



**İNSAN BAŞ VE BOYUN SKUAMÖZ HÜCRELİ  
KARSİNOMLARINDA *miR-363-3p* VE *miR-200c-3p*'NİN  
ROLLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Fatma ŞANLI**

**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 *miR-363-3p* VE *miR-200c-3p*'NİN ROLLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Fatma ŞANLI**

**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.

15 / 08 / 2023

Fatma ŞANLI

# ÖZET

DOKTORA TEZİ

## İNSAN BAŞ VE BOYUN SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMLARINDA *miR-363-3p* VE *miR-200c-3p*'NİN ROLLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatma ŞANLI

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Baş ve boyun kanserleri (BBK) en yaygın görülen altıncı malignitedir. Tanı ve tedavisinde önemli ilerlemeler olmasına rağmen, BBK'ler hala kansere bağlı önemli ölüm nedenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm dünyada BBK'nin mortalite ve insidansının artacağı beklentisi yeni tedavi yaklaşımlarının gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Yeni tedavi yöntemlerinin gelişimini ön ayak olmak amacıyla da önemli biyolojik belirteçler keşfetmek bir zorunluluk haline gelmiştir. Bu tez kapsamında, miR-200c-3p/miR-363-3p'nin BBK patogeneziindeki *in vitro* rollerinin daha iyi anlaşılması, olası yeni hedef genlerinin belirlenmesi ve bu hedef gen aracılığıyla kanser oluşum ve gelişim süreçlerindeki katkı mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, BBK tümör dokularında normal doku örneklerine göre miR-200c-3p ifadesinin azaldığı belirlenmesine karşın, miR-363-3p ifadesinin tümör örneklerinde normal doku örneklerine göre değişmediği tespit edildi. Bu nedenle, sonraki çalışmalarda miR-200c-3p'nin olası tümör süpresör potansiyeli araştırıldı. MiR-200c-3p'nin ektopik olarak arttırıldığı BBK hücrelerinde hücre canlılığı, hücre göçü, hücre invazyonu ve hücre apoptozu gibi kanser ilişkili fenotipler üzerindeki etkileri bir takım *in vitro* testlerle incelenerek ortaya çıkarıldı. Ayrıca, *in siliko* analizler yardımıyla aday hedef gen olarak belirlenen SSFA2'nin, ilk kez bu tez kapsamında miR-200c-3p'nin doğrudan hedefi olduğu lusiferaz raportör testi ile doğrulandı. Ek olarak, SSFA2'nin BBK patogeneziinde onkogenik potansiyele sahip olduğu bir takım *in vitro* testlerle ortaya çıkarıldı. Ayrıca, SSFA2'nin taksol dirençli hücrelerde aşırı ifade edildiği ve SSFA2 ifade artışına paralel Ca<sup>2+</sup> salınım kanalı olan IP3R1'in hücrelerde zamanla azaldığı ve BBK'de taksol direncinin ortaya çıkmasına neden olduğu ilk kez bu tez kapsamında ortaya konuldu. Elde ettiğimiz bu veriler, BBK gelişimi ve taksol direncinin oluşumunda miR-200c-3p/SSFA2/IP3R1 aksisinin rol aldığı ve BBK'lerde taksol direncinin üstesinden gelmek için SSFA2'nin terapötik olarak hedeflenebileceği ortaya çıkarıldı.

**2023, 110 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Baş ve Boyun Kanserleri, miR-200c-3p, miR-363-3p, SSFA2, IP3R1, Taksol Direnci

## ABSTRACT

Ph.D

### IDENTIFICATION OF THE ROLES OF miR-363-3p and miR-200c-3p IN HUMAN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMAS

Fatma ŞANLI

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 cancers (HNC) are the sixth most common malignancy. Despite significant advances in the diagnosis and treatment, HNCs are still one of the major causes of cancer-related deaths. The expectation that the mortality and incidence of HNC will increase worldwide has revealed the necessity for development of new treatment approaches. It has become a necessity to discover important biomarkers in order to advance the development of new treatment methods. In this thesis, it is aimed to better understand the *in vitro* roles of miR-200c-3p/miR-363-3p in the pathogenesis of HNC, to identify possible new target genes and to understand the contribution of this target to the HNC pathogenesis. Although miR-200c-3p expression was found to be decreased in HNC tumor tissues compared to normal tissue samples, it was determined that miR-363-3p expression did not change in tumor samples compared to normal tissue samples. Considering these findings, the possible tumor suppressor potential of miR-200c-3p was investigated in subsequent functional studies. The effects of ectopic overexpression of miR-200c-3p on cancer-related phenotypes of HNC cells, such as cell viability, cell migration, cell invasion and cell apoptosis were investigated by a number of *in vitro* tests. In addition, SSFA2 which was identified as a candidate target gene with the help of *in silico* analyzes, was confirmed as a direct target of miR-200c-3p for the first time in this thesis. In addition, a number of *in vitro* tests revealed that SSFA2 has oncogenic potential in the pathogenesis of HNC. In addition, we demonstrated that SSFA2 is overexpressed in taxol resistant cells and along with downregulation of IP3R1, the Ca<sup>2+</sup> release channel. Our findings revealed that miR-200c-3p/SSFA2/IP3R1 axis may contribute to HNC pathogenesis and development of taxol resistance and SSFA2 may serve as an important therapeutic target to overcome taxol resistance in HNCs.

**2023, 110 page**

**Keywords:** Head and Neck Cancers, miR-200c-3p, miR-363-3p, SSFA2, IP3R1, Taxol Resistance

## TEŞEKKÜR

Zorlu bir yolculuk olan doktora sürecinde tecrübesi ile doğru yol haritaları belirleyen, tezimin planlanmasından sonuçlanmasına kadar geçen süreçte her konuda desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak doktora eğitimimi en iyi şekilde almama yardımcı olan sayın danışman hocam Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ'a,

Doktora eğitimim boyunca, desteklerini her daim yanımda hissettiğim ve birlikte uyum içerisinde çalıştığımız değerli arkadaşlarım; Abdulmelik AYTATLI, Ahsen KILIÇ, Neslişah BARLAK, Özel ÇAPIK ve Süleyman ÇELİK'e,

Sabrı, özverisi ve anlayışı ile beni her zaman destekleyen, bu yola çıkmamda en büyük paya sahip ve bana benden daha çok inanan kıymetli eşim Murat ŞANLI'ya,

Şartlar ne olursa olsun sorgusuz sualsiz hep yanı başımda olan ve umudumu kaybettiğim anda umudumu yeniden yeşertmek için ellerinden geleni yapan, kalbimdeki tarifsiz sevginin biricik müsebbipleri, canım annem Gülden EREN, canım babam Ramazan EREN ve canım kardeşlerim Damla & Derya EREN'e,

Ve bu zorlu süreçte en çok fedakarlık yapan, vakitlerinden en çok çalmak zorunda kaldığım güzel kızlarım Zeynep Asya, Öykü ve Ece ŞANLI'ya ve,

Tez süresince, YÖK 100/2000 doktora projesi ve 2211/C öncelikli alanlar doktora burs programı kapsamında maddi desteklerini aldığım Yükseköğretim Kurulu (YÖK) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na,

Sonsuz teşekkürler...

Bu çalışma, Erzurum Teknik Üniversitesi (Proje No: 2020/11) ve Atatürk Üniversitesi (Proje No: TCD-2021-9011) Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

**Fatma ŞANLI**  
**Ağustos 2023**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Kanserin Tanımı.....	1
1.2. Baş ve Boyun Kanseri.....	8
1.2.1. Hipofarenks kanseri .....	10
1.2.2. Dil kanseri .....	12
1.3. MikroRNA'lar (miRNA'lar).....	13
1.4. MikroRNA'ların Keşfi.....	14
1.5. MikroRNA Biyogenezi .....	15
1.6. Kanser Gelişiminde mikroRNA'ların Rolü.....	16
1.7. Kansereleşme Sürecinde miR-200c-3p ve Rollerini .....	20
1.8. Kansereleşme Sürecinde miR-363-3p ve Rollerini.....	22
1.9. Taksol ve Taksole Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları.....	23
1.10. SSFA2 (KRAP; ITPRID2) .....	26
1.11. IP3R1 Aracılı Ca <sup>2+</sup> Salınımı Karsinogenez Sürecinde Oldukça Önemlidir.....	27
1.12. SSFA2 ve IP3R Arasındaki İlişki.....	28
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	30
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	34
3.1. Materyal .....	34
3.2. Yöntem .....	42
3.2.1. Normal ve tümörlü baş ve boyun kanseri doku örneklerinin temini ve arşivlenmesi .....	42
3.2.2. İn siliko analiz .....	43
3.2.3. Hücre hatları ve taxol dirençli hücrelerin oluşturulması .....	43
3.2.4. SSFA2 plazmitinin FaDu hücrelerine stabil transfeksiyonu .....	44

3.2.5. SSFA2 genini yüksek düzeyde ifade eden FaDu hücrelerinin seçilimi.....	45
3.2.6. miR-200c-3p, miR-363-3p, SSFA2 ve IP3R1 ifadelerinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi .....	45
3.2.7. Hücre sayımı .....	47
3.2.8. Hücrelerin 6-kuyucuklu ve 96-kuyucuklu plakelere ekilmesi.....	48
3.2.9. MikroRNA transfeksiyonu .....	48
3.2.10. miR-200c-3p ve SSFA2'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerinin araştırılması .....	48
3.2.11. miR-200c-3p ve SSFA2'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin göçü üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi .....	49
3.2.12. miR-200c-3p ve SSFA2'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin invazyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması .....	50
3.2.13. miR-200c-3p ve SSFA2'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin koloni oluşumu potansiyeli üzerindeki etkilerinin araştırılması .....	51
3.2.14. miR-200c-3p ve miR-363-3p'nin in siliko araçlarla hedef tahmini .....	52
3.2.15. Dokulardan protein izolasyonu .....	53
3.2.16. Hücrelerden protein izolasyonu .....	53
3.2.17. Western blot analizi.....	54
3.2.18. Lusiferaz raportör testi .....	55
3.2.19. Apoptoz deneyi .....	55
3.2.20. Endojen süpresör deneyi .....	56
3.2.21. Hücre içi Ca <sup>2+</sup> ölçümü.....	56
3.2.22. Xeostospongin C ve Taksol stok solüsyonlarının hazırlanması.....	56
3.2.23. Hücrelerin XEC ile muamele edilmesi.....	57
3.2.24. İstatistiksel analiz .....	57
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>58</b>
4.1. Baş ve Boyun Kanseri Doku Örneklerinde miR-200c-3p ve miR-363-3p'nin İfade Düzeyi Analizi.....	58
4.2. BBK ve Normal Ağız İçi Fibroblast Hücrelerinde miR-200c-3p İfade Analizi .....	61
4.3. FaDu ve SCC-9 Hücrelerinde Transfeksiyondan Sonra Artan miR-200c-3p İfadesinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Doğrulanması .....	62
4.4. SCC-9 ve FaDu Hücrelerinde Artan miR-200c-3p İfadesinin Dil ve Hipofarenks Kansellerinin Progresyonu ile İlişkili Hücresel Fenotipler Üzerindeki Etkilerinin Analizi .....	63

4.4.1. Artan miR-200c-3p ifadesinin BBK hücre canlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması.....	63
4.4.2 miR-200c-3p'nin BBK hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkisinin araştırılması.....	64
4.4.3. miR-200c-3p'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin apoptotik aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılması.....	65
4.4.4. miR-200c-3p'nin baş ve boyun kanseri hücrelerinin hücre göçü üzerindeki etkisinin araştırılması.....	66
4.4.5. miR-200c-3p'nin baş ve boyun kanseri hücrelerinin hücre invazyonu üzerindeki etkisinin araştırılması.....	66
4.4.6. miR-200c-3p'nin hedefinin belirlenmesi.....	67
4.5. BBK Hücre Hatlarında SSFA2 İfade Düzeyi Analizi.....	69
4.6. SCC-9 ve FaDu Hücrelerindeki SSFA2 İfadesinin miR-200c-3p Transfeksiyonu Sonrasında RNA ve Protein Düzeyinde Tespiti.....	69
4.7. SSFA2'nin, miR-200c-3p'nin Doğrudan Hedefi Olduğunun Teyit Edilmesi.....	70
4.8. SSFA2 Overekspresyon Plazmitleri İle Transfekte Edilen Baş ve Boyun Kanseri Hücresinde SSFA2'nin Artmış İfadesinin Doğrulanması.....	71
4.9. SSFA2'nin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	72
4.10. SSFA2'nin Hücre Apoptozu Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi.....	73
4.11. SSFA2'nin FaDu Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	73
4.12. SSFA2'nin FaDu Hücrelerinin Göç Etme Kapasiteleri Üzerindeki Etkisinin Analiz Edilmesi.....	74
4.13. SSFA2'nin FaDu Hücrelerinin Hücre İnvazyon Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	75
4.14. Taksol Dirençli BBK Hücrelerinde SSFA2'nin Etkisinin Araştırılması.....	75
4.14.1. SSFA2'nin overeksprese edildiği FaDu hücrelerinde taksolün hücre canlılığı üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi.....	76
4.14.2. Taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinde SSFA2'nin mRNA ve protein düzeyinde tespiti.....	77
4.14.3. Taksol dirençli BBK hücrelerinde SSFA2'nin endojen süpresör RNA ile susturulmasının mRNA ve protein düzeyinde belirlenmesi.....	78
4.14.4. SSFA2'nin endojen süpresör RNA ile susturulmasının hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi.....	78

4.14.5. SSFA2'nin endojen süpresör RNA ile susturulmasının hücrelerin koloni oluşturma potansiyeli üzerine etkisinin değerlendirilmesi .....	79
4.15. Taksol Dirençli BBK Hücrelerinde SSFA2 ve IP3R1 Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi.....	80
4.16. Taksol Direncinin Kazanılmasında IP3R1'in Etkisinin <i>in vitro</i> Fonksiyonel Deneylerle İncelenmesi .....	83
4.17. Ca <sup>2+</sup> Salınımının Taksol Direncinin Oluşumundaki Etkisinin İncelenmesi.....	85
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>87</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>95</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler      Açıklama

$\beta$	Beta
$^{\circ}$	Derece
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
V	Volt
%	Yüzde

### Kısaltmalar

BBK	Baş ve Boyun Kanseri
DAG	Diacylglycerol
DSHK	Dil Skuamöz Hücreli Karsinoma
EBV	Epstein-Bar Virüsü
EMT	Epitel Mezenkimal Geçiş
F-Aktin	Filamentli Aktin
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
HFK	Hipofarenks Kanseri
HIF1- $\alpha$	Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1
IP3R	İnositol 1,4,5-Trisfosfat Reseptörü
ITPRID2	IP3 reseptörü etkileşimli bölge içeren protein 2
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
SSFA2	Sperm Specific Antigen 2
XEC	Xeostospongine C

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kanser oluşum süreci Anonymous (2000)'den değiştirilerek alınmıştır .....	1
Şekil 1.2. Kanser hücrelerinin sahip olması gereken temel özellikler (Hanahan 2022)'den değiştirilerek alınmıştır.....	2
Şekil 1.3. Bir proto-onkogenin onkogene dönüşümü sonucu kanser meydana gelmektedir Anonymous (2023)'den değiştirilerek alınmıştır.....	3
Şekil 1.4. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonları karsinogenez sürecine katkıda bulunmaktadır. Anonymous (2021a)'dan değiştirilerek alınmıştır. ....	4
Şekil 1.5. Kanser etiyolojisi (Anand et al. 2008)'den değiştirilerek alınmıştır .....	4
Şekil 1.6. Ülkemizde 2020 yılındaki ortaya çıkan yeni kanser vakası ve kansere bağlı yaşam kaybı. Anonymous (2021b)'dan değiştirilerek alınmıştır.....	6
Şekil 1.7. Dünya genelinde 2019 yılı ölüm sayıları ve sebepleri (ilk 10 hastalık). (Ritchie 2018)'den değiştirilerek alınmıştır.....	6
Şekil 1.8. Dünya genelinde GLOBOCAN 2018 yılı baş ve boyun kanseri insidans oranları (Johnson et al. 2020)'den değiştirilerek alınmıştır. ....	8
Şekil 1.9. Baş ve boyun karsinomunun meydana geldiği başlıca anatomik bölgeler (Sabatini and Chiocca 2020)'den değiştirilerek alınmıştır.....	9
Şekil 1.10. MikroRNA Biyogenezi Anonymous (2008)'dan değiştirilerek alınmıştır... 16	
Şekil 4.1. Baş ve boyun tümör ve normal doku örneklerinde miR-200c-3p'nin ifade seviyesi.....	59
Şekil 4.2. Baş ve boyun tümör ve normal doku örneklerinde miR-363-3p'nin ifade seviyesi.....	59
Şekil 4.3. Tümör ve normal doku örneklerinde miR-200c-3p ifadesinin miRGator 3.0 veritabanı aracılığı ile gösterimi. ....	60
Şekil 4.4. miR-200c-3p ifadesinin baş ve boyun hastalarında sağkalıma etkisi.....	60
Şekil 4.5. BBK hastalarına ait tümör ve normal doku örneklerinde T evresi, Grade ve N evresine göre miR-200c-3p'nin ifade seviyesi.....	61
Şekil 4.6. Baş ve boyun kanseri hücre hatlarında endojen miR-200c-3p ifade seviyesi.62	
Şekil 4.7. miR-200c-3p mimik ile transfeksiyon sonrasında hücrelerdeki miR-200c-3p düzeyi. ....	63

<b>Şekil 4.8.</b> miR-200c-3p ile transfekte edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde hücre canlılığı.....	64
<b>Şekil 4.9.</b> miR-200c-3p ile transfekte edilen hücrelerin koloni sayısı üzerindeki etkisi. ....	64
<b>Şekil 4.10.</b> miR-200c-3p ile transfekte edilen hücrelerin koloni çeşidi üzerindeki etkisi. ....	65
<b>Şekil 4.11.</b> miR-200c-3p ile transfekte edilen hücrelerde apoptotik aktivite değişimi... ..	65
<b>Şekil 4.12.</b> miR-200c-3p ile transfekte edilen BBK hücrelerinin hücre göçü değişimi. ....	66
<b>Şekil 4.13.</b> miR-200c-3p ile transfekte edilen BBK hücrelerinin hücre invazyonu değişimi. ....	67
<b>Şekil 4.14.</b> Baş ve boyun kanseri tümör ve normal doku örneklerinde SSFA2'nin mRNA düzeyinde ifade seviyesi. ....	67
<b>Şekil 4.15.</b> Tümör ve normal doku örneklerinde SSFA2'nin protein düzeyinde ifade seviyesi. ....	68
<b>Şekil 4.16.</b> Baş ve boyun kanseri tümör ve normal doku örneklerinde SSFA2 ifadesi. ....	68
<b>Şekil 4.17.</b> Baş ve boyun kanseri hücre hatlarında SSFA2'nin mRNA ve protein düzeyinde ifade seviyesi. ....	69
<b>Şekil 4.18.</b> miR-200c-3p ile transfekte edilen BBK hücre hatlarında SSFA2 ifadesinin RNA ve protein düzeyinde tespiti. ....	70
<b>Şekil 4.19.</b> miR-200c-3p mimik ve SSFA2 3'UTR plazmidinin HEK293T hücrelerine birlikte yapılan transfeksiyon ardından hücrelerde belirlenen lusiferaz aktivite düzeyi. ....	70
<b>Şekil 4.20.</b> miR-200c-3p ve SSFA2 arasında negatif yönlü bir korelasyon mevcuttur. .	71
<b>Şekil 4.21.</b> FaDu hücrelerinde stabil overeksprese edilen SSFA2'nin mRNA ve protein düzeyinde ifadesi. ....	72
<b>Şekil 4.22.</b> FaDu hücrelerinde stabil overeksprese edilen SSFA2'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. ....	72
<b>Şekil 4.23.</b> FaDu hücrelerinde stabil overeksprese edilen SSFA2'nin hücrenin apoptotik aktivitesi üzerindeki etkisi. ....	73
<b>Şekil 4.24.</b> SSFA2 overeksprese plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli. ....	74

<b>Şekil 4.25.</b> SSFA2 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu hücrelerinin migrasyon potansiyeli. ....	74
<b>Şekil 4.26.</b> SSFA2 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu hücrelerinin invazyon potansiyeli.....	75
<b>Şekil 4.27.</b> SSFA2 yüksek düzeyde ifade eden FaDu hücre hattında taksolün doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri.....	77
<b>Şekil 4.28.</b> Taksol dirençli hücrelerde SSFA2'nin mRNA ve protein düzeyinde ifade seviyesi. ....	77
<b>Şekil 4.29.</b> Süpresör SSFA2 ile transfekte edilen taksol dirençli hücrelerde SSFA2'nin RNA ve protein düzeyinde ifadesi. ....	78
<b>Şekil 4.30.</b> SSFA2 ifadesinin susturulduğu taksol dirençli hücrelerde hücre canlılık değişimi. ....	79
<b>Şekil 4.31.</b> SSFA2 ifadesi susturulmuş taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinde koloni sayısı değişimi.....	79
<b>Şekil 4.32.</b> SSFA2 ifadesi susturulmuş taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinde koloni çeşidi değişimi. ....	80
<b>Şekil 4.33.</b> SSFA2'nin overeksprese edildiği FaDu hücrelerinde IP3R1'in mRNA ve protein düzeyinde ifade seviyesi. ....	82
<b>Şekil 4.34.</b> SSFA2'nin susturulduğu taksol dirençli hücrelerde IP3R1'in mRNA ve protein düzeyinde ifade seviyesi. ....	82
<b>Şekil 4.35.</b> Taksol IC <sub>50</sub> dozlarıyla muamele edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde IP3R1'in protein düzeyi. ....	83
<b>Şekil 4.36.</b> Taksol dirençli hücrelerde IP3R1'in ifadesi parental hücelere göre protein seviyesinde azalmaktadır. ....	83
<b>Şekil 4.37.</b> XEC ile muamele edilen hücreler taksole karşı direnç geliştirmektedir. ....	84
<b>Şekil 4.38.</b> XEC ile muamele sonrası FaDu hücrelerinde IP3R1 ve SSFA2 protein ifade düzeyi. ....	84
<b>Şekil 4.39.</b> SSFA2'nin overeksprese edildiği hücrelerde hücre içi Ca <sup>2+</sup> miktarı.....	85
<b>Şekil 4.40.</b> SSFA2'nin susturulduğu taksol dirençli hücrelerde hücre içine salınan Ca <sup>2+</sup> miktarı. ....	86
<b>Şekil 4.41.</b> XEC ile muamele edilen Taksol dirençli hücrelerde hücre içine salınan Ca <sup>2+</sup> miktarı. ....	86

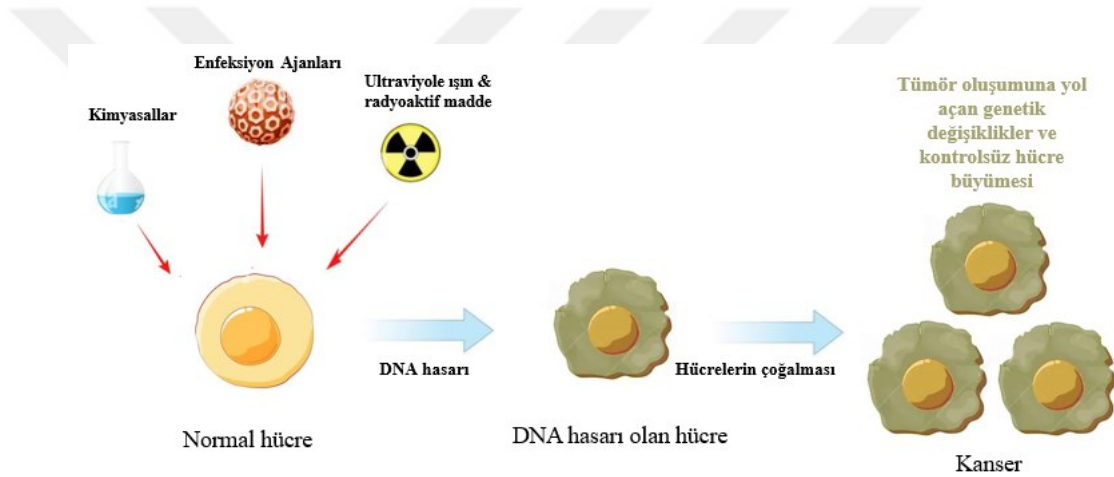
## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Baş ve boyun kanseriyle ilişkilendirilmiş ve yukarı regüle olan mikroRNA'lar, hedef genleri ve rolleri.....	18
<b>Çizelge 1.2.</b> Baş ve boyun kanseriyle ilişkilendirilmiş ve aşağı regüle olan mikroRNA'lar, hedef genleri ve rolleri.....	19
<b>Çizelge 3.1.</b> Çalışmada kullanılan cihazlar.....	34
<b>Çizelge 3.2.</b> Çalışmada kullanılan kitler, kimyasallar ve sarf malzemeler.....	37
<b>Çizelge 3.3.</b> Çalışma kapsamında kullanılan primer dizileri.....	47
<b>Çizelge 3.4.</b> miR-200c-3p için belirlenen olası hedef genler.....	52
<b>Çizelge 3.5.</b> miR-363-3p için belirlenen olası hedef genler.....	53
<b>Çizelge 3.6.</b> SSFA2 3'UTR site directed mutagenез primer dizileri.....	55
<b>Çizelge 4.1.</b> Hastaların kliniko patolojik özellikleri.....	58

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Kanserin Tanımı

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyerek vücudun diğer bölgelerine yayılma gösterdiği; büyüme özellikleri ve büyüme faktörü bağımlılıkları değişen hücreler ile karakterize proliferatif bir hastalıktır (Şekil 1.1) (Yang et al. 2007). Türk Tıbbi Onkoloji Derneği'ne göre de kanser, genetik ve çevresel faktörlerin etkileriyle değişikliğe uğramış hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalıp bölünmeleri sonucu ortaya çıkan kötü huylu hastalıklar olarak tanımlanmaktadır.



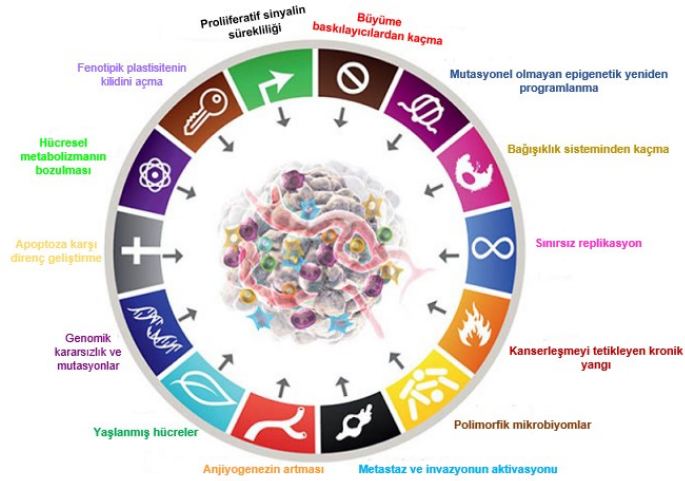
Şekil. 1.1. Kanser oluşum süreci, Anonymous (2000)'den değiştirilerek alınmıştır

Kanser, kademeli olarak gelişen ve büyümeyi kontrol etme yeteneğini tamamen yitiren hücrelerin oluşturduğu çok karmaşık bir hastalık bozuklukları dizisidir (Debela et al. 2021). Herhangi bir organ veya vücut kısımlarından köken alan bu kanser hücreleri normal hücrelerin aksine büyümeyi durdurma yeteneğinden yoksundurlar (Roy and Saikia 2016). Tümör hücrelerinin çoğalma yeteneklerinin arkasında birçok biyolojik mekanizma vardır. Normal hücreler ile tümör hücrelerini birbirinden ayıran bu mekanizmalar ve kanser hücrelerinin sahip olması gereken fenotipik özellikler Hanahan Weinberg tarafından tanımlanmıştır (Şekil 1.2) (Hanahan 2022).

## 1. GİRİŞ

Bunlar;

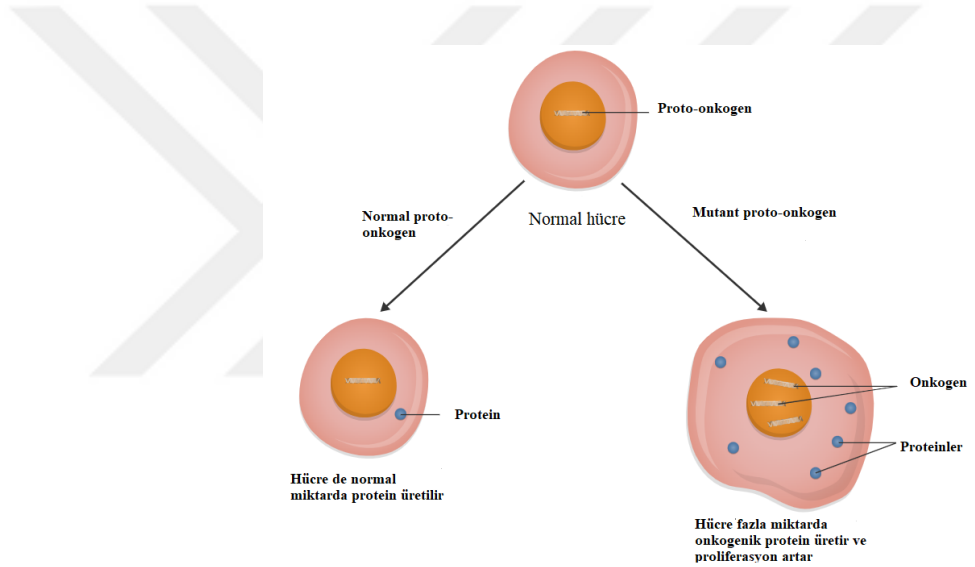
1. Hücre çoğalma sinyalinin sürekliliği,
2. Büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçma,
3. Genomdaki bazı genlerin epigenetik mekanizma ile yeniden programlanması,
4. İmmün sistemden kaçış,
5. Replikasyon kapasitesinin artması,
6. Kanseri destekleyen inflamasyon,
7. Tümör oluşumunu destekleyen mikrobiyotanın oluşması,
8. Farklı dokulara yayılmayı ve göç etmeyi kolaylaştıran invazyon ve metastazın aktivasyonu,
9. Yeni damar oluşumunu sağlayan anjiyogenezin indüklenmesi,
10. Tümör mikroçevresini destekleyen yaşlanmış hücrelerin artması,
11. Genomik instabilite ve mutasyonların artması,
12. Hücre ölümüne karşı direnç geliştirme,
13. Hücre enerji metabolizmasının yeniden programlanması,
14. Fenotipik plastisite ve bozulmuş farklılaşmanın ortaya çıkması.



**Şekil 1.2.** Kanseri destekleyen temel özellikler (Hanahan 2022)'den değiştirilerek alınmıştır.

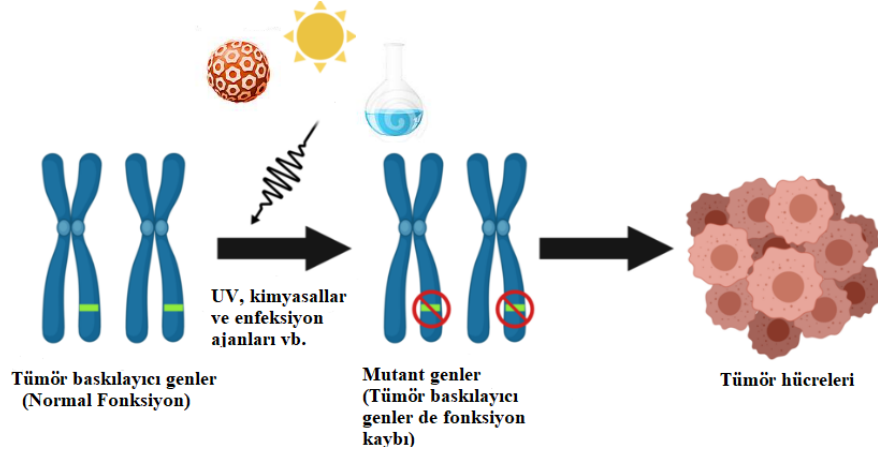
## 1. GİRİŞ

KontROLSÜZ bölünmenin esas olduğu karsinogenez sürecinde, genetik ve çevresel etmenlerin de dahil olduğu birçok faktör bu süreci etkilemektedir. Neoplastik transformasyona yol açan mutasyonların hedefi olan temel genetik faktörler proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdir. Proto-onkogenler; hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol oynayan proteinleri kodlayan ve hücrelerin kontrollü bir şekilde bölünme ve çoğalmasından sorumlu olan gen gruplarıdır. Bu genler; nokta mutasyonları, gen amplifikasyonları ve kromozomal translokasyonları içeren çeşitli genetik mekanizmalar tarafından aktive edilir. Bu genetik mekanizmalar, proto-onkogenlerin tümörjenik fenotipe baskın bir şekilde katkıda bulunan onkogenlere dönüşmesine ve bu da hücre çoğalması üzerindeki kontrolün kaybolmasına yol açar (Şekil 1.3) (Torry and Cooper 1991).



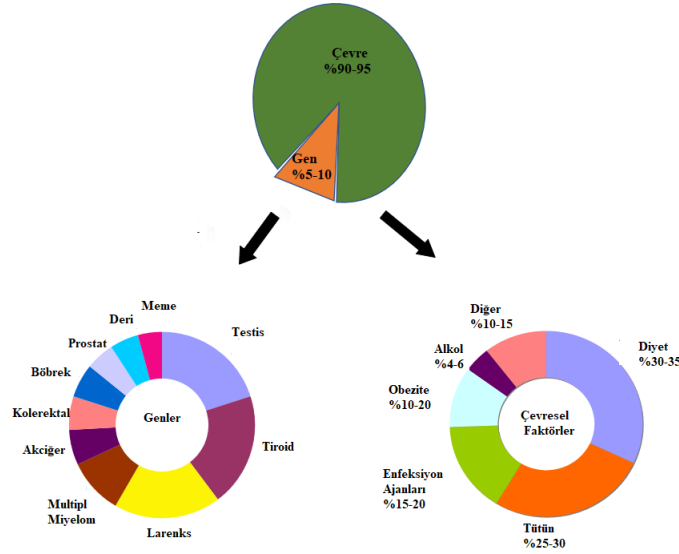
**Şekil 1.3.** Bir proto-onkogenin onkogene dönüşümü sonucu kanser meydana gelmektedir Anonymous (2023)'dan değiştirilerek alınmıştır.

Karsinogenez sürecine katkıda bulunan diğer bir gen grubu ise tümör baskılayıcılarıdır. Tümör baskılayıcı genler, Deoksiribonükleik Asit (DNA) hasarı onarımında, hücre bölünmesinin kontrolünde, apoptozun indüklenmesinde ve metastazın baskılanmasında rol almaktadır (Wang et al. 2018b). Hücresel büyümenin negatif düzenleyicileri olan bu genlerde meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonları tümör oluşum sürecine katkıda bulunur (Şekil 1.4) (Michor et al. 2005).



**Şekil 1.4.** Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonları karsinogenez sürecine katkıda bulunmaktadır. Anonymous (2021a)'dan değiştirilerek alınmıştır.

Tüm kanserlerin yaklaşık %10'unu yalnızca kalıtsal faktörler oluşturmaktadır. Bununla birlikte beslenme, sigara kullanımı, alkol tüketimi, radyasyon ve toksik maddelere maruziyet gibi çeşitli çevresel faktörler de bu süreçlerde oldukça etkilidir (Şekil 1.5) (Anand et al. 2008).



**Şekil 1.5.** Kanser etiolojisi (Anand et al. 2008)'den değiştirilerek alınmıştır

Yaşlanan bir nüfus ve karsinojen maddelere giderek artan maruziyet, son 50 yılda kanser prevalansının önemli ölçüde yükselmesine neden olmuştur. Öte yandan, kanser ilk çağlardan günümüze kadar insanlar için korkutucu bir hastalık olmuştur. Kanser hakkında tarihte yer alan ve insan kanserinin bilinen en eski tanımları, 19. yüzyılda keşfedilen antik mısır el yazmalarıdır. Meme kanserine ilk referans olarak kabul edilen bu yazıtlarda

## 1. GİRİŞ

---

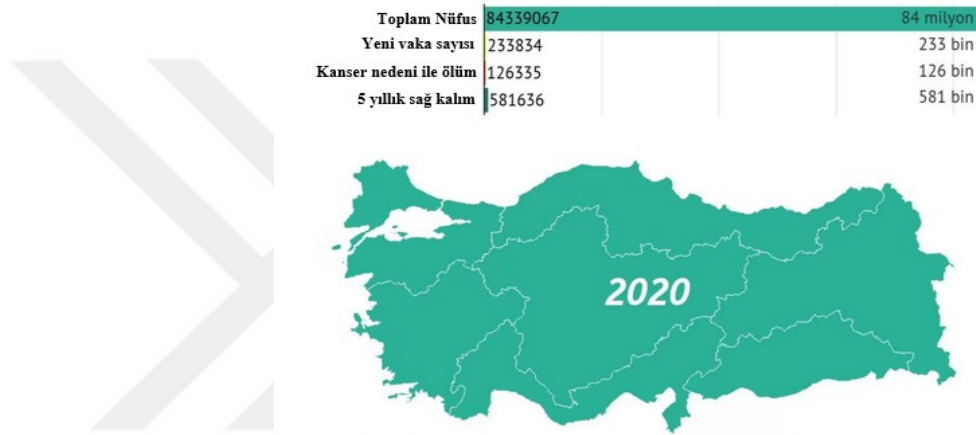
meme kanseri tanımlanmış ve tümörün memeye yayılması durumunda hiçbir tedavinin başarılı olmadığından bahsedilmiştir (Faguet 2015). Günümüzde yapılan birçok çalışmada daha etkili tedavilere yönelik bir kısım erken tanı biyobelirteçlerinin tanımlanması ile yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Kanser terimi ise ilk olarak Yunan tıp doktoru Hipokrat (M.Ö 460-377) tarafından kullanılmıştır. Bu dönemde vücut yüzeyinde ortaya çıkan, büyüyen ve organizmada iyileşme göstermeyen farklı biçimdeki şişliklere şekil olarak yengece benzetildiğinden Yunanca'da yengeç anlamına gelen “carcinoma” terimi kullanılmıştır (Sigerist 1932). Yunanlı bir doktor olan Galen ise, MS 2. yy. da tüm tümörleri karakterize etmek adına Yunanca da şişlik anlamına gelen “oncos” kelimesini kullanmış ve Hipokrat'ın “carcinoma” teriminden ise sadece kötü huylu tümörleri tanımlamak için yararlanmışır (Karpozilos and Pavlidis 2004).

