



**İNSAN BAŞ VE BOYUN SKUAMÖZ HÜCRELİ
KARSİNOMLARINDA MİR-1825'İN ROLLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Özel ÇAPIK

Doktora Tezi

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ**

2023

Her hakkı saklıdır.



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

İNSAN BAŞ VE BOYUN SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMLARINDA
MİR-1825'İN ROLLERİNİN BELİRLENMESİ

Özel ÇAPIK

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2023

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

08 / 03 / 2023

Özel ÇAPIK

ÖZET

DOKTORA TEZİ

İNSAN BAŞ VE BOYUN SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMLARINDA MİR-1825'İN ROLLERİNİN BELİRLENMESİ

Özel ÇAPIK

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinoma (BBSHK), yılda yaklaşık 600.000 yeni vaka ile dünya çapında görülen en yaygın altıncı kanserdir. Son yıllarda BBSHK'nin tanı ve tedavisinde önemli gelişmeler olmasına rağmen hala kanser nedeni ölümlerin dikkate değer sebeplerinden biridir ve ileri BBSHK vakalarına karşı yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve onkogenlerin karakterize edilmesi acil bir gerekliliktir. Bu tez çalışmasında, miR-1825'in BBSHK patogenezindeki *in vitro* ve *in vivo* rollerinin anlaşılması, olası yeni hedef genlerinin belirlenmesi ve BBSHK hücrelerinden türetilen eksozomların hipoksik koşullar altında anjiyogenez oluşumu üzerine etkilerinin *in vitro* testlerle araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda BBSHK hücrelerinde miR-1825 dereglasyonunun hücre canlılığı, göçü, invazyonu, apaptozu gibi kanser ilişkili fenotipler ile hücrelerin kök hücre potansiyelleri üzerine etkileri bir kısım *in vitro* testlerle incelenerek ortaya çıkarıldı. MiR-1825'in ifadesinin ektopik olarak artırıldığı veya azaltıldığı BBSHK hücrelerinde miR-1825'in potansiyel hedeflerini belirlemek için gen mikrodizin analizi yapıldı ve ifadesi anlamlı olarak değişen olası aday hedef genler tespit edildi. Ayrıca ektopik miR-1825 aşırı ifadesinin BBSHK hücrelerinin tümör oluşturma kapasitesini artırıcı yönde etki ettiği *in vivo* NUDE fare modelinde gösterildi. Ek olarak, miR-1825'in BBSHK oluşumunda mikroçevre üzerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla hipoksik koşullara maruz kalan BBSHK'li hücrelerde ve bu koşullarda hücrelerden salınan eksozomlarda miR-1825 seviyesinin arttığı gösterildi. Hipoksik koşullarda salınımı artan eksozomların ve eksozomlarca taşınan miR-1825'in damar endotel hücrelerinin (HUVEC) anjiyogenik potansiyelini artırdığı bir kısım *in silico* analizlerle ve *in vitro* çalışmalarla ortaya çıkarıldı. Elde ettiğimiz bulgularla BBSHK gelişiminde miR-1825/FREM1 aksisinin rol aldığı ve BBSHK oluşumuna bağlı olarak oluşabilecek hipoksik koşullarda eksozomal miR-1825'in TSC2/mTOR aksisini hedefleyerek anjiyogenez oluşumunu uyardığı ortaya konuldu.

2023, 121 sayfa

Anahtar Kelimeler: Baş ve Boyun Kanserleri, miR-1825, Eksozom, Anjiyogenez, Hipoksi

ABSTRACT

Ph.D

IDENTIFICATION OF THE ROLES OF MİR-1825 IN HUMAN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMAS

Özel ÇAPIK

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) are the sixth most common malignant cancer worldwide. Although the therapeutic modalities currently used for patients with HNSCC improved in recent decades, it is an urgent necessity to understand the pathogenesis of HNSCC, to develop novel treatment strategies and to characterize the oncogenes that are responsible for aggressive HNSCC phenotype. In this thesis study, it was aimed to understand the roles of miR-1825 in the pathogenesis of HNSCC, to identify possible new target genes and investigating the potential roles of HNSCC-derived exosomes on angiogenesis under hypoxic conditions by *in vitro* and *in vivo* tests. We examined the impacts of miR-1825 deregulation on the cancer associated phenotypes using *in vitro* tests evaluating cell viability, clonogenicity, cell migration, invasion, apoptosis and stem cell characteristics. Gene microarray analysis was performed to identify potential targets of miR-1825 in HNSCC cells. It has also been shown using NUDE mice *in vivo* that ectopic miR-1825 overexpression has a stimulating potential on the tumorigenic capacity of HNSCC cells. In addition, in order to reveal the effects of miR-1825 on the microenvironment in the formation of HNSCC, we showed that the level of miR-1825 increased in cells with HNSCC exposed to hypoxic conditions and in exosomes released from these cells. Our findings, it has been revealed that miR-1825/FREM1 axis plays a mediator role in the development of HNSCC and that exosomal miR-1825 stimulates the formation of angiogenesis by targeting the TSC2/mTOR axis in hypoxic conditions that may occur due to HNSCC formation.

2023, 121 page

Keywords: Head and Neck Cancers, miR-1825, Exosome, Angiogenesis, Hypoxia

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca derin bilgi ve tecrübesi, sabrı ve anlayıőıyla her zaman en büyük motivasyon kaynağım olan, nezaketi ve zengin fikirleriyle bana yol gösteren, desteğini her an hissetiğim kendisiyle çalıőmaktan onur ve mutluluk duyduğum çok kıymetli bilge danıőmanım Sn. Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ'a

Cancer Therapeutics Lab ekibimiz, Abdülmelik AYTATLI, Ahsen KILINÇ, Fatma ŐANLI, Muhammed Süleyman ÇELİK ve Nesliőah BARLAK'a

Ve hep yanımda olan sevgili aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Bu tez alıőması TÜBİTAK tarafından 118Z767 ve 121Z004 nolu proje ile desteklenmiőtir.

Özel ÇAPIK
Mart 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser Nedir?.....	1
1.2. Baş ve Boyun Kanseri.....	2
1.2.1. Larenks kanseri.....	4
1.2.2. Farenks kanseri.....	5
1.2.3. Dil kanseri.....	7
1.3. MikroRNA'lar.....	8
1.4. MikroRNA Biyogenezi.....	10
1.5. MikroRNA ve Kanser.....	12
1.6. MiR-1825 ve Hedef Genler.....	14
1.7. Eksozom.....	17
1.8. Eksozom Biyogenezi.....	19
1.9. Anjiyogenez, Hipoksi ve Kanser Mikroçevre İlişkisi.....	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. Materyal.....	31
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. <i>In siliko</i> araçlarla miR-1825'in onkogenik potansiyellerinin belirlenmesi.....	36
3.2.2. Normal ve tümörlü baş boyun kanseri doku örneklerinin temini ve arşivlenmesi.....	37
3.2.3. Hücre hatlarının temini ve kültüre edilmesi.....	38
3.2.4. Dokulardan TRIzol ile RNA izolasyonu.....	39
3.2.5. Hücrelerden RNA izolasyonu.....	39
3.2.6. cDNA/miRNA cDNA sentezi ve qRT-PCR.....	40

3.2.7. Hücre sayımı	42
3.2.8. Hücrelerin 6-kuyucuklu, 24 kuyucuklu ve 96-kuyucuklu platelere ekilmesi	43
3.2.9. MikroRNA transfeksiyonu	43
3.2.10. MiR-1825'in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerinin araştırılması	43
3.2.11. MiR-1825'in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin göçü üzerindeki etkilerinin araştırılması	44
3.2.12. MiR-1825'in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin invazyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması	44
3.2.13. MiR-1825'in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin koloni oluşumu üzerindeki etkilerinin araştırılması	45
3.2.14. MiR-1825'in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin kürecik oluşumu üzerindeki etkilerinin araştırılması	45
3.2.15. MiR-1825'in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin hücre apoptozu üzerindeki etkilerinin araştırılması	46
3.2.16. Aldehid dehidrojenaz aktivite testi	46
3.2.17. Gen ifadesi mikroarray analizi	46
3.2.18. <i>In siliko</i> araçlarla mikroRNA hedef tahmini	47
3.2.19. Western blot analizi	48
3.2.20. Lusiferaz raportör testi	49
3.2.21. İmmünohistokimyasal analiz	50
3.2.22. NUDE farelerde <i>in vivo</i> tümör modellerinin oluşturulması	50
3.2.23. CoCl ₂ ile kimyasal hipoksi modelinin oluşturulması	52
3.2.24. Hipoksik şartlarda kültürlenmiş baş ve boyun skuamöz karsinomlu hücrelerden türetilen eksozomların izolasyonu ve karakterizasyonu	53
3.2.25. Eksozom etiketleme	54
3.2.26. Endotel hücrelere miRNA transfeksiyonuna eş zamanlı olarak eksozom uygulaması	55
3.2.27. Hücrelerden ve eksozomlardan RNA izolasyonu	55
3.2.28. cDNA/miRNA cDNA sentezi ve qRT-PCR	55
3.2.29. MiR-1825'in ve hipoksik indüklü kanser türevli eksozomların HUVEC hücrelerinin göçü üzerine etkilerinin araştırılması	57
3.2.30. MiR-1825'in ve hipoksik indüklü kanser türevli eksozomların HUVEC hücrelerinin invazyonu üzerine etkilerinin araştırılması	57

3.2.31. MiR-1825'in ve hipoksik indüklü kanser türevli eksozomların HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma potansiyeli üzerine etkilerinin araştırılması	58
3.2.32. MiR-1825'in ve hipoksik indüklü kanser türevli eksozomların HUVEC hücre küreciklerinin oluşturduğu anjiyojenik uzantıların oluşumu üzerine etkilerinin araştırılması.....	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	60
4.1. MiR-1825 BBSHK İçin Potansiyel Onkogenik Bir MikroRNA'dır.....	60
4.2. BBSHK ve Normal Ağız İçi Fibroblast Hücrelerinde Artan ve Azalan miR-1825 İfadesi BBKa Progresyonu ile İlişkili Hücrel Fenotipler Üzerinde Etkilidir	64
4.3. BBSHK ve Normal Ağız İçi Fibroblast Hücrelerinde Artan ve Azalan MiR-1825 İfadesi Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMG) ve Kök Hücre Özellikleri ile İlişkili hücrel Fenotipler Üzerinde Etkilidir	69
4.4. MiR-1825'in BBSHK Hücrelerinde Artmış İfadesi <i>In Vivo</i> Tümör Gelişimi ile İlişkilidir.....	74
4.5. FREM1, MiR-1825'in Doğrudan Hedefidir	79
4.6. MiR-1825'in İfadesi Hipoksi Sonucunda Hem Tümör Hücrelerinde Hem de Tümör Hücrelerinden Salınan Eksozomlarda Artar.....	85
4.7. MiR-1825 Endotel Hücrelerinin Anjiyojenik Potansiyelini Artırır	89
4.8. Kanser Türevli Hipoksik Eksozomlar MiR-1825 İçerikleri Aracılığıyla Anjiyojenezi İndükler	93
4.9. Hipoksik İndüklü Tümör Eksozomları MiR-1825/TSC2/mTOR Yolağı Aracılığı ile HUVEC Hücrelerinin Anjiyojenez Potansiyelini Artırır.....	98
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	104
KAYNAKLAR	110

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

°	Derece
<	Küçük
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
V	Volt
%	Yüzde

Kısaltmalar

BBSHK	Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinoma
CoCl ₂	Kobalt Klorür
DSHK	Dil Skuamöz Hücreli Karsinoma
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EBV	Epstein-Bar Virüsü
FKa	Farenks Kanseri
FSHK	Farenks Skuamöz Hücreli Karsinoma
GEO	Gene Expression Omnibus
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
LSHK	Larenks Skuamöz Hücreli Karsinoma
LKa	Larenks Kanseri
RNA	Ribonükleik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kanser oluşum süreci (Leja D 2023)'den değiştirilerek alınmıştır	1
Şekil 1.2. Baş ve boyunda olası kanser bölgelerinin gösterimi (Johnson et al. 2023) den değiştirilerek alınmıştır.....	3
Şekil 1.3. Dünya genelinde GLOBOCAN 2020 verilerine göre elde edilen BBSHK insidansı ve ölüm oranları (Anonymous 2020)'den değiştirilerek alınmıştır.	4
Şekil 1.4. MikroRNA'lar yaklaşık 18-24 nükleotit uzunluğunda, tek zincirli RNA'lardır	9
Şekil 1.5. MikroRNA'ların biyogenezi (O'Carroll et al. 2012)'den değiştirilerek alınmıştır.	11
Şekil 1.6. Onkogen ve tümör süpresör mikroRNA'ların karsinogenez süreçlerindeki fonksiyonları (Esquela-Kerscher and Slack 2006)'dan değiştirilerek alınmıştır.	14
Şekil 1.7. Ekstrasellüler veziküllerin yapısı (Lai et al. 2022)'den değiştirilerek alınmıştır.	18
Şekil 1.8. Eksozomların yapısı ve içeriği (Calvo and Izquierdo 2022)'den değiştirilerek alınmıştır.	19
Şekil 1.9. Eksozomların içerikleri, biyogenezi ve hedef hücrelere alınma yolları (Liu et al. 2021)'den değiştirilerek alınmıştır.	22
Şekil 1.10. Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF1 α aktivitesi (Lin et al. 2014)'den alınmıştır	25
Şekil 4.1. GSE41282 (Renal hücreli karsinom), GSE53992 (Kolanjiyokarsinom), GSE47841 (Over kanseri) ve GSE31164 (Hepatoselüler karsinom) numaralı GEO verilerinin analiz sonucu.....	60
Şekil 4.2. MiR-1825 ifadesinin baş ve boyun hastalarında sağkalıma etkisi.....	61
Şekil 4.3. Baş boyun tümör ve normal doku örneklerinde miR-1825 ifade seviyesi	63
Şekil 4.4. Baş boyun tümör ve normal doku örneklerinde T evresi, grade ve N evresine göre miR-1825 ifade seviyesi.	63
Şekil 4.5. Transfeksiyon öncesi hücrelerde endojen miR-1825 ifade düzeyi.....	64
Şekil 4.6. Transfeksiyon sonrası hücrelerde miR-1825 ifade düzeyi	65

Şekil 4.7. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde zamana bağlı hücre canlılık değişimi.	65
Şekil 4.8. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde zamana bağlı hücre canlılık değişimi.	66
Şekil 4.9. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde hücre göçü değişimi	66
Şekil 4.10. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde hücre göçü değişimi	67
Şekil 4.11. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde hücre invazyonu değişimi	67
Şekil 4.12. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde hücre invazyonu değişimi.	68
Şekil 4.13. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde apoptotik aktivite değişimi.	68
Şekil 4.14. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde kürecik oluşturma potansiyeli değişimi.	69
Şekil 4.15. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde kürecik oluşturma potansiyeli değişimi.	70
Şekil 4.16. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde koloni oluşturma potansiyeli değişimi.	70
Şekil 4.17. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde koloni oluşturma potansiyeli değişimi.	71
Şekil 4.18. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde ALDH aktivitesi	72
Şekil 4.19. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde ALDH aktivitesi.....	72
Şekil 4.20. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde EMT ve kök hücre işaretçilerinin ifadeleri.	73
Şekil 4.21. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde EMT ve kök hücre işaretçilerinin ifadeleri.	74
Şekil 4.22. Hep-2 ve FaDu hücrelerinde stabil olarak yüksek düzeyde ifade edilen miR-1825'in ifade düzeyi.	75
Şekil 4.23. MiR-1825'i stabil olarak yüksek düzeyde ifade eden Hep-2 ve FaDu hücrelerinde zamana bağlı artmış canlılık seviyesi.....	75
Şekil 4.24. Deney süresince farelerin vücut ağırlıklarındaki değişim	76
Şekil 4.25. Deney sonrası farelerin deri altında oluşan tümörlerde miR-1825 seviyesi	77

Şekil 4.26. MiR-1825'i yüksek düzeyde ifade eden hücreler ile kontrol grubu hücrelerin oluşturduğu tümör hacimlerinin zamana bağlı grafiği.....	77
Şekil 4.27. MiR-1825'i yüksek düzeyde ifade eden hücreler ile kontrol grubu hücrelerin oluşturduğu tümör ağırlıkları.	78
Şekil 4.28. Farelerin deri altında oluşan tümörlerin histopatolojik incelemesi sonucu elde edilen Ki-67 ve H&E görüntüleri.....	78
Şekil 4.29. Farelerin akciğerlerinde gelişebilecek uzak metastaz bölgelerinin histopatolojik incelemesi sonucu elde edilen H&E görüntüleri.....	79
Şekil 4.30. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş Hep-2 hücrelerinde anlamlı olarak değişim gösteren genlerin profilinin ısı haritası gösterimi (İK-İnhibitör Kontrol, İ-İnhibitör, MK-Mimik Kontrol, M-Mimik).....	80
Şekil 4.31. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde hedef genlerin ifade seviyeleri.	81
Şekil 4.32. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde hedef genlerin ifade seviyeleri.	81
Şekil 4.33. Baş ve boyun kanseri örneklerinde FREM1 ifade seviyesi.....	82
Şekil 4.34. Baş ve boyun kanseri hastalarında FREM1 ifadesinin sağ kalıma etkisi.....	82
Şekil 4.35. Transfeksiyon yapılmayan hücrelerde endojen FREM1'in mRNA ve protein düzeyinde ifade seviyesi.	83
Şekil 4.36. HEK-293 hücrelerine miR-1825 ve FREM1 3'UTR plazmidini'nin eş zamanlı transfeksiyonu sonrası hücrelerde lusiferaz aktivite seviyesi.....	83
Şekil 4.37. miR-1825 transfekte edilen hücrelerde FREM1 ifadesinin protein düzeyinde ifade seviyesi.	84
Şekil 4.38. BBSHK hasta doku örneklerinde FREM1 ifadesinin temsili görüntüsü ve farklı FREM1 ifade skoruna sahip hasta sayısı (x200) (n=21) (Kırmızı ok-normal epitel alan, Beyaz ok-tümör alanı).....	85
Şekil 4.39. CoCl ₂ ile muamele edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde zamana bağlı hücre canlılık değişimi.	86
Şekil 4.40. CoCl ₂ ile muamele edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde hipoksik markerların ifade değişimi (*P < 0,05).	86
Şekil 4.41. Hipoksik koşullara maruz kalan hücrelerde miR-1825 ifade seviyesi.....	87
Şekil 4.42. Kanser türevli hipoksik eksozomların karakterizasyonu.....	88
Şekil 4.43. Kanser türevli hipoksik eksozomların membran düzeyinde karakterizasyonu	88

Şekil 4.44. Kanser türevli hipoksik eksozomlarda endojen miR-1825 ifade seviyesi.....	89
Şekil 4.45. Transfeksiyon sonrası HUVEC’lerde miR-1825 ifade düzeyi	90
Şekil 4.46. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş HUVEC’lerde zamana bağlı hücre canlılık değişimi.	90
Şekil 4.47. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş HUVEC’lerde hücre göçü değişimi.	91
Şekil 4.48. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş HUVEC’lerde hücre invazyonu değişimi.	91
Şekil 4.49. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş HUVEC’lerde tüp oluşum potansiyelinin değişimi.....	92
Şekil 4.50. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş HUVEC’lerde anjiojenez potansiyelinin değişimi.....	92
Şekil 4.51. PKH67 etiketli eksozomların HUVEC lere taşındığının konfokal görüntüsü.....	93
Şekil 4.52. HUVEC lere taşınan eksozomal miR-1825’in ifade seviyesi	94
Şekil 4.53. Kanser türevli eksozomal miR-1825 ile muamele edilen HUVEC lere hücre canlılık seviyesi.	94
Şekil 4.54. Kanser türevli eksozomal miR-1825 ile muamele edilen HUVEC lere POFUT1 ifade seviyesi.	95
Şekil 4.55. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC lere miR-1825 ifade seviyesi.	95
Şekil 4.56. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC lere hücre canlılık seviyesi.	96
Şekil 4.57. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC lere hücre göçü değişimi.....	96
Şekil 4.58. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC lere hücre invazyonu değişimi.	97
Şekil 4.59. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde tüp oluşum potansiyelinin değişimi.	97
Şekil 4.60. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde anjiojenez potansiyelinin değişimi.	98

Şekil 4.61. Hipoksik koşullar altında HUVEC hücrelerinde ifade seviyesi değişen ve tahmini miR-1825 hedef genlerinin gösterimi (GSE12546).	99
Şekil 4.62. HEK-293 hücrelerine miR-1825 ve TSC2 3'UTR plazmidi'nin eş zamanlı transfeksiyonu sonrası hücrelerde lusiferaz aktivite seviyesi.	100
Şekil 4.63. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilen HUVEC hücrelerinde TSC2 ifade seviyesi.	100
Şekil 4.64. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde TSC2 ifade seviyesi.	101
Şekil 4.65. TSC2'nin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu içinde lokalizasyonu (TCGA) ...	101
Şekil 4.66. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilen HUVEC hücrelerinde mTOR ifade seviyesi.	102
Şekil 4.67. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde mTOR ifade seviyesi.	102
Şekil 4.68. Tümör kaynaklı eksozomal miR-1825'in endotel hücreler ile etkileşiminin ve tümör anjiyogenezi ile bağlantılı olarak miR-1825/TSC2/mTOR yolağının şematik gösterimi.	103

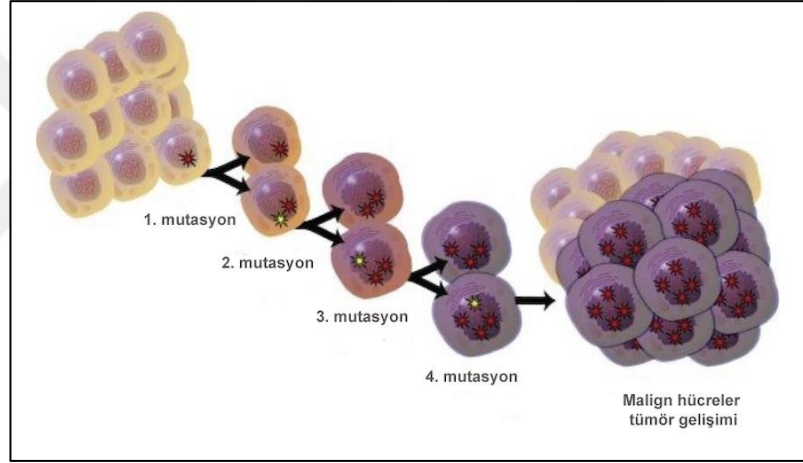
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	31
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.....	33
Çizelge 3.3. Kök hücre ve EMG belirteç genlerinin ifadelerinin belirlenmesinde kullanılan primer dizileri	41
Çizelge 3.4. MiR-1825 hedef genlerinin ifadelerinin belirlenmesinde kullanılan primer dizileri	42
Çizelge 3.5. MiRNA'ların hedef genlerinin tahmin edilmesinde kullanılan <i>in silico</i> programlar.....	48
Çizelge 3.6. FREM1 ve TSC2 3'UTR klonlama primer dizileri	49
Çizelge 3.7. FREM1 3'UTR site directed mutagenesis primer dizileri	50
Çizelge 3.8. Çalışma kapsamında kullanılacak deney grupları	51
Çizelge 3.9. Hipoksik marker primer dizileri	56
Çizelge 4.1. Hastaların klinik-patolojik bilgileri.	62

1. GİRİŞ

1.1. Kanser Nedir?

Kanser, vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilen çok aşamalı bir süreç neticesinde normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesi ile mevcut sınırlarının ötesinde kontrolsüz bir şekilde büyüyerek diğer organlara yayılabilen bir neoplazma olarak tanımlanmaktadır (Sung et al. 2021). Kanser, hücre bölünmesi, büyümesi ve metabolizmasını düzenleyen onkogen ve tümör süpresör genlerde meydana gelen mutasyonların, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesi sonucu oluşan bir hastalıktır (Hanahan and Weinberg 2011; Duarte et al. 2012) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Kanser oluşum süreci (Leja D 2023)'den değiştirilerek alınmıştır

Kanser, tarih boyunca insan ve hayvanlarda görülebilen bir hastalık olmuştur. Edinilen ilk yazılı kayıtlara göre kanser için milattan önce 460-370 yılları arasında yaşayan tıbbın babası olarak bilinen Hipokrat tarafından ilk defa ülser oluşturmeyen tümör için “carcinosis” ve ülser oluşturan tümör için “carcinoma” terimleri kullanılmıştır. Kanser hücrelerinin parmak benzeri uzantılarının yengeçleri (cancer) andırması dolayısıyla MÖ 25-MS 50 yılları arasında Roma’lı hekim Celcus tarafından da bu hastalık için “cancer” ifadesi kullanılmaya başlanmıştır. Yunan doktor Galen (MS 130-200) ise tümörleri tanımlamak için Yunanca’da şişlik anlamına gelen oncos kelimesini kullanmıştır (Anonymous 2023).

1. GİRİŞ

Hücre biyolojisinin 1900'lü yıllarda aydınlatılması için gerçekleştirilen çok sayıda çalışma, kanser patogenezinin de anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Onkogen ve tümör süpresör genlerin 1970'li yıllardaki keşfiyle birlikte de kanserin moleküler tanımı yapılmaya başlanmıştır. Günümüze kadar buldukları organa ve köken aldıkları hücre türüne göre 200'den fazla kanser türü ve 100'den fazla kanser çeşidinin olduğu tahmin edilmiştir (Committee 2022; Williams et al. 2022). Hücre biyolojisinin anlaşılması, insan genom projesinin sonuçlandırılması ve mikroarray teknolojileri ile yeni nesil dizileme teknolojisinin geliştirilmesi adına gerçekleştirilen çok sayıda önemli çalışma ile kanserin, popülasyonlardan bireylere, moleküler düzeyden genetik materyaldeki değişikliklere kadar bir çok düzeyde farklılıklar gösteren oldukça kompleks bir hastalık olduğu ortaya çıkarılmıştır (Stratton et al. 2009; Arnedos et al. 2014; Zhao et al. 2019).

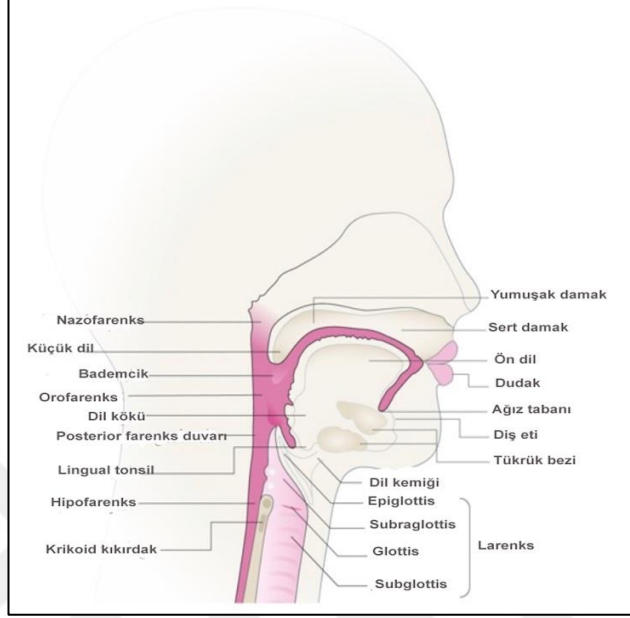
Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünya çapında en yaygın görülen ikinci hastalık olarak rapor edilmiştir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansının (IARC) paylaştığı en son küresel kanser verilerine göre 2020'de dünya çapında yaklaşık 19,3 milyon kişiye kanser teşhisi konmuştur ve kanser ilişkili ölüm sayısı 10 milyon olarak bildirilmiştir (Anonymous 2020; Siegel et al. 2022). Ülkemizde ise 2020 kanser istatistiklerine göre yeni kanser vaka sayısı yaklaşık 234 bin kişi olarak belirlenmiş ve kansere bağlı ölüm sayısı ise yaklaşık 127 bin kişi olarak bildirilmiştir (Sung et al. 2021). Dünya'da her 8 erkekten ve her 11 kadından 1'i kanser nedeniyle yaşamını yitirirken, ülkemizde ise kanser, her 5 ölümden birinin sebebi olarak rapor edilmiştir (Sung et al. 2021; Siegel et al. 2022). Gelecek 20 yıl içerisinde de kanser için beklenen tahmini vaka sayısının %47'lik bir artışla yaklaşık 30 milyon olması beklenmektedir (Anonymous 2020; Sung et al. 2021). Bütün bu bilgiler ışığında, kanserin moleküler patolojisinin aydınlatılması, kanser tanısı ve tedavisine yönelik kullanılacak yeni yöntem, uygulama ve araştırmaların geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

1.2. Baş ve Boyun Kanseri

Baş ve boyun kanseri (BBK), üst solunum ve sindirim yolları (dudaklar, ağız boşluğu, burun boşluğu, orofarinks, nazofarenks, hipofarinks ve gırtlak/üst trakea), tükürük bezlerinde tutulumu olan ve bu bölgelerle ilişkili lenfadenopatiyi içeren epitelyal malignitelerdir (Owens et al. 2022). Baş ve boyun kanseri, yılda yaklaşık 600.000 yeni

1. GİRİŞ

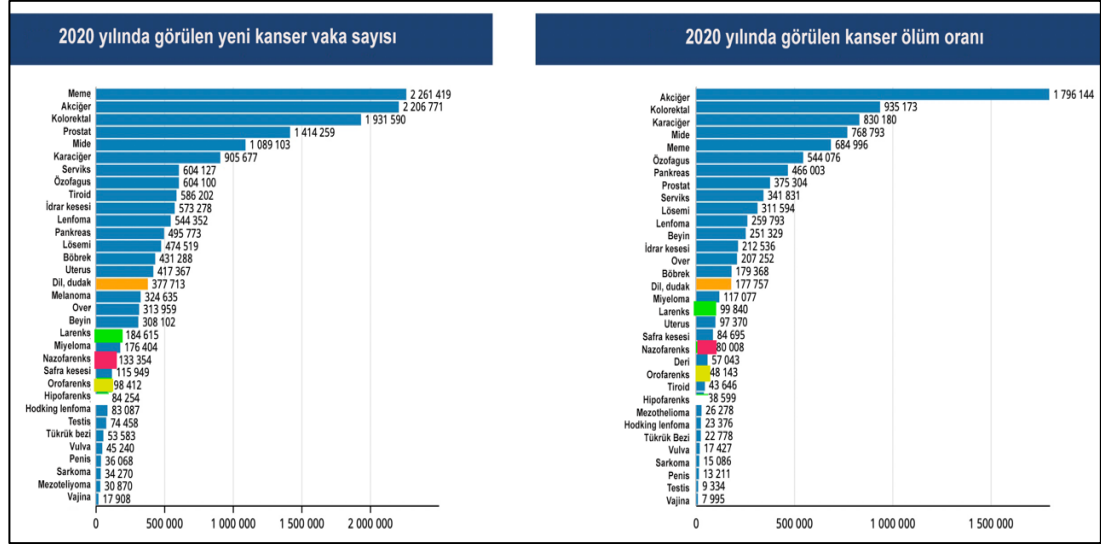
vaka ile dünya çapında görülen en yaygın altıncı kanserdir ve bu tümörlerin %90'ı mukozal baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlardır (BBSHK) (Leemans et al. 2018; Moskovitz et al. 2018; Alshafı et al. 2019; Johnson et al. 2020) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Baş ve boyunda olası kanser bölgelerinin gösterimi (Johnson et al. 2023) den değiştirilerek alınmıştır.

BBSHK için uzun süreli tütün kullanımı, alkol tüketimi, yüksek riskli insan papilloma virüs (HPV) türleri ve Epstein-Barr virüsü (EBV) ile enfeksiyon, ana onkojenik etkenler olarak kabul edilmektedir (Alshafı et al. 2019). BBSHK'lı hastaların tedavisinde genellikle radyo-terapi (RT), kemo-terapi (KT), immün terapi, kombine tedavi ya da cerrahi yöntemler uygulanmaktadır (Moskovitz et al. 2018). BBSHK'da son derece yaygın görülen lenf nodu metastazı ve lokal nüks oranı, yüksek ölüm ve düşük sağ kalım (%40-50) oranının temel sebebi olarak belirlenmiştir ve bu etmenler erken tanıdaki başarısızlık ile birlikte hastaların tedavi sürecinin zorlaşmasına ve yaşam kalitesinin olumsuz yönde etkilenmesine sebep olmuştur (Magnes et al. 2021; Wang et al. 2021). Günümüzde yapılan birçok çalışmada daha etkili tedavilere yönelik bir kısım erken tanı biyobelirteçlerinin tanımlanması ile yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi hedeflenmektedir.

1. GİRİŞ



Şekil 1.3. Dünya genelinde GLOBOCAN 2020 verilerine göre elde edilen BBSHK insidansı ve ölüm oranları (Anonymous 2020)'den değiştirilerek alınmıştır.

1.2.1. Larenks kanseri

Larenks (gırtlak), boynun ön tarafında trakea üstünde, yemek borusuna paralel olarak bulunan, stromal ve epitelyal dokulardan oluşmuş kıkırdak yapıda bir organdır (Marur and Forastiere 2016). Larenks, konuşma, yutma, solunum ve alt solunum yollarının korunması gibi birçok önemli fonksiyona sahiptir (Nocini et al. 2020). Larenks, anatomik olarak supraglottik, glottik ve subglottik olmak üzere 3 bölgeden oluşmaktadır. Glottik bölge, ses tellerinin bulunduğu orta kısımdır. Subraglottik bölge, damar yönünden zengin olup lenfatik yayılımın en fazla olduğu, glottik bölgenin üzerinde kalan kısımdır. Subglottik bölge ise glottik bölgenin altında kalan trakea olarak devam eden kısımdır. Larenks kanseri (LKa)'nin yerleşimi bazı ülkelere göre farklılık gösterebilir genel olarak vakaların büyük bir kısmının (%55-60) glottik bölgelerde meydana geldiği gösterilmiştir (Hoffman et al. 2006). Larenks'in her üç bölgesinde de meydana gelen tümörlerin %96'sı yüzey epitelden köken alan skuamöz hücreli karsinomdan (SHK) oluşmaktadır (Steuer et al. 2017).

Larenks skuamöz hücreli karsinom (LSHK), dünya çapında görülen yeni vakaların yaklaşık %2-5'ini, baş boyun kanserlerinin ortalama %25'ini oluşturmaktadır ve baş boyun tümörleri arasında görülme sıklığı en yüksek olan kanser türüdür. GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünya genelinde yeni larenks kanser vaka sayısı

1. GİRİŞ

yaklaşık 185.000, kansere bağlı ölüm sayısı ise yaklaşık 100.000 olarak bildirilmiştir (Anonymous 2020; Sung et al. 2021).

LSHK'nın insidansı ve mortalitesi hastaların cinsiyetine, yaşına, beslenme şekline, sigara ve alkol tüketim oranlarına ve bir kısım genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. GLOBOCAN 2020 verilerine göre hem dünya genelinde hem de ülkemizde LSHK'nın insidansı ve mortalitesi, kadınlara oranla erkeklerde daha fazladır ve yaşa bağlı olarak artmaktadır. Bu hastalarda medyan tanı yaşı 55-65 aralığında iken ölüm yaşı ortalama 68 olarak rapor edilmiştir (Sung et al. 2021). LSHK'nın bilinen en önemli nedenleri arasında sigara ve alkol tüketimi bulunmaktadır. Ayrıca yaş, cinsiyet, insan papilloma virüsü (HPV), Epstein-Barr virüsü (EBV), Larengofarengeal reflü (Larenksin kronik tahrişi), radyasyon maruziyeti, hava kirliliği, besin yetersizliği (örneğin, vitamin A, C ve demir eksikliği) ve iş kaynaklı kanserojen maruziyeti larenks kanserine yakalanma riskini arttıran faktörler arasında yer aldığı kabul görmektedir (Marur and Forastiere 2016; Steuer et al. 2017; Nocini et al. 2020).

LSHK'nın nedenleri hakkında yeterli bilgiye sahip olsak da hastalığın teşhis ve tedavisi halen başarılı bir şekilde gerçekleştirilememektedir. LSHK tanısı, temelde klinik muayene ve larengoskopi, ince iğne aspirasyon biyopsisi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), bilgisayarlı tomografi (BT), pozitron emisyon tomografisi (PET) taraması gibi görüntüleme sistemleri ile yapılmaktadır (Han and Sumer 2021; Biau et al. 2022; Huynh et al. 2022). LSHK'nın teşhis edilmesindeki zorlu süreç, hastalığı erken teşhis eden yeni yöntemlerin geliştirilmesiyle giderilmeye çalışılmaktadır. Bu bağlamda, LSHK'nın erken teşhisi, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerekliliği, hastaların sağlıklarını yeniden geri kazanmaları ve LSHK patogenezinin aydınlatılması önemli bir süreç olarak görülmektedir.

1.2.2. Farenks kanseri

Farenks (yutak), burun ve ağız boşluğunun arkasında yer alan, sindirim sisteminin yemek borusu üzerinde kalan kısmıdır. Farenks, kas ve mukoza yapılı 5 cm uzunluğunda tüp biçiminde, yoğun lenfatik dolaşıma sahip bir organdır ve ağızda bulunan besinin yemek borusuna geçmesini sağlamaktadır (Mendenhall et al. 2019). Farenks anatomik

1. GİRİŞ

olarak nazofarenks, orofarenks ve hipofarenks olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır. Bu bölgelerde meydana gelen kanserlerin %90'ı skuamöz hücrelerden kaynaklanmaktadır (Kang et al. 2020).

Farenks skuamöz hücreli karsinomun (FSHK) bilinen en önemli nedenleri arasında larenks kanserinde olduğu gibi yaş, cinsiyet, insan papilloma virüsü (HPV), Epstein-Barr virüsü (EBV), radyasyon maruziyeti, hava kirliliği ve iş kaynaklı kanserojen maruziyeti yer almaktadır (Lam and Chan 2018). FSHK'nın nedenleri hakkında yeterli bilgiye sahip olsak da teşhis ve tedavisiyle ilgili süreçler hala başarılı bir şekilde yapılmamaktadır. FSHK tanısı temelde klinik muayene, ince iğne aspirasyon biyopsisi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), bilgisayarlı tomografi (BT), pozitron emisyon tomografisi (PET) taraması gibi görüntüleme sistemleri ile yapılmaktadır (Petkar et al. 2017; Pointreau et al. 2022). FSHK'nın teşhis edilmesindeki zorlu süreç, hastalığı erken teşhis eden yeni yöntemlerin geliştirilmesiyle giderilmeye çalışılmaktadır. Dolayısıyla, FSHK'nın erken teşhisi, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliği, hastaların sağlıklarını yeniden geri kazanmaları ve FSHK patogenezinin aydınlatılması LSHK'da olduğu gibi önemli bir süreç olarak görülmektedir.

Nazofarenks (geniz), boğazın burunla birleşen bölümüdür. Nazofarenks kanser insidansı yüksek olamamasına rağmen uzak metastaz yapma ihtimalinin yüksek olmasından dolayı mortalitesi oldukça yüksektir (Y. Chen et al. 2019). Nazofarenks kanserlerinin erkeklerdeki insidans ve mortalitesi kadınlara oranla daha yüksektir. GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünya genelinde yeni orofarenks kanser vaka sayısı yaklaşık 135.000, kansere bağlı ölüm sayısı ise yaklaşık 80.000 olarak bildirilmiştir (Anonymous 2020; Sung et al. 2021).

Orofarenks, solunum ve sindirim sistemlerinin ortak alanıdır ve ağız boşluğunun arkasında kalan kısımdır. Bu bölgede, dilin üçte birlik arka kısmı, yumuşak damak, yoğun lenfatik dolaşıma sahip bademcikler, yan ve arka farengeal duvarlar bulunmaktadır. Farenksin orofarenks bölgesinin yoğun lenfatik dolaşıma sahip olması dolayısıyla orofarenks kanserli hastaların ölüm oranı oldukça yüksektir (Burtness and Contessa 2021). GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünya genelinde yeni orofarenks kanser vaka

1. GİRİŞ

sayısı yaklaşık 100.000, kansere bağlı ölüm sayısı ise yaklaşık 50.000 olarak bildirilmiştir (Anonymous 2020; Sung et al. 2021).

Hipofarenks, gırtlığın arkasında ve yemek borusunun hemen üzerinde yer almaktadır ve sağ ve sol piriform sinüsler, hipofaringeal duvarlar ve postkrikoid olmak üzere 3 bölümden oluşmaktadır (Echanique et al. 2021). Bu bölgelerde meydana gelen kanserler çok yaygın olmamasına rağmen *erken* evrelerde tümörün belirgin bir semptomunun olmamasından dolayı oldukça agresiftir ve kötü prognoza sahiptir ve %95 oranında yassı epitel hücreli karsinom gelişmektedir (Pointreau et al. 2022). Hipofarenks kanseri, baş boyun kanserleri arasında %30-35 ile en düşük 5 yıllık sağ kalım oranına sahiptir (Gameau et al. 2018). GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünya genelinde yeni orofarenks kanser vaka sayısı yaklaşık 85.000, kansere bağlı ölüm sayısı ise yaklaşık 39.000 olarak bildirilmiştir (Anonymous 2020; Sung et al. 2021).

1.2.3. Dil kanseri

Dil, yassı epitele sahip müköz membran ile çevrili çizgili kas yapısındadır. Dil, çiğneme, tatma, konuşma ve yutkunma gibi fonksiyonları olan kompleks bir yapıdadır ve kök, gövde, apeks, dorsum ve ön yüz olmak üzere anatomik olarak 5 bölümden oluşmaktadır. Bu bölgelerde meydana gelen kanser, baş boyun maligniteleri arasında yer alan oral kavite kanserlerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Dil kanserlerinin %95'inden fazlasını SHK'lar oluşturur (Chang et al. 2022).

Dil skuamöz hücreli karsinoma (DSHK), genellikle dilin yan tarafında ya da tabanında meydana gelmektedir ve metastaz ve invazyon yapma kabiliyeti oldukça yüksektir (Mannelli et al. 2018; Best et al. 202). DSHK'nın görülme sıklığı, yaş, kültür, yaşam tarzı ve ülkelerin gelişmişliklerine göre farklılık göstermektedir (De Berardinis et al. 2022). Ayrıca, sigara ve alkol tüketimi, genetik yatkınlık, ağız hijyeni, dental travma, diyet, HPV, EBV, Hepatit C ve HIV gibi etkenlerin ağız kanserlerinin gelişimi üzerindeki etkileri gösterilmiştir ve kadınlara oranla erkek popülasyonlarda görülme sıklığı daha yüksektir (Ansarin et al. 2019; Näsman et al. 2020; X. Wang et al. 2021).

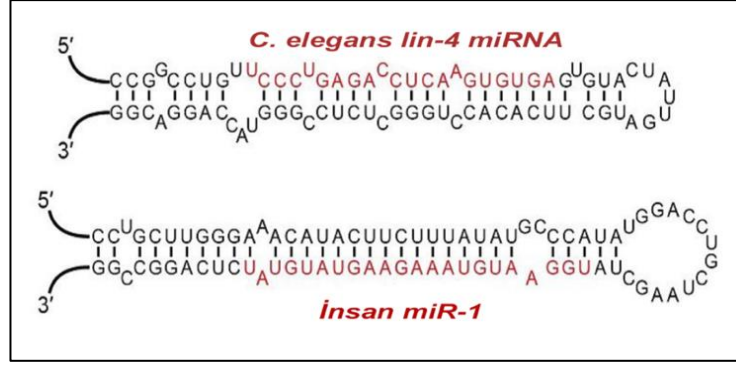
1. GİRİŞ

Son çalışmalarda HPV-16 ve HPV-18'in genç bireylerde görülen DSHK'nın önemli sebepleri arasında yer aldığı gösterilmiştir ve dolayısıyla hastalığın insidansının arttığı tespit edilmiştir (Bzhalava et al. 2020; Lehtinen et al. 2021). DSHK'nın nedenleri hakkında yeterli bilgiye sahip olsak da hastalığın tedavisi hala başarılı bir şekilde gerçekleştirilememektedir.

DSHK tanısı temelde klinik muayene, ince iğne aspirasyon biyopsisi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), bilgisayarlı tomografi (BT), pozitron emisyon tomografisi (PET) taraması gibi görüntüleme sistemleri ile yapılmaktadır (Hara and Juloori 2022; Nilsson et al. 2022). DSHK'nın tedavisindeki zorlu süreç, hastalığı erken tedavi eden yeni yöntemlerin geliştirilmesiyle giderilmeye çalışılmaktadır. Dolayısıyla, DSHK'nın erken teşhisi, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, oluşum sürecinin moleküler mekanizmalarının ve patogenezinin aydınlatılması LSHK ve FSHK'da olduğu gibi önemli bir süreç olarak görülmektedir. GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünya genelinde yeni oral kavite kanser vaka sayısı yaklaşık 380.000, kansere bağlı ölüm sayısı ise yaklaşık 180.000 olarak bildirilmiştir (Anonymous 2020; Sung et al. 2021).

