



**KARBOPLATİN'İN BAŞ VE BOYUN KANSERİ
ÜZERİNDEKİ ANTI-KANSER ETKİSİNİN MİR-145 İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ahsen KILIÇ

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

**2021
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KARBOPLATİN'İN BAŞ VE BOYUN KANSERİ ÜZERİNDEKİ ANTI-KANSER
ETKİSİNİN MİR-145 İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ahsen KILIÇ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2021

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**KARBOPLATİN'İN BAŞ VE BOYUN KANSERİ ÜZERİNDEKİ ANTI-KANSER
ETKİSİNİN MİR-145 İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ danışmanlığında, Ahsen KILIÇ tarafından hazırlanan bu çalışma 14 / 01 / 2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile (3/3)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ *İmza* :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Onur ÇİZMECİOĞLU *İmza* :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Fatma Necmiye KACI *İmza* :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

* Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2019/12 nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

14 / 01 / 2021

İmzası

Ahsen KILIÇ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARBOPLATİN'İN BAŞ VE BOYUN KANSERİ ÜZERİNDEKİ ANTI-KANSER ETKİSİNİN MİR-145 İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahsen KILIÇ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC), baş ve boyun bölgesinde sık görülen kanser türlerinden biridir. Karboplatin, HNSCC dahil birçok kanserin tedavisinde kullanılır. Karboplatinin tümör hücrelerinin mikroRNA profilini değiştirdiği gösterilmiştir, ancak, karboplatin sitotoksik etkilerini gösterirken bu süreçte mikroRNA'ların katılımı hakkında sınırlı çalışma vardır. Bu çalışmada, karboplatin uygulaması sonrasında miR-145 ifade seviyeleri ve iyi karakterize edilmiş direkt hedeflerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, karboplatin ve miR-145'in HNSCC hücrelerinin proliferatif kapasitesi üzerindeki etkisi, Cell Viability Detection Kit-8 kullanılarak değerlendirildi. MiR-145 ve hedeflerinin ifade seviyeleri, karboplatin muamelesi ve p53 inhibisyonu üzerine kantitatif-gerçek zamanlı-PCR kullanılarak değerlendirildi. Western blot, karboplatin ve/veya pifitrin- α ile muamele edilen hücrelerde p53 ve p53'ün asetillenmiş versiyonlarının seviyelerini ölçmek için kullanıldı. Karboplatinin, HNSCC hücrelerinin canlılığını inhibe ettiği ve miR-145 ifade seviyesini doza bağımlı bir şekilde indüklediği gösterildi. MiR-145'in aşırı ifadesine benzer şekilde, karboplatin muamelesi miR-145 doğrudan hedeflerinin ifade seviyesini baskıladı. Ayrıca, miR-145'in transkripsiyonel aktivatörü olan ve karboplatin muamelesi sonucunda aktive olan p53'ün karboplatin ile muamele edilmiş hücrelerde pifitrin- α tarafından inhibisyonunun miR-145 direkt hedeflerin baskılanmasını tersine çevirdiği gösterildi. Sonuçlar, karboplatinin hücreleri öldürme mekanizmalarından birinin DNA hasarı ile aktifleşen p53'ün artan ifadesine paralel olarak miR-145 ve hedeflerinin deregülasyonu olabileceğini göstermektedir. Bildiğimiz kadarıyla bu bulgular, kanser hücrelerinde karboplatin ve miR-145 arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk bulgulardır.

2021, 63 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Baş ve boyun kanseri, Karboplatin, p53, miR-145, mikroRNA

ABSTRACT

MS. Thesis

INVESTIGATION OF THE ANTI-CANCER EFFECTS OF CARBOPLATIN ON HEAD AND NECK CANCER CELLS IN ASSOCIATION WITH MIR-145

Ahsen KILIÇ

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Omer Faruk KARATAS

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is one of common cancer types in the head and neck region. Carboplatin is used against several cancers including HNSCC. Carboplatin has been shown to change microRNA profile of tumor cells, however, there is limited study about the involvement of microRNAs while carboplatin exerts its cytotoxic effects. In this study, we aimed at investigating the expressions of miR-145 and its well-characterized direct-targets upon carboplatin treatment. The effects of carboplatin and miR-145 on the proliferative capacity of HNSCC cells were evaluated using Cell Viability Detection Kit-8. Expressions of miR-145 and its targets were evaluated using quantitative-real-time-PCR upon carboplatin treatment and p53 inhibition. Western blot was used to measure the levels of p53 and its acetylated versions in cells treated with carboplatin and/or pifithrin- α . We demonstrated that carboplatin inhibited the viability of HNSCC cells and induced the expression of miR-145 in a dose dependent manner. Similar to miR-145 overexpression, carboplatin treatment suppressed the expressions of miR-145 direct-targets. Besides, we showed that carboplatin activated p53, which is a transcriptional activator of miR-145, and inhibition of p53 by pifithrin- α in carboplatin-treated cells reversed the suppression of miR-145 direct-targets. Our results show that one of the mechanisms of carboplatin to kill cells might be induction of miR-145 and deregulation of its targets in parallel, via p53 activation, which happens through carboplatin's DNA damaging property. To the best of our knowledge, these findings are the first to reveal the relationship between carboplatin and miR-145 in cancer cells.

2021, 63 Page

Key Words: Head and neck cancer, carboplatin, p53, miR-145, microRNA

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimin tamamlanması ile ilgili çalışmalarında bilgi, deneyim ve tecrübelerinin yanı sıra manevi olarak da desteğini her zaman hissettiğim her türlü anlayış, ilgi ve sabrı gösteren kendisiyle çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum kıymetli danışman hocam Sn. Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ'a

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca hoşgörü ve sabırla her konuda bana destek olan, bilimsel ve deneysel anlamda yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Nesliőah BARLAK, Fatma EREN ŐANLI, Özel ÇAPIK ve Abdülmelik AYTATLI'ya

Bu zorlu süreçte bana destek olarak yalnız bırakmayan eşim Hakan KILIÇ'a ve bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, desteklerini ve sevgilerini benden esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ahsen KILIÇ
Ocak 2021

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Kansere Sebep Olan Bazı Çevresel Faktörler.....	2
1.3. Baş ve Boyun Kanseri.....	4
1.3.1. Larenks Anatomisi ve Larenks Kanseri.....	6
1.3.2. Hipofarenks Anatomisi ve Hipofarenks Kanseri.....	8
1.4 MikroRNA'lar.....	9
1.4.1. MikroRNA Biyosentezi.....	10
1.4.2. MikroRNA'lar ve Kanser.....	11
1.4.3. MiR-145.....	13
1.5. Karboplatin.....	13
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM	18
3.1. Cihazlar.....	18
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Hücre Hatlarının Temini ve Kültüre Edilmesi.....	21
3.2.2. Hücre Sayımı.....	21
3.2.3. Hücrelerin 6 Kuyucuklu ve 96 Kuyucuklu Platelere Ekilmesi.....	22
3.2.4. Karboplatinin Stok Çözeltilisinin Hazırlanışı.....	22
3.2.5. Pifithrin- α Stok Çözeltilisinin Hazırlanışı.....	22
3.2.6. MikroRNA Transfeksiyonu.....	22
3.2.7. Karboplatinin Hep-2 ve FaDu Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	23

3.2.8. Karboplatinin Mir-145 İle Birlikte Hep-2 ve FaDu Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	23
3.2.9. Hücrelerden TRIzol İle RNA İzolasyonu	24
3.2.10. cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	25
3.2.11. MikroRNA'lar İçin cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	26
3.2.12. Hep-2 ve FaDu Hücrelerinden Protein İzolasyonu	26
3.2.13. SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi	26
3.2.14. Western Blot.....	28
3.2.15. İstatistiksel Analiz.....	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	29
4.1. Karboplatinin Hep-2 ve FaDu Hücreleri Üzerindeki Proliferatif Etkisinin Değerlendirilmesi.....	29
4.2. Karboplatinin Mir-145 İfade Seviyesi Üzerindeki Etkisi.....	29
4.3. Karboplatinin MiR-145 Hedef Genlerinin İfade Seviyesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	30
4.4. Karboplatinin P53 Aktivasyonu İle MiR-145 İfade Seviyesini İndükler.....	33
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR	40
EKLER.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler **Acıklama**

°	Derece
%	Yüzde
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
nm	Nanometre
V	Volt
<	Küçük
α	Alfa

Kisaltmalar

HNSCC	Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
EBV	Epstein-Barr Virüsü
LKa	Larenks Kanseri
BT	Bilgisayarlı Tomografi
PET	Pozitron Emisyon Tomografi
RNA	Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
TSmiR	Tümör Süpresör MikroRNA
FBS	Fetal Bovine Serum
PBS	Phosphate Buffered Saline

CVDK-8

Cell Viability Detection Kit-8

qRT-PCR

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Kansere Sebep Olan Etmenler	2
Şekil 1.2 Alkol ve Sigara Tüketiminin Kansere İlişkisi.....	3
Şekil 1.3 HNSCC’de Tümör Bölgelerine Göre Genel Sağ Kalım	5
Şekil 1.4 Baş ve Boynun Farklı Bölgelerindeki Olası Kansere Bölgelerini Gösteren Çizim	6
Şekil 1.5 1992’den Günümüze Larenks Kanseri Yeni Vaka ve Ölüm Oranları	7
Şekil 1.6 miRNA’ların Düzenli ve Düzensiz Olmayan Yollarla Biyosentezi	10
Şekil 1.7 Onkogen ve Tümör Söpresör miRNA’ların Karsinogenez Süreçlerindeki Fonksiyonları	12
Şekil 1.8 Karboplatin ve Cisplatinin Kimyasal Yapıları	14
Şekil 1.9 Karboplatin’in DNA’da Oluşturduğu Çapraz Bağlantılar	14
Şekil 4.1 Karboplatin Uygulamasının Hep-2 ve FaDu Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri.....	29
Şekil 4.2 Karboplatin Uygulamasının miR-145 İfade Seviyesi Üzerindeki Etkileri ..	30
Şekil 4.3 Karboplatin Uygulaması ve miR-145 Transfeksiyonu Sonrasında Hücrelerdeki miR-145 İfade Düzeyi	31
Şekil 4.4 Karboplatin Uygulaması ve Eksojen miR-145 İfadesinin Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkisi.....	32
Şekil 4.5 Karboplatin Uygulaması ve Eksojen miR-145 İfadesinin miR-145 Hedef Genlerinin İfade Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	33
Şekil 4.6 Karboplatin Uygulaması ve Eksojen miR-145 İfadesi Sonrasında Hücrelerdeki P53 İfade Düzeyi.....	34
Şekil 4.7 Karboplatin ve/veya Pifithrin- α Uygulaması Sonrasında Hücrelerdeki P53 İfade Düzeyi	35
Şekil 4.8 Karboplatin ve/veya Pifithrin- α Uygulaması Sonrasında Hücrelerdeki miR-145 İfade Düzeyi	35
Şekil 4.9 Karboplatin ve/veya Pifithrin- α Uygulaması Sonrasında Hücrelerdeki miR-145 Hedef Genlerinin İfade Düzeyleri Üzerindeki Etkileri	36
Şekil 4.10 HNSCC’de P53/miR-145 Aktivasyonu İle Karboplatinin Mekanizmasının Şematik Gösterimi.....	36

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	18
Tablo 3.2 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler, Kitler ve Kimyasal Malzemeler.....	19
Tablo 3.3 Primer Listesi ve Dizileri	25
Tablo 3.4 SDS-PAGE İçin Yürütme Jelinin Hazırlanışı.....	27
Tablo 3.5 SDS-PAGE İçin Ayırma Jelinin Hazırlanışı.....	27



1. GİRİŞ

1.1 Kanser

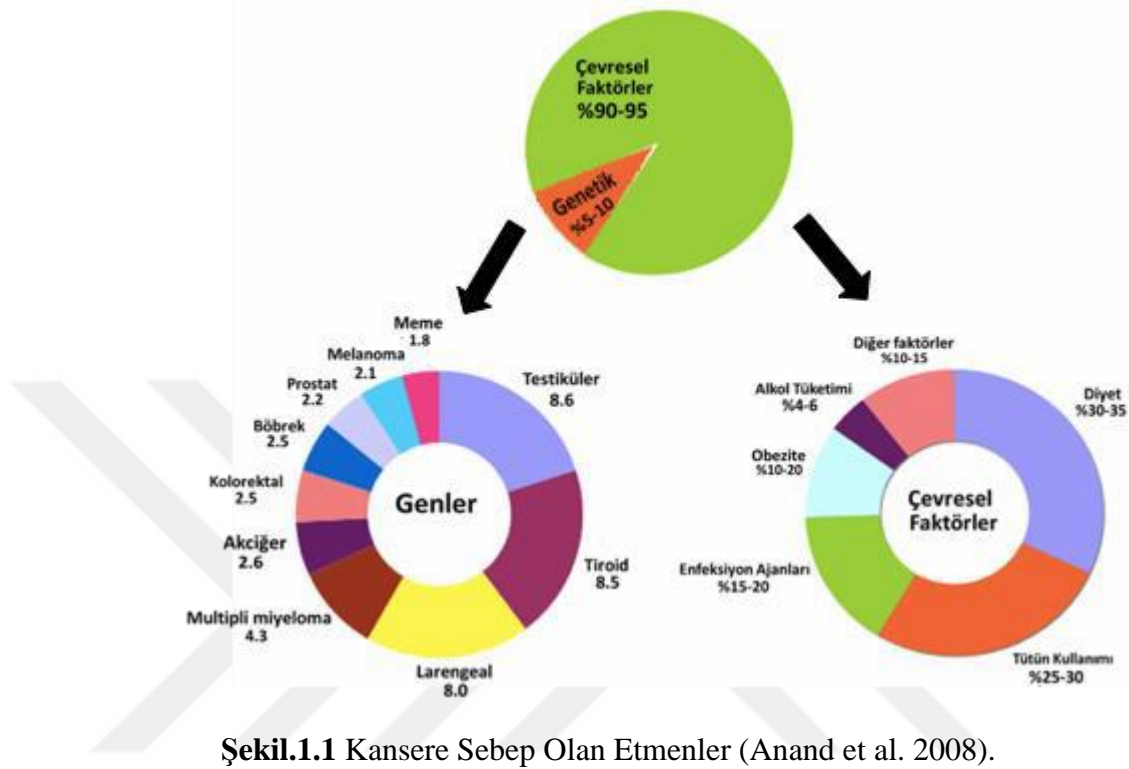
Kanser, hücrelerin kontrolsüz ve anormal bir şekilde çoğalmasıyla normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüştüğü vücudun hemen hemen her dokusunda veya organında meydana gelebilen, çok aşamalı süreçte ortaya çıkan bir hastalıktır (Anonim 2021). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı kanseri, bir organ veya dokudaki hücrelerin kontrolsüz olarak bölünüp çoğalmasıyla ortaya çıkan kötü urlar olarak tanımlanmaktadır (Barlak 2018).

Kanser dünya çapında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci en yaygın görülen hastalıktır. Her altı ölümden birisi kanser nedeniyle meydana gelmekle birlikte 2018 yılında kanser ilişkili tahmini ölüm sayısı 9.6 milyondur (Anonim 2018). Günümüze kadar tanılanan 200'den fazla kanser türü ve 100'den fazla kanser çeşidi vardır. Kanser türleri genellikle kanserin köken aldığı doku ve organa göre adlandırılır. Ayrıca kanser türleri epitel hücre veya skuamöz hücre gibi kendisini oluşturan hücre tipi ile de tarif edilebilir (Yıldız 2014).