İngiliz cerrah Pervicall Pott 1775 yılında testis kanserinin baca temizleyicileri arasında yaygın bir durum olduğunu keşfetmesiyle, kansere çevresel bir etmenin neden olabileceğini gösteren ilk bilim insanı olmayı başarmıştır (Ross 1986). 19. yüzyılın başlarında mikroskopun kullanılmaya başlanmasıyla, kanser araştırmaları ve tümör yapılarının anlaşılmasında önemli ölçüde ilerleme kaydedilmiştir. 1831 yılında ilk kez Robert Brown tarafından hücrede çekirdeğin varlığından bahsedilmiş, 1838 yılına gelindiğinde ise Theodor Schwann, tüm canlıların hücrelerden oluştuğunu iddia eden “hücre teorisi”ni ortaya atmıştır (Müller-Wille 2010). 1877'de Julius Cohnheim, tümörlerin bir organizmanın embriyonik gelişim sırasında yanlış bölgelere yerleşim gösteren hücrelerden kalan “embriyonik kalıntılar”dan oluştuğunu öne sürmüştür (Vinnitsky 2014).

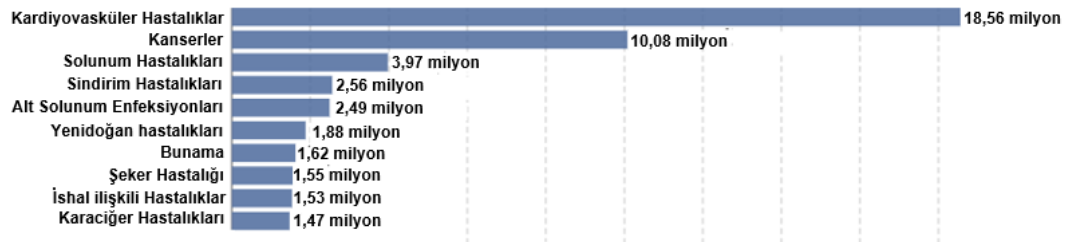
## 1. GİRİŞ

20. yüzyılın en korkulan hastalıklarından biri olan kanser, 21. yüzyılda da süreklilik ve artan görülme sıklığına sahiptir. GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında yeni kanser vakasının 19,3 milyon olduğu ve yaklaşık 10 milyon kişinin kanser nedeniyle hayatını kaybettiği bildirilmiş ve 2040 yılında ise bu oranın yaklaşık 29 milyona ulaşacağı ileri sürülmüştür (Deo et al. 2022). Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de her yıl binlerce insana kanser tanısı konmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2020 verilerine göre, ülkemizde 233.834 yeni kanser vakası kaydedilmiş ve 126.335 kişi de kanser nedeni ile hayatını kaybettiği bildirilmiştir (Şekil 1.6) (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2020).



**Şekil 1.6.** Ülkemizde 2020 yılındaki ortaya çıkan yeni kanser vakası ve kansere bağlı yaşam kaybı. Anonymous (2021b)’den değiştirilerek alınmıştır.

Kanser hem dünyada hem de ülkemizde önde gelen hastalık ve ölüm nedenlerinden biridir. Daha önceki yıllarda ölüme sebebiyet veren hastalıklar açısından 7., veya 8., sırada yer alan kanser, bugün Türkiye dahil, dünyanın birçok ülkesinde kalp hastalıklarından sonra en çok ölüm oranına sahip ikinci hastalıktır (Şekil 1.7) (Balachandran and Govindarajan 2005).



**Şekil 1.7.** Dünya genelinde 2019 yılı ölüm sayıları ve sebepleri (ilk 10 hastalık) (Ritchie 2018)’den değiştirilerek alınmıştır.

## 1. GİRİŞ

---

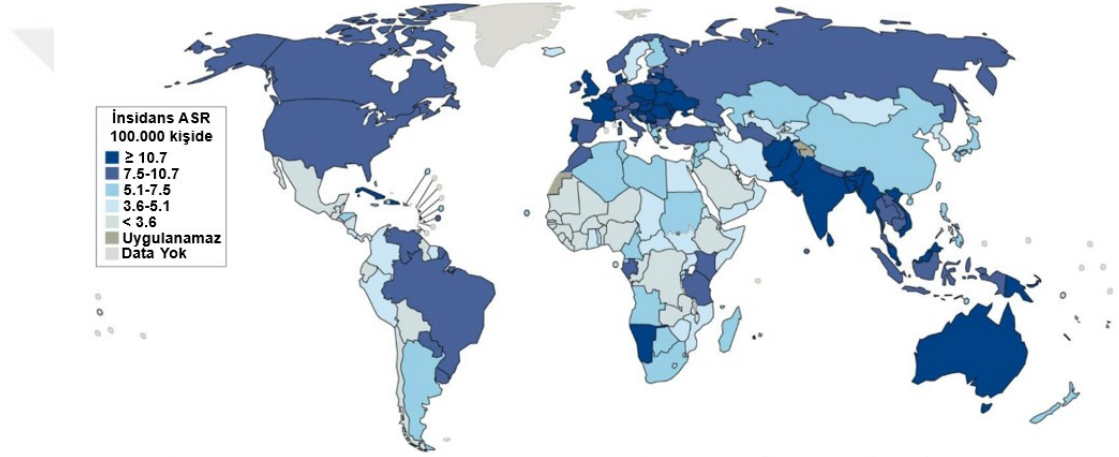
Kanser hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Mevcut yüke ek olarak, nüfus artışı, yaşlanma ve kanser riskli yaşam tarzının yaygınlaşması, vaka ve ölüm sayılarında önemli oranda bir artışı da beraberinde getirmiştir (Torre et al. 2016). Bulaşıcı olmayan hastalıklar grubunda yer alan kanserin tedavisinde mevcut yöntemlerin yetersiz kalması ve bu anlamda kanserle ilişkili ölüm oranlarının artması kanserin korkulan bir hastalık olarak düşünülmesine sebep olmakta ve birçok hastada ciddi psikolojik travmalara yol açmaktadır (Babaoğlu 2003). Bu nedenle, kanserle ilişkili ölümlerin azaltılması, kanser hastalarının yaşam kalitelerinin artırılması ve kanserin etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için yeni çalışmaların yapılması önemli ve gerekli bir adım olarak düşünülmektedir.

Her kanser türü, farklı moleküler mekanizmalarla gelişip yayılım gösterdiği için, tedaviye yanıt verme şekilleri kanserin türüne bağlı olarak değişim göstermektedir. Bundan dolayı günümüzde kanser hastalarının tedavisinde mevcut belirli bir terapötik yaklaşım yoktur (Barlak 2018). Uygulanacak olan tedavi, kanserin türüne, tümörün olduğu yere, kaçınıcı evrede olduğuna ve hastanın genel sağlık durumuna bağlı olarak değişim göstermekle birlikte genelde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormonal terapi, immünoterapi, gen terapisi ve kişiye özgü tedavi yaklaşımları gibi çeşitli tedavi yaklaşımları mevcuttur. Bununla beraber kombine tedavi yaklaşımlarının en etkili terapötik strateji olduğu söylenebilir (Wang et al. 2018a).

## 1. GİRİŞ

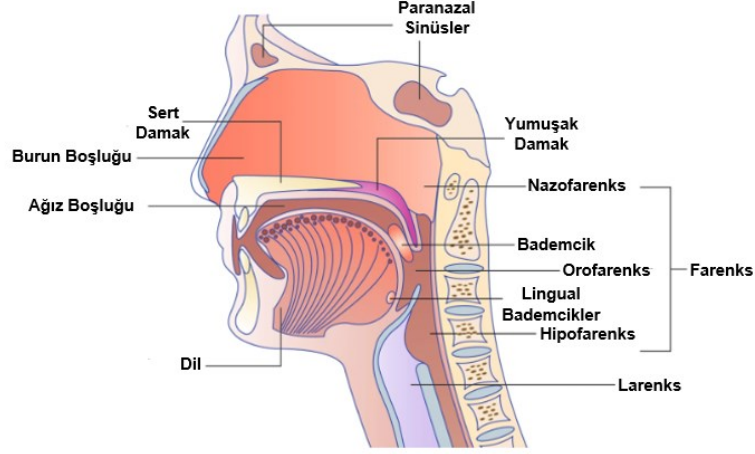
### 1.2. Baş ve Boyun Kanseri

Baş ve boyun kanseri (BBK), 2018’de yaklaşık 900.000 yeni vaka ve 450.000 ölümlle tüm dünyada en yaygın görülen altıncı malignitedir (Şekil 1.8). Küresel kanser istatistik verilerine göre BBK’ler her yıl teşhis edilen ortalama 700.000 vaka sayısı ile yeni tanılanan kanser vakalarının yaklaşık %5’ini oluşturmaktadır. GLOBOCAN 2018 verileri baz alındığında %95’ini skuamöz hücreli karsinomların oluşturduğu BBK insidansının, 2030 yılına kadar %30 oranında artarak yılda 1,08 milyon yeni vaka sayısına ulaşması beklenmektedir (Kilic et al. 2020).



**Şekil 1.8.** Dünya genelinde GLOBOCAN 2018 yılı baş ve boyun kanseri insidans oranları (Johnson et al. 2020)’den değiştirilerek alınmıştır.

Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülme insidansına sahip olan baş ve boyun kanserleri; ağız ve burun boşluğu, orofarenks, larenks, dil, dudak, tükürük bezi ve hipofarenks dahil çeşitli organlarda ortaya çıkan karmaşık bir hastalıktır (Şekil 1.9) (Chapman et al. 2015; Höffken et al. 1978). Baş ve boyun kanserlerinin yaklaşık %72’sinin oluşumundaki en önemli risk faktörü tütün ve alkol tüketimidir. Bununla birlikte, diyet, ağız hijyeni, insan papilloma virüsü (HPV) ve Epstein-Barr virüsü (EBV) gibi enfeksiyöz ajanlar ve kanserojenlere maruziyet de BBK geliştirme riskini arttırabilmektedir (Shaw and Beasley 2016).



**Şekil 1.9.** Baş ve boyun karsinomunun meydana geldiği başlıca anatomik bölgeler (Sabatini and Chiocca 2020)'den değiştirilerek alınmıştır.

Baş ve boyun kanserli hastalarda beş yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %50'dir. Ancak, kanser erken evrede tespit edildiğinde 5 yıllık sağ kalım açısından tedavi etkinliği oldukça yüksektir. Buna rağmen, hastanelere başvuran BBK hastalarının büyük çoğunluğu (yaklaşık %60) sıklıkla lokal lenf düğümlerini etkileyen ileri evre hastalığa sahiptir. İlk başvuruda uzak metastaz, hastaların sadece %10'unda ortaya çıkabilen oldukça nadir bir durumdur (Barlak 2023). TNM evreleme açısından yapılan değerlendirmeye göre erken evre tanılanan hastalarda sağ kalım oranı %80'lerdeyken; uzak metastaz yapan ileri evre hastalarda bu oran %20'lere kadar düşüş göstermektedir (Tomik et al. 2001).

Baş ve boyun bölgesindeki tümör yapılarının karmaşık anatomisi ve hayati açıdan oldukça önemli fizyolojik rolleri göz önüne alındığında, tedavinin amacı sadece sağ kalımı iyileştirmek değil, aynı zamanda da organ fonksiyonunu korumaktır. BBK hastaları için olağan tedavi yaklaşımları genellikle cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Ancak, uygulanacak tedavi tümörün konumuna, tümör evresine, tümör bölgesinin cerrahi müdahaleye uygunluğuna, çiğneme, yutma, nefes alma ve konuşma gibi önemli fonksiyonlara sahip organların korunma isteğine göre farklılık göstermektedir. Genellikle erken evre (I-II) BBK hastaları cerrahi veya radyoterapi yöntemi ile tedavi edilirken, ileri evre (III-IV) hastaların tedavisinde cerrahi ve radyoterapiye ek olarak kemoterapi de kullanılmaktadır. Kemoterapinin ileri evre BBK hastalarının tedavisinde kullanılması hastaların iyileşmesi bakımından oldukça önemli bir terapötik stratejidir (Argiris et al. 2008). Ancak, son yıllardaki terapötik ilerlemelerle birlikte erken teşhis edilen vakalarda

tedavide başarı sağlanmasına rağmen nüks ve metastaz BBK tanısı alan hastaların düşük sağ kalım oranlarının temel iki nedeni olmaya devam etmektedir (Rahman et al. 2019; Wang et al. 2020; Zhou et al. 2020). Bu nedenle, BBK karsinogenezinin altında yatan moleküler sebeplerin anlaşılması, erken teşhisin geliştirilmesi, prognozun ön görülmesi ve etkili terapötiklerin oluşturulması için çok önemli bir adımdır. Sonuç olarak BBK hastaları ile ilişkili yeni biyobelirteçleri tanımlamaya ve hastalarda yeni tedavi stratejilerin moleküler mekanizmasını incelemeye acil ihtiyaç vardır.

### 1.2.1. Hipofarenks kanseri

Hipofarenks, orofarenksin altında ve servikal özofagusun kraniyalinde yer alan farens bölgesidir. Bu onu larenks ve solunum yolundan ziyade gastrointestinal sistemin bir parçası yapar (Silverman et al. 1984). Hipofarenks, orofarenks ve nazofarenks ile birlikte faringeal mukozal alanın bir kısmını oluşturmaktadır (Pameijer et al. 1998). Farenks (yutak), ağız ve burun boşluğunun arkasında yemek borusu ve trakeanın üzerinde kalan boyun bölgesidir. İnsanlarda sindirim sisteminin bir parçası olan bu bölge, solunum sisteminin de önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Mendenhall et al. 2019). Hipofarenks kendi içerisinde; çift priform sinüsler, postkrikoid alan ve posterior hipofaringeal duvar şeklinde üç farklı anatomik alt bölgeye ayrılmaktadır. Priform sinüsler, tüm hipofarenks kanser vakalarının %60'ından fazlasını oluşturan en sık tanılanan bölgedir ve postkrikoid bölge ise vakaların %5'inden azının köken aldığı, en az tanılanan hipofarenks bölgesidir (Hoffman et al. 1997). Hipofarenks kanserlerinin %20'den azını en iyi prognoza ve uzun süreli sağkalıma sahip olan faringeal duvar veya piriform sinüsün erken evre tanılanan lezyonları oluşturmaktadır (Ho et al. 1993). Hipofarenks, konum itibarıyla larenks (gırtlak) ve servikal yemek borusuna çok yakındır ve bu durumda tedaviye başlamadan önce hastalığın bulunduğu bölgenin doğru bir şekilde belirlenmesini zorunlu kılmaktadır.

Ulusal Kanser Veri Tabanı, tüm baş ve boyun kanserlerinin %4'ünün ve üst solunum-sindirim sistemindeki tüm malignitelerinin ise %7'sinin hipofaringeal karsinoma sahip kişilerden meydana geldiğini bildirmiştir (Hoffman et al. 1998; Hoffman et al. 1997). Hipofarenks kanseri (HFK) oldukça nadir görülen baş ve boyun kanserlerinden biri olmasına rağmen, baş ve boyun bölgesindeki tüm kanserler arasında en yüksek mortalite oranına sahiptir. Genel olarak, tanısal görüntüleme, radyasyon ve

## 1. GİRİŞ

---

kemoterapideki gelişmelere ve iyileştirilmiş cerrahi tekniklere rağmen HFK'nin 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %40'lardadır (Braakhuis et al. 2014). Hastalığın geç evrede tanınması ve erken evrede tümörün bir belirti vermemesi sağkalımın düşük olmasının temel nedenleri arasında gösterilmektedir. Hipofarenks malin tümörleri kötü prognoza sahiptir. Bu tümörler, disfaji, globus hissi ve otalji gibi yavaş yavaş daha belirgin hale gelen genel faringeal semptomlarla karakterizedir (Wycliffe et al. 2007). Hipofaringeal karsinom, klinik olarak tespit edilmesi zor olabilen ve hastalığın boyutunun hafife alınmasına yol açabilen yüksek bir submukozal yayılım insidansı göstermektedir. Erken evrede tanınmasını sağlayacak belirgin semptomlar mevcut olmadığından, ileri evrede tanılanan hastaların yaklaşık %60-80'inde servikal metastazlar mevcuttur (Grégoire et al. 2018). Hastaların yaklaşık %75'inden fazlasında hipofarengeal kanserler ileri evrede (III ve IV) tanılanmaktadır (Petersen et al. 2018). Bütün bunlar HFK hastalarının kötü prognoza sahip olmalarının en temel nedenleridir. Diğer baş ve boyun kanserlerinde olduğu gibi karmaşık bir etiyojiye sahip olan HFK'nin en önemleri nedenleri arasında; tütün ve alkol kullanımı, yaş, cinsiyet, demir ve C vitamini eksikliği ve insan papilloma virüsü enfeksiyonu yer almaktadır (Wycliffe et al. 2007).

HFK teşhisi almış hastalar için uygulanacak olan tedavi yöntemleri, kanserin evresine, hastalığın sebebine ve nerede bulunduğuyla ilgili olarak değişmekle beraber genellikle cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve kombine tedavi gibi tedavi yaklaşımları mevcuttur. HFK hastalarının çoğu, cerrahi ve radyasyon tedavisini birleştiren tedavi seçeneğinden yararlanmaktadır. Radyoterapi tek başına da kullanılabilen bir tedavi yöntemidir. Ancak, T1 veya T2 gibi küçük lezyonlar için fayda sağladığı düşünülmektedir. Hiperfraksiyone radyasyon tedavisi ise HFK'nin daha fazla bölgesel kontrolünün sağlanması açısından standart radyoterapiye göre daha başarılı sonuçlar sağlamaktadır. Kemoradyoterapi, HFK tedavisinin etkili alternatif bir yöntemidir, ancak organ koruması gereken durumlarda organın işlev bozukluğuna neden olabilmektedir.

Kemoradyoterapi ile organ koruma tedavisi giderek daha fazla araştırılmakta ve hastaların yaklaşık %30'unda ciddi derecede yan etkilere neden olabileceği düşünülmektedir (Gourin and Terris 2004). Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapideki gelişmelere rağmen, HFK hastalarının ortalama sağ kalım oranlarında bir değişme olmamıştır (Cho et al. 2017). Çünkü, bu kanser türü uzak bölgelere metastaz yapabilen

ve hastalığın ilk evrelerinde kuvvetli belirteçleri olmayan daha çok ileri evrelerde tanısı konulabilen baş ve boyun kanseri türlerinden biridir. Dolayısıyla; metastazı önlemek ve hastaların yaşam sürelerini iyileştirmek için yeni stratejiler ve etkili metotlar geliştirmek gerekmektedir. Yeni tedavi yöntemlerinin gelişimini ilerletmek için de önemli biyobelirteçleri keşfetmek bir zorunluluk haline gelmiştir.

### 1.2.2. Dil kanseri

Melanom dışı deri kanserleri hariç, ağız içi kanserleri, baş ve boyun bölgesinin en sık görülen karsinomlarıdır. Skuamöz hücreli karsinom, bu bölgedeki neoplazmaların %90'ını oluşturmaktadır, geri kalan %10'luk kısmını ise tükürük bezi maligniteleri ve diğer yaygın olmayan tümörler oluşturmaktadır (Ettinger et al. 2019). Dil, dudak ve ağız tabanı ile birlikte, ağız boşluğu içerisinde en sık tutulum gösteren alt bölgeleri temsil etmektedir. Dilin üçte ikisi ağız boşluğunun bir parçası olarak kabul edilirken; üçte birlik kısmı ise dil tabanının bir alt bölgesi olarak kabul edilmektedir.

Son yıllarda ağız içi kanserlerinin tanı ve tedavisindeki mevcut ilerlemelere rağmen, dil skuamöz hücre karsinomu olan hastaların uzun vadede prognozu genellikle kötüdür (Aytatlı 2017). Dil kanseri hastalarının ileri evrede tanılanması prognozu etkileyen en önemli faktördür (Vokes et al. 1993; Swango 1996). Bunun yanı sıra cerrahi ve radyoterapideki gelişmelere rağmen, dil kanseri hastalarının 5 yıllık sağ kalımında son yıllarda önemli ölçüde ilerleme kaydedilememiş ve %50-55 seyrinde kalmıştır. Bunun temel sebepleri arasında geç tanılanma, bölgesel invazyon ya da uzak bölgelerde metastazların gelişmesi gösterilmektedir (Sano and Myers 2007).

Dil kanseri, aşırı alkol ve tütün kullanımının etkisiyle ortaya çıkan ve 60 yaş üstü erkek bireyleri daha çok etkileyen bir malignite olarak değerlendirilmesine rağmen, son zamanlarda yapılan çalışmalar alkol ve sigaraya maruz kalmayan genç yaştaki erkek hastalarda da insidansının önemli ölçüde arttığı kaydedilmiştir (Jeon et al. 2017). GLOBOCAN 2020 verilerine göre yeni tanılanan ağız boşluğu kanser vaka sayısı 380.000, kansere bağlı ölüm sayısı ise yaklaşık 180.000 kişi olarak bildirilmiştir (Çapık 2023).

Oldukça agresif özellikte bir kanser olan dil skuamöz hücre karsinomlarının tedavi seçenekleri, primer tümörün boyutuna ve konumuna, lenf düğümlerinin durumuna, uzak metastazların varlığına veya yokluğuna, hastanın uygulanacak tedaviyi tolere edebilme durumuna ve hastanın tercihinine göre değişkenlik göstermektedir. DSHK'ları için standart tedavi yaklaşımı genellikle cerrahidir. Ancak, ileri evrede tanılanan ve lenf nod metastazına sahip hastalar için hastanın yaşam kalitesini arttırmak adına ilk hatta uygulanan tedavi cerrahi yöntemleri içermemektedir. Radyoterapi ve kemoterapi tek başına tedavi seçeneği olarak nadiren uygulanan, genellikle birlikte uygulandığında etkili olabilen tedavi yöntemleridir (Hwa et al. 2015).

DSHK hastaları için standart tedavi yöntemleri klinikte yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bu hastaların mortalite ve 5 yıllık sağ kalım oranlarında belirgin bir azalma görülmemesi, aynı zamanda tüm dünyada mortalite ve insidansının artacağı beklentisi yeni tedavi yaklaşımlarının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Yeni tedavi yöntemlerinin gelişimini ilerletmek amacıyla da önemli biyolojik belirteçler keşfetmek bir zorunluluk haline gelmiştir.

### 1.3. MikroRNA'lar (miRNA'lar)

MikroRNA'lar (miRNA'lar) tek zincirli, yaklaşık 17-25 nükleotid uzunluğunda, endojen olarak sentezlenen ve hedef mRNA'ların hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyede gen ifadesini düzenleyen kısa RNA molekülleridir. Organizmaların gelişimi için kritik öneme sahip olan ve proteinlere dönüşmeyen bu RNA molekülleri, mRNA'ların 3'untranslated region (UTR) bölgelerini hedefleyerek bu RNA'ların parçalanmasına, bunun sonucunda da translasyonun durup hedef genlerin ifadelerinin azalmasına sebep olan süreçlerde yer alırlar (Vishnoi and Rani 2017, Lee and Dutta 2009). Bununla birlikte, mikroRNA'ların anormal ifadesi kanser dahil birçok insan hastalığı ile ilişkilidir (O'Brien et al. 2018). Bu nedenle, miRNA'ların düzenlenmesini, hedeflerini nasıl seçtiklerini ve nasıl sentezlendiklerini (biyogenezi) anlamak oldukça önemlidir.

### 1.4. MikroRNA'ların Keşfi

İnsan genom projesinin tamamlanması beraberinde bize gen tanımının genomun küçük bir yüzdesini oluşturan (yaklaşık %1,5-2) sadece protein kodlayan dizilerle sınırlı olmadığını, herhangi bir protein kodlamadığı halde genomun önemli ölçüde büyük bir bölümünün ifadesini düzenleyen “kodlamayan RNA” üreten genlerin var olduğunu ortaya koymuştur.

MikroRNA'ların hikayesi, Victor Ambros ve arkadaşlarının 1993 yılında yuvarlak solucanın (*Caenorhabditis elegans*) gelişim evresindeki kusurları araştırmak amacıyla genetik bir tarama yapmasıyla başlamıştır. Ambros, lin-4 geninin herhangi bir proteini kodlamadığını, bunun yerine lin-14 proteinin ifadesini baskılayan, yaklaşık 22 ve 61 nukleotid uzunluğunda küçük bir RNA oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır (Tétreault and De Guire 2013). 2000'li yıllara gelindiğinde ise Reinhart ve arkadaşları tarafından ilk memeli mikroRNA'sı olan, let-7 adı verilen, canlıların gelişim basamaklarının düzenlenmesinde rol alan ikinci bir mikroRNA türü keşfedilmiş ve türler arasında bu mikroRNA'nın korunduğu bulunmuştur (Reinhart et al. 2000). Bu keşif, beraberinde *C. elegans*, sirke sineği (*D. melanogaster*) ve insan genomlarının çok daha fazla sayıda mikroRNA barındırdığını ortaya çıkarmıştır (Vishnoi and Rani 2017).

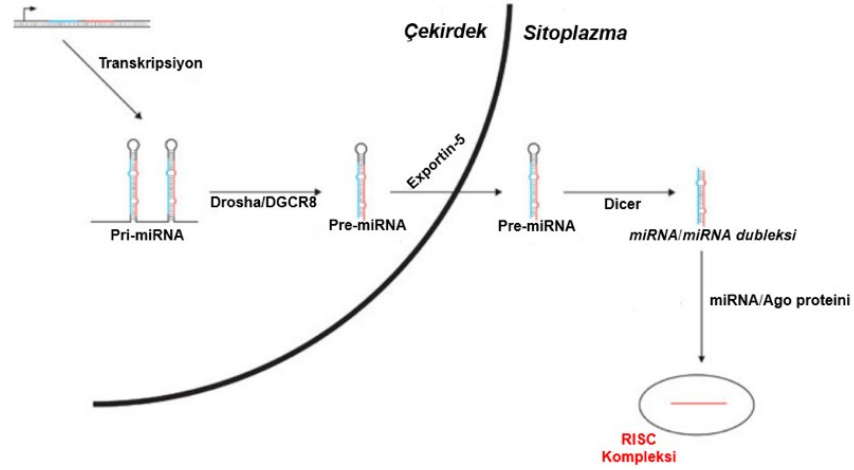
MikroRNA'lar, genomun protein kodlayan ekzon veya intron bölgelerinden ya da proteine dönüşmeyen 3' ve 5' UTR bölgelerindeki RNA'lardan üretilen, ancak proteine çevrilmeyen fonksiyonel RNA molekülleridir. Keşfedilmelerinden bu yana mikroRNA'ların rolleri ve yeni mikroRNA'ların bulunması açısından büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

MiRBase sayfasında, şimdiye kadar toplamda 38.589 mikroRNA tanımlanmış, bu mikroRNA'lardan, hem omurgalı hem de omurgasız hayvanlarda yüksek oranda korunmuş dizilere sahip 2654 tane olgun mikroRNA'nın (1917 prekürsör) insana ait olduğu belirlenmiştir (Kozomara et al. 2019).

### 1.5. MikroRNA Biyogenezi

MikroRNA biyogenezi, çekirdekte başlayıp sitoplazmaya kadar uzanan, üç temel adımdan oluşan bir süreçtir. İlk olarak RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen mikroRNA'ların; 5' ucuna şapka (cap), 3' ucuna poli (A) kuyruğu eklenir ve sonuçta birkaç kilobaz uzunluğunda birincil mikroRNA (pri-miRNA) olarak adlandırılan prekürsör bir transkript meydana gelir (Lee et al. 2004; Cai et al. 2004). Çekirdekte oluşan bu pri-miRNA'lar karakteristik bir saç tokası yapısı içerir ve gövdelerinde yaklaşık 33 baz çifti uzunluğunda kısmi olarak baz eşleşmesi yapmış bir bölgeye sahiptir (Bartel 2004; Carthew et al. 2009). Daha sonra bu pri-miRNA'lar Ribonukleaz III (RNase) enzimi olan DROSHA ve kofaktörü Di George Syndrome Critical Region 8 (DGCR8, Pasha)'den oluşan heterodimer yapıdaki mikroişlemci kompleks aracılığıyla 60-100 nükleotid (nt)'lik saç tokası yapıları prekürsör mikroRNA (pre-miRNA)'lara dönüştürülür.

Prekürsör hairpinin çekirdekte sitoplazmaya taşınımı ise nuklear taşıma reseptörü Exportin-5 (XPO5) ve nukleer protein Ran-GTP aracılığıyla gerçekleşir (Di Leva et al. 2014; Vishnoi and Rani 2017). Sitoplazmaya taşınan pre-mikroRNA'dan olgun bir mikroRNA'nın meydana gelmesi ise diğer bir RNase III enzimi olan Dicer tarafından gerçekleştirilir ve sonuçta yaklaşık 22 nt uzunluğunda çift zincirli RNA oluşur (Hutvagner et al. 2001; Ketting et al. 2001). Oluşan miRNA dupleksleri Argonaute (Ago) proteinleriyle birleşerek RNA ile indüklenmiş susturma kompleksini (RISC) meydana getirirler. Bu arada RNA dubleksinin çift zincirli yapısı gevşeyerek bozulur ve bir ipliği Ago'da olgun bir mikroRNA (rehber zincir) olarak kalırken diğer iplik (antiklavuz veya yolcu iplik) sitoplazmada parçalanır. RISC kompleksi içerisine dahil olan tek zincirli olgun mikroRNA'lar, Ago proteinleri aracılığıyla hedef mRNA'nın 3'UTR bölgeleri ile baz eşleşmesi yapması sonucunda ya hedef mRNA'nın stabilizasyonunu etkiler ya da translasyonun baskılanmasına neden olurlar (Bartel 2009; Djuranovic et al. 2011) (Şekil 1.10).



**Şekil 1.10.** MikroRNA Biyogenezini Anonymous (2008)'dan değiştirilerek alınmıştır

İnsan genomundaki genlerin %60'ından fazlasını hedefleyen mikroRNA'ların gen regülasyonunda oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (Friedman et al. 2009). Bu durumda, mikroRNA'lar aracılığıyla gerçekleştirilen gen regülasyonunun transkripsiyon sonrası (post-transkripsiyonel) gen ifadesini düzenleyen mekanizmalar arasında oldukça etkili olduğunu göstermektedir.

### 1.6. Kanser Gelişiminde mikroRNA'ların Rolü

Karsinogenez; sağlıklı bir hücrenin tümör hücrelerine dönüştüğü ve belirli bir kitle oluşturmak için çoğaldığı heterojenik bir süreçtir. Bu temel süreçte en önemli mekanizmalar, tümör hücrelerinin anormal bir şekilde çoğalması ve apoptozdan kaçmasıdır. MikroRNA'lar ise hücrelerin çoğalması ve apoptoz gibi temel birçok biyolojik olaylarda kilit rol üstlenmişlerdir.

MikroRNA'ların karsinogenez sürecinde önemli rol oynadığı ilk kez Calin ve arkadaşları tarafından 2002'de, B hücreli kronik lenfositik lösemide (KLL) sıklıkla silinen bir bölge olan 13q14.3 kromozomal lokusunda yer alan miR-15a ve miR-16-1'den oluşan bir kümenin tanımlanmasıyla ortaya çıkarılmış ve 13q14 kromozomal bölgenin silinmesi de bu iki mikroRNA'nın kaybına yol açmıştır (Calin et al. 2002). Bu durumda, mikroRNA'ların insan kanserinin patogeneziinde rol oynayabileceğine dair ilk kanıt ortaya koymuştur. Bu ilk çalışmadan sonra yapılan birçok çalışmada da çeşitli kanser

## 1. GİRİŞ

---

hücre hatlarında ve klinik tümör örneklerinde giderek daha fazla sayıda mikroRNA'nın anormal şekilde ifade edildiği gösterilmiştir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, mikroRNA'ların insan kanserlerinde kapsamlı bir şekilde deregüle edildiği ve tümör başlangıcı, büyümesi, metastazı ve ilerlemesinde önemli roller oynadığını göstermiştir (Ali Syeda et al. 2020). Bütün kanserlerin patofizyolojisini etkilediği düşünülen mikroRNA'ların, olgun veya öncü transkriptlerinin anormal ekspresyonu, normal dokulara kıyasla birkaç farklı tümör dokusunda karakterize edilmiştir. Çalışmalar ayrıca belirli tümör tipleri ile ilişkili olan farklı mikroRNA ifade profillerinin de olduğunu göstermiştir (Ross and Davis 2011). Belirli kanser türlerinde tanımlanan, spesifik mikroRNA'ların anormal seviyelerine ek olarak, mikroRNA'ların kanser gelişimi ve ilerlemesinde önemli rolü olduğunu gösteren biyolojik kanıtlar, hayvan modelleriyle birlikte insan kanser hücre hatlarında da deneysel olarak gösterilmiştir (Takamizawa et al. 2004). Örneğin; meme, kolon ve akciğer kanserlerinde ifadesi azalan let-7'nin, Ras ve Myc gibi önemli onkogenlerin ifadesini baskılayan tümör süpresör özellikte bir mikroRNA olduğu gösterilmiştir (Thammaiah and Jayaram 2016; Johnson et al. 2005; Manier et al. 2017). Nazofaringeal karsinom hastalarında, miR-331-3p'nin ifadesinin azaldığı ve artan ekspresyonunun da apoptozu tetikleyerek hücre çoğalmasını tamamen baskıladığı ortaya çıkarılmıştır (Xuefang et al. 2020). miR-200 ailesine ait, önemli mikroRNA'lardan biri olan miR-200c-3p'nin nöroblastoma doku ve hücrelerinde önemli ölçüde aşağı regüle olduğu ve artan miR-200c-3p ifadesinin nöroblastoma hücrelerinin migrasyon, invazyon ve proliferasyon kapasitelerini FRS2 genini hedefleyerek inhibe ettiği gösterilmiştir (Li et al. 2019). Bu tümör baskılayıcı mikroRNA'ların aksine, bazı mikroRNA'ların da yukarı regüle oldukları ve onkogenik fonksiyon gösterdikleri bilinmektedir. MiR-483'ün koleraktal tümörlerde normal gruplara göre ifadesinin arttığı, koleraktal kanserin gelişimi ve nüks etmesiyle ifade artışının paralel yönde ilerlediği gösterilmiştir (Zhou et al. 2021). Bir başka çalışmada, miR-125b'nin ifadesinin baskılanmasının apoptozu indüklediği, G1/S fazında hücre döngüsünü durdurduğu ve akciğer kanseri hücrelerinin invazyon kapasitelerini azalttığı gösterilmiştir (Wang et al. 2015b). MiR-7 gibi bazı spesifik mikroRNA'lar ise hem onkogenleri hem de tümör baskılayıcı genleri hedefleyerek hem onkogenik (oncomiR) hem de tümör süpresör mikroRNA olarak fonksiyon gösterebilirler (Svoronos et al. 2016).