1.3. MikroRNA'lar

MikroRNA'lar endojen olarak sentezlenen, tek zincirli, yaklaşık 19-25 nükleotit uzunluğunda, protein kodlamayan ve gen ifadesini negatif olarak düzenleyen kısa ribonükleik asitlerdir (RNA) (Saliminejad et al. 2019; Barlak et al. 2020). MikroRNA'lar, ilk olarak Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında *Caenorhabditis elegans* (*C. Elegans*) larvasında Lin-4 olarak isimlendirilen genin protein kodlamamasına rağmen lin-14 proteininin ifadesini baskılayarak larva gelişiminde rol aldığı ortaya çıkarılmasıyla keşfedilmiştir (Lee et al. 1993; Iorio and Croce 2012) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. MikroRNA'lar yaklaşık 18-24 nükleotit uzunluğunda, tek zincirli RNA'lardır

Sonraki yıllarda ise Reinhart ve arkadaşları *C.elegans*'ta yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, canlının gelişim zamanlamasını düzenlemekte rol alan farklı bir mikroRNA keşfetmişlerdir (Reinhart et al. 2000). Let-7'nin insanlar dahil birçok organizmada türler arasında da korunmuş olduğunun keşfedilmesi let-7'nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir (Pasquinelli et al. 2000). İlerleyen çalışmalarda, let-4 ve let-7'ye benzeyen yaklaşık 19-25 nükleotit uzunluğunda küçük RNA moleküllerinin birçok farklı türde olduğunun keşfedilmesiyle birlikte 2001 yılından itibaren mikroRNA olarak adlandırılmışlardır (Lagos-Quintana et al. 2001; Iorio and Croce 2012).

MikroRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan ekzon veya intron bölgeleri ya da protein kodlamayan 3' ve 5' untranslated region (UTR) bölgelerindeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanmasına rağmen proteine translasyonu gerçekleşmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir. Keşiflerinden şimdiye kadar, mikroRNA'ların fonksiyonları ve yeni mikroRNA'ların tanımlanmaları ile ilgili önemli gelişmeler kaydedilmiştir.

Şu ana kadar yapılan çalışmalarla binlerce mikroRNA ve bu mikroRNA'ların her birinin yüzlerce hedeflerinin bulunması, mikroRNA'ların hücre gelişimi, farklılaşması, proliferasyonu ve apoptozis yollarında düzenleyici roller üstlendikleri ortaya konulmuştur.

1.4. MikroRNA Biyogenezi

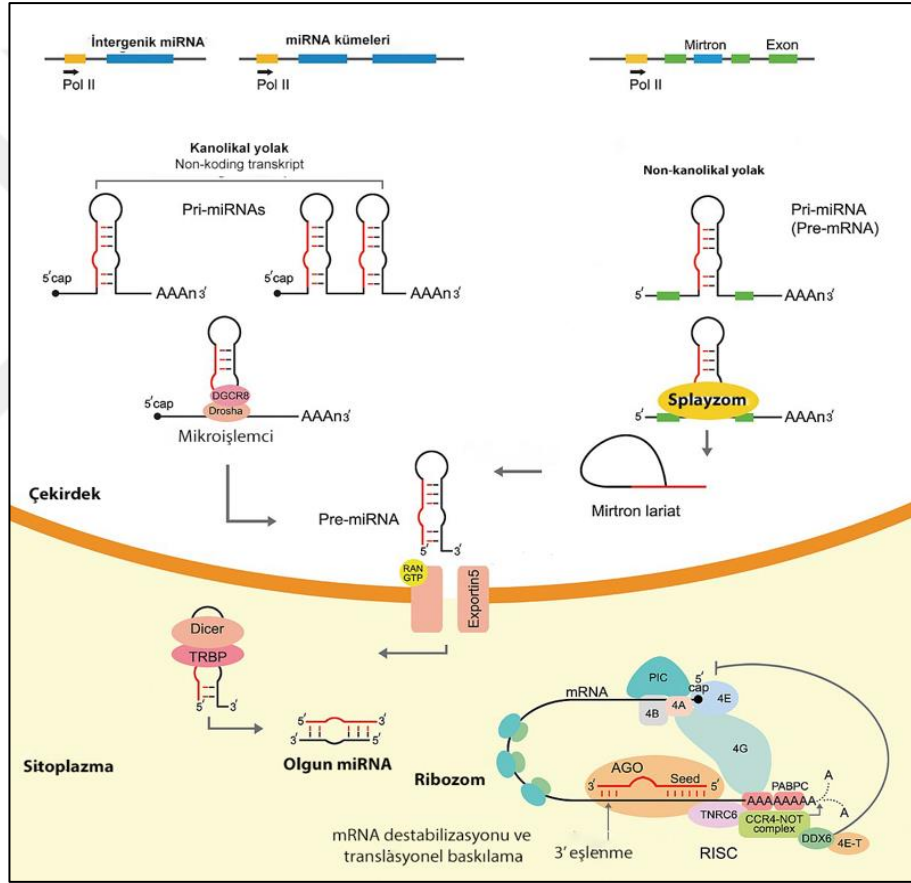
MikroRNA'ların sentezi kanonik ve kanonik olmayan 2 farklı yolak ile üç adımlık süreçte gerçekleşmektedir. İlk adımda, mikroRNA genlerinden primer mikroRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşmektedir (Kristensen et al. 2019). Ardından, nükleus içinde pri-miRNA'lar prekürsör mikroRNA (pre-miRNA) moleküllerine dönüştürülmektedir. Son adımda ise sitoplazma içinde olgun mikroRNA'lar oluşturulmaktadır. Kanonik mikroRNA biyogenezi, genomik DNA'dan RNA polimeraz II enzimi tarafından yaklaşık 500-3.000 baz uzunluğundaki primer transkript (pri-miRNA) lerin sentezi ile başlamaktadır. Pri-miRNA'lar, genel olarak 5'cap ve 3'poli A kuyruğuna sahip stem-loop yapısındadırlar (Bhaskaran and Mohan 2014; Matsuyama and Suzuki 2019).

Çekirdekte pri-miRNA'lar, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8) (Pasha) tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotit uzunluğunda olan stem-loop yapısında prekürsör mikroRNA'ya (pre-miRNA) dönüştürülür (Bhaskaran and Mohan 2014).

Bir nükleaz olan Drosha ile çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha'nın oluşturduğu komplekse mikroişlemci kompleks (Microprocessor complex) adı verilir. Pre-miRNA molekülü daha sonra bir nüklear taşıma reseptörü olan Exportin-5 (XPO5) ve nüklear bir protein olan Ras related nuclear protein (RAN) aracılığı ile GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır (Matsuyama and Suzuki 2019). Ardından, pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden ve transactivation-responsive RNA-binding protein TAR-RNA (TRBP) ile ilişkili Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 19-25 nükleotid uzunluğunda çift zincirli olgun miRNA dubleksine çevrilir. Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. MikroRNA/mikroRNA dubleks yapılı miRNA RISC'in yapısında bulunan Argonaute (AGO) proteinine yüklenir (Tafrihi and Hasheminasab 2019). Daha sonra RISC kompleksinde yer alan bir RNAz olan Argonaute proteini, 5'ucu daha kararlı olan miRNA dubleksinden sadece birini seçerek RISC kompleksine dahil eder. Bu iplik kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılırken diğer iplik antiklavuz olarak adlandırılır.

1. GİRİŞ

Antiklavuz ipliğin başlangıçta parçalandığı düşünülürken yeni nesil sekanslama yöntemleri ile yapılan çalışmalara göre bu zincirin de fonksiyonel olduğu ve farklı biyolojik süreçlerde rol aldığı bulunmuştur (Matsuyama and Suzuki 2019; Tafrihi and Hasheminasab 2019). Kanonikal olmayan mikroRNA biyogenezinde ise Drosha/DGCR8'den bağımsız bir şekilde mikroRNA'ların sentezi sürecinde kısa intron dizilerinden transkribe edilen ve splice mekanizması aracılığıyla oluşan mirtron'dan pre-miRNA benzeri yapılar oluşur. Pre-miRNA benzeri yapılar, XPO5 aracılığıyla sitoplazmaya taşınarak kanonikal yolak ile aynı şekilde olgun mikroRNA sentezi gerçekleşir (Westholm and Lai 2011) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. MikroRNA'ların biyogenezini (O'Carroll et al. 2012)'den değiştirilerek alınmıştır.

MikroRNA moleküllerinin olgunlaşmasının ardından tek zincirli miRNA'yı içeren aktif RISC kompleksi spesifik baz eşleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanarak, mRNA'nın tanınmasında önemli bir rol oynar ve mRNA'nın deadenilasyonuna, degradasyonuna ya da translasyonel inhibisyonuna neden olarak hedef genlerin baskılanmasına yol açar (Westholm and Lai 2011).

1. GİRİŞ

Bir mikroRNA baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanır. MikroRNA'ların çoğu, hedef mRNA'nın 3' ucundaki UTR bölgesine bağlanır. Bu bağlanma kusurlu, mükemmel olmayan ve eksik komplementerliği içerir ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. MikroRNA'ların diğer bir bağlanma bölgesi ise hedef mRNA'nın açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF) bölgesidir. Bu bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği gösterir ve Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır. MikroRNA'ların kendi nükleotit dizilerine komplementer olan hedef genleri tanıma özellikleri vardır. MikroRNA'ların her biri birden fazla mRNA'nın ifadesini düzenleyebilir ve mRNA'ların her biri de birden fazla mikroRNA tarafından hedeflenebilir. Şimdiye kadar toplamda 38589 mikroRNA tanımlanmıştır. Bu mikroRNA'lardan hem omurgalı hem de omurgasız hayvanlarda yüksek oranda korunmuş dizilere sahip 2.656 tane olgun mikroRNA'nın insan genomu tarafından kodlandığı tespit edilmiştir (miRBase: Release 22.1)

Bu mikroRNA'ların insan genlerinin %70'inden fazlasını hedefleyerek genlerin ifadesini düzenlediği düşünülmektedir. Bu da mikroRNA'larla gerçekleştirilen gen regülasyonunun, post-transkripsiyonel gen regülasyon modelleri arasında son derece önemli olduğunu göstermektedir

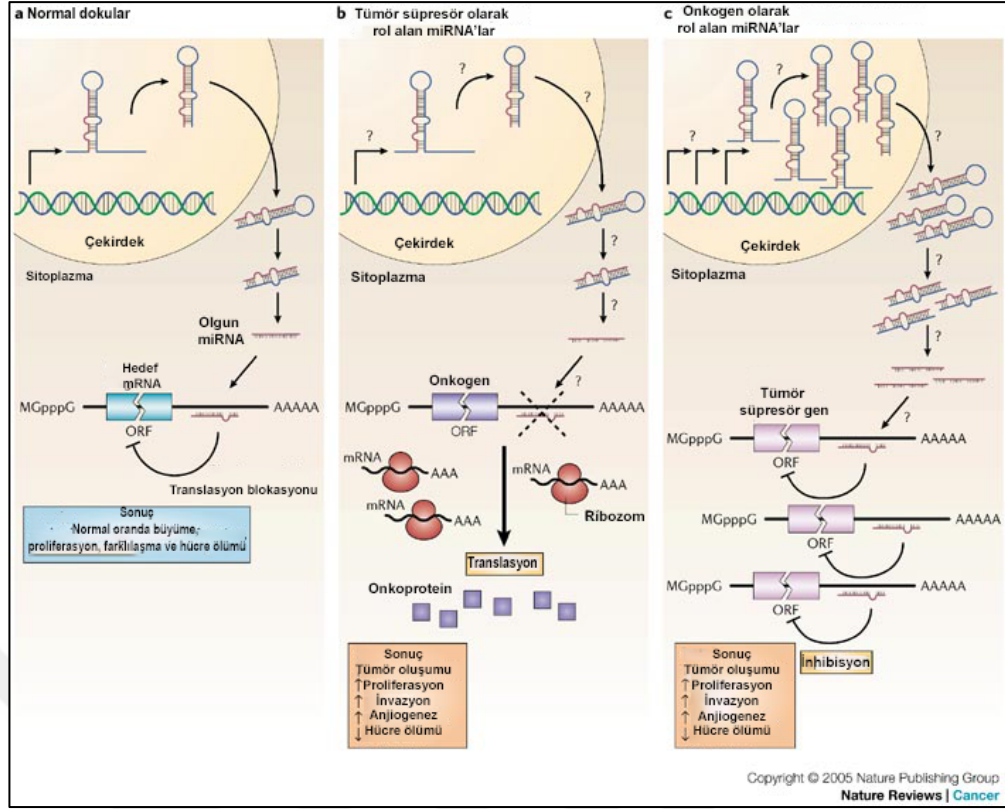
1.5. MikroRNA ve Kanser

MikroRNA'ların ilk keşfedildikleri günden itibaren normal ve kanserli hücre ya da dokudaki rolünü anlamak için araştırmalar yapılmış ve bunun neticesinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu moleküllerin hematopoez, farklılaşma, çoğalma, hücre göçü, hücre siklusü ve apoptoz (programlı hücre ölümü) gibi çok önemli hücresel olaylarda kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir (Calin et al. 2002; Lee and Dutta 2009; Di Leva et al. 2014).

Protein kodlayan (onkogen/tümör süpresör) genlerde meydana gelen fonksiyonel bozuklukların kansere neden olduğu bilinmektedir. Son yıllarda tümör oluşumunda mikroRNA'ların da etkili olduğunun gösterilmesiyle kanserin genetik nedenlerinin daha karmaşık olduğu bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalarla mikroRNA'ların normal ve kanserli dokular arasında ifade farklılıklarının belirlenmesi, mikroRNA'ların kanser progresyonundaki rollerini güçlendirmiştir (Zhang et al. 2007; Di Leva et al. 2014). Kanserle ilişki genomik alanların ya da frajil bölgelerin %50'den fazlasının mikroRNA'ları kodlayan genlerden oluşması mikroRNA'ların kanser patogeneziindeki önemini ortaya koymuştur (Calin et al. 2004). MikroRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceğinin anlaşılmasıyla birlikte farklı kanser türlerinde spesifik hücre tiplerinde mikroRNA'ların ifade seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. MikroRNA'ların hedefledikleri mRNA'ların moleküler sinyal yollarındaki rollerine göre tümör baskılayıcı veya onkogenik özellik kazanabildiği gösterilmiştir (Fabbri et al. 2008).

Normal dokularda, bazı mikroRNA'ların proto-onkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Bu mikroRNA'ların, onkogenlerin ifadesini kontrol ettikleri ve "tümör süpresör miRNA'lar" (TS-miR) olarak rol aldıkları gösterilmiştir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı mikroRNA'ların ifadelerinin azalması, onkogenlerin ifadelerinin artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur (Zhang et al. 2007; Kalinowski et al. 2014). Bunun aksine, çeşitli kanserlerde ifadeleri artan, tümör süpresör genlerin baskılanmasını sağlayan "onko-miR" olarak adlandırılan bir kısım onkogenik mikroRNA'lar da tespit edilmiştir. Bu mikroRNA'lar, kontrolsüz büyümeyi tetikleyerek anti-apoptotik yönde fonksiyon gösterirler (Esquela-Kerscher and Slack 2006; Svoronos et al. 2016). Sonuç olarak, mikroRNA'lar tümör süpresör ve onkogen mRNA'ları potansiyel hedef olarak görmektedirler. Bu yüzden, bir mikroRNA'nın gerçek fonksiyonu ya TS-miR'in veya onko-miR'in hücrel fonksiyonuna bağlıdır ve bazı mikroRNA'lar da buldukları koşullara bağlı olarak hem tümör süpresör hem de onkogen karakter gösterirler (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Onkogen ve tümör süpresör mikroRNA'ların karsinogenez süreçlerindeki fonksiyonları (Esquela-Kerscher and Slack 2006)'dan değiştirilerek alınmıştır.

MikroRNA'ların, kanserin erken tanı, tedavi ve prognozunun belirlenmesinde, kanserli dokulardaki ifadelerinin, ifade paternlerindeki değişikliklerin ve hedefledikleri mRNA'ların ortaya çıkarılmasında önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir (Kabzinski et al. 2021; Uzuner et al. 2022).

1.6. MiR-1825 ve Hedef Genler

MiR-1825, POFUT1 (Protein O-Fukosiltransferaz 1) geninin 7. ekzonunda yer almakla birlikte insan embriyonik kök hücrelerinde ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerde rekürren fonksiyon kazanımı görülen 20q11.21 kromozomal bölgesinde bulunan onkogenik bir mikroRNA'dır (Martins-Taylor et al. 2011).

20q11.21 kromozomal bölgesinde meydana gelen amplifikasyonun insan embriyonik kök hücrelerinin, koloni oluşturabilme potansiyelini arttırdığı ve hücre apoptozunu azalttığı gösterilmiştir (Nguyen et al. 2014).

İlginç bir şekilde, 20q11.21 amplifikasyonunun, insan embriyonik kök hücrelerinde kanserle ilintili çok sayıda genin zenginleşmesine neden olduğu bulunmuştur (Werbowetski-Ogilvie et al. 2009; Karatas et al. 2016). Nguyen ve ark tarafından *in vitro* kültür ortamında 20q11.21 kromozomal bölgesinde amplifikasyonun meydana getirildiği mutant insan embriyonik kök hücre (hESC) hatlarında gen ifade değişimleri incelenmiş ve miR-1825'in ifade seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Nguyen et al. 2014). Bu bulguların yanı sıra, CD133+ ve CD133- LSHK örneklerinin mikroRNA profil karşılaştırması yapılmış, miR-1825'in CD133+ larenks kanseri kök hücrelerinde önemli ölçüde artan ifadeye sahip olduğu rapor edilmiştir (Karatas et al. 2016). MiR-1825'in, kök hücrelerle ilişkili özelliklerin kazanılması ve sürdürülmesinde olduğu kadar tümör gelişimi, progresyonu ve metastazında da rol aldığı öne sürülmüştür (Khan et al. 2019). MiR-1825'in prostat kanseri dokularında ifadesinin arttığı ve prostat kanseri için bir biyobelirteç olarak işlev görebileceği gösterilmiştir (Guo et al. 2018). İlginç bir şekilde bazı glioblastoma hücrelerinde (U138, Inz308) miR-1825 ifade seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmesine rağmen bazı glioblastoma hücrelerinde (U251, U373) ve glioblastoma hasta serumlarında ifade seviyesinin düşük olduğu gösterilmiştir (Xing and Zeng 2017; Xi et al. 2021). Hepatosellüler karsinomlu hastalarının serumlarında ise miRNome profillemesi çalışması yapılmıştır. Tanımlanan 274 mikroRNA arasından miR-1825'in normal serum örneklerine kıyasla ifade seviyesinin anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Pascut et al. 2019).

Kolorektal kanser hasta doku ve serum örneklerinde miR-1825 seviyesinin yüksek olması kolorektal kanser gelişiminde miR-1825'in önemli bir role sahip olabileceğini göstermiştir. Ayrıca KEGG patway analizi ile miR-1825'in hedef genlerinin genellikle hücrenin biyolojik süreçleri ve moleküler fonksiyonları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Pruseth et al. 2021). Bu bulguların yanı sıra servikal, hepatosellüler, akciğer ve pankreas gibi çeşitli karsinomlarda miR-1825 ifade seviyesinin önemli derecede arttığı ve kanser progresyonu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Li et al. 2013; Kang et al. 2022; Kwon et al. 2022; Hassan et al. 2023).

1. GİRİŞ

Bunlara ek olarak, miR-1825'in varsayılan hedefi olarak mikroarray analizi sonucunda tarafımızca tespit edilen FREM1 (FRAS1-related extracellular matrix gene 1) hücre dışı matrisle ilişkili bir transmembran proteindir (Smyth et al. 2004; Yu et al. 2018). Embriyonik gelişim sırasında epidermal yeniden şekillenme ve epitelyal mezenkimal etkileşim bölgelerinde önemli ölçüde ifade edilmektedir (Smyth et al. 2004; Li et al. 2020). Ayrıca FREM1 bazı dokularda immün hücre infiltrasyonu ve kanser hücre progredyonu ile ilişkilidir (Jiang and Jiang 2022). Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre FREM1 ifadesinin kanserlerin ilerlemesi ve tümör evreleri ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Luo et al. 2020). Ancak bu konuda henüz detaylı fonksiyonel çalışmalar yapılmamıştır. Bu bilgiler, miR-1825/FREM1 aksisinde, miR-1825'in bir onko-miR adayı olarak BBSHK gelişiminin önemli bir aracı olarak hizmet edebileceğini göstermektedir.

Bir kısım *in silico* araçlar kullanarak tarafımızca miR-1825'in olası hedefi olarak belirlenen TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*) ise hücre büyümesini kontrol eden tuberin proteinini kodlayan tümör baskılayıcı bir genidir (Alesi et al. 2021). TSC2, hücre büyümesinin ana düzenleyicisi olan mTOR (mammalian target of rapamycin) aktivitesinin negatif düzenleyicisi olarak rol alır ve hücre proliferasyonu, anjiyojenez gibi birçok hayati sürece aracılık eder. TSC2'nin downstream hedefi olan mTOR'un, Akt sinyal yolu aracılığı ile hipoksik koşullarda endotel hücre proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Huang et al. 2022). Kanser hücrelerinde TSC2 genindeki mutasyonların PI3K yolağınca hücre büyümesinin aşırı uyarılması ve protein sentezinin aşırı aktivasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak TSC2'nin özellikle BBSHK'da mikroçevre ve anjiyojenez ile ilişkisinin altında yatan moleküler mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır.

Bu doğrultuda, hipoksik koşullar altında kanser kaynaklı anjiyojenez oluşumunda eksozomal miR-1825'in rollerinin araştırılması amaçlandı ve yeni bir aksis önerildi. Son yıllarda, mikroRNA'ların işlevlerinin ve hedeflerinin anlaşılmasına ve ayrıca karsinojenik süreçler sırasında tümör baskılayıcı veya onkogenlerle etkileşimlerinin belirlenmesine odaklanan çok fazla araştırma yapılmıştır.

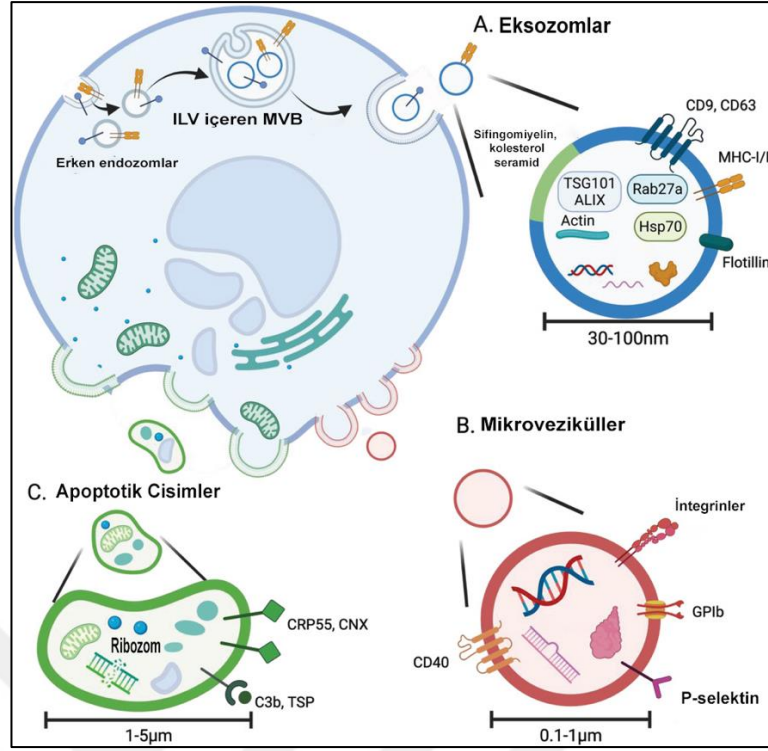
Ancak miR-1825'in özellikle BBSHK'daki hücre patogenezi, olası yeni hedef genlerinin belirlenmesi, özellikle de mikroçevre, anjiyojenez, kanser kök hücre özelliklerine katkısı gibi işlevleri hala aydınlatılamamıştır ve fonksiyonel çalışmalar yapılmamıştır.

1.7. Eksozom

Canlıların yaşamı boyunca devam eden hücreler arası iletişim, çok hücreli organizmalarda milyarlarca hücrenin işlevlerini eş zamanlı olarak gerçekleştirebilmeleri için hayati bir öneme sahiptir (Kalluri and LeBleu 2020). Hücreler bu iletişimi, hücre homeostazı korumak, hücre dışı ortamdaki patojenlere cevap vermek, hücre göçü, proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve hatta karsinogenez gibi mekanizmaları kontrol etmek ve salgılanan moleküllerin transferi gibi biyolojik olaylar için gerçekleştirirler (Doyle and Wang 2019; Kalluri and LeBleu 2020).

Bilim insanları uzun yıllar boyunca hücre iletişim, sadece hormonlar, sitokinler veya nörotransmitterler aracılığıyla gerçekleştiğini düşündüler (Camussi et al. 2010). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarla, hücre dışı veziküller ("Extracellular vesicle", EV) aracılığıyla da hücrelerin iletişim kurabildiği gösterilmiştir (Ratajczak et al. 2006).

EV'ler plazma zarından doğrudan veya dolaylı olarak oluşan, lipit bir tabaka ile çevrili, küçük küresel yapılardır. Bu veziküller, kargo içeriği, büyüklüğü, plazma membran oluşumu ve sekresyonuna göre sınıflandırılmaktadır (Cordonnier et al. 2017). EV'ler, endositik yoldan yönlendirilen ve hücre dışı ortamına ekzositozla salınan eksozomlar (Trams et al. 1981), doğrudan plazma zarından tomurcuklanarak hücre dışına salgılanan mikroveziküller (Borges et al. 2013) ve apoptoz sırasında hücreler tarafından salınan apoptotik cisimler (Théry et al. 2002; Ratajczak et al. 2006) olarak sınıflandırılmaktadırlar (Şekil 1.7).



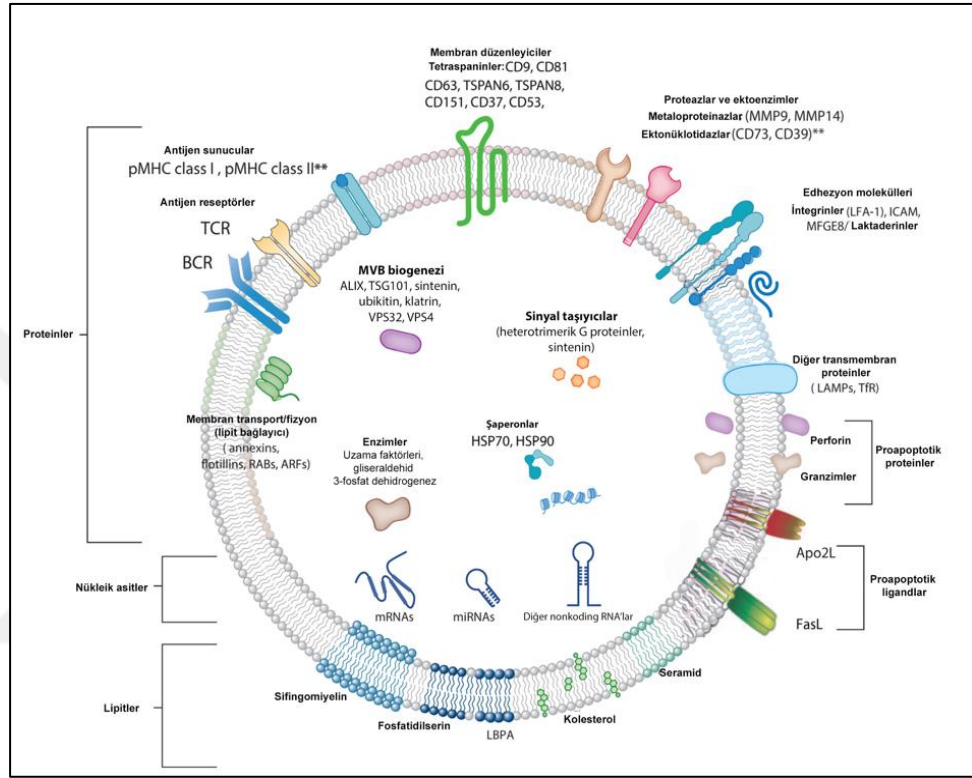
Şekil 1.7. Ekstrasellüler veziküllerin yapısı (Lai et al. 2022)'den değiştirilerek alınmıştır.

EV'lere kıyasla daha fazla fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynayan, en küçük EV alt grubunu oluşturan eksozomlar, bilinen bütün hücreler tarafından hücre dışı ortama salınan, bütün biyolojik sıvılarda bulunan ve boyutları 30-300 nanometre arasında değişen, herhangi bir hücresel organel içermeyen, membran kaynaklı çift zarlı keseciklerdir (Zhang et al. 2015; Hessvik and Llorente 2018; Jung and Mun 2018). Eksozomlar ilk olarak 1983 yılında, retikülosit olgunlaşmasıyla ilgili bir çalışmada, transferrin reseptörünün hücre dışına 50 nm'lik veziküllerle taşındığının bulunmasıyla keşfedilmiştir.

Keşfedildikleri ilk zamanlarda hücre homeostazının yan ürünlerinden veya hücre hasarından dolayı salgılandığı düşünülen bu keseciklerin, son yıllarda yapılan çalışmalarla önemli fizyolojik görevleri olduğu ortaya çıkarılmıştır (Trams et al. 1981; Simpson et al. 2009; Rauf et al. 2022). Eksozomları diğer EV'den daha önemli hale getiren nokta, eksozomların içeriklerinde taşıdıkları biyoaktif moleküllerin kargolarıdır. Bu sayede hücre-hücre etkileşiminde rol oynayarak alıcı hücrelere transfer olduklarında taşıdıkları biyoaktif molekül kargoları ile hücrenin fonksiyonunu değiştirebilirler.

1. GİRİŞ

Hücre–hücre iletişiminin en önemli elemanlarından biri olan eksozomlar salgılandıkları hücreden diğer hücelere içerisinde bulundurdukları mRNA, mikroRNA, lncRNA, tek zincirli (ssDNA) ve çift zincirli DNA (dsDNA), genomik DNA fragmentleri, nükleik asit, protein ve lipid gibi biyoaktif bileşenlerin aktarımını sağlamaktadırlar (Raposo and Stoorvogel 2013) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Eksozomların yapısı ve içeriği (Calvo and Izquierdo 2022)'den değiştirilerek alınmıştır.

1.8. Eksozom Biyogenezisi

Eksozomlar endositik yollarla üç farklı aşamada meydana gelirler (i) plazma membranı hücre membranından içe doğru kıvrılarak erken endozom ile endositik vezikül oluşturur; (ii) ikinci aşamada geç endozom ile endozomal membranın içe doğru tomurcuklanması ile multiveziküler (MVB) cisimcikler oluşur; (iii) son aşamada, geç endozomların olgunlaşması ile, MVB'lerin plazma membranı ile birleşmesi sonucu eksozom oluşur ve vezikül içerisindeki hücre dışına eksozom olarak salgılanır (Gurung et al. 2021). Ancak oluşan bütün MVB'ler, içeriklerini eksozom olarak dışarı salgılamamaktadırlar.

1. GİRİŞ

MVB'lerin bazıları lizozomlarla birleşerek yapılarının parçalanması sonucu içeriklerini hücreye geri kazandırırken bazıları ise melanozomlar, azurofilik granülleri gibi lizozom benzeri organellerin oluşumuna katkı sağlarlar (Gurung et al. 2021).

Yapılan son çalışmalar MVB'lerin oluştuktan sonra sahip oldukları kolesterol seviyesine bağlı olarak izleyeceği metabolik yolları belirlediğini göstermiştir. Kolesterol seviyesi yüksek olmayan MVB'ler lizozoma doğru yönelirken, kolesterol seviyesi yüksek olan MVB'ler ise plazma membranı ile birleşerek içeriklerini eksozom olarak dışarı salgılamaktadır. Eksozomlardaki kolesterol seviyesi hem eksozom stabilitesinin korunmasında hem de hücre tarafından eksozomun salınmasında kolaylık sağlar (Subra et al. 2007). Tüm bu süreçler hücre içindeki sinyalizasyon molekülleri ile sıkı bir şekilde kontrol edilir. Ancak bu yollardan hangisinin, hangi koşullarda devreye gireceği henüz bilinmemektedir. Dolayısıyla, eksozom salınımı ve MVB içerisindeki keseciklerin lizozoma gönderilmesi arasındaki dengeyi düzenleyen mekanizmanın nasıl işlendiği hâlâ araştırılmakta olan bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Eksozom içerisine biyomoleküllerin alınması spesifik bir seçimle 3 farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (Bozkurt 2018; Vietri et al. 2020).

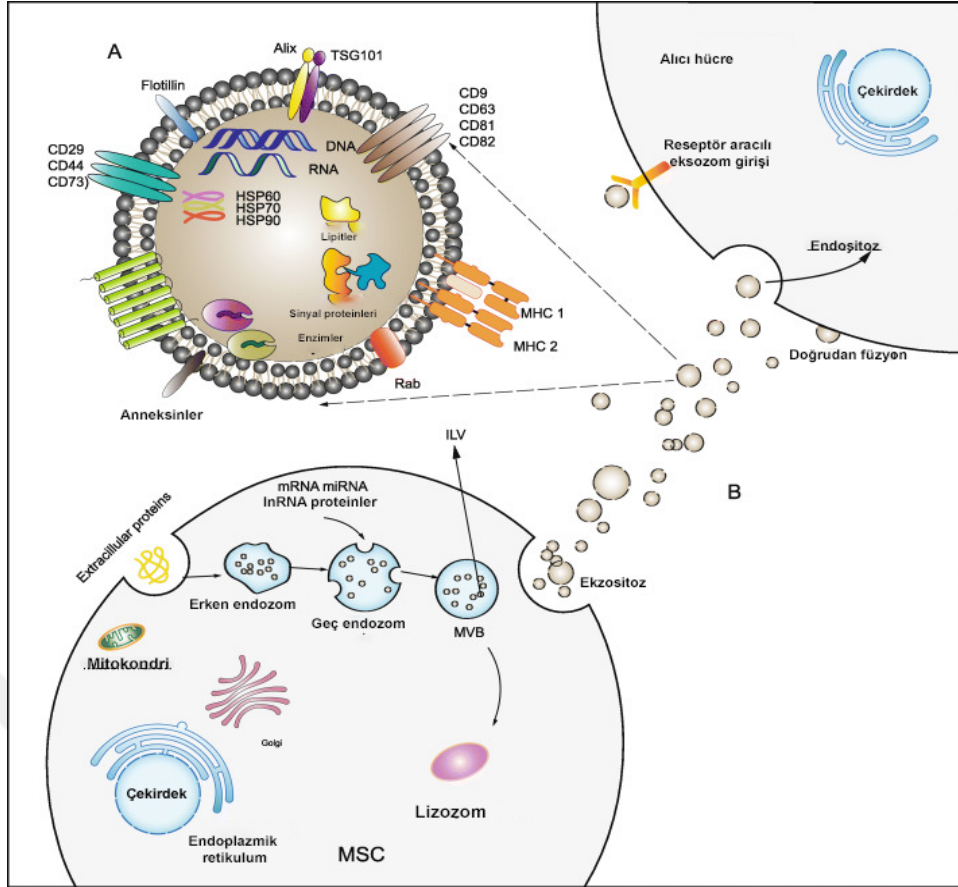
İlk mekanizmada ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport)'ye bağlı mekanizma aracılığı ile birbiriyle eş zamanlı olarak çalışan pek çok protein alt grubu, eksozomlara biyotinlenmiş protein alımını sağlar. ESCRT-0 biyotinlenmiş proteinlerin tanınmasında ve bu proteinlerin endozomal membrana toplanmasında rol alır. ESCRT-0, ESCRT-1'i bu da ESCRT-2'yi bölgeye çeker ve bu yolla toplanan ESCRT-1 ve 2 membran tomurcuklanmasını harekete geçirir ve Alix proteini yapıyı sabitler. ESCRT-3 ise tomurcuk yapıdaki vezikülün membrandan ayrılmasını sağlar (Henne et al. 2011; Larios et al. 2020).

İkinci mekanizmada Tetraspanin ve lipid bağımlı mekanizma ile sitozolde yer alan kargonun, spesifik bir seçim ile eksozom içerisine alınması şeklindedir. Örneğin bir sfingolipid olan seramidler (sfingomiyelinaz (nSMase), asit sfingomiyelinaz (aSMase) ya da novo sentezi etkisi) endozomal membranın kendiliğinden hücre içine doğru çökmesine sebep olurken, Fosfolipaz D (PLD) eksozom salınımında rol alır (Ghossoub et al. 2020; Larios et al. 2020).

Son mekanizma olan hipotetik modelde ise, eksozomlarca taşınan mikroRNA miktarı ve eksozom içeriğinin kökenlendikleri hücreye göre değişmesi, mikroRNA'ların eksozomlar içine seçilerek alındığını düşündürmektedir. Örneğin T hücrelerinden salınan eksozomlarda bir grup mikroRNA'nın özellikli bir baz dizisine sahip olduğu (GGAG) ve bu dizinin A2B1 ribonükleoprotein tarafından tanındığı tespit edilmiştir. MikroRNA'lar dışında mRNA'ların ve kodlama yapmayan diğer RNA moleküllerinin de (ncRNA gibi) alınırken seçildiği düşünülmektedir. Ancak mekanizmaları henüz aydınlatılmamıştır (Bozkurt 2018). Eksozomların hücre dışına salınmasında Rab GTPazlar, moleküler motor proteinleri, hücre iskelet sistemi proteinleri ve SNARE proteinleri rol almaktadırlar. Hücre içi Ca^{2+} seviyesi, hücre içi ve dışı pH gradienti, hipoksi gibi faktörler eksozom salınımını önemli derecede etkilemektedir (Kahlert and Kalluri 2013).

Eksozomların hedef hücreleri seçme mekanizmaları ve seçilen hücelere içeriklerini nasıl aktarabildiği hala araştırılmaktadır. Bu aşamada eksozomların hedef doku ve organlara ulaştıktan sonra hücre içine alınma mekanizmalarının anlaşılması oldukça önemlidir (Kahlert and Kalluri 2013). Eksozomlar hedef hücelere 3 farklı yoldan alınabilirler (Liu et al. 2021) (Şekil 1.9).

Birinci yol ile eksozomların zar yüzeyinde bulunan ligandlar, hedef hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanabilir. İkinci yol ile eksozomlar yüzeylerinde bulunan adezyon molekülleri aracılığı ile hedef hücre membranına füzyon yapabilir. Üçüncü yol ile ise eksozomlar, hedef hücre aracılığı ile fagosite edilebilir.



Şekil 1.9. Eksozomların içerikleri, biyogenezi ve hedef hücelere alınma yolları (Liu et al. 2021)'den değiştirilerek alınmıştır.

Eksozomlar, birçok koşulda hem sağlıklı hücrelerden hem de kanser hücreleri ve tümör mikroçevresiyle ilişkili mezenkimal kök hücreler, stromal ve endotel hücreler tarafından salgılanır ve tümör progresyonuna katkıda bulunan sinyal yollarını (MAPK/ERK, PI3K/AKT, Wnt/b-katenin, STAT3, reseptör tirozin kinazlar ve TGF-beta) doğrudan ya da dolaylı olarak etkilerler (Jia et al. 2017; Sun et al. 2018).

Kanser hücreleri arasında eksozomlar aracılığıyla otokrin, parakrin ve endokrin etkileşim sağlanmakta, yoğun iletişim ağı kurulmakta ve bu ağ içinde endotel hücrelerinden immün sistem hücrelerine kadar çok sayıda aktör rol almaktadır. Eksozomların, yüzeylerinde veya vezikül içinde taşıdıkları kargo içerikleri (onkojenik sinyal proteinleri, ligandlar, enzimler, mRNA ve mikroRNA) aracılığı ile kanser hücreleri immün sistemden kaçabilmekte, tümör mikroçevresinde hiposik bir ortam oluşturarak anjiyogenezini artırmakta, ilaç direnci kazanmakta, invazyon ve metastaz yapma yetenekleri elde etmektedirler (Kalluri and LeBleu 2020; Paskeh et al. 2022).

1. GİRİŞ

Eksozomların kargo içeriklerinin (özellikle mRNA ve mikroRNA içeriği) hastalıkların tanısında önemli bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Eksozomlar, salgılandıkları hücrelerin membran ve sitoplazmik özelliklerini karakteristik olarak taşırlar. Eksozomların vücuttaki bütün sıvılardan elde edilebilir olması, birçok hastalık için tanı aşamasını kolaylaştırıcı, belirteç ekseni çalışmalarının yapılmasına olanak sağlamıştır (Kalluri and LeBleu 2020).

Eksozomal kargo biyomoleküllerinden mikroRNA'lar, türler arasında yüksek düzeyde korunmaları ve gen ifadesindeki düzenleyici rolleri nedeniyle oldukça dikkat çekicidir. Eksozomal mikroRNA'ların keşfi ile mikroRNA'ların doğrudan eksozomlar yoluyla hedef hücrelere iletilerek mRNA hedeflerinin fonksiyonel modülasyonu ile sonuçlanabildiği ve eksozomal mikroRNA'ların bir kısım reseptörlere bağlanarak bağışıklık hücrelerini aktive eden ligandlar olarak hareket etme kapasitesine sahip oldukları gösterilmiştir (Zhang et al. 2015; Yue et al. 2020). Eksozomal mikroRNA'lar, hastaların kanında, idrarında ve diğer vücut sıvılarında stabil bir şekilde bulunabilir ve eksozomlar, spesifik yüzey proteinlerinin mevcudiyetiyle orjinlendikleri dokuların veya hücrelerin içeriğini yansıtabilirler. Ayrıca, eksozomal mikroRNA'ların miktarı ve bileşimi, hastalar ve sağlıklı bireyler arasında farklılık gösterir. Bu nedenle, eksozomal mikroRNA'lar, hastalık durumlarını belirtmek için invaziv olmayan biyobelirteçler olarak kullanım potansiyeli göstermektedirler. Ayrıca, yapılan çalışmalarda, eksozomal mikroRNA'ların klinik tanıya yardımcı olabileceği, kanserde prognostik belirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Zhang et al. 2015).

Eksozomal mikroRNA'lar hem tümör baskılayıcılar olarak hem de hücre proliferasyonu, hücre göçünü, epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT), anjiyojenezi, vasküler permeabilite (damar geçirgenliği) ve metastazı düzenleyen promotörler olarak kanser mikroçevresi ve hücre dışı matris üzerinde de önemli etkilere sahiptir (Sun et al. 2018). Eksozomal mikroRNA'ların, bir kısım sinyal yollarını aktive ederek anjiyojenez, metastaz, epitel hücrelerin malign transformasyonu ve ilaç direnci gibi önemli süreçlere dahil olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Meng et al. 2019).

Eksozomlar, doku onarımı ve rejenerasyonu veya sinir sisteminin gelişimi gibi fizyolojik süreçlerin yanı sıra patolojik süreçlerde de (kanser anjiyojenezi ve ilerlemesi, enfeksiyonda bağışıklık sistemi düzenlemesi, ateroskleroz ve Parkinson, Alzheimer ve amiotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklar) rol alır (Olejarz et al. 2020).

1.9. Anjiyojenez, Hipoksi ve Kanser Mikroçevre İlişkisi

Anjiyojenez ya da vaskülogenez, endotel hücrelerin aracılık ettiği ve mevcut damarlardan yeni kan damarlarının oluşum süreci olarak tanımlanmaktadır (Meng et al. 2019). Anjiyojenez, embriyonik gelişim, morfogenez, doku rejenerasyonu, yara iyileşmesi, dokulara besin maddelerinin sağlanması gibi fizyolojik süreçlerde ve tümör büyümesi, tümör uzak metastazı, özellikle tümör mikroçevresi için besin ve oksijen alımı (oksijenasyon) gibi patolojik süreçlerde rol oynar (Cui et al. 2020; Kretschmer et al. 2021).

