

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLOREKTAL KANSERLERDE METASTAZI
KONTROL EDEN
POST-GENOMİK SÜREÇLER**

GİZEM ÇALIBAŞI KOÇAL

TEMEL ONKOLOJİ
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2016

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2011970065

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLOREKTAL KANSERLERDE METASTAZI
KONTROL EDEN
POST-GENOMİK SÜREÇLER**

TEMEL ONKOLOJİ
DOKTORA TEZİ

GİZEM ÇALIBAŞI KOÇAL

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Yasemin BASKIN

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2012.KB.SAG.003 sayı ile; ve TÜBİTAK 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs
Programı tarafından B.14.2.TBT.0.06.01-214-6041 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc/PhD-201197006

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü *Onkoloji* Anabilim Dalı, *Temel Onkoloji* Doktora programı öğrencisi **Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL**, '**KOLOREKTAL KANSERLERDE METASTAZI KONTROL EDEN POST-GENOMİK SÜREÇLER**' konulu *Doktora* tezini 30 Haziran 2016 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Doç.Dr.Yasemin BASKIN

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr.İlhan ÖZTOP

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr.Süleyman SARIOĞLU

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü

Doç.Dr.Türkan YİĞİTBAŞI

ÜYE

İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Prof.Dr.H. Nur OLGUN

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr.Uğur YILMAZ

YEDEK ÜYE

İzmir Üniversitesi, Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİN	vi
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	4
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	4
1.2. Araştırmanın Amacı	5
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Kolorektal Karsinoma.....	6
2.1.1. Epidemiyoloji	6
2.1.2. Etiyoloji	6
2.1.3. Kolon ve Rektumun Anatomisi	7
2.1.4. Kolorektal Kanseri Tanısı ve Evrelemesi	7
2.1.5. Histolojik Tip.....	9
2.1.6. Tedavi	10
2.2. Kolorektal Kanseri Gelişiminin Moleküler Genetik Temeli	10
2.2.1. Kolorektal Kanserde Çok Basamaklı Karsinogenez Modeli	10
2.2.2. Onkogenlerin ve Sinyal Yollarının Aktivasyonu.....	14
2.2.2.1. EGFR Sinyal Yolu ve Aktivasyonu.....	14
2.2.2.2. RAS/RAF/MEK Sinyal Yolu	15
2.2.2.3. PI3K/AKT/mTOR Yolu	17
2.3. Kolorektal Kanseri Metastazı ve Moleküler Genetik Temeli.....	19
2.3.1. Epitelyal-Mezenkimal Transisyon ve Mezenkimal-Epitelyal Transisyon Kavramları	19
2.3.2. Kolorektal Kanserde EMT Sürecinin Transkripsiyonel Düzenlenmesi	20

2.3.3. Kolorektal Kanserin EMT Süreci ile İlişkili Sinyal Yolakları	23
2.3.4. Kolorektal Kanserin EMT Sürecinde Etkili Olan Kodlamayan RNA'lar	24
2.3.5. Kolorektal Kanserin EMT Sürecinde Mikroçevre.....	27
2.4. Fiziksel Mikroçevrenin EMT'ye Etkisi	29
2.4.1. Fiziksel Mikroçevre	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Araştırmanın Tipi	37
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	37
3.3. Araştırmanın Örneklemi	37
3.4. Çalışma Materyali	37
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	37
3.6. Veri Toplama Araçları.....	37
3.6.1. Hücre Hatları ve Statik Hücre kültürü	37
3.6.2. Mikrofluidik Çiplerin Dizaynı ve Üretimi	39
3.6.3. Hücrelerin Mikrofluidik Çipe Ekilmesi ve Tüp Bağlantılarının Yapılması ..	40
3.6.4. Mikrofluidik Çiplerle Dinamik Kültür Deneylerinin Optimizasyonu	43
3.6.5. Dinamik Kültür Optimizasyonunda Canlılık Analizi.....	43
3.6.6. Mikrofluidik Çip Platformundaki Sıvı Akışının Bilgisayar Modellemesi	44
3.6.6.1 Sıvı Akış Geriliminin Teorik Olarak Hesaplanması.....	44
3.6.6.2. Sıvı Akım Geriliminin- 'Shear stres' Numerik Simülasyonu	45
3.6.7. Deney Koşullarının Belirlenmesi	46
3.6.8. Proliferasyonu Belirlemek için Canlılık Analizi	48
3.6.9. Floresan İmmünohistokimya	49
3.6.10. miRNA Ekspresyon Analizi	51
3.6.11. mRNA Transkriptom Analizleri	51
3.6.12. miRNA Ekspresyon ve mRNA Transkriptom Analizlerinin Doğrulanması	53
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	54
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	55
3.8.1. İmmünohistokimya Değerlendirmesi ve İstatistiksel Analiz	55
3.8.2. mRNA Transkriptomik Veri Analizi	55
3.8.3. miRNA'lara Özgü Hedef Tahmini	55

3.8.4. Sıcaklık Haritası (Heat Map) Analizi	55
3.8.5. Yolak Analizi	56
3.8.6. Gen Ontoloji Analizi	56
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	56
3.10. Etik Kurul Onayı	57
4. BULGULAR.....	58
4.1. Kolorektal Kanser Hücrelerinin Çoğaltılması	58
4.2. Mikrofluidik Çipte Dinamik Kültür Optimizasyonu	59
4.3. Mikrofluidik Sıvı Skışımın ve Sıvı Seriliminin Hesaplanması	61
4.4. Proliferasyon Deneyleri ve Standart Eğriler.....	62
4.5. Dinamik Hücre Kültürü	62
4.5.1. Mikrofluidik Dinamik Kültür Etkisiyle Hücre Proliferasyonunda Oluşan Farklılıklar	63
4.5.2. Mikrofluidik Sıvı Akışının Etkisiyle Kopan Hücreler	65
4.6. Floresan İmmünohistokimya	66
4.7. miRNA Ekspresyon Analizi	69
4.8. mRNA Transkriptom Analizi	73
4.9. miRNA Ekspresyon ve mRNA Transkriptom Analizlerinin Doğrulanması	78
4.10. Biyoinformatik Analizler.....	80
4.10.1. Gen Ontoloji Analizleri	80
4.10.1.1. Anjiyogenezin Düzenlenmesi (GO:0001525)	80
4.10.1.2. Apoptozun Negatif Düzenlenmesi (GO:0043066)	83
4.10.1.3. Apoptozun Düzenlenmesi (GO:0042981)	85
4.10.1.4. Antijen İşlenmesi ve Sunumu (KEGG Pathway- hsa04612).....	87
5. TARTIŞMA.....	90
5.1. Mikrofluidik Çipte Dinamik Kültür Optimizasyonu	90
5.2. Mikrofluidik Sıvı Skışımın ve Sıvı Geriliminin Hesaplanması.....	90
5.3. Mikrofluidik dinamik kültür etkisiyle hücre proliferasyonunda oluşan farklılıklar.....	91
5.4. Mikrofluidik Sıvı Akışı Etkisiyle Kopan Hücreler.....	92
5.5. Floresan İmmünohistokimya	92

5.6. miRNA Ekspresyon Analizi	93
5.6.1. HCT-116 hücrelerindeki miRNA ekspresyonları.....	93
5.6.2. HT-29 hücrelerindeki miRNA ekspresyonlar.....	97
5.7. mRNA Transkriptom Analizi	101
5.8. Biyoinformatik analizler	102
5.8.1. Gen Ontoloji Analizleri.....	102
5.8.1.1. Anjiyogenezin düzenlenmesi (GO:0001525)	102
5.8.1.2. Apoptozun negatif düzenlenmesi (GO:0043066).....	106
5.8.1.3. Apoptozun düzenlenmesi süreci (GO:0042981)	111
5.8.1.4. Antijen işlenmesi ve sunumu yolağı (KEGG Pathway hsa04612).....	113
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	118
7. KAYNAKLAR	122
8. EKLER	139
8.1. Etik Kurul Onayı	139
8.2. Özgeçmiş ve Yayın Listesi	140

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. KRK gelişiminde etkili olan faktörler	6
Tablo 2. Kolorektal kanserlerde TNM evreleme sistemi	8
Table 3. EMT ve kolorektal kanser metastazının düzenlenmesinde görev alan transkripsiyon faktörleri	22
Tablo 4. EMT ile ilişkili mikro-RNA'lar	25
Tablo 5. HCT-116 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasında istatistiksel olarak değişim gösteren miRNA'ların sinyal değerleri, değişim katları ve p-değerleri	71
Tablo 6. HT-29 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasında istatistiksel olarak değişim gösteren miRNA'ların sinyal değerleri, değişim katları ve p-değerleri	73
Tablo 7. HCT-116 hücrelerinde dinamik ve statik kültürler arasındaki istatistiksel olarak anlamlılık gösteren mRNA ekspresyonları	75
Tablo 8. HT-29 hücrelerinde dinamik ve statik kültürler arasındaki istatistiksel olarak anlamlılık gösteren mRNA ekspresyonları	77
Tablo 9. Anjiyogenez sürecinde etkin olabilecek mRNA ve miRNA'lar	83
Tablo 10. Apoptozun negatif düzenlenmesinde etkin olabilecek mRNA ve miRNA'lar	85
Tablo 11. Apoptozun düzenlenmesi sürecinde etkin olabilecek mRNA ve miRNA'lar	87
Tablo 12. Antijen işlenmesi ve sunumu yolağında sürecinde etkin olabilecek mRNA ve miRNA'lar	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Kolon ve rektum anatomisi	7
Şekil 2. Kolorektal kanserde multi-step karsinogenez	12
Şekil 3. Wnt/ β -catenine sinyal yolağı	13
Şekil 4. p53 yolağı	13
Şekil 5. EGFR aracılı sinyal yolağı	15
Şekil 6. RAS/RAF/MEK sinyal yolağı	16
Şekil 7. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı	17
Şekil 8. Metastazın basamakları	19
Şekil 9. Metastaz sürecinde, epitelyal-mezenşimal ve mezenşimal-epitelyal transisyon ...	20
Şekil 10. Epitelyal mezenşimal transizyonda etkili düzenleyiciler	21
Şekil 11. Kolorektal kanserde EMT ilişkili sinyal yolakları ve tümör mikroçevresi	24
Şekil 12. Tümör mikroçevresi bileşenleri	28
Şekil 13. Tümör mikroçevresinde, hücre fenotipini değiştiren biyomekanik güçler	30
Şekil 14. Mikrofluidik teknolojilerinin kanser alanındaki yeri	34
Şekil 15. Kanser araştırmalarında kullanılan mikrofluidik teknolojilerinin gösterimi	35
Şekil 16. Biyolojik sistemlerde çoklu-omiks teknolojileri ile genomdan fenomiğe	36
Şekil 17. Mikrofluidik çipin ölçüleri	40
Şekil 18. Mikrofluidik çipin bileşenleri	40
Şekil 19. Mikrofluidik çiplerin içine hücre ekilmesi	41
Şekil 20. Gaz geçirgen tüp bağlantılarının yapılması	42
Şekil 21. İnkübatör içinde mikrofluidik çip platformu	42
Şekil 22. Numerik sıvı dinamizm simülasyonu	46
Şekil 23. Projenin deneysel şeması	47
Şekil 24. Presto Blue viability/proliferation assay	49
Şekil 25. Agilent Bioanalyzer ile RNA kalitesinin kontrol edilmesi	52
Şekil 26. HCT-116 hücrelerinin kültür süresince gözlenen mikroskopik görüntüleri	58
Şekil 27. HT-29 hücrelerinin kültür süresince gözlenen mikroskopik görüntüler	58
Şekil 28. Mikrofluidik çiplerde sızıntı problemleri	59
Şekil 29. Farklı sıvı akış hızları uygulanan HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin görüntüleri ..	60

Şekil 30. HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin Live (Yeşil)- Dead (Kırmızı) Viability Assay floresans mikroskopi görüntüleri	60
Şekil 31. Mikrofluidik çipte sıvı gerilim dağılımları	61
Şekil 32. HCT-116 hücre hattına ait standart eğri grafiği	62
Şekil 33. HT-29 hücre hattına ait standart eğri grafiği	62
Şekil 34. Deney grupları ve deney planı	63
Şekil 35. HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin 72 saat sonra dinamik ve statik kültürleri	64
Şekil 36. Dinamik ve statik kültür altında bulunan HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin bulunduğu çiplerin 72 saat sonraki mozaik görüntüleri	64
Şekil 37. Mikrofluidik dinamik ve statik kültürlerde HCT-116 ve HT-29 hatlarına ait hücre sayıları	65
Şekil 38. Mikrofluidik dinamik kültürde sıvı akışı etkisiyle kopan hücrelerin oluşturduğu koloniler	66
Şekil 39. HCT-116 hücrelerinin floresans immünohistokimya görüntüleri	66
Şekil 40. HT-29 hücrelerinin floresans immünohistokimya görüntüleri	67
Şekil 41. HCT116 hücrelerinde floresans immünohistokimya ile saptanan E-kaderin, N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarının yoğunluklarına ait grafikler	68
Şekil 42. HT-29 hücrelerinde floresans immünohistokimya ile saptanan E-kaderin, N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarının yoğunluklarına ait grafikler	68
Şekil 43. HCT-116 hücrelerinin olduğu mikrofluidik kanalın floresans mikroskopi görüntüsü	69
Şekil 44. HT-29 hücrelerinin olduğu mikrofluidik kanalın floresans mikroskopi Görüntüsü	69
Şekil 45. HCT-116 hücreleriyle uygulanan dinamik ve statik kültür ortamlarındaki miRNA ekspresyon analizine ait sıcaklık haritası	70
Şekil 46. HCT-116 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasında istatistiksel olarak değişim gösteren miRNA'lar ve değişim katsayıları	70
Şekil 47. HT-29 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasındaki miRNA ekspresyon analizine ait sıcaklık haritası	72
Şekil 48. HT-29 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasında istatistiksel olarak değişim gösteren miRNA'lar ve değişim katsayıları	72

Şekil 49. HCT-116 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasındaki mRNA transkriptom analizine ait sıcaklık haritası	74
Şekil 50. HT-29 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasındaki mRNA transkriptom analizine ait sıcaklık haritası.....	76
Şekil 51. AKR1B10 ve TP53INP1'in ekspresyon durumlarına ait amplifikasyon eğrileri 78	
Şekil 52. IFI6 ve TP53INP1'in ekspresyon durumlarına ait amplifikasyon eğrileri.....	79
Şekil 53. mir-10a-5p'nin ekspresyon durumlarına ait amplifikasyon eğrileri	79
Şekil 54. Biyoinformatik analizlerin akışı.....	80
Şekil 55. HCT-116 hücrelerinde gen ontoloji analizi-anjiyogenez süreci	82
Şekil 56. HCT-116 hücrelerinde gen ontoloji analizi- apoptozun negatif düzenlenmesi Süreci	84
Şekil 57. HCT-116 hücrelerinde gen ontoloji analizi- apoptozun düzenlenmesi süreci	86
Şekil 58. HCT-116 hücrelerinde gen ontoloji analizi- KEGG antijen işlenmesi ve Sunumu	88
Şekil 59. Tümör immünolojisinde ısı şok proteinlerinin (HSP) rolü	115
Şekil 60. Antijen işlenmesi ve sunumu ile KLRD1 geni arasındaki ilişki	117

KISALTMALAR

KRK:	Kolorektal kanserler
5-FU:	5-Fluorourasil
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
CIN:	Kromozomal dengesizlik
MSI:	Mikrosatellit dengesizliği
TSG:	Tümör baskılayıcı genlerden
APC:	Adenomatöz polipozis koli
DCC:	'Deleted in colorectal carcinogenesis' tümör baskılayıcı geni
RTK:	Tirozin kinaz reseptörüdür
PI3K:	Fosfatidilinozitol-3-kinaz
MAPK:	Mitojen aktive edici protein kinaz
mTOR:	Rapamisin'in memelilerdeki hedefi
PIP2:	Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat
PIP3:	Fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat
PDGF:	Platelet kökenli büyüme faktörü
EGF:	Epidermal büyüme faktörü
bFGF:	Fibroblast büyüme faktörü
EMT:	Epitelyal-mezenkimal transisyon
MET:	Mezenkimal-epitelyal transisyon
mKRK:	Metastatik kolorektal kanser
ECM:	Ekstraselüler matriks
TGF- beta:	Transforme edici büyüme faktör- beta
miRNA:	mikroRNA
miR:	mikroRNA
CAF:	Karsinoma ilişkili fibroblastlar
ATCC:	<i>American Type Culture Collection</i>
FBS:	Fötal sığır serumu
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PMMA:	Polimetilmetakrilat

DSA: Çift taraflı adeziv film

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

mm: Milimetre

µm: Mikrometre

mM: Milimolar

µM: Mikromolar

Dk: Dakika



TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmanın haklı gururunu taşıdığım, tüm lisansüstü eğitim hayatım boyunca benden desteğini esirgemeyen, bilimsel değerleriyle birlikte insani değerleriyle de örnek alacağım, akademik danışman kimliğinin hakkını vermekten hiçbir zaman kaçınmayan çok değerli Hocam, Doç.Dr.Yasemin Baskın'a;

Deneysel çalışmalarımı yürüttüğüm Harvard Üniversitesi, Harvard-MIT (Massachusetts Institute of Technology) Health Sciences (Boston, ABD) ve Stanford Üniversitesi, Canary Center for Early Cancer Detection (Palo Alto, ABD)'nde öğretim üyesi olan Doç.Dr.Utkan Demirci'ye ve onun yönetimindeki tüm BAMM Laboratories ekibine ve Yard.Doç.Dr. Sinan Güven'e;

Yurtdışında bulunduğum süre boyunca, 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na;

Doktora tez projemi bütçe açısından destekleyen DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri'ne, Biyoinformatik analizlerim sırasında yardımını esirgemeyen Yard.Doç.Dr.Zerrin Işık'a;

Kıymetli öneri ve deneyimlerini paylaşarak yol gösteren saygıdeğer Onkoloji Enstitüsü müdürümüz Prof. Dr. Nur Olgun'a, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma ve Onkoloji Enstitüsü idari personeline;

Tez İzleme Kurulu'nda ve Tez Jürisi'nde bulunarak çok değerli önerilerini paylaşan ve vakitlerini ayıran kıymetli hocalarıma;

Laboratuvarda çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz ama çalışma arkadaşından çok daha fazlası olan çok sevdiğim dostlarıma;

Bende her zaman hatırı olacak olan Volha Liaudankaya'ya;

Her zor anımda yanımda olduğunu gösteren, varlığıyla bana destek veren teyzem Rasime Sertdemir'e;

Her koşulda yanımda olduklarını sonsuz anlayışları, destekleri ve sevgileriyle bana hissettiren canım annem, babam, ablam ve enişteme;

Hayatıma girdiği andan itibaren sevgisi, hoşgörüsü, sabrı ve güler yüzüyle herşeyi daha güzel ve kolay kılan, eşim Ersin Koçal'a yanımda olduğu her an için;

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum....

Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL

İzmir, Haziran 2016

ÖZET

Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL, MSc

Yazışma adresi: Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü,
Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İZMİR

Kanserin oluşumu ve metastatik fenotip kazanarak ilerlemesi, sadece genetik mutasyonların oluşumuna bağlı olmayan kompleks bir süreçtir. Peritoneal sıvı akışları, sıvı gerilimleri, mikroçevrenin asiditesi veya aşırı proliferasyon gösteren tümör kitlesinin etkisiyle değişen anormal intertisyel sıvı paternleri gibi tümör mikroçevresinin fiziksel özellikleri, kanser hücresinin proliferasyonu, immün sistemden kaçışı, epitelyal-mezenşimal transisyon ve metastaz gibi patofizyolojik fonksiyonları etkilemektedir. Tümör mikroçevresinin fiziksel parametreleri ile değişiklik gösteren fenotipik değişiklikler mikrofluidik sistemler ile hedeflenebilmektedir. Bu araştırmanın amacı, mikrofluidik kültür teknikleri kullanarak vücuttaki sürekli sıvı akışının ve sıvı geriliminin kolorektal kanserin metastatik davranışı üzerine olan etkisini post-genomik düzeyde anlamaktır.

Çalışmada, sürekli sıvı akışına maruz kalan kolorektal kanser hücreleri (HCT-116 ve HT-29) üzerinde E-kaderin, N-kaderin ve vimentin belirteçlerine ait boyamalar ile epitelyal ve mezenşimal fenotipler karakterize edildi. Sürekli sıvı akışının etkisiyle istatistiksel olarak anlamlılık göstren transkriptom ve miRNA analiz sonuçları ile hedef molekül ve yolak analizleri gerçekleştirildi.

Sürekli sıvı akışına maruz kalan kolorektal kanser hücrelerinde, E-kaderin ekspresyonundaki azalma, N-kaderin ve vimentin ekspresyonundaki artış ($p < 0.05$) ile EMT-benzeri fenotip gösterildi. Sürekli sıvı akışının ve sıvı gerilimin etkisiyle değişim gösteren miRNA ve mRNA ekspresyon profilleriyle gerçekleştirilen gen ontolojikanalizlerinde, anjiyogenez, apoptoz ve antijen sunumu proseslerinin EMT ile indüklenen metastazı destekleyecek şekilde değiştiği saptandı.

Sürekli sıvı akımıyla dinamizm kazanan mikroçevre, epitelyal-mezenşimal transisyon, anjiyogenez, apoptozun düzenlenmesi ve antijen sunumu gibi kanserin ilerlemesini sağlayan fonksiyonları etkilemektedir. Hücrenin biyolojik süreçlerine etki ederek terapötik sonuçları da

etkileyebilme yetisi olan intertisyel sıvı akışı ve sıvı gerilimin her kanser tipine bağılı olarak sebep olduğu değişiklikler ve bunlara at moleküler mekanizmalarının açığa çıkarılması ile potansiyel terapötik hedeflerin oluşması söz konusudur.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, epitelyal-mezenşimal transisyon, metastaz, mikrofluidik hücre kültürü



ABSTRACT

Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL, MSc

Corresponding address: Dokuz Eylul University, Institute of Oncology,
Department of Basic Oncology, IZMIR

The formation and progression of cancer with a metastatic phenotype, have a complex matter, which is not simply based upon genetic mutations. Dynamic physical conditions, such as peritoneal fluid flow, shear forces, acidity of microenvironment or aberrant interstitial fluid flow patterns driven by un-controlled tumor bulk; impose significant pathophysiologic functions, such as proliferation, immune-escaping, epithelial-mesenchymal transition and metastasis. Hence novel microfluidic strategies can target phenotypic changes driven by physical parameters of tumor microenvironment. The aim of this study, to understand the effect of continuous fluid flow on metastatic behaviour of colorectal cancer cells in terms of post-genomic regulations.

First, we characterized the epithelial and mesenchymal phenotypes (with E-cadherin, N-cadherin and Vimentin markers) of colorectal cancer cells (HCT-116 and HT-29) under continuous flow. Target prediction and pathway analysis were further performed to better understand the effect of continuous flow at transcriptome and miRNA level.

Cancer cells under flow condition demonstrated EMT-like phenotype, with a statistically significant decrease in E-cadherin and increase in N-cadherin and vimentin expressions. It was observed with mRNA and miRNA expression profiles analysed by bioinformatic analysis; angiogenesis, apoptosis and antigen presentation processes were altered by the effect of continuous fluid flow and shear stress in support of EMT-induced metastasis.

Continuous fluid flow driven dynamic microenvironment, affects main processes of cancer cell such as epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis, apoptosis and antigen presentation. Although the effects of interstitial fluid flow, that can effect the biological behaviour of cancer cell and therapeutic results; is not fully understood; determination of interstitial fluid flow driven alterations and mechanisms can be positive therapeutic targets.

Keywords: Colorectal cancer, epithelial-mesenchymal transition, metastasis, microfluidic cell culture

1.GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Kanserin moleküler genetiğini ilgilendiren çalışmalar aracılığıyla, karsinogenez, invazyon, EMT ve metastaz süreçlerindeki genomik değişiklikler bilinmektedir, ancak DNA'dan sonraki mRNA'nın ve protein sentezine kadar işleyen mekanizmalar silsilesi ve aktif-inaktif yollar hakkında bilgilerimiz yeterli değildir. Bu nedenle genomikten fenomiğe kadar ilerleyen; epigenomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomikten oluşan post-genomik süreçler hakkında da bilgi sahibi olunmalıdır. Özellikle kanserin terapötik yönetimi ve ilerleyişi hakkındaki öngörülerin doğruluğu açısından, çoğu kanserde ölüm nedeni olarak karşımıza çıkan metastazın oluşumu ve ilerleyişi hakkında bilgi sahibi olunmalıdır. Metastazın gerçekleşebilmesi için, kanser hücrelerinin epitelial fenotipten mezenşimal fenotipe geçişi olarak tanımlanan epitelial mezenşimal transizyon (EMT) oldukça önemlidir. Bu fenotip geçişinde hücreler arasındaki bağlantıların kopması, apiko-bazal polaritenin kaybolması, matriksin yeniden modellenmesi, motilitenin artması ve invazyonun indüklenmesi gereklidir.

EMT sürecinde, kanser hücresinde biyokimyasal ve biyolojik değişikliklerin gözlenmesinin yanı sıra morfolojik değişiklikler de gözlemlendiği için, fiziksel tümör mikroçevresi faktörlerinin EMT sürecine etki etmesi kaçınılmazdır. Örneğin tümör proliferasyonu ve gelişimi ile dokular çevresinde artan basınç, neoplastik progresyonda, hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonunda, ve EMT'de kanser hücresine avantaj sağlamaktadır. Bu süreçte tümör çevresindeki ekstraselüler matriksin (ECM) mekanik özelliklerinde de değişiklikler gözlenir. ECM'nin yeniden düzenlenmesi, ECM proteinlerinin birikmesi ve stromal fibroblastların aktivasyonu sonucu artan matriks sertliği, integrin aktivasyonu ile tümörün invaziv davranışında da gözlenen değişiklikleri beraberinde getirmektedir. Temel sebebi ECM'deki biyolojik ve mekanik değişimler olan tümör mikroçevresinin dinamizminin bir diğer sebebi de interstisyel yani dokular arası sıvı akımının artmasıdır. Temel olarak vasküler, lenfatik ve çoğalma paternlerindeki farklılıklar interstisyel sıvı akımında, miktarında ve basıncında değişiklik göstermektedir. Bu nedenle her tümörün kendine özgü bir interstisyel sıvı paterni vardır (78). Bu noktada interstisyel sıvının, tümörün biyolojik süreçlerinde oluşturduğu değişikliklerin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Mikrofluidik teknolojilerinin (microfluidics) ve hücre analiz sistemlerinin gelişmesiyle interstisyel sıvı akışı gibi mikroçevrede bulunan fiziksel etkenlerin kanser hücrelerine olan etkileri ortaya çıkartılmaya başlanmıştır (83). Kolon ve rektum hücreleri, anatomisi ve sürekli peristaltik hareketler gereği de sıvı akımına ve sıvı akım gerilimine maruz kalmaktadır. KRK tümörün yerleşim gösterdiği kolorektal anatomisi, oluşan asidik akımlar ve tümörün kendi mikroçevresinde artan interstisyel sıvı akımı sebeplerinden dolayı oldukça dinamik bir fiziksel mikroçevre oluşmaktadır. KRK’de mikroçevrenin fiziksel dinamizminin EMT ile ilişkili metastaza olan etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle EMT biyolojisinin anlaşılmasına ve süreci tanımlayan biyobelirteçlerin açığa çıkarılmasına yönelik çalışmalara gereksinim sürmektedir (82).

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada KRK fiziksel mikroçevresindeki interstisyel sıvı akımının mikrofluidik teknolojileri aracılığıyla taklit edilmesi sonucu, indüklenen metastatik hücre fenotipindeki post-genomik değişikliklere epigenomik ve transkriptomik açıdan odaklanmıştır. Vücudun doğası gereği sonsuz olan ve kanser hücrelerine agresif karakter kazandıran interstisyel sıvı akımının ve bu sıvı akışının oluşturduğu sıvı geriliminin (shear stress) indüklediği EMT sürecinde etkin olan mRNA ve mikro-RNA profillerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Mikrofluidik dinamik hücre kültür tekniklerinin kullanılması ile, interstisyel sıvı akışının ve bu sıvı akışının oluşturduğu sıvı geriliminin indüklediği EMT ve metastaz sürecinde etkin olan mRNA ve mikro-RNA profillerinin belirlenmesinin hedeflendiği bu çalışma tanımlayıcı bir çalışmadır. Vücudun doğal ve dinamik fiziksel mikroçevresinin kanser hücrelerine kazandırdığı özellikler hakkında bilgi sahibi olunarak, oldukça karmaşık, çok parametrelili olan metastaz ve EMT mekanizmasına yönelik yeni ajanlarla kanserin yönetimi desteklenebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Kolorektal Karsinoma

2.1.1. Epidemiyoloji

Kanser tüm dünya genelinde ölüm sebepleri arasında kalp damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır (1). Kolorektal kanserler (KRK), Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa ülkelerinde, kanserle ilişkili morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden biridir. KRK' nin, ABD'de tüm kanserler arasında, erkeklerde akciğer ve prostat; kadınlarda da meme ve akciğer kanserinden sonra en sık görülen kanser olduğu bilinmektedir (2). Türkiye 2012 kanser insidansları verilerine göre de erkeklerde akciğer ve prostat kanserinden; kadınlarda ise meme ve tiroid kanserinden sonra en sık gözlenen kanser olarak kayıtlara geçmiştir (3). KRK'nin insidans ve mortalite oranlarının gelişmiş ülkelerde ve kentselleşmenin yoğun olduğu bölgelerde daha fazla olduğu gözlenmektedir ve tüm kanser çeşitlerinde olduğu gibi KRK'de de beklenen olgu sayısı hızla artmaktadır. KRK açısından Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya yüksek riskli; Afrika, Asya ve Güney Amerika ise düşük riskli bölgeler olarak belirlenmiştir. Avrupa kıtasında ise, Batı Avrupa, Güney Avrupa'ya göre daha çok riskli bölge olarak ifade edilmektedir (4).

2.1.2.Etyoloji

KRK gelişiminde etkili olduğu düşünülen çok sayıda risk faktörü tanımlanmıştır. (Tablo 1). Bu faktörlerin belirlenmesi tarama ve takip programları açısından önem teşkil etmektedir.

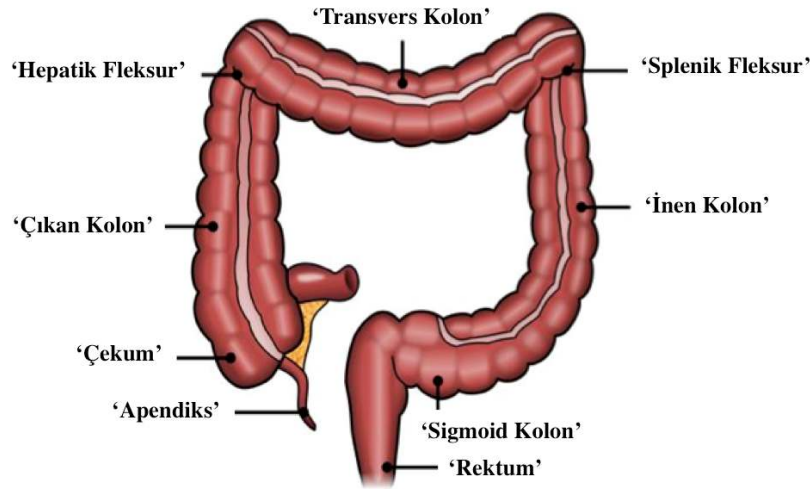
Tablo 1. KRK gelişiminde etkili olan faktörler

Risk Faktörü	
Yaş	50 üzeri
Diyet	Yağdan zengin, posadan fakir beslenme
Kişisel öykü	Kolorektal adenomlar
Aile öyküsü	Polipozis sendromları, herediter non-polipozis KRK, birinci dereceden KRK'li aile yakınları
Inflamatuvar bağırsak hastalıkları	Ülseratif kolit, Crohn hastalığı

KRK açısından düşük insidanslı bölgelerden, yüksek insidansın gözlemlendiği bölgelere göç sonrasında; KRK insidanslarındaki artış, çevresel faktörlerle birlikte diyet alışkanlıklarının ve hayat tarzının kanser gelişiminde önemli olduğunu göstermektedir. Diyet ve yaşam şeklinin yanında Amerika Birleşik Devletleri'nde siyahilerin ve Aşkenazi Yahudi'lerindeki kalıtsal mutasyonların aktarılması da kanser gelişme riskini yükseltmektedir (5). Önceleri daha çok sol kolon yerleşimli tümörler fazla gözlenirken, son yıllarda sağ kolon ve proksimal yerleşimli tümörlerin artışı bildirilmiştir (6).

2.1.3. Kolon ve Rektumun Anatomisi

Kalın bağırsak hattı ortalama 150 cm uzunluğunda olup, duodenum önünden geçen dikey bir düzlemle sağ kolon ve sol kolon olacak şekilde ikiye ayrılır. Sol kolon; çekum, çıkan kolondan; sağ kolon ise transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon, rektum ve anüs bölümlerinden oluşur (Şekil 1). Kolon duvarının katları mukoza submukoza, sirküler kas tabakası, longitudinal kas tabakası ve serozadır (7).



Şekil 1. Kolon ve rektum anatomisi

2.1.4. Kolorektal Kanser Tanısı ve Evrelemesi

Klinikte KRK varlığını düşündüren semptomlar arasında; alt gastrointestinal sistem kanaması, karın ağrısı, barsak alışkanlığının değişmesi veya tıkanması, iştah azalması, kilo kaybı yer almaktadır. Hastalığın tanısında öykünün dikkatli alınması ve dijital rektal muayenenin de

olduğu olduğu fiziksel muayene önemlidir. Fiziksel muayene sırasında karında ele gelen kitle, karaciğer metastazına bağlı hepatomegali, sarılık diğer fizik muayene bulgularıdır. Laboratuvar testlerinin yorumlanmasından sonra gaytada gizli kan varlığı, demir eksikliği anemisi, karaciğer fonksiyon bozuklukları da KRK varlığında saptanabilir. Bütün değerlendirmelerden sonra kolonoskopi ve bilgisayarlı tomografi ile tüm vücut tarama yapılmalıdır.

KRK tedavilerinin düzenlenmesi ve prognozların belirlenmesi amacıyla, histolojisi, makroskopisi, metastaz gibi kriterler göz önüne alınarak çeşitli evrelendirmeler yapılmıştır. KRK’de patolojik evreleme sistemi ilk kez 1929 yılında kanserin yayılımı ve lenfatik tutulumuna bağlı olarak Cuthbert Dukes tarafından yapılmıştır. Ancak 1954 yılında Astler-Coller’in tümör derinliğinin önemini vurgulamasıyla Dukes evrelemesi şeklinde revize edilmiştir. Günümüzde KRK evrelemesinde, 2010 yılında Amerikan Kanser Birliği (American Joint Committee on Cancer- AJCC) tarafından önerilen ve primer tümör yayılımı- bölgesel lenf nodu tutulumu ve intratorasik veya uzak metastaz varlığına göre yapılan TNM (Tumor, Nodes, Metastasis) evreleme sistemi kullanılmaktadır (Tablo 2) (8).

Tablo 2. Kolorektal kanserler TNM evreleme sistemi

Evre	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1- T2	N1- N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3- T4a	N1- N1c	M0
	T2- T3	N2a	M0
	T1- T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3- T4a	N2b	M0
	T4b	N1- N2	M0
IVA	Herhangi T	Herhangi N	M1a
IVB	Herhangi T	Herhangi N	M1b

Kısaltmalar: Primer Tümör Boyutu (T): Tx- Primer tümör hakkında herhangi bir bilgi yok; T0- Primer tümör gösterilemedi; Tis- Karsinoma insitu; T1- Submukoza tutulmuş; T2- Muskularis propria tutulmuş; T3- Tümör muskularis propriadan perikolorektal dokulara uzanım göstermekte; T4a- Tümör visseral periton yüzeyine kadar uzanmış (seroza tutulmuş); T4b- Tümör komşu organ ve dokulara invaze. *Bölgesel Lenf Nodları (N):* Nx: Bölgesel lenf bezi hakkında herhangi bir bilgi yok; N0: Bölgesel lenf bezi metastazı gösterilemedi; N1: Bir-üç lenf bezi metastazı; N1a: Bölgesel bir lenf bezi metastazı; N1b: Bölgesel iki-üç lenf bezi metastazı; N1c: Bölgesel lenf bezi metastazı olmadan non-peritonize perikolik veya perirectal dokularda veya subserozal, mezenterik tümör depozit(ler)i; N2: Dört veya daha fazla lenf bezi metastazı; N2a: Bölgesel dört-altı lenf bezi metastazı; N2b: Bölgesel yedi veya daha fazla lenf bezi metastazı. *Uzak Metastaz (M):* Mx- Uzak metastaz hakkında herhangi bir bilgi yok; M0- Uzak metastaz yok; M1- Uzak metastaz var; M1a- Bir organ veya bölgede (örneğin; bölgesel olmayan lenf nodu) metastaz; M1b- Birden fazla organ veya bölge metastazı

2.1.5. Histolojik Tip

KRK histolojik tiplerine göre epitelyal tümörler, lenfoid doku tümörleri, stromal tümörler, adenomalar ve adenokarsinomlar olarak sınıflandırılırlar. Adenokarsinomalar, tüm KRK'lerin %90-95'ini oluştururlar. Adenokarsinomaların alt tipi olan, müsinöz adenokarsinomda tümör dokusunun %50'sinden daha fazlasında müsin görülmektedir. Bazı müsinöz adenokarsinomalarda, taşlı yüzük hücreleri de bulunabilir. Taşlı yüzük hücreli adenokarsinomlarda, müsinöz adenokarsinomlardan farklı olarak tümör hücrelerinin sitoplazmasında artmış müsin yapımı bulunur. Bu tümörlere az rastlanmakla birlikte, genellikle gençlerde teşhis edilen ileri evre adenokarsinomlardır. Medüller kanserde, lenfosit infiltrasyonu gösteren tümör hücreleri bulunur. MSH ve MLH yanlış eşleşme tamir gen proteinlerinin kaybı sonucu gelişen medüller kanser, herediter nonpolipozis kolorektal kanser sendromunda sık gözlenir. Bazı adenokanserler müsin üretimi, dağınık Paneth hücreleri, endokrin hücreler ve küçük odaklar halinde yassı hücreler içerirler. Çok nadir görülen indifferansiye kanserlerin; az differansiye nöroendokrin neoplazi (küçük hücreli karsinom), lenfoma veya lösemi infiltrasyonundan ayırt edilmesi zor olabilir (9, 10).

2.1.6. Tedavi

Günümüzde KRK dahil olmak üzere neredeyse bütün kanserler multidisipliner yaklaşım içerisinde tedavi planlanmasını gerektirmektedir. Metastatik odağı bulunmayan KRK’de cerrahi operasyon küratiftir. İzole karaciğer metastazı olan hastalarda da cerrahi yine önemli bir seçenek olup; cerrahi rezeksiyon için karaciğerden başka metastaz saptanmaması, karaciğerdeki metastatik odakların tek bir lobda yerleşim göstererek, dörtten az sayıda olması ve tümör boyutunun 5 cm’den küçük olması gerekmektedir. İzole karaciğer metastazı olan KRK hastalarında, cerrahi rezeksiyon ile 5 yıllık sağ kalım %50’lere ulaşmaktadır ancak metastaz anında hastaların sadece %20-25’i cerrahiye uygun bulunmaktadır (11). Cerrahi öncesinde, kemoterapötik ajanlar ve lokal tedavilerle (neoadjuvan kemoterapi) cerrahi uygulanamayan hastaların %10-30’unda hastalık geriletilerek, cerrahiye uygun hale getirilmektedir. Bu amaçla kullanılan iki grup kemoterapi (KT) mevcuttur:

a. Konvansiyonel- sitotoksik kemoterapi: Bu grupta 5-Fluorourasil (5-FU), irinotekan, oksaliptin, kapesitabin (oral 5-FU analogu) bulunmaktadır. Bu ajanlar, hızlı bölünen tüm hücreleri hedefler ve hücrelerin DNA sentezini bloke ederler.

b. Hedefe yönelik ajanlar – sitostatik terapi: Bu grupta bulunan ajanlar, bölünen hücrelere, spesifik reseptör ve proteinlere bağlanarak etki eder. Örnek olarak epidermal büyüme faktörü reseptörünü (epithelial growth factor receptor- EGFR) hedefleyen setuksimab ve panitumumab, tirozin kinaz inhibitörü regorafenib ve vasküler endotelial büyüme faktörünü (vascular endothelial growth factor- VEGF) hedefleyen bevacizumab ve aflibercept bunlara örnek verilebilir.

Cerrahi sonrası birinci ve ikinci basamak tedavilerde sitotoksik ajanlar kendileri tek olarak veya kombinasyonlar halinde kullanılmaktadır. Bu tek veya kombinasyon halinde kullanımlara, hedefe yönelik ajanlardan bevacizumab ve setuksimab da dahil edilebilmektedir (12).