## 1. GİRİŞ

Yapılan çeşitli çalışmalar mikroRNA'ların tümör oluşum sürecinin başlaması, hücrelerin çoğalması, göç etmesi ve yeni damarların oluşması gibi karsinogenezin birçok kritik sürecinde önemli rol oynadığını göstermiştir (Kong et al. 2012). Çizelge 1-1 ve Çizelge 1-2'de baş boyun kanserleri ile ilişkilendirilmiş bazı mikroRNA'lar, hedef genleri ve rolleri gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Baş ve boyun kanseriyle ilişkilendirilmiş ve yukarı regüle olan mikroRNA'lar, hedef genleri ve rolleri.

mikroRNA	Hedef Gen	Biyolojik Etki	İfade Seviyesi	Kanser Türü	Referans
MiR-183	MTA1	Tümör geniz inhibisyonu	↑	Nazofarengeal	(Wang, Wang and Li 2017a)
MiR-503	WEE1	Radyoterapiye Hassasiyetin artması	↑	Laryngeal	(Ma et al. 2017)
MiR-145	SOX2, OCT4, KLF4, ABCG2	Kanser kök hücre özelliklerinin ortadan kalkması	↑	Laryngeal	(Karatas et al. 2016a)
MiR-451	RAB14	Radyoterapiye hassasiyetin artması	↑	Nazofarengeal	(Zhang et al. 2014)
MiR-146b	HBP1	Hücre çoğalması, invazyonun artması	↑	Oral skuamöz hücre karsinomu	(Li et al. 2020)
MiR-19b	KRAS	Sisplatine duyarlılığın artması	↑	Nazofarengeal	(Zhang et al. 2018)
MiR-512-5p	hTERT	Tümör büyümesinin baskılanması	↑	Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom	(Li et al. 2015)
MiR-146a	IRAK1, TRAF6 ve NUMB	Tümör oluşumuna neden olan özelliklerin artması	↑	Oral karsinom	(Hung et al. 2013)
MiR-155	SOCS1/STAT3	Hücre çoğalması ve invazyon artması	↑	Laryngeal	(Zhao et al. 2013)

## 1. GİRİŞ

**Çizelge 1.2.** Baş ve boyun kanseriyle ilişkilendirilmiş ve aşağı regüle olan mikroRNA'lar, hedef genleri ve rolleri.

mikroRNA	Hedef Gen	Biyolojik Etki	İfade Seviyesi	Kanser Türü	Referans
MiR-188	SIX1	Hücre çoğalması ve göçünde artış	↓	Oral skuamöz hücre karsinomu	(Wang and Liu 2016)
MiR-27b-5p/ miR-372-5p	MEHP	Hücre çoğalmasını uyarır	↓	Oral skuamöz hücre karsinomu	(Wang et al. 2019b)
MiR-1254	CD36	Hücre çoğalması ve invazyonunda artış	↓	Oral skuamöz hücre karsinomu	(Chen, Zhang and Zhang 2019a)
MiR-125b	PRXL2A	Kemoterapötik direnç ve oksidatif stresin artması	↓	Oral skuamöz hücre karsinomu	(Chen et al. 2019b)
MiR-129-5p	APC	Apoptozun artması	↓	Laryngeal	(Li et al. 2013)
MiR-5191	NOTCH2	Migrasyon, invazyon ve proliferasyonun artması	↓	Tükürük bezi adenoid kistik karsinom	(Li et al. 2022)
MiR-873-5p	SEC11A	Migrasyon, invazyon ve proliferasyonun baskılanması ile apoptozun tetiklenmesi	↓	Dil skuamöz hücre karsinomu	(Yao et al. 2022)
MiR-99a	MTMR3	Metastazın artması	↓	Oral skuamöz hücre karsinomu	(Kuo et al. 2014)
MiR-370	IRS1	Tümör fenotiplerinin inhibe olması	↓	Oral skuamöz hücre karsinomu	(Chang et al. 2013)

Sonuç olarak, mikroRNA'ların malin dokulardaki ekspresyonlarının, ekspresyon paternlerindeki değişikliklerinin ve hedef mRNA'larının belirlenmesinin kanserin erken teşhisi, tedavisi ve prognozunda oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

### 1.7. Kanserleşme Sürecinde miR-200c-3p ve Roller

İnsan genomunun, %60'ından fazlasını düzenlediği tahmin edilen MikroRNA'larda meydana gelen düzensizlikler, baş ve boyun kanseri dahil çeşitli karsinogenez sürecinde oldukça etkilidir. Bu mikroRNA'lardan biri de miR-200 ailesidir. MiR-200 ailesi kanserde en yaygın şekilde çalışılan mikroRNA'lar arasındadır.

hsa-miR-200a-3p, hsamiR-200b-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-141-3p ve hsa-miR-429'u içeren miR-200 ailesi, genellikle tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren bir mikroRNA grubudur ve epitel mezankimal geçişi (EMT'yi) baskılamada oldukça önemlidir. Bu mikroRNA ailesi kromozomal konumlarına ve çekirdek dizilerine göre miR-141/200a ve miR-200b/200c/429 şeklinde iki alt gruba ayrılmaktadır. Her bir grup, birbirinden bağımsız iki farklı polisistronik pri-mikroRNA transkripti şeklinde ifade edilir (Tang et al. 2013). MiR-200b/200c/429 grubu 1. kromozomun kısa kolu üzerinde yer almasına karşın; miR-141/200c grubu da 12. kromozomun kısa kolu üzerindedir (Saleeb et al. 2019). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bu mikroRNA ailesinin hücre invazyonu, hücre göçü, hücre proliferasyonu ve ilaç direnci ile ilişkili farklı kanser türlerinde önemli rol oynayabildiği bildirilmiştir (Valladares-Ayerbes et al. 2012). Ayrıca, çeşitli ifade profil çalışmaları, farklılaşmış epitel dokularının miR-200 ailesi bakımından zenginleştiğini göstermiştir. Bu nedenle, miR-200 ailesi üyelerinin kanser hücresi epitel fenotipinin güçlü bir belirteci ve temel düzenleyici faktörü olduğu öne sürülmüştür (Valladares-Ayerbes et al. 2012). Metastazın önemli bir adımı olan EMT sürecinde miR-200 ailesinin üyelerinde meydana gelen ifade kaybının, E-kaderinin baskılanmasına ve buna paralel, hücre göçü ve hücre invazyonun artmasına ve dolayısıyla da kanser progresyonuna katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (Korpal et al. 2008).

MiR-200 ailesinin önemli bir üyesi olan miR-200c-3p, farklılaşmış epitelyal dokularda güçlü bir biyobelirteç olarak keşfedilen düzenleyici bir faktördür (Korpal et al. 2008). Danarto et al. (2020) miR-200c-3p'nin metastatik prostat kanseri dokularında metastatik olmayan doku örneklerine göre ifadesinin azaldığını ve prostat kanseri hastaları için bir biyobelirteç olarak işlev görebileceğini rapor etmişlerdir. İlginç bir şekilde hem bölgesel hemde metastatik meme kanseri tümör ve serum örneklerinde miR-200c-3p'nin yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir (Navarro-Manzano et al. 2022).

## 1. GİRİŞ

---

Karataş et al. (2016b) tarafından CD133+ ve CD133-larenks skuamöz hücre karsinom (LSHK) örneklerinin mikroRNA profil karşılaştırmasının yapıldığı başka bir çalışmada miR-200c-3p ifadesinin CD133+ larenks kanser kök hücrelerinde kayda değer bir oranda azaldığı ortaya çıkarılmıştır. MiR-200c-3p'nin kök hücrelerle ilişkili özelliklerin kazanılması ve sürdürülmesinin yanı sıra, kemoterapi direnci, tümör gelişimi ve metastazında da rol oynadığı bilinmektedir (Wang et al. 2010). MiR-200c-3p'nin azalan ifadesi prostat kanseri dokularında gösterilmiş ve prostat kanseri için bir biyobelirteç olarak işlev görebileceği ifade edilmiştir (Zhang et al. 2019). Over kanseri alt gruplarını içeren mikroRNA profillemeye çalışmasında, farklı şekilde ifade edilen birkaç mikroRNA tanımlanmış ve bu da mikroRNA'ların karsinogenez sürecinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Özellikle de EMT sürecinde etkili olan miR-200c ailesinden miR-200c-3p'nin yüksek düzeyde ifade edildiği ve ifadedeki bu artışın da hastaların sağ kalımı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Vilming Elgaaen et al. 2014). Ardila et al. tarafından yapılan bir çalışmada ise kolorektal kanser ve ileri evre adenom hastalarına ait serum ve doku örneklerinde, miR-200c-3p'nin ifadesi değerlendirilmiş, kolorektal kanser hastalarına ait serum örneklerinde kontrol grubundaki hastalara oranla daha yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir. Bununla beraber, adenom hastalarına ait serum örneklerinde diğer gruplardaki hastalara ait serum örneklerine göre miR-200c-3p yüksek olması kolorektal kanser taraması ve önlemi için iyi bir aday olabileceğini ortaya koymuştur (Ardila et al. 2019).

Diğer mikroRNA'larda olduğu gibi miR-200c-3p de terapötik direncin oluşumunda oldukça etkilidir. Meme kanseri hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada, miR-200c-3p'nin MDR1 ifadesini baskılayarak hücrelerin doksorubisine karşı hassasiyetini arttırdığı belirtilmiştir (Safaei et al. 2022). Aynı şekilde, Olaparib dirençli yumurtalık kanseri hücrelerine miR-200c-3p transfeksiyonu sonrası, miR-200c-3p'nin dirençli hücrelerde Olaparib'in antikanser etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (Anastasiadou et al. 2021). Renal hücreli karsinom hücre hatlarının kullanıldığı başka bir çalışmada, miR-200c-3p'nin SLC6A1 ifadesini baskılayarak invazyon ve migrasyonu engellediği belirtilmiştir (Maolakuerban et al. 2018).

### 1.8. Kanserleşme Sürecinde miR-363-3p ve Roller

İnsan X kromozomu üzerinde yer alan miR-363-3p, miR-106a-363 kümesinden türetilen mikroRNA'lardan biridir (Zhou et al. 2022). Daha önce yapılan pek çok çalışmada farklı kanser türlerinde ifadesinin bozulduğu bildirilen miR-363-3p'nin, tümör gelişimi ve progresyonunda önemli rol oynadığı ifade edilmiştir (Ma et al. 2020). Onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak karakterize edilen mikroRNA'lar, farklı kanserlerde farklı işlevlere sahip olabilirler (Vannini et al. 2018). Bu mikroRNA'lar arasında olan miR-363-3p'nin artan ifadesi mide ve glioblastomanın agresifliği ile paralellik göstermesine karşın; karaciğer kanseri (Ying et al. 2017), kolorektal kanser (Hu et al. 2016), akciğer kanseri (Wang et al. 2017b) ve baş ve boyun kanseri (Sun et al. 2013) gibi birçok tümör çeşidinde ifade düzeyinin azaldığı belirtilmiştir. Osteosarkom vakalarında miR-363-3p'nin ifade seviyesinin düştüğü, ileri *in vitro* fonksiyonel çalışmalarda osteosarkom hücre hatlarında miR-363-3p'nin ifade düzeyinin arttırılmasının SOX4'ün baskılanmasını ve malin fenotipin ortadan kalkmasını teşvik ettiği bildirilmiştir (Wang et al. 2019a).

Yapılan çalışmalarda, çeşitli mikroRNA'ların birçok tümörün kemoterapi direncine aracılık edebildiği gösterilmiştir. Taksole karşı dirençli hale getirilen yumurtalık kanseri hücre hatlarında ve hastalardan elde edilen doku örneklerinde miR-363'ün önemli düzeyde ifadesinin arttığı gösterilmiş, artan miR-363'ün yumurtalık kanseri hücrelerinin taksole karşı direnç mekanizmasının gelişmesini desteklediği ve yumurtalık kanseri hastalarının düşük sağ kalımı ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Mohamed et al. 2018). İlginç bir şekilde, küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinde ise miR-363-3p'nin transfeksiyonu sonrası hücrelerin gemsitabine karşı hassasiyet geliştirdiği gösterilmiş, azalan miR-363-3p ifadesinin gemsitabine karşı direnç oluşmasına katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Bian et al. 2021).

Hücre hatlarının kullanıldığı bir diğer çalışmada, miR-363-3p'nin PTEN ve BIM gibi önemli tümör süpresörlerin ifadesini baskılayarak apoptozu engellediği ve lösemi hücrelerinin büyümesini teşvik ettiği belirtilmiştir (Drobna et al. 2020). Bunun yanı sıra, rolü tam aydınlatılamamış olsa da miR-363-3p'nin glioma kanserlerinde onkomiR olarak davrandığı, glioma hastalarına ait tümör dokularında yüksek düzeyde ifade edildiği, bu

nedenle glioma için potansiyel terapötik bir hedef olarak düşünülebileceği rapor edilmiştir (Xu et al. 2018). Karaciğer kanseri hastalarına ait serum örneklerinde, miR-363-3p'nin yüksek olması karaciğer kanserinin gelişiminde miR-363-3p'nin önemli bir role sahip olabileceğini ve potansiyel bir biyolojik belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Zhang et al. 2016). Bu bulguların yanı sıra, CD133+ ve CD133- LSHK örneklerinin mikroRNA profil karşılaştırması yapılmış, miR-363-3p'nin CD133+ larenks kanseri kök hücrelerinde önemli ölçüde azalan ifade profiline sahip olduğu tespit edilmiştir (Karatat et al. 2016).

Bu bilgiler ışığında, baş ve boyun kanserlerinde miR-363-3p ve miR-200c-3p'nin tümör süpresör fonksiyona sahip oldukları söylenebileceği ve miR-363-3p ve miR-200c-3p'nin baş ve boyun kanserleri için de potansiyel biyobelirteç olabilecekleri hipotezi oluşturulmuştur.

### 1.9. Taksol ve Taksole Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Hücrelerde mikrotübüllerin  $\beta$  alt ünitelerine bağlanarak tubulin polimerleşmesini stabil hale getiren Taksol (Paklitaksel), meme, yumurtalık ve baş ve boyun kanserleri başta olmak üzere pek çok kanserin tedavisinde kullanılan antineoplastik özellikte bir kemoterapi ajanıdır. Hücre iskeletinin temel bileşeni olan bu mikrotübüller, tüm ökaryotik hücrelerde korunmuş, uzun, iplikli yapıda tüp şeklindeki proteinlerdir (Jordan and Wilson 2004). Antikanser tedavisi için en başarılı hedefler arasında olan dinamik yapıdaki mitotik iğcikli mikrotübülleri hedefleyen ilaçlar, bu dinamik yapının bozulmasına, mitozun engellenmesine yol açar. Bunun sonucunda da proliferatif kapasiteleri baskılanan hücreler apoptoza yönlendirilir (Yang et al. 2009; Nogales et al. 1995).

Taksol antimitotik etkisini, mitoz bölünmedeki kontrol noktaları aracılığıyla gerçekleştirir. Bölünmenin, metafaz safhasında ekvatorial düzlemde yer alan kromozomlar anafaz safhasına geçişle birbirinden ayrılmaya ve iğ ipliklerinin yardımıyla zıt kutuplara çekilmeye başlarlar. Bu noktada, kromozomların her birinin hücreye eşit bir şekilde dağılabilmesi için her kromatit, kinetokor bölgeleri aracılığıyla mikrotübüllere (iğ ipliklerine) bağlanır. Bu sırada kinetokorlara iğ ipliklerinin bağlanma durumu, kontrol

## 1. GİRİŞ

---

noktasındaki proteinler tarafından kontrol edilir ve sıkı şekilde bağlanmamış olan iğ iplikleri, anafaz uyarıcı kompleksinin inhibisyonunu sağlayarak mitoz bölünmeyi durduran bir sinyal yolağının aktivasyonuna yol açar ve hücre döngüsü mitoz bölünmeyi gerçekleştiremez. Taksol ise bölünme aşamasında kinetokorlara gevşek bir şekilde bağlanan iğ iplikleri sayesinde mitoz bölünmenin gerçekleşmemesine neden olur (Waters et al. 1998; Kops et al. 2005; Lara-Gonzalez et al. 2012). Baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ya da kemo-radyoterapi gibi terapötik yaklaşımlar mevcuttur. Ancak, tedavide uygulanacak cerrahi metotların uygulanan organın fonksiyonunu bozduğu da bilinmektedir. Bu nedenle baş ve boyun kanseri hastalarının tedavisinde, radyoterapi ve kemoterapi ya da bu ikisinin kombinasyonunun kullanımına yönelik bir eğilim vardır. Kemo-radyoterapi, primer olarak orofarenks, nazofarenks ve hipofarenks bölgelerinde gelişen ve ilerleyen kanserlerde organ fonksiyonunun korunmasına yardımcı olmakta ve avantajlı bir tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, kemoterapi ya da kemo-radyoterapi, tümörün ilerlemesini kontrol altına almak ve ileri evre (III veya IV) baş ve boyun kanserli hastaların sağ kalım sürelerini uzatmak için de umut verici yöntemler olarak düşünülmektedir (Kawashita et al. 2020). Ancak, kemoterapi tedavisinde ortaya çıkabilecek olan kemoterapi direnci ise tümörün ilerlemesine, nüksetmesine ve hastaların uzun vadeli sağ kalım oranlarının düşmesine neden olabilmektedir (Kawashita et al. 2020).

Baş ve boyun kanserli hastaların tedavisinde taksan grubunu içeren yeni kemoterapi ajanlarının geliştirilmesine yönelik yapılan bir çalışmada, neoadjuvan tedavilerin taksanları içermesi, larenksin korunurluğunu arttırmış ve terapiye verilen yanıt oranlarında gözle görülür bir iyileşme sağlamıştır. Bunun sonucunda, taksan grubunu içeren neoadjuvan terapi yöntemleri, baş ve boyun kanserli hastaların tedavisinde standart bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaya başlanmıştır (Salvador-Coloma and Cohen 2016). Tüm bu bulguların yanı sıra, taksan grubu bileşiklerin BBK hastalarının tedavisinde kullanım şekline dair net bir prosedürün bulunmaması ve uzun süreli kullanımı, baş ve boyun kanseri hücrelerinin direnç mekanizması geliştirmesine yol açmıştır. Direnç mekanizmasının gelişimi ise tümör hücrelerinin metastaz yapmasına ve sekonder tümör bölgelerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Mody et al. 2016; Woo et al. 2017).

## 1. GİRİŞ

---

Kanser kök hücrelerinin varlığı, apoptozun baskılanması, DNA onarım mekanizmasındaki bozukluklar, artan ilaç akışı ve epitel mezankimal geçiş dahil kemoterapötik ajanlara karşı tümör hücrelerinin direnç göstermesini destekleyen pek çok sayıda mekanizma bulunmaktadır (Bayraktar and Van Roosbroeck 2018; Wang et al. 2015a).

Taksol direnç mekanizmalardan en iyi bilineni ve en etkili olan artan ilaç akışına neden olan ABC taşıyıcılarıdır. ABC transporter ailesine dahil olan P-gp'nin bazı kanser hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilmesi taksol gibi kemoterapötik ilaçların hücre yüzeyinde bulunan atım pompası aracılığıyla hücreden dışarı atılmasına ve hücre içi konsantrasyonlarının azalmasına yol açar (Gottesman and Pastan 1993). Ökaryotik hücrelerde Sitokrom P450 (CYP) olarak adlandırılan bir grup protein taksol gibi çeşitli kemoterapötik ilaçların metabolize edilmesini sağlamaktadır. Kanser hücrelerinde normal hücrelere göre daha yüksek düzeyde ifade edilebilen bu proteinler, taksolün hücre içi metabolize edilme etkinliğini sınırlandırması sonucu taksolün hücre içi konsantrasyonlarının azalmasına ve tedavi etkinliğinin ortadan kalkmasına yol açmaktadır. Bunun sonucunda taksolün tedavi etkinliğinin düşmesi tümör hücrelerinin bu ilaca karşı direnç geliştirilmesi ile ilişkilendirilebilir (Jibodh et al. 2013).

Taksol, hücrenin mitotik faza girmesini engelleyen ve iğ ipliklerinin oluşumundan sorumlu olan tübülün proteinleri ile mikrotübüller arasındaki dengenin değişmesine neden olan anti-mitotik bir ajandır. Ökaryotik hücrelerde tübülün proteinlerinin, taksole karşı bağlanma afiniteleri değişen çeşitli izotipleri bulunmaktadır. Bu izotiplerden herhangi birinde meydana gelecek olan mutasyonlar, o izotipin hücrede yüksek düzeyde ifade edilmesine, bunun sonucunda da taksole bağlanma afinitesinin artmasına yol açar. Yapılan çeşitli çalışmalarda tubulin proteininin  $\beta$ III izoformunun artan ifadesi çeşitli kanserlerde taksole karşı meydana gelen direnç mekanizması ile ilişkilendirilmiştir (Parker et al. 2017). Bir organizmanın dokularını yeterince oksijen ile besleyemediği durumda ortaya çıkan hipoksida hücrelerde çeşitli değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Bu değişikliklerden birisinde kanser hücrelerinde anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 ile hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF1- $\alpha$ )'nın artan etkileşimi sonucu pro-apoptotik mekanizma baskılanır ve apoptotik mekanizmanın ortadan kalkmasına yol açar. Bunlara ek olarak, artan HIF1- $\alpha$ , EMT ve kanser kök hücrelerle ilişkili proteinlerin ifadesinin

artmasına neden olur. Dolayısıyla, hücrelerde azalan taksol aktivitesi taksol ile uyarılan hücrenin apoptotik mekanizmalara karşı bir direnç ortaya koymasına yol açar (Sermeus et al. 2012; Karakashev and Reginato 2015).

### 1.10. SSFA2 (KRAP; ITPRID2)

KRAP olarak da bilinen SSFA2, KRAS ile indüklenen aktin etkileşimli bir genidir. İlk olarak, HCT116 insan kolon kanseri hücrelerinde KRAS tarafından up-regüle edilen genlerden biri olarak tanımlanan KRAP, karaciğer, pankreas, kahverengi yağ dokusunun yanı sıra yetişkin bir farenin nadiren iskelet veya kalp kasında da ifade edildiği bilinmektedir (Zhu et al. 2019; Fujimoto et al. 2009). SSFA2, normal kolon epitelinde nadir olarak ifade edilmesinin yanı sıra bazı kanser hücrelerinde deregüle ekspresyona sahip olduğu gözlemlenmiştir. İnsanlarda KRAP mRNA seviyesi en güçlü şekilde pankreas ve testis dokularında belirlenmesine rağmen, diğer organlarda da az da olsa ifadesinin olduğu gözlemlenmiştir (Inokuchi et al. 2004). KRAP, balıktan memeli türüne kadar yapısal olarak korunmuş bir gen olmasına rağmen, ekspresyon paterni ve işlevi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, KRAP'ın insan ve farede yüksek dizi benzerliğine sahip olması, fizyolojik olarak bu genin oldukça önemli rollere sahip olabileceğini düşündürmektedir (Fujimoto et al. 2007). Son yıllarda yapılan çok sayıda araştırma, SSFA2'nin kanser için potansiyel bir hedef olabileceğini ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada, SSFA2'nin tercihen karaciğere yayılan küçük hücreli akciğer kanseri metastazıyla bağlantılı olduğu rapor edilmiştir (Kakiuchi et al. 2003). Lenfoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada, p38 MAPK inhibisyonunun, SSFA2'nin ekspresyonunu azalttığı ve kronik lenfositik lösemide proliferatif fenotipi etkileyebileceği tespit edilmiştir (Lin et al. 2004). Glioma hücrelerinde ise azalan SSFA2 ifadesi, hücrelerin çoğalma kapasitesini azaltmış ve IL1A, IL1B and CDK6 ifadelerini düzenleyerek hücreleri erken apoptoza teşvik ettiği ortaya çıkarılmıştır (Zhu et al. 2019). Tüm bunlara ek olarak mevcut olan diğer veriler, SSFA2'nin karsinogenez sürecinde malignite gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Amatschek et al. 2004; Murillo et al. 2006). KRAP, filamentli aktin (F-aktin) ile ilişkili bir sitoplazmik proteini kodlar ve bu protein, hepatositlerin ve pankreatik acinar hücrelerin apikal kutbu çevresinde lokalizedir (Inokuchi et al. 2004; Fujimoto et al. 2007). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada KRAP eksikliği olan farelerin belirgin gelişimsel kusurları olmamasına rağmen, doğumdan sonra deri altı dokusunda yağ birikiminin azaldığı ve

gelişmiş glikoz metabolizması sergilediği gösterilmiş, bu durum KRAP'ın fizyolojik olarak sistemik enerji homeostazının düzenlenmesine katıldığını düşündürmüştür (Fujimoto et al. 2009).

KRAP'ın susturulduğu fare modellerinde, farelerin normal bir yaşam süresine sahip olduğu ve doğurganlığının etkilenmediği gösterilmiştir. Ancak, bu fareler yabancıl türlere göre sütten kesildikten sonra daha az kilo alımı ve daha zayıf bir görünüm sergilemişlerdir. Daha da önemlisi, KRAP yoksun fareler, yüksek yağlı bir diyet altında diyete bağlı kilo alımına, yağlı karaciğer oluşumuna ve insülin direncine karşı korunmuştur ve bu da KRAP'ın obezite ve ilgili hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceğini göstermektedir (Fujimoto and Shirasawa 2011). KRAP'ın metabolizma, hücre iskeleti ve hücre göçünü düzenlemesindeki fonksiyonunun daha fazla açıklanmasının yanı sıra, KRAP aracılı kontrol edilen sinyal yollarının tümör oluşum sürecindeki rollerinin daha iyi anlaşılması karsinogenez sürecindeki moleküler mekanizmaları daha net şekilde anlamamıza yardımcı olacaktır. Bununla birlikte yapılan literatür taraması sonucu, SSFA2'nin baş ve boyun kanserlerinde malign fenotipin oluşum süreci ile alakalı yeterince bilgi olmadığı da ortaya çıkarılmıştır.

### 1.11. IP3R1 Aracılı $Ca^{2+}$ Salınımı Karsinogenez Sürecinde Oldukça Önemlidir

İnsan vücudundaki en yaygın ikinci haberci olan hücre içi kalsiyum iyonları ( $Ca^{2+}$ ), gen ekspresyonu, hücre döngüsü kontrolü, hücre hareketliliği, otofaji ve apoptoz gibi hemen hemen tüm hücresel yollarda etkili bir sinyal molekülüdür (Berridge et al. 2000; Schrödl et al. 2009). Bu sinyal molekülü özellikle proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengenin sağlanması açısından gereklidir. Hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında ortaya çıkan dengesizlikler ise kansere neden olan önemli bir mekanizmadır (Schrödl et al. 2009).

Normal  $Ca^{2+}$  sinyalinin bozulması, malign fenotiplerin gelişimine katkıda bulunan bir süreçtir. Karsinogenez sürecinde, kanser hücreleri, yüksek oranlarda çoğalmak, hücre hareketliliğini arttırmak, bağışıklık sisteminden kaçmak ve yeniden damarlaşmayı sağlayabilmek için  $Ca^{2+}$  sinyallerini yeniden şekillendirmek zorundadırlar. Tümörijenik

yolakların,  $Ca^{2+}$  kanallarının, taşıyıcıların veya  $Ca^{2+}$ -ATPazların değişmiş ifade seviyesi veya anormal aktivasyonu ile ilişkili olduğuna dair artan bir farkındalık vardır (Cui et al. 2017). Bu önemli kanallardan biri de inositol 1,4,5- trisfosfat reseptör (IP3R)'leridir.

İnositol 1,4,5-trisfosfat reseptörü (IP3R)'nün dokular arasında farklı şekilde ifade edilen üç alt tipi mevcuttur ve her biri Endoplazmik Retikulumun (ER) zarları üzerinde özelleşmiş  $Ca^{2+}$  salınım kanalı olarak fonksiyon göstermektedir. IP3R'nin hücre içerisindeki uygun lokalizasyonu, fonksiyonu açısından oldukça önem arz etmektedir (Fujimoto et al. 2011c). Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalarla IP3R'nin özellikle tip I izoformunun (IP3R1) IP3 kaynaklı  $Ca^{2+}$  salınımından,  $Ca^{2+}$  salınım kapasitesinden ve hücrelerin çoğalmasından birincil derecede sorumlu olduğu gösterilmiş (Wang et al. 2001) ve IP3R1 aracılı  $Ca^{2+}$  artışının, mitokondriyal apoptozun indüklenmesi için de önemli bir sinyal olduğu bildirilmiştir (Assefa et al. 2004). Ayrıca, IP3R1 ifadesindeki değişiklikler tümörün biyolojik özellikleriyle de ilişkilendirilmiştir. Mesane kanseri hücre hatlarında, sisplatine karşı direnç gelişimi, IP3R1 ifadesinin sisplatin kaynaklı aşağı regülasyonu ile ilişkilidir. Bu verilerle paralel olarak, IP3R1'in susturulduğu mesane hücrelerinde apoptotik mekanizmanın baskılanması hücrelerin sisplatine karşı daha dirençli hale gelmesine neden olmuştur (Tsunoda et al. 2005). Jurkat hücrelerinde de azalan IP3R1 ifadesi apoptozun önemli ölçüde inhibisyonuna yol açmıştır. Diğer taraftan bu hücrelerde IP3R1'in aşırı ifadesi, sitozolik  $Ca^{2+}$  seviyesinin artmasına ve buna bağlı olarak da apoptozun tetiklenmesine neden olmuştur (Jayaraman and Marks 1997).

### 1.12. SSFA2 ve IP3R Arasındaki İlişki

IP3 reseptörü etkileşimli bölge içeren protein 2 (ITPRID 2) olarak da bilinen SSFA2, IP3R'nin hücre içi lokalizasyonu ve fonksiyonel aktivitesi açısından oldukça önemli bir moleküldür (Fujimoto et al. 2011b; Fujimoto et al. 2011c). siRNA aracılı KRAP ifadesinin ortadan kaldırılmasıyla hücrelerde IP3 reseptörü ifadesinin artmasına ve buna paralel de sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun artmasına neden olmuştur. Aksine, KRAP'ın yüksek düzeyde ifade edildiği hücrelerde IP3 reseptörünün aktivitesini kaybettiği ve bunun sonucunda da sitozolik  $Ca^{2+}$  miktarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Thillaiappan et al. 2021). Bu nedenle KRAP, IP3 reseptörlerinin hücresel konumunun belirlenmesinde ve işlevsel olmasında oldukça önemlidir ve daha yüksek IP3R seviyeleri ise  $Ca^{2+}$  sinyallerinin oluşumu için oldukça gereklidir (Vorontsova et al.

2022). Bir başka çalışmada ise, KRAP'ın susturulduğu farelerde, IP3 reseptör alt tiplerinin karaciğer ve pankreas dokularında lokalizasyonunun bozulduğu gösterilmiştir. Ayrıca, kültürlenmiş epitel hücrelerinde de KRAP'ın IP3 reseptörü ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu bulgular, KRAP'ın fiziksel olarak IP3R ile birleştiğini ve IP3R'nin *in vivo* ve kültürlenmiş epitelyal hücrelerde uygun yerleşimini düzenlediğini ve fizyolojik hücre programlarının altında yatan  $Ca^{2+}$  sinyaline ışık tutabileceğini göstermektedir (Fujimoto et al. 2011a).

Birçok agonist aracılığıyla hücrel aktivasyon fosfolipaz C (PLC)'nin uyarılmasına ve ardından da hücre içerisine alınan PLC'nin fosfatidilinositol 4,5-bifosfatın (PIP2) inositol'ü 1,4,5-trisfosfat (IP3) ve diasilgliserole (DAG) parçalamasına yol açar. Artan DAG konsantrasyonu protein kinaz C (PKC)'nin aktivasyonuna neden olurken; IP3, ER zarlarında bulunan hücre içi bir  $Ca^{2+}$  salma kanalı olan IP3R'ye bağlanır ve bunun sonucunda da hücre içi depolardan  $Ca^{2+}$  salınımı gerçekleşir (Vermassen et al. 2003). ER'den IP3 kaynaklı  $Ca^{2+}$  salınımı, hücrenin çoğalması ve hayatta kalması dahil birçok olayda etkili  $Ca^{2+}$  sinyalleri üretir. Ancak, IP3 aracılığıyla başlatılan  $Ca^{2+}$  sinyalleri hücre ölümüne neden olan apoptotik mekanizmayı da teşvik etmektedir. Bununla birlikte, hücrelerin çeşitli agonistlerle uzun süreli uyarılması, IP3 reseptörünün ubiquitin-proteazom yolağı aracılığıyla parçalanmasına ve ER'den hücre içerisine salınan  $Ca^{2+}$  miktarının düşmesine neden olur. Bunun sonucunda da apoptoza gidemeyen hücre çeşitli kemoterapötiklere karşı bir direnç geliştirir (Rong et al. 2009).

Bu doğrultuda yaptığımız tez kapsamında, BBK klinik örnekleri ve hücre hatlarında miR-200c-3p, miR-363-3p, bu iki mikroRNA'nın olası ortak hedefi olarak tespit ettiğimiz SSFA2 ve ifadesi SSFA2 aracılı regüle edilen IP3R1'in ifadelerinin araştırılması, miR-200c-3p ile SSFA2'nin BBK karsinogenezindeki rollerinin araştırılması ve miR-200c-3p/SSFA2/IP3R1 aksisinin baş ve boyun kanserlerinde gelişen taksol direncindeki olası rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

### 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Jayaraman et al. (1997) tarafından Jurkat hücrelerinde azalan IP3R1 ifadesinin apoptozun önemli ölçüde inhibisyonuna yol açtığı belirtilmiştir. Diğer taraftan bu hücrelerde IP3R1'in aşırı ifadesinin, sitozolik  $Ca^{2+}$  seviyesinin artmasına ve buna bağlı olarak da apoptozun tetiklenmesine neden olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Wang et al. (2001) tarafından IP3R'nin özellikle tip I izoformunun (IP3R1) IP3 kaynaklı  $Ca^{2+}$  salınımından,  $Ca^{2+}$  salınım kapasitesinden ve hücrelerin çoğalmasından birincil derecede sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Assefa et al. (2004) tarafından IP3R1 aracılı  $Ca^{2+}$  artışının, mitokondriyal apoptozun indüklenmesi için de önemli bir sinyal olduğu bildirilmiştir.

Tsunoda et al. (2005) mesane kanseri hücre hatlarında, sisplatine karşı direnç gelişimini IP3R1 ifadesinin sisplatin kaynaklı aşağı regülasyonu ile ilişkilendirmiştir. Bu verilere paralel olarak, IP3R1'in susturulduğu mesane hücrelerinde apoptotik mekanizmanın baskılanmasının hücrelerin sisplatine karşı daha dirençli hale gelmesine neden olduğu rapor edilmiştir.

Fujimoto et al. (2007) mikroarray temelli gen ifade analizi ile SSFA2'nin hücre malignede yer alan belirli reseptörleri ve sinyal moleküllerini etkilediğini ve SSFA2'nin hücre göçü, hücre çoğalması ve apoptoz gibi süreçler ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Valladares-Ayerbes et al. (2012) tarafından miR-200 ailesi üyelerinin hücre invazyonu, göçü, proliferasyonu ve ilaç direnci ile ilişkili olarak farklı kanser türlerinde önemli roller oynadıkları bildirilmiştir.

Bose et al. (2013) skuamöz hücre karsinomun baş ve boyun kanserlerinin histolojik açıdan en yaygın formu olduğunu ve bütün baş boyun kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturduklarını ifade etmişlerdir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

Okayama et al. (2016) SSFA2'nin yüksek fosforilasyon seviyelerinin akciğer adenokarsinomunda kötü sağkalım ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Karatas et al. (2016) CD133 pozitif ve CD133 negatif olarak ayrıştırılan LSHK örneklerinde mikroRNA profil karşılaştırması neticesinde, miR-200c-3p ve miR-363-3p'nin CD133 pozitif larenks kanseri kök hücrelerinde anlamlı olarak düşük seviyede ifade edildiğini ortaya koymuşlardır.

Wang et al. (2017) miR363-3p'nin aşırı ifadesinin akciğer kanser hücrelerinin çoğalmasını ve koloni oluşumunu engellediğini, miR-363-3p'nin susturulmasının ise ters etkilere sahip olduğunu göstermişlerdir.

Jiang et al. (2018) tarafından miR-363-3p'nin küçük hücreli akciğer kanser hücre hattı ve tümör dokularında azaldığını, azalan miR-363-3p ifadesinin, küçük hücreli akciğer kanser hastalarında yakın ve uzak bölgedeki metastazın varlığı ile korele olduğu rapor edilmiştir.

O'Brien et al. (2018) organizmaların gelişimi için kritik öneme sahip olan mikroRNA'ların kanser dahil çeşitli insan hastalıkları ile ilişkili olduğunu belirtmiştir.

Xu et al (2018) tarafından sodyum bütirat uygulanan kolorektal kanser hücrelerinde miR-200c-3p'nin artan ifadesine paralel Bmi-1'in aşağı regülasyonu neticesinde hücrelerin göç etme kapasitelerinin azaldığı rapor edilmiştir.

Byun et al. (2019) tarafından miR-200c, hipoksinin ana düzenleyicisi olan HIF-1 $\alpha$ 'nın ifadesinin azalmasına ve bunun neticesinde de hipoksi kaynaklı etkilerin ortadan kalkmasına yol açtığı belirtilmiş, ayrıca miR-200c'nin aşırı ekspresyonunun, tümör hipoksisini inhibe eden antikanser özellikte terapötik bir hedef olabileceği gösterilmiştir.

Cao et al. (2019) miR-363'ün aşağı regülasyonunun epitelial yumurtalık kanserinin oluşumuyla ve sisplatin kemoterapi direnciyle anlamlı bir şekilde ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

Economopoulou et al. (2019) baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda (BBSK) sağkalımın iyileştirilmesi için BBSK'nin tanı, erken tespiti ve prognozunda umut verici sonuçlar gösteren çeşitli biyobelirteçler bulunması gerektiğini ortaya koymuşlardır.

Li et al. (2019) miR-200c-3p ifadesinin nefroblastoma dokuları ve hücrelerini normal böbrek dokuları ve hücreleri ile karşılaştırdıklarında miR-200c-3p ifadesinin önemli ölçüde aşağı regüle olduğunu bulmuşlardır. Ektopik miR-200c-3p'nin FRS2'yi hedefleyerek nefroblastoma hücrelerinin canlılık, migrasyon ve invazyon kapasitelerini inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Shen et al. (2019) kolanjiokarsinomun erken tespiti ve prognostik tahmini için serum biyobelirteçleri olarak eksozomal miR-200 ailesinden özellikle miR-200c-3p'nin en iyi biyobelirteç olduğunu ortaya koymuşlardır.

