



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PINK1-AS LNCRNA'SININ HCT116 KOLON KANSERİ HÜCRE
HATTINDAKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI***

Ebru TEMİZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

GAZİANTEP
2016

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

***PINK1*-AS LNCRNA’SININ HCT116 KOLON KANSERİ HÜCRE
HATTINDAKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ebru TEMİZ

Tez Savunma Tarihi: 01.06.2016
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU
Tez Danışmanı

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

Tez Jürisi İmzası

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU
Yrd.Doç.Dr.Feridun AKKAFA

BEYAN

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

27.06.16

Ebru TEMİZ

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmamın bütün aşamalarında bilgi, tecrübe, destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU'ya,

Yüksek lisans dönemim boyunca bilgi ve önerileri ile bize yol gösteren Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Ahmet ARSLAN'a, Tez çalışmam süresince katkı ve yardımlarını esirgemeyen hocalarımız Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK, Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI, Yrd. Doç. Dr. Yusuf Ziya İĞCİ, Doç. Dr. Mehri İĞCİ, Yrd. Doç. Dr. Shameem Saadat'a,

Laboratuvarıda beraber çalıştığımız, iyi ve kötü günlerimde her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Öğr. Gör. Sercan ERGÜN, Arş. Gör. Sevil KIRKBEŞ, Uzm.Dr.Demet TAŞDEMİR, Arş. Gör. İbrahim BOZGEYİK, Seçil EROĞLU, Esra BOZGEYİK, Seçil DEMİRAL, Zekiye ALTAN, Zeynep ULUKÜTÜK, Murat KORKMAZ, Kaifee ARMAN, Muhammad SAFDAR, Yunus ŞAHİN ve İbrahim Halil ÇİTÇİ' ye,

Bugünlere gelmeme vesile olan, beni yetiştirip büyüten, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli AİLEM'e ve Yüksek Lisans dönemim boyunca her türlü desteğini yanımda hissettiğim dostum Ayşe KÜPELİKİLİNÇ'a,

Akademik görüşleri,güdümlleyici telkinleri ve tüm sabrı ile her zaman yanımda olan nişanlım Mehmet BOSTANCIKLIOĞLU'na,

Bu tezin gerçekleştirilmesinde finansal desteğinden dolayı Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne (BAPYP, Proje No: TF.15.17),

Teşekkürlerimi Sunarım...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGEVE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xii
RESİM LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ.....	3
1.1.Amaç ve Kapsam.....	3
2.GENEL BİLGİLER.....	6
2.1.Kolon Anatomisi.....	6
2.1.1.Çıkan Kolon.....	6
2.1.2.Transverse(enine) Kolon.....	7
2.1.3.İnen Kolon	7
2.1.4.Sigmoid Kolon	7
2.1.5.Rektum.....	7
2.2.Kolon Fizyolojisi.....	7
2.3.Kolon Histolojisi.....	8
2.4.Kolorektal Kanser.....	9

2.4.1.Epidemiyolojisi.....	9
2.4.2.Etiyoloji.....	9
2.4.3.Kanser biyolojisi.....	10
2.4.4. Kanserın genetik yapısı.....	10
2.5. Kolon Kanserı Hücre Hatları ve Özellikleri.....	11
2.6. Kolorektal kanserde mikrosatellit kararsızlığı (Microsatellite Instability; MSI).....	12
2.7. Hücre Ölümü.....	13
2.7.1. Apoptozis	13
2.7.2. Nekrozis.....	16
2.8. Kanserde Kodlamayan RNA'lar.....	18
2.8.1.KüçükKodlamayan RNA'lar (miRNAs).....	19
2.8.1.1.Küçük Kodlamayan RNA'ların Özellikleri.....	19
2.8.1.2.miRNABiyogenezi.....	20
2.8.1.2.1.Anti-miR-122-5p.....	22
2.8.1.2.2.Anti-miR-490-3p.....	22
2.8.1.2.3.Anti-miR-34a-5p.....	23
2.8.1.2.4.Anti-miR-449c-5p.....	23
2.8.1.3.Kanserde Küçük Kodlamayan RNA'ların Etkisi.....	24
2.8.2.Uzun Kodlamayan RNA'lar (lncRNAs).....	24
2.8.2.2.Uzun Kodlamayan RNA'ların Özellikleri.....	24
2.8.2.3.Uzun Kodlamayan RNA'ların Keşfi ve İşlevsel Özellikleri.....	27
2.8.2.4.LncRNA İşlevsel Özellikleri.....	28
2.9.Kanserde Uzun Kodlamayan RNA'ların Etkisi.....	30
2.10.PINK1(PTEN ile tetiklenmiş varsayılan kinaz I)	30

3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1.Hücre Kültürü Hazırlık	32
3.2.Hücre Soyunun Özellikleri.....	32
3.3. Hücrelerde Kullanılan Kültür Vasatının Hazırlanması.....	32
3.4.Hücre Açılması.....	33
3.5.Hücreleri Büyütme ve Deney için Hazırlama.....	33
3.6.Hücrelerinin Sayılması.....	33
3.7.Anti-mi RNA'ların Aktarımı.....	34
3.8.Hücre Soyundan Total RNA izolasyonu.....	34
3.8.1.mRNA'dan cDNA eldesi.....	36
3.8.2.Elde edilen cDNA'lardan kalite ve miktar tayini.....	37
3.9. <i>PINK1-AS</i> , <i>PINK1</i> , <i>PTEN</i> ve <i>GAPDH</i> Genlerinin İfade Düzeyleri Ölçümü için Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR) Yöntemi.....	37
3.9.1.Primer Tasarımı.....	38
3.9.2. <i>PINK1-AS</i> , <i>PINK1</i> , <i>PTEN</i> ve <i>GAPDH</i> Genlerinin İfade Düzeyleri Ölçümü için eş zamanlı PCR bileşenleri.....	38
3.9.3.İstatistiksel Analiz.....	39
3.10.Akım (flow) sitometride apoptozis seviyelerine bakılması.....	40
4.BULGULAR.....	42
4.1.HCT116 Hücre Soyunda <i>PINK1-AS</i> Geninin İfade Sonuçları	42
4.1.1.HCT116 hücre soyunda Anti-miR-122-5p'nin etkisi ile <i>PINK1-AS</i> geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	43
4.1.2.HCT116 hücre soyunda Anti-miR-490-3p'nin etkisi ile <i>PINK1-AS</i> geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	44
4.1.3.HCT116 hücre soyunda Anti-miR-34a-5p'nin etkisi ile <i>PINK1-AS</i> geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	45

4.1.4. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-449c-5p'nin etkisi ile PINK1-AS geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	46
4.1.5. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-122-5p, Anti-miR-490-3p, Anti-miR-34a-5p, Anti-miR-449c-5p'nin ve negatif kontrolün etkileri kıyaslanarak PINK1-AS geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	47
4.2. HCT116 Hücre Soyunda PINK1 Geninin İfade Sonuçları.....	48
4.2.1. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-122-5p'nin etkisi ile PINK1 geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	49
4.2.2. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-490-3p'nin etkisi ile PINK1 geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	50
4.2.3. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-34a-5p'nin etkisi ile PINK1 geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	51
4.2.4. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-449c-5p'nin etkisi ile PINK1 geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	52
4.2.5. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-122-5p, Anti-miR-490-3p, Anti-miR-34a-5p, Anti-miR-449c-5p'nin ve negatif kontrolün etkileri kıyaslanarak PINK1 geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	53
4.3. HCT116 Hücre Soyunda PTEN Geninin İfade Sonuçları.....	54
4.3.1. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-122-5p'nin etkisi ile PTEN geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	55
4.3.2. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-490-3p'nin etkisi ile PTEN geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	56
4.3.3. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-34a-5p'nin etkisi ile PTEN geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	57
4.3.4. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-449c-5p'nin etkisi ile PTEN geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	58

4.3.5. HCT116 hücre soyunda Anti-miR-122-5p,Anti-miR-490-3p, Anti-miR-34a-5p, Anti-miR-449c-5p'nin ve negatif kontrolün etkileri kıyaslanarak PTEN geninin katlı değişim ifade sonuçları.....	59
4.4. Akım (Flow) Sitometride Apoptozis Analiz Sonuçları.....	60
4.4.1. HCT116 Hücre Soyuna Anti-miR-122-5p Aktarılması Sonrası Apoptozis Analiz Sonuçları.....	60
4.4.2. HCT116 Hücre Soyuna Anti-miR-490-3p Aktarılması Sonrası Apoptozis Analiz Sonuçları.....	61
4.4.3. HCT116 Hücre Soyuna Anti-miR-34a-5p Aktarılması Sonrası Apoptozis Analiz Sonuçları.....	62
4.4.4. HCT116 Hücre Soyuna Anti-miR-449c-5p Aktarılması Sonrası Apoptozis Analiz Sonuçları.....	63
5.TARTIŞMA.....	64
6.KAYNAKÇA.....	67
7.ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGE VE KISALTMALAR

DNA:Deoksiribo Nükleik Asit,
RNA: Ribo Nükleik Asit,
MMR: Mismatch Repair (Yanlış eşleşme onarım),
ATP: Adenozin Trifosfat,
UTR: Untranslated Region (Proteine dönüşmeyen bölgeler),
OFR: Open Reading Frames (Okuma Çerçevesi),
AUG: Başlama Kodonu,
miRNA: mikroRNA,
LncRNA: Long non-coding RNA,
mRNA:Mesajcı RNA,
rRNA: Ribozomal RNA,
ncRNA: Non-coding RNA,
piRNA: PIWI proteinini ile etkileşimi olan RNA,
DGCR8: DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8,
Drosha: RNAaz III enzimi,
GTP: guanozin trifosfat,
RAN: RAs-ilişkili Nükleer protein,
RISC: RNA indüklenmiş susturma kompleksi,
pri-mikroRNA: primer mikroRNA,
TRBP: HIV-1 TAR RNA-bağlanma proteini.
cDNA: Complementary DNA,
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu,
qRT-PCR: Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction,
RISC: RNA-induced silencing complex,
RT-PCR: Reverse transkriptaz PCR,
siRNA: Small interfering RNA,

bç: Baz çifti,
XIST: X-inaktivasyon spesifik transkript,
TSIX: X-inaktivasyon spesifik antisense transkript,
lincRNA: Uzun intergenik kodlanmayan RNA,
CAP1: CAP, adenilat siklaz ilgili protein 1,
HOTAIR: Homeobox (HOX) transkript antisense RNA,
HOTTIP: HOXA distal transkript antisense RNA,
HYMAI: Hydatidiform mole associated ve imprinted,
IAP: İntrasisternal A-parçası,
RASGRF1: RAS-protein-spesifik guanin nükleotit salan faktör 1,
snoRNA: Küçük nükleolar RNA,
TERRA: Telomerik tekrar içeren RNA,
tiRNA: Transkripsiyon başlatıcı RNA,
TNRF-1: Tümör nekrosis faktör reseptörü-1,
KR: Kolorektal,
KRK: Kolorektal karsinom,
FAP: Familyal adenomatöz polipozis,
HNPCC: Hereditör nonpolipozis kolorektal kanser,
ATCC: Amerikan tipi kültür koleksiyonu,
MSI: Microsatellite Instability,
PINK1-AS: PINK1-Antisense,

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Kolon anatomisi.....	6
Şekil 2.2. Kolon Histolojisi ve Kansere Evreleri.....	8
Şekil 2.3. Kansere oluşumu.....	11
Şekil 2.4. Mikrosatellit kararsızlığı yolağı.....	12
Şekil 2.5. Programlı hücre ölümünde görev alan moleküller.....	14
Şekil 2.6. İçsel ve Dışsal yoldan apoptozisin oluşumu.....	15
Şekil 2.7. Bir Hücrede Nekrozis ve Apoptozis oluşumunun kıyaslanması.....	16
Şekil 2.8. miRNA'ların Oluşumu (biyogenezi).....	20
Şekil 2.9. Diğer RNA'ların miRNA oluşumuna (biyogenesis) etkisi.....	21
Şekil 2.10. miR-122-5p dizileme görüntüsü.....	22
Şekil 2.11. miR-490 dizileme görüntüsü.....	22
Şekil 2.12. miR-34a dizileme görüntüsü.....	23
Şekil 2.13. miR-449c dizileme görüntüsü.....	23
Şekil 2.14. LncRNA ve büyük moleküllerin etkileşimi.....	25
Şekil 2.15. LncRNA'ların Çeşitli Biyolojik Süreçlere Katılması.....	27
Şekil 2.16. Beş geniş kategoride LncRNA'lar.....	28
Şekil 2.17. LncRNA 'ların işlevsel özellikleri.....	29
Şekil 2.18. PINK1 geninin kromozom üzerindeki görüntüsü.....	31
Şekil 3.1. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü.....	40
Şekil 3.2. $2^{-\Delta Ct}$ formülü.....	40
Şekil 4.1. PINK1-AS ve GAPDH genlerinin ifade sonuç eğrisi.....	42

Şekil 4.2. HCT116 Hücre soyunda PINK1-AS gen ifadesinin NC ve Anti-miR-122-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	43
Şekil 4.3. HCT116 Hücre soyunda PINK1-AS gen ifadesinin NC ve Anti-miR-490-3p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	44
Şekil 4.4. HCT116 Hücre soyunda PINK1-AS gen ifadesinin NC ve Anti-miR-34a-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	45
Şekil 4.5. HCT116 Hücre soyunda PINK1-AS gen ifadesinin NC ve Anti-miR-449c-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	46
Şekil 4.6. HCT116 Hücre soyunda PINK1-AS gen ifadesinin NC, Anti-miR-122-5p, Anti-miR-490-3p, Anti-miR-34a-5p, Anti-miR-449c-5p'nin katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	47
Şekil 4.7. PINK1 ve GAPDH genlerinin ifade sonuç eğrisi.....	48
Şekil 4.8. HCT116 Hücre soyunda PINK1 gen ifadesinin NC ve Anti-miR-122-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	49
Şekil 4.9. HCT116 Hücre soyunda PINK1 gen ifadesinin NC ve Anti-miR-490-3p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	50
Şekil 4.10. HCT116 Hücre soyunda PINK1 gen ifadesinin NC ve Anti-miR-34a-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	51
Şekil 4.11. HCT116 Hücre soyunda PINK1 gen ifadesinin NC ve Anti-miR-449c-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	52
Şekil 4.12. HCT116 Hücre soyunda PINK1 gen ifadesinin NC, Anti-miR-122-5p, Anti-miR-490-3p, Anti-miR-34a-5p, Anti-miR-449c-5p'nin katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	53
Şekil 4.13. PTEN ve GAPDH genlerinin ifade sonuç eğrisi.....	54
Şekil 4.14. HCT116 Hücre soyunda PTEN gen ifadesinin NC ve Anti-miR-122-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	55
Şekil 4.15. HCT116 Hücre soyunda PTEN gen ifadesinin NC ve Anti-miR-490-3p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	56

Şekil 4.16. HCT116 Hücre soyunda PTEN gen ifadesinin NC ve Anti-miR-34a-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	57
Şekil 4.17. HCT116 Hücre soyunda PTEN gen ifadesinin NC ve Anti-miR-449c-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	58
Şekil 4.18. HCT116 Hücre soyunda PTEN gen ifadesinin NC, Anti-miR-122-5p, Anti-miR-490-3p, Anti-miR-34a-5p, Anti-miR-449c-5p'nin katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.....	59
Şekil 4.19. HCT116 hücre soyuna Anti-miR-122-5p'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. A). Apoptozise giden hücrelerin NC'e göre toplam yüzde grafiksel gösterimi. B). Kaluza analizprogramına göre boyanan hücrelerin yüzde grafiksel gösterim.....	60
Şekil 4.20. HCT116 hücre soyuna Anti-miR-490-3p'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. A). Apoptozise giden hücrelerin NC'e göre toplam yüzde grafiksel gösterimi. B). Kaluza analizprogramına göre boyanan hücrelerin yüzde grafiksel gösterim.....	61
Şekil 4.21. HCT116 hücre soyuna Anti-miR-34a-5p'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. A). Apoptozise giden hücrelerin NC'e göre toplam yüzde grafiksel gösterimi. B). Kaluza analizprogramına göre boyanan hücrelerin yüzde grafiksel gösterim.....	62
Şekil 4.22. HCT116 hücre soyuna Anti-miR-449c-5p'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. A). Apoptozise giden hücrelerin NC'e göre toplam yüzde grafiksel gösterimi. B). Kaluza analizprogramına göre boyanan hücrelerin yüzde grafiksel gösterim.....	63

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. KRK gelişiminde rol oynayan risk faktörleri.....	10
Tablo 2.2. Kolon kanseri hücre hattı örnekleri.....	12
Tablo 3.1. Kullanılan hücre soyunun özellikleri.....	32
Tablo 3.2. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımının içerikleri.....	36
Tablo 3.3. mRNA'dan cDNA eldesinde revers transkripsiyon için termal döngüleyici ayarları.....	36
Tablo 3.4. Örneklerden elde edilen mRNA cDNA'larının derişimleri.....	37
Tablo 3.5. PINK1-AS, PINK1,PTEN ve GAPDHgenlerinin ifade seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizilimleri.....	38
Tablo 3.6. Eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri.....	39
Tablo 3.7. Eş zamanlı PCR prosedürü.....	39

RESİM LİSTESİ

Resim 2.1. Apoptozis ve Genler.....	14
Resim 2.2. Nekrozis ve apoptozisin kıyaslanması.....	17
Resim 2.3. Kodlamayan RNA'lar	19



ÖZET

PINK1-AS LNCRNA'SININ HCT116 KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDAKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ebru TEMİZ

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Haziran 2016, 93sayfa

Kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra dünyada görülme sıklığı en çok olan hastalıktır. Kolon kanseri dünyada en çok görülen 3. kanser türüdür. Tüm yaşlarda görülmesine rağmen % 90'ından fazlası kırk yaş ve üzerindedir. Kanser tedavisine yönelik kullanılan kemoterapik ilaçlar kanserin ilerlemesini durdurmak ve tümörü yok etmeyi amaçlamaktadır. Kullanılan bu ilaçlar tümörlü hücrelerin yok olmasını sağlarken sağlıklı hücrelerin zarar görmesine sebep olmaktadır. Yeni tedavi yöntemi olarak, hücrelerin kanserleşmesine sebep olan moleküllerin ifade seviyelerinin düzenlenmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Tüm kanser türlerinde olduğu gibi kolon kanserinin de oluşmasında çevresel faktörlerin yanı sıra kodlamayan RNA'larında etkisi olduğu yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir. Kolon kanserinde PINK1 genin aşırı ifade olması ve kanserleşme sürecinde etkisi olduğu bulunmuştur. PINK1-AS geni, PINK1 geninin zıttı olup bu genin ifade sırasında düzenlenmesinde sorumlu bir uzun kodlamayan RNA'dır. İlişkilendirilmiş anti-miRNA'larla PINK1-AS genini hedefleyerek PINK1 geninin ifadesini düzenleyip kolon kanseri hücrelerinde programlı ölüm yolağının tetiklenmesini sağlamayı düşünmekteyiz. Bu amaçla kolon kanseri hücre hattına (HCT116) kültür ortamında PINK1-AS'i hedefleyen anti-miRNA'lar aktarıldı. Bu hücrelerden total RNA elde edilip, cDNA sentezi yapıldı. Eş zamanlı PCR kullanılarak PINK1-AS, PINK1 ve PTEN gen ifade düzeylerine bakıldı. miRNA aktarımı yapılan HCT116 hücre soyunun apoptozis düzeyini belirlemek için akım sitometri kullanıldı. Yapılan çalışmada elde edilen bulgulara göre, ilişkilendirilmiş miRNA'lara maruz bırakılan hücrelerde PINK1-AS, PINK1 ve PTEN gen ifade seviyelerinde negatif kontrol miRNA'a göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Programlı ölüme giden hücre sayısı ile canlı hücre sayısı oranları kıyaslandığında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Sonuç olarak; PINK gen ifadesinin susturulması için PINK1-AS genini hedefleyen farklı moleküller tespit edilerek, kolon kanserinde tedaviye yönelik yeni çalışmalar yapılabilir.

Anahtar kelimeler: Kolon kanseri, Anti-miRNA aktarımı, q PCR, Apoptozis, PINK1-AS

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF PINK1-AS LNCRNA IN HCT116 COLON CANCER CELL LINE

Ebru TEMİZ

Master of Science Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Serdar ÖZTUZCU

June 2016, 93 pages

Cancer is the most frequent disease in the world ranking after heart and vascular disease. Colon cancer is the third most seen among all cancers. Although colon cancer is seen in all age groups, more than 90% of patients are forty years old and over. Most of chemotherapeutic drugs aim to inhibit the progression of cancer and to irradiate the tumor. Chemotherapeutic agents kill cancer cells, while at the same time causing damage to normal cells. As a new approach for the treatment of cancer, new perspectives are gaining importance that target the expression level of molecules responsible for cancer. Environmental factors as well as non-coding RNAs are responsible for the cause of colon cancer. In colon cancer, gene expression level of PINK1 is found to be highest and is responsible for cancer progression. PINK1-AS is an antisense long non-coding RNA opposite to PINK1 and is responsible for its gene regulation. We are of the opinion that miRNAs targeting PINK1-AS regulate the gene expression of PINK1 in colon cancers triggering the apoptosis. Therefore, colon cancer cell line (HCT116) was transfected using anti-miRNAs targeting PINK1-AS in cell culture. cDNA was converted from the total RNA isolated from this cell line. Gene expression levels of PINK1-AS, PINK1 and PTEN were seen using real-time PCR. Apoptosis level of the transfected cell line was seen using flow cytometry. The expression data obtained from the gene expression levels of PINK1-AS, PINK1 and PTEN was not significant as compared to negative control miRNA. The apoptosis level was also not significant when analysed. As a result, in order to silence PINK1, other molecules targeting PINK1-AS gene should be found out for the treatment of colon cancer.

Key words: Colon Cancer, Anti-miRNA Transfection, qPCR, Apoptosis, PINK1-AS

1.GİRİŞ

1.1.Amaç ve Kapsam

Kanser, dokuları oluşturan hücrelerde DNA' nın hasarı sonucu hücrelerin amaçsız, denetimsiz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalması sonucu normal dokuları işgal etmesi (invazyon) ve işlevlerini engellemesi olarak tanımlanmaktadır. Kanser vücudumuzdaki tek bir bölgede hastalık oluşturmayıp, vücuttaki tüm doku ve organlarda kan veya lenf yoluyla yayılması (metastaz) ile oluşan bir hastalık grubudur.Normal vücut hücre ve dokuları orijinal büyüklük ve yapılarını korurken kanser hücreleri saldırgan bir tablo çizerler (1).

Kanser dünya çapında ölüme sebep olan hastalıklardan biridir. Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan kanser, son yıllarda kalp-damar sistemi hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselmiştir. Uluslararası kanser araştırma merkezinin tahminine göre 2015'de kolon kanseri görülme sıklığı tüm kanserler arasında %9,7'sini oluşturmaktadır. Bu oranın 814.000'nini erkekler oluşturur iken 664.000 kadınlar oluşturmaktadır (2). Cerrahi uygulamalar, radyoterapi (ışın tedavisi), kemoterapi (ilaç tedavisi) ve immünoterapi (bağışıklık sistemini güçlendirici tedavi) günümüzde uygulanan başlıca kanser tedavi yöntemlerindendir (3).

Kolon diye adlandırdığımız kalın bağırsak, yaklaşık 2 metre uzunluğundaki sindirim sisteminin ince bağırsaktan sonra gelen kısmıdır. Kolon kanserinin toplumda görülme sıklığı 10.000'de 5 olup, görülme sıklığı olarak; erkeklerde 3. kadınlarda 2. sıradadır. Bütün kanserler içinde görülme sıklığı bakımından 3. sırada yer alır (4). Kolon kanserinin oluşmasında genetik yatkınlığın yanısıra çevresel faktörlerinde etkisi büyüktür. Yapılan çalışmalara göre, kolon kanserinde DNA yanlış eşleşme baz onarım mekanizmasının eksikliği kolon kanseri oluşmasına sebep olduğu tespit edilmiş ve erken tanıda önemli bir bio-belirteç olarak belirlenmiştir(5). Bu bio-belirteçten yola çıkarak kolon kanserinin tedavisine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

Kolon kanserinin tedavisi amaçlı yapılan çalışmalar için sık sık kolon kanseri hücre hattı olan HCT116 (DNA yanlış eşleşme baz onarım mekanizması (MMR) eksik) kullanılmaktadır (5).

Kolon kanserine sebep olduğu bilinen bu mekanizmanın aydınlatılabilmesi için hücre içi moleküllerle olan ilişkisinin bilinmesi faydalı olacaktır. Bu amaç doğrultusunda ilişkili olduğu düşünülen moleküller üzerinde çalışmak kolon kanserinin tedavisi için önemli bir adım olacaktır. Bu moleküllerin hücrenin, sağ kalımına veya kanserleşmeye olan etkileri günümüzde yeni bir alan olarak dikkat çekmektedir.