2.2. Kolorektal Kanser Gelişiminin Moleküler Genetik Temeli

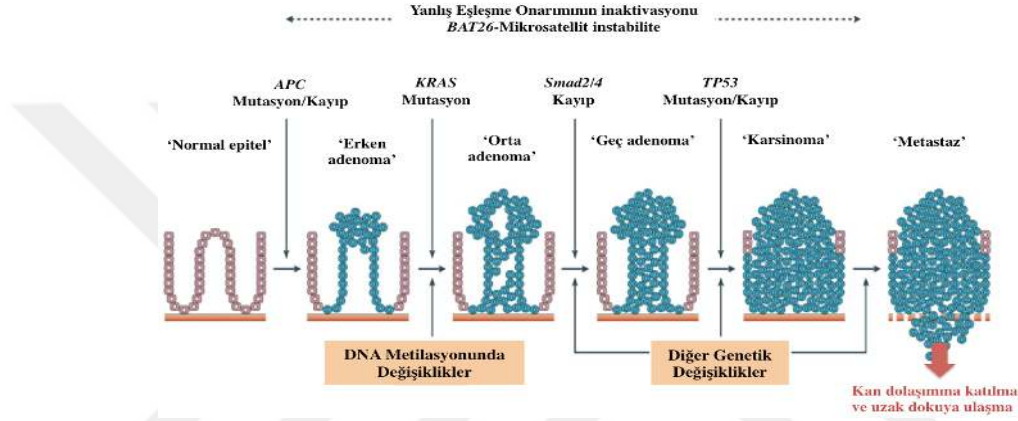
2.2.1. Kolorektal Kanserde Çok basamaklı Karsinogenez Modeli

Tümör hücrenin kontrol mekanizmalarına yanıt oluşturmak yerine, büyüme sinyallerinden bağımsız bir şekilde kontrolsüz olarak büyümesi olarak tanımlanabilir. Bir tümör iyi huylu- benign ya da kötü huylu- malign olabilir. Malign tümörlerin yani kanserlerin iyi huylu

tümörlerden ayrılmasını sağlayan özellikleri invaziv olmaları ve metastaz yapmalarıdır (13, 14). Kanserin moleküler mekanizmaları ile ilgili yapılan çalışmalar sonrasında, karsinogenezin çok basamaklı ve karmaşık bir süreç olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalarla, normal bir dokunun, kanserleşebilmesi için; hücrenin genetik değişiklikler sonucu 6 temel özelliğe sahip olması gerektiğinin altı çizilmiştir. Bunlar; otokrin uyarım ile büyümeye devam etme, büyümeyi baskılayan sinyallere duyarsızlık, programlı hücre ölümünden kaçış, limitsiz yenilenme potansiyeli, anjiyogenez yeteneği, invazyon ve metastaz olarak sınıflandırılır (15). Geçtiğimiz yıllarda kolorektal kanserin genetik mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalarla, kolorektal kanserin genetik olarak oldukça heterojen ve karmaşık bir hastalık olduğu gösterilmiştir (16). Sayısal veya yapısal kromozomal anormalliklerin (anöploidi) artması ile oluşan kromozomal dengesizlik (chromosomal instability, CIN), CpG zengin bölgelerin hipermetilasyonu ile oluşan epigenetik dengesizlikler, ve DNA yanlış eşleşme tamirindeki bozukluklarla oluşan mikrosatellit dengesizliği (microsatellite instability, MSI) KRK gelişiminde tanımlanan temel değişimlerdir (17). MSI, kolorektal kanser olgularının yaklaşık %13'üne neden olmaktadır. MSI, HNPCC sendromlarının %90'ında, sporadik kolorektal kanserlerin %20'sinde görülmektedir. MSI, çoğunlukla hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 ve hMSH6'yı içeren DNA yanlış eşleşme tamir enzimlerinde olmak üzere ve TGF BR11, PTEN, BAX, IGFIIR, hMSH6, hMSH3, E2F- 4 gibi MSI yolağındaki genlerin mikrosatellitlerindeki mutasyonlar tanımlanmıştır (16, 17).

Epigenetik dengesizlikler, KRK'lerin yaklaşık % 40'ında etkili olmaktadır. Epigenetik mekanizma ile kodlayan DNA dizisinin 5' ucunda yer alan CpG zengin bölgeler hipermetilasyona giderek tümör baskılayıcı genler gibi bazı genlerin sesizleşmesine neden olmaktadır. hMLH1, P16INK4A, MGMT, ER, APC, COX2 genlerinin insan kolorektal kanserlerinde hipermetile olarak sessizleştiği rapor edilmiştir (16, 17). Kromozomlarda büyük ya da küçük parçalarının kazanımı veya kaybına neden olan CIN de, KRK'lerin % 47'sinde ise etkili olmaktadır. CIN, sporadik kolorektal kanserlerinin yaklaşık olarak %80'ninde etkindir ve CIN yolağında, tümör baskılayıcı genlerden (tumour suppressor genes- TSG) APC, P53, SMAD2, SMAD4, DCC ve onkogenlerden ise KRAS, β -katenin rol oynamaktadır (17, 18). KRK, yapılan moleküler genetik tabanlı çalışmalar sayesinde tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerdeki çeşitli mutasyonların birikimi ile 20- 40 yılda gelişim gösteren kanserin,

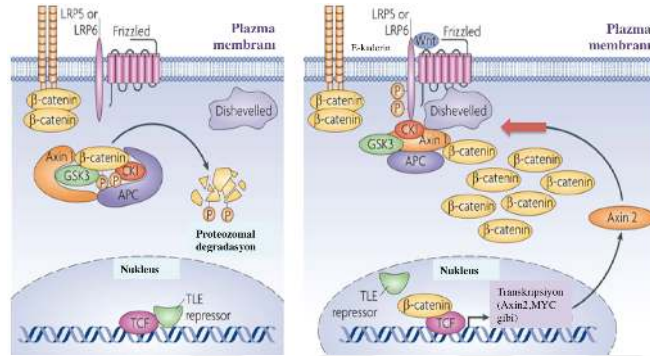
multistep karsinogenezine iyi bir örnek model olmuştur (Şekil 2). KRK'deki CIN yolağı, normal epitel hücresinde *APC* geninin kaybı ile hücre çoğalmasındaki artış ve DNA hipometilasyonu takip etmektedir. *APC* geninin her iki allelinin kaybı ya da inaktivasyonu erken adenom oluşumuna neden olmaktadır. Erken adenom hücrelerindeki 12p (*KRAS*), 18q (DCC-Smad), 17p (p53) kromozom bölgelerinde daha sonra oluşan mutasyonlar kolon kanserine neden olacak malignant transformasyona yol açmaktadırlar.



Şekil 2. Kolorektal kanserde multi-step karsinogenez (Kaynak-19'dan modifiye edilmiştir.)

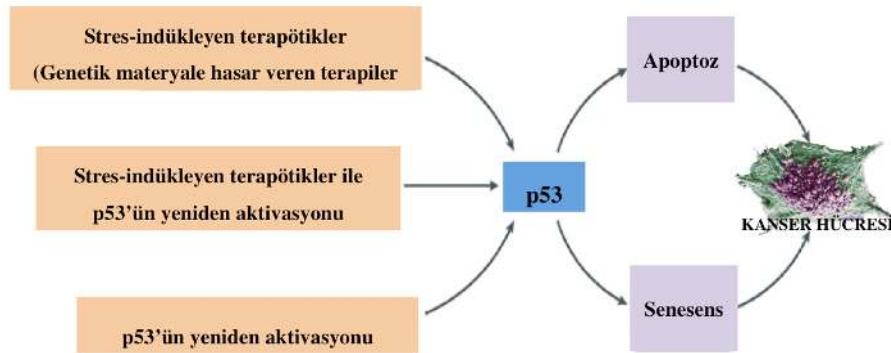
APC geni: Adenomatöz polipozis koli (APC) geni 5q21-22'de yerleşimli bir tümör süpressör gen olup, hücre büyümesini tetikleyen sinyalleri baskılama mikrotübül demetlerini bağlama ve hücre göçü ile adezyonunu kontrol etme gibi hücre açısından çok önemli görevlere sahiptir (Şekil 3). Aynı zamanda APC, kolorektal karsinomaların gelişmesinde önemli rol oynayan Wnt/ β -katenin sinyal yolağında etkin bir molekül olan β -katenin düzeyini kontrol etmektedir. APC geninde tanımlanan missense mutasyonlar ve delesyonlar ile kısalmış APC proteininin üretimi sonucu APC inaktivasyonu gerçekleşir. KRK'lerin %80'inden fazlasında APC inaktiftir. Hücre-hücre adezyonunda rol aldığı APC; aksin, GSK-3 β ve β -kateninden oluşan sitoplazmik bir degradasyon kompleksin oluşumunu yöneterek β -katenin'in degradasyonuna yol açar. β -katenin, kaderin temelli hücre adezyon kompleksinin bir üyesidir ve hücre dışından gelen uyarıların hücre içine iletilmesini sağlar. APC'de meydana gelen mutasyon sonucu fonksiyon kaybı geliştiğinde, β -katenin birikimi ve nukleus proteinlerinin birikimi ile hücre çoğalmasında artış ve azalmış apoptoz söz konusu olur. APC geninde fonksiyon kaybı, aynı zamanda hücreler arası adezyonda etkin transmembran proteini E-kaderin üzerinden

adezyonda değişiklikler gözlenir. Çünkü E-kaderinin sitoplazmik bölümü β -catenine bağlanır, bu komplekte alfa-catenine ve aktine bağlanarak adezyon oluşumunda rol oynar.



Şekil 3. Wnt/ β -catenine sinyal yolağı (Kaynak-20'den modifiye edilmiştir.)

p53 geni: 17. kromozomun kısa kolunda (17p) yer alan p53 geni, bir tümör baskılayıcı genidir ve hücre fosfoproteini olan p53 proteininin sentezinden sorumludur. p53 geni hücre siklusunda G1-S fazları arasındaki kontrol noktalarında, hücrenin DNA hasarlanmalarına karşı korunmasını sağlayan bir kontrol noktası proteinidir ve böylece hücrenin çoğalmasında ve farklılaşmasında görev alır (Şekil 4). p53 kaybı hasarlı hücrenin apoptozdan kaçış sebebidir. Kolorektal karsinogenezin geç dönemlerinde oluşan p53 inaktivasyonu, adenomun karsinoma dönüşümünü yönetir. p53 geninin yerleşim gösterdiği, kromozom 17p' nin delesyonuna KRK'lerin %75 inde rastlanmaktadır. KRK'lerde metastaz varlığı ile 17p ve 18q yerleşimli allelik kayıp ve delesyonlar arasında anlamlı bir ilişki gözlenmiştir (21).



Şekil 4. p53 yolağı (Kaynak-22'den modifiye edilmiştir.)

DCC geni: Onsekizinci kromozomunuzun kolunda (18q21) yerleşmiş olan DCC (Deleted in colorectal carcinogenesis) tümör baskılayıcı geninin delesyonu KRK'lerin %70'inde ve ileri

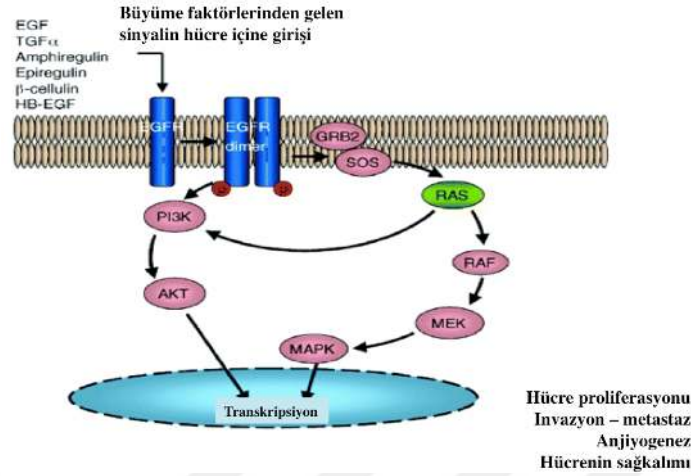
derecede displazi gözlenen adenomların yarısında gözlenmiştir. DCC geni, yapısal olarak hücre adezyon moleküllerine benzeyen bir proteinin sentezini düzenlenmektedir, adezyon molekülüne benzer bu protein sentezlenemediğinde hücreler arası etkileşimin neoplazik transformasyonla sonuçlanacak yönde değiştiği düşünülmektedir. DCC varlığı, 2 ve 3. evredeki KRK'lerde kötü prognozun oldukça kuvvetli bir belirleyicisidir. Aynı kromozomun değişik bir bölgesinde yerleşim gösteren ve diğer bir tümör süpresör gen olan DPC4/Smad4'ün de kolorektal kanser vakalarının üçte birinde delesyona uğradığı gösterilmiştir. DPC4 uyarı iletimini transforme edici büyüme faktörü (Transforming growth factor-beta, TGF-beta) reseptörleri aracılığı ile sağlayan SMAD gen ailesi içinde yer alır. TGF-beta epitel hücresinde büyümeyi önleyici etki göstermektedir ve kolon adenokarsinom hücreleri genellikle TGF-beta' nın hücre üzerindeki bu etkisine direnç göstermektedir. APC geni kaybı ile ailesel adenomatöz polipozis modeli oluşturulan farelerde DPC4'ün deneysel olarak inaktivasyonu adenomatöz poliplerin kansere dönüşümüne yol açmaktadır (23).

2.2.2. Onkogenlerin ve Sinyal Yolaklarının Aktivasyonu

Onkogenler hücrede sinyallerin iletiminde ve buna bağlı olarak da hücre büyümesinin kontrolünde rol oynayan genlerdir. Bu genlerdeki DNA düzeyindeki değişiklikler genlerin aşırı aktivasyonuna neden olarak mesajların hücre yüzeyinden hücrenin nükleusuna geçişine, artan hücre proliferasyonuna ve tümör büyümesine yol açar. KRK'de onkogenlerdeki aktivasyonlar aracılığıyla aktivitesi artan sinyal yolları: RAS/RAF/MAPK sinyal iletim yolağı, PI3K sinyal iletim yolağı, WNT/APC/CTNNB1 sinyal iletim yolağı ve TGFB1/SMAD sinyal iletim yolağıdır.

2.2.2.1. EGFR Sinyal Yolağı ve Aktivasyonu

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, ERBB1 veya HER1), ERBB ailesi içinde yer alan bir tirozin kinaz reseptörüdür (RTK). Hücre membranı yerleşimli, EGFR fosfatidilinozitol-3-kinaz (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/Akt ve RAS/RAF/ Mitojen active edici protein kinaz (mitogen-activated protein kinase, MAPK) gibi proliferatif ve anti-apoptotik sinyal arayollarını aktive ederek, hücreye gelen proliferasyon sinyalinin nükleusa iletilmesini sağlar (Şekil 5) (24).

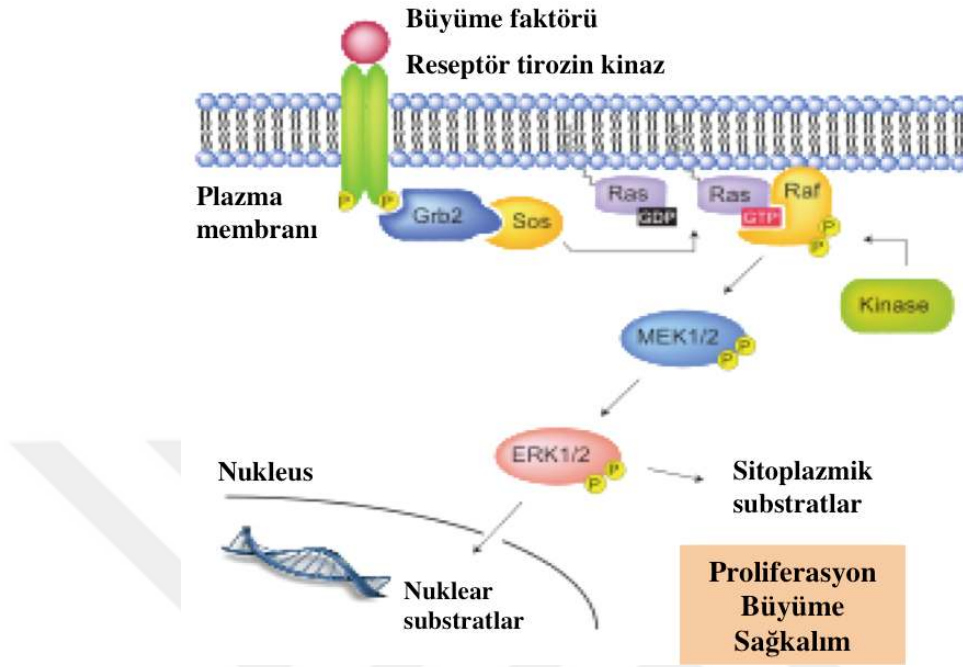


Şekil 5. EGFR aracılı sinyal yolağı (Kaynak-24'ten modifiye edilmiştir.)

KRK karsinogenezinde gelişen aşırı EGFR aktivasyonu, EGFR overekspresyonu veya EGFR yolağındaki diğer moleküllerde bulunan mutasyonlar sonucu sinyal yolağı altı moleküllerinin kontrolsüz aktivasyonuna bağlı olarak da gelişebilir. Özetle EGF aracılı RAS-MAPK yolunun aktivasyonu, nükleusta, siklin bağımlı kinazları (CDK4 ve CDK6) aktive eden, siklin D birikimiyle sonucu hücre G1 fazından S fazına geçer. PI3K/Akt yolu aracılığıyla da artan Akt fonksiyonu ile, CDK-siklin kompleksine bağlanıp, G1 fazında hücre bölünmesini durduran p27'nin transkripsiyon seviyesi azalır ve hücre bölünmesi artış yönünde uyarılır.

2.2.2.2. RAS/RAF/MEK Sinyal Yolağı

RAS: EGFR aktivasyonu ile, RAS sinyal iletim arayolu başlatılmaktadır. RAS protein insanda guanine bağlayan proteinin sentezleyen *RAS* geni tarafından kodlanır. *KRAS*, *NRAS* ve *HRAS* olmak üzere 3 ras geni mevcuttur ve 12.kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir. İnaktif durumda guanozin difosfat-GDP ile bağlı olan RAS, büyüme faktörü- reseptör etkileşimi sonucu fosforile olup, guanozin trifosfat- GTP ile bağlı duruma geçerek aktifleşir. KRK'lerin %65 inde *RAS* geninde (genellikle *KRAS*) nokta mutasyonu saptanmaktadır ve KRK gelişiminin orta dönemlerinde oluşmaktadır. *RAS* proteinleri ile; ardışık olarak birbirleri tarafından aktiflenen RAS- RAF- MAPK moleküllerinden oluşan sinyal yolağı ve PI3K ile bunun aktive ettiği PDK1-AKT moleküllerinden oluşan sinyal ara yolları aktiflenir (Şekil 6).



Şekil 6. RAS/RAF/MEK sinyal yolağı (Kaynak-25'ten modifiye edilmiştir.)

RAS proteinlerinden, KRAS birinci arayolda, HRAS ise ikinci arayolda daha etkin olarak rol alır. RAS ve PI3K arayollarının aynı zamanda ya da birbirini tamamlayacak şekilde çalıştıkları ve bu nedenle kanser tedavisinde başarının her iki arayolun inhibisyonu ile sağlanabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, ara yollardaki moleküllere ait moleküler bozukluklar, kanser gelişimi ve progresyonu açısından önemlidir. KRK'lerin %40'ında izlenen ve ekzon 2'ye ait kodon 12 ve 13'teki nokta mutasyonları ile oluşan *KRAS* aktivasyonu, alt yolağın aktivasyonu ile tümörlerin anti-EGFR tedavisine yanıtızsız olmasına neden olur. Bu nedenle *KRAS* geninin mutasyon analizi önemlidir, çünkü *KRAS* mutasyonları, EGFR inhibitör tedavisine yanıtızsızlık durumu ile ilişkilidir.

***BRAF*:** RAS proteinleri, MAPK ve PI3K arayollarını içeren çok sayıda sinyal kaskadı üzerinden de etki gösterir. Bu nedenle bu ara yollara ait moleküllerde de mutasyon izlenmesi önemlidir. MEK1 ve MEK2 gibi MAPK efektörlerini aktive eden bir protein kinazı kodlayan *BRAF* genine ait mutasyonlar, KRK'lerin %5-10 unda gözlenir. Kötü prognozla ilişkilendirilen bu mutasyonlar genellikle, 15. ekzonda kodon 600 bölgesinde (V600A, V600D, V600E ve V600KRM) ve 11. ekzonda gözlenir. Hastalarda en sık V600E mutasyonu gözlenir. *BRAF* mutasyonlarına sahip KRK'li hastalarda, setuksimab ve panitumumab gibi monoklonal

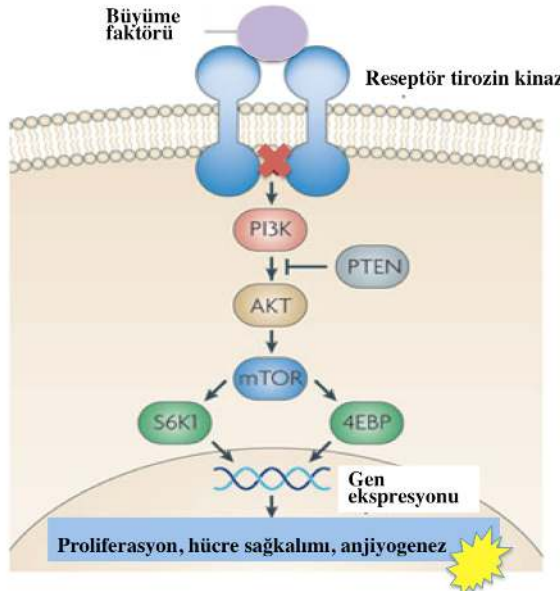
antikorlara karşı direnç gelişimi gözlenir. Bu hastalarda, V600E mutasyona spesifik küçük inhibitörler ve MEK inhibitörleri kullanılması önerilmektedir (26).

MEK: MAPK/ERK Kinaz (MEK1), tirozin ve S/T-dual protein kinazdır. MEK'in aktivitesi, RAF'taki (BRAF > CRAF >ARAF) katalitik bölge S rezidülerinin fosforilasyonu ile düzenlenir MEK1'in ana hedefi ERK, bunun aksine ERK'in çok sayıda hedefi vardır (27).

ERK-1,2: Ekstrasellüler sinyal düzenleyen kinazlar 1,2 (ERK 1,2), MEK1 ve MEK2' nin aracılık ettiği fosforilasyon ile düzenlenir. ERK'ler Ets-1, c-Jun ve c-Myc gibi transkripsiyon faktörünü aktive edebilir ve hücre döngüsünün düzenlenmesine katılan çok sayıda proteini fosforile edebilir. ERK2 proliferasyonu pozitif olarak düzenlerken, ERK1 bazı hücrelerde ERK2'nin etkilerini inhibe edebilir (28).

2.2.2.3. PI3K/AKT/mTOR Yolağı

Fosfatidilinozitol 3-kinazlar / AKT / Rapamisin'in memelilereki hedefi (mammalian target of rapamycin, mTOR) (PI3K/AKT/mTOR) yolağında meydana gelen bozukluklar, migrasyon ve invazyonu etkilediğinden, arayoldaki kilit moleküller, potansiyel tedavi hedeflerini oluşturur (Şekil 7). PI3K/AKT/mTOR yolağı, RAS/RAF yolağı ile etkileşim içinde olduklarından tümörün EGFR tedavisine vereceği yanıtın belirlenmesinde yardımcı olabilirler (29).



Şekil 7. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı (Kaynak-30'dan modifiye edilmiştir.)

PI3K: PI3K proteinleri, fosfoinozidlerin 3'hidroksil grubunu fosforile ederek, fosfatidilinozitol-4,5-bifosfatın (PIP2), fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfata (PIP3) dönüşümünü sağlar. Sekonder haberci olan PIP3, hücrenin büyümesi, çoğalması, yaşamı üzerinde etkili olan protein kinaz B olarak da bilinen AKT'ı, fosforilasyon yoluyla aktive eder. KRK'lerin, %15-25'inde PI3KCA geninde kinaz aktivitesini arttırarak PIP3 oluşumunun artmasına neden olan somatik mutasyonlar gözlenmiştir (29).

PTEN: Yine bu alt yolakta yer alan, tümör baskılayıcı etkiye sahip PTEN proteini, PIP3'ten PIP2 defosforilasyonunu yöneterek, hücre döngüsü, apoptoz, hücre göçü ve genomik stabilite üzerine etki etmektedir. PTEN inaktivasyonuna yol açan somatik mutasyonlar, KRK'lerde %10 oranında görülmektedir. PTEN ekspresyon kaybı, hem *KRAS* mutasyonu bulunan, hem de bulunmayan vakalarda gözlenmektedir (31).

AKT: AKT'in aktivasyonu çok basamaklı bir süreç olup; platelet kökenli büyüme faktörü (platelet derived growth factor, PDGF), insülin, epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF), fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor, bFGF) gibi aynı kökene sahip proteinlerin membran reseptörlerine bağlanması sonucunda, RTK'ların fosforilasyon yoluyla aktive olmaları sağlar. Fosforile aktif AKT, membrandan ayrılarak nukleus ve sitosolde bulunan hedeflerini fosforiller. Ayrıca AKT, ribozom sentezi, protein sentezi regülasyonu ve mRNA translasyonunu kontrol eden moleküller üzerinden hücre boyutunu düzenleyen mTOR'u fosforile ederek aktive eder (29).

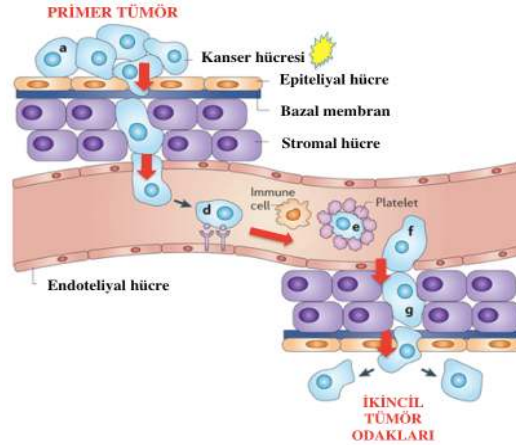
mTOR: PI3K sinyal arayolunda rol oynayan mTOR, ökaryotik hücre büyümesi ve proliferasyonunun temel kontrol noktasıdır. mTOR arayolunun aktivasyonu ve mTOR aşırı ekspresyonu, prostat, hepatosleüler karsinom ve meme karsinomları dahil olmak üzere birçok kanserde gösterilmiştir. mTOR, mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTOR kompleks 2 (mTORC2) olmak üzere iki multiproteinden oluşur. mTORC1 mitojenlere cevap olarak, S6K1 ve 4E-BP1'i fosforilleyerek translasyonu başlatır. mTORC2 ise, AKT ve protein kinaz C yi aktifleyebilir (32).

2.3. Kolorektal Kanser Metastazı ve Moleküler Genetik Temeli

2.3.1. Epitelyal-Mezenkimal Transisyon ve Mezenkimal-Epitelyal Transisyon Kavramları

Karsinogenez süreci, yukarıda anlatıldığı gibi hücre sayısının kontrolsüz bir şekilde çoğalmasını yöneten genetik ve epigenetik değişiklikleri içermektedir. Ancak oluşan kanserin ilerlemesinde temel neden, göç kabiliyetini kazanan hücrelerin ikincil büyüme odaklarına gidip büyümesidir. Buna metastaz denmektedir ve kanserli hastaların temel ölüm sebebidir. KRK'de de cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi seçeneklerinde gelişmeler ve artışlar olmasına rağmen, hastaların %40-50'si tanı anında metastatik hastalığa sahiptir. Çoğu metastatik KRK (mKRK) hastası da klasik tedavi seçeneklerine uyumlu değildir ve $\leq$ %10 kadarı 5 yıllık sağkalım şansı verilmektedir. Bu nedenle invazyon ve metastaza dair genomik, post-genomik ve fiziksel olmak üzere tüm bilgilerin artması gerekliliği kaçınılmazdır.

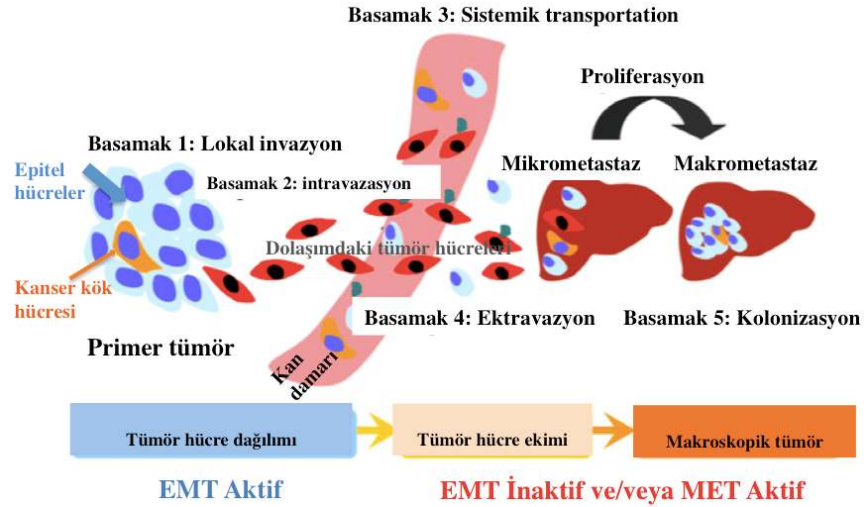
Metastatik kaskad, primer tümör odağından kaçış (a), bölgesel stromaya penetrasyon (b), bölgesel vasküler ve lenfatik sisteme geçiş (intravazasyon) (c), ikincil metastaz odaklarıyla etkileşime girebilmek için reseptör ekspresyonu (d), plateletlerle küme oluşturarak immun hücrelerde kaçış (e), endotelle etkileşime geçme ve adezyon (f), ekstrasvazasyon (g), uzak bölgede koloniler oluşturma ve bu yerde proliferasyon gibi çeşitli basamaklardan oluşur (33).



Şekil 8. Metastazın basamakları (Kaynak-33'ten modifiye edilmiştir.)

Yukarıda tanımlanan ardıl basamaklarda kanser hücresinin epitelyal ve mezenkimal fenotipleri arasındaki dönüşümler söz sahibidir. Son yıllarda invazyon ve metastazın gelişiminde

epitel fenotipten, mezenkimal fenotipe dönüşümün gerçekleştiği epitelyal-mezenkimal transisyonun (epithelial-mesenchymal transition, EMT) anahtar olduğu gösterilmiştir. EMT, çeşitli moleküler bağlantılar ile birarada tutulan, bazal yüzeyleri ile bazal membranla etkileşim halinde olarak apikal-bazal polaritesini barındıran epitelyal hücrelerin; bir seri biyokimyasal değişim ile hücrelerarası bağlantılarını ve apikal-bazal polaritesini kaybedip, mezenkimal karakter kazanarak invaziv özellik kazanması, apoptoza direnç geliştirmesi olarak tanımlanabilir. EMT sürecinin biyokimyasal ve morfolojik olarak tersi olarak tanımlanan mezenkimal-epitelyal transizyonda (mesenchymal-epithelial transition, MET) tümör hücrelerinin primer odaktan ayrılıp, uzak yere metastaz yapmasından sonrası (teorik olarak ekstrasvazasyondan sonra) süreç olarak tanımlanır. Ancak MET hakkında elde edilen bilgiler EMT'ye göre daha sınırlıdır ve EMT'nin daha ayrıntılı anlaşılabilir olmasından sonra artış gösterebilecektir (34).

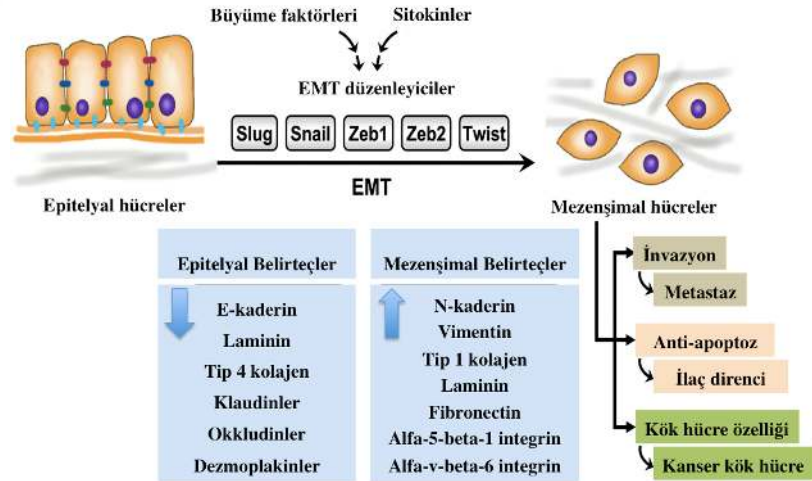


Şekil 9. Metastaz sürecinde, epitelyal- mezenkimal transisyon ve mezenkimal-epitelyal transisyon (Kaynak-34'ten modifiye edilmiştir.)

2.3.2. Kolorektal Kanserde EMT Sürecinin Transkripsiyonel Düzenlenmesi

EMT, KKK metastazında oldukça önemlidir. KKK hastalarında, E-kaderinin azalan ekspresyonu ve vimentinin artan ekspresyonu lenf nodu metastazı, zayıf tümör diferansiyasyonu ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (35, 36). EMT prosesi üç grup transkripsiyon düzenleyici tarafından yönetilmektedir. Bunlardan ilki SNAI1 ve SNAI2 (Slug)' in dahil olduğu Snail çinko-

parmak ailesi; ikincisi ZEB ailesi ZEB1 ve ZEB2 (SIP1); ve üçüncüsü ise TWIST1, TWIST2 ve E12/E47' dahil olduğu bHLH ailesi (Şekil 10, Tablo 3). KRK hastalarından elde edilen rezeksiyon dokularının %85'inde kuvvetli TWIST1 ekspresyonu gözlenmiştir. TWIST1 ekspresyonu lenf nodu invazyonu, erkek cinsiyet ve kötü sonuçla ilişkilendirilmiştir (37). SLUG1 ve ZEB1 ekspresyonu, E-kaderin ekspresyonunun azalması ile korele bulunmuş ve ZEB1, ZEB2 artışı azalan sağkalımla ilişkilendirilmiştir (38). Ayrıca ZEB1, ekstraselüler matriksin (Extracellular matrix- ECM) EMT aracılı degradasyonu aktiflediği gibi ve plazminojen aktivatör inhibitörünün inhibisyonunu da gerçekleştirir. SLUG ve vimentin ekspresyonları arasında da bir ilişki saptanmıştır. KRK'li hastalarda SLUG ekspresyonu lenf nod metastazı ve anjiyogenez ile ilişkili bulunmuştur (39). Son zamanlarda yapılan araştırmalar doğrultusunda KRK EMT'sinde etkin olan başka transkripsiyon faktör ailelerinin olduğu bildirilmiştir. Bunlar Brachyury, AP4, fork-head box protein C2 (FOXC2), E2-2 (TCF4 olarak bilinir), SOX2, OCT4, Nanog, prospero homeobox1 (PROX1), homeobox protein SIX1, paired related homeobox 1 (PRRX1), HMGA1, Fra-1, ve ZNF281/ZBP99'dur (34).



Şekil 10. Epitelyal-mezenkimal transisyon düzenleyicileri (Kaynak-40'tan modifiye edilmiştir.)

Tablo 3. EMT ve kolorektal kanser metastazının düzenlenmesinde görev alan transkripsiyon faktörleri

Moleküller	KRK’de klinik önemi
<i>Transkripsiyon faktörleri: CDH promotör bölgesine bağlanan</i>	
SNAI1	Metastaz, ilaç direnci, kötü prognoz
SLUG	Metastaz, kısa sağkalım, kötü prognoz, anjiyogenez, ilaç direnci
ZEB1	İnvazyon, metastaz, kısa sağkalım
ZEB2	Progresyon, kısa sağkalım
Brachyury	Kötü prognoz
AP4	Karaciğer metastazı, kısa sağkalım
<i>EMT ile ilişkili diğer transkripsiyon faktörleri</i>	
TWIST1	Lenf nodu invazyonu, kötü prognoz, kısa sağkalım
FOXC2	Lenf nodu metastazı
SOX2	Karaciğer ve lenf nodu metastazı
OCT4	Karaciğer metastazı
Nanaog	Lenf nodu metastazı, kötü prognoz
PROX1	İleri tümör evresi, lenf nodu metastazı
PRRX1	Metastaz ve kötü prognoz
Fra-1	Kısa rekürrenssiz sağkalım, yüksek T evresi
Transkripyon düzenleyiciler	
FLH2	İnvazyon, metastaz

Kısaltmalar: EMT: Epitelyal mezenkimal transisyon, KRK: Kolorektal kanser, FOXC2: Forkhead box C2, SOX2: SRY box 2, OCT4: Octamer-binding transcription factor 4, PROX1:prospero homeobox 1, PRRX1: paired related homeobox 1, FHL2: four and a half LIM protein 2.

2.3.3. Kolorektal Kanserin EMT Süreci ile İlişkili Sinyal Yolakları

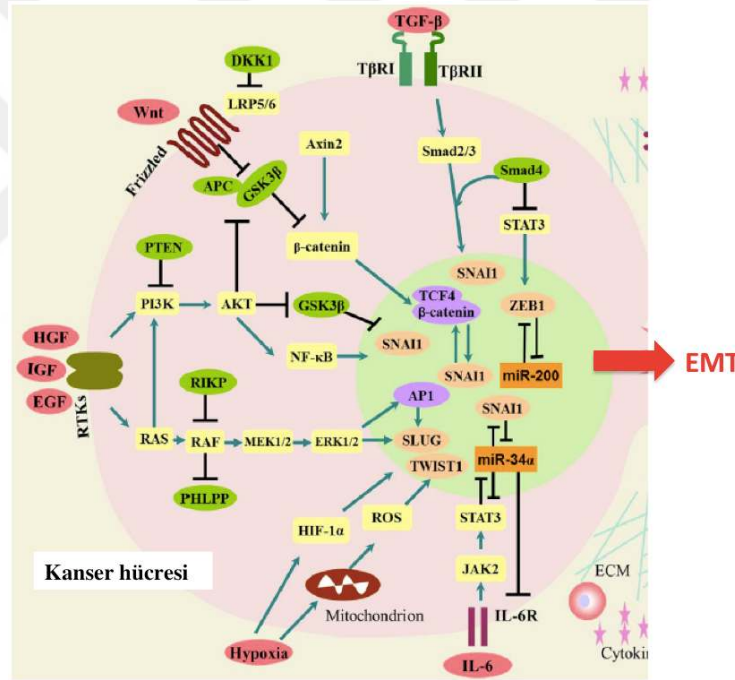
Kanser hücreleri tümör mikroçevresinden gelen bir seri ekstraselüler sinyale yanıt olarak EMT sürecine girer. TGF-beta, Wnt ve büyüme faktör reseptörlerinin dahil olduğu sinyal yolakları KRK'inde dahil olduğu birçok kanserdeki invazyon ve metastazda oldukça aktiftir. TGF-beta/Smad sinyal yolağı KRK'de EMT'nin gelişiminde oldukça önemlidir. TGF-beta ligandları, membranda bulunan T β R1 ve T β R2 reseptörlerinin dimerizasyonu ile Smad'ın fosforillenmesini yönetir. Aktiflenen Smad2 ve Smad3, nükleusta Smad4 ile birlikte lokalize olur. TGF-beta reseptörlerindeki ve Smad sinyalizasyondaki değişiklikler, KRK'lerin %40-50'sinde saptanmıştır ve KRK proliferasyonunun en temel sebeplerindendir. Smad4'ün kaybı KRK metastazlarının %30'unda saptanmış ve E-caherin kaybı ile artan β -catenin ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur. Smad4, SW480 KRK hücre hattında invazivliği baskılar ve mezenkimal benzeri fenotipten, polarize epitelyal fenotipe geçişi indükler ve EMT'de etkin olan endojen TGF-beta'nın azalması ile ilişkilidir (41). Ayrıca Smad4'ün kaybı EMT'de doğrudan etkisi olan ve ZEB1 ekspresyonunu arttırarak KRK progresyonunda rol alan STAT3 aktivasyonu ile sonuçlanır (42). Smad4 kaybı KRK hastalarında, metastazın öngörülmesi açısından umut vadeden bir belirteç olarak görülmektedir (43). Smad4'ün kaybı BMP'nin aktiflenmesi üzerinden EMT'nin indüklenmesi ile, Rho ve ROCK'ın aktiflenmesini sağlamaktadır (44). Wnt sinyal mekanizması KRK progresyonu ve EMT için önemlidir. APC ve β -catenin mutasyonları bu yolağın aktiflenmesini sağlar. Nükleer β -catenin artışı hücrenin mezenkim-benzeri yapıdan EMT sürecine geçişini destekler. Wnt'nin inhibitörü olan DKK1 (dickkopf-1), EMT'yi inhibe ederek KRK'nin ilerlemesini durdurur. Diğer bir Wnt inhibitörü Axin2, SNAI1 üzerinden EMT'yi indükleyerek hem in vitro hem in vivo metastatic aktiviteyi iletir (45). RAS/ERK1/2 yolağının KRK'de EMT'yi desteklediğine dair sonuçlar bulunmaktadır. CaCo2 hücrelerinde RAS'ın artan ekspresyonu, histon modifikasyonları ile Siklin D1 ve E-kaderin'nin düzenlenmesini sağlar. Slug, RAS yolağı ile düzenlenir ve mutant *RAS* ile EMT'ye giden KRK'erde yeni bir hedef haline gelebilir. *BRAF* ve *RAS* onkogenleri, TGF-beta ile birlikte yada tek başlarına hücre migrasyonu ve invazyonunu yöneten Rho GTPaz'ları düzenler (46).

Bağırsak kökenli epitelyal hücrelerde MEK1 aktivasyonu EMT'yi indüklemektedir. Egr-1, Fra-1 ve AP-1, MEK1 tarafından indüklenen SNAI1 ve SLUG ekspresyonlarından sorumludurlar. AP-1, ERK/AKT yolakları ile aktiflenir ve integrin alfa2'yi hedef alarak EMT'yi

indükleyen EZH2'yi aktifler. RAF1 ve RAF/MEK/ERK yolağının negatif düzenleyicisi PHLPP, KRK'de EMT'yi baskılayarak hücrenin motilitesini ve tümör ilerlemesini durdurur. KRK'lerin %2-3'ünde PHLPP geninde mutasyonlar saptanmıştır (47).

PIK3C mutasyonları veya PTEN kaybı ile PI3K/AKT yolağının aktiflenmesi, KRK ilerlemesinden sorumludur. EMT ve anjiyogenezi düzenleyen AKT sinyal yolağı SNAI1 ve SLUG gibi EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin ekspres olmasından sorumludur.