Kanser hem hücrelerin bölünmelerini ve işleyiş şeklini kontrol eden genlerdeki değişikliklerden hem de çevresel faktörlerden kaynaklanan kompleks bir hastalıktır. Kanser oluşumuna ve gelişimine katkıda bulunan genetik faktörler proto-onkogenler, tümör süpresör genler ve DNA tamir genleri olmak üzere üç ana gen tipini içermektedir. Proto-onkogenler normal hücre büyümesi ve bölünmesinde temel olarak rol alan genlerdir. Bu genlerde herhangi bir mutasyon aracılığıyla değişiklik meydana geldiğinde normalden daha aktif olarak hücrelerin kontrolsüz büyümelerine, bölünmelerine ve hayatta kalmalarına izin vererek kanser gelişimine katkıda bulunan genler olarak rol oynayabilirler. Hücre büyümesini ve bölünmesini kontrol eden diğer bir gen grubu tümör süpresör genlerdir. Tümör süpresör genlerde meydana gelen değişiklikler de hücrelerin kontrolsüz bölünmelerine yol açabilir. DNA tamir genlerinde mutasyon bulunan hücreler diğer genlerde de mutasyon geliştirme eğilimindedirler. Tüm bu mutasyonların birikmesi de hücrelerde kanser gelişimine neden olabilmektedir (Anonim 2015). Tüm kanserlerin sadece %5-10'unun kalıtsal bir gen kusurundan kaynaklanması, kanser oluşumunda

1. GİRİŞ

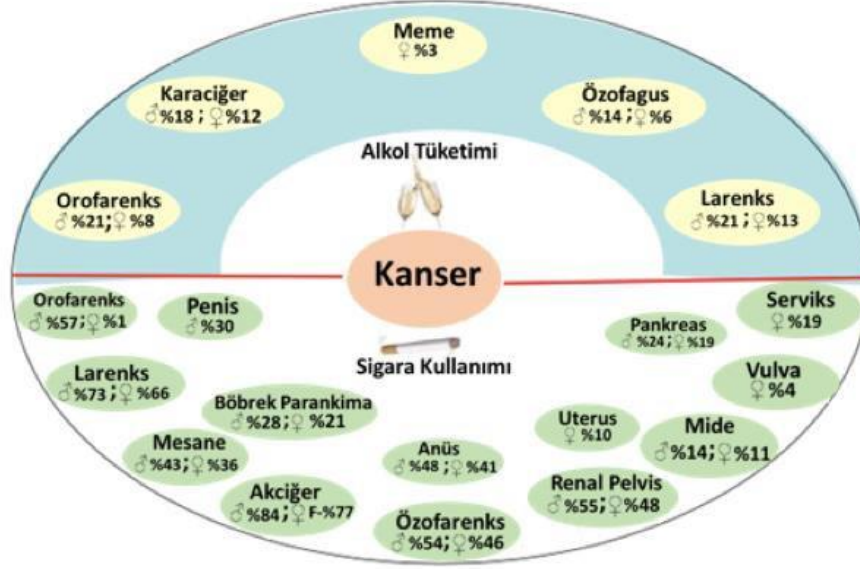
çevresel faktörlerin önemini göstermektedir. Kanser oluşumunu ve ölüm oranını etkileyen önemli çevresel faktörler arasında tütün, alkol, diyet, yaş, obezite, enfeksiyon ajanları, çevresel kirlenmeler ve radyasyon bulunur (Şekil.1.1) (Anand et al. 2008).



1.2 Kansere Sebep Olan Bazı Çevresel Faktörler

Tütün Kullanımı: Tütün kullanımı, en az 14 kanser türünün gelişme riskini arttırmaktadır. Buna ek olarak, tütün kullanımı tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %25-30'unu ve akciğer kanserinden ölümlerin %87'sini oluşturmaktadır. Tütün dumanında 70'ten fazla kanserojen olduğu belirlenmiştir (Anand et al. 2008).

Alkol: Kronik alkol kullanımının ağız boşluğu kanserleri, farenks, hipofarenks, gırtlak ve özofagus, karaciğer, pankreas ve meme kanserleri dahil olmak üzere, birçok kanser için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Anand et al. 2008). Alkolün kanser oluşumuna nasıl katkıda bulunduğu tam olarak anlaşılamamıştır; ancak etanolün bir ko-karsinojen olduğu düşünülmektedir. Ek olarak alkolün NF- κ B proinflatuar yolunu aktive ederek tümör oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Alkol ve sigara tüketiminin kanser ile ilişkisi (Anand et al. 2008).

Diyet: Diyetin kansere nasıl katkıda bulunduğu tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak nitratlar, nitrozaminler, pestisitler ve dioksinler gibi kanserojenlerin çoğunun yiyecek veya yemek pişirme ürünlerinden geldiği düşünülmektedir. Bazı gıda kanserojenlerinin inflamatuvar yolları aktive ettiği gösterilmiştir (Anand et al. 2008).

Obezite: İnsülin benzeri büyüme faktörü, insülin, leptin, cinsiyet hormonları, şişmanlık, insülin direnci ve inflamasyon gibi nörokimyasalları içeren obezite ile kanser arasında yaygın ilişki olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Anand et al. 2008).

Enfeksiyon Ajanları: Dünya çapında neoplazmaların yaklaşık %17,8'i enfeksiyonlarla ilişkilidir. Enfeksiyonla ilişkili inflamasyon, kanser için ana risk faktörüdür ve kansere bağlı neredeyse tüm virüslerin inflamatuvar belirteç olan NF- κ B'yi aktive ettiği gösterilmiştir. (Anand et al. 2008).

Çevre Kirliliği: Birçok hava kirleticisi kanser riskini, özellikle de akciğer kanseri riskini arttırmaktadır. Uçucu organik bileşikler ve böcek ilaçları gibi kirleticiler, çocukluk çağı lösemi ve lenfoma riskini artırır (Anand et al. 2008).

Radyasyon: Radyasyonun yol açtığı kanserler arasında lösemi, lenfoma, tiroit kanserleri, cilt kanserleri, sarkomlar, akciğer ve meme karsinomları bulunur (Anand et al. 2008).

1. GİRİŞ

Doğru kanser tanısı etkili tedavi yaklaşımının belirlenmesi için oldukça önemlidir. Kanser tedavi sürecinde mortaliteyi azaltmak ve hastaların sağ kalım oranlarını artırmak için farklı tedavi seçenekleri kullanılmaktadır. Tedavi seçenekleri kanserin türüne, evresine, yerine, kişinin genel sağlık durumuna bağlı olarak değişmekle birlikte radyasyon, cerrahi ve kemoterapi kullanılan en yaygın ve geleneksel tedavi yöntemleri arasındadır. Cerrahi tedavi vücudun diğer kısımlarına yayılmamış olan kanserlerin tedavisi için kullanılır. Kanser in etkilediği vücut kısmı veya tamamı çıkarılır fakat tüm kanser türleri için cerrahi tedavi kullanılamaz. Kemoterapi kanser hücrelerini yok etmek veya büyümelerini yavaşlatmak için kullanılan güçlü ilaç tedavisidir. Kemoterapi yayılan kanserler için etkili bir tedavi yöntemidir. Mevcut kemoterapi ajanlarının tüm kanser türlerinde etkinliği aynı değildir. Kemoterapinin çok sayıda türü olmasına rağmen kullanılacak olan yöntem kanserin türüne, aşamasına ve hastaya bağlıdır. Radyoterapi x-ray ışınlarını kullanarak kanser hücrelerinin çoğalmasını yavaşlatmak veya yok etmek için kullanılan diğer bir tedavi yöntemidir. Radyoterapi tek başına, kemoterapi veya cerrahi ile birlikte kullanılabilir (Mariah-Singh and Raymakers 2018; Wadhawan et al. 2019).

Mevcut tedavi yaklaşımlarına rağmen kanser sıklığı dünya genelinde hızlı bir şekilde artmakta, her geçen gün daha fazla büyüyen bir sağlık problemi olmaktadır. Aynı zamanda, bireylerin kendilerine, ailelerine, topluma hem psikolojik hem de maddi bir yük oluşturmaktadır. Elde edilen yeni veriler ve kanser vaka sayılarındaki artış yeni tanı ve tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Bununla birlikte sağlık sistemlerinin güçlü olduğu ülkelerde erken tanı ve kaliteli tedavi ile birçok kanser türüne sahip bireylerin hayatta kalma şansı ve oranı artmaktadır (Anonim 2021).

1.3 Baş ve Boyun Kanseri

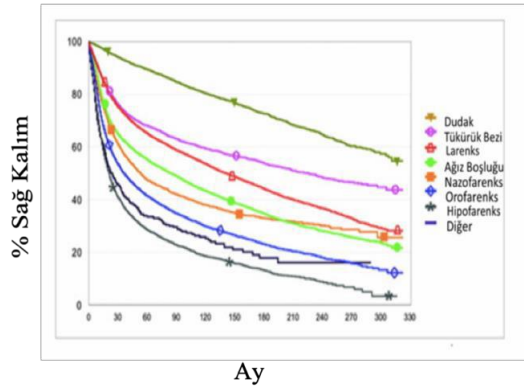
Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC), hipofarenks, orofarenks, dudak, ağız boşluğu, nazo-farenks veya larenks kaynaklı çeşitli tümörleri kapsayan heterojen bir hastalıktır. HNSCC dünya çapında kanserler arasında altıncı sıradadır ve tümör ölümlerinin yaklaşık %1 ila %2'sinden sorumludur (Lo Nigro et al. 2017).

1. GİRİŞ

HNSCC, dünya çapında önemli morbidite ve mortalite ile en sık görülen kanserlerden birisidir (Yang et al. 2019). Her yıl yaklaşık 650.000 yeni HNSCC tanısı konmaktadır (Kawakita and Matsuo 2017).

HNSCC'ler esas olarak ağız boşluğu, orofarinks, hipofarinks ve gırtlakta ortaya çıkar. HNSCC'nin birincil etiyolojisi insan papiloma virüsü (HPV), sigara tüketimi, alkol tüketimi ve Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu ile ilişkilidir (Li and Zhang 2019). Ayrıca ağız bakımının düzenli ve uygun yapılmaması alkol ve tütün ürünlerinin tüketimiyle bağımlı olarak HNSCC için risk faktörleri arasında gösterilebilir (Guha et al. 2007). Yaş, cinsiyet, meslek, ilaçlar, radyasyon, genetik faktörler, immünolojik etkenler, kimyasal ajanlar, travma, kronik irritasyon gibi çeşitli faktörler de HNSCC oluşumunda etkilidir. Erkeklerde HNSCC gelişmesi kadınlardan iki kat daha olasıdır ve HNSCC erkeklerde kadınlardan daha erken gelişmektedir (ortalama yaş: erkekler, 62; kadınlar, 66) (Sundermann et al. 2018).

HNSCC için tedavi seçenekleri arasında cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi ve üçünün farklı kombinasyonları bulunmaktadır. Hangi tedavinin seçileceği kanser türüne, tümör büyüklüğüne, TNM evresine, yerine ve hastanın iradesine bağlıdır. Bu kapsamlı tedavi yöntemlerine rağmen, HNSCC'de 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %65'tir. Sağkalım, tümörün erken tespit edilmesiyle ve tümörün bulunduğu yer ile ilişkilidir (Şekil 1.3) (Sundermann et al. 2018; Yang et al. 2019). HNSCC ile ilişkili düşük sağkalım oranları, kısmen erken tanıdaki başarısızlıktan kaynaklanmaktadır. Hastaların sadece üçte biri erken evrede teşhis edilebilir (Economopoulou et al. 2019).

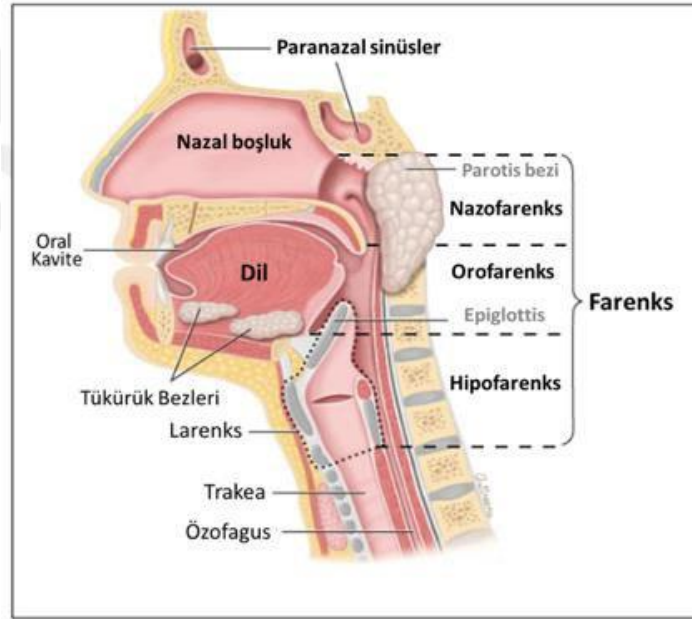


Şekil 1.3. HNSCC'de Tümör Bölgelerine Göre Genel Sağ Kalım (Carvalho et al. 2005)'dan değiştirilerek alınmıştır.

1.3.1 Larenks Anatomisi ve Larenks Kanseri

Larenks, boyun bölgesinde bulunan solunum ve konuşma fonksiyonlarından sorumlu bir organdır (Şekil 1.4) (Dibek 2018). Larenks, yutulan materyalin solunum yoluna aspirasyonunu önlemek için kasları ve bağları barındıran kıkırdaklı bir yapıya sahiptir (Hoerter et al. 2019).

Larenks üç bölüme ayrılır: supraglottik bölüm, glottik bölüm ve subglottik bölüm. Supraglottik bölüm, hiyoid kemiğin alt sınırı, epiglottis ve vestibüler kıvrımlar arasındaki bölümü içerir. Glottik bölüm, gerçek vokal kordlar, larenjiyal ventrikül ve glottisin genişliğini ayarlayan ariteno kıkırdaklarından oluşur. Subglottik bölüm ise glottisin alt sınırı ile trakeanın krikoid kıkırdak alt sınırının arasında bulunur (Dibek 2018).

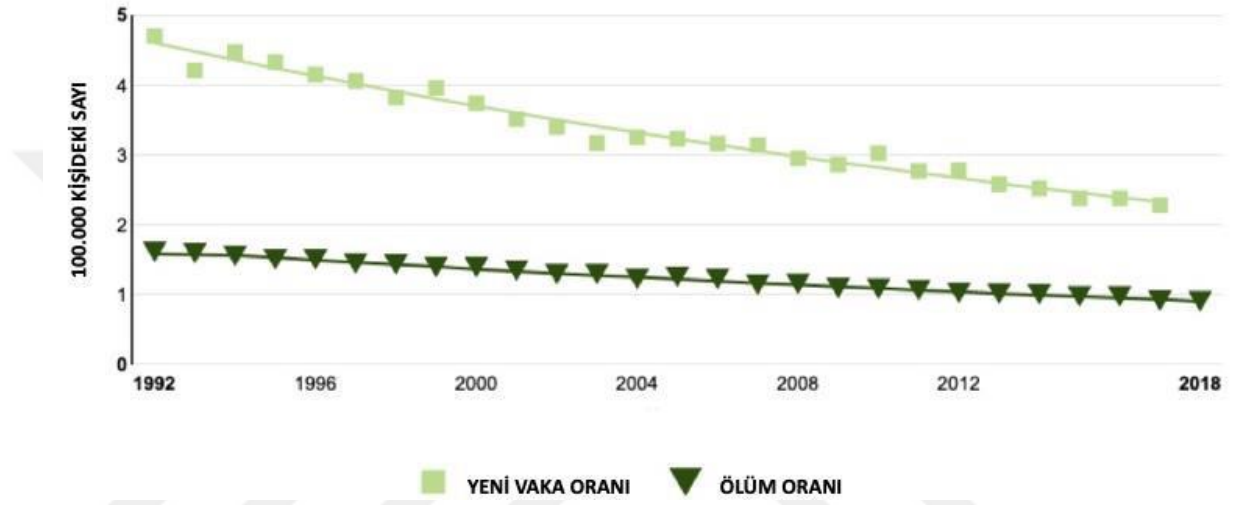


Şekil 1.4 Baş ve Boynun Farklı Bölgelerindeki Olası Kanseri Bölgelerini Gösteren Çizim (Dibek 2018)'den değiştirilerek alınmıştır.