Genomun yaklaşık %2'si kodlanan (proteine çevrilen) bölgeleri içerirken, kodlanmayan (proteine çevrilmeyen) bölgenin genomda daha çok bulunması, bu bölgelerin farklı görevler üstlendiğini düşündürmektedir. Yapılan son çalışmalara göre, kodlanan bölgelerden ziyade kodlanmayan bölgelerin; gen ifadesinde düzenlenme, büyüme, farklılaşma gibi hayatsal faaliyetleri gerçekleştirdiğini göstermiştir. Bir başka deyişle asıl kodlanan bölgenin doğru çalışmasını güdülemektedir. ncRNA (noncoding-kodlanmayan) olarak bilinen bu bölgeler proteine dönüşmezler ve birden fazla alt gruptan oluşurlar. Kodlanmayan RNA'lardan, küçük kodlamayanlar (miRNA) ve uzun kodlamayanlar (lncRNA) hücrenin kanserleşmesinde ve ilerlemesinde rol aldıkları yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (6).

miRNA'lar yaklaşık 19-24 nt (<200 nt) uzunluğunda küçük kodlanmayan moleküllerdir (7). İnsan genomunun %1-2'sini oluşturan mi RNA'lar, genom içerisinde protein kodlayan bölgede, intron içinde veya genler arası bölgede yer alır ve protein kodlayan genlerin yaklaşık %50'sinin işlevini kontrol ettiği tahmin edilmektedir (8,9). mRNA'ya özelleşmiş bölgelerinden bağlanarak, mRNA'nın baskılanmasını ve proteine dönüşmesini engeller (9).

LncRNA'lar hem kanser oluşumunda hem de normal biyolojik süreçlerde önemli moleküllerin işlevlerini düzenlenmede görev alan, 200 nükleotitten büyük kodlamayan bir yazılım dizisidir (10). Lnc RNA'lar X-kromozomu etkisizleştirilmesi (inaktivasyonu), genomik damgalama (imprinting), kromatin düzenlenmesi, gen yazılımı (transkripsiyonu) ve uç uca ekleme gibi önemli biyolojik süreçlerin gerçekleşmesinde rol oynamaktadır (11). Bir başka deyişle lncRNA'lar kanserleşme sürecinin denetlenmesinde birden fazla mekanizma ile hareket etmektedir. Bu molekülün işlevi ve hücre içi moleküler mekanizması hakkında bilgi artmasına rağmen, hücrenin kanserleşme sürecindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir(12). LncRNA'larının çalışma mekanizmaları, üstlendikleri düzenleyici rolleri, hücrenin kanserleşmesi üzerine etkileri zamanla aydınlatılması ile kanserde yeni tedavi yollarının

keşfedilmesinin önünü açacaktır (13, 14).miRNA ve lncRNA'lar sitoplazmada veya çekirdekte bulunan moleküllerdir ve etkileşime girerek mRNA'nın yazılım sonrası düzenlenmesinde görev aldıkları tespit edilmiştir (15). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, miRNA ve lncRNA arasındaki etkileşimi aydınlatmaya yönelik olarak hız kazanmıştır. Bu etkileşim genellikle birbirlerinin çalışmasını durdurma yada arttırma yönünde olmuştur.

Gruplandırmak gerekirse;miRNA'ların tetiklemeyle lncRNA'ların yok edilmesi, mRNA ile etkileşime girmek için miRNA ve lncRNA'nın yarışması, lncRNA'lar miRNA'lar gibi davranarak mRNA'nın baskılanmasında görev almasıdır(16).Genel anlamda miRNA ve lncRNA'ların etkileşimi gen ifadesinin düzenlenmesinde (yazılım sırasında, yazılım sonrasında ve çevirim sonrasında) birlikte görev alırlar (16).

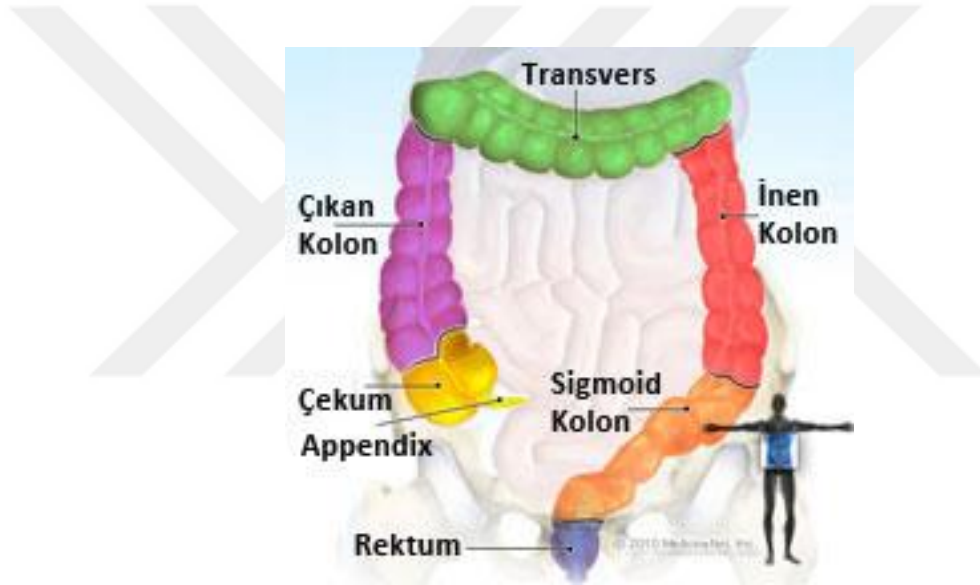
LncRNA'lar ile miRNA'ların etkileşimini ve kanser ile olan ilişkilerini aydınlatmak için yapacağımız çalışmadaki amacımız; Kolon kanserinin (DNA yanlış eşleşme baz onarım mekanizması (MMR) eksik olan) oluşmasında etkili olduğu tespit edilmiş genler ile lncRNA ve miRNA'nın etkileşimlerini incelemek ve bu moleküllerin kanserleşme üzerine etkilerini aydınlatmaktır. Bu etkileşimden yola çıkarak tedaviye yönelik yeni yaklaşımlar çıkarmak ve hastalığın baskılanmasını sağlayacak yolların işlevsel hale getirilmesi için çalışmaların başlamasına fikir vermesidir. DNA yanlış eşleşme baz onarım mekanizması (MMR) eksikliği sonucu oluşan kolon kanserinde PINK1 geninin aşırı ifade olduğu ve bu genin susturulmasıyla hücrelerde programlı ölüm yolağının tetiklendiği yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir(17,18).

Bu doğrultada PINK1 geninin ifadesini azaltmak ve hücrelerde programlı ölüm yolağını tetiklemek için, PINK1 geninin tersi (antisens) olan PINK1-AS (lncRNA) geninin ifadesinin hücre içerisinde aşırı ifade olması sağlanmalıdır. 9537 nükleotit uzunluğunda olan PINK1-AS geni, yazılım sonrası mRNA işleme sırasında rol alan bir lncRNA'dır. PINK1-AS geninin aşırı ifade olması için ilişkilendirilmiş Anti-miRNA'lar (inhibitör) kullanılacaktır. Hücre içi moleküllerinin ifade seviyelerinin düzenlenmesi ile kanserin gelişmesi durdurulabilir ve yeni tedavi yolları keşfedilerek literatüre katkı sağlayabiliriz.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kolon Anatomisi

Kolon, sindirim kanalının 1/5'ini oluşturan, ileumun bitiminden itibaren anüse kadar uzanan ve ortalama 120- 150 cm uzunluğunda çekumdan rektuma kadar olan kısımdır (Şekil 2.1.). Periton içinde ve retroperitoneal alanda karaciğer, dalak, mide, ince bağırsak, böbrekler, üreterler ve mesane gibi organlarla komşuluk gösterir (19).



Şekil2.1. Kolon anatomisi(20)

Kolon; çıkan kolon, transverse (enine) kolon, inen kolon, sigmoid kolon olarak 4 kısıma ayrılmaktadır. Çekum; yaklaşık uzunluğu 12-15 cm olan rektum sigmoid kolon ile başlar anal kanal ile sonlanır. Rektum; kolonun son bölümüdür ve anüse açılır ve yaklaşık 12 cm uzunluğundadır. Son birkaç santimetresi deriye benzer bir doku ile kaplıdır. Çekumdan taşıyıcı kolonun ortasına kadar olan, kolon kısmına sağ kolon, kalan kısma ise sol kolon denir (19).

2.1.1. Çıkan Kolon

Çekumun üst kısmından başlayan çıkan kolon, karın boşluğunun yan bölümünde yukarıya ve arkaya doğru yükselerek karaciğerin alt yüzeyine gelir. 12-15 cm boyunda

ve 5-6 cm çapındadır. Karın yan duvarı ile komşudur. Komşuluk yaptığı oluşumlara gevşek bağ dokusu ile bağlıdır (19).

2.1.2. Transverse (enine) Kolon

Karaciğerin sağ lobunun altında flexura coli dextra'dan başlayıp sola doğru uzanarak dalağın alt yüzeyine gelen taşıyıcı kolon, flexura coli sinistra'yı oluşturur. Aşağıya kıvrılarak inen kolon olarak devam eder. Taşıyıcı kolon 40-60 cm uzunluğunda 4 cm çapındadır (19).

2.1.3. İnen Kolon

İnen kolon, 20-25 cm boyunda ve 3 cm çapındadır. Dış yan yüzü karın arka duvarı ile komşudur ve ön yüzü ince bağırsak kıvrımları ile örtülüdür (19).

2.1.4. Sigmoid kolon

Sigmoid kolon, sakrumun ön yüzünde S3 seviyesinde rektum ile devam eder. S harfi şeklinde kıvrım gösteren sigmoid kolonun uzunluğu 30-40 cm, çapı 5-6 cm'dir. Alt ve üst kenarlar sabit olan sigmoid kolonun orta kısmı oldukça hareketlidir (19).

2.1.5. Rektum

Yaklaşık 12 cm uzunluğunda olan rektum üçüncü sakral omur hizasında başlar. Rektumun sadece 2/3'ü peritonla örtülüdür ve iç yüzeyini döşeyen mukoza diğer kalın bağırsak bölümlerine oranla daha kalın, damardan zengin ve altındaki tabakaya daha gevşek olarak tutunmuştur (19).

2.2. Kolon Fizyolojisi

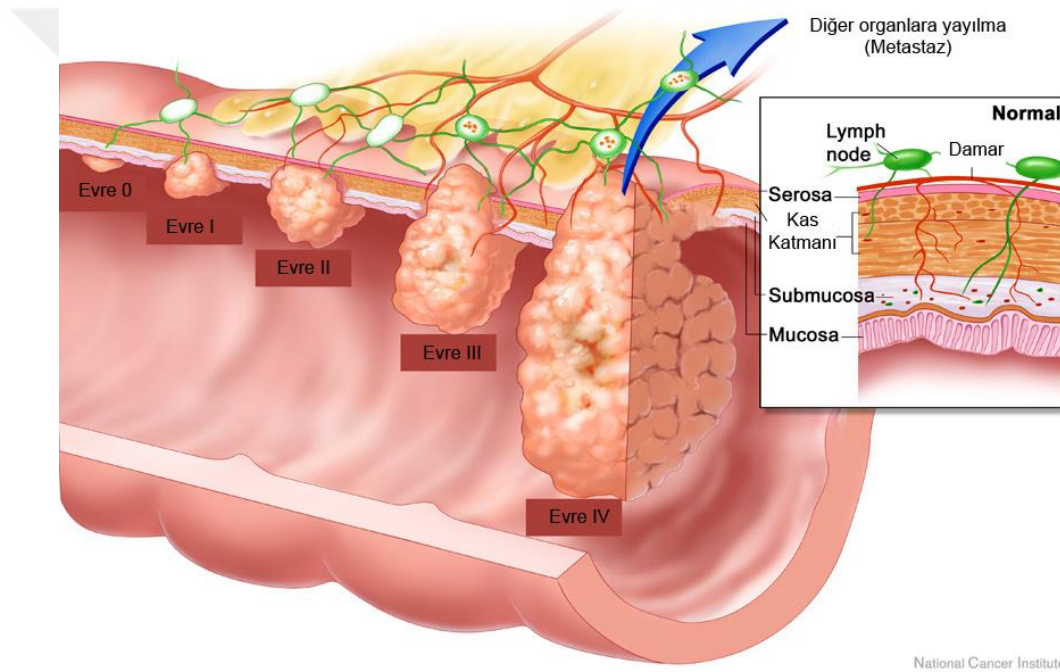
Kolon, son zamanlara kadar sadece dinamik bir rezervuar olarak düşünülmektedir. Sağ kolon absorpsiyonda görev alırken sol kolonun gaitayı depolaması ve rektuma doğru transferi şeklinde basitçe tanımlamanın dışında kolonun birçok fizyolojik fonksiyonunun olduğu bilinmektedir(21).

Kolonun depolama, emilim, taşıma ve salgılama gibi görevleri vardır. Hergün yaklaşık 600-1000 ml ileum içeriği kolona geçer ve bunun % 90'ı sudur. Ancak dışkı ile atılan su miktarı 180 ml düzeyindedir. Su emiliminin neredeyse tamamı çekum ve çıkan kolonda

meydana gelir(22). Ayrıca kolondan sodyum, klorür, sakkaroz ve laktoz da emilir.Klorür emilimi karşılığında az miktarda bikarbonat lümeneye verilerek ortamın alkali olması sağlanır (pH 8-8,4) ve potasyum, salgılanan mukus ile lümeneye geçer (22).

2.3. Kolon Histolojisi

Gastrointestinal kanal bazı genel yapısal özellikler gösterir. Ortasında değişen çapta lümen vardır. Bu lümen 4 tabakadan oluşan bir duvarla çevrilidir ve içten dışa sırayla; mukoza, mukoza altı (submukaza), kas tabakası ve serozadır(23) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.0. Kolon Histolojisi ve Kansere Evreleri(24).

Mukoza: Kalın bağırsağın içini kaplayan bir örtü tabakasıdır. Mukoza besin maddelerinin sindirimini ve kana emilmesini sağlar(23).

Mukoza altı: Mukoza ve kas tabakası arasında destek dokusu bulunur, mukoza tabakasının besleyici damarları ve lenfatiklerinin olduğu tabaka altmukoza tabakasıdır(23).

Kas tabakası: Besin maddelerinin ileri doğru hareket işlevi orta kısımda bulunan kas tabakası ile sağlanır (23).

Seroza: Bağırsak duvarının en dış kısmında bulunur. Yüzeyi düzgün bir tabakadır, bağırsakların karın boşluğu içinde birbirine yapışmasını engeller ve bağırsaklar düzenli şekilde çalışır (23).

2.4. Kolorektal Kanser

2.4.1. Epidemiyolojisi

Kanser, dünya çapında büyük bir sağlık sorunudur. Dünyada gerçekleşen her dört ölümden birisi kanserden kaynaklanmaktadır (25). Kolorektal kanserler (KRK), Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve diğer Batı'lı ülkelerde, kanserle ilişkili morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden biridir. ABD'de, hem erkeklerde (prostat ve akciğer kanserinden sonra) hem de kadınlarda (meme ve akciğer kanserinden sonra) yeni gelişen ve ölüme yol açan kanserler arasında 3. sırada yer almaktadır (26).

Son yıllarda kalın bağırsak kanseri epidemiyolojisi ilgi çeken bir araştırma alanı olmuştur. Toplumlar arası kolorektal kanser oluşum hızı (insidans) farklılıklarının sebebi; yüksek karbonhidratlı besinler ve düşük lifli diyetle bağlanmaktadır Benzer şekilde, taze meyve ve sebzelerin belli miktarda tüketilmesi düşük kanser oluşum hızı ile ilişkili olabilir (27,28).

2.4.2. Etiyoloji

KRK'lerin gelişimde hem genetik hemde çevresel olarak birçok risk faktörü tanımlanmıştır (Tablo 1.1.). Ayrıca bazı kanser öncülü doku lezyonlarında tümör gelişimine sebep olabilir (27). Çalışma raporlarına göre, kanser oluşum hızı ve kanser kaynaklı ölüm oranları gelişmiş ülkelerde daha yüksektir. Bunun sebebi de, kırmızı etin fazla tüketilmesi, yüksek yağlı diyet, fiziksel etkinliğin az olması ve yaşam süresinin daha uzun olması ile ilişkili olabilir (29).

Bazı çalışmalarda ise, alkol tüketiminin kanser oluşum riskini arttırabileceği öne sürülmüştür. Alkol bağımlılarında folat ve metionin eksikliği KRK oluşumunun sebebi olabilir. KRK gelişimde etkili olduğu düşünülen risk faktörlerinin doğru tanımlanması, hastalığın erken tanısında ve seyrinde önem taşımaktadır (27).

Tablo 2.1. KRK gelişiminde rol oynayan risk faktörleri(30)

Risk Faktörü	Açıklamalar
Yaş	> 50
Diyet	- Yağdan zengin, posadan fakir
Kişisel öykü	- KR adenom (senkron ya da metakron) - KRK
Aile öyküsü	- Polipozis sendromları (FAP, Gardner, Turcot, Muir-Torre, Peutz-Jeghers, familial juvenil polipozis) - HNPCC - KRK'li birinci dereceden akrabalar
İnflamatuvar barsak hastalıkları	- Ülseratif kolit (UK) - Crohn hastalığı

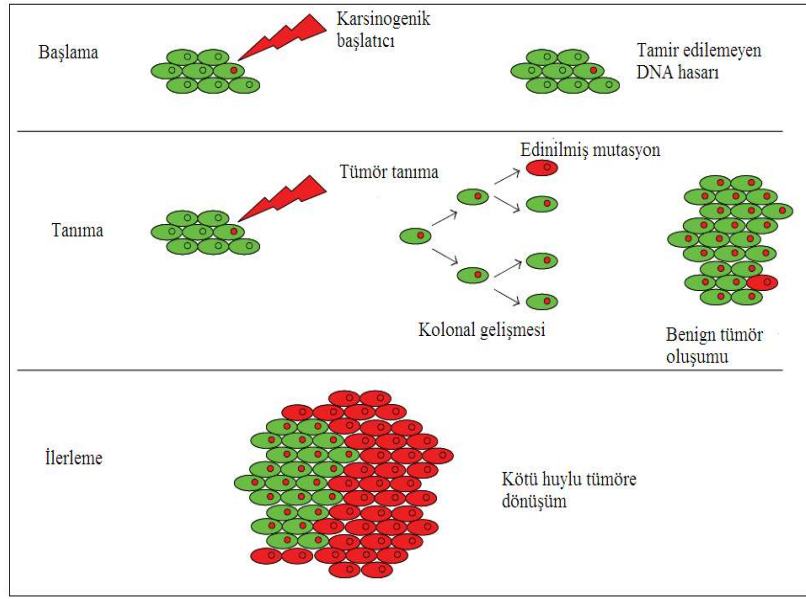
2.4.3. Kanser biyolojisi

Kanser, hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalması olarak tanımlanmaktadır. Hücrenin kontrol çoğalması çeşitli faktörlerle meydana gelmektedir. Kanser başlangıç noktası göre gruplandırmak gerekirse; *kemik, kasveyabağ doku* gibi mezenkimal dokulardan kaynaklanan sarkomalar; *bağırsak mukozası, bronşlar* veya *meme dokusu* gibi epitel dokudan kaynaklanan karsinomlar; *kemik iliği, lenfatik sistem* veya *periferik kan* boyunca yayılan lösemi ve lenfoma gibi hematopoetik ve lenf dokusuna ait kötü huylu tümörlerdir(31).

Görülen kanserlerin yaklaşık % 90'ı karsinomdur. Vücut içinde hücrelerin çoğalmasının epitelde gerçekleşmesi ya da epitel dokuların kanser gelişimini destekleyen çeşitli fiziksel ve kimyasal hasarlara sıklıkla maruz kalmasından kaynaklandığını göstermektedir (32).

2.4.4. Kanser genetik yapısı

Kanserleşme, hücre büyümesi ve çoğalmasından sorumlu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Kanserleşen hücrede, hasar denetim mekanizmaları doğru çalışmaz ve sürekli bölünme tetiklenir. Kanser aşamaları; genel anlamda başlama, tanıma ve ilerleme olarak sınıflandırılmaktadır. Kanser oluşumu basit bir mutasyon ile oluşmakla birlikte radyasyon, çeşitli kimyasallar gibi etmenler hücrenin kanserleşmesine sebep olmaktadır. (Şekil 2.3.) (33).



Şekil 2.3. Kanser oluşumu (33).

Birçok kanser, bir somatik hücrenin mutasyona uğraması ile başlar, kontolsüz ve hızlı bölünmesiyle tümör diye adlandırdığımız neoplazi yapısının oluşmasına sebep olur. Hücreyi kanserleşme yolunda etkileyen genler **Onkogenler** ve **Tümör baskılayıcı genler** olarak sınıflandırılmaktadır (34).

Mutasyon sonucu oluşan onkogen, hücreyi kontolsüz bir şekilde bölünmesi için uyarır, tümör baskılayıcı genler ise oluşan mutasyonların kalıcı olmaması için hücre bölünmesini engeller. DNA eşleşmesi ve tamiri sırasında meydana gelen bozukluklar genomik kararsızlığa ve kanser oluşumuna sebep olur(35).

2.5. Kolon Kanseri Hücre Hatları ve Özellikleri

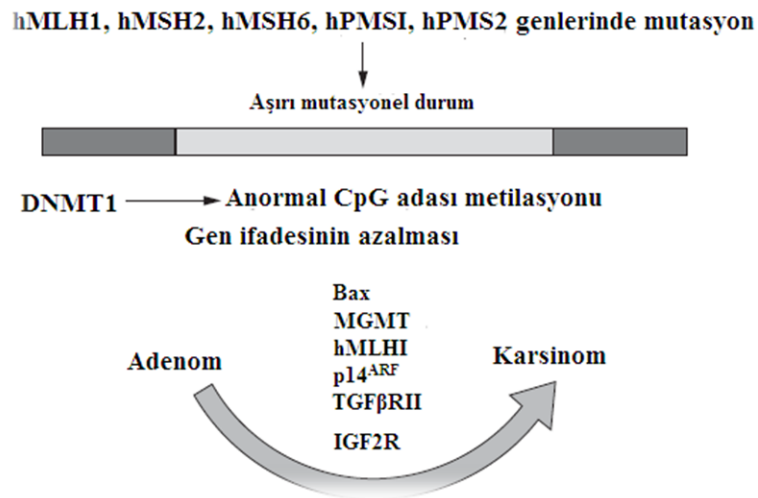
Ticari olarak temin edilebilen bazı kolon kanseri hücre hatları tablo 2.2.'de gösterilmektedir (36).

Tablo 2.2. Kolon kanseri hücre hattı örnekleri

Ticari ismi	Organizma	Morfoloji	Hastalık
HCT116 (ATCC CCL-247) (DNA yanlış eşleşme baz onarım eksikliği)	İnsan	Epitel	Kolorektal adenokarsinoma
LoVo (ATCC CCL-229)	İnsan	Epitel	Kolorektal adenokarsinoma
T84 (ATCC CCL-248)	İnsan	Epitel	Kolorektal adenokarsinoma
HT29 (ATCC HTB-38)	İnsan	Epitel	Kolorektal adenokarsinoma
SW48 (ATCC CCL-231)	İnsan	Epitel	Kolorektal adenokarsinoma

2.6. Kolorektal kanserde mikrosatellit kararsızlığı (Microsatellite Instability; MSI)

Mikrosatellit kararsızlığı (MSI), genomun kararlı kalmasını sağlayan DNA tamir genlerinde oluşan mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Kolorektal kanserlerin % 15'i mikrosatellit kararsızlık tümörlerinden meydana geldiği bulunmuştur (37).



Şekil 2.4. Mikrosatellit kararsızlığı yolağı(37).

Mikrasatellit kararsızlığı, yanlış eşleşme (mismatches repair) tamir mekanizmasında oluşan hasarlardan oluşmaktadır. *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS1*, *hPMS2* genlerindeki mutasyon sonucu, kanserle ilişkili genlerde çerçeve kayması (frameshift mutation) mutasyonunun oluşmasına; *Bax*, *MGMT*, *hMLH1*, *p14^{ARF}*, *TGFβRII*, *IGF2R* gibi genleride aynı şekilde susturulması kanser oluşumuna sebep olur(38).

Mikrosatellit genlerinden bazılarının özendirirci bölgelerinde sitozin/guanin dinükleotid dizisi veya CpG adaları olarak bilinen uzun diziler mevcuttur. Burada normal olmayan metilasyondan başlıca sorumlu olan enzim *DNMT1* (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1)'dir. Bu yol ile DNA onarım enzimi *MGMT*(O-6-methylguanine-DNA methyltransferase), *hMLH1* (human mut-L homologue) ve *p14^{ARF}*(p53 düzenleyici) gibi önemli genler susturulur. Bu genlerin susturulması karsinom oluşması için uyarılır (Şekil 2.4.)(38).

2.7.Hücre Ölümü

2.7.1.Apoptozis

Her hücre doğal yaşam döngüsü içinde varlığını sürdürür. Doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Hücrenin sağ kalımı, doku yeniden yapımı (homeostazisi) ve yıkımı gibi süreçlerle bir düzen içinde sağlanmaktadır. Bu düzenin oluşması apoptozis ve proliferasyon dengesine bağlıdır (39).Apoptozis programlı hücre ölüm şekli olarak tanımlanmakta ve birçok özelliği yönünden nekrozisden ayrılmaktadır.

Apoptozis terimi ilk olarak 1972 de iskoçyalı araştırmacılar J.F.K.Kerr,Wyllie ve Currie tarafından (40)nekrozdan (41)farklı olarakgerçekleşen bir ölüm mekanizması olarak tanımlanmış ve fizyolojik hücre ölümünü ifade etmek için kullanılmıştır (42,43).