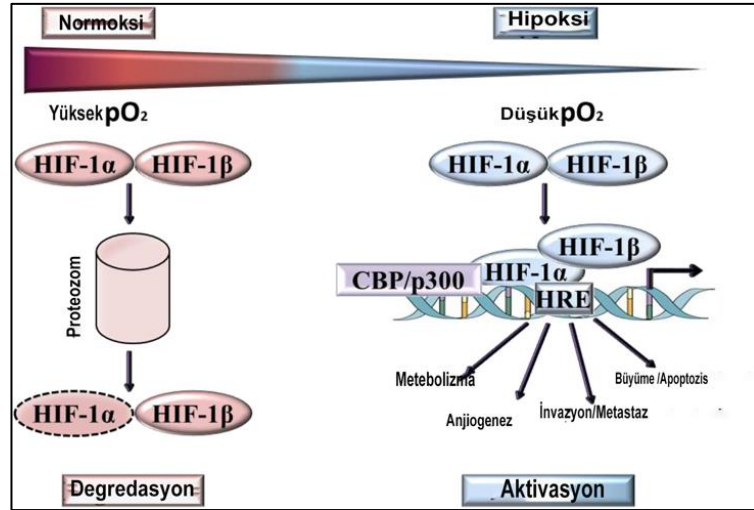
Tümör hücreleri, karsinojenik etkiyle malign bir potansiyel kazanıp kontrolsüz çoğalmaya başlayıncaya kadar oldukça uzun ve sessiz bir dönem geçirirler. Bu aşamadan sonra özellikle damar oluşumu ile birlikte tümörlerde hızlı bir progresyon dönemi başlar. Tümör hücrelerinin bir kısmı kapiller damarlar etrafında oksijenin diffüzyon mesafesi olan 200-300 mikron mesafeye kadar dizilerek buldukları dokuda yeni damar oluşumuna gerek duymadan 2-3 mm'lik büyüklüğe kadar ulaşabilirler ve asemptomatik lezyonlar olarak kalırlar (Liu and Deisseroth 2006). Ancak diğer bir kısmı ise daha fazla büyüebilmek için yeni damar oluşumuna (anjiyojenez) gereksinim duyar, yeterli oksijen ve besin alamadıkları için özellikle mikroçevre üzerinde anjiyojenik faktörler salgılayarak endotel hücreler üzerindeki reseptörlerine bağlanırlar ve anjiyojenezi hızlandırırlar (Kretschmer et al. 2021).

Tümör mikroçevresi (TME), kanser hücrelerinin yanı sıra, stromal hücreler (örn. bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreler ve mezenkimal kök hücreler), hücre dışı matriksi (ECM), kan damarları, sitokinler ve büyüme faktörlerinin bir arada olduğu ve bunların birbirleriyle devamlı etkileşim halinde olduğu hücresel ve biyokimyasal bir ortamdır (Meng et al. 2019).

1. GİRİŞ

TME’de çoğunlukla dokudaki oksijen seviyesinin azalmasına bağlı oluşan hipoksiye yanıt olarak anjiyojenezin meydana geldiği ve hipoksinin anjiyojenez için tetikleyici bir güç olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Majidpoor and Mortezaee 2021).

Hipoksik durumda ($pO_2 < 10-15$ mmHg), yeterli oksijene ulaşabilmek ya da hipoksik duruma adapte olabilmek için oksijensiz kalan hücrelerde ve tümör mikroçevresinde, oksijene bağlı transkripsiyonel bir aktivatör ve tümör mikroçevresinde “hipoksi sensörü” olarak rol oynayan hipoksi ile indüklenebilir faktörlerin (HIF-1), osteopontin (OPN) ve karbonik anhidraz-9’un (CA-9) ifadesi artar ve hücreler anjiyojenik faktörler salarak kılcal damarların gelişimini destekler (Thairu et al. 2011; Viallard and Larrivé 2017). Kılcal damar oluşumu devam ederken endotel hücreler bir kısım büyüme faktörleri salgırlar (VEGF, FGF, PDGF ve Heparin Binding-EGF gibi) ve damar oluşumunu desteklerler (kan basıncına dayanıklı esnek damar oluşumu) (Viallard and Larrivé 2017; Paredes et al. 2021). Hipoksik TME kanser hücrelerinde, anjiyojenez, genomik instabilite, invazyon, metastaz, radyo/kemoterapi tedavi direnci, enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi, immün yanıtın ve apoptozdan kaçış gibi prognostik faktörlerle ilişkilendirilmektedir (Meng et al. 2019) (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF1α aktivitesi (Lin et al. 2014)’den alınmıştır.

1. GİRİŞ

Hipoksi, kötü prognosis ve düşük sağ kalım ile karakterize tümörlerin temel özelliğidir (Kumar and Deep 2020). Dolayısıyla, TME'deki hipoksi varlığı ve düzeyinin saptanması giderek önem kazanmaktadır. Yapılan son çalışmalarda, kanser dokularında tespit edilen prognostik değişimlerin ya da patolojik durumların, TME'de artan tümör kaynaklı hipoksik eksozomlar aracılığı ile meydana geldiği gösterilmiştir. Eksozomlar, kanser hücreleri ve mikroçevredeki farklı hücreler arasında bir kısım sinyal iletimleri ile hipoksik adaptasyon sağlamanın yanı sıra hayatta kalmaları, büyümeleri, anjiyojenik yapılar oluşturmaları ve metastatik yayılmaları için uygun koşulları oluşturmak üzere mikroçevreleriyle yoğun bir şekilde iletişim kurarlar (Meng et al. 2019; Kumar and Deep 2020).

Hipoksik koşullarda eksozomal kargo içerikleri önemli ölçüde değişir ve hipoksik eksozomlar, yüzeylerinde veya vezikül içinde taşıdıkları onkojenik sinyal proteinleri, ligandlar, enzimler ve mikroRNA'lar yoluyla tümör progresyonuna, anjiyojenezine ve metastazına olanak sağlamaktadırlar. Eksozomal mikroRNA'ların meme kanseri ve kolorektal kanser dahil birçok hipoksik tümörlerde potansiyel biyobelirteç olduğu ileri sürülmüştür (Qu et al. 2014; Jung et al. 2017; Wang et al. 2017). Yumurtalık kanserinde HIF'lerin, miR-21-3p, miR-125b-5p ve miR-181d-5p dahil olmak üzere çeşitli onkogenik mikroRNA'larca zenginleşmiş eksozomların salınımını indüklediği gösterilmiştir (Ramteke et al. 2015; Kulkarni et al. 2019; Kumar and Deep 2020). Prostat kanser hücreleri tarafından salgılanan hipoksik eksozomlarda kanserle ilişkili fibroblast (CAF) fenotipinin bilinen indükleyicileri olan IL6, TNF1 α ve TGF- β 2'nin daha yüksek ekspresyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir.

Prostat stromal hücrelerin hipoksik eksozomlar ile muamelesi sonucunda, α -SMA'nın (CAF fenotipi için bir biyobelirteç) ifadesinin arttığı ileri sürülmüştür (Kumar and Deep 2020). Ağız skuamöz hücreli karsinomda eksozomal miR-210-3p'nin tümör anjiyojenezini, progresyonunu ve tümör evresini artırdığı tespit edilmiştir (Paskeh et al. 2022). Ancak özellikle BBSHK'da hipoksik şartlarda salınan eksozomal mikroRNA'ların tümör anjiyojenezine etkisini gösteren fonksiyonel çalışmalar yapılmamıştır.

1. GİRİŞ

Son yıllarda BBSHK'nin tanı ve tedavisinde önemli gelişmeler olmasına rağmen BBSHK hala kanser nedeni ölümlerin dikkate değer sebeplerinden biridir ve ileri BBSHK vakalarına karşı yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve yeni onkogenlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi acil bir gerekliliktir. Tüm bu bilgiler kapsamında, bu tez çalışmasında, miR-1825'in BBSHK patogenezindeki rollerinin anlaşılması, kanser kök hücre özelliklerine katkısı, olası yeni hedef genlerinin belirlenmesi ve BBSHK hücrelerinden türetilen eksozomal miR1825'in hipoksik koşullar altında anjiyojenez oluşumu üzerine fonksiyonel etkilerinin *in vitro* ve/veya *in vivo* testlerle araştırılması amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lu et al. (2008); Bourguignon et al. (2012); Yu et al. (2014), MikroRNA'ların %50'den fazlasının kanserle ilişkili genomik bölgelerde veya kırılma bölgelerde yer aldığını ve onko-miR'ler veya TS-miR'ler olarak hareket ettiklerini belirtmişlerdir. Bu da mikroRNA'ların BBSHK dahil olmak üzere insan kanserlerinin patogenezi ile yakından ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Lu et al. (2008); Shen et al. (2019); Wang et al. (2019); Pan et al. (2021) MikroRNA'ların hücrelere kanser kök hücre özelliğinin kazandırılması, tümör başlangıcı ve ilerlemesi, anjiyogenez, tümör mikroçevresinin yeniden şekillendirilmesi, epitelyal mezenkimal geçiş, invazyon, hücrelerin aşırı çoğalması ve ilaç direnci gibi birçok kanser oluşum süreci ile ilişkili olduklarını ortaya çıkarmışlardır.

Voutsadakis et al. (2021) 20q11.21 lokusunun potansiyel onkogenik özelliklere sahip kanser ile ilişkili genleri içerdiğini ve kolorektal kanserde bu bölgede saptanan amplifikasyonun genomik instabiliteye ve tekrarlayan genetik anormalliklere yol açarak kanser patogeneziye katkıda bulunduğunu göstermiştir.

Joe et al. (2020) 20q11.21 bölgesindeki kopya sayısı değişiminin, birçok kanser türünde ve insan pluripotent kök hücrelerde artan göç kapasitelerine, metastatik potansiyele, anormal farklılaşma eğilimlerine, hücre çoğalmasına ve apoptoza duyarlılığın azalmasına yol açtığını tespit etmiştir.

Nguyen et al. (2013); Martins-Taylor et al. (2011) MiR-1825'in de içerisinde yer aldığı 20q11.21 kromozomal bölgesinin insan embriyonik ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde tekrarlayan bir fonksiyon kazanımı bölgesi olduğunu göstermişlerdir.

Ponsuksili et al. (2014) MiR-1825'in hepatoselüler karsinomlu hastaların kanında ve serumunda yüksek oranda ifade edilen mikroRNA'lardan biri olduğunu göstermişlerdir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Li et al. (2013) Pankreas kanserli hastaların serum örneklerini kullanarak yaptıkları mikroarray analizi sonucunda ifadeleri anlamlı olarak değişen 735 mikroRNA arasından miR-1825'in kanserli hastaların serum örneklerinde oldukça yüksek ifade düzeyine sahip olduğunu saptamışlardır.

Karatas et al. (2016) CD133 pozitif ve CD133 negatif olarak ayrıştırılan LSHK örneklerinde mikroRNA profil karşılaştırması neticesinde, miR-1825'in CD133 pozitif larenks kanseri kök hücrelerinde anlamlı olarak yüksek düzeyde ifade edildiğini ortaya çıkarmışlardır.

Xu et al. (2020); Zeng et al. 2020 FREM1 ifadesinin meme kanseri prognozu ve immün hücre infiltrasyonu ile ilişkili olduğunu ve FREM1'in meme kanseri için potansiyel bir prognostik biyobelirteç olduğunu göstermişlerdir.

Min et al. (2015) Geç tanı, lenf nodu ve uzak metastazın BBSHK'da kötü prognoz ve düşük sağkalıma yol açan kritik nedenler olduğunu belirtmişlerdir.

Jansen et al. (2010) Endotelyal hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve tümör kütlesi içinde yeni kan damarlarının oluşumunu içeren karmaşık bir süreç olan anjiyojenezin, BBSHK dahil birçok kanser türünde tümör büyümesine ve metastazına katkıda bulunan gelişmiş bir vasküler ağ sağladığını göstermişlerdir.

Sato et al. (2019) Tümör kaynaklı eksozomal mikroRNA'ların, kanser olmayan hücrelerde pre-metastatik niş oluşumuna zemin hazırlayarak, parakrin sinyal iletimi aracılığı ile hücrelere ait mikroçevreyi değiştirerek tümörün ilerlemesine büyük ölçüde katkı sağladıklarını göstermişlerdir.

Li et al. (2020) Hipoksi ile indüklenen glioblastoma tarafından salgılanan eksozomlardaki miR-182-5p'nin, HUVEC'lere taşınarak anjiyojenez ve dolayısıyla glioma progresyonuna yol açtığını bulmuşlardır.

Zeng et al. (2018) Eksozomdan türetilen miR-25-3p'nin endotel hücrelere taşındığını, Krüppel benzeri faktör 2 (KLF2) ve KLF4'ü hedefleyerek anjiyojenez ve

2. KAYNAK ÖZETLERİ

vasküler geçirgenliği indüklediğini ve pre-metastatik niş oluşumunu sağladığını ortaya koymuşlardır.

Li et al. (2020) Tümör kaynaklı mikroRNA'ların, kanser hücreleri ve bunların stromal hücreleri arasında taşınabildiğini ve her iki hücre tipinde de hedeflerinin ifadesini etkili bir şekilde inhibe edebildiğini göstermişlerdir.

Kalkuni et al. (2019); Kumar and Deep (2020) Yumurtalık kanserinde HIF'lerin, miR-21-3p, miR-125b-5p ve miR-181d-5p dahil olmak üzere çeşitli onkogenik miRNA'larca zenginleşmiş eksozomların salınımını indüklediği gösterilmiştir.

Qu et al. (2014); Wang et al. (2017) Hipoksik koşullarda eksozomal kargo içeriklerinin önemli ölçüde değiştiğini ve hipoksik eksozomların yüzeylelerinde veya vezikül içinde taşıdıkları onkojenik sinyal proteinleri, ligandlar, enzimler ve mikroRNA'lar yoluyla tümör progresyonuna, anjiyojenezine ve metastazına olanak sağladıklarını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca eksozomal mikroRNA'ların meme kanseri ve kolorektal kanser dahil birçok hipoksik tümörlerde potansiyel biyobelirteç olduğunu göstermişlerdir.

Kumar and Deep (2020) Prostat kanser hücreleri tarafından salgılanan hipoksik eksozomlarda CAF fenotipinin bilinen indükleyicileri olan IL6, TNF1 α ve TGF- β 2'nin daha yüksek ifadeye sahip olduğunu tespit etmişlerdir ve prostat stromal hücrelerin hipoksik eksozomlar ile muamelesi sonucunda, α -SMA'nın (CAF fenotipi için bir biyobelirteç) ifadesinin arttığını ileri sürmüşlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının *in vitro* kısmı, 118Z767 nolu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (YÜTAM) laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışmanın *in vivo* kısmı 121Z004 nolu TÜBİTAK 1002 projesi kapsamında ANKARA, KOBAY Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1'de, kullanılan sarf malzemeler ise Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Materyal	Marka	Kullanım amacı
Derin Dondurucu (-20°C)	Biobase	-20°C korunması gereken malzemeler için kullanıldı.
Buzdolabı (4°C)	Biobase	+4°C'de saklanması gereken malzemeler için kullanıldı.
Derin Dondurucu (-80°C)	ESCO Lexicon®	-80°C korunması gereken malzemeler için kullanıldı.
Epoch Spektrofotometre	BioTek EPOCH	Hücre canlılık testlerinde, RNA, protein ve ekzozom konsantrasyonunun ölçümünde kullanıldı.
Laminar air-flow (Class II Safety Cabinet)	ESCO NordicSafe™	Tüm hücre kültürü çalışmalarında steril bir ortam sağlanması için kullanıldı.
Ultra santrifüj	HITACHI	Ekzozomların izolasyonunda kullanıldı.
Gerçek zamanlı qPZR (qRT-PCR) cihazı	Qiagen Rotor-Gene	Hedef genlerin ifade seviyelerinin analizi için kullanıldı.
İnvert Mikroskop	Leica	Hücrelerin görüntülenmesinde kullanıldı.
LSM 710 Konfokal lazer taramalı mikroskop	Zeiss	Ekzozomların endotel hücrelere taşındığını doğrulamak amacıyla kullanıldı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.1. (Devam)

TEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)	Hitachi HighTech HT7700	Eksozomların şekil ve boyutlarının banalizisi için kullanıldı.
Zetasizer Nano ZSP90	Malvern Panalytical	Eksozomların boyutlarının analizi için kullanıldı.
TC20™ Automated Cell Counter	BioRad	Hücrelerin sayılması için kullanıldı.
Mikropipet	Axygen	Çalışmalarda kullanılacak sıvı malzemelerin miktarlarını hacimsel olarak doğru şekilde elde etmek amacıyla kullanıldı.
Su Banyosu	Wisd WiseBath	Hücre kültüründe kullanılacak materyallerin uygun sıcaklık derecesine getirilmesinde kullanıldı.
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Eksozom ve protein izolasyonunun belirli aşamasında kullanıldı.
Mini Santrifüj	WiseSpin	Çalışmalarda, ayrıştırma işlemlerinin gerçekleşmesi için kullanıldı.
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10	Katı-Sıvı karışımları homojenize etmek için kullanıldı.
Otoklav	Tomy SX-500E	Çalışmalarda kullanılan tüm materyali sterilize etme işleminde kullanıldı.
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202	Belirli sıcaklıklarda inkübasyon gerektiren çalışmalarda kullanıldı.
Jel Görüntüleme Cihazı	Bio-RadChemiDoc	Jel ve membran görüntüleme için kullanıldı.
Blotlama Cihazı	Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™	Western blot deneyinde proteinlerin jelden membrana transferi için kullanıldı.
SDS-PAGE elektroforez	Bio-Rad	Proteinlerin ayrıştırılmasında kullanıldı.
Yatay elektroforez	Bio-Rad	Plazmid, genomik DNA ve PCR ürünlerinin ayrıştırılmasında kullanıldı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Materyal	Marka	Kullanım Amacı
175 cm ² hücre büyütme kapları	SPL	Hücrelerin çoğaltılmaları için kullanıldı.
75 cm ² hücre büyütme kapları	SPL	Hücrelerin çoğaltılmaları için kullanıldı.
25 cm ² hücre büyütme kapları	SPL	Hücrelerin çoğaltılmaları için kullanıldı.
96 kuyucuklu plate	SPL	Hücre canlılık testlerinde hücrelerin çoğaltıldığı ortam olarak kullanıldı.
24 kuyucuklu plate	SPL	RNA ve Protein izolasyonu için hücrelerin çoğaltıldığı ortam olarak kullanıldı.
6 kuyucuklu plate	SPL	RNA/Protein izolasyonu ve transfeksiyon için hücrelerin çoğaltıldığı ortam olarak kullanıldı.
NutriCulture RPMI 1640	EcoTech Biotechnology	FaDu, Detroit-562 ve Hep-2 hücrelerinin çoğaltıldığı besiyeri ortamı olarak kullanıldı.
DMEM F12	Gibco®	SCC-9 hücrelerinin çoğaltıldığı besiyeri ortamı olarak kullanıldı.
NutriCulture DMEM High Glucose	EcoTech Biotechnology	HGF-1 ve HUVEC hücrelerinin çoğaltıldığı besiyeri ortamı olarak kullanıldı.
Fetal Bovine Serum (FBS)	BioSera	Hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gerekli büyüme faktörlerini içeren serum olarak kullanıldı.
Penisilin-Streptomisin	Gibco®	Hücrelerin çoğaltıldığı besiyeri ortamını bakteri, mantar gibi kontaminasyonlara karşı korumak için kullanıldı.
L-Glutamin	Gibco®	Hücrelerin çoğalmasını destekleyici olarak kullanıldı.

Çizelge 3.2. (Devam)

Trypsin	Gibco®	Hücrelerin pasajlama aşamasında tutundukları yüzeyle bağlantısını kesmek için kullanıldı.
Hydrocortisone	Sigma	DMEMF12 besiyerini hazırlamak için kullanıldı.
Phosphate Buffered Saline (PBS)1x	EcoTech Biotechnology	İzotonik tampon çözelti olarak hücre kültürü çalışmalarında hücreleri yıkama amaçlı kullanıldı.
ClearBand Nitroselüloz Membran	EcoTech Biotechnology	Proteinlerin jelden transferi için kullanıldı.
Whatman Kâğıdı	Thermo Fisher Scientific	Western Blot yönteminde sandviç modeli oluşturmak ve tamponun akışını sağlamak için kullanıldı.
ClearBand RIPA Lizis Buffer	EcoTech Biotechnology	Protein izolasyonunda hücreleri parçalamak için kullanıldı.
ClearBand Laemmli Sample Buffer 10x	EcoTech Biotechnology	Protein örneklerinin hazırlanması için kullanıldı.
Cell Viability Detection Kit-8	EcoTech Biotechnology	Hücre canlılığını belirlemek için kullanıldı.
ClearBand ECL Western Blot Substrat	EcoTech Biotechnology	Antijen-antikor ilişkisinin ve miktarının belirlenmesi ve görüntülenmesinde kullanıldı.
Primer antikor (β -aktin, FREM1, CD63, Hif1a, mTOR, TSC2)	Santa Cruz Biotechnology®	Membrandaki protein havuzundan araştırmaya konu olan proteini saptamak ve ölçmek amacıyla belirli bir proteine spesifik olarak bağlanmayı sağlaması amacıyla kullanıldı.
Anti-Mouse ve Anti-Rabbit SekonderAntikor	Santa Cruz Biotechnology®	Membrandaki protein havuzundan araştırmaya konu olan proteini saptamak ve ölçmek amacıyla belirli bir proteine spesifik olarak bağlanmayı sağlaması amacıyla kullanıldı.

Çizelge 3.2. (Devam)

Ki-67 Rabbit Monoclonal antibody	Ventana	Fare ksenograft tümör örneklerinin analizi için kullanıldı.
RNA Invitrogen™ mirVana™ miRNA Isolation Kit	Invitrogen™	Eksozomlardan mikroRNA izolasyonu yapmak için kullanıldı.
bEGF, FGF ve rhIGF-I	Protech Human	Küre oluşturma ve 3D anjiyogenez testinde büyüme faktörü olarak kullanıldı.
Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR)	Corning®	Hücre invazyon testi, tüp oluşumu testi, 3D anjiyogenez testi için kullanıldı.
Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix High Concentration	Corning®	Farelerde ksenograft tümör modeli oluşturmak için kullanıldı.
PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit	Sigma-Aldrich	Eksozomların etiketlenmesi için kullanıldı.
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen™	Hedef genlerin hücrelere transfeksiyonu için transfeksiyon ajanı olarak kullanıldı.
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	MikroRNA'lardan cDNA sentezi için kullanıldı.
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	RNA'lardan cDNA sentezi için kullanıldı.
TaqMan Universal Master Mix	Applied Biosystems	Hedef genlerin ifade seviyelerini incelemek için kullanıldı.
RNU43, RNU6B ve miR- 1825 Spesifik Prob	Applied Biosystems	Hedef genlerin ifade seviyelerini incelemek için kullanıldı.
Non-targeting mimic control, miR-1825 mimic, miR1825 inhibitör	Sigma-Aldrich	Hücrelere transfekte etmek için kullanıldı.
Non-targeting mimic control	Sigma-Aldrich	Hedef genlerin ifade seviyelerini incelemek için kullanıldı.
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	Solis BioDyne	Hedef genlerin ifade seviyelerini incelemek için kullanıldı.

Çizelge 3.2. (Devam)

Affimetrix, Gene Level Array Clariom™ D Assay, human	Thermo Fisher	Mikroarray analizi yapmak için kullanıldı.
pLightSwitch-3'UTR plasmid	Active Motif	FREM1 3'UTR primerlerini klonlamak için kullanıldı.
LightSwitch™ Luciferase Assay Kit	Active Motif	Hücrelerden lusiferaz testi yapmak için kullanıldı.
TSC2 3'UTR plazmidi (pMir Target vector 7.9 kb)	Origene	MiR-1825'in hedef genin TSC2 olduğunu doğrulamak için kullanıldı.
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent	MiR-1825'in hedef genin FREM1 ve TSC2 olduğunu doğrulamak için kullanıldı.
EcoPURE Total RNA Kit	EcoTech Biotechnology	Hücre ve dokulardan RNA izolasyonu için kullanıldı.
EcoSpin Plazmid Isolation Kit	EcoTech Biotechnology	Hücrelerden plazmit izolasyonu için kullanıldı.
EcoPURE PCR/Gel Purification Kit	EcoTech Biotechnology	PCR ile çoğaltılan DNA örneğinin saflaştırılması için kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. *In siliko* araçlarla miR-1825'in onkogenik potansiyellerinin belirlenmesi

MiR-1825'in onkogenik potansiyelini ortaya koymak adına Gen Expression Omnibus (GEO) veri tabanında herkese açık olarak bulunan 4 adet mikrodizin verisi analiz edildi. Bu kapsamda, renal hücreli karsinom (GSE41282) ve kolanjiyokarsinomlu (GSE53992) hastaların tümör-normal doku çiftlerinde miR-1825 ifade seviyelerindeki değişim incelendi. Ayrıca hepatoselüler karsinomlarda (GSE47841) histolojik farklılaşma derecesine ve over kanserlerde (GSE31164) ise reküren-nonreküren durumlarına göre miR-1825 ifade seviyelerindeki farklılıklar araştırıldı. Ayrıca, miR-1825'in varsayılan hedefi olarak tespit edilen FREM1'in BBSHK hastalarının tümör-normal doku çiftlerinde ekspresyon seviyelerindeki değişiklik, UALCAN web aracı

kullanılarak araştırıldı (Chandrashekar et al. 2017). Bunlara ek olarak The Cancer Genome Atlas (TCGA) veritabanındaki veriler kullanılarak Kaplan Meier Plotter online uygulaması yardımıyla miR-1825 ve FREM1 ifade seviyesinin sağ kalıma etkisini incelemek için baş ve boyun kanseri hastalarına ait veriler kullanılarak sağkalım analizi yapıldı (Li et al. 2018).

Diğer yandan, Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında herkese açık olarak bulunan GSE12546 veri seti GEO2R *in silico* aracı kullanılarak mimik hipoksik koşullar altında HUVEC hücrelerinde deregüle olmuş genler (DEGs) analiz edildi. Gruplar arasında farklı ifadeye sahip genlerin nokta grafiği, GEO2R *in silico* aracıyla oluşturuldu. Ayrıca, cBioPortal veri tabanındaki PathwayMapper veri aracı ile the Cancer Genome Atlas Program (TCGA) veri tabanından elde edilen veriler kullanılarak TSC2 ile ilişkili yollar ortaya çıkarıldı (Cerami et al. 2012).

3.2.2. Normal ve tümörlü baş boyun kanseri doku örneklerinin temini ve arşivlenmesi

Tez kapsamında incelenmiş olan baş boyun skuamöz karsinomlu hastalara ait doku örnekleri Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak-Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda rutin patolojik inceleme için alınan ve Atatürk Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik incelemesi yapılan örneklerden temin edildi. Biyopsi sonucu skuamöz hücreli karsinoma sahip hastalar çalışmaya dahil edildi ve bu hastalardan ameliyat sonrasında normal ve tümörlü baş boyun kanser dokusu alındı, sıvı nitrojen içerisinde hızlıca dondurularak, RNA ve protein izolasyonuna kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. En az %70 oranında tümör dokusu içerdiği patolojik inceleme ile doğrulanan örnekler çalışmaya dahil edildi. Ayrıca, her bir hastadan temin edilen örneklerden bir kısmı immünohistokimya analizleri için kullanıldı.

Çalışmanın etiği, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesi (Erzurum, Türkiye) tarafından değerlendirildi ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde bilimsel ve etik açıdan bir sakınca olmadığına karar verildi (Kurul Karar No: B.30.2.ATA.0.01.00/34).

Hastalardaki tümörlerin TNM sınıflandırılmaları, tümör histolojik derecelendirmeleri, maksimum tümör çapı, tümörün yerleşimi bilgileri ile hasta yaşı, cinsiyeti, alkol ve sigara kullanım alışkanlıkları kaydedildi. Hastaların HIV, otoimmün hastalıklar ve hepatit için negatif olmalarına dikkat edildi. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilecek gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) deneyleri için çalışmaya dahil edilecek hasta sayısını belirlemek adına gerçekleştirilen güç analizi aşağıdaki gibidir;

Örneklerin ifade düzeyleri arasındaki farkın 10 birim, anlamlılık sınırının 0,001 olarak belirlendiğinde %80 güç düzeyine göre SD değerinin büyük olduğu grupta 12, küçük olduğu grupta 8 olacağı düşünüldüğünde her gruba yaklaşık 30 kişi (28 kişi) düştüğü hesaplandı (Anonymous 2018).

3.2.3. Hücre hatlarının temini ve kültüre edilmesi

Tez kapsamında kullanılan larenks kanseri hücre hattı Hep-2 hücreleri Şap Enstitüsü kültür koleksiyonundan, Detroit-562 nazofarenks kanseri hücre hattı Adana Alparslan Türkeş Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nden Dr. Öğr. Üyesi Sibel Öztaş'tan, FaDu hipofarenks kanseri hücre hattı, SCC-9 dil kanseri hücre hattı ve kontrol hücreleri olarak HGF-1 immortalize insan ağız içi fibroblast hücreleri ATCC® hücre kültür koleksiyonundan, HUVEC insan göbek kordonu damar endotel hücre hattı İstanbul Yeditepe Üniversitesi Tıbbi Genetik Bölümünden Prof. Dr. Ömer Faruk Bayrak'tan temin edildi.

Hep-2, Detroit-562 ve FaDu hücre hatları %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-Glutamin eklenerek hazırlanan RPMI-1640 besiyeri içerisinde çoğaltıldı. SCC-9 Hücre hattı %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin ve 400 ng/ml konsantrasyonda hidrokortizon eklenerek hazırlanan DMEM F12 besiyeri içerisinde çoğaltıldı. HGF-1 ve HUVEC hücre hattı %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin eklenerek hazırlanan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besi yeri içerisinde çoğaltıldı. Hücreler, deney süresi boyunca 37°C'de %5 CO₂'li nemlendirilmiş inkübatörde 25cm² ve 175cm²'lik flasklar içerisinde kültüre edildi. Hücreler her 2-3 günde bir, hücrelerin çoğalma hızlarına ve yapılacak deneylerin

amacına bağılı olarak pasajlandı. Deneyleler Termal döngü cihazı (PCR) ile rutin olarak test edilen mikoplazma içermeyen hücrelerle yapıldı.

3.2.4. Dokulardan TRIZol ile RNA izolasyonu

Baş ve boyun kanseri hastalarından tümör ve normal dokuların temin ve arşivlenmesine paralel olarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. -80°C'de saklanan doku örnekleri eşit miktarda kullanılarak sıvı nitrojen içerisinde toz haline getirildi. Sonrasında toz haline getirilen örnekler 500 µl TRIZol solüsyonu ile iyice pipetlenerek homojenize edildi.

Homojenize dokular TRIZol içerisinde oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek dokuların iyice parçalanması ve nükleik asitlere bağlanan proteinlerin nükleik asitlerden tamamen ayrışması sağlandı. Ardından 200 µl kloroform eklenerek örnekler iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildikten sonra 4°C'de 12.000g'de 15 dakika santrifüjlendi. Faz ayrışması gerçekleşen solüsyonların üstteki RNA içeren organik fazları yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Sonrasında 500 µl izopropanol eklenerek iyice karıştırılan örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 4°C'de 12.000g'de 10 dakika santrifüjlendi. Bu adım sonrasında beyaz renkte ya da renksiz çökelti şeklinde görülebilen RNA'lar %75 etil alkolle yıkanarak 4°C'de 7.500g'de 5 dakika santrifüjlendi. Son olarak kurumaya bırakılan RNA'lar iyice kuruduktan sonra nükleazlardan arındırılmış moleküler düzey su içerisinde çözüldü. RNA konsantrasyon ve saflıkları Epoch Microplate Spectrophotometer kullanılarak belirlendi.

3.2.5. Hücrelerden RNA izolasyonu

Hücreler 6 ve 24 kuyucuklu platelere ekilmiş ve bir gün boyunca inkübasyona bırakıldı. MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mimik mikroRNA ile transfekte edilen hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında her kuyudaki besi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1x PBS ile yıkandı. Hücrelerden RNA izolasyonu scraper yardımıyla üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. RNA konsantrasyon ve saflıkları Epoch Microplate Spectrophotometer kullanılarak belirlendi.

3.2.6. cDNA/miRNA cDNA sentezi ve qRT-PCR

Hücrelerden ve hasta doku örneklerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra ilk olarak miR-1825'in baş ve boyun kanseri hastalarına ait normal ve tümör doku örneklerindeki ifade düzeyleri mRNA seviyesinde qRT-PCR ile değerlendirildi. MiR-1825 ifade seviyelerini belirlemek adına öncelikle hücrelerden ve hasta dokularından elde edilen total RNA örnekleri konsantrasyonları 15 ng/ μ l olacak şekilde seyreltildi ve her örnek için 2 μ l RNA kullanıldı. Sonrasında, miR-1825 ve internal kontrol olarak kullanılan RNU43 için cDNA sentezi, mikroRNA spesifik primerler (Applied Biosystems) ve 'TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit' (Applied Biosystems) kullanılarak üretici firmanın protokollerine göre gerçekleştirildi. MiR-1825'in ifade analizi mikroRNA spesifik prob (Applied Biosystems) ve 'TaqMan Universal Master Mix' (Applied Biosystems) ile hazırlanan reaksiyonlar ile 2 ya da 3 tekrarlı olacak şekilde Rotor-Gene qRT-PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Kantitatif analiz delta-delta-Ct yöntemi kullanılarak yapıldı. MicroRNA ifade bilgisi küçük nükleer RNA'lardan RNU43 ile normalize edildi.

Gene ifade analizlerini gerçekleştirmek için elde edilen total RNA'dan cDNA sentezi High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit' (Thermo, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. Kısaca, kitin içeriğindeki bileşenler kullanılarak 2X RT Master Mix hazırlandı ve 20 μ L reaksiyon için 1000 ng RNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentez işlemleri SensQuest Labcycler PCR üzerinde sırasıyla 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika ve 85°C'de 5 dakika basamakları takip edilerek gerçekleştirildi. MikroRNA hedef genlerin hücrelerde ifadesi, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) ile üretici firmanın protokolü takip edilerek Rotor-Gene qRT-PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Primerlerin özgünlüğü, erime eğrisi analizi ile doğrulandı. Gen ifadelerinin normalizasyonu için GAPDH internal kontrol olarak kullanıldı. Deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve rölatif kantitasyon analizi delta-delta-CT metodu kullanılarak yapıldı. Çalışma kapsamında kullanılan primer dizileri Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kök hücre ve EMG belirteç genlerinin ifadelerinin belirlenmesinde kullanılan primer dizileri.

<i>Gen</i>	<i>Dizi</i>
<i>CD133-F</i>	5'-CGGCACCATGGTCTCTGG-3'
<i>CD133-R</i>	5'-CAGCACACTCCACACATGGC-3'
<i>SOX2-F</i>	5'-CTCCGGGACATGATCAGC-3'
<i>SOX2-R</i>	5'-GGTAGTGCTGGGACATGTG-3'
<i>KLF4-F</i>	5'-CCCAATTACCCATCCTTCCTG-3'
<i>KLF4-R</i>	5'-GTCTTCCCCTCTTTGGCTTG-3'
<i>OCT4-F</i>	5'-CTGGAGAAGGAGAAGCTGGA-3'
<i>OCT4-R</i>	5'-CAAATTGCTCGAGTTCTTTCTG-3'
<i>CD44-F</i>	5'-AGCAGCAGGTCAGAGTGTGG-3'
<i>CD44-R</i>	5'-GATCGATGCCCTGCTTTACC-3'
<i>E-Cad-F</i>	5'-TGCCCAGAAAATGAAAAAGG-3'
<i>E-Cad-R</i>	5'-GTGTATGTGGCAATGCGTTC-3'
<i>N-Cad-F</i>	5'-ACAGTGGCCACCTACAAAGG-3'
<i>N-Cad-R</i>	5'-CCGAGATGGGGTTGATAATG-3'
<i>SNAIL1-F</i>	5'-AAGATGCACATCCGAAGCC-3'
<i>SNAIL1-R</i>	5'-CGCAGGTTGGAGCGGTCAGC-3'
<i>SNAIL2-F</i>	5'-ATACCACAACCAGAGATCCTCA-3'
<i>SNAIL2-R</i>	5'-GACTCACTCGCCCCAAAGATG-3'
<i>ZEB1-F</i>	5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3'
<i>ZEB1-R</i>	5'-ACAGCAGTGTCTTGTGTTGTAG-3'
<i>ZEB2-F</i>	5'-AACAAACGAGATTCTACAAGCCTC-3'
<i>ZEB2-R</i>	5'-TCGCGTTCCTCCAGTTTTCTT-3'
<i>Vimentin-F</i>	5'-GAGAACTTTGCCGTTGAAGC-3'
<i>Vimentin-R</i>	5'-GCTTCCTGTAGGTGGCAATC-3'
<i>GAPDH-F</i>	5'-CCATCTCCAGGAGCGAGATC-3'
<i>GAPDH-R</i>	5'-GGCATTGCTGATGATCTTGAGG-3'
<i>NOTCH-1-F</i>	5'-AGCAGCAGGTCAGAGTGTGG-3'
<i>NOTCH-1-R</i>	5'-GATCGATGCCCTGCTTTACC-3'

Çizelge 3.4. MiR-1825 hedef genlerinin ifadelerinin belirlenmesinde kullanılan primer dizileri.

<i>Gen</i>	<i>Dizi</i>
<i>STK4-AS1-F</i>	5'-CACTCAGAGCTCCGGCTT-3'
<i>STK4-AS1-R</i>	5'-AAGGGTGGGTGCTCAGGT-3'
<i>FAM107B-F</i>	5'-CAGAATTGCAGAAGGTGATGGA-3'
<i>FAM107B-R</i>	5'-TTCACCTTCACAACTCGGG-3'
<i>CDH1-F</i>	5'-TGTTGAAGTGAACACCCCAGA-3'
<i>CDH1-R</i>	5'-TTTCACTTCGCCCCAGGG-3'
<i>FREM1-F</i>	5'-AAAGGAGTGCACCTATGACAGTC-3'
<i>FREM1-R</i>	5'-AGGCCACCAACGGTGACT-3'
<i>KCNMA-F</i>	5'-GGTTCACACCTCCAGGAATGG-3'
<i>KCNMA-R</i>	5'-CATTAGAATGTGCGTCCCCTG-3'
<i>ISPD (CRPPA)-F</i>	5'-AGTCACATCTGAGGCTCTGG-3'
<i>ISPD (CRPPA)-R</i>	5'-CTACTCTCTTCAAGCATGCTCAG-3'
<i>OVOL2 -F</i>	5'-ATGCCCAAAGTCTTCCTGGT-3'
<i>OVOL2 -R</i>	5'-CGTCGCTGCGGCAGTCCT-3'
<i>TSC-2-F</i>	5'-AAAGGAGTGCACCTATGACAGTC-3'
<i>TSC-2-R</i>	5'-AGGCCACCAACGGTGACT-3'

3.2.7. Hücre sayımı

Kültüre edilen hücreler %65-70 oranında yoğunluğa ulaştıktan sonra PBS ile yıkandı ve tripsin ile muamele edilerek kaldırılan hücreler santrifüj ile çöktürüldü. Santrifüj sonrası hücre pelletleri belirlenen oranda taze besiyeri eklenerek çözdürüldü ve iyice homojen hale gelmesi sağlandı. Hücre sayımı için BioRad TC20™ Automated Cell Counter cihazı kullanıldı. Tripkan mavisi boyaması için eppendorf tüp içerisine Tripkan mavisi solüsyonundan 10 µl ve sayımı yapılacak hücre solüsyonundan 10 µl eklendi.

Hazırlanan karışımdan hücre sayım cihazının slaytlarına 10 µl yüklendi ve cihazda sayım gerçekleştirildi.

3.2.8. Hücrelerin 6-kuyucuklu, 24 kuyucuklu ve 96-kuyucuklu platelere ekilmesi

Hücre sayımından sonra 6 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğuna 2 ml besiyeri içerisinde $1,2 \times 10^5$ - $1,5 \times 10^5$ sayıda hücre ekimi yapıldı.

24 kuyucuklu platenin her bir kuyucuğuna 500 µl besiyeri içerisinde $2-3 \times 10^4$ hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 96 kuyucuklu platenin her bir kuyucuğuna 100 µl besiyeri içerisinde $2-3 \times 10^3$ hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra hücreler deneylerde kullanılincaya kadar 37°C 'de %5'lik CO_2 içeren inkübatör içerisinde büyütüldü.

3.2.9. MikroRNA transfeksiyonu

MikroRNA transfeksiyon işlemi miR-1825 mimik ve miR-1825 inhibitör moleküllerinin hücre içerisine etkili bir şekilde taşınmasını sağlayan Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (Thermo, Rockford, USA) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre yapıldı. Kontrol olarak herhangi bir geni hedeflemeyen bir oligonükleotid dizisi (non-targeting kontrol mikroRNA) kullanıldı. Hücreler 6-, 24-, veya 96-kuyucuklu platelere uygun sayılarda ekilerek 1 gün boyunca inkübe edildikten sonra Karatas ve ark. tarafından tarif edildiği şekilde transfeksiyon işlemine tabi tutuldu (Karatas et al. 2016). Sonrasında hücreler 37°C 'de inkübasyona bırakılarak ve 24, 48 veya 72 saat sonunda fonksiyonel çalışmalarda kullanıldı.

3.2.10. MiR-1825'in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerinin araştırılması

MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mimik mikroRNA ile transfekte edilen hücrelerin canlılığını değerlendirmek için hücreler 96 kuyucuklu platenin kuyusuna ekildi ve 24 saat sonra hücreler Lipofectamine RNAiMAX

Transfection Reagent (Invitrogen) kullanılarak, miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mimik mikroRNA ile transfekte edildi. Hücre canlılığı üç gün boyunca 24 saatte bir ölçüldü. Hücre canlılığı, CVDK-8 (EcoTech Biotechnology) kiti ile üretici firmanın protokolüne göre Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) yardımıyla 450 nm’de absorbans ölçümü yapılarak değerlendirildi.

3.2.11. MiR-1825’in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin göçü üzerindeki etkilerinin araştırılması

MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mimik mikroRNA ile transfekte edilen hücrelerin göçünü değerlendirmek için hücreler 6 kuyucuklu platenin herbir kuyusuna ekildi ve 24 saat sonra hücreler Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) kullanılarak miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mimik mikroRNA ile transfekte edildi. Hücre göçü testi Transwell® Permeable Supports (Corning) kullanılarak gerçekleştirildi. MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen hücreler, Transwell® Permeable Supports’a, iki tekrarlı olarak her chamber’da 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra göç etmeyen hücreler pamuk swap yardımıyla chamber’ların üst tarafından kazındı, membranın alt yüzeyinde göç eden hücreler %100 metanol ile sabitlendi ve 20 dakika boyunca %2’lik etanol ve %0,3’lük kristal viyole içeren solüsyon içerisinde boyandı. Membranlar slaytların üzerine sabitlendikten sonra hücre sayımı yapıldı.

3.2.12. MiR-1825’in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin invazyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması

MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mimik mikroRNA ile transfekte edilen hücrelerin invazyonunu değerlendirmek için hücreler 6 kuyucuklu platenin herbir kuyusuna ekildi ve 24 saat sonra hücreler Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) kullanılarak miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mimik mikroRNA ile transfekte edildi. Hücrelerin invaziv potansiyeli BD BioCoat Matrigel invasion chambers (Becton Dickinson) kullanılarak değerlendirildi. MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen hücreler, BD BioCoat Matrigel invasion chambers’a iki tekrarlı olarak her chamber’da

5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra göç etmeyen hücreler pamuk swap yardımıyla chamber'ların üst tarafından kazındı, membranların alt yüzeyine göç eden hücreler %100 metanol ile sabitlendi ve 20 dakika boyunca %2'lik etanol ve %0,3'lük kristal viyole içeren solüsyon içerisinde boyandı. Membranlar slaytların üzerine sabitlendikten sonra hücre sayımı yapıldı.

3.2.13. MiR-1825'in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin koloni oluşumu üzerindeki etkilerinin araştırılması

MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mimik mikroRNA ile transfekte edilen hücreler 48 saat sonra tripsinle kaldırılarak 6 kuyucuklu platenin her bir kuyusuna $3-4 \times 10^3$ hücre düşecek şekilde üç tekrarlı olarak ekildi. 3 günde bir besiyerleri taze besiyeri ile değiştirildi. Ortalama 10-12 gün sonunda koloniler çıplak göz ile görülecek büyüklüğe ulaştığında kuyulardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyular PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler metanol ile fikse edildi. Fikse edilen koloniler %0,1 kristal viyole ile 20 dakika boyunca boyandı. Daha sonra invert mikroskop kullanılarak koloniler sayıldı ve klon çeşitlerine (holoklon, meroklon ve paraklon) göre sınıflandırıldı.

3.2.14. MiR-1825'in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin kürecik oluşumu üzerindeki etkilerinin araştırılması

MiR-1825'in baş ve boyun kanser oluşumunda kök hücre karakteristiği ile ilişkisinin belirlenmesi için küre oluşturma testi yapıldı. MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mimik mikroRNA ile transfekte edilmiş olan hücreler 96 kuyucuklu ultra-low attachment plateler de her kuyuya 1000 hücre gelecek şekilde üç tekrarlı olarak ekildi. Hücreler epidermal büyüme faktörü (EGF, 20 ng/mL), insulin büyüme faktörü (IGF, 5 µg/mL) ve fibroblast büyüme faktörü (bFGF, 20 ng/mL) içeren serumsuz RPMI besi yeri (Gibco-BRL, Bethesda, MA) ile kültüre edildi ve hücrelerin besiyeri ortamı her 2 günde bir değiştirildi. 4. günün sonunda her bir kuyucuktaki kürecik sayısı rastgele üç ayrı bölgedeki kürecikler invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) yardımıyla sayılarak hesaplandı.

3.2.15. MiR-1825'in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinin hücre apoptozu üzerindeki etkilerinin araştırılması

MiR-1825'in HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinde apoptotik aktivite üzerindeki etkisinin araştırılması için Kaspaz testi kullanıldı. MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mimik mikroRNA ile transfekte edilen hücrelerde transfeksiyondan 48 saat sonra Kaspaz-3 aktivitesi "CaspACE™ Assay System, Colorimetric (Biovision)" kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek ölçüldü. Optikal yoğunluk değerleri Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) ile absorbans ölçümü yapılarak belirlendi.