Larenks nefes alış veriş sırasında hava akışını düzenleme yeteneğine sahiptir. Ayrıca konuşma, yutma ve nefes alma gibi birçok önemli fonksiyona sahiptir. Alt solunum yolunun korunması larenksin en önemli görevidir. Yutma sırasında, larenks soluk borusunu kapatır ve geçici olarak nefes almayı durdurur. Larenksin diğer görevleri arasında konuşma fonksiyonunun gerçekleştirilmesi, solunum sürecinin düzenlenmesi ve göğüs kafesinin sabitlenmesi gösterilebilir (Dibek 2018).

1. GİRİŞ

Larenks kanseri (LKa) baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarının en sık görülen ikinci kanseridir ve tüm vücut malinitelerinin % 2-5'ini oluşturmaktadır (Dibek 2018). LKa, Türkiye'deki güncel verilere göre özellikle erkeklerde görülen 8. kanser türüdür (Anonim 2017). LKa, kadınlara oranla erkeklerde daha sık görülmektedir. Hastaların yaklaşık %60'ı ileri evrede tanı alabildiği için yeni tedaviler geliştirilmesine rağmen LKa'nın 5 yıllık sağ kalım oranında belirgin bir azalış gözlenmemiştir (Şekil 1.5) (Karatas et al. 2016a).



Şekil 1.5. 1992'den Günümüze Larenks Kanseri Yeni Vaka ve Ölüm Oranları (Howlader N et al. 2018)'dan değiştirilerek alınmıştır.

LKa ilerleyen yaşlarda daha sık görülmektedir. LKa tanısı en fazla 55-64 yaşları arasında konmaktadır ve larenks kanserli hastalarda medyan tanı yaşı 65'tir. Larenks kanseri sebebiyle ölümdaki medyan yaşı ise 68'tir (Karataş 2014; Obid et al. 2019).

LKa gelişimine pek çok faktör katkıda bulunur. Ancak ana risk faktörü tütün ürünleridir (Obid et al. 2019). Alkol tüketimi, mesleki maruziyet, yaş, cinsiyet, ırk, viral faktörler, hava kirliliği, radyasyon ise diğer önemli risk faktörleri arasındadır (Dibek 2018). Ses kısıklığı, boğuk ses, yutma güçlüğü, nefes darlığı, kulak ağrısı ve öksürük LKa'nın belirtileri arasındadır (Kınış 2008). LKa tanısı için birçok teknik kullanılmaktadır. Bu teknikler doğrudan veya dolaylı larengoskopi, mikrolarengoskopi, manyetik rezonans görüntüleme taraması, biyopsi incelemesi, tarama, bilgisayarlı tomografi tarama göğüs filmi, pozitron emisyon tomografi taramasıdır (Karataş 2014; Dibek 2018). LKa tedavisinde konvansiyonel koruyucu cerrahi müdahale, endoskopik

1. GİRİŞ

lazer cerrahisi, larenjektomi, radyasyon tedavisi ve kombine kemoterapi kullanılmaktadır (Kınış 2008).

1.3.2 Hipofarenks Anatomisi ve Hipofarenks Kanseri

Hipofarenks, sağ ve sol piriform sinüsler, hipofaringeal duvarlar ve her biri tanısal kodlama için hipofarenksin bir alt bölgesi olarak kabul edilen postkrikoid bölgeden oluşan en uzun farenks parçasıdır (Helliwell 2003).

Hipofarenkste meydana gelen kanserler, farenksin diğer bölgelerinde meydana gelen kanserlerden daha nadirdir (Helliwell 2003). Hemen hemen tüm hipofarenks kanserleri mukozal skuamöz hücreli karsinomlardır. Hipofarenksin skuamöz hücreli karsinomu, tüm baş ve boyun kanserlerinin yaklaşık %5'ini oluşturur ve beş yıllık sağkalım oranı %30 civarında seyretmektedir. Klinik olarak, hipofarenks karsinomları agresif olma ve uzak bölgelere metastaz yapma eğilimindedir (Mura et al. 2013; Pracy et al. 2016).

Hipofarenksin üst bölgesinde meydana gelen kanserlerin başlıca sebebi alkol ve tütün ürünlerinin tüketimi iken hipofarenksin alt bölgesi olan postkrikoid bölgede meydana gelen kanserlerin başlıca sebebinin beslenme eksiklikleri olduğu düşünülmektedir (Mura et al. 2013). Hastalığın erken evresindeki semptomların eksikliğinden ve tümörün genellikle mukoza altına yayılmasından dolayı, hipofarenks kanserlerinin çoğu ileri evrede ortaya çıkar ve genellikle uzak metastazlarla tespit edilir. Hipofarenksin skuamöz hücreli karsinomları erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir. Hipofarenks karsinomlu hastaların %50'sinde boyun kitlesi mevcuttur. Boyun kitlesine ek olarak hastalarda yutma güçlüğü, ağrılı yutma, ses değişimi, kulak ağrısı gibi semptomlar gözlenmektedir (Mura et al. 2013; De Virgilio et al. 2019).

Hipofarenks kanserleri için yaygın kullanılan tedavi seçenekleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Erken evrede tespit edilen hipofarenks kanserleri sadece radyoterapi ile tedavi edilebilmektedir ancak ileri evre hipofarenks kanserleri için tedavi seçeneği olarak kemoterapi kullanılmaktadır (Mura et al., 2013).

1.4 MikroRNA'lar

MikroRNA'lar endojen olarak sentezlenen, 18-24 nükleotid uzunluğunda, kısa, tek zincirli, protein kodlamayan RNA molekülleridir ve transkripsiyon sonrası gen ifadesini kontrol eden RNA'lardır (Ricci et al. 2018).

MikroRNA'lar ilk defa 1993 yılında *C. elegans*'ın gelişimini çalışan bilim insanları tarafından kodlamayan lin-4 kısa RNA molekülünün *C. elegans* larvalarının gelişimsel sürecinde lin-14 proteinin ifadesini baskılayarak gelişimde rol aldığı gösterilerek keşfedilmiştir (Lee et al. 1993; Olsen and Ambros 1999). Sonraki yıllarda let-7'nin de keşfedilmesi ve birçok organizmada homologlarının bulunduğu tespit edilmesiyle mikroRNA'ların gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir regülatör olabileceği fikri öne sürülmüştür (Saliminejad et al. 2018).

Bugüne kadar hayvanlar, bitkiler, yuvarlak solucanlar, sinekler, balıklar, kurbağalar, çiçekli bitkiler, yosunlar ve virüslerde yüzlerce mikroRNA geni ve binlerce mikroRNA çeşidi tanımlanmıştır (Reinhart et al. 2000; Mo 2012)

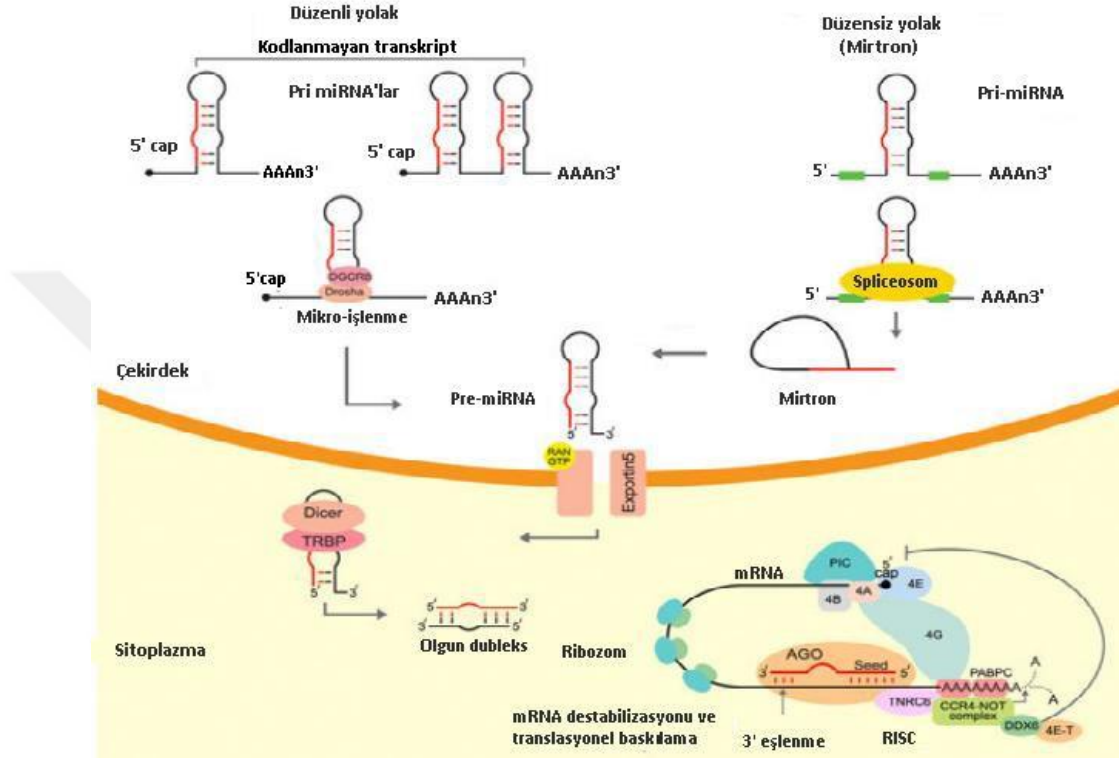
MikroRNA'lar hedef genlerinin 3'UTR'lerine bağlanarak mRNA degradasyonuna ya da transkripsiyonel inhibisyona neden olur (Raisch et al. 2013). Tek bir mikroRNA 200 kadar farklı mRNA'yı hedefleyebilir ya da aynı mRNA farklı mikroRNA'lar tarafından hedeflenebilir. Bu şekilde, protein kodlayan genlerin yaklaşık olarak %60'ının ifadesi mikroRNA'lar tarafından düzenlenir (Balacescu et al. 2018).

Son zamanlarda yapılan mikroRNA çalışmaları ile mikroRNA'ların farklılaşma, proliferasyon, hücre ölümü, apoptoz, organ gelişimi ve metabolizma dahil birçok biyolojik sürecin kontrol edilmesindeki görevleri ortaya konulmuştur (Bartel 2004; Hammond 2015). Biyolojik süreçlerdeki temel rolleri, mikroRNA'ların ifadelerinin dereğüle olmasının kanser dahil birçok hastalığa yol açabileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle mikroRNA'ların hastalık süreçlerinde ve normal süreçlerde nasıl rol aldığı araştırılması gerekmektedir.

1. GİRİŞ

1.4.1 MikroRNA Biyosentezi

MikroRNA biyosentezi evrimsel olarak korunmuş bir mekanizmadır. MikroRNA biyosentezi ile ilişkili olarak düzenli ve düzenli olmayan olmak üzere iki farklı yolak bulunmaktadır (Şekil 1.6) (Saliminejad et al. 2018).



Şekil 1.6 MiRNA'ların Düzenli ve Düzenli Olmayan Yolaklarla Biyosentezi (Saliminejad et al. 2018)'ten değiştirilerek alınmıştır.

Düzenli mikroRNA biyosentez yolağında mikroRNA sentezi birkaç yüz nükleotid ile birkaç kilobaz arasında değişen büyüklüklerde primer transkriptlerin (pri-mikroRNA) sentezi ile başlar (Denli et al. 2004). MikroRNA'lar polimeraz II aracılığıyla çekirdekte uzun pri-mikroRNA'lar olarak transkribe edilir (Ambros 2004; Bartel 2004; Zamore and Haley 2005). Pri-mikroRNA'ların çoğunda mRNA'lar gibi 5' ucunda Cap ve 3' ucunda poli-A kuyruğu bulunmaktadır (Cai et al. 2004). Pri-mikroRNA'lar, RNaz III enzim ailesinden olan Droscha ve Dicer için substrat görevi gören stem-loop yapısına katlanırlar (Krol et al. 2010). Pri-mikroRNA'lar çekirdekte tanımlanır ve daha sonra RNaz III enzimi Droscha ve RNA bağlanma proteini DiGeorge syndrome crucial region sequence 8 (DGCR8) aracılığıyla stem-loop yapısındaki prekürsör mikroRNA'ları (pre-miRNA'lar) oluşturmak üzere parçalanırlar. Pre-mikroRNA'lar daha sonra nükleer transport reseptörü

1. GİRİŞ

Exportin-5 ve Ras-Related Nuclear Protein(RAN) aracılığıyla GTP bağımlı olarak sitoplazmaya taşınır (Yi et al. 2003). Burada RNaz III enzimi Dicer ve TAR RNA binding protein (TRBP) tarafından stem-loop yapısı kesilerek işlenir ve çift iplikli olgun mikroRNA'lar oluşturulur (Mo 2012; Ha and Kim 2014). MikroRNA/mikroRNA çift iplikli yapı Argonaute (AGO) proteinine yüklenerek bir ipliği çıkarılır ve diğeri olgun mikroRNA olarak işlev yapmak üzere AGO aracılığıyla RISC (RNA induced silencing complex) kompleksine yüklenir. Tek iplikli olgun mikroRNA RISC kompleksine tutunarak hedef mRNA'lara taşınır (Davis-Dusenbery and Hata 2010). Diğeri zincirin nükleazlar aracılığıyla parçalandığı düşünülürken son bulgular bu zincirin de fonksiyonel olduğunu ve biyolojik süreçlerde çeşitli rolleri olduğunu ortaya çıkarılmıştır (Bernstein et al. 2001; Ketting et al. 2001).

Düzenli olmayan yolakta düzenli yolaktan farklı olarak mikroRNA olgunlaşması Drosha/DGCR8'den bağımsız olarak gerçekleşir. pre-mikroRNA'lar mirtron olarak adlandırılan kısa intron dizilerinden transkribe edilir. Mirtronlar splice mekanizması aracılığıyla pre-mikroRNA'lara dönüştürülürler. Daha sonra bu pre-mikroRNA'lar Exportin-5 aracılığıyla sitoplazmaya taşınır ve sonrasında düzenli yolak ile aynı şekilde olgun mikroRNA sentezi gerçekleştirilir (Westholm and Lai 2011).

MikroRNA'nın RISC ile birleşmesi hedef mRNA'nın tanınmasında önemli rol oynar ve mRNA deadenilasyonuna, degradesiyonuna ya da translasyonel inhibisyona neden olarak hedef genin baskılanmasına yol açar (Humphreys et al. 2005; Pillai et al. 2005; Nottrott et al. 2006; Petersen et al. 2006; Filipowicz et al. 2008). Olgun mikroRNA spesifik mRNA'yı baz eşleşmesi yoluyla hedefler (Davis-Dusenbery and Hata 2010).

1.4.2 MikroRNA'lar ve Kanser

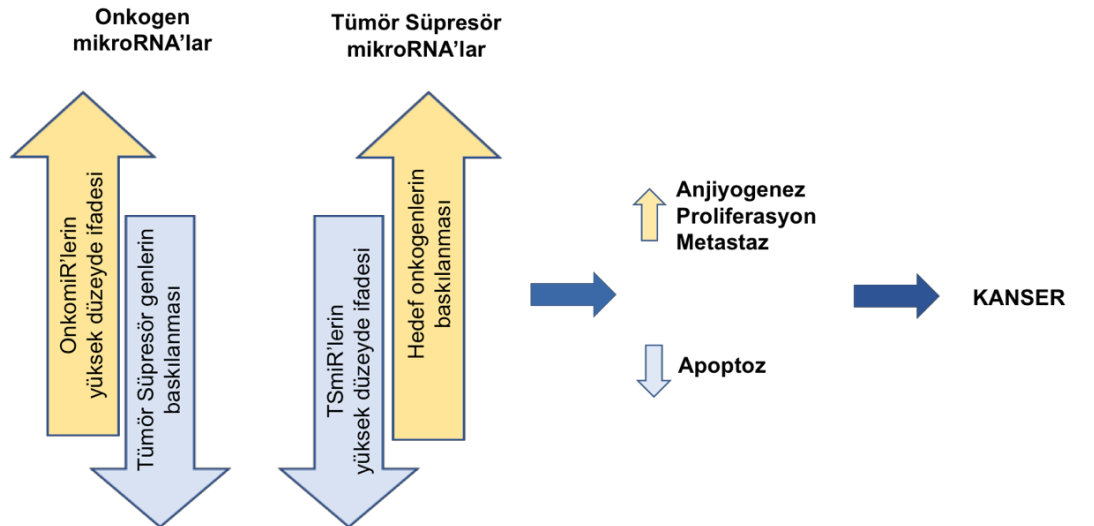
MikroRNA ifadesindeki düzensizlikler çeşitli mekanizmalar aracılığıyla kanser gelişiminde önemli rol oynar. MikroRNA ifade profillemesi çalışmaları ile normal ve tümörlü dokularda farklı ifadelerine sahip oldukları, aynı zamanda tümör evrelerinin belirlenmesinde kullanılabilecekleri gösterilmiştir. Özgün mikroRNA ifadesi ve kanser prognozu arasındaki kuvvetli ilişki mikroRNA'ların kanser çalışmaları ve araştırmalarındaki önemini ortaya koymaktadır (Ma et al. 2012).