Metastaz ilişkili fosfataz olan PRL-3 AKT'ı aktifleyerek PTEN'I baskılayarak EMT'yi indükler. PI3K/AKT alt yolağının bulunan mTOR1 ve mTOR2'de Rho A ve Rac-1 aracılığıyla KRK'de EMT, motilite ve metastazı indükler (48, 49).



Şekil 11. Kolorektal kanserde EMT ilişkili sinyal yolakları ve tümör mikroçevresi

2.3.4. Kolorektal Kanserin EMT Sürecinde Etkili Olan Kodlamayan RNA'lar

Kısa kodlamayan RNA'lar ve mikro-RNA'lar (miRNA, miR), 19-24 nükleotid uzunluğunda olup, gen ekspresyonunu post-transkripsiyon seviyesinde hedef mRNA'yı degrade ederek veya protein translasyonunu inhibe ederek etkilerler. miRNA'ların kanserde düzenlenmelerinde problemler olmaktadır. Son yıllarda EMT ile direk veya dolaylı olarak ilişkili miRNA'lar Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. EMT ile ilişkili mikro-RNA'lar

<i>Molekül</i>	<i>Üst düzenleyicileri</i>	<i>Hedef Gen</i>	<i>KRK'deki önemi</i>
<i>EMT inhibisyonunda etkili miRNA'lar</i>			
miR-200 ailesi	P53/TGF-beta/ZEB1/SNAI1/SIX1	ZEB1/ETS1/FLT1	Kötü sağkalım ve prognozun baskılanması
miR-34	P53/SNAI1/ZEB1/IL-6	Fra-1/ZNF281/SNAI1	Lenf node ve uzak metastazın baskılanması
miR-15a/16-1	P53/AP4	AP4	Uzak metastazın ve kötü prognozun baskılanması
miR-183-96-182	p21-ZEB1	SLUG/ZEB1	Belirlenmemiş
miR-137	HMGA1	FMNL2	Belirlenmemiş
miR-138	Belirlenmemiş	TWIST2	Lenf nodu ve uzak metastaz ile kötü prognozun baskılanması
miR-212	Belirlenmemiş	MnSOD	Agresif tümör fenotipinin ilerlemesinin baskılanması
miR-30b	Belirlenmemiş	SIX1	Karaciğer metastazı ve kısa sağkalımın baskılanması
miR-320a	Belirlenmemiş	Rac1	Metastazın baskılanması
miR-101	HIF-1 alfa	Beta-catenin	Belirlenmemiş
<i>EMT'nin indüklenmesinde etkili miRNA'lar</i>			
miR-21	TGF-beta/TNF-alfa/AP1/ETS1	TIAM1/RECK Integrin-beta4	Kötü prognoz
miR-31	TGF-beta/TNF- alfa	TIAM1/SATB2	Kötü prognoz
miR-9	PROX1	E-kaderin	Belirlenmemiş
miR-130b	Belirlenmemiş	PPAR γ	Uzak metastaz, kısa sağkalım, kötü prognoz
miR-29a	Belirlenmemiş	KLF4	Metastaz ve kötü prognoz
miR-103/107	Belirlenmemiş	DAPK/KLF4	Lenf nodu ve uzak metastaz, kısa sağkalım ve kötü prognoz

Kısaltmalar: EMT: epitelyal-mezenkimal transisyon; KRK: kolorektal kanser; miR: mikroRNA; TGF-beta: transforming growth factor- beta; SIX1: SIX homeobox 1; FLT1: fms-related tyrosine

kinase 1; ZNF281: finger protein 281; MMP: matrixks metalloproteinaz; PBX3: pre-B-cell leukemia homeobox 3; HMGA1, high-mobility group A1; FMNL2, formin-like 2; MnSOD, manganese superoxide dismutase; Rac1: ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; HIF-1 alfa: Hipoksi indükleyen factor 1- alfa; TNF-alfa: Tümör nekrozis factor-alfa; TIAM1: T-cell lenfoma invazyon metastaz 1; AP1: activator protein 1; RECK: reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs; SATB2: special AT-rich sequence-binding protein 2; PROX1: prospero homeobox 1; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; KLF4: kruppel-like factor 4; DAPK: death-associated protein kinase.

miR-200 ailesi (miR-200a/b/c, miR-141 and miR-429), ile yapılan çalışmalar bu ailenin ekspresyonundaki azalmaların EMT için önemli olduğunu ve ZEB1 ile ZEB2'nin miR-200c ile miR-200b'nin hedefleri olduğunu ortaya koymuştur. Tümör baskılayıcı gen olan p53'ün kaybı, miR-200c'nin promotör bölgelere bağlanması ile miR-200c ekspresyonunun azalması ile EMT'nin indüklenmesini aktive eder. Ayrıca miR-200 ailesi ile miR-205 EMT'de etkili TGF-beta yolağının alt üyeleridir. Bu miRNA'ların yeniden ekspresyonları MET sürecinde görülmektedir. ZEB1, miR-141 ve mir-200c'nin ekspresyonunun baskılayarak KKR hücrelerinin epitelial dönüşümünü indükler. Bu denge, EMT- EMT arasındaki geçişleri destekler. miR-200a/200b/429 ve miR-200c/141'in epigenetik regülasyonu EMT ve MET arasındaki düzeni destekler. miR-200 ailesindeki metilasyon ile epigenetik susturulma EMT-MET fenotipleri arasındaki geçişi, kanser progresyonu ve metastazı indüklediğinde gösterilmiştir. Karaciğer metastazlarında miR-200 ve miR-141'in, primer tümör dokusuna göre daha fazla eksprese olduğu ve bunun miRNA promotör bölgesi hipometilasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiş. Bu nedenle primer tümördeki düşük miR-200c ekspresyonunun kötü prognostik faktör olarak gösterilmektedir (50, 51).

miR-200'ün dışında başka miRNA'ların da ekspresyonları KKR metastazında azalmıştır, p53'ün hedefi olan miR-34a bunlardan biridir. miR-34a, Fra-1 üzerinden MMP1 ve MMP9'un ekspresyonunu azaltır. miR-34a ekspresyonunun azalması, c-Met, SNAI1 ve beta-catenin'in artan düzeyleri ve KKR metastazı ile ilişkilidir. ILR-6R/STAT3/miR-34a geri dönüşüm mekanizmasının da EMT üzerinde etkisi vardır ve p53'ün miR-34a'yı arttırması bunu

bozmaktadır. Aynı zamanda p53, miR-15a/16-1 ve AP4'yi de indükleyerek EMT'yi indükleme yönünde etki eder (52).

Bir diğer tümör baskılayıcı olan p21-ZEB1 kompleksi, miR-18-96-182 birleşimi ile EMT'yi inhibe eder. P53'ün p21'i doğrudan kontrol etmesine rağmen, bu komplekste etkisi yoktur (53).

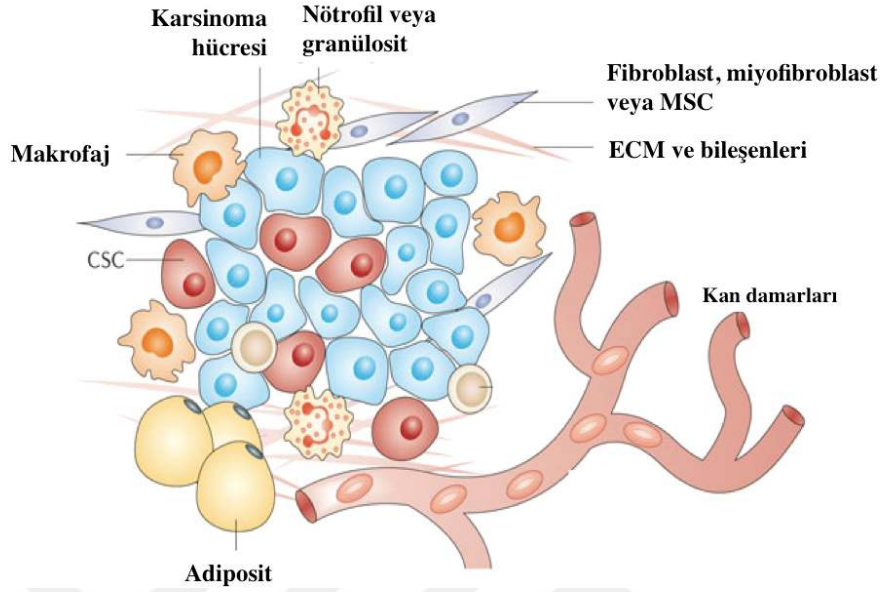
Diğer bir tümör baskılayıcı miRNA olan Let-7c, MMP11 ve PBX3 mRNA'larını stabilize ederek EMT'yi inhibe eder. KRK'de Let-7c'nin azalan ekspresyonu, metastaz, ileri TNM evresi ve kötü prognoz ile ilişkilidir (54).

HGMA1 hedefi olan miR-137, TGF-beta ile indüklenen EMT'de yer alan FMNL2'yi hedefleyerek KRK'de EMT sürecini baskılar. miR-138/212/30b/320a/101'de KRK metastazındaki EMT sürecinde rol alan önemli miRNA'lardır. EMT aktivatörü olan TGF-beta'daki artışların, miR-21 ve miR-31'in ekspresyonlarını arttırdığı gözlemlenmiştir. miR-21'in ekspresyon artışı KRK'de kötü prognostik faktör olarak görülmektedir. miR-31'inde lenf nodu olan KRK'lerde arttırdığı gösterilmiştir. miR-31 KRK metastazı ile ilişkili olan SATB2'yi hedef alarak EMT'yi indükler (55).

PROX1, miR-9-2 ile birlikte E-kaderin ekspresyonunu azaltır. Ayrıca miR-140b, miR-29a, miR-103/107 de tümör gelişimi ile metastazı destekleyici yönde etkisi olan miRNA'lardır (56).

2.3.5. Kolorektal Kanserin EMT Sürecinde Mikroçevre

Kanser hücreleri ile kanserin oluşum gösterdiği mikroçevre arasındaki etkileşimler, kanserin ilerlemesi ve metastazı açısından çok önemlidir. Tümör mikroçevresi inflamatuvar ve immün hücreler ile, karsinoma ilişkili fibroblastlar (carcinoma associated fibroblasts- CAF), hipoksi, çözünen faktörler, sinyal molekülleri ve ekstraselüler matriks bileşenlerinden oluşan oldukça kompleks bir çevredir (Şekil 12). Tüm bu karmaşık içerikle birlikte, kompleks etkileşimler aracılığıyla tümör mikroçevresi EMT sürecinde tahmin edildiği oldukça söz sahibidir (57).



Şekil 12. Tümör mikroçevresi bileşenleri (Kaynak-58'ten modifiye edilmiştir.)

CAF'lar tümör hücreleri ile, tümör mikroçevresindeki diğer hücreler arasındaki etkileşimlerin bir parçasıdır ve mikroçevreyi matriks metalloproteinazlar (matrix metalloproteinase, MMP), MMP inhibitörleri, ECM bileşenleri, büyüme faktörleri ve sitokinler üreterek modüle ederler. Bazı çalışmalarda CAF'ların, EMT, hipoksi ve TGF-beta yolağının aktivasyonunda gen ekspresyon düzeylerini arttırdığına yönelik sonuçlar açığa çıkarılmıştır (59).

Inflamatuvar bileşenlerde tümörün progresyonu ve metastazı için oldukça önemlidir. IL-1beta, EMT aracılığıyla KRK progresyonunu indükler. IL-8 (CXCL8) ve CXCL20 sinerjistik etkileriyle PI3K/AKT-ERK1/2 aracılığıyla EMT'yi indükleyerek KRK progresyonunu ve metastazını arttırırlar. IL6, p53'ün ribozom biyogenezini arttırarak, p53 aktivitesini ve ekspresyonunu azaltır. P53 ekspresyon ve fonksiyon kaybı, E-kaderinin azalması, SLUG'ın artması sonucu EMT-benzeri hücre fenotipik değişikliklere sebep olur.

TNF-alfa, KRK'de SNAI1'in AKT/GSK-3beta aracılı stabilizasyonu ile EMT'yi indükler. Bu sonuç EMT ile inflamasyon arasındaki ilişkiyi açıkça ortaya koymaktadır. Ayrıca TNF-alfa, TGF-beta ile indüklenen EMT'yi IL-8 ve CXCR üzerinden hızlandırır. CAF'lara yönelik olarak yapılan proteom profillemeye çalışmalarında, TGF-beta yolağı ile ilişkili olan LTBP2, CD11, OLFML3 ve FSTL1 gibi proteinlerin ekspresyonu, kanser stromasına yönelik yeni moleküler

belirteçlerin ortaya çıkışını göstermiştir. TGF-beta ile uyarılan CAF'lardan, IL-11 salgılanması GP130/STAT3'ün tetiklenmesini sağlar, bu da metastazın başlamasını uyarır (60, 61).

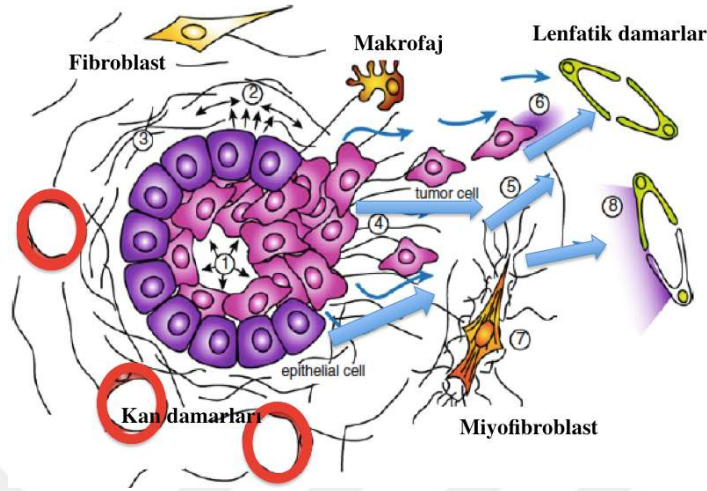
Tümör mikroçevresinde bulunan başka tip hücrelerde metastaz sürecine katılmaktadır. Epitel ve kolon tümör dokularının ko-kültürlerinden hücre süpernatantları ile yapılan sekretom analizlerinde, IGFBP6 tümör baskılayıcının azaldığı gözlemlenmiştir. Aynı değişiklik EMT hücrelerinde de gözlenmiştir (62).

2.4. Fiziksel Mikroçevrenin EMT'ye Etkisi

2.4.1. Fiziksel Mikroçevre

Kanser hücrelerinin çevresindeki dokunun kanser hücresinin davranışına, sağkalımına, büyümesine, invazyon ve metastazına etki ettiğini gösterecek şekilde moleküler kanıtlar mevcuttur. Her kanserin temelinde yatan problem kontrolsüz büyüme olsa bile, kanser çeşitlerinde hücresel olarak farklılıklar olduğu gibi mikroçevreleri de farklıdır. Bu değişiklikler, kanserin fenotipinden terapi sonuçlarına kadar etki etmektedir. Mikroçevredeki farklılıklar biyokimyasal, biyolojik veya biyofiziksel/fiziksel olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser ve kanser ilişkili hücrelerin tümörün büyümesi ve gelişimini destekleyecek şekilde salgıladıkları sitokin paternlerindeki farklılıklar biyokimyasal değişiklikler; fibroblast ve immün hücreler gibi kanser ilişkili hücrelerin kanser davranışını ve terapötik yanıtlarını değiştirmesi biyolojik değişiklikler; stromanın sertleşmesi, interstisyel basınç, sıvı akımının değişmesi de biyo-fiziksel ya da fiziksel değişiklikler olarak şeklinde karşımıza çıkmaktadır (63).

Bir tümör kitlesel olarak büyümeye başladığında, hücrede, salgılanan moleküllerde ve ECM'de bir seri değişiklikler oluşur. Ancak tümörün etrafını saran fiziksel mikroçevrede de çok büyük değişiklikler gelişir. Tümörün büyümesine ve ilerlemesine eşlik eden, normal olmayan basınç ve sıvı akım artışları gözlemlenir. Günümüzde, bu biyomekanik güçlerin tümör mikroçevresini şekillendiren faktörler olduğu kabul edilmektedir. Bu fiziksel değişiklikler tümörün büyümesinden ileri gelen çevre dokulara doğru giden basınç, doku sertliğinin ve dokular arasındaki sıvı akımın artması olarak sınıflanabilir (Şekil 13) (64).



Şekil 13. Tümör mikroçevresinde, hücre fenotipini değiştiren biyomekanik güçler (Kaynak-64'ten modifiye edilmiştir.). 1) Tümör hücreleri proliferasyonun artmasıyla epitele doğru basınç oluşturur. 2) Bu stress ECM'de basınç farklılığı oluşmasını sağlar. 3) ECM yoğunlaşır ve sertleşir. 4) İnvazyonun oluşacağı lokasyonda matrix yeniden organize olur ve invazyonun oluşmasına yardımcı olur. 5) Tümör ilişkili anjiyogenezin artması, dokular arası sıvının ve lenfatik drenajın artışı sonucu sıvı akımı artar. 6) Tümör hücreleri bu sıvı akımını gradiyent oluşturmak için kullanır. 7) Dokular arası sıvı miyofibroblast diferansiyasyonu indükler. 8) Lenfatik kemokin salınımı artar.

Kanserin başlangıç gösterdiği yerde, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile birlikte kanser kitlesinin merkezinden çevredeki komşu hücrelere doğru basınç oluşur. Bu artan basıncın terapötik yenilginin sebeplerinden bir olması, çeşitli çalışmaların çıkış noktasını oluşturmuştur (63). Tümör proliferasyonu ve gelişimi ile dokular çevresinde artan basınç, epitelyal homeostazda, hücresel davranış değişikliklerinin oluşmasında, neoplastik progresyonda, hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonunda, ve EMT'de oldukça önemlidir (65). EMT sürecinde, kanser hücrelerinde biyokimyasal ve biyolojik değişikliklerin gözlenmesinin yanısıra morfolojik değişiklikler de gözlemlendiği için, fiziksel tümör mikroçevresi faktörlerinin EMT sürecine etki etmesi kaçınılmazdır. Ancak, artan basınç sadece tümörün proliferasyonu ve büyümesi ile ilişkili değildir, aynı zamanda tümörün çevresindeki ECM'ye ait mekanik özelliklerin değişmesiyle de ilişkilidir.

Tümör mikroçevresi mekanik olarak ECM'nin yeniden düzenlenmesi, ECM proteinlerinin birikmesi ve stromal fibroblastların aktivasyonu sebeplerinden dolayı dinamikdir ve bu dinamizm tümörün, normal dokulara göre daha sert olmasına olanak tanımaktadır. Matriks sertliği ve yoğunluğundaki değişimler, integrin aktivasyonu ile tümörün davranışında da değişiklikleri beraberinde getirmektedir. İntegrinlerin biraraya toplanması, ERK aktivitesindeki artış, Rho/ROCK tarafından üretilen hücre kasılmaları tümörün epitelyal organizasyonunu bozarak progresyonu ve invazyonu arttırır. Matriks sertliğini arttıran, artmış yoğunluk adezyon yoğunluğunun da artmasına sebep olarak FAK-Rho-ERK sinyalini arttırır. Ancak matriks sertliğinin hücredeki metastatik fenotiple ilişkili olabileceği yönünde elde edilen verilere rağmen, sertliğin HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde metastatik fenotipi arttırdığı bulunmuştur (66, 67). Sonuç olarak, tümör dokusunun sertliği kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur; tümör dokusunun yumuşaması metastazı ve hastalığın ilerleyişini azaltacak bir belirteç olarak görülmüştür (68).

Tümör mikroçevresinde gözlenen bir diğer fiziksel değişiklik ise interstisyel yani dokular arası sıvı akımının artmasıdır. İnterstisyel sıvı, stromayı oluşturan dokular arasındaki sıvı olarak tanımlanır. Normal dokuda, bu sıvı stromal dokuda dağılmış olarak bulunan ve hücreler tarafından kullanılan besin bileşenleri ve oksijenin kan damarlarından plazma olarak akımıdır. Kan damarlarından sızan bu sıvının çoğu kapiller tarafından geri emilir, bir kısmı dokular tarafından filter edilir ve lenfatik akıma doğru boşaltılır. Normal dokuda bu sistem, interstisyel sıvının artışını engeller. Ancak tümör dokusunda bu sistem zayıftır ve sıvı artışına neden olmaktadır (64).

Kanser hücrelerinin ihtiyaçlarını karşılayabilmek adına, tümör mikroçevresinde anjiyegenez ve anjiyogeneze göre daha nadir olsa da lenf anyjiyogenezi uyarılır. Sayıca artan damarların ve lenfatiklerin, damar duvarından çevre dokulara sıvı akışı artar. Düzensiz ancak yeni damar sistemlerinin oluşumu da artan interstisyel sıvının en temel sebeplerindendir (69). Kanserli hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile dokuda artan basınç ile çevredeki normal dokularda gözlenen normal basınç arasındaki gardiyent farkından dolayı da tümör stroması boyunca, interstisyel sıvı artışı açığa çıkar. Bu sıvı artışını Butler ve arkadaşları ilk kez meme tümörlerinde göstermiştir (70). Sonuç olarak artan sıvı akışı ile, tümör hücreleri sıvı akış gerilimine (shear stress) maruz kalır. Değişen sıvı akımı ve akım gerilim paternleri ile çözünen moleküllerin

dağılımında farklılıklar oluşturduğu gibi hücrelerin fenotipinde ve davranışlarında değişim görülmektedir.

İki-boyutlu veya üç-boyutlu hücre kültür tekniklerinin kullanılması ile sıvı akımının hücreye etkisini araştırmak üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Hoffman ve arkadaşlarının, interstisyel sıvı akımının hücrenin proliferasyonunu arttırdığı yönünde çalışmaları vardır. Akciğer kanseri hücreleriyle yapılan çalışmada, interstisyel sıvı akımının azalması ile hücrenin fosforilasyonuna olumlu yönde etki eden p44/42 MAPK fosforilasyonunun azaldığı gözlenmiştir (71). Fosforilasyon süreçlerindeki aksamalar hücrenin proliferasyon süreçlerinde temel olarak etki eden faktörlerdendir. Hücrenin proliferasyonuna etki etmesinin dışında, interstisyel sıvı akımının ilaç direncinin sebeplerinden biri olduğu savunulmaktadır. Tümör ortamında değişen interstisyel sıvı akımından dolayı metastazların transferinde oluşan değişikliklerin ilaç direnci oluşumuna etki ettiği bilinmektedir (72).

Rofstad ve arkadaşları tarafından da, interstisyel sıvı akımının terapötik direncin dışında radyasyon direncinde de etkili olduğu gösterilmiş. Normoksik koşullar altında olmaması beklenen radyasyon direncinin, sıvı akımının artmasıyla arttığı, ve bunun tümör hücre klonojenitesi ve VEGFR-A ekspresyonunun ilgili olabileceği savunulmuş (73).

Polacheck ve arkadaşları da, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile yaptıkları çalışmalar da, interstisyel sıvı akımının bulunduğu hat üzerinde migrasyonun oluştuğunu göstermişler. Bu şekilde sıvı akımının migrasyon yönünde etki edeceği yorumu yapılmış ancak, sıvı akımının kuvveti ve hücre yoğunluğunun değişmesiyle migrasyon yönünün değişebileceği de bilinmektedir (74).

İnterstisyel sıvı, sadece tümör hücrelerini etkilemez. Tümör mikroçevresinde bulunan fibroblast ve bağışıklık sistemi kökenli hücreleri de etkiler. Shieh ve arkadaşlarının MDA-MB-423S meme kanseri hücreleriyle ko-kültür edilen fibroblastlar üzerinde yaptıkları çalışmalarda, tümör invazyonunu yürüten fibroblast aracılı stromal düzenlenmelerin interstisyel sıvı ile yürütüldüğü yönünde bilgi sağlamıştır. Bu çalışmada, kanser hücreleri ile fibroblastların invazyon sürecinde birlikte çalıştığı, sıvı akımının fibroblastların hareketlenme ve invazyon kabiliyetine olumlu yönde etki ettiği gözlenmiştir. Ayrıca interstisyel sıvı akımının TGF-beta 1 ve kollajenaz-bağımlı invazyonu tetiklediği gösterilmiştir (75).

Rofstad ve arkadaşlarının, insan melanoma zenograft modellerinde yaptıkları çalışmalarda, kanser tedavisinde önemli parametreler olan hipoksi ve lenf nodu metastazına interstisyel sıvı akımının etki ettiği gösterilmiş. Lenf nodu metastazı yapan tümörlerde interstisyel sıvı akımı ve basıncının, yapmayanlara göre daha fazla olduğu ve yine interstisyel sıvı basıncının fazla olduğu tümörlerde hipoksi oranının daha fazla olduğu sonuçlarına ulaşılmış (76).

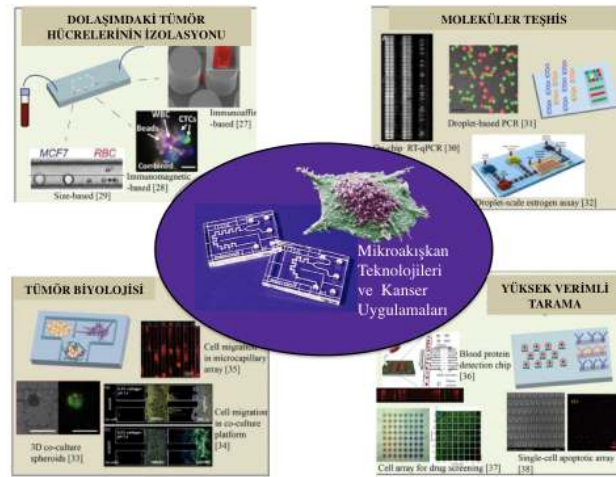
Rizvi ve arkadaşları, over kanseri hücrelerinde interstisyel sıvı akımı varlığında E-kaderin ekspresyonunun azalması ve vimentin ekspresyonunun artması sayesinde gösterilen EMT'nin indüklendiği göstermişler. Bu geçiş sırasında, over kanseri için kötü prognostik faktör olan EGFR ekspresyonunun EMT'nin indüklenmesini yönettiği gösterilmiş (77).

Literatür eşliğinde verilen bilgiler doğrultusunda, interstisyel sıvı akımının ve sıvı akış geriliminin kanser hücrelerini proliferasyon, migrasyon, invazyon ve metastaz yönünde indükleyerek hücreye agresif fenotip kazandırdığı gösterilmiştir. Bir tümör kitlesinin hücreleri kendi içinde bile farklılık gösterirken, çeşitli tipteki tümörler arasındaki davranış, çoğalma, büyüme, metastaz ve hatta anjiyogenez paternlerindeki farklılıkların gözlenmesi normaldir. Temel olarak vasküler, lenfatik ve çoğalma paternlerindeki farklılıklar interstisyel sıvı akımında, miktarında ve basıncında değişiklik göstermektedir. Bu nedenle her tümörün kendine özgü bir interstisyel sıvı paterni vardır (78). Bu nedenle tümörün davranışından, çoğalmasına, anjiyogenezine ve invazyon metastaz sürecine kadar etki ettiği yönünde kanıtlar bulunan, interstisyel sıvının her tümörde oluşturduğu değişikliklerin açığa çıkarılması oldukça önemlidir.

İnterstisyel sıvı akımının KRK'deki metastazı yürüten EMT sürecine etkisi yönünde çalışma bulunmamaktadır. Kolorektal kanserlerde hematogen ve lenfatik yollarla metastazın yanında, peritoneal dağılım yoluyla gerçekleşen metastaz görülmektedir (%10-25). Bu tablo erken müdahaleyi gerektiren, erken müdahale söz konusu olmadığında cerrahi ve kemoterapi açısından hastanın fayda görmediği hızla mortaliteye doğru giden bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. KRK'nin peritoneal yayılımında IGF-1, HIF1 α , VEGF, EGFR ve ITGB1 en çok adı geçen potansiyel hedeflerdir. Ancak peritoneal yayılımda, tümör hücrelerinin dökülmesi ile invazyon ve metastazda söz konusudur. Özellikle hücrelerin dökülmesi ile peritoneal kaviteye yayılımında yer çekiminin etkisi ve ortamdaki sıvı akımının varlığı (asit, mukus, interstisyel sıvı, kan akımı) önemli fiziksel faktörlerdir (79, 80, 81). Kolon ve rektum hücreleri, anatomisi ve sürekli peristaltik hareketler gereği de sıvı akımına ve sıvı akım gerilimine maruz kalmaktadır.

Sonuç olarak KRK tümörün yerleşim gösterdiği kolorektal anatomisi, oluşan asidik akımlar ve tümörün kendi mikroçevresinde artan interstisyel sıvı akımı sebeplerinden dolayı oldukça dinamik bir fiziksel mikroçevre oluşmaktadır. KRK’de mikroçevrenin fiziksel dinamizminin EMT ile ilişkili metastaza olan etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle EMT biyolojisinin anlaşılmasına ve süreci tanımlayan biyobelirteçlerin açığa çıkarılmasına yönelik çalışmalara gereksinim sürmektedir (82).

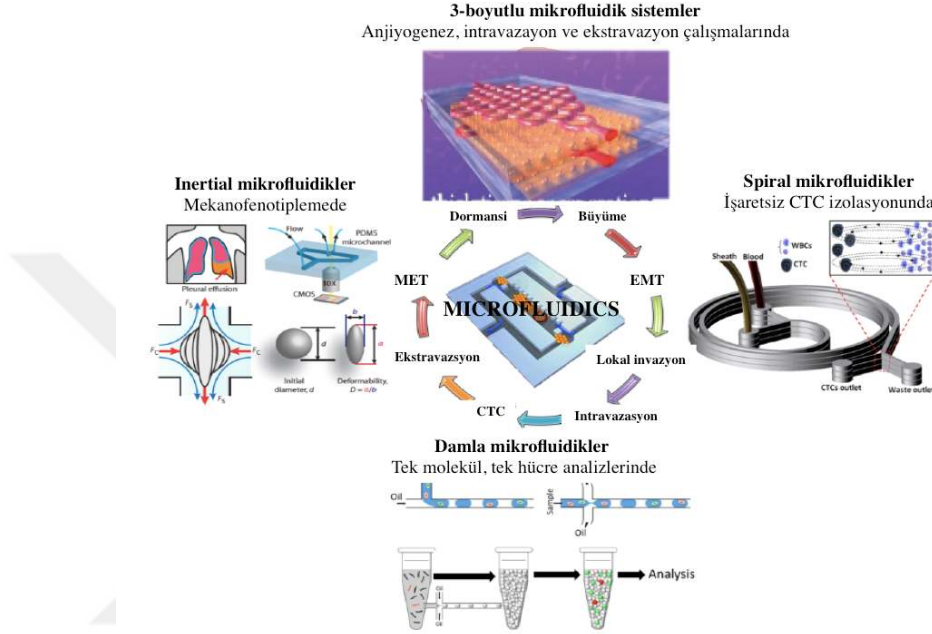
Mikrofluidik teknolojilerinin (microfluidics) ve hücre analiz sistemlerinin gelişmesiyle interstisyel sıvı akışı gibi mikroçevrede bulunan fiziksel etkenlerin kanser hücresine olan etkileri ortaya çıkartılmaya başlanmıştır (83). Mikrofluidik teknolojileri, 1µl- 1000µl arasında sıvı hacmine sahip olan, kontrol edilebilen laboratuvar metodolojileri sunmaktadır. Çip teknolojilerinin mikrofluidik teknolojileri ile birleştirilmesiyle, kanser başta olmak üzere birçok sorun teşkil eden hastalık hakkında ileri analizler yapılabilir. Mikrofluidik teknolojileri ile kanser alanında, hastalığa yönelik büyük ölçekli tarama ve teşhis çalışmaları (çip tabanlı mutasyon taramaları gibi), ileri tümör biyolojisi çalışmaları (migrasyon, metastaz, proliferasyon çalışmaları gibi) ve dolaşımdaki tümör hücresine yönelik araştırmalar yapılabilir (Şekil 14) (84).



Şekil 14. Mikrofluidik teknolojilerinin kanser alanındaki rolü (Kaynak-84’ten modifiye edilmiştir.)

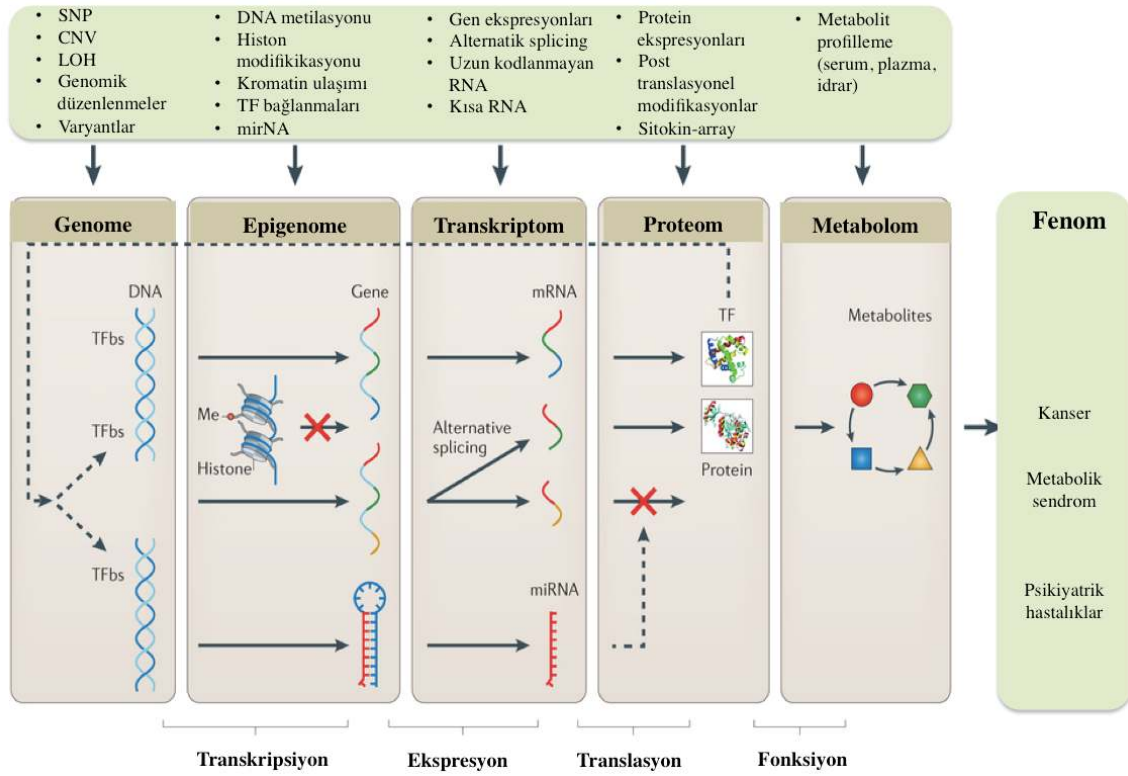
Mikrofluidik teknolojilerinin kullanılmasıyla tümör biyolojisi alanındaki çalışmalarda, kanserin büyümesi, EMT, invazyon, dolaşımdaki tümör hücreleri, MET dahil olmak üzere bir

çok temel konu üzerinde araştırma yapılabilir. Tek hücre fenotipik tanımlama, üç-boyutlu anjiyogenez çalışmaları gibi mikrofluidik teknolojilerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilen çeşitli kanser araştırmaları Şekil 15’de gösterilmiştir.



Şekil 15. Kanser araştırmalarında kullanılan mikrofluidik teknolojilerinin gösterimi (Kaynak-83'ten modifiye edilmiştir.)

Kanserin moleküler genetiğini ilgilndiren çalışmalarda, daha çok DNA düzeyinde elde edilen bilgilerin fazlalığı sayesinde kanser genomu hakkında konuşabiliyoruz. Özellikle kolorektal, meme ve akciğer kanserleri gibi sık rastalanan kanser türlerinin daha çok çalışılması nedeniyle bunların karsinogenez, EMT, invazyon, metastaz süreçlerindeki genomik değişiklikler bilinmektedir. Ancak hücrede DNA'dan sonra mRNA'nın ve ardından proteinin sentezine kadar işleyen mekanizmalar silsilesi kanserin kaderini değiştirebileceği gibi yönetimini de değiştirmektedir. Bu nedenle genomikten fenomiğe kadar ilerleyen; epigenomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomikten oluşan post-genomik süreçler hakkında da bilgi sahibi olunmalıdır (Şekil 16).



Şekil 16. Biyolojik sistemlerde çoklu-omiks teknolojileri ile genomdan fenomiğe (Kaynak-85'ten modifiye edilmiştir.)

Ancak kanserin oluşumundan sonraki EMT'nin başlamasıyla devamı gelen olaylar zinciri metastaz hakkındaki bilgiler azdır. Bu çalışmada kolorektal kanser fiziksel mikroçevresindeki intertisyel sıvı akımının mikrofluidik teknolojileri aracılığıyla taklit edilmesi sonucu, indüklenen metastatik hücre fenotipindeki post-genomik değişikliklere epigenomik ve transkriptomik açıdan odaklanmıştır. Vücudun doğası gereği sonsuz olan ve kanser hücrelerine agresif karakter kazandıran intertisyel sıvı akımının ve bu sıvı akışının oluşturduğu sıvı geriliminin (shear stress) indüklediği EMT sürecinde etkin olan mRNA ve mikro-RNA profillerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Vücudun doğal ve dinamik fiziksel mikroçevresinin kanser hücrelerine kazandırdığı özellikler hakkında bilgi sahibi olunarak, oldukça karmaşık ve çok parametrelili olan metastaz ve EMT mekanizmasına yönelik yeni ajanlarla kanserin yönetimi desteklenebilir. Böylece kolorektal kanserin cerrahi ve klinik olarak oldukça sorunlu hale gelen metastaz tablosunda daha uzun sağkalım süreleri elde edilebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Bu çalışma tanımlayıcı bir araştırma olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamani

Bu çalışma Eylül 2011- Haziran 2016 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde laboratuvarları ile Amerikada Harvard Üniversitesi- Harvard MIT Health Sciences & Technology (Boston, Massachusetts) ve Stanford Üniversitesi- Canary Cancer Center (Palo Alto, California) laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.3. Araştırmanın Örneklemi

Çalışma, ticari hücre hatlarının kullanıldığı in vitro bir araştırma olarak gerçekleştirilmiştir. İnsan ya da hayvan materyali kullanılmamıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada, kolorektal kanser hücre hatları kullanılmıştır. HT-29 (ATCC® HTB-38™) ve HCT-116 (ATCC® CCL-247) hücre hatları, American Type Culture Collection (ATCC)'den satın alındı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bu çalışma kolorektal kanser metastazı açısından tanımlayıcı bir çalışma olduğu için kolorektal kanser metastaz sürecinin varlığı bağımlı değişken; analizi yapılan 44,699 geni tanımlayan mRNA, 30,424 mikro-RNA, mikrofluidik sürekli sıvı akışı ve hücre tipi ise bağımsız değişkendir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Hücre Hatları ve Statik Hücre kültürü

Kullanılan Malzemeler- Cihazlar

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco by Life Technologies, NY, USA)
- Fötal sığır serumu (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)

- Penisilin- Streptomisin (10,000U/ml) (Gibco by Life Technologies, Grand Island, Katalog no: 15140-122, NY, USA)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7.4 (1X) ([-] kalsiyum klorür [-] Magnezyum klorür) (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, USA)
- Mikropipet set (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Kimwipes (Kimtech Science Brand, Kimberly-Clark Worldwide, Inc, USA)
- 0.05% Tiripsin-EDTA (1X), Fenol-Kırmızı (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)
- Tripan mavisi (Sigma Aldrich, USA)
- 25cm² hücre kültür flaskı (MedSupply Partners, USA)
- 75cm² hücre kültür flaskı (MedSupply Partners, USA)
- 50 mililitre (ml) tüp (MedSupply Partners, USA)
- 15 ml tüp (MedSupply Partners, USA)
- Serolojik pipet-10 ml (MedSupply Partners, USA)
- Serolojik pipet-5 ml (MedSupply Partners, USA)
- Etanol (MedSupplyPartners, USA)
- Karbondioksit inköbatör (Thermo Scientific, USA)

Deneyisel Uygulama

Deneyisel kolorektal karsinoma hücre hatları olan HT-29 (ATCC® HTB-38™) ve HCT-116 (ATCC® CCL-247), American Type Culture Collection (ATCC)'den satın alındı. HT-29 hücre hattı, 44 yaşında bayandan (beyaz ırk) izole edilen, epitelyal morfolojiye sahip hücrelerdir. HT-29 hücrelerinde p53 geninin 273. kodunda G -> A mutasyonu ile Arg -> His dönüşümü bulunmaktadır. Ayrıca, *c-myc*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *Myb*, *sis* ve *fos* oncogenlerinin ekspresyonu ile p53'ün aşırı ekspresyonu gözlenmektedir. HCT-116 hücreleri ise erkek hastadan izole edilmiş olup epitelyal morfolojiye sahiptirler. *RAS* proto-onkogeninin 13. kodonunda mutasyon barındırmaktadırlar (86, 87).

HCT-116 ve HT-29 hücreleri deneyde kullanılmak üzere flasklarda çoğaltıldı. Hücrelerin çoğaltılması için ve deneylerde %10 fetal sığır serumu (Fetal bovine serum- FBS) ve %1

Penisilin-streptomisin ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 4 g/L glucose, 4.0 mM L-Glutamine)'den oluşan kültür ortamı kullanıldı. Hücreler 37°C'de 5% CO₂ içeren inkübatör ortamında çoğaltıldı.