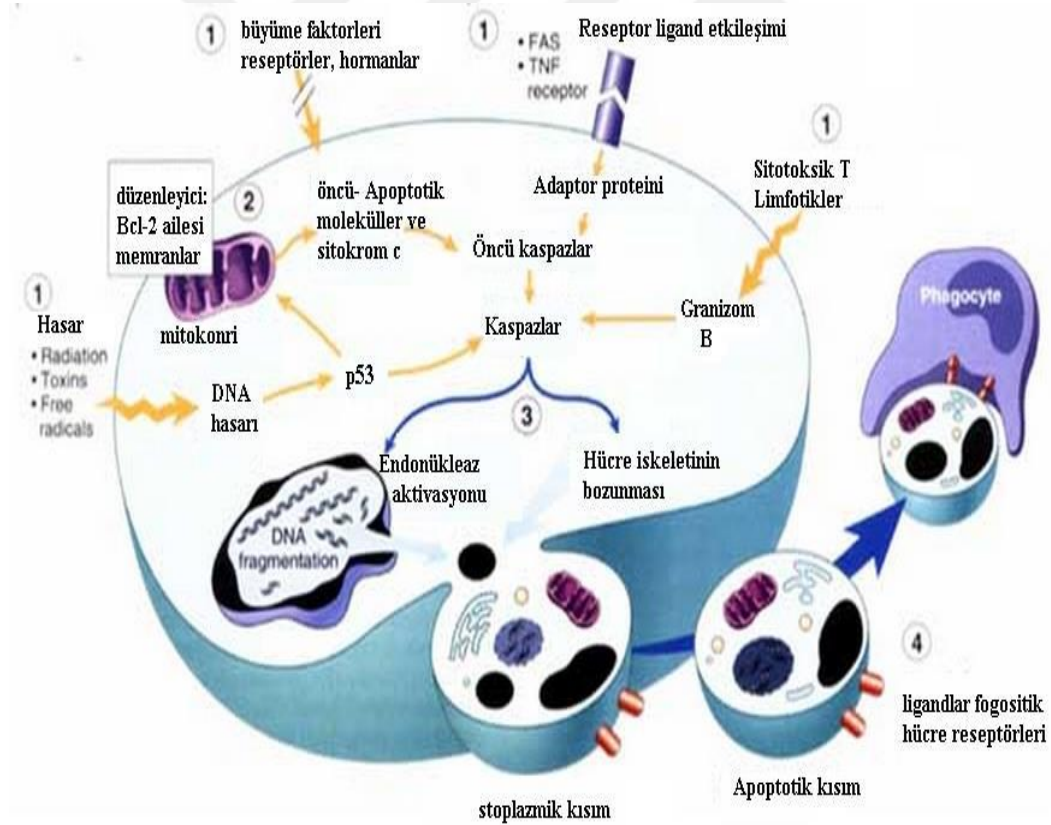
Teorik olarak apoptozis, hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanların etkisiyle gerçekleşen hücre sel lezyonların veya genetik faktörlerin etkisiye aktif olan ve hücrenin kendisi tarafında programlı bir mekanizmanın vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden bir mekanizma olup, hücre intiharı olarak tanımlanmaktadır (41,42).

Hücrede apoptozis mekanizmasının düzenlemesi için birçok molekül devreye girmektedir. Örnek olarak; kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi molekülleri, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriler verilebilir (Resim 2.1.) (44).

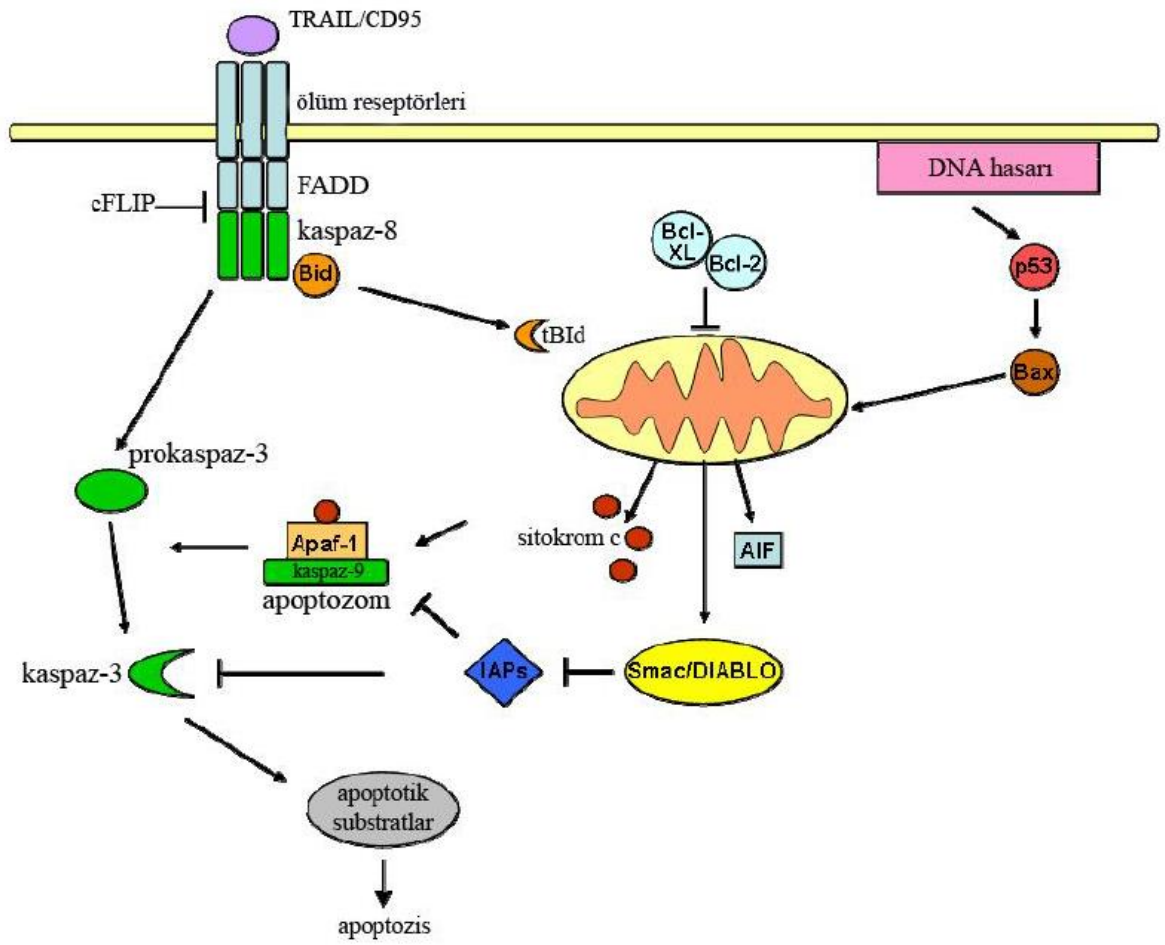
Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
- Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-x1, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1 - c-abl geni - ras onkogeni - çözünabilir fas - p35 - A20	- Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bcl, Hrk1 - c-myc - p53, p21 - fas (CD95/APO1) - FADD/MORT, RIP, FAST - interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE) - LOH (MTS1/CDK41)

Resim2.1. Apoptozis ve Genler (44).

Hücre içinde apoptotik süreç boyunca sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen düzenlenmesinde ve hücre iskeleti organizasyonunda rol almaktadır (Şekil 2.5.).Bu moleküller hücre içi ve hücre dışı tetikleyiciler tarafından uyarılarak aktif hale getirilir (45,46)(Şekil 2.6.).



Şekil 2.5.Programlı hücre ölümünde görev alan moleküller

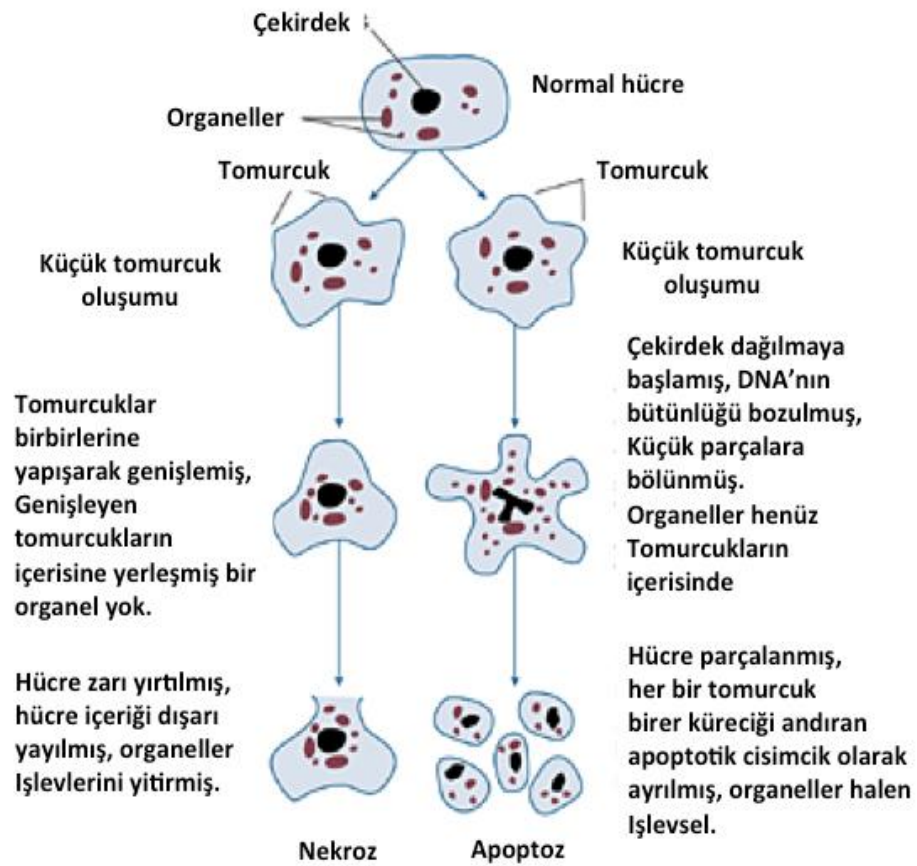


Şekil 2.6. İçsel ve Dışsal yoldan apoptozisin oluşumu (45).

Apoptoza gitmek için uyarılan hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşır ve komşu hücrelerle olan bağlantısını keser. Hücre boyut olarak küçülür ve büzülür, DNA'sı nükleozomlarından kesilir, organeller sitoplazmada yoğunlaşır ve kromatin yoğunlaşması ile piknotik (kromatin yoğunlaşması ile oluşan ve apoptozisin karakteristik özelliği) bir görünüm alır (47). Hücre zarının yapısında bulunan fosfotidilserin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne yer değiştirir (transloke olur). Çekirdek küçülür ve parçalara ayrılır. Zarla sarılı hücre parçaları tomurcuklar halinde parçalanır ve her biri apoptotik cisimcikler olarak ayrılır. Bu apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınıp parçalanır (fagosit edilir.).

2.7.2. Nekrozis

Nekrosis, hücre yada doku ölümü olarak açıklanmaktadır (Şekil 2.7. Tablo 4.). Hücrenin iyon dengesi dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar (yanma, ısı toksik madde v.b) sonucu bozulur. DNA tamirinden sorumlu nuklear enzim olan PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) NAD⁺ ile reaksiyona girerek NAD kaybına sebep olur. ATP eksikliğine bağlı olarak, iyon dengesi bozulur ve hücre su alarak organeller şişmeye başlar, hücre zarının bütünlüğü bozulurak ozmotik basınç artar ve hücre patlar (48,49). Hücrenin patlamasının sonucunda, hücre içeriği hücreler arası boşluğa salınır ve yangı dediğimiz (enflamasyon, iltihaplanma) immün yanıtın oluşmasına sebep olur. Bu olayın karakteristik özelliği makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuya göç etmesidir. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite eder. Bu nedenle enflamasyon nekrozun önemli bir işaretidir(48,49).



Şekil 2.7. Bir Hücrede Nekrozis ve Apoptozis oluşumunun kıyaslanması

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması “Senescence” HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
Morfolojik özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin “flocculation”u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı fakat membranda “bleb”lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre kütülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücresinin intact mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C’de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde “smear” görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümün geç safhasında)	İyi kontrollu, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C’de gerçekleşmez DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirtici) Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosit edilirler İnflamasyon görülmez

Resim 2.2. Nekrozis ve apoptozisin kıyaslanması(50).

2.8. Kanserde Kodlamayan RNA'lar

Genetik yatkınlığın yanısıra çevresel faktörlerinde etkisi ile doku veya organlarda genomik istikrarsızlık ve mutasyonun tespit edilmesi kanserin varlığına işaret olarak kendini gösterir. Kanserli hücrelerinin en büyük özelliklerinden biri çevresindeki hücrelerinde kanserleşmesi ve yayılması yönünden güdümlemesidir. Bu hücrelerin önceden tespit edilmesi için, kanserleşen hücrelerde meydana gelen değişimleri tespit etmek önem kazanmıştır (12).

İlk zamanlar bu konu üzerinde yapılan çalışmalar protein kodlayan bölgeler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu proteinleri kodlayan genler üzerinde yapılan çalışmalar ile genlerdeki mutasyonlar tespit edilmiş ve hastalıklarla olan ilişkileri aydınlatılmaya çalışılmıştır. İnsan genom projesinin başlaması ve tüm genomun dizilenmesinin ardından aslında proteine kodlayan kısmın sadece %2 olduğunun görülmesi, hastalıkların oluşması ve ilerlemesinde diğer moleküllerin yani %98 'lik kısmın daha büyük etkisi olduğu tespit edilmiş ve araştırmalar bu bölgelere daha çok yoğunlaştırılmıştır (51,52). %98 'lik bu bilinmeyen ve "karanlık madde" olarak tanımlanan kodlamayan RNA'lar (ncRNA) genomdan ayrı düşünülemeyen ve gizemli bir unsur olarak ortaya çıkmıştır. Bu protein kodlamayan bölgelerinin, kodlayan bölgelerden hem yapısal hemde işlevsel olarak farklarının anlaşılması çok zaman almış ve hala keşfedilmeyi beklemektedir. Yapılan çalışmalar ile ncRNA'ların işlev ve özellikleri hakkındaki bilgiler her geçen gün artmaktadır ve çeşitli hastalıklarla ilişkileri tanımlanmaktadır. Kodlamayan RNA'ların işlevleri olarak yazılım, yazılım sonrası gen ifadesinin susturulması ve kromozomların yeniden düzenlenmesi gibi aslında genetik ve epigenetik düzenlemeler olarak iki başlıkta toplamak mümkündür(53).ncRNA'ları nükleotid sayıları baz alınarak gruplandırmak gerekirse; kısa kodlamayan ve uzun kodlamayan RNA'lar olarak gruplandırılmaktadır (51,54). Kısa düzenleyici RNA'ların uzunlukları 15- 40 baz çifti arasında değişmektedir. Örnek olarak, siRNA (small interfering RNA), mikro RNA (miRNA) ve PIWI (P-element induced wimpy testis) proteini ile etkileşimi olan RNA (piRNA) verilebilir (Resim 2.3.)(16).Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) ise 200 nükleotitten büyük ve hücre döngüsü, çoğalması ve apoptozis gibi birçok biyolojik süreçte rol alan dizilerdir. Şu ana kadar çalışılmış lncRNA'ların çoğu, birçok biyolojik süreçlerde görev aldığı ve gen ifadesini düzenlediği raporlanmıştır(Resim 2.3.) (14).

Resim 2.3. Kodlamayan RNA'lar(52)

İsim	Uzunluk	İnsandaki Sayısı	Fonksiyonu	Örnekler	Referans
Kısa ncRNA'lar					
miRNA	19-24 bç	>1,424	mRNA'ların düzenlenmesi	miR-15/16, miR-124a, miR-34b/c, miR-200	23
piRNA	26-31 bç	23,439	Germ hücrelerinde transpozon baskılanması, DNA metilasyonu	RASGRF1 LINE1 ve IAP elementlerini hedefleyen piRNA'lar	24
tiRNA	17-18 bç	>5,000	Transkripsiyonun düzenlenmesi	Hedefi <i>CAP1</i> geni olan	25
Orta ncRNA'lar					
snoRNA	60-300 bç	>300	rRNA'nın modifikasyonları	U50, SNORD	26
Uzun ncRNA'lar					
lncRNA	>200 bç	>1000	DNA-kromatin kompleksinde <i>scaffold</i> işlevi	<i>HOTAIR</i> , <i>HOTTIP</i> , <i>lincRNA-p21</i>	27
Diğer lncRNA'lar	>200 bç	>3000	X kromozomunun inaktivasyonu	<i>XIST</i> , <i>TSLX</i> , <i>TERRAs</i> , <i>p15AS</i> , <i>H19</i> , <i>HYMAI</i>	27

2.8.1.Küçük Kodlamayan RNA'lar (miRNAs)

2.8.1.1. Küçük Kodlamayan RNA'ların Özellikleri

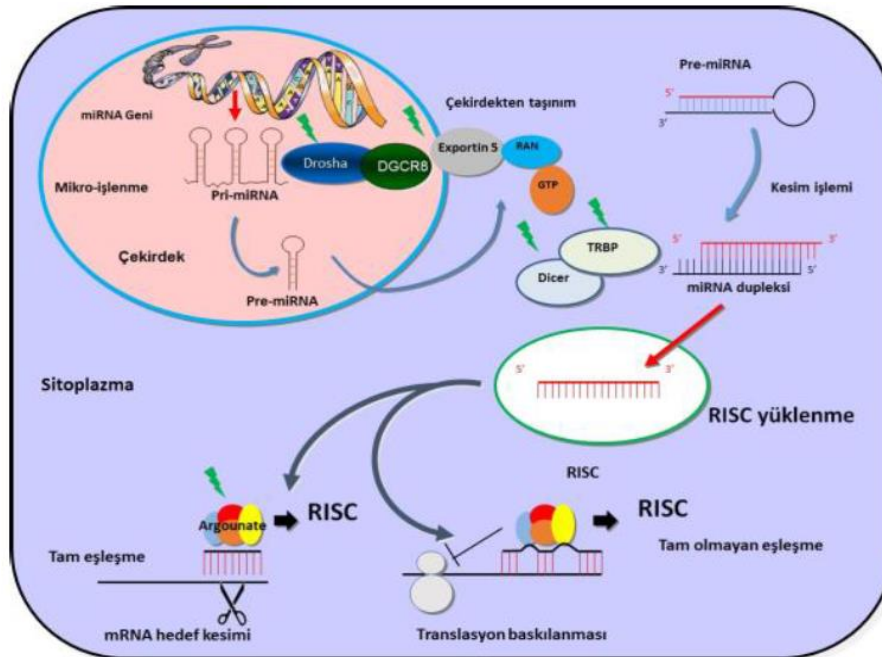
mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanarak gen ifadesinin negatif düzenlenmesinden sorumlu 21-23 bç oluşana küçük kodlamayan RNA'lardır(55). miRNA'lar ilk defa 1993 yılında *Lee ve arkadaşları* tarafından tanımlanan, 19-25 nükleotid uzunluğunda, hücre içinde sentezlenen ve protein kodlamayan RNA'lar olarak tanımlanmıştır(56). Hedefledikleri mRNA'larla ilişkilerine göre hücrede etki gösterirler. Hedef mRNA yüzlerce olmakla birlikte, bir mRNA'nında yüzlerce hedef miRNA'sı olabilir(57). miRNA'nın hedef mRNA üzerindeki etkisi aralarındaki baz eşleşmesine bağlıdır. miRNA'nın mRNA ile baz eşleşmesi, mRNA'nın çevirime uğramayan bölgesi olan 3'UTR bölgesinde gerçekleşir. Genelde hedef mRNA'nın AU'ce zengin bölgelerinde ve katlanmaların olmadığı kısımlardan bağlanır (58).

Bu eşleşme %100 olarak gerçekleşmiyorsa, mRNA'nın yazılımı baskılanır. Tam eşleşmenin gerçekleştiği durumlarda ise mRNA yıkıma uğrar.miRNA'lar hedef mRNA'nın yazılım sonrası kontrol yollarında işlev göstererek, gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumludur(59). Son yapılan çalışmalara göre miRNA'lar gen ifadesini azaltmanın yanısıra arttırdığının da desteklemektedir (58).miRNA'lar son

yıllarda fonksiyonları, yapısı ve mRNA'lar üzerindeki etkisi yönünden biyomedikal araştırmalar için oldukça popüler olmuştur. miRNA'lar; hastalığın başlaması, ilerlemesi gibi aşamalarda ifade seviyelerindeki farklılıktan dolayı çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş ve tedavi edici yaklaşımların önünü açmıştır (7). Kardiyovasküler, kanser ve yaşlılıkla bağlantılı hastalıklar (felç) örnek olarak verilebilir. Hastalıkla ilişkilendirilmiş miRNA'lar, hastalığın tanısında ve seyri ile ilgili biyobelirteç olarak kullanılabilir (7,60,61).

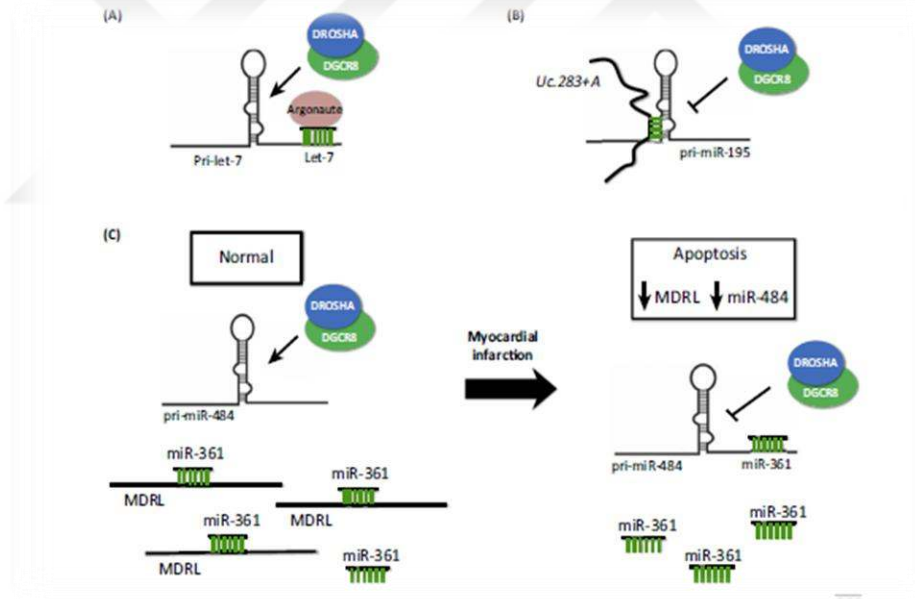
2.8.1.2. miRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezi, çekirdekte RNA polimeraz II (RNA Pol II) veya RNA polimeraz III (RNA Pol III) aracılığıyla yazılım ile başlamakta ve saç tokası yapısında olgun miRNA dizisini içeren uzun miRNA (pri-miRNA) oluşmaktadır(62). Saç tokası yapısı, RNaz III endonükleaz enzimi (Drosha) ve çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8)'den (Pasha kompleksi) tarafından işlenerek 60-70 nükleotid uzunluğunda öncül miRNA'ya (Pre-miRNA) dönüştürülür (63). Pre-miRNA'lar çekirdek zar proteini (exportin-5) aracılığıyla sitoplazmaya taşınır ve RNaz III enzimi (Dicer) ile 21-24 nükleotid uzunluğunda iki kısa RNA molekülü meydana gelir(63). Dicer enzimi RNA indüklenmiş susturma kompleksinin (RISC) oluşumunu başlatır ve oluşan iki kısa RNA molekülünden sadece biri RISC'e katılır (Şekil 2.8.)(63).



Şekil 2.8.miRNA'ların Oluşumu(biyogenezi)(64).

Yapılan çalışmalar ile tanımlanan miRNA sayısı artmaktadır(65). Hastalığın başlamasında, ilerlemesinde, hücre farklılaşması, çoğalması ve kanser gibi patolojilerde farklı profilleresahip olmuşlardır(66). miRNA'ların hücre içi düzenleme mekanizmaları oldukça karmaşıktır(65,30). Bazılarının ifade seviyesi artarken bazılarının azalması bu moleküllerin hücrede farklı yolları aktif hale getirdiğini göstermektedir(7,65,30). Hücrelerin çoğalması veya büyümesini tetiklediği olumlu etkinin yanısıra apoptozisi tetiklemesiyle olumsuz etki yaptığı çalışmalar ile tespit edilmiştir(7,30). miRNA'ların gen ifadesi düzenleme mekanizmaları; epigenetik(ilgili genin özendirici bölgesinde metilasyon yaparak), yazılım faktörleri ile gen ifade seviyesinde ve yazılım sonrası düzenlemeler olarak tanımlanmıştır (67).Son yıllarda yapılan çalışmalar ile miRNA'ların gen ifadesi düzenleme mekanizmalarının yanısıra diğer kodlamayan RNA olan lncRNA'larla olan ilişkileri aydınlatılmaya çalışılmıştır (Şekil 2.9.)(15). Bu etkileşim çeşitli veri tabanları kullanılarak tespit edilmektedir.



Şekil 2.9.Diğer RNA'ların miRNA oluşumuna (biyogenesis) etkisi (15).

(A) let-7 miRNA'sının oluşumu. (B) korunmuş bölgeden gelen Uc.283+A lncRNA'sının çekirdekte pri- miRNA-195 oluşum sürecini düzenlemesi. (C) MDRL (mitochondrial dynamic-related lncRNA) lncRNA'sının, miR-484'in pri-miRNA'dan pre-miRNA'a geçişi sürecini baskılayan miR-361'nin ifadesini azaltmasından dolayı apoptozis ve mitokondrial parçalanmanın baskılanmasını sağlamaktadır (68).