1. GİRİŞ

MikroRNA'ların hücre proliferasyonu, apoptoz, farklılaşma, kök hücre gelişimi, migrasyon ve invazyon ve benzeri hücresel süreçlerde yer alan çeşitli hedef genlerin ifadesini özellikle transkripsiyon sonrası aşamada düzenledikleri ve ifadelerindeki deregülasyonun kanser dahil birçok hastalığa sebep olduğu bilinmektedir. (Griffiths-Jones 2004; Griffiths-Jones et al. 2006; Griffiths-Jones et al. 2008).

MikroRNA'lar kanserde rol aldığı düzenleyici mekanizmalara bağlı olarak onkogenik veya tümör süpresör mikroRNA (TSmiR) olarak kategorize edilebilir. Bazı mikroRNA'lar da farklı dokularda onkogen veya tümör süpresör genleri hedefleyerek hem onkogenik hem de TSmiR olarak rol alırlar (Şekil 1.7) (Saliminejad et al. 2018).

TSmiR'ler kanser hücrelerinde normal doku hücrelerine göre daha düşük seviyede ifade edilirler. TSmiR'lerin azalmış ifadeleri hedef onkogenlerin ifade düzeylerinin artmasına, böylelikle tümör gelişimine yol açar. TSmiR'lerin etki mekanizmaları hücre proliferasyonu, hücre göçü ve apoptozunu etkileyerek karsinogenezde işlev gören tümör süpresör genlerle aynıdır (Filipowicz et al. 2008; Majid et al. 2010). Bu mikroRNA'ların *in vivo* veya *in vitro* ortamda kanser hücrelerindeki ifade düzeylerinin normal seviyeye yükseltilmesi bu hücrelerinin proliferatif, invaziv, klonogenik ve metastatik potansiyellerinin azalmasına yol açar.



Şekil 1.7 Onkogen ve Tümör Süpresör MikroRNA' ların Karsinogenez Süreçlerindeki Fonksiyonları (Saliminejad et al. 2018)'ten değiştirilerek alınmıştır.

1.4.2 miR-145

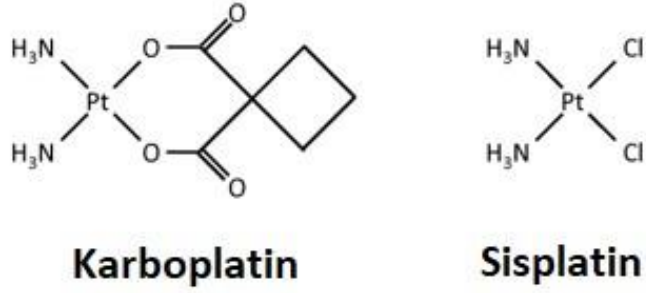
MiR-145, yüksek düzeyde korunmuş, ifadesi p53 tarafından kontrol edilen önemli bir TSmiR'dir. MiR-145, 5q32 kromozomal bölgesinde yerleşik olan 2549 baz uzunluğundaki MIR145 geninden ifade edilmektedir. Pri-miR-145'in işlenmesinden sonra 88 nükleotit uzunluğundaki pre-miR-145'e dönüştürülen, sonrasında da Dicer tarafından kırılarak tek zincirli hale getirilen olgun miR-145' in dizisi 5'-GUCCAGUUUCCCCAGGAAUCCCU-3'dir (Anonim 2020).

Meme kanseri, kolorektal kanser, hematolojik kanserler, yumurtalık kanseri, B-hücreli kanser ve prostat kanseri gibi birçok kanser çeşidinde sıklıkla miR-145 ifade kaybının olduğu gösterilmiştir (Wang and Lee 2009; Chen et al. 2010). LKa'da yapılan çalışmalarda da bir tümör baskılayıcı mikroRNA olan miR-145'in ifade kaybının olduğu gösterilmiştir (Cao et al. 2013; Karatas et al. 2016b; Ding et al. 2017).

p53, hücre döngüsünü, DNA replikasyonunu ve kontrolsüz hücre bölünmesini kontrol ettiği için tümör baskılayıcı protein olarak adlandırılır. p53, çeşitli genleri aktive ederek ya da baskılayarak hücre yollarını kontrol eder. p53 proteini mutasyona uğradığında işlevini kaybeder ve tümörün ilerlemesi ile sonuçlanır (Kanapathipillai 2018). p53'ün mir-145'in promotörü ile etkileşime girerek mir-145'in ifadesini artırdığı belirtilmiştir. Kanserlerde miR-145 ifadesinin azalması promotör hipermetilasyonu veya p53 mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir. Karsinogenez sürecinde miR-145 promotörünün hipermetile olduğu veya p53 mutasyonlarının p53'ün miR-145 promotörüne bağlanmasını engellediği için miR-145 ifadesinin azaldığı belirtilmiştir (Sachdeva et al. 2009; Suh et al. 2011).

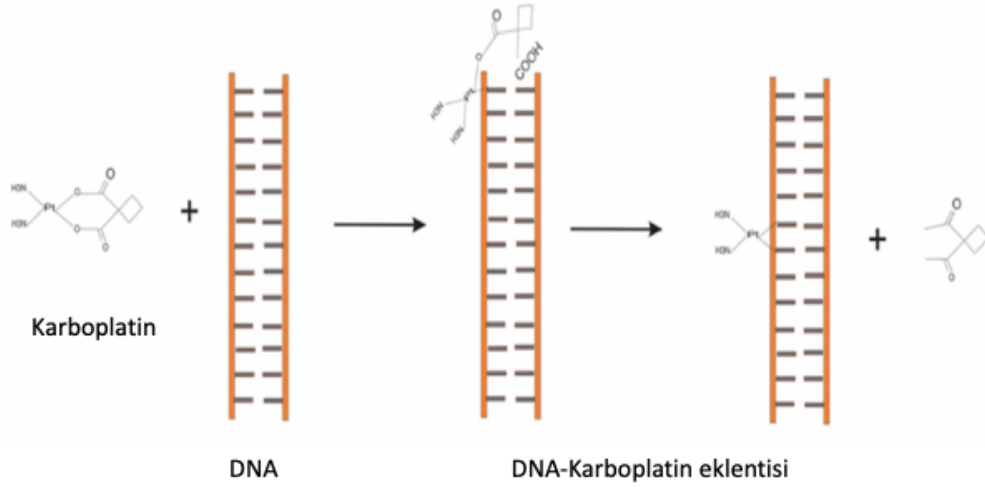
1.5 Karboplatin

Platin bazlı bir anti-kanser ilacı olan karboplatin (cis-diamin-1,1-siklobütan dikarboksilat platin), sisplatinin bir analogu olarak geliştirilmiştir ve meme, yumurtalık, akciğer ve baş boyun kanserleri dahil olmak üzere birçok kansere karşı uzun zamandır kullanılmaktadır (Şekil 1.8) (Ando et al. 2014; Dasari and Tchounwou 2014).



Şekil 1.8 Karboplatin ve Sisplatinin Kimyasal Yapıları (Ando et al. 2014)'ten değiştirilerek alınmıştır.

Sisplatin etki mekanizmasına benzer şekilde, karboplatin, guanin ve adenin bazlarına kovalent olarak bağlanarak DNA üzerinde çapraz bağlar oluşturur. Oluşan çapraz bağlar, DNA hasar tanıma ve onarımı, hücre döngüsü durdurma ve apoptozis gibi çeşitli sinyal iletim yollarını aktive ederek hücrelerin çoğalmasını engeller (Şekil 1.9) (Liu et al. 2011; Ando et al. 2014).



Şekil 1.9 Karboplatin'in DNA'da Oluşturduğu Çapraz Bağlantılar (De Sousa et al. 2014)'ten değiştirilerek alınmıştır.

Sisplatin ile karşılaştırıldığında karboplatinin daha az nefrotoksik ve nöro toksik yan etkileri vardır (Lokich and Anderson 1998). Karboplatinin sisplatine göre daha az bulantı, kusma ve baş dönmesi meydana getirdiği yapılan Faz I çalışmaları ile gösterilmiştir (Lee et al. 1988). HNSCC'li hastaların tedavisinde de sisplatinin yan etkilerine karşı karboplatin alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır (Aguiar et al. 2016). Ayrıca, karboplatinin, tümör hücrelerinin mikroRNA profilinde değişikliklere

1. GİRİŞ

neden olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Yu et al. 2017; Zang et al. 2017). Ancak, özellikle HNSCC'de, tümör hücrelerini öldürürken karboplatinin sitotoksik etkilerine mikroRNA'ların katılımı hakkında sınırlı bir çalışma vardır.

Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışmada karboplatin ile muamele edilen HNSCC hücre hatlarından bir tümör baskılayıcı mikroRNA olan miR-145'in ve miR-145'in iyi karakterize edilmiş direkt hedeflerinin ifade seviyeleri araştırılarak karboplatinin hücre canlılığını azaltırken kullandığı mekanizmalardan birinin ortaya konulması amaçlanmaktadır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Shen ve ark. 2018 Karboplatinin larenks kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak pro-apoptotik etkisini göstermiş ve larenks kanseri hücrelerinde karboplatin aracılı apoptoz mekanizmasını ortaya koymuşlardır.

Cristina ve ark. 2014 Karboplatinin 4T1 hücrelerinde ve 4T1 murine meme kanseri modelinde tümör büyümesini ve metastazı baskılayarak hem *in vitro* hem de *in vivo* anti-kanser etki gösterdiğini ve meme kanserinde kombine yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için potansiyel bir aday olabileceğini bulmuşlardır.

Lei Lin ve ark. 2016 Karboplatinin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücre hatlarında mikroRNA ifadesini düzenleyerek NSCLC hücrelerinin invazyonunu engellediğini ve anti-kanser özellik gösterdiğini bulmuşlardır.

Economopoulou ve ark. 2019 Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda (HNSCC) sağ kalımın iyileştirilmesi için HNSCC'nin tanı, erken tespiti ve prognozunda umut verici sonuçlar gösteren çeşitli biyobelirteçler bulunması gerektiğini ortaya koymuşlardır.

Karatas ve ark. 2016 mikroRNA'ların kanser tanı ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılabilmesini ve larenks kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser tipinde mikroRNA'ların ifadesinin azaldığını göstermişlerdir.

Seung Un Seo ve ark. 2017 Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda (HNSCC) karboplatin ile muamele edilen kanser hücrelerinde translasyon sonrası seviyede c-FLIP ve Mcl-1 ifadesini aşağı regüle ederek apoptozu indüklediğini göstermişlerdir.

Lisa Narveson ve ark. 2016 İndüksiyon kemoterapisi ile tedavi edilemeyen baş ve boyun kanserli hastalarda daha az toksik yan etkileri olan karboplatin tedavisinin kullanılabilmesini önermişlerdir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Seong O. Suh ve ark. 2011 Prostat kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmada normal hücrelerde p53'ün mir-145'in promotörü ile etkileşime girerek mir-145'in ifadesini artırdığını; kanserli hücrelerde ise p53 proteininde meydana gelen mutasyonun p53'ün miR-145'e bağlanmasını engellediği için miR-145'in ifadesinin azaldığını ve bu azalma sonucunda karsinogenezin meydana geldiğini bulmuşlardır.

Paul Zarogoulidis ve ark. 2015 Akciğer kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmada mikroRNA ve karboplatin ile muamele edilen hücrelerde pro-apoptotik genlerin aktive olduğunu ve kanser hücrelerinin proliferatif kapasitelerinin inhibe edildiğini bulmuşlardır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.1’de gösterilmektedir.

Tablo 3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

CİHAZIN ADI	MARKA
Derin Dondurucu (-20°C)	Templo
Buzdolabı (4°C)	Edesa
Derin Dondurucu (-80°C)	ESCO Lexicon®
Epoch Spektrofometre	Biotek EPOCH
Laminar air-flow (Class II Safety Cabinet)	ESCO NordicSafe™
CO ₂ İnkübatör	ESCO Celculture CO ₂ Incubator
Akım Sitometre	Partec
Mikropipet	Axypet
Mini Santrifüj	WiseSpin
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen
Termal döngü cihazı (PZR)	SensQuest Labcycler
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
qRT PCR	Qiagen Rotor-Gene Q
Otoklav	Tomy SX-500E
İnvert Mikroskop	Leica
Su Banyosu	Wisd WiseBath
Saf Su Cihazı	Millipore Direct- Q-3 UV
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
Jel Görüntüleme Cihazı	Bio-Rad ChemiDoc
Blotlama Cihazı	Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler, kitler ve kimyasal malzemeler Tablo 3.2’de gösterilmektedir.

Tablo 3.2 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler, Kitler ve Kimyasal Malzemeler

Sarf Malzeme, Kitler ve Kimyasallar	MARKA
96 kuyucuklu plate	Corning® Costar®
6 kuyucuklu plate	Corning® Costar®
Eppendorf tüpler (0,2 - 0,5 - 1,5 ml)	IsoLab
25 cm ² hücre büyütme kapları	Corning® Costar®
Steril serolojik pipetler (5, 10 ml)	LP Italiana
Falkon tüpleri (15, 50 ml)	LP Italiana
RPMI 1640 besi yeri	Gibco®
DMEM 1X besi yeri	Gibco®
Tripsin	Gibco®
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco®
Penisilin-Streptomisin	Gibco®
L-Glutamin	Sigma-Aldrich®
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich®
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x	EcoTech Biotechnology
TRIZol	Gibco®
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich®
Kloroform	Sigma-Aldrich®
İzopropanol	Sigma-Aldrich®
Etanol	Merck
Nitroselüloz Membran	Sigma-Aldrich®
Whatman Kağıdı	Sigma-Aldrich®
RIPA Lysis Buffer	EcoTech Biotechnology

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Laemmli Sample Buffer 10x	EcoTech Biotechnology
Süt Tozu	EcoTech Biotechnology
ClearBand ECL Western Blot Substrat	EcoTech Biotechnology
p53 Primer Antikor	Cell Signaling Technology
Beta Aktin Primer Antikor	Santa Cruz Biotechnology
Anti-asetil p53(Lys373&382) Primer Antikor	Upstate Biotechnology
PMSF	Roche
Proteaz İnhibitör Kokteyl	Thermo Scientific®
Anti-p53 Asetil K120	Abcam
Sekonder Antikor	Santa Cruz Biotechnology
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Lipofectamine 3000	Invitrogen
Cell Viability Detection Kit-8	EcoTech Biotechnology
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
TaqMan Universal Master Mix	Applied Biosystems
miR-145 Spesifik Prob	Applied Biosystems
RNU43 Spesifik Prob	Applied Biosystems
miR-145 mimic	Invitrogen
non-targeting mimic control	Invitrogen
OCT4 Spesifik Primer	Sentegen Biotech
SOX2 Spesifik Primer	Sentegen Biotech
KLF4 Spesifik Primer	Sentegen Biotech
ABCG2 Spesifik Primer	Sentegen Biotech
GAPDH Spesifik Primer	Sentegen Biotech
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	Solis Biodyne

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre Hatlarının Temini ve Kültüre Edilmesi

Tez kapsamında kullanılan larenks kanseri hücre hattı Hep-2 hücreleri Şap Enstitüsü Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan ve hipofarenks kanseri hücre hattı FaDu hücreleri İzmir Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

Hep-2 hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin eklenerek hazırlanan RPMI-1640 besi yeri içerisinde çoğaltıldı. FaDu hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin eklenerek hazırlanan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besi yeri içerisinde çoğaltıldı. Hücreler, deney süresi boyunca 37°C'de %5 CO₂'li nemlendirilmiş inkübatörde 25cm² 'lik flasklar içerisinde kültüre edildi.