Zhu et al. (2019) glioma hücre hatları ve dokularında SSFA2'nin yüksek düzeyde ifade edildiğini, azalan SSFA2 ifadesine paralel olarak hücre çoğalma kapasitesinin azaldığını rapor etmişlerdir.

Ankasha et al. (2021) oldukça metastatik özelliklere sahip yüksek dereceli seröz yumurtalık kanserinin ilerlemesinde onkojenik miR-200c-3p'nin DLC1'in 3'UTR bölgesini hedefleyerek neoplastik sürece katkıda bulunduğunu belirtmiştir.

Wang et al. (2021) miRNA-877-5p'nin doğrudan SSFA2'yi hedeflediğini ve prostat kanserinin kötü huylu ilerlemesini engellediğini bildirmişlerdir.

Kang et al. (2022) miR-200c-3p'in kolarektal karsinomlu hastaların dokularında yüksek düzeyde ifade edilen bir mikroRNA olduğunu ve bu nedenle klinik olarak tek bir hastada kolarektal karsinomun prognozunu ve metastatik potansiyelini doğru bir şekilde değerlendirmek ve terapötik stratejii belirlemek için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Liu et al. (2022) tarafından küçük hücreli akciğer karsinomunda ektopik miR-200c-3p'nin hücrelerin sisplatin hassasiyetini arttırdığı ve RRM2'yi hedefleyerek küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinin malin fenotiplerini baskıladığı rapor edilmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

Raue et al. (2022) miR-200c-3p ifadesinin meme kanseri progresyonu ve makrofaj hücre infiltrasyonu ile ilişkili olduğunu ve miR-200c-3p'nin makrofajlarda meme kanseri hücrelerinin göç etme kapasiteleri ile ilişkili çok sayıda mRNA'yı hedefleyebileceğini ortaya koymuşlardır.

Vorontsova et al. (2022) tarafından ER'den  $Ca^{2+}$  salınımına aracılık eden inositol trisfosfat reseptörlerin (IP3R'lerin) hücre içi lokalizasyonlarının fonksiyonları açısından oldukça önemli olduğu rapor edilmiştir.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasının tüm basamakları Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (YÜTAM) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş olup, Erzurum Teknik Üniversitesi (Proje No: 2020/11) ve Atatürk Üniversitesi (Proje No: TCD-2021-9011) Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

#### 3.1. Materyal

Çalışma kapsamında kullanılan cihazların listesi ve kullanım gerekçeleri Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka/Model	Kullanım amacı
Laminar air-flow (Class II Safety Cabinet)	ESCO NordicSafe™	Yapılan tüm hücre kültürü çalışmalarına steril bir ortam sağlamak için kullanıldı.
Derin Dondurucu (-20°C)	Biobase	-20°C’de saklanması gereken malzemeler için kullanıldı.
Buzdolabı (4°C)	Biobase	Besiyerleri, kimyasal malzemeleri ve kitleri saklamak için kullanıldı.
Derin Dondurucu (-80°C)	ESCO Lexicon®	Hücreleri, kullanılan ilaçları ve kitleri muhafaza etmek için kullanıldı.
Epoch Spektrofotometre	BioTek EPOCH	Hücre canlılık testlerinde absorbans ölçümü ile RNA ve protein konsantrasyonlarını belirlemek için kullanıldı.
Saf Su Cihazı-UV	Millipore Direct- Q-3	Hazırlanan çözeltilerin çözücüsü olarak kullanıldı.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

**Çizelge 3.1. (Devam)**

Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	RNA ve protein izolasyonunun belirli bir aşamasında kullanıldı
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10	Katı-Sıvı karışımları homojenize etmek amacıyla kullanıldı.
Otoklav	Tomy SX-500E	Çalışmalarda kullanılan tüm materyalin sterilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanıldı.
İnvert Mikroskop	Leica	İncelenen hücrelerin görüntülenmesi ve bazı çalışmalarda fotoğraflanması amacıyla kullanıldı.
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202	Çalışmaların belirli sıcaklıkta inkübasyon gerektiren adımlarında kullanıldı.
Su Banyosu	Wisd WiseBath	Hücre kültüründe kullanılacak solüsyonların belirli sıcaklık derecelerine getirilmesinde yararlandı.
SDS-PAGE elektroforez	Bio-Rad	Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmasında kullanıldı.
Mikropipet seti	Axypet	Her deneyde kullanılacak sıvı bileşenlerin hacmini doğru bir şekilde elde etmek amacıyla kullanıldı.
Mini Santrifüj	WiseSpin	Tüm çalışmalarda, ayrıştırma işlemlerini gerçekleştirmek için kullanıldı.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

**Çizelge 3.1. (Devam)**

Gerçek zamanlı qPZR (qRT-PCR) cihazı	Qiagen Rotor-Gene	MikroRNA'ların ve hedef genlerin ifade seviyelerini analiz etmek için kullanıldı.
Çalkalamalı İnkübatör	ZHİCHENG ZHWY- 2102C	Bakteri hücrelerinde plazmitleri çoğaltmak için kullanıldı.
İnkübatör	Memmert	Transformasyon işleminden sonra bakterilerin petri kaplarında büyütülmesi için kullanıldı.
Blotlama Cihazı	Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™	Westen blot çalışmasında jelden membrana proteinlerin aktarılmasında kullanıldı.
Masaüstü pH Metre	Adwa, AD1000	Hazırlanan solüsyonların pH'sının ayarlanmasında kullanıldı.
Analitik Terazı (0,0001)	Shimadzu ATX 224	Çalışmalarda kullanılacak ilaç ve diğer kimyasalların hassas bir şekilde tartmak amacıyla kullanıldı.
Dikey Jel Yürütme Sistemi	Bio-Rad	Proteinlerin SDS-PAGE jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasında kullanıldı.
Yatay Jel Yürütme Sistemi	Bio-Rad	İzole edilen RNA'ların integritelerinin kontrol edilmesinde kullanıldı.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan kitler, kimyasallar ve sarf malzemeler

Malzeme	Marka	Kullanım Amacı
25 cm <sup>2</sup> hücre büyütme kapları	SPL	Çalışmalarda kullanılacak hücrelerin çoğaltılması için kullanıldı.
96 kuyucuklu plate	Corning® Costar®	Canlılık testini yapabilmek için hücrelerin çoğaltıldığı ortam olarak kullanıldı.
6 kuyucuklu plate	Corning® Costar®	RNA/protein izolasyonu, miRNA ve hedef gen transfeksiyonu ile tek hücre koloni testi için hücrelerin kültüre edildiği ortam olarak kullanıldı.
Penisilin-Streptomisin	Gibco®	Hücrelerin büyütülme ortamlarını kontaminasyon kaynaklarından (mantar, bakteri vb) korumak için kullanıldı.
DMEM-F12 Besiyeri	Gibco®	SCC-9 hücrelerini çoğaltmak amacıyla besiyeri olarak kullanıldı.
Nutriculture RPMI 1640	EcoTech Biotechnology® (Türkiye)	FaDu hücrelerini kültüre edebilmek amacıyla besiyeri olarak kullanıldı.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco®	Hücrelerin büyüebilmesi ve çoğalabilmesi için gereken büyüme faktörlerini içeren serum olarak kullanıldı.
L-Glutamin	Sigma-Aldrich®	Hücrelerin çoğalabilmesini sağlayan destekleyici olarak kullanıldı.
N,N,N',N'-Tetramethyl ethylendiamine (TEMED)	Sigma-Aldrich® (Germany)	Akrilamid-Bis akrilamidin polimerizasyonunu katalizleme de kullanıldı.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

**Çizelge 3.2.** (Devam)

RIPA Lizis Buffer		EcoTech Biotechnology® (Türkiye)	Protein izolasyonunda hücreleri parçalamak için kullanıldı.
ClearBand Nitroselüloz	Membran	EcoTech Biotechnology® (Türkiye)	Proteinlerin jelden aktarımını sağlamak amacıyla kullanıldı.
Whatman Kağıdı		Thermo Fisher Scientific	Western blot aşamasında proteinlerin membrana yarı-kuru aktarımında sandviç modeli oluşturmak ve tamponun akışını sağlamak amacıyla kullanıldı.
Laemli Sample Buffer 10x		EcoTech Biotechnology® (Türkiye)	Protein örneklerinin hazırlanmasında faydalandı.
ClearBand ECL Western Blot Substrat		EcoTech Biotechnology® (Türkiye)	Antijen-antikor ilişkisini belirlemede ve proteinleri saptamada kullanıldı.
Proteaz İnhibitör Kokteyl		Thermo Scientific®	Proteinler izole edildiğinde proteazların proteinleri parçalamasını önlemek için kullanıldı.
PMSF		Roche	Protein izolasyonu sırasında, serin proteazların hücre içindeki proteinleri parçalamasını durdurmak için kullanıldı.
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit		Applied Biosystems	Dokulardan ve hücrelerden elde edilen RNA'lerden cDNA elde etme de yararlandı.
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Master mix		Solis Biodyne	Hedef genlerin ifadesinin mRNA düzeyinde belirlenmesinde kullanıldı.
Bis-akrilamit		Sigma-Aldrich® (Germany)	SDS-PAGE jelin polimerleşmesi için kullanıldı.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

**Çizelge 3.2. (Devam)**

Cell Viability Detection Kit-8	EcoTech Biotechnology ® (Türkiye)	Hücre canlılığını değerlendirmek için kullanıldı.
Falkon tüpleri	LP Italiana	Sıvı haldeki malzemelerin, kimyasalların ve besiyerlerinin saklanması amacıyla kullanıldı.
Steril serolojik pipetler	LP Italiana	Tek hücre koloni testi için hücrelerin kültüre edilmesi amacıyla kullanıldı.
Primer antikor ( $\beta$ -aktin, SSFA2, IP3R1)	Santa Cruz Biotechnology®	Membranın protein havuzundan araştırmaya konu olan hedef proteini belirlemek ve ölçmek için, o proteine spesifik bağlanmayı sağlamak amacıyla kullanıldı.
Primer antikor (SSFA2)	Biorbyt	Membranın protein havuzundan araştırmaya konu olan hedef proteini belirlemek ve ölçmek için, o proteine spesifik bağlanmayı sağlamak amacıyla kullanıldı.
Anti-Mouse Sekonder Antikor	Santa Cruz Biotechnology®	Membranın protein havuzundan araştırmaya konu olan hedef proteini belirlemek ve ölçmek için, o proteine spesifik bağlanmayı sağlamak amacıyla kullanıldı.
Anti-Rabbit Sekonder Antikor	Santa Cruz Biotechnology®	Membranın protein havuzundan araştırmaya konu olan hedef proteini belirlemek ve ölçmek için, o proteine spesifik bağlanmayı sağlamak amacıyla kullanıldı.
Akrilamit	BioShop	SDS-PAGE jelin polimerleşmesi amacıyla kullanıldı

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

**Çizelge 3.2. (Devam)**

SSFA2 3'UTR plazmidi (pMir Target vector 7.9 kb)	ORİGENE	MiR-200c-3p'nin hedef geninin SSFA2 olduğunu doğrulamak amacıyla kullanıldı.
LightSwitch™ Luciferase Assay Kit	Active Motif	Hücrelerden lüsiiferaz deneyini yapmak amacıyla kullanıldı.
QuikChange II XL Site- Directed Mutagenesis Kit	Agilent	MiR-200c-3p'nin hedef geninin SSFA2 olduğunu doğrulamak amacıyla kullanıldı.
Non-targeting mimic Control ve miR-200c-3p mimic	Sigma-Aldrich	Hücelere mikroRNA mimik ve kontrolün transfeksiyonu için kullanıldı.
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	BioShop	SDS PAGE jelin hazırlanmasında ve yürütme tamponu içerisinde kullanıldı.
Corning BioCoat™ Matrigel Invasion Chamber	Corning® (USA)	Hücre invazyon deneyi için kullanıldı.
Transwell® Permeable Supports Chamber	Corning® (USA)	Hücre migrasyon deneyi için kullanıldı.
İzopropanol	Sigma-Aldrich®	SDS jelinin hazırlanmasında kullanıldı.
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich®	Hem ilaçların çözücüsü olarak hem de çalışılan hücrelerin stoklanmasında kullanıldı.
PBS (1X)	EcoTech Biotechnology® (Türkiye)	Hücre kültüründe FBS kalıntıları uzaklaştırmada kullanıldı.
Amonyum Persülfat	BioShop	SDS PAGE jelinin hazırlanmasında kullanıldı.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

---

**Çizelge 3.2. (Devam)**

---

SSFA2 (NM_006751) Human Tagged ORF Clone	ORİGENE	SSFA2 ekspresyon plazmidini klonlamak için kullanıldı.
Genetisin	BioShop	Memeli Hücrelerine aktarılan plazmitlerin seçilimini sağlamak amacıyla kullanıldı.
Ponceau S	EcoTech Biotechnology® (Turkey)	Membrana aktarılan proteinlerin görünür hale getirildikten sonra kesilebilmesi amacıyla kullanıldı.
Trizma Base	Sigma-Aldrich® (Germany)	SDS-PAGE jelinin hazırlanması sırasında kullanıldı.
Hydrocortisone	Sigma	DMEM-F12 besiyerini hazırlamak amacıyla kullanıldı.
Hücre kültürü flaskları	SPL (Korea)	Hücrelerin kültüre edilmesinde kullanıldı.
Metanol	Sigma-Aldrich®	Hücrelerin fiksasyonu için kullanıldı.
Crystal Violet	Sigma-Aldrich®	Migrasyon, invazyon ve tek hücre koloni testlerinde hücreleri boyamak için kullanıldı.
Lipofectamine 3000 Transfection Reagent	Invitrogen	Hedef genin ve mikroRNA'nın hücrelere aktarılmasını sağlayan transfeksiyon ajanı olarak kullanıldı.
Eppendorf tüpler (0,2-0,5-1,5 ml)	LP Italiana	Sıvı formda örneklerle çalışmak için kullanıldı.

---

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Normal ve tümörlü baş ve boyun kanseri doku örneklerinin temini ve arşivlenmesi

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak-Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda normal patolojik inceleme sırasında alınan ve Atatürk Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik incelemesi yapılan baş ve boyun kanserli 30 hastadan temin edilen tümör ve tümöre komşu normal doku örnekleri tez kapsamında kullanıldı. Elde edilen tüm numuneler cerrahi işleminden hemen sonra sıvı nitrojen içerisinde dondurularak, protein ve RNA izolasyonu gerçekleştirilene kadar -80°C'de muhafaza edildi.

İnsan doku numunelerini toplama ve kullanma prosedürleri Helsinki Deklerasyonu ilkelerine göre gerçekleştirildi. Tez kapsamında kullanılacak örneklerin toplanmasına dair protokol Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu (Erzurum, Türkiye) tarafından değerlendirildi ve çalışmanın yapılmasında bilimsel ve etik açıdan bir sakınca olmadığı kararına varıldı (Kurul Karar No: B.30.2.ATA.0.01.00/313). Proje kapsamında kullanılan tüm örnekler, katılımcıların her birine yazılı bilgilendirilmiş onam formu imzalatılan hastalardan temin edildi.

Hastalardan temin edilen doku örneklerinin TNM sınıflandırılmaları, tümör histolojik derecelendirmeleri, maksimum tümör çapı, tümörün yerleşimi bilgileri ile hasta yaşı, cinsiyeti, alkol ve sigara kullanım alışkanlıkları kaydedildi ve örnek temin edilen 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).

#### 3.2.2. İn siliko analiz

MiR-200c-3p'nin tümör süpresör potansiyele sahip olduğunu doğrulamak adına öncelikle miRGator 3.0 veritabanındaki veriler standart arama parametreleri kullanılarak incelendi ve miR-200c-3p'nin normal dokulardaki ifade bilgileri veritabanı arayüzünden temin edildi. Ayrıca, The Cancer Genome Atlas (TCGA) veritabanındaki veriler kullanılarak Kaplan Meier Plotter online uygulaması yardımıyla miR-200c-3p ifade seviyesinin sağ kalıma etkisini incelemek için baş ve boyun kanseri hastalarına ait veriler kullanılarak sağkalım analizi yapıldı (Li et al. 2018).

#### 3.2.3. Hücre hatları ve taxol dirençli hücrelerin oluşturulması

Tez kapsamında toplam üç adet hücre hattı kullanıldı. Kullanılan hücre hatlarından FaDu, SCC-9 ve HGF-1 hücreleri 2020-2022 yılları arasında ATCC® hücre kültür koleksiyonundan temin edildi.

Hipofarenks kanseri hücre hattı olan FaDu hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin ile desteklenen RPMI-1640 besiyerinde kültüre edildi. Dil kanseri hücre hattı olan SCC-9 hücreleri de %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin ve 400 ng/ml Hidrokortizon (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ile hazırlanan DMEM-F12 besiyerinde büyütüldü. Deneylerde kontrol olarak kullanılan immortalize insan ağız içi fibroblast hücreleri HGF-1 ise %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin ile hazırlanan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde çoğaltıldı. Kültüre edilen tüm hücreler deney süresi boyunca 37°C %5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş inkübatörde 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklar içerisinde çoğaltıldı.

Hücrelerin çoğaltma işleminin gerçekleştirildiği besiyeri, genellikle 3 günde bir olacak şekilde değiştirildi ve hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlandı. Bütün hücreler, mikoplazma açısından rutin olarak test edildi ve tüm deneyler mikoplazma açısından negatif olan hücreler kullanılarak gerçekleştirildi.

Taksol dirençli baş ve boyun kanseri hücre hatları FaDu/Tax-R ve SCC-9/Tax-R hücreleri, laboratuvarımızda artan dozlarda taksol ile muamele edilerek oluşturuldu. İlk

olarak, pasajlanan parental FaDu ve SCC-9 hücreleri %40-50 konfluensiye ulaştıktan sonra sırasıyla 6 nM ve 0,5 nM taksol ile muamele edildi. 1 gün sonra mikroskop altında hücrelerin morfolojileri ve çoğalma hızları baz alınarak besiyerleri taksol içermeyen yeni besiyerle değiştirildi. Belirli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra flaska geri ekilen hücreler tekrar, taksol ile muamele edildi. Muamele süresi boyunca morfolojilerinde ve çoğalma hızlarında bir değişiklik görülmediği saptanan hücreler taksol içeren besiyerlerinde bırakıldı. Bu şekilde en düşük taksol dozu ile belirli bir süre inkübe edilen hücrelerin taksole direnç kazandığını teyit etmek amacıyla; taksole hassas hücreler ile taksole direnç kazandığını düşündüğümüz hücreler aynı taksol dozu ile muamele edildi. 24 saat sonra taksole hassas hücrelerin yaklaşık %50'sinde ölüm meydana gelirken; dirençli hale gelen hücrelerin ölmediği ve çoğaldığı gözlemlendi. En düşük doza direnç kazandırılan FaDu ve SCC-9 hücreleri artan dozlarda taksol ile (ilk dozun 2 katı olacak şekilde) muamele edildi ve direnç kazandırma işlemi boyunca aynı basamaklar döngüsel bir şekilde tekrarlandı. Bu döngüsel tekrarlar yaklaşık 6 ay boyunca artan dozlarda devam edildi ve en sonunda FaDu hücreleri 32 nM, SCC-9 hücreleri ise 2 nM taksol IC<sub>50</sub> dozlarına direnç kazandırıldı.

#### 3.2.4. SSFA2 plazmitinin FaDu hücrelerine stabil transfeksiyonu

FaDu hücre hattında SSFA2 genini overeksprese etmek amacıyla SSFA2 açık okuma çerçevesine sahip insan pCMV6-Entry (PS100001) ekspresyon vektörü (SSFA2 (NM\_006751) Human Tagged ORF Clone, Origene Technologies) ve kontrol plazmidi olarak pCMV6-AC-GFP (Origene Technologies, Inc.) memeli ekspresyon vektörü ticari olarak satın alındı.

FaDu hücrelerinin SSFA2 ve kontrol plazmiti ile transfeksiyonu LP3000 Transfection Reagent (Invitrogen, San Diego, CA) yardımıyla üretici firmanın protokolü takip edilerek aşağıda tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi.

6 kuyucuklu platelerin her bir kuyusuna 80.000 hücre olacak şekilde FaDu hücreleri ekildi. Hücreler yüzeye tutunduktan 24 saat sonra her bir kuyu için 1 µL LP3000, 1,25 µl P3000 ve 625 ng plazmit kullanıldı. 125 µL OPTİMEM ve 1 µL LP3000 bir tüpte; 125 µL OPTİMEM, 1,25 µl P3000 ve 625 ng plazmit diğer bir tüpte karıştırıldı.

Daha sonra birleştirilen bu iki karışım oda sıcaklığında 15 dk'lık inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücreler transfeksiyon karışımı ile muamele edilerek 37°C'de inkübasyona bırakıldı. SSFA2 genini yüksek düzeyde ifade eden hücreler ile kontrol hücreleri seçim sağlanıncaya kadar 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültüre edildi.

#### **3.2.5. SSFA2 genini yüksek düzeyde ifade eden FaDu hücrelerinin seçilimi**

SSFA2 genini stabil olarak yüksek düzeyde ifade eden FaDu hücreleri ve kontrol hücrelerinin seçilimi için %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-Glutamin ve 250 µg/ml genetisin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Amerika Birleşik Devletleri) eklenerek hazırlanan RPMI-1640 besiyeri içerisinde 37°C 'de %5 CO<sub>2</sub> içeriğine sahip inkübatörde yaklaşık 1 ay boyunca çoğaltıldı ve SSFA2 genini yüksek düzeyde ifade eden hücrelerin seçilimi gerçekleştirildi. Seçilimi tamamlanan ve genetisine dirençli hale gelen hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere çoğaltılıp, stoklandı.

#### **3.2.6. miR-200c-3p, miR-363-3p, SSFA2 ve IP3R1 ifadelerinin qRT-PCR ile değerlendirilmesi**

Başlangıçta tümör ve normal doku örneklerinde miR-200c-3p, miR-363-3p ve SSFA2'nin ifade düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) kullanılarak değerlendirildi. Bu kapsamda örneklerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR işlemleri aşağıdaki protokollere göre gerçekleştirildi.

#### **Dokulardan TRIzol ile RNA izolasyonu:**

80°C'de saklanan normal ve tümör doku örnekleri öncelikle sıvı nitrojen içerisinde havanda dövülerek toz haline getirildi. Ardından toz haline getirilen numuneler 500 µL TRIzol solüsyonu ile iyice pipetlenerek homojenat haline getirildi. Doku örneklerinin iyi bir şekilde parçalanması ve nükleik asitlere bağlanan proteinlerin tamamen ayrışması için dokular TRIzol solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra her bir örneğe 200 µL kloroform eklenerek iyice karıştırıldı ve 2-3 dakika bekletildikten sonra 4°C'de 12.000g'de 15 dakika santrifüjlendi. Faz ayrışması sağlanan solüsyonların üst kısımda RNA içeren organik

fazları yeni bir mikrosantrifüj tüplere 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 (BioTek, Winooski, VT, USA) kullanılarak belirlendi. RNA bütünlüğü ise jel elektroforez aracılığıyla görüntüldü.

#### **Hücrelerden RNA izolasyonu:**

MiR-200c-3p mimik ya da kontrol mimik ile transfekte edilen hücreler ile SSFA2'nin yüksek düzeyde ifade edildiği veya baskılandığı hücrelerden RNA izolasyonu EcoPure Total RNA Kit (Ecotech Biotechnology, Erzurum, Turkey) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflıkları Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA) cihazı ile 260/230 ve 260/280 nm'de absorbans ölçülerek belirlendi.

#### **cDNA sentezi ve qRT-PCR:**

Dokulardan ve hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra tümör ve normal doku örneklerinde miR-200c-3p, miR-363-3p, SSFA2 ve IP3R1 ifade düzeyleri qRT-PCR ile değerlendirildi. MiR-200c-3p, miR-363-3p ve SSFA2 ile IP3R1'in ifade seviyelerini belirlemek adına her bir örnekten elde edilen RNA'ların konsantrasyonları sırasıyla 100 ng/ µL (mikroRNA cDNA sentezi için) ve 1000 ng/ µL (mRNA'dan cDNA sentezi için) şekilde seyreltildi ve her örnek için 2 µL RNA kullanıldı. Ardından, miR-200c-3p'ye veya miR-363-3p'ye özgü stem loop primer ve 'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit' (Thermo, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokollerine göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi için 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. MiR-200c-3p, miR-363-3p, IP3R1 ile

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

SSFA2'nin ifade analizi 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)' (Solis BioDyne) ve Çizelge 3.3'te listelenen primerler kullanılarak yapıldı. qRT-PCR, RotorGene (Qiagen) gerçek-zamanlı termal döngü cihazında, standart parametreler kullanılarak yürütüldü. MiR-200c-3p ve miR-363-3p için RNU43; SSFA2 ve IP3R1 için ise GAPDH internal kontrol olarak kullanıldı ve deneyler iki tekrarlı olacak şekilde yapıldı. İfade seviyesindeki farklılıklar delta-delta-CT metodu kullanılarak gerçekleştirildi (Livak and Schmittgen 2001).

**Çizelge 3.3.** Çalışma kapsamında kullanılan primer dizileri

<b><u>miR-200c-3p</u></b>	<b>Dizi</b>
<i>Stem loop</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAACTGGATACGACTCCATCC
<i>Forward (5'-3')</i>	GCACGTAATACTGCCGGGT
<i>Reverse (3'-5')</i>	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA
<b><u>miR-363-3p</u></b>	<b>Dizi</b>
<i>Stem loop</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAACTGGATACGACTCCATCC
<i>Forward (5'-3')</i>	GCACGTAATACTGCCGGGT
<i>Reverse (3'-5')</i>	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA
<b><u>RNU43</u></b>	<b>Dizi</b>
<i>Forward (5'-3')</i>	CTTATTGACGGGCGGACAG
<i>Reverse (3'-5')</i>	TCAGAACGTGACAATCAGCA
<b><u>SSFA2</u></b>	<b>Dizi</b>
<i>Forward (5'-3')</i>	CGCGATATGGCTCAAGGACT
<i>Reverse (3'-5')</i>	CACCTTCATGGAGGTGGTTGG
<b><u>IP3R1</u></b>	<b>Dizi</b>
<i>Forward (5'-3')</i>	ACATTGGACGAGGCTGGAAA
<i>Reverse (3'-5')</i>	CCTCATTGCAGCCTGGGTTA
<b><u>GAPDH</u></b>	<b>Dizi</b>
<i>Forward (5'-3')</i>	CCATCTCCAGGAGCGAGATC
<i>Reverse (3'-5')</i>	GGCATTGCTGATGATCTTGAGG

#### 3.2.7. Hücre sayımı

Deneylerde kullanılacak hücrelerin sayımı için ilk olarak; T25 flaskta çoğaltılan hücrelerin yoğunluğu en az %60'a ulaştıktan sonra hücrelerin bulunduğu yüzey ilk olarak 1 ml PBS ile yıkandı. Daha sonra 1 ml seyreltilmiş tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı ve kaldırılan hücreler daha sonra santrifüj ile çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant döküldü ve geriye kalan hücre pelletleri yoğunluğa bağlı olarak belirlenen oranda taze besiyeri eklenerek çözdürüldü ve iyice homojen hale gelmesi sağlandı. Hücre sayımı BioRad TC20™ Automated Cell Counter cihazı aracılığıyla gerçekleştirildi. Cihazın sayım için kullanılan slaytlarına 10 µL hücre ile 10 µL tripan mavisi 1:1 oranında olacak

şekilde karıştırıldı ve karışımdan 10 µL sayım slaytlarına yüklendi ve cihaz tarafından otomatik olarak hücre sayımı gerçekleştirildi.

#### 3.2.8. Hücrelerin 6-kuyucuklu ve 96-kuyucuklu platelere ekilmesi

Hücre sayımından sonra deney yapılacak hücre ve platelere göre değişen sayıda hücrenin ekimi gerçekleştirildi. 6 kuyucuklu plateler için her bir kuyusunda 2 ml besiyeri içerisinde  $12 \times 10^4$ - $15 \times 10^4$  hücre ekimi yapıldı. 96 kuyucuklu platelere ise her bir kuyu içerisinde 100 µL besiyerinde  $2 \times 10^3$ - $3 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi.

#### 3.2.9. MikroRNA transfeksiyonu

MiR-200c-3p ve herhangi bir geni hedeflemeyen oligonukleotid dizisi kontrol mikroRNA'nın (non-targeting kontrol) hücre içine etkili bir şekilde taşınmasını kolaylaştıran Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (Thermo, Rockford, ABD) kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. 6- veya 96-kuyucuklu platelere uygun sayılarda ekilen ve 24 saatlik inkübasyon sonrası %80-90 konfluensiye ulaşan hücrelere Karatas et al. (2016) tarafından tarif edildiği şekilde transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminin ardından 37°C'de inkübasyona bırakılan hücreler 24 ve 48 saat sonra fonksiyonel çalışmalarda kullanıldı.

#### 3.2.10. miR-200c-3p ve SSFA2'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerinin araştırılması

MiR-200c-3p'nin ve SSFA2'nin hücre canlılığı üzerine etkisi aşağıda kısaca tarif edildiği şekilde değerlendirildi.

MiR-200c-3p mimik ve kontrol mimik ile transfekte edilen FaDu hücreleri 96 kuyucuklu platelerin her bir kuyusuna  $2 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekilirken; SCC-9 hücreleri ise 96 kuyucuklu platelerin kuyularına kuyucuk başı  $3 \times 10^3$  hücre ekildi. 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından Lipofectamine® RNAiMAX Reagent kullanılarak hücreler miR-200c-3p mimik ve kontrol mimik ile transfekte edildi.

SSFA2'nin hücre canlılığı üzerine etkisi değerlendirmek için de SSFA2'nin ifadesinin arttığı FaDu hücrelerinden 96 kuyucuklu platelerin her bir kuyusuna kuyu başı  $2 \times 10^3$  olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi. Her iki grubun hücre canlılığı 2 gün boyunca her 24 saatte bir ölçüldü. Hücre canlılığı, CVDK-8 (EcoTech Biotechnology) kiti ile üretici firmanın protokolü takip edilerek Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) yardımıyla 450 nm'de absorbans ölçümü yapılarak değerlendirildi.

#### **3.2.11. miR-200c-3p ve SSFA2'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin göçü üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi**

MiR-200c-3p'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin göç etme potansiyelleri üzerine etkisini değerlendirmek için hücreler 6 kuyucuklu platenin her bir kuyusunda kuyu başına  $8 \times 10^4$  FaDu ve  $10 \times 10^4$  SCC-9 hücresi düşecek şekilde ekildi. 1 gün sonra hücreler Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) kullanılarak miR-200c-3p mimik ya da kontrol mimik ile transfekte edildi. Hücre göçü Transwell insert testi ile Transwell® Permeable Supports (24-well insert, Corning) kullanılarak değerlendirildi. Bunun için, 1 gün sonra miR-200c-3p mimik ya da kontrol mimik ile transfekte edilen 6 kuyucuklu platedeki hücreler kaldırıldı ve Transwell® Permeable Supports'a, iki tekrarlı olacak şekilde her chamber'a FaDu ( $3 \times 10^4$  hücre) ve SCC-9 ( $4,5 \times 10^5$  hücre) hücreleri ekildi. 1 gün boyunca  $37^\circ\text{C}$  %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde bırakıldı. İnkübasyon sonrasında göç etmeyen hücreler pamuk swaplar kullanılarak chamberların üst tarafından kazındı ve %100 metanol ile membranın alt yüzeyine göç eden hücrelerin fiksasyonu sağlandı. Ardından, her bir chamber %2 etanol ve %0,1 kristal viyole içeren solüsyon içerisine oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası boya tamamen uzaklaşana kadar her bir chamber 1x PBS (Ecotech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra slaytlar üzerine sabitlenen membranların farklı bölgelerinden hücre sayımı yapıldı ve invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) yardımıyla fotoğraflar çekildi.

SSFA2'nin hücre göçü üzerine etkilerini değerlendirmek adına ITPRD12'yi yüksek düzeyde ifade eden hücreler ile kontrol plazmitinin yüksek düzeyde ifade edildiği hücreler kullanıldı. Bunun için de aynı şekilde Transwell® Permeable Supports

insertlerden yararlanıldı. 24 kuyucuklu platenin her bir kuyusundaki insertlerin içerisine,  $3 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 250  $\mu$ L FBS'siz RPMI-1640 besiyerinde süspansiyon edilen hücreler iki tekrarlı olacak şekilde eklendi. Ardından her bir insert 24 kuyucuklu platede %10 FBS içeren besiyeri bulunan kuyulara yerleştirildi. FaDu SSFA2 ve FaDu kontrol hücreleri 24 saat boyunca  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  içeren nemli inkübatör içerisinde kültür edildi. Bu sürenin sonunda göç etmeyen hücreler pamuklu swap yardımıyla chamberların üst tarafından kazındı ve filtrenin alt yüzeyine göç eden hücreler de %100 metanol ile sabitlendi. Ardından her bir chamber %2 etanol ve %0,1 kristal viyole içeren solüsyona bırakıldı ve 20 dakika süre boyunca boyanmaya bırakıldı. 1x PBS ile yıkanan ve kuruyan membranlar slaytların üzerine sabitlendikten sonra hücre sayımı yapıldı.

#### **3.2.12. miR-200c-3p ve SSFA2'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin invazyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması**

MiR-200c-3p mimik ve kontrol mimik ile transfekte edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinin invaziv potansiyellerini değerlendirmek adına, ilk olarak hücreler 6 kuyucuklu planelere kuyu başı  $8 \times 10^4$  FaDu hücresi ve  $10 \times 10^4$  SCC-9 hücresi olacak şekilde ekildi. 1 gün sonra hücreler Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) kullanılarak miR-200c-3p mimik ya da kontrol mimik ile transfekte edildi. Hücrelerin invaziv potansiyellerini değerlendirmek için de BD BioCoat Matrigel invasion chamberlar (Becton Dickinson) kullanıldı. Bunun için ilk olarak, transfekte edilen hücreler kaldırıldı ve Transwell® Permeable Supports'a, iki tekrarlı olacak şekilde FaDu hücreleri ( $5 \times 10^4$  hücre) ve 250  $\mu$ L serum içermeyen RPMI-1640 besiyeri içerisinde, SCC-9 hücreleri ( $6 \times 10^4$  hücre) 250  $\mu$ L serum içermeyen DMEM-F12 besiyeri içerisinde süspansiyon edildi ve iki tekrarlı olacak şekilde insertlerin içerisine yerleştirildi. Her bir insert kemoatraktan olarak serum içeren besiyerlerin bulunduğu 24 kuyucuklu planelere yerleştirildi ve hücreler  $37^\circ\text{C}$  inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda göç etmeyen hücreler pamuk swap yardımıyla insertlerin üst yüzeyinden kazındı ve membranın alt yüzeyine göç eden hücreleri sabitlemek için insertler %100 metanol içeren kuyulara yerleştirildi. Daha sonra göç eden hücreleri görünür hale getirmek amacıyla chamberlar %2'lik etanol ve %0,3'lük kristal viyole içeren solüsyon içerisinde 20 dakika boyunca boyanmaya bırakıldı. Boyayı uzaklaştırana kadar her bir chamber 1x PBS (Ecotech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı.

Kuruyan membranlar slaytların üzerine sabitlendi ve ardından hücre sayımı yapıldı ve invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) yardımıyla fotoğraflandı.

SSFA2'nin hücrelerin invaziv kapasiteleri üzerine etkisini değerlendirmek için BD BioCoat Matrigel invasion chambers (Becton Dickinson) kullanıldı. SSFA2'nin aşırı ifade edildiği FaDu hücreleri ve ile kontrol plazmitinin yüksek düzeyde ifade edildiği hücreler ( $5 \times 10^4$  hücre) 250  $\mu$ L FBS'den yoksun RPMI-1640 besiyeri içerisinde süspansiyon edildi ve iki tekrarlı olacak şekilde chamberların içerisine eklendi. İnsertler içerisinde serum içeren RPMI-1640 besiyerinin bulunduğu 24 kuyucuklu plateelerin kuyularına yerleştirildi ve 37°C %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 24 saat boyunca kültür edildi. İnkübasyon süresi sonunda göç edemeyen hücreler pamuklu swap yardımıyla chamberların üst kısmından kazındı ve membranın alt yüzeyine göç eden hücreler %100 metanol ile fikse edildi. Daha sonra chamberlar 20 dakika boyunca %2'lik etanol ve %0,3'lük kristal viyole içeren solüsyon içerisinde boyandı. Bu sürenin sonunda boyayı uzaklaştırana kadar her bir chamber 1x PBS (Ecotech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan membranlar slaytların yüzeyine sabitlendi, farklı bölgelerden hücre sayımı yapıldı ve invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) kullanılarak fotoğraflar çekildi.