2.8.1.2.1. Anti-miR-122-5p

miR-122-5p omurgalı hayvanlarda aşırı ifade olan bir miRNA'dır. Çeşitli hastalıklara sebep olduğu bilinmekle birlikte özellikle kalp hastalıkları, karaciğer ve meme kanserinin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (60).

miR-122-5p'nin nükleotid dizisi <http://www.mirbase.org/> veri bankası kullanılarak tespit edilmiştir. (UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG) (Şekil 2.10.)



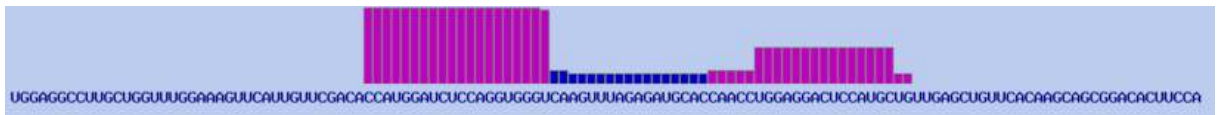
miR-122-5p

Şekil 2.10. miR-122-5p dizileme görüntüsü

2.8.1.2.2. Anti-miR-490-3p

Bu miRNA'nın hücre içerisinde ifade seviyesi yüksek olduğu zaman hücre döngüsünü ve apoptozis durduğu aynı zamanda hücre göçünü ve istilasını da yavaşladığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu miRNA'nın ifadesinin azalması ise mide, kolon ve akciğer kanserinde büyüme ve yayılmanın baskılanmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Mesane kanserinde de tümör baskılayıcı miRNA olarak görev yaptığı yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir. Aksine karaciğer kanserinde miR-490-3p'nin aşırı ifadesi ise hücre bölünmesini, göçünü ve istilasını tetiklemektedir (69).

miR-490-3p'nin nükleotid dizisi <http://www.mirbase.org/> veri bankası kullanılarak tespit edilmiştir. (CAACCUGGAGGACUCCAUGCUG) (Şekil 2.11.)



miR-490-5p

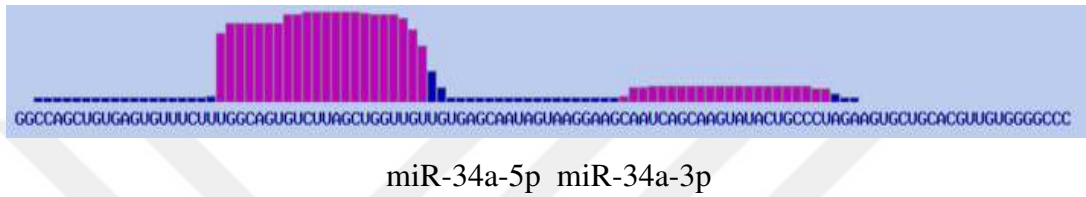
miR-490-3p

Şekil 2.11. miR-490 dizileme görüntüsü

2.8.1.2.3. Anti-miR-34a-5p

Mir-34a-5p kolon kanserinde ekspresyon seviyesi düşük olduğu yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir. Bu veriden faydalanarak çalışmaların devamında kolon kanser hücrelerinde mir-34a-5p'nin ifadesi arttırılmış ve sonucunda hücre büyümesi, istilası, yayılması ve göçünün baskılandığı gözlemlenmiştir (70).

miR-34a-5p'nin nükleotid dizisi <http://www.mirbase.org/> veri bankası kullanılarak tespit edilmiştir. (UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU) (Şekil 2.12.)



Şekil 2.12. miR-34a dizileme görüntüsü

2.8.1.2.4. Anti-miR-449c-5p

miR-449c-5p çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş olup hücrelerin kanserleşmesinde rolü olduğu yapılan çalışmalar ile bulunmuştur. Akciğer kanserinde tümör baskılayıcı olarak görev yapar, mide kanserinde ise düşük seviyede ifade olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'nın ifadesindeki artış mide kanseri hücrelerinde hücre bölünmesini ve apoptozu baskıladığı yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir(71).

miR-449c-5p'nin nükleotid dizisi <http://www.mirbase.org/> veri bankası kullanılarak tespit edilmiştir. (UAGGCAGUGUAUUGCUAGCGGCUGU) (Şekil 2.13.)



Şekil 2.13. miR-449c dizileme görüntüsü

2.8.1.3. Kanserde Küçük Kodlamayan RNA'ların Etkisi

Tanımlanan miRNA'lar çeşitli kanser türlerinde, kalp-damar hastalıklarında, nörolojik ve metabolik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Hücrelerde düzensiz ifade seviyeleri sonucunda, hücre farklılaşması, çoğalması, hücre göçü ve damarlaşmayı tetiklemektedir (72).

miRNA'ların düzensiz ifadesi sonucu delesyon, duplikasyon, gen ifadesinde artış, mutasyonlar, mRNA'nın işlenmesinin baskılanması gibi mekanizmalar aktif hale gelerek hücre kontrolsüz bölünme yoluna gitmektedir (73). miRNA'lar kanserleşme sürecinde tümör baskılayıcı ve teşvik edici olarak gruplandırılırlar (74).

miRNA'lar hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak görev yaparlar. Çeşitli kanser türlerinde ifade seviyeleri artan miRNA'lar onkogenik olarak adlandırılırken, onkogen olarak tanımlanan miRNA'lar tümör baskılayıcı genleri yada hücre farklılaşmasını kontrol eden genleri tetikleyerek tümör oluşumuna neden olurlar (74,75). Örneğin miR-21 (onkogenik miRNA), yedi farklı kanser tipinde yüksek ifade edildiği bulunmuştur ve yapılan bir çalışmada miR-21'in direk hedefi tümör baskılayıcı olan PTEN (putative protein tyrosine phosphatase) olarak bulunmuştur (74, 76). PTEN büyüme, kurtarım ve çoğalma yollarını düzenleyen bir proteindir, ayrıca kanserde PTEN'in kaybindan kaynaklı farklı yollara da (örneğin hücre göçü, genomik kararsızlıkta artış) etki ettiği bulunmuştur (77).

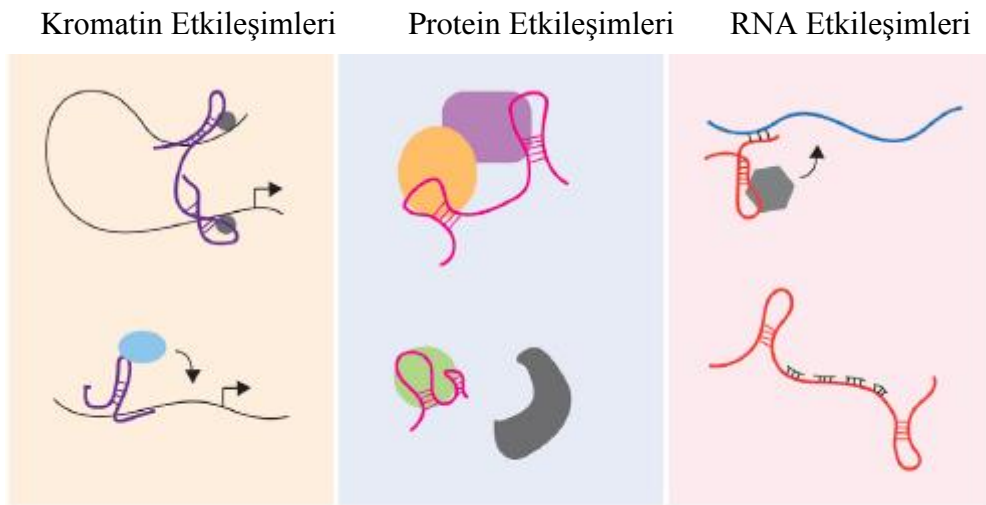
2.8.2. Uzun Kodlamayan RNA'lar (lncRNAs)

2.8.2.2. Uzun Kodlamayan RNA'ların Özellikleri

Hücre çekirdeği; DNA tıpkı yapımı, RNA sentezi (transkripsiyon), Protein sentezi (translasyon) ve RNA'nın işlenmesi gibi hücresel işlevlerin gerçekleştiği yerdir (78, 79). Hücre çekirdeğinin, hücre işlevlerinin ve metabolizmasının yönetimi görevleri oldukça önemlidir. Birçok gen ve proteinin düzenlenmesi süreci ve işlevlerinin aydınlatılması araştırmalarının sayısı giderek artmaktadır.

siRNA ve miRNA'nın hücresel işlevleri üzerine birçok çalışma bulunmasına rağmen lncRNA'lar "karanlık madde" olarak kalmıştır (80). Son yapılan çalışmalar ile lncRNA'ların varlığının kanıtları artmış ve hücresel işlevlerin düzenlenmesi yönünde anahtar rol oynadığı bulunmuştur (81).

LncRNA'lar büyük ölçüde biyoinformatik vasıtasıyla belirlendiği gibi, herhangi belirgin protein kodlama potansiyeli içermeyen, uzunluğu 200 nükleotidden büyük RNA molekülü olarak tanımlanır (81). Gen ifadesinin düzenlenmesi, dozaj ayarlama, genomik susturma, çekirdek organizasyonu ve çekirdek por karmaşası üzerinden çekirdek sitoplazma geçiş trafiğinin düzenlenmesi gibi birçok hücrel işlevde görev aldığı son yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir (80,82). Ayrıca lncRNA'lar büyük moleküllerin etkileşime girmesini ve işlevsel olarak birbirlerini etkilemesine sebep olmaktadır (Şekil 2.14.) (83). Protein kodlayan bölgeler ile kıyaslandığında, lncRNA'ların önemli açık okuma çerçeve (OFRs), tipik başlama kodonu (AUG), 3' çevrilmemiş bölgeleri (UTRs) ve sonlanma kodonu eksikliği belirlenmiştir (80, 84). LncRNA'lar protein kodlayan bölge (ekzonik) ve kodlamayan (intronik) transkripler arasında dağılmıştır (80, 84). Yapılan çalışmalar ve gelişen teknoloji ile lncRNA'ların dizilerinin belirlenmesi ve işlevlerinin bilinirliğinin artması genom içerisindeki görevlerinin daha iyi anlaşılmasına neden olmuştur (85). Çeşitli hastalıklarda özellikle kanserde, hücrenin kanserleşme sürecindeki etkileri ve kanser türleri arasında farklı lncRNA'ların ifadesindeki değişiklikler nedeniyle bu süreçte etkisi olduğunu açıkça göstermiştir (85). Bu lncRNA'ların farklı zamanlarda belirli dokularda ifade seviyelerinin farklı olduğu görülmüş. Örneğin kanserin gelişim süreçlerinde, nörodegeneratif hastalıklarında (Alzheimer) farklı zamanda farklı seviyede ifade oldukları tespit edilmiştir (85,86).

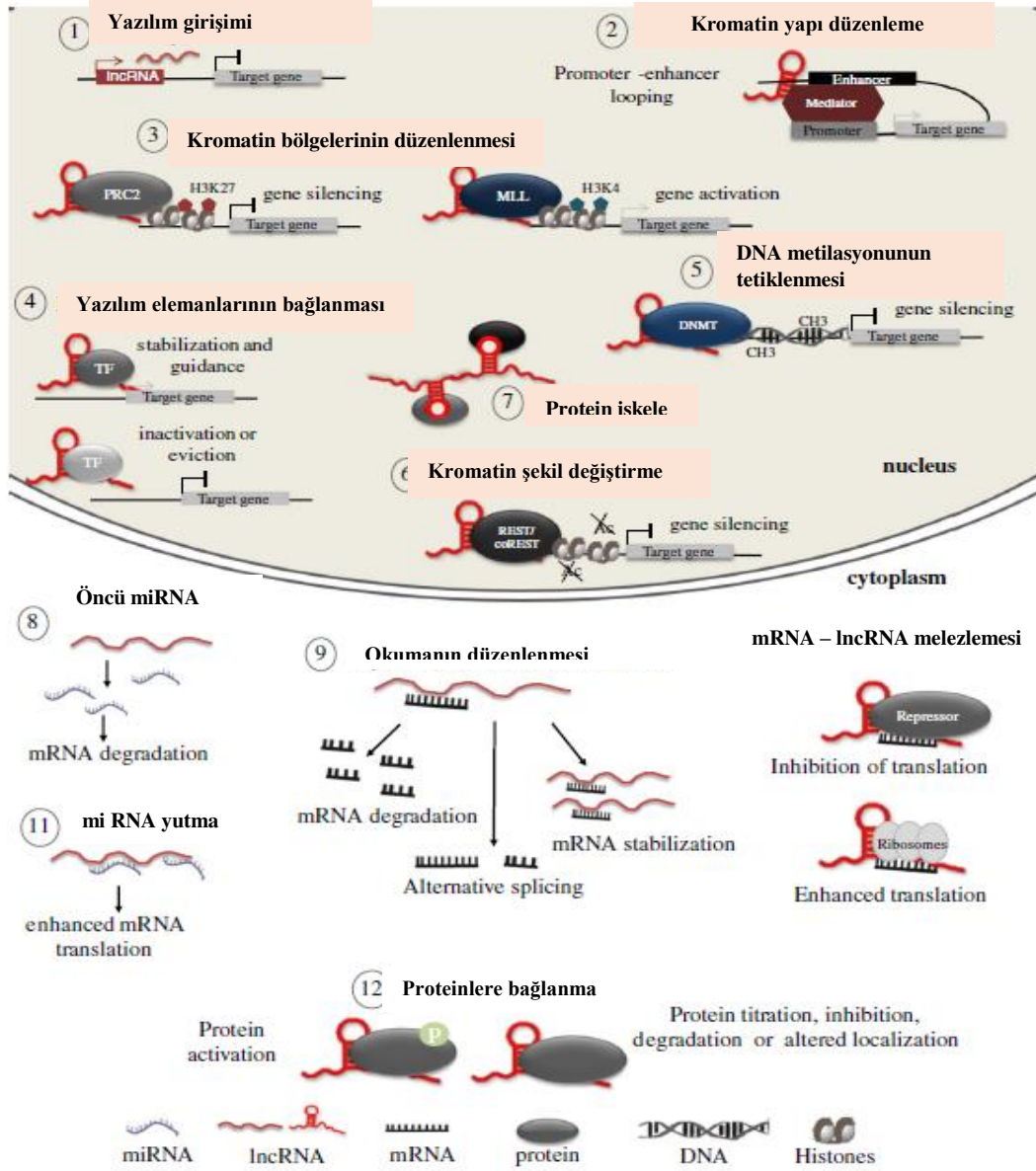


Şekil 2.14. LncRNA ve büyük moleküllerin etkileşimi (83).

Gelişen teknoloji ile gizemli RNA dünyası aydınlatılmaya ve hastalıklarla olan ilişkileri tespit edilmeye başlanmıştır. Hastalıkların nerdeyse tamamında protein kodlayan bölgelerle ilişkileri tespit edilmiş fakat tam olarak belirlenmemiştir(81). Son yapılan çalışmalar ve bulgular doğrultusunda hastalıklar arasında gen ifadesi farklı RNA'ların olması, bu moleküllerin işlevinin ve metabolizmasının araştırılması gerektiğini düşündürmektedir(81).Gelişmekte olan her alan gibi, bu yeni moleküllerin ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir(85).

Yaklaşık 20 yıl önce özellikle mesane kanserinde tümör büyümesini azaltıcı yönde düzenlenmesinden sorumlu H19 geninin keşfedilmesi uzun kodlamayanRNA'ların varlığını göstermiştir(87).Kısa zaman sonra X kromozomunu suskun (inaktif) halegetiren özel inaktif transkript (XIST'in) tanımlanması ile kodlanmayan RNA'ların için düzenleyici veyapısal fonksiyonlar önerilmiştir(88).Prostat kanser antijen 3 lncRNA PCA3 DD3 kötü huylu prostat kanserinde aşırı ifade edilmesi ile lncRNA'ların kansere özgü ifadesergileyebilir algısını güçlendirmiştir (81).

İnsan genomunun ayrıntılı açıklanması ile kodlayan bölgelerde birçok transkriptin sessiz olması bu transkriptin gerçek bir lncRNA olduğunu işaret eder. Henüz keşfedilmeyi bekleyen binlerce belki milyonlarca lncRNAdizileri bulunmaktadır(89). LncRNA'ların işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte, artan lncRNA sayısı ve birçokbiyolojik süreçteki etkisi (Şekil 2.15.), normal ve kötü huylu dokudaki ifade seviyesindeki farklılıktan dolayı hücrede önemlifonksiyonlara sahip olduklarını göstermektedir(81).



Şekil 2.15. LncRNA'ların Çeşitli Biyolojik Süreçlere Katılması(90).

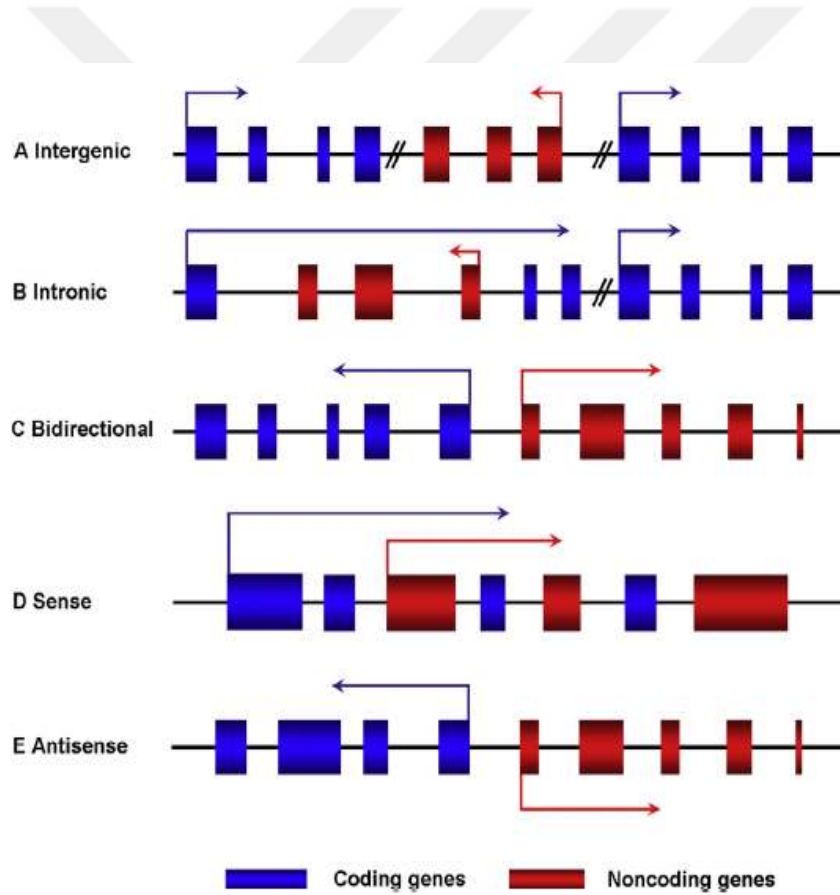
2.8.2.3. Uzun Kodlamayan RNA'ların Keşfi ve İşlevsel Özellikleri

GENCODE projesi sayesinde insan lncRNA'larının büyük çoğunluğunun yapısal organizasyonları ve hücre içi işlevleri tanımlanmıştır. Hastalıklara özgü lncRNA'ların tanımlanmasıyla hastalıkların oluşum ve tedavi sürecini anlamada biobelirteç olarak kullanma çalışmalarının önünü açmıştır(91).

2.8.2.4. LncRNA İşlevsel Özellikleri

LncRNA'lar, DNA, RNA ve proteinlerin belirli dizilerine bağlanarak işlev görürler(92, 93). Bazı lncRNA'lar kromatin düzenlemesi yanısıra yazılımı düzenleme işlevlerinin olduğu deneysel olarak tanımlanmıştır(92,93). Son yapılan çalışmalar ile kanser gelişiminin çeşitli evrelerinde lncRNA'ların etkili olduğu tespit edilmiştir. LncRNA'lar yazılım sonrası yapıştırma, düzenleme, lokalizasyon, çeviri ya da yıkma gibi RNA işlenmesinde önemli olayları düzenler (92,93). Ayrıca lncRNA'lar, "miRNA süngerleri" olarak ve küçük düzenleyici miRNA'ların ifadesini azaltıcı yönde işlev gösterdiği tespit edilmiştir (94).

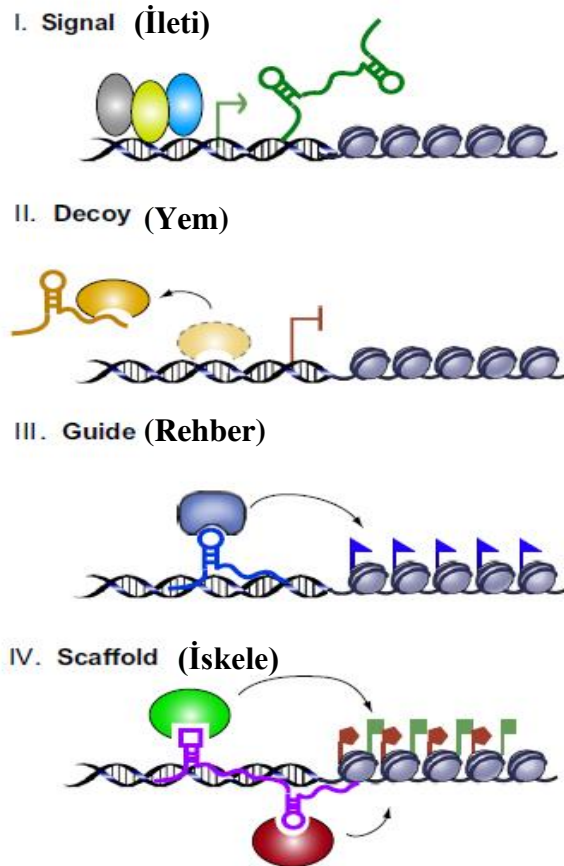
LncRNA'lara beş geniş kategoriden bakmak gerekirse (Şekil 2.16.) ;



Şekil 2.16. Beş geniş kategoride lncRNA'lar (A) intergenik lncRNA: iki protein kodlayan bölge arasında genomik aralığın içinde bağımsız bir birim olarak uzanmakta, (B) intronik: protein kodlayan genin intronun içinden kodlanması, (C) Bidirectional: genellikle bir kaç yüz baz çifti üzerinden, ters yönde ve protein kodlayan genin özendirici bölgesinden kodlanması, (D) sense : (E) antisense: bir veya daha fazla ekzon ile çakışık ve kodlayan genin ters yada aynı yönde kodlanması (92,95).

Son zamanlarda lncRNA'ların işlevleri çeşitli moleküler mekanizmaya göre katagorize edilmiştir. LncRNA'ları gruplandırmak gerekirse;

- **İleti (Sinyal) modeli:** Molekül sinyalinin ya da yazılım aktivitesinin bir göstergesi olarak hücre tipine özel işlev görür (96).
- **Yem (decoy) modeli:** Diğer düzenleyici RNA'lara ya da proteinlere bağlanarak çalışır. Hedefledikleri moleküllerin ifadesinin düzenlenmesini sağlar (96).
- **Rehber (Guide) modeli:** Belirli protein bağlı RNA'lar, belirli hedefribonükleoprotein karmaşımlarına (kompleksleri) yönlendirir (96).
- **İskele (Scaffold) modeli:**İlgili moleküler bileşenlerin (proteinler veya RNA) monte edilebileceği bir platform gibi yapısal bir role sahiptir(96)(Şekil 2.17.).



Şekil 2.17. LncRNA 'ların işlevsel özellikleri(6,96)

2.9. Kanserde Uzun Kodlamayan RNA'ların Etkisi

Moleküler açıdan kanser, onkogenik ve tümör baskılayıcı genlerin işlevleri ve ifadelerinin bozulmasından dolayı oluşan genetik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır.

Kanser oluşumu ile ilişkilendirilmiş ve bu gen kategorisine giren birçok lncRNA tanımlanmıştır (12).

Son yapılan çalışmalar ile lncRNA'lar farklı biyolojik süreçlerde görev yaptıklarından dolayı bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. Kodlanmayan RNA'ların normal olmayan ifade düzeyleri ve mutasyonlarında dolayı kanserde dâhil olmak üzere çeşitli hastalıklarla yakından ilişkilendirilmiştir (95).

LncRNA'ların fonksiyonları analiz edildiğinde hücrede genetik bilginin işlenmesi sırasında, her adımda çok yönlü düzenleyici işlev gösterdiği tespit edilmiştir. LncRNA'lar hücrenin kanserleşmesinde; kontrolsüz çoğalmasını, farklılaşmasını ve çeşitli dokulara yayılmasını tetikleyen önemli hücresel olayların gerçekleşmesini sağlamaktadır. LncRNA'ların artan sayısı ve işlevlerinin anlaşılmasıyla birlikte, çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinde bio-belirteç olarak kullanmak için güçlü bir aday olmuştur (83, 97).