3.2.2 Hücre Sayımı

Hücre sayımı Tripan Blue boyama yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Hep-2 ve FaDu hücreleri 25 cm² flasklar içerisinde %70-80 yoğunluğa ulaşmaya kadar kültüre edildi. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler PBS ile yıkandıktan sonra Tripsin ile muamele edilerek santrifüj ile çöktürüldü. Santrifüj sonrasında hücre pelletleri üzerine taze besi yeri eklendi ve homojen hale gelinceye kadar çözdürülerek hücre süspansiyonları hazırlandı. Tripan Blue boyaması için eppendorf tüp içerisine Tripan mavisi solüsyonundan 15 µl ve sayımı yapılacak hücre solüsyonundan 15 µl eklendi. Hazırlanan Tripan mavisi ve hücre solüsyonu içerisinde köpük oluşmayacak şekilde karıştırıldı. Önceden alkol ile temizlenmiş olan hemositometre lam ve lameli arasına boyanmış hücre solüsyonu yüklendi. Mikroskop yardımıyla canlı hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Mililitredeki canlı hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı ve istenilen hücre sayısı hücre solüsyonu içerisinden alındı.

$$\text{Ortalama Hücre Sayısı} \times \text{Dilüsyon oranı} \times 10.000$$

3.2.3 Hücrelerin 6 Kuyucuklu ve 96 Kuyucuklu Platelere Ekilmesi

Hücre sayımı gerçekleştirildikten sonra 6 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğuna 2 ml besi yeri içerisinde Hep-2 hücrelerinden 2×10^5 , FaDu hücrelerinden ise $1,8 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi.

96 kuyucuklu plateler için ise her bir kuyucukta 100 µl besi yeri içerisinde Hep-2 ve FaDu hücrelerinden 3000 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi. Hücreler deneylerde kullanılincaya kadar 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi.

3.2.4 Karboplatinin Stok Çözeltisinin Hazırlanışı

Ticari olarak temin edilen karboplatin üretici firmanın talimatlarına göre hazırlandı. Kısaca, 5 mg karboplatin tartılarak 1346 µl distile suda çözüldü ve 10 mM'lık stok hazırlandı. Hazırlanan stok karboplatin solüsyonundan 200 µl alınıp 800 µl distile su ile seyreltilerek 2 mM'lık ara stoklar hazırlandı ve alikotlanarak kullanılincaya kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.5 Pifithrin-α Stok Çözeltisinin Hazırlanışı

Ticari olarak temin edilen Pifithrin-α üretici firmanın talimatlarına göre dimetil sülfoksit içerisinde çözüldü ve 2 mM stok hazırlandı. Alikotlanarak kullanılincaya kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi. Besi yeri ile seyreltilerek 20 µM son konsantrasyonda hücrelere uygulandı.

3.2.6 MikroRNA Transfeksiyonu

Tez kapsamında yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere hücreler miR-145 mimik ile transfekte edildi. Kontrol olarak da herhangi bir geni hedeflemeyen oligonükleotid dizisi olan kontrol mikroRNA kullanıldı.

Transfeksiyon işlemi Lipofectamine 3000 Transfection Reagent Kit (Invitrogen, San Diego, CA, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek

gerçekleştirildi. Hep-2 ve FaDu hücreleri 6 kuyucuklu platelere sırasıyla kuyucuk başına 2×10^5 ve $1,8 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı ve sonrasında transfeksiyon işlemi kısaca aşağıda tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi.

6 kuyucuklu platerlerde transfeksiyon gerçekleştirmek amacıyla her bir kuyucuk için 1 μ l transfeksiyon reaktifi ve 125 μ l Opti-MEM besi yeri, farklı bir tüpte 10 nm mimik/kontrol mikroRNA yine 125 μ l Opti-MEM besi yeri ile karıştırıldı. Bu iki karışım birleştirilerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin bulunduğu kuyucuklardaki besi yeri uzaklaştırıldı ve kuyulara taze besi yeri eklendi. Ardından hazırlanan 250 μ l transfeksiyon karışımı her kuyudaki besi yeri üzerine damla damla eklenerek plate hafifçe karıştırıldı. Hücreler, yapılacak deneyin amacına göre 37°C inkübatör içerisinde inkübasyona bırakılarak 24 veya 48 saat sonra toplandı.

3.2.7 Karboplatinin Hep-2 ve FaDu Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Karboplatinin Hep-2 ve FaDu hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için hücreler 96 kuyucuklu platelere ekildi ve bir gün boyunca 37°C 'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında hücreler 0,5-1-2 ve 4 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda karboplatin içeren besi yeri ile muamele edildi. Karboplatinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi 24 ve 48 saat sonra Cell Viability Detection Kit-8 (CVDK-8, EcoTech Biotechnology, Türkiye) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek değerlendirildi. Kısaca inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besi yeri boşaltıldı ve her bir kuyucuğa %10 CVDK-8 solüsyonu içeren taze besi yeri eklendi. Hücreler 37°C 'de karanlıkta 3 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Hücre canlılığı Epoch 2 Microplate Spectrophotometer cihazı ile 450 nm'de aborbans ölçümü yapılarak değerlendirildi.

3.2.8 Karboplatinin MiR-145 ile birlikte Hep-2 ve FaDu Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Karboplatin veya miR-145'in Hep-2 ve FaDu hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için hücreler 96 kuyucuklu platelere ekildi ve bir gün

boyunca 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent kit (Invitrogen, San Diego, CA, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek 10 nm miR-145 mimik veya kontrol mikroRNA transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyon yapılan hücreler 4 µg/ml konsantrasyonda Karboplatin ile muamele edildi ve hücreler 48 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Hücre canlılığı CVDK-8 kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek değerlendirildi. Kısaca inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besi yeri boşaltıldı ve her bir kuyucuğa %10 CVDK-8 solüsyonu içeren taze besi yeri eklendi. Hücreler 37°C’de karanlıkta 3 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Hücre canlılığı Epoch 2 Microplate Spectrophotometer cihazı ile 450 nm’de aborbans ölçümü yapılarak değerlendirildi.

3.2.9 Hücrelerden TRIzol ile RNA İzolasyonu

Hep-2 ve FaDu hücreleri 6 kuyucuklu platelere ekildi ve bir gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonrasında hücreler miR-145, karboplatin ve/veya Pifithrin-α ile muamele edilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında her kuyudaki besi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1x PBS ile yıkandı. Her kuyuya 500 µl TRIzol solüsyonu eklendi ve hücreler scraper yardımıyla buldukları kuyucuklardan kazındı ve toplandı. Hücreler TRIzol’de iyice homojenize edildikten sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilerek hücrelerin iyice parçalanması sağlandı. Sonrasında örneklerin üzerine 100 µl kloroform eklenerek iyice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 2-3 dk inkübasyona bırakıldı ve 4°C 12000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapılarak faz ayrışması sağlandı. Faz ayrışması sonucu RNA içeren sıvı şeffaf fazlar yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerine 250 µl izopropanol eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılarak sonrasında 4°C 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Tüpün alt kısmında beyaz renkte çökelti şeklinde görülebilen RNA’lar %75 etil alkolle yıkanarak 4°C 7500 rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldı. RNA’lar kurumaya bırakıldı ve iyice kuruduktan sonra nükleaz içermeyen molekül grade su içerisinde çözüldü. RNA saflıkları ve konsantrasyonları Epoch 2 Microplate Spectrophotometer cihazı kullanılarak ölçüldü.

3.2.10 cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kontrol hücreleri, Karboplatin, Pifithrin- α ve Karboplatin ile birlikte Pifithrin- α uygulaması sonrasında Hep-2 ve FaDu hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin her birinden 1000 ng kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentez işlemleri 'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit'i (Thermo, ABD) ile üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. Gen ekspresyon analizleri gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR SuperMix ile üretici firmanın protokolü takip edilerek Rotor-Gene qRT-PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. GAPDH internal kontrol olarak kullanıldı ve deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Rölatif kantitasyon analizi delta-delta-CT metodu kullanılarak yapıldı. qRT-PCR reaksiyonları gerçekleştirilirken kullanılan primer dizileri Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3 Primer Listesi ve Dizileri

GEN	DİZİ
<i>SOX2-F</i>	5'-CTCCGGGACATGATCAGC-3'
<i>SOX2-R</i>	5'-GGTAGTGCTGGGACATGTG-3'
<i>KLF4-F</i>	5'-CCCAATTACCCATCCTTCCTG-3'
<i>KLF4-R</i>	5'-GTCTTCCCCTCTTTGGCTTG-3'
<i>OCT4-F</i>	5'-CTGGAGAAGGAGAAGCTGGA-3'
<i>OCT4-R</i>	5'-CAAATTGCTCGAGTTCTTTCTG-3'
<i>ABCG2-F</i>	5'-AGCAGCAGGTCAGAGTGTGG-3'
<i>ABCG2-R</i>	5'-GATCGATGCCCTGCTTTACC-3'
<i>GAPDH-F</i>	5'-CCATCTTCCAGGAGCGAGATC-3'
<i>GAPDH-R</i>	5'-GGCATTGCTGATGATCTTGAGG-3'

3.2.11 MikroRNA'lar için cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MiR-145 mimik ya da kontrol mikroRNA ile transfekte edilen Hep-2 ve FaDu hücrelerinden TRIzol solüsyonu kullanılarak izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları 15 ng/ μ l olacak şekilde seyreltildi ve her örnek için 2 μ l RNA kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA reaksiyonları microRNA TaqMan Assay primerleri ile TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit'i kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. qRT-PCR işlemleri TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek Rotor-Gene gerçek zamanlı PZR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. RNU43 internal kontrol olarak kullanıldı ve deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

3.2.12 Hep-2 ve FaDu Hücrelerinden Protein İzolasyonu

Hep-2 ve FaDu hücreleri 6 kuyucuklu platelere ekildi ve bir gün sonra hücreler miR-145, karboplatin ve/veya Pifithrin- α ile muamele edildi. 48 saat sonra 6 kuyucuklu platelerdeki besi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler buldukları kuyucuklardan scraper yardımı ile kazındı. 10 mM PMSF (Roche, Basel, İsviçre) ve fosfataz inhibitör kokteyl (Santa Cruz Biotechnology, Dallas) içeren RIPA Lizis Tamponu (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) içerisinde süspansiyon edildi ve dondur-çöz yapılarak hücrelerin iyice parçalanması sağlandı. Daha sonra santrifüj yapılarak proteinler ayrıştırıldı. Ayrıştırılan proteinler 1x Laemmli Sample Buffer (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ile karıştırıldı ve 100°C'de 5 dakika kaynatıldı. Protein örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

3.2.13 SDS-PAGE Jel Elektroforezi

SDS-PAGE jel elektrofrezinde %4'lük yürütme jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanıldı. Kullanılan jeller Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'te belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3.4. SDS-PAGE İçin Yürütme Jelinin Hazırlanışı

Yürütme jeli (%4'lük)	Hacim
Akrilamid+Bis-akrilamid (%29+%1)	397,5 µl
Distile su	2,175 ml
Tris-HCl (pH:6.8)	375 µl
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	30 µl
Amonyum Persülfat (%10)	30 µl
TEMED	7,5 µl

Tablo 3.5. SDS-PAGE İçin Ayırma Jelinin Hazırlanışı

Ayırma jeli (%10'luk)	Hacim
Akrilamid+Bis-akrilamid (%29+%1)	1,65 ml
Distile su	1,4 ml
Tris-HCl (pH:8.8)	1,875 ml
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	50 µl
Amonyum Persülfat (%10)	50 µl
TEMED	2 µl

Ayırma jeli tabloda belirtilen miktarlardaki solüsyonlar karıştırılarak iki cam tabakası arasında %10 konsantrasyonda hazırlandı ve jel yüzeyi izopropanol ile kaplandı. Jel, polimerizasyonu için oda sıcaklığında 25-30 inkübasyona bırakıldı. Daha sonra izopropanol uzaklaştırıldı.

Yürütme jeli tabloda belirtilen miktarlardaki solüsyonlar karıştırılarak hazırlandı. Jel, polimerizasyonu için oda sıcaklığında 20-25 dakika inkübasyona bırakıldı. Jel hazır hale geldikten sonra önceden 10x Laemmli Sample Buffer (EcoTech Biyoteknoloji, Erzurum, Türkiye) ile hazırlanan eşit miktarda protein örnekleri jel kuyularına yüklendi ve proteinler %10 SDS-PAGE jel ile ayrıldı.

3.2.14 Western Blot

SDS-PAGE jelde proteinler ayrıldıktan sonra jel sistemden çıkarıldı. Proteinler Trans-Blot® Turbo™ Transfer Sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) kullanılarak nitrocelüloz membrana aktarıldı. Membranlar oda sıcaklığında 1 saat %5 yağsız süt tozu ile blokladı. +4°C’de bir gece boyunca β -Actin (1:200; Santa Cruz Biotechnology), p53 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-p53 acetyl K120 (1/1000; Abcam, Cambridge, United Kingdom) ve anti-acetyl-p53 Lys 373&382 (1/1000; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) primer antikoları ile blotlandı. Daha sonra PBST ile yıkanan membranlar HRP ile konjuge uygun sekonder antikolar ile oda sıcaklığında 1 saat problandı. Ardından protein sinyalleri ClearBand ECL Western Blotting Substrate (Ecotech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) kullanılarak görüntüledi. Spesifik protein bantları ImageJ programı kullanılarak ölçüldü.

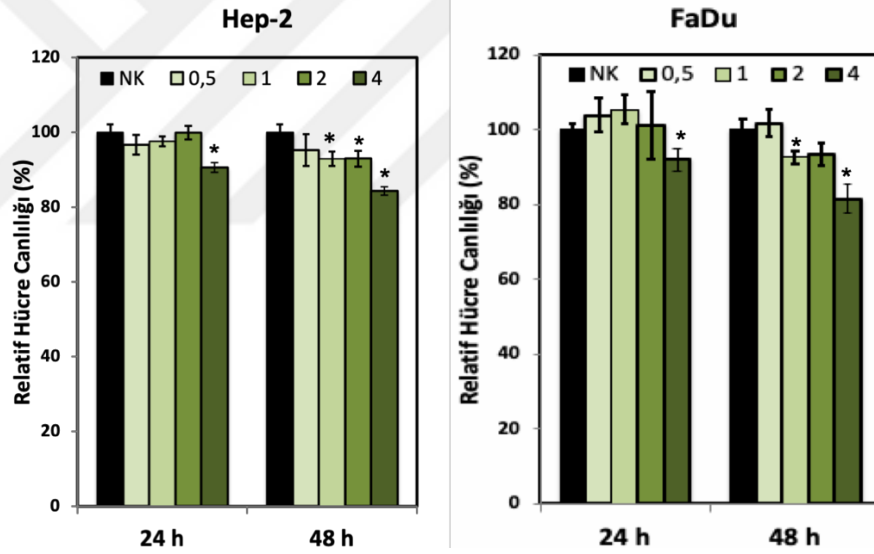
3.2.15 İstatistiksel Analiz

Veriler, ortalama \pm standart hatası olarak verilmiştir ve istatistiksel anlamlılıklar Student’s t test kullanılarak değerlendirildi. Analiz sonuçlarında 0.05’ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Karboplatinin Hep-2 ve FaDu Hücreleri Üzerindeki Proliferatif Etkisinin Değerlendirilmesi

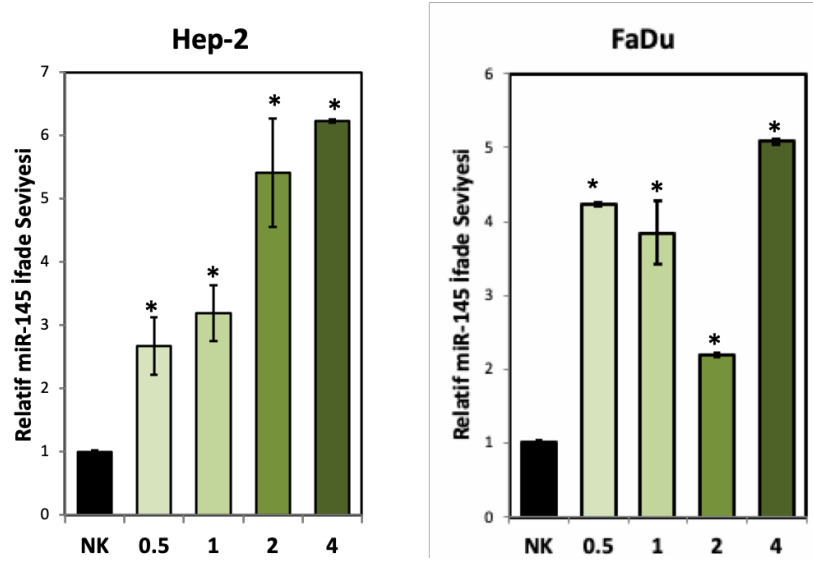
Karboplatinin Hep-2 ve FaDu hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi CVDK-8 testi kullanılarak değerlendirildi. Bunun için hücreler 24 ve 48 saat boyunca 0,5, 1, 2 ve 4 µg/ml konsantrasyonlarda karboplatin içeren besi yeri ile muamele edildi. 24 saatlik karboplatin ile muamele sonrasında her iki hücre hattında da hücre canlılığının en yüksek doz olan 4 µg/ml konsantrasyonda anlamlı olarak azaldığı, 48 saatlik muameleden sonra ise hücre canlılığının 1, 2 ve 4 µg/ml konsantrasyonlarda anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4.1, *p<0,05).