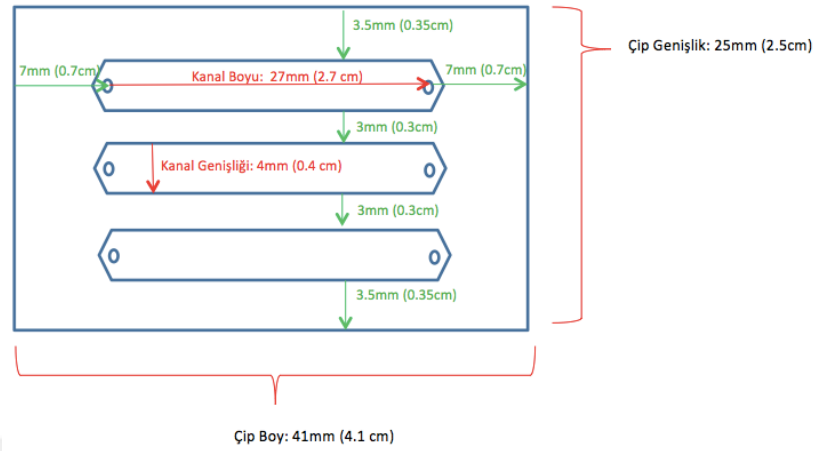
3.6.2. Mikrofluidik Çiplerin Dizaynı ve Üretimi

Kullanılan Malzemeler- Cihazlar

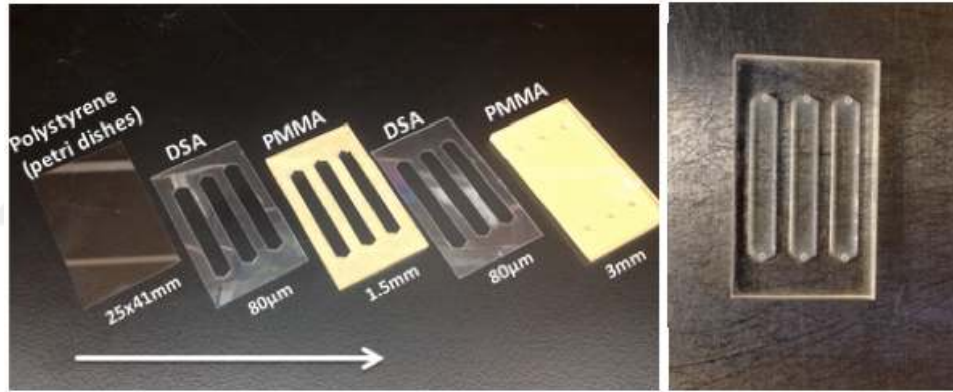
- 1.5-milimetre (mm) kalınlığında polimetilmetakrilat (PMMA) (McMaster Carr, Santa Fe Springs, CA, USA),
- 3.175-mm kalınlığında polimetilmetakrilat (PMMA) (McMaster Carr, Santa Fe Springs, CA, USA),
- 80-mikrometre (µm) kalınlığında çift taraflı adeziv film (double-sided adhesive- DSA film) (iTapeStore, Scotch Plains, NJ, USA)
- Polistiren petri dish (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Lazer kesici (VersaLASER; Universal Laser Systems Inc., Arizona, USA).
- Etanol (MedSupplyPartners, Katalog No: EK-4085-1GL/CS, USA)
- Kimwipes (Kimtech Science Brand, Kimberly-Clark Worldwide, Inc, USA)

Deneyisel Uygulama

Mikrofluidik çipler 1.5 and 3.175-mm kalınlığında polimetilmetakrilat (polymethyl methacrylate -PMMA) (McMaster Carr, Santa Fe Springs, CA, USA), 80-µm kalınlığında çift taraflı adeziv film (double-sided adhesive- DSA film) (iTapeStore, Scotch Plains, NJ, USA) ve polistiren petri dish kullanılarak (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) yapılmıştır (77). Mikrofluidik çipin tüm bileşenleri 25 × 41 mm ölçülerinde olacak şekilde lazer kesici (VersaLASER; Universal Laser Systems Inc., Arizona, USA) kullanılarak kesilmiştir (Şekil 17). Her çip, hücre kültürü için 3 kanal (Genişlik: 4 mm, Boy: 27 mm) içerecek şekilde tasarlanmıştır. Çipin üst bileşeni 3.175-mm kalınlığındaki PMMA katmanlarından, orta kesimi, 1.5-kalınlığındaki PMMA katmanlardan, en alt kesimi ise petri dishlerden elde edilmiştir. En alt katmanın, polistiren petri kaplarından kesilmesinin amacı hücrelerin etkin bir şekilde yüzeye yapışmalarını sağlamaktır (Şekil 18).



Şekil 17. Mikrofluidik çipin ölçüleri



Şekil 18. Mikrofluidik çipin bileşenleri

Mikrofluidik çipin tüm bileşenlerinin kesilmesinin ardından, bileşenlerin birleştirilerek çipin elde edilme aşaması steril koşullar altında gerçekleştirildi. Çipin tüm bileşenleri öncelikle %70'lik etil alkol ile temizlendi ve 1 saat süreyle ultra violet- UV altında steril edildi. Daha sonra laminar akışlı biyogüvenlik sınıf II kabinet içinde tüm birleştirme işlemleri yapıldı.

3.6.3. Hücrelerin Mikrofluidik Çipe Ekilmesi ve Tüp Bağlantılarının Yapılması

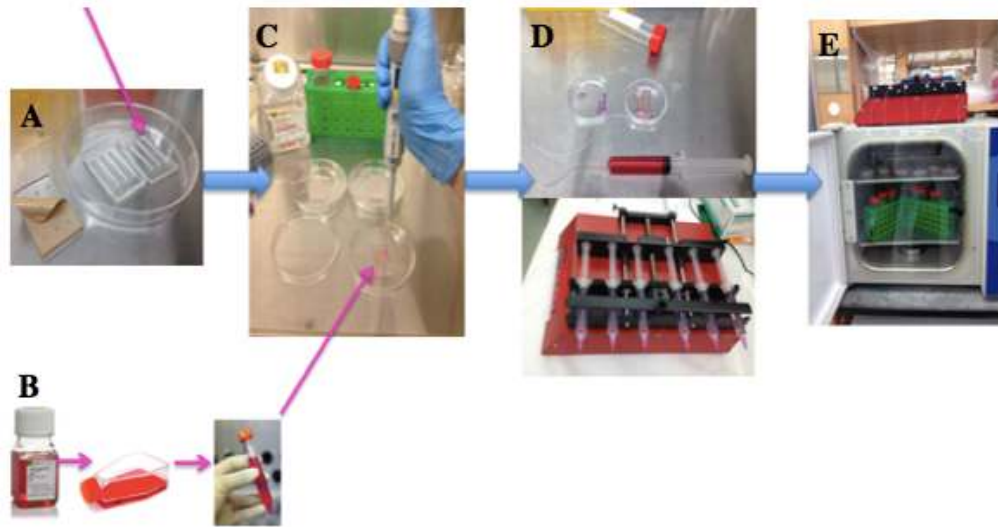
Kullanılan Malzemeler- Cihazlar

- Gaz geçirgen tüpler (Saint-Gobain PPL Corp., OH, USA)
- Epoksi yapıştırıcı (Devcon, Danvers, MA, USA)

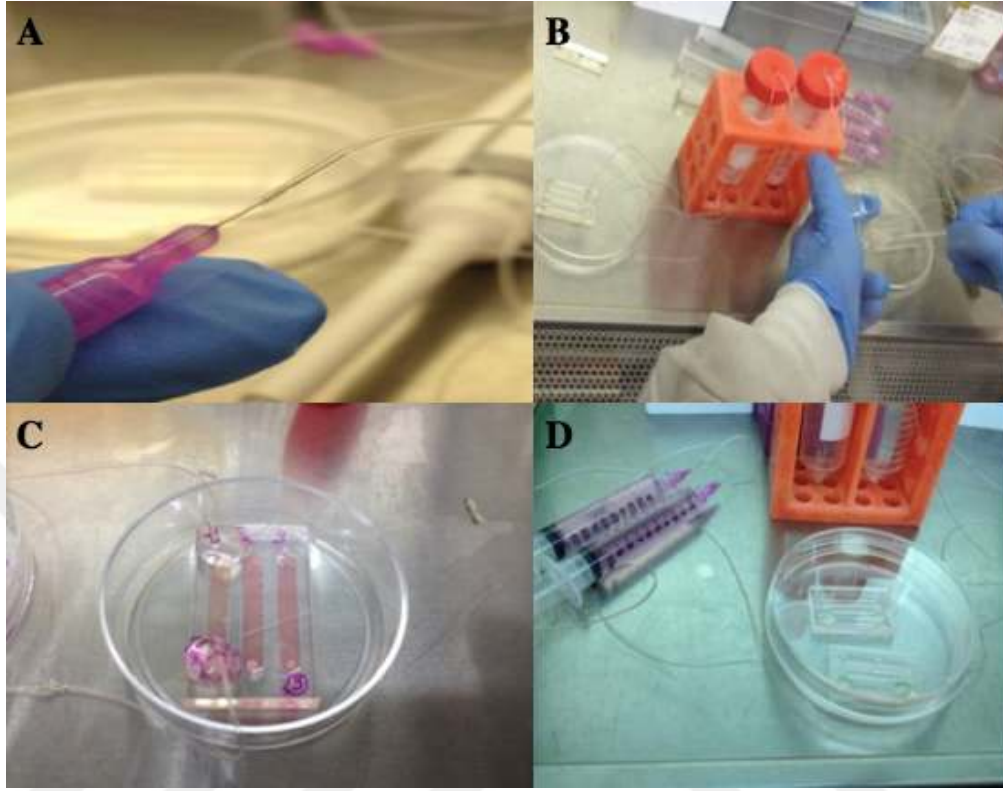
- 8 kanallı şırınga pompası (New Era Pump Systems Inc., Farmingdale, NY, USA)
- 3 mililitrelik steril şırınga (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)
- 26-G küt uçlu iğne (SAI Infusion Technologies Inc., Baltimore, MD, USA)
- Karbondioksit inköbatör (Thermo Scientific, USA)

Deneysel Uygulama

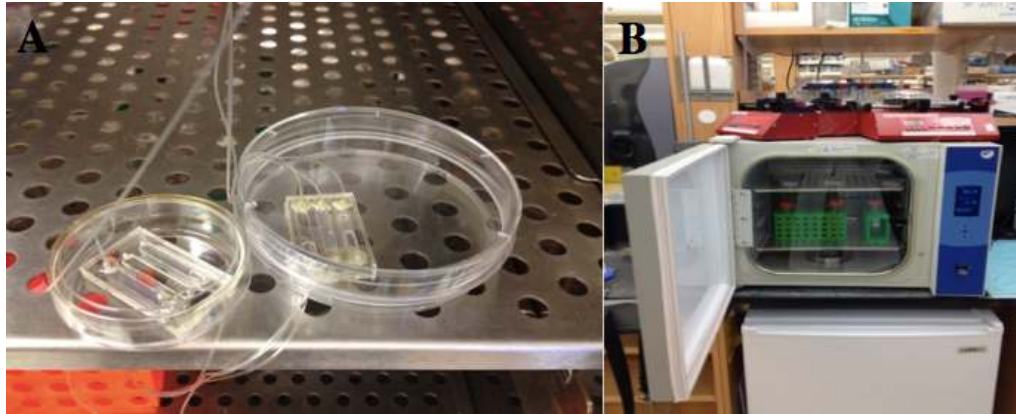
Mikrofluidik çipin birleştirilme ve sterilizasyon işlemlerinden sonra, çipin kanallarının içine, giriş ve çıkış deliklerini kullanarak yoğunluğu 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Kanal başına $1,8 \times 10^5$ hücre içerecek şekilde, $180\mu\text{l}$ hücre süspansiyonu ekildi (Şekil 19). Hücrelerin kanala tamamen yapışması amacıyla 12 saat beklenildi ve sonra akım için gerekli olan tüp bağlantıları yapıldı (Şekil 20). Gaz geçirgen tüpler çipin giriş ve çıkış deliklerine, 5 dakikada (dk) kuruyan epoksi yapıştırıcı kullanılarak sabitlendi. Üç mililitrelik şırıngalar 26-G kalınlığındaki iğneler takılı hücre kültür ortamı ile dolduruldu. Şırınga çipin içine giriş deliğine sabitlenen tüplere bağlandı. Çıkış deliğinden çıkan tüpler, 50 ml'lik tüplere sabitlenerek, deney süresince kullanılan ortamın toplanması sağlandı. Şırıngalar, otomatik şırınga pompasına bağlandı ve istenilen akım hızı ayarlanarak deneye başlandı (Şekil 21). Kontaminasyon riskini önlemek amacıyla, çipler ve media hergün değiştirildi.



Şekil 19. Mikrofluidik çiplerin içine hücre ekilmesi. A) Mikrofluidik çiplerin hazırlanması, B) Ekimi yapılacak hücrelerin elde edilmesi, C) Hücrelerin çip içine ekilmesi, D) Tüp ve şırınga bağlantılarının yapılması, E) Dinamik kültür için sıvı akımının başlatılması.



Şekil 20. Gaz geçirgen tüp bağlantılarının yapılması. A) Şırınga uçlarının gaz geçirgen tüplere bağlanması, B) Tüplerin çiplerin giriş ve çıkış deliklerine bağlanması. C) Epoksi yapıştırıcı ile tüplerin deliklere sabitlenmesi, D) Tüm bağlantılarla birlikte çiplerin görüntüsü.



Şekil 21. Karbondioksit inkübatör içinde mikrofluidik çip platformu. A) Çipler bağlantıları hasar görmeyecek şekilde inkübatörün üst rafına konulur. B) Şırınga pompaları bağlantılarının hasar görmesini engelleyecek şekilde inkübatörün üstüne konulur.

3.6.4. Mikrofluidik Çiplerle Dinamik Kültür Deneylerinin Optimizasyonu

Kullanılan Malzemeler- Cihazlar

- Fibronektin (Sigma-Aldrich, USA)
- Laminin (Sigma-Aldrich, USA)
- Matrigel Matrix (BD Biosciences, MA, USA)
- Cover Slips 40 x 4 mm (Fischer Scientific Catalog # 12-545-87, USA)
- Polistiren petri dish (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)

Deneysel Uygulama

Optimizasyon sürecinde asıl hedef hücrelerin, çipler içinde uygun koşul ve zaman içinde yaşatılması ve planlanan deneylerin yapılabilmesi için eksikliklerin veya problemlerin giderilmesi idi. Bu süreçte karşılaşılan en önemli sorun, çiplerin deneylerin başlatıldıktan sonra sızdırma yapması olarak gözlemlendi. Bu durumu aşmak amacıyla, çiplerin birleştirilme süreci mengene ile yapılmaya başlandı ve çiplerin hava kabarcığı kalmayacak şekilde birbirine yapışması sağlandı. Hücrelerin çip yüzeyine etkili bir şekilde yapışması için polistiren petrilerden çiplerin en alt tabakası kesildi ve hücrelerin yapışması sağlandı. Deneyler için optimum sıvı akış hızının bulunabilmesi için 2-4-6 $\mu\text{l}/\text{dk}$ hızları sırasıyla denendi. Her bir sıvı akım hızı sonrasında canlılık analizleri yapıldı. Optimum hız her iki hücre hattı içinde 2 $\mu\text{l}/\text{dk}$ olarak belirlendi. Deney planının uzunluğuna göre ve deneyin sonlandırılmasından sonra gerekli analizlerin yapılabilmesine olanak sağlayacak şekilde hücre konsantrasyonu belirlendi. Hücre konsantrasyonları, immünohistokimya deneylerinde hücrelerin kalkmasını engelleyecek şekilde; post-genomik analizlerde yeterli hücre sayısına erişilebilecek şekilde HCT-116: 0.3 milyon/ml, HT-29 ise 0.8 milyon/ml ayarlandı.

3.6.5. Dinamik Kültür Optimizasyonunda Canlılık Analizi

Kullanılan Malzemeler- Cihazlar

- Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells (Molecular Probes, Cat no: L-3224, USA)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7.4 (1X) (PBS) ([$^-$] kalsiyum klorür [$^-$] Magnezyum klorür) (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)

- Floresans mikroskop (Zeiss, Axio Observer, USA)

Deneysel Uygulama

Optimizasyon sürecinde farklı hızların denenmesinin ardından (2-4-6 $\mu\text{l/dk}$), hücre Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, Cat no: L-3224, USA) kullanılarak canlılık analizleri yapıldı. Bu kit iki prob kullanılması ile canlı ve ölü hücrelerin iki renkli floresan ile ayrılmasını sağlar. 20 μl , konsantrasyonu 2 mM etidium homodimer-1 (EthD-1) stok solüsyonu 10 mL steril hücre kültürüne uygun fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile karıştırılarak 4 μM EthD-1 solüsyonu elde edildi. Daha sonra 5 μl , konsantrasyonu 4 mM olan calcein AM stok solüsyonu da önceden hazırlanan 10 mL EthD-1 solüsyonuna eklendi ve çalışma solüsyonu (veya son adıyla LIVE/DEAD® assay reagent- 2 μM calcein AM ve 4 μM EthD-1) elde edildi. Canlılık anlyzi yapılacak olan hücrelerin kültür ortamı aspire edildi ve steril PBS ile yıkanarak hücreler kültür ortamından arındırıldı. Hücrelerin üzerine 100-150 μL çalışma solüsyonu eklendi ve 37°C’de 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda floresan mikroskop ile görüntüleme yapıldı (Zeiss, Axio Observer, USA).

3.6.6. Mikrofluidik Çip Platformundaki Sıvı Akışının Bilgisayar Modellemesi

3.6.6.1 Sıvı Akış Geriliminin Teorik Olarak Hesaplanması

Aderan hücreler üzerinde mikrofluidik sıvı akımı ile oluşan sıvı geriliminin teorik olarak analizi yapıldı. Mikrofluidik kanal içindeki Reynold sayısı aşağıdaki denklem ile hesaplandı.

$$Re = \frac{Q D_H \rho}{\mu A}$$

Denklemdaki Q sıvı akışının hacim cinsinden değeri ($2 \mu\text{L min}^{-1}$), D_H tüpün hidrolik çapı, ρ sıvının yoğunluğu, μ sıvının dinamik viskozitesi, A ise tüpün çapraz alanıdır. Dikdörtgen şeklindeki kanalın boyu (h) ve genişliği (w) kullanılarak, hidrolik çapı aşağıdaki denklemle hesaplandı.

$$D_H = \frac{2hw}{(h + w)}$$

Ortam sıcaklığının 37°C olduğu koşullarda, sıvı yoğunluğu 1000 kg m^{-3} , dinamik viskozitesi $0.000692 \text{ kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak kabul edildi. Tüm bu veriler doğrultusunda laminar sıvı

akımının olduğu bölgedeki Reynold sayısı, 0.0173 olarak hesaplandı. which belongs to laminar flow region.

Laminar sıvı akımındaki ortalama sıvı akım gerilimi- shear stress aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\tau = \frac{6\mu Q}{h^2 w}$$

Kanalın orta uzunluğundaki sıvı akım gerilimi- shear stress, $\tau 1.44 \times 10^{-5}$ Pa (or 14.4×10^{-5} dyne cm^{-2}) olarak hesaplandı. Kanalın orta uzunluğundaki ($L/2$) sıvı sisteminin sınır katman kalınlığı aşağıdaki denklem ile 41 mm olarak hesaplandı.

$$\delta = 4.91 \sqrt{\frac{\mu w h L / 2}{\rho Q}}$$

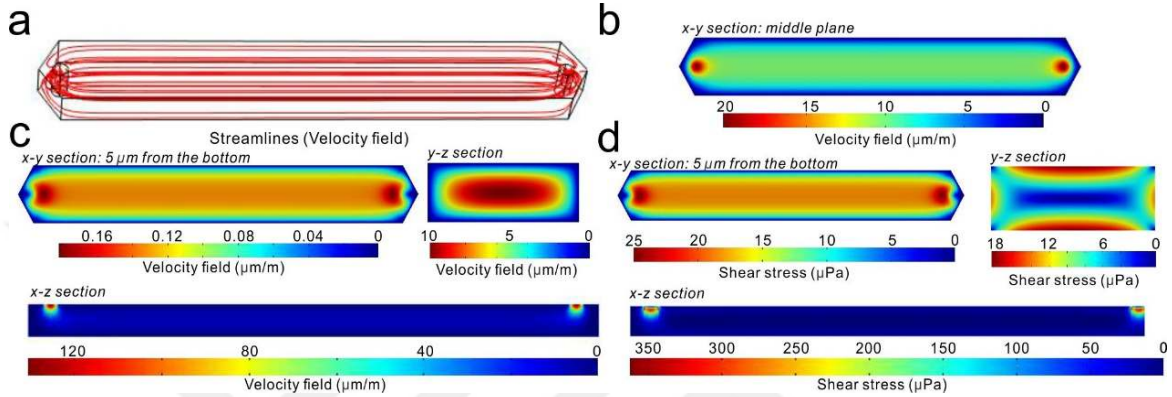
Mikrofluidik kanal içindeki sıvı olarak sıvı akım gerilimi- shear stress, laminar akış içindeki tüm Newton tipi akışkanlar için aşağıdaki denklemle hesaplandı. u kanal boyunca (x düzlemi) sıvı velositesi; y ise mikrofluidik kanal duvarından tabana kadar olan uzaklık olarak alındı.

$$\tau = \mu \frac{\partial u}{\partial y}$$

3.6.6.2. Sıvı Akım Geriliminin- ‘Shear stres’ Numerik Simülasyonu

Bölgesel sıvı akım geriliminin-shear stress dağılımının değerlendirilmesi için üç-boyutlu numerik simülasyon yazılımı Comsol Multiphysics™ kullanıldı. Newton tipi akışkanlar için sürekli durumun denklemi Navier-Stokes denklemi, simülasyon için kullanıldı. Modelde mikrofluidik kanalın gerçek boyutları kullanıldı. Perfüze olan kültür ortamı yani sıvı homojen sıkıştırılamayan ve yoğunluğu 1000 kg m^{-3} , viskozitesi $0.000692 \text{ kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$ olan Newton tip akışkanlar olarak modellendi. Mikrofluidik kanalın girişi sıvı akışının hacimsel birimi $2 \mu\text{L min}^{-1}$ ile laminar giriş olarak modellendi, kanalın çıkışındaki basınç ise 0 kPa olarak modellendi. Simüle edilen akımlar, tüm kanal boyunca ve hücrelerin yapışmış olduğu tüm alan boyunca Reynold sayısının hesaplanmasıyla tahmin edildiği gibi düzlemsel akım olarak gösterildi (Şekil 22a). Mikrofluidik kanalın orta katmanındaki velosite alanının $10 \mu\text{m s}^{-1}$ (Şekil 22b) olmasına rağmen, hücrelerin yapışmış olduğu alanda bu yaklaşık $0.12 \mu\text{m s}^{-1}$ (Şekil 22c) olacak şekilde çok küçük

olarak hesaplandı (Şekil 22d). X-Y, Y-Z and Z-X düzlemlerinde simüle edilen velosite alanı ve sıvı akım gerilimi- shear stress, hücrenin yapışmış olduğu alan üzerinde eşit dağılım göstermektedir (Şekil 22c,d).

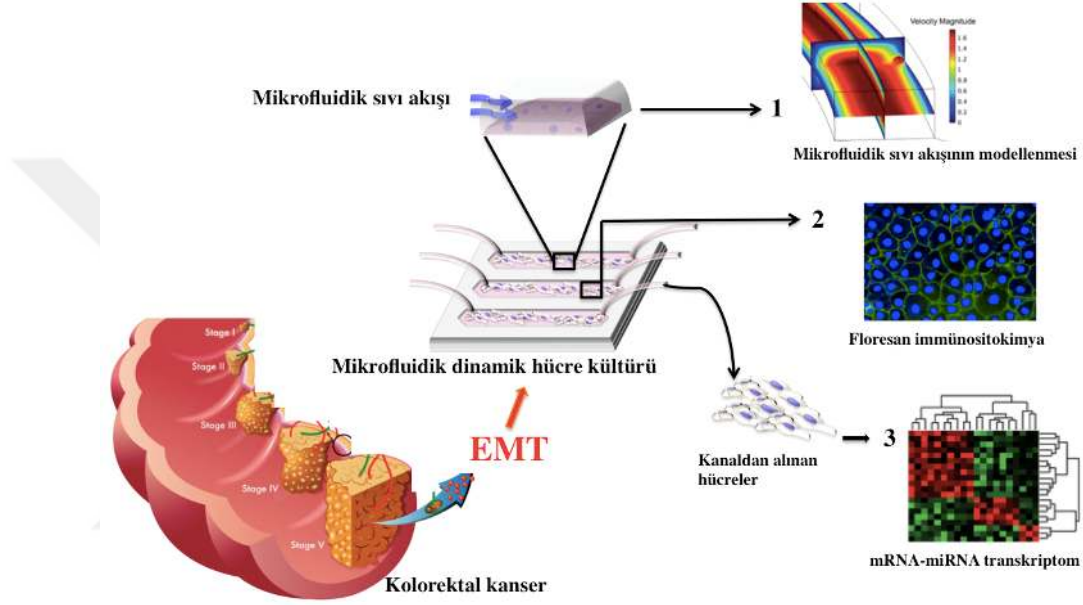


Şekil 22. Numerik sıvı dinamizm simülasyonu. **A)** Akım çizgileri; **B)** Mikrofluidik ortasındaki velosite alanı, **C)** XY, YZ ve ZX düzlemlerindeki velosite alanı; **D)** XY, YZ and ZX düzlemlerinde sıvı akım gerilimi- shear stress.

3.6.7. Deney Koşullarının Belirlenmesi

Mikrofluidik çip ile dinamik hücre kültür optimizasyonu ve tüm yazılımsal modellemelerle sıvı akımının ve sıvı geriliminin-shear stress kanalın her yerinde eşit dağılıma sahip olduğu gösterildikten sonra, deneylere başlandı. Mikrofluidik çiplerin üretilip steril edilmesinden sonra, hücreler kanallara ekildi ve hücrelerin kanal yüzeyinde tamamen yapışması amacıyla 24 saat beklenildi. Hücrelerin tamamen yapışması gerçekleşmeden, tüplerin bağlantılarının yapılması başlatılan akım ile yapışmayan hücrelerin çipten çıkmasına neden olacağından bu süre oldukça önemlidir. Hücrelerin tamamen yapıştığı gözlenip, mikrofluidik akım bağlantıları yapıldıktan sonra 48 saat boyunca hücreler laminar sıvı akışına ve bununla oluşan sıvı gerilimine-shear strese maruz bırakıldılar. 48 saat sonunda sıvı akışı sonlandırılıp, immünohistokimya boyamaları ve post-genomik analizler yapıldı (Şekil 23). Laminar sıvı akışının ve sıvı geriliminin-shear stress KRK EMT'si üzerindeki olası pozitif etkisini gözleyebilmek için, pozitif kontrol olarak EMT'yi indükleyen TGF-beta kullanıldı. TGF-beta'nın, hücre kültür ortamındaki konsantrasyonu 10 ng/ml olacak şekilde ayarlandı (88, 89). TGF-beta grubuna, TGF-beta

eklenmesinden 12 saat önce FBS'siz kültür ortamı (0.5% FBS, 1% penisilin-streptomisin eklenmiş DMEM) verilmesi ile FBS-açlığı uygulandı. Negatif kontrol olarak, mikrofluidik dinamik sıvı akışının olmadığı, hücrelerin manuel olarak kültür edildiği geleneksel statik hücre kültürü yapıldı. Statik hücre kültür deneylerinde, çip içinde hücrelerin yeterli kültür ortamına ulaşabilmesi ve olası hipoksiyi ortadan kaldırmak için 12 saatte bir kültür ortamı değiştirildi.



Şekil 23. Projenin deneysel şeması

Deney Grupları

- 1- Mikrofluidik dinamik kültür grubu
- 2- Statik hücre kültür grubu (Negatif kontrol)
- 3- TGF-beta'nın kullanıldığı statik kültür grubu (Pozitif kontrol)

Deney Planı Özeti

1. GÜN:

- Mikrofluidik çiplerin hazırlanması-sterilizasyonu, hücrelerin ekilmesi
- Mikrofluidik dinamik kültür grubu için tüp bağlantılarının yapılması
- Statik grubun, kültür ortamının 24 saat sonunda değiştirilmesi

- TGF-beta grubunun kültür ortamının hücrelerin ekiminden 24 saat sonra 10 ng/ml TGF-beta içeren kültür ortamı ile değiştirilmesi (TGF-beta eklenmesinden 12 saat öncesinde hücreler FBS'siz kültür ortamı eklenmesi)

2. GÜN:

- Mikrofluidik dinamik kültür grubunda, sürekli sıvı akımının devam etmesi için platforma yeni kültür ortamlarının yüklenmesi
- Statik grubun, kültür ortamının 12 saatte bir manuel olarak pipetaj ile değiştirilmesi
- TGF-beta grubunun, kültür ortamının TGF-beta içeren taze media ile 12 saatte bir manuel olarak pipetaj ile değiştirilmesi

3. GÜN:

- Mikrofluidik dinamik kültür grubunda, sürekli sıvı akımının devam etmesi için platforma yeni kültür ortamlarının yüklenmesi
- Statik grubun, kültür ortamının 12 saatte bir manuel olarak pipetaj ile değiştirilmesi
- TGF-beta grubunun, kültür ortamının TGF-beta içeren taze media ile 12 saatte bir manuel olarak pipetaj ile değiştirilmesi

4. GÜN:

- Dinamik kültür deneylerinin sonlandırılması ve ilgili deneylerin (Canlılık, floresan immünositokimya, mRNA-mirNA transkriptom analizleri) yapılması

3.6.8. Proliferasyonu Belirlemek için Canlılık Analizi

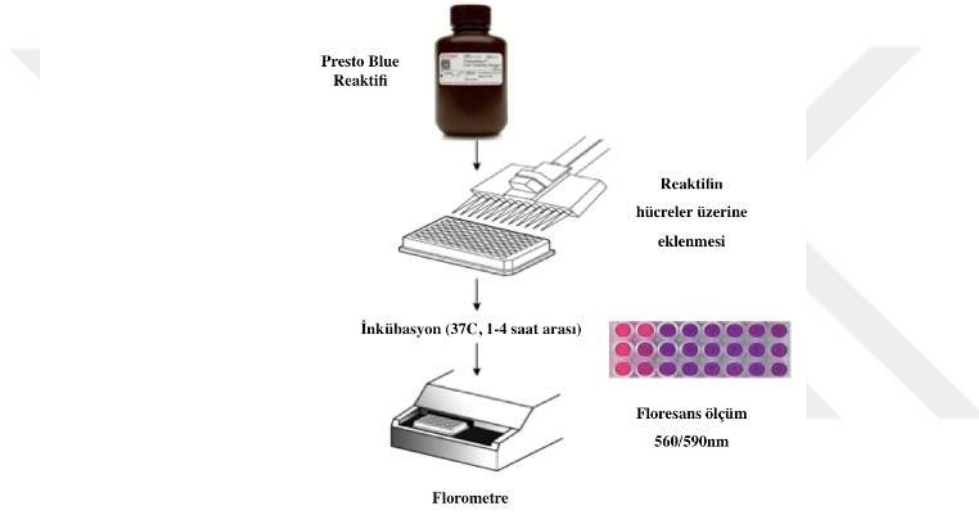
Kullanılan Malzemeler- Cihazlar

- Presto Blue Viability Reagent (Invitrogen, Frederick, MD, USA).
- Çoklu plaka okuyucu (BioTek Instruments, Inc., Synergy 2 Multi-mode-microplate reader, USA)
- 96 kuyucuklu plate (MedSupply Partners, Katalog no: BTS-781962, USA)

Deneysel Uygulama

Hücrelerin proliferasyonlarını takip etmek amacıyla, Presto Blue Cell Viability Reagent kullanılarak canlılık analizi yapıldı. Presto Blue resazurin tabanlı bir canlılık analizi sağlar. Canlı olan hücrelerin metabolik aktivasyonu sonucu mavi olan reaktifin rengi pembe-kırmızıya döner

(Şekil 24). Kolorimetrik değişim, florometrik olarak 560nm (eksitasyon) ve 590nm (emisyon) dalga boylarında çoklu plaka okuyucu (BioTek Instruments, Inc., Synergy 2 Multi-mode-microplate reader, USA) ile okundu. Hücre sayısının belirlenebilmesi için seri dilüsyon ile $0,25 \times 10^4$ hücre ($0,25 \times 10^4$ - $0,5 \times 10^4$ - $0,75 \times 10^4$ - 1×10^4 - $1,5 \times 10^4$ - 2×10^4) olan kuyucuklardan, standart eğri çıkartıldı. Presto blue reaktifi hücre kültür ortamına %10 oranında eklendi. Elde edilen reaktif içeren kültür ortamı hücrelere verildi ve 30 dk inkübatörde inkübe edildi. Renk değişimi plaka okuyucu ile okundu ve hücre sayıları standart eğrilerden elde edildi.



Şekil 24. Presto Blue canlılık/proliferasyon deneyi

3.6.9. Floresan İmmünositokimya

Kullanılan Malzemeler- Cihazlar

- E-kaderin primer antikör (Abcam, ab1416, Cambridge, MA, USA)
- N-kaderin primer antikör (Abcam, ab12221, Cambridge, MA, USA)
- Vimentin primer antikör (Novus Biological, NB300-223, Littleton, CO, USA)
- 4% Para-formaldehit (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)
- Sığır serum albümin (Sigma Aldrich, Cat no: A2153, St. Louis, MO, USA)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, Cat no: T9289, St Louis, MO, USA)]
- Alexa Fluor-488-goat anti-mouse (Life Technologies, A-10667, Carlsbad, CA, USA)
- Alexa Fluor-568 goat anti-rabbit (Life Technologies, A-11011, Carlsbad, CA, USA)

- Alexa Fluor-647 donkey anti-chicken (Jackson ImmunoResearch Lab, 703-606-155, West Grove, PA, USA)
- 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) (Invitrogen Molecular Probes, D1306, Eugene, OR, USA)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7.4 (1X) (PBS) ([-] kalsiyum klorür [-] Magnezyum klorür) (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)
- Floresans mikroskop (Zeiss, Axio Observer, USA)

Deneyisel Uygulama

TGF-beta'nın uygulandığı grup, EMT'nin indüklendiği pozitif grup olarak kabul edildi. Bu grupta, EMT'yi gösteren epitelyal protein olan E-kaderin, mezenkimal proteinler olan N-kaderin ve Vimentine floresans immünositokimya aracılığıyla bakıldı. Mikrofluidik dinamik kültür grubu ile TGF-beta grubunun benzerliğinin gösterilmesi yani dinamik kültür grubunda EMT sürecinin mikrofluidik sıvı akışı ile indüklendiğini göstermek amacıyla immünohistokimya boyamaları yapıldı. EMT pozitif TGF-beta grubunda, statik gruba göre rölatif E-kaderin ekspresyon azalması, N-kaderin ve vimentinde ise ekspresyon artışı görülmeliyken; TGF-beta ile dinamik kültür grubunda boyama paternlerinin aynı olması beklenmektedir.

Hücrelerin ortamı hücrelere zarar vermeden aspire edilip atıldı ve hücreler PBS ile dikkatlice yıkandı. Ardından, %4 para-formaldehit (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) ile 20 dk oda sıcaklığında inkübe ederek hücrelerin fikse olması sağlandı. Fiksasyondan sonra hücreler boyama tamponu (PBS içinde %1 sığır serum albümini ve %0.3 Triton X-100) içinde dilüe edilmiş E-kaderin (dilüsyon 1:250), N-kaderin (dilüsyon 1:500) ve Vimentin (dilüsyon 1:250) antikorları ile gece boyunca 4°C'de inkübe edildiler. Gece boyunca süren inkübasyondan sonra, primer antikor kalıntısının kalmaması için hücreler iki defa PBS ile yıkandı. Yıkama basamaklarından sonra, hücreler Alexa Fluor-488 (dilüsyon 1:1000), Alexa Fluor-568 (dilüsyon 1:500) ve Alexa Fluor-647 (dilüsyon 1:500) sekonder antikorları ile oda sıcaklığında hafif çalkalama eşliğinde 2 saat inkübe edildi. Sekonder antikorların uygulanmasından sonra DNA, nükleus boyası 4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dihidroklorür (DAPI) (dilüsyon 1:1000) ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Tüm boyamaların ardından hücreler dikkatlice yıkandı ve floresans mikroskop ile uygun dalga boyu seçilerek (E-kaderin için 488, N-kaderin için 568, Vimentin için 647) görüntülendi.

3.6.10. miRNA Ekspresyon Analizi

Kullanılan Malzemeler-Cihazlar

- miRNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).
- Affymetrix Fluidics station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- Affymetrix gene chip scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- Affymetrix® miRNA QC tool 1.1.1.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- Affymetrix Expression Console Summarization algorithm (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

Deneyisel Uygulama

miRNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. cDNA sentezi öncesinde her örnek içine kontrol olarak sentetik miRNA eklenerek (spike- miRNA). mirNAekspresyonu için mikro-array Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Arrays kiti (Affymetrix, Santa Clara, CA) kullanılarak gerçekleştirildi. Kit, miRBase Release 20 versiyonunu kullanarak 30,400 olgun miRNA probe setini (2,578 insan miRNA prob) taramaktadır. Kaullanılan array'in yıkanma ve boyanma işlemleri Affymetrix Fluidics station 450, tarama işlemleri Affymetrix gene chip scanner 3000 7G, analiz işlemleri ise data normalizasyonu ve kalite kontrolünün de yapıldığı, cihazın kendi yazılımı olan Affymetrix® miRNA QC tool 1.1.1.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) kullanılarak gerçekleştirildi. Ekspresyon değerleri ise mirNA için RNA ve belirleme limitleri kullanılarak, Affymetrix Expression Console Summarization probe-set algoritması aracılığıyla elde edildi. Tüm transkriptom deneyleri, duplike olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.6.11. mRNA Transkriptom Analizleri

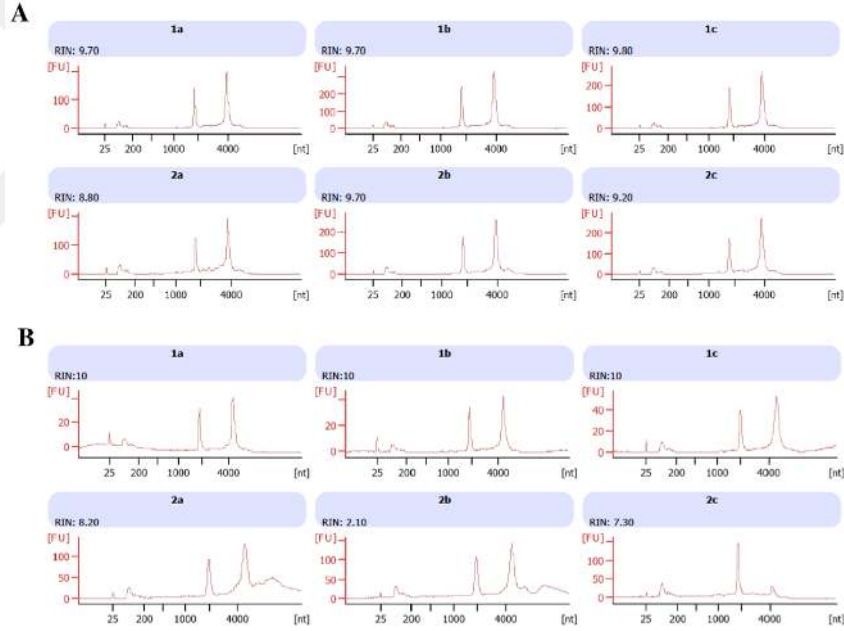
Kullanılan Malzemeler-Cihazlar

- RNeasy mini-prep (Qiagen, Valencia, CA, USA)
- NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)
- Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies Inc, Palo Alto, CA, USA)

- Affymetrix GeneChip Human Transcriptome Arrays (HTA) 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- Affymetrix Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

Deneysel Uygulama

Hücrelerden total RNA, kolon tabanlı RNA izolasyon kiti ile elde edildi (RNeasy mini-prep, Qiagen, Valencia, CA, USA). İzolasyondan sonra RNA konsantrasyonu spektrofotometrik olarak, (ND-1000 spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE); kalitesi de Agilent 2100 Bioanalyzer sistemi (Agilent Technologies Inc, Palo Alto, CA) kullanılarak test edildi (Şekil 10).



Şekil 25. Agilent Bioanalyzer ile RNA kalitesinin kontrol edilmesi

Her bir örnekten 250 nanogram total RNA, cDNA eldesi için kullanıldı (GeneChip WT Plus Reagent Kit, Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). Elde edilen cDNA'lar 45°C'de 60 rpm hızla çalkanarak 16 saat boyunca inkübe edilerek, GeneChip Human Transcriptome Arrays (HTA) 2.0'e hibridize edildi. Transkriptom array 44,699 geni tanımlayan mRNA'yı içermektedir. Daha sonra array Affymetrix Fluidics Station 450 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) ile yıkandı ve GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) kullanılarak tarandı.

3.6.12. miRNA Ekspresyon ve mRNA Transkriptom Analizlerinin Doğrulanması

Yapılan miRNA ekspresyon ve mRNA transkriptom analizleri gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile doğrulandı.

miRNA doğrulama reaksiyonları için mir10a-5p, mir10b-5p, mir320e ve mir4419a miRNA'ları seçildi. Çoğaltma işlemleri için Qiagen Mispript Precursory Assays, miRNA primerleri kullanıldı (mir320e: cat no. MP00009072; mir4419a: cat no. MP00010577; mir10b-5p: cat no. MP00000168; mir10a-5p: cat no. MP00000161). Master miks hazırlığında, miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, catNo: 218073, Berlin, Germany) kullanıldı. Reaksiyon hazırlığında, kullanılan reaktif, primer, kalıp miktarları aşağıdaki gibidir.