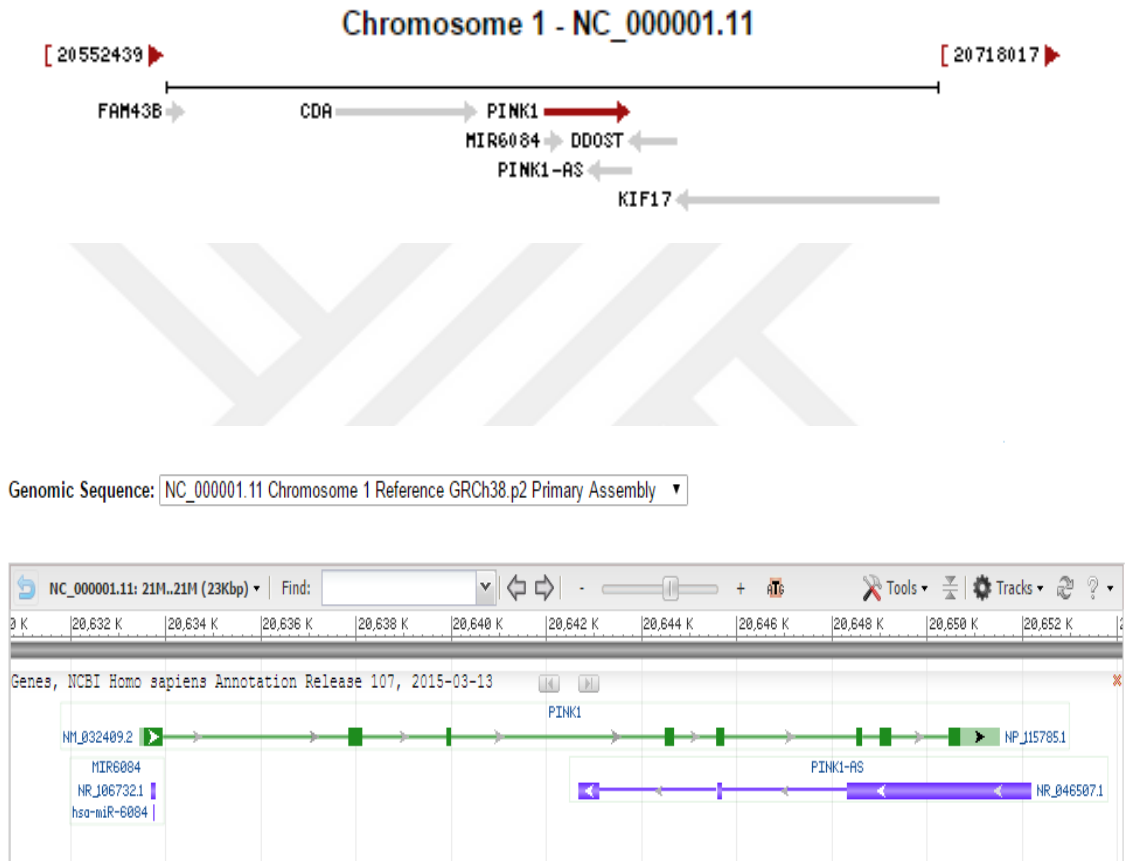
2.10. PINK1 (PTEN ile tetiklenmiş varsayılan kinaz I)

PINK1 (PTEN ile tetiklenmiş varsayılan kinaz I) kromozom 1 üzerinde yerleşik olup son yapılan çalışmalar ile kanser oluşumunda etkili olduğu tespit edilmiş bir gendir (Şekil 2.18.) (98).

PINK1 geni ile yapılan son çalışmalar, nörodejenerasyon ve kanser ile ilişkili olduğu yönünde raporlanmıştır. Hücre döngüsünde bölünme tetikleyici şekilde düzenleyici rolü olduğu ve kanserle ilişkili fenotipte rol aldığı bulunmuştur (18).

PINK1 geninin susturulması hücrelerde bölünmesi, koloni oluşumu, hücre göçü ve istilasını azaltıcı olduğu bulunmuştur (98). Kanser hücrelerindeki PINK1 geninin susturulması yeni dönem tedavi yaklaşımları arasında yer almaktadır (98). Çalışma raporlarına göre, PINK1 geni baskılayıcı ile diğer mitoz bölünme durdurucu hedefli ilaçlar birlikte kullanılması kanser tedavisi için umut olacaktır (99). Kanser, birçok moleküler hasar sonucu oluşmaktadır. Kanser üzerine yapılan çalışmalar derinleştikçe çeşitli yolların etkileri belirlenmektedir.

DNA yanlış eşleşme baz onarım mekanizmasının eksikliği sonucu oluşan kanser türünde PINK1 gen ifadesinin aşırı olduğu tespit edilmiştir. Bu kanser türünde PINK1 geninin susturulması yeni dönemde tespit edildiği gibi ölümcül olacaktır (17).



Şekil 2.18.PINK1 geninin kromozom üzerindeki görüntüsü

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Hazırlık

Hücre kültüründe kullanılan steril tüm plastik malzemeler ve sarflar ticari firmalardan temin edildi. Cam malzemeler 160°C’de 60-90 dakika sterilize edildi. 0,22µm ve 0,45 µm por çapına sahip mikrobiyolojik filtreler kullanılarak kullanılacak olan sıvı malzemeler (Fetal Bovine Serum ve Antibiyotik) steril edildi.Çalışmanın yapılacağı steril kabin (SafeMate 1.2, BioAir, LAF Technologies Pty Ltd, Victoria, Avusturalya) 15-20 dakika ultraviyole ışık açılarak steril edildi. Steril edilen kabin içine alınacak malzemeler %70 alkolle silinerek içeri alındı.Çalışmanın türüne göre kullanılacak olan cam ve plastik malzemeler kabin içine alındı ve kabin içerisinde açılarak deney için hazır hale getirildi.

3.2. Hücre Soyunun Özellikleri

Tezde kullanılacak olan kolon kanseri hücre soyu (HCT116), ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel, Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Bu hücre soyunun özellikleri Tablo’6 da gösterilmiştir.

Hücre soyu	ATCC adı	Kanser	Morfolojisi
HCT116	CCL-247	Karsinom	Epiteyal

Tablo3.1.Kullanılan hücre soyunun özellikleri

3.3. Hücrelerde Kullanılan Kültür Vasatının Hazırlanması

Hücreler için DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium) ile hazırlanan kültür vasatı kullanıldı.

Kültür vasatının hazırlanması

DMEM	500 ml (Sigma, Deisenhofen,Almanya)
FCS	50 ml (%10)(Sigma, Deisenhofen, Almanya)
Penicilin streptomycin	5 ml (%1) (Sigma,Deisenhofen, Almanya)

3.4. Hücre Açılması

Hücreler sıvı azot içerisinde çıkartılarak 37 °C 'lık su ve alkol içeren ortamda dikkatlice çözündürüldü. %70 alkol ile dezenfekte edilerek steril edilmiş kabin içerisine alındı. Kültür vasatından 50ml santrifüj tüpüne yaklaşık 10 ml olacak şekilde bölündü. Çözdürülen hücre solüsyonu, kültür vasatı içeren ortama dikkatlice transfer edilip 1500rpm 4 dk santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında santrifüj tüpü steril edilerek kabine alındı ve vakum sistemi kullanılarak pellete dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı.

Hücre pelleti homojenize hale getirilerek yaklaşık 3 ml'lik hücre kültür vasatı ile dilüe edilip pasaj stol solüsyonu olarak hazır hale getirildi. Yeni bir santrifüj tüpüne yaklaşık 15ml hücre kültürü vasatı bölünüp, hazırlanan hücre stok solüsyonundan yaklaşık 250 µl alınıp kültür vasatına eklendi ve 75 cm² 'lik flasklara (Hücre kültürü kapları) (Falcon; BD Biosciences, ABD)pasajlanıp 37 °C 'de, %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda inkübe edildi.

3.5. Hücreleri Büyütme ve Deney için Hazırlama

Hücreler 75 cm² 'lik flasklarda (Falcon; BD Biosciences, ABD) %100 e ulaştıktan sonra besiyeri çekilip, hücrelerin üzerine 5 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) eklenerek hücreler yıkandı ve flasklara 37°C su banyosunda ısıtılan 1X'lik Trypsin'den 1-2 ml eklendi. Flasklar 3-4 dakika 37°C CO₂ etüvde bekletildi. Daha sonra flasklara Trypsin'in aktivitesini durdurmak için 5 ml FCS'li DMEM eklendi. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopla kontrol edildi. Hücreler kalktıktan sonra Trypsini etkisizleştirmek için 5-10 ml %10 FCS (Fetal Bovine Serum) içeren kültür vasatı eklendi. Kültür kabındaki hücreler 50 ml'lik steril tüpe aktarıldı. 1500 rpm 4 dk santrifüj edilerek süpernatantları uzaklaştırılıp pasaj ve ekim yapılarak 37 °C 'de, %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda yetiştirildi.

3.6. Hücrelerinin Sayılması

Santrifüj işleminin ardından tüp içerisindeki üst faz atıldı ve tüpün alt kısmında toplanmış olan hücreler tüpün kenarlarına yavaşça vurularak homojenize hale getirilip üzerine 5 ml hücre kültür vasatı eklendi. Hücre sayımı için aşağıdaki karışım hazırlandı.

10 µl hücre süspansiyonu

10 µl %0,5'lik Trypan-Blue

Hazırlanan bu karışım thoma lamına (Marienfeld, Almanya) konarak lam içerisindeki canlı hücreler sayıldı. Sonuca göre % 10 FCS li DMEM ile seyreltilen hücreler 12 well hücre kültür kaplarına ekildi. Hücreler %70 konfulans olana kadar yaklaşık 24 saat bekletildi.

3.7. Anti-mi RNA'ların Aktarımı

1 nmol inhibitör miRNA (Qiagen, Almanya) (Anti-miR-122-5p, Anti-miR-490-3p, Anti-miR-34a-5p, Anti-miR-449c-5p)50 µl RNase saf su (RNase free water) ile çözdürüldü. 12 well hücre kaplarına $0.8-3 \cdot 10^5$ sayısında hücreler FCS'li DMEM ile ekildi. Yaklaşık 24 saat sonrasında Anti-miRNA aktarımı için 0,5'lik ependorf tüpünde 3 µl inhibitor (20uM stock), 200 µl DMEM (Serum free) ve 6 µl transfection reagent eklenerek vortekslenip, 5-10 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek hazırlandı. %70 konfulans olan hücrelerin üzerine damla damla verildi. Hafif bir şekilde karıştırıldı ve 37 °C 'de, %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda 72 saat inkübe edildi.

3.8. Hücre Soyundan Total RNA izolasyonu

Hücre soyundan total RNA izole etmek için miRNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılmıştır.

RNA eldesi için aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir;

1. Hücreler 75 cm² 'lik flasklarda %100 konfulans olduktan sonra, 5 ml HBSS ile yıkanıp üzerine 1X tripsin eklenerek kaldırıldı ve sonrasında FCS'li DMEM ile inaktive edilerek santrifüj edildi.
2. Süpernatant kısmı pellete dokunmadan uzaklaştırıldı ve pellet 5 ml hücre kültürü vasatı ile süspanse edildi.
3. Hücreler sayılarak yaklaşık $4-5 \cdot 10^5$ olacak şekilde 12 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına FCS'li DMEM ile ekildi.
4. 24 saat sonrasında yaklaşık %70 konfulans olan hücrelere miRNA inhibitörü aktarımı yapıldı ve 72 saat 37 °C 'de, %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda inkübe edildi.
5. Bu süre sonrasında hücrelerin ortamında olan FCS'li DMEM vakum yardımıyla uzaklaştırıldı ve 1ml HBSS ile yıkanıp üzerlerine 400 µl 1X Tripsin eklenerek yaklaşık 1 dk bekletildi. FCS'li DMEM kullanılarak Tripsin inaktive edildi.

6. Hücreler 1,5ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 1500 rpm'de 4 dk çöktürüldü.
7. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent eklendi.
8. Elde edilen hücre homojenatı oda sıcaklığında (15–25°C) 5 dakika boyunca muhafaza edildi.
9. Üzerine 140 µl kloroform eklendi ve 15 sn boyunca pipetaj yapılarak 2-3 dakika boyunca odasıcaklığında tutuldu.
10. 4°C'de 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı ve üst faz yeni bir tüpe alındı.
11. Yeni tüpe alınan miktarın 1,5 katı (yaklaşık 600 µl) 100% etanol eklendi ve pipet ile iyice karıştırıldı.
12. En fazla 700 µl örnek 2 ml toplama tüpü içerisindeki RNeasy® Mini kolona yüklendive oda sıcaklığında 20 sn boyunca 8000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı. Bu işlem örnek bitimine kadar tekrar edildi.
13. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 700 µl Buffer RWT çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 20 sn boyunca 8000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.
14. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona bu sefer 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklendi ve yine oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000 rpm'de santrifüj edildi. (Not: Kullanmadan önce Buffer RWT ve RPE çözeltilerine %96-100 etanol eklendi.) Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.
15. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona tekrar 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklendi ve bu aşamada oda sıcaklığında 2 dk boyunca 8000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken kalıntı atıldı.
16. 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 30–50 µl RNase içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilerek 1 dk boyunca 8000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpündeki birikinti total RNA'yı içermektedir.

3.8.1. mRNA'dan cDNA eldesi

Elde edilen total RNA içindeki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için Ipsogen RT Kit(Qiagen, GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı (Tablo 7.).Test edilecek (10 µl) her bir RNA örneğinin 5 µl'si 65°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilip 5 dakika buzda bekleterek soğutuldu. Revers Transkriptaz ön karışımı buzda hazırlandı ve buzda tutuldu.

Tablo 3.2. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan Revers Transkriptaz PCR Reaksiyon karışımının içerikleri

Bileşenler	Örnek başına hacim (µl)
5x Revers Transkriptaz tamponu	5
dNTP	2
Random primer (100 µM)	5,25
RNaz İnhibitörü (40 U/µl)	0,5
Ters transkriptaz (200 U/µl)	1
DTT	1,25
RNaz içermeyen su	0,5
Örnek başına RT ön karışım hacmi	15,5

Ön karışım dikkatlice karıştırıldı, kısa süreli santrifüj edildi ve her bir RNA örneğininüzeline ön karışımdan 15 µl eklendi. Her bir tüp dikkatlice karıştırıldı ve kısa süreli santrifüj edildi. Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City,CA, USA) cihazındaki kayıtlı revers transkripsiyon programı çalıştırıldı (Tablo 8.). Tüpün altındaki cDNA'yı toplamak için kısa süreli santrifüj edildi ve qPCR gerçekleştirene kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 3.3.mRNA'dan cDNA eldesinde revers transkripsiyon için termal döngüleyici ayarları

Süre (dakika)	Sıcaklık (°C)
10	25
60	50
5	85
∞	4

Tepkime tamamlandıktan sonra elde edilen tek sarmal cDNA örneklerinin dondurulup çözülerek oluşan kaybı önlemek için 0.2 ml'lik PCR tüplerine 2 µl eşit miktarlarda dağıtıldı. Eşit miktarlarda bölme işlemi yapıldıktan sonra cDNA'ların kullanım ömrünü uzatmak için -80°C'de muhafaza edildi.

3.8.2. Elde edilen cDNA'lardan kalite ve miktar tayini

Elde edilen cDNA örneklerinin miktarlarını ve kalitesini tayin etmek ve tüm örnekleri aynı yoğunlukta reaksiyona tabi tutmak için spektrofotometrik yöntem (Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System (BioTek, Winooski, United States) kullanıldı. İfade analizi deneyleri öncesi örneklerden elde edilen cDNA'lar 50 ng/µl'e çekildi.

Tablo 3.4.Örneklerden elde edilen mRNA cDNA'larının derişimleri

Örnekler	Derişim (ng/µL)	260/280 Absorbans Değerleri
SF (DMEM)	1887,6	1,80
NC (inhibitör negatif kontrol)	1856	1,78
Anti- miR-122-5p	1789,6	1,79
Anti- miR-490-3p	1799,2	1,80
Anti- miR-34a-5p	1792	1,79
Anti- miR-449c-5p	1915,9	1,81

3.9.*PINK1-AS*, *PINK1*,*PTEN* ve *GAPDH* Genlerinin İfade Düzeyleri Ölçümü için Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR) Yöntemi

Eş zamanlı PCR reaksiyonu DNA bağlayan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı olarak takibine olanak sağlar. SYBR Green bu amaçla sıklıkla kullanılan boyalardan biridir. Çift iplikli DNA molekülüne bağlanarak floresan ışıma verir. Primerin bağlanması takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı artmakta ve buna bağlı

olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. SYBR Green boyasından alınan ışımanın sınır değeri aştığı noktaya Ct yada Cp değeri adı verilmektedir. Bu noktada DNA amplifiye olmuş ve DNA'ya bağlanan boyanın verdiği ışımaya sınır değeri aşmıştır. Işımanın sınır değeri aştığı anda amplifikasyondan emin olunur ancak doğru amplikonun takibinin yapıldığının belirlenebilmesi için erime eğrisinin incelenmesi gerekmektedir. Çünkü SYBR Green belirli bir DNA molekülüne bağlanan özgül bir boya değil, tüm çift iplikli DNA moleküllerine bağlanan bir boyadır.

3.9.1. Primer Tasarımı

PINK1-AS, PINK1, PTEN ve GAPDH primerleri, NCBI veritabanında yer alan “Gene” arayüzü (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) kullanılarak tasarlandı. Kullanılan primerlerin ileri ve geri primer dizilimleri tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 3.5. PINK1-AS, PINK1, PTEN ve GAPDH genlerinin ifade seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizilimleri.

Primer Adı	İleri Dizi (Fw)	Geri Dizi (Rw)
PINK1-AS	CGATGCCCTGTTGAACCAGA	CCCCAGTGAAGTATCGTGGC
PINK1	CAGCAAGAGACCATCTGCCC	GAGCCAGCCAACCATCTTGT
PTEN	GCGGAACCTGCAATCCTCAG	GGTAACGGCTGAGGGAACTC
GAPDH	GGAAGGACTCATGACCACAGT	GGATGATGTTCTGGAGAGCCC

3.9.2. PINK1-AS, PINK1, PTEN ve GAPDH Genlerinin İfade Düzeyleri Ölçümü için eş zamanlı PCR bileşenleri

Tablo 11’e göre eş zamanlı PCR ön karışımı buzda hazırlandı. Buz üzerinde 50 ng/μl’e çekilen cDNA örnekleri üzerine dağıtıldı. Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazındaki kayıtlı programı çalıştırıldı (Tablo 12.).

Tablo 3.6. Eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri

Bileşenler	Hacim (µl)
RT ² SYBR Green ROX FAST Mastermix	5
F Primer (10 µM)	0,3
R Primer (10 µM)	0,3
Rnaz/Dnaz içermeyen su	3,9
cDNA (50 ng)	0,5
Total	10

Tablo 3.7. Eş zamanlı PCR prosedürü

	Sıcaklık (°C)	Süre(sn)
Enzim aktivasyonu	95	10 dakika
Denaturasyon	95	15
Primer bağlanması/uzama	60	60
Erime eğrisi	65	1
	95	sürekli

3.9.3. İstatistiksel Analiz

HCT116 hücre soyundan PINK1-AS, PINK1, PTEN ve GAPDH ifade düzeylerinin sonuçlarını istatistiksel olarak karşılaştırmak için microsoft office excel programı kullanılmıştır. Kısmi miktarlara dayalı yöntemde HCT116 hücre soyunda Anti-miRNA aktarımı sonunda ölçümü yapılan PINK1-AS, PINK1, PTEN genlerin değerleri GAPDH geni ölçüm değerleri ile normalize edilmiştir.

Normalizasyonda kullanılan GAPDH geni, belirli şartlar altında ifade düzeyi değişmeyen, tüm dokularda ve hücrede bazal düzeyde ifade edilen hamarat genlerdir. qRT-PCR yönteminde Cp (Crossing points) değerleri elde edilmiştir. qRT-PCR sonuçlarındaki Ct yada Cp değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır (Şekil 3.1.).

Bu değer bize ilgili genin bir hücre hattındaki ifade düzeyinin, kontrol baz alınarak diğer hücre hattındakine göre kıyaslanmasını sağlar; yani, katsayıbilgisi edinilir.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\text{Örnek } \Delta Ct (\text{Gen}) - \text{Kontrol } \Delta Ct (\text{Referans}))}$$

Şekil 3.1. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü

qRT-PCR sonuçlarında ilgili genin referans gene göre kıyaslaması için $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır (Şekil 3.2.). Bu değer bize o genin referans gene göre hangi oranda ifade düzeyinin değiştiiğini gösterir yani, göreceli ifade bilgisini verir.

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-(\text{Gen Ct} - \text{Referans Ct})}$$

Şekil 3.2. $2^{-\Delta Ct}$ formülü

3.10. Akım (flow) sitometride apoptozis seviyelerine bakılması

Hücre apoptozu Annexin V ve 7AAD içeren kit kullanılarak üretici firmanın (Becton Dickinson, Pharmingen, UK) tavsiyeleri doğrultusunda çalışıldı. Apoptotik hücrelerle nekrotik hücreleri ayırmak için, hücreler Annexin V (yeşil floresan) ve 7AAD (kırmızı floresan) ile aynı anda boyatıldı.

1. Well platelere total hücre 1.000.000 olacak şekilde ekildi.
2. 12'lik well plate ekilmiş olan hücrelere Anti-miRNA aktarımı yapıldıktan 72 saat sonrasında 300 ml tripsin ve 1ml FCS'li DMEM kullanılarak kaldırıldı.
3. Kaldırılan hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, pellete dokunulmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Hücre süspansiyonlarının üzerine 1ml PBS eklendi, 5 saniye vorteksle pellet çözüldü, 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, üst faz döküldü. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra, hücre süspansiyonlarının üzerine binding buffer

eklendi.(1ml binding buffer + 9 ml distile su ile seyreltildi) 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.

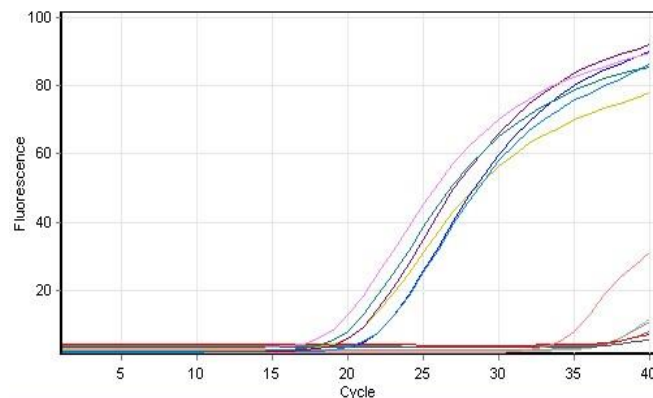
5. Hücre süspansiyonların üzerine 500 µl binding buffer eklendi. Kısaca vortekslendi veyeni tüplere 100 µl olacak şekilde transfer edildi.
6. 100µlhücre süspansiyonun üzerine 5 µl Annexin, 5 µl 7AAD eklendi hafif karıştırılıp 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
7. Hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.
8. Hücre süspansiyonlarının üzerine 500 µl binding buffer(1ml binding buffer + 9 mldistile su ile seyreltildi) eklendi.
9. Hücre süspansiyonları daha sonra Becton coulter NAVIOUS tipi akım (flow) sitometreile değerlendirildi. Kaluza analysis programı kullanılarak her örnek için hücrelersayılp analiz edildi.

4. BULGULAR

Kolon kanseri oluşumunda rol oynayan birçok molekül ve ilişkili yollar tam olarak aydınlatılamamış olup, organın büyümesine ve sağ kalımına etkileri tam olarak bilinmediği için tedavi edici ilaçlara karşı direnç geliştirme olasılığı yüksektir. Yeni dönemde keşfedilen miRNA'ların kanser oluşturmada ve şiddetini arttırmada etkisi olduğu bulunmuştur. miRNA'larının kanser oluşumunda tek başına etkisinin olması yanısıra hücre içi diğer moleküller ile etkileşime girerek hücrede olumsuz etki yaptığı düşünülmektedir. Ancak bu moleküller özellikle lncRNA'ların kanser üzerindeki etkisi ve yazılım faktörleri ile etkileşimleri gizemini korumaktadır. Kolon kanserinde tedaviye yönelik yeni yaklaşımların geliştirilmesi için, kolon kanseri hücre hattında (HCT116) Anti-miR-122-5p, Anti-miR-490-3p, Anti-miR-34a-5p, Anti-miR-449c-5p'nin PINK1-AS'e (uzun kodlamayan RNA) etkilerinin belirlenmesi için anti-miRNA aktarılması, gen ifadesi analizleri ve apoptozis seviyelerine bakılmıştır.