3.2.16. Aldehid dehidrojenaz aktivite testi

Fadu, SCC-9, Hep-2 ve HGF-1 hücreleri 6 kuyucuklu platelerin her bir kuyusuna 8×10^4 hücre olacak şekilde ekildi ve hücreler %50 konfluensiye ulaştıktan sonra miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mimik mikroRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler tripsinle kaldırılarak toplandı ve hücrelerin aldehid dehidrojenaz (ALDH) aktiviteleri "Aldehyde Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (SIGMA)" kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek ölçüldü.

3.2.17. Gen ifadesi mikroarray analizi

MiR-1825'in hedef genlerini belirlemek adına öncelikle gen ifade mikrodizin analizi yapılmıştır. Öncelikle Hep-2 hücreleri 5×10^4 hücre/kuyu yoğunluğunda 6 kuyucuklu platelere ekildi ve bir gün boyunca inkübe edildi. Ardından miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında her kuyudaki besi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1x PBS ile yıkandı. Hücrelerden RNA izolasyonu yularıda tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi.

RNA integriteleri jel elektroforez yardımıyla kontrol edildi. Normalizasyon için referans olarak Clariom D arrays for human RNA'sı kullanılmıştır. Toplamda sekiz RNA

örneği (dört grup ve her grup için iki tekrarlı olacak şekilde) biotin ile etiketlendi, saflaştırıldı ve Affymetrix GeneChip Hybridization Oven 640 arraylerine yüklenerek hibridize edildi. Hibridizasyon sonrası yıkamalardan sonra, slaydı taramak için yüksek çözünürlük teknolojisine sahip Affymetrix GCS 3000 7G tarayıcı kullanıldı. Elde edilen görüntüler, Computer Workstation ve GeneChip Operating Software (GCOS) kullanılarak analiz edildi (Lu et al. 2006). İfade değerlerinin normalizasyonu için Robust Multi-array Average (RMA) kullanıldı.

MiR-1825'i yüksek düzeyde ifade eden ve MiR-1825 ifadesinin inhibe olduğu hücrelerdeki gen ifade profilleri kontrol mikroRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki gen ifade profilleriyle karşılaştırılarak log₂ ekspresyon değerleri kullanılarak gen ifade kat değişimleri belirlendi. Daha sonra gruplar arasında ifadeleri anlamlı olarak değişen genler belirlendi.

3.2.18. *İn siliko* araçlarla mikroRNA hedef tahmini

MiR-1825'in hedef genlerini belirlemek adına gen ifade mikrodizin analizi yapıldıktan sonra ifadesiz anlamlı değişen genler biyoinformatik araçlar yardımıyla filtrelenerek öncelikli aday hedef genler belirlendi. MiR-1825'in tahmini hedef genlerinin belirlenmesinde Çizelge 3.3'te verilen biyoinformatik veritabanları kullanıldı. Bu programlar hedef genlerin 3'UTR bölgelerindeki dizilerin mikroRNA dizileri ile komplementerlik oluşturabilme potansiyellerine göre olası hedef genlerin tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Mikrodizin çalışması sonucunda ifade seviyeleri değişmiş olarak bulunan genler arasından bu algoritmalar tarafından doğrudan miR-1825'in hedefi olarak tahmin edilen genlerden 7 tanesi ileri analizler için seçildi. Belirlenen bu öncelikli aday genler için literatür taraması yapılarak BBSHK'da tümör süpresör potansiyeli olan en güçlü adaylar ileri doğrulama çalışmaları için kullanıldı.

Çizelge 3.5. MiRNA'ların hedef genlerinin tahmin edilmesinde kullanılan *in silico* programlar.

İsim	Web Adresi	Referans
miRanda	http://www.microrna.org	(Betel et al. 2010)
miRBase	http://microrna.sanger.ac.uk	(Griffiths-Jones 2010)
TargetScan	http://www.targetscan.org	(Lewis et al. 2005)
miRecords	http://mirecords.biolead.org/	(Xiao et al. 2009)
TarBase	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/	(Papadopoulos et al. 2009)
MirDB	http://mirdb.org/miRDB/	(Wang 2008)

3.2.19. Western blot analizi

MiR-1825 hedef genlerinin protein düzeyinde ifadeleri miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen ve edilmeyen hücrelerde incelendi. Fadu, SCC-9, Hep-2, Detroit-562 ve HGF-1 hücreleri 6 kuyucuklu platelerin her bir kuyusuna 8×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücreler miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra protein izolasyonu kısaca aşağıda tarif edilen şekilde yapıldı.

6 kuyucuklu platelerdeki besi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1x PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklardan scraper yardımı ile kazındı. Hücreler 10 mM PMSF (Roche, Basel, İsviçre) ve fosfataz inhibitör kokteyl (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Amerika Birleşik Devletleri) içeren RIPA Lizis Buffer (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) içerisinde toplandı ve lizatlar dondur-çöz yapılarak hücrelerin iyice parçalanması sağlandı. Daha sonra santrifüj yapılarak proteinler ayrıştırıldı. Ayrıştırılan protein ekstraktları 10x Laemmli Sample Buffer (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ile karıştırıldı ve 100 °C'de 5 dakika kaynatıldı. Protein örnekleri kullanılmaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Eşit miktarda yüklenen proteinler SDS-PAGE jelde ayrıştırıldı. Proteinler Trans-Blot® Turbo™ Transfer Sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) kullanılarak nitroselüloz membrana aktarıldı. Membranlar oda sıcaklığında 1 saat %5 yağsız süt tozu ile bloklandı. +4°C'de bir gece boyunca anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778 HRP, 1:200), anti-FREM-1 (1/1000; Abcam, Cambridge, United Kingdom), anti-CD63 (Santa Cruz Biotechnology, sc-5275 HRP, 1:200), anti-HIF1α (Santa Cruz Biotechnology, sc-13515, 1:200), anti-p-mTOR (Santa Cruz Biotechnology, sc-293133 HRP, 1:1000) ve anti-TSC2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-

271315, 1:1000) primer antikorları ile blotlandı. Membranlar PBST ile yıkandıktan sonra HRP ile konjugeye uygun sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Ardından protein sinyalleri ClearBand ECL Western Blotting Substrate (Ecotech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) kullanılarak görüntülendi. Spesifik protein bantları Image J programı kullanılarak ölçüldü.

3.2.20. Lusiferaz raportör testi

Hedef aday genlerin (FREM1 ve TSC2) miR-1825'in direk hedefleri olduğunu doğrulamak için lusiferaz raportör testi yapıldı. Bunun için öncelikle miR-1825'in hedef dizilerini içeren FREM1 3'UTR bölgesi pLightSwitch-3'UTR vektörüne (Active Motif) klonlandı. MiR-1825'in diğer hedefi olan TSC2 3'UTR plazmidini (pMir Target vector 7.9 kb) ise OriGene Technologies firmasından satın alındı.

HEK-293 hücreleri 6 kuyucuklu kültür platelerinde üç tekrarlı ve her kuyuda 7×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile aday hedef geni içeren 3'UTR luciferase reporter (Origene, Rockville, MD) plazmidini ile Lipofectamine 3000 reagent (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler lizis tamponunda parçalandı. Lizatlar, LightSwitch™ Luciferase Assay Kit (Active Motif) kullanılarak lusiferaz aktiviteleri açısından karşılaştırıldı. Daha sonra aday hedef genin 3'UTR bölgesinde tahmini hedef dizisinde QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) ile üretici firmanın protokolüne göre mutagenез gerçekleştirildi. Mutagenез primer dizileri, QuikChange Primer Design Tool kullanılarak tasarlandı. Yukarıda tarif edilen lusiferaz raportör testi mutant dizileri içeren plazmitlerle tekrar edildi. Çalışma kapsamında kullanılan primer dizileri Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. FREM1 ve TSC2 3'UTR klonlama primer dizileri

<i>Gen</i>	<i>Dizi</i>
<i>FREM1-F-NheI</i>	5'-CTAGCTAGCCAAGTGTCATGCTGGCCAC-3'
<i>FREM1-R-XhoI</i>	5'-TTATCAATCTTTCTGGCACTATTA-3'
<i>TSC2-F</i>	5'-AGAAGCTGCGCGGTGGTGTG-3'
<i>TSC2-R</i>	5'-ACGCCGGCTGGATGATCCTCCAG-3'

Çizelge 3.7. FREM1 3'UTR site directed mutagenesis primer dizileri

<i>Gen</i>	<i>Dizi</i>
<i>FREM1-F</i>	5'-CTAGCCAAGTGCATGCTGGCGTGACCGAGTGGATCGGTGGTGAACC-3'
<i>FREM1-R</i>	5'-GGTTCACCACCGATCCACTCGGTCACGCCAGCATGCACTTGGCTAG-3'
<i>TSC2-F</i>	5'-GGCCGGGGCCCTCCCTCCTCGTGACCCCTTGGACGGTATTGC-3'
<i>TSC2-R</i>	5'-GCAATACCGTCCAAGGGGTCACGAGGAGGGAGGGCCCCGGCC-3'

3.2.21. İmmünohistokimyasal analiz

MiR-1825'in hedef geni olduğu doğrulanan FREM1 için baş ve boyun kanseri hastalarından alınan tümör ve normal doku örneklerinde immünohistokimyasal analiz yapıldı. Dokular cerrahi müdahale sonrasında alındıktan sonra fiksasyon, dehidratasyon, şeffaflandırma ve impragnasyon (doygunluk) aşamalarından geçirildi. Fiksasyon ve parafine gömme işlemlerinden sonra mikrotom cihazı kullanılarak dokulardan ince kesitler alınıp preparatlar hazırlandı. İmmünohistokimyasal analize hazır hale getirilen preparatlardaki formalin çapraz bağları veya diğer fiksatifler tarafından gizlenen antijenleri ortaya çıkarmak (antijen geri kazanımı-antijen retrieval) için bazı ön işlemler uygulandı. Ön işlemlerin ardından, preparatlar sırasıyla FREM-1 primer antikor (ab105360, 1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA), sekonder antikor (Goat polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgG-H&L (Alexa Fluor® 594), sekonder antikora bağlanan avidin-biotin-peroksidaz kompleksi (The ImmunoCruz® ABC Kit) ile muamele edildi. Ardından hematoksilin karşıt boyama (counter staining) ile kromajen (renk değiştiren reaktif) olarak 3,3 'diaminobenzidin (DAB) işlemleri uygulandı. Yıkama ve kurutma aşamalarından sonra preparatlar ışık mikroskopunda incelenerek FREM1'in normal ve tümör dokularındaki seviyeleri değerlendirildi.

3.2.22. NUDE farelerde *in vivo* tümör modellerinin oluşturulması

MiR-1825'in Hep-2 ve FaDu hücrelerine stabil transfeksiyonu

Hücreler 6 kuyucuklu platelere uygun sayılarda ekilerek 1 gün boyunca inkübe edildikten sonra pCMV-MIR Kontrol Mimik ve MIR1825-pCMV-MIR Mimik (Creative Biogene Biotechnology) plazmidleri ile Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent (Invitrogen) kullanılarak transfekte edildi. 48 saatlik inkübasyon süresinin ardından

3. MATERYAL ve YÖNTEM

hücrelerin seçilimi için selektif besiyeri (250 µg/ml Neomycin) eklendi ve bu genleri stabil olarak ifade eden hücrelerin seçilimi yapıldı. Seçilimi tamamlanan hücrelerdeki miR-1825'in artmış ifadesi gerçek zamanlı PZR ile doğrulandı.

Bunun için seçilimi tamamlanmış hücrelerden üretici firmanın belirlediği protokole göre RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve gerçek zamanlı PZR yukarıda tarif edildiği şekilde yapıldı. Ardından miR-1825'in stabil bir şekilde ifade edildiği hücrelerde miR-1825 ifadesinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi yukarıda tarif edildiği şekilde CVDK-8 testi kullanılarak doğrulandı.

Model farelerin temini ve bakımı

Çalışma için etik kurul onayı Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş. Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'ndan alındı ve çalışmalar Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada timüsü olmayan 6-8 haftalık çıplak fareler (nu/nu NUDE fareler) kullanıldı. Fareler patojen olmayan şartlarda laminar flow kutuları içinde ve onaylanmış protokoller takip edilerek saklandı. Çalışma grupları Çizelge 3.8'de belirtildiği şekilde oluşturuldu. (<http://www.lasec.cuhk.edu.hk/sample-size-calculation.html>) online aracı kullanılarak yapılan güç analizinde 1,5 katlık ortalama fark, %20 standart sapma ve 0,01 alfa değeri ile %95 güce ulaşmak için her deney grubunda 6 adet fareye ihtiyaç duyulduğu hesaplandı. Deney süresince fare ağırlığı dikkate alınarak yem ve içme suyu günlük olarak değiştirildi. Farelerin vücut ağırlıkları haftada iki kez ölçüldü. Deney sonunda tüm hayvanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

Çizelge 3.8. Çalışma kapsamında kullanılacak deney grupları

Grup	Hücre Türü	Soyu	Yaşı	Sayısı
Kontrol mikroRNA	Hep-2	NUDE Fare	Erişkin (6-8 hafta)	6
Mimik miR-1825	Hep-2	NUDE Fare	Erişkin (6-8 hafta)	6
Kontrol mikroRNA	FaDu	NUDE Fare	Erişkin (6-8 hafta)	6
Mimik miR-1825	FaDu	NUDE Fare	Erişkin (6-8 hafta)	6

NUDE farelerde *in vivo* tümör modellerinin oluşturulması

Stabil transfekte edilen ve seçilimi tamamlanan Hep-2 ve FaDu hücrelerinin NUDE farelere iki taraflı olarak deri altından sübkütan enjeksiyonları yapıldı. Enjeksiyon 1:1 oranında hazırlanmış 1×10^6 hücre içeren besi yeri ve yüksek konsantrasyonlu Matrigel matriks (BD Biosciences) karışımı kullanılarak yapıldı.

Deney grubu farelerde oluşan tümörlerin incelenmesi ve histopatolojik analizi

Hücrelerin NUDE farelere enjeksiyonundan sonra 1 ay boyunca haftada iki kez tümör hacmi ve farelerin ağırlıkları ölçüldü. Tümör hacmi kaliper kullanılarak üç boyutlu olarak ölçüldü ve “Hacim (mm³) = boy x en² x 0,4” formülü kullanılarak hesaplandı. 1 ay sonunda denekler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi ve tümörler çıkarılarak hacim ve ağırlıkları ölçüldü. Oluşan tümör örnekleri eşit hacimlere bölünerek sonraki deneylerde kullanılmak üzere ya sıvı azotta hızlıca donduruldu ya da fikse edilmek için formalin içerisine alındı. Tümör örneklerinin bir kısmından RNA izolasyonu yapılarak miR-1825’in artmış ifadesi gerçek zamanlı PZR yapılarak doğrulandı. Fikse edilip parafin içerisine gömülen dokulardan ise kesitler alınarak Ki-67 için immünohistokimyasal analiz yapıldı.

Ayrıca miR-1825’in yüksek düzeyde ifade edildiği gruplarda gelişebilecek olası metastazları incelemek adına, baş ve boyun kanserlerinin yaygın uzak metastaz bölgelerinden birisi olan ve incelemesi nispeten daha kolay olan akciğerlerdeki olası metastatik lezyonların varlığı H&E boyamaları yapılarak analiz edildi.

3.2.23. CoCl₂ ile kimyasal hipoksi modelinin oluşturulması

FaDu ve SCC-9 hücreleri 96 well platelerin her bir kuyusuna sırasıyla 2×10^3 ve 4×10^3 hücre gelecek şekilde ekildi ve 24 saat boyunca kültüre edildi. Kimyasal hipoksi modeli oluşturmak ve hücrelerde önemli bir toksik etki oluşturmayan optimum konsantrasyonu belirlemek için FaDu ve SCC-9 hücreleri serumsuz besiyeri ile hazırlanan farklı konsantrasyonlarda (50-100-150-200-250 μ M) CoCl₂ ile 24 ve 48 saat

boyunca muamele edildi. Ardından hücre canlılığı üç gün boyunca 24 saatte bir CVDK-8 kiti ile üretici firmanın protokolü takip edilerek ölçüldü. Optikal yoğunluk değerleri Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) yardımıyla 450 nm’de absorbans ölçümü yapılarak belirlendi. Daha sonra FaDu ve SCC-9 hücreleri serumsuz besiyeri ortamında optimum CoCl_2 konsantrasyonu ile muamele edilerek 24 saat sonra RNA ve protein izolasyonu yapılmak üzere harvest edildi. Hipoksi modeli oluşturulan hücrelerden elde edilen RNA ve proteinler sonraki deneylerde kullanılmaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

3.2.24. Hipoksik şartlarda kültürlenmiş baş ve boyun skuamöz karsinomlu hücrelerden türevlenen eksozomların izolasyonu ve karakterizasyonu

FaDu ve SCC-9 hücreleri her bir T175 cm^2 ’lik flaska 2×10^6 hücre düşecek şekilde ekildi ve %50-60 yoğunluğa ulaşmaları beklendi. Daha sonra hücreler 1x PBS ile yıkandı. Herhangi bir uygulama yapılmayan sadece serumsuz besiyeri eklenmiş normoksik şartlarda kültüre edilen hücreler kontrol grupları olarak değerlendirildi. Hipoksik şartlarda kültüre edilecek hücrelere serumsuz besiyeri ortamında FaDu hücreleri için 100 μM ve SCC-9 hücreleri için 150 μM CoCl_2 uygulaması yapıldı. Hücrelerin 48 saatlik inkübasyonundan sonra flasklardan koşullu besiyeri alındı ve ultrasantrifüj yöntemiyle hücrelerin besiyeri ortamına salınan eksozomların izolasyonunu yapmak üzere 50 ml’lik falkon tüplere aktarıldı. İlk olarak koşullu besiyerindeki ölü hücreleri uzaklaştırmak için 4°C ’de 2.000 g’de 20 dakika boyunca santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant temiz falkon tüplere aktarıldı. Sonrasında süpernatantlar 4°C ’de 12.000 g’de 45 dakika boyunca tekrar santrifüj yapıldı. Santrifüj aşaması tamamlanan koşullu besiyeri 0.22 μm por çapına sahip filtreden (Isolab, Eschau, Germany) geçirildikten sonra steril ultrasantrifüj tüplerine (HITACHI, himac CS150NX S50A rotor) aktarılarak 4°C ’de 110.000 g’de 2 saat boyunca ultrasantrifüj kullanılarak santrifüj yapıldı. Eksozom pelleti 1 ml soğuk 1x PBS ile yıkandıktan sonra 4°C ’de 110.000 g’de 2 saat boyunca ultrasantrifüj kullanılarak tekrar santrifüj yapıldıktan sonra eksozom pelleti 1ml soğuk 1x PBS kullanılarak çözüldü. İzole edilen eksozomların konsantrasyonu BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Fisher, Gaithersburg, MD, USA) kullanılarak ölçüldü ve deneylerde kullanılmaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

İzole edilen eksozomların morfolojik karakterizasyonu Hitachi HighTech HT7700 Transmission Electron Microscope (TEM, Hitachi, Chiba, Japan) kullanılarak yapıldı. Bu doğrultuda, her bir grup için 50 µl eksozom süspansiyon solüsyonu alınarak 300 mesh copper grid üzerine mikropipet yardımıyla bırakıldı ve 16 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek gridler kurutuldu. Ardından TEM kullanılarak 80-120 kV'da görüntü alındı.

Normoksik ve hipoksik eksozomların partikül boyutu ve çapı ise Malvern Zetasizer Nano ZSP90 (Malvern Panalytical, Malvern, UK) kullanılarak ölçüldü. Bu doğrultuda, 640 µl eksozom süspansiyon solüsyonu mikropipet yardımıyla alındı ve Zetasizer Nano ZSP90 içerisine aktarıldı. Zetasizer software (Malvern Instruments) kullanılarak sonuçlar değerlendirildi.

Son olarak, eksozom karakterizasyonu için eksozom lizatlarının eksozom yüzey belirteci CD63 için pozitif oldukları western blot ile doğrulandı.

3.2.25. Eksozom etiketleme

Hipoksik indüklü kanser türevli hücrelerden izole edilen eksozomlar PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit General Cell Membrane Labeling (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kullanılarak üretici firmanın belirlediği protokole göre işaretlendi. Floresan olarak etiketlenen eksozomlar 1x PBS'de çözüldü ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Floresan olarak PKH67 ile etiketlenen eksozomların içeriklerini HUVEC hücrelerine aktardıklarını doğrulamak için öncelikle HUVEC hücreleri içerisine lamel yerleştirilen 6 kuyucuklu platelerin her kuyusuna 8×10^4 hücre gelecek şekilde ekildi. %55-60 konfluensiye ulaşan hücreler PKH67 ile etiketli 10 µg eksozom ile 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 1x PBS ile 3 kez yıkandı ve 4°C'de 30 dakika boyunca %4 lük gluteraldehit solüsyonu ile fikse edildi. Fiksasyon işleminin ardından hücreler 1-2 µg/mL Hoechst 33258 boya solüsyonu ile 4°C'de 15 dakika inkübe edildi. Ardından hücreler LSM 710 Confocal Laser Scanning Microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) kullanılarak görüntülendi.

3.2.26. Endotel hücelere miRNA transfeksiyonuna eş zamanlı olarak eksozom uygulaması

MikroRNA transfeksiyon işlemi, miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitör ya da kontrol mikroRNA moleküllerinin endotel hücre içerisine etkili bir şekilde taşınmasını sağlayan Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (Thermo, Rockford, USA) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre yapıldı (Karatas et al. 2016). Kontrol olarak kontrol mikroRNA kullanıldı. Transfeksiyon işlemine paralel olarak hücelere 25 µg/ul normoksik ve hipoksik indüklü kanser hücre türevli eksozomlar uygulandı. Bu hüceler 24 ve 48 saat boyunca serumsuz besiyeri ortamında kültür edildikten sonra fonksiyonel çalışmalarda kullanıldı.

3.2.27. Hücelerden ve eksozomlardan RNA izolasyonu

Hipoksik BBSHK hücelerden tüvlenen ve mikroRNA taşıyan eksozomlardaki total RNA Invitrogen™ mirVana™ miRNA Isolation Kit (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) kullanılarak üretici firmanın standart protokolüne göre izole edildi. MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transkte edilen HUVEC hücelerden ve hipoksik indüklü baş ve boyun skuamöz hücelerden total RNA, EcoPURE Total RNA Kit (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Turkey) kullanılarak izole edildi. RNA konsantrasyon ve saflıkları Epoch Microplate Spectrophotometer kullanılarak belirlendi ve RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C’de saklandı.

3.2.28. cDNA/miRNA cDNA sentezi ve qRT-PCR

Hücelerden ve eksozomlardan RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra ilk olarak miR-1825’in ifade düzeyleri mRNA seviyesinde qRT-PCR ile değerlendirildi. MiR-1825 ifade seviyelerini belirlemek için öncelikle hücelerden ve eksozomlardan elde edilen total RNA örnekleri konsantrasyonları 15 ng/µl olacak şekilde seyreltildi ve her örnek için 2 µl RNA kullanıldı. Sonrasında, miR-1825 ve internal kontrol olarak kullanılan RNU43 ve RNU6B için miRNA cDNA sentezi, mikroRNA spesifik primerler (Applied Biosystems) ve ‘TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit’ (Applied

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Biosystems) kullanılarak üretici firmanın protokollerine göre gerçekleştirildi. MiR-1825'in ifade analizi mikroRNA spesifik prob (Applied Biosystems) ve 'TaqMan Universal Master Mix' (Applied Biosystems) ile hazırlanan reaksiyonlar ile 3 tekrarlı olacak şekilde Rotor-Gene qRT-PCR cihazında gerçekleştirildi. Kantitatif analiz delta-delta-Ct yöntemi kullanılarak yapıldı. MikroRNA ifade bilgisi küçük nükleer RNA'lardan RNU43 ve RNU6B ile normalize edildi.

Gen ifade analizleri için miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen ve transfeksiyona eş zamanlı olarak eksozom uygulanan hücre grupları için izole edilen RNA örneklerinin her birinden 1000 ng kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentez işlemleri 'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit'i (Thermo, ABD) ile üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. Hedef genlerin (HIF1A, HIF2A, CA-9 ve TSC2) ifade analizleri 5x HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR SuperMix ile üretici firmanın protokolü takip edilerek Rotor-Gene qRT-PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. GAPDH internal kontrol olarak kullanıldı. Kantitatif analiz delta-delta-Ct yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında kullanılan primer dizileri Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Hipoksik marker primer dizileri

<i>Gen</i>	<i>Dizi</i>
<i>CA9-F</i>	<i>5'-GACTCTCGGCTACAGCTGAAC-3'</i>
<i>CA9-R</i>	<i>5'-CAGGCAGGAATTCAGCTGGA-3'</i>
<i>HIF1A-F</i>	<i>5'- GCTTTGCAGAATGCTCAGAGA-3'</i>
<i>HIF1A-R</i>	<i>5'-TGCTCCATTCCATTCTGTTTAC-3'</i>
<i>HIF2A-F</i>	<i>5'-GACTTCACTCATCCCTGCGAC -3'</i>
<i>HIF2A-R</i>	<i>5'-AGGTGGCTGACTTGAGGTTG-3'</i>
<i>GAPDH-F</i>	<i>5'-CCATCTTCCAGGAGCGAGATC'-5'</i>
<i>GAPDH-R</i>	<i>5'-GGCATTGCTGATGATCTTGAGG-3'</i>

3.2.29. MiR-1825'in ve hipoksik indüklü kanser türevli eksozomların HUVEC hücrelerinin göçü üzerine etkilerinin araştırılması

MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitör ya da kontrol mikroRNA transfeksiyonunun ve hipoksik indüklü eksozom uygulamasının HUVEC hücrelerinin göç etme potansiyeli üzerindeki etkisini değerlendirmek için hücreler 6 kuyucuklu platelere ekildi. 24 saat sonra hücreler Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) kullanılarak, miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edildi. Ayrıca, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen HUVEC hücrelerine eş zamanlı olarak hipoksik ve normoksik kanser hücre türevli 100 µg/mL eksozom uygulandı. Hücre göçü testi Transwell® Permeable Supports (Corning) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler 24 well Transwell® Permeable Supports'a iki tekrarlı olarak her chamber'da 5×10^4 hücre olacak şekilde serumsuz ortamda ekildi. Chamber'ın alt kısmına ise 500 µl %20 FBS içeren besiyeri eklendi. 24 saat sonra göç etmeyen hücreler pamuk swap yardımıyla chamber'ların üst tarafından kazındı ve membranın alt yüzeyine göç eden hücreler %100 matanol ile sabitlendi ve 20 dakika boyunca %2'lik etanol ve %0,3'lük kristal viyole içeren solüsyon içerisinde boyandı. Membranlar slaytların üzerine sabitlendikten sonra göç eden hücreler invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) kullanılarak sayıldı.

3.2.30. MiR-1825'in ve hipoksik indüklü kanser türevli eksozomların HUVEC hücrelerinin invazyonu üzerine etkilerinin araştırılması

MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitör ya da kontrol mikroRNA transfeksiyonunun ve hipoksik indüklü eksozom uygulamasının HUVEC hücrelerinin invazyon potansiyeli üzerindeki etkisini değerlendirmek için hücreler 6 kuyucuklu platelere ekildi. 24 saat sonra hücreler Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) kullanılarak miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edildi. Ayrıca, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen HUVEC hücrelerine eş zamanlı olarak hipoksik ve normoksik kanser hücre türevli 100 µg/mL eksozom uygulandı. Hücrelerin invaziv potansiyeli BD BioCoat Matrigel invasion chambers (Becton Dickinson) kullanılarak değerlendirildi. Hücreler, BD BioCoat Matrigel invasion chambers'a iki tekrarlı olarak her chamber'da 5×10^5 hücre

olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra göç etmeyen hücreler pamuk swap yardımıyla chamber'ların üst tarafından kazındı ve membranın alt yüzeyine göç eden hücreler %100 metanol ile sabitlendi. Sonrasında hücreler 20 dakika boyunca %2'lik etanol ve %0,3'lük kristal viyole içeren solüsyon içerisinde boyandı. Membranlar slaytların üzerine sabitlendikten sonra invaze olan hücreler invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) kullanılarak sayıldı.

3.2.31. MiR-1825'in ve hipoksik indüklü kanser türevli eksozomların HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma potansiyeli üzerine etkilerinin araştırılması

MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitör ya da kontrol mikroRNA transfeksiyonunun ve hipoksik indüklü eksozom uygulamasının HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma potansiyeli üzerindeki etkisini değerlendirmek için hücreler 6 kuyucuklu platelerin kuyularına ekildi. 24 saat sonra hücreler Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) kullanılarak miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edildi. Ayrıca, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen HUVEC hücrelerine eş zamanlı olarak hipoksik ve normoksik kanser hücre türevli 100 µg/mL eksozom uygulandı. Hücrelerin anjiyojenez potansiyeli Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix (Corning, NY, USA) matrijel kullanılarak değerlendirildi. 40 µl matrijel 96 kuyucuklu platenin kuyularına eklendi ve matrijelin polimerleşmesi için 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Mimik miR-1825, inhibitor miR-1825 veya kontrol mikroRNA ile transfekte edilen hücreler herbir kuyuya 2×10^4 hücre gelecek şekilde matrijel üzerine eklendi. İnhibitor/kontrol mikroRNA ile transfekte edilen hücre gruplarına eş zamanlı olarak hipoksik ve normoksik kanser hücre türevli 100 µg/mL eksozom uygulandı ve hücreler 37°C'de 16 saat boyunca inkübe edildi. Oluşan tüp benzeri anjiyojenik uzantılar invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) kullanılarak sayıldı.

3.2.32. MiR-1825'in ve hipoksik indüklü kanser türevli eksozomların HUVEC hücre küreciklerinin oluşturduğu anjiyojenik uzantıların oluşumu üzerine etkilerinin araştırılması

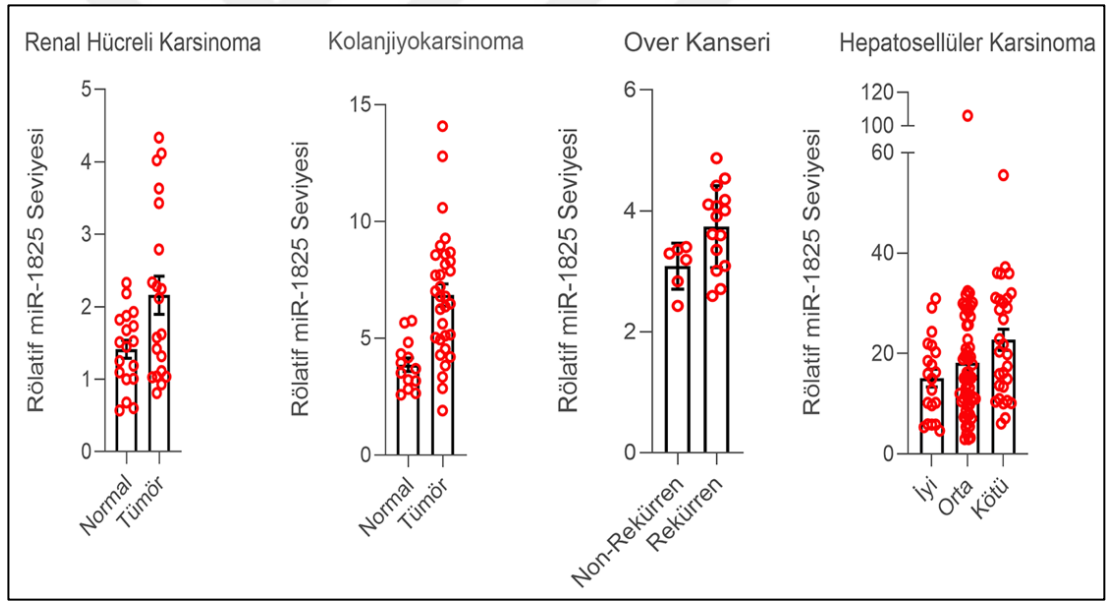
MiR-1825 mimik, miR-1825 inhibitör ya da kontrol mikroRNA transfeksiyonunun ve hipoksik indüklü eksozom uygulamasının HUVEC küreciklerinin oluşturduğu anjiyojenik uzantıların oluşumu üzerindeki etkisini değerlendirmek için 6 kuyucuklu platelerin kuyularına HUVEC hücreleri ekildi. 24 saat sonra hücreler Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) kullanılarak miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitör ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edildi. Ayrıca, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen HUVEC hücrelerine eş zamanlı olarak hipoksik ve normoksik kanser hücre türevli 100 µg/mL eksozom uygulandı. HUVEC hücre kürecikleri Koff ve arkadaşları tarafından tarif edildiği şekilde hanging drop yöntemi ile oluşturuldu (Korff and Augustin 1998).

Kısaca, metil selüloz bazal besi yeri ile hazırlanarak kullanılmaya kadar 4°C'de saklandı (Saccu et al. 2022). Transfeksiyon yapılan ve eksozom uygulanan hücre grupları tripsin yardımıyla kaldırılıp sayıldı. Hücre kültürüne uygun petri kabı kapaklarında her damlacıkta (25 µl) 1×10^3 hücre olacak şekilde hücre ve metil selüloz solüsyonu karışımından oluşan damlacıklar oluşturuldu. Petri kabının alt kısmına ise damlacıklardaki nem dengesini korumak için 1x PBS eklendi. Daha sonra petri kapları kürecikler oluşuncaya kadar 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde minimum 24 saat inkübasyona bırakıldı. Anjiyojeniz oluşumunu gözlemek ve oluşan küreciklerden metilselüloz ve besiyeri karışımını uzaklaştırmak için kürecikler toplandı ve 1x PBS ile yıkandıktan sonra 5 dakika boyunca 300g'de 4°C'de santrifuj yapıldı. Ardından pellet matrijel ve metil selüloz ile hazırlanan serumsuz besiyerinde tümörfaz (sphere) yapıları bozulmayacak şekilde çözülerek 96 well platelerin her bir kuyusuna 50 µl iki tekrarlı olacak şekilde eklendi ve 30 dakika boyunca 37 °C %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından matrijelin üzerine bEGF (Protech Human, Cat no: AF-100-15-100UG), FGF (Protech Human, Cat no:100-18B-10UG) ve rhIGF-I (StemCell Tech, Cat no: 7022.2) büyüme faktörlerini içeren serumsuz besiyeri eklendi ve hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24-48 saat boyunca inkübe edildi. Oluşan anjiyojenik uzantılar invert mikroskop kullanılarak sayıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

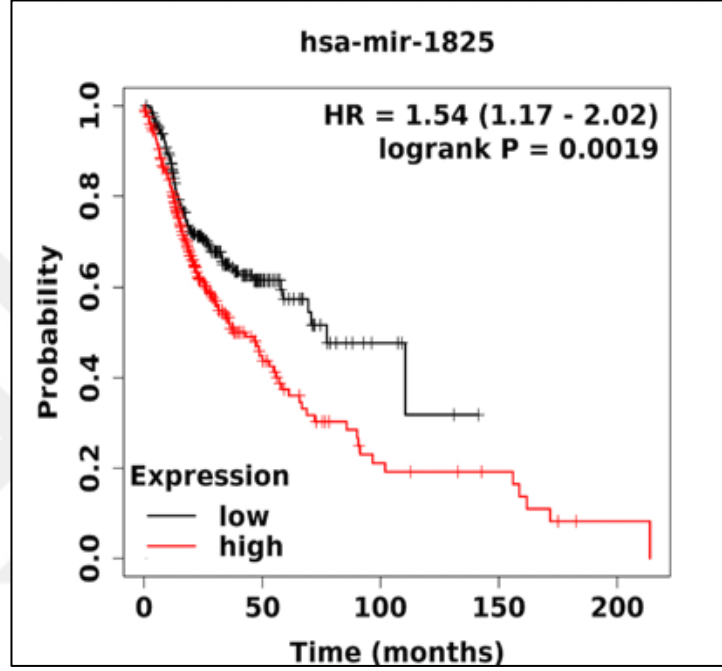
4.1. MiR-1825 BBSHK İçin Potansiyel Onkogenik Bir MikroRNA'dır

MiR-1825'in onkogenik potansiyelini ortaya koymak adına öncelikle GEO veritabanında herkese açık olarak bulunan mikrodizin verileri incelendi. Renal hücreli karsinom (GSE41282) ve kolanjiyokarsinomlu (GSE53992) hastaların tümör dokularında miR-1825 ifade seviyesinin normal dokulara kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu gösterildi. Ayrıca rekürren over kanser (GSE47841) örneklerinde miR-1825 ifade seviyesinin daha fazla olduğu ve hepatosellüler karsinomlarda (GSE31164) histolojik farklılaşma derecesi azaldıkça miR-1825 ifade seviyesinin arttığı tespit edildi (Şekil 4.1). Bu bulgular miR-1825'in onkojenik potansiyelini destekler niteliktedir.



Şekil 4.1. GSE41282 (Renal hücreli karsinom), GSE53992 (Kolanjiyokarsinom), GSE47841 (Over kanseri) ve GSE31164 (Hepatosellüler karsinom) numaralı GEO verilerinin analiz sonucu.

Sonrasında Kaplan Meier Plotter online uygulaması kullanılarak baş ve boyun kanseri hastaları için sağkalım analizi yapıldı ve yüksek miR-1825 ifadesi olan hastalarda medyan sağkalım 42,97 hafta iken düşük miR-1825 ifadesi olan hastalarda medyan sağkalımın 77,3 hafta olduğu tespit edildi (Şekil 4.2). Bu bulgu da miR-1825'in özellikle baş ve boyun kanseri için onkogenik potansiyel taşıdığını destekler önemli bir ön veri olarak karşımıza çıkmaktadır.



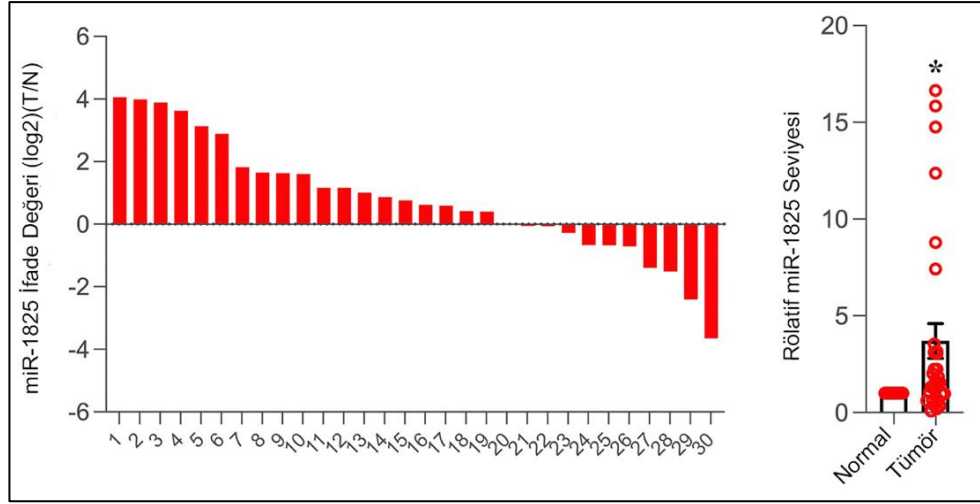
Şekil 4.2. MiR-1825 ifadesinin baş ve boyun hastalarında sağkalıma etkisi

In silico verileri teyit amacıyla öncelikle Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak-Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda rutin patolojik inceleme için alınan ve Atatürk Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik incelemesi yapılan 51 adet BBSHK hastasına ait normal ve tümör doku örnekleri temin edildi. Bu hastalara ait klinikopatolojik ve demografik veriler Çizelge 4.1'de verilmektedir.

Çizelge 4.1. Hastaların klinik-patolojik bilgileri

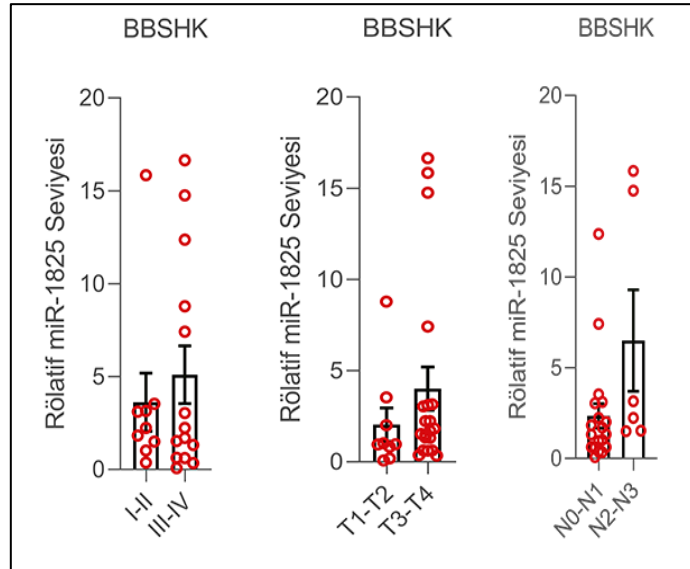
	BBSK hasta sayısı
Yaş	
≤ 60	21
> 60	30
Cinsiyet	
Erkek	34
Kadın	17
Tümör Tipi	
Supraglottik	16
Subglottik	3
Glottik	18
Transglottik	4
Epiglottik	2
Aryepiglottik	1
Dil	7
TNM Evreleme	
T1 ve T2	20
T3 ve T4	31
Tümör Hacmi	
≤ 2 cm ³	11
> 2 cm ³	40
Histological Grade	
I	7
II	23
III	4
IV	17

Bu hasta örneklerinden 30 normal-tümör çift doku qRT-PCR ile incelendiğinde BBSHK tümör doku örneklerinde miR-1825 ifade düzeyinin aynı hastalardan temin edilen normal doku örneklerine göre $3,69 \pm 0,89$ kat arttığı tespit edildi ($p < 0,01$; Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Baş boyun tümör ve normal doku örneklerinde miR-1825 ifade seviyesi

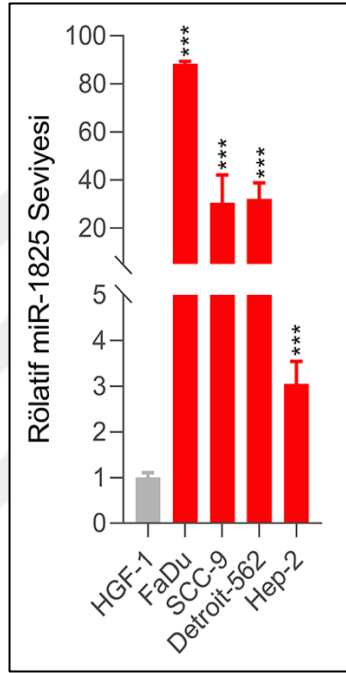
MiR-1825 ifadesi için T evresi, N evresi ve tümör gradesine göre karşılaştırma yapıldığında da anlamlı olmamakla birlikte T3 ve T4 evre tümör dokularında T1 ve T2 evre dokularına göre, grade III ve IV tümör dokularında grade I ve II tümör dokularına göre yüksek miR-1825 ifadesi tespit edildi. N evresine göre yapılan değerlendirmede ise N2 ve N3 evre tümör dokularında miR-1825 ifadesinin N0 ve N1 evre tümör doku örneklerine göre anlamlı olarak artmış olduğu gösterildi ($p < 0,05$; Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Baş boyun tümör ve normal doku örneklerinde T evresi, grade ve N evresine göre miR-1825 ifade seviyesi.

4.2. BBSHK ve Normal Ağız İçi Fibroblast Hücrelerinde Artan ve Azalan MiR-1825 İfadesi BBKa Progresyonu ile İlişkili Hücresel Fenotipler Üzerinde Etkilidir

Hasta tümör doku örneklerinde ifadesinin artmış olduğunu gösterdiğimiz miR-1825'in BBSHK ve normal ağız içi fibroblast hücrelerinde ifadesi incelendiğinde de BBSHK hücrelerinde miR-1825 ifadesinin HGF-1 hücrelerine göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0,05$; Şekil 4.5).