- 2x miscript SYBR green master mix: 12,5 μ l
- 10xmispript primer (forward-reverse): 2,5 μ l
- RNase –free water: 5 μ l
- Kalıp miRNA CDNA'sı: 5 μ l

mRNA doğrulama çalışması için AKR1B10 (aldo-keto reductase family 1, member B10-aldose reductase), CYP1B1 (cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1), TP53INP1 (tumor protein p53 inducible nuclear protein 1), IFI6 (interferon, alpha-inducible protein 6) genleri seçilmiştir. Seçilen genler için ileri ve geri olacak şekilde iki primer kullanıldı. Kullanılan primerler aşağıdaki gibidir.

AKR1B10: For-ACGGATCAGAACCTGGGCTG , Rev-ACGGATCAGAACCTGGGCTG;
CYP1B1: For-GTCTTGCCCTAGGCAAAGGTC, Rev-GGATGGACAGCGGGTTTAGC;
IFI6: For-CGCGCGCGGCGCCACCATGC, Rev-GGGCCTTCCAGAACCCGGAG;
TP53INP1: For-CGCCCCGCCCCGCGTCCTTC, Rev-CCTTGTCTTTAGTTGGCCCAATG.

mRNA çalışmasında pcr reaksiyon hazırlığı için, Light Cycler Faststart DNA Master^{Plus} SYBR Green I (Qiagen, Cat no. 03515885001, Berlin, Germany) kit kullanıldı. Reaksiyon hazırlığında, kullanılan reaktif, primer, kalıp miktarları aşağıdaki gibidir.

- 5x SYBR green master mix: 4 μ l
- primer (forward-reverse): 2 μ l
- RNase –free water: 11 μ l
- Kalıp mRNA CDNA'sı: 3 μ l

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

1) Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 02.06.2011 tarihinde 228-GOA protokol numarası ve 2011/18-04 karar numarasıyla etik kurul onayı alınması (Haziran 2011) ve Eylül 2011 itibariyle literature taramaları ve deney planlamalarının yapılması



2) Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından araştırma bütçesinin kabulü ve malzemelerin temin edilmesi (2012.KB.SAG.003) (Haziran 2012- Haziran 2013)



3) Kolorektal kanser hücrelerinin çoğaltılması (Haziran –Ekim 2013)



4) Mikrofluidik dinamik kültürün yapılabilmesi için gereken mikrofluidik çiplerin dizaynı, üretilmesi ve optimizasyonu (Kasım 2013- Haziran 2014)



5) Mikrofluidik çiplerde, dinamik hücre kültürünün gerçekleştirilmesi (Haziran 2014- Şubat 2015)



6) Floresans immünohistokimya deneylerinin optimizasyonu ve epitelyal mezenkimal transisyonun gösterilmesi (Haziran 2014- Şubat 2015)



7) mRNA ve mikro-RNA transkriptom analizleri ile verilerin elde edilmesi (Kasım 2014-Mart 2015)



8) Transkriptom analizlerinden elde edilen verinin biyoinformatik ve istatistik tabanlı yazılımlarla analizi (Nisan 2015- Ocak 2016)



9) Literatür taraması, tezin, tezden elde edilen yayının yazılması ve bilimsel dergiye gönderilmesi (Şubat 2016- Haziran 2016).

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

3.8.1. İmmünotokimya Değerlendirmesi ve İstatiksel Analiz

Çalışmada doğrultusunda gerçekleştirilen tüm deneyler 3 kez tekrarlandı. İmmünotokimya fotoğraflarından görüntü analizleri Image J programı ile gerçekleştirildi ve elde edilen piksel değerleri anlamlılık açısından istatistiksel olarak değerlendirildi. Dinamik ve statik olmak üzere, iki deney grubu arasındaki anlamlılığın değerlendirilmesi Non-parametrik Mann Whitney U testi ile yapıldı. İstatiksel analiz SPSS V.21.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA) ile gerçekleştirildi. İstatiksel anlamlılık değeri $p \leq 0.05$ olarak değerlendirildi.

3.8.2. mRNA Transkriptomik Veri Analizi

Ham veriler, ilk kez Li and Wong in 2001 tarafından önerilen, 'Robust multi-array average (RMA)' yöntemi ile, Affymetrix tarafından sağlanan Expression Console'da normalize edildi (90, 91). Gruplar arasındaki ekspresyon farklılığı olan genleri belirlemek için tek yönlü ANOVA (One-Way Between-Subject ANOVA, Unpaired) analizi uygulandı. Her genin görevi ve kanserde rolü Pubmed veritabanı üzerinden araştırıldı.

3.8.3. miRNA'lara Özgü Hedef Tahmini

miRNA düzeyindeki farklılıklar Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 array kullanılarak elde edildi. Gruplar arasındaki ekspresyon farklılığı olan genleri belirlemek için tek yönlü ANOVA (One-Way Between-Subject ANOVA, Unpaired) analizi uygulandı. Hedef olma potansiyeli olan miRNA'ların gen hedeflerinin belirlenmesi için miRBase mirNA veritabanı kullanıldı (<http://www.mirbase.org/>) (92).

3.8.4. Sıcaklık Haritası (Heat Map) Analizi

İki örnek arasındaki farklılıkları ortaya koyabilmek adına, sıcaklık haritaları-heatmap çizildi. Veri normalizasyonu için Z-skor düzeltilmesi uygulandı. Daha sonra görüntü elde edebilmek için R-Bioconductor kullanıldı.

3.8.5. Yolak Analizi

KRK'nin EMT sürecinde etkin olan yolakları bulabilmek amacıyla, anlamlı olarak ekspresyon düzeylerinde değişiklik saptanan miRNA ve mRNA'ların bağlantılı olduğu yolaklar üzerinden analizler yapıldı. Yolak topolojisi, insan protein etkileşim veritabanı ile STRING (Versiyon 10.0, erişim tarihi Temmuz 2015) olarak isimlendirilen protein-protein etkileşim ağından elde edildi (93). Metastaz ve EMT sürecinin içinde olan yolaklara odaklanılmıştır. Yuvarlak ve baklava biçimindeki şekiller eksprese olmuş gen ve miRNA hedeflerini temsil etmektedir.

3.8.6. Gen Ontoloji Analizi

Biyolojik süreçleri ve genleri içeren sinyal yolaklarını anlamlandırabilmek için gen ontoloji analizi uygulandı. Bu amaç için ana yolaktaki gen adları, DAVID internet sitesinden input veri olarak alındı (94). Anlamlı GO terimleri (BP = Biological process; CC = Cellular component; MF = Molecular function) ve ulaşılan yolakların anlamlı olabilmesi için p değeri 0.05 (Benjamini FDR) sınır olarak kabul edildi. Bazı biyolojik proseslerin metastaz ve hücre ölümüyle ayrıntılı olduğu görüldü. Bu sonuçlar ana yolakta farklı renklerle işaretlendi. Örneğin, anjiyogenez ilişkili genler mavi olarak işaretlendi, diğer genler gri olarak işaretlendi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmada mikrofluidik dinamik hücre kültür teknikleri kullanılmıştır. Deneyler süresince karşılaşılan en önemli sorun, mikrofluidik dinamik kültür platformunda karşılaşılan sızıntı problemleridir. Sızıntı problemlerinin büyük çoğunluğu deneylerin optimizasyonu süresince aşılmış olmasına rağmen, sıvı dinamizmine ve manuel çip üretimine dayanan bir platform olmasından ötürü sızıntı problemleri tamamen sıfıra indirilememektedir. Sızıntının gözlemlendiği her deney setinde, çipler yeniden yapıldı ve deney seti yenilendi. Bu tür durumlar, deney planları içerisinde zaman kaybı oluşmasına neden olmaktadır. Mikrofluidik çip içerisinde yapılan floresans immünohistokimya deneylerinde, boyama, inkübasyon, yıkama gibi ardıl işlemler sonucu yüzeye yapışmış hücrelerin bir kısmı veya tamamı yüzeyden kopabilmektedir. Bu durum yüzeydeki tüm hücrelerin boyanamaması veya deney setinin kaybedilmesi ile sonuçlanabilmektedir.

3.10. Etik Kurul Onayı

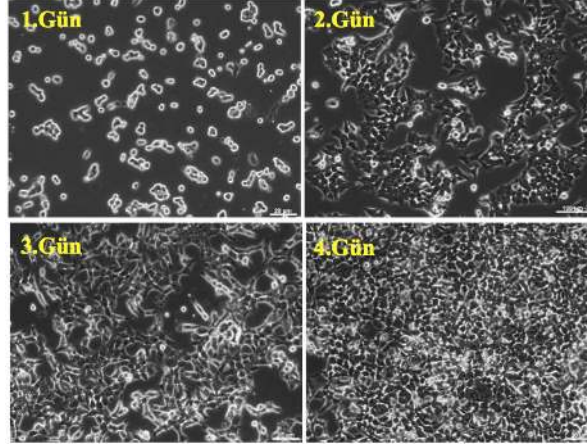
Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 02.06.2011 tarihinde 228-GOA protokol numarası ve 2011/18-04 karar numarasıyla etik kurul onayı almıştır (Ek 1).



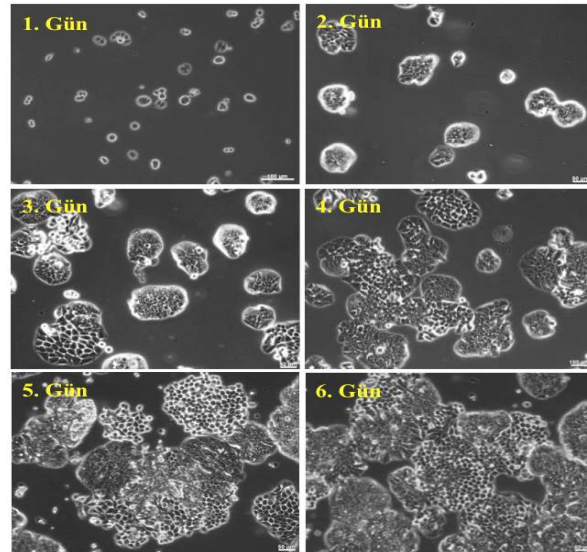
4.BULGULAR

4.1. Kolorektal Kanser Hücrelerinin Çoğaltılması

Deneylerin yapılması için seçilen HCT-116 ve HT-29 ve hücre hatları ATCC'den temin edildikten sonra, deneylerde kullanılmak üzere uygun kültür ortamı içinde çoğaltıldılar (Şekil 26, 27).



Şekil 26. HCT-116 hücrelerinin kültür sürecince gözlenen mikroskopik görüntüleri. (Bar ölçeği: 20 μ m)



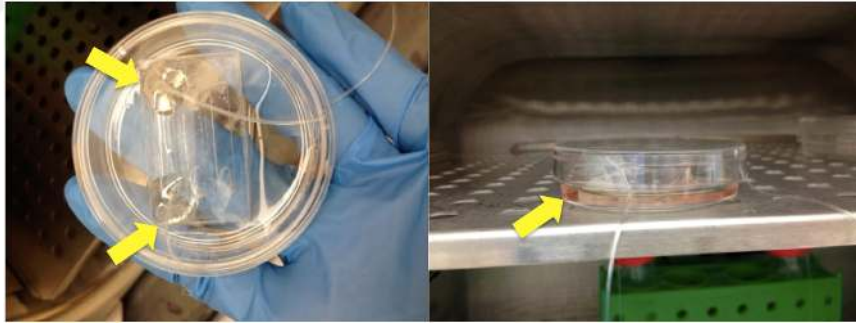
Şekil 27. HT-29 hücrelerinin kültür süresince gözlenen mikroskopik görüntüler. (Bar ölçeği: 50 μ m)

4.2. Mikrofluidik Çipte Dinamik Kültür Optimizasyonu

Mikrofluidik dinamik kültür deneylerine başlamadan önce hücre tipi, hücre sayısı, yüzey materyali, sıvı akış hızı ve çip bileşenleri açısından dinamik kültür modelinin optimizasyonu yapıldı.

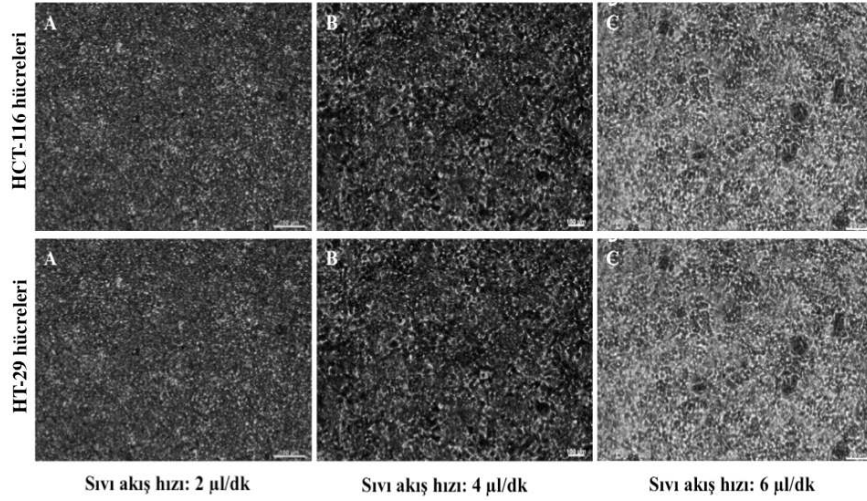
Daha sonra ilk olarak çipten iyi görüntü alabilmek için, çipin en alt tabakasında cam lamel kullanılması hedeflendi. Hücrelerin lamel üzerine verimli yapışabilmesi için, fibronektin ($1-5 \mu\text{l}/\text{cm}^2$), laminin ($3 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) ve matrigel (1%) bileşenleri lamel yüzeyinin hücre yapışmasına uygun hale getirilmesi için kullanıldı. Ancak MatriGel'den daha az hacimlerde kullanabiliyor olmamızdan ötürü MatriGel kullanımı tercih edildi.

Ancak daha sonra dinamik kültür süresince devam eden sıvı akışından doğan sızıntı problemlerini gidermek adına, çip bileşenlerini mengene tarzı sıkıştırıcı kullanarak sıkıştırabilmek için lamel kullanımı yerine petri kültür kaplarından kesilen plakaların kullanılmasına başlandı (Şekil 28).



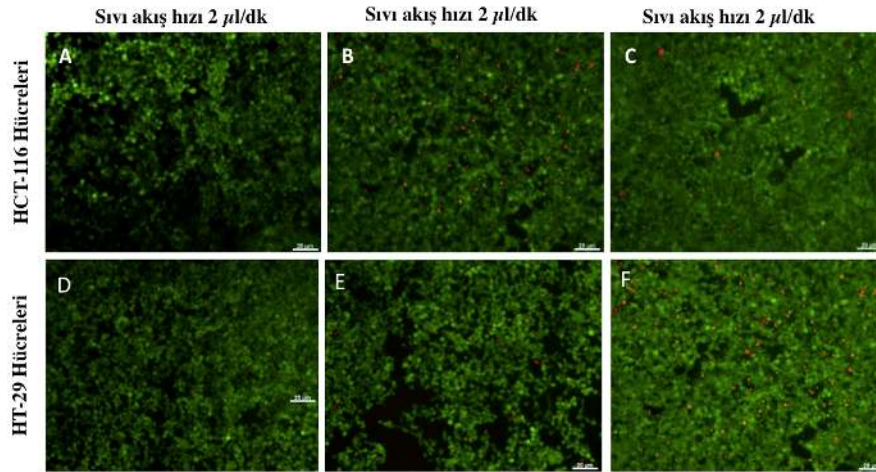
Şekil 28. Sızıntı problemleri

Mikrofluidik dinamik hücre kültür modellerinde deney ve hücre tipine göre farklı sıvı akış hızları seçilebilir. Sıvı akış hızı $2-4-6 \mu\text{l}/\text{dk}$ olacak şekilde farklı hızlar denendi. $4 \mu\text{l}/\text{dk}$ ve $6 \mu\text{l}/\text{dk}$ hızları altında, hücreler üçüncü deney gününden önce konflue oldukları ve dolayısıyla ölüm oranları arttığı için; $2 \mu\text{l}/\text{dk}$ sıvı akış hızının kullanımına karar verildi (Şekil 29).



Şekil 29. Farklı sıvı akış hızları uygulanan HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin görüntüleri. (Bar ölçeği: 100µm)

Sıvı akış hızının artması ile hücre yoğunluğunun artması, çipteki hücrelerin büyüyebileceği uygun yüzey alanının ve besin ortamın hızla azalmasına; ve ölen hücre sayısının da buna bağlı olarak artmasına neden olmaktadır. Hücre canlılığının görüntülenebilmesi için Live/Dead canlılık analizi yapıldı. 2µl/dk sıvı akış hızının ölen hücre sayısının azlığı ve deney planı açısından en uygun hız olduğu mikroskobik olarak da gözlemlendi (Şekil 30).



Şekil 30. HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin Live (Yeşil)- Dead (Kırmızı) Viability Assay floresans mikroskopi görüntüleri. A ve D- Sıvı akış hızı: 2 µl/dk; B ve E- Sıvı akış hızı 4 µl/dk; C ve F- sıvı akış hızı 6 µl/dk. Bar ölçeği: 20µm.

4.3. Mikrofluidik Sıvı Akışının ve Sıvı Geriliminin Hesaplanması

Mikrofluidik çip kanalının içindeki sıvı gerilimi teorik olarak hesaplandı (Şekil 31). Sistem içindeki Stokes sıvı akım rejimine ait olan Reynold sayısı 0.0173 olarak hesaplandı. Stokes sıvı akışında, kanalın orta uzunluğunda duvar sıvı gerilimi aşağıdaki denklemle 1.44×10^{-5} Pa olarak hesaplandı.

$$\tau = \frac{6\mu Q}{h^2 w}$$

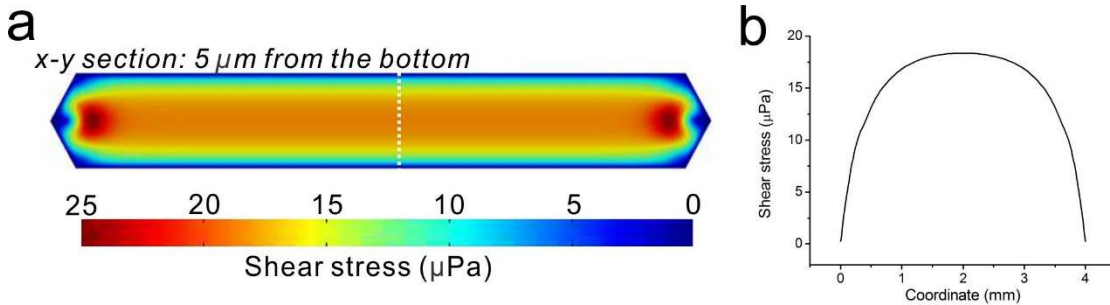
(Denklemdaki μ sıvının dinamik viskozitesi ($0.000692 \text{ kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$), Q hacimsel olarak sıvı akış hızı ($2 \mu\text{L min}^{-1}$), h mikrofluidik çip kanalının yüksekliği (1.55 mm) ve w 'de genişliği (4 mm)).

Sıvı gerilim dağılımının değerlendirilmesi için, Comsol Multiphysics™ yazılımı kullanılarak sıvı dinamiği hesaplandı. Sıkıştırılamayan Newton akışkanları için Navier-Stokes denklemi hesaplandı. Mikrofluidik sistemin orta noktasındaki ($L/2$) bağlantı düzlemlerindeki kalınlık, mikrofluidik kanalın yüksekliğinden daha fazladır. Sıvı içindeki gerilim aşağıdaki formülle açıklandı.

$$\tau = \mu \frac{\partial u}{\partial y}$$

(Formüldeki u kanal boyunca sıvının hızı, y kanalın tabanından itibaren uzaklık olarak alındı.)

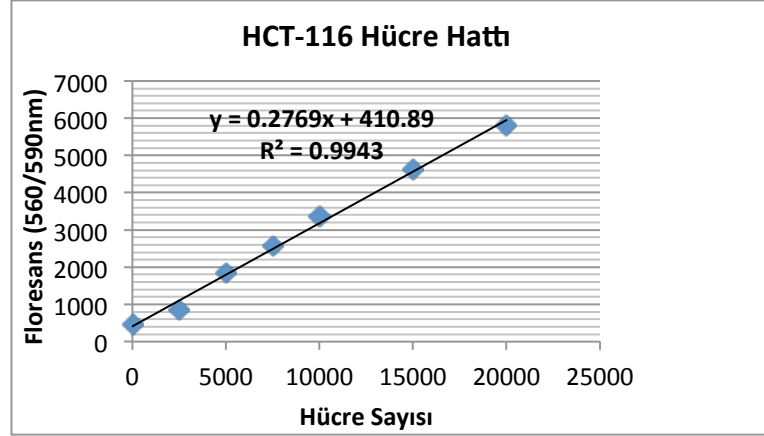
Sıvı hızı ve sıvı gerilimi 'Material-Metot' kısmındaki şekilde açıklandı. Sonuçlar adan hücrelerin $25 \mu\text{Pa}$ değerinde uniform bir gerilime maruz kaldıklarını göstermekte.



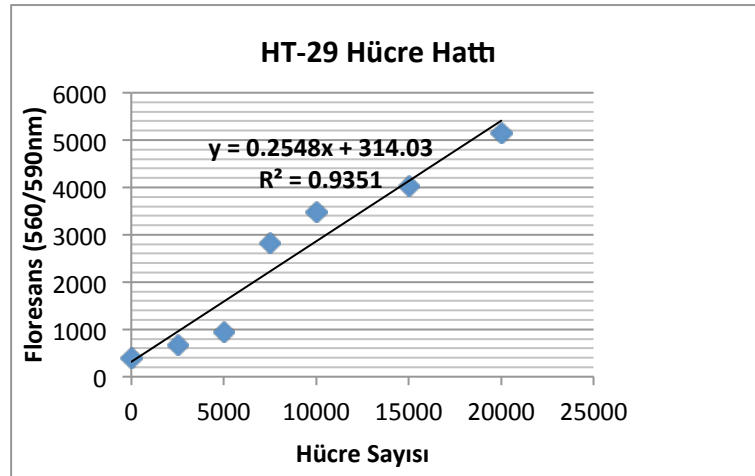
Şekil 31. Mikrofluidik çipte sıvı gerilim dağılımları. **A)** Kanaldan $5 \mu\text{m}$ uzaklıktaki sıvı gerilim kuvveti. **B)** Mikroçip kanalının orta düzleminden kesit alındığı zaman gözlenen sıvı gerilimi.

4.4. Proliferasyon Deneyleri ve Standart Eğriler

Hücrelerin proliferasyonu hakkında yorum yapabilmek için Presto Blue canlılık reaktifi ile canlılık analizi yapıldı. Öncelikli olarak hücre sayısı bilinen deney ortamları üzerinden yapılan florometrik analizlerle hücre tipine göre standart eğri grafikleri çıkartıldı (Şekil 32, 33). Grafiklerden elde edilen eğri denklemleri kullanılarak, sonraki deneylerdeki hücre sayıları hakkında bilgi sahibi olundu.



Şekil 32. HCT-116 hücre hattına ait standart eğri grafiği

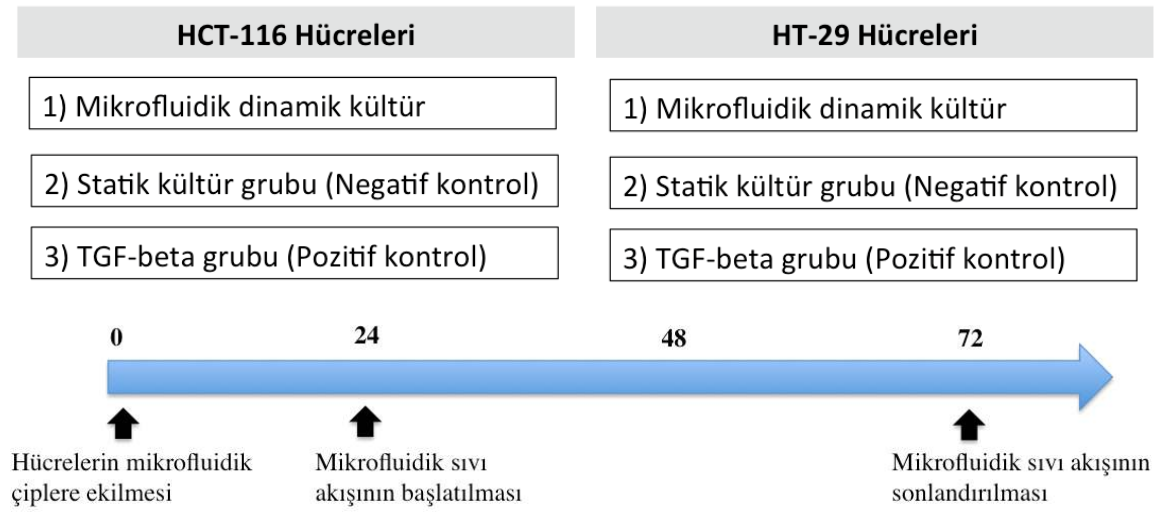


Şekil 33. HT-29 hücre hattına ait standart eğri grafiği

4.5. Dinamik Hücre Kültürü

Kolorektal kanser metastazına, vucüt içindeki interstisyel sıvı akışının dolayısıyla peritoneal sıvı akışının etkisini incelemek amacıyla mikrofluidik dinamik kültür platformu

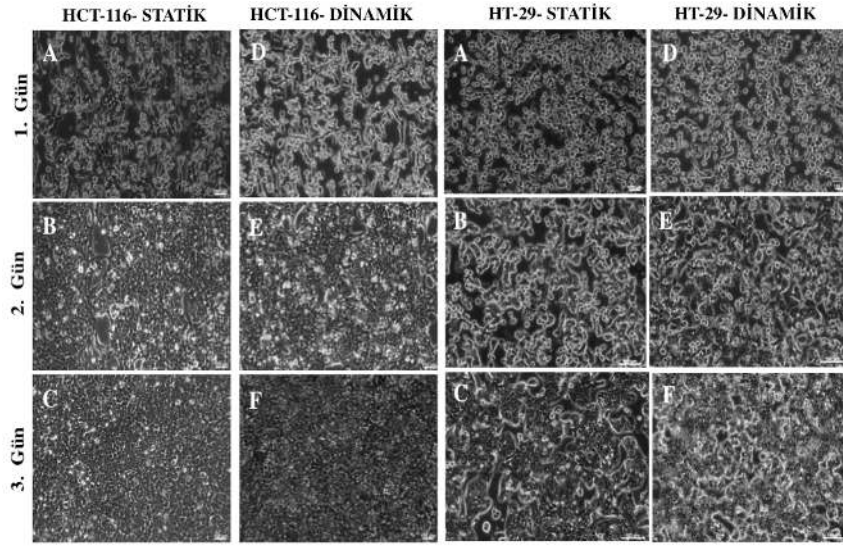
oluşturuldu ve optimizasyonları yapıldı. Kolorektal kanser hücrelerinin mikrofluidik çipler içine ekilmesinden 24 saat sonra mikrofluidik dinamik hücre kültürü başlatıldı ve hücreler 48 süresince sıvı akışına ve buna bağlı olarak sıvı gerilimine maruz kaldı. Negatif kontrol olarak mikrofluidik akışın olmadığı statik hücre kültürü, pozitif kültür olarak da EMT indükleyici TGF-beta'nın 10ng/ml olarak uygulandığı statik kültür uygulamaları yapıldı. 48 saatlik sıvı akışı maruziyetinden sonra floresans immünositokimya boyamaları ve moleküler analizler gerçekleştirildi. Deney grupları ve deney planına ait şema aşağıdaki gibidir (Şekil 34).



Şekil 34. Deney grupları ve deney planı

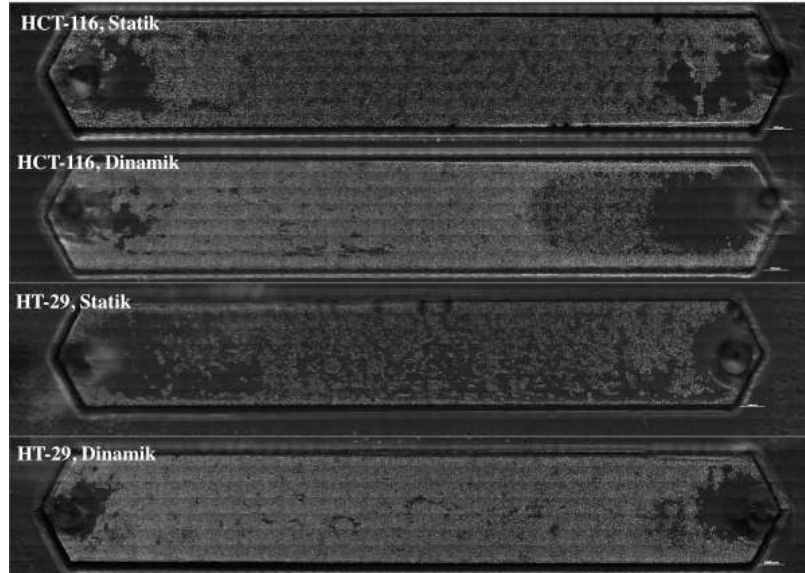
4.5.1. Mikrofluidik Dinamik Kültür Etkisiyle Hücre Proliferasyonunda Oluşan Farklılıklar

Mikrofluidik sıvı akışı ile elde edilen dinamik kültürün başlatılmasından sonra hücrelerin mikroskopik görüntüleri alındı (Şekil 35). Deney sonunda, dinamik ortamda bulunan hücrelerde morfolojik olarak değişimler olduğu saptandı. Dinamik ortamdaki hücrelerin hacimsel olarak daha az yer kaplayıp, iğsi bir görünüm kazanma eğiliminde olduğu gözlemlendi.



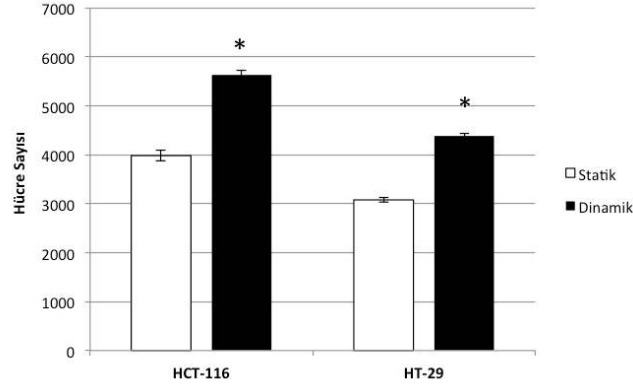
Şekil 35. HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin 72 saat sonra dinamik ve statik kültür görüntüleri. (Bar ölçek: 100 μ m)

Deney planını kapsayan, dinamik kültür sonunda çipin tüm görüntüsü mozaik mikroskobik çekimlerle yapıldı ve tüm çip içerisindeki hücre dağılımları gözlemlendi (Şekil 36). Çip kanalını kapsayan görüntülerden, dinamik grupta hücre konsantrasyonunun daha fazla olduğu gözlemlendi.



Şekil 36. Dinamik ve statik kültür altında bulunan HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin bulunduğu çiplerin 72 saat sonraki mozaik görüntüleri (Bar ölçek: 100 μ m)

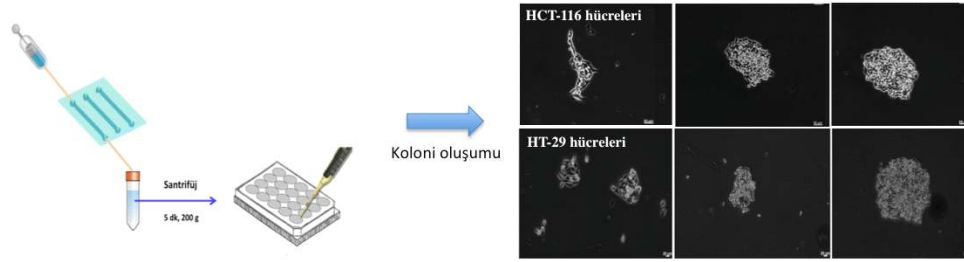
Dinamik kültürün, hücrelerin proliferasyonuna olan etkisini görmek için, deney sonunda canlılık analizleri ile hücre sayıları belirlendi (Şekil 37). Mikrofluidik sıvı akışının hücrede proliferasyonu arttırdığı gözlemlendi.



Şekil 37. Mikrofluidik dinamik ve statik kültürlerde HCT-116 ve HT-29 hatlarına ait hücre sayıları

4.5.2. Mikrofluidik Sıvı Akışının Etkisiyle Kopan Hücreler

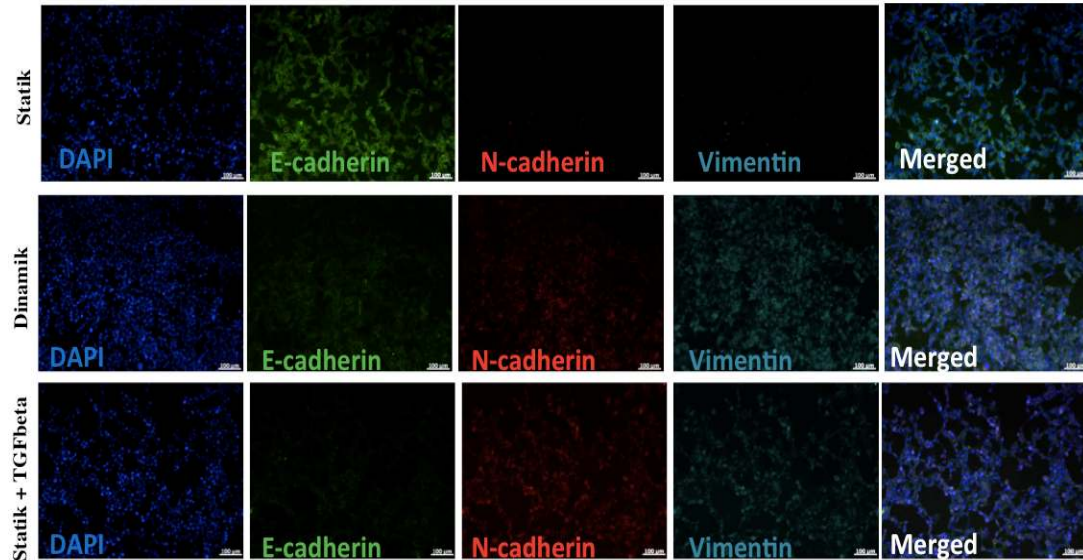
Mikrofluidik çip platformu ile hücreler 48 saat boyunca 2 μ l/dk sıvı akışına maruz kaldılar. Sürekli sıvı akışı ile mikrofluidik çipin içinden geçen ve hücrelerin tarafından kullanılan kültür ortamı, mikrofluidik çipin çıkış deliklerinden çıkan ince tüpler sayesinde, deney platformunun sonunda 50ml'lik tüpler içinde toplandı. Bu tüpler içinde toplanılan kültür ortamı, sıvı akışı ile kopmuş olabileceği ihtimali olan hücreleri yakalayabilmek amacıyla alındı ve kuyucuklu plate'lere ekildi (Şekil 38). Toplanan kültür ortamlarının ekilmesinin ardından ortamda büyüyen hücre kolonilerinin görülmesi, mikrofluidik sıvı akışı ile hücrelerin ortamdan koptuğunu göstermektedir. Bu hücreler sonraki çalışmalar da MET sürecine ışık tutabilmesi açısından önem içermektedir.



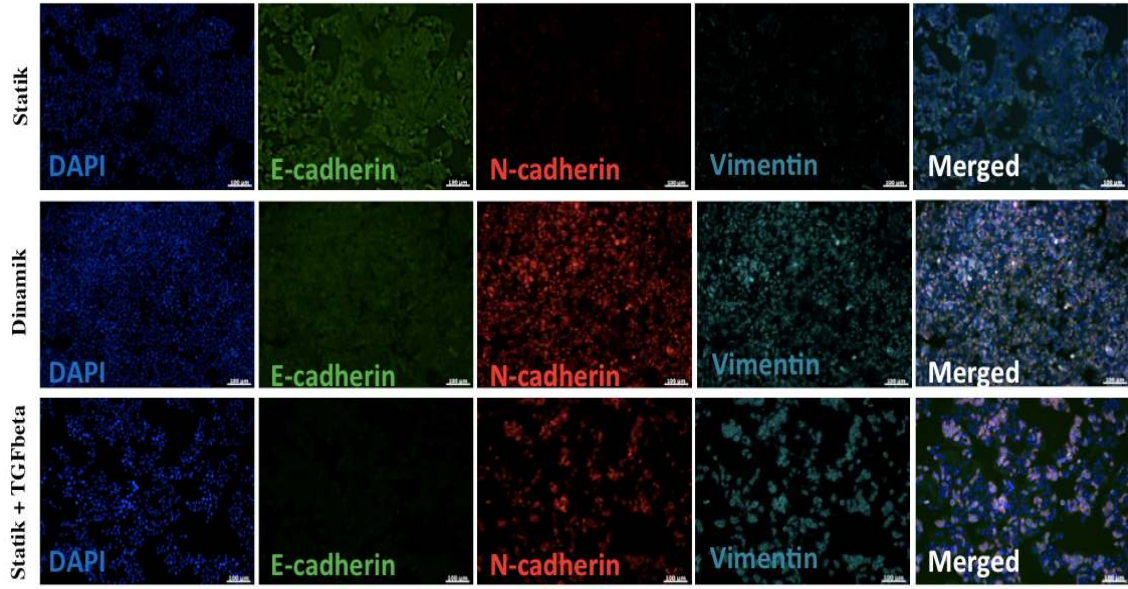
şekil 38. Mikrofluidik dinamik kültürde sıvı akışı etkisiyle kopan hücrelerin oluşturduğu koloniler. (Sıvı akış hızı: 2 μ l/dk. HCT-116 hücreleri- Bar lek:10 μ m-, HT-29 hücreleri- Bar lek: 20 μ m.)

4.6. Floresan İmmünositokimya

Mikrofluidik dinamik kültür kullanarak, interstisyel vucüt sıvılarını taklit ederek KRK metastazının EMT sürecine odaklanılan bu projede, sıvı akışına maruz kalan hücrelerde epitel karakterden mezenşimal karaktere geçişin varlığı gösterildi. Bunun için E-kaderin (yeşil), N-kaderin (kırmızı) ve Vimentin (cyan) ekspresyonlarındaki değişiklikler floresan immnositokimyasal tekniklerle gösterildi (şekil 39, 40). TGF-beta kullanılarak EMT-pozitif gruplar ile sıvı akışına maruz bırakılan hücreler karşılaştırıldı.

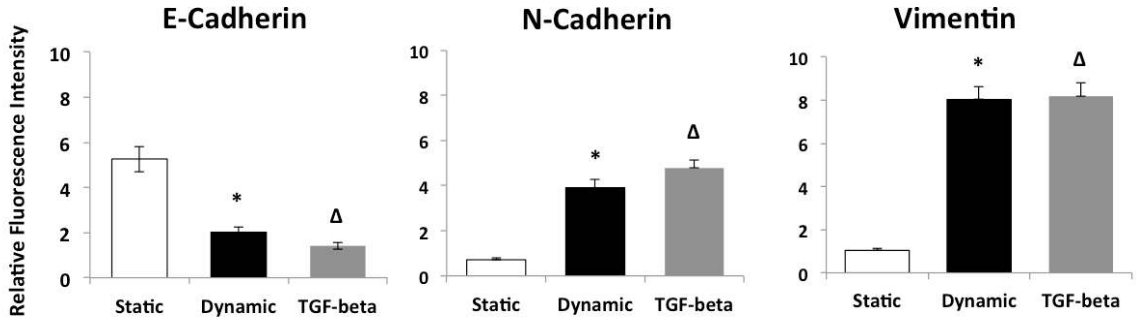


şekil 39. HCT-116 hücrelerinin floresans immünositokimya görüntüleri.

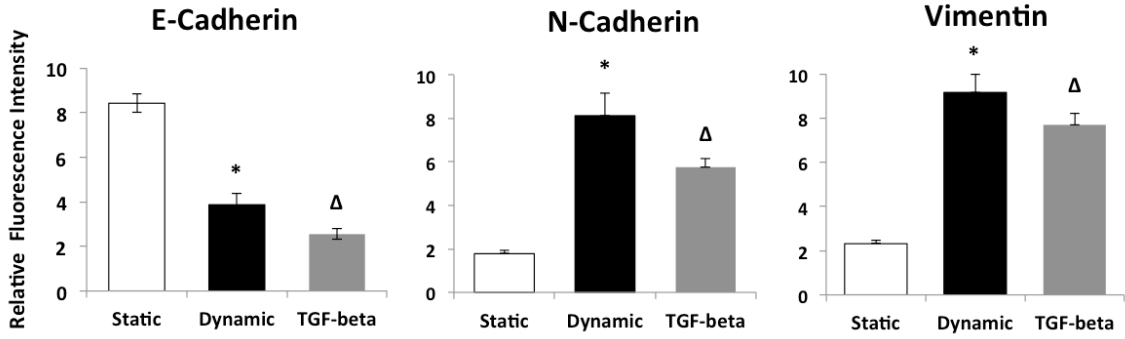


Şekil 40. HT-29 hücrelerinin floresans immünositokimya görüntüleri

Elde edilen floresans immünositokimya görüntülerinden, E-kaderin, N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarına ait kantitatif veri etmek için, görüntü analiz programı ile piksel analizi yapıldı (Şekil 41, 42). Oluşturulan grafiklerle ve yapılan istatistik analiz sonucu, HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde, sürekli sıvı akışına maruz kalan hücrelerle, statik kontrol grubundaki ekspresyonlar karşılaştırıldığında; sürekli sıvı akışına maruz kalan hücrelerdeki E-kaderin ekspresyonundaki azalma, N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarındaki artışlar istatistiksel olarak anlamlı saptandı (p değeri $\leq 0,05$). TGF-beta kullanılması ile oluşturulan EMT-pozitif gruptaki ekspresyon değişikliklerinin de statik koşullarda altındaki hücrelerle kıyaslanması sonucu; TGF-beta grubundaki E-kaderin ekspresyonundaki azalma ile N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarındaki artışlar istatistiksel olarak anlamlı saptandı (p değeri $\leq 0,05$). Ancak sürekli sıvı akışına maruz kalan hücrelerdeki ekspresyonlar ile TGF-beta grubundaki ekspresyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Bu durum, iki grubun benzer ekspresyon paterni sergilediğini göstermektedir. Buradan yola çıkarak, sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan HCT-116 ve HT-29 hücreleri; E-kaderin, N-kaderin ve vimentin ekspresyonları ile EMT-benzeri bir fenotip sergilediği saptandı.

