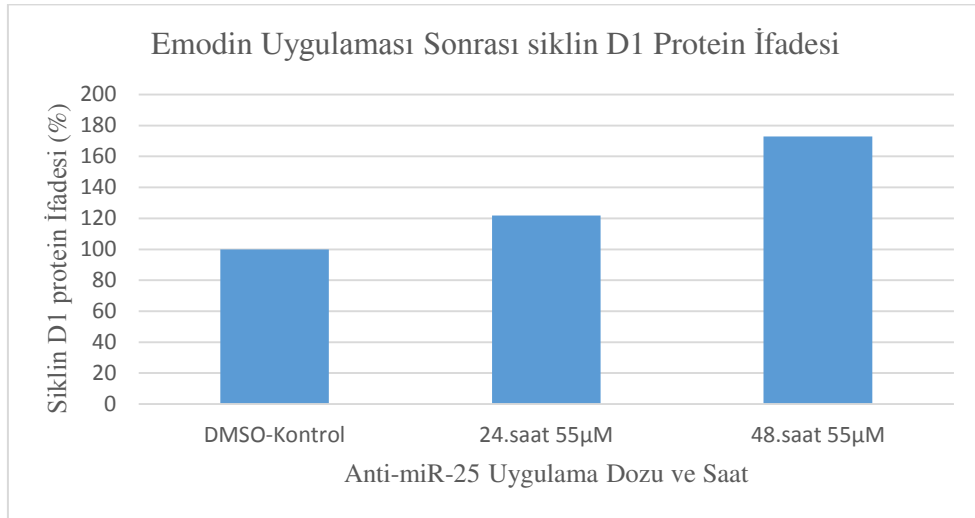
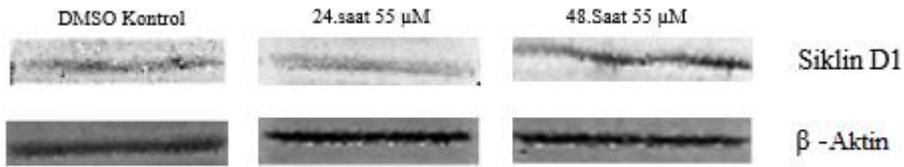
4.5. Western Blot Analizleri

HT-29 hücrelerine DMSO, 55 μ M emodin, anti-miR-25 ve anti-miR-25 negatif kontrolü uygulaması yapılmış ve belirlenen süre (24 ve 48 saat) sonunda protein ifadesine bakılmıştır.

4.5.1. Emodin Uygulaması Sonrası Protein İfadesi

Siklin D1

Emodin 55 μ M uygulaması yapılarak 24. ve 48. saatler sonunda hücrelerden elde edilen total proteinlerden Siklin D1 protein ifadesine bakıldığında kontrol grubuna göre bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).

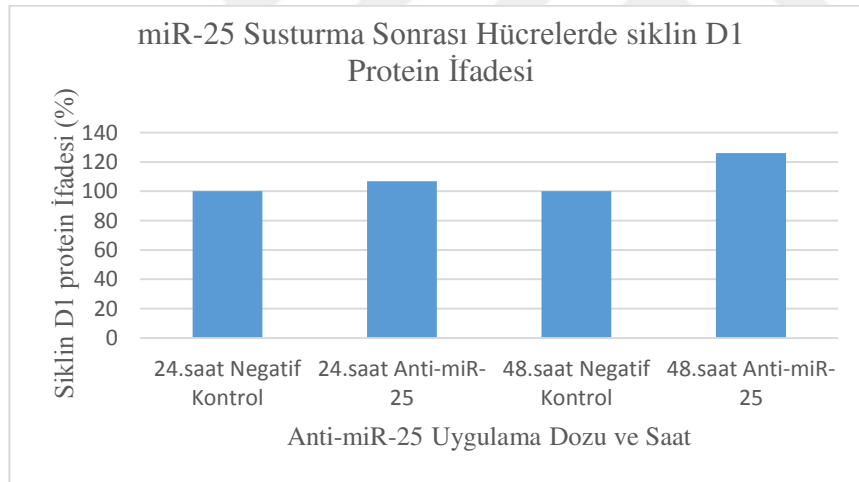
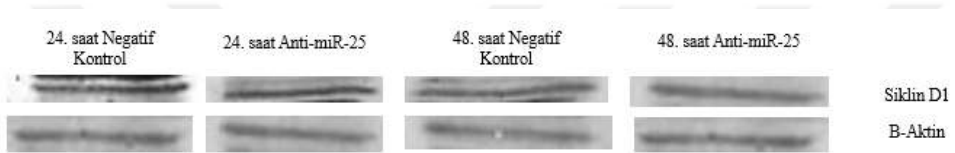


Şekil 4.17 Emodin uygulaması sonucu Siklin D1 protein ifadesi değişimi (deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır).

4.5.2. Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası Protein İfadesi

Siklin D1

Hücelere anti-miR-25 uygulaması sonrasında Siklin D1 protein ifadesinde ki değişim negatif kontrol grubuna göre karşılaştırılmış ve bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Anti-miR-25 uygulaması sonucu Siklin D1 protein ifadesi değişimi (deneyler farklı zamanlarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser tedavi stratejileri birçok yolla gerçekleştirilmektedir. Bunların en başında da kanser dokusunda yer alan hücrelerin genel ayırt edici özellikleri kullanılarak bu hücrelerin ya yok edilmesi ya da çoğalmasının engellenmesidir. Bunun için birçok tedaviye yönelik bileşikler geliştirilmekte ya da doğal olarak mevcut olan ve halk arasında yaygın kullanımı olan bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin etki mekanizmaların bilinmesi ve yer aldığı moleküler mekanizmaların aydınlatılması hem daha spesifik hem de etkili kullanımı açısından önemlidir. Bu nedenle özellikle doğal olarak mevcut olan bileşiklerin etkisi ve mekanizmaları üzerine çalışmalar oldukça fazladır. Emodin, birçok bitkinin köklerinde ve rizomlarında bulunan aktif bir bileşendir, Çin geleneksel tedavilerinde yıllardır kullanılmaktadır. Farklı kanser tiplerinde anti-kanser etki sergilemesinin yanı sıra cilt yanıklarında, enfeksiyonlarda, safra taşlarında, hepatit ve kemik iliği tedavilerinde de kullanılmaktadır (He, vd., 2012). Son yıllarda emodin'in kanser önleyici etkisi üzerine yapılan çalışmalar ilerleme göstermiştir. Ayrıca farklı mekanizmalardan dolayı emodin'in farklı kanser tiplerinde antitümör etkileri olduğu bulunmuştur (Wei, vd. 2013).