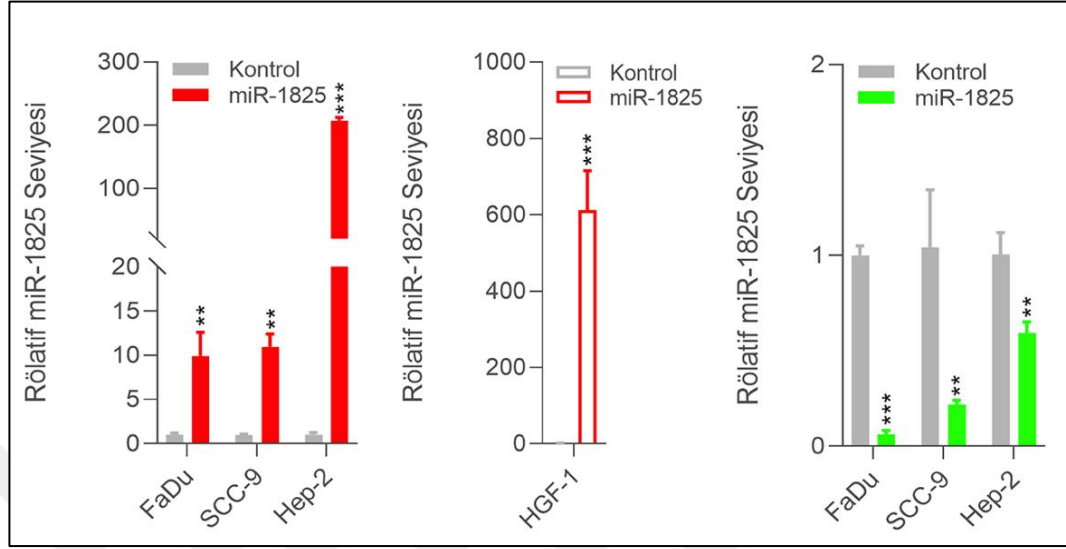


Şekil 4.5. Transfeksiyon öncesi hücrelerde endojen miR-1825 ifade düzeyi

MiR-1825'in baş ve boyun kanseri progresyonu ile ilişkili hücresel fenotipler üzerinde etkilerinin incelenmesi için tez çalışması kapsamında kullanılan hücreler miR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilerek miR-1825 ifadesinin bu hücrelerde artması ve azalması sağlandı. Bu doğrultuda, uygun besiyeri ortamında kültürü yapılan hücreler 6-kuyucuklu platalere uygun sayılarda ekilerek 1 gün boyunca inkübe edildikten sonra miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA'lar ile transfekte edildi. Sonrasında transfeksiyon verimliliği qRT-PCR ile kontrol edildi. MiR-1825 mimik ile transfekte edilen hücrelerde kontrol mimik ile transfekte edilen hücelere göre miR-1825 ifadesinin anlamlı olarak arttığı ve transfeksiyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği gösterildi. Aynı şekilde hücrelerin inhibitör miR-1825 ya da inhibitor

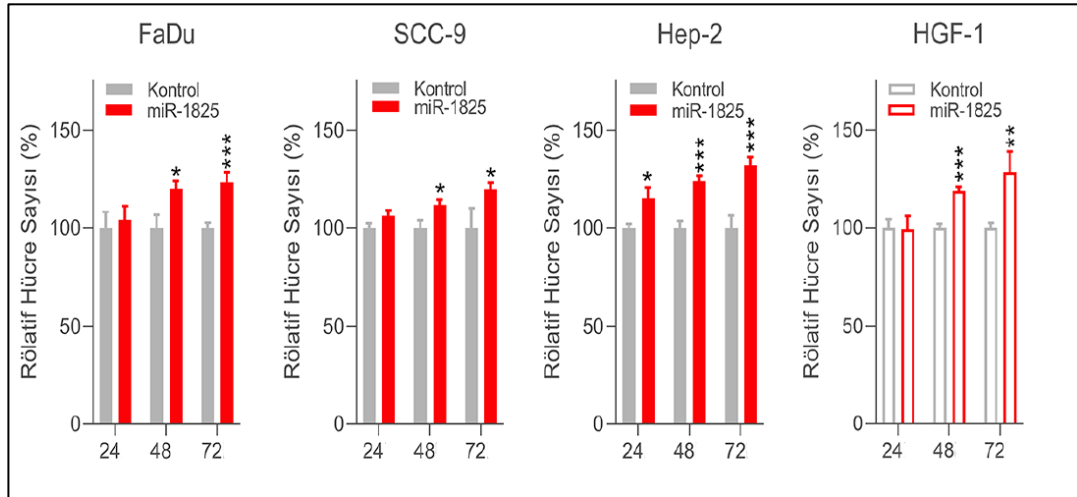
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

kontrol ile transfekte edilmesinin ardından miR-1825 ifadesinin kontrollere göre anlamlı olarak azaldığı doğrulandı (Şekil 4.6).



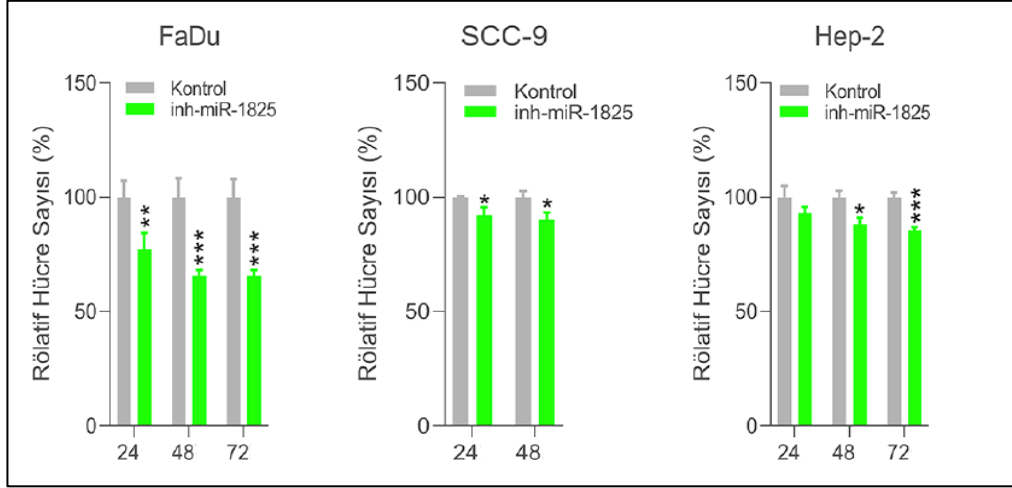
Şekil 4.6. Transfeksiyon sonrası hücrelerde miR-1825 ifade düzeyi

Artmış ve azalmış miR-1825 ifadesinin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini incelendiğinde artmış miR-1825 ifadesinin FaDu, SCC-9, Hep-2 ve HGF-1 hücrelerinde kontrol grubuna göre hücre canlılığını artırdığı ortaya konuldu (Şekil 4.7).



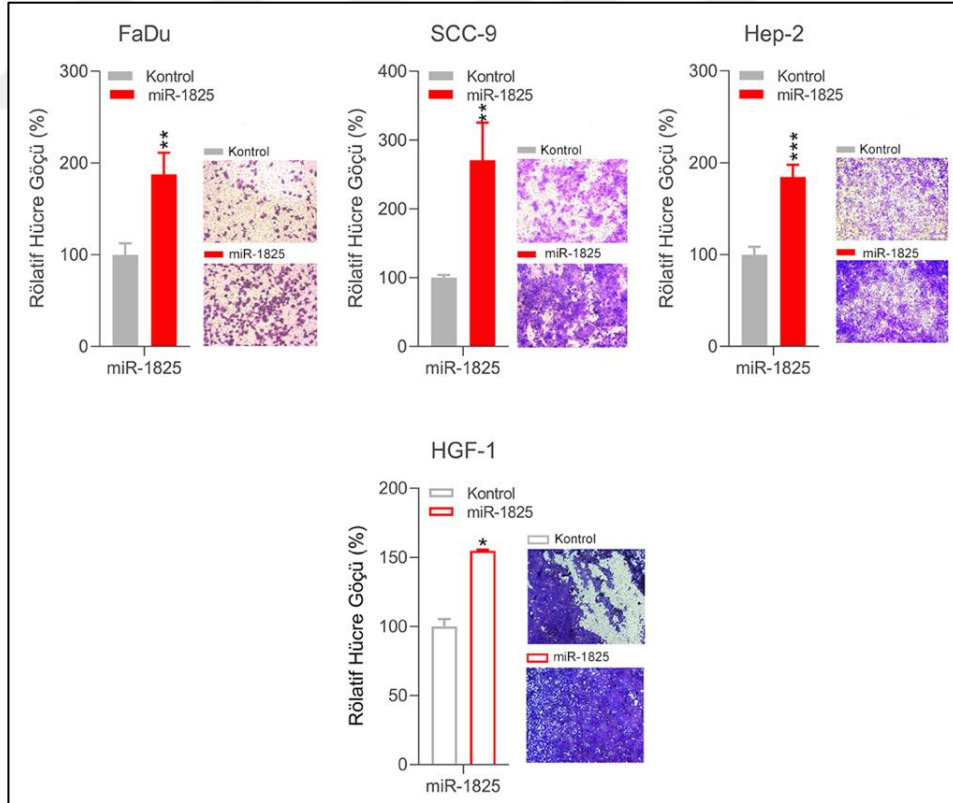
Şekil 4.7. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde zamana bağlı hücre canlılık değişimi.

MiR-1825 inhibisyonunun ise FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı tespit edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde zamana bağlı hücre canlılık değişimi.

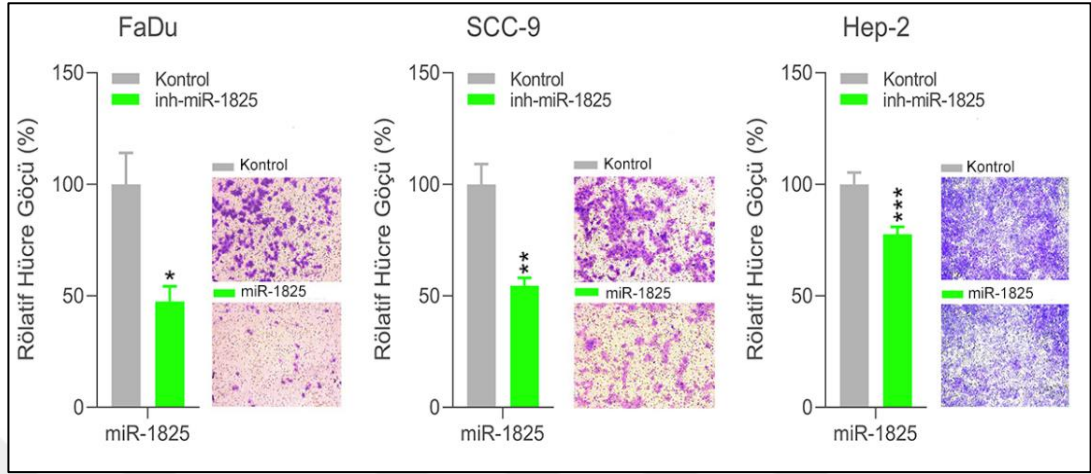
MiR-1825'in hücre göçü üzerindeki etkilerini incelemek için hücre göçü testi yapıldı. Bulgularımız artmış miR-1825 ifadesinin FaDu, SCC-9, Hep-2 ve HGF-1 hücrelerinde hücre göçünü artırdığını ortaya koydu (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde hücre göçü değişimi

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

MiR-1825 inhibisyonunun ise FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinin göç etme potansiyelini azalttığı ortaya konuldu (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde hücre göçü değişimi

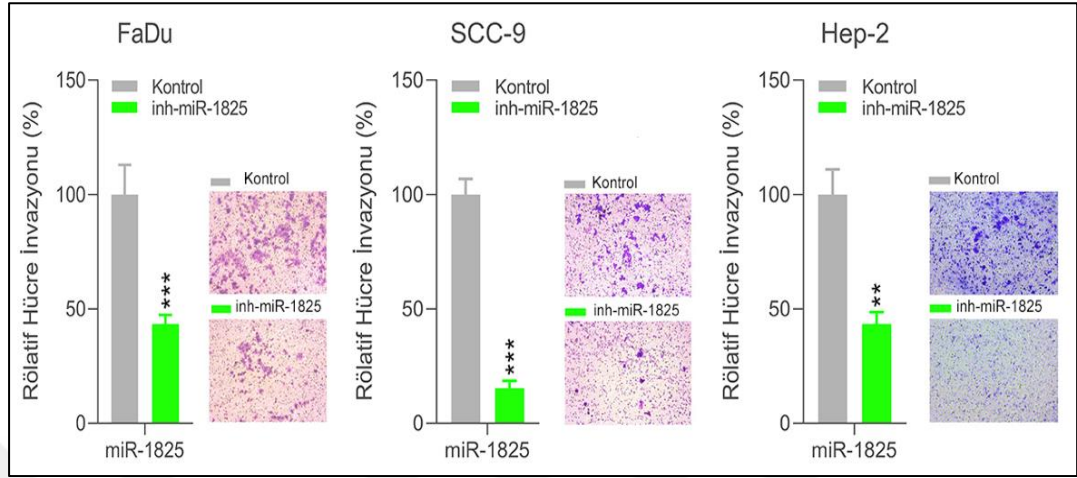
Artmış ve azalmış miR-1825 ifadesinin FaDu, SCC-9, Hep-2 ve HGF-1 hücrelerinin invaziv potansiyeli üzerindeki etkilerini incelemek için ise BD BioCoat Matrigel invasion chamber'lar kullanılarak matrijel invazyon testi yapıldı. Artmış miR-1825 ifadesinin FaDu, SCC-9, Hep-2 ve HGF-1 hücrelerinde hücre invazyonunu artırdığını ortaya konuldu (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde hücre invazyonu değişimi

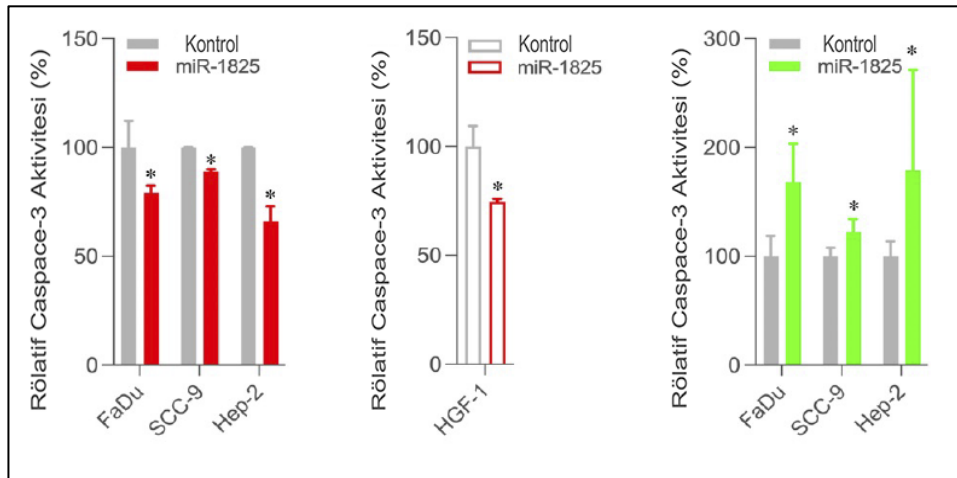
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

MiR-1825 inhibisyonunun ise FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinin invazyonunu azalttığı ortaya konuldu (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde hücre invazyonu değişimi.

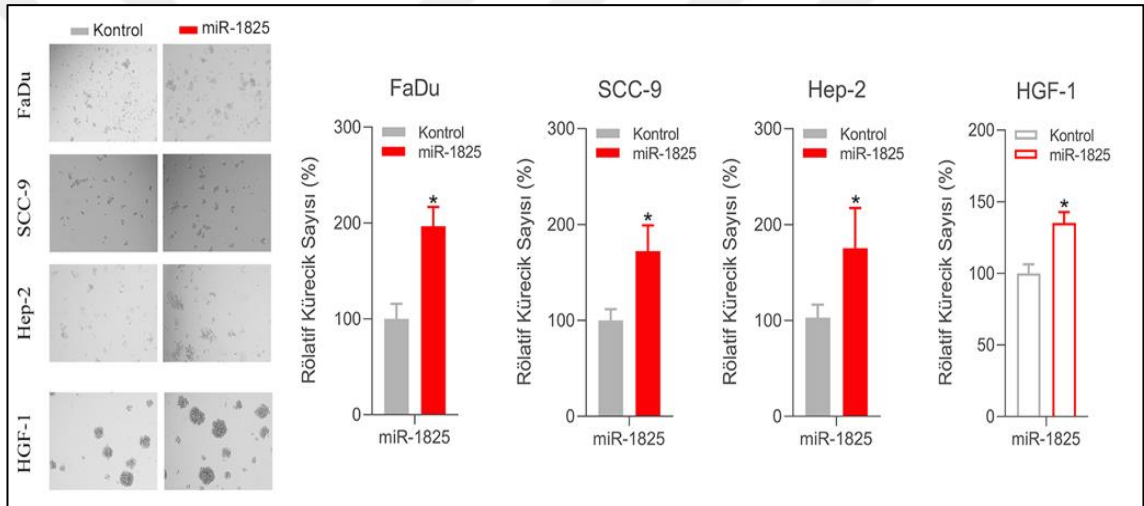
MiR-1825'in FaDu, SCC-9, Hep-2 ve HGF-1 hücrelerinde hücre canlılığını etkileme mekanizmalarından birisinin apoptoz üzerinden olup olmadığını değerlendirme için hücrelerin apoptotik aktivitesi "Caspase-3/CPP32 Colorimetric Assay (BioVision)" kiti kullanılarak ölçüldü. Artmış miR-1825 ifadesinin HGF-1, Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinde apoptotik aktiviteyi azalttığı gösterildi. Buna zıt olarak miR-1825 inhibisyonunun Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinde apoptotik aktiviteyi artırdığı ortaya konuldu (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde apoptotik aktivite değişimi.

4.3. BBSHK ve Normal Ağız İçi Fibroblast Hücrelerinde Artan ve Azalan MiR-1825 İfadesi Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMG) ve Kök Hücre Özellikleriyle İlişkili Hüresel Fenotipler Üzerinde Etkilidir

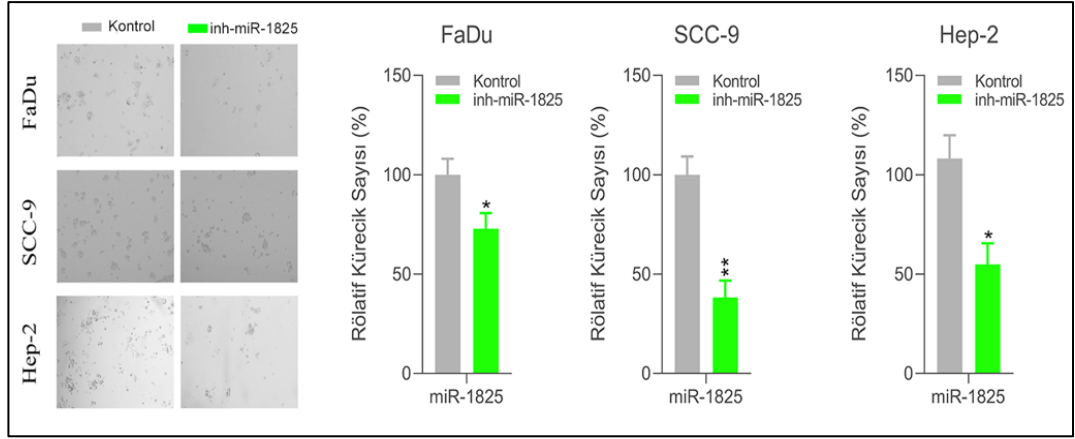
MiR-1825'in lokalize olduğu 20q11.21 bölgesinin insan embriyonik ve pluripotent kök hücrelerde amplifiye olduğunun gösterilmesi dolayı miR-1825'in BBSHK hücrelerinde kök hücre özellikleri ile ilişkisi araştırıldı. Bu doğrultuda öncelikle miR-1825'in hücrelerin kürecik oluşturma potansiyeli üzerindeki etkileri incelendi. Artmış miR-1825 ifadesinin FaDu, SCC-9, Hep-2 ve HGF-1 hücrelerinin kürecik oluşturma potansiyelini artırdığı gösterildi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. MiR-1825 mimik ile transfecte edilmiş hücrelerde kürecik oluşturma potansiyeli değişimi.

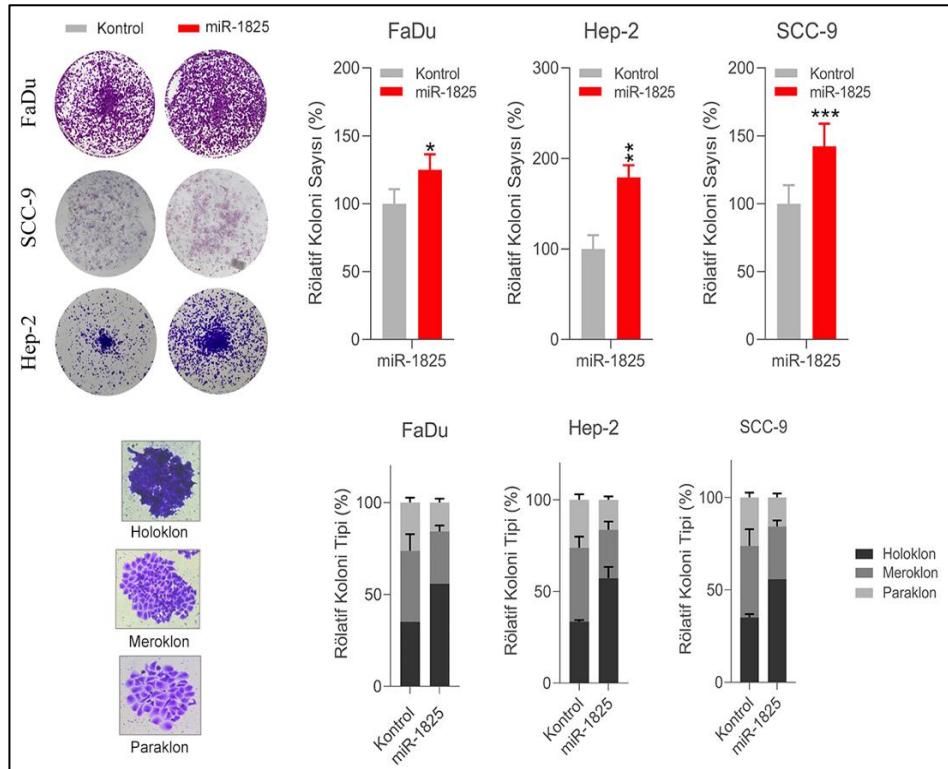
MiR-1825 inhibisyonunun ise Hep-2, FaDu ve SCC-9 hücrelerinde kök hücre potansiyelini azalttığı ortaya konuldu (Şekil 4.15).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.15. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde kürecik oluşturma potansiyeli değişimi.

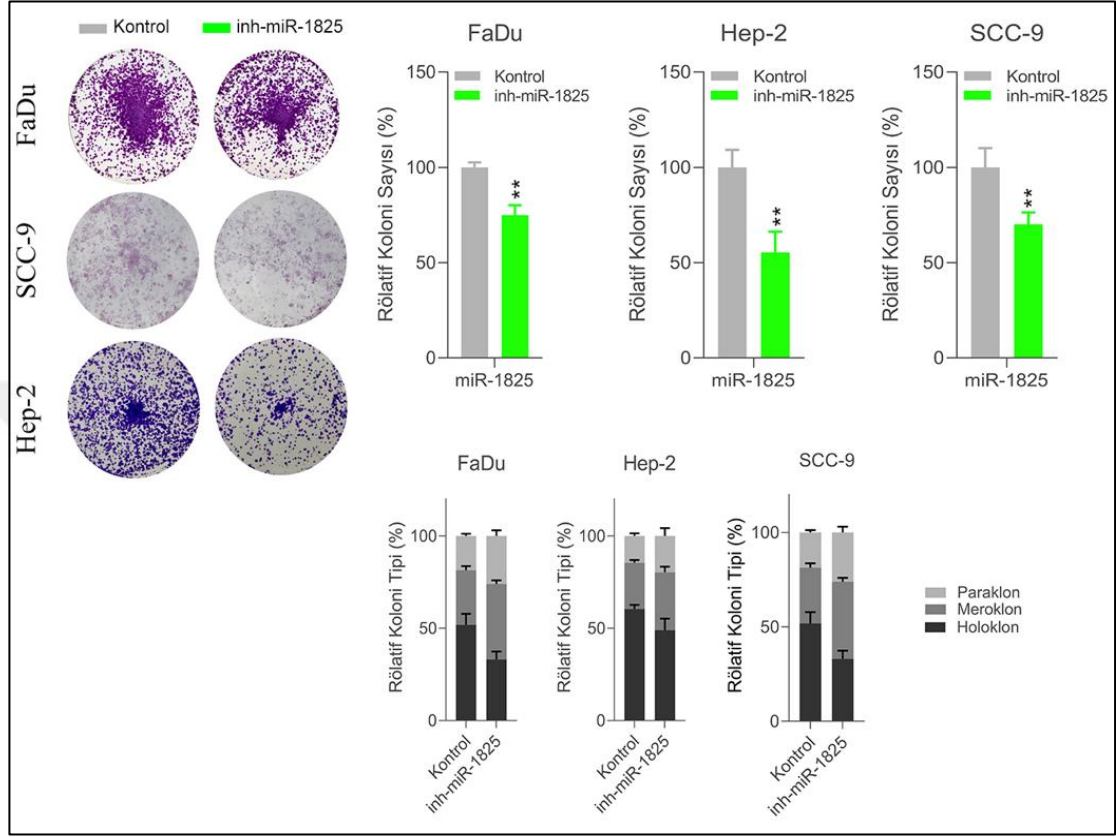
MiR-1825'in kök hücre karakteristiği üzerindeki etkisi ayrıca tek hücre koloni testi ile de değerlendirildi. Artmış miR-1825 ifadesinin FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde hem daha fazla koloni oluşumuna hem de kök hücrelerce zengin holoklonların toplam popülasyondaki oranının meroklon ve özellikle farklılaşmış hücrelerce zengin paraklonlara göre artmasına yol açarak hücrelerin kök hücre potansiyelini artırdığı ortaya konuldu (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde koloni oluşturma potansiyeli değişimi.

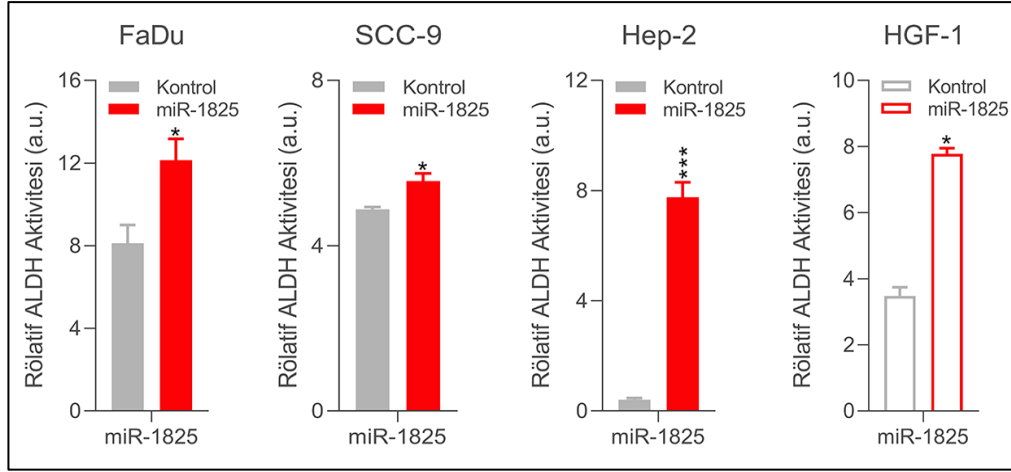
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

MiR-1825 inhibisyonunun ise FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde holoklonların oranının düşmesi ve meroklon ve paraklon oranının artmasına yol açarak miR-1825'in hücrelerin kök hücre potansiyelini azaltıcı etkisini teyit etti (Şekil 4.17).



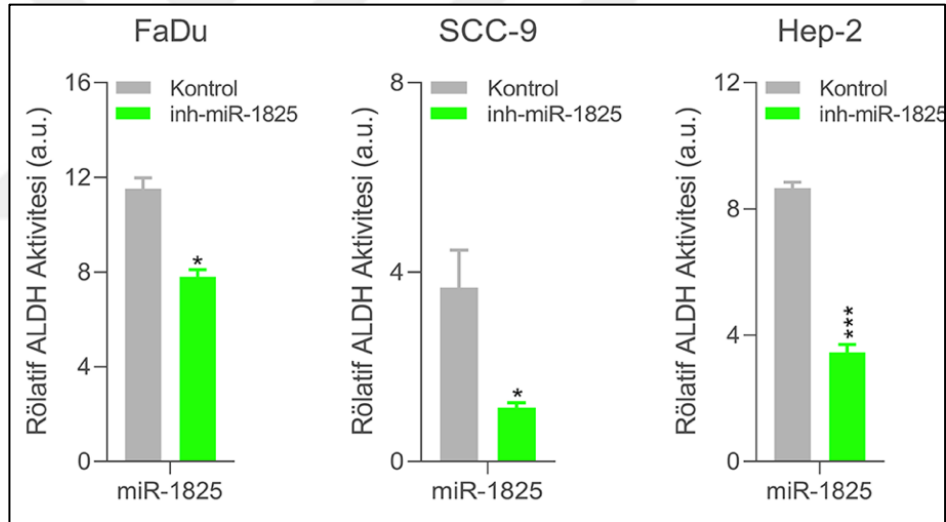
Şekil 4.17. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde koloni oluşturma potansiyeli değişimi.

MiR-1825'in BBSHK hücrelerinin kök hücre karakteristiği üzerindeki etkisi önerimli bir kök hücre işaretçisi olan ALDH aktivitesinin değerlendirilmesi ile de incelendi. Artmış miR-1825 ifadesinin FaDu, SCC-9, Hep-2 ve HGF-1 hücrelerinde ALDH aktivitesinin anlamlı derecede artmasına yol açtığı gösterildi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde ALDH aktivitesi

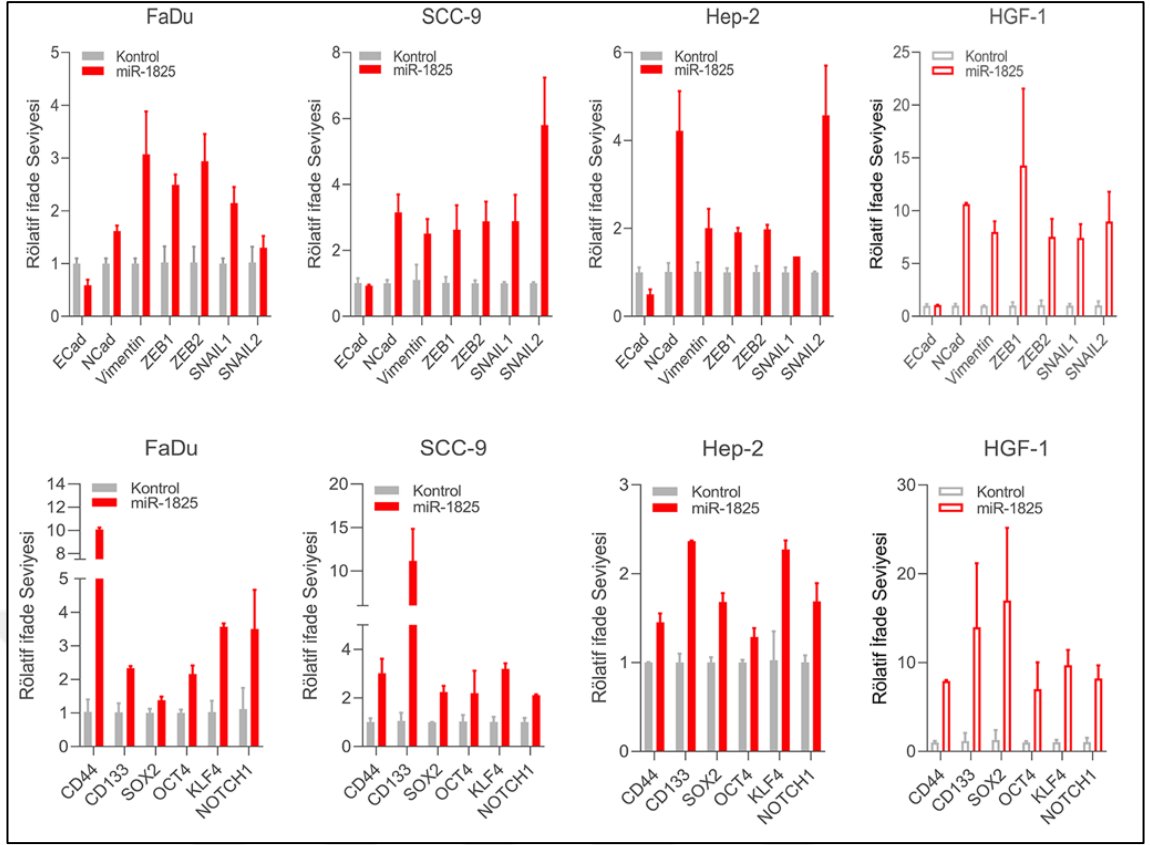
Azalan miR-1825 ifadesinin ise FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde ALDH aktivitesinin baskılanmasına sebep olduğu tespit edildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde ALDH aktivitesi

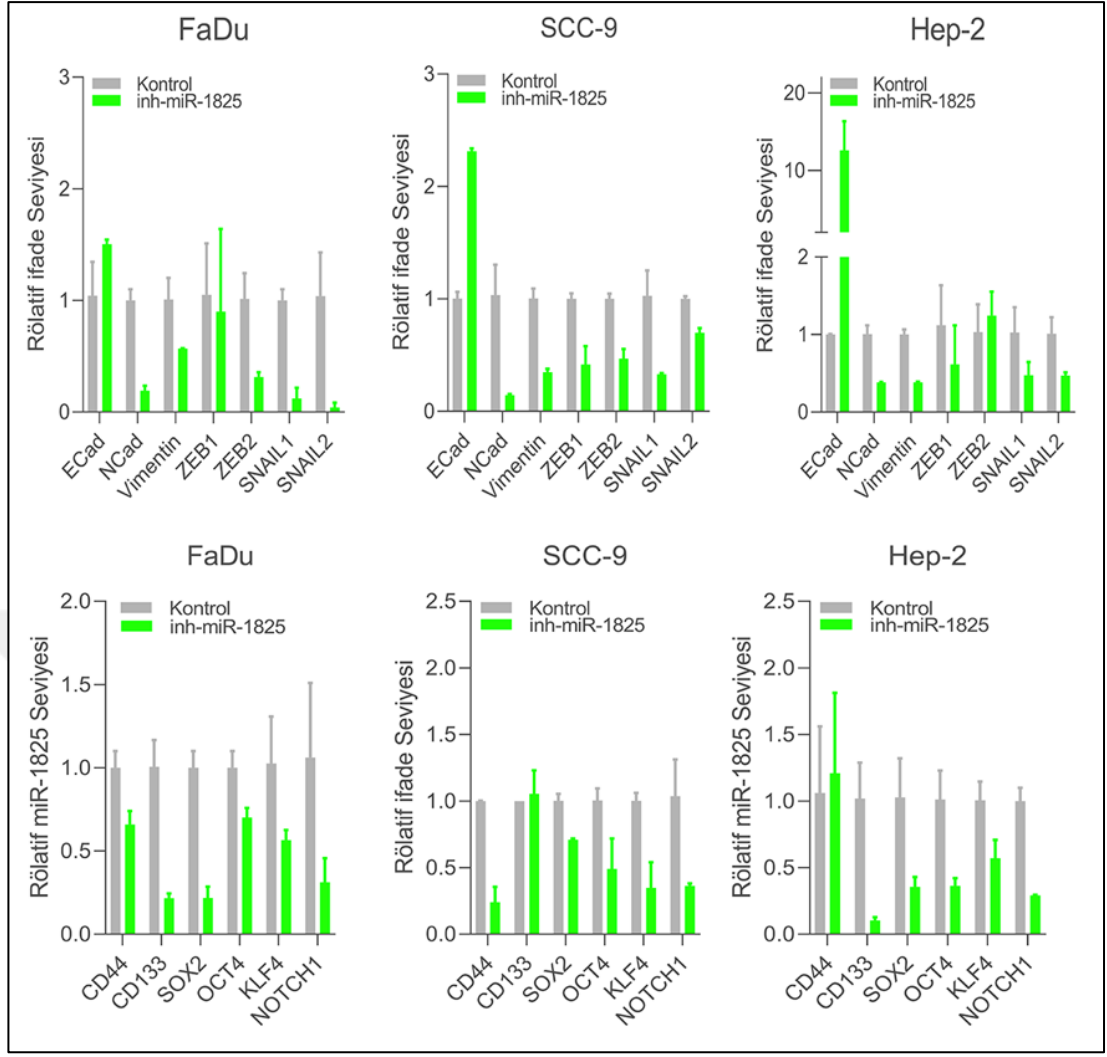
Sonrasında miR-1825'in EMG ve kök hücre karakteristiği ile ilişkili genlerin ifade seviyeleri üzerindeki etkileri qRT-PCR ile değerlendirildi. Artmış miR-1825 ifadesinin FaDu, SCC-9, Hep-2 ve HGF-1 hücrelerinde epitelyal işaretçi E-cadherin'in ifadesinin azalmasına ve mezenkimal karakterle ilgili EMG genleri ile kök hücre işaretçisi genlerin ifadelerinin artmasına yol açtığı gösterildi (Şekil 4.20).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.20. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde EMT ve kök hücre işaretçilerinin ifadeleri.

MiR-1825 ifadesinin inhibisyonunun ise FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde epitelyal işaretçi E-cadherin'in ifadesinin artmasına ve mezenkimal karakterle ilgili EMG genleri ile kök hücre işaretçisi genlerin ifadelerinin azalmasına sebep olduğu gösterildi (Şekil 4.21).

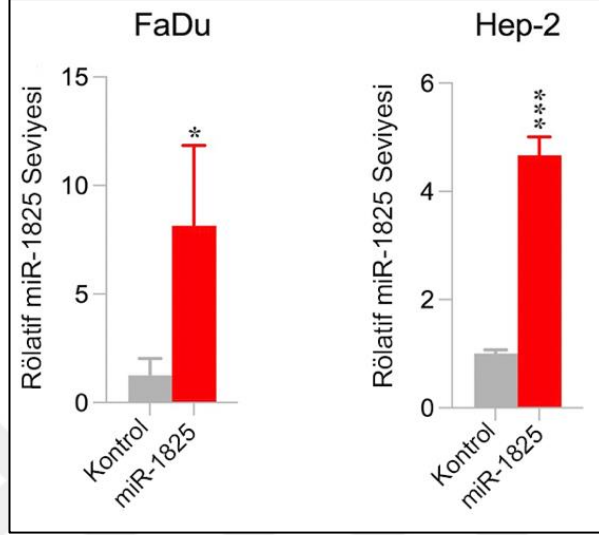


Şekil 4.21. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde EMT ve kök hücre işaretçilerinin ifadeleri.

4.4. MiR-1825'in BBSHK Hücrelerinde Artmış İfadesi *in vivo* Tümör Gelişimi ile İlişkilidir

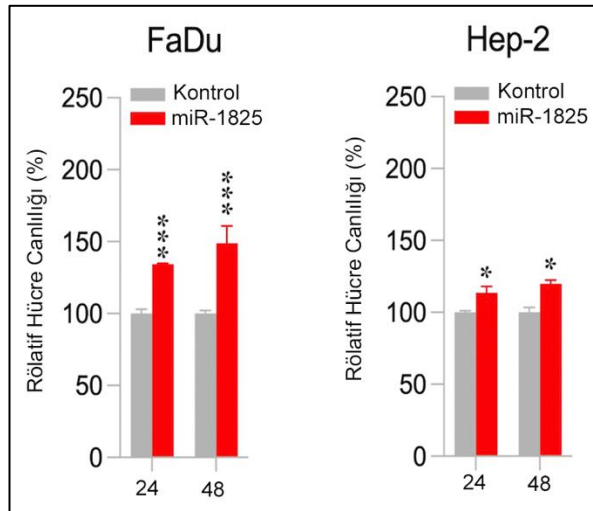
In vivo modeller karsinogenez süreçlerinin moleküler açıdan daha iyi anlaşılması ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu doğrultuda, insan kanser hücrelerinin immün sistemi bastırılmış NUDE farelerde sırt bölgesinden subkütan enjeksiyonu ile oluşturulan ksenograft modellerin kullanımı kanser çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Bu modeller teknik açıdan insan tümörlerinin *in vivo* ortamını yansıtabilmekte ve hızlı tümör gelişimine imkan sunarak hızlı bir şekilde sonuç alınmasını sağlamaktadır. Bu yönüyle, subkütan yolla oluşturulan ksenograft model tümör oluşum potansiyelinin belirlenmesi ve meydana gelen histolojik ve moleküler değişikliklerin incelenmesi açısından ideal bir modeldir.

Bu doğrultuda BBSHK hücrelerinde miR-1825'in *in vivo* onkojenik potansiyelini araştırmak için öncelikle miR-1825'i stabil olarak yüksek düzeyde ifade eden FaDu ve Hep-2 hücreleri oluşturuldu ve bu hücrelerde artan miR-1825 ifadesi qRT-PCR kullanılarak doğrulandı (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Hep-2 ve FaDu hücrelerinde stabil olarak yüksek düzeyde ifade edilen miR-1825'in ifade düzeyi.

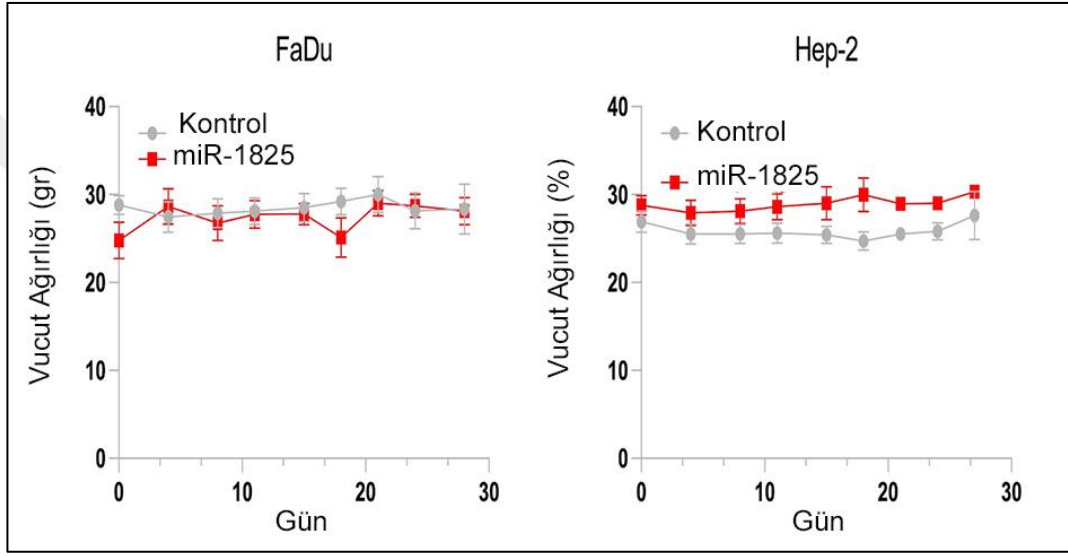
Stabil transfeksiyon yapılarak artmış miR-1825 ifadesinin BBSHK hücre canlılığını artırdığı gösterilmiştir. MiR-1825'i stabil olarak yüksek düzeyde ifade eden FaDu ve SCC-9 hücrelerinde de kontrol hücrelerine kıyasla 24 ve 48 saatlik süre sonunda hücre canlılığını anlamlı olarak artırdığı doğrulandı (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. MiR-1825'i stabil olarak yüksek düzeyde ifade eden Hep-2 ve FaDu hücrelerinde zamana bağlı artmış canlılık seviyesi.

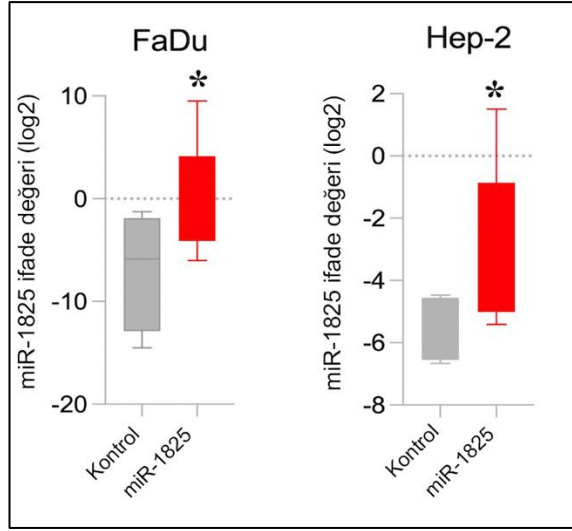
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Daha sonra, FaDu ve Hep-2 hücrelerinde miR-1825'in artan ifadesinin tümör oluşumu üzerine etkilerini araştırmak için timüsü olmayan çıplak nu/nu NUDE fare *in vivo* kanser modeli kullanıldı. MiR-1825'i stabil olarak yüksek düzeyde ifade eden Hep-2 ve FaDu hücreleri NUDE farelere iki taraflı olarak deri altından enjekte edildi. Hücrelerin enjeksiyonundan sonra 1 ay boyunca sakrifikasyona kadar haftada iki kez farelerin vücut ağırlıkları ölçüldü ve hem kontrol hem de miR-1825'in overeksprese edildiği farelerin vücut ağırlıklarının gruplarda anlamlı şekilde değişmediği gözlemlendi (Şekil 4.24).