4.1. HCT116 Hücre Soyunda PINK1-AS Geninin İfade Sonuçları

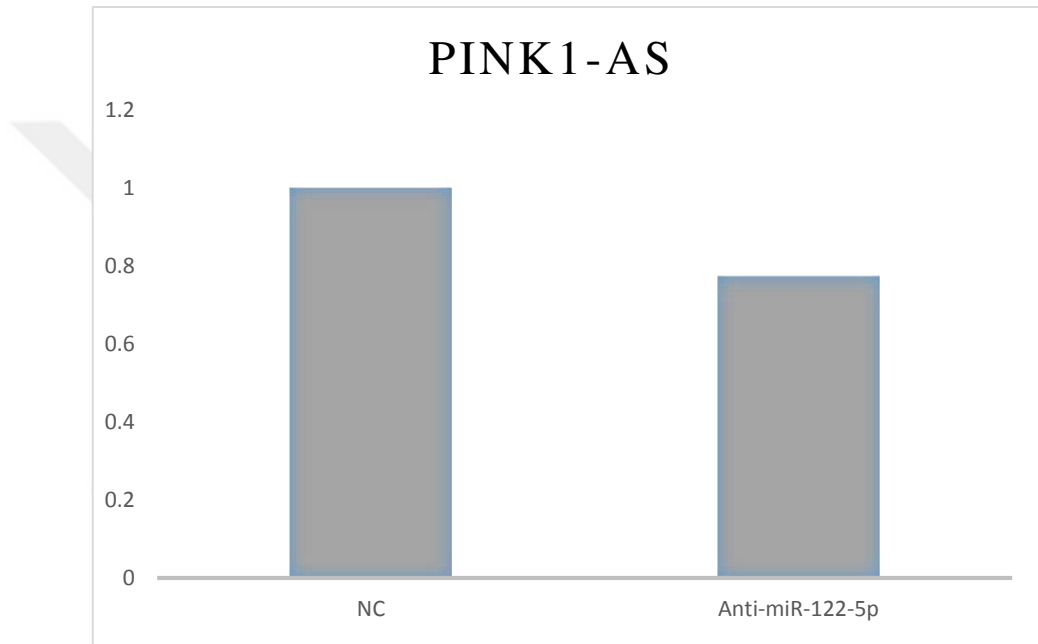
HCT116 kolon kanseri hücre soyuna Anti-miRNA'ların etkisi, hücre soyuna aktarılmasından 72 saat sonrasında kaldırılıp total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve gerçek zamanlı PCR yöntemleriyle ölçüldü. Anti-miR-122-5p, Anti-miR-490-3p, Anti-miR-34a-5p, Anti-miR-449c-5p'nin PINK1-AS genine etkisi hamarat gen olarak kullanılan GAPDH gen ifadesi ile normalizasyonu yapılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. PINK1-AS ve GAPDH genlerinin ifade sonuç eğrisi

4.1.1. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-122-5p*'nin etkisi ile PINK1-AS geninin katlı değişim ifade sonuçları

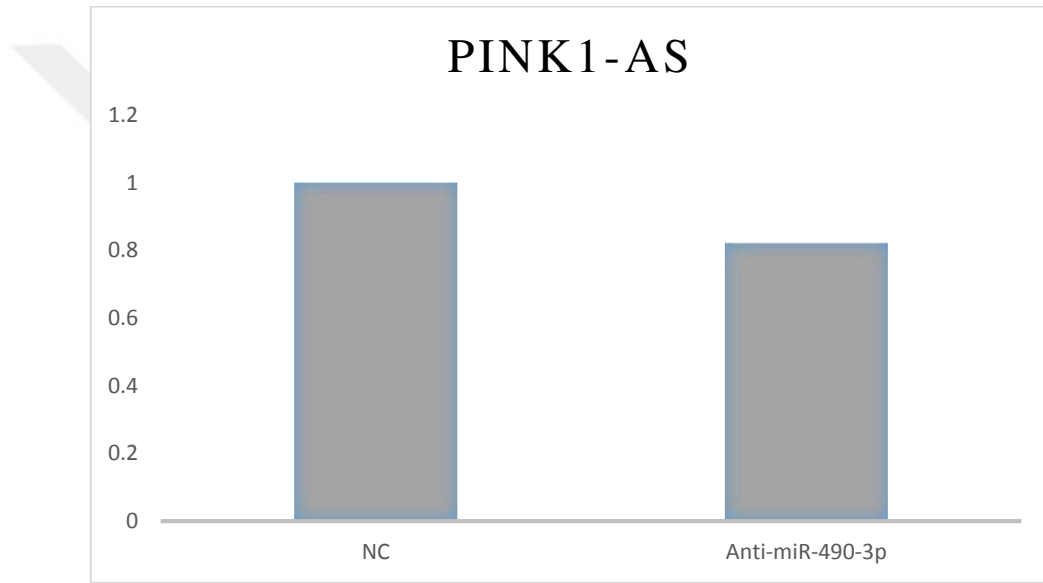
HCT116 hücre soyunda, PINK1-AS lncRNA'sının negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Anti-miR-122-5p'nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 0,7 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2.HCT116 Hücre soyunda PINK1-AS gen ifadesinin NC ve Anti-miR-122-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.1.2. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-490-3p*'nin etkisi ile PINK1-AS geninin katlı değişim ifade sonuçları

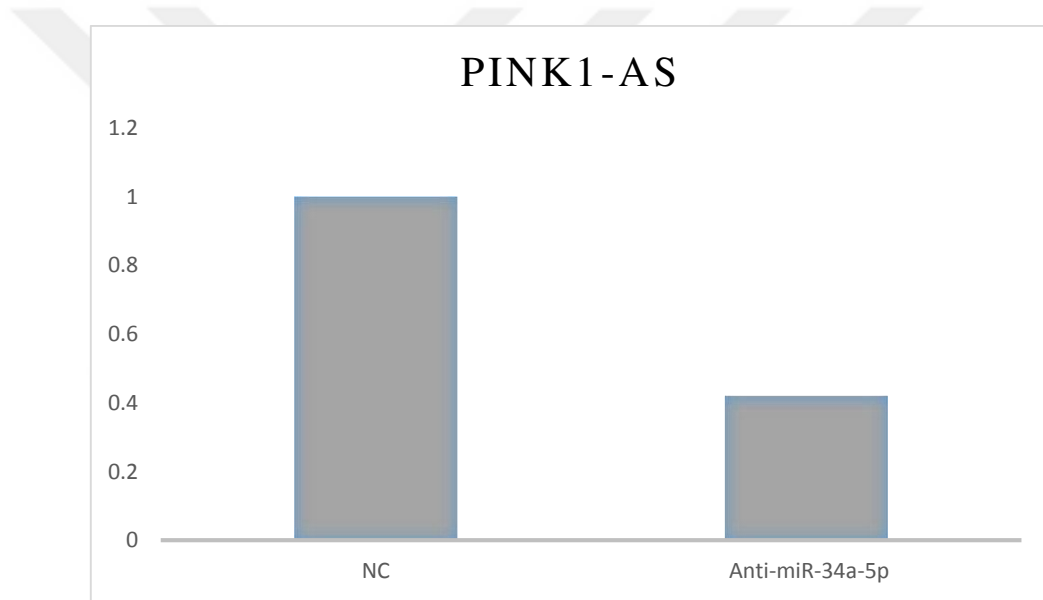
HCT116 hücre soyunda, PINK1-AS lncRNA'sının negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Anti-miR-490-3p'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 0,8 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3.HCT116 Hücre soyunda PINK1-AS gen ifadesinin NC ve Anti-miR-490-3p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.1.3. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-34a-5p*'nin etkisi ile PINK1-AS geninin katlı değişim ifade sonuçları

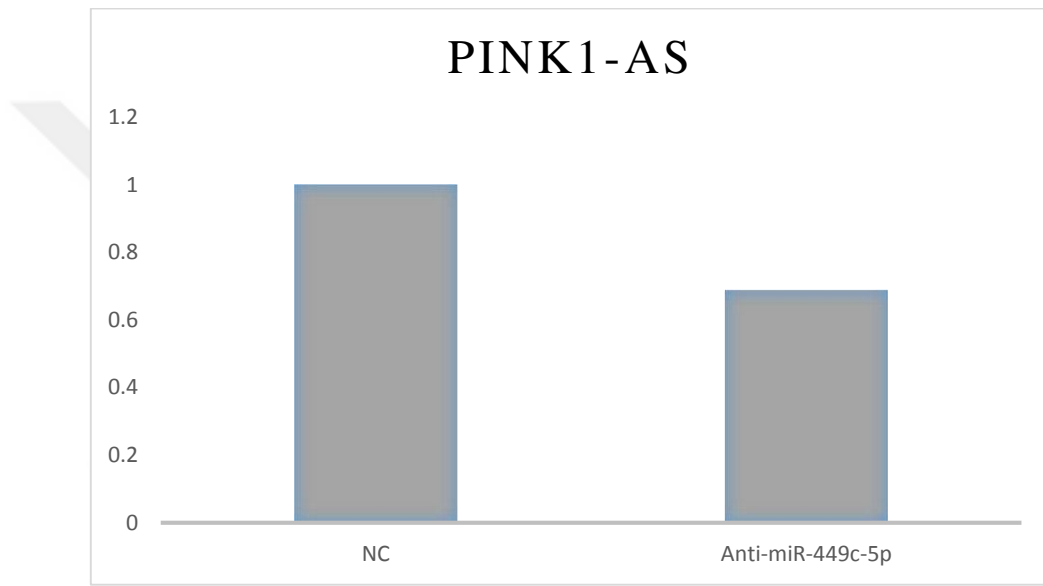
HCT116 hücre soyunda, PINK1-AS lncRNA'sının negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.4.'de gösterilmiştir. Anti-miR-34a-5p'nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 0,4 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4.HCT116 Hücre soyunda PINK1-AS gen ifadesinin NC ve Anti-miR-34a-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.1.4. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-449c-5p*'nin etkisi ile PINK1-AS geninin katlı değişim ifade sonuçları

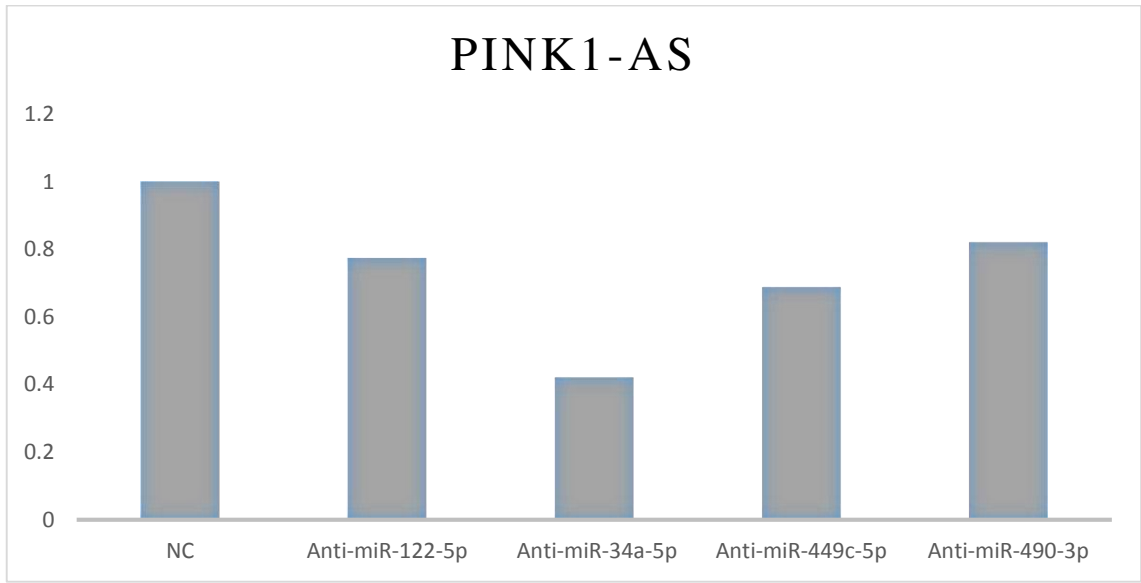
HCT116 hücre soyunda, PINK1-AS lncRNA'sının negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.5.'de gösterilmiştir. Anti-miR-449c-5p'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 0,7 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5.HCT116 Hücre soyunda PINK1-AS gen ifadesinin NC ve Anti-miR-449c-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.1.5. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-122-5p*, *Anti-miR-490-3p*, *Anti-miR-34a-5p*, *Anti-miR-449c-5p*'nin ve negatif kontrolün etkileri kıyaslanarak PINK1-ASgeninin katlı değişim ifade sonuçları

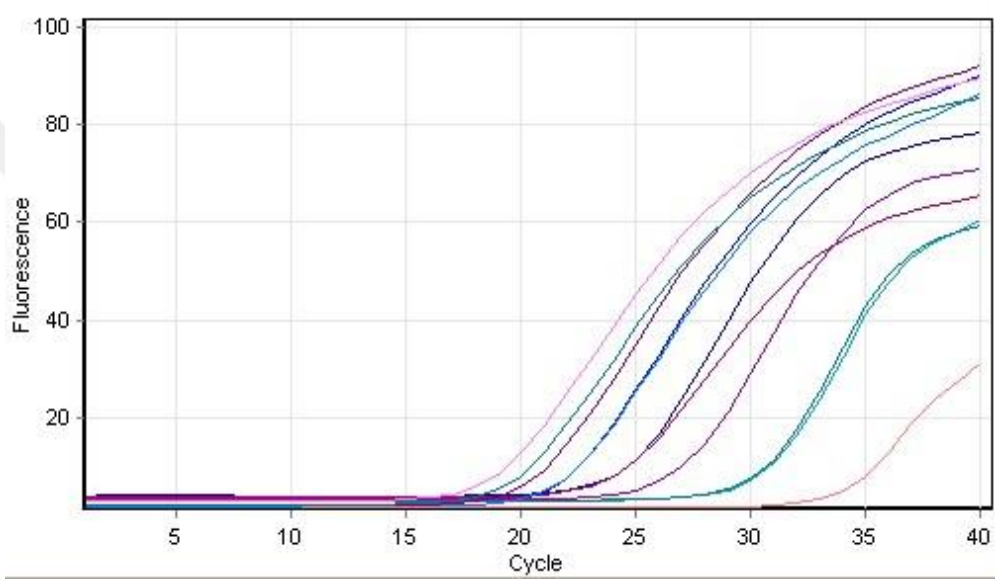
HCT116 hücre soyunda, PINK1-AS lncRNA'sının negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.6.'de gösterilmiştir. *Anti-miR-122-5p*, *Anti-miR-490-3p*, *Anti-miR-34a-5p*, *Anti-miR-449c-5p*'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarları sırasıyla : (0,7), (0,8), (0,4), (0,7) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6. HCT116 Hücre soyunda PINK1-AS gen ifadesinin NC, *Anti-miR-122-5p*, *Anti-miR-490-3p*, *Anti-miR-34a-5p*, *Anti-miR-449c-5p*'nin katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.2. HCT116 Hücre Soyunda PINK1 Geninin İfade Sonuçları

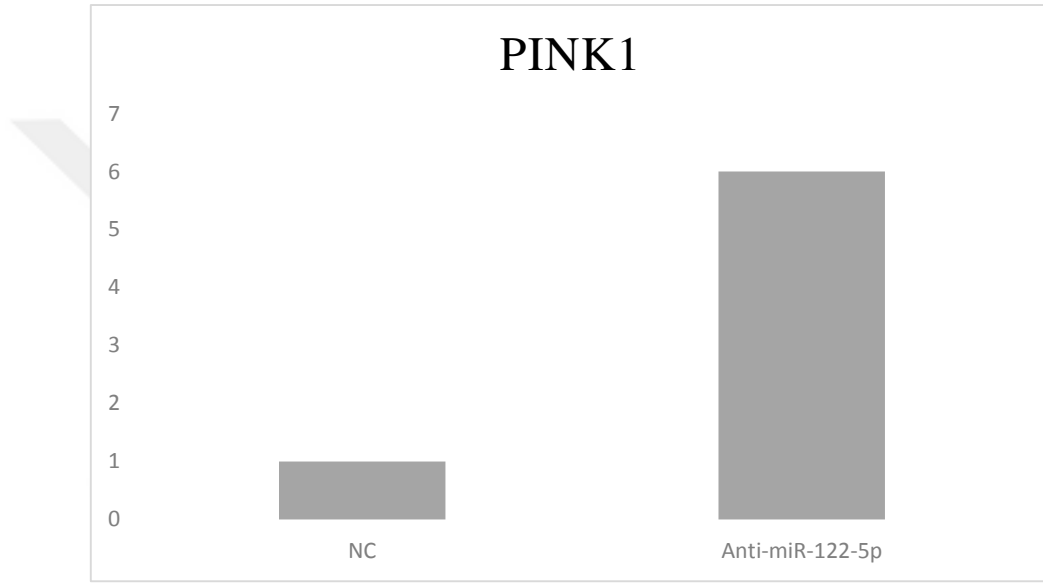
HCT116 kolon kanseri hücre soyuna Anti-miRNA'ların etkisi, hücre soyuna aktarılmasından 72 saat sonrasında kaldırılıp total RNA izolasyonu, c DNA sentezi ve gerçek zamanlı PCR yöntemleriyle ölçüldü. Anti-miR-122-5p, Anti-miR-490-3p, Anti-miR-34a-5p, Anti-miR-449c-5p'nin PINK1 genine etkisi hamarat gen olarak kullanılan GAPDH gen ifadesi ile normalizasyonu yapılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7.PINK1 ve GAPDH genlerinin ifade sonuç eğrisi

4.2.1. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-122-5p*'nin etkisi ile PINK1 geninin katlı değişim ifade sonuçları

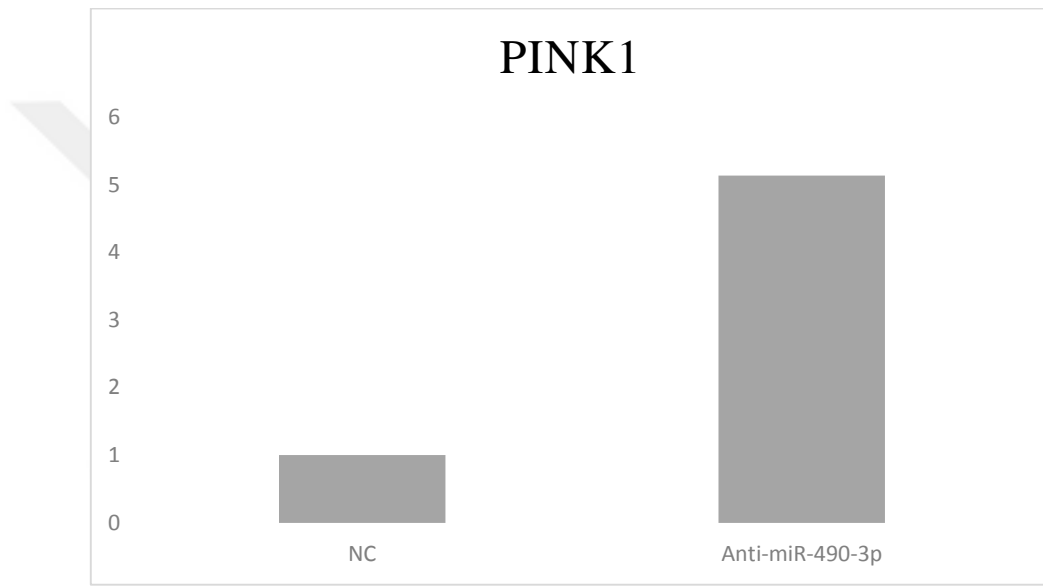
HCT116 hücre soyunda, PINK1 geninin negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.8.'de gösterilmiştir. *Anti-miR-122-5p*'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 6,0 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8. HCT116 Hücre soyunda PINK1 gen ifadesinin NC ve *Anti-miR-122-5p*'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.2.2. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-490-3p*'nin etkisi ile PINK1 geninin katlı değişim ifade sonuçları

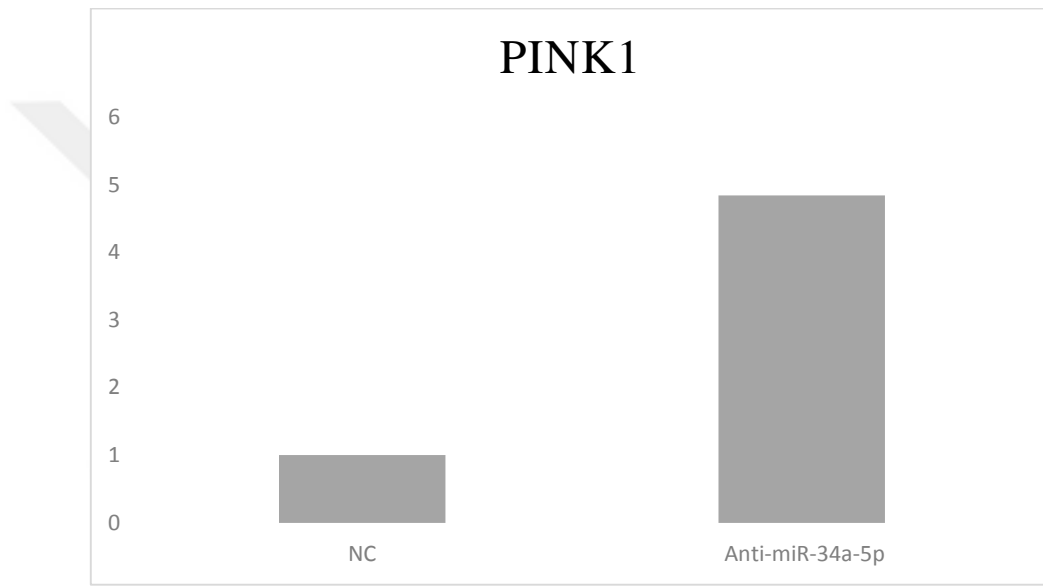
HCT116 hücre soyunda, PINK1 geninin negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.9.'de gösterilmiştir. *Anti-miR-490-3p*'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 5,1 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.9.HCT116 Hücre soyunda PINK1 gen ifadesinin NC ve *Anti-miR-490-3p*'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.2.3. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-34a-5p*'nin etkisi ile PINK1 geninin katlı değişim ifade sonuçları

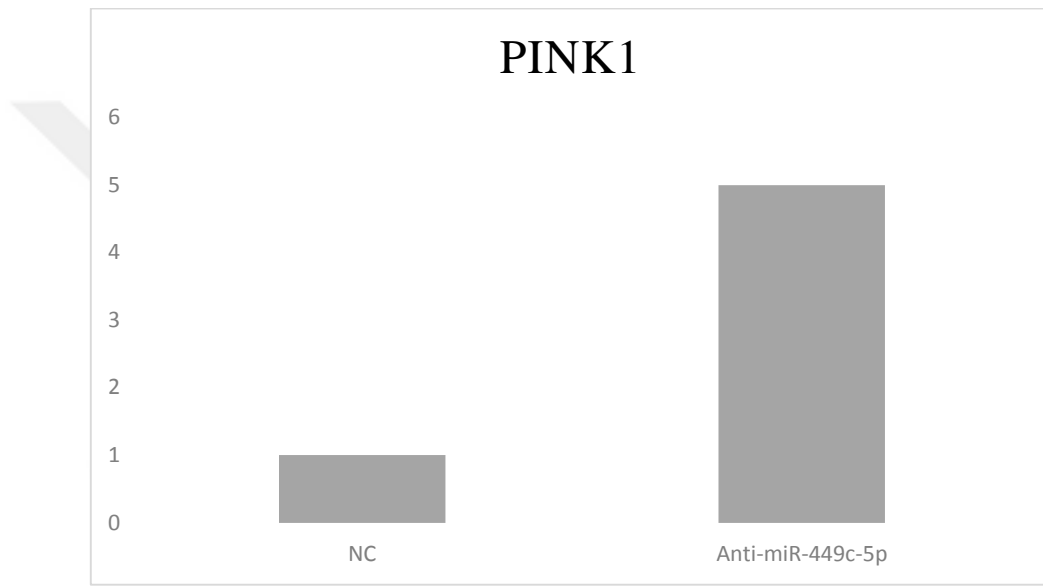
HCT116 hücre soyunda, PINK1geninin negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.10.'da gösterilmiştir. *Anti-miR-34a-5p*'nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 5,0 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10.HCT116 Hücre soyunda PINK1 gen ifadesinin NC ve *Anti-miR-34a-5p*'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.2.4. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-449c-5p*'nin etkisi ile PINK1 geninin katlı değişim ifade sonuçları

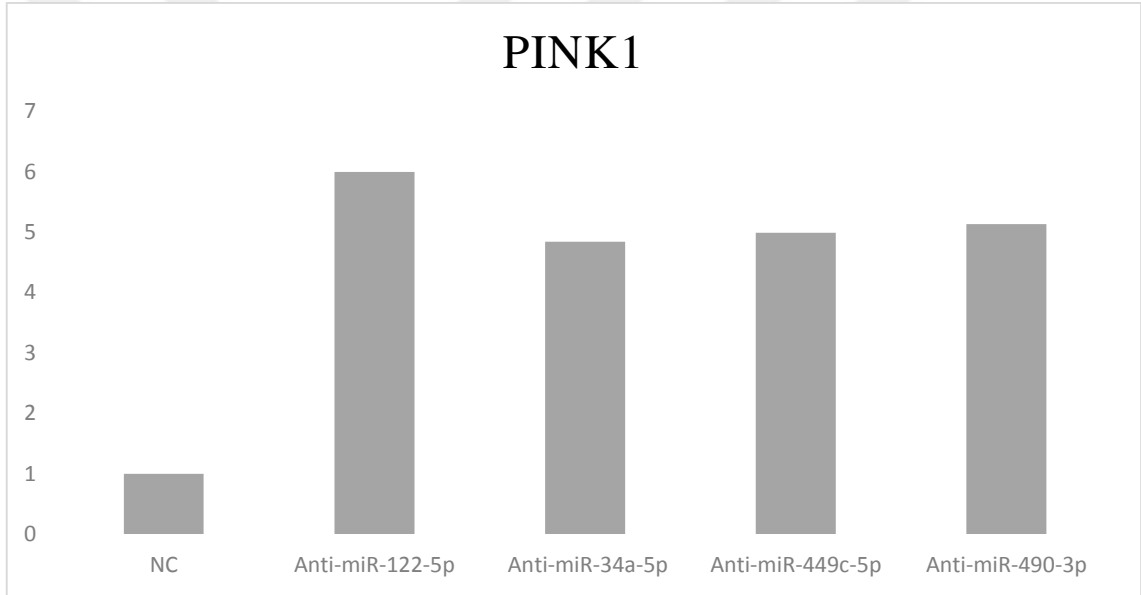
HCT116 hücre soyunda, PINK1geninin negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.11.'de gösterilmiştir. Anti-miR-449c-5p'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 5,0 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.11. HCT116 Hücre soyunda PINK1 gen ifadesinin NC ve Anti-miR-449c-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.2.5. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-122-5p*, *Anti-miR-490-3p*, *Anti-miR-34a-5p*, *Anti-miR-449c-5p*'nin ve negatif kontrolün etkileri kıyaslanarak PINK1 geninin katlı değişim ifade sonuçları