Kolorektal kanserler birçok faktör tarafından etkilenmekle birlikte bunlar yoğun olarak hücre çoğalması, apoptoz, metastaz veya anjiyogenez gibi mekanizmalarla ilişkili genlerin ifadesindeki anormalliklerle ilişkilidir. Bu mekanizmalar üzerinde etkili genlerin ifadelerinin düzenlenmesi ya da tedavi stratejilerinde önemli olabilir. Bu nedenle birçok mekanizma üzerinde etkisi görülen emodinin kolorektal kanser üzerine etkisi ve yine gen ifadesinin düzenlenmesinde son yıllarda yoğun olarak çalışılan miR-25'in hücre içindeki ifadesi bu çalışmanın amacını oluşturmuştur. Bir kimyasalın hücre üzerine belli etkilerinin çalışılması sitotoksik doz belirlendikten sonra gerçekleştirilir. Özellikle kanser hücreleri için organizmalarda etkili doz belirlenirken hücrelere sitotoksik etki araştırmanın başlangıcını oluşturur. Hücre canlılık testlerinde genel uygulama farklı platformlarda elde edilen sonuçların birbiri ile uyumlu olmasıdır. Yapılan bu tez çalışmasında öncelikle emodinin, HT-29 kolorektal kanser hücre hattında proliferasyona etkisi MTT hücre canlılık testi ve hücre analiz cihazı canlılık testi yöntemleriyle doza ve süreye bağlı olarak saptanmış 24 ve 48 saat için veriler elde edilmiştir (Şekil 4.1, 4.3, 4.5). MTT ve akış sitometrisi benzeri çalışan hücre analiz sistemi (Muse™) sonuçları uyumlu çıkmıştır ve elde edilen değerler ileri uygulamalar için seçilecek bileşik

konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmıştır. 24 saat sonucunda hücrelerin canlılığı üzerinde emodinın kararlı bir etkisinin olmadığı ve daha kararlı ve etkin sürenin 48 saat olduğu görülmüştür. Emodin uygulamasının farklı konsantrasyonlar için hücre canlılığı grafiğinde ($r^2=0.9627$) hücrelerin yarısının canlı olduğu doz yani IC50 değeri 55 μM olarak saptanmıştır (Şekil 4.4). Bu saptanan IC50 konsantrasyonu daha önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında farklı kanser tiplerinde uygulanan emodin dozuna yakın olduğu görülmektedir. Zu ve arkadaşları (2015), tarafından meme kanseri hücrelerine 10 μM ve 40 μM emodin uygulaması yapılarak etkin dozun 40 μM olduğu bulunmuştur Başka bir çalışmada da yine meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücrelerinin farklı dozlarda (10-20-40 ve 60 μM) emodin uygulaması yapılarak etkin dozun 40 μM olduğu bulunmuştur (Sui vd., 2014). HT-29 kolorektal kanser hücre hattında belirlenen 55 μM emodin konsantrasyonu çalışmanın sonrası için yapılacak denemelerde de Apoptoz için AP50 (hücrelerin %50'sinin apoptik olduğu konsantrasyon) değerinin belirlenmesi çalışmaları dışında üst sınırı oluşturmuştur.

Emodin ve miR-25 ifadesinin ilişkilendirildiği kanser gelişimi ve tedavisi ile ilgili mekanizmalardan birisi apoptozdur. Apoptoz, anormal hücrelerin bir organizmadan çıkarıldığı, genetik olarak düzenlenmiş bir hücre ölüm şekli olup, çok hücreli organizmaların doku homeostası bakımından normal gelişimini sağlar (Reed, 2003). Apoptotik hücre ölümüne, kompleks biyokimyasal olaylar serisi ve kesin morfolojik değişiklikler eşlik eder; bunlar hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması, zar tomurcuklanması ve membrana bağlı apoptotik cisimlerin ortaya çıkışıdır (Wylli vd., 1981). Emodinin apoptoz üzerinde etkisine bakmak için apoptozu belirleme yöntemlerinden sıklıkla kullanılan HO/PI boyama yöntemi kullanılmıştır. Apoptozun etkin dozunun belirlenmesi için proliferasyonda kullanmış olduğumuz dozlar baz alınarak uygulamalar yapılmıştır. HO/PI boyama yöntemiyle yapılan uygulama sonucunda elde edilen verilerden emodinın artan konsantrasyonlarda apoptozu indüklediği görülmüştür (Şekil 4.7) Elde edilen proliferasyon ve apoptoz verilerine göre 24 ve 48 saatler için konsantrasyona karşı apoptik hücre grafikleri çizilmiştir. 24 ve 48 saat için emodin uygulamalarından elde edilen doza bağlı apoptoz ve proliferasyon grafiklerinden korelasyon (r^2) değeri 0.9 üzerinde olan 48 saat uygulamalarının verileri kullanılarak AP50 (Şekil 4.8) için etkin dozun yaklaşık 55 μM olduğu hesaplanmıştır ve çalışma bu belirlenen doz üzerinden yapılmıştır.

Yapılan proliferasyon ve apoptoz deneylerinde kullanılan emodin konsantrasyonlarının hücre döngüsü üzerine etkisine bakılmıştır. Hücre döngüsünde yer alan ya da döngünün düzenlenmesinde etkili olan bazı moleküler hedefler vasıtası ile kimyasallar etkili olabilmektedir. Özellikle siklinler ve siklin bağlı kinazların aktivitesinin düzenlenmesi önemlidir. Bu siklinlerin veya siklin bağlı kinazlar hücre döngüsünün belli aşamalarının başlaması ya da tamamlanmasını yönlendirir. Bu amaçla artan konsantrasyonlarda emodin uygulamasının hücreleri belli aşamada tutup tutmadıkları test edilmiştir. IC50 ve AP50 değerleri üzerinde olan 80 µM konsantrasyonda 24. saatte hücreler G0/G1 fazında tutulurken, 48. saat de G2/M fazında tutulan hücre sayısının göreceli olarak az oranda arttığı görülmektedir (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Ancak bu dozlar sitotoksik ve apoptotik dozların üzerinde olduğu için çalışmada hücre döngüsü düzenleyici genler *siklin D1* dışında değerlendirilmemiştir. Uygulanan dozlardan sitotoksik ve apoptotik dozların altında kalan dozlarda da hücre döngüsü üzerine belirgin bir etki gözlenmemiştir.

MiRNA'lar, protein kodlamayan yaklaşık 18-23 nükleotid uzunluğunda RNA molekülleridir. Bu RNA moleküllerinin hücre farklılaşması ve tipinin belirlenmesi gibi pek çok fizyolojik ve patolojik durumlarda düzenleyici olarak önemli roller aldığı gösterilmiştir. Karsinogeneizde miRNA'ların ifade seviyelerindeki değişimlere bakıldığında, normal ve tümörlü dokular arasında farklılık olduğu belirlenmiştir. Gen ifadesini düzenlendiği gösterilen miRNA'ların kanser hücrelerindeki seviyelerinin normal hücrelerle karşılaştırılması kanserin tanı, takip ve tedavisinde önemli olmuştur (Çelik vd., 2013). Pek çok çalışmada miRNA'ların apoptoz ve hücre büyümesi düzenlenmesinde rol aldığını göstermiştir (Cheng vd., 2005; Tanno vd., 2005).