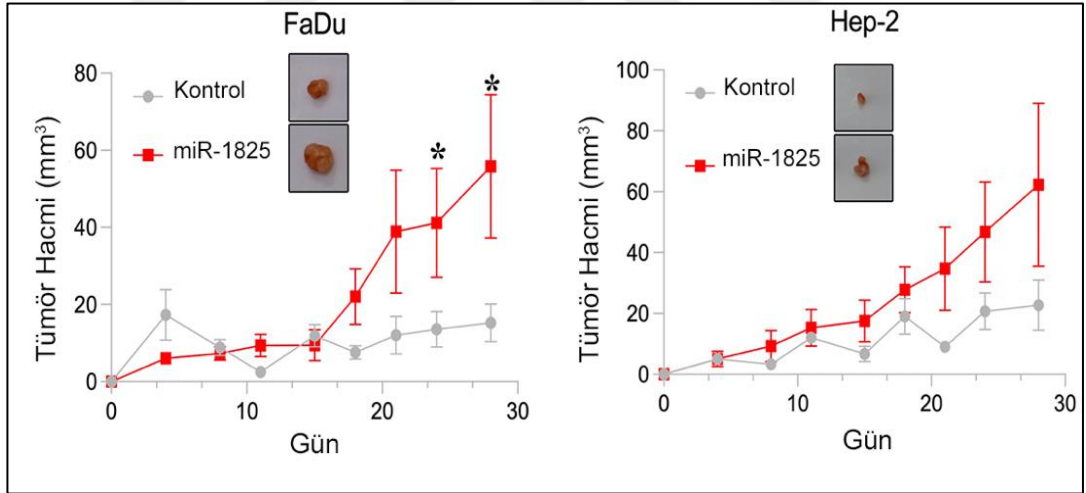
Şekil 4.24. Deney süresince farelerin vücut ağırlıklarındaki değişim

1 ay sonunda fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi ve mevcut tümörler ve olası metastazları incelemek adına akciğerler çıkartıldı. Tümör örneklerindeki farklı miR-1825 ifadesi qRT-PCR ile incelendi. MiR-1825'i yüksek düzeyde ifade eden hücrelerin oluşturduğu tümörlerde kontrol grubuna kıyasla miR-1825 seviyesi anlamlı derecede daha yüksek olarak teyit edildi (Şekil 4.25).



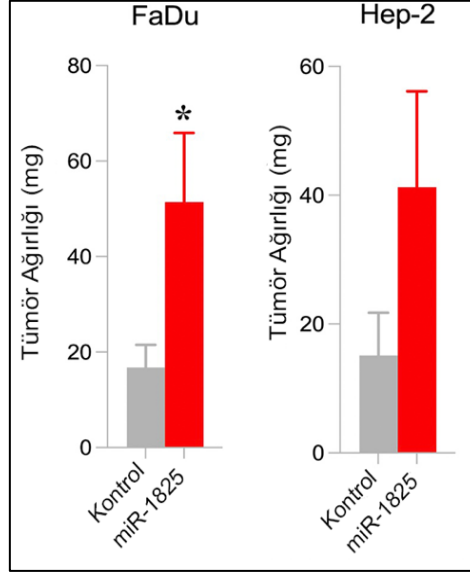
Şekil 4.25. Deney sonrası farelerin deri altında oluşan tümörlerde miR-1825 seviyesi

Deney süresince haftada iki kere ölçülen tümör hacim bilgileri kullanılarak oluşturulan grafikler miR-1825'i yüksek düzeyde ifade eden hücrelerin kontrol grubu hücrelere kıyasla daha büyük tümörler oluşturduğu gösterildi (Şekil 4.26).



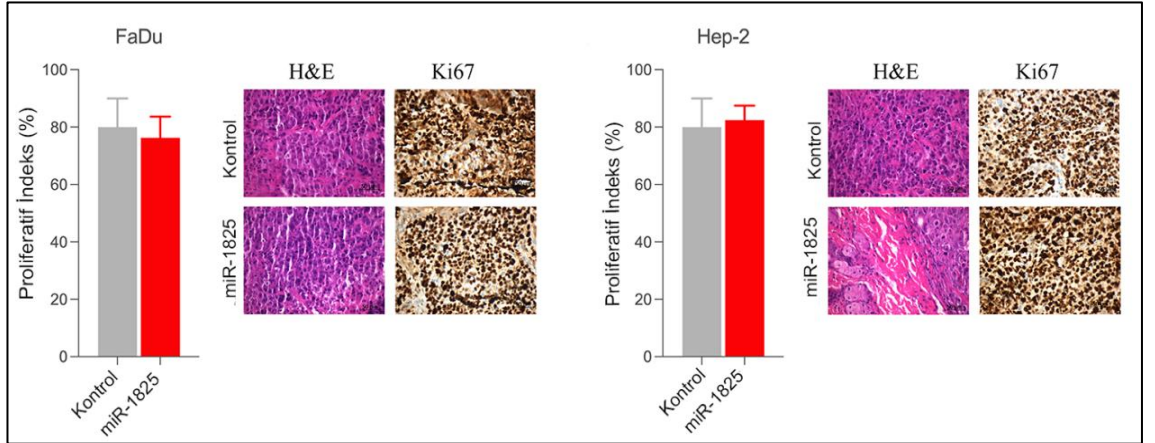
Şekil 4.26. MiR-1825'i yüksek düzeyde ifade eden hücreler ile kontrol grubu hücrelerin oluşturduğu tümör hacimlerinin zamana bağlı grafiği.

Sakrifikasyon sonrasında çıkartılan tümörlerin ağırlıkları ölçüldüğünde de miR-1825'i yüksek düzeyde ifade eden hücrelerin oluşturduğu tümör ağırlıklarının kontrol grubuna göre anlamlı oranda daha yüksek olduğu gösterildi (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. MiR-1825'i yüksek düzeyde ifade eden hücreler ile kontrol grubu hücrelerin oluşturduğu tümör ağırlıkları.

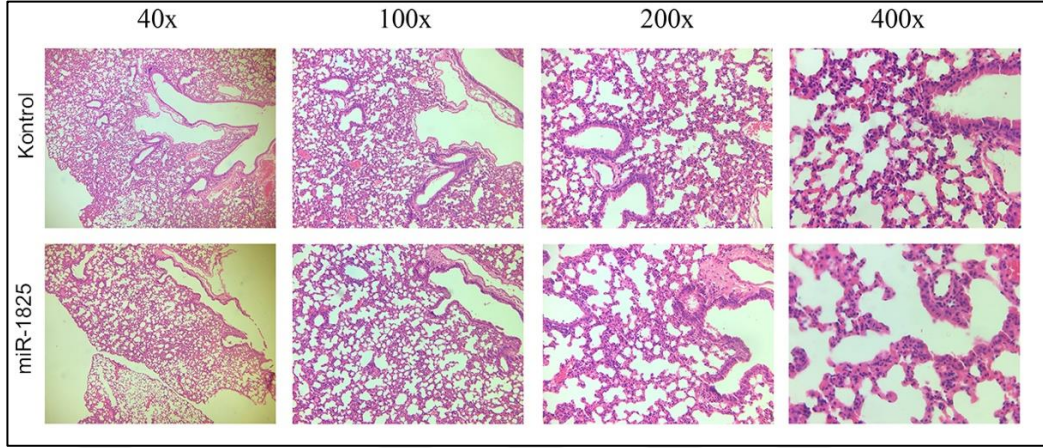
Sakrifikasyondan sonra elde edilen tümör örneklerinin bir kısmı formaldehit içerisinde fikse edilip parafin içerisine gömülerek örneklerden kesitler alındı. Değişen miR-1825'in hücre çoğalması üzerindeki etkilerini değerlendirmek için İmmünohistokimyasal olarak Ki-67 boyaması yapıldı. Ki-67 açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Farelerin deri altında oluşan tümörlerin histopatolojik incelemesi sonucu elde edilen Ki-67 ve H&E görüntüleri.

MiR-1825'in yüksek düzeyde ifade edildiği gruplarda gelişebilecek olası metastazları incelemek adına, baş ve boyun kanserlerinin yaygın uzak metastaz bölgelerinden birisi olan akciğerlerdeki metastatik lezyonların varlığı H&E boyamaları

yapılarak incelendi fakat her iki grupta da metastatik lezyonlar gözlemlenmedi (Şekil 4.29).

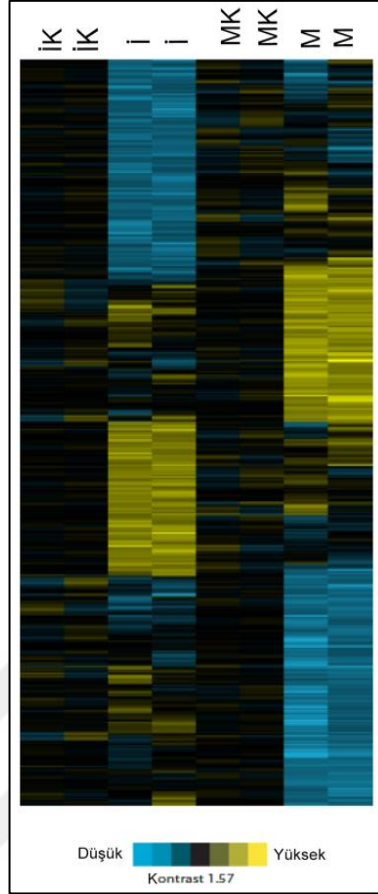


Şekil 4.29. Farelerin akciğerlerinde gelişebilecek uzak metastaz bölgelerinin histopatolojik incelemesi sonucu elde edilen H&E görüntüleri.

4.5. FREM1, MiR-1825'in Doğrudan Hedefidir

MiR-1825'in BBSHK hücreleri üzerindeki onkogenik fonksiyonel etkilerini moleküler düzeyde daha fazla araştırmak için miR-1825'in olası hedef genleri araştırıldı. Bu doğrultuda öncelikle mimik miR-1825, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen Hep-2 hücrelerindeki gen ifade profilindeki değişimlerin belirlenmesi için gen ifade mikrodizin çalışması yapıldı.

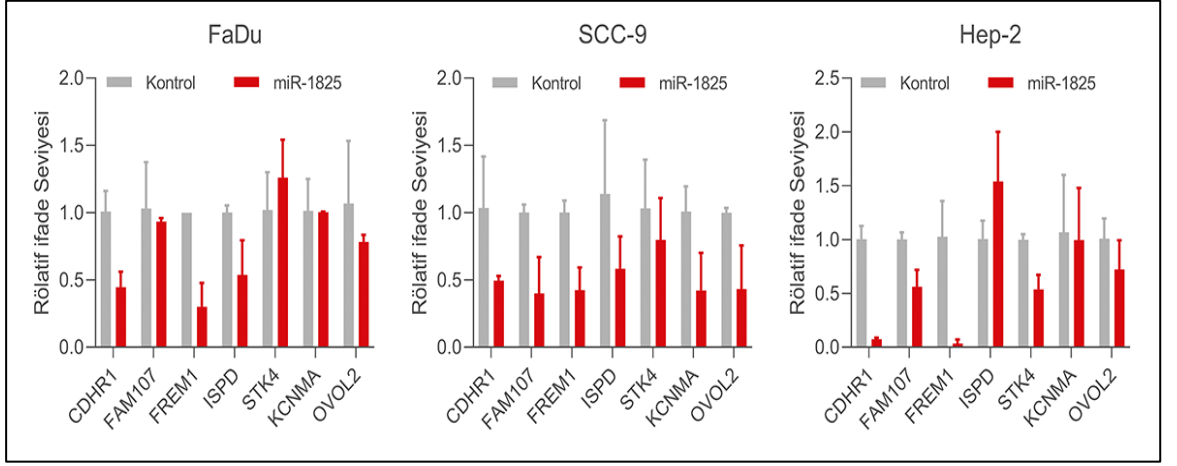
Mikrodizin analizi sonucunda ifade seviyeleri değişmiş olarak bulunan toplamda 2.281 gen arasından inhibitör grubunda ifadesi değişen 718, mimik grubunda ifadesi değişen 1593 tane gen tespit edildi. Hem inhibitör kontrol/inhibitör hem de mimik kontrol/mimik grubunda en az 1,5 katlık değişim gösteren total 1472 gen tespit edildi. İnhibitor grubunda yukarı regüle edilen ve mimik grubunda aşağı regüle edilen 63 gen ($p < 0.05$, limma), miR-1825 için olası hedefler olarak değerlendirildi. Ancak, *in siliko* araçlarının kullanılması ile bu 63 genin hiçbirisinin potansiyel bir miR-1825 hedefi olmadığı belirlendi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş Hep-2 hücrelerinde anlamlı olarak değişim gösteren genlerin profilinin ısı haritası gösterimi (İK-İnhibitör Kontrol, İ-İnhibitör, MK-Mimik Kontrol, M-Mimik).

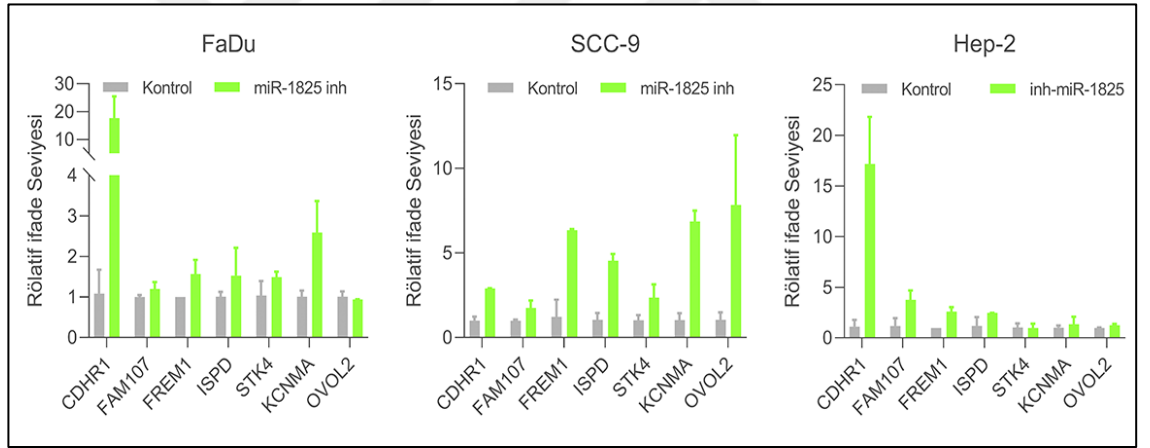
Bu sebeple miR-1825 için aday hedef seçmek adına mimik miR-1825 grubunda ifade seviyesi kontrole göre anlamlı derecede azalan ve *in siliko* araçlar tarafından olası miR-1825 hedefi olarak tahmin edilen 7 adet gen (CDHR1, FAM107, FREM-1, ISPD, STK, KCNMA, OVOL2) validasyon çalışmaları için seçildi. Bu genler için ilk validasyon çalışması olarak miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilmiş FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde qRT-PCR ile ifade analizi yapıldı. Her üç hücre hattında da mimik miR-1825 transfeksiyonu sonrasında bu aday hedef genlerin ifadelerinin azaldığı gösterildi (Şekil 4.31).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



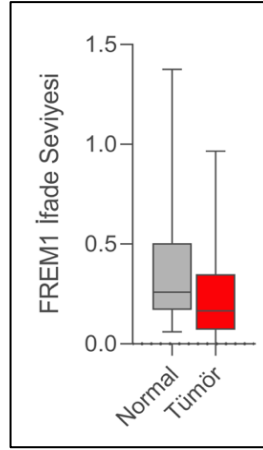
Şekil 4.31. MiR-1825 mimik ile transfekte edilmiş hücrelerde hedef genlerin ifade seviyeleri.

MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilen FaDu, SCC-9 ve Hep-2 hücrelerinde ise hedef genlerin ifadelerindeki artış genel olarak doğrulandı (Şekil 4.32).



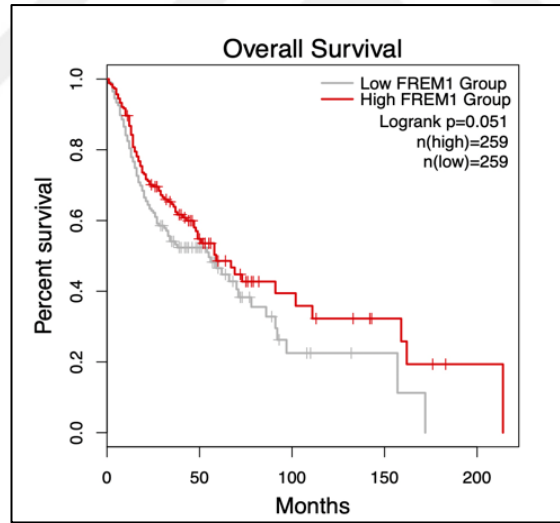
Şekil 4.32. MiR-1825 inhibitör ile transfekte edilmiş hücrelerde hedef genlerin ifade seviyeleri.

Diğer yandan bu aday hedef genlerden her 3 hücre hattında da ifadesi tutarlı olarak değişim gösteren ayrıca literatür taraması ve bioinformatik veri tabanlarında yapılan değerlendirmeler sonucunda baş ve boyun kanserlerinde tümör süpresör potansiyeli olan en güçlü aday genin FREM1 olduğu belirlendi. Bu sebeple sonraki çalışmalara FREM1 ile devam edilmesine karar verildi. FREM1'in baş ve boyun kanserlerindeki tümör süpresör potansiyelini doğrulamak adına TCGA verisetinde yapılan incelemede BBSHK hastalarının tümör doku örneklerinde FREM1 ifade seviyesinin normal dokulara kıyasla düşük olduğu gösterildi (Şekil 4.33).



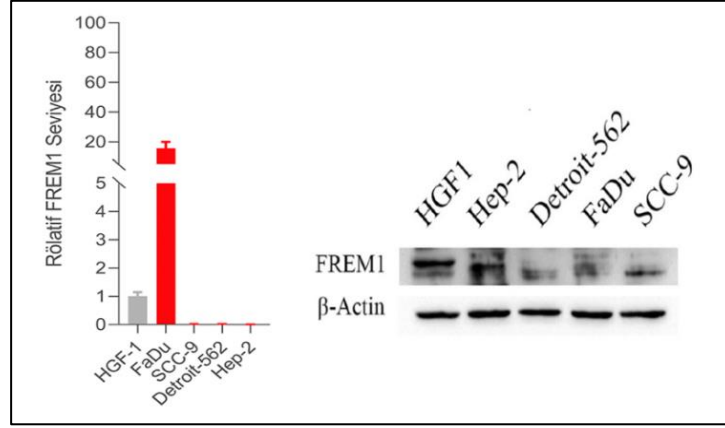
Şekil 4.33. Baş ve boyun kanseri örneklerinde FREM1 ifade seviyesi

Kaplan Meier Plotter online uygulaması ile gerçekleştirilen sağkalım analizinde ise tümör dokularında düşük FREM1 ifadesi olan hastalarda sağkalımın daha düşük olduğu tespit edildi (Şekil 4.34). Bu bulgular FREM1'in BBSHK özelinde miR-1825 için olası güçlü bir hedef olduğunu gösterdi.



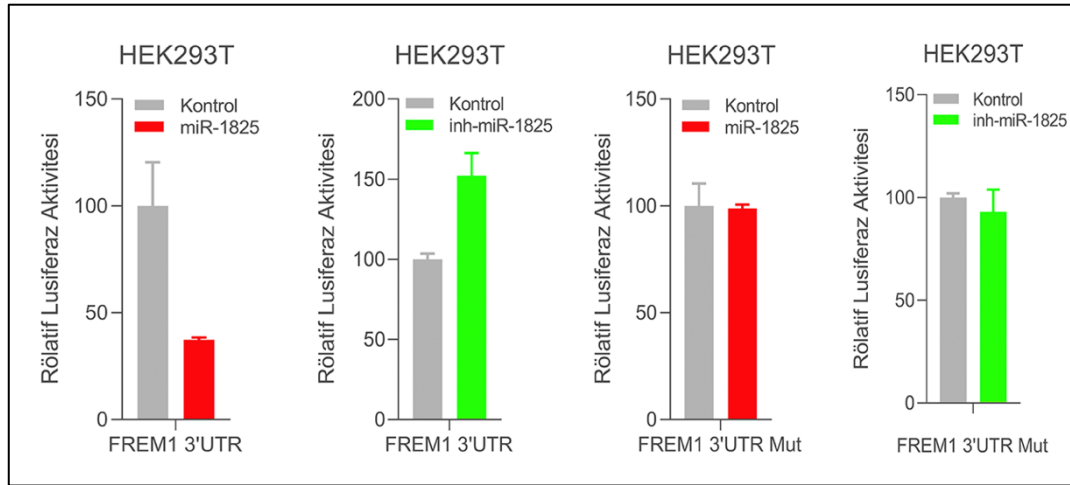
Şekil 4.34. Baş ve boyun kanseri hastalarında FREM1 ifadesinin sağ kalıma etkisi

Elde ettiğimiz *in siliko* verileri desteklemek için HGF-1 normal ağız içi fibroblast hücreleri ve Detroit, FaDu, SCC-9, Hep-2 BBSHK hücrelerinde endojen FREM1 ifadesi mRNA ve protein düzeyinde incelendi. Bulgularımız, Hep-2 hücresi hariç kanser hücrelerindeki FREM1 ifade seviyesinin, HGF-1 normal ağız içi fibroblast hücrelerine kıyasla anlamlı derecede düşük olduğunu ortaya koydu (Şekil 4.35).



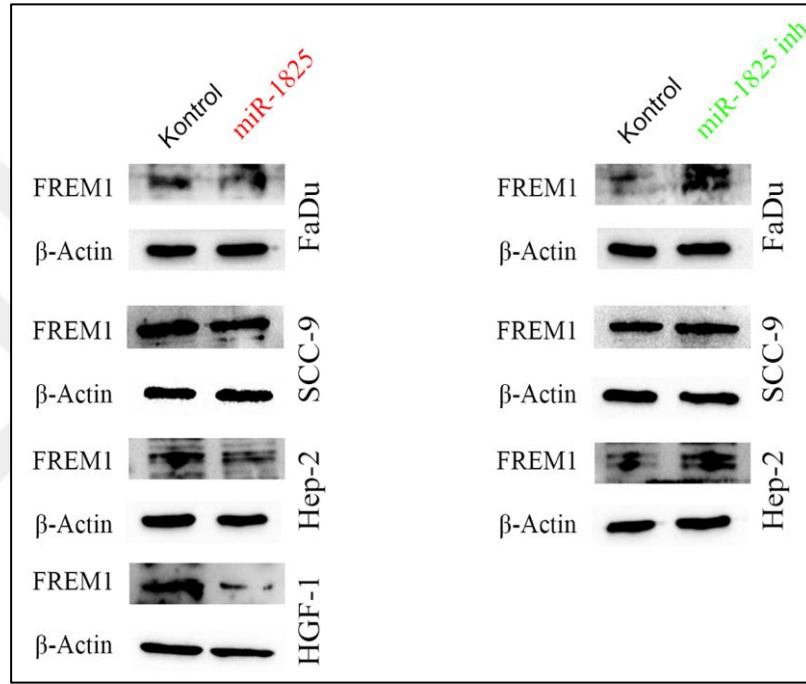
Şekil 4.35. Transfeksiyon yapılmayan hücrelerde endojen FREM1'in mRNA ve protein düzeyinde ifade seviyesi.

Sonrasında olası hedef olarak belirlenen FREM1 geninin doğrudan miR-1825'in hedefi olduğunu teyit etmek için lusiferaz raportör testi yapıldı. Artmış miR-1825 ifadesinin FREM1 3'UTR'sini taşıyan lusiferaz geninin aktivitesini baskıladığı, azalan miR-1825 ifadesinin lusiferaz aktivitesini artırdığı gösterildi (Şekil 4.36). Ardından FREM1'in 3'UTR'sinde tahmini miR-1825 bağlanma dizisinde QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit ile mutagenез gerçekleştirildi. Dizi analizi ile hedef bölgede oluşturulan mutagenезin başarılı şekilde gerçekleştirildiği Codoncode Aligner Software kullanılarak doğrulandıktan sonra tahmini miR-1825 bağlanma dizisi değiştirilen FREM1 3'UTR'sini taşıyan lusiferaz geninin aktivitesi üzerinde mimik miR-1825 veya inhibitör miR-1825'in etki etmediği gösterildi (Şekil 4.36). Bu veriler FREM1'in miR-1825'in direkt bir hedefi olduğunu doğruladı.



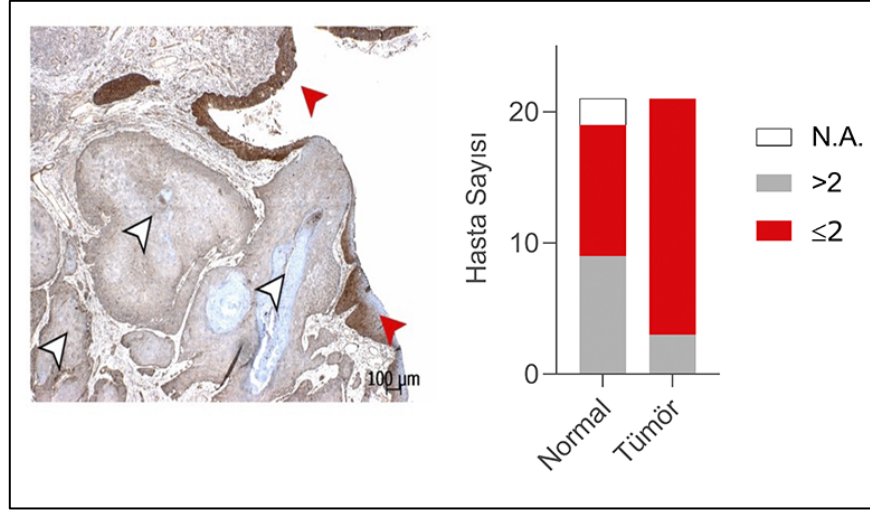
Şekil 4.36. HEK-293 hücrelerine miR-1825 ve FREM1 3'UTR plazmidinin eş zamanlı transfeksiyonu sonrası hücrelerde lusiferaz aktivite seviyesi.

Bu bulgularımıza ek olarak, miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitörü ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen FaDu, SCC-9, Hep-2 ve HGF-1 hücrelerinde de FREM1'in ifade seviyesi protein düzeyinde incelendi. MiR-1825 mimik ile transfekte edilen hücrelerde kontrol mimik ile transfekte edilen hücelere göre tümör süpresör potansiyele sahip FREM1 ifadesinin anlamlı seviyede azaldığı, buna zıt olarak hücrelerin inhibitör miR-1825 ya da inhibitor kontrol ile transfekte edilmesinin ardından FREM1 ifadesinin kontrole göre anlamlı seviyede arttığı ortaya konuldu (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. MiR-1825 transfekte edilen hücrelerde FREM1 ifadesinin protein düzeyinde ifade seviyesi.

MiR-1825'in hedefi olduğu doğrulanan FREM1'in insan baş ve boyun kanseri özelinde tümör süpresör potansiyelini doğrulamak adına immünohistokimyasal analiz yapıldı. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak-Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda rutin patolojik inceleme için alınan ve Atatürk Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik incelemesi yapılan örnekler kullanıldı. Bulgularımız, BBSHK tümör dokularındaki FREM1 seviyesinin normal dokulara kıyasla anlamlı şekilde az olduğunu ortaya koyarak FREM1'in tümör süpresör potansiyelini doğruladı (Şekil 4.38).

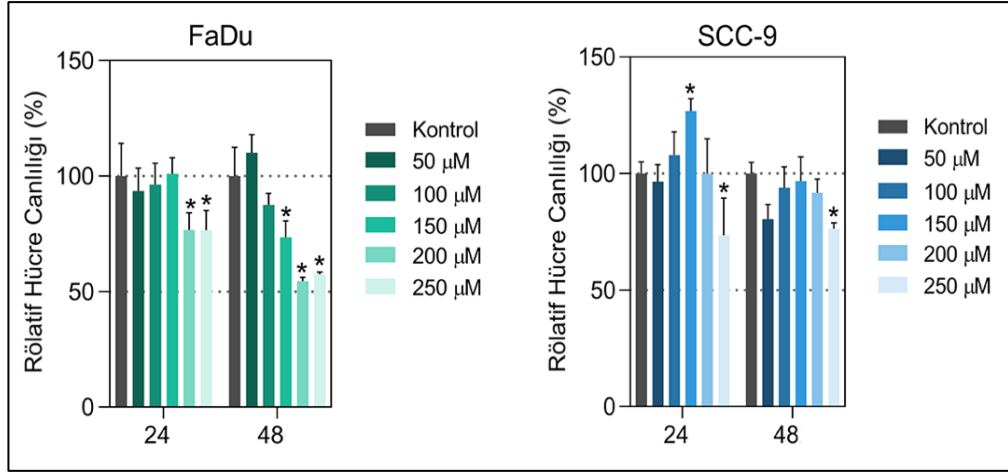


Şekil 4.38. BBSHK hasta doku örneklerinde FREM1 ifadesinin temsili görüntüsü ve farklı FREM1 ifade skoruna sahip hasta sayısı (x200) (n=21) (Kırmızı ok-normal epitel alan, Beyaz ok-tümör alanı).

4.6. MiR-1825'in İfadesi Hipoksi Sonucunda Hem Tümör Hücrelerinde Hem de Tümör Hücrelerinden Salınan Eksozomlarda Artar

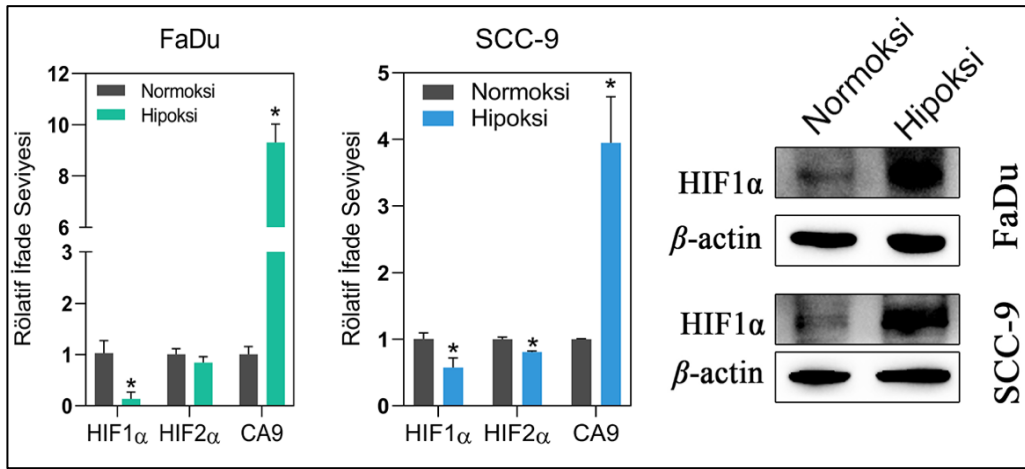
Hipoksi'nin kanser hücre popülasyonundaki kanser kök hücreleri zenginleştiği gerçeği göz önünde bulundurularak BBSHK hücrelerinin kanser kök hücre karakteristiği üzerinde etkisi olduğunu gösterdiğimiz miR-1825'in hipoksik stres koşullarına maruz kalan hücrelerde ve hipoksi kaynaklı tümör eksozomlarında artabileceği ve buna paralel olarak tümör mikroçevresindeki endotel hücrelerinin anjiyojenik potansiyellerini artırabileceği değerlendirildi.

Bu doğrultuda öncelikle BBSHK hücrelerinde hipoksi modeli oluşturmak için mimetik ajan olarak CoCl_2 kullanıldı. FaDu ve SCC-9 hücreleri üzerine en az toksisiteye sahip etkili CoCl_2 dozunu bulmak için, hücreler 24 ve 48 saat boyunca serumsuz ortamda artan dozlarda (50-100-150-200-250 μM) CoCl_2 ile muamele edildi. Sırasıyla FaDu ve SCC-9 hücrelerinde 100 μM ve 150 μM CoCl_2 'nin hücrelerin canlılık seviyesini önemli ölçüde etkilemediği gösterildi (Şekil 4.39).



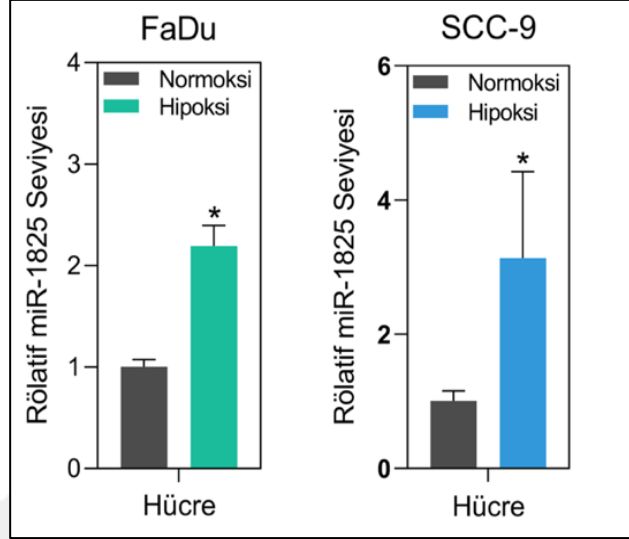
Şekil 4.39. CoCl₂ ile muamele edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde zamana bağlı hücre canlılık değişimi.

CoCl₂ ile muamele edilen hücrelerde hipoksi oluştuğunu ve modelin başarısını doğrulamak için CoCl₂ ile muamele edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde hipoksik belirteçlerin ifadeleri mRNA (HIF1a, HIF2a ve CA-9) ve protein (HIF1a) seviyesinde incelendi. Toksik olmayan CoCl₂ dozları ile muamele edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde literatürle uyumlu olarak kontrol normoksik hücrelere kıyasla HIF1a ve HIF2a ifadelerinin mRNA düzeyinde azaldığı ve CA-9 düzeyinin arttığı bulundu (Koukourakis et al. 2008; Janaszak-Jasiecka et al. 2016). Diğer yandan, hücreler CoCl₂ ile muamele edildikten sonra hem FaDu hem de SCC-9 hücrelerinde HIF1a protein seviyesi önemli ölçüde artış gösterdi (Şekil 4.40). Bu da BBSHK hücrelerinde CoCl₂ muamelesinin hipoksik şartları başarılı bir şekilde taklit ettiğini gösterdi.



Şekil 4.40. CoCl₂ ile muamele edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde hipoksik markerların ifade değişimi (*P < 0,05).

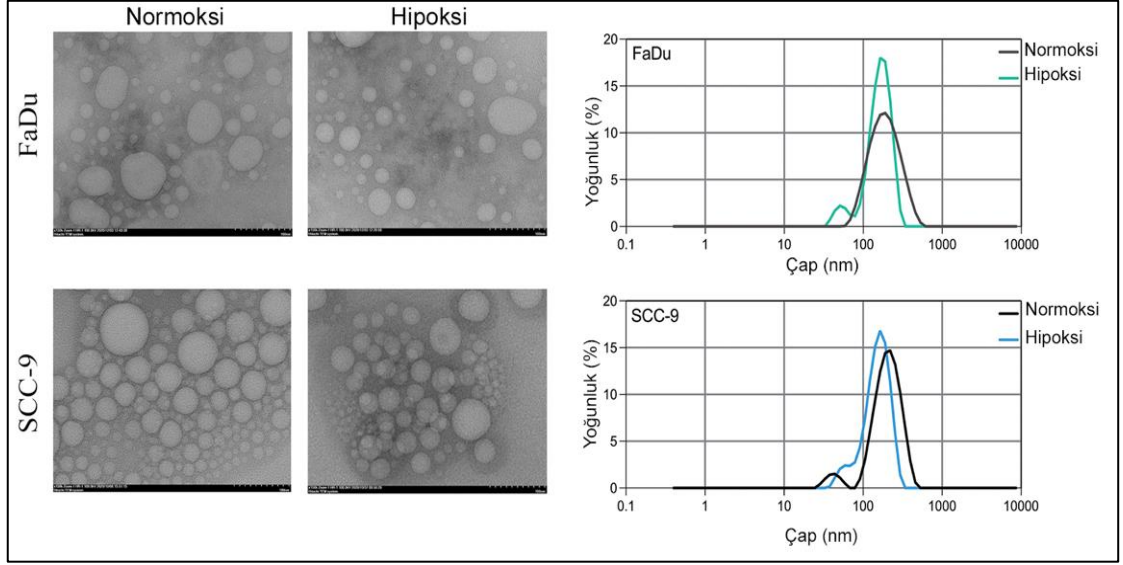
Kanser hücrelerinde hipoksi oluşturduktan sonra bu hücrelerdeki miR-1825 seviyesi değerlendirilerek hipoksik koşullarda BBSHK hücrelerinde miR-1825 seviyesinde önemli bir artış olduğu gösterildi (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. Hipoksik koşullara maruz kalan hücrelerde miR-1825 ifade seviyesi

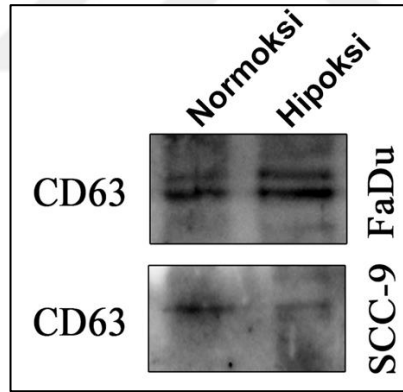
Hipoksik koşullarda tümör hücrelerinden salınan eksozomlarda miR-1825 seviyesini incelemek için 48 saat boyunca normoksik ve hipoksik koşullara maruz kalan FaDu ve SCC-9 hücrelerinin bulunduğu serumsuz besiyeri ortamından eksozomlar izole edildi. Eksozomların izolasyonunu doğrulamak adına eksozomlar TEM kullanılarak görselleştirildi ve Zetasizer Nano ZSP90 kullanılarak boyut analizi yapıldı.

TEM analizi 50 ila 350 nm arasında değişen tipik yuvarlak mikroveziküllerin varlığını göstererek eksozomların izole edilmiş olduğunu doğrulayan ilk kanıt oldu. Nano ZSP90 kullanılarak yapılan boyut analizi ise normoksik ve hipoksik şartlarda toplanan eksozomların benzer bir boyut dağılımı ve yoğunluğuna sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.42).



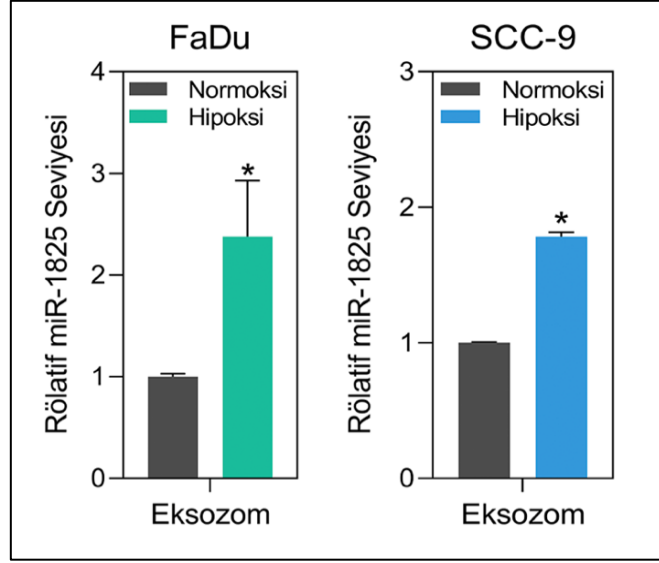
Şekil 4.42. Kanser türevli hipoksik eksozomların karakterizasyonu

Bu bulgulara paralel olarak, izole edilen eksozom lizatlarında eksozomal yüzey işaretçisi CD63'ün varlığı western blot analizi ile gösterilerek eksozom izolasyonunun validasyonu tamamlandı (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. Kanser türevli hipoksik eksozomların membran düzeyinde karakterizasyonu

Daha sonra, hipoksik koşullar altında kanser türevli eksozomlardaki miR-1825 seviyesi incelendi ve hücrelerdekine benzer şekilde normoksik şartlarda salınan eksozomlara kıyasla hipoksik eksozomlarca taşınan miR-1825'in daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 4.44).

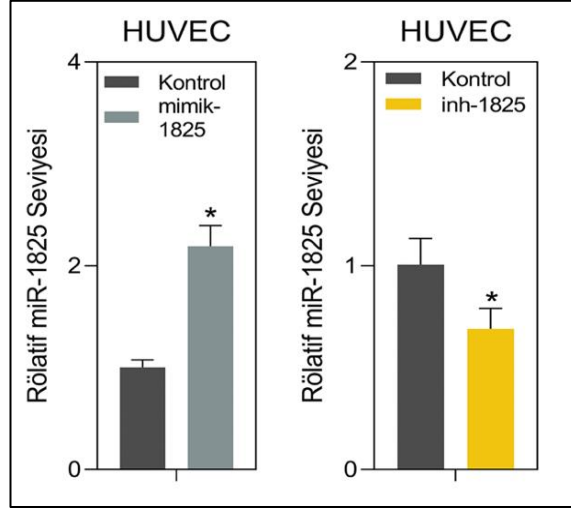


Şekil 4.44. Kanser türevli hipoksik eksozomlarda endojen miR-1825 ifade seviyesi

Bu bulgular, miR-1825'in kanser mikroçevresinin düzenlenmesinde de rol alabileceğine dair önemli kanıtlar olarak değerlendirildi.

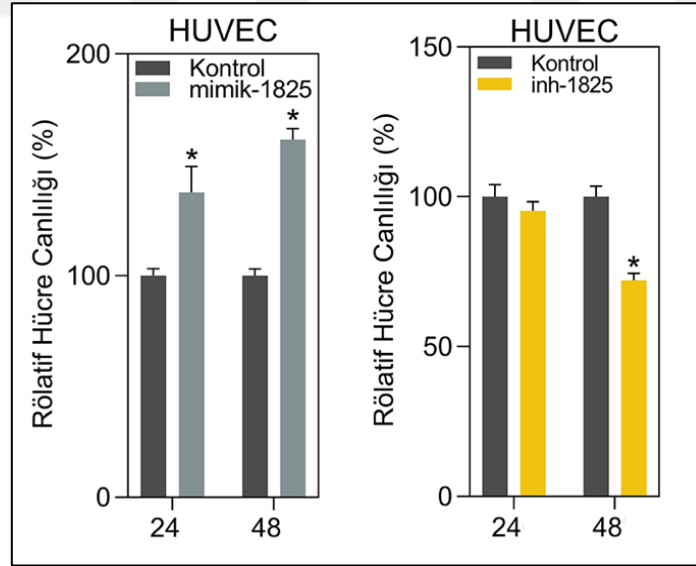
4.7. MiR-1825 Endotel Hücrelerinin Anjiyojenik Potansiyelini Artırır

Hipoksik şartlarda mikroçevrede regüle edilen en önemli hüresel sürecin anjiyojenez olduğu gerçeğinden yola çıkarak öncelikle miR-1825'in endotel hücreleri üzerinde bir etkisi olup olmadığını *in vitro* testlerle değerlendirdik. Bu doğrultuda öncelikle endotel hücrelerini miR-1825 ile transfekte edip bu hücrelerde miR-1825'in ifadesindeki değişimi qRT-PCR ile doğruladık. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilen HUVEC hücrelerinde sırasıyla artan ve azalan miR-1825 ifadesi gösterildi (Şekil 4.45).



Şekil 4.45. Transfeksiyon sonrası HUVEC’lerde miR-1825 ifade düzeyi

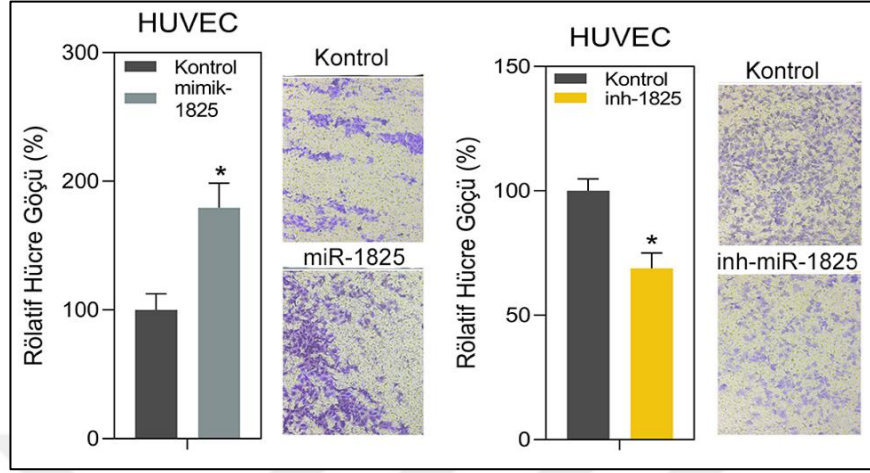
Artan ve azalan miR-1825 ifadesinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi CVDK-8 kiti kullanılarak incelendi. MiR-1825 mimik ile transfekte edilen HUVEC hücrelerinde kontrol hücrelere göre hücre canlılığının anlamlı olarak arttığı gösterildi. Bunun aksine miR-1825 inhibitör ile transfekte edilen hücrelerde ise hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş HUVEC’lerde zamana bağlı hücre canlılık değişimi.