#### **3.2.13. miR-200c-3p ve SSFA2'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin koloni oluşumu potansiyeli üzerindeki etkilerinin araştırılması**

MiR-200c-3p mimik ya da kontrol mimik ile transfekte edilen hücreler ile SSFA2 ifadesinin arttığı hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri tek hücre koloni testi ile değerlendirildi. MiR-200c-3p mimik veya kontrol mimik ile transfekte edilen hücreler ile SSFA2'nin overekspresiyon edildiği hücreler 6 kuyucuklu platenin her bir kuyusuna  $3-4 \times 10^3$  hücre düşecek şekilde 3 tekrarlı olarak ekildi. Kuyular içerisindeki besiyeleri 3-4 günde bir taze besiyeri ile değiştirildi. Yaklaşık 15 günlük inkübasyon sonrası gözle görülebilir büyüklüğe ulaşan koloniler %100 metanol ile fikse edildi ve 20 dakika boyunca %2 etanol ve %0,1 kristal viyole içeren solüsyon içerisinde boyanmaya bırakıldı. Daha sonra invert mikroskop yardımıyla sayılan koloniler klon çeşitlerine (holoklon, meroklon ve paraklon) göre sınıflandırıldı (Beaver et al. 2014).

## 3.2.14. miR-200c-3p ve miR-363-3p'nin in siliko araçlarla hedef tahmini

MiR-200c-3p ve miR-363-3p'nin olası hedef genlerini belirlemek adına öncelikli olarak biyoinformatik araçlar kullanıldı. Kullanılan bu *in siliko* programlar hedef genleri, 3'UTR bölgelerindeki dizilerin mikroRNA'larla komplementerlik oluşturabilme potansiyellerine göre tespit edilmesini sağlamaktadır. MiR-200c-3p için ve miR-363-3p için ayrı ayrı tespit edilen bu tahmini hedef genler arasından öncelikli aday genlerin belirlenmesi için ilk olarak kullanılan 10 *in siliko* programdan en az 9 tanesi tarafından tahmin edilen hedef genler seçildi (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5). MiR -200c-3p ve miR-363-3p'nin hedefi olarak tahmin edilen genlerden 5 tanesi seçildi. Seçilen bu hedef genler için yapılan literatür taraması sonucu baş ve boyun kanserlerinde onkogen olma potansiyeli en güçlü olan ve her iki mikroRNA için ortak olarak belirlenen aday hedef gen ileri doğrulama çalışmaları için kullanıldı.

Çizelge 3. 4. miR-200c-3p için belirlenen olası hedef genler

mikroRNA	Gen	miRwal	MicroT4	miRanda	mirbridg	miRDB	miRMap	miRNA	RNA22	RNAhyb	Targetsc	Toplam	Onkogen	Referans
miR-200c-3p	<b>SSFA2</b>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	9	✓	(Khowal et al. 2018)
miR-200c-3p	ACTC1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	9	✓	(da Rocha et al. 2019)
miR-200c-3p	ZEB1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	9	✓	(Göppel et al. 2017)
miR-200c-3p	ZFX	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	9	✓	(Yang et al. 2015)
miR-200c-3p	ATXN1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	9	✓	(Li et al. 2018)

**Çizelge 3. 5.** miR-363-3p için belirlenen olası hedef genler

mikroRNA	Gen	miRWalk	MicroT4	miRanda	mirbridg	miRDB	miRMap	miRNAM	RNA22	RNAhybr	Targetsca	Toplam	Onkogen	Referans
miR-363-3p	<b>SSFA2</b>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	9	✓	(Khowal et al. 2018)
miR-363-3p	BCAT1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	9	✓	(Zhou et al. 2013)
miR-363-3p	EGR2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	9	✓	(Liu et al. 2008)
miR-363-3p	KIF5B	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	9	✓	(Viola et al. 2017)
miR-363-3p	RNF2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	9	✓	(Yang et al. 2016)

### 3.2.15. Dokulardan protein izolasyonu

SSFA2'nin doku örneklerinde protein düzeyinde ifadesini değerlendirmek adına tümör ve normal doku örneklerinde protein izolasyonu gerçekleştirildi. -80°C derin dondurucu buzdolabında muhafaza edilen dokular ilk olarak sıvı nitrojen içinde havanda dövülüp toz haline getirildi. Ardından toz halindeki örnekler 10 mM PMSF ve 1x fosfataz inhibitörü ile hazırlanan RIPA Lizis Tamponunda (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) iyice pipetaj yapıldı ve QIAGEN TissueLyser LT kullanılarak üretici firmanın protokolü yardımıyla tüm doku örnekleri parçalandı. Süspanse edilen doku örnekleri 4°C'de 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında pelletlerden alınmadan proteinleri içeren süpernatantlar yeni ependorf tüplere aktarıldı. Ardından proteinlerin konsantrasyonları belirlendi. Protein örnekleri 10x Laemmli Sample Buffer (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ile 100°C'de 5 dakika kaynatıldı ve hemen buz üzerine alındı. Örnekler kullanılmadan önce -80°C'de saklandı.

### 3.2.16. Hücrelerden protein izolasyonu

MiR-200c-3p mimik ve kontrol mimik ile transfekte edilen FaDu ve SCC-9 hücreleri, SSFA2'yi yüksek düzeyde ifade eden FaDu hücreleri ve Taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinden protein izolasyonu yapıldı. 6 kuyucuklu platelere ekilen FaDu ve SCC-9 hücreleri tutunduktan 1 gün sonra miR-200c-3p mimik ve kontrol mimik ile

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

---

transfekte edildi. 48 saat sonra 1x PBS ile yıkanan 6 kuyucuklu platenin kuyusundaki hücreler scraper yardımı ile kazındı.

Ayrıca, SSFA2'yi yüksek düzeyde ifade eden FaDu hücreleri ile Taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücreleri eşit miktarda sayıldı. Elde edilen bütün hücre grupları için protein izolasyonu aşağıda kısaca tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi.

10 mM PMSF ve 1x fosfataz inhibitörü içeren RIPA Lizis Tamponu (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) içeren RIPA Lizis Buffer (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) içerisinde süspansiyon haline getirilen hücreler sıvı nitrojen içerisinde üç kez dondur çöz yapılarak iyice parçalanması sağlandı. 4°C ya da buz üzerinde 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler 4°C 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Temiz ependorfa toplanan proteini içeren süpernatantlar 10x Laemmli Sample Buffer (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ile karıştırıldı ve 100°C'de 5 dakika boyunca kaynatıldı. Deneylerde kullanılmaya kadar bütün örnekler -80°C'de saklandı.

#### 3.2.17. Western blot analizi

MiR-200c-3p'nin hedef geninin protein düzeyinde ifadesini belirlemek amacıyla elde edilen her protein örneğinden eşit miktarlarda kullanılarak %10 SDS-PAGE jel yardımıyla ayrıştırıldı. Daha sonra proteinler Trans-Blot® Turbo™ Transfer Sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) yardımıyla nitroselüloz membranlara aktarıldı. Her bir membran %5 yağsız süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. 4°C'de gece boyunca anti-SSFA2 (Biorbyt, orb637630, 1:500) anti-IP3R1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-271197, 1:500) ve anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778 HRP, 1:200) primer antikorları ile inkübe edildi. 1x PBST tamponu ile 3 kez 10'ar dakika yıkanan membranlar daha sonra oda sıcaklığında HRP ile konjuge sekonder antikorla 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından protein sinyalleri Clarity Max ECL Western Blot Substrate (BioRad, United States, Hercules, CA) veya ClearBand Western Blotting Substrate (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) kullanılarak görüntülendi. Proteine özgü bant yoğunlukları Image J programı kullanılarak ölçüldü.

#### 3.2.18. Lusiferaz raportör testi

SSFA2'nin MiR-200c-3p'nin doğrudan hedefi olduğunu doğrulamak amacıyla lusiferaz raportör testi yapıldı. Bunun için miR-200c-3p'nin hedef dizilerini içeren SSFA2 3'UTR plazmidi (pMir Target vector 7.9 kb) OriGene Technologies firmasından ticari olarak temin edildi. HEK-293 hücreleri 6 kuyucuklu platelerin her bir kuyusunda  $8 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 3 tekrarlı olarak ekildi. 24 saat sonra miR-200c-3p mimik ya da kontrol mikroRNA ve aday hedef geni içeren 3'UTR luciferase reporter (Origene, Rockville, MD) plazmidi Lipofectamine 3000 reagent (Thermo Fisher Scientific) yardımıyla hücrelere transfekte edildi. Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra lizis tamponuyla hücrelerin iyi bir şekilde parçalanması sağlandı. Elde edilen lizatlar, LightSwitch™ Luciferase Assay Kit (Active Motif) kullanılarak lusiferaz aktiviteleri bakımından karşılaştırıldı. Ardından QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) aracılığıyla aday hedef genin 3'UTR bölgesindeki tahmini hedef dizisinde üretici firmanın protokolüne göre mutagenез gerçekleştirildi. 'QuikChange Primer Design Tool' online veritabanı kullanılarak Mutagenез primer dizileri tasarlandı. Lusiferaz raportör testi mutant dizileri içeren plazmitlerle yukarıda tarif edildiği şekilde tekrar edildi. Çalışma kapsamında kullanılan mutagenезe ait primer dizileri Çizelge 3.6'da verilmiştir.

#### Çizelge 3.6. SSFA2 3'UTR site directed mutagenез primer dizileri

##### SSFA2-3'UTR-Mut

---

Forward (5'-3')	agttttaaattaattctaataagggaaatcaaatgaaataaagtcacatacaataaataattaggctttcaaactgctagag
Reverse (3'-5')	agttttaaattaattctaataagggaaatcaaatgaaataaagtcacatacaataaataattaggctttcaaactgctagag

---

#### 3.2.19. Apoptoz deneyi

MiR-200c-3p transfeksiyonunun FaDu ve SCC-9 hücrelerindeki apoptotik aktivite üzerindeki etkisi için kaspaz deneyi yapıldı. Bunun için ilk olarak, 6 kuyucuklu platein her bir kuyusuna FaDu ( $8 \times 10^4$ ) ve SCC-9 ( $10 \times 10^4$ ) hücreleri ekildi ve  $37^\circ\text{C}$ 'de 1 gün inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda hücreler miR-200c-3p mimik veya kontrol mimik ile transfekte edildi. 48 saatlik transfeksiyon sonrası apoptotik aktivite

kolorimetrik Kaspaz-3 “CaspACE™ Assay System, Colorimetric (Biovision)” kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek ölçüldü. Ölçümler için hazırlanan kaspaz assay karışımları kuyucuklara eklendi ve karanlık ortamda 37°C’de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Optimal yoğunluk değişimleri Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) kullanılarak 405 nm’de yapılan absorbans ölçümleri ile değerlendirildi.

#### 3.2.20. Endojen süpresör deneyi

Endojen olarak SSFA2 geninin baskılanmanın fonksiyonel etkilerini görmek için “EndoGenius Suppressor Assay” (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) kullanıldı. Bunun için ilk olarak, 6 ve 96 kuyucuklu platelere deney için belirlenen sayılarda hücre ekimi gerçekleştirildi. 24 saat’lik inkübasyondan sonra üretici firmanın protokolü takip edilerek transfeğe edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler ileri fonksiyonel çalışmalar da kullanıldı.

#### 3.2.21. Hücre içi Ca<sup>2+</sup> ölçümü

Hücre içine salınan Ca<sup>2+</sup> miktarını ölçmek için “Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit” (Invitrogen, Oregon USA) kullanıldı. Bunun için ilk olarak, 96 kuyucuklu platelerin her bir kuyusuna 2x10<sup>3</sup> hücre ekildi. 37°C’de 24 saatlik inkübasyonun ardından hücre içine salınan Ca<sup>2+</sup> miktarı üretici firmanın protokolü takip edilerek ölçüldü. Ölçümler için hazırlanan Ca<sup>2+</sup> assay karışımları kuyucuklara eklendikten sonra, 1 saat 37°C inkübatörde; 1 saat de oda sıcaklığında karanlıkta bırakıldı. İnkübasyon sonrası, optimal yoğunluk değişimleri, Fluoroskan Ascent FL cihaz kullanılarak değerlendirildi.

#### 3.2.22. Xeostospongin C ve Taksol stok solüsyonlarının hazırlanması

Ticari olarak satın alınan Xeostospongin C (XEC, Cayman, 64950) üreticinin talimatlarına uygun bir şekilde hazırlandı. 50 mg XEC 56 µL DMSO içerisinde çözülerek 2 mM konsantrasyonda ana stok hazırlandı. Deneylerde kullanılacak olan 10 µM

konsantrasyonda ara doz hazırlandıktan sonra tüm stoklar kullanılıncaya kadar -80°C’de saklandı.

Ticari olarak satın alınan taksol üreticinin talimatına uygun olacak şekilde hazırlandı. Bunun için ilk olarak, 5 mg tartılıp 585 µl DMSO içerisinde çözüldükten sonra 10 mM ana stok hazırlandı. 10 mM ana stokdan daha sonra deneylerde kullanılmak üzere ara stoklar oluşturuldu. Tüm stoklar -80°C’de saklandı.

#### **3.2.23. Hücrelerin XEC ile muamele edilmesi**

XEC’in hücelere, literatür taraması sonucu belirlenen şekilde ve konsantrasyonda uygulandı (Xu et al. 2015). Bunun için ilk olarak, 6 ve 96 kuyucuklu platelere belirlenen sayıda FaDu ve FaDu SSFA2 hücreleri ekildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra, hücreler 10 µM konsantrasyonda XEC ile 15 dakika boyunca muamele edildi. Muamele sonrası XEC içeren besiyerleri çekildi, her bir kuyuya taze besiyerleri eklendi ve XEC ile muamele edilen bu hücreler daha sonraki çalışmalar için kullanıldı.

#### **3.2.24. İstatistiksel analiz**

Üç tekrarlı olarak yapılan deneylerde elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar, kontroller ile kıyaslanarak Mann-Whitney-U testi yardımıyla yapılmıştır. Figürler GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) ve Adobe Photoshop 21 aracılığıyla oluşturulmuştur. Student’s t test aracılığıyla analiz edilen tüm istatistiksel verilerin 0,05’e eşit veya daha küçük değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

##### 4.1. Baş ve Boyun Kanseri Doku Örneklerinde miR-200c-3p ve miR-363-3p'nin İfade Düzeyi Analizi

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda rutin olarak patolojik açıdan incelenme amacıyla alınan ve Atatürk Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda incelemesi yapılan ve tez kapsamında kullanılan baş ve boyun kanseri dokularının ait olduğu hastaların kliniko-patolojik özellikleri çizelge 4.1'de verilmiştir.

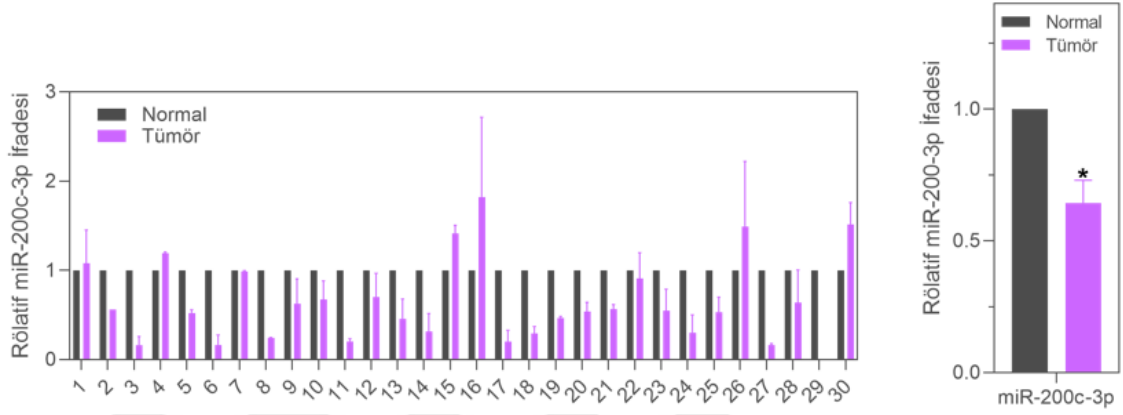
**Çizelge 4.1.** Hastaların kliniko-patolojik özellikleri

	Hasta Sayısı (30)
<b>Yaş</b>	
≤ 60	15
> 60	14
-	1
<b>Cinsiyet</b>	
Erkek	29
Kadın	1
<b>Tümör Konumu</b>	
Supraglottik	13
Glottik	17
<b>TNM Evre</b>	
T1 ve T2	12
T3 ve T4	18
<b>Histolojik Grade</b>	
I ve II	10
III ve IV	20

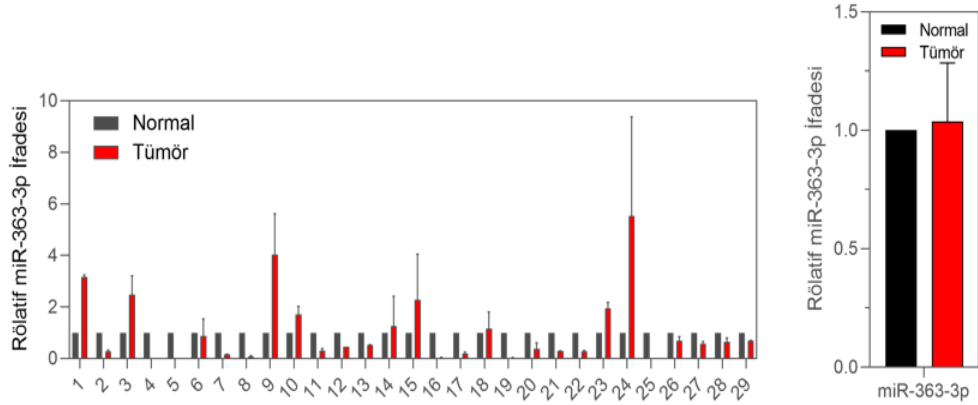
Bu hastalardan temin edilen dokularda miR-200c-3p ve miR-363-3p'nin rölatif ifade seviyesi kantitatif gerçek zamanlı PZR yardımıyla değerlendirildi. Gen ifadelerinin normalizasyonu için RNU43 internal kontrol olarak kullanıldı ve rölatif kantitasyon analizi delta-delta-CT metodu yardımıyla yapıldı.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

BBK tümör doku örneklerinde miR-200c-3p'nin ifade düzeyinin aynı hastalardan elde edilen normal doku örneklerine göre yaklaşık 2 kat azaldığı tespit edilmesine karşın (Şekil 4.1); miR-363-3p'nin ifadesi ise tümör örneklerinde normal doku örneklerine göre değişmediği tespit edildi (Şekil 4.2). Bu bulgular göz önünde bulundurularak, sonraki fonksiyonel çalışmalarda miR-200c-3p'nin olası tümör süpresör potansiyeli araştırıldı.

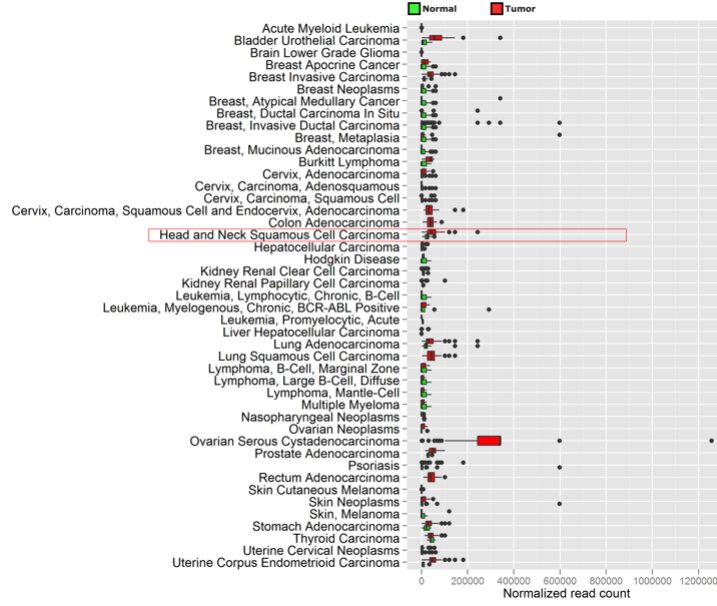


Şekil 4.1. Baş ve boyun tümör ve normal doku örneklerinde miR-200c-3p'nin ifade seviyesi.



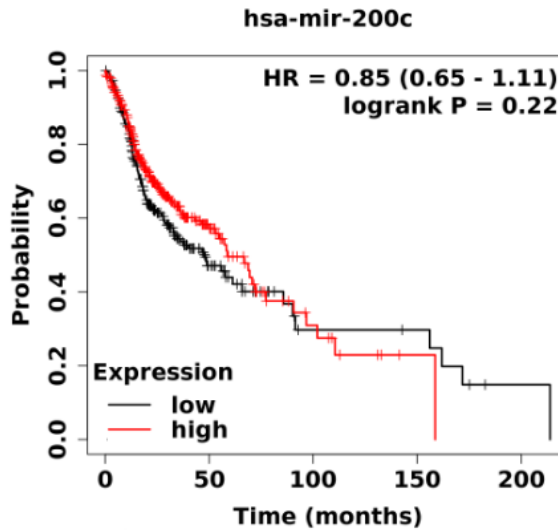
Şekil 4.2. Baş ve boyun tümör ve normal doku örneklerinde miR-363-3p'nin ifade seviyesi.

Sonrasında tümör dokularında normal dokulara göre azalan miR-200c-3p'nin tümör süpresör potansiyele sahip olduğunu doğrulamak adına *in siliko* veri tabanları kullanıldı. İlk olarak miRGator 3.0 veritabanındaki verilerin yardımıyla BBK tümör ve normal dokularda miR-200c-3p'nin ifadesi incelendi ve tümör dokularında normal dokulara göre miR-200c-3p ifadesinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.3).



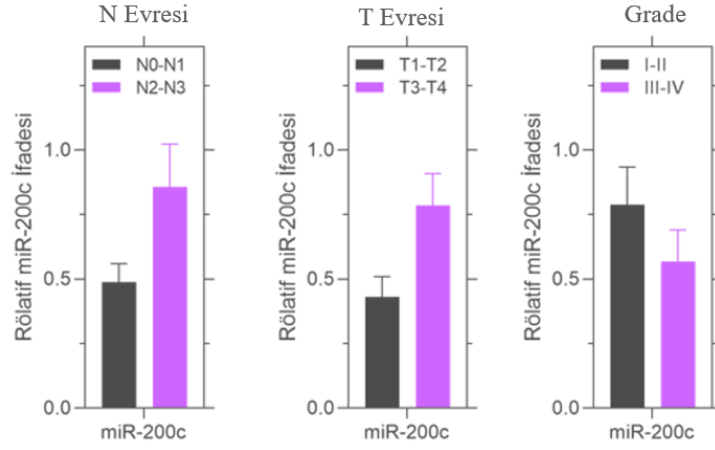
Şekil 4.3. Tümör ve normal doku örneklerinde miR-200c-3p ifadesinin miRgator 3.0 veritabanı aracılığı ile gösterimi.

Daha sonra Kaplan Meier Plotter online uygulaması kullanılarak baş ve boyun kanseri hastaları için sağkalım analizi yapıldı ve düşük miR-200c-3p ifadesi olan hastalarda medyan sağkalım 47,67 hafta iken yüksek miR-200c-3p ifadesi olan hastalarda medyan sağkalımın 58,73 hafta olduğu tespit edildi (Şekil 4.4). Anlamlı olmasa da miR-200c-3p'nin tümör süpresör potansiyelini doğrulayan bu bulgu da miR-200c-3p'nin BBK karsinogenezinde önemli roller üstleniyor olabileceğine işaret etmektedir. 200c-3p'nin tümör süpresör potansiyelini doğrulayan bu bulgu da miR-200c-3p'nin BBK karsinogenezinde önemli roller üstleniyor olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.4. miR-200c-3p ifadesinin baş ve boyun hastalarında sağkalıma etkisi

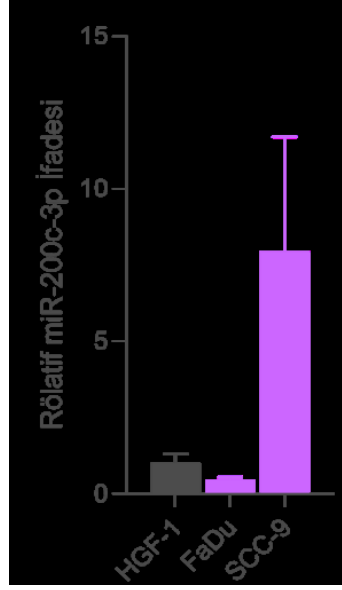
MiR-200c-3p ifadesi T evresi, N evresi ve tümör gradesi göz önüne alınarak değerlendirildiğinde anlamlı olmamakla birlikte T3 ve T4 evre tümör dokularında T2 ve T1 evre tümör dokularına göre; N2 ve N3 evre tümör dokularında N0 ve N1 evre tümör dokularına göre yüksek miR-200c ifadesi tespit edildi. Tümör gradesine göre yapılan değerlendirmede ise yine anlamlı olmamakla birlikte grade III ve IV tümör dokularında grade I ve II tümör dokularına göre düşük miR-200c ifadesi tespit edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. BBK hastalarına ait tümör ve normal doku örneklerinde T evresi, Grade ve N evresine göre miR-200c-3p'nin ifade seviyesi.

#### 4.2. BBK ve Normal Ağız İçi Fibroblast Hücrelerinde miR-200c-3p İfade Analizi

Hastalardan elde edilen tümör doku örneklerinde azalan ifadeye sahip olduğunu gösterdiğimiz miR-200c-3p'nin BBK ve normal ağız içi fibroblast hücrelerinde ifade seviyesi gerçek zamanlı PZR ile araştırıldı. BBK hücre hatından biri olan FaDu hücrelerinde miR-200c-3p'nin ifadesinin HGF-1 hücrelerine göre anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edilmesine karşın; SCC-9 hücrelerinde ise miR-200c-3p ifadesinin HGF-1 hücrelerine göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.6).

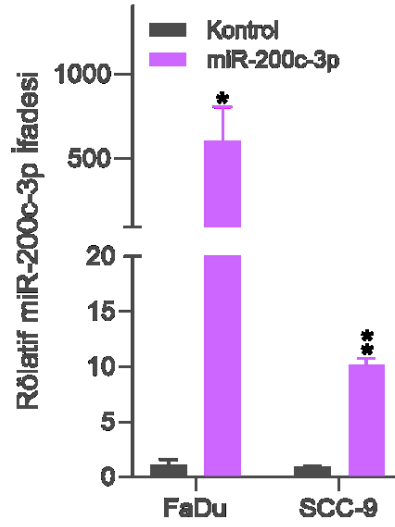


Şekil 4.6. Baş ve boyun kanseri hücre hatlarında endojen miR-200c-3p ifade seviyesi

### 4.3. FaDu ve SCC-9 Hücrelerinde Transfeksiyondan Sonra Artan miR-200c-3p İfadesinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Doğrulanması

MiR-200c-3p'nin, baş ve boyun kanseri progresyonu ile ilişkili hücre fenotipler üzerindeki etkisini belirlemek için kültüre edilen FaDu ve SCC-9 hücreleri miR-200c-3p mimik ile transfekte edildi. İlk olarak 6 kuyucuklu platelere uygun sayılarda ekilen FaDu ve SCC-9 hücreleri 24 saat sonra miR-200c-3p mimik ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edildi. Ardından transfeksiyon verimliliği kantitatif gerçek zamanlı PZR ile incelendi.

MiR-200c-3p mimik ile transfekte edilen hücrelerde mimik kontrol ile transfekte edilen hücelere göre miR-200c-3p ifadesinin anlamlı olarak arttığı ve transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği gösterildi (Şekil 4.7).

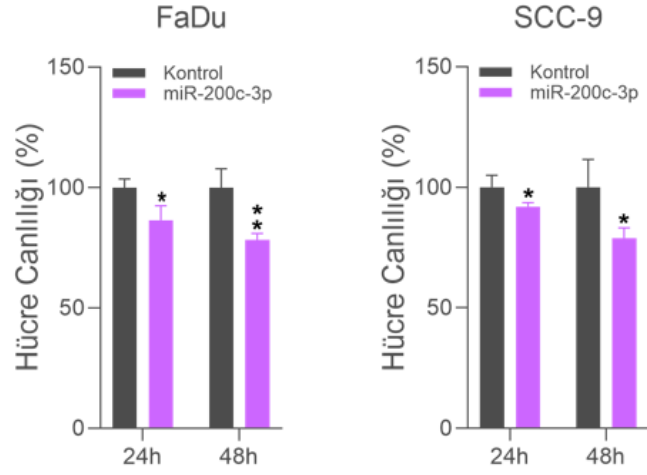


Şekil 4.7. miR-200c-3p mimik ile transfeksiyon sonrasında hücrelerdeki miR-200c-3p düzeyi.

#### 4.4. SCC-9 ve FaDu Hücrelerinde Artan miR-200c-3p İfadesinin Dil ve Hipofarenks Kanserlerinin Progresyonu ile İlişkili Hücresel Fenotipler Üzerindeki Etkilerinin Analizi

##### 4.4.1. Artan miR-200c-3p ifadesinin BBK hücre canlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması

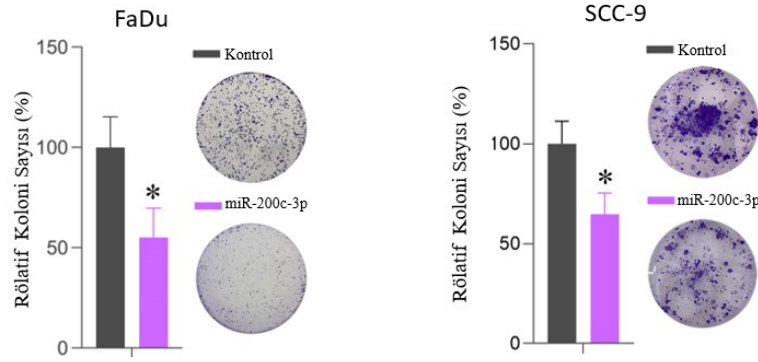
miR-200c-3p ifadesinin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi Cell Viability Detection Kit-8 (CVDK-8, EcoTech Biotechnology, Turkey) kullanılarak ürettiği firmanın protokolü takip edilerek değerlendirildi. Bu doğrultuda, artan miR-200c-3p'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinde kontrol grubuna göre hücre canlılığını azalttığı ortaya konuldu (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. miR-200c-3p ile transfekte edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde hücre canlılığı

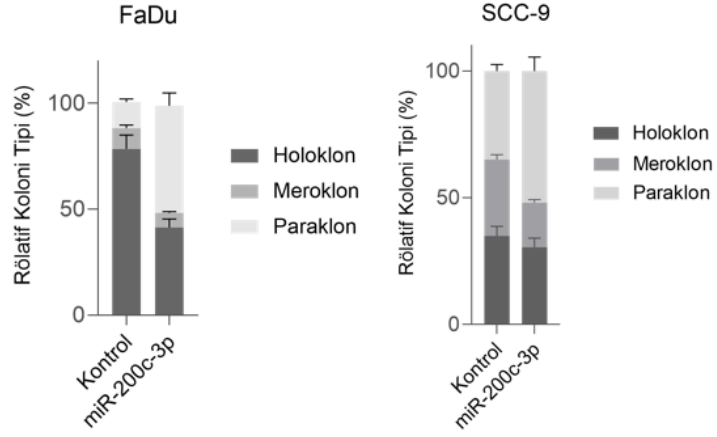
#### 4.4.2 miR-200c-3p'nin BBK hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkisinin araştırılması

MiR-200c-3p'nin koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkisi tek hücre koloni testi ile değerlendirildi. Artan miR-200c-3p ifadesinin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelini azalttığı gösterildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. miR-200c-3p ile transfekte edilen hücrelerin koloni sayısı üzerindeki etkisi

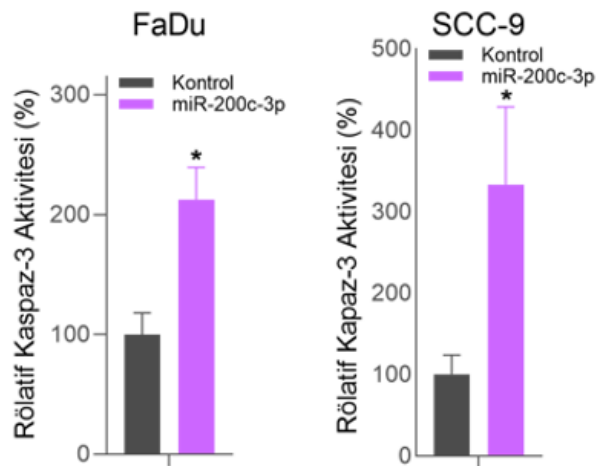
Ayrıca, artmış miR-200c-3p ifadesinin kök hücre oluşturma potansiyeli yüksek olan holoklon türü klonların sayısını azaltırken, meroklon ve özellikle de farklılaşmış hücre açısından zengin içeriğe sahip paraklon türü klonların sayısının da arttığı belirlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. miR-200c-3p ile transfekte edilen hücrelerin koloni çeşidi üzerindeki etkisi

#### 4.4.3. miR-200c-3p'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin apoptotik aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılması

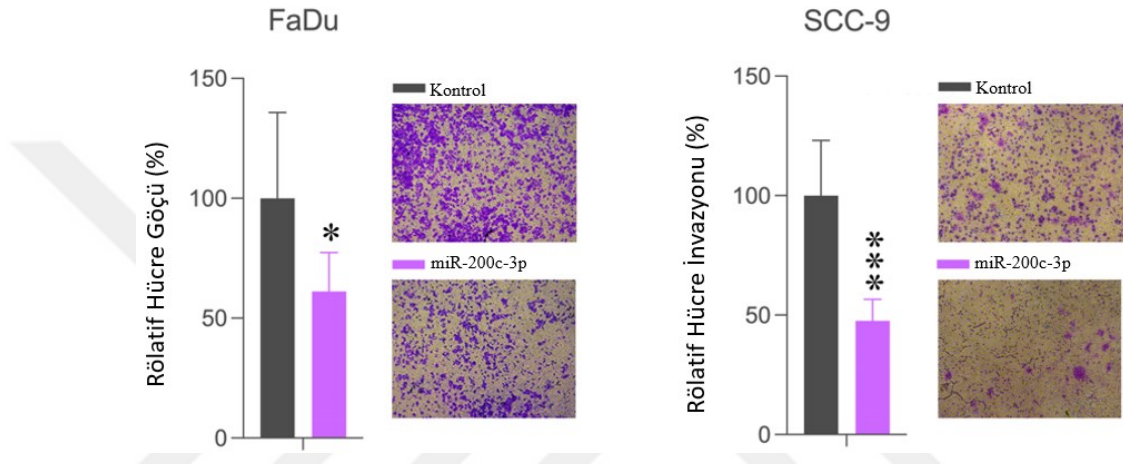
MiR-200c-3p transfeksiyonunun FaDu ve SCC-9 hücrelerinde hücre canlılığını etkileyen mekanizmalardan birisinin apoptoz aracılı olup olmadığını değerlendirmek adına, hücrelerdeki apoptotik aktivite kolorimetrik Kaspaz-3 aktivite assayı “Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit, BioVision”)” kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek ölçüldü. MiR-200c-3p ifadesinin FaDu ve SCC-9 hücrelerinde artışına paralel olarak apoptotik aktivitenin de arttığı gözlemlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. miR-200c-3p ile transfekte edilen hücrelerde apoptotik aktivite değişimi

##### 4.4.4. miR-200c-3p'nin baş ve boyun kanseri hücrelerinin hücre göçü üzerindeki etkisinin araştırılması

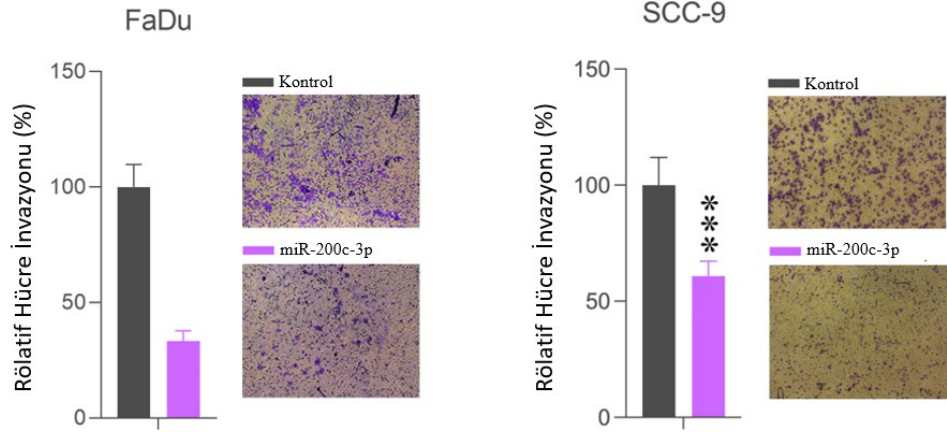
MiR-200c-3p'nin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin göç etme kapasiteleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için hücre göçü testi yapıldı. Bulgularımız, artmış miR-200c-3p ifadesine bağlı olarak FaDu ve SCC-9 hücrelerinin göç etme potansiyelinin azaldığını ortaya koydu (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. miR-200c-3p ile transfekte edilen BBK hücrelerinin hücre göçü değişimi

##### 4.4.5. miR-200c-3p'nin baş ve boyun kanseri hücrelerinin hücre invazyonu üzerindeki etkisinin araştırılması

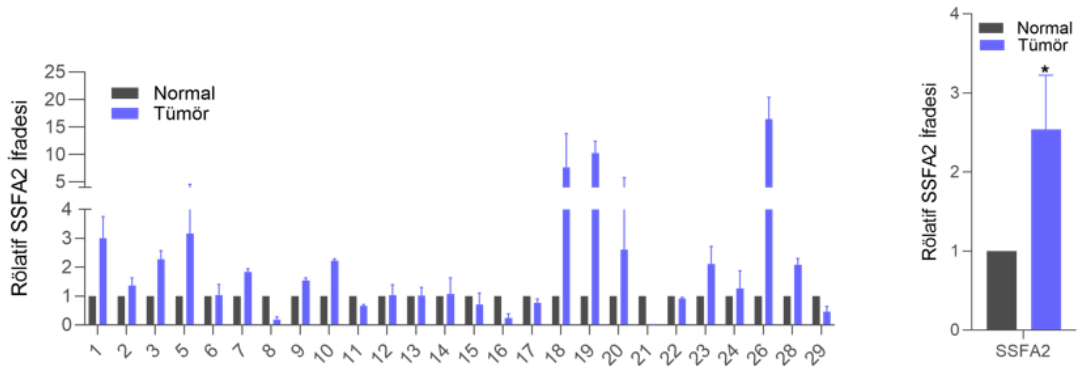
FaDu ve SCC-9 hücrelerinde artmış miR-200c-3p ifadesinin hücrelerin invazyon kapasitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek adına, Corning BioCoat™ Matrigel Invasion Chamberlar kullanıldı. Bulgularımız, artan miR-200c-3p ifadesinin FaDu ve SCC-9 hücrelerinin invaziv potansiyelini azalttığını gösterdi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. miR-200c-3p ile transfekte edilen BBK hücrelerinin hücre invazyonu değişimi

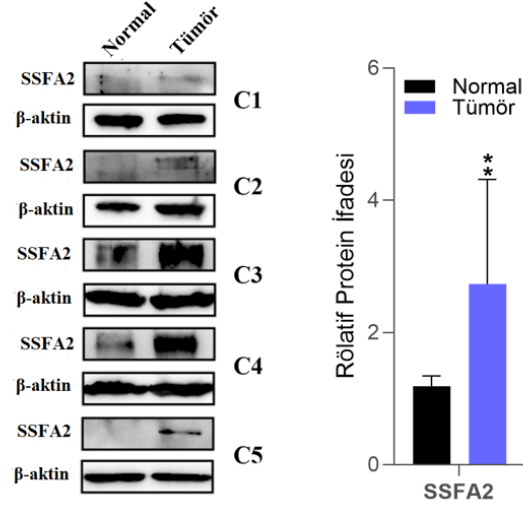
#### 4.4.6. miR-200c-3p'nin hedefinin belirlenmesi

MiR-200c-3p'nin, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarda tümör süpresör fonksiyona sahip olduğunu moleküler seviyede daha fazla doğrulamak adına miR-200c-3p'nin olası hedef genleri araştırıldı. Hem miR-200c-3p hem de miR-363-3p için 10 *in siliko* programının en az 9 tanesi tarafından tahmin edilen ve ortak olan gen hedef olarak seçildi. Tespit edilen bu tahmini hedef genler arasında, öncelikli aday genin belirlenmesi için yapılan literatür taraması sonucu dil ve hipofarenks kanserlerinde onkogen olma potansiyeli en yüksek olan SSFA2 aday gen olarak belirlendi. Ardından BBK hastalarından elde edilen tümör ve normal doku örneklerinde SSFA2'nin ifade seviyesi qRT-PCR ile değerlendirildi. Bulgularımız, BBK tümör dokularındaki SSFA2 seviyesinin normal dokulara kıyasla anlamlı şekilde daha fazla olduğunu ortaya koyarak SSFA2'nin onkogenik potansiyele sahip olabileceğini gösterdi. (Şekil 4.14).