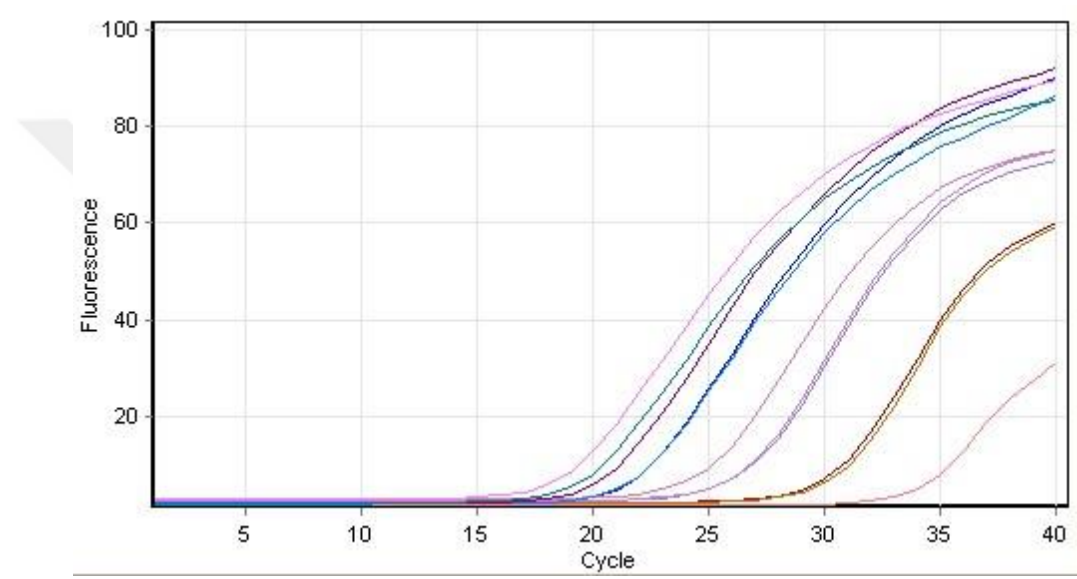
HCT116 hücre soyunda, PINK1 geninin negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.12.'de gösterilmiştir. *Anti-miR-122-5p*, *Anti-miR-490-3p*, *Anti-miR-34a-5p*, *Anti-miR-449c-5p*'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarları sırasıyla : (6,0), (5,1), (5,0), (5,0) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.12. HCT116 Hücre soyunda PINK1 gen ifadesinin NC, *Anti-miR-122-5p*, *Anti-miR-490-3p*, *Anti-miR-34a-5p*, *Anti-miR-449c-5p*'nin katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.3. HCT116 Hücre Soyunda PTEN Geninin İfade Sonuçları

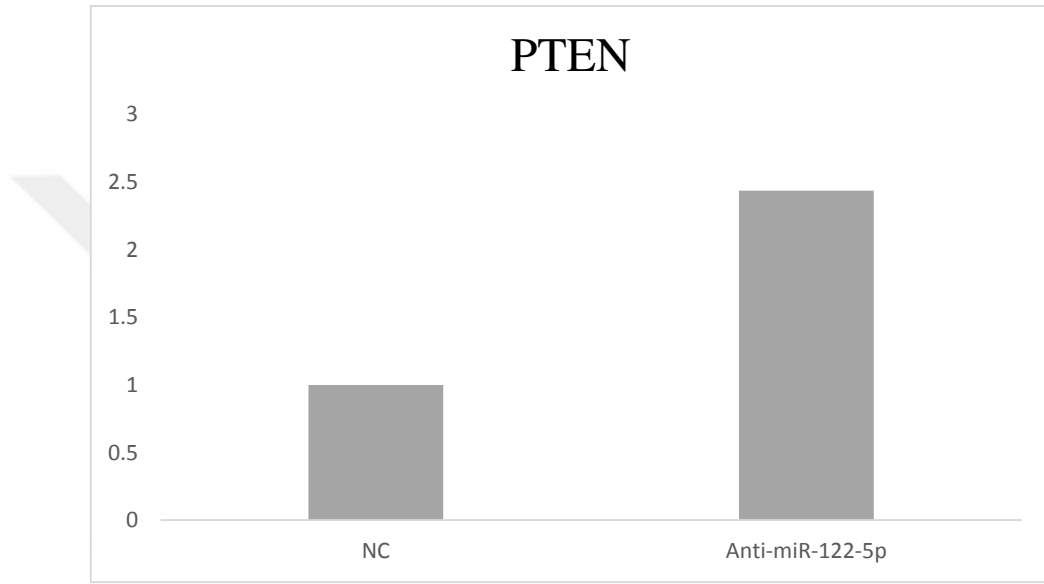
HCT116 kolon kanseri hücre soyuna Anti-miRNA'ların etkisi, hücre soyuna aktarılmasından 72 saat sonrasında kaldırılıp total RNA izolasyonu, c DNA sentezi ve gerçek zamanlı PCR yöntemleriyle ölçüldü. Anti-miR-122-5p, Anti-miR-490-3p, Anti-miR-34a-5p, Anti-miR-449c-5p'nin PTEN genine etkisi hamarat gen olarak kullanılan GAPDH gen ifadesi ile normalizasyonu yapılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. PTEN ve GAPDH genlerinin ifade sonuç eğrisi

4.3.1. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-122-5p*'nin etkisi ile PTEN geninin katlı değişim ifade sonuçları

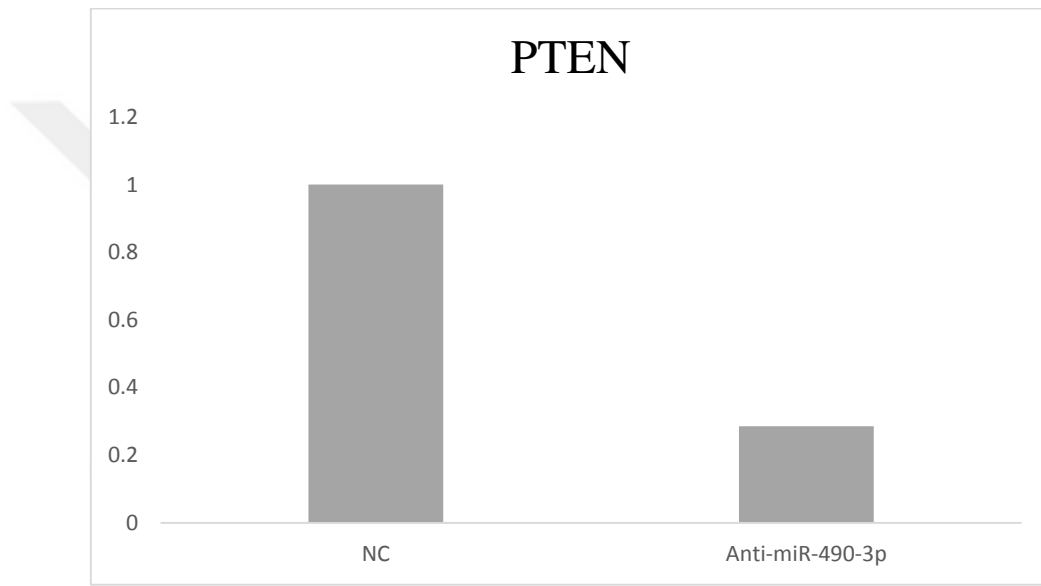
HCT116 hücre soyunda, PTEN geninin negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.14.'de gösterilmiştir. Anti-miR-122-5p'nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 2,4 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.14. HCT116 Hücre soyunda PTEN gen ifadesinin NC ve Anti-miR-122-5p'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.3.2. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-490-3p*'nin etkisi ile PTEN geninin katlı değişim ifade sonuçları

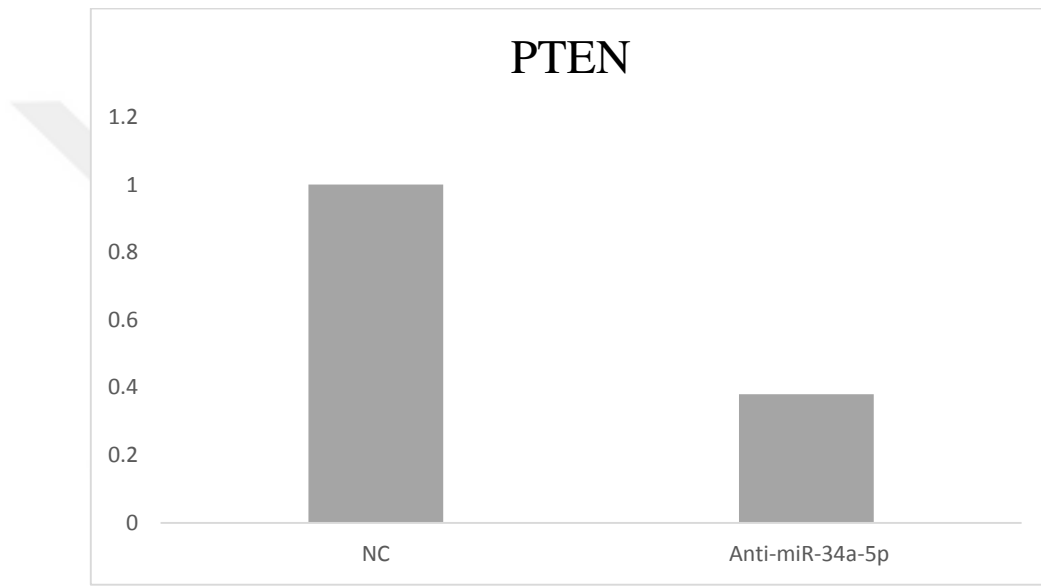
HCT116 hücre soyunda, PTEN geninin negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.15.'de gösterilmiştir. *Anti-miR-490-3p*'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 0,3 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.15.HCT116 Hücre soyunda PTEN gen ifadesinin NC ve *Anti-miR-490-3p*'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.3.3. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-34a-5p*'nin etkisi ile PTEN geninin katlı değişim ifade sonuçları

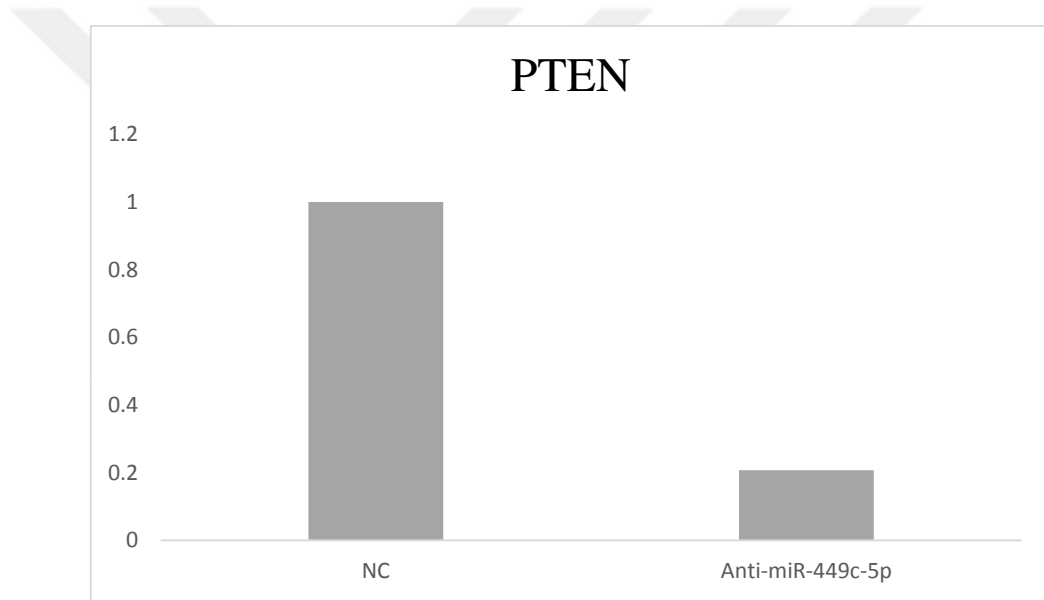
HCT116 hücre soyunda, PTEN geninin negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.16.'de gösterilmiştir. *Anti-miR-34a-5p*'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 0,3 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.16. HCT116 Hücre soyunda PTEN gen ifadesinin NC ve *Anti-miR-34a-5p*'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.3.4. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-449c-5p*'nin etkisi ile PTEN geninin katlı değişim ifade sonuçları

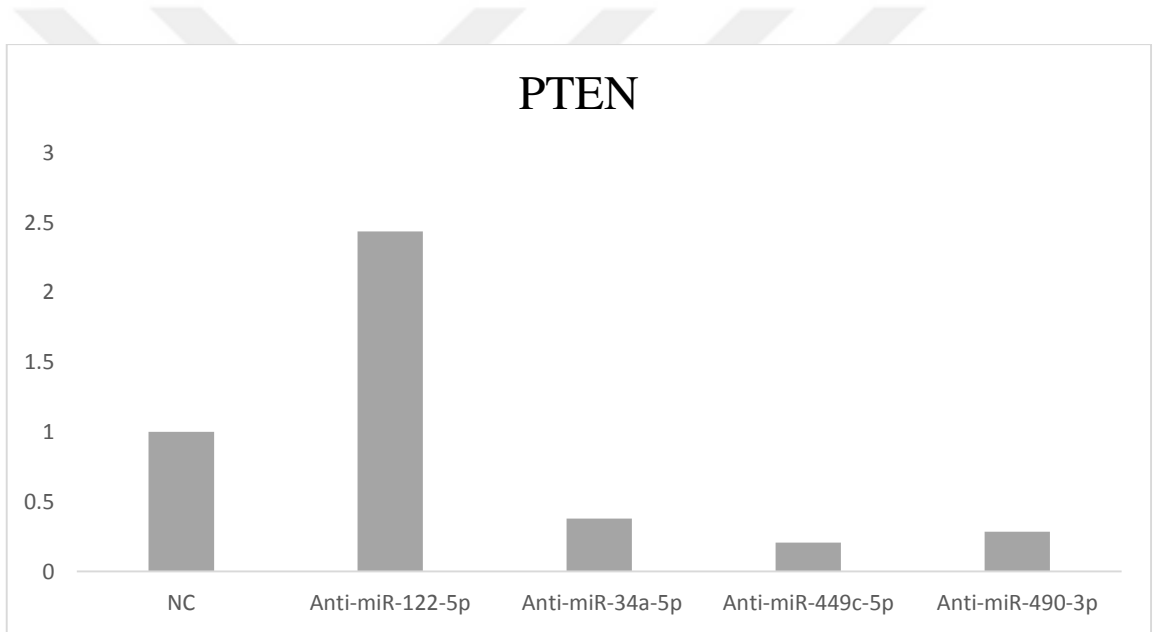
HCT116 hücre soyunda, PTEN geninin negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.17.'de gösterilmiştir. *Anti-miR-449c-5p*'nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarı 0,2 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.17.HCT116 Hücre soyunda PTEN gen ifadesinin NC ve *Anti-miR-449c-5p*'deki katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.3.5. HCT116 hücre soyunda *Anti-miR-122-5p*, *Anti-miR-490-3p*, *Anti-miR-34a-5p*, *Anti-miR-449c-5p*'nin ve negatif kontrolün etkileri kıyaslanarak PTEN geninin katlı değişim ifade sonuçları

HCT116 hücre soyunda, PTEN geninin negatif kontrole göre ifade seviyesi şekil 4.18.'de gösterilmiştir. *Anti-miR-122-5p*, *Anti-miR-490-3p*, *Anti-miR-34a-5p*, *Anti-miR-449c-5p*'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarları sırasıyla : (2,4), (0,3), (0,3), (0,2) olarak bulunmuştur.



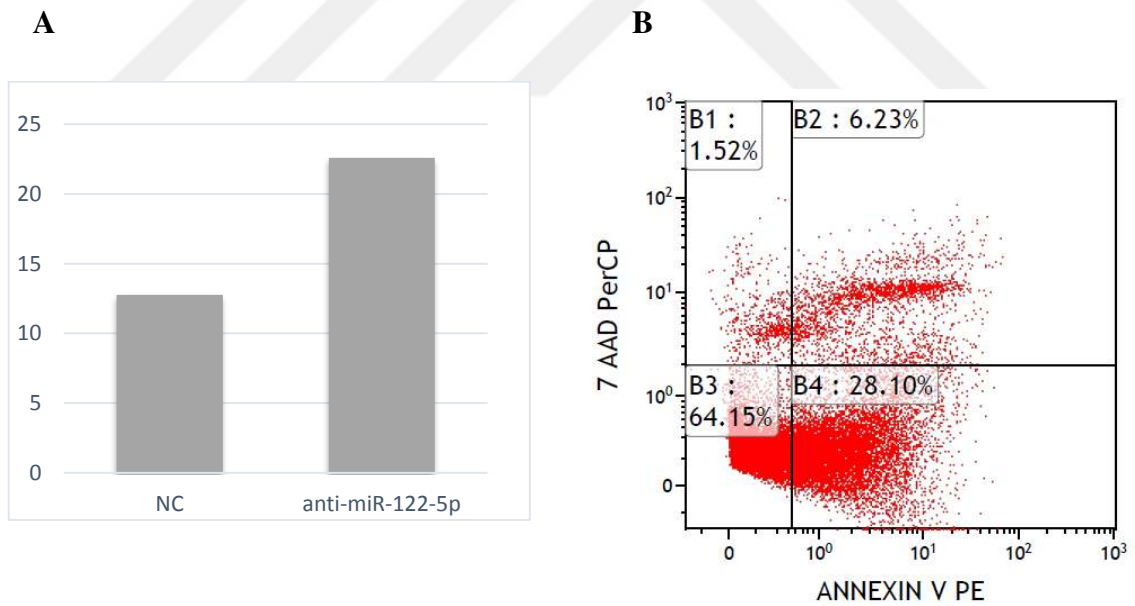
Şekil 4.18. HCT116 Hücre soyunda PTEN gen ifadesinin NC, *Anti-miR-122-5p*, *Anti-miR-490-3p*, *Anti-miR-34a-5p*, *Anti-miR-449c-5p*'nin katlı oran değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.

4.4. Akım (Flow) Sitometride Apoptozis Analiz Sonuçları

HCT116 kolon kanseri hücre soyuna Anti-miRNA'ların etkisi, hücre soyuna aktarılmasından 72 saat sonrasında kaldırıldı. Hücre apoptozisi Annexin V ve 7AAD içeren kit kullanılarak üretici firmanın(Becton Dickinson, Pharmingen, UK) tavsiyeleri doğrultusunda çalışıldı. Apoptotik hücrelerle nekrotik hücreleri ayırmak için, hücreler Annexin V (yeşil floresan) ve 7AAD(kırmızı floresan) ile aynı anda boyandı.Hücreler Navious Softwareprogramı ile çalışıldı ve kaluza (analysis) analiz programı ile değerlendirildi.

4.4.1. HCT116 Hücre Soyuna *Anti-miR-122-5p*AktarılmasıSonrası Apoptozis Analiz Sonuçları

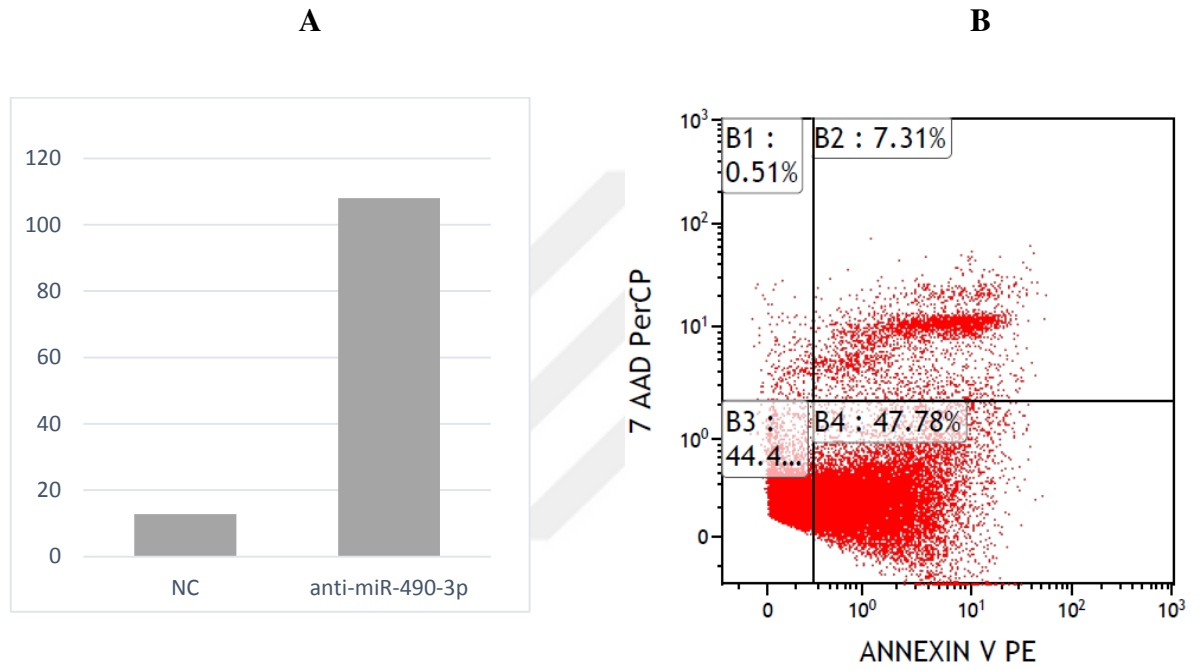
HCT116 hücre soyuna Anti-miR-122-5p'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları şekil 4.19.'da grafiksel olarak gösterilmiştir.Kaluza analizprogramına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir: apoptozise giden hücrelerin yüzdesi34,33 iken canlı hücrelerin yüzdesi 64,15 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.19. HCT116 hücre soyuna Anti-miR-122-5p'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. A). Apoptozise giden hücrelerin NC'e göre toplam yüzde grafiksel gösterimi. B). Kaluza analizprogramına göre boyanan hücrelerin yüzde grafiksel gösterim.

4.4.2. HCT116 Hücre Soyuna *Anti-miR-490-3p* Aktarılması Sonrası Apoptozis Analiz Sonuçları

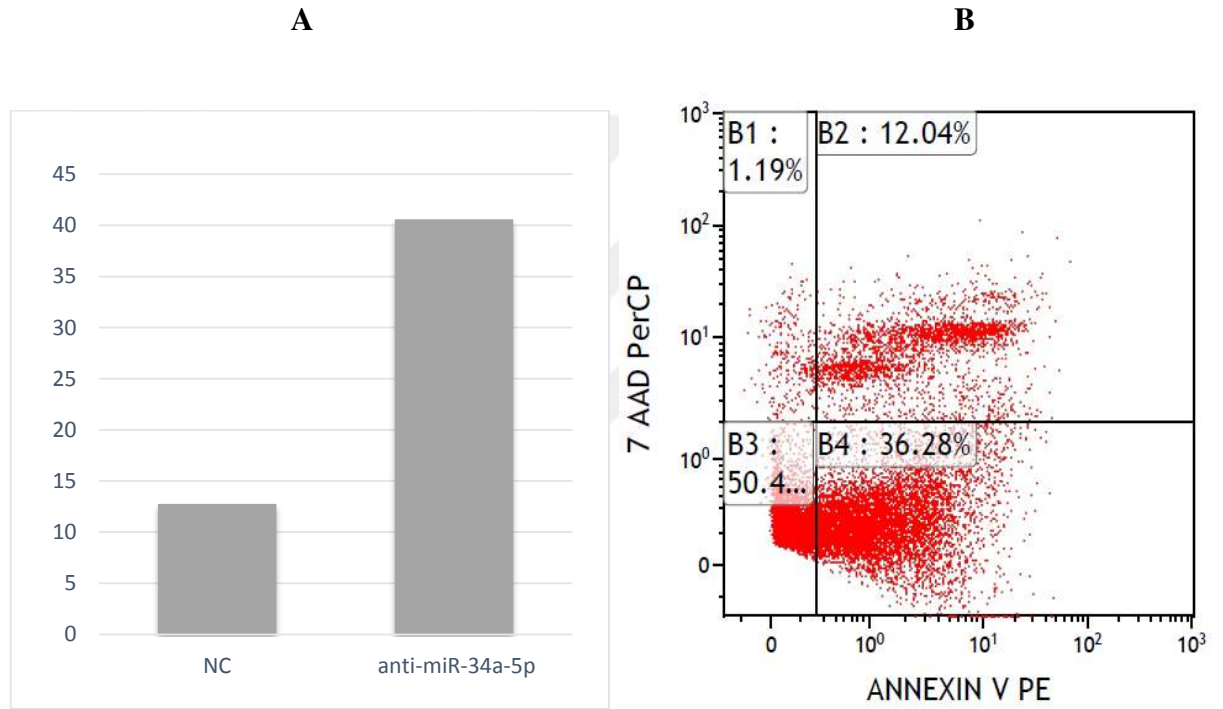
HCT116 hücre soyuna *Anti-miR-490-3p*'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları şekil 4.20.'de grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir: apoptozise giden hücrelerin yüzdesi 59,09 iken canlı hücrelerin yüzdesi 44,4 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20. HCT116 hücre soyuna *Anti-miR-490-3p*'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. A). Apoptozise giden hücrelerin NC'e göre toplam yüzde grafiksel gösterimi. B). Kaluza analizprogramına göre boyanan hücrelerin yüzde grafiksel gösterim.