Şekil 4.1. Karboplatin Uygulamasının Hep-2 ve FaDu Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

4.2 Karboplatinin MiR-145 İfade Seviyesi Üzerindeki Etkisi

Karboplatinin hücreleri öldürürken kullandığı potansiyel mekanizmaları araştırmak için, HNSCC de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde iyi karakterize edilmiş bir tümör baskılayıcı mikroRNA olan miR-145'in ifade seviyesi değerlendirildi. Her iki hücre hattında da miR-145 ifade seviyesinin karboplatin ile muamele edilen hücrelerde doza bağlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 4.2, *p<0,05).

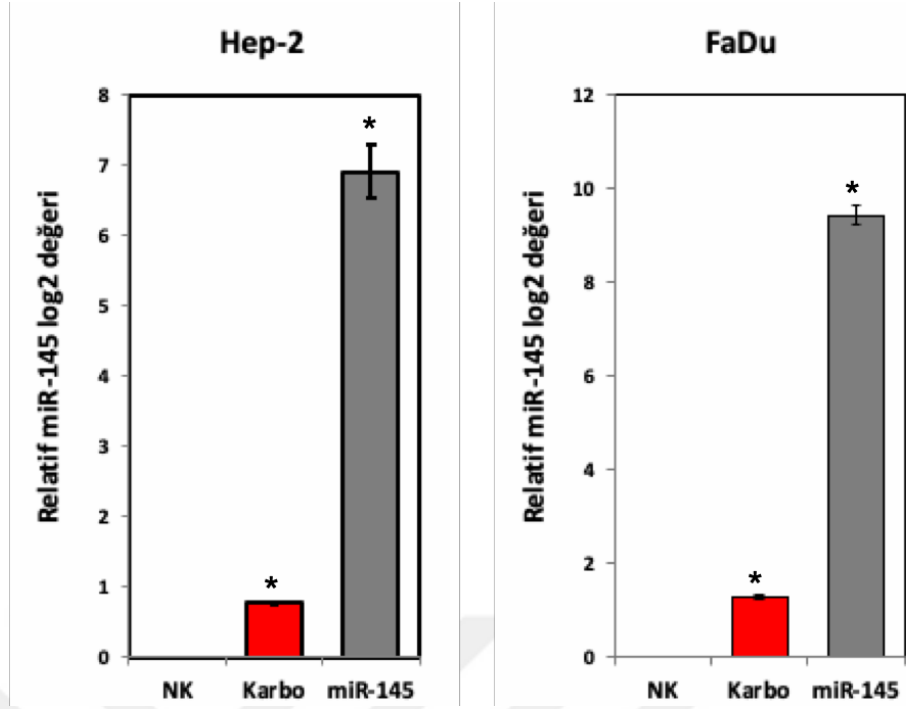


Şekil 4.2. Karboplatin Uygulamasının MiR-145 İfade Seviyesi Üzerindeki Etkileri

Kısaca, karboplatin, hem Hep-2 hem de FaDu hücrelerinde miR-145 ifade seviyesini indükler ve bu bulgular, miR-145'i karboplatinin önemli bir potansiyel endojen efektörü olarak işaret eder. Karboplatin uygulamasının proliferasyonu etkili bir şekilde önlediği ve her iki hücre hattında miR-145 ifade seviyesini anlamlı olarak artırdığı için, sonraki *in vitro* çalışmalarda optimum doz olarak 4 µg/ml karboplatin kullanıldı.

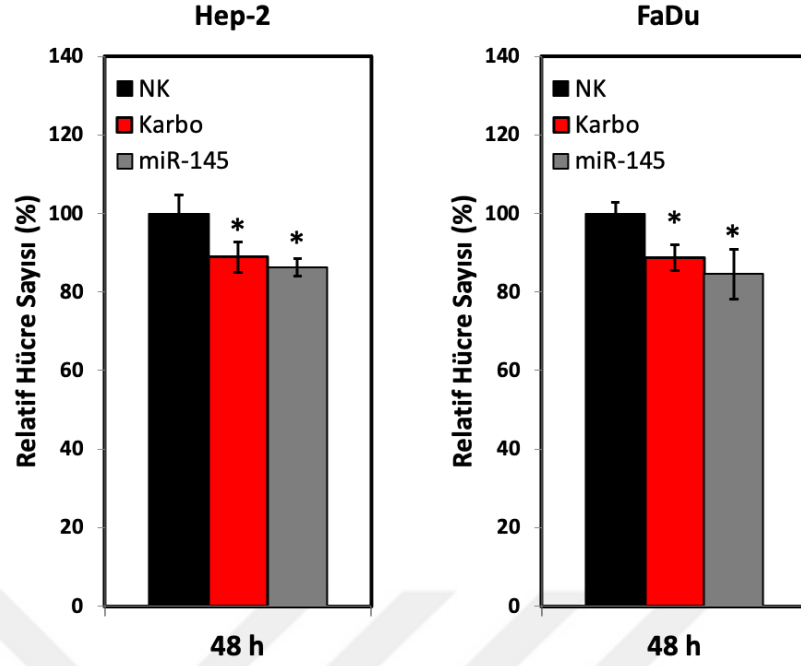
4.3 Karboplatinin Mir-145 Hedef Genlerinin İfade Seviyesi Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Karboplatin ile muamele Hep-2 ve FaDu hücrelerinde miR-145 ifade seviyesini artırdığından, karboplatin uygulaması ve ektopik miR-145 ifade seviyesinin kanser hücrelerinin fenotiplerinde benzer değişikliklere neden olup olmadığı belirlenmek istendi. Öncelikle karboplatin ile muamele ve miR-145 ile transfeksiyon sonrasında miR-145'in artan ifade seviyesini doğrulamak için Hep-2 ve FaDu hücrelerinden karboplatin ile muamele ve miR-145 ile transfeksiyondan 24 saat sonra RNA izolasyonu yapıldı ve ifade analizi real-time PCR kullanılarak 2 ya da 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. MiR-145 ile transfekte edilmiş olan Hep-2 ve FaDu hücrelerinde kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında miR-145'in ifade seviyesinin anlamlı olarak arttığı belirlendi (Şekil 4.3, *p<0,05).



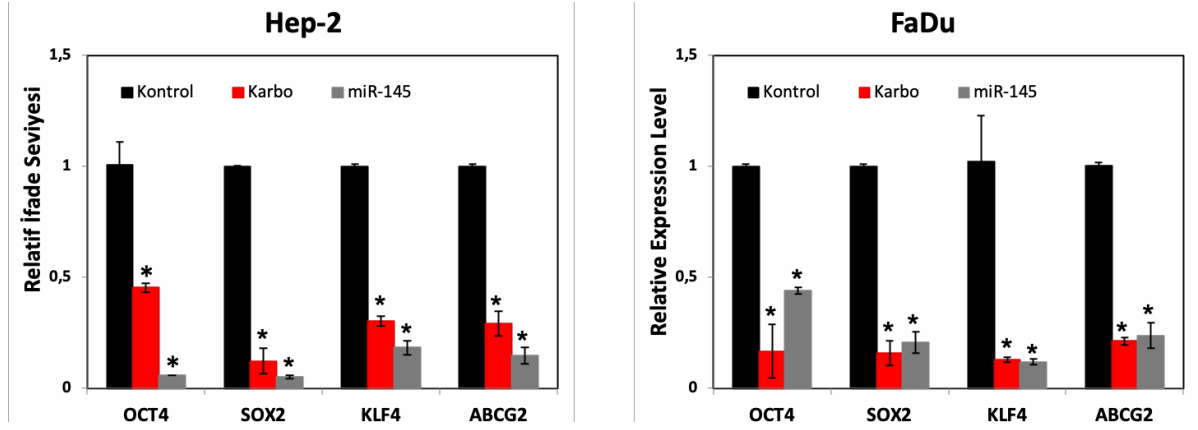
Şekil 4.3. Karboplatin Uygulaması ve MiR-145 Transfeksiyonu Sonrasında Hücrelerdeki MiR-145 İfade Düzeyi

Ayrıca miR-145'in tümör baskılayıcı potansiyelini doğrulamak için miR-145 ile transfekte edilen Hep-2 ve FaDu hücrelerinden 48 saatin sonunda proliferasyon testi yapıldı. Kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında miR-145 ile transfekte edilen hücrelerin canlılığının %80'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.4, *p<0,05).



Şekil 4.4. Karboplatin Uygulaması ve Ektopik MiR-145 İfadesinin Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkisi

Karboplatinin miR-145'in doğrudan hedeflerinin ifade seviyeleri üzerindeki etkilerini görmek için miR-145'in iyi karakterize edilmiş hedefleri olan OCT4, SOX2, KLF4 ve ABCG2'nin ifade değişimleri değerlendirildi. İlk olarak, miR-145'in aşırı ifadesi üzerine bu genlerin ifadelerinin azaldığı doğrulandı. Aynı zamanda, bu genlerin ifade seviyeleri karboplatin ile muamele edilen hücrelerde değerlendirildi ve kontrollerle karşılaştırıldığında OCT4, SOX2, KLF4 ve ABCG2 ifade seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Bu sonuçlar, karboplatin uygulamasının miR-145'in ifade seviyesini artırmasına paralel olarak, miR-145 hedef genlerinin ifade profilinin değişmesine neden olduğunu gösterdi (Şekil 4.5, *p<0,05).



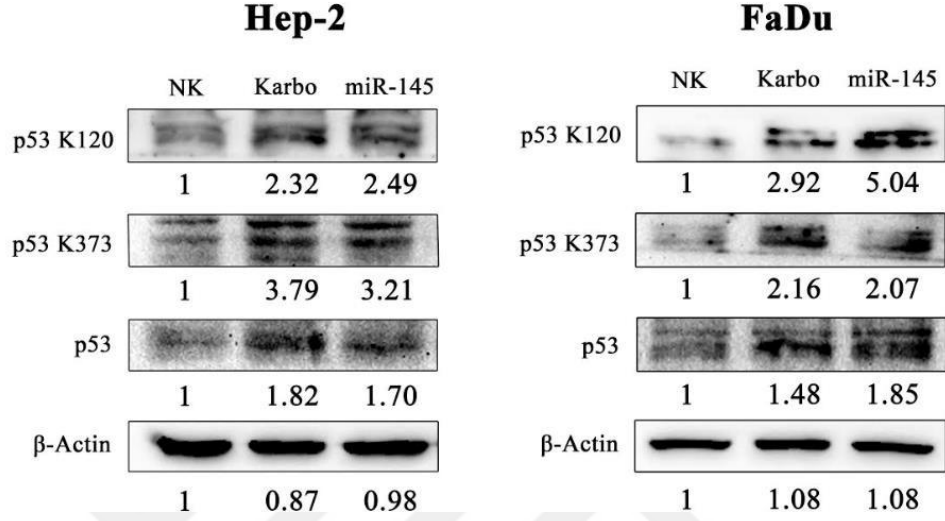
Şekil 4.5. Karboplatin Uygulaması ve Ektopik Mir-145 İfadesinin Mir-145 Hedef Genlerinin İfade Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

4.4 Karboplatin P53 Aktivasyonu ile MiR-145 İfade Seviyesini İndükler

Karboplatinin ana etki mekanizmalarından biri DNA üzerinde çapraz bağlar oluşturarak DNA'yı hasara sürüklemektir. Karboplatin ile DNA hasarı neticesinde aktive olan p53 arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Hep-2 ve FaDu hücrelerinden western blot analizi yapıldı. Karboplatin ile muamele edilen Hep-2 hücrelerinde p53 ifadesinin yaklaşık olarak 1,8 kat arttığı, FaDu hücrelerinde p53 ifadesinin ise yaklaşık olarak 1,4 kat arttığı gözlemlendi. p53'ün K120 residüsünden asetillenmiş versiyonunun miktarının Hep-2 hücrelerinde yaklaşık olarak 2,3 kat arttığı, FaDu hücrelerinde ise yaklaşık olarak 2,9 kat arttığı gözlemlendi. p53'ün K373 residüsünden asetillenmiş versiyonunun miktarının ise Hep-2 hücrelerinde yaklaşık olarak 3,7 kat arttığı, FaDu hücrelerinde ise yaklaşık olarak 2,1 kat arttığı gözlemlendi (Şekil 4.6).

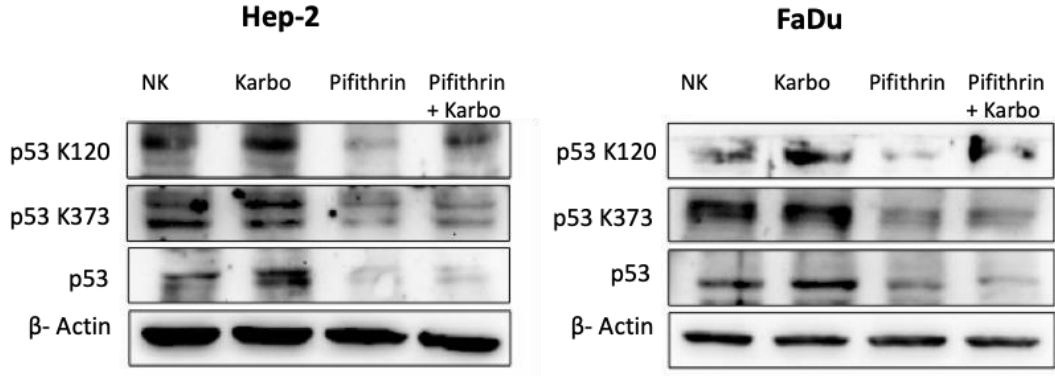
Bu sonuçlar karboplatin uygulamasının baş ve boyun kanseri hücre hatlarında hem p53'ün ifadesini hem de p53'ün aktivasyonunu arttırdığını ortaya koydu. Aynı zamanda, miR-145 ile transfeksiyondan sonra p53 ifade seviyesini değerlendirmek için western blot analizi yapıldı. Hep-2 ve FaDu hücreleri miR-145 ile transfekte edildikten 48 saat sonra hücrelerden protein izolasyonu yapılarak p53 ve asetillenmiş versiyonlarının miktarları incelendi. MiR-145 ile transfeksiyon sonucunda p53 ifade seviyesinin Hep-2 hücrelerinde yaklaşık olarak 1,7 kat arttığı, FaDu hücrelerinde ise p53 ifade seviyesinin yaklaşık olarak 1,8 kat arttığı gözlemlendi. p53'ün K120 residüsünden asetillenmiş versiyonunun miktarının Hep-2 hücrelerinde yaklaşık olarak 2,4 kat, FaDu hücrelerinde ise yaklaşık olarak 5 kat arttığı gözlemlendi. MiR-145 ile transfeksiyondan sonra p53'ün K373 residüsünden

asetillenmiş versiyonunun miktarının ise Hep-2 hücrelerinde yaklaşık olarak 3,2 kat arttığı; FaDu hücrelerinde ise yaklaşık olarak 2 kat arttığı gözlemlendi. (Şekil 4.6). Bu sonuçlar, miR-145'in de p53'ü aktive ederek pro-apoptotik bir etki potansiyeli olduğunu gösterdi.