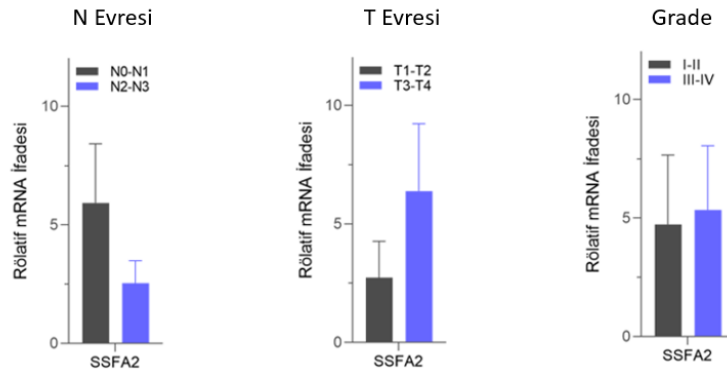
Şekil 4.14. Baş ve boyun kanseri tümör ve normal doku örneklerinde SSFA2'nin mRNA düzeyinde ifade seviyesi.

BBK hastalarına ait 5 çift normal ve tümör doku örneklerinde SSFA2 ifade seviyesi protein düzeyinde western blot ile değerlendirildi. Bulgularımız SSFA2 ifade seviyesinin tümör doku örneklerinde normal dokulara göre anlamlı bir şekilde arttığını gösterdi (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** Tümör ve normal doku örneklerinde SSFA2'nin protein düzeyinde ifade seviyesi.

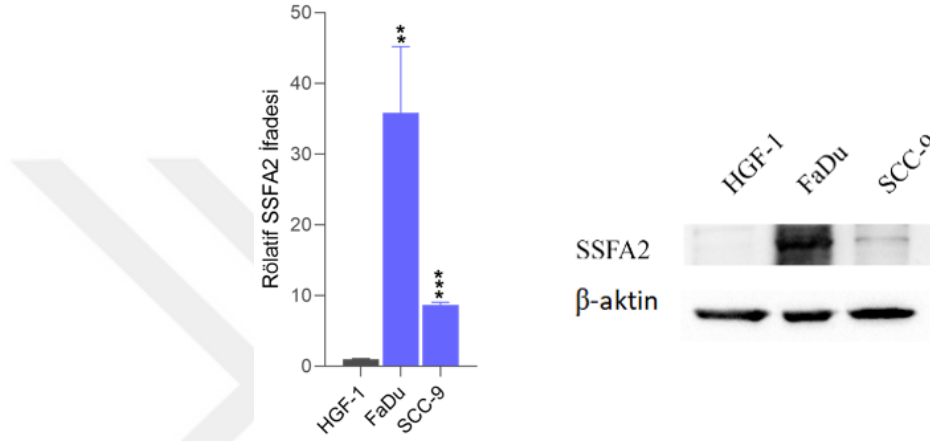
Ayrıca, SSFA2 ifadesi için T evresi, tümör gradesi ve N evresine göre karşılaştırma yapıldığında anlamlı olmamakla birlikte T3 ve T4 evre tümör dokularında T1 ve T2 evre tümör dokularına göre yüksek SSFA2 ifadesi belirlendi. N evresine göre yapılan değerlendirmede ise N2 ve N3 evre tümör dokularında N0 ve N1 evre tümör dokularına göre daha düşük düzeyde SSFA2 seviyesi tespit edildi. Tümör gradesine göre yapılan değerlendirmede ise SSFA2'nin ifadesinin grade III ve IV tümör dokularında grade I ve II tümör dokularına göre değişmediği tespit edildi (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** Baş ve boyun kanseri tümör ve normal doku örneklerinde SSFA2 ifadesi

#### 4.5. BBK Hücre Hatlarında SSFA2 İfade Düzeyi Analizi

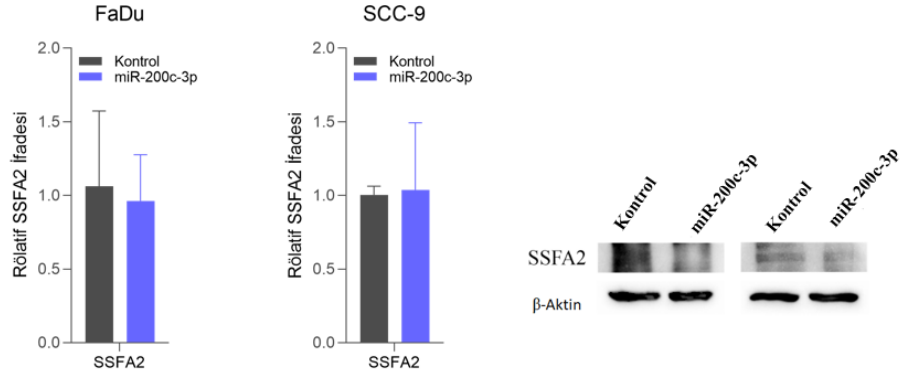
SSFA2'nin ifadesi immortalize insan ağız içi fibroblast hücreleri HGF-1 ile FaDu ve SCC-9 hücre hatlarında mRNA seviyesinde qRT-PCR ile, protein düzeyinde ise western blot ile değerlendirildi. Bulgularımız, FaDu ve SCC-9 hücre hatlarında HGF-1 hücreleri ile karşılaştırıldığında hem mRNA hem de protein seviyesinde SSFA2 ifadesinin arttığını gösterdi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Baş ve boyun kanseri hücre hatlarında SSFA2'nin mRNA ve protein düzeyinde ifade seviyesi.

#### 4.6. SCC-9 ve FaDu Hücrelerindeki SSFA2 İfadesinin miR-200c-3p Transfeksiyonu Sonrasında RNA ve Protein Düzeyinde Tespiti

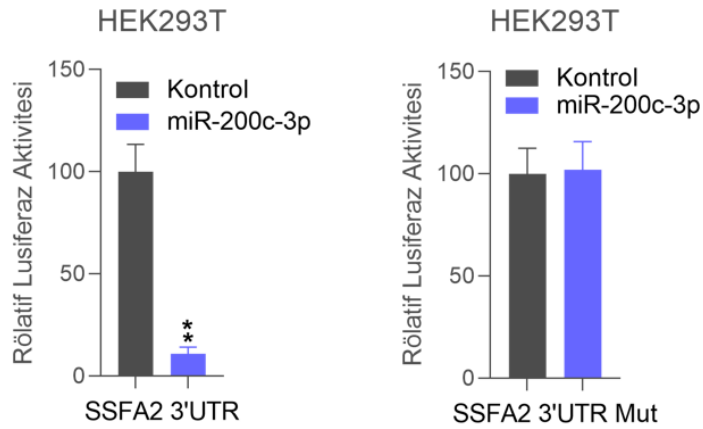
MiR-200c-3p mimik ya da kontrol mimik ile transfekte edilen BBK hücrelerinde SSFA2 ifade seviyesi RNA ve protein düzeyinde incelendi. MiR-200c-3p ile transfekte edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde kontrol mikroRNA ile transfekte edilen hücelere göre onkogenik potansiyele sahip olduğu düşünülen SSFA2'nin protein düzeyinde azaldığı, ancak RNA düzeyinde değişmediği ortaya çıkarıldı (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** miR-200c-3p ile transfekte edilen BBK hücre hatlarında SSFA2 ifadesinin RNA ve protein düzeyinde tespiti.

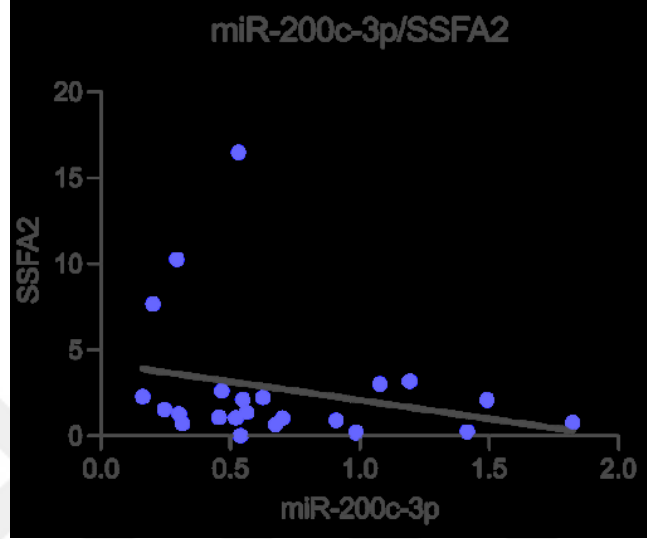
#### 4.7. SSFA2'nin, miR-200c-3p'nin Doğrudan Hedefi Olduğunun Teyit Edilmesi

Elde ettiğimiz bu bulgular doğrultusunda, SSFA2'nin miR-200c-3p'nin doğrudan bir hedefi olduğunu doğrulamak adına lusiferaz raportör testi yapıldı. MiR-200c-3p'nin transfekte edildiği hücrelerde, SSFA2 3'UTR'sini taşıyan lusiferaz geninin aktivitesinin azaldığı gösterildi (Şekil 4.18). Daha sonra SSFA2'nin 3'UTR bölgesindeki tahmini miR-200c-3p bağlanma dizisinde QuikChange II XL Site Directed Mutagenesis Kit yardımıyla mutagenез meydana getirildi. Hedef bölgede oluşturulan mutagenезin başarılı şekilde gerçekleştirildiği CodonCode Aligner Software yardımıyla doğrulandı ve ardından tahmini miR-200c-3p bağlanma dizisi değiştirilen SSFA2 3'UTR'sini taşıyan lusiferaz geninin aktivitesi üzerinde mimik miR-200c-3p'nin etki etmediği gösterildi (Şekil 4.19). Bu veriler, SSFA2'nin miR-200c-3p'nin doğrudan bir hedefi olduğunu ortaya koydu.



**Şekil 4.19.** miR-200c-3p mimik ve SSFA2 3'UTR plazmidinin HEK293T hücrelerine birlikte yapılan transfeksiyon ardından hücrelerde belirlenen lusiferaz aktivite düzeyi.

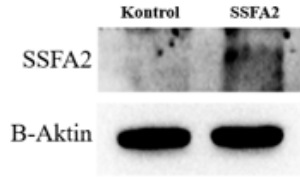
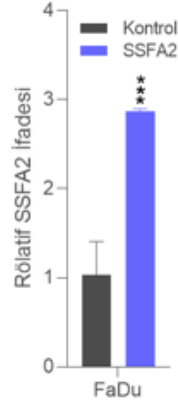
Elde ettiğimiz bu veriler baş ve boyun kanserinde tümör süpresör fonksiyon gösteren miR-200c-3p onkogenik potansiyele sahip SSFA2 ile negatif yönde bir korelasyon gösterdiğini ve bunun neticesinde de BBK patogenezinde önemli roller oynayabileceğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. miR-200c-3p ve SSFA2 arasında negatif yönlü bir korelasyon mevcuttur

#### 4.8. SSFA2 Overekspresyon Plazmitleri İle Transfekte Edilen Baş ve Boyun Kanseri Hücresinde SSFA2'nin Artmış İfadesinin Doğrulması

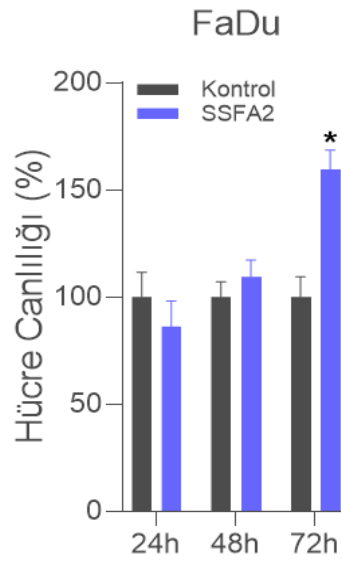
SSFA2'nin baş ve boyun kanserinde onkogenik role sahip olduğunu *in vitro* çalışmalar yardımıyla daha detaylı araştırmak için ticari olarak satın alınan, SSFA2'nin açık okuma çerçevesinin klonlandığı pCMV6-Entry vektörü ve kontrol plazmiti pCMV6-AC-GFP kullanıldı. Çoğaltıldıktan sonra hazır hale getirilen plazmitler FaDu hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan sonra seçilimi tamamlanan hücrelerden RNA ve protein seviyesinde SSFA2 ifadesine bakıldı ve SSFA2 ifade artışı RNA ve protein düzeyinde doğrulandı (Şekil 4.21).



**Şekil 4.21.** FaDu hücrelerinde stabil overeksprese edilen SSFA2'nin mRNA ve protein düzeyinde ifadesi.

#### 4.9. SSFA2'nin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

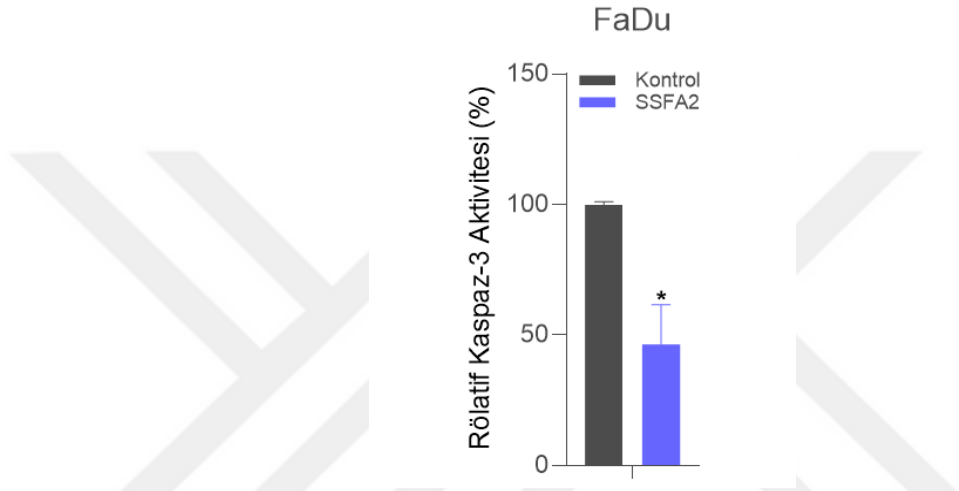
FaDu hücrelerinin canlılığı üzerinde SSFA2'nin etkisi Cell Viability Detection Kit-8 (CVDK-8, EcoTech Biotechnology, Turkey) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre değerlendirildi. Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda SSFA2'nin aşırı ifade edildiği FaDu hücrelerinde canlılığında artış gösterdiği ortaya konuldu (Şekil 4.22).



**Şekil 4.22.** FaDu hücrelerinde stabil overeksprese edilen SSFA2'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

#### 4.10. SSFA2'nin Hücre Apoptozu Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

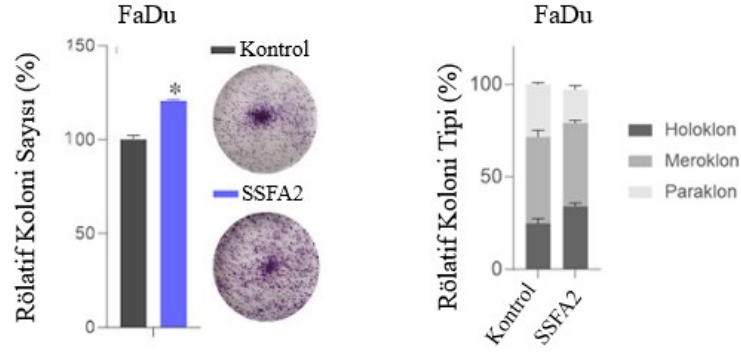
SSFA2'nin FaDu hücrelerinin canlılığını etkileyen mekanizmalardan birisinin apoptoz kaynaklı olup olmadığını değerlendirmek için hücrelerdeki apoptotik aktivite kolorimetrik Kaspaz-3 aktivite testi “Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit, BioVision)” kiti yardımıyla ölçüldü. SSFA2 ifadesinin FaDu hücrelerindeki artışına paralel apoptotik aktivitenin azaldığı belirlendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. FaDu hücrelerinde stabil overeksprese edilen SSFA2'nin hücrenin apoptotik aktivitesi üzerindeki etkisi.

#### 4.11. SSFA2'nin FaDu Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

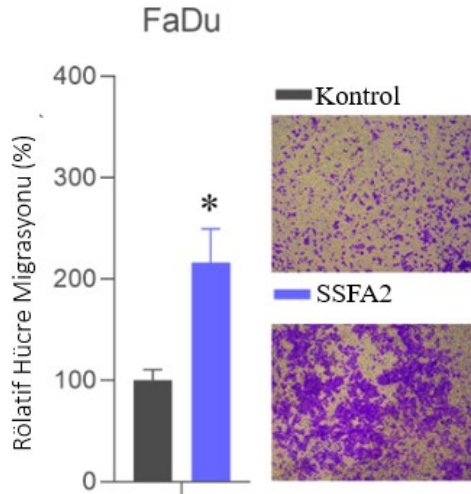
SSFA2'nin koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkisi tek hücre koloni testi yardımıyla incelendi. Bulgularımız, artan SSFA2 ifadesine paralel FaDu hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelinin de arttığını gösterdi (Şekil 4.24). Ayrıca, SSFA2'nin yüksek düzeyde ifade edildiği FaDu hücrelerinde, holoklon türü koloni sayıları artarken, paraklon türü koloni sayılarında azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. SSFA2 overeksprese plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli.

#### 4.12. SSFA2'nin FaDu Hücrelerinin Göç Etme Kapasiteleri Üzerindeki Etkisinin Analiz Edilmesi

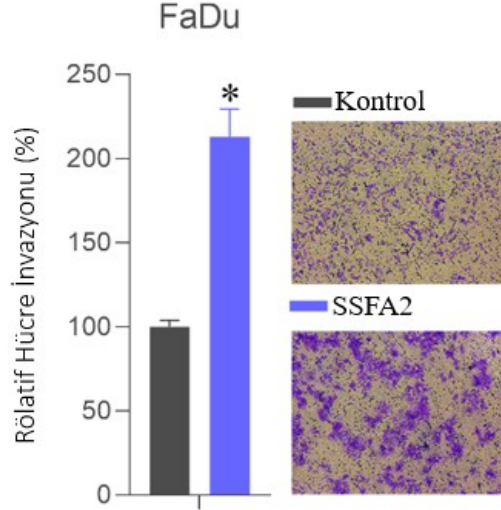
SSFA2'nin FaDu hücrelerinin göç etme kapasitesi üzerindeki etkisi Transwell insert testi kullanımıyla değerlendirildi. Bulgularımız artan SSFA2 ifadesinin FaDu hücrelerinin hücre göçünü artırdığını ortaya koydu (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. SSFA2 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu hücrelerinin migrasyon potansiyeli.

#### 4.13. SSFA2'nin FaDu Hücrelerinin Hücre İnvazyon Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

SSFA2'nin hücrelerin invazyon potansiyeli üzerindeki etkilerini değerlendirme de 'Corning BioCoat™ Matrigel Invasion Chamberlar kullanıldı ve artan SSFA2 ifadesinin FaDu hücrelerinde hücrelerin invaziv potansiyelini artırdığını ortaya koydu (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. SSFA2 overekspresyon plazmitleri ile transfekte edilmiş FaDu hücrelerinin invazyon potansiyeli.

Tez kapsamında elde ettiğimiz bu bulgular, SSFA2'nin baş ve boyun kanserinde onkogenik bir potansiyele sahip olabileceğini doğruladı. Ayrıca, baş ve boyun kanserlerinde taksole karşı ortaya çıkan direnç mekanizmasında SSFA2'nin potansiyel katkıları ilk defa bu tez kapsamında incelenmiştir.

#### 4.14. Taksol Dirençli BBK Hücrelerinde SSFA2'nin Etkisinin Araştırılması

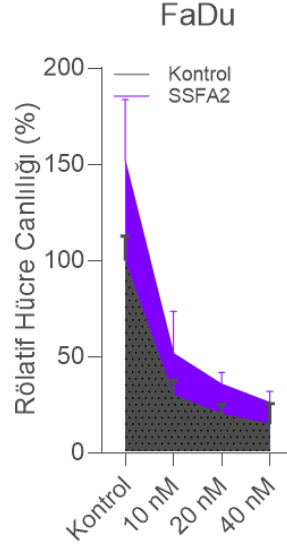
Kemoterapi direncinin oluşmasında, kanser kök hücrelerin varlığı, alternatif sinyal yollarının aktive olması ve tümör metabolizmasındaki değişimler oldukça etkilidir (Ramos and Bentires-Alj 2015). Karsinogenez sürecinde alternatif sinyal yollarının aktivasyonu taksol dahil çeşitli kemoterapötiklere karşı direncin ortaya çıkmasında oldukça etkilidir. Bugüne kadar, taksole olası direnç mekanizmaları kapsamlı bir şekilde çalışılmış ve 100'den fazla proteinin bu sürece dahil olduğu öne sürülmüştür. Bununla birlikte, altta yatan mekanizmaların tatmin edici bir açıklamanın hala eksik

olması ve önerilen proteinlerin hiçbirinin şimdiki kadar klinik olarak kanıtlanamaması, baş ve boyun kanseri hücrelerinde taksol direncinin gelişmesi sorununun hala tam olarak çözülememesine neden olmaktadır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, onkogen potansiyele sahip olduğu gösterilen SSFA2'nin, karsinogenezin çeşitli süreçlerinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. SSFA2'nin artan fosforilasyon seviyesi akciğer adenokarsinomunda düşük sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (Okayama et al. 2016). Yine yapılan bir başka çalışmada, glioma hücrelerinde SSFA2 inhibisyonunun, hücre proliferasyonunu azalttığı, G1/S geçişini düzenlediği ve apoptozu indüklediği ortaya çıkarılmıştır (Zhu et al. 2019). MiR-877-5p tarafından doğrudan hedeflenen SSFA2, prostat kanser hücrelerinin malign özelliklerinin ortadan kalkmasına neden olmuştur. (Wang et al. 2021). Bütün bu çalışmalar, SSFA2'nin insan hastalıklarında özellikle de karsinogenez sürecinde potansiyel bir hedef olarak kritik rollere sahip olabileceğini göstermiştir.

##### **4.14.1. SSFA2'nin overeksprese edildiği FaDu hücrelerinde taksolün hücre canlılığı üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi**

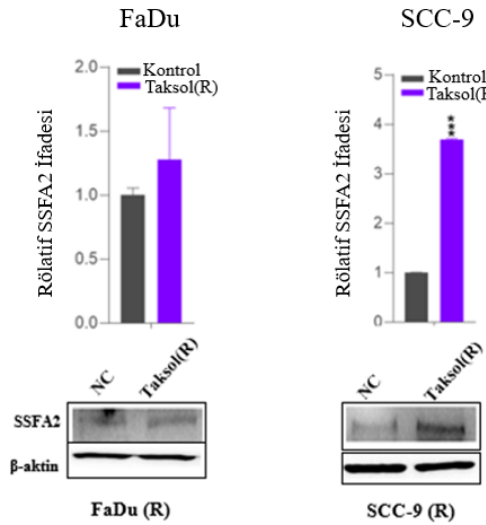
SSFA2'nin taksol direncinde etkili olduğunu değerlendirmek adına, SSFA2'yi yüksek düzeyde ifade eden FaDu hücreleri artan konsantrasyonlarda taksol ile muamele edildi. Kontrol hücrelerinde doz artışına bağlı olarak canlılık azalırken, SSFA2 yüksek düzeyde ifade edildiği hücrelerde IC<sub>50</sub> değerinin arttığı gösterildi (Şekil 4.27).



**Şekil 4.27.** SSFA2 yüksek düzeyde ifade eden FaDu hücrelerinde taksolün doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkileri.

#### 4.14.2. Taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinde SSFA2'nin mRNA ve protein düzeyinde tespiti

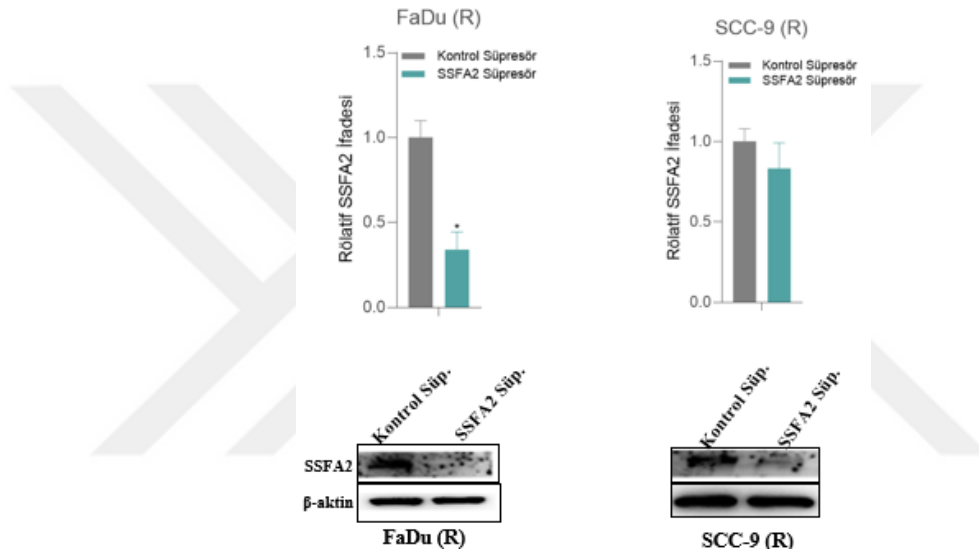
Taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinde, direnç mekanizmasının daha fazla ortaya çıkarılması adına parental ve taksol dirençli hücrelerde gerçek zamanlı PCR ve western blot analizi yapıldı. Bulgularımız doğrultusunda, taksol dirençli hücrelerde parental hücrelere göre SSFA2'nin mRNA ve protein düzeyinde arttığı ortaya konuldu (Şekil 4.28).



**Şekil 4.28.** Taksol dirençli hücrelerde SSFA2'nin mRNA ve protein düzeyinde ifade seviyesi.

#### 4.14.3. Taksol dirençli BBK hücrelerinde SSFA2'nin endojen süpresör RNA ile susturulmasının mRNA ve protein düzeyinde belirlenmesi

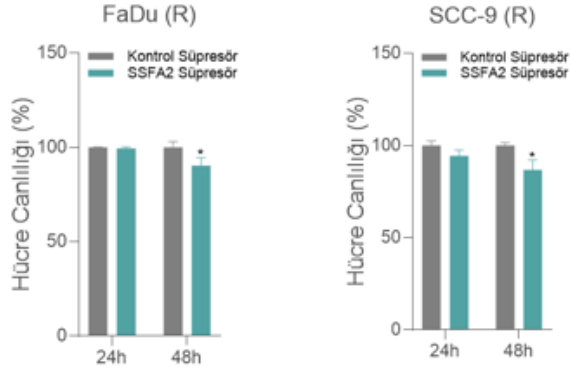
Taksol direnç kazandırılan BBK hücrelerinde SSFA2'nin endojen süpresör RNA ile susturulması sağlandı. Susturulma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla taksol dirençli SSFA2 endojen süpresör RNA ile transfekte edilen hücrelerde SSFA2 ifadesi RNA ve protein düzeyinde incelendi. Bulgularımız SSFA2'nin mRNA ve protein düzeyinde azaldığını ortaya çıkardı (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Süpresör SSFA2 ile transfekte edilen taksol dirençli hücrelerde SSFA2'nin RNA ve protein düzeyinde ifadesi.

#### 4.14.4. SSFA2'nin endojen süpresör RNA ile susturulmasının hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi

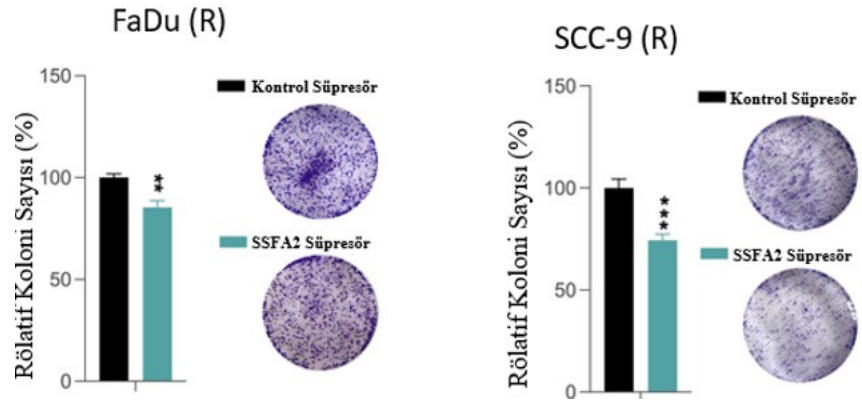
Taksol dirençli FaDu ve SCC-9 dirençli hücrelerde SSFA2 endojen süpresör testi ile susturuldu ve bu hücrelerin canlılığı 24 ve 48 saat sonra değerlendirildi. Taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinde 48. saatte canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. SSFA2 ifadesinin susturulduğu taksol dirençli hücrelerde hücre canlılık değişimi.

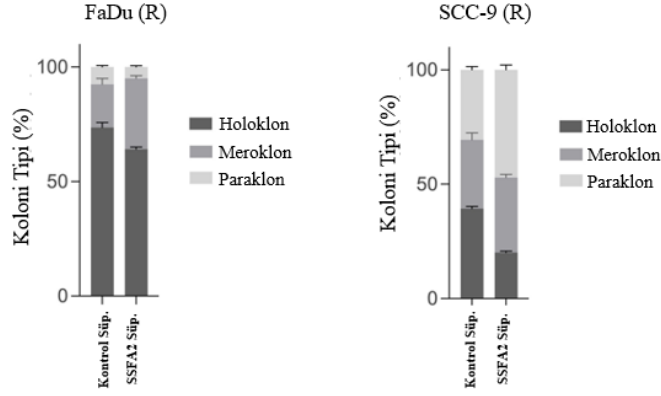
#### 4.14.5. SSFA2'nin endojen süpresör RNA ile susturulmasının hücrelerin koloni oluşturma potansiyeli üzerine etkisinin değerlendirilmesi

Taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinde SSFA2'nin susturulması sonrası hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri tek hücre koloni aracılığıyla değerlendirildi. Bulgularımız, SSFA2'nin susturulduğu taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinin koloni oluşum potansiyellerinin azaldığını ortaya koydu (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. SSFA2 ifadesi susturulmuş taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinde koloni sayısı değişimi.

Ek olarak, susturulan SSFA2 ifadesinin taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinde holoklon türü klonların azalmasına; paraklon türü klonların da artmasına neden olduğu gösterildi (Şekil 4.32).



**Şekil 4.32.** SSFA2 ifadesi susturulmuş taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinde koloni çeşidi değişimi.

#### 4.15. Taksol Dirençli BBK Hücrelerinde SSFA2 ve IP3R1 Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi

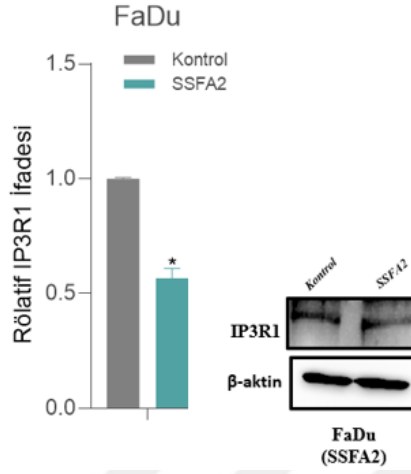
Çeşitli maligniteler için kemoterapötik direnç, tedaviden sonra daha düşük sağkalım ile ilişkilidir. Bu ilişkinin arkasındaki mekanizmalar oldukça karmaşık olmakla beraber, çok sayıda süreç tedavi yaklaşımlarının önündeki en önemli engellerdir (Hoy et al. 2021). Kanserin tam olarak tedavi edilememesi nedenlerinden biri olan bu kemoterapötik direncin oluşumuna; azalan ilaç birikimi, apoptozun baskılanması, artan DNA hasarı ve ilaç hedefindeki değişiklikler gibi birçok mekanizma katkıda bulunmaktadır. Karsinogenez sürecinde, kanser hücrelerinin alternatif sinyal yollarını tercih ettiği ve bunun sonucunda kemoterapötiklere karşı direnç mekanizması geliştirdiği çok iyi bilinmektedir. Yapılan çalışmalarla, IP3R1 aracılı  $Ca^{2+}$  salınımının da bu mekanizmalardan biri olduğu gösterilmiştir.

İnsan vücudundaki en yaygın ikinci haberci olan hücre içi kalsiyum iyonları ( $Ca^{2+}$ ) gen ekspresyonu, hücre döngüsü kontrolü, hücre hareketliliği, otofaji ve apoptoz gibi hemen hemen tüm hücresel yollarda yer alan bir sinyal molekülüdür (Berridge et al. 2000; Schrödl et al. 2009).  $Ca^{2+}$  sinyal molekülü özellikle proliferasyon ve apoptoz

arasındaki dengenin sağlanması açısından gereklidir. Hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında ortaya çıkan dengesizlikler kansere neden olan önemli bir mekanizmadır (Schrödl et al. 2009). Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalarla IP3R'nin özellikle tip I izoformunun IP3 kaynaklı  $Ca^{2+}$  salınımından,  $Ca^{2+}$  salınım kapasitesinden ve hücrelerin çoğalmasından birincil derecede sorumlu olduğu gösterilmiş (Wang et al. 2001) ve IP3R1 aracılı  $Ca^{2+}$  artışının, mitokondriyal apoptozun indüklenmesi için de önemli bir sinyal olduğu bildirilmiştir (Assefa et al. 2004). Ayrıca, IP3R1 ifadesindeki değişiklikler tümörün biyolojik özellikleriyle de ilişkilendirilmiştir. Mesane kanseri hücre hatlarında, sisplatin karşı direnç gelişimi, IP3R1 ifadesinin sisplatin kaynaklı aşağı regülasyonu ile ilişkilidir. Bu verilerle paralel olarak, IP3R1'in susturulduğu mesane hücrelerinde apoptotik mekanizmanın baskılanması hücrelerin sisplatin karşı daha dirençli hale gelmesine neden olmuştur (Tsunoda et al. 2005). Jurkat hücrelerinde de azalan IP3R1 ifadesi apoptozun önemli ölçüde inhibisyonuna yol açmıştır. Diğer taraftan bu hücrelerde IP3R1'in aşırı ifadesi, sitozolik  $Ca^{2+}$  seviyesinin artmasına ve buna bağlı olarak da apoptozun tetiklenmesine neden olmuştur (Jayaraman and Marks 1997). IP3 reseptörü etkileşimli bölge içeren protein 2 (ITPRID 2) olarak da bilinen SSFA2, IP3R'nin hücre içi lokalizasyonu ve fonksiyonel aktivitesi açısından oldukça önemli bir moleküldür (Fujimoto et al. 2011b; Fujimoto et al. 2011c).