Çalışmada proliferasyon ve apoptoz deneyleri sonucunda belirlenen emodin dozunun miR-25 ifadesine etkisine bakılmıştır ve sonuçta miR-25 ifadesinin zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.11). Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde emodin uygulaması yapılan hücrelerde miR-25 ifadesine etkisi araştırılmamıştır. Emodin uygulaması sonrasında miR-25 ifadesinde elde ettiğimiz artış, proliferasyon ve apoptoz sonuçları, emodinin hücre çoğalması ya da apoptoz üzerinde etkili olabileceğini göstermiştir. Kolorektal kanserde miRNA ifade düzeyleri farklılık göstermektedir. 2003 yılında Micheal ve arkadaşları kolorektal kanserli doku örneklerinde miRNA-143 ve miRNA-145'in azaldığını belirtmişlerdir (Chen vd., 2009). Ng ve arkadaşları (2009) tarafından kolorektal

kanserli ve normal dokularda miR-17-3p ve miR-92 seviyelerine bakıldığında kanserli hastalarda gen ifadelerinin yüksek olduğu görülmüştür. MiR-25 ifadesi çeşitli kanser tiplerinde araştırılmıştır ve kimisinde onkogen özellik gösterirken kimisinde tümör baskılayıcı olarak görev görmektedir. Li ve arkadaşları (2013) tarafından miR-25'in kolorektal kanserde ifadesi araştırılmış normal dokulara göre kanserli dokularda miR-25 ifadesinin önemli derecede arttığı görülmüştür. Başka bir çalışmada miR-25'in anormal ifadesi hücreleri hücre döngüsünün G2/M fazında tutuklanmasını indükleyerek koloni oluşumunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Esposito vd., 2012). Elde edilen sonuçlar emodin uygulaması ile elde edilen miR-25 ifade artışının emodin etki mekanizmalarından birini oluşturduğunu düşündürmektedir. Ancak emodin uygulaması ile artan miR-25 ifadesinin Esposito ve arkadaşlarının (2012) öngördüğü gibi hücre bölünmesini göreceli olarak artırmasa da belirgin olarak G2/M fazında tutmadığı söylenebilir. Muhtemelen doğrudan bu aşamada etkisini söylemek için miR-25 mimik transfeksiyonu ile hücre döngüsünü değerlendirmek çok daha doğru sonuç verecektir.

Gen ifadeleri değerlendirilirken hem emodin uygulamasının hem de miR-25 ifadesinin *siklin D1* ve *survivin* genlerinin ifadelerine etkisi çalışılmıştır. Emodin uygulaması ile korele olan miR-25 ifade artışı doğrudan olmasada dolaylı olarak hücre içindeki gen ifadesi değişimi ile ilişkilendirilebilir. Bunun doğruluğunu ortaya koymak için izlenecek yol hücrelere ilgili mikroRNA'nın transfeksiyonu, susturulması ve mekanizmalarda yer alan muhtemel genlerin mRNA dizilerinin, miRNA dizilerinin hedef dizilerinin olup olmayacağını saptanmasıdır. Bu veriler ışığında emodin uygulaması ile artan miR-25 ifadesi yerine miR-25 susturulduğunda emodin uygulaması ile araştırılan gen ifadelerinin değişiminin de saptanması amaçlanmıştır. Bunun için hücre içindeki mevcut miR-25 ifadesi anti-miR25 uygulaması yapılarak baskılanmış ve ilgili gen ifadeleri bu hücrelerde araştırılmıştır. HT-29 hücrelerinde uygun anti-miR-25 uygulama dozu üretici firma yönergesine uygun olarak test edilerek saptanmıştır. Anti-miR-25 transfeksiyonu yapılarak 24. ve 48. saatler sonunda elde edilen miR-25 ifadesine bakılmış ve uygun transfeksiyon dozunun 30 µM olduğu görülmüştür (Şekil 4.12).

Elde ettiğimiz emodin uygulaması yapılan ve miR-25 ifadesi susturulmuş hücrelerden elde ettiğimiz total RNA ve protein kullanılarak emodin ya da miR-25'in hücre bölünmesi ve apoptozda önemli işlevi olan gen ifadelerindeki değişim araştırılmıştır. Siklin D1, hücre döngüsünde düzeyi ilk artan, G1 evresinde ortaya çıkarak cdk 4 ve 6'yı aktive edip hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli rolü olan

bir moleküldür. Siklin D1, çoğu kolon kanseri hücrelerini indüklediği görülmüştür (Al-Maghrabi, vd., 2015). Emodin uygulaması yapılan HT-29 hücrelerinden elde edilen cDNA'lardan *siklin D1* gen ifadesine mRNA düzeyinde bakılmış ve kontrol DMSO grubuna göre karşılaştırma yapıldığında zamana bağlı olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 4.13). 2014 yılında yapılan bir çalışmada MCF-7 hücrelerine östrojenin neden olduğu hücre çoğalması ve anti-apoptoz etkileri emodin uygulanmasının inhibe edilebileceği, siklin D1 ifadesini düşürdüğü görülmüştür (Sui vd., 2014). SiHA ve HeLa hücrelerine emodin uygulaması yapılmış ve sonucunda emodinin *siklin D1* ifadesini düşürdüğü belirtilmiştir (Thacker, Karunagaran, 2015). Çalışmamızda emodin uygulaması ile *siklin D1* mRNA ifadesi düşerken (Şekil 4.13) protein seviyesinde bir artış görülmüştür (Şekil 4.17). Aynı şekilde hücre döngüsünde de G1 fazında tutulan hücre sayısında bir artış saptanamamıştır (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Bu *siklin D1* ifadesinin değişimi hücre bölünmesi ile ilişkilendirilememiştir. Muhtemelen canlı hücre sayısındaki düşüş hücre bölünmesinin durdurulmasından çok apoptozun tetiklenmesi ile ilişkili görünmektedir.

Aynı şekilde HT-29 hücrelerine anti-miR-25 uygulaması yapıldığında da negatif kontrole göre *siklin D1* ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.15). Fakat, hücrelere hem emodin uygulaması yapıldıktan sonra hem de miR-25'in susturulması sonucunda protein ifadesinde herhangi bir düşme gözlemlenmemiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Seçilen doz ve süre için hücre döngüsünde *siklin D1*'in etkili olduğu G1 fazında hücrelerin hala S fazına geçmeleri protein seviyesindeki sonuçları desteklemekte ancak emodinin hücre bölünmesini durdurmak için *siklin D1* üzerinde RNA ifadesi ve protein ifadesi açısından bir paralellik bulunmamaktadır. Buradan yola çıkarak, emodinin hücre bölünmesine test ettiğimiz doz için *siklin D1* geni üzerinden belirli bir etkisinin olmadığını veya 48 saat emodin uygulamasının hücrelerin G1'den S geçişi için gerekli siklin D1 ifadesi baskılamasını gerçekleştiremediği söylenebilir. Yüksek 80 µM doz için hücrelerin daha çok G1 de tutulduğu gözlenmiştir ancak bu konsantrasyon sitotoksik doz olduğu için bu konsantrasyonda gen ifadesi çalışılmamıştır.