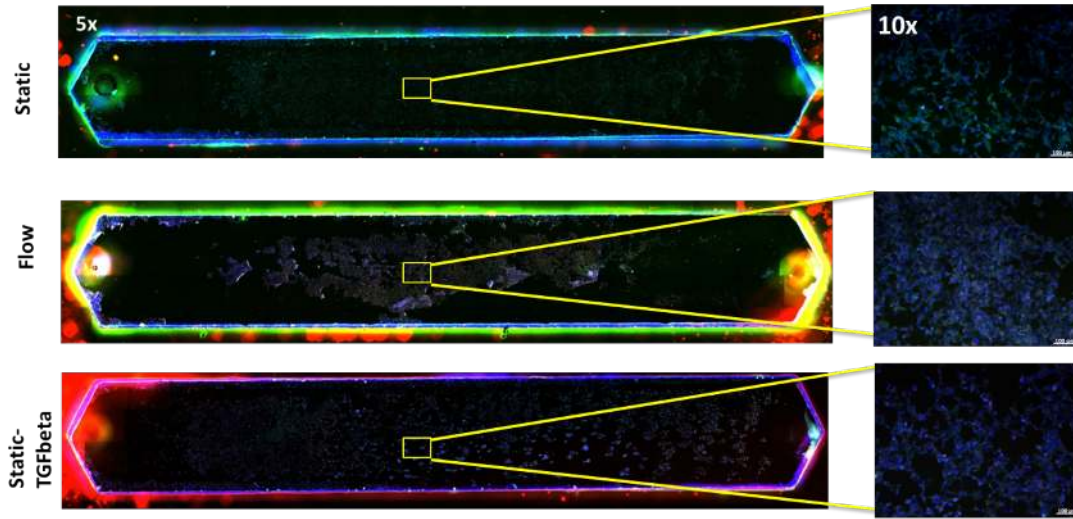


Şekil 41. HCT116 hücrelerinde floresans immünohistokimya ile saptanan E-kaderin, N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarının yoğunluklarına ait grafikler

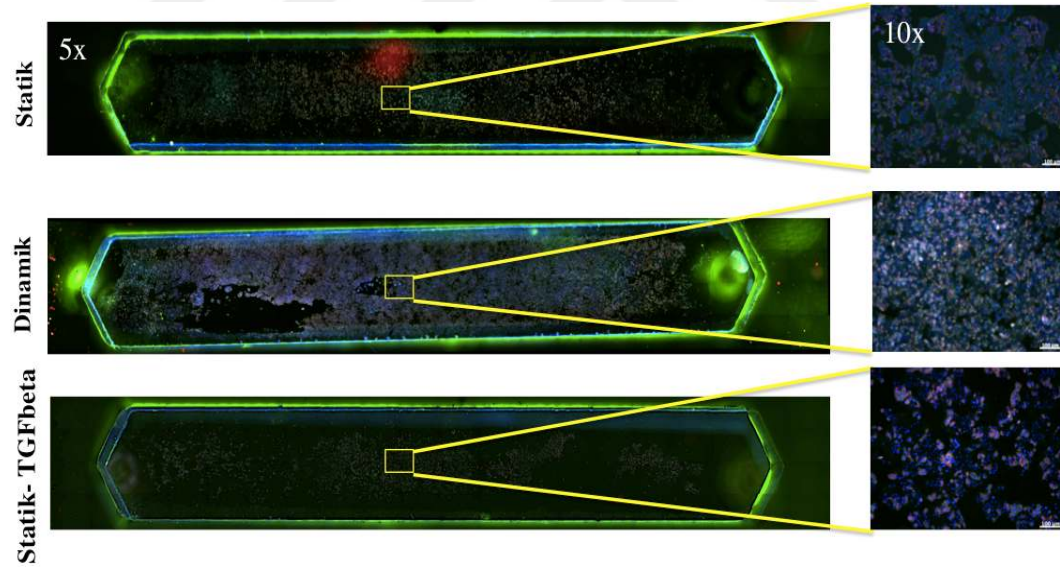


Şekil 42. HT-29 hücrelerinde floresans immünohistokimya ile saptanan E-kaderin, N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarının yoğunluklarına ait grafikler

Kanalların çeşitli yerlerinden alınan görüntülerle birlikte, kanallar bir bütün olarak da değerlendirildi. Bunun için floresans mikroskopun mozaik çekim özelliği kullanılarak tüm kanalın parça parça görüntüleri alındı ve birleştirildi (Şekil 43, 44). Kanalın her yerinde E-kaderin, N-kaderin ve vimentin için aynı değişim paternlerinin olduğu görüldü.



Şekil 43. HCT-116 hücrelerinin olduğu mikrofluidik kanalın floresans mikroskopi görüntüsü [E-cadherin(yeşil), N-cadherin (kırmızı), Vimentin (cyan), DAPI (mavi)]

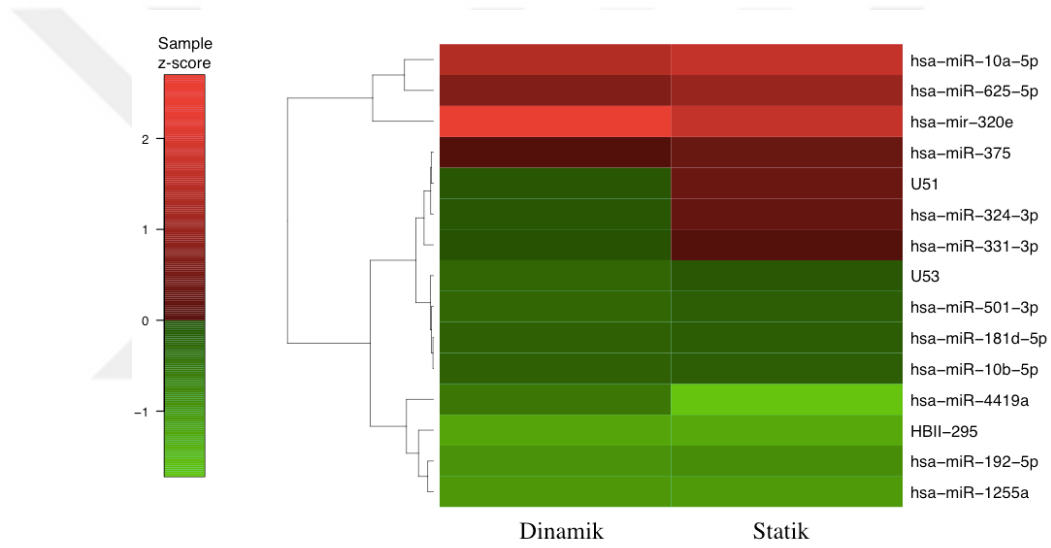


Şekil 44. HT-29 hücrelerinin olduğu mikrofluidik kanalın floresans mikroskopi görüntüsü [E-cadherin(yeşil), N-cadherin (kırmızı), Vimentin (cyan), DAPI (mavi)]

4.7. miRNA Ekspresyon Analizi

Dinamik kültür altında sürekli sıvı kışı ve buna bağlı olarak sıvı gerilime maruz kalan hücrelerde miRNA ekspresyon paternlerindeki değişikliklerin ve olası yolakların belirlenmesi için Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array kullanıldı. HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin,

dinamik ve statik kültürlerdeki miRNA ekspresyon değerlerinin kırmızı ve yeşil renklerle temsil edildiği sıcaklık haritaları (Heat Map) çizildi (Şekil 45 ve 47). HCT-116 hücre hattında hem dinamik kültür ortamında hem de statik kültür ortamındaki, miRNA'ların ifade değişikliklerine özgü olan sıcaklık haritası Şekil 45'de verilmiştir. HCT-116 hücre hattı ile yapılan deneylerde, 12 miRNA'da istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlemlendi. Bunlardan 2'sinde ekspresyon artışı (miR-320e, miR-4419a), 10'unda ise ekspresyon azalışı (miR-1255a, miR-331-3p, miR-10b-5p, miR-181d-5p, miR-501-3p, miR-192-5p, miR-10a-5p, miR-375, miR-625-5p, miR-324-3p) gözlemlendi (Şekil 46).



Şekil 45. HCT-116 hücreleriyle uygulanan dinamik ve statik kültür ortamlarındaki miRNA ekspresyon analizine ait sıcaklık haritası



Şekil 46. HCT-116 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasında istatistiksel olarak değişim gösteren miRNA'lar ve değişim katsayıları

HCT-116 hücre hattında değişimi gözlenen miRNA'ların ifadelerine ait ortalama sinyaller, değişim katsayıları ve p-değerleri Tablo 5'de verilmiştir.

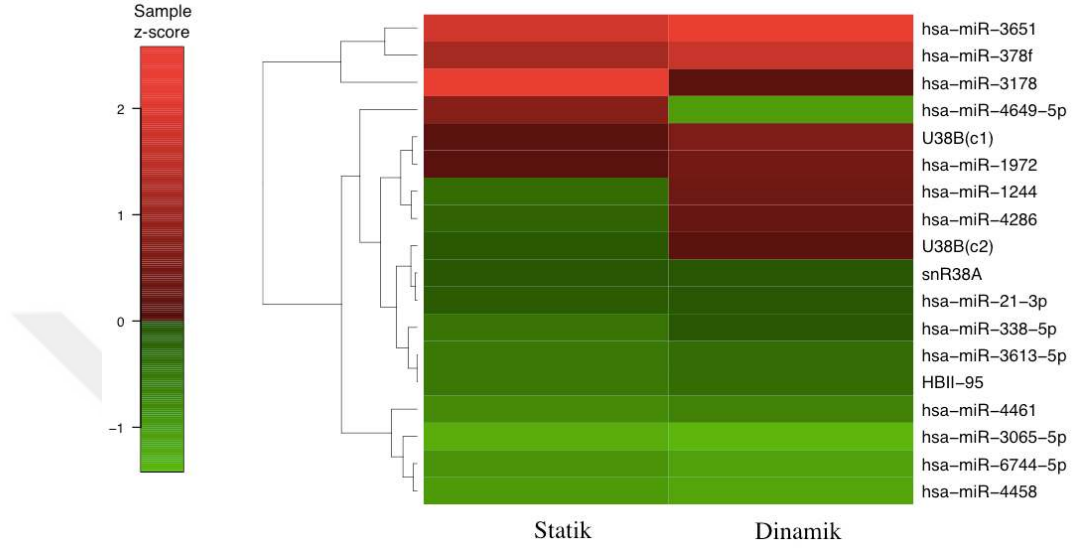
Tablo 5. HCT-116 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasında istatistiksel olarak değişim gösteren miRNA'ların sinyal değerleri, değişim katları ve p-değerleri

mikroRNA- Gen ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyal	Statik Kültür Ortalama Sinyal	Değişim Katı	p-değeri
hsa-mir-320e (Gen ID:100422913)	7.95	6.83	2,18	0,023875
hsa-miR-4419a (Gen ID: 100616177)	1.65	0.58	2,1	0,034385
hsa-miR-1255a (Gen ID: 100302193)	0.73	1.75	-2,03	0,016593
hsa-miR-331-3p (Gen ID: 442903)	2.71	3.80	-2,12	0,033685
hsa-miR-10b-5p (Gen ID: 406903)	2.31	3.41	-2,15	0,004215
hsa-miR-181d-5p (Gen ID: 574457)	2.32	3.44	-2,17	0,043195
hsa-miR-501-3p (Gen ID: 574503)	2.20	3.38	-2,28	0,016357
hsa-miR-192-5p (Gen ID: 406967)	0.86	2.08	-2,34	0,036722
hsa-miR-10a-5p (Gen ID: 406902)	5.59	6.83	-2,36	0,009895
hsa-miR-375 (Gen ID: 494324)	2.78	4.31	-2,87	0,001235
hsa-miR-625-5p (Gen ID: 693210)	4.13	5.67	-2,91	0,009473
hsa-miR-324-3p (Gen ID: 442898)	2.65	4.21	-2,95	0,003143

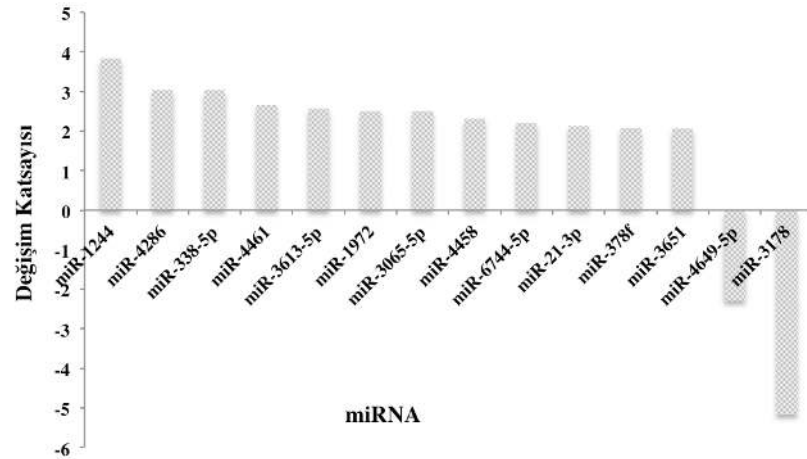
HT-29 hücre hattında hem dinamik kültür ortamında hem de statik kültür ortamındaki, miRNA'ların ifade değişikliklerine özgü olan sıcaklık haritası Şekil 47'de verilmiştir.

HT-29 hücre hattı ile yapılan deneylerde, dinamik kültür ile statik kültür arasında 14 miRNA'da istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlemlendi. Bunlardan 12'sinde ekspresyon artışı (miR-1244, miR-4286, miR-338-5p, miR-4461, miR-3613-5p, miR-1972, miR-3065-5p, miR-

4458, miR-6744-5p, miR-21-3p, miR-378f, miR-3651); 2'sinde ise ekspresyon azalışı (miR-4649-5p, miR-3178) gözlemlendi (Şekil 48).



Şekil 47. HT-29 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasındaki miRNA ekspresyon analizine ait sıcaklık haritası



Şekil 48. HT-29 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasında istatistiksel olarak değişim gösteren miRNA'lar ve değişim katsayıları

HT-29 hücre hattında değişimi gözlenen miRNA'ların ifadelerine ait ortalama sinyaller, değişim katsayıları ve p-değerleri Tablo 6'da verilmiştir.

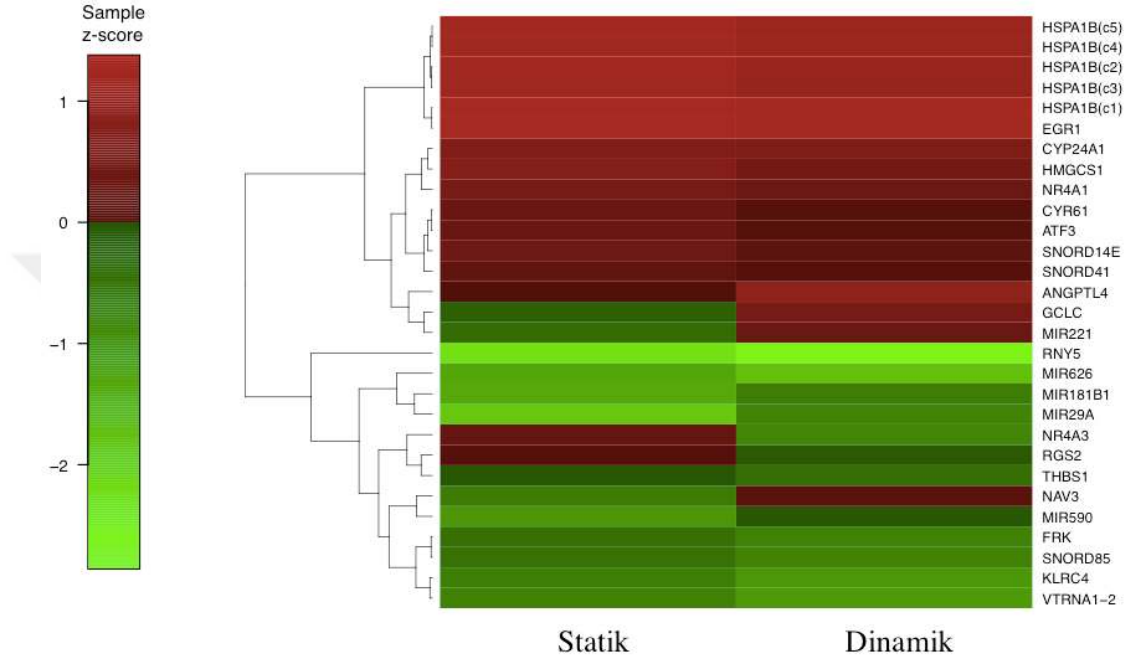
Tablo 6. HT-29 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasında istatistiksel olarak değişim gösteren miRNA'ların sinyal değerleri, değişim katları ve p-değerleri

mikroRNA- Gen ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyal	Statik Kültür Ortalama Sinyal	Değişim Katı	p-değeri
hsa-miR-1244 (Gen ID: 100302285)	3,55	1,62	3,82	0,020052
hsa-miR-4286 (Gen ID: 100422982)	3,4	1,81	3,02	0,045569
hsa-miR-338-5p (Gen ID: 442906)	3,05	1,46	3,01	0,028168
hsa-miR-4461 (Gen ID: 100616209)	2,4	1	2,65	0,010171
hsa-miR-3613-5p (Gen ID: 100500908)	2,75	1,39	2,57	0,008343
hsa-miR-1972 (Gen ID: 100302243)	3,62	2,3	2,51	0,000683
hsa-miR-3065-5p (Gen ID: 100422915)	1,67	0,35	2,5	0,026867
hsa-miR-4458 (Gen ID: 100616142)	1,9	0,7	2,3	0,029568
hsa-miR-6744-5p (Gen ID: 102466725)	1,98	0,85	2,19	0,019278
hsa-miR-21-3p (Gen ID: 406991)	3,05	1,97	2,11	0,028699
hsa-miR-378f (Gen ID: 100616492)	4,89	3,83	2,07	0,007671
hsa-miR-3651 (Gen ID: 100500918)	5,76	4,73	2,05	0,006061
hsa-miR-4649-5p (Gen ID: 100616346)	2,02	3,22	-2,29	0,027645
hsa-miR-3178 (Gen ID: 100422974)	3,28	5,65	-5,16	0,010016

4.8. mRNA Transkriptom Analizi

Dinamik kültür altında sürekli sıvı kışı ve buna bağlı olarak sıvı gerilime maruz kalan hücrelerde mRNA transkriptom analizi açısından farklılıkların ve olası yolların belirlenmesi için Affymetrix GeneChip Human Transcriptome Array (HTA) 2.0 kullanıldı. HCT-116 ve HT-

29 hücre hatlarının dinamik ve statik kültürlerdeki mRNA ekspresyon değerlerinin kırmızı ve yeşil renklerle temsil edildiği sıcaklık haritaları (Heat Map) grafikleri çizildi (Şekil 49 ve 50).

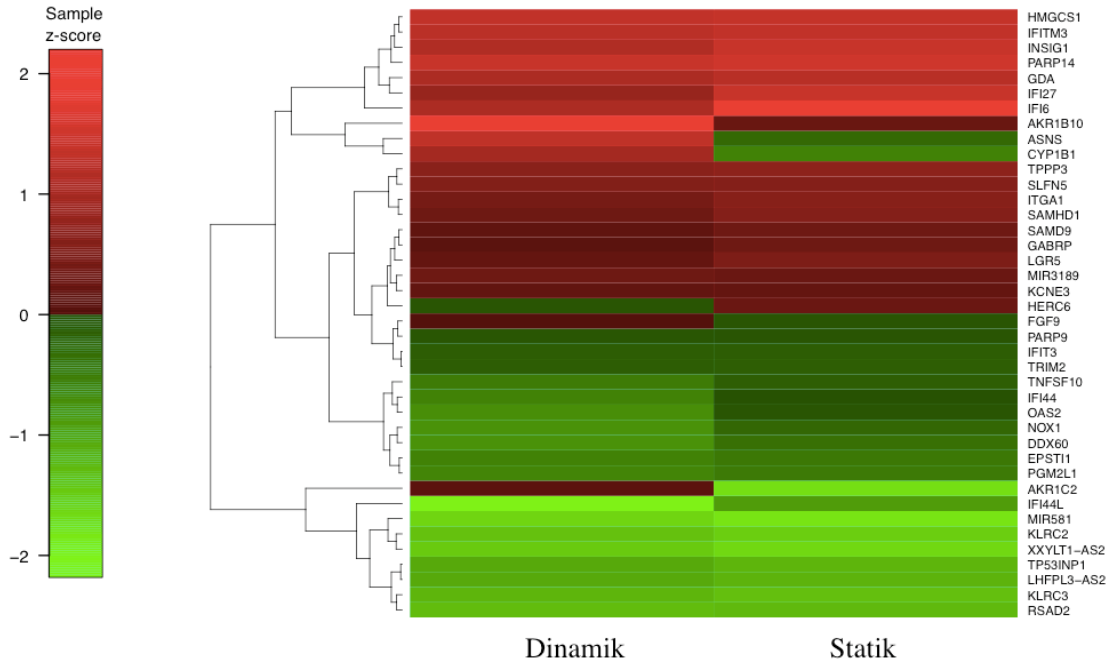


Şekil 49. HCT-116 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasındaki mRNA transkriptom analizine ait sıcaklık haritası

HCT-116 hücre hattında değişimi gözlenen mRNA'ların ekspresyon ifadelerine ait ortalama sinyaller, değişim katsayıları, p-değerleri, gen sembolü, gen açıklaması, genin kodlanan-kodlanmayan bölgede olduğu gibi bilgiler Tablo 7'da verilmiştir.

Tablo 7. HCT-116 hücrelerinde dinamik ve statik kültürel arasındaki istatistiksel olarak anlamlılık gösteren mRNA ekspresyonları

Transcript Cluster ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyal	Statik Kültür Ortalama Değeri	Değişim Katsayısı	p-değeri	Gen Sembolü	Gen Açıklaması	Grup
TC07001869.hg.1	5,01	3,1	3,76	0,01791	MIR29A	microRNA 29a	Coding
TC07000452.hg.1	6,47	4,83	3,12	0,015975	MIR590	microRNA 590	Coding
TC01000013.hg.1	8,15	6,82	2,53	0,007389	M37726,uc001abb.3	angiotensin-like 4	Coding
TC19000147.hg.1	8,48	7,25	2,34	0,001327	ANGPTL4	neuron navigator 3	Coding
TC12000656.hg.1	6,9	5,75	2,23	0,000665	NAV3	ncrna:snRNA chromosome:GRCh37:17:56756888-56757051-1 gene:ENSG00000200997	Coding
TC17001742.hg.1	7,3	6,14	2,23	0,001547		gene_biotype:snRNA transcript_biotype:snRNA	Coding
TC22000758.hg.1	5,3	4,15	2,23	0,011003		DQ574091,uc021wpc.1	Coding
TC02000467.hg.1	4,58	3,46	2,16	0,047422		uc021yys.1	Coding
TC08001607.hg.1	2,59	1,5	2,13	0,020841		DQ585837,uc022baq.1	Coding
TC01003671.hg.1	5,3	4,22	2,12	0,017977	MIR181B1	microRNA 181b-1	Coding
TC03001179.hg.1	2,32	1,26	2,1	0,020705		DQ579436,uc003bwq.1	Coding
TC03002840.hg.1	5,25	4,17	2,1	0,009047		accn=AB114414 class=mRNAlike lncRNA name=NULL ref=H-invitational v7.5 transcriptid=HT000242351 cpScore=-1.7915100 cnci=-0.2853270 accn=AB114415 class=mRNAlike lncRNA name=NULL ref=H-invitational v7.5 transcriptid=HT000242352 cpScore=1.0034400 cnci=-0.2518230	NonCoding
TC0X000985.hg.1	7,39	6,33	2,08	0,026529	MIR221	microRNA 221	Coding
TC22000751.hg.1	4,42	3,39	2,04	0,01978		DQ576685,uc003arw.1	Coding
TC08001845.hg.1	5,94	4,91	2,03	0,010158		accn=AF147436 class=mRNAlike lncRNA name=Human lncRNA ref=JournalRNA transcriptid=3935 cpScore=-1.2396000 cnci=-0.3250389	NonCoding
TC06004051.hg.1	7,72	6,72	2,01	0,000913	GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	Coding
TC19001207.hg.1	6,76	7,77	-2,01	0,023429	SNORD41	small nucleolar RNA, C/D box 41	Coding
TC20000962.hg.1	7,9	8,91	-2,02	0,001692	CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	Coding
TC15000312.hg.1	3,26	4,28	-2,03	0,014481	MIR626	microRNA 626	Coding
TC09000232.hg.1	7,64	8,67	-2,04	0,003232		DQ586551,uc004abq.1	Coding
TC01001624.hg.1	6,36	7,39	-2,05	0,002472	RG52	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	Coding
TC06002043.hg.1	5,15	6,2	-2,06	0,002733	FRK	lyn-related kinase	Coding
TC17001281.hg.1	2,28	3,32	-2,06	0,03962		DQ592978,uc021ttj.1	Coding
TC07001081.hg.1	6,02	7,08	-2,08	0,007102		AK123998,uc021zyp.1	Coding
TC12001420.hg.1	1,14	2,2	-2,08	0,017267	RNY5	RNA, Ro-associated Y5	Coding
TC05000735.hg.1	4,44	5,5	-2,09	0,000695	VTRNA1-2	vault RNA 1-2	Coding
TC01002448.hg.1	5,09	6,16	-2,11	0,009775	SNORD85	small nucleolar RNA, C/D box 85	Coding
TC09001141.hg.1	6,52	7,62	-2,14	0,00568		cdna:known chromosome:GRCh37:9:47295879-47314322-1 gene:ENSG00000236029 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding cdna:known chromosome:GRCh37:9:47304013-47305485-1 gene:ENSG00000236029 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:processed_transcript cdna:all chromosome:VEGA50:9:47295879-47314322-1 Gene:OTTHUMG0000066812 cdna:all chromosome:VEGA50:9:47304013-47305485-1 Gene:OTTHUMG0000066812 cdna:all chromosome:VEGA50:9:47295855-47314322-1 Gene:OTTHUMG0000066812 cdna:all chromosome:VEGA50:9:47310639-47314322-1 Gene:OTTHUMG0000066812 cdna:all chromosome:VEGA50:9:47310494-47312525-1 Gene:OTTHUMG0000066812 cdna:all chromosome:VEGA50:9:47304037-47311881-1 Gene:OTTHUMG0000066812 cdna:all chromosome:VEGA50:9:47304438-47311821-1 Gene:OTTHUMG0000066812 cdna:all chromosome:VEGA50:9:47299315-47314148-1 Gene:OTTHUMG0000066812	Coding
TC12000414.hg.1	7,39	8,5	-2,16	0,003593	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Coding
TC12001222.hg.1	4,52	5,63	-2,16	0,012952	KLRC4	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4; KLRC4-KLRK1 readthrough; killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	Coding
TC06000385.hg.1	9,15	10,27	-2,17	0,000522	HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1B; heat shock 70kDa protein 1A	Coding
TC15001370.hg.1	2,37	3,49	-2,18	0,047956		DQ595419,uc021sh.1	Coding
TC15002325.hg.1	4,68	5,81	-2,18	0,021229		accn=NULL class=lncRNA name= ref=EnsemblNoncode transcriptid=ENST00000544685 cpScore=0.5532600 cnci=-0.3468069 accn=NULL class=lncRNA name=Human lncRNA ref=Scripture Reconstruction LincRNA By Lnc transcriptid=linc_jun_340 cpScore=-1.3225700 cnci=-0.4024593 linc-WHAMM-1 chr15:+83419350-83424082	NonCoding
TC05000701.hg.1	9,12	10,26	-2,2	0,000461	EGR1	early growth response 1	Coding
TC09000231.hg.1	4,96	6,11	-2,21	0,008763		cdna:putative chromosome:GRCh37:9:40028620-40032417-1 gene:ENSG00000227921 gene_biotype:protein_coding transcript_biotype:protein_coding cdna:all chromosome:VEGA50:9:40028620-40032417-1 Gene:OTTHUMG0000066698	Coding
TC09000274.hg.1	7,08	8,25	-2,25	0,00325		BX538190,uc004ady.3	Coding
TC14000492.hg.1	3,21	4,37	-2,25	0,026049		ncrna:snRNA chromosome:GRCh37:14:77932627-77932779-1 gene:ENSG00000212371 gene_biotype:snRNA transcript_biotype:snRNA	Coding
TC06001605.hg.1	1,19	2,37	-2,26	0,043108		DQ595963,uc021yvv.1	Coding
TC09001960.hg.1	7,12	8,32	-2,29	0,00295		linc-ANKRD20A1-12 chr9:+65629314-65635808	NonCoding
TC6_dbp_hap3000070.hg.1	8,8	9,99	-2,29	0,000603	HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1B; heat shock 70kDa protein 1A	Coding
TC6_apd_hap1000040.hg.1	8,76	9,96	-2,3	0,000709	HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1B; heat shock 70kDa protein 1A	Coding
TC6_cox_hap2000079.hg.1	8,83	10,04	-2,31	0,000701	HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1B; heat shock 70kDa protein 1A	Coding
TC6_qbl_hap6000070.hg.1	8,84	10,05	-2,31	0,000983	HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1B; heat shock 70kDa protein 1A	Coding
TC01001777.hg.1	6,8	8,03	-2,34	0,000303	ATF3	activating transcription factor 3	Coding
TC09001921.hg.1	6,19	7,44	-2,38	0,012104		linc-FAM75A3-1 chr9:+40332916-40337603	NonCoding
TC05000724.hg.1	5,57	6,83	-2,4	0,003322		havana:sense_intronic chromosome:GRCh37:5:139579748:139582772:1 gene:ENSG00000250069 gene_biotype:sense_intronic transcript_biotype:sense_intronic cdna:all chromosome:VEGA50:5:139579748:139582772:1 Gene:OTTHUMG00000163412	Coding
TC11002391.hg.1	6,99	8,25	-2,41	0,008369	SNORD14E	small nucleolar RNA, C/D box 14E	Coding
TC10000968.hg.1	4,48	5,76	-2,42	0,002939		ncrna:snRNA chromosome:GRCh37:10:1088233-1088295-1 gene:ENSG00000238924 gene_biotype:snRNA transcript_biotype:snRNA	Coding
TC15000270.hg.1	5,79	7,07	-2,43	0,000201	THBS1	thrombospondin 1	Coding
TC01001388.hg.1	6	7,29	-2,44	0,002033		uc021pty.1	Coding
TC10000477.hg.1	5,46	6,76	-2,46	0,011084		havana:sense_intronic chromosome:GRCh37:10:75764895-75787673:1 gene:ENSG0000025761 gene_biotype:sense_intronic transcript_biotype:sense_intronic cdna:all chromosome:VEGA50:10:75764895-75787673:1 Gene:OTTHUMG0000018491	Coding
TC09001920.hg.1	7,43	8,75	-2,5	0,004927		linc-FAM75A3-2 chr9:+40308215-4032860 linc-FAM75A3-2 chr9:+40308742-40324812	NonCoding
TC01000818.hg.1	6,78	8,1	-2,51	0,00264	CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Coding
TC05001316.hg.1	7,67	9,01	-2,53	0,000299	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	Coding
TC06003829.hg.1	3,33	4,7	-2,58	0,047732		accn=AL357202 class=mRNAlike lncRNA name=Human lncRNA ref=JournalRNA transcriptid=4597 cpScore=-1.1288800 cnci=-0.4123882	NonCoding
TC07002185.hg.1	3,59	5,06	-2,77	0,018644		accn=BC042028 class=mRNAlike lncRNA name=Human lncRNA ref=JournalRNA transcriptid=3669 cpScore=-1.1990600 cnci=-0.5145587	NonCoding
TC05002982.hg.1	4,69	6,68	-3,95	0,01123		accn=CR605684 class=mRNAlike lncRNA name=Human lncRNA ref=JournalRNA transcriptid=2906 cpScore=-1.1790800 cnci=-0.3504249	NonCoding
TC08002253.hg.1	4,87	6,91	-4,13	0,006241		accn=540832 class=mRNAlike lncRNA name=Human lncRNA ref=JournalRNA transcriptid=4932 cpScore=2.3176100 cnci=-0.1444044	NonCoding
TC09000508.hg.1	4,99	7,91	-7,57	0,000472	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	Coding



Şekil 50. HT-29 hücrelerinde dinamik kültür ile statik kültür arasındaki mRNA transkriptom analizine ait sıcaklık haritası

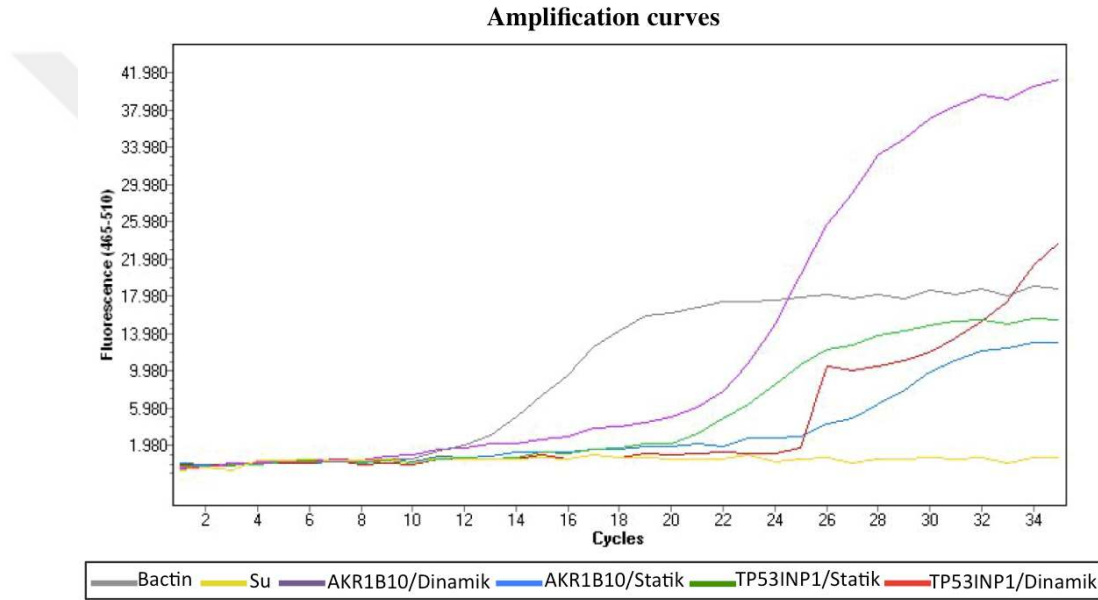
HT-29 hücre hattında değişimi gözlenen mRNA'ların ekspresyon ifadelerine ait ortalama sinyaller, değişim katsayıları, p-değerleri, gen sembolü, gen açıklaması, genin kodlanan-kodlanmayan bölgede olduğu gibi bilgiler Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. HT-29 hücrelerinde dinamik ve statik kültürel arasındaki istatistiksel olarak anlamlılık gösteren mRNA ekspresyonları

Transcript Cluster ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyal	Statik Kültür Ortalama Değer	Değişim Katsayısı	p-değeri	Gen Sembolü	Açıklama	Grup
TC07002600.hg.1	9,4	7,8	3,05	0,001624		accn=CR541801 class=mRNAlike lncRNA name=Human lncRNA ref=JournalRNA transcriptid=5325 cpcScore=7.3858300 cnci=-0.0951388	NonCoding
TC07000834.hg.1	9,19	7,67	2,86	0,005705	AKR1B10	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	Coding
TC10000986.hg.1	6,38	5,11	2,41	0,000263	AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III); aldo-keto reductase family 1 member C2-like	Coding
TC12001500.hg.1	7,77	6,52	2,38	0,005875		ncrna:snRNA chromosome-GRCh37:12:51407917:51408024:-1 gene:ENSG00000206830 gene_biotype:snRNA transcript_biotype:snRNA	Coding
TC09002418.hg.1	8,24	7,09	2,22	0,03657		accn=NR_038064 class=lncRNA name= ref=RefGeneNoncode transcriptid=NR_038064 cpcScore=4.5302500 cnci=-0.2145143	NonCoding
TC07001630.hg.1	8,06	6,99	2,1	0,01155	ASNS	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	Coding
TC02001749.hg.1	7,3	6,26	2,06	0,035929		cdna:all chromosome:VEGA50:2:38294116:38297840:-1 Gene:OTTHUMG00000100970	Coding
TC15001892.hg.1	6,64	5,61	2,05	0,020476		DQ586064.uc002bsw.1	Coding
TC02001750.hg.1	7,59	6,56	2,04	0,044987	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	Coding
TC08002448.hg.1	5,85	4,83	2,03	0,01315		accn=AF086429 class=mRNAlike lncRNA name=Human lncRNA ref=JournalRNA transcriptid=4038 cpcScore=-1.1569400 cnci=-0.3882638	NonCoding
TC03001082.hg.1	4,18	5,2	-2,03	0,009969	XXYLT1-AS2	XXYLT1 antisense RNA 2 (non-protein coding)	Coding
TC08001440.hg.1	4,75	5,78	-2,03	0,03695	TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	Coding
TC13000037.hg.1	6,28	7,3	-2,03	0,024039	FGF9	fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	Coding
TC05001347.hg.1	3,98	5,01	-2,04	0,035881	MIR581	microRNA 581	Coding
TC15001370.hg.1	2,77	3,8	-2,04	0,042494		DQ595419.uc021slh.1	Coding
TC19000357.hg.1	6,67	7,69	-2,04	0,005471	MIR3189	microRNA 3189	Coding
TC05001316.hg.1	8,08	9,13	-2,07	0,028389	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	Coding
TC08001847.hg.1	7,97	9,02	-2,07	0,007574		accn=AB370195 class=mRNAlike lncRNA name=NULL ref=H-invitational v7.5 transcriptid=HIT000409808 cpcScore=1.6810300 cnci=-0.1326172 accn=AB370194 class=mRNAlike lncRNA name=NULL ref=H-invitational v7.5 transcriptid=HIT000409807 cpcScore=1.1046800 cnci=-0.2689832	NonCoding
TC05002373.hg.1	4,24	5,29	-2,08	0,043432		accn=NULL class=lncRNA name= ref=UCSCGeneNoncode transcriptid=uc003jox.1 cpcScore=-0.9847360 cnci=-0.3244947	NonCoding
TC12003272.hg.1	4,3	5,36	-2,09	0,007068	KLRC2	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2	Coding
TC12003271.hg.1	4,52	5,59	-2,1	0,03041	KLRC3	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3; killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2	Coding
TC03000634.hg.1	8,19	9,28	-2,12	0,024917	PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	Coding
TC17000396.hg.1	7,04	8,13	-2,12	0,040027	SLFN5	schlafen family member 5	Coding
TC07001726.hg.1	4,71	5,81	-2,13	0,037419	LHFPL3-AS2	LHFPL3 antisense RNA 2 (non-protein coding)	Coding
TC17002115.hg.1	6,35	7,44	-2,13	0,023957		accn=CR618823 class=mRNAlike lncRNA name=Human lncRNA ref=JournalRNA transcriptid=5171 cpcScore=-1.2730500 cnci=-0.3617070 linc-DHRS7B-5 chr17:+20691696-20692707	NonCoding
TC16001187.hg.1	7,16	8,26	-2,14	0,014634	TPPP3	tubulin polymerization-promoting protein family member 3	Coding
TC04000770.hg.1	6,02	7,13	-2,16	0,031316	TRIM2	tripartite motif containing 2	Coding
TC10000637.hg.1	6,03	7,16	-2,18	0,014958	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	Coding
TC11001230.hg.1	7,97	9,1	-2,18	0,007527	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	Coding
TC11002082.hg.1	6,48	7,62	-2,2	0,017533	KCNE3	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	Coding
TC03001705.hg.1	6,13	7,3	-2,26	0,018929	PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	Coding
TC04000120.hg.1	3,63	4,81	-2,26	0,017614		DQ584082.uc021xmd.1	Coding
TC09000330.hg.1	7,72	8,93	-2,31	0,022272	GDA	guanine deaminase	Coding
TC05001349.hg.1	2,76	4	-2,36	0,049762		cdna:all chromosome:VEGA50:5:53582024:53582161:-1 Gene:OTTHUMG00000162284	Coding
TC07001605.hg.1	6,46	7,78	-2,5	0,047124	SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	Coding
TC02000034.hg.1	4,38	5,71	-2,51	0,009568	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	Coding
TC13000612.hg.1	5,39	6,73	-2,53	0,016417	EPSTI1	epithelial stromal interaction 1 (breast)	Coding
TC05003439.hg.1	6,83	8,19	-2,56	0,041047	ITGA1	integrin, alpha 1	Coding
TC07001039.hg.1	7,82	9,18	-2,56	0,04513	INSIG1	insulin induced gene 1	Coding
TC11003279.hg.1	6,13	7,5	-2,59	0,021263		accn=AJ303364 class=mRNAlike lncRNA name=NULL ref=H-invitational v7.5 transcriptid=HIT000246888 cpcScore=1.6105800 cnci=-0.3331473	NonCoding
TC11002081.hg.1	5,29	6,71	-2,68	0,045498	PGM2L1	phosphoglucomutase 2-like 1	Coding
TC20000821.hg.1	6,71	8,14	-2,68	0,042919	SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	Coding
TC05000937.hg.1	6,35	7,81	-2,75	0,006745	GABRP	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi	Coding
TC12000624.hg.1	6,51	8	-2,81	0,030354	LGR5	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	Coding
TC07000215.hg.1	3,82	5,35	-2,88	0,043492		DQ584906.uc022abp.1	Coding
TC04000484.hg.1	6,16	7,7	-2,92	0,02316	HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6	Coding
TC03002006.hg.1	5,49	7,13	-3,12	0,032744	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Coding
TC04001718.hg.1	5,11	6,86	-3,36	0,03447	DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	Coding
TC14001821.hg.1	7,55	9,33	-3,45	0,014729		accn=AJ294851 class=mRNAlike lncRNA name=NULL ref=H-invitational v7.5 transcriptid=HIT000246658 cpcScore=-0.8530460 cnci=-0.2424470 accn=AY126456 class=mRNAlike lncRNA name=NULL ref=H-invitational v7.5 transcriptid=HIT000250729 cpcScore=-0.7976560 cnci=-0.1799725	NonCoding
TC03003211.hg.1	7,36	9,15	-3,47	0,043196		accn=NR_033994 class=lncRNA name= ref=RefGeneNoncode transcriptid=NR_033994 cpcScore=3.1503400 cnci=-0.3031873	NonCoding
TC14000584.hg.1	7,38	9,2	-3,53	0,024012	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	Coding
TC0X001211.hg.1	5,1	7,02	-3,78	0,024871	NOX1	NADPH oxidase 1	Coding
TC01000795.hg.1	5,37	7,31	-3,83	0,022113	IFI44	interferon-induced protein 44	Coding
TC21000739.hg.1	5,6	7,68	-4,24	0,01432		accn=AY186254 class=mRNAlike lncRNA name=NULL ref=H-invitational v7.5 transcriptid=HIT000085081 cpcScore=0.8460430 cnci=-0.2242677	NonCoding
TC12000886.hg.1	5,2	7,3	-4,29	0,001131	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	Coding
TC01002412.hg.1	7,73	10,15	-5,32	0,00784	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	Coding
TC01000794.hg.1	3,21	6,16	-7,76	0,006161	IFI44L	interferon-induced protein 44-like	Coding

4.9. miRNA Ekspresyon ve mRNA Transkriptom Analizlerinin Doğrulanması

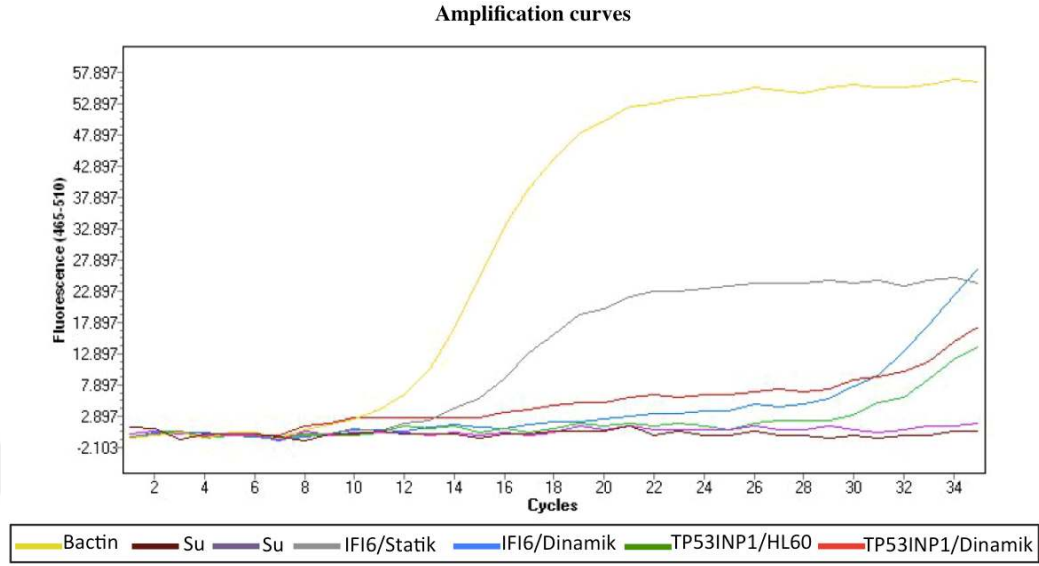
Gerçekleştirilen miRNA ve mRNA analizlerinin doğrulanması amacıyla, 4 adet mRNA ve miRNA'nın (AKR1B10, IFI6, TP53INP1, mir-10a-5p) gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu eşliğinde ekspresyonları kontrol edildi. miRNA kontrolü için HCT-116 hücreleri, mRNA kontrolleri için de HT-29 hücreleri kullanıldı. AKR1B10'ün, mikro-dizin sonuçlarında olduğu gibi dinamik kültür ortamında, statik kültür ortamına oranla daha çok eksprese olduğu belirlendi (Şekil 51).