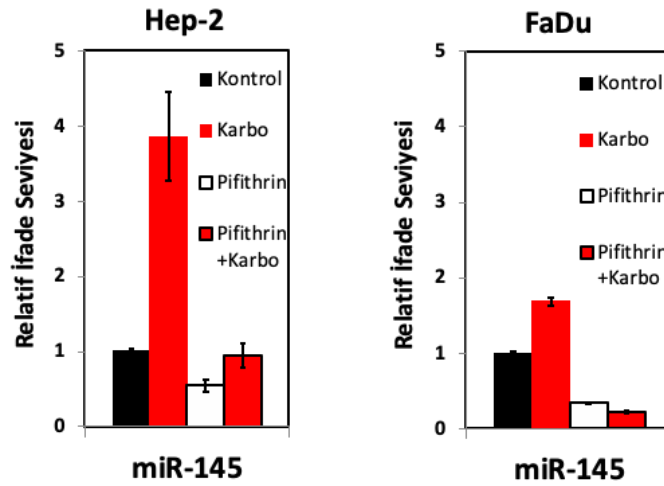
Şekil 4.6. Karboplatin Uygulaması ve Ektopik Mir-145 İfadesi Sonrasında Hücrelerdeki p53 İfade Düzeyi

Karboplatin ve/veya p53 inhibitörü olan pifithrin- α ile muamele sonucunda p53'ün inhibisyonunu protein düzeyinde belirlemek için western blot analizi yapıldı. Karboplatin ve/veya pifithrin- α ile muamele edilen hücrelerden protein izolasyonu yapılarak p53 ve K120 ve K373 residülerinden asetillenmiş versiyonlarının seviyeleri incelendi. Karboplatin ile muamele sonrasında kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında p53 ile K120 ve K373 asetile p53 ifadesinin arttığı belirlendi. Pifithrin- α ile muamele sonrasında ise p53 ile K120 ve K373 asetile p53 ifadesinin azaldığı belirlendi. Karboplatin ve pifithrin- α 'nın kombinasyon halinde uygulandığında ise sadece karboplatin ile muamele edilen duruma göre p53 ve asetillenmiş versiyonlarının ifade seviyelerinin de azaldığı tespit edildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Karboplatin ve/veya Pifithrin- α Uygulaması Sonrasında Hücrelerdeki P53 İfade Düzeyi

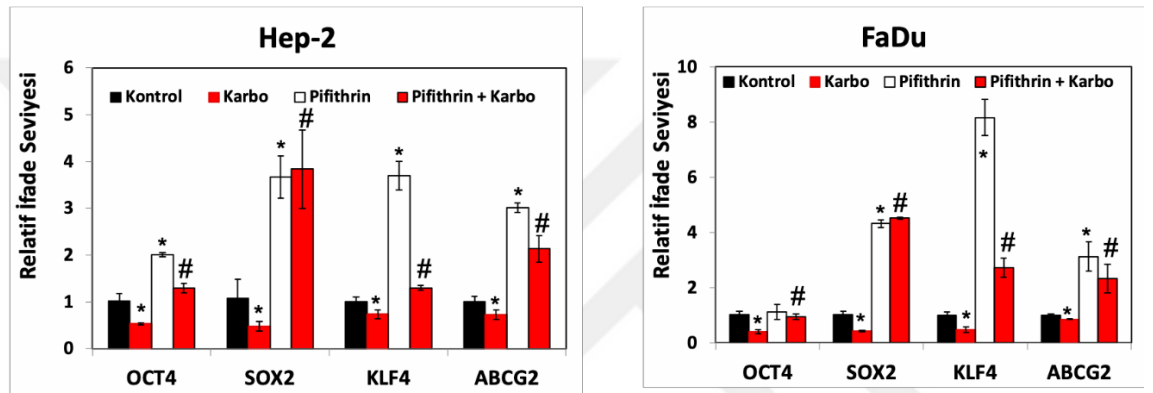
p53'ün, miR-145 ifade seviyesini miR-145'in promotör bölgesine bağlanarak transkripsiyonel olarak aktive ettiği bilindiğinden, Hep-2 ve FaDu hücreleri karboplatin ve/veya p53 inhibitörü olan pifithrin- α ile muamele edilerek miR-145 ifade seviyesindeki değişim incelendi. Hücrelere yalnızca karboplatin verildiğinde miR-145 ifade seviyesinin kontrole göre arttığı belirlendi. Pifithrin- α ile p53 inhibisyonu sonucunda her iki hücre hattında da miR-145 ifade seviyesinin azaldığı tespit edildi. Karboplatin ve pifithrin- α beraber uygulandığında ise kontrole kıyasla miR-145 ifade seviyesinin azaldığı bulundu. Bu bulgular karboplatinin p53 aracılığı ile miR-145 ifadesini deregüle ettiği savını doğrulamaktadır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Karboplatin ve/veya Pifithrin- α Uygulaması Sonrasında Hücrelerdeki miR-145 İfade Düzeyi

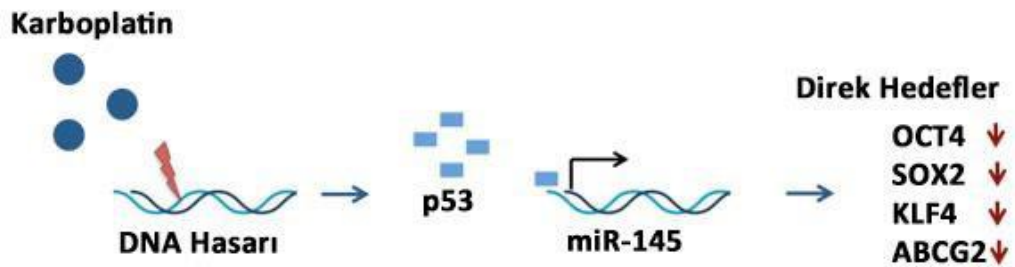
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Karboplatinin miR-145 ifade seviyesini artırdığının bir kanıtı olarak karboplatin ve/veya pifithrin- α uygulamasından sonra miR-145'in hedef genlerinin ifadeleri Hep-2 ve FaDu hücrelerinde mRNA seviyesinde incelendi. Karboplatin uygulamasından sonra miR-145'in ifadesinin artışının yanı sıra her iki hücre hattında da OCT4, SOX2, KLF4, ABCG2 genlerinin ifadesinin azaldığı belirlendi. Pifithrin- α ile p53 inhibisyonu sonucunda da miR-145'in ifade seviyesi azalmasına paralel olarak hedef genlerinin ifadesinin arttığı gösterildi. Bu bulgular karboplatinin hücreleri öldürme mekanizmalarından birinin, miR-145 ve p53 aracılığıyla gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.9 *p<0,05).



Şekil 4.9 Karboplatin ve/veya Pifithrin- α Uygulaması Sonrasında Hücrelerdeki miR-145 Hedef Genlerinin İfade Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

Tüm bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, karboplatinin hücreleri öldürme mekanizmalarından birinin, DNA'ya hasar verme özelliği aracılığıyla gerçekleşen p53 aktivasyonu yoluyla miR-145'in indüksiyonu ve buna paralel olarak miR-145'in hedeflerinin ifadelerinin azalması olduğu ileri sürülebilir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 HNSCC'de P53/Mir-145 Aktivasyonu İle Karboplatinin Mekanizmasının Şematik Gösterimi

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Baş ve boyun kanserleri dünya çapındaki malinitelerin % 3 ila 4'ünü oluşturur ve en sık görülen beşinci kanser türüdür (Alamolhoda et al. 2019). En sık görülen baş ve boyun kanseri tipi ise HNSCC 'dir (Hirata-Nozaki et al. 2019). Her yıl dünya çapında yaklaşık 700.000 hastaya HNSCC teşhisi konmakta ve bu kanser tipiyle ilişkili olarak 350.000 ölüm meydana gelmektedir (Diao et al. 2019; van Harten et al. 2019). Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi klinik müdahalelerdeki ilerlemelere rağmen, baş ve boyun kanseri hastalarının 5 yıllık sağ kalım oranı son 30 yılda önemli ölçüde artış göstermemiştir (Vigneswaran et al. 2011; Park et al. 2015). Bunun ana nedeni, HNSCC'nin başlangıçta mevcut tedavilerle tam veya kısmi iyileşme gösterse de daha sonra lokal veya metastatik olarak nüks etmesidir (Ricco et al. 2019). Larenjiyal ve hipofarenjiyal skuamöz hücreli karsinom, baş ve boyun bölgesinin en yaygın kanser türleridir (Lu et al. 2016). Terapötik modalitelerdeki son gelişmelere rağmen hem larenjiyal hem de hipofarenjiyal kanserli hastaların ortalama hayatta kalma oranları değişmeden kalmıştır.

MikroRNA'lar RNA'ların 3'UTR'sini hedefler ve hem protein kodlayan hem de kodlamayan genlerin post-transkripsiyonel olarak ifadelerini düzenler (Seven et al. 2014). Hücre içi süreçlerin birçoğunu düzenledikleri ve deregülasyonlarının farklı kanser tiplerinin başlaması ve ilerlemesi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kim et al. 2019). MiR-145, OCT4, SOX2, KLF4 ve ABCG2 dahil olmak üzere çok sayıda onkogenik doğrudan hedefe sahip bir tümör baskılayıcı mikroRNA'dır. Akciğer, prostat, meme, kolon, yumurtalık, mide, kolorektal kanser ve larenjiyal skuamöz hücreli karsinomda aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Karatas et al. 2016b; Kim et al. 2019). Bu çalışmada, karboplatin ile muamele edilen hücrelerde miR-145 ve direkt hedeflerinin ifade seviyeleri araştırıldı ve miR-145 ifadesindeki artışla birlikte, doğrudan hedeflerinin seviyelerinde önemli bir düşüş gözlemlendi. Bu bulgular, kanser hücrelerinde karboplatin sitotoksitesisi için önemli bir potansiyel mekanizmaya işaret etmektedir.

Karboplatin, baş boyun kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ajandır (Maring et al. 2018; Szturz et al. 2019). Karboplatinin ana hedefi DNA'dır ve DNA'ya bağlanarak zincirdeki bazlar arasında çapraz bağlar oluşturur

(Shen et al. 2018). Bu çapraz bağlar, DNA replikasyonunu ve onarımını inhibe ederek, transkripsiyon hatalarına ve hücrel fonksiyonların inhibisyonuna yol açar (Shen et al. 2018; Shu 2018). Karboplatin, hücre döngüsü tutuklanmasını teşvik eder, proliferasyonu inhibe eder ve p53 sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla kanser hücrelerinin apoptozunu indükler (de Souza et al. 2014; Zhang et al. 2017). Bununla birlikte, karboplatin sitotoksitesinin mekanizmaları hakkında sınırlı bilgi olduğundan, alternatif etki modellerini ortaya çıkarmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Karboplatin, DNA lezyonlarının oluşumu ve dolayısıyla p53 sinyal yolunun aktivasyonu ile karakterizedir. Hücrede genotoksik stres ve DNA hasarı meydana geldiğinde, lizin 120 ve lizin 373'te asetilasyon meydana gelir ve bu modifikasyonlar, p53 DNA bağlanma aktivitesinin artmasına yol açar (Knights et al. 2006; Sykes et al. 2006). Lizin K120'deki asetilasyon, DNA hasarından sonra hMOF ve TIP60 asetiltransferazlar tarafından hızla gerçekleştirilir; bu, p53'e PUMA ve BAX gibi pro-apoptotik genlere bağlanma potansiyeli sağlar. Ayrıca p300/CBP, DNA hasarı üzerine p53'ün 373. rezidüsünde bulunan lizinleri spesifik olarak asetiller ve p53 N-terminal rezidülerinin hiper-fosforilasyonuna yol açan ve p53'ün pro-apoptotik genlerin promotörleri ile etkileşimini teşvik eden p53 aktivasyonu, hücre ölümüne yol açar (Knights et al. 2006). Bu çalışma ile baş ve boyun kanseri hücrelerinin karboplatin ile muamelesinin p53 ifade seviyesini arttırdığı ve DNA hasarı ile ilişkili K120 ve K373 bölgelerinde asetilasyonunu teşvik ettiği gösterildi.

MiR-145'in promotöründe p53 yanıt elemanlarına sahip olduğu ve miR-145'in ifadesinin transkripsiyonel seviyede p53 aracılığıyla kontrol edildiği gösterilmiştir (Sachdeva et al. 2009; Suh et al. 2011). Karboplatin p53 ifade seviyesini indüklediğinden, karboplatin muamelesi üzerine miR-145'in yukarı regülasyonu ve miR-145 doğrudan hedeflerin aşağı regülasyonu doğrulandı. MiR-145'in artan ifadesinin p53 indüksiyonu ile ilişkisini doğrulamak için, Pifithrin-a kullanarak p53 inhibe edildi ve p53'ün inhibisyonunun, miR-145 ifade seviyesinin baskılanmasıyla sonuçlandığı gösterildi. İlginç bir şekilde, p53 inhibisyonu, miR-145'in karboplatinin sitotoksite potansiyeline katkısı için ikinci bir kanıt sağlayan miR-145 hedef genlerinin ifade seviyelerinin artmasına da yol açtı.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bulgular göz önünde bulundurularak, karboplatinin p53 aracılığıyla miR-145 ifade seviyesini doza bağımlı bir şekilde indüklediği literatürde ilk kez gösterildi. Bu sonuçlar, karboplatinin HNSCC hücrelerini öldürürken kullandığı mekanizmalardan birinin, önemli bir tümör baskılayıcı mikroRNA olan indüklenmiş miR-145 ifadesi yoluyla uygulanabileceğini gösterdi.



KAYNAKLAR

- Aguiar, P.N., Tadokoro, H., da Silva, G.F., Landgraf, M.M., Noia Barreto, C.M., Filardi, B.A., Lopes, G.L., Oliveira, P. and de Mello, R.A. 2016. Definitive chemoradiotherapy for squamous head and neck cancer: cisplatin versus carboplatin? A meta-analysis. *Future Oncol* 12, 2755-2764.
- Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-5.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B. and Aggarwal, B.B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 25, 2097-116.
- Ando, Y., Shimokata, T., Yasuda, Y. and Hasegawa, Y. 2014. Carboplatin dosing for adult Japanese patients. *Nagoya J Med Sci* 76, 1-9.
- Anonim, 2015. Web Sitesi: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, Eriřim Tarihi: 10.01.2021.
- Anonim, 2017. Web Sitesi: <http://dosyasb.saglik.gov.tr/> , Eriřim Tarihi: 10.01.2021.
- Anonim, 2018. Web Sitesi: <https://www.iarc.who.int/featured-news/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-18-1-million-new-cases-and-9-6-million-cancer-deaths-in-2018/>, Eriřim Tarihi: 10.01.2021.
- Anonim, 2020. Web Sitesi: <http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw>, Eriřim Tarihi: 10.01.2021.
- Anonim, 2021. Web Sitesi: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 Eriřim Tarihi: 10.01.2021.
- Balacescu, O., Sur, D., Cainap, C., Visan, S., Cruceriu, D., Manzat-Saplacan, R., Muresan, M.S., Balacescu, L., Lisencu, C. and Irimie, A. 2018. The Impact of miRNA in Colorectal Cancer Progression and Its Liver Metastases. *Int J Mol Sci* 19.
- Barлак, N. 2018. Metforminin larenks kanseri hücre hattı Hep-2 hücreleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve 5-Florourasil ile sinerjistik etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 69, Erzurum.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-97.

- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-6.
- Cai, X., Hagedorn, C.H. and Cullen, B.R. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957-66.
- Cao, P., Zhou, L., Zhang, J., Zheng, F., Wang, H., Ma, D. and Tian, J. 2013. Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 35, 720-8.
- Carvalho, A.L., Nishimoto, I.N., Califano, J.A. and Kowalski, L.P. 2005. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer* 114, 806-16.
- Chen, X., Gong, J., Zeng, H., Chen, N., Huang, R., Huang, Y., Nie, L., Xu, M., Xia, J., Zhao, F., Meng, W. and Zhou, Q. 2010. MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression. *Cancer Res* 70, 2728-38.
- Dasari, S. and Tchounwou, P.B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 740, 364-78.
- Davis-Dusenbery, B.N. and Hata, A. 2010. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem* 148, 381-92.
- de Sousa, G.F., Wlodarczyk, S.R. and Monteiro, G. 2014. Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 50, 701.
- de Souza, C.M., Araújo e Silva, A.C., de Jesus Ferraciolli, C., Moreira, G.V., Campos, L.C., dos Reis, D.C., Lopes, M.T., Ferreira, M.A., Andrade, S.P. and Cassali, G.D. 2014. Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model. *Biomed Pharmacother* 68, 51-7.
- De Virgilio, A., Iocca, O., Malvezzi, L., Di Maio, P., Pellini, R., Ferreli, F., Cugini, G., Colombo, G. and Spriano, G. 2019. The Emerging Role of Robotic Surgery among Minimally Invasive Surgical Approaches in the Treatment of Hypopharyngeal Carcinoma: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med* 8.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. and Hannon, G.J. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-5.
- Diao, P., Song, Y., Ge, H., Wu, Y., Li, J., Zhang, W., Wang, Y. and Cheng, J. 2019. Identification of 4-lncRNA prognostic signature in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cell Biochem* 120, 10010-10020.

- Dibek, N.D. 2018. Department of molecular biology and genetic master of science. Yüksek Lisans Tezi, Biruni Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı, 90, İstanbul.
- Ding, Y., Wu, Y., Gao, W., Zhang, C., Zhao, Q., Guo, H., Qu, X., Wen, S. and Wang, B. 2017. Analysis of gene expression profiling variations induced by hsa-miR-145-5p-overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma cell line Tu-177. *Mol Med Rep* 16, 5863-5870.
- Economopoulou, P., de Bree, R., Kotsantis, I. and Psyrris, A. 2019. Diagnostic Tumor Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) in the Clinical Setting. *Front Oncol* 9, 827.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102-14.
- Griffiths-Jones, S. 2004. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32, D109-11.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A. and Enright, A.J. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34, D140-4.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S. and Enright, A.J. 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36, D154-8.
- Guha, N., Boffetta, P., Wunsch Filho, V., Eluf Neto, J., Shangina, O., Zaridze, D., Curado, M.P., Koifman, S., Matos, E., Menezes, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Fernandez, L., Mates, D., Daudt, A.W., Lissowska, J., Dikshit, R. and Brennan, P. 2007. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol* 166, 1159-73.
- Ha, M. and Kim, V.N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 509-24.
- Hammond, S.M. 2015. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 87, 3-14.
- Helliwell, T.R. 2003. acp Best Practice No 169. Evidence based pathology: squamous carcinoma of the hypopharynx. *J Clin Pathol* 56, 81-5.
- Hirata-Nozaki, Y., Ohkuri, T., Ohara, K., Kumai, T., Nagata, M., Harabuchi, S., Kosaka, A., Nagato, T., Ishibashi, K., Oikawa, K., Aoki, N., Ohara, M., Harabuchi, Y., Uno, Y., Takei, H., Celis, E. and Kobayashi, H. 2019. PD-L1-specific helper T-cells exhibit effective antitumor responses: new strategy of cancer immunotherapy targeting PD-L1 in head and neck squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 17, 207.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I. and Preiss, T. 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16961-6.

- Kanapathipillai, M. 2018. Treating p53 Mutant Aggregation-Associated Cancer. *Cancers (Basel)* 10.
- Karatas, O.F., Suer, I., Yuceturk, B., Yilmaz, M., Oz, B., Guven, G., Cansiz, H., Creighton, C.J., Ittmann, M. and Ozen, M. 2016a. Identification of microRNA profile specific to cancer stem-like cells directly isolated from human larynx cancer specimens. *BMC Cancer* 16, 853.
- Karatas, O.F., Yuceturk, B., Suer, I., Yilmaz, M., Cansiz, H., Solak, M., Ittmann, M. and Ozen, M. 2016b. Role of miR-145 in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 38, 260-6.
- Karataş, Ö.F. 2014. İnsan skuamöz hücreli larenks karsinomunda kanser kök hücrelerine özgü miRNA'ların profillenmesi ve mir-145'in larenks kanseri ve kanser kök hücrelerindeki fonksiyonunun araştırılması
- Kawakita, D. and Matsuo, K. 2017. Alcohol and head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 36, 425-434.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. and Plasterk, R.H. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15, 2654-9.
- Kim, S., Choi, M.C., Jeong, J.Y., Hwang, S., Jung, S.G., Joo, W.D., Park, H., Song, S.H., Lee, C., Kim, T.H. and An, H.J. 2019. Serum exosomal miRNA-145 and miRNA-200c as promising biomarkers for preoperative diagnosis of ovarian carcinomas. *J Cancer* 10, 1958-1967.
- Kınış, V. 2008. Larenks kanseri tümör (T) evrelemesinde teşhis yöntemlerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması, T.C Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi II. Kulak Burun Boğaz Kliniği, Uzmanlık Tezi, 65, İstanbul.
- Knights, C.D., Catania, J., Di Giovanni, S., Muratoglu, S., Perez, R., Swartzbeck, A., Quong, A.A., Zhang, X., Beerman, T., Pestell, R.G. and Avantaggiati, M.L. 2006. Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J Cell Biol* 173, 533-44.
- Krol, J., Loedige, I. and Filipowicz, W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.
- Lee, E.J., Egorin, M.J., Van Echo, D.A., Cohen, A.E., Tait, N. and Schiffer, C.A. 1988. Phase I and pharmacokinetic trial of carboplatin in refractory adult leukemia. *J Natl Cancer Inst* 80, 131-5.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-54.

- Li, L. and Zhang, Z.T. 2019. Genetic Association between. *Dis Markers* 2019, 6523837.
- Liu, H., Zang, C., Scheffe, J.H., Schwarzlose-Schwarck, S., Regierer, A.C., Elstner, E., Schulz, C.O., Scholz, C., Possinger, K. and Eucker, J. 2011. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to the cytotoxic effect of carboplatin in breast cancer in vitro. *Anticancer Res* 31, 2713-22.
- Lo Nigro, C., Denaro, N., Merlotti, A. and Merlano, M. 2017. Head and neck cancer: improving outcomes with a multidisciplinary approach. *Cancer Manag Res* 9, 363-371.
- Lokich, J. and Anderson, N. 1998. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Ann Oncol* 9, 13-21.
- Lu, W., Feng, L., Li, P., Wang, Y., Du, Y., Chen, X., Wu, S., Zhao, G. and Lou, W. 2016. Effects of HPV-16 infection on hypopharyngeal squamous cell carcinoma and FaDu cells. *Oncol Rep* 35, 99-106.
- Ma, R., Jiang, T. and Kang, X. 2012. Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res* 31, 38.
- Majid, S., Dar, A.A., Saini, S., Yamamura, S., Hirata, H., Tanaka, Y., Deng, G. and Dahiya, R. 2010. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer* 116, 5637-49.
- Mariah-Singh, D. and Raymakers, E. 2018. What is the cancer? Information on cancer for patients and family. *CANSA* 19, 437-896.
- Maring, S., Elsayad, K., Stenner, M., Rudack, C., Haverkamp, U., Rehkämper, J., Wardelmann, E. and Eich, H.T. 2018. Efficacy of Carboplatin/Paclitaxel-Based Radiochemotherapy in Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck. *Oncol Res Treat* 41, 736-743.
- Mo, Y.Y. 2012. MicroRNA regulatory networks and human disease. *Cell Mol Life Sci* 69, 3529-31.
- Mura, F., Bertino, G., Occhini, A. and Benazzo, M. 2013. Surgical treatment of hypopharyngeal cancer: a review of the literature and proposal for a decisional flow-chart. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 33, 299-306.
- Nottrott, S., Simard, M.J. and Richter, J.D. 2006. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1108-14.
- Obid, R., Redlich, M. and Tomeh, C. 2019. The Treatment of Laryngeal Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 31, 1-11.
- Olsen, P.H. and Ambros, V. 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216, 671-80.

- Park, M.R., Kim, S.G., Cho, I.A., Oh, D., Kang, K.R., Lee, S.Y., Moon, S.M., Cho, S.S., Yoon, G., Kim, C.S., Oh, J.S., You, J.S., Kim, D.K., Seo, Y.S., Im, H.J. and Kim, J.S. 2015. Licochalcone-A induces intrinsic and extrinsic apoptosis via ERK1/2 and p38 phosphorylation-mediated TRAIL expression in head and neck squamous carcinoma FaDu cells. *Food Chem Toxicol* 77, 34-43.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J. and Sharp, P.A. 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21, 533-42.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. and Filipowicz, W. 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309, 1573-6.
- Pracy, P., Loughran, S., Good, J., Parmar, S. and Goranova, R. 2016. Hypopharyngeal cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol* 130, S104-S110.
- Raisch, J., Darfeuille-Michaud, A. and Nguyen, H.T. 2013. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroenterol* 19, 2985-96.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-6.
- Ricci, C., Marzocchi, C. and Battistini, S. 2018. MicroRNAs as Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells* 7.
- Ricco, N., Flor, A., Wolfgeher, D., Efimova, E.V., Ramamurthy, A., Appelbe, O.K., Brinkman, J., Truman, A.W., Spiotto, M.T. and Kron, S.J. 2019. Mevalonate pathway activity as a determinant of radiation sensitivity in head and neck cancer. *Mol Oncol* 13, 1927-1943.
- Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S., Elble, R., Watabe, K. and Mo, Y.Y. 2009. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3207-12.
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H.R., Soleymani Fard, S. and Ghaffari, S.H. 2018. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*.
- Seven, M., Karatas, O.F., Duz, M.B. and Ozen, M. 2014. The role of miRNAs in cancer: from pathogenesis to therapeutic implications. *Future Oncol* 10, 1027-48.
- Shen, B., Mao, W., Ahn, J.C., Chung, P.S. and He, P. 2018. Mechanism of HN-3 cell apoptosis induced by carboplatin: Combination of mitochondrial pathway associated with Ca²⁺ and the nucleus pathways. *Mol Med Rep* 18, 4978-4986.
- Shu, W. 2018. Downregulation of high mobility group protein box-1 resensitizes ovarian cancer cells to carboplatin. *Oncol Lett* 16, 4586-4592.

- Suh, S.O., Chen, Y., Zaman, M.S., Hirata, H., Yamamura, S., Shahryari, V., Liu, J., Tabatabai, Z.L., Kakar, S., Deng, G., Tanaka, Y. and Dahiya, R. 2011. MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis* 32, 772-8.
- Sundermann, B.V., Uhlmann, L., Hoffmann, J., Freier, K. and Thiele, O.C. 2018. The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases. *J Craniomaxillofac Surg* 46, 177-182.
- Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S. and McMahon, S.B. 2006. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* 24, 841-51.
- Szturz, P., Cristina, V., Herrera Gómez, R.G., Bourhis, J., Simon, C. and Vermorken, J.B. 2019. Cisplatin Eligibility Issues and Alternative Regimens in Locoregionally Advanced Head and Neck Cancer: Recommendations for Clinical Practice. *Front Oncol* 9, 464.
- Van Harten, A.M., Buijze, M., van der Mast, R., Rooimans, M.A., Martens-de Kemp, S.R., Bachas, C., Brink, A., Stigter-van Walsum, M., Wolthuis, R.M.F. and Brakenhoff, R.H. 2019. Targeting the cell cycle in head and neck cancer by Chk1 inhibition: a novel concept of bimodal cell death. *Oncogenesis* 8, 38.
- Vigneswaran, N., Wu, J., Song, A., Annapragada, A. and Zacharias, W. 2011. Hypoxia-induced autophagic response is associated with aggressive phenotype and elevated incidence of metastasis in orthotopic immunocompetent murine models of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Exp Mol Pathol* 90, 215-25.
- Wadhawan, A., Chatterjee, M. and Singh, G. 2019. Present Scenario of Bioconjugates in Cancer Therapy: A Review. *Int J Mol Sci* 20.
- Wang, Y. and Lee, C.G. 2009. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. *J Cell Mol Med* 13, 12-23.
- Westholm, J.O. and Lai, E.C. 2011. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 93, 1897-904.
- Yang, W., Jiang, C., Xia, W., Ju, H., Jin, S., Liu, S., Zhang, L., Ren, G., Ma, H., Ruan, M. and Hu, J. 2019. Blocking autophagy flux promotes interferon-alpha-mediated apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 451, 34-47.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-6.
- Yıldız, S. 2014. Kümeleme ve Türkiye'de kanser kümelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Beykent Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü İşletme Yönetimi Ana Bilim Dalı, 177, İstanbul


- Yu, X., Zheng, H., Chan, M.T. and Wu, W.K. 2017. Modulation of chemoresponsiveness to platinum-based agents by microRNAs in cancer. *Am J Cancer Res* 7, 1769-1778.
- Zamore, P.D. and Haley, B. 2005. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* 309, 1519-24.
- Zang, H., Peng, J., Wang, W. and Fan, S. 2017. Roles of microRNAs in the resistance to platinum based chemotherapy in the non-small cell lung cancer. *J Cancer* 8, 3856-3861.
- Zhang, J., Xiong, X., Hua, X., Cao, W., Qin, S., Dai, L., Liang, P., Zhang, H. and Liu, Z. 2017. Knockdown of FUSE binding protein 1 enhances the sensitivity of epithelial ovarian cancer cells to carboplatin. *Oncol Lett* 14, 5819-5824.



EK-1

Tezden Üretilmiş Yayınlar:

Mode of Action of Carboplatin Via Activating p53/miR-145 Axis in Head and Neck Cancers

Ahsen Kilic, BSc; Neslisah Barlak, MSc; Fatma Sanli, MSc; Abdumelik Aytatli, BSc; Ozel Capik, MSc; Omer F. Karatas, PhD 

Objectives: In this study, we aimed at investigating the expressions of miR-145 and its well-characterized direct targets on carboplatin treatment.

Study Design: Laboratory study.

Methods: The effect of carboplatin and miR-145 on the proliferative capacity of head and neck squamous cell carcinoma cells was evaluated using Cell Viability Detection Kit-8. Expressions of miR-145 and its targets were evaluated using quantitative real-time polymerase chain reaction on carboplatin treatment and p53 inhibition. Western blot was used to measure the levels of p53 and its acetylated versions in cells treated with carboplatin and/or pifithrin- α .

Results: We demonstrated that carboplatin induced the expression of miR-145 in a dose-dependent manner and suppressed the expressions of miR-145 direct targets. In addition, we showed that inhibition of p53 by pifithrin- α in carboplatin-treated cells reduced miR-145 expression and reversed the suppression of miR-145 direct targets.

Conclusions: Considering all these findings together, one of the proposed mechanisms of carboplatin to kill cells might be the induction of miR-145 and deregulation of its targets in parallel, via p53 activation, which happens through carboplatin's DNA-damaging property. To the best of our knowledge, these findings are the first to reveal the relationship between carboplatin and miR-145 in cancer cells.

Key Words: Head and neck cancer, carboplatin, p53, miR-145, microRNA.

Level of Evidence: NA

Laryngoscope, 130:2818–2824, 2020