Bir diğer çalışılan gen *survivin*, apoptoz proteinlerinin inhibitörlerinden ilk olarak bulunandır ve kanser hücrelerinde ifade olur (Aynacı vd., 2012). *Survivin* gen ifadesinde ki artış bazı kanserler için bir belirteç olduğu öngörülmektedir (Dai vd., 2010). Farklı çalışmalarda da emodin'in *survivin* ifadesine etki ettiği görülmüştür. Lian ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, insan myeloid lösemi hücre hattı

olan U937 hücrelerine emodin uygulaması yapılarak *survivin* ifadesine bakılmış ve ifadesinin azaldığı görülmüştür (Lian vd., 2014). HT-29 hücrelerine yaptığımız emodin uygulamasında *survivin* ifadesinin azaldığı (Şekil 4.14), anti-miR-25 uygulaması yapılan hücrelerden elde edilen veriler sonucunda ise *survivin* gen ifadesinin arttığı bulunmuştur (Şekil 4.16). Çalışmamızda emodin uygulaması ve miR-25 ifadesi baskılanması ile ortaya çıkan *survivin* ifadesindeki değişim, emodinin miR-25 ifadesi artışı ile *survivin* ifadesini düşürdüğü böylece hücrelerin apoptoza gittiği fikrini vermektedir. 2011 yılında safra kesesi kanseri hücresi olan SGC996 ile gerçekleştirilen bir çalışmada tek başına emodin kullanımının *survivin* ifadesi üzerine etkisinin olmadığı görülürken sispaltinle beraber emodin uygulamasının *survivin* ifadesini düşürerek hücreleri apoptoza sürüklediği ortaya çıkarılmıştır (Wang vd., 2010). Liu vd. (2011) tarafından yapılmış olan diğer bir çalışmada, pankreas kanseri hücresi olan SW1990'a emodin uygulaması yapılmış ve *survivin* ifadesinin düştüğü apoptozun arttığı gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda, emodinin HT-29 kolon kanserinde, hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği ve buna bağlı olarak apoptozu indüklediği görülmüştür. Fakat, emodinin hücre bölünmesi üzerine etkisi *siklin D1* üzerinden ortaya konamamıştır. Emodin uygulaması miR-25 ifadesinin HT-29 hücrelerinde artırdığı görülmüştür. Emodin uygulaması apoptoz inhibitörü olan *survivin* gen ifadesini düşürmektedir. Bu düşüşün miR25 ile ilişkisini ortaya koymak için yapılan miR-25 susturma deney sonuçları miR-25 ifadesi azalması ile *survivin* ifade artışı arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Emodin uygulaması sonucunda miR-25'in ifadesinde görülen artışın *survivin* üzerinden apoptozu indüklediği, kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı görülmüş ve buna bağlı olarak miR-25 ile apoptoz arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Fakat bu ilişkinin net bir şekilde ortaya çıkarılabilmesi için miR-25'in transfeksiyonu ile emodin uygulaması olmaksızın hücredeki *survivin* ifadesinin, ilişkili gen ifadelerinin ve eğer miR-25'in doğrudan hedefi *survivin* ise bunun ortaya konması için daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKÇA

- Aktuğ, H. 2014. Apoptozis ve hücre döngüsü. **Ege Tıp Dergisi (Ege Journal of Medicine)** 53, 1, 60-64.
- Alberts, B., Bray, D. 2004. Essential Cell Biology. New York, **Garland Science**.
- Al-Maghrabi, J., Mufti, S., Gomaa, W., Buhmeida, A., Al-Qahtani, M., Al-Ahwal, M., Immunoexpression of cyclin D1 in colorectal carcinomas is not correlated with survival outcome. 2015, **Journal of Microscopy and Ultrastructure** 3, 62–67.
- Alp Alpaslan Real-Time PCR Problemleri ve Floresan kimyası, 2012. **Hacettepe Üniversitesi kurs kitapçığı**.
- American Cancer Society, 2013. Cancer Facts & Figures 2013. [<http://www.cancer.org>], Erişim Tarihi: 17.05.2017
- Amerikan kanser derneği, 2016 [<http://www.cancer.org>] Erişim Tarihi: 02.04.2017
- Anonim, 2010. **Sağlık İstatistikleri Yıllığı**, 2010. T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara.
- Anton, R., Chatterjee, S.S., Simundza, J., Cowin, P., Dasgupta, R. 2011. A systematic screen for micro-RNAs regulating the canonical Wnt pathway. **PLoS One**, 6, e26257.
- Aynacı, E., Coşkunpınar, E., Eren, A., Kum, O., Oltulu, Y.M., Akkaya, N., Turna, A., Yaylım, İ., Yıldız, P. 2012. Survivin geni -625G/C polimorfizminin Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri ile ilişkisinin araştırılması. **Journal of Cell and Molecular Biology**, 10,1, 27-32.
- Bandrés, E., Cubedo, E., Agirre, X., Malumbres, R., Zárate, R., Ramirez, N., Abajo, A., Navarro, A., Moreno, I., Monzó, M., García-Foncillas, J. 2006. Identification by real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and nontumoral tissues. **Mol. Cancer.**, 5, 29, doi:10.1186/1476-4598-5-29.

- Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, 136, 2, 215–33, doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.
- Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 13, 1097–1101.
- Cai, J., Niu, X., Chen, Y., Hu, Q., Shi, G., Wu, H., et al. 2008. Emodin-induced generation of reactive oxygen species inhibits RhoA activation to sensitize gastric carcinoma cells to anoikis. **Neoplasia**, 10, 1, 41–51, pmid:18231637.
- Calin, G., Sevignani, C., Dumitru, C., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites ve genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci USA**, 101, 2999–3004.
- Cha, T.L., Qiu, L., Chen, C.T., Wen, Y. Hung, M.C. 2005. Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. **Cancer Res.**, 65, 2287–2295.
- Chan, A.T., Giovannucci, E.L. 2010. Primary prevention of colorectal cancer. **Gastroenterology**, 138, 2029.
- Chen, Y.C., Shen, S.C., Lee, W.R., et al. 2002. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. **Biochem. Pharmacol.**, 64, 1713–1724.
- Chen, X.H., Sun, R.S., Hu, J.M., Mo, Z.Y., Yang, Z.F., Jin, G.Y., Guan, W.D., Zhong, N.S. 2009. Inhibitory effect of emodin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 36, 146–153.
- Chen X., Yang Z., Sun R., Mo Z., Jin G., Wei F., Hu Ji., Guan W., and Zhong N., 2014. Preparation of Lung-Targeting, Emodin-Loaded Polylactic Acid Microspheres and Their Properties **Int. J. Mol. Sci.**, 15, 6241–6251; doi:10.3390/ijms15046241