Şekil 51. AKR1B10 ve TP53INP1'in ekspresyon durumlarına ait amplifikasyon eğrileri

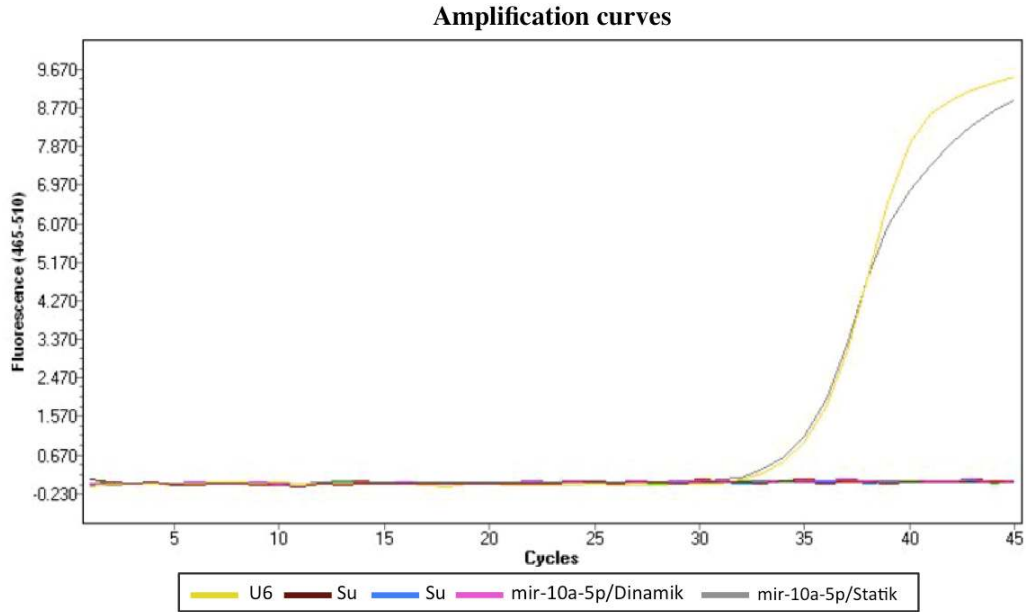
TP53INP1'ün statik koşullar altında ekspresyonunun belirlenmesine rağmen, dinamik koşullar altındaki ekspresyonuna ait güvenilir veri alınamadı (Şekil 51). Bunun için bir diğer reaksiyon da yeniden kontrol gerçekleştirildi (Şekil 52). Diğer reaksiyonda TP53INP1-negatif olan HL-60 hücre hattında da değerlendirme yapıldı. Bu sonuçlar eşliğinde, dinamik koşullar altında TP53INP1 ekspresyonunun yok denecek kadar azaldığı söylenebilir. Mikro-dizi sonuçlarında da, dinamik koşullar altında TP53INP1'in azaldığı belirlendi.

IFI6'nın ekspresyon durumuna ait elde edilen verilerden, mikro-dizin analizlerinde de olduğu gibi dinamik koşullar altında IFI6 ekspresyonunun yokdenecek kadar azaldığını göstermektedir (Şekil 52).



Şekil 52. IFI6 ve TP53INP1'in ekspresyon durumlarına ait amplifikasyon eğrileri

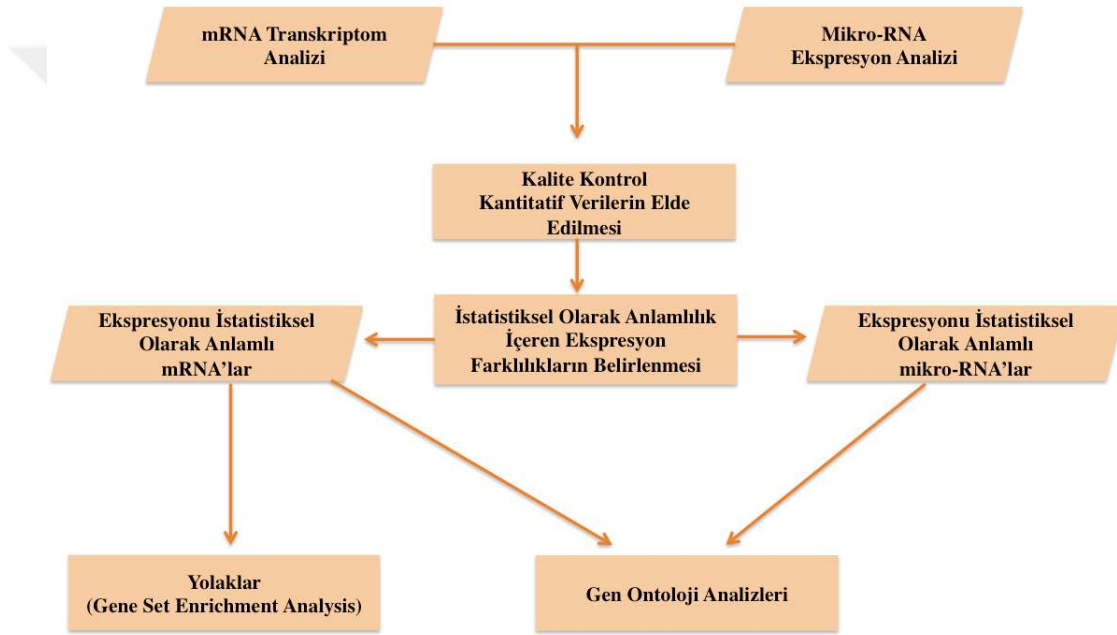
mir-10a-5p için gerçekleştirilen pcr analizde de, dinamik koşullar altında mir-10a-5p'nin ekspresyonunun yok denecek kadar azaldığını göstermektedir.



Şekil 53. mir-10a-5p'nin ekspresyon durumlarına ait amplifikasyon eğriler

4.10. Biyoinformatik Analizler

Dinamik kültür grubu ile statik kültür grubunun mRNA ve miRNA analiz verilerinden elde edilen sinyallerin karşılaştırılması ile istatistiksel olarak anlamlı olan (p değeri $\leq 0,05$) değişimlerin saptanması gerçekleştirildi. Anlamlı olan miRNA ve mRNA değişimleri, biyoinformatik analizler ile yollar, spesifik süreçlere özgü valide edilmiş gen setleri ve hedefler açısından analiz edildi.



Şekil 54. Biyoinformatik analizlerin akışı

4.10.1. Gen Ontoloji Analizleri

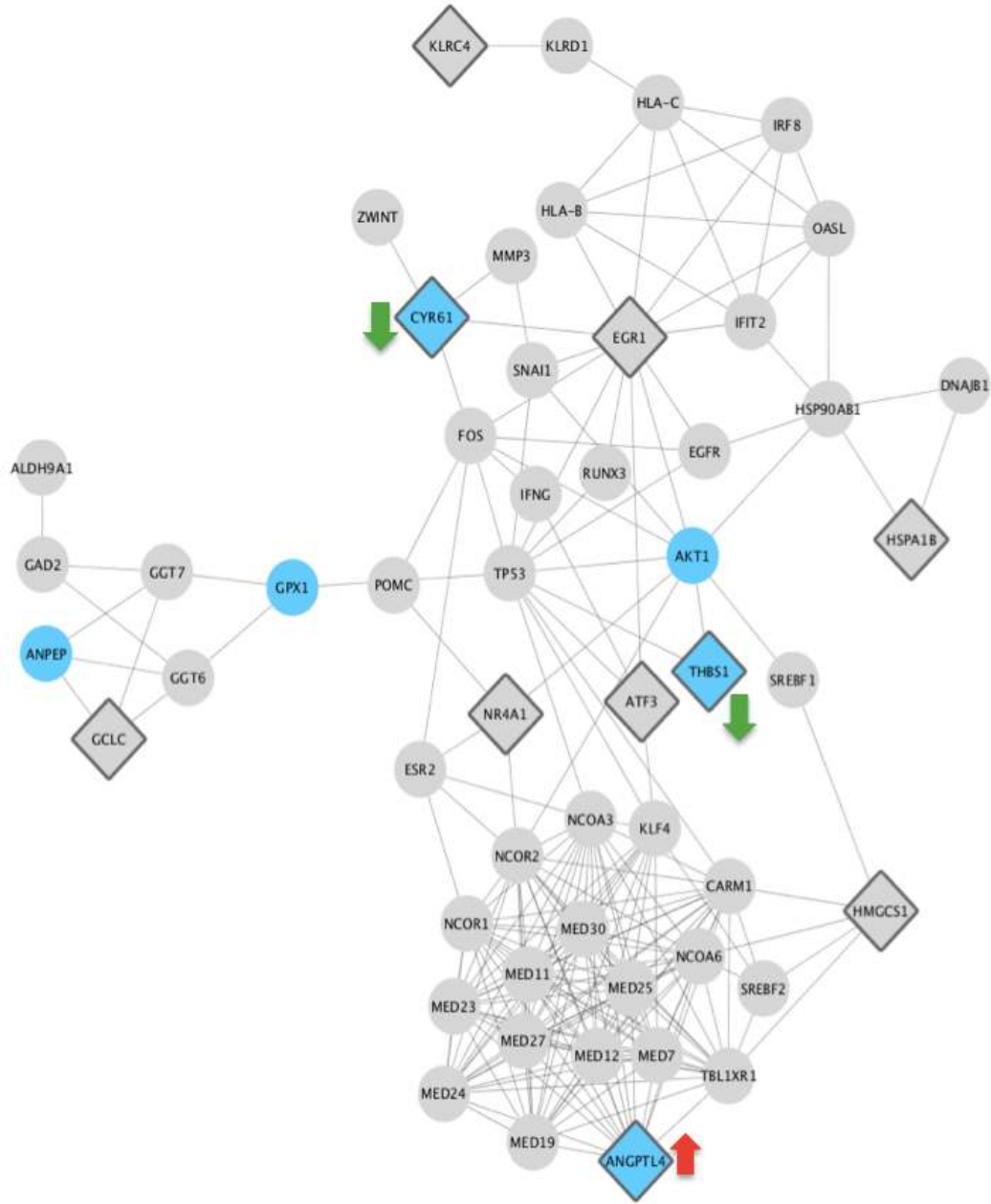
4.10.1.1. Anjiyogenezin Düzenlenmesi (GO:0001525)

Gen ontoloji analizindeki biyolojik süreçler içinden anjiyogenez süreci, HCT-116 hücrelerinde anlamlı olarak karşımıza çıkmaktadır (p değeri 0.002) (Şekil 55). Anlamlı ekspresyon değişimi gözlenen mRNA ve miRNA'ların, anjiyogenez sürecinde yer alan 6 geni göstermesi sonucu bu süreç anlamlı saptanmıştır (Tablo 9). Anjiyogenez sürecinin anlamlı çıkmasında etkili olan 6 gen şunlardır: Anjiyopoietin-benzeri- 4 (Angiopoietin-like-4,

ANGPTL4), sistein zengin protein 61 (cysteine rich angiogenic inducer 61-CYR61), trombospondin-1 (Thrombospondin-1, THBS-1 or TSP-1), v-akt mürin thimoma viral onkogen homolog 1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, AKT1), alanil aminopeptidaz (alanyl aminopeptidase, ANPEP) ve glutatyon peroksidaz- 1 (glutathione peroxidase 1, GPX1).

AKT1, ANPEP ve GPX1 genleri; anlamlı ekspresyon değişimi saptanan miR-181d, miR-331, miR-501, ve miR-625 mikro-RNA'larının hedefleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak mikro-RNA'ların hedef genlerinden AKT1, ANPEP ve GPX1 istatistiksel olarak anlamlı gen listesi içinde bulunmamaktadır.





Süreç	Gen Sayısı	Genler	P değeri	Benjamini	Bonferroni
GO:0001525~angiogenesis	6	3491, 51129, 2876, 290, 207 7057	0,002	0,039	0,898

Şekil 55. HCT-116 hücrelerinde gen ontoloji analizi-anjiyogenez süreci

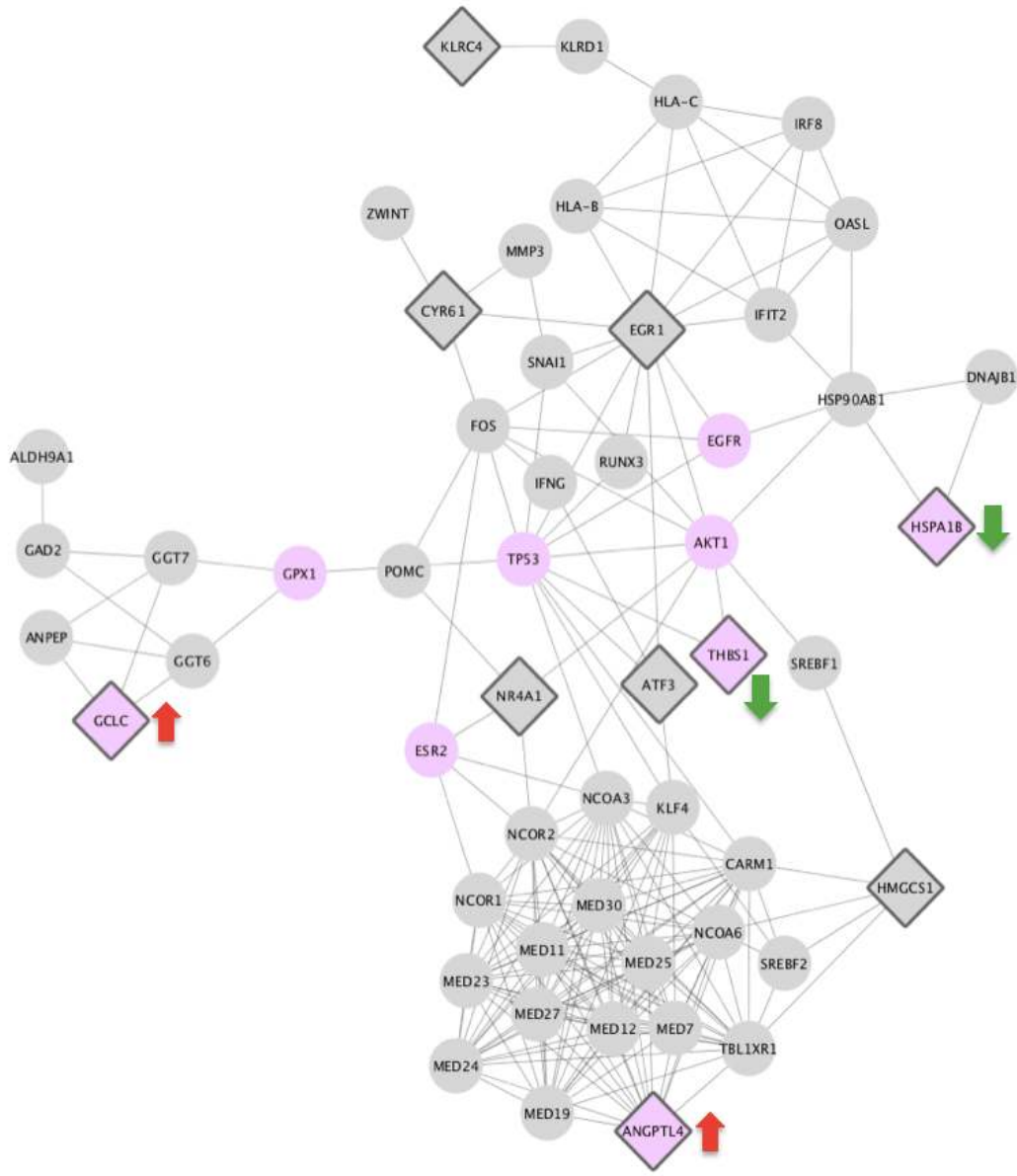
Tablo 9. Anjiyogenez sürecinde etkin olabilecek mRNA ve miRNA'lar

Gen	Gen ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyal	Statik Kültür Ortalama Sinyal	Değişim Katsayısı	P Değeri
ANGPTL4	51129	8,48	7,25	2,34	0,001
CYR61	3491	6,78	8,1	-2,51	0,002
THBS1	7057	5,79	7,07	-2,43	0,0002
miRNA	Hedef Gen -ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyali	Statik Kültür Ortalama Sinyal	Değişim Katsayısı	P Değeri
miR-331-3p (ID:442903)	AKT-1 (ID: 207)	2,71	3,8	-2,12	0,033
miR-375 (ID:494324)	ANPEP (ID:290)	2,78	4,31	-2,87	0,001
miR-501-3p (ID: 574503)	AKT-1 (ID: 207)	2,2	3,38	-2,28	0,016
miR-625-5p (ID: 693210)	GPX1 (ID:2876) AKT1 (ID:207)	4,13	5,67	-2,91	0,009

4.10.1.2. Apoptozun Negatif Düzenlenmesi (GO:0043066)

Gen ontoloji analizindeki biyolojik süreçler içinden apoptozun negatif olarak düzenlenmesi süreci (GO:0043066), HCT-116 hücrelerinde anlamlı olarak karşımıza çıkmaktadır (p değeri 0.00004) (Şekil 56). Anlamlı ekspresyon değişimi gözlenen mRNA ve miRNA'ların, apoptozun negatif düzenlenmesi sürecinde yer alan 9 geni göstermesi sonucu bu süreç anlamlı saptanmıştır (Tablo 10). Bu genler şunlardır: Anjiyopoietin-benzeri- 4 (ANGPTL4), glutamat-sistein ligaz, katalitik alt birimi (Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC), ısı şok protein ailesi- A üye 1B (Heat shock protein family A (Hsp70) member 1B, HSPA1B), trombospodin-1 (TSP-1), östrojen reseptör-2 (Estrogen receptor 2, ER-beta veya ESR2), tümör protein 53 (TP53 tumor protein p53, TP53), v-akt mürin thimoma viral onkogen homolog 1 (AKT1), epidermal büyüme faktör reseptörü (epidermal growth factor receptor, EGFR) ve glutatyon peroksidaz- 1 (GPX1).

ESR2, TP53, AKT1, EGFR ve GPX1 genleri; anlamlı ekspresyon değişimi saptanan miR-181d-5p, miR-324-3p, miR-331-3p, miR-375, miR-501-3p ve miR-625-5p mikro-RNA'larının hedefleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak mikro-RNA'ların hedef genlerinden ESR2, TP53, AKT1, EGFR ve GPX1 istatistiksel olarak anlamlı gen listesi içinde bulunmamaktadır.



Süreç	Gen Sayısı	Genler	P değeri	Benjamini	Bonferroni
GO:0043066~negative regulation of apoptosis	9	3304, 51129, 2876, 1956, 2729, 2100, 207, 7157, 7057	0,00004	0,001	0,043

Şekil 56. HCT-116 hücrelerinde gen ontoloji analizi- apoptozun negatif düzenlenmesi süreci

Tablo 10. Apoptozun negatif düzenlenmesi sürecinde etkin mRNA ve miRNA'lar

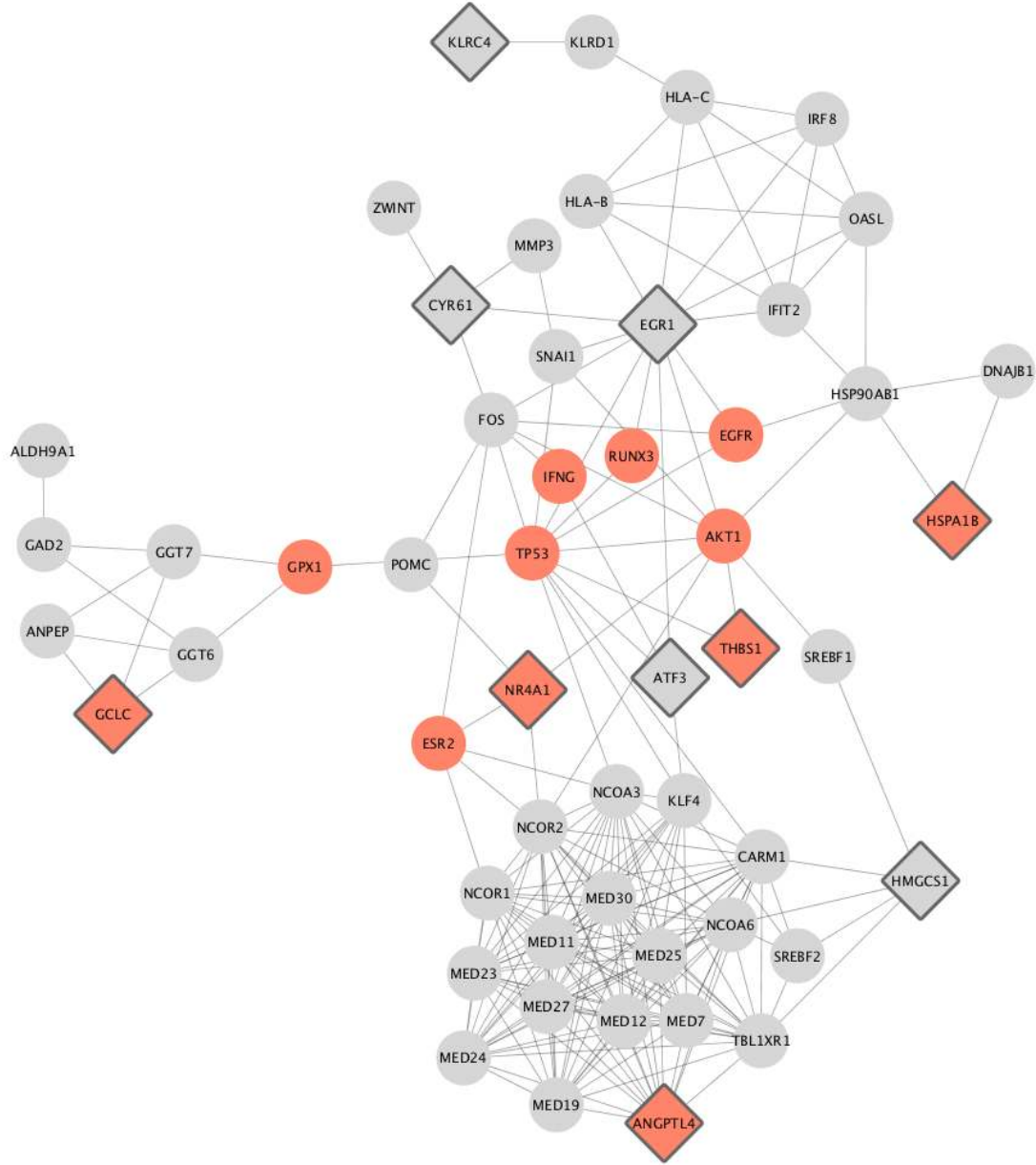
Gen	Gen ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyal	Statik Kültür Ortalama Sinyal	Değişim Katsayısı	P Değeri
ANGPTL4	51129	8,48	7,25	2,34	0,0013
GCLC	2729	7,72	6,72	2,01	0,0009
HSPA1B	3304	9,15	10,27	-2,17	0,0005
THBS1	7057	5,79	7,07	-2,43	0,0002
miRNA	Hedef Gen -ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyali	Statik Kültür Ortalama Sinyal	Değişim Katsayısı	P Değeri
miR-181d-5p (ID: 574457)	ESR2 (ID:1956)	2,32	3,44	-2,17	0,0431
miR-324-3p (ID: 442898)	TP53 (ID:7157)	2,65	4,21	-2,95	0,0031
miR-331-3p (ID:442903)	AKT1 (ID: 207)	2,71	3,8	-2,12	0,0336
miR-375 (ID:494324)	EGFR (ID:1956)	2,78	4,31	-2,87	0,0012
miR-501-3p (ID: 574503)	AKT1 (ID:207)	2,2	3,38	-2,28	0,0163
miR-625-5p (ID: 693210)	AKT1 (ID:207) EGFR (ID:1956) GPX1 (ID:2876)	4,13	5,67	-2,91	0,0094

4.10.1.3. Apoptozun Düzenlenmesi (GO:0042981)

Gen ontoloji analizindeki biyolojik süreçler içinden apoptozun düzenlenmesi süreci (GO:0042981) HCT-116 hücrelerinde anlamlı olarak karşımıza çıkmaktadır (p değeri 0.004) (Şekil 57). Anlamlı ekspresyon değişimi gözlenen mRNA ve miRNA'ların, apoptozun negatif düzenlenmesi sürecinde yer alan 12 geni göstermesi sonucu bu süreç anlamlı saptanmıştır (Tablo 10). Bu genler şunlardır: Anjiyopoietin-benzeri- 4 (ANGPTL4), glutamat-sistein ligaz, katalitik alt birimi (GCLC), nükleer reseptör ailesi 4, grup A üye 1 (nuclear receptor subfamily 4 group A member 1, NR4A1), ısı şok protein ailesi- A üye 1B (HSPA1B), trombospondin-1 (TSP-1), östrojen reseptör-2 (ESR2), interferon gama (IFNG), tümör protein 53 (TP53), v-akt mürin thimoma viral onkogen homolog 1 (AKT1), epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR), runt-bağımlı transkripsiyon faktör 3 (Runt-related transcription factor 3, RUNX3) ve glutatyon peroksidaz- 1 (GPX1).

ESR2, IFNG, TP53, AKT1, EGFR, RUNX3, ve GPX1 genleri; anlamlı ekspresyon değişimi saptanan miR-181d-5p, miR-324-3p, miR-331-3p, miR-375, miR-501-3p ve miR-625-5p mikro-RNA'larının hedefleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak mikro-RNA'ların hedef

genlerinden ESR2, IFNG, TP53, AKT1, EGFR, RUNX3 ve GPX1 istatistiksel olarak anlamlı gen listesi içinde bulunmamaktadır.



Süreç	Gen Sayısı	Genler	P değeri	Benjamini	Bonferroni
GO:0042981~regulation of apoptosis	12	3304, 3458, 3164, 51129, 2876, 864, 1956, 2729, 2100, 207, 7157, 7057	0,0001	0,004	0,133

Şekil 57. HCT-116 hücrelerinde gen ontoloji analizi- apoptozun düzenlenmesi süreci

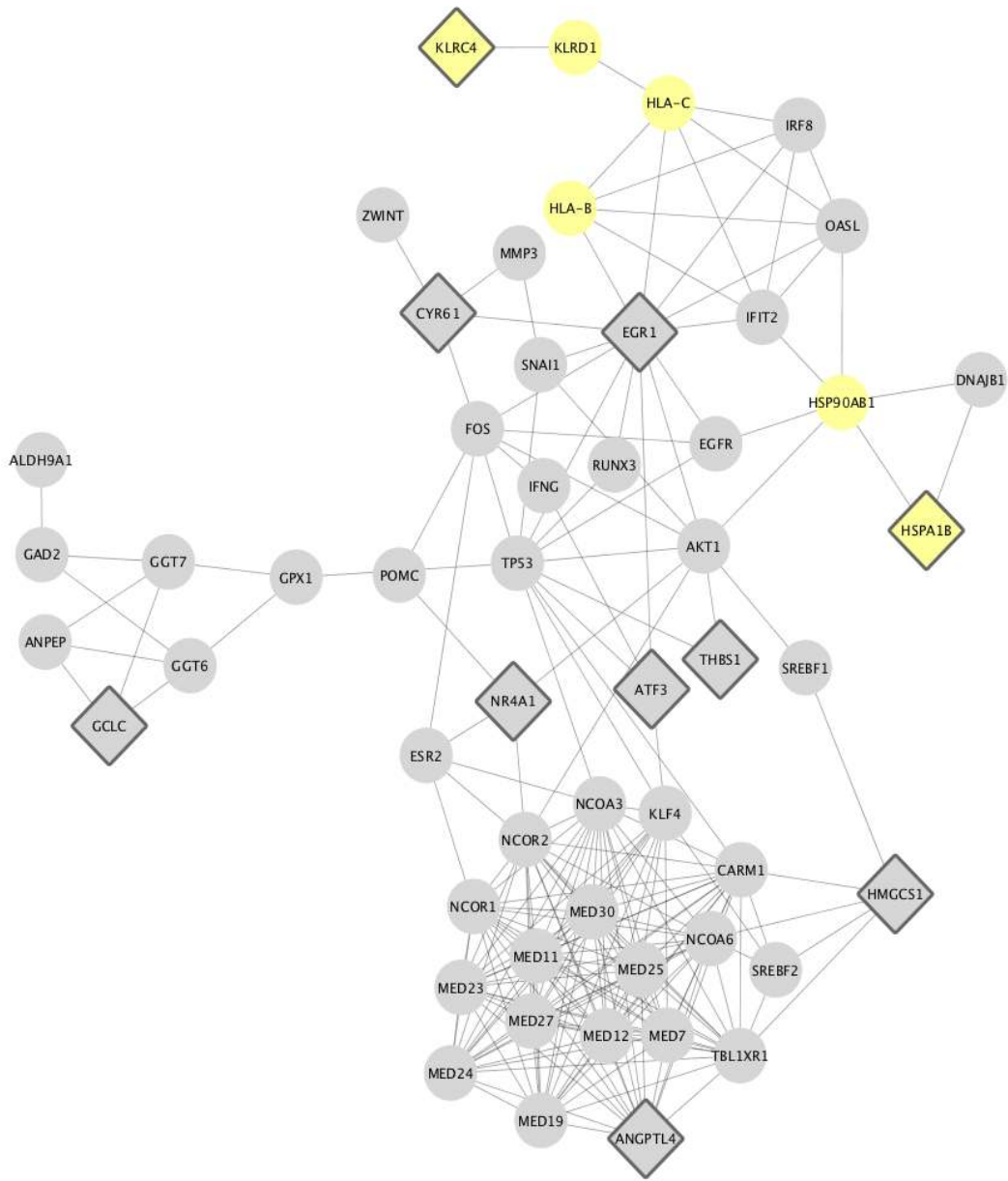
Tablo 11. Apoptozun düzenlenmesi sürecinde etkin olabilecek mRNA ve miRNA'lar

Gen	Gen ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyal	Statik Kültür Ortalama Sinyal	Değişim Katsayısı	P Değeri
ANGPTL4	51129	8,48	7,25	2,34	0,0013
GCLC	2729	7,72	6,72	2,01	0,0009
NR4A1	3164	7,39	8,5	-2,16	0,0035
HSPA1B	3304	9,15	10,27	-2,17	0,0005
THBS1	7057	5,79	7,07	-2,43	0,0002
miRNA	Hedef Gen -ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyali	Statik Kültür Ortalama Sinyal	Değişim Katsayısı	P Değeri
miR-181d-5p (ID: 574457)	ESR2 (ID:1956) IFNG (ID:3458)	2,32	3,44	-2,17	0,0431
miR-324-3p (ID: 442898)	TP53 (ID:7157)	2,65	4,21	-2,95	0,0031
miR-331-3p (ID:442903)	AKT1 (ID: 207)	2,71	3,8	-2,12	0,0336
miR-375 (ID:494324)	EGFR (ID:1956)	2,78	4,31	-2,87	0,0012
miR-501-3p (ID: 574503)	AKT1 (ID:207)	2,2	3,38	-2,28	0,0163
miR-625-5p (ID: 693210)	AKT1 (ID:207) RUNX3(ID:864) EGFR (ID:1956) GPX1 (ID:2876)	4,13	5,67	-2,91	0,0094

4.10.1.4. Antijen İşlenmesi ve Sunumu (KEGG Pathway- hsa04612)

Elde edilen miRNA ve mRNA verileri eşliğinde yapılan KEGG yolak analizinde, antijen işlenmesi ve sunumu yolağı (hsa04612) anlamlı olarak karşımıza çıkmaktadır (p değeri 0.0007) (Şekil 58). Anlamlı ekspresyon değişimi gözlenen mRNA ve miRNA'ların, antijen işlenmesi ve sunumu sürecinde yer alan 6 geni göstermesi sonucu bu süreç anlamlı saptanmıştır (Tablo 12). Bu genler şunlardır: Isı şok protein ailesi- A üye 1B (Heat shock protein family A (Hsp70) member 1B, HSPA1B), katil hücre lektin benzeri reseptör C4 (killer cell lectin like receptor C4, KLRC4), majör histokompatibilite kompleks, sınıf 1, B (major histocompatibility complex, class I, B; HLA-B), majör histokompatibilite kompleks, sınıf 1, C (major histocompatibility complex, class I, C; HLA-C), ısı şok protein 90kDa alfa ailesi, sınıf B üye 1 (heat shock protein 90kDa alpha family class B member 1, HSP90AB1), katil hücre lektin benzeri reseptör D1 (killer cell lectin like receptor D1, KLRD1).

HLA-B, HLA-C, HSP90AB1 ve KLRD1 genleri; anlamlı ekspresyon değişimi saptanan miR-181d-5p ve miR-324-3p mikro-RNA'larının hedefleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak mikro-RNA'ların hedef genleri istatistiksel olarak anlamlı gen listesi içinde bulunmamaktadır.



Süreç	Gen Sayısı	Genler	P değeri	Benjamini	Bonferroni
KEGG PATHWAY hsa04612:Antigen processing and presentation	6	8302, 3304, 3824, 3107, 3106, 3326	0,0007	0,033	0,065

Şekil 58. HCT-116 hücrelerinde gen ontoloji analizi– KEGG antijen işlenmesi ve sunumu

Tablo 12. Antijen işlenmesi ve sunumu yolağında sürecinde etkin olabilecek mRNA ve miRNA'lar

Gen	Gen ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyal	Statik Kültür Ortalama Sinyal	Değişim Katsayısı	P Değeri
HSPA1B	3304	9,15	10,27	-2,17	0,0005
KLRC4	8302	4,52	5,63	-2,16	0,0129
miRNA	Hedef Gen -ID	Dinamik Kültür Ortalama Sinyali	Statik Kültür Ortalama Sinyal	Değişim Katsayısı	P Değeri
miR-181d-5p (ID: 574457)	HLA-B (ID:3106) HLA-C (ID:3107) HSP90AB1 (ID:3326)	2,32	3,44	-2,17	0,0431
miR-324-3p (ID: 442898)	KLRD1 (ID:3824)	2,65	4,21	-2,95	0,0031

5. TARTIŞMA

5.1. Mikrofluidik Çipte Dinamik Kültür Optimizasyonu

Mikrofluidik dinamik kültürün gerçekleştirilebilmesi için ilk olarak çip tasarımı yapıldı. Hücrelerin çip içerisinde tek tabaka olarak (monolayer) büyütülebilmesi için çipler içerisinde kanallar tasarlandı ve hücrelerin bu kanallara ekilerek yapışması ve mikrofluidik akım varlığında kültürün gerçekleştirilmesi tasarlandı. Sıvı sızıntı problemleri çeşitli çip bileşenlerinin değiştirilmesi ve çip birleştirme aşamalarında yapılan değişiklikler ile aşıldı. Kültür için uygun çiplerin tasarımı ve üretiminin gerçekleştirilmesinden sonra, çip içerisinde hücrelerin deney koşulları ve planı çerçevesinde idame ettirilebilir olması açısından hücre tipi sayısı, yüzey materyali, sıvı akış hızı açısından çeşitli denemelerle optimum kültür değerleri saptandı. Sıvı akış hızının artması ile hücre yoğunluğunun artması, çipteki yüzey ve besin ortamının hızla azalması ile ölen hücre sayısının da buna bağlı olarak artmasından ötürü, sıvı akış hızı $2\mu\text{l}/\text{dk}$ olarak belirlendi ve deneylerde kullanıldı.

5.2. Mikrofluidik Sıvı Akışının ve Sıvı Geriliminin Hesaplanması

Mikrofluidik çipin kanalı içindeki sıvı gerilimi teorik olarak hesaplandı. Mikrofluidik sistem için, Stokes sıvı akış rejimine ait olan Reynold sayısı 0.0173 olarak hesaplandı. Kanalın orta uzunluğu boyunca ortalama sıvı gerilimi –shear stress, aşağıdaki denklemin kullanılmasıyla 1.44×10^{-5} Pa olarak hesaplandı.

$$\tau = \frac{6\mu Q}{h^2 w}$$

Denklemden μ , sıvıya ait dinamik viskoziteyi ($0.000692 \text{ kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$); Q hacimsel sıvı akış hızını ($2 \mu\text{L min}^{-1}$); h , mikrofluidik çipin kanal uzunluğunu (1.55 mm) ve w ise mikrofluidik çipin kanal genişliğini (4 mm) simgelemektedir.

Bölgesel olarak sıvı gerilimi-shear stress dağılımını değerlendirmek için; Comsol Multiphysics™ yazılımı kullanılarak sıvı dinamikleri hesaplandı. Sıkıştırılamayan Newton sıvılar için Navier-Stokes denklemi ile hesaplamalar yapıldı. Bu durumda mikrofluidik kanalın yarısındaki (uzunluğun yarısı olarak $L/2$), sınır katmanının kalınlığı, mikrofluidik kanalın kalınlığından daha fazladır, sıvı gerilimi-shear stress aşağıdaki denklemle açıklanabilir.

$$\tau = \mu \frac{\partial u}{\partial y}$$

Denklemden yer alan u mikrofluidik kanal boyunca sıvının hızını; y ise mikrofluidik kanal duvarından tabana kadar olan uzaklık olarak alındı. Sonuçlara göre adheran hücreler uniform bir sıvı gerilimine- shear strese maruz kalıyor (Şekil 31).