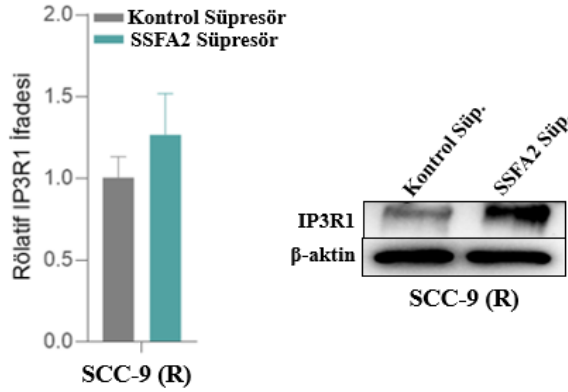
Bu bilgiler doğrultusunda, IP3R1 aktivasyonu, sitozolik  $Ca^{2+}$  miktarına artmasına ve bunun sonucunda da hücrelerin apoptoza gitmesine neden olmaktadır. Ayrıca, IP3R1'in fonksiyon gösterebilmesi onun hücre içi lokalizasyonuna da bağlıdır. Hücrelerin her hangibir agonistler ile uyarılması, ilk etapta IP3R1'in aktive olmasına ve  $Ca^{2+}$ 'un ER'den sitoplazmaya salınıp hücrelerin apoptoza gitmesine neden olmaktadır. Ancak, taksol gibi çeşitli agonistlerle uzun süreli uyarılma, IP3R1'in parçalanmasına ve sitozolik  $Ca^{2+}$  miktarının azalıp hücrelerin apoptoza gitmemesine yol açar. Apoptoza gidemeyen hücreler bir süre sonra bu kemoterapötiklere karşı direnç mekanizması geliştirmeye ve bunun sonucunda da taksol gibi kemoterapötiklerin etkinliğini kaybetmesine yol açmaktadır. Tez kapsamında elde ettiğimiz bulgular neticesinde, taksole karşı direnç mekanizmasının oluşmasında SSFA2'nin etkili olduğu gösterildi. Ancak, SSFA2'nin direnç mekanizmasında etkinliğinin IP3R1 aracılı olduğunu doğrulamak adına ilk olarak SSFA2 overeksprese edildiği FaDu hücrelerinde IP3R1

ifadesine mRNA ve protein düzeyinde bakıldı ve beklenildiği gibi SSFA2 artışına paralel IP3R1 ifadesinin azaldığı ortaya konuldu (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. SSFA2'nin overeksprese edildiği FaDu hücrelerinde IP3R1'in mRNA ve protein düzeyinde ifade seviyesi.

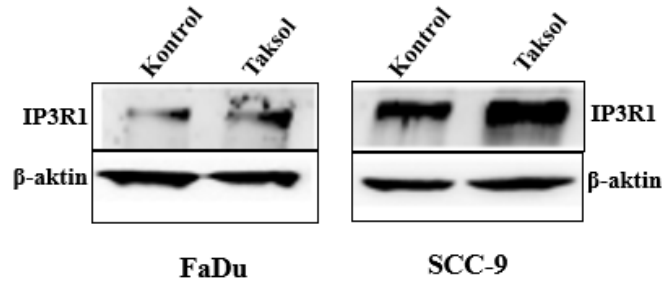
Ardından SSFA2'nin susturulduğu taksol dirençli SCC-9 hücrelerinde, IP3R1 ifadesi qRT-PCR ve western blot ile analiz edildi ve taksole direnç kazandırılan ve SSFA2'nin susturulduğu bu gruplarda IP3R1 ifadesinin mRNA ve protein düzeyinde arttığı ortaya konuldu (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. SSFA2'nin susturulduğu taksol dirençli hücrelerde IP3R1'in mRNA ve protein düzeyinde ifade seviyesi.

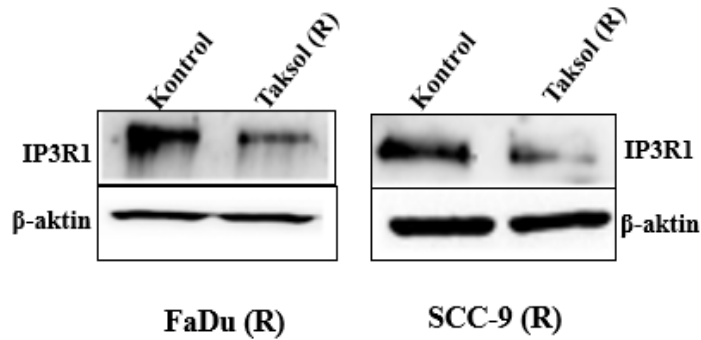
#### 4.16. Taksol Direncinin Kazanılmasında IP3R1'in Etkisinin *in vitro* Fonksiyonel Deneylerle İncelenmesi

Taksol ile kısa süreli hücrelerin muamele edilmesi IP3R1'in aktive olmasına yol açmaktadır. Bu bilgiyi doğrulamak adına taksole direnç kazandırıldıkları IC50 dozları ile muamele edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde IP3R1 ifadesi protein düzeyinde incelendi. Bulgularımız, taksol ile kısa süreli muamelenin IP3R1 ifadesinin protein düzeyinde arttığını gösterdi (Şekil 4.35).



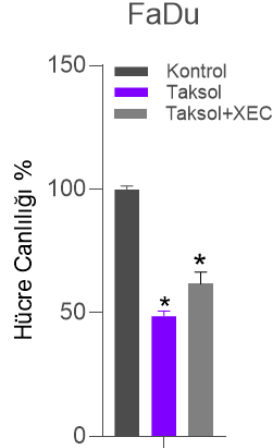
**Şekil 4.35.** Taksol IC<sub>50</sub> dozlarıyla muamele edilen FaDu ve SCC-9 hücrelerinde IP3R1'in protein düzeyi.

Ancak, taksol direncinin oluşumunda IP3R1'in etkili olduğunu ortaya koymak adına taksol dirençli FaDu ve SCC-9 hücrelerinde IP3R1'in ifadesi protein düzeyinde değerlendirildi. Bulgularımız doğrultusunda, taksol dirençli bu hücrelerde IP3R1 ifadesinin protein düzeyinde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.36).



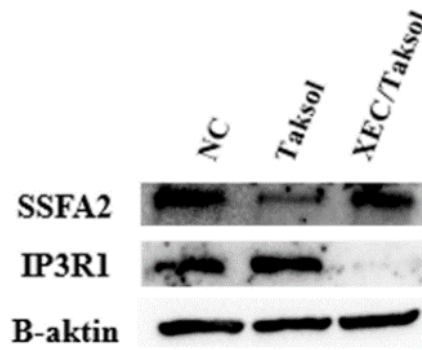
**Şekil 4.36.** Taksol dirençli hücrelerde IP3R1'in ifadesi parental hücelere göre protein seviyesinde azalmaktadır.

IP3R1'in taksol direncinde rol aldığını daha fazla doğrulamak adına literatürde IP3R inhibitörü olduğu bilinen XEC ile muamele edilen FaDu hücrelerinde hücre canlılık deneyi yapıldı. Bulgularımız doğrultusunda, XEC ile muamele edilen FaDu hücreleri taksole karşı dirençli hale geldi ve canlılığın arttığı gözlemlendi (Şekil 4.37).



**Şekil 4.37.** XEC ile muamele edilen hücreler taksole karşı direnç geliştirmektedir

Taksol direncinin kazanılmasında rol oynayan hem IP3R1 hem de SSFA2 arasındaki ilişkiyi daha fazla detaylandırmak adına XEC ile muamele edilen FaDu hücrelerinde hem IP3R1 hem de SSFA2 ifadesi western blot ile incelendi. XEC ile muamele sonrası IP3R1 ifadesinin azaldığı; SSFA2 ifadesinin arttığı ortaya konuldu (Şekil 4.38).

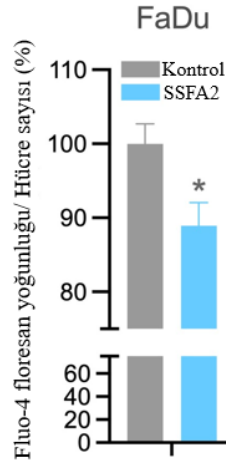


**Şekil 4.38.** XEC ile muamele sonrası FaDu hücrelerinde IP3R1 ve SSFA2 protein ifade düzeyi.

##### 4.17. $Ca^{2+}$ Salınımının Taksol Direncinin Oluşumundaki Etkisinin İncelenmesi

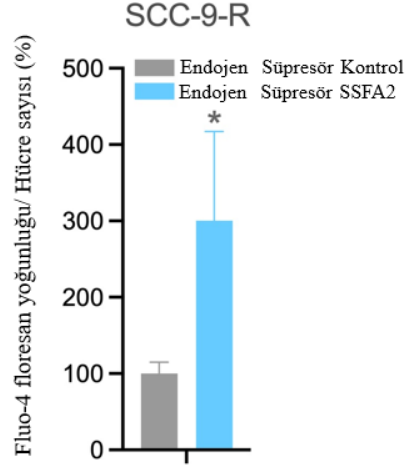
Literatürden elde ettiğimiz bilgiler doğrultusunda IP3R1 aracılı  $Ca^{2+}$  salınımı, hücrenin çoğalması ve hayatta kalması dahil birçok olayda etkilidir. Ayrıca, IP3 aracılığıyla başlatılan  $Ca^{2+}$  sinyalleri hücre ölümüne neden olan apoptotik mekanizmayı da teşvik etmektedir. Bununla birlikte, hücrelerin çeşitli agonistlerle uzun süreli uyarılması, IP3 reseptörünün ubiquitin-proteazom yoluyla aracılığıyla parçalanmasına ve ER'den hücre içerisine salınan  $Ca^{2+}$  miktarının düşmesine neden olur. Bunun sonucunda da apoptoza gidemeyen hücrenin çeşitli kemoterapötiklere karşı direnç mekanizması geliştirebilmektedir (Rong et al. 2009).

Bu bilgiler ve daha önceki elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda SSFA2'nin yüksek düzeyde ifade edildiği FaDu hücrelerinde hücre içi  $Ca^{2+}$  miktarında bir azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.39).



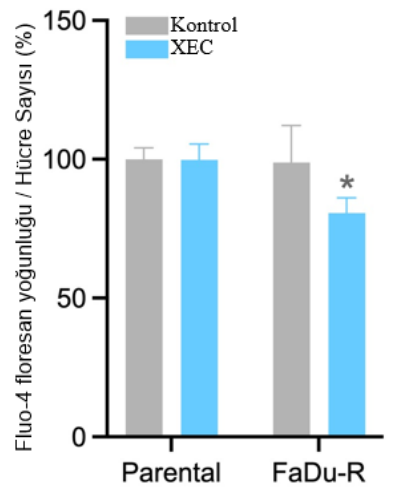
Şekil 4.39. SSFA2'nin overeksprese edildiği hücrelerde hücre içi  $Ca^{2+}$  miktarı

Ayrıca, SSFA2'nin susturulduğu taksol dirençli hücrelerde hücre içi  $Ca^{2+}$  miktarının kontrol hücrelerine göre arttığı gözlemlendi (Şekil 4.40).



**Şekil 4.40.** SSFA2'nin susturulduğu taksol dirençli hücrelerde hücre içine salınan  $Ca^{2+}$  miktarı.

Son olarak, IP3R1 inhibitörü XEC ile muamele edilen taksol dirençli FaDu hücrelerinde hücre içi  $Ca^{2+}$  miktarının azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.41).



**Şekil 4.41.** XEC ile muamele edilen Taksol dirençli hücrelerde hücre içine salınan  $Ca^{2+}$  miktarı.

Bulgularımız doğrultusunda, baş ve boyun kanseri hücrelerinde miR-200c-3p'nin azalması SSFA2 ifadesinin artmasını sağlamıştır. Artan SSFA2 ifadesinin ise hücrelerde IP3R1'in baskılanmasına, hücre içerisine salınan  $Ca^{2+}$  miktarının düşmesine ve hücrelerin apoptoza gidememesine yol açtığı söylenebilir. Sonuç olarak, apoptoza gidemeyen hücrelerin ise taksole karşı bir direnç mekanizması geliştirdiği düşünülmektedir.

### 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Baş ve boyun kanseri, 2018’de yaklaşık 900.000 yeni vaka ve 450.000 ölümle tüm dünyada en yaygın görülen altıncı malignitedir. Küresel kanser istatistik verilerine göre her yıl teşhis edilen baş ve boyun kanserleri 700.000 vaka sayısı ile yeni tanılanan kanser vakalarının yaklaşık %5’ini oluşturmaktadır. GLOBOCAN 2018 verileri baz alındığında BBK insidansının 2030 yılına kadar %30 oranında artarak yılda 1,08 milyon yeni vaka sayısına ulaşması beklenmektedir. BBK’nin %95’ini skuamöz hücreli karsinomlar oluşturmaktadır (Kilic et al. 2020; Johnson et al. 2020).

Son yıllardaki terapötik ilerlemeler BBK’nin tedavisinde başarılı sonuçlara yol açmasına rağmen, nüks ve metastaz gibi etkenler bu hastaların sağ kalım oranlarının yükselmesinin önündeki en önemli nedenlerdir (Rahman et al. 2019; Wang et al. 2020; Zhou et al. 2020). Bu nedenle, BBK karsinogenezinin moleküler alt yapısının anlaşılması, erken teşhis araçlarının geliştirilmesi, prognozun ön görülmesi ve etkili terapötiklerin oluşturulması oldukça önemlidir. Dolayısıyla, BBK hastalarına daha iyi tedavi alternatifleri sunmak için BBK'daki etkili biyobelirteçleri ve potansiyel moleküler mekanizmaları araştırmak oldukça önem arz etmektedir.

Şu ana kadar, BBK için yapılan pek çok çalışma ile, tedavilerin etkinliğini arttıracak ve hastalığın ileri evrelerde tanılanmasını engelleyecek, erken tanı biyobelirteçlerinin belirlenmesi ile yeni ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, mikroRNA’ların karsinogenez sürecinde etkili olduğunu göstermek adına çok sayıda çalışma yapılmıştır (Wang et al. 2013; Xu et al. 2022; Feng et al. 2022). Klinik örneklerde ve BBK hücre hatlarının kullanıldığı birçok çalışmada mikroRNA’ların anormal bir şekilde ifade edildiği ve bu anormalliklerin BBK’nin oluşum ve ilerlemesinde son derece önemli rollere sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle, BBK’nin patogenezinin ve progresyonunun tam olarak anlaşılmasında, mikroRNA’ların rollerini aydınlatmak dikkat çekici bir adımdır.

MikroRNA’lar genomun protein kodlayan ekzon veya intron bölgelerinden ya da proteine dönüşmeyen 3’ ve 5’ UTR bölgelerindeki RNA genlerinden veya intergenik bölgelerdeki kodlamayan genlerden üretilen, ancak proteine çevrilmeyen fonksiyonel

RNA molekülleridir. Keşfedilmelerinden bu yana mikroRNA'ların hücreSEL süreçlerdeki rollerinin keşfedilmesi ve yeni mikroRNA'ların bulunması açısından büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

Proteinlere dönüşmeyen bu mikroRNA'lar, mRNA'ların 3'UTR bölgelerini hedefleyerek bu RNA'ların parçalanmasına bunun sonucunda da translasyonun durup hedef genlerin ifadelerinin azalmasına sebep olan bir süreçte yer alırlar. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, mikroRNA'ların insan kanserlerinde kapsamlı bir şekilde deregüle edildiği ve tümör başlangıcı, büyümesi, metastazı ve ilerlemesinde önemli roller oynadığını göstermiştir (Ali Syeda et al. 2020). Bütün kanserlerin patofizyolojisini etkilediği düşünülen mikroRNA'ların, olgun veya öncü transkriptlerinin anormal ekspresyonu normal dokulara kıyasla birkaç farklı tümör dokusunda karakterize edilmiştir. Çalışmalar ayrıca belirli tümör tipleri ile ilişkili olan farklı mikroRNA ifade profillerinin de olduğunu göstermiştir (Ross and Davis 2011).

MiR-200 ailesinin önemli bir üyesi olan miR-200c-3p, farklılaşmış epitelyal dokularda güçlü bir biyobelirteç olarak keşfedilen düzenleyici bir faktördür (Korpal et al. 2008). Danarto et al. (2020) miR-200c-3p'nin metastatik prostat kanseri dokularında metastatik olmayan doku örneklerine göre ifadesinin azaldığını ve prostat kanseri hastaları için bir biyobelirteç olarak işlev görebileceğini rapor etmişlerdir. İlginç bir şekilde hem bölgesel hem de metastatik meme kanseri tümör ve serum örneklerinde miR-200c-3p'nin yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir (Navarro-Manzano et al. 2022). Karataş et al. (2016b) tarafından CD133+ ve CD133- LSHK örneklerinin mikroRNA profil karşılaştırmasının yapıldığı başka bir çalışmada miR-200c-3p ifadesinin CD133+ larenks kanser kök hücrelerinde kayda değer bir oranda ifadesinin azaldığı ortaya çıkarılmıştır. MiR-200c-3p'nin kök hücrelerle ilişkili özelliklerin kazanılması ve sürdürülmesinin yanı sıra, kemoterapi direnci, tümör gelişimi ve metastazında da rol oynadığı bilinmektedir.

Diğer mikroRNA'larda olduğu gibi miR-200c-3p'de terapötik direncin oluşumunda oldukça etkilidir. Meme kanseri hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada, miR-200c-3p'nin MDR1 ifadesini baskılayarak hücrelerin Doxorubicin'e karşı hassasiyetini arttırdığı belirtilmiştir (Safaei et al. 2022). Aynı şekilde, Olaparib dirençli yumurtalık

kanseri hücrelerine miR-200c-3p transfeksiyonu sonrası, miR-200c-3p dirençli hücelere karşı Olaparib'in antikanser etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir. Renal hücreli karsinom hücre hatlarının kullanıldığı başka bir çalışmada, miR-200c-3p'nin SLC6A1 ifadesini baskılayarak invazyon ve migrasyonu engellediği belirtilmiştir (Maolakuerban et al. 2018).

Taksol, meme, yumurtalık ve baş ve boyun kanserleri başta olmak üzere pek çok kanserin tedavisinde kullanılan antineoplastik bir kemoterapi ajanıdır. Taksol gibi mikrotübülleri hedefleyen ilaçlar, mikrotübüllerin dinamik yapısının bozulmasına, mitozun engellenmesine neden olur. Bunun sonucunda, proliferatif kapasiteleri baskılanan hücreler apoptoza yönlendirilir (Yang et al. 2009; Nogales et al. 1995).

Baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ya da kemo-radyoterapi gibi terapötik yaklaşımlar mevcuttur. Ancak tedavide uygulanacak cerrahi metotların uygulanan organın fonksiyonunu bozduğu da bilinmektedir. Bu nedenle, baş ve boyun kanseri hastalarının tedavisinde radyoterapi ve kemoterapi ya da bu ikisinin kombinasyonunun kullanımına yönelik bir eğilim vardır. Kemoterapi ya da kemoradyoterapi, tümörün ilerlemesini kontrol altına almak ve ileri evre (III veya IV) baş ve boyun kanserli hastaların sağ kalım sürelerini uzatmak için de umut verici yöntemler olarak düşünülmektedir (Kawashita et al. 2020). Bununla birlikte, kemoterapi tedavisinde ortaya çıkabilecek olan kemoterapi direnci, tümörün ilerlemesine, nüksetmesine ve hastaların uzun vadeli sağ kalım oranlarının düşmesine neden olabilmektedir (Kawashita et al. 2020).

Kanser kök hücrelerinin varlığı, apoptozun baskılanması, DNA onarım mekanizmasındaki bozukluklar, artan ilaç akışı ve epitel mezenkimal geçiş dahil olmak üzere kemoterapötik ajanlara karşı direnci destekleyen pek çok sayıda mekanizma bulunmaktadır (Bayraktar and Van Roosbroeck 2018; Wang et al. 2015a). Bu mekanizmaların ortak özelliği, taksol aktivitesinin azalmasına bağlı olarak, taksol ile uyarılma sonucu hücrelerin apoptotik mekanizmalara karşı bir direnç sergilmesine yol açtığı bilinmektedir.

Aynı zamanda KRAP olarak da bilinen SSFA2 KRAS ile indüklenen aktin etkileşimli bir gen dir. İlk olarak, HCT116 insan kolon kanseri hücrelerinde KRAS tarafından up-regüle edilen genlerden biri olarak tanımlanan KRAP, karaciğer, pankreas, kahverengi yağ dokusu ile yetişkin bir fare nin nadiren iskelet veya kalp kasında da ifade edildiği gösterilmiştir (Zhu et al. 2019; Fujimoto et al. 2009). KRAP, balıktan memeli türlerine kadar yapısal olarak korunmuş bir gen olmasına rağmen, ekspresyon paterni ve işlevi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, KRAP'ın insan ve farede yüksek dizi benzerliğine sahip olması, fizyolojik olarak bu genin oldukça önemli rollere sahip olabileceğini düşündürmektedir (Fujimoto et al. 2007).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, SSFA2'nin kanser için potansiyel bir hedef olabileceğini ortaya koymaktadır. Lenfoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada, p38 MAPK inhibisyonunun, SSFA2 ekspresyonunu azalttığı ve SSFA2'nin, kronik lenfositik lösemide proliferatif fenotipi etkileyebileceği gösterilmiştir (Lin et al. 2004).

IP3R'nin farklı tipteki dokularda farklı ifadeye sahip üç alt tipi mevcuttur ve her biri ER zarları üzerinde özelleşmiş  $Ca^{2+}$  salınım kanalı olarak fonksiyon göstermektedir. (Fujimoto et al. 2011c). Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalarla IP3R'nin özellikle tip I izoformunun (IP3R1) IP3 kaynaklı  $Ca^{2+}$  salınımından,  $Ca^{2+}$  salınım kapasitesinden ve hücrelerin çoğalmasından birincil derecede sorumlu olduğu gösterilmiş (Wang et al. 2001) ve IP3R1 aracılı  $Ca^{2+}$  artışının, mitokondriyal apoptozun indüklenmesi için de önemli bir sinyal olduğu bildirilmiştir (Assefa et al. 2004).

Hücre içi  $Ca^{2+}$  gen ekspresyonu, hücre döngüsü kontrolü, hücre hareketliliği, otofaji ve apoptoz gibi hemen hemen tüm hücre sel yolaklarda yer alan ve her yerde bulunan oldukça önemli bir sinyal molekülüdür (Berridge et al. 2000; Schrödl et al. 2009). Bu, özellikle proliferasyon ve apoptoz arasındaki dengenin sağlanması açısından gereklidir. Hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında ortaya çıkan bu tür dengesizlikler kansere neden olan önemli bir mekanizmadır (Schrödl et al. 2009).

Literatürden elde edilen birkaç araştırmaya göre, IP3 reseptörü etkileşimli bölge içeren protein 2 (ITPRID 2) olarak da bilinen SSFA2, IP3R'nin hücre içi lokalizasyonu ve fonksiyonel aktivitesi açısından oldukça önemlidir (Fujimoto et al. 2011b; Fujimoto et

al. 2011c). siRNA aracılı KRAP ifadesinin ortadan kaldırılmasıyla hücrelerde IP3 reseptörü ifadesinin artmasına ve buna paralel de sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun artmasına neden olmuştur. Aksine, KRAP'ın yüksek düzeyde ifade edildiği hücrelerde IP3 reseptörünün aktivitesini kaybettiği ve bunun sonucunda da sitozolik  $Ca^{2+}$  miktarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Thillaiappan et al. 2021). Bu nedenle KRAP, IP3 reseptörlerinin hücresel konumunun belirlenmesinde ve işlevsel olmasında oldukça önemli görünmektedir ve daha yüksek IP3R seviyeleri  $Ca^{2+}$  sinyallerinin oluşumu için zorunlu görünmektedir (Vorontsova et al. 2022).

Tüm bu bilgiler neticesinde, bu tez kapsamında miR-200c-3p'nin BBK patogenezinde ve terapötik direnç oluşumundaki rollerinin daha detaylı incelemesi yapılmış, olası hedef genleri ve bu genlerin taksol direncindeki etkileri *in vitro* deneylerle incelenmiştir.

Bu amaç doğrultusunda yapılan *in siliko* çalışmalarla, miR-200c-3p'nin farens ve nazofarens dokularında yüksek ifadeye sahip olduğu, buna karşın baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom örneklerinde nispeten düşük ifadeye sahip olduğu gösterilmiştir. Ardından, baş ve boyun kanseri hastalarına ait tümör doku örneklerinde, miR-200c-3p ifadesinin normal doku örneklerine göre önemli ölçüde azaldığının ortaya çıkarılması, miR-200c-3p'nin BBK oluşum ve patogenezinde katkı sağlayabileceğine dair önemli bulgular sunmuştur. Elde edilen bu bulgular, tez kapsamında yapılacak çalışmaların çıkış noktası olmuştur.

Elde ettiğimiz verilerde, BBK hücre hatlarında miR-200c-3p'nin artan ifadesinin, hücre canlılığı, hücre göçü, hücre invazyonu, hücrelerin koloni oluşturma potansiyeli ve apoptotik aktivitesi gibi bir takım karsinogenez süreci ile ilişkili hücresel fenotiplerle negatif yönde ilişkili olduğu gösterilmiştir.

MiR-200c-3p'nin baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarda tümör süpresör fonksiyona sahip olduğunu moleküler seviyede daha fazla doğrulamak adına miR-200c-3p'nin olası hedef genleri araştırılmıştır. Hem miR-200c-3p hem de miR-363-3p için 10 *in siliko* programın en az 9 tanesi tarafından tahmin edilen 5'er gen olası hedef olarak seçilmiştir. Tespit edilen bu tahmini hedef genler arasında öncelikli aday genin

belirlemesi için yapılan literatür taraması sonucu dil ve hipofarenks kanserlerinde onkogen olma potansiyeli en yüksek olan SSFA2 aday gen olarak belirlenmiştir. Daha sonra, BBK hücreleri ve hastalardan elde edilen tümör doku örneklerinde SSFA2 ifade seviyeleri mRNA ve protein düzeyinde incelenmiş ve SSFA2 ifadesinin hem RNA hem de protein düzeyinde kanser hücreleri ve tümör dokularında normal hücre ve normal doku örneklerine göre önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, miR-200c-3p'nin BBK hücrelerinde ektopik olarak artan ifadesine paralel SSFA2 ifadesinin mRNA ve protein düzeyinde azaldığı gösterilmiş ve bu BBK hücre hatlarında miR-200c-3p'nin olası hedefinin SSFA2 olduğu lusiferaz testi aracılığıyla doğrulanmıştır. Bunlara ek olarak, BBK hücrelerinde artan SSFA2 ifadesi agresif tümör fenotipleri ile ilişkili bulunmuştur.

BBK hastalarının tedavisinin önündeki en büyük engellerden biriside tedaviye dirençtir. BBK'inde onkogenik fonksiyona sahip olduğuna gösterdiğimiz SSFA2 bu taksol direncinin ortaya çıkmasında oldukça etkilidir. Bu amaç doğrultusunda SSFA2'yi yüksek düzeyde ifade ettiğimiz BBK'i hücrelerinde taksol direnç mekanizmasında etkili olan IP3R1'in aktivitesi kaybolmakta ve bunun neticesinde ER zarları üzerinde bulunan IP3R1 reseptörleri aracılığıyla sitoplazmaya Ca<sup>2+</sup> salınımı gerçekleşmemektedir. Bunun sonucunda hücre içerisine salgılanan Ca<sup>2+</sup> miktarı azalmakta ve taksol ile uyarılan hücreler apoptoza gidememektedir. Sonuç olarak, taksole karşı kazanılan direnç mekanizmalarından birisinin de IP3R1 aracılıklı apoptoza karşı direnç gelişmesinden kaynaklanmaktadır ve bu durumda hücre içi Ca<sup>2+</sup> miktarının azalmasıyla ilişkilidir. Bu amaç doğrultusunda miR-200c-3p'nin hedefi olduğu doğrulanan SSFA2'nin, baş ve boyun kanserlerinde taksole karşı gelişen direnç mekanizması üzerindeki etkilerini ortaya koymak adına, taksole direnç kazandırılan hücre hatlarında bir takım *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, SSFA2'nin yüksek düzeyde ifade edildiği FaDu hücreleri ve parental hücreler taksol ile muamele edilmiş ve SSFA2'nin yüksek düzeyde ifade edildiği hücrelerde taksolün canlılığı parental hücrelere göre daha az etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, taksol dirençli hücrelerde parental hücrelere göre SSFA2 ifadesinin RNA ve protein düzeyinde de önemli ölçüde arttığı ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra, taksol dirençli hücrelerde SSFA2'nin endojen olarak susturulması baş ve boyun kanser hücrelerini tekrar taksole karşı hassas hale getirmiştir.

SSFA2 ile negatif yönde korelasyon gösterdiği hem literatür taraması hem de elde ettiğimiz veriler doğrultusunda ortaya çıkarılan IP3R1'in baş ve boyun kanseri hücrelerinin taksole karşı geliştirdikleri direnç mekanizmasında etkili olduğu tespit edilmiştir. Bunun için ilk olarak, SSFA2'nin overeksprese edildiği FaDu hücrelerinde IP3R1 ifadesinin mRNA ve protein düzeyinde azaldığı gösterilmiştir. Ardından, SSFA2'nin baş ve boyun kanseri hücrelerinin taksole karşı direnç geliştirmelerinin IP3R1'in baskılanması sonucu olduğunu doğrulamak adına, taksol dirençli hücrelerde SSFA2'nin endojen olarak susturulması sağlanmış ve bu hücrelerde IP3R1 ifadesinin RNA ve protein düzeyinde arttığı gösterilmiştir.

Taksol dirençinde IP3R1'in etkili olabileceğini daha fazla doğrulamak adına, taksol dirençli hücrelerde IP3R1 ifadesinin mRNA ve protein düzeyinde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, IP3R1'in inhibitörü olan XEC ile hücrelerin muamele edilmesi de hücrelerin taksole karşı direnç geliştirmesine yol açmıştır. Bunlara ek olarak, SSFA2 ve IP3R1 arasında negatif bir korelasyon olduğu da XEC ile muamele edilen hücrelerde SSFA2'nin protein düzeyinde artış göstermesi ile doğrulanmıştır.

ER zarları üzerinde bulunan IP3R1, hücre içerisine  $Ca^{2+}$  salınımında oldukça etkilidir. Hücre içerisine salınan  $Ca^{2+}$  ise hücrenin apoptoza gitme sürecine katkı sağlayan moleküllerdendir. Bununla birlikte, hücrelerin çeşitli agonistlerle uzun süreli uyarılması IP3 reseptörünün ubikitin-proteazom yolağı aracılığıyla parçalanmasına ve ER'den hücre içerisine salınan  $Ca^{2+}$  miktarının düşmesine neden olur. Bunun sonucunda da apoptoza gidemeyen hücre çeşitli kemoterapötiklere karşı bir direnç geliştirir (Rong et al. 2009).

Bu bilgiler doğrultusunda, IP3R1 aracılı  $Ca^{2+}$  salınımının hücrelerin taksole karşı direnç geliştirmesinde etkili olduğu ilk olarak SSFA2'nin yüksek düzeyde ifade edildiği FaDu hücrelerinde incelenmiş, bu hücrelerde SSFA2 artışına paralel hücre içerisine salınan  $Ca^{2+}$  miktarında bir düşüş meydana gelmiştir. Yine aynı şekilde, XEC ile muamele edilen taksol dirençli hücrelerde, hücre içerisine salınan  $Ca^{2+}$  miktarında da bir düşüş meydana gelmiştir. Bunlara ek olarak, SSFA2'nin endojen olarak susturulduğu taksol dirençli hücrelerde, hücre içerisine salınan  $Ca^{2+}$  miktarın da bir artış meydana gelmiştir.

Bulgularımız, baş ve boyun kanseri hücrelerinde miR-200c-3p'nin azalmasının bu hücrelerde taksol direncini arttırabileceğini, SSFA2'nin susturulduğu durumlarda ise artan IP3R1'in bu direnci tersine çevirebileceğini göstermektedir. Elde ettiğimiz bu bulgular, BBK hücrelerinde taksole karşı direnç mekanizmasının gelişmesinde miR-200c-3p/SSFA2/IP3R1 aksisinin oldukça önemli bir aracı ve BBK tedavisi için önemli bir hedef olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, baş ve boyun kanserlerindeki terapötik direnç sürecindeki bu yolağın rolünün daha kapsamlı bir şekilde incelenmesi amacıyla başka projeler için ön veri olarak kullanılacak sonuçlara ulaşılmıştır.



## KAYNAKLAR

- Ali, S. Z., Langden, S. S. S., Munkhzul, C., Lee, M. ve Song, S. J. 2020. Regulatory mechanism of microrna expression in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1723.
- Amatschek, S., Koenig, U., Auer, H., Steinlein, P., Pacher, M., Gruenfelder, A., Dekan, G., Vogl, S., Kubista, E., Heider, K. H., Stratowa, C., Schreiber, M. ve Sommergruber, W. 2004. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Research*, 64(3), 844-856.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B. ve Aggarwal, B. B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25, 2097-2116.
- Anastasiadou, E., Messina, E., Sanavia, T., Mundo, L., Farinella, F., Lazzi, S., Megiorni, F., Ceccarelli, S., Pontecorvi, P., Marampon, F., Di Gioia, C. R. T., Perniola, G., Panici, P. B., Leoncini, L., Trivedi, P., Lenzi, A. ve Marchese, C. 2021. MiR-200c-3p contrasts pd-11 induction by combinatorial therapies and slows proliferation of epithelial ovarian cancer through downregulation of  $\beta$ -catenin and c-Myc. *Cells*, 10(3), 519.
- Anonymous, 2000. Web Sitesi: <https://www.dreamstime.com/process-cancer-cell-development-process-cancer-development-cancer-causing-agents-stages-transforming-normal-cell-image189151464/>, Eriřim Tarihi: 29.07.2023.
- Anonymous, 2008. Web Sitesi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27046/> doi: 10.3824/stembook.1.47.1, Eriřim Tarihi: 08.08.2023.
- Anonymous, 2018. Web Sitesi: <http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power>, Eriřim Tarihi: 02.08.2023.
- Anonymous, 2021a. Web Sitesi: <https://www.ascienceshow.com/citations/episode-105>, Eriřim Tarihi: 20.05.2023.
- Anonymous, 2021b. Web Sitesi: <https://www.drozdogan.com/turkiye-kanser-istatistikleri-2020/> Eriřim Tarihi: 29.07.2023.
- Anonymous, 2023. Web Sitesi: <https://www.coursehero.com/sg/cell-biology/cancer-causes-and-risk-factors/>, Eriřim Tarihi: 20.05.2023.
- Ardila, H. J., Sanabria-Salas, M. C., Meneses, X., Rios, R., Huertas-Salgado, A. ve Serrano, M. L. 2019. Circulating miR-141-3p, miR-143-3p and miR-200c-3p are differentially expressed in colorectal cancer and advanced adenomas. *Molecular and Clinical Oncology*, 11(2), 201-207.
- Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D. ve Ferris, R. L. 2008. Head and neck cancer. *Lancet*, 371(9625), 1695-1709.