- Cheng, A.M., Byrom, M.W., Shelton, J., Ford, L.P., 2005. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. **Nucleic Acids Res.** 1;33(4):1290-7, doi: 10.1093/nar/gki200
- Chun-Guang, W., Jun-Qing, Y., Bei-Zhong, L., Dan-Ting, J., Chong, W., Liang, Z. 2010. Anti- tumor activity of emodin against human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines in vitro and vivo. **Eur. J. Pharmacol.** 10, 627, 1, 3, 33–41, doi:10.1016/j.ejphar.2009.10.035, pmid:19857484.
- Corté, H., Manceau, G., Blons H., Laurent-Puig, P., MicroRNA and colorectal cancer, 2012. **Digestive and Liver Disease** 44,195–200, doi:10.1016/j.did.2011.10.010
- Coşkun, G., Özgür, H., 2011 Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması [http://cu.dergipark.gov.tr/download/article-file/25371] Erişim Tarihi: 19.09.2017
- Çelik, D.A., Kopar, P.A., Özçelik, N., 2013, MikroRNA’lar ve kanser ile ilişkisi. **S.D.Ü. Tıp Fak. Dergisi** 20(3)/121-127
- Dai, C., Li, J., Shi, S., Yu, L., Ge, L., Chen, P. 2010. Survivin and Smac Gene Expressions but not Livin Are Predictors of Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer Patients Treated with Adjuvant Chemotherapy Following Surgery. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, 2-9.
- Damodharan, U., Ganesan, R., Radhakrishnan, U.C. 2011. Expression of MMP2 and MMP9 (gelatinases A and B) in human colon cancer cells. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 165, 5, 6, 1245–52, doi: 10.1007/s12010-011-9342-8, pmid:21866366.
- DiPaola, R.S. 2002. To arrest or not to G2-M cell-cycle arrest: Commentary re: AK Tyagi et al. Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest and apoptosis. **Clin. Cancer Res.**, 8, 11, 3512-9.

- Dobrucalı, A. Kolorektal kanserde epidemiyoloji, sınıflama ve etyopatogenezi. **Kolon, rektum ve anal bölge hastalıkları**, 2003. S,395-412
- Dulic, V., Lees, E., Reed, S.I. 1992. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein-kinase. **Science**, 257, 5078, 1958-61.
- Edwards, B.K., Ward, E., Kohler, B.A. 2010. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. **Cancer**, 116, 544.
- Erson, A., Petty, E.. 2008. MicroRNAs in development ve disease. **Clin Genet**, 74,296-306.
- Esau, CC., ve Monia, BP., 2007. Therapeutic potential for microRNAs . **Advanced drug delivery reviews**, 59,2,3,101-114.
- Esposito, F., Tornincasa, M., Pallante, P., Federico, A., Borbone, E., Pierantoni, G.M., Fusco, A. 2012. Down-regulation of the miR-25 and miR-30d contributes to the development of anaplastic thyroid carcinoma targeting the polycomb protein EZH2. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 97, E710–718
- Golias, C.H., Charalabopoulos, A., Charalabopoulos, K. 2004. Cell proliferation and cell cycle control: A mini review. **Clin. Pract.**, 58, 12, 1134-41.
- Guo, J., Li, W., Shi, H., Xie, X., Li, L., Tang, H., Wu, M., Kong, Y., Yang, L., Gao, J., Liu, P., Wei, W., Xie, X. 2013. Synergistic effects of curcumin with emodin against the proliferation and invasion of breast cancer cells through upregulation of miR-34a. **Mol. Cell Biochem.**, 382, 103–111.
- Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M., Del Pozo, J.C. 2002. G(1) to S transition: More than a cell cycle engine switch. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 5, 6, 480-6.
- Güleş, Ö., Eren, Ü. 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. **Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi**, 2, 73-78.

- Han, Y.M., Lee, S.K., Jeong, D.G., Ryu, S.E., Han, D.C., Kim, D.K., Kwon, B.M. 2012. Emodin inhibits migration and invasion of DLD-1 (PRL-3) cells via inhibition of PRL-3 phosphatase activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 22, 323-326.
- Harris, T.J. et al. 2010. The molecular pathology of cancer. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, 7, 251–265.
- He, L., Bi, J., Guo, Q., Yu, Y., Ye, X., 2012. Effects of Emodin Extracted from Chinese Herbs on Proliferation of Non-small Cell Lung Cancer and Underlying Mechanisms, , **Asian Pacific J Cancer Prev**, 13, 1505-1510, DOI:<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.4.1505>
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams. P.M. 1996. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, 6, 986-994.
- Hsu, C.M., Hsu, Y.A., Tsai, Y., Shieh, F.K., Huang, S.H., Wan, L., et al. 2010. Emodin inhibits the growth of hepatoma cells: finding the common anti-cancer pathway using Huh7, Hep3B, and HepG2 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 19, 392, 4, 473–8, doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.153, pmid:19895793.
- Huang, Q., Shen, H.M., Shui, G., Wenk, M.R. Ong, C.N. 2006. Emodin inhibits tumor cell adhesion through disruption of the membrane lipid Raft-associated integrin signaling pathway. **Cancer Res.**, 66, 5807-5815.
- Huang, Z., Chen, G., Shi, P. 2009. Effects of emodin on the gene expression profiling of human breast carcinoma cells. **Cancer Detect. Prev.**, 32, 286–291, doi: 10.1016/j.cdp.2008.12.003, pmid:19185431.
- Huang, Y., Yang, Y.B., Zhang, X.H., Yu, X.L., Wang, Z.B. ve Cheng, X.C., 2013, MicroRNA-21 gene ve cancer, *Medical Oncology*, 30(376): 1-9.
- Huppi, K., Volfovsky, N., Mackiewicz, M., Runfola, T., Jones, TL., Martin, SE., 2007. MicroRNAs ve genomic instability. **Semin Cancer Biol**, 17,65-73.

- International Agency for Research on Cancer (2014a). Cancer Fact Sheets. in Globocan 2012 Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, DOI: [http:// globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).
- Joyce, D., Albanese, C., Steer, J., Fu, M., Bouzahzah, B., Pestell, R.G. 2001. NF-Kappa and cell cycle regulation: The cyclin connection. **Cytokine Growth Factor Rev.**, 12, 1, 73-90.
- Karaaslan, Ç., “Western Blott” Tekniği, 2008. **Astım Allerji İmmünoloji**, 6,1,:38-40
- Kendir, G., Güvenç, A., 2010. Etnobotanik ve Türkiye’de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış. **Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi**, 30, 1, 49-80.
- Kierszenbaum, A.L., Tres, L.L. (eds). 2006. **Histology and Cell Biology**. New York, Elsevier, ISBN:0-323-01639-1.
- Kim, M.S., Park, M.J., Kim, S.J., et al. 2005. Emodin suppresses hyaluronic acid-induced MMP-9 secretion and invasion of glioma cells. **Int. J. Oncol.**, 27, 839-846.
- Ko, J.C., Su, Y.J., Lin, S.T., Jhan, J.Y., Ciou, S.C., Cheng, C.M. 2010. Suppression of ERCC1 and Rad51 Expression through ERK1/2 Inactivation is Essential in Emodin-Mediated Cytotoxicity in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **Biochem. Pharmacol.**, 15, 79, 4, 655–64. doi:10.1016/j.bcp.2009.09.024, pmid:19799875.
- Kong, J.M., Goh, N.K., Chia L.S., 2003 Chiatet-Fatt,. Recent Advances İn Traditional Plant Drugs And Orchids. **Acta Pharmacol Sin**, 24 ,1,: 7-21
- Kwak, H.J., Park, M.J., Park, C.M., et al. 2006. Emodin inhibits vascular endothelial growth factor-A-induced angiogenesis by blocking receptor-2 (KDR/Flk-1) phosphorylation. **Int. J. Cancer.**, 118, 2711-2720.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, 294, 853–858.