5.3. Mikrofluidik Dinamik Kültür Etkisiyle Hücre Proliferasyonunda Oluşan Farklılıklar

Mikrofluidik sıvı akışı ile dinamik kültürün başlatılmasından sonra, Presto Blue canlılık analizi ve hücrelerin mikroskopik görüntüleri ile sürekli sıvı akışının ve buna bağlı sıvı geriliminin hücre sayısında ve morfolojisinde oluşturduğu değişiklikler gözlemlendi. Sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimi-shear stress altında idame ettirilen HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin hücre sayısında, statik kültürde çoğalan hücrelere oranla anlamlı artış saptandı (p -değeri $\leq 0,05$) (Şekil 37). Dinamik kültür altında çoğalan hücreler, sayının artmasından dolayı çipin tabanında yer yer çok katmanlı görünüm kazandılar (Şekil 35).

Literatürde, intertisyel sıvı akışının biyomühendislik tabanlı deneysel modellerle taklit edildiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu tarz çalışmalar da, normal hücreler de olduğu gibi kök hücreler ve kanser hücreleri de kullanılmaktadır. Çünkü vücutta bütün hücreler bir arada bulunmaktadır ve ortamdaki fiziksel değişikliklerden bütün yapılar etkilenmektedir. Örneğin osteoblastların ve mezenkimal kökenli hücrelerin proliferasyonlarında, ortamdaki sıvı akışının etkisiyle artışlar olduğu saptanmıştır (95, 96). Bunların dışında oral skuamöz hücreli kanserlerde, meme ve glioblastoma kanserleri üzerinde yapılan çalışmalarda da, sıvı akışının ve buna bağlı sıvı geriliminin-shear stress'in hücrenin proliferasyonunu arttırdığı gözlenmiştir (63, 97, 98).

Bizim çalışmamızda da, HCT-116 ve HT-29 KKK hücrelerinin 48 saat boyunca sıvı akışına ve buna bağlı olarak sıvı gerilimine-shear stress maruz kalması sonucu, dinamik kültür altındaki hücrelerin proliferasyonlarında statik kültür altında olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi. Yerleşim yerindeki farklılıkların olmasına rağmen sıvı akışı etkisiyle proliferasyonda değişikliklerin saptanması, vücut içerisinde doğal olarak bulunan ve tümör kitlesi çevresinde daha çok artışı gözlenen sıvı akışının ve buna bağlı olarak sıvı gerilimlerinin –shear stress hücrenin proliferasyonuna artış yönünde etkiye edeceği söylenebilir.

5.4. Mikrofluidik Sıvı Akışı Etkisiyle Kopan Hücreler

Mikrofluidik sıvı etkisiyle kopan hücrelerin, EMT süreciyle birlikte MET sürecine de ışık tutabilmesi açısından önemlidir. Bu hücreler MET'i daha iyi modelleyebilen deney modellerinin kullanılarak, çeşitli ileri analizlerin yapılabilmesi açısından saklandı.

5.5. Floresan İmmünohistokimya

Tüm kanserlerde olduğu gibi metastaz sürecinin gerçekleşmesi için gerekli olan EMT sürecinde, epitelyal kökenli hücreler epitelyal karakterlerini kaybedip onu yerine mezenşimal bir karakter kazanırlar. Epitel doku, bağırsak gibi dokuların üst katmanını oluşturur. Epitel doku patojenler için bariyer oluştururken aynı zamanda salgı ve emilim süreçlerinde de iş görür. Epitel dokuların bu işlevlerini görebilmesi için apikal-bazal polaritesini ve sıkı bağlantılar ile oluşturdukları dokular arası bağlantılarını kaybetmemesi gerekir. Bunun tersi olarak da mezenşimal hücreler şekilsel olarak değişim gösterirlerken, migrasyon ve invazyon kapasiteleri de artar. Embriyogenezde çok önemli olan bu fenotipik dönüşüm, E-kaderinin transkripsiyonel ekspresyonunu, aktin sitoskelet düzenlenimlerini ve membran düzenlenimlerini arttıran TGF-beta ve Wnt sinyal yollarını indükler. EMT sürecinin moleküler belirteçleri N-kaderin, vimentin, nükleer beta-catenin ve çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunda artış, ile E-kaderin ekspresyonunda azalmaları içerir (99, 100).

Bu nedenle KKK metastazının EMT sürecine odaklanılan bu projede, interstisyel vücut sıvılarını taklit etmek amacıyla kullanılan mikrofluidik dinamik kültür modelinde EMT'nin moleküler varlığı gösterilerek, sıvı akışının hücreleri epitel karakterden mezenşimal karaktere yönlendirdiği gösterildi. Bunun için E-kaderin N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarındaki değişiklikler floresan immünohistokimyasal tekniklerle gösterildi (Şekil 40). EMT indükleyen TGF-beta kullanılarak EMT-pozitif grup ile, dinamik kültürde sıvı akışına maruz kalan hücreler karşılaştırıldı.

Dinamik kültürde sürekli sıvı akışına ve sıvı gerilimine- shear stress maruz kalan HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde, statik kültürde çoğalan hücrelere göre E-kaderin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma; N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p-değeri $\leq 0,05$) (Şekil 41, 42).

Rizvi ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışmada, sıvı akışı ve sıvı geriliminin etkisiyle, over kanseri hücrelerinde EGFR ve vimentin ekspresyonu aracılı EMT gözlenmiştir. Grup vücut içerisindeki doğal sıvı akışının over kanseri hücrelerinde EMT'yi ve heterojen yapıyı desteklediği yönünde verilerini literatüre sunmuştur (77). Literatürde sıvı akışı ile indüklenen invazyon ve metastazı konu alan araştırmalarda mevcuttur. Piotrowski-Daspit ve arkadaşlarının, interstisyel sıvı akışının invaziv fenotip üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada, sıvı akışı ve onunla oluşan basıncın, meme kanseri hücrelerinde Snail, vimentin, ve E-kaderin ekspresyonlarını değiştirerek hücreye EMT yönünde avantaj kazandırdığını göstermişlerdir (101).

Bizim çalışmamızda da temel EMT moleküler belirteçleri olarak tanımlanan E-kaderin, N-kaderin ve vimentindeki ekspresyon değişimlerinin EMT yönünde olmasından ötürü, interstisyel sıvı akışının hücreye invaziv-metastatik karakter kazandırdığı söylenebilir.

Kanalların çeşitli yerlerinden alınan görüntülerle birlikte, kanallar bir bütün olarak da değerlendirildi (Şekil 43, 44). Bunun için floresans mikroskobun mozaik çekim özelliği kullanılarak tüm kanalın parça parça görüntüleri alındı ve birleştirildi. Sıvı akışı ile açığa çıkan sıvı gerilimi- shear stres'in bütün kanal boyunca aynı olduğu yapılan modellemelerle saptanmış olmasına rağmen, bu akışın ve gerilimin kanalın her yerinde aynı etkiyi oluşturduğunu görmek, sıvı paterninin uniform olduğunu görmemiz açısından önemliydi. HCT-16 ve HT-29 hücrelerine ait görüntülerde, kanalın her yerinde E-kaderin ekspresyonundaki azalma, N-kaderin ve vimentin ekspresyonundaki artış paternlerinin aynı olduğu görüldü.

5.6. miRNA Ekspresyon Analizi

Dinamik kültür altında sürekli sıvı akışı ve buna bağlı olarak sıvı gerilime maruz kalan hücrelerde EMT moleküler belirteçlerindeki değişikliklerin gösterilmesinden sonra, vücuttaki doğal sıvı akışının kanser hücreleri EMT üzerindeki etkisinin miRNA ekspresyonları açısından belirlenmesi için Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) kullanılarak ekspresyon durumları ve olası yollar hakkında bilgi sahibi olundu.

5.6.1. HCT-116 Hücrelerindeki miRNA Ekspresyonları

HCT-116 hücre hattı ile yapılan deneylerde, 12 miRNA'da istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlemlendi. Bunlardan 2'sinde ekspresyon artışı (mir-320e, miR-4419a), 10'unda ise

ekspresyon azalışı (miR-1255a, miR-331-3p, miR-10b-5p, miR-181d-5p, miR-501-3p, miR-192-5p, miR-10a-5p, miR-375, miR-625-5p, miR-324-3p) gözlemlendi (Şekil 46).

KRK hasta dokuları ile metastaz ve rekürrens biyobelirteci belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, miR-320e'nin lenf nodu metastazı olan 3.derece ve uzak metastazı olan 4.derece kanser hastaların dokularında, normal dokulara göre istatistiksel olarak anlamlı artışı görülmüştür. Yine aynı çalışmada miR-320e'nin kötü prognoz ve rekürrens açısından anlamlı bulunduğu savunulmuştur (102). Bizim çalışmamızda sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentindeki ekspresyon paternleri ile EMT fenotipini gösteren HCT-116 hücrelerinde de miR-320e'nin eksprese olmuş olması, miR-320e'nin metastatik süreçlerde rol aldığına göstergesi olabilir.

Hepatoselüler karsinoma dokularında yapılan bir çalışmada miR-331-3p ekspresyonundaki artışın, proliferasyonu ve EMT aracılı metastazı indüklediği gözlemlenmiştir (103). Yine hepatoselüler karsinoma hastalarından alınan serumlar üzerinde yapılan çalışmada da serumlarda miR-331-3p gözlenmesinden ve TNM sınıflandırmasıyla korelasyon saptanmasından ötürü miR-331-3p'in diyagnostik ve prognostik belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüş. Ancak aynı çalışmada miR-331-3p'deki değişimin miR-182 ve alfa-fetoprotein ile birlikte değerlendirilerek benin ya da malin karaciğer hastalıklarında diyagnostik belirteç olarak kullanılabileceği savunulmuş (104). Bizim çalışmamızda sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HCT-116 hücrelerinde miR-331-3p ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Literatürde miR-331-3p'in hepatoselüler karsinomada ekspresyonundaki artışlar üzerinde durulmuştur, ancak aynı çalışmalarda bu belirteçlerin karaciğer hastalıklarında teşhis amacıyla kullanılabılır yorumları, miR-331-3p ekspresyonundaki artışın karaciğere özgü olduğunu düşündürmektedir. miR-331-3p'ün KRK'deki ekspresyon durumuyla ilgili yayın bulunmamaktadır.

miR-10b invazyon ve metastaz süreçlerindeki rolüyle iyi tanımlanmış bir belirteçtir. Özellikle meme kanseri üzerinde yapılmış olan çalışmalarda artan ekspresyonlarının metastazla ilişkili olduğu savunulmuş. miR-10b'nin ekspresyonundaki artış, homeobox D10 mRNA'sının translasyonunu inhibe ederek, pro-metastatik gen olan Rhoc'un ekspresyonunda artışa sebep olur (105, 106). KRK'de de mir-10b'nin invazyon ve metastaz süreçlerindeki rolü, meme kanserindeki gibi Rhoc ekspresyonundaki artış üzerinden yürüdüğü yönündedir ve miR-10b'deki

artışın metastatik fenotip ile korele olduğu savunulmaktadır (107). Hur K ve arkadaşlarının 2015'te yayınladıkları çalışmalarında, KRK'in primer tümörlerinde miR-10b ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış, karaciğer metastaz odaklarında ise anlamlı azalma saptamışlardır. Buradan yola çıkarak, primer tümörde miR-10b ekspresyonundaki artışın metastaz açısından prognostik olduğunu raporlamışlardır (108). Bizim çalışmamızda sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HCT-116 hücrelerinde miR-10b ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Literatürdeki verilerin çoğunluğu KRK'de miR-10b ekspresyonlarında artış ile olduğu yönündedir. Ancak Hur K ve arkadaşları 10b'nin metastazın gerçekleşmesinden önce artış gösterdiğini, uzak noktaya metastazın gerçekleşmesinden sonra ise metastatik odakta ekspresyonun azaldığını göstermeleri bilgisi doğrultusunda, EMT ve MET proseslerinden sonra miR-10b ekspresyonunda azalma olabileceği yorumu yapılabilir. Gasch C ve arkadaşları ise, dolaşımdaki tümör hücrelerinde miR-10b ekspresyonlarında heterojenite saptamışlardır. Dolaşımdaki tümör hücrelerinin, kan damarlarındaki dolaşımları süresince sıvı akışına ve gerilimine maruz kaldıkları ve EMT-MET süreçlerini arasında heterojen fenotipe sahip olmaları; miR-10b'nin ekspresyonunda etkileri olabileceğini düşündürmektedir (109).

miR-181d hakkındaki bilgiler genellikle glioblastoma üzerinden elde edilmiştir. (110, 111). Wang XF ve arkadaşları, glioblastoma hücrelerinde miR-181d'nin ekspresyonunun proliferasyonu baskıladığını, hücre döngüsünden kaçısı ve apoptozu tetiklediğini bildirmişlerdir (112). KRK hücre hatlarıyla yürüttüğümüz çalışmamızda, HCT-116 hücrelerinde miR-181d'nin ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Literatürde miR-181d'nin KRK'deki ekspresyonu hakkında bilgi olmamasına rağmen, glioblastoma hücrelerinde gösterdiği etkinin HCT-116 hücrelerinde de gösterilebileceği akla gelmektedir. Bu durumda, sıvı akışı ve etkisiyle oluşan sıvı geriliminin, kanser hücresine EMT yönünde avantaj kazandırmasıyla birlikte, tümör baskılayıcıların ifadelerine etki ederek de kanser hücresine avantaj kazandırabileceği düşünülebilir.

miR-501 hakkındaki nadir bilgilerden biri Huang ve arkadaşlarının yayınlarında, miR-501'in hepatoselüler kanserdeki ekspresyon artışının proliferasyonu indüklemesinden dolayı terapötik hedef olabileceği yönündedir. miR-501'in KRK'deki ekspresyon durumuyla ilgili bilgi bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda ise miR-501'in ekspresyonunda artış değil azalma gözlenmiştir. Bu durumun literatürde bulunan tek bir yayınlı yorumlanması zordur.

miR-192'deki ekspresyon artışının KRK'de karaciğer metastazını baskıladığı yönünde bilgi mevcuttur. Bu açıdan Geng L ve arkadaşları tarafından, miR-192'nin KRK gelişimi ve ilerlemesi yönünde oldukça önemli bir etkisi olduğu savunulmaktadır (113). Bizim çalışmada sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HCT-116 hücrelerinde miR-192 ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Geng L ve arkadaşlarının yayımladıkları çalışmaları eşliğinde, miR-192 ekspresyonundaki azalmanın, karaciğer metastazını indüklemeye yönünde etkisi olabilir.

Serviks kanserinde ve glioblastomada, miR-10a ekspresyonlarındaki artışın invazyon ve metastazı indüklediği gösterilmiştir (114, 115). Ancak bunun yanısıra, Khan S ve arkadaşları tarafından meme kanserinde ekspresyonunda azalmanın raporlanmasıyla birlikte, miR-10a'nın tümör baskılayıcı olarak rol aldığı savunulmuştur (116). Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HCT-116 hücrelerinde miR-10a ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Khan S ve arkadaşlarının yayınlarında savundukları gibi miR-10a'nın tümör baskılayıcı olarak kabul edilmesi durumunda, sürekli sıvı akışının ve sıvı gerilimin etkisiyle tümör baskılayıcıların ifade paternlerinde değişiklik oluşturabileceği akla gelmektedir. Ancak literatürde aynı miRNA'ya ait farklı ekspresyon durumlarını ve farklı biyolojik fonksiyonları savunan yayınların olması bu konuda bilimsel çalışmaların artması gerekliliğini göstermektedir.

Dil skuamöz hücreli karsinom hücre hatlarında, miR-375 ekspresyonundaki artışın hücre proliferasyonunu ve hücre siklus ilerlemesini inhibe ettiği gösterilmiştir (117). Li Y ve arkadaşlarının küçük hücreli dışı akciğer kanseri hasta dokularından yürüttükleri çalışmada, miR-375 ekspresyonunda azalmanın ilerlemiş hastalık ve lenf nodu metastazı varlığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (118). Ancak literatürde miR-375 ekspresyonundaki artışın kemoterapötik direnciyle birlikte EMT yönünde bir geçiş sağladığı yönünde yayınlarda mevcuttur (119). Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HCT-116 hücrelerinde miR-375 ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Dinamik kültür altındaki HCT-116 hücrelerinde proliferasyonun artmasıyla birlikte EMT'nin de indüklendiğini gösterdiğimiz çalışmamızın sonuçları, miR-375 hakkındaki kaynaklarla birlikte değerlendirildiği zaman miR-375 azalmasının proliferasyonu arttırarak metastazı indükleyebileceği yorumu yapılabilir. Ancak

literatürde farklı ekspresyon durumlarını ve farklı biyolojik fonksiyonları savunan yayınların olması bu konuda bilimsel çalışmaların artması gerekliliğini göstermektedir.

Hepatoselüler kanser, özofagus kanseri, kolorektal kanser üzerinde yapılan çalışmalarda miR-625'in azalan ekspresyonunun invazyonu ve metastazı indüklediği yönünde sonuçlar raporlanmıştır (120, 122). Özellikle KRK HCT-116 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen yayında, miR-625'in metastaz ve hastalığın yönetimi açısından oldukça önemli biyobelirteç olabileceği üzerinde durulmuştur. Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HCT-116 hücrelerinde miR-625 ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Bu durumda, yukarıda tanımlanan çalışmaların verileri doğrultusunda kanser hücrelerinin sürekli sıvı akışı ve gerilimine maruz kalmasının, hücreye invazyon ve metastaz yönünde avantaj sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Hepatoselüler kanser hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, miR-324 inhibisyonunun invazyonu indüklediği gösterilmiş (123). Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HCT-116 hücrelerinde miR-324 ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Bu durumda sürekli sıvı akışına maruziyet durumunda gözlenen ekspresyondaki azalmanın invazyon ve metastaz açısından hücreye avantaj sağlayabileceği fikri akla gelmektedir.

miR-4419a, miR-1255a kanserdeki ekspresyon durumu ve göreviyle ilgili literatürde bilgi bulunmamaktadır.

HCT-116 hücre hattının sürekli sıvı akışına maruz kalması durumunda ekspresyonunda değişimi gözlenen miRNA'ların, literatür verileri doğrultusunda kanser hücrelerine sağkalım, proliferasyon, invazyon ve metastaz açısından avantaj sağladığı söylenilebilir. Ancak her biri ayrı bir araştırma konusu olacak şekilde hem *in vitro* hem *in vivo* modeller ile bu sonuçlar doğrultusunda daha çok araştırmalar yürütülmelidir.

5.6.2. HT-29 Hücrelerindeki miRNA Ekspresyonları

HT-29 hücre hattı ile yapılan deneylerde, 14 miRNA'da istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlemlendi. Bunlardan 12'sinde ekspresyon artışı (hsa-miR-1244, hsa-miR-4286, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-4461, hsa-miR-3613-5p, hsa-miR-1972, hsa-miR-3065-5p, hsa-miR-4458, hsa-miR-

6744-5p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-378f, hsa-miR-3651); 2'sinde ise ekspresyon azalışı (hsa-miR-4649-5p, hsa-miR-3178) gözlemlendi (Şekil 48).

Son iki yılda akciğer kanseri üzerinde yapılan iki çalışmada miR-1244 ile ilgili veriler sunulmuştur. Akciğer kanseri hasta dokularında, yapılan bir çalışmada miR-1244'teki azalmanın proliferasyon ve invazyonu etkileyerek hasta sağkalımıyla ilişkili olduğu sunulmuştur. Bu veriler doğrultusunda miR-1244'ün tümör baskılayıcı olarak görev aldığı yorumu yapılmıştır (124). Akciğer kanseri hücre kültürü üzerinde yapılan bir diğer çalışmada da, yine miR-1244 ekspresyonundaki azalmanın sisplatin direnciyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (125).

Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HT-29 hücrelerinde miR-1244 ekspresyonunda literatüre zıt olarak artış saptanmıştır. Literatürdeki verilerin azlığı nedeniyle miR-1244 hakkında çok veril yapılamamaktadır. Daha çok bilimsel verilerle birlikte yorum yapılabilir.

miR-4286 ekspresyonunun özofagus kanserinde artış gösterdiği yönünde az da olsa yayınlar mevcuttur. Drahos J ve arkadaşları tarafından Barret's özofagus ile özofagus kanseri arasında ayırıcı tanıda kullanılabileceği yönünde bilgiler sunulmuştur (126). Zhai R ve arkadaşları da, *Helikobakter pilori* kökenli özofagus kanserinde ise sağkalım açısından miR-4286 ekspresyonundaki artışın kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir (127).

Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HT-29 hücrelerinde miR-4286 ekspresyonunda artış saptanmıştır. Literatürdeki özofagus kanseri yayınlarından yola çıkılarak, dinamik kültürde EMT fenotipi sunan HT-29 hücrelerinde miR-4286 ekspresyonunda artış görülmesi, dinamik mikroçevrenin kanser hücrelerinin fenotiplerini olumsuz etkilediği yönünde yorum yapılabilir. Ancak literatürdeki verilerin artışı ile doğru yorumlamalar yapılabilir.

miR-338 ekspresyonunun akciğer kanserinde ve KRK'de azaldığı gösterilmiştir. Huang N ve arkadaşları tarafından KRK hücre hatları üzerinde yapılan çalışmada, miR-338 ekspresyonunun inhibe edilmesi ile EMT'nin indüklendiği gösterilmiştir (128). Yine KRK üzerinde yapılmış olmasına rağmen hem tümör dokusu hem hücre hatları ile yürütülen bir çalışmada da miR-338 ekspresyonundaki azalmanın hastalıksız sağkalım, proliferasyon ve invazyon açısından kötü prognostik olduğu sunulmuştur (129).

Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HT-29 hücrelerinde miR-338 ekspresyonunda artış saptanmıştır. Yukarıda bahsedilen çalışmalardan elde edilen miR-338 ekspresyonu ve EMT ilişkisi hakkındaki veri ile bizim çalışmamızdan elde edilen veriler tamamen zıt yöndedir.

Qin Y ve arkadaşlarının kolon kanseri hücreleri üzerinde yürüttükleri çalışmada, normoksik ve hipoksik koşullar altında miR-4458 ekspresyonundaki artışın, glikolizi ve laktat üretimini inhibe ederek proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiş (130).

Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HT-29 hücrelerinde miR-4458 ekspresyonunda artış saptanmıştır. Bu artışın Qin Y ve arkadaşlarının çalışmalarından elde ettikleri veri doğrultusunda proliferasyonu inhibe etmesi beklenirdi, ancak dinamik kültürde sürekli sıvı akışına maruz kalan hücrelerin hücre sayılarının statik kültür altındaki hücrelere göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle dinamik kültürün proliferasyonu inhibe etmediği gözlemlendiği için, miR-4458 üzerinden proliferasyonun inhibe edilmesi dinamik kültür koşulları altında gerçekleşmeyebilir.

miR-21 üzerine odaklanılan çalışmalar son yıllarda oldukça artmıştır. miR-21'in kolorektal kanserde artan ekspresyonları bir çok çalışmada gösterilmiştir. Artan ekspresyonunun proliferasyon, invazyon ve metastazda etkili olduğu gösterilmiştir. Wong ST ve arkadaşlarının glioblastoma ve meme kanserinde miR-21'i inhibe etmeleriyle, hücre proliferasyonunda azalma ve kaspaz bağlantılı apoptozda artış gösterilmiştir (131, 132). MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmada da mir-21 baskılanmasıyla inhibe olan invazyon ve metastazının gösterilmesi de miR-21'in kanser hücresi açısından oldukça önemli olduğu göstermektedir (133). Xiong B ve arkadaşlarının HCT-116 KKK hücre hattıyla yaptıkları bir çalışmada miR-21 baskılanmasının hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu inhibe ederken, apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada ileri evre metastatik KKK hasta dokularında da miR-21 ekspresyon düzeylerinin artmış olduğu gösterilmiş olup, miR-21'in terapötik hedef olabileceği yorumlanmıştır (134). Fukushima Y ve arkadaşlarının 306 KKK hasta dokularıyla yaptıkları çalışmada miR-21 ekspresyonunu invazyon, lenfatik ve venöz invazyon, karaciğer metastazı ve Dukes tümör evrelendirmesi ile korele olduğu saptanmıştır. Aynı

çalışmada miR-21 ekspresyonu fazla olan hastalarda genel sapkalım ve hastalık sağkalımın, miR-21 ekspresyonu az olan hastalara göre daha kısa olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle miR-21 ekspresyonunun KRK hastaları için iyi bir prognostik belirteç olacağı üzerinde durulmuştur (135). TGF-beta ile muamele edilen KRK hücrelerinde, miR-21 ekspresyonunda artış ile hücre motilite ve invazyonda da artış saptanmıştır. miR-21 ekspresyonundaki artışla lenf nodu tutulumunun ve uzak meta staz gelişimi ilişkili olarak gösterilmiştir (136). Bornachea O ve arkadaşlarının deney hayvanları üzerinde yaptıkları çalışmada da miR-21 ile EMT arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (137).

Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HT-29 hücrelerinde miR-21 ekspresyonunda artış saptanmıştır. Literatürdeki miR-21 ile metastaz ve EMT arasında ilişki olduğunu savunan yayınlarından yola çıkılarak, vücut içindeki sürekli sıvı akışı ve buna bağlı olan sıvı geriliminin kanser hücresine metastaz ve EMT yönünde avantaj sağladığı söylenilebilir.

Wang C ve arkadaşları, özofagus kanserinde miR-3651'in ekspresyonunun azaldığını ve bu azalmanın tümörün proliferasyonu ile gelişiminde rol aldığını göstermişlerdir (138). Ries J ve arkadaşlarının oral skuamöz hücreli karsinomlu hastaların kanları üzerinden yürüttükleri çalışmada miR-3651'in ekspresyonunda anlamlı artış saptamışlardır ve bunun non-invaziv olarak teşhiste kullanılabileceğini yönünde yorumda bulunmuşlardır (139).

Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HT-29 hücrelerinde miR-3651 ekspresyonunda artış saptanmıştır.

Pan X ve arkadaşlarının nazofarenks kanserinde yürüttükleri çalışmada, miR-4649-3p ekspresyonundaki artışın hücre proliferasyonunun inhibe ettiği gösterilmiştir (140).

Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HT-29 hücrelerinde miR-4649-3p'nin ekspresyonunda anlamlı azalma saptanmıştır. Pan X ve arkadaşlarının yayınlarında sundukları veriler doğrultusunda, dinamik kültür altındaki hücrelerde proliferasyonun artması beklenir. Zaten deney planlarımızda gerçekleştirdiğimiz hücre canlılık-proliferasyon analizlerinde dinamik koşullar altındaki hücre grubunda hücre sayısının statik koşullar altındaki gruptan daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu durumda miR-4649-3p'nin proliferasyonla ilişkili

olduğu da söylenilebilir.

Li W ve arkadaşlarının hepatoselüler kanser üzerinde yürüttükleri çalışmada, miR-3178 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı ve tümörögenezle metastazın inhibe olduğu raporlanmıştır. Bu nedenle, yayında miR-3178'in terapötik bir hedef olabileceği raporlanmıştır (141).

Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HT-29 hücrelerinde miR-3178'nin ekspresyonunda anlamlı azalma saptanmıştır. Literatürden farklılık gösteren miR-3178 ekspresyon verisi açısından yorum yapabilmek için ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

miR-4461'nin, miR-3613-5p, miR-1972, miR-3065-5p, miR-6744, miR-378f'nin kanserdeki ekspresyon durumu ve göreviyle ilgili literatürde bilgi bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda ise sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin ve vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HT-29 hücrelerinde miR-4461, miR-3613-5p, miR-1972, miR-3065-5p, miR-6744, miR-378f'nin ekspresyonlarında artış saptanmıştır.

5.7. mRNA Transkriptom Analizi

Dinamik kültür altında sürekli sıvı akışı ve buna bağlı olarak sıvı gerilime maruz kalan hücrelerde EMT moleküler belirteçlerindeki değişikliklerin gösterilmesinden sonra, vücuttaki doğal sıvı akışının kanser hücreleri EMT üzerindeki etkisinin mRNA transkriptom analizi açısından belirlenmesi için Affymetrix GeneChip Human Transcriptome Array (HTA) 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) kullanılarak ekspresyon durumları ve olası yollar hakkında bilgi sahibi olundu.

Dinamik mikrofluidik kültürde sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin, vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HCT-116 hücreleri ile statik kültürde kültür edilen HCT-116 hücreleri arasındaki mRNA profilindeki değişimi belirlemek amacıyla 67528 genin (Kodlanan: 44699, Kodlanmayan: 22829) ekspresyonu değerlendirildi. İki farklı grup arasında (dinamik ve statik) 59 gende (Kodlanan: 49, Kodlanmayan: 10) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Toplamda 59 genden, 16'sının (Kodlanan: 14, Kodlanmayan: 2) ekspresyonunda artış, 43'ünün (Kodlanan: 35, Kodlanmayan: 8) ekspresyonunda azalma saptandı.

Dinamik mikrofluidik kültürde sürekli sıvı akışı ve sıvı gerilimine maruz kalan, ve E-kaderin, N-kaderin, vimentin boyanma paternleri ile EMT fenotipini sunan HT-29 hücreleri ile statik kültürde kültür edilen HT-29 hücreleri arasındaki mRNA profilindeki değişimi belirlemek amacıyla 67528 genin (Kodlanan: 44699, Kodlanmayan: 22829) ekspresyonu değerlendirildi. İki farklı grup arasında (dinamik ve statik) 57 gende (Kodlanan: 47, Kodlanmayan: 10) istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Toplamda 57 genden, 10'unun (Kodlanan: 7, Kodlanmayan: 3) ekspresyonunda artış, 47'sinin (Kodlanan: 37, Kodlanmayan: 10) ekspresyonunda azalma saptandı.

5.8. Biyoinformatik Analizler

Dinamik kültür grubu ile statik kültür grubunun mRNA ve miRNA analiz verilerinden elde edilen sinyallerin karşılaştırılması ile istatistiksel olarak anlamlı olan (p değeri $\leq 0,05$) değişimler saptandı. Bu anlamlı olan miRNA ve mRNA değişimleri biyoinformatik analizler ile yollar, spesifik süreçlere özgü valide edilmiş gen setleri ve hedefler açısından analiz edildi.

Anlamlı olarak eksprese olan miRNA'ların hedefi olan proteinlerle, anlamlı olarak eksprese olan mRNA'lardan biyolojik prosesler içinde komşu olanların belirlenmesi gen ontoloji analizleri gerçekleştirildi. Komşulukların belirlenmesinin ardından, anlamlı ekspresyon değişiklikleri üzerinden prosesler anlamlandırıldı. Bu şekilde HCT-116 hücreleri için anjiyogenez süreci (GO:0001525), apoptozun negatif düzenlenmesi (GO:0043066), apoptozun düzenlenmesi süreci (GO:0042981), Antijen işlenmesi ve sunumu yolağı (KEGG Pathway hsa04612) anlamlı olarak saptandı. HT-29 hücre hattına ait olarak anlamlı bir süreç ya da yolak saptanamadı. Bu nedenle proseslere ve yollara özgü yorumlar HCT-116 hücre hattı üzerinden yapıldı.

5.8.1. Gen Ontoloji Analizleri

5.8.1.1. Anjiyogenezin Düzenlenmesi (GO:0001525)

Gen ontoloji analizindeki biyolojik süreçler içinden anjiyogenez süreci (GO:0001525) anlamlı olarak karşımıza çıkmaktadır (p değeri 0.002). Anlamlı ekspresyon değişimi gözlenen miRNA ve miRNA'ların, anjiyogenez sürecinde yer alan 6 geni göstermesi sonucu bu süreç anlamlı saptanmıştır. Anjiyogenez sürecinin anlamlı çıkmasında etkili olan 6 gen şunlardır: Anjiyopoyetin-benzeri-4 (Angiopoietin-like-4, Angptl4), sistein zengin protein 61 (cysteine rich

angiogenic inducer 61-CYR61), trombospondin-1 (Thrombospondin-1, THBS-1 or TSP-1), v-akt mürin thimoma viral onkogen homolog 1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, AKT1), alanil aminopeptidaz (alanyl aminopeptidase, ANPEP) ve glutatyon peroksidaz- 1 (glutathione peroxidase 1, GPX1). AKT1, ANPEP ve GPX1 genleri; anlamlı ekspresyon değişimi saptanan miR-181d, miR-331, miR-501, ve miR-625 mikro-RNA'larının hedefleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak mikro-RNA'ların hedef genlerinden AKT1, ANPEP ve GPX1 istatistiksel olarak anlamlı gen listesi içinde bulunmamaktadır.

Anjiyopoietin-benzeri- 4 (Angiopoietin-like-4, Angptl4), anjiyopoietin protein ailesine ait bir proteindir ve sıklıkla nekrotik alanlarda sentezlendiği bilinir. ANGPTL4'ün çoğu tümörde artmış olduğu gösterilmiştir. ANGPTL4, O(2)(-)'nin üretimi için integrinlerle birlikte NADPH oksidazı module eder. Yüksek O(2)(-) miktarı Src'yi active ederek PI3K, ERK ve c-Myc üzerinden anjiyogenez ve anoikis direnci ile sağkalımı artırır (142, 143). Mide kanserlerinde, artan ANGPTL4'nin venöz invazyon ve metastazda yer alan faktörlerden biri olduğu savunulmaktadır (144). Meme kanseri hücrelerinde de, ANGPTL4'in TGF-beta ile indüklenmesi sonucu meme kanseri hücrelerinin dolaşıma geçerek akciğer tutulumunda etkili olduğu gösterilmiş (145). HCT-116 KRK hücre hattının kullanıldığı çalışmalarda, apoptozu indükleyerek metastazı arttırdığı gözlemlenmiş (146). HCT-116 ve HT-29 hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda, artmış ANGPTL4 ekspresyonunun hücre migrasyonunu arttırdığı, F-aktin orgnizasyonunu ve pseudopod oluşumunu yönettiği gösterilmiş. Ayrıca ANGPTL4'ün azalmış E-cadherin ekspresyonu ile ilişkisi gösterilmiş. Tüm sonuçlarla ANGPTL4 ekspresyonunun kolorektal invazyon ve metastazında etkili olduğu gösterilmiş (147). Vucüt içindeki sürekli sıvı akışının HCT-116 KRK hücre hatlarında oluşturduğu değişim üzerine odaklandığımız bu çalışmada, ANGPTL4 artışı üzerinden anjiyogenez sürecinin indüklendiği yorumu yapılabilir. Ayrıca literatürde raporlanan artan ANGPTL4 ekspresyonu ve azalmış E-cadherin ekspresyonu ilişkisinin metastazdaki etkinliğinin gösterilmesi de, immünohistokimya ile azaldığını gösterdiğimiz E-cadherin ve transkriptomik analiz ile arttığını gösterdiğimiz ANGPTL4 ekspresyonu sonuçlarımızla uyumaktadır. ANGPTL4'ün vucüttaki sürekli sıvı akışı ve oluşturduğu sıvı basıncı ile değişen kanser hücre fenotipi açısından odaklanması gereken bir belirteç olduğunu düşündürmektedir.

Sistein zengin protein 61 (cysteine rich angiogenic inducer 61-CYR61) sistein bakımından zengin olan ve heparine bağlanan bir proteindir. Ekstraselüler matriks oluşumunda, diferansiyasyonda, hücre proliferasyonunda, migrasyonda, sağkalımda, anjiyogeneizde ve tümörogeneizde etkilidir. CYR61 literatürde CCN1, GIG1, IGFBP10 olarak da adlandırılır. CYR61 kolorektal kanserlerinde dahil olduğu birçok grup kanserde ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur. Özellikle kolorektal kanserde hücre proliferasyonunda, sağkalımda ve kötü prognozda ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur (148, 149). Özofagus kanserinde ise EMT sürecinde ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur (150). HCT-116 KRK hücreleri ile yapılan bu çalışmada, anjiyogeneiz ve EMT süreçlerinde ekspresyonu artan CYR-61 açısından artış gözlenmemiştir. Dolayısıyla vucut içindeki sürekli sıvı akışının ve sıvı akışının oluşturduğu basıncın CYR-61 ve anjiyogeneiz ile ilişkisi açısından net bir yargıda bulunulamamaktadır.

Trombospondin-1 (Thrombospondin-1, THBS-1), matrikse bağlı adeziv bir proteindir ve tümör progresyonunu module eder. THBS1; literatürde TSP, THBS, TSP1, TSP-1, THBS-1 olarak da adlandırılır. Metalloproteinazlar (MMP) ile metalloproteinazların doku inhibitörleri arasındaki denge çok önemlidir. TSP-1'in, meme ve prostat kanserlerinde MMP inhibitörlerinin ekspresyonunu arttırarak invazyonda anahtar faktör olduğu yönünde yayınlar mevcuttur (151). Melanoma metastatik hücre kültür modelinde ve çoğunluğunun kolorektal kanser olduğu metastatik hastalardan alınan serumlar üzerinde yapılan çalışmalarda, VEGF'in artış gösterdiği metastatik kanserlerde TSP-1'in azaldığı gösterilmiş. Buradan yola çıkarak anjiyogeneizin de aktif olduğu metastaz durumunda THBS-1 ekspresyonunun azaldığı sonucuna erişilebilir (152, 153). THBS-1'in metastatik süreçte ekspresyonunun arttığını gösteren yayınlarda literatürde mevcuttur. Mezenşimal melanoma hücrelerinde, THBS-1 ekspresyonlarının artış ile EMT sürecine katkıda bulunduğu savunulmuştur. Buradan THBS-1'in durumunun henüz netlik kazanmadığı anlaşılmaktadır (154). Ancak bizim çalışmamızda, HCT-116 KRK hücrelerinin sürekli sıvı akışına ve sıvı basıncına maruz kalması ile azalan TSP ekspresyonu ile anjiyogeneizde artış olabileceği yorumu yapılabilmektedir.

Mikro-RNA'lar üzerine yapılan çalışmalar hızla devam etmektedir. Literatürde mikro-RNA'ların biyolojik süreçlerdeki azalan ve artan ekspresyonları hakkında bilgiler görmek mümkündür. miR-331-3p'nin azalan ve artan ekspresyon durumlarındaki olası hedefleri ve rolü üzerine çeşitli yayınlar mevcuttur. Zheng X ve arkadaşlarının KRK hücreleri ve dokuları üzerinde

yaptıkları çalışmada miR-331-3p ekspresyonunun proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği raporlanmış (155). Leedman PJ ve arkadaşları, prostat kanseri üzerinde yaptıkları çalışmada, miR-331-3p'in ErbB2 mRNA ve proteinini azaltarak, PI3K/AKT'ın alt yollarını blokladığını bildirmişlerdir (156). Mir-331-3p'in ekspresyon artışı durumunda; hücre döngüsünün ilerlemesi, apoptoz inhibisyonu, büyüme, glukoz metabolizması, anjiyogenez gibi kanser hücresinin hayati fonksiyonlarında görevli AKT yolağının inhibe olması kanserin gelişimi ve ilerlemesi açısından dezavantaj oluşturmaktadır (157, 158). Böylece, miR-331-3p artışında kanser hücresinde hücre döngüsünün ilerleyememesi, proliferasyonda azalma, anti-apoptotik süreçlerde azalma, anjiyogenezde azalma gözlenebilir. Bu çalışmada, HCT-116 KRK hücrelerinin sürekli sıvı akışına ve shear strese maruz kalması durumunda miR-331-3p'de gözlenen ekspresyon azalması gözlenmiştir. Yapılan gen ontoloji analizi ile miR-331-3p'nin AKT-1 üzerinden anjiyogenez sürecinde etkili olabileceği bulunmuştur. Ancak veri setinde AKT-1 de anlamlı ekspresyon değişimi gözlenmemiştir.

Xu H ve arkadaşlarının 2012'de KRK tümör dokuları ve hücre hatları (HCT-116 , HT-29, SW-40) üzerinde yaptıkları çalışmada, miR-375 ekspresyonunun azaldığı raporlanmıştır. Ancak tümörün boyutu, histolojik derecesi, TNM sınıflandırmaları ile ilişkisi saptanamamıştır (159). Zhuo W ve arkadaşlarının, 2014 yılında mide kanseri üzerinde yaptıkları çalışmada ise, miR-375'in azalan ekspresyonlarının JAK2 üzerinden artan invazyon, migrasyon ve metastaz ile ilişkisi saptanmıştır (160). Eberhardt NL ve arkadaşlarının, 2013 yılında tiroid kanseri üzerinde yaptıkları çalışmada da, miR-375 ekspresyonundaki azalma ile AKT yolağı üzerinden anjiyogenezde artış olacağı raporlanmıştır (161). Bizim HCT-116 KRK hücre hatları üzerinde yaptığımız çalışmamızın biyoinformatik analizleri sonucunda, miR-375 ekspresyonunda azalmanın ANPEP üzerinden anjiyogenezi indüklenebileceği verisi alınmıştır. Ancak veri setinde ANPEP'de anlamlı ekspresyon saptanamamıştır.

Literatürde mir-501-3p'ye ait pek bilgi bulunmamaktadır. Jiang N ve arkadaşlarının 2015'te yayımladıkları çalışmada, hepatoselüler karsinoma doku örneklerinde ve hücre hatlarında mir-501-3p'nin ekspresyonunun arttığını ve proliferasyonun indüklendiğini raporlamışlardır (162). KRK üzerinde yapılan çalışmalarda da mir-501-3p ekspresyonunda artışlar raporlanmıştır, ancak biyolojik fonksiyonu hakkında bilgi verilmemiştir (163). Bu çalışmada HCT-116 hücrelerinde mir-501-3p ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Ancak miR-501-3p'in hedefi

olarak anjiyogenez sürecinde yer alan AKT-1 geninde anlamlı ekspresyon değişikliği saptanmamıştır.

Literatürde miR-625-5p'ye yönelik sonuçlar değişkenlik göstermektedir. Tian KH ve arkadaşlarının 2015'te yayımladığı çalışmalarında, özofagus kanserinde azalan mir-625-5p ekspresyonunun kötü prognozla korele