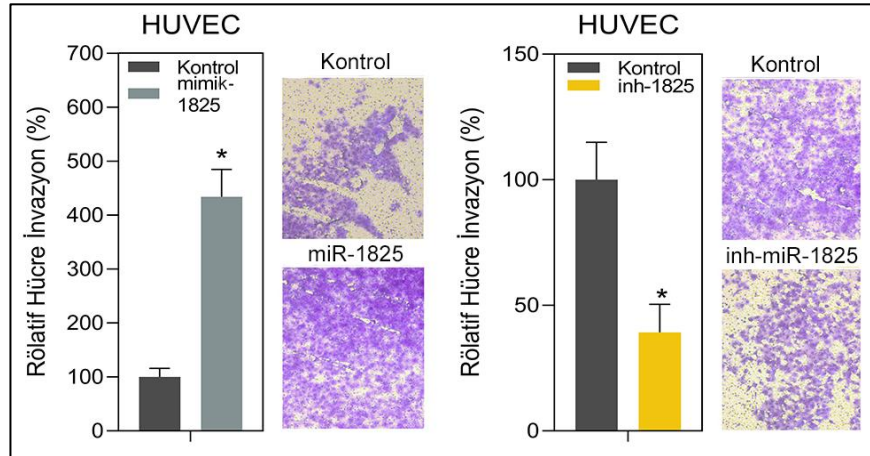
Bunlara ek olarak HUVEC hücrelerinde artan ve azalan miR-1825 ifadesinin endotel hücrelerin göç edebilme potansiyeli üzerindeki etkileri incelendi ve artan miR-1825 ifadesinin kontrol hücrelerine göre hücre göçünü anlamlı olarak artırdığı

gösterilirken azalan miR-1825 ifadesinin HUVEC hücre göçünü anlamlı olarak düşürdüğü tespit edildi (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş HUVEC'lerde hücre göçü değişimi.

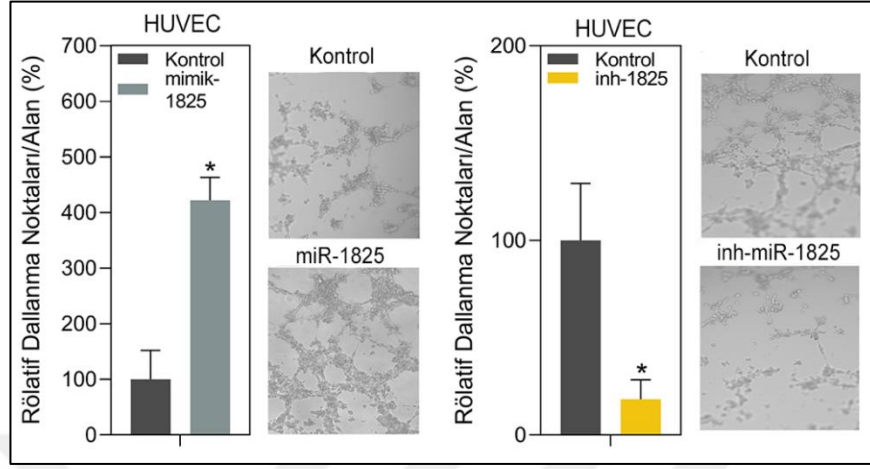
Sonrasında HUVEC hücrelerinde artan ve azalan miR-1825 ifadesinin endotel hücrelerin invaze olabilmeye yetenekleri üzerindeki etkileri incelendi ve artan miR-1825 ifadesinin hücre invazyonunu artırırken azalan miR-1825 ifadesinin hücre invazyonunu anlamlı olarak düşürdüğü tespit edildi (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş HUVEC'lerde hücre invazyonu değişimi.

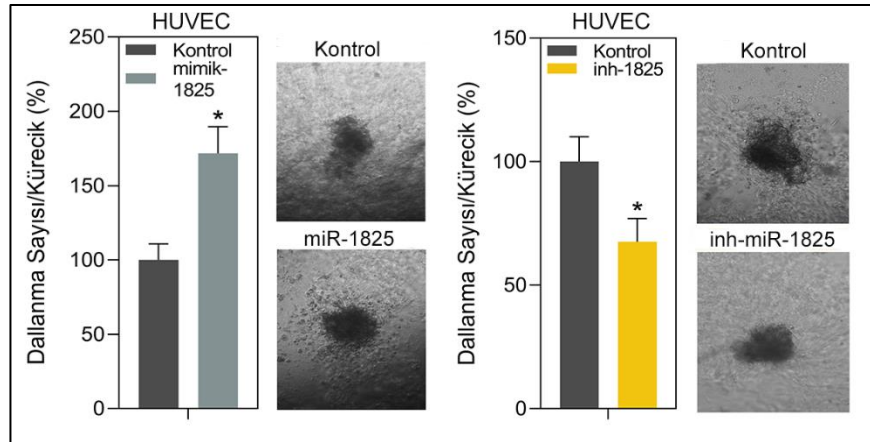
Daha da önemlisi, miR-1825'in artan ve azalan ifadelerinin endotel hücrelerin anjiyojenik potansiyeli üzerindeki etkileri tüp oluşum analizi ile incelendi ve miR-1825 ifadesindeki artışın endotel hücrelerin damar oluşturma potansiyelini arttırdığı, azalan

miR-1825 ifadesinin ise endotel hücrelerde damar oluşturma potansiyelini anlamlı olarak azalttığı ortaya konuldu (Şekil 4.49).



Şekil 4.49. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş HUVEC’lerde tüp oluşum potansiyelinin değişimi.

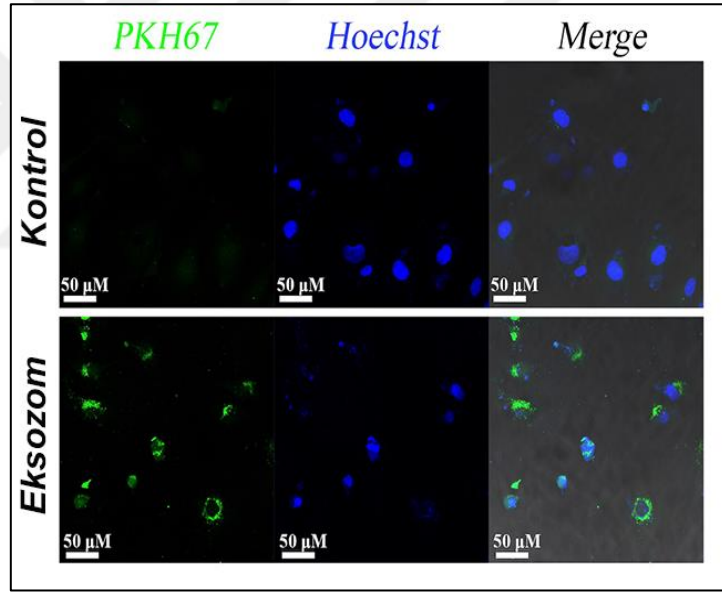
MiR-1825’in artan ve azalan ifadelerinin endotel hücrelerin anjiyojenik potansiyeli üzerindeki etkileri üç boyutlu kürecik temelli anjiyojenez analizi ile de incelendi. MiR-1825 ifadesindeki artışın endotel hücre küreciklerinin damar oluşturma potansiyelini arttırdığı gösterilirken azalan miR-1825 ifadesinin endotel hücre küreciklerinde damar oluşturma potansiyelini anlamlı ölçüde azalttığı ortaya çıkarıldı (Şekil 4.50). Bu bulgular miR-1825’in HUVEC hücrelerinin anjiyojenik potansiyelini değiştirebildiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.50. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilmiş HUVEC’lerde anjiyojenez potansiyelinin değişimi.

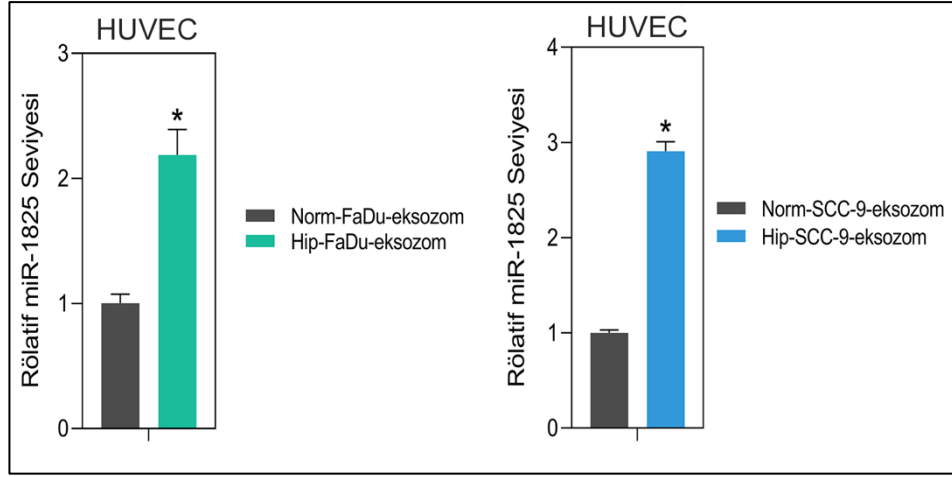
4.8. Kanser Türevli Hipoksik Eksozomlar MiR-1825 İçerikleri Aracılığıyla Anjiyojenezi İndükler

MikroRNA'ların hücreler arasında eksozomal kargolar aracılığıyla taşındığı bilinmektedir (Liu et al. 2021). MiR-1825'in tümör kaynaklı eksozomlarda zenginleştiğini ve endotel hücrelerde anjiyojenez ile ilişkili fenotipleri indüklemeye potansiyeline sahip olduğunu tespit ettikten sonra, hipoksi ile indüklenen tümör eksozomlarının miR-1825 içerikleri aracılığıyla anjiyojenezi destekleyip desteklemediği incelendi. Hipoksik koşullar altında FaDu ve SCC-9 hücreleri tarafından salgılanan miR-1825'in eksozomlar aracılığı ile HUVEC hücrelerine taşındığını doğrulamak için öncelikle eksozomlar yeşil floresan PKH67 ile etiketlendi ve etiketlenen eksozomların içeriklerinin HUVEC hücrelerine başarılı şekilde taşındığı gösterildi (Şekil 4.51).



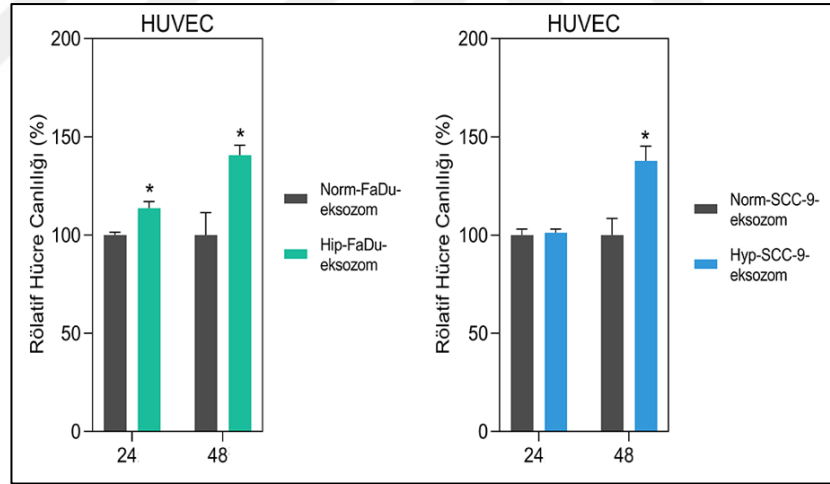
Şekil 4.51. PKH67 etiketli eksozomların HUVEC lere taşındığının konfokal görüntüsü

Hipoksik şartlarda tümör hücrelerinden salınan eksozomlar ile muamele edilen endotel hücrelerinde miR-1825 ifadesinin arttığını doğrulamak için, 48 saat boyunca normoksik ve hipoksik koşullara maruz kalan FaDu ve SCC-9 hücrelerinden izole edilen eksozomlar HUVEC'lere uygulandı. Normoksik eksozomlara kıyasla hipoksik türevli eksozom uygulanan endotel hücrelerde miR-1825 seviyesinin anlamlı olarak arttığı gösterildi (Şekil 4.52).



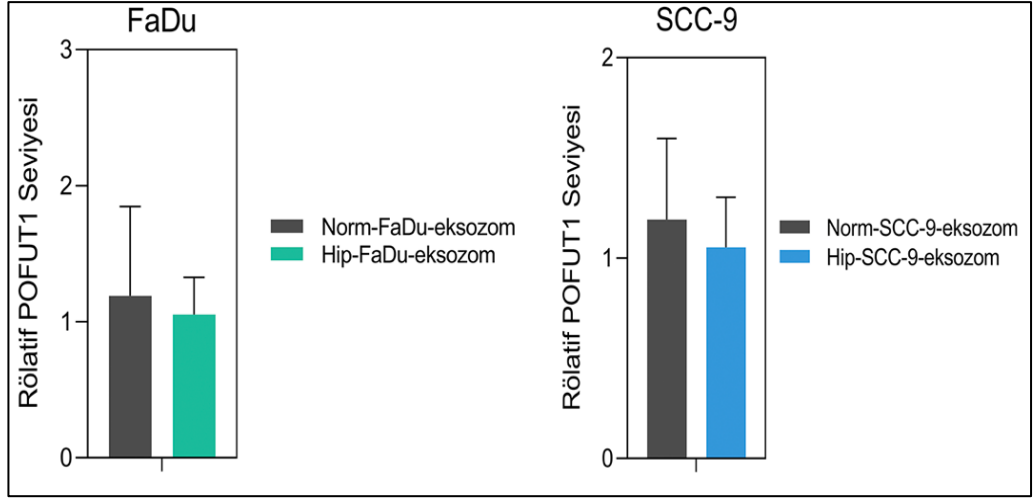
Şekil 4.52. HUVEC lere taşınan eksozomal miR-1825'in ifade seviyesi

Bunun yanı sıra, hipoksik türevli eksozomların HUVEC hücrelerine uygulanmasının bir sonucu olarak alıcı hücrelerde miR-1825 seviyelerindeki artıştan dolayı, hipoksik eksozomlarla muamele edilen HUVEC hücrelerinde kontrollere kıyasla hücre canlılığının arttığı gösterildi (Şekil 4.53).



Şekil 4.53. Kanser türevli eksozomal miR-1825 ile muamele edilen HUVEC lerde hücre canlılık seviyesi.

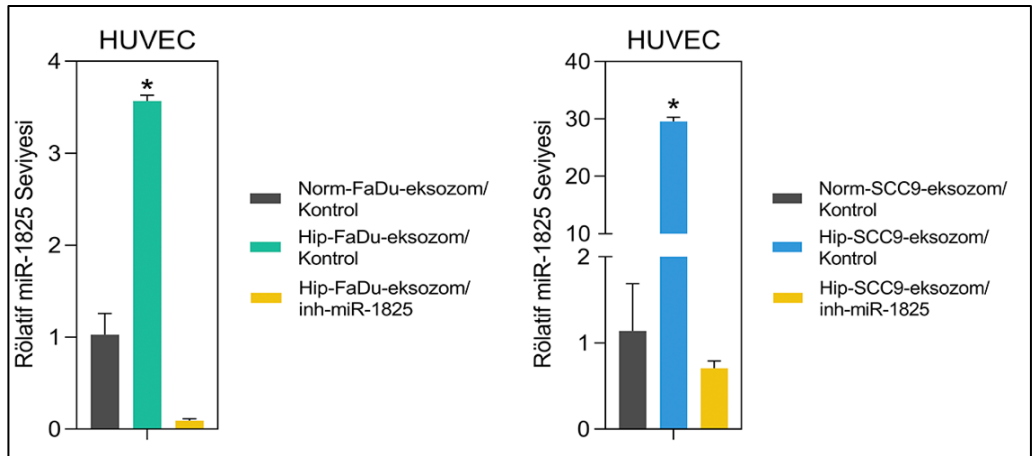
Eksozom uygulamasından sonra endojen miR-1825 seviyesindeki artış olasılığını dışlamak için kanser türevli normoksik ve hipoksik eksozomlarla muamele edilmiş HUVEC hücrelerinde miR-1825'in konakçı geni olan POFUT1'in ifade seviyesi incelendi ve POFUT1 ifadesinin normoksik veya hipoksik eksozomlar ile muamele edilen hücre grupları arasında fark olmadığı tespit ortaya konuldu (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. Kanser türevli eksozomal miR-1825 ile muamele edilen HUVEC lere POFUT1 ifade seviyesi.

Bu bulgularla normoksik ve hipoksik türevli eksozom uygulamasından sonra HUVEC’lerde miR-1825 seviyesindeki değişikliğin, transkripsiyonel aktivitedeki değişiklikten değil, ektopik miR-1825’in transferinden kaynaklandığı sonucuna varıldı.

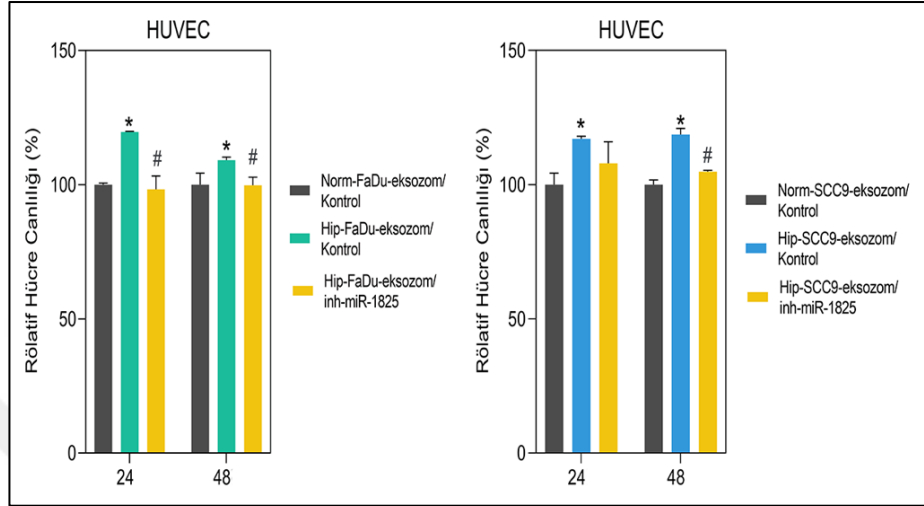
Ardından, hipoksik türevli tümör eksozomlarınca taşınan miR-1825’in etkilerinin inhibitör miR-1825 tarafından bertaraf edilip edilmediği değerlendirildi. Bu doğrultuda HUVEC hücreleri hipoksik indüklü tümör eksozomları ile muamele ve eş zamanlı olarak da inhibitör miR-1825 ile transfekte edildi. HUVEC hücrelerinde hipoksik türevli tümör eksozomlarca artırılan miR-1825 ifadesinin miR-1825 inhibitörü tarafından azaltıldığı her 2 hücre hattında da doğrulandı (Şekil 4.55).



Şekil 4.55. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC lere miR-1825 ifade seviyesi.

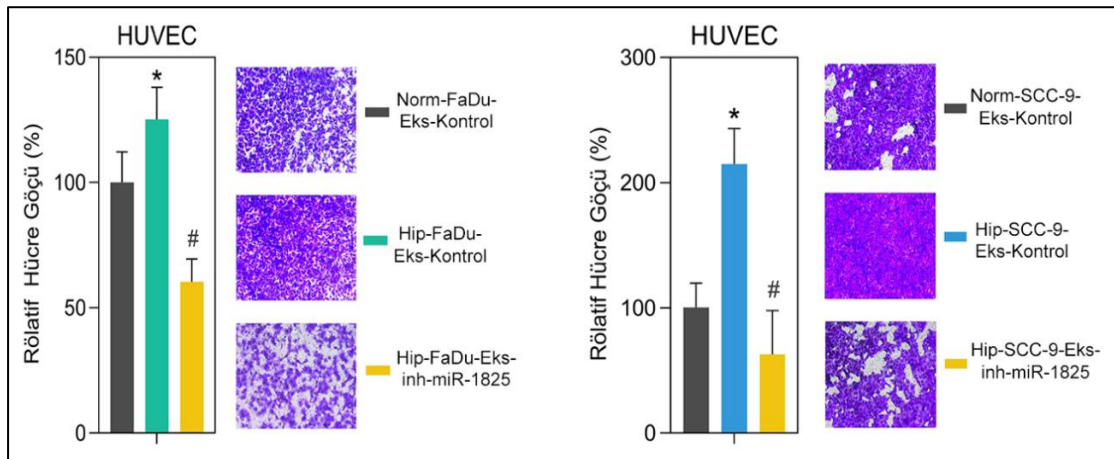
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu doğrulama sonrasında tümör türevli eksozom uygulamasına eş zamanlı olarak inhibitör miR-1825'in transfeksiyonunun endotel hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi incelendi. Hipoksik eksozom ile muamele sonrasında artan hücre canlılığının inhibitör miR-1825 transfeksiyonu geri çevrildiği gösterildi (Şekil 4.56).



Şekil 4.56. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC lerde hücre canlılık seviyesi.

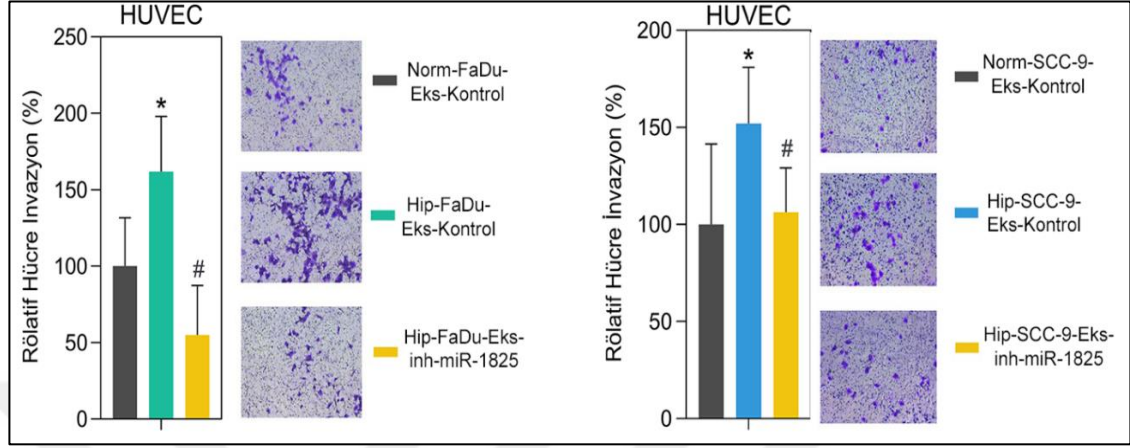
Diğer yandan, eksozom uygulamasına eş zamanlı olarak inhibitör miR-1825'in transfeksiyonunun hipoksik eksozom ile muamele sonrasında artan hücre göçü potansiyelini geri çevirdiği de ortaya konuldu (Şekil 4.57).



Şekil 4.57. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC lerde hücre göçü değişimi.

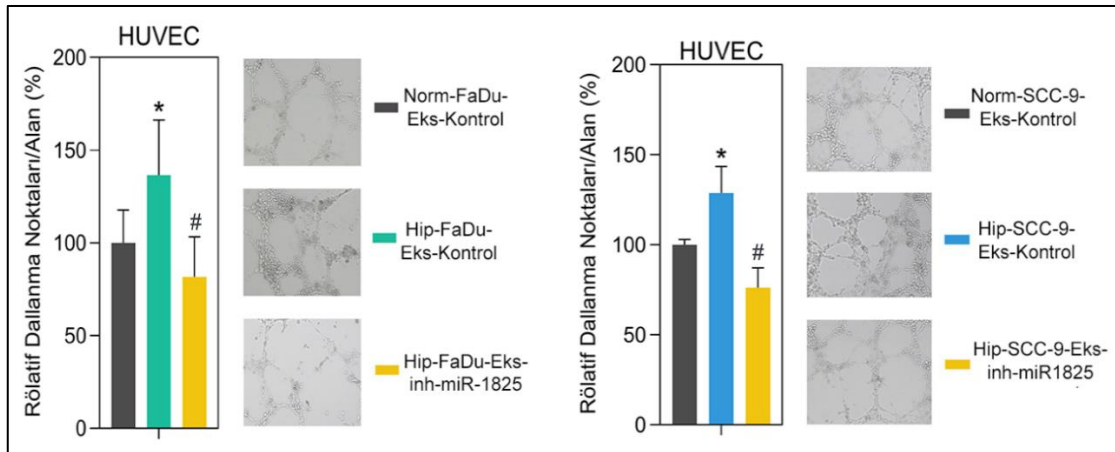
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Benzer şekilde, ekzozom uygulamasına eş zamanlı olarak inhibitör miR-1825'in transfeksiyonunun hipoksik ekzozom ile muamele sonrasında artan hücre invazyon potansiyelini geri çevirdiği de doğrulandı (Şekil 4.58).



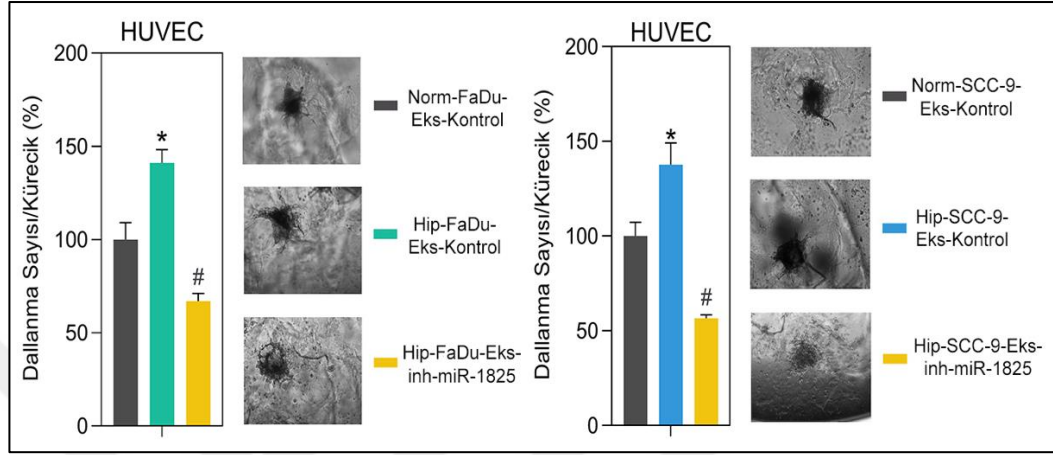
Şekil 4.58. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli ekzozomlar ile muamele edilen HUVEC lerde hücre invazyonu değişimi.

Hipoksi kaynaklı tümör ekzozomal miR-1825'in ve eş zamanlı olarak yapılan inhibitör miR-1825 transfeksiyonunun endotel hücrelerinin anjiyojenik özelliklerini etkileyip etkilemediğini belirlemek için tüp oluşumu deneyi yapıldı. HUVEC hücrelerinin hipoksik indüklü tümör ekzozomlarına maruz kalması neticesinde artan anjiyojenik potansiyellerinin miR-1825'in susturulması sonrasında kaybedildiği gösterildi (Şekil 4.59).



Şekil 4.59. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli ekzozomlar ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde tüp oluşum potansiyelinin değişimi.

Benzer şekilde, anjiyojenik potansiyeli değerlendirmek için kullanılan bir diğer yöntem olan sferoid tabanlı 3D anjiyojenez testi de hipoksik indüklü tümör eksozomlarının miR-1825 içeriğinin HUVEC hücrelerinin anjiyojenik potansiyellerinin regüle edilmesinde önemli olduğunu doğruladı (Şekil 4.60).



Şekil 4.60. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde anjiyojenez potansiyelinin değişimi.

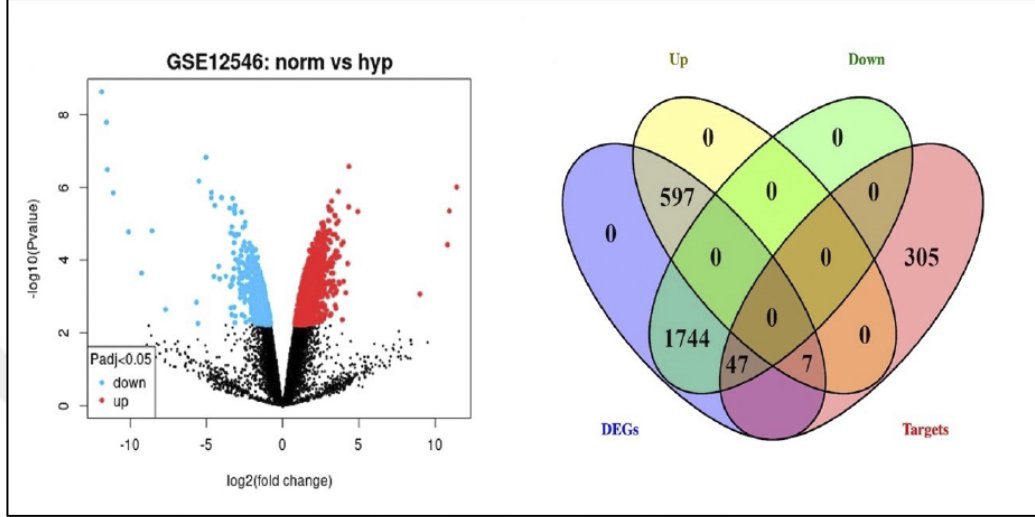
Elde ettiğimiz bu bulgular, hipoksik indüklü tümör eksozomlarının önemli bir mikroRNA taşıyıcısı olduğunu ve eksozomlarca taşınan miR-1825'in endotel hücrelerin anjiyojenik potansiyelini değiştirdiklerini göstermektedir.

4.9. Hipoksik İndüklü Tümör Eksozomları MiR-1825/TSC2/mTOR Yolağı Aracılığı ile HUVEC Hücrelerinin Anjiyojenez Potansiyelini Artırır

Hipoksik indüklü tümör eksozomlarının HUVEC hücrelerine uygulanması sonucunda anjiyojenezde meydana gelen değişimin altında yatan mekanizmayı daha fazla incelemek amacıyla, GEO veritabanında herkese açık olarak bulunan mikrodizin verileri araştırıldı ve GSE12546 veriseti kullanılarak mimik hipoksik koşullara maruz kalan HUVEC hücrelerinde farklı şekilde ifade edilen genler (DEG) incelendi. GEO2R *in siliko* araç ile yapılan analiz sonucunda hipoksik koşullar altında insan damar endotel hücrelerinde 597 genin ifadesinin arttığı ve 1791 genin ifadesinin azaldığı tespit edildi. Sonrasında bu DEG'ler arasında miR-1825'in olası hedeflerini bulmak için miRWalk 2.0, miRanda, RNA22 ve TargetScan *in siliko* araçları kullanılarak miR-1825 hedefleri

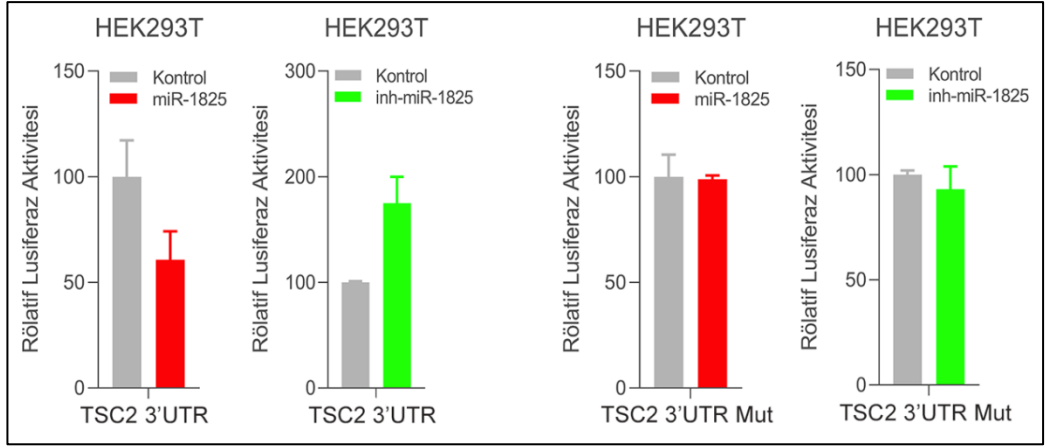
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

belirlendi. Ven diagram analizi yapılarak hem hipoksik koşullara maruz kalan HUVEC hücrelerinde ifadesi değişen hem de miR-1825'in olası hedef genleri gösterildi. Anjiyojenik süreçlerde rol alması dolayısıyla TSC2 geni en güçlü hedeflerden biri olarak belirlendi (Chen et al. 2012; Zhai et al. 2012; Gaber et al. 2021) (Şekil 4.61).



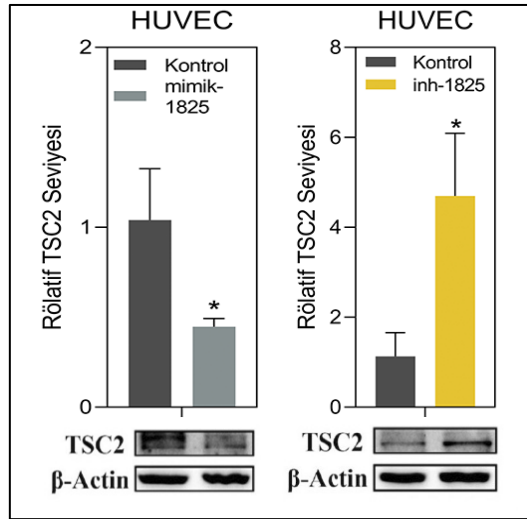
Şekil 4.61. Hipoksik koşullar altında HUVEC hücrelerinde ifade seviyesi değişen ve tahmini miR-1825 hedef genlerinin gösterimi (GSE12546).

In silico veri tabanları kullanılarak miR-1825'in hedefi olarak belirlenen TSC2'nin miR-1825'in doğrudan hedefi olduğunu doğrulamak için lusiferaz raportör testi yapıldı. Artmış miR-1825 ifadesinin TSC2 3'UTR'sini taşıyan lusiferaz geninin aktivitesini baskıladığı, azalan miR-1825 ifadesinin lusiferaz aktivitesini artırdığı gösterildi (Şekil 4.62). Ardından TSC2'nin 3'UTR'sinde tahmini miR-1825 bağlanma dizisinde QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit ile mutagenез gerçekleştirildi. Dizi analizi ile hedef bölgede oluşturulan mutagenезin başarılı şekilde gerçekleştirildiği Codoncode Aligner Software kullanılarak doğrulandıktan sonra tahmini miR-1825 bağlanma dizisi değiştirilen TSC2 3'UTR'sini taşıyan lusiferaz geninin aktivitesi üzerinde mimik miR-1825 veya inhibitör miR-1825'in etki etmediği gösterildi (Şekil 4.62). Bu veriler TSC2'nin miR-1825'in direkt bir hedefi olduğu doğruladı.



Şekil 4.62. HEK-293 hücrelerine miR-1825 ve TSC2 3'UTR plazmidinin eş zamanlı transfeksiyonu sonrası hücrelerde lusiferaz aktivite seviyesi.

TSC2'nin miR-1825'in direkt hedefi olduğu doğrulandıktan sonra, miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitör ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen HUVEC hücrelerinde TSC2 seviyesi mRNA ve protein düzeyinde incelendi ve kontrol grubuna kıyasla miR-1825'in yüksek düzeyde ifade edildiği grupta TSC2 seviyesinin anlamlı şekilde azaldığı aksine miR-1825'in inhibe edildiği grupta ise TSC2 seviyesinin anlamlı şekilde arttığı gösterildi (Şekil 4.63).

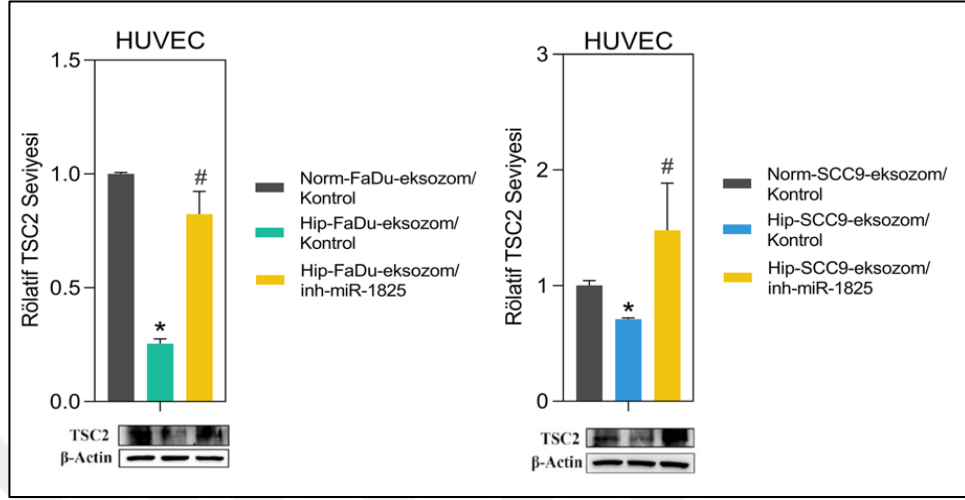


Şekil 4.63. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilen HUVEC hücrelerinde TSC2 ifade seviyesi.

Diğer yandan, HUVEC hücreleri hipoksik indüklü tümör eksozomlar ile muamele edilerek ve eş zamanlı olarak miR1825 inhibitörü ile transfekte edilerek mRNA ve protein seviyesinde TSC2 ifadesi değerlendirildi ve hipoksik indüklü eksozom ile muamele

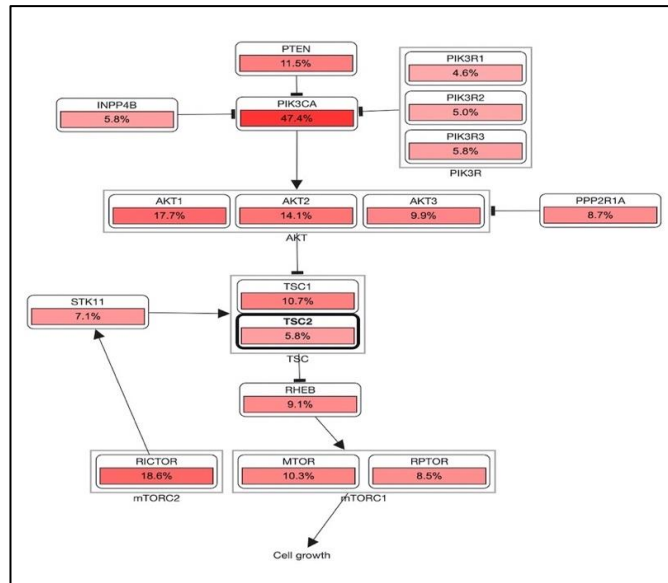
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

edilen hücrelerde TSC2 seviyesinin azaldığı, hipoksik indüklü eksozomlara ek olarak miR-1825'in inhibe edilmesinin ise TSC2 ifadesini tekrardan arttırdığı gösterildi (Şekil 4.64).



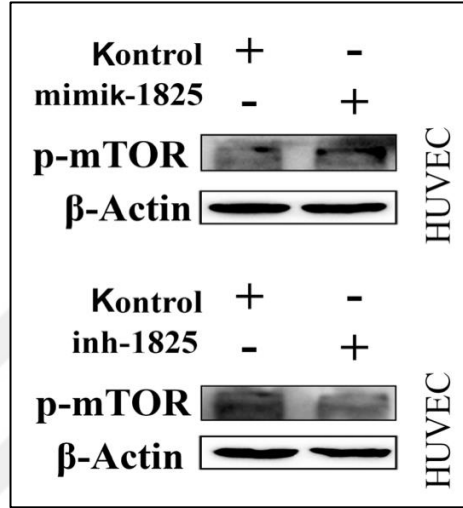
Şekil 4.64. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli eksozomlar ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde TSC2 ifade seviyesi.

MiR-1825/TSC2 aksisinin HUVEC hücrelerinde meydana getireceği moleküler etkileri daha fazla aydınlatmak amacıyla TSC2'nin ilişkili olduğu sinyal yolları cBioPortal veritabanında bulunan PathwayMapper *in siliko* aracı kullanılarak incelendi. TSC2'nin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı ile ilişkili olduğu ve TSC2'nin en önemli hedeflerinden birinin mTOR olduğu belirlendi (Şekil 4.65).



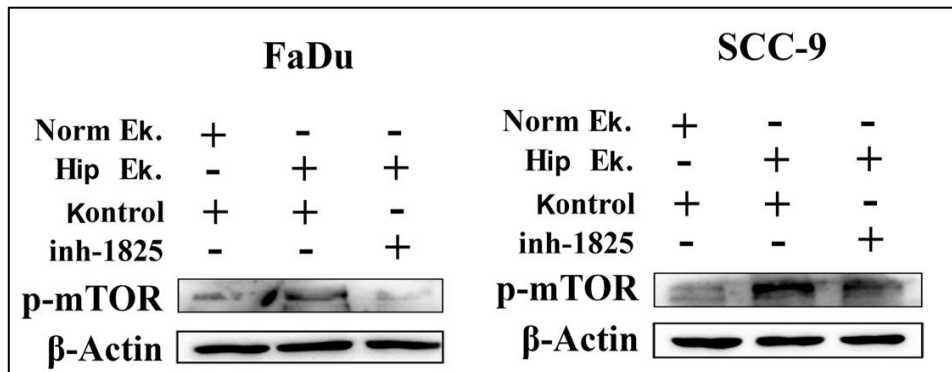
Şekil 4.65. TSC2'nin PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu içinde lokalizasyonu (TCGA)

Anjiyogenezde mTOR aktivasyonunun önemi göz önüne alındığında, başlangıçta miR-1825 mimik, miR-1825 inhibitör ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen HUVEC hücrelerinde protein düzeyinde aktif mTOR seviyeleri (p-mTOR) wetern blot ile değerlendirildi ve miR-1825'in aşırı ifade edildiği gruplarda aktif mTOR seviyesinin anlamlı olarak arttığı aksine miR-1825'in inhibe edildiği grupta ise aktif mTOR seviyesinin anlamlı olarak azaldığı gösterildi (Şekil 4.66).



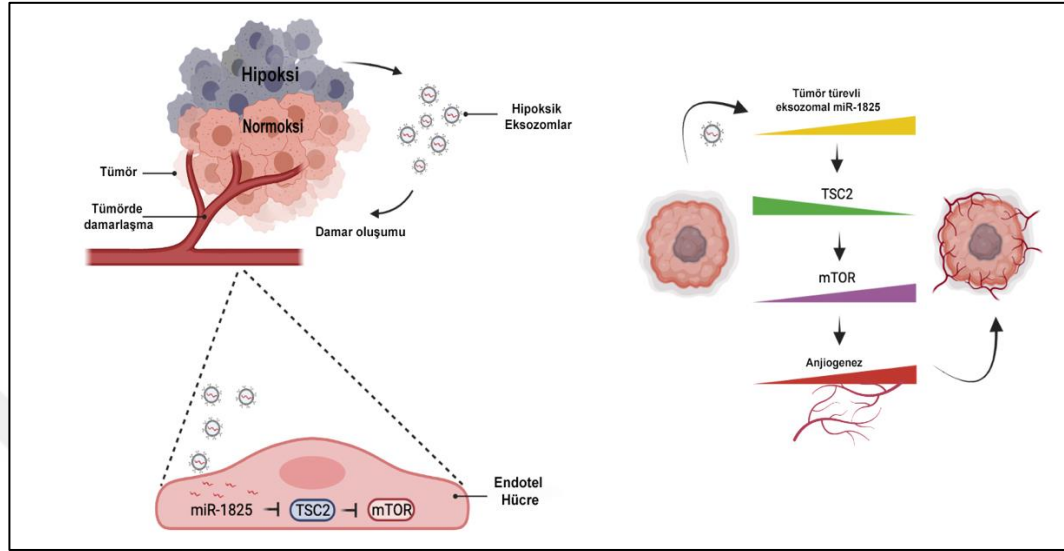
Şekil 4.66. MiR-1825 mimik ve inhibitör ile transfekte edilen HUVEC hücrelerinde mTOR ifade seviyesi.

Hipoksik indüklü kanser hücre türevli ekzozom uygulamasının beklenen şekilde mTOR aktivitesini artırdığı, ekzozomlara eş zamanlı inhibitör miR-1825 uygulamasının ise mTOR aktivasyonunu tersine çevrildiği gösterildi (Şekil 4.67).



Şekil 4.67. MiR-1825 inhibitör transfeksiyonuna eş zamanlı olarak tümör türevli ekzozomlar ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde mTOR ifade seviyesi.

Elde ettiğimiz bu bulgular, hipoksik indüklü tümör eksozomlarının taşıdığı miR-1825'in HUVEC hücrelerine aktarılabildiğini ve bunun da TSC2/mTOR sinyal yolağını deregüle ederek anjiyogenezi teşvik ettiğini göstermektedir (Şekil 4.68).