- Lai, J.M., Chang, J.T., Wen, C.L., Hsu, S.L. 2009. Emodin induces a reactive oxygen species- dependent and ATM-p53-Bax mediated cytotoxicity in lung cancer cells. **Eur. J. Pharmacol.** 25, 623, 1, 3, 1–9, doi:10.1016/j.ejphar.2009.08.031, pmid:19744477.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, 294, 858–862.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, 75, 843–854.
- Lee, R.C., Ambros, V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, 294, 862–864.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J.**, 23: 4051–4060.
- Leite, K.R., Tomiyama, A., Reis, S.T., Sousa-Canavez, J.M., Saudo, A., Camara-Lopes, L.H., Srougi, M. 2011. MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer-from high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis. **Urol. Oncol.**, 128, 110-115.
- Li, X.X., Wang, J., Wang, H.L., Wang, W., Yin, X.B., Li, Q.W., et al. 2012. Characterization of cancer stem-like cells derived from a side population of a human gallbladder carcinoma cell line, SGC-996. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 23,419, 4, 728–34, doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.090, pmid:22387537.
- Li, Q., Zou, C., Zou, C., Huang, H., Jin, J., Han, Z., et al. 2013. MicroRNA-25 functions as a potential tumor suppressor in colon cancer by targeting Smad7. **Cancer Lett.**, 2, 19, 3830-3835.
- Li, X., Yang, C., Wang, X., Zhang, J., Zhang, R., Liu, R. 2013. The expression of miR-25 is increased in colorectal cancer and is associated with patient prognosis. **Med. Oncol.**, 30, 781, DOI 10.1007/s12032-013-0781-7.

- Li, X.X., Dong, Y., Wang, W., Wang, H.L., Chen, Y.Y., Shi, G.Y., et al. 2013. Emodin as an effective agent in targeting cancer stem- like side population cells of gallbladder carcinoma. **Stem Cells Dev.**, 15, 22, 4, 554–66, doi:10.1089/scd.2011.0709, pmid:22974371.
- Lian, X.L., Hu, J.D., Zheng Z.H., Chen, Y.Y. 2014. Effects of emodin on apoptosis and cell cycle related genes in U937 cells. **Journal of Experimental Hematology**. 22, 6, doi: 10.7534/j.issn.1009-2137.2014.06.007.
- Lin, S.Z., Wei, W.T., Chen, H., Chen, K.J., Tong, H.F., Wang, Z.H., Ni, Z.L., Liu, H.B., Guo, H.C., Liu, D.L. 2012. Antitumor Activity of Emodin against Pancreatic Cancer Depends on Its Dual Role: Promotion of Apoptosis and Suppression of Angiogenesis. **PLoS ONE**, 7, 8, e42146.doi:10.1371/journal.pone.0042146.
- Liu, L., Chen, L., Xu, Y., Li, R., Du, X. 2010. microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 400, 2, 236–40, doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.046.
- Liu, A., Chen, H., Wei, W., Ye, S., Liao, W., Gong, J., et al. 2011. Antiproliferative and antimetastatic effects of emodin on human pancreatic cancer. **Oncol. Rep.**, 26, 1, 81–9., doi:10.3892/or.2011.1257, pmid:21491088.
- Liu, J.X., Zhang, J.H., Li, H.H., Lai, F.J., Chen, K.J., Chen, H., et al. 2012. Emodin induces Panc-1 cell apoptosis via declining the mitochondrial membrane potential. **Oncol. Rep.**, 28, 6, 1991–6. doi:10.3892/or.2012.2042, pmid:22992976.
- Lu, Y., Zhang, J. Qian, J. 2008. The effect of emodin on VEGF receptors in human colon cancer cells. **Cancer Biother. Radiopharm.**, 23, 222-228.
- Ma, Y.S., Weng, S.W., Lin, M.W., Lu, C.C., Chiang, J.H., Yang, J.S. 2012. Antitumor effects of emodin on LS1034 human colon cancer cells in vitro and in vivo: roles of apoptotic cell death and LS1034 tumor xeno grafts model. **Food Chem. Toxicol.**, 50, 5, 1271–8, doi:10.1016/j.fct.2012.01.033, pmid:22321733.

- Macfarlane, L.A., Murphy, P.R. 2010. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. **Curr. Genomics**, 11, 537–561.
- Mahmood, T., Yang, P.C., 2012, Western blot: technique, theory, and trouble shooting. **N Am J Med Sci**. Sep;4(9):429-34. doi: 10.4103/1947-2714.100998. PubMed PMID:23050259; PubMed Central PMCID: PMC3456489.
- Marchi, S., Lupini, L., Patergnani, S., Rimessi, A., Missiroli, S., Bonora, M., et al. 2013. Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25. **Curr. Biol.**, 23, 1, 58-63.
- Marcussen, M., Larsen, P.J., 1996. Cell cycle-dependent regulation of cellular ATP concentration, and depolymerization of the interphase microtubular network induced by elevated cellular ATP concentration in whole fibroblasts. **Cell Motil Cytoskeleton** 35,94-9
- Motoyama, K., Inoue, H., Takatsuno, Y., Tanaka, F., Mimori, K., Uetake, H., Sugihara, K., Mori, M. 2009. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. **Int. J. Oncol.**, 34,4, 1069–75.
- Muto, A., Hori, M., Sasaki, Y., Saitoh, A., Yasuda, I., Maekawa, T. 2007. Emodin has a cytotoxic activity against human multiple myeloma as a Janus-activated kinase 2 inhibitor. **Mol. Cancer. Ther.**, 6, 3, 987–94.
- Nana-Sinkam, SP., ve Croce, CM., 2013. Clinical Applications for microRNAs in Cancer, **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. 93,1, 98-104.
- Ng, E.K., Chong, W.W., Jin, H., Lam, E.K., Shin, V.Y., Yu, J., Poon, T.C., Ng, S.S., Sung, J.J., 2009, Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. **Gut**, 58,10,1375-81. doi: 10.1136/gut.2008.167817.
- National Cancer Institute. Erişim Tarihi: 10 09.2017.