- Assefa, Z., Bultynck, G., Szlufcik, K., Nadif Kasri, N., Vermassen, E., Goris, J., Missiaen, L., Callewaert, G., Parys, J. B. ve De Smedt, H. 2004. Caspase-3-induced truncation of type I inositol trisphosphate receptor accelerates apoptotic cell death and induces inositol trisphosphate-independent calcium release during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 43227-43236.
- Aydatlı, A. 2021. FGFR inhibitörü AZD4547'nin baş ve boyun kanseri hücrelerinde gelişen taksol direncine karşı üzerindeki etkilerinin in vitro testlerle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 79, Erzurum.
- Balachandran, P. ve Govindarajan, R. 2005. Cancer--an ayurvedic perspective. *Pharmacological Research*, 51, 19-30.
- Barлак, N. 2018. Metforminin larenks kanseri hücre hattı Hep-2 hücreleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve 5-florourasil ile sinerjistik etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 69, Erzurum.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- Bayraktar, R. ve Van Roosbroeck, K. 2018. miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics. *Cancer Metastasis Reviews*, 37, 33-44.
- Beaver, C. M., Ahmed, A. ve Masters, J. R. 2014. Clonogenicity: holoclones and meroclones contain stem cells. *PLoS One*, 9(2), e89834.
- Berridge, M. J., Lipp, P. ve Bootman, M. D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 11-21.
- Bian, W. G., Zhou, X. N., Song, S., Chen, H. T., Shen, Y. ve Chen, P. 2021. Reduced miR-363-3p expression in non-small cell lung cancer is associated with gemcitabine resistance via targeting of CUL4A. *European Review for Medical Pharmacological Science*, 25(21), 6444.
- Braakhuis, B. J., Leemans, C. R. ve Visser, O. 2014. Incidence and survival trends of head and neck squamous cell carcinoma in the Netherlands between 1989 and 2011. *Oral Oncology*, 50(7), 670-675.
- Cai, X., Hagedorn, C. H. ve Cullen, B. R. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12), 1957-1966.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. ve Croce, C. M. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 99(24), 15524-15529.
- Carthew, R. W. ve Sontheimer, E. J. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655.

- Chang, K. W., Chu, T. H., Gong, N. R., Chiang, W. F., Yang, C. C., Liu, C. J., Wu, C. H. ve Lin, S. C. 2013. miR-370 modulates insulin receptor substrate-1 expression and inhibits the tumor phenotypes of oral carcinoma. *Oral Diseases*, 19(6), 611-619.
- Chapman, B. V., Wald, A. I., Akhtar, P., Munko, A. C., Xu, J., Gibson, S. P., Grandis, J. R., Ferris, R. L. ve Khan, S. A. 2015. MicroRNA-363 targets myosin 1B to reduce cellular migration in head and neck cancer. *BMC Cancer*, 15(1), 1-10.
- Chen, R., Zhang, Y. ve Zhang, X. 2019a. MiR-1254 functions as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma by targeting CD36. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 18(9), 1533033819859447.
- Chen, Y. F., Wei, Y. Y., Yang, C. C., Liu, C. J., Yeh, L. Y., Chou, C. H., Chang, K. W. ve Lin, S. C. 2019b. miR-125b suppresses oral oncogenicity by targeting the anti-oxidative gene PRXL2A. *Redox Biology*, 22, 101140.
- Cho, J. H., Joo, Y. H., Shin, E. Y., Park, E. J. ve Kim, M. S. 2017. Anticancer effects of colchicine on hypopharyngeal cancer. *Anticancer Research*, 37, 6269-6280.
- Cui, C., Merritt, R., Fu, L. ve Pan, Z. 2017. Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(1), 3-17.
- Çapık, Ö. 2023. İnsan baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarında mir-1825'in rollerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 121, Erzurum.
- da Rocha, R. G., Santos, Santos, E. M., Gomes, E. S. B., Ramos, G. V., Aguiar, K. M., Gonçalves, B. R., Santos, S. H. S., De Paula, A. M. B., Guimarães, A. L. S. ve Farias, L. C. 2019. Leptin impairs the therapeutic effect of ionizing radiation in oral squamous cell carcinoma cells. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 48(1), 17-23.
- Danarto, R., Astuti, I., Umbas, R. ve Haryana, S. M. 2020. Urine miR-21-5p and miR-200c-3p as potential non-invasive biomarkers in patients with prostate cancer. *Turkish Journal of Urology*, 46(1), 26-30.
- Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K. ve Manyazewal, T. 2021. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*, 9, 20503121211034366.
- Deo, S. V. S., Sharma, J. ve Kumar, S. 2022. GLOBOCAN 2020 report on global cancer burden: challenges and opportunities for surgical oncologists. *Annals of Surgical Oncology*, 29(11), 6497-6500.
- Di Leva, G., Garofalo, M. ve Croce, C. M. 2014. MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology*, 9, 287-314.
- Djuranovic, S., Nahvi, A. ve Green, R. 2011. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science*, 331(6017), 550-553.

- Drobna, M., Szarzyńska, B., Jaksik, R., Sędek, Ł., Kuchmiy, A., Taghon, T., Van Vlierberghe, P., Szczepański, T., Witt, M. ve Dawidowska, M. 2020. hsa-miR-20b-5p and hsa-miR-363-3p affect expression of. *Cells*, 9(5), 1137.
- Ettinger, K. S., Ganry, L. ve Fernandes, R. P. 2019. Oral cavity cancer. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 31(1), 13-29.
- Faguet, G. B. 2015. A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database. *International Journal of Cancer*, 136(9), 2022-2036.
- Feng, Y. L., Ke, T., Wang, G. L., Qi, H. Y. ve Xiao, Y. 2022. MicroRNA-200c-3p negatively regulates ATP2A2 and promotes the progression of papillary thyroid carcinoma. *Biochemical Genetics*, 60(5), 1676-1694.
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. ve Bartel, D. P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92-105.
- Fujimoto, T., Koyanagi, M., Baba, I., Nakabayashi, K., Kato, N., Sasazuki, T. ve Shirasawa, S. 2007. Analysis of KRAP expression and localization, and genes regulated by KRAP in a human colon cancer cell line. *Journal of Human Genetics*, 52(12), 978-984.
- Fujimoto, T., Miyasaka, K., Koyanagi, M., Tsunoda, T., Baba, I., Doi, K., Ohta, M., Kato, N., Sasazuki, T. ve Shirasawa, S. 2009. Altered energy homeostasis and resistance to diet-induced obesity in KRAP-deficient mice. *PLoS One*, 4(1), e4240.
- Fujimoto, T. ve Shirasawa, S. 2011. KRAS-induced actin-interacting protein: a potent target for obesity, diabetes and cancer. *Anticancer Reserach*, 31 (7), 2413-2417.
- Fujimoto, T., Machida, T., Tanaka, Y., Tsunoda, T., Doi, K., Ota, T., Okamura, T., Kuroki, M. ve Shirasawa, S. 2011a. KRAS-induced actin-interacting protein is required for the proper localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(2), 438-443.
- Fujimoto, T., Machida, T., Tsunoda, T., Doi, K., Ota, T., Kuroki, M. ve Shirasawa, S. 2011b. Determination of the critical region of KRAS-induced actin-interacting protein for the interaction with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(2), 282-286.
- Fujimoto, T., Machida, T., Tsunoda, T., Doi, K., Ota, T., Kuroki, M. ve Shirasawa, S. 2011c. KRAS-induced actin-interacting protein regulates inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-mediated calcium release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(2), 214-217.
- Gottesman, M. M. ve Pastan, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1), 385-427.
- Gourin, C. G. ve Terris, D. J. 2004. Carcinoma of the hypopharynx. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 13(1), 81-98.

- Grégoire, V., Grau, C., Lapeyre, M. ve Maingon, P. 2018. Target volume selection and delineation (T and N) for primary radiation treatment of oral cavity, oropharyngeal, hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 87, 131-137.
- Göppel, J., Möckelmann, N., Münscher, A., Sauter, G. ve Schumacher, U. 2017. Expression of epithelial-mesenchymal transition regulating transcription factors in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Research*, 37(10), 5435-5440.
- Hanahan, D. 2022. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46.
- Ho, C. M., Lam, K. H., Wei, W. I., Yuen, P. W. ve Lam, L. K. 1993. Squamous cell carcinoma of the hypopharynx--analysis of treatment results. *Head & Neck*, 15(5), 405-412.
- Hoffman, H. T., Karnell, L. H., Shah, J. P., Ariyan, S., Brown, G. S., Fee, W. E., Glass, A. G., Goepfert, H., Ossoff, R. H. ve Fremgen, A. M. 1997. Hypopharyngeal cancer patient care evaluation. *Laryngoscope*, 107(8), 1005-1017.
- Hoffman, H. T., Karnell, L. H., Funk, G. F., Robinson, R. A. ve Menck, H. R. 1998. The national cancer data base report on cancer of the head and neck. *Archives of Otolaryngology & Head Neck Surgery*, 124(9), 951-62.
- Hoy, A. J., Nagarajan, S. R. ve Butler, L. M. 2021. Tumour fatty acid metabolism in the context of therapy resistance and obesity. *Nature Reviews. Cancer*, 21(12), 753-766.
- Hu, F., Min, J., Cao, X., Liu, L., Ge, Z., Hu, J. ve Li, X. 2016. MiR-363-3p inhibits the epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses metastasis in colorectal cancer by targeting Sox4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 474(1), 35-42.
- Hung, P. S., Liu, C. J., Chou, C. S., Kao, S. Y., Yang, C. C., Chang, K. W., Chiu, T. H. ve Lin, S. C. 2013. miR-146a enhances the oncogenicity of oral carcinoma by concomitant targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB genes. *PLoS One*, 8(11), e79926.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Bálint, E., Tuschl, T. ve Zamore, P. D. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293(5531), 834-838.
- Höffken, K., Seeber, S., Schmidt, C. G. ve Hupfauer, W. 1978. Chemotherapy of osteo and Ewing sarcomas. *Zeitschrift für Orthopädie und Ihre Grenzgebiete*, 116(4), 534-537.
- Hwa, J. S., Kwon, O. J., Park, J. J., Woo, S. H., Kim, J. P., Ko, G. H., Seo, J. H. ve Kim, R. B. 2015. The prognostic value of immunohistochemical markers for oral tongue squamous cell carcinoma. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 272(10), 2953-2959.

- Inokuchi, J., Komiya, M., Baba, I., Naito, S., Sasazuki, T. ve Shirasawa, S. 2004. Deregulated expression of KRAP, a novel gene encoding actin-interacting protein, in human colon cancer cells. *Journal of Human Genetics*, 49(1), 46-52.
- Jayaraman, T. ve Marks, A. R. 1997. T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 17(6), 3005-12.
- Jeon, J. H., Kim, M. G., Park, J. Y., Lee, J. H., Kim, M. J., Myoung, H. ve Choi, S. W. 2017. Analysis of the outcome of young age tongue squamous cell carcinoma. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, 39, 1-7.
- Jibodh, R. A., Lagas, J. S., Nuijen, B., Beijnen, J. H. ve Schellens, J. H. 2013. Taxanes: old drugs, new oral formulations. *European Journal of Pharmacology*, 717(1-3), 40-46.
- Johnson, D. E., Burtneess, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E. ve Grandis, J. R. 2020. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 92.
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D. ve Slack, F. J. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5), 635-647.
- Jordan, M. A. ve Wilson, L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Review Cancer*, 4(4), 253-265.
- Kakiuchi, S., Daigo, Y., Tsunoda, T., Yano, S., Sone, S. ve Nakamura, Y. 2003. Genome-wide analysis of organ-preferential metastasis of human small cell lung cancer in mice. *Molecular Cancer Research*, 1(7), 485-499.
- Kang, E., Jung, S. C., Nam, S. K., Park, Y., Seo, S. H., Park, K. U., Oh, H. K., Kim, D. W., Kang, S. B. ve Lee, H. S. 2022. Tissue miR-200c-3p and circulating miR-1290 as potential prognostic biomarkers for colorectal cancer. *Scientific Reports*, 12(1), 2295.
- Karakashev, S. V. ve Reginato, M. J. 2015. Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy. *Cancer Management and Reserach*, 7, 253-264.
- Karatas, O. F., Suer, I., Yuceturk, B., Yilmaz, M., Hajiyev, Y., Creighton, C. J., Ittmann, M. ve Ozen, M. 2016a. The role of miR-145 in stem cell characteristics of human laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells. *Tumour Biology*, 37, 4183-4192.
- Karatas, O. F., Suer, I., Yuceturk, B., Yilmaz, M., Oz, B., Guven, G., Cansiz, H., Creighton, C. J., Ittmann, M. ve Ozen, M. 2016b. Identification of microRNA profile specific to cancer stem-like cells directly isolated from human larynx cancer specimens. *BMC Cancer*, 16, 1-11.
- Karpozilos, A. ve Pavlidis, N. 2004. The treatment of cancer in Greek antiquity. *European Journal of Cancer*, 40(14), 2033-2040.

- Kawashita, Y., Soutome, S., Umeda, M. ve Saito, T. 2020. Oral management strategies for radiotherapy of head and neck cancer. *The Japanese Dental Science Review*, 56(1), 62-67.
- Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J. ve Plasterk, R. H. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Development*, 15(20), 2654-2659.
- Howal, S., Naqvi, S. H., Monga, S., Jain, S. K. ve Wajid, S. 2018. Assessment of cellular and serum proteome from tongue squamous cell carcinoma patient lacking addictive proclivities for tobacco, betel nut, and alcohol: Case study. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(7), 5186-5221.
- Kilic, A., Barlak, N., Sanli, F., Aytatli, A., Capik, O. ve Karatas, O. F. 2020. Mode of action of carboplatin via activating p53/miR-145 axis in head and neck cancers. *Laryngoscope*, 130(12), 2818-2824.
- Kong, Y. W., Ferland-McCollough, D., Jackson, T. J. ve Bushell, M. 2012. microRNAs in cancer management. *The Lancet Oncology*, 13(6), e249-e258.
- Kops, G. J., Weaver, B. A. ve Cleveland, D. W. 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Reviews Cancer*, 5(10), 773-85.
- Korpai, M., Lee, E. S., Hu, G. ve Kang, Y. 2008. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 14910-14914.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M. ve Griffiths-Jones, S. 2019. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D155-D162.
- Kuo, Y. Z., Tai, Y. H., Lo, H. I., Chen, Y. L., Cheng, H. C., Fang, W. Y., Lin, S. H., Yang, C. L., Tsai, S. T. ve Wu, L. W. 2014. MiR-99a exerts anti-metastasis through inhibiting myotubularin-related protein 3 expression in oral cancer. *Oral Diseases*, 20(3), e65-e75.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G. ve Taylor, S. S. 2012. The spindle assembly checkpoint. *Current Biology*, 22(22), R966-R980.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. ve Kim, V. N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051-4060.
- Lee, Y. S. ve Dutta, A. 2009. MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology*, 4, 199-227.
- Li, B., Wang, F., Li, X., Sun, S., Shen, Y. ve Yang, H. 2018. Hsa\_circ\_0008309 May be a potential biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Disease Markers*, 2018, 7496890.

- Li, J., Lei, H., Xu, Y. ve Tao, Z. Z. 2015. miR-512-5p suppresses tumor growth by targeting hTERT in telomerase positive head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *PLoS One*, 10(8), e0135265.
- Li, K., Zhou, Z., Li, J. ve Xiang, R. 2020. miR-146b functions as an oncogene in oral squamous cell carcinoma by targeting HBP1. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19, 1533033820959404.
- Li, M., Tian, L., Wang, L., Yao, H., Zhang, J., Lu, J., Sun, Y., Gao, X., Xiao, H. ve Liu, M. 2013. Down-regulation of miR-129-5p inhibits growth and induces apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting APC. *PLoS One*, 8(10), e77829.
- Li, T., Zhao, P., Li, Z., Wang, C. C., Wang, Y. L. ve Gu, Q. 2019. miR-200c-3p suppresses the proliferative, migratory, and invasive capacities of nephroblastoma cells via targeting FRS2. *Biopreservation and Biobanking*, 17(5), 444-451.
- Li, Z., Zhang, Q., Su, H., Li, H. Y., Cao, G., Xu, J. K., Wang, J. L., Niu, C. Z., Zhang, F., Yang, J. ve Chen, W. 2022. miR-5191 acts as a tumor suppressor in salivary adenoid cystic carcinoma by targeting Notch-2. *Oral Diseases*, 28(7), 1871-1881.
- Lin, Z., Crockett, D. K., Jenson, S. D., Lim, M. S. ve Elenitoba-Johnson, K. S. 2004. Quantitative proteomic and transcriptional analysis of the response to the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 in transformed follicular lymphoma cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(8), 820-833.
- Liu, C. J., Liu, T. Y., Kuo, L. T., Cheng, H. W., Chu, T. H., Chang, K. W. ve Lin, S. C. 2008. Differential gene expression signature between primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *The Journal of Pathology*, 214(4), 489-497.
- Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Ma, H., Lian, R., Wu, Z., Li, X., Yu, W., Shang, Y. ve Guo, X. 2017. MiR-503 enhances the radiosensitivity of laryngeal carcinoma cells via the inhibition of WEE1. *Tumour Biology*, 39(10), 1010428317706224.
- Ma, X., Jin, L., Lei, X., Tong, J. ve Wang, R. 2020. MicroRNA-363-3p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in retinoblastoma cells via the Akt/mTOR signaling pathway by targeting PIK3CA. *Oncology Reports*, 43(5), 1365-1374.
- Manier, S., Powers, J. T., Sacco, A., Glavey, S. V., Huynh, D., Reagan, M. R., Salem, K. Z., Moschetta, M., Shi, J., Mishima, Y., Roche-Lestienne, C., Leleu, X., Roccaro, A. M., Daley, G. Q. ve Ghobrial, I. M. 2017 The LIN28B/let-7 axis is a novel therapeutic pathway in multiple myeloma. *Leukemia*, 31(4), 853-860.
- Maolakuerban, N., Azhati, B., Tusong, H., Abula, A., Yasheng, A. ve Xireyazidan, A. 2018. MiR-200c-3p inhibits cell migration and invasion of clear cell renal cell carcinoma via regulating SLC6A1. *Cancer Biology & Therapy*, 19(4), 282-291.

- Mendenhall, W. M., Strojan, P., Beitler, J. J., Langendijk, J. A., Suarez, C., Lee, A. W., Rinaldo, A., Rodrigo, J. P., Smees, R., Eisbruch, A., Harrison, L. B., Corry, J. ve Ferlito, A. 2019. Radiotherapy for parapharyngeal space tumors. *American Journal of Otolaryngology*, 40(2), 289-291.
- Michor, F., Iwasa, Y., Vogelstein, B., Lengauer, C. ve Nowak, M. A. 2005. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis?. *Seminars in Cancer Biology*, 15(1), 43-49.
- Mody, M. D., Gill, H. S. ve Saba, N. F. 2016. The evolving and future role of taxanes in squamous cell carcinomas of the head and neck: A Review. *JAMA Otolaryngology Head & Neck Surgery*, 142(9), 898-905.
- Mohamed, Z., Hassan, M. K., Okasha, S., Mitamura, T., Keshk, S., Konno, Y., Kato, T., El-Khamisy, S. F., Ohba, Y. ve Watari, H. 2018. miR-363 confers taxane resistance in ovarian cancer by targeting the Hippo pathway member, LATS2. *Oncotarget*, 9(53), 30053-30065.
- Murillo, H., Schmidt, L. J., Karter, M., Hafner, K. A., Kondo, Y., Ballman, K. V., Vasmatazis, G., Jenkins, R. B. ve Tindall, D. J. 2006. Prostate cancer cells use genetic and epigenetic mechanisms for progression to androgen independence. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 45(7), 702-716.
- Müller-Wille, S. 2010. Cell theory, specificity, and reproduction, 1837-1870. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Science*, 41(3), 225-231.
- Navarro-Manzano, E., Luengo-Gil, G., González-Conejero, R., García-Garre, E., García-Martínez, E., García-Torralba, E., Chaves-Benito, A., Vicente, V. ve Ayala de la Peña, F. 2022. prognostic and predictive effects of tumor and plasma miR-200c-3p in locally advanced and metastatic breast cancer. *Cancers (Basel)*, 14(10), 2390.
- Nogales, E., Wolf, S. G., Khan, I. A., Ludueña, R. F. ve Downing, K. H. 1995. Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature*, 375(6530), 424-427.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. ve Peng, C. 2018. overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 9, 402.
- Okayama, A., Kimura, Y., Miyagi, Y., Oshima, T., Oshita, F., Ito, H., Nakayama, H., Nagashima, T., Rino, Y., Masuda, M., Ryo, A. ve Hirano, H. 2016. Relationship between phosphorylation of sperm-specific antigen and prognosis of lung adenocarcinoma. *Journal of Proteomics*, 139, 60-66.
- Pameijer, F. A., Mukherji, S. K., Balm, A. J. ve van der Laan, B. F. 1998. Imaging of squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Seminars in Ultrasound CT, and MR*, 19, 476-491.
- Parker, A. L., Teo, W. S., McCarroll, J. A. ve Kavallaris, M. 2017. an emerging role for tubulin isotypes in modulating cancer biology and chemotherapy resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1434.

- Petersen, J. F., Timmermans, A. J., van Dijk, B. A. C., Overbeek, L. I. H., Smit, L. A., Hilgers, F. J. M., Stuiver, M. M. ve van den Brekel, M. W. M. 2018. Trends in treatment, incidence and survival of hypopharynx cancer: a 20-year population-based study in the Netherlands. *European Archives of Otorhinolaryngol*, 275, 181-189.
- Rahman, S., Kraljević Pavelić, S. ve Markova-Car, E. 2019. Circadian (de)regulation in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 2662.
- Ramos, P. ve Bentires-Alj, M. 2015. Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance. *Oncogene*, 34(28), 3617-3626.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R. ve Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901-906.
- Rong, Y. P., Bultynck, G., Aromolaran, A. S., Zhong, F., Parys, J. B., De Smedt, H., Mignery, G. A., Roderick, H. L., Bootman, M. D. ve Distelhorst, C. W. 2009. The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106(34), 14397-14402.
- Ross, J. A. 1986. Percivall Pott 1714-1788. *Paraplegia*, 24(5), 287-292.
- Ross, S. A. ve Davis, C. D. 2011. MicroRNA, nutrition, and cancer prevention. *Advances in Nutrition*, 2(6), 472-485.
- Roy, P. S. ve Saikia, B. J. 2016. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, 53(3), 441-442.
- Sabatini, M. E. ve Chiocca, S. 2020. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *British Journal of Cancer*, 122(3), 306-314.
- Safaei, S., Amini, M., Najjary, S., Mokhtarzadeh, A., Bolandi, N., Saeedi, H., Alizadeh, N., Javadrashid, D. ve Baradaran, B. 2022. miR-200c increases the sensitivity of breast cancer cells to Doxorubicin through downregulating MDR1 gene. *Experimental and Molecular Pathology*, 125, 104753.
- Saleeb, R., Kim, S. S., Ding, Q., Scorilas, A., Lin, S., Khella, H. W., Boulos, C., Ibrahim, G. ve Yousef, G. M. 2019. The miR-200 family as prognostic markers in clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology*, 37(12), 955-963.
- Salvador-Coloma, C. ve Cohen, E. 2016. Multidisciplinary care of laryngeal cancer. *Journal of Oncology Practice*, 12(8), 717-724.
- Sano, D. ve Myers, J. N. 2007. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer Metastasis Review*, 26, 645-662.
- Schrödl, K., Oelmez, H., Edelmann, M., Huber, R. M. ve Bergner, A. 2009. Altered Ca<sup>2+</sup>-homeostasis of cisplatin-treated and low level resistant non-small-cell and small-cell lung cancer cells. *Cellular Oncology*, 31(4), 301-315.

- Sermeus, A., Genin, M., Maincent, A., Fransolet, M., Notte, A., Leclere, L., Riquier, H., Arnould, T. ve Michiels, C. 2012. Hypoxia-induced modulation of apoptosis and BCL-2 family proteins in different cancer cell types. *PLoS One*, 7(11), e47519.
- Shaw, R. ve Beasley, N. 2016. Aetiology and risk factors for head and neck cancer: United Kingdom national multidisciplinary guidelines. *The Journal of Laryngology and Otology*, 130(S2), S9-S12.
- Sigerist, H. E. 1932. The historical development of the pathology and therapy of cancer. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 8(11), 642.
- Silverman, P. M., Bossen, E. H., Fisher, S. R., Cole, T. B., Korobkin, M. ve Halvorsen, R. A. 1984. Carcinoma of the larynx and hypopharynx: computed tomographic-histopathologic correlations. *Radiology*, 151(3), 697-702.
- Sun, Q., Zhang, J., Cao, W., Wang, X., Xu, Q., Yan, M., Wu, X. ve Chen, W. 2013. Dysregulated miR-363 affects head and neck cancer invasion and metastasis by targeting podoplanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(3), 513-520.
- Svoronos, A. A., Engelman, D. M. ve Slack, F. J. 2016. OncomiR or tumor suppressor? the duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer Research*, 76(13), 3666-3670.
- Swango, P. A. 1996. Cancers of the oral cavity and pharynx in the United States: an epidemiologic overview. *Journal of Public Health Dentistry*, 56(6), 309-318.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T. ve Takahashi, T. 2004. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research*, 64(11), 3753-3756.
- Tang, H., Deng, M., Tang, Y., Xie, X., Guo, J., Kong, Y., Ye, F. ve Su, Q. 2013. miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression. *Clinical Cancer Research*, 19(20), 5602-5612.
- Thammaiah, C. K. ve Jayaram, S. 2016. Role of let-7 family microRNA in breast cancer. *Noncoding RNA Research*, 1(1), 77-82.
- Thillaiappan, N. B., Smith, H. A., Atakpa-Adaji, P. ve Taylor, C. W. 2021. KRAP tethers IP. *Nature Communications*, 12(1), 4514.
- Tomik, J., Składzien, J. ve Modrzejewski, M. 2001. Evaluation of cervical lymph node metastasis of 1400 patients with cancer of the larynx. *Auris, Nasus, Larynx*, 28(3), 233-2340.
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. ve Jemal, A. 2016. global cancer incidence and mortality rates and trends--an update. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 25(1), 16-27.
- Torry, D. S. ve Cooper, G. M. 1991. Proto-oncogenes in development and cancer. *American Journal of Reproductive Immunology*, 25(3), 129-132.

- Tsunoda, T., Koga, H., Yokomizo, A., Tatsugami, K., Eto, M., Inokuchi, J., Hirata, A., Masuda, K., Okumura, K. ve Naito, S. 2005. Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor type1 (IP3R1) modulates the acquisition of cisplatin resistance in bladder cancer cell lines. *Oncogene*, 24(8), 1396-1402.
- Tétreault, N. ve De Guire, V. 2013. miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical Biochemistry*, 46(10-11), 842-845.
- Valladares-Ayerbes, M., Reboredo, M., Medina-Villaamil, V., Iglesias-Díaz, P., Lorenzo-Patiño, M. J., Haz, M., Santamarina, I., Blanco, M., Fernández-Tajes, J., Quindós, M., Carral, A., Figueroa, A., Antón-Aparicio, L. M. ve Calvo, L. 2012. Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 1-14.
- Van Roosbroeck, K., Pollet, J. ve Calin, G. A. 2013. miRNAs and long noncoding RNAs as biomarkers in human diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 13(2), 183-204.
- Vannini, I., Fanini, F. ve Fabbri, M. 2018. Emerging roles of microRNAs in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 48, 128-133.
- Vermassen, E., Van Acker, K., Annaert, W. G., Himpens, B., Callewaert, G., Missiaen, L., De Smedt, H. ve Parys, J. B. 2003. Microtubule-dependent redistribution of the type-1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in A7r5 smooth muscle cells. *Journal of Cell Science*, 116(7), 1269-1277.
- Vilming Elgaaen, B., Olstad, O. K., Haug, K. B., Brusletto, B., Sandvik, L., Staff, A. C., Gautvik, K. M. ve Davidson, B. 2014. Global miRNA expression analysis of serous and clear cell ovarian carcinomas identifies differentially expressed miRNAs including miR-200c-3p as a prognostic marker. *BMC Cancer*, 14(1), 1-13.
- Vinnitsky, V. 2014. The development of a malignant tumor is due to a desperate asexual self-cloning process in which cancer stem cells develop the ability to mimic the genetic program of germline cells. *Intrinsically Disordered Proteins*, 2(1), e29997.
- Viola, D., Giani, C., Mazzeo, S., Ugolini, C., Ciampi, R., Molinaro, E., Agate, L., Borrelli, N., Chella, A., Fontanini, G., Basolo, F. ve Elisei, R. 2017. KIF5B/RET rearrangement in a carcinoma of the thyroid gland: a case report of a fatal disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(9), 3091-3096.
- Vishnoi, A. ve Rani, S. 2017. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview. *Methods in Molecular Biology*, 1509, 1-10.
- Vokes, E. E., Weichselbaum, R. R., Lippman, S. M. ve Hong, W. K. 1993. Head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine*, 328(3), 184-194.
- Vorontsova, I., Lock, J. T. ve Parker, I. 2022. KRAP is required for diffuse and punctate IP. *Cell Calcium*, 107, 102638.

- Wang, F., Xia, J., Wang, N. ve Zong, H. 2013. miR-145 inhibits proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma in part by targeting c-Myc. *Onkologie*, 36(12), 754-758.
- Wang, G., Wang, S. ve Li, C. 2017a. MiR-183 overexpression inhibits tumorigenesis and enhances DDP-induced cytotoxicity by targeting MTA1 in nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biology*, 39(6), 1010428317703825.
- Wang, J., Chen, X., Tian, Y., Zhu, G., Qin, Y., Pi, L., Wei, M., Liu, G., Li, Z., Chen, C., Lv, Y. ve Cai, G. 2020. Six-gene signature for predicting survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Aging (Albany NY)*, 12(1), 767-783.
- Wang, J., Yang, M., Li, Y. ve Han, B. 2015a. The role of micrnas in the chemoresistance of breast cancer. *Drug Development Research*, 76(7), 368-374.
- Wang, J. J., Lei, K. F. ve Han, F. 2018a. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(12), 3855-3864.
- Wang, K., Yan, L. ve Lu, F. 2019a. miR-363-3p inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion via targeting SOX4. *Oncology Research*, 27(2), 157-163.
- Wang, L. ve Liu, H. 2016. microRNA-188 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and inhibits proliferation and invasion by targeting SIX1. *Tumour Biology*, 37, 4105-4113.
- Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N. ve Shin, Y. K. 2018b. Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: an overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2647-2693.
- Wang, M., Qiu, Y., Zhang, R., Gao, L., Wang, X., Bi, L. ve Wang, Y. 2019b. MEHP promotes the proliferation of oral cancer cells via down regulation of miR-27b-5p and miR-372-5p. *Toxicology In Vitro*, 58, 35-41.
- Wang, S. J. ve Bourguignon, L. Y. 2006. Hyaluronan-CD44 promotes phospholipase C-mediated  $Ca^{2+}$  signaling and cisplatin resistance in head and neck cancer. *Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery*, 132(1), 19-24.
- Wang, W., Yi, J., Dong, D., Mao, W., Wang, X. ve Yan, Z. 2021. miRNA-877-5p inhibits malignant progression of prostate cancer by directly targeting SSFA2. *European Journal of Histochemistry*, 65(3).
- Wang, X., Zhang, Y., Fu, Y., Zhang, J., Yin, L., Pu, Y. ve Liang, G. 2015b. MicroRNA-125b may function as an oncogene in lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 11(5), 3880-3887.
- Wang, Y., Chen, J., Taylor, C. W., Hirata, Y., Hagiwara, H., Mikoshiba, K., Toyo-oka, T., Omata, M. ve Sakaki, Y. 2001. Crucial role of type 1, but not type 3, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP(3)) receptors in IP(3)-induced  $Ca^{2+}$  release, capacitative  $Ca^{2+}$  entry, and proliferation of A7r5 vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 88(2), 202-209.

- Wang, Y., Chen, T., Huang, H., Jiang, Y., Yang, L., Lin, Z., He, H., Liu, T., Wu, B., Chen, J., Kamp, D. W. ve Liu, G. 2017b. miR-363-3p inhibits tumor growth by targeting PCNA in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 8(12), 20133-20144.
- Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Azmi, A. S., Kong, D., Banerjee, S. ve Sarkar, F. H. 2010. Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resistance Updates*, 13(4-5), 109-118.
- Waters, J. C., Chen, R. H., Murray, A. W. ve Salmon, E. D. 1998. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *The Journal of Cell Biology*, 141(5), 1181-1191.
- Woo, B. H., Kim, D. J., Choi, J. I., Kim, S. J., Park, B. S., Song, J. M., Lee, J. H. ve Park, H. R. 2017. Oral cancer cells sustainedly infected with *Porphyromonas gingivalis* exhibit resistance to taxol and have higher metastatic potential. *Oncotarget*, 8(29), 46981-46992.
- Wycliffe, N. D., Grover, R. S., Kim, P. D. ve Simental, A. 2007. Hypopharyngeal cancer. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, 18(4), 243-258.
- Xu, D. X., Guo, J. J., Zhu, G. Y., Wu, H. J., Zhang, Q. S. ve Cui, T. 2018. MiR-363-3p modulates cell growth and invasion in glioma by directly targeting pyruvate dehydrogenase B. *European Review for Medical Pharmacological Sciences*, 22(16), 5230-5239.
- Xu, L. Z., Ning, J. Z., Ruan, Y. ve Cheng, F. 2022. MiR-363-3p promotes prostate cancer tumor progression by targeting Dickkopf 3. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(4), e24360.
- Xu, X., Chen, D., Ye, B., Zhong, F. ve Chen, G. 2015. Curcumin induces the apoptosis of non-small cell lung cancer cells through a calcium signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(6), 1610-1616.
- Xuefang, Z., Ruinian, Z., Liji, J., Chun, Z., Qiaolan, Z., Jun, J., Yuming, C. ve Junrong, H. 2020. miR-331-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting elf4B-PI3K-AKT pathway. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19, 1533033819892251.
- Yang, F., Ma, H., Feng, L., Lian, M., Wang, R., Fan, E. ve Fang, J. 2015. Zinc finger protein x-linked (ZFX) contributes to patient prognosis, cell proliferation and apoptosis in human laryngeal squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(11), 13886-13899.
- Yang, L., Han, Y., Suarez Saiz, F. ve Minden, M. D. 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, 21(5), 868-876.
- Yang, X. X., Ma, M., Sang, M. X., Wang, X. X., Song, H., Liu, Z. K. ve Zhu, S. C. 2016. Radiosensitization of esophageal carcinoma cells by knockdown of RNF2 expression. *International Journal of Oncology*, 48(5), 1985-1996.

- Yang, Z., Kenny, A. E., Brito, D. A. ve Rieder, C. L. 2009. Cells satisfy the mitotic checkpoint in Taxol, and do so faster in concentrations that stabilize syntelic attachments. *The Journal of Cell Biology*, 186(5), 675-684.
- Yao, Y., Liu, X. Q., Yang, F. Y. ve Mu, J. W. 2022. MiR-873-5p modulates progression of tongue squamous cell carcinoma via targeting SEC11A. *Oral Diseases*, 28(6), 1509-1518.
- Ying, J., Yu, X., Ma, C., Zhang, Y. ve Dong, J. 2017. MicroRNA-363-3p is downregulated in hepatocellular carcinoma and inhibits tumorigenesis by directly targeting specificity protein 1. *Molecular Medicine Reports*, 16(2), 1603-1611.
- Zhang, J., Zhang, H., Qin, Y., Chen, C., Yang, J., Song, N. ve Gu, M. 2019. MicroRNA-200c-3p/ZEB2 loop plays a crucial role in the tumor progression of prostate carcinoma. *Annals of Translational Medicine*, 7(7), 141.
- Zhang, T., Sun, Q., Liu, T., Chen, J., Du, S., Ren, Liao, G. ve Yuan, Y. 2014. MiR-451 increases radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting ras-related protein 14 (RAB14). *Tumour Biology*, 35, 12593-12599.
- Zhang, Y., Zhao, Y., Liu, L., Su, H., Dong, D., Wang, J., Chen, Q. ve Li, C. 2018. MicroRNA-19b promotes nasopharyngeal carcinoma more sensitive to cisplatin by suppressing KRAS. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 17, 1533033818793652.
- Zhao, X. D., Zhang, W., Liang, H. J. ve Ji, W. Y. 2013. Overexpression of miR -155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3. *PLoS One*, 8(2), e56395.
- Zheng, X., Li, J., Peng, C., Zhao, J., Chi, J., Meng, X., Yun, X., Li, D., Yu, Y., Gao, M. ve Li, Y. (-2015. MicroRNA-24 induces cisplatin resistance by targeting PTEN in human tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 51(11), 998-1003.
- Zhou, H., He, Q., Li, C., Alsharafi, B. L. M., Deng, L., Long, Z. ve Gan, Y. 2022. Focus on the tumor microenvironment: A seedbed for neuroendocrine prostate. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 955669.
- Zhou, W., Feng, X., Ren, C., Jiang, X., Liu, W., Huang, W., Liu, Z., Li, Z., Zeng, L., Wang, L., Zhu, B., Shi, J., Liu, J., Zhang, C., Liu, Y. ve Yao, K. 2013. Overexpression of BCAT1, a c-Myc target gene, induces cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Molecular Cancer*, 12(1), 1-11.
- Zhou, W., Yang, W., Duan, L., Wang, X., Lv, P., Hu, Z., Zhao, Y., Wu, Z., Zhang, Y. ve Hong, L. 2021. MicroRNA-483 Functions as an oncogene in colorectal cancer. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 51(1), 30-37.
- Zhou, Z., Liu, C., Liu, K., Lv, M., Li, B., Lan, Z., Chen, W. ve Kang, M. 2020. expression and possible molecular mechanisms of microrna-205-5p in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19, 1533033820980110.

Zhu, A., Li, X., Wu, H., Miao, Z., Yuan, F., Zhang, F., Wang, B. ve Zhou, Y. 2019. Molecular mechanism of SSFA2 deletion inhibiting cell proliferation and promoting cell apoptosis in glioma. *Pathology, Research and Practice*, 215(3), 600-606.