4.4.3. HCT116 Hücre Soyuna *Anti-miR-34a-5p* Aktarılması Sonrası Apoptozis Analiz Sonuçları

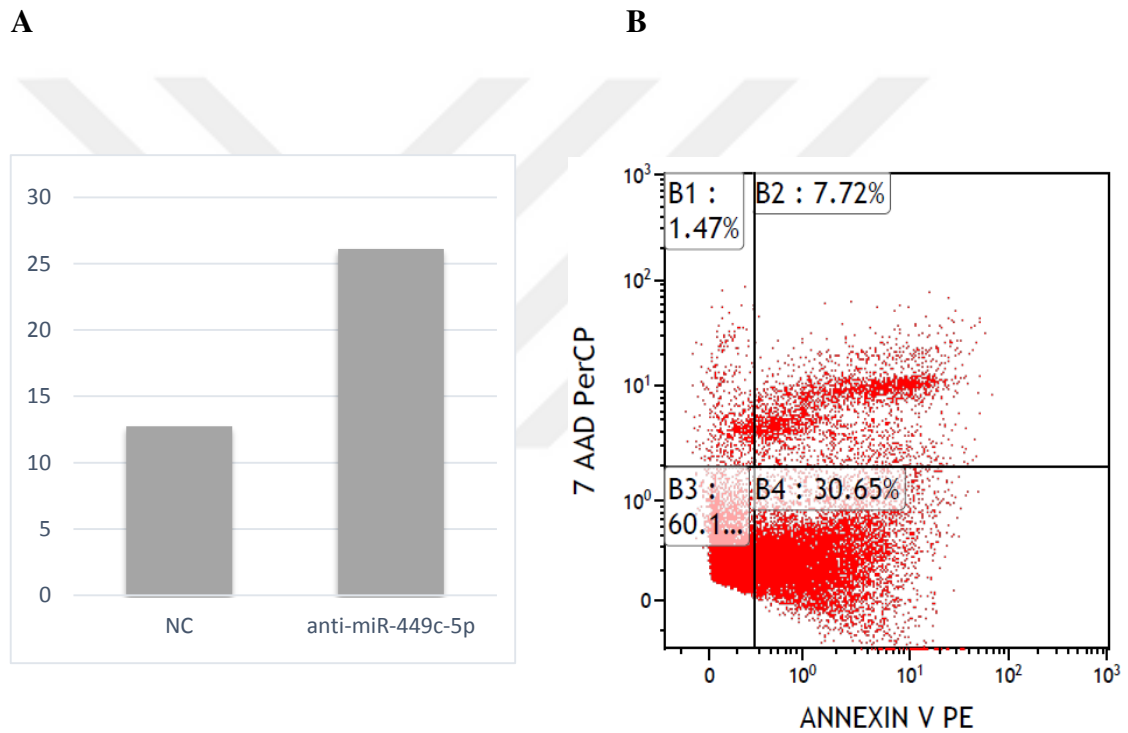
HCT116 hücre soyuna *Anti-miR-34a-5p*'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları şekil 4.21.'de grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir: apoptozise giden hücrelerin yüzdesi 48,32 iken canlı hücrelerin yüzdesi 50,4 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.21. HCT116 hücre soyuna *Anti-miR-34a-5p*'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. A). Apoptozise giden hücrelerin NC'e göre toplam yüzde grafiksel gösterimi. B). Kaluza analiz programına göre boyanan hücrelerin yüzde grafiksel gösterim.

4.4.4. HCT116 Hücre Soyuna *Anti-miR-449c-5p* Aktarılması Sonrası Apoptozis Analiz Sonuçları

HCT116 hücre soyuna *Anti-miR-449c-5p*'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları şekil 4.22.'de grafiksel olarak gösterilmiştir. Kaluza analiz programına göre elde edilen verilerin değişim oranları şöyledir: apoptozise giden hücrelerin yüzdesi 38,37 iken canlı hücrelerin yüzdesi 60,1 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.22. HCT116 hücre soyuna *Anti-miR-449c-5p*'nin aktarılması sonrası apoptozis analiz sonuçları grafiksel olarak gösterilmiştir. A). Apoptozise giden hücrelerin NC'e göre toplam yüzde grafiksel gösterimi. B). Kaluza analiz programına göre boyanan hücrelerin yüzde grafiksel gösterim.

5. TARTIŞMA

Kanser, dünya çapında görülen büyük bir sağlık sorunudur. Gerçekleşen her dört ölümden birisi kanserden kaynaklanmaktadır(25).Kolorektal kanserler (KRK), Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve diğer Batı'lı ülkelerde, kanserle ilişkili morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden biridir. ABD'de, hem erkeklerde (prostat ve akciğer kanserinden sonra) hem de kadınlarda (meme ve akciğer kanserinden sonra) yeni gelişen ve ölüme yol açan kanserler arasında 3. sırada yer almaktadır(26).

Genetik yatkınlığın yanısıra çevresel faktörlerinde etkisi ile doku veya organlarda genomik istikrarsızlık ve mutasyonun tespit edilmesi kanserin varlığına işaret olarak kendini gösterir. Kanserleşen hücrelerinin en büyük özelliklerinden biri çevresindeki hücrelerinde kanserleşmesi ve yayılması yönünden güdümlemesidir. Bu hücrelerin önceden tespit edilmesi için, kanserleşen hücrelerde meydana gelen değişimleri tespit etmek önem kazanmıştır (12).

İnsan genom projesinin başlaması ve tüm genomun dizilenmesinin ardından aslında proteine kodlayan kısmın sadece %2 olduğunun görülmesi, hastalıkların oluşması ve ilerlemesinde diğer moleküllerin yani %98 'lik kısmın daha büyük etkisi olduğu tespit edilmiş ve araştırmalar bu bölgelere daha çok yoğunlaştırılmıştır (51, 52).%98 'lik bu bilinmeyen ve "karanlık madde" olarak tanımlanan kodlamayan RNA'lar genomdan ayrı düşünülemeyen ve gizemli bir unsur olarak ortaya çıkmıştır. Bu protein kodlamayan bölgelerinin, kodlayan bölgelerden hem yapısal hemde işlevsel olarak farklarının anlaşılması çok zaman almış ve hala keşfedilmeyi beklemektedir. Yapılan çalışmalar ile kodlanmayan RNA'ların işlev ve özellikleri hakkındaki bilgiler her geçen gün artmakta ve çeşitli hastalıklarla ilişkileri tanımlanmaktadır(53).

Kodlamayan RNA'ların işlevleri yazılım sırası, yazılım sonrası gen ifadesinin susturulması ve kromozomların yeniden düzenlenmesinde aslında genetik ve epigenetik düzenlemeler olarak iki başlıkta toplamak mümkündür(53).Kodlanmayan RNA'ları nükleotid sayılarına göre gruplandırmak gerekirse; kısa kodlamayan ve uzun kodlamayan RNA'lar olarak gruplandırılmaktadır (51, 54).Tanımlanan miRNA'lar (kısa kodlamayan) çeşitli kanser türlerinde, kalp-damar hastalıklarında, nörolojik ve metabolik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

Hücrelerde düzensiz ifade seviyeleri sonucunda, hücre farklılaşması, çoğalması, göçü ve damarlaşmayı tetiklemektedir (72).Birçok gen ve proteinin düzenlenmesi süreci ve işlevlerinin aydınlatılması araştırmalarının sayısı giderek artmaktadır. siRNA ve miRNA'nın hücresel işlevleri üzerine birçok çalışma bulunmasına rağmen lncRNA'lar "karanlık madde" olarak kalmıştır (80).

Son yapılan çalışmalar ile lncRNA'ların varlığının kanıtları artmış ve hücresel işlevlerin düzenlenmesi yönünde anahtar rol oynadığı bulunmuştur (81). LncRNA'lar büyük ölçüde biyoinformatik olarak belirlenmiş olup, herhangi belirgin protein kodlama potansiyeli içermeyen, uzunluğu 200 nükleotidden büyük RNA molekülü olarak tanımlanmaktadır(81). Gen ifadesinin düzenlenmesi, dozaj ayarlama, genomik susturma, çekirdek organizasyonu ve çekirdek por karmaşamı üzerinden çekirdek sitoplazma geçiş trafiğinin düzenlenmesi gibi birçok hücresel işlevde görev aldığı son yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir (80,82).

LncRNA'ların işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte, artan lncRNA sayısı ve birçok biyolojik süreçteki etkisi, normal ve kötü huylu dokudaki ifade seviyesindeki farklılıktan dolayı hücrede önemli fonksiyonlara sahip olduklarını göstermektedir(81). LncRNA'ların fonksiyonları analiz edildiğinde hücrede genetik bilginin işlenmesi sırasında, her adımda çok yönlü düzenleyici işlev gösterdiği tespit edilmiştir. LncRNA'lar hücrenin kanserleşmesinde; kontrolsüz çoğalmasını, farklılaşmasını ve çeşitli dokulara yayılmasını tetikleyen önemli hücresel olayların gerçekleşmesini sağlamaktadır. LncRNA'ların artan sayısı ve işlevlerinin anlaşılmasıyla birlikte, çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinde bio-belirteç olarak kullanmak için güçlü bir aday olmuştur (83,97).PINK1 geni ile yapılan son çalışmalar, nörodejenerasyon ve kanser ile ilişkili olduğu yönünde raporlanmıştır. Hücre döngüsünde bölünme tetikleyici şekilde düzenleyici rolü olduğu ve kanserle ilişkili fenotipte rol aldığı bulunmuştur(18).PINK1 geninin susturulması hücrelerde bölünmesi, koloni oluşumu, hücre göçü ve istilasını azaltıcı olduğu bulunmuştur (98). Kanser hücrelerindeki PINK1 geninin susturulması yeni dönem tedavi yaklaşımları arasında yer almaktadır (98). Çalışma raporlarına göre, PINK1 geni baskılayıcı ile diğer mitoz bölünme durdurucu hedefli ilaçlar birlikte kullanılması kanser tedavisi için umut olacağı yönündedir(99).Kanser, birçok moleküler hasar sonucu oluşmaktadır.Kanser üzerine yapılan çalışmalar derinleştikçe çeşitli yolların etkileri belirlenmektedir (17).

DNA yanlış eşleşme baz onarım mekanizmasının eksikliği sonucu oluşan kanser türünde PINK1 gen ifadesinin aşırı olduğu tespit edilmiştir. Bu kanser türünde PINK1 geninin susturulması yeni dönemde tespit edildiği gibi ölümcül olacaktır (17).

Bu çalışmadaki amacımız DNA yanlış eşleşme baz onarım mekanizması eksik olan kolon kanseri hücrelerinde PINK1 geninin ifadesinin susturulmasıdır. PINK1 geninin susturulması için gen ifadesini düzenleyen PINK1-AS lncRNA'sının ifadesini artırmayı amaçladık. Literatür taraması ve veri tabanları kullanılarak bu molekül ile ilişkili miRNA'lar tespit ettik. PINK1-AS lncRNA'sının ifadesini arttırmak için ilişkili miRNA'ların inhibitörlerini kullandık.

Gen ifadesinin kodlanmayan RNA aktarımı ile düzenlemesine yönelik yapılan çalışmalara göre, ilişkilendirilmiş miRNA ve lncRNA etkileşimi farklı kanser türünde aşırı ifade olan mRNA üzerindeki etkisi gösterilmiştir (100,101).Yapılan çalışmalarda PINK1 gen ifadesinin hücrenin kanserleşme sürecinde etkili olduğu tespit edilmiştir(18,101).Çalışmamızdakolon kanserinde PINK1 gen ifadesini susturmak için, mRNA inhibitörlerinin aktarımı yapılarak kısmi miktarlara dayalı PCR yöntemi ile PINK1, PINK1-ASve GAPDH genlerinin ifade seviyelerine bakılmıştır. Analizi yapılan veriler değerlendirildiğinde, kontrol geninin ifade sonucuna göre PINK1 ve PINK1-AS genlerinin ifadesinin beklediğimiz aksine anlamlı bir artış tespit edilmemiştir ($p>0.05$)(102). PINK1 geninin hücrede ifadesinin azalmasıyla programlı ölümün tetiklendiği belirlenmiştir (18,103). Yapmış olduğumuz anti-miR-122-5p,anti-miR-490-3p, anti-miR-34a-5p ve anti-miR-449c-5p aktarımı sonrasında apoptozis deneyiniyüzdelik analiz sonuçlarına göre ölü hücre ve canlı hücre oranları arasında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle beraber alternatif moleküler teknikler kullanılarak benzer deney modellerinin tekrar edilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.Anti-miRNA aktarımının uygun vektörlere klonlama yapılarak hücreye aktarılıp, bu anti-miRNA'ların ifade seviyeleri kontrol edilerek normale göre değişim miktarları doğrulandıktan sonra mRNA seviyesindeki değişimlere bakılabilir. Ayrıca, elde edilen mRNA seviyelerindeki değişimlerin protein ifadesine ne kadar yansıdığının tespiti için Western Blot veya immünohistokimya gibi proteine dayalı analizler yapılarak sonuçlar doğrulanabilir. Hücre döngüsü deneyi yapılarak apoptozis sonuçları ile kıyaslanarak yorumlanabilir. Benzer yöntemler ile ilişkili anti-miRNA'ların mimikleri kullanılarak tüm veriler ortak yorumlanabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Chen H, Xu J, Hong J, Tang R, Zhang X, Fang J-Y. Long noncoding RNA profiles identify five distinct molecular subtypes of colorectal cancer with clinical relevance. *Molecular oncology*. 2014;8:1393-1403.
2. Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG. Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clinical colorectal cancer*. 2016.
3. Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:188-200.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in Globocan 2012. *International journal of cancer*. 2015;136:E359-E386.
5. YIU AJ, YIU CY. Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer research*. 2016;36:1093-1102.
6. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell*. 2011;43:904-914.
7. Kala R, Peek GW, Hardy TM, Tollefsbol TO. MicroRNAs: an emerging science in cancer epigenetics. *Journal of clinical bioinformatics*. 2013;3:1.
8. Sana J, Faltejskova P, Svoboda M, Slaby O. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J Transl Med*. 2012;10:103.
9. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11:597-610.

10. Kornienko AE, Guenzl PM, Barlow DP, Pauler FM. Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. *BMC biology*. 2013;11:1.
11. Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, Calin GA. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research&quest. *Oncogene*. 2012;31:4577-4587.
12. Yang G, Lu X, Yuan L. LncRNA: a link between RNA and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2014;1839:1097-1109.
13. Cheetham S, Gruhl F, Mattick J, Dinger M. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *British journal of cancer*. 2013;108:2419-2425.
14. Johnsson P, Lipovich L, Grandér D, Morris KV. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2014;1840:1063-1071.
15. Pilyugin M, Irminger-Finger I. Long non-coding RNA and microRNAs might act in regulating the expression of BARD1 mRNAs. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;54:356-367.
16. Yoon J-H, Abdelmohsen K, Gorospe M: Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs. in *Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier; 2014. pp. 9-14.
17. Martin SA, Hewish M, Sims D, Lord CJ, Ashworth A. Parallel high-throughput RNA interference screens identify PINK1 as a potential therapeutic target for the treatment of DNA mismatch repair-deficient cancers. *Cancer research*. 2011;71:1836-1848.
18. O'Flanagan CH, O'Neill C. PINK1 signalling in cancer biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2014;1846:590-598.
19. Gökmen GF. Kolon Anatomisi. *Sistemik Anatomi*. 2008,.

20. (http://www.basurum.com/Kolon_Anatomi)
21. Menteş bb. kolon fizyolojisi.
22. Güngör ig, özçelik oda. deneysel kolon anastomozunda siyanoakrilat kullanımının anastomoz sağlamlığı üzerine etkisi (deneysel çalışma).
23. Carlos J, C. Jose, and R. Kelley,. Sindirim Sistemi, Temel Histoloji. . 1999.
24. www.herbalistbozkurtbey.com
25. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics for hispanics/latinos, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2012;62:283-298.
26. Emir S, Sözen S, Kanat BH, Özkan Z, Yazar FM, Kavlakoğlu B, Bozan MB, Erol F. Mekanik Bağırsak Tıkanıklığına Neden Olan Kolorektal Kanselerde Morbidite ve Mortaliteye Etki Eden Faktörler. International Journal of Basic&Clinical Medicine. 2014;2.
27. Baykan A, Zorluoğlu A, Geçim E, Terzi C: Kolon ve Rektum Kanseri. İstanbul: Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği; 2010.
28. Gönen Ö. Kolorektal Kanseri Epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri Journal of Surgery. 2004;9:11-14.
29. Pampaloni B, Mavilia C, Bartolini E, Tonelli F, D'Asta F, Brandi M: Phytoestrogens and Colon Cancer, Intech Open Access Publisher; 2013.
30. Yo-patogenezi E. Kolorektal Kanseri Taramasında Yeni Yöntemler.
31. Nussbaum RL, McInnes, R.R., Willard, H.F., Boerkoel, C.F., . Tıbbi Genetik. 2005.
32. Alberts Bte. Molecular Biology of The Cell.2002.

33. Centelles JJ. General aspects of colorectal cancer. *ISRN oncology*. 2012;2012.
34. Nordling C. A new theory on the cancer-inducing mechanism. *British journal of cancer*. 1953;7:68.
35. Hermsen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciutto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology*. 2002;123:1109-1119.
36. http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr
37. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2001;1:55-67.
38. Watson A. Apoptosis and colorectal cancer. *Gut*. 2004;53:1701-1709.
39. Rosen A, Casciola-Rosen L. Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Apoptosis and Autoimmunity*. 2003:243-260.
40. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26:239.
41. Searle J, Kerr J, Bishop C. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathology annual*. 1982;17:229.
42. Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi*. 2008;6.
43. Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, Gores GJ. Apoptosis and necrosis in the liver. *Comprehensive Physiology*. 2013.
44. Aksit H, Bildik A. Apoptosis. *Yüzüncü yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008;19:55-63.

45. Enstitüsü sb, dali iha. nöroblastomalarda pi3-k sağkalim sinyal iletimini.
46. Kiraz Y, Adan A, Yandim MK, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*. 2016;1-16.
47. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35:495-516.
48. Cummings BS, Wills LP, Schnellmann RG. Measurement of cell death in Mammalian cells. *Current Protocols in Pharmacology*. 2012;12.18. 11-12.18. 24.
49. Dillon CP, Tummers B, Baran K, Green DR. Developmental checkpoints guarded by regulated necrosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;1-12.
50. Ulukaya E. Apoptozis ders notları. Erişim:[<http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf>] Erişim tarihi. 2003;4:2007.
51. Shi T, Gao G, Cao Y. Long Noncoding RNAs as Novel Biomarkers Have a Promising Future in Cancer Diagnostics. *Disease Markers*. 2016;2016.
52. Akkaya ZY, DİNÇER P. Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. *Marmara Medical Journal*. 2013;26.
53. Jalali S, Bhartiya D, Lalwani MK, Sivasubbu S, Scaria V. Systematic transcriptome wide analysis of lncRNA-miRNA interactions. *PloS one*. 2013;8:e53823.
54. Xie X, Tang B, Xiao Y-F, Xie R, Li B-S, Dong H, Zhou J-Y, Yang S-M. Long non-coding RNAs in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2015.
55. Tokarz P, Blasiak J. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment. *Acta Biochim Pol*. 2012;59:467-474.
56. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in cell biology*. 2007;17:118-126.

57. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215-233.
58. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13:271-282.
59. Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen H. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroenterol*. 2013;19:2985-2996.
60. Yao X-L, Lu X-L, Yan C-Y, Wan Q-L, Cheng G-C, Li Y-M. Circulating miR-122-5p as a potential novel biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8:16014.
61. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Current opinion in pharmacology*. 2010;10:543-550.
62. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*. 2009;11:228-234.
63. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*. 2002;21:4663-4670.
64. Yang J-S, Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular cell*. 2011;43:892-903.
65. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC genomics*. 2007;8:1.
66. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic acids research*. 2005;33:1290-1297.

67. Vinci S, Gelmini S, Mancini I, Malentacchi F, Pazzagli M, Beltrami C, Pinzani P, Orlando C. Genetic and epigenetic factors in regulation of microRNA in colorectal cancers. *Methods*. 2013;59:138-146.
68. Guil S, Esteller M. RNA–RNA interactions in gene regulation: the coding and noncoding players. *Trends in biochemical sciences*. 2015;40:248-256.
69. Xu X, Chen R, Li Z, Huang N, Wu X, Li S, Li Y, Wu S. MicroRNA-490-3p inhibits colorectal cancer metastasis by targeting TGF β R1. *BMC cancer*. 2015;15:1.
70. Gao J, Li N, Dong Y, Li S, Xu L, Li X, Li Y, Li Z, Ng S, Sung J. miR-34a-5p suppresses colorectal cancer metastasis and predicts recurrence in patients with stage II/III colorectal cancer. *Oncogene*. 2015;34:4142-4152.
71. Wu Z, Wang H, Fang S, Xu C. MiR-449c inhibits gastric carcinoma growth. *Life sciences*. 2015;137:14-19.
72. Sekar TV, Mohanram RK, Foygel K, Paulmurugan R. Therapeutic evaluation of microRNAs by molecular imaging. *Theranostics*. 2013;3:964-985.
73. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer science*. 2010;101:2087-2092.
74. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6:857-866.
75. Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *European Journal of Cancer*. 2007;43:1529-1544.
76. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006;130:2113-2129.

77. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. Annual review of pathology. 2009;4:127.
78. Grünwald D, Singer RH, Rout M. Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes. Nature. 2011;475:333-341.
79. Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. Nature reviews Molecular cell biology. 2013;14:153-165.
80. Zhang K, Shi Z-M, Chang Y-N, Hu Z-M, Qi H-X, Hong W. The ways of action of long non-coding RNAs in cytoplasm and nucleus. Gene. 2014;547:1-9.
81. Bergmann JH, Spector DL. Long non-coding RNAs: modulators of nuclear structure and function. Current opinion in cell biology. 2014;26:10-18.
82. Fang Y, Fullwood MJ. Roles, Functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in cancer. Genomics, proteomics & bioinformatics. 2016;14:42-54.
83. Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. Cancer Cell. 2016;29:452-463.
84. Ramsköld D, Wang ET, Burge CB, Sandberg R. An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. PLoS Comput Biol. 2009;5:e1000598.
85. Haemmerle M, Gutschner T. Long non-coding RNAs in cancer and development: where do we go from here? International journal of molecular sciences. 2015;16:1395-1405.
86. Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. Annual review of biochemistry. 2012;81.

87. Luo M, Li Z, Wang W, Zeng Y, Liu Z, Qiu J. Upregulated H19 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating ID2 expression. *FEBS Journal*. 2013;280:1709-1716.
88. Bhartiya D, Scaria V. Genomic variations in non-coding RNAs: Structure, function and regulation. *Genomics*. 2016.
89. Pirastu R, Comba P, Iavarone I, Zona A, Conti S, Minelli G, Manno V, Mincuzzi A, Minerba S, Forastiere F. Environment and health in contaminated sites: the case of Taranto, Italy. *Journal of environmental and public health*. 2013;2013.
90. Calore F, Lovat F, Garofalo M. Non-coding RNAs and cancer. *International journal of molecular sciences*. 2013;14:17085-17110.
91. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research*. 2012;22:1775-1789.
92. Han D, Wang M, Ma N, Xu Y, Jiang Y, Gao X. Long noncoding RNAs: novel players in colorectal cancer. *Cancer letters*. 2015;361:13-21.
93. He Y, Meng X-M, Huang C, Wu B-M, Zhang L, Lv X-W, Li J. Long noncoding RNAs: Novel insights into hepatocellular carcinoma. *Cancer letters*. 2014;344:20-27.
94. Wang J, Liu X, Wu H, Ni P, Gu Z, Qiao Y, Chen N, Sun F, Fan Q. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic acids research*. 2010;38:5366-5383.
95. Wang J, Song Y-X, Ma B, Wang J-J, Sun J-X, Chen X-W, Zhao J-H, Yang Y-C, Wang Z-N. Regulatory roles of non-coding RNAs in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16:19886-19919.

96. Dinger ME, Amaral PP, Mercer TR, Pang KC, Bruce SJ, Gardiner BB, Askarian-Amiri ME, Ru K, Soldà G, Simons C. Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *Genome research*. 2008;18:1433-1445.
97. Mattick JS, Rinn JL. Discovery and annotation of long noncoding RNAs. *Nature structural & molecular biology*. 2015;22.
98. O’Flanagan CH, Morais VA, O’Neill C. PINK1, cancer and neurodegeneration.
99. MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nature cell biology*. 2005;7:591-600.
100. Zhou Y, Xu X, Lv H, Wen Q, Li J, Tan L, Li J, Sheng X. The Long Noncoding RNA MALAT-1 Is Highly Expressed in Ovarian Cancer and Induces Cell Growth and Migration. *PloS one*. 2016;11:e0155250.
101. Ge Y, Yan X, Jin Y, Yang X, Yu X, Zhou L, Han S, Yuan Q, Yang M. fMiRNA-192 and miRNA-204 Directly Suppress lncRNA HOTTIP and Interrupt GLS1-Mediated Glutaminolysis in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005726.
102. Ciara H. O’Flanagan VAM, Cora O’Neill. PINK1, cancer and neurodegeneration. *Oncoscience*. 2016;Vol. 3.
103. Berthier A, Navarro S, Jiménez-Sáinz J, Roglá I, Ripoll F, Cervera J, Pulido R. PINK1 displays tissue-specific subcellular location and regulates apoptosis and cell growth in breast cancer cells. *Human pathology*. 2011;42:75-87.

7. ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Kahramanmaraş'ın Elbistan ilçesinde doğdu. İlk,orta ve lise öğretimini burada tamamladı. 2008 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitime başladı. 2012 yılında buradan mezun oldu. 2013 Güz döneminde Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitime başladı.