- Nie, J., Liu, L., Zheng, W., Chen, L., Wu, X., Xu, Y., et al. 2012. microRNA-365, down-regulated in colon cancer, inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis of colon cancer cells by probably targeting Cyclin D1 and Bcl-2. **Carcinogenesis**, 33, 1, 220–5, doi:10.1093/carcin/bgr245.
- Peng, Y., Croce, C.M. 2016. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 1, 15004; doi:10.1038/sigtrans.2015.4
- Petrocca, F., Vecchione, A., Croce, C.M. 2008. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling, **Cancer Res.**, 68, 8191–8194.
- Poliseno, L., Salmena, L., Riccardi, L., Fornari, A., Song, MS., Hobbs, RM., Sportoletti, P., Varmeh, S., Eqla, A., Fedele, G., Rameh, L., Loda, M., Pandolfi, P.P. 2010. Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. **Science signaling**. 3:ra29.
- Qiao, L., Wong, B.C. 2009. Targeting apoptosis as an approach for gastrointestinal cancer therapy. **Drug Resist. Updat.**, 12, 55–64.
- Razumilava, N., Bronk, S.F., Smoot R.L., Fingas, C.D., Werneburg, N.W., Roberts, L.R., Mott, J.L. 2012. miR-25 Targets TRAIL Death Receptor-4 ve Promotes Apoptosis Resistance in Cholangiocarcinoma. **Hepatology**, 55(2): 465–475.
- Reed, J.C. 2003. Apoptosis-targeted therapies for cancer. **Cancer Cell**, 3, 17–22.
- Rode, H.J., 2008 Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation. **4th ed. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH**;
- Sağlık Bakanlığı Türkiye halk sağlığı kurumu **Türkiye Kanser İstatistikleri 2016**, Ankara
- Sağlık Bakanlığı, Türkiye halk sağlığı kurumu, **Kanser Daire Başkanlığı**, 2017. [www.kanser.org] Erişim tarihi: 15.07.2017

- Schee, K., Boye, K., Abrahamsen, T.W., Fodstad, O., Flatmark, K. 2012. Clinical relevance of microRNA miR-21, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-106a and miR-145 in colorectal cancer. **BMC Cancer**, 12, 505. doi:10.1186/1471-2407-12-505.
- Schimanski, C.C., Frerichs, K., Rahman, F., Berger, M., Lang, H., Galle, P.R., Moehler M., Gockel, I. 2009. High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. **World J. Gastroenterol.**, 15, 17, 2089–96.
- Schwartsmann, G., Ratain, M.J., Cragg, G.M., Wong, J.E., Saijo, N., Parkinson, D.R., Fujiwara, Y., Pazdur, R., Newman, D.J., Dagher, R., Di Leone, L., 2002. Anticancer drug discovery and development throughout the world. **J Clin Oncol.** Sep 15;20(18 Suppl):47S-59S. Review. PubMed PMID: 12235225
- Selcuklu, S., Yakicier, M., Erson, A.. 2009. An investigation of microRNAs mapping to breast cancer related genomic gain ve loss regions. **Cancer Genet Cytogenet**, 189,15-23.
- Senderowicz, A.M., Sausville, E.A. 2000. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. **J. Natl. Cancer Inst.**, 92, 5, 376-87.
- Sherr, C.J. 2000. The Pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited. **Cancer Res.**, 60, 14, 369895.
- Shrimali, D., Shanmugam, M.K., Kumar, A.P., Zhang, J., Tan, B.K., Ahn, K.S., Sethi, G. 2013. Targeted abrogation of diverse signal transduction cascades by emodinfor the treatment of inflammatory disorders and cancer. **Cancer Lett.**, 341, 139–149.
- Shukla, G.C., Singh, J., Barik, S. 2011. MicroRNAs: processing, maturation, target recognition and regulatory functions. **Mol. Cell. Pharmacol.**, 3, 3, 83–92.
- Srinivas, G., Anto, R.J., Srinivas, P., Vidhyalakshmi, S., Senan, V.P. Karunagaran, D. 2003. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. **Eur. J. Pharmacol.**, 473, 117-125.

- Su, Y.T., Chang, H.L., Shyue, S.K., Hsu, S.L. 2005. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. **Biochem. Pharmacol.**, 70, 229-241.
- Sui, J., Xie, K., Zou, W., Xie, M. 2014. Emodin Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation through the ER α -MAPK/Akt-Cyclin D1/Bcl-2 Signaling Pathway. **Asian. Pac. J. Cancer. Prev.**, 15, 15, 6247-6251, DOI:<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.15.6247>.
- Tanno, B., Cesi, V., Vitali, R., Sesti, F., Giuffrida, M.L., Mancini, C., Calabretta, B., Raschella G., 2005. Silencing of endogenous IGFBP-5 by micro RNA interference affects proliferation, apoptosis and differentiation of neuroblastoma cells. **Cell Death and Differentiation**, 12, pp.213-223, doi: 10.1038/sj.cdd.4401546
- Terzioğlu, G., Keskin, A.Ü., Demirel G.Y., 2013. Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. **Türk J Immunol** 1,3,:74-89
- Thacker, P., Karunakaran, D. Curcumin and Emodin Down-Regulate TGF- β Signaling Pathway in Human Cervical Cancer Cells. 2015 **Plos One**, doi.org/10.1371/journal.pone.0120045
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R.L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C.C., Croce, C.M. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 103, 7, 2257–61, doi:10.1073/pnas.0510565103.
- Wang, W., Sun, Y.P., Huang, X.Z., He, M., Chen, Y.Y., Shi, G.Y., et al. 2010. Emodin enhances sensitivity of gallbladder cancer cells to platinum drugs via glutathion depletion and MRP1 downregulation. **Biochem. Pharmacol.**, 15, 79, 8, 1134–40, doi:10.1016/j.bcp.2009.12.006, pmid:20005210.