Şekil 4.68. Tümör kaynaklı eksozomal miR-1825'in endotel hücreleri ile etkileşiminin ve tümör anjiyogenezi ile bağlantılı olarak miR-1825/TSC2/mTOR yolunun şematik gösterimi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Baş ve boyun kanseri, yılda yaklaşık 600.000 yeni vaka ile dünya çapında görülen en yaygın altıncı kanserdir ve bu tümörlerin %90'ı mukozal baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlardır (BBSHK) (Leemans et al. 2018; Moskovitz et al. 2018; Alsahafi et al. 2019; Johnson et al. 2020). BBSHK'da son derece yaygın görülen lenf nodu metastazı ve lokal nüks, yüksek ölüm ve düşük sağ kalımın (%40-50) oranının temel sebebi olarak belirlenmiştir ve bu etmenler erken tanıdaki başarısızlık ile birlikte hastaların tedavi sürecinin zorlaşmasına ve yaşam kalitesinin olumsuz yönde etkilenmesine sebep olmuştur (Magnes et al. 2021; Wang et al. 2021).

BBSHK'nın nedenleri hakkında yeterli bilgiye sahip olsak da hastalığın teşhis ve tedavisi halen istenilen ölçüde bir başarıyla gerçekleştirilememektedir. Özellikle larenks ve farenks gibi BBSHK'larının teşhis edilmesindeki zorlu süreçler, hastalığı erken teşhis eden yeni yöntemlerin geliştirilmesiyle giderilmeye çalışılmaktadır. Bu bağlamda, BBSHK için erken teşhis ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve BBSHK moleküler patogenezinin aydınlatılması önemli birer hedef olarak görülmektedir. Günümüzde BBSHK üzerine yapılan birçok çalışmada daha etkili tedavilere yönelik bir kısım erken tanı biyo belirteçlerinin tanımlanması ile yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu doğrultuda BBSHK oluşumunda mikroRNA'ların rol aldığını gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Klinik örneklerde ve BBSHK hücre hatlarında mikroRNA'ların anormal ifade değişimleri ortaya çıkarılmıştır. Bu değişimlerin BBSHK patogenezinde önemli rollere sahip olduğu ileri sürülmektedir. Dolayısıyla BBSHK oluşumunun anlaşılmasında mikroRNA'ların rollerinin aydınlatılması önemli bir adımdır.

MikroRNA'lar, genom üzerinde intragenik ve intergenik bölgelerden transkribe olmasına rağmen proteine translasyonu gerçekleşmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir. MikroRNA'ların ilk keşfedildikleri günden itibaren normal ve kanserli hücre ya da dokudaki rollerini anlamak için araştırmalar yapılmış ve bunun neticesinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda mikroRNA'ların hematopoez, farklılaşma, çoğalma, hücre göçü, anjiyojenez, hücre siklusu ve apoptoz (programlı hücre ölümü) gibi çok önemli hücreyel olaylarda kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir (Calin et al. 2002; Lee and Dutta 2009; Leva et al. 2014). MikroRNA'lar kanserin erken tanı, tedavi ve prognozunun belirlenmesinde özellikle kanserli dokulardaki ifadelerinin, ifade paternindeki değişikliklerin ve hedefledikleri mRNA'ların ortaya çıkarılması ile ilgili önemli fırsatlar sunacaktır (Kabzinski et al. 2021; Uzuner et al. 2022).

MiR-1825, POFUT1 (Protein O-Fukosiltransferaz 1) geninin 7. ekzonunda yer alan insan embriyonik kök hücrelerinde ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerde rekürren fonksiyon kazanımı görülen 20q11.21 kromozomal bölgesinde bulunan onkogenik bir mikroRNA'dır (Martins-Taylor et al. 2011). 20q11.21 kromozomal bölgesinde meydana gelen amplifikasyonunun insan embriyonik kök hücrelerinin, koloni oluşturabilme potansiyelini arttırdığı ve hücre apoptozunu azalttığı gösterilmiştir (Nguyen et al. 2014). İlginç bir şekilde, 20q11.21 amplifikasyonu, insan embriyonik kök hücrelerinde kanserle ilintili çok sayıda genin zenginleşmesine neden olmuştur (Werbowski-Ogilvie et al. 2009; Karatas et al. 2016). Ayrıca, CD133+ ve CD133- LSHK örneklerinin mikroRNA profil karşılaştırması yapılmış, miR-1825'in CD133+ larenks kanseri kök hücrelerinde önemli ölçüde artan ifadeye sahip olduğu gösterilmiştir (Karatas et al. 2016).

MiR-1825'in, kök hücrelerle ilişkili özelliklerin kazanılması ve sürdürülmesinde olduğu kadar tümör gelişimi, progresyonu ve metastazında da rol aldığı öne sürülmüştür (Khan et al. 2019). MiR-1825'in prostat kanseri dokularında ifadesinin arttığı ve prostat kanseri için bir biyobelirteç olarak işlev görebileceği gösterilmiştir (Guo et al. 2018). İlginç bir şekilde bazı glioblastoma hücrelerinde (U138, Inz308) miR-1825 ifade seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmesine rağmen bazı glioblastoma hücrelerinde (U251, U373) ve glioblastoma hasta serumlarında ifade seviyesinin düşük olduğu rapor edilmiştir (Xing and Zeng 2017; Xi et al. 2021). Hepatosellüler karsinomlu hastaların serumlarında ise miRNome profillemesi çalışması yapılmıştır. Tanımlanan 274 mikroRNA arasından miR-1825'in normal serum örneklerine kıyasla ifade seviyesinin anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Pascut et al. 2019).

Bu bulguların yanı sıra servikal, akciğer ve pankreas gibi çeşitli karsinomlarda miR-1825 ifade seviyesinin önemli derecede arttığı rapor edilmiştir (Li et al. 2013; Kang et al. 2022; Kwon et al. 2022; Hassan et al. 2023).

Şu ana kadar yapılan çalışmalarla binlerce mikroRNA, bu mikroRNA'ların tümör mikroçevre ile ilişkisi ve yüzlerce hedeflerinin bulunması, hücre gelişimi, farklılaşması, anjiyojenezi, proliferasyonu ve apoptozis yollarında düzenleyici roller üstlendikleri tespit edilmiştir. Son zamanlarda BBSHK oluşumunda, tümör mikroçevre ve mikroçevredeki eksozomların taşıdıkları kargo içeriklerinin (onkojenik sinyal proteinleri, ligandlar, enzimler, mRNA ve mikroRNA) rol aldığı ortaya çıkarılmıştır. Eksozomal kargo biyomoleküllerinden mikroRNA'lar, türler arasında yüksek düzeyde korunmaları ve gen ifadesindeki düzenleyici rolleri nedeniyle oldukça dikkat çekicidir.

Eksozomal mikroRNA'ların keşfi ile mikroRNA'ların doğrudan eksozomlar yoluyla hedef hücrelere iletilerek mRNA hedeflerinin fonksiyonel modülasyonu ile sonuçlanabildiği gösterilmiştir. Eksozomal mikroRNA'ların, bir kısım sinyal yollarını aktive ederek anjiyojenez, metastaz, epitel hücrelerin malignata transformasyonu ve ilaç direnci gibi önemli rollere sahip olduğu, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Meng et al. 2019). Eksozomların kargo içeriklerinin (özellikle mRNA ve mikroRNA içeriği) hastalıkların tanısında önemli bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Eksozomlar, salgılandıkları hücrelerin membran ve sitoplazmik özelliklerini karakteristik olarak taşırlar. Eksozomların vücuttaki bütün sıvılardan elde edilebilir olması, birçok hastalık için tanı aşamasını kolaylaştırıcı, belirteç eksenli çalışmaların yapılmasına olanak sağlamıştır (Kalluri and LeBleu 2020).

Hipoksik koşullarda eksozomal kargo içerikleri önemli ölçüde değişir ve hipoksik eksozomlar, yüzeylerinde veya vezikül içinde taşıdıkları onkojenik sinyal proteinleri, ligandlar, enzimler ve mikroRNA'lar yoluyla tümör progresyonuna, anjiyojenezine ve metastazına olanak sağlamaktadırlar. Eksozomal mikroRNA'ların meme kanseri ve kolorektal kanser dahil birçok hipoksik tümörlerde potansiyel biyobelirteç olduğu ileri sürülmüştür (Qu et al. 2014; Jung et al. 2017; Wang et al. 2017).

Yumurtalık kanserinde HIF'lerin, miR-21-3p, miR-125b-5p ve miR-181d-5p dahil olmak üzere çeşitli onkogenik mikroRNA'larca zenginleştirilmiş eksozomların salınımını indüklediği gösterilmiştir (Ramteke et al. 2015; Kulkarni et al. 2019; Kumar and Deep 2020).

Ağız skuamöz hücreli karsinomda eksozomal miRNA-210-3p'nin tümör anjiyojenezi, progresyonu ve tümör evresini artırdığı tespit edilmiştir (Paskeh et al. 2022). Ancak özellikle BBSHK'da hipoksik indüklü eksozomal mikroRNA'ların tümör anjiyojenezine etkisini gösteren fonksiyonel çalışmalar yapılmamıştır. Son yıllarda BBSHK'nin tanı ve tedavisinde önemli gelişmeler olmasına rağmen hala kanser nedenli ölümlerin dikkate değer sebeplerinden biridir ve ileri BBSHK vakalarına karşı yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve ilgili onkogenlerin karakterize edilmesi acil bir gerekliliktir.

Tüm bu bilgiler kapsamında, bu tez çalışmasında miR-1825'in BBSHK patogenezindeki rollerinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılması, olası yeni hedef genlerinin belirlenmesi ve BBSHK hücrelerinden türetilen eksozomal miR-1825'in hipoksik koşullar altında anjiyojenez oluşumu üzerine etkilerinin fonksiyonel *in vitro* ve *in vivo* testlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda yapılan *in siliko* çalışmalarla miR-1825'in farklı kanser türlerinde yüksek ifadeye sahip, kötü prognoz ve düşük sağ kalım ile ilişkili olduğu bulunmuş ve miR-1825'in onkogenik potansiyele sahip olduğu ortaya konulmuştur. Sonrasında, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen BBSHK hastalarına ait tümör doku örneklerinde miR-1825'in ifade düzeyinin normal baş ve boyun doku örneklerine göre yüksek olduğu teyit edilerek miR-1825'in özellikle baş ve boyun karsinogenez sürecine katkı sağladığına dair önemli ön bulgular elde edilmiş ve bu bulgular bu tez çalışması için önemli bir çıkış noktası olmuştur.

Bulgularımızda, BBSHK hücrelerinde miR-1825 deregülasyonunun hücre canlılığı, göçü, invazyonu, apaptozisi gibi kanser ilişkili fenotipler ile hücrelerin kök hücre potansiyelleri üzerine etkileri bir kısım *in vitro* testlerle incelenerek ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca ektopik miR-1825 aşırı ifadesinin BBSHK hücrelerinin tümör

oluşturma kapasitesini artırıcı yönde etki ettiği *in vivo* NUDE fare modelinde gösterilmiştir.

MiR-1825'in ifadesinin ektopik olarak arttırıldığı veya azaltıldığı BBSHK hücrelerinde miR-1825'in potansiyel hedeflerini belirlemek için gen mikroarray analizi yapılmış ve ifadesi anlamlı olarak değişen olası aday hedef genler tespit edilmiştir. Ardından gen mikroarray analizi sonucu belirlenen bu öncelikli aday genler için literatür taraması yapılarak biyoinformatik veri tabanlarıyla BBSHK'da tümör baskılayıcı potansiyeli olan en güçlü aday gen FREM1 olarak belirlenmiştir.

Tarafımızdan yapılan *in siliko* analizlerin yanısıra BBSHK hücrelerinde ve klinik örneklerde yapılan bir kısım analizlerle FREM1'in ifade seviyesi endojen olarak incelenmiş kanser hücrelerinde ve tümör dokularında FREM1 ifadesinin azalmasına paralel olarak tümör baskılayıcı potansiyele sahip önemli bir hedef gen olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, miR-1825'in BBSHK hücrelerinde ekzojen ifadesine bağlı olarak FREM1 ifadesinin de değişiklik gösterdiği mRNA ve protein düzeyinde gösterilmiştir. Bulgularımızda BBSHK hücrelerinde miR-1825'in olası hedefinin FREM1 olduğu lusiferaz testi yapılarak teyit edilmiştir.

MiR-1825'in BBSHK oluşumunda mikroçevre üzerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla hipoksik koşullara maruz kalan BBSHK hücrelerinde ve bu koşullarda salınan eksozomlarda miR-1825 seviyesinin arttığı, hipoksik koşullarda salınımı artan eksozomların ve bu eksozomlarca taşınan miR-1825'in HUVEC hücrelerinin anjiyojenik potansiyelini artırdığı bir kısım *in siliko* analizlerle ve *in vitro* çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Bu bulgular kanser hücrelerinin hipoksik koşullara maruz kaldıklarında hipoksik stresten kaçmak için hücre dışı ortamını yeniden düzenleyerek miR-1825 aracılığı ile anjiyojenezin indüklenmesinde potansiyel bir role sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Dolayısıyla hipoksik indüklü tümör eksozomlarının önemli bir mikroRNA taşıyıcısı olduğunu ve eksozomlarca taşınan miR-1825'in endotel hücrelerin anjiyojenik potansiyelini artırdığını göstermiştir.

Elde ettiğimiz bütün bulgularla, BBSHK gelişiminde miR-1825/FREM1 aksisinin önemli bir aracı olarak rol aldığı ve BBSHK oluşumuna bağlı olarak meydana gelebilecek

hipoksik koşulların eksozomal miR-1825'in TSC2/mTOR aksisini hedefleyerek anjiyojenez oluşumunu uyardığı ortaya çıkarılmıştır.

Yaptığımız bu tez çalışması sonucunda tespit edilen agresif BBSHK oluşumundan sorumlu olan mikroRNA ve hedef genlerin mevcut verilere daha net bir kanıt oluşturması için BBSHK sürecindeki rolleri ve moleküler mekanizmaları daha fonksiyonel *in vitro* ve *in vivo* tekniklerle aydınlatılmalıdır. Ayrıca, bulgularımız BBSHK hastalarının başarılı klinik sonuçlara sahip olması için yeni ve etkili tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin acil ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır. Son olarak, bu çalışmadan elde edilen veriler BBSHK progresyonunda, gerek hücre içerisinde bulunan olgun miR-1825 gerekse de mikroçevrede mevcut olan eksozomal miR-1825'in önemli role sahip olduğunu göstermiş ve bu rolün daha detaylı olarak anlaşılması için başka projelere öncülük edecek sonuçlara ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Alesi, N., Akl, E. W., Khabibullin, D., Liu, H. J., Nidhiry, A. S., Garner, E. R., Filippakis, H., Lam, H. C., Shi, W., Viswanathan, S.R. and Morroni, M. 2021. Tsc2 regulates lysosome biogenesis via a non-canonical ragc and tfeb-dependent mechanism. *Nature Communications*, 12(1), 1-12.
- Alsaifi, E., Begg, K., Amelio, I., Raulf, N., Lucarelli, P., Sauter, T. and Tavassoli M. 2019. Clinical update on head and neck cancer: Molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Diseases*, 10(8), 1-17.
- Anonymous, 2018. Web Sites: <http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power>, Erişim Tarihi: 08.05.2018.
- Anonymous, 2020. Web Sites: <https://gco.iarc.fr/>, Erişim Tarihi: 01.02.2020.
- Anonymous, 2023. Web Sites: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/index?sitearea>, Erişim Tarihi: 22.05.1971.
- Ansarin, M., Bruschini, R., Navach, V., Giugliano, G., Calabrese, L., Chiesa, F., Medina, J. E., Kowalski, L. P. and Shah, J. P. 2019. Classification of glossectomies: Proposal for tongue cancer resections. *Head and Neck*, 41(3), 821-827.
- Arnedos, M., Vielh, P., Soria, J. C. and Andre, F. 2014. The genetic complexity of common cancers and the promise of personalized medicine: Is there any hope?. *Journal of Pathology*, 232(2), 274-282.
- Barlak, N., Capik, O., Sanli, F. and Karatas, O. F. 2020. The roles of micrnas in the stemness of oral cancer cells. *Oral Oncology*, 109(1), 1-12.
- Best, D. L., Spresser, W., Shivers, P., Edwards, S. P. and Ward, B. B. 2021. Squamous cell carcinoma of the tongue in young patients: A case series and literature review. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, 79(6), 1270-1286.
- Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C. and Leslie, C. 2010. Comprehensive modeling of microrna targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biology*, 11(9), 1-14.
- Bhaskaran, M. and Mohan, M. 2014. Micrnas: History, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary Pathology*, 51(4), 759-774.
- Biau, J., Pointreau, Y., Blanchard, P., Khampan, C., Giraud, P., Lapeyre, M. and Maingon, P. 2022. Radiotherapy for laryngeal cancers. *Cancer Radiotherapy*, 26(1-2), 206-212.
- Borges, F. T., Reis, L. A. and Schor, N. 2013. Extracellular vesicles: Structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, 46(2), 824-830.

- Burtneß, B. and Contessa, J. 2021. Hypoxia-guided therapy for human papillomavirus-associated oropharynx cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 113(6), 652-653.
- Bzhalava, Z., Arroyo Mühr, L. S. and Dillner, J. 2020. Transcription of human papillomavirus oncogenes in head and neck squamous cell carcinomas. *Vaccine*, 38(25), 4066-4070.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K. and Rassenti, L. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro-rna genes mir15 and mir16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceeding of National Academy of Science*, 99(24), 15524-15529.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C.M. 2004. Human microrna genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceeding of National Academy of Science*, 101(9), 2999-3004.
- Calvo, V. and Izquierdo, M. 2022. T Lymphocyte and CAR-T cell-derived extracellular vesicles and their applications in cancer therapy. *Cells*, 11(5), 1-27.
- Camussi, G., Deregibus, M. C., Bruno, S., Cantaluppi, V. and Biancone, L. 2010. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International*, 78(9), 838-848.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E. and Antipin, Y. 2012. The cbio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, 2(5), 401-404.
- Chandrashekar, D. S., Bashel, B., Balasubramanya, S. A. H., Creighton, C. J., Ponce-Rodriguez, I., Chakravarthi, B. V. and Varambally, S. 2017. Ualcan: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia*, 19(8), 649-658.
- Chang, L., Wang, D., Kan, S., Hao, M., Liu, H., Yang, Z., Xia, Q. and Liu, W. 2022. Ginsenoside rd inhibits migration and invasion of tongue cancer cells through h19/mir-675-5p/cdh1 axis. *Journal of Applied Oral Science*, 30(2), 1-12.
- Chen, W., Ma, T., Shen, X. N., Xia, X. F., Xu, G. D., Bai, X. L. and Liang, T. B. 2012. Macrophage-induced tumor angiogenesis is regulated by the tsc2-mtor pathway. *Cancer Research*, 72(6), 1363-1372.
- Chen, Y. P., Chan, A. T. C., Le, Q. T., Blanchard, P., Sun, Y. and Ma, J. 2019. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*, 394(100192), 64-80.
- Committee, A. C. P. R. S. 2022. Cancer in 2022. *Cancer Discovery*, 12(8), 2733-2738.

- Cordonnier, M., Chanteloup, G., Isambert, N., Seigneuric, R., Fumoleau, P., Garrido, C. and Gobbo, J. 2017. Exosomes in cancer theranostic: Diamonds in the rough. *Cell Adhesion and Migration*, 11(2), 151-163.
- Cui, Z., Liu, Q. L., Sun, S. Q., Jiao, K., Liu, D. R., Zhou, X. C. and Huang, L. 2020. Mir-378a-5p inhibits angiogenesis of oral squamous cell carcinoma by targeting klk4. *Neoplasma*, 67(1), 85-92.
- De Berardinis, R., Tagliabue, M., Belloni, P., Gandini, S., Scaglione, D., Maffini, F., Margherini, S., Riccio, S., Giugliano, G., Bruschini, R. and Chu, F. 2022. Tongue cancer treatment and oncological outcomes: The role of glossectomy classification. *Surgery Oncology*, 42(1), 1-7.
- Di Leva, G., Garofalo, M. and Croce, C. M. 2014. Micrnas in cancer. *Annual Review of Pathology*, 9(24), 287-314.
- Doyle, L. M and Wang, M. Z. 2019. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 8(7), 727-728.
- Duarte, S., Loubat, A., Momier, D., Topi, M., Faneca, H., Pedroso de Lima, M. C., Carle, G. F. and Pierrefite-Carle, V. 2012. Isolation of head and neck squamous carcinoma cancer stem-like cells in a syngeneic mouse model and analysis of hypoxia effect. *Oncology Reports*, 28(3), 1057-1062.
- Echanique, K. A., Evans, L. K., Han, A. Y., Chhetri, D. K. and St John, M. A. 2021. Cancer of the larynx and hypopharynx. *Hematology Oncology Clinics of North America*, 35(5), 933-947.
- Esquela-Kerscher, A. and Slack, F. J. 2006. Oncomirs - micrnas with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4), 259-269.
- Fabbri, M., Croce, C. M. and Calin, G. A. 2008. Micrnas. *Cancer Journal*, 14(2), 1-6.
- Gaber, G., El Achy, S., Khedr, G. A., Parimi, V., Helenowski, I., Donnelly, E. D., Strauss, J. B., Woloschak, G., Wei, J. J., Small, W. and Refaat, T. 2021. Impact of p53, hif1a, ki-67, ca-9, and glut1 expression on treatment outcomes in locally advanced cervical cancer patients treated with definitive chemoradiation therapy. *American Journal of Clinical Oncology*, 44(2), 58-67.
- Garneau, J. C., Bakst, R. L. and Miles, B. A. 2018. Hypopharyngeal cancer: A state of the art review. *Oral Oncology*, 86(1), 244-250.
- Ghossoub, R., Chéry, M., Audebert, S., Leblanc, R., Egea-Jimenez, A. L., Lembo, F., Mammari, S., Le Dez, F., Camoin, L., Borg, J. P. and Rubinstein, E. 2020. Tetraspanin-6 negatively regulates exosome production. *Proceeding of the National Academy Sciences*, 117(11), 5913-5922.
- Griffiths-Jones, S. 2010. Mirbase: MicroRNA sequences and annotation. *Current Protocols Bioinformatics*, 29(1), 2-9.

- Guo, X., Han, T., Hu, P., Zhu, C., Wang, Y. and Chang, S. 2018. Five micrnas in serum as potential biomarkers for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention. *International Urology and Nephrology*, 50(12), 2193-2200.
- Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L. and Baruteau, J. 2021. The exosome journey: From biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication Signal*, 19(1), 1-9.
- Han, J. and Sumer, B. D. 2021. The changing demographics and treatment of larynx cancer. *Annals Surgical Oncology*, 28(12), 6927-6928.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5) 646-674.
- Hara, J. H. L. and Juloori, A. 2022. Node out, about it? Consideration of adjuvant treatment of oral tongue cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 112(15), 849-861.
- Hassan, M., Nasr, S. M., Amin, N. A., El-Ahwany, E., Zoheiry, M. and Elzallat, M. 2023. Circulating liver cancer stem cells and their stemness-associated micrnas as diagnostic and prognostic biomarkers for viral hepatitis-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Noncoding RNA Research*, 8(2), 155-163.
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J. and Emr, S. D. 2011. The escrt pathway. *Developmental Cell*, 21(1), 77-91.
- Hessvik, N. P. and Llorente, A. 2018. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(1), 193-208.
- Hoffman, H. T., Porter, K., Karnell, L. H., Cooper, J. S., Weber, R. S., Langer, C. J., Ang, K. K., Gay, G., Stewart, A. and Robinson, R. A. 2006. Laryngeal cancer in the united states: Changes in demographics, patterns of care, and survival. *Laryngoscope*, 116(111), 1-13.
- Huang, Q., Li, F., Hu, H., Fang, Z., Gao, Z., Xia, G., Ng, W. L., Khodadadi-Jamayran, A., Chen, T., Deng, J. and Zhang, H. 2022. Loss of TSC1/TSC2 sensitizes immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Science Advances*, 8(5), 1-10.
- Huynh, E., Boyle, S., Campbell, J., Penney, J., Mak, R. H., Schoenfeld, J. D., Leeman, J. E. and Williams, C. L. 2022. Technical note: Toward implementation of mr-guided radiation therapy for laryngeal cancer with healthy volunteer imaging and a custom mr-ct larynx phantom. *Medical Physics*, 49(3), 1814-1821.
- Iorio, M. V. and Croce, C. M. 2012. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine*, 4(3), 143-159.
- Janaszak-Jasiecka, A., Bartoszezwska, S., Kochan, K., Piotrowski, A., Kalinowski, L., Kamysz, Ochocka, R. J., Bartoszezowski, R. and Collawn, J. F. 2016. MiR-429 regulates the transition between hypoxia-inducible factor (hif)1a and hif3a expression in human endothelial cells. *Science Reports*, 6(1), 22775.

- Jia, Y., Chen, Y., Wang, Q., Jayasinghe, U., Luo, X., Wei, Q., Wang, J., Xiong, H., Chen, C., Xu, B. and Hu, W. 2017. Exosome: Emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget*, 8(25), 41717-41733.
- Jiang, C. and Jiang, W. 2022. Integrated bioinformatics identifies. *Applied Bionics and Biomechanics*, 2022(11), 1-10.
- Johnson, D. E., Burtness, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E. and Grandis, J. R. 2020. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 1-50.
- Jung, K. O., Youn, H., Lee, C. H., Kang, K. W. and Chung, J. K. 2017. Visualization of exosome-mediated mir-210 transfer from hypoxic tumor cells. *Oncotarget*, 8(6), 9899-9910.
- Jung, M. K. and Mun, J. Y. 2018. Sample preparation and imaging of exosomes by transmission electron microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, 131(4), 1-5
- Kabzinski, J., Maczynska, M. and Majsterek, I. 2021. MicroRNA as a novel biomarker in the diagnosis of head and neck cancer. *Biomolecules*, 11(6), 844-865.
- Kahlert, C. and Kalluri, R. 2013. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*, 91(2), 431-437.
- Kalinowski, F. C., Brown, R. A., Ganda, C., Giles, K. M., Epis, M. R., Horsham, J. and Leedman, P. J. 2014. MicroRNA-7: A tumor suppressor mirna with therapeutic potential. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 54(1), 312-317.
- Kalluri, R. and LeBleu, V. S. 2020. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478), 1-40.
- Kang, Y., Gan, Y., Jiang, Y., You, J., Huang, C., Chen, Q., Xu, X., Chen, F. and Chen, L. 2022. Cancer-testis antigen kk-1c-1 is a potential biomarker associated with immune cell infiltration in lung adenocarcinoma. *BMC Cancer*, 22(11), 1-11.
- Kang, Y., He, W., Ren, C., Qiao, J., Guo, Q., Hu, J., Xu, H., Jiang, X. and Wang, L. 2020. Advances in targeted therapy mainly based on signal pathways for nasopharyngeal carcinoma. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 245-251.
- Karatas, O. F., Suer, I., Yuceturk, B., Yilmaz, M., Hajiyev, Y., Creighton, C. J., Ittman, M. and Ozen, M. 2016a. The role of mir-145 in stem cell characteristics of human laryngeal squamous cell carcinoma hep-2 cells. *Tumor Biology*, 37(2), 4183-4192.
- Karatas, O. F., Suer, I., Yuceturk, B., Yilmaz, M., Oz, B., Guven, G., Cansiz, H., Creighton, C. J., Ittmann, M. and Ozen, M. 2016b. Identification of microRNA profile specific to cancer stem-like cells directly isolated from human larynx cancer specimens. *BMC Cancer*, 16(1), 1-11.

- Khan, A. Q., Ahmed, E. I., Elareer, N. R., Junejo, K., Steinhoff, M. and Uddin, S. 2019. Role of mirna-regulated cancer stem cells in the pathogenesis of human malignancies. *Cells*, 8(8), 840-849.
- Korff, T. and Augustin, H. G. 1998. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *Journal Cell Biology*, 143(5), 1341-1352.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Danielidis, V. and Sivridis, E. 2008. Hypoxia inducible factor (hif1alpha and hif2alpha) and carbonic anhydrase 9 (ca9) expression and response of head-neck cancer to hypofractionated and accelerated radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology*, 84(1), 47-52.
- Kretschmer, M., Rüdiger, D. and Zahler, S. 2021. Mechanical aspects of angiogenesis. *Cancers (Basel)*, 13(19), 4987-4995.
- Kristensen, L. S., Andersen, M. S., Stagsted, L. V. W., Ebbesen, K. K., Hansen, T. B. and Kjems, J. 2019. The biogenesis, biology and characterization of circular rnas. *Nature Reviews Genetics*, 20(11), 675-691.
- Kulkarni, B., Kirave, P., Gondaliya, P., Jash, K., Jain, A., Tekade, R. K. and Kalia, K. 2019. Exosomal mirna in chemoresistance, immune evasion, metastasis and progression of cancer. *Drug Discover Today*, 24(10), 2058-2067.
- Kumar, A. and Deep, G. 2020. Hypoxia in tumor microenvironment regulates exosome biogenesis: Molecular mechanisms and translational opportunities. *Cancer Letters*, 479(1), 23-30.
- Kwon, A. Y., Jeong, J. Y., Park, H., Hwang, S., Kim, G., Kang, H., Heo, J. H., Lee, H. J., Kim, T. H. and An, H. J. 2022. MiR-22-3p and mir-30e-5p are associated with prognosis in cervical squamous cell carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 1-14.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed rnas. *Science*, 294(5543), 853-858.
- Lam, W. K. J. and Chan, J. Y. K. 2018. Recent advances in the management of nasopharyngeal carcinoma. *F1000Research*, 1829(7), 1-6.
- Lai, J.J., Chau, Z.L., Chen, S.Y., Hill, J.J., Korpany, K.V., Liang, N.W., Lin, L.H., Lin, Y.H., Liu, J.K., Liu, Y.C. and Lunde, R. 2022. Exosome processing and characterization approaches for research and technology development. *Advanced Science*, 9(15), 1-29.
- Larios, J., Mercier, V., Roux, A. and Gruenberg, J. 2020. Alix- and escrt-iii-dependent sorting of tetraspanins to exosomes. *Journal Cell Biology*, 219(3).
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. 1993. The c. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small rnas with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5), 843-854.

- Lee, Y. S. and Dutta, A. 2009. Micrnas in cancer. *Annual Review Pathology*, 4(1), 199-227.
- Leemans, C. R., Snijders, P. J. F. and Brakenhoff, R. H. 2018. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(5), 269-282.
- Lehtinen, M., Lagheden, C., Luostarinen, T., Eriksson, T., Apter, D., Bly, A., Gray, P., Harjula, K., Heikkilä, K., Hokkanen, M. and Karttunen, H. 2021. Human papillomavirus vaccine efficacy against invasive, hpv-positive cancers: Population-based follow-up of a cluster-randomised trial. *BMJ Open*, 11(12), 1-5.
- Leja, D. 2023. Darwinian Selection Does Not Influence Tumor Progression. *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 5(1), 1-2.
- Lewis, B. P., Burge, C. B. and Bartel, D. P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microrna targets. *Cell*, 120(1), 15-20.
- Li, A., Yu, J., Kim, H., Wolfgang, C. L., Canto, M. I., Hruban, R. H. and Goggins, M. 2013. Microrna array analysis finds elevated serum mir-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls. *Clinical Cancer Research*, 19(13), 3600-3610.
- Li, H. N., Li, X. R., Lv, Z. T., Cai, M. M., Wang, G. and Yang, Z. F. 2020. Elevated expression of frem1 in breast cancer indicates favorable prognosis and high-level immune infiltration status. *Cancer Medicine*, 9(24), 9554-9570.
- Li, M. X., Jin, L. T., Wang, T. J., Feng, Y. J., Pan, C. P., Zhao, D. M. and Shao, J. 2018. Identification of potential core genes in triple negative breast cancer using bioinformatics analysis. *Oncology Targets and Therapy*, 11(18), 4105-4112.
- Lin, S. C., Liao, W. L., Lee, J. C. and Tsai, S. J. 2014. Hypoxia-regulated gene network in drug resistance and cancer progression. *Experimental Biology and Medicine*, 239(7), 779-792.
- Liu, W. Z., Ma, Z. J., Li, J. R. and Kang, X. W. 2021. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: Therapeutic opportunities and challenges for spinal cord injury. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), 1-15.
- Liu, Y. and Deisseroth, A. 2006. Tumor vascular targeting therapy with viral vectors. *Blood*, 107(8), 3027-3033.
- Lu, G., Nguyen, T. V., Xia, Y. and Fromm, M. 2006. Affyminer: Mining differentially expressed genes and biological knowledge in genechip microarray data. *BMC Bioinformatics*, 7(4) 1-11.
- Luo, J., Xie, Y., Zheng, Y., Wang, C., Qi, F., Hu, J. and Xu, Y. 2020. Comprehensive insights on pivotal prognostic signature involved in clear cell renal cell carcinoma microenvironment using the estimate algorithm. *Cancer Medicine*, 9(12), 4310-4323.

- Magnes, T., Wagner, S., Kiem, D., Weiss, L., Rinnerthaler, G., Greil, R. and Melchardt, T. 2021. Prognostic and predictive factors in advanced head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 1-16.
- Majidpoor, J. and Mortezaee, K. 2021. Angiogenesis as a hallmark of solid tumors-clinical perspectives. *Cell Oncology (Dordr)*, 44(1), 715-737.
- Mannelli, G., Arcuri, F., Agostini, T., Innocenti, M., Raffaini, M. and Spinelli, G. 2018. Classification of tongue cancer resection and treatment algorithm. *Journal of Surgical Oncology*, 117(5), 1092-1099.
- Martins-Taylor, K., Nisler, B. S., Taapken, S. M., Compton, T., Crandall, L., Montgomery, K. D., Lalande, M. and Xu, R.H. 2011. Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 29(6), 488-491.
- Marur, S. and Forastiere, A. A. 2016. Head and neck squamous cell carcinoma: Update on epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceeding*, 91(3), 386-396.
- Matsuyama, H. and Suzuki, H. I. 2019. Systems and synthetic microrna biology: From biogenesis to disease pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 1-23.
- Mendenhall, W. M., Strojan, P., Beitler, J. J., Langendijk, J. A., Suarez, C., Lee, A. W., Rinaldo, A., Rodrigo, J. P., Smee, R., Eisbruch, A. and Harrison, L. B. 2019. Radiotherapy for parapharyngeal space tumors. *American Journal of Otolaryngology*, 40(2), 289-291.
- Meng, W., Hao, Y., He, C., Li, L. and Zhu, G. 2019. Exosome-orchestrated hypoxic tumor microenvironment. *Molecular Cancer*, 18(1), 1-14.
- Moskovitz, J., Moy, J. and Ferris, R. L. 2018. Immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Current Oncology Reports*, 20(1), 1-7.
- Nguyen, H. T., Geens, M., Mertzaniidou, A., Jacobs, K., Heirman, C., Breckpot, K. and Spits, C. 2014. Gain of 20q11.21 in human embryonic stem cells improves cell survival by increased expression of bcl-xl. *Molecular Human Reproduction*, 20(2), 168-177.
- Nilsson, O., Knutsson, J., Landström, F. J., Magnuson, A. and Von Beckerath, M. 2022. Ultrasound-assisted resection of oral tongue cancer. *Acta Otolaryngology*, 20(1), 1-6
- Nocini, R., Molteni, G., Mattiuzzi, C. and Lippi, G. 2020. Updates on larynx cancer epidemiology. *Chinese Journal of Cancer Research*, 32(1), 18-25.
- Näsman, A., Du, J. and Dalianis, T. 2020. A global epidemic increase of an hpv-induced tonsil and tongue base cancer potential benefit from a pan-gender use of hpv vaccine. *Journal of International Medicine*, 287(2), 134-152.

- O'carroll, D. and Schaefer, A. 2013. General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 39-54.
- Olejarz, W., Kubiak-Tomaszewska, G., Chrzanowska, A. and Lorenc, T. 2020. Exosomes in angiogenesis and anti-angiogenic therapy in cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1-25.
- Owens, D., Paleri, V. and Jones, A. V. 2022. Head and neck cancer explained: An overview of management pathways. *British Dental Journal*, 233(9), 721-725.
- Papadopoulos, G. L., Reczko, M., Simossis, V. A., Sethupathy, P. and Hatzigeorgiou, A. G. 2009. The database of experimentally supported targets: A functional update of tarbase. *Nucleic Acids Research*, 37(1), D155-158.
- Paredes, F., Williams, H. C. and San Martin, A. 2021. Metabolic adaptation in hypoxia and cancer. *Cancer Letters*, 502(1), 133-142.
- Pascut, D., Krmac, H., Gilardi, F., Patti, R., Calligaris, R., Crocè, L. S. and Tiribelli, C. 2019. A comparative characterization of the circulating mirnome in whole blood and serum of hcc patients. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.
- Paskeh, M. D. A., Entezari, M., Mirzaei, S., Zabolian, A., Saleki, H., Naghdi, M. J., Sabet, S., Khoshbakht, M. A., Hashemi, M., Hushmandi, K. and Sethi, G. 2022. Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling. *Journal of Hematology and Oncology*, 15(1), 1-39.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degan, B., Müller, P. and Spring, J. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory rna. *Nature*, 408(6808), 86-89.
- Petkar, I., Bhide, S., Newbold, K., Harrington, K. and Nutting, C. 2017. Dysphagia-optimised intensity-modulated radiotherapy techniques in pharyngeal cancers: Is anyone going to swallow it?. *Clinical Oncology*, 29(7), 1-9.
- Pointreau, Y., Biau, J., Delaby, N., Thariat, J. and Lapeyre, M. 2022. Radiotherapy for hypopharynx cancers. *Cancer Radiotherapy*, 26(1-2), 199-205.
- Pruseth, B., Ghosh, A., Pradhan, D., Purkait, S. and Guttula, P. K. 2021. Analysis of overexpressed mirna in circulation and cancer tissue to develop a potential microrna panel for the diagnosis of colorectal cancer. *Microrna*, 10(4), 250-262.
- Qu, A., Du, L., Yang, Y., Liu, H., Li, J., Wang, L., Liu, Y., Dong, Z., Zhang, X., Jiang, X. and Wang, H. 2014. Hypoxia-inducible mir-210 is an independent prognostic factor and contributes to metastasis in colorectal cancer. *PLoS One*, 9(3), 1-12.
- Ramteke, A., Ting, H., Agarwal, C., Mateen, S., Somasagara, R., Hussain, A., Graner, M., Frederick, B., Agarwal, R. and Deep, G. 2015. Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Molecular Carcinogenesis*, 54(7), 554-565.

- Raposo, G. and Stoorvogel, W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373-383.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A. and Ratajczak, M. Z. 2006. Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 20(9), 1487-1495.
- Rauf, A., Al-Awthman, Y. S., Khan, I. A., Muhammad, N., Ali Shah, S. U., Bahattab, O., Al-Duais, M. A., Sharma, R. and Rahman, M. 2022. *In vivo* anti-inflammatory, analgesic, muscle relaxant, and sedative activities of extracts from. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, 2022(1), 1-7.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R. and Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 rna regulates developmental timing in caenorhabditis elegans. *Nature*, 403(6772), 901-906.
- Saccu, G., Menchise, V., Gai, C., Bertolin, M., Ferrari, S., Giordano, C., Manco, M., Dastrù, W., Tolosano, E., Bussolati, B. and Calautti, E. 2022. Bone marrow mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles promote corneal wound repair by regulating inflammation and angiogenesis. *Cells*, 11(23), 1-24.
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S. and Ghaffari, S. H. 2019. An overview of micrnas: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*, 234(5), 5451-5465.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. and Jemal, A. 2022. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer Journal Clinic*, 72(1), 7-33.
- Simpson, R. J., Lim, J. W., Moritz, R. L. and Mathivanan, S. 2009. Exosomes: Proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Review of Proteomics*, 6(3), 267-283.
- Smyth, I., Du, X., Taylor, M. S., Justice, M. J., Beutler, B. and Jackson, I. J. 2004. The extracellular matrix gene *frem1* is essential for the normal adhesion of the embryonic epidermis. *Proceeding of National Academy Sciences*, 101(37), 13560-13565.
- Steuer, C. E., El-Deiry, M., Parks, J. R., Higgins, K. A. and Saba, N. F. 2017. An update on larynx cancer. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 31-50.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J. and Futreal, P. A. 2009. The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724.
- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B. and Record, M. 2007. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 89(2), 205-212.
- Sun, Z., Shi, K., Yang, S., Liu, J., Zhou, Q., Wang, G., Song, J., Li, Z., Zhang, Z. and Yuan, W. 2018. Effect of exosomal mirna on cancer biology and clinical applications. *Molecular Cancer*, 17(1), 1-9.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and

- mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.
- Svoronos, A. A., Engelman, D. M. and Slack, F. J. 2016. Oncomir or tumor suppressor?. The duplicity of micrnas in cancer. *Cancer Research*, 76(13), 3666-3670.
- Tafrihi, M. and Hasheminasab, E. 2019. Mirnas: Biology, biogenesis, their web-based tools, and databases. *Microna*, 8(1), 4-27.
- Thairu, N., Kiriakidis, S., Dawson, P. and Paleolog, E. 2011. Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis in 2011: Learning the lessons of the colorectal cancer experience. *Angiogenesis*, 14(1), 223-234.
- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O. and Amigorena, S. 2002. Indirect activation of naïve cd4+ t cells by dendritic cell-derived exosomes. *National Immunology*, 3(12), 1156-1162.
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N. and Heine, U. 1981. Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimia Biophysica Acta*, 645(1), 63-70.
- Uzuner, E., Ulu, G. T., Gürler, S. B. and Baran, Y. 2022. The role of mirna in cancer: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Methods Molecular Biology*, 2257(1), 375-422.
- Viallard, C. and Larrivé, B. 2017. Tumor angiogenesis and vascular normalization: Alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409-426.
- Vietri, M., Radulovic, M. and Stenmark, H. 2020. The many functions of esrts. *Nature Reviwers Molecular Cell Biology*, 21(1), 25-42.
- Wang, G., Zhang, M., Cheng, M., Wang, X., Li, K., Chen, J., Xiong, G. and Xu, X. 2021. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma: Functions and regulatory mechanisms. *Cancer Letters*, 507(1), 55-69.
- Wang, W., Qu, A., Liu, W., Liu, Y., Zheng, G., Du, L., Zhang, X., Yang, Y., Wang, C. and Chen, X. 2017. Circulating mir-210 as a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer. *European Journal of Cancer Care (Engl)*, 26(4), 1-8.
- Wang, X. 2008. Mirdb: A micrna target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*, 14(6), 1012-1017.
- Wang, X., Liu, K., Gong, H., Li, D., Chu, W., Zhao, D., Wang, X. and Xu, D. 2021. Death by histone deacetylase inhibitor quisinostat in tongue squamous cell carcinoma via apoptosis, pyroptosis, and ferroptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 410(1), 1-14.
- Werbowetski-Ogilvie, T. E., Bossé, M., Stewart, M., Schnerch, A., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Wynder, T., Smith, M. J., Dingwall, S., Carter, T. and Williams, C. 2009. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nature Biotechnology*, 27(1), 91-97.

- Westholm, J. O. and Lai, E. C. 2011. Mirtrons: MicroRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, 93(11), 1897-1904.
- Williams, P. A., Zaidi, S. K. and Sengupta, R. 2022. Aacr cancer disparities progress report 2022. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 31(7), 1249-1250.
- Xi, S., Cai, H., Lu, J., Zhang, Y., Yu, Y., Chen, F., Huang, Q., Wang, F. and Chen, Z. 2021. The pseudogene prelid1p6 promotes glioma progression via the hnhph1-akt/mTOR axis. *Oncogene*, 40(26), 4453-4467.
- Xiao, F., Zuo, Z., Cai, G., Kang, S., Gao, X. and Li, T. 2009. Mirecords: An integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 105-110.
- Xing, W. and Zeng, C. 2017. A novel serum microRNA-based identification and classification biomarker of human glioma. *Tumour Biology*, 39(5), 1-11.
- Yu, Q., Lin, B., Xie, S., Gao, S., Li, W., Liu, Y., Wang, H., Huang, D. and Xie, Z. 2018. A homozygous mutation p.Arg2167Trp in *frem2* causes isolated cryptophthalmos. *Human Molecular Genetics*, 27(13), 2357-2366.
- Yue, B., Yang, H., Wang, J., Ru, W., Wu, J., Huang, Y., Lan, X., Lei, C. and Chen, H. 2020. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis. *Cell Proliferation*, 53(7), 1-10.
- Zhai, R., Zhao, Y., Liu, G., Ter-Minassian, M., Wu, I. C., Wang, Z., Su, L., Asomaning, K., Chen, F., Kulke, M. H. and Lin, X. 2012. Interactions between environmental factors and polymorphisms in angiogenesis pathway genes in esophageal adenocarcinoma risk: A case-only study. *Cancer*, 118(3), 804-811.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. and Anderson, T. A. 2007. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1), 1-12.
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J. and Mi, S. 2015. Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13(1), 17-24.
- Zhao, E. Y., Jones, M. and Jones, S. J. M. 2019. Whole-genome sequencing in cancer. *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine*, 9(3), 1-13.