- Way, T., Huang, J., Chou, C., Huang, C., Yang, M., Ho, C. 2014. Emodin represses TWIST1-induced epithelial–mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the b-catenin and Akt pathways. **European Journal of Cancer**, 50, 366–378.
- Wei, E.K., Giovannucci, E., Wu, K. 2004. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. **Int. J., Cancer**, 108, 433.
- Wei, W., Lin, S., Liu, D., Wang, Z. 2013. The distinct mechanisms of the antitumor activity of emodin in different types of cancer (review). **Oncology Reports**, 30, 2555,2562.
- Winawer, S.J., Sherlock, P. 2007. Best practice and research clinical gastroenterology. **Colorectal cancer screening**, vol, 21, 6, 1031.
- Wong, M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, 39, 75-85.
- World Cancer Report 2014. **World Health Organization**. 2014. pp. Chapter 1.1.
- World Health Organization. February 2014. Erişim Tarihi: 10.09 2017.
- Wylli, A.H., Beattie, G.J., Hargreaves, A.D. 1981. Chromatin changes in apoptosis. **Histochem. J.**, 13, 681–692.
- Xie, M., Ma, Y., Miao, L., Wang, Y., Wang, H., Xing, Y., Xi, T., Lu, Y. 2014. Emodin-Provoked Oxidative Stress Induces Apoptosis in Human Colon Cancer HCT116 Cells through a p53-Mitochondrial Apoptotic Pathway. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, 15, 13, 5201-5205.
- Xing, J., Song, G., Deng, J., Jiang, L., Xiong, P., Yang, B., Liu, S. 2015. Antitumor Effects and Mechanism of Novel Emodin Rhamnoside Derivatives against Human Cancer Cells In Vitro. **Plos One**, 10,12, e0144781. doi:10.1371/journal.pone.0144781
- Xue, H., Chen, Y., Cai, X., Zhao, L., He, A., Guo, K., Zheng, X. 2013. The combined effect of survivin-targeted shRNA and emodin on the proliferation and invasion of ovarian cancer cells. **Wolters Kluwer Health Anti-Cancer Drugs**, 24, 937–944.

- Xue, Q., Sun, K., Deng, H., Lei, S., Dong, J., Li, G. 2013. Anti-miRNA-221 sensitizes human colorectal carcinoma cells to radiation by upregulating PTEN, **World J. Gastroenterol**, 28, 19, 48, 9307-9317.
- Yan, J., Marr, TG., 2005. Computational analysis of 3'-ends of ESTs shows four classes of alternative polyadenylation in human, mouse ve rat. **Genome Res**; 15,369-75.
- Yaoxian, W., Hui, Y., Yunyan, Z., Yanqin, L., Xin, G., Xiaoke, W. 2013. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway. **Cancer Cell Int.**, 16, 13, 1, 71. doi:10.1186/1475-2867-13-71, pmid:23866157.
- Yu, X.F., Zou, J., Bao, Z.J., Dong, J. 2011. MiR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. **World J. Gastroenterol.**, 17, 4711–4717.
- Yu, J., Bao, W., Lei, J. 2013. Emodin Regulates Apoptotic Pathway in Human Liver Cancer Cells. **Phytother. Res.**, 27, 251–257.
- Zhang, H., Zuo, Z., Lu, X., Wang, L., Wang, H., Zhu, Z. 2012. MiR-25 regulates apoptosis by targeting Bim in human ovarian cancer. **Oncol. Rep.**, 27, 2, 594-598.
- Zhou, Y.L., Liu, C., Dai, X.X., Zhang, X.H., Wang, O.C. 2012. Overexpression of miR-221 is associated with aggressive clinicopathologic characteristics and the BRAF mutation in papillary thyroid carcinomas. **Med. Oncol.**, 29, 3360-3366
- Zhou, J., Wang, J., Wu, S., Zhu, S., Wang, S., Zhou, H., Tian, X., Tang, N., Nie, S. 2014. Angiopoietin-like protein 2 negatively regulated by microRNA-25 contributes to the malignant progression of colorectal cancer. **International journal of molecular medicine**, 34, 1286-1292.
- Zu, C., Zhang, M., Xue, H., Cal, X., Zhao, L., He, A., Qin, G., Yang, Zheng, 2015, Emodin induces apoptosis of human breast cancer cells by modulating the expression of apoptosis-related genes, **Oncology Letters**, 10(5): 2919–2924, doi:10.3892/ol.2015.3646

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : İlkem CEYLAN

Doğum Yeri Ve Tarihi : Söke – 01.01.1986

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü.

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

A) Yayınlar

-

B) Bildiriler

□ Uluslararası Kongreler

Ceylan İ., Yavasoglu Sİ., Bursalı F., Yaylagül EÖ., Akıner M., Çağlar SS., Şimsek FM., and Ulger C., Knockdown resistance of Anopheles sacharovi and Anopheles superpictus populations in Southern Turkey., 13th ICZEGAR (International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions),7-11/10/2015, Irakleio, GREECE, Poster.

Yaylagül EÖ., Yavasoglu Sİ., Köşlütöğlü Ç., **Ceylan İ.**, Akıner M., Çağlar SS., Şimsek FM. and Ulger C., Determination of Glutathione S-Transferase and Acetylcholine Esterase Enzymes Activities of Anopheles sacharovi Populations in Turkey. 13th ICZEGAR (International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions),7-11/10/2015, Irakleio, GREECE, Poster.

Şimsek FM., **Ceylan İ.**, Bursalı F., Yavasoglu Sİ., Örenlili E., Akiner M., Çağlar SS. and Ülger C., Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles sacharovi* and *Anopheles superpictus* based on ace-1 mutation in Turkey., 19th E-SOVE (European Society for Vector Ecology) Conference, 14-17/09/2014, Thessaloniki, Greece, Poster.

Yaylagül E.O., Babat Y., **Ceylan İ.**, Akat E., Ülger C., The effect of Baicalein on miR-25 and PDCD6IP expression in osteosarcoma cell line Saos-2, 3rd International Congress of Molecular Biology and Biotechnology, 02-06/06/2014, Sarajevo/Bosnia-Herzegovina, Oral presentation, 04/06/2014.

□ **Ulusal Kongreler**

Yaylagül E.Ö., Babat Y., **Ceylan İ.**, Ülger C., Baicaleinin osteosarkoma hücre hattı Saos-2 hücrelerinde miR-25 ve hedef gen ifadesi üzerine etkisi., 22.Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27/06/2014, Eskişehir, Sözlü sunum, 24/06/2014.

Ceylan İ., Yaylagül E.Ö., Şahin B.A., Ülger C., İnsan kolon kanseri Ht-29 hücre hattında Emodin uygulamasının CYP1A1 gen ifadesine etkisi, 22.Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27/06/2014, Eskişehir, Sözlü sunum, 25/06/2014.

Yaylagül E.Ö., Babat Y., **Ceylan İ.**, Ülger C., Osteosarkoma hücre hattı Saos-2 hücrelerine Baicalein uygulamasının miR-25 ifadesine etkisi, XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası katılımlı), 27-30/10/2013, Aydın, Poster, 29/10/2013.

Ceylan İ., Şahin A. Burcu, Babat Y., Yaylagül E.Ö., Ülger C., Meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücrelerine Escin uygulamasının p21 gen ifadesine etkisi, XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası katılımlı), 27-30/10/2013, Aydın, Poster, 27/10/2013.

C) Katıldığı Projeler

01/2014-01/2017: Ht-29 İnsan Kolorektal Kanser Hücre Hattında Emodin'in Mir-25 İfadesine Etkisi (Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: Fef-15020, Araştırmacı)

01/2013–01/2016: Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu, Akdeniz ve Ege Bölgelerinde Anopheles (Culicidae: Diptera) Türlerinin İnsektisit Direnci (TÜBİTAK Projesi, Proje No: 112T479, Bursiyer öğrenci)

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : ilkemceylan@gmail.com

Tarih 18/01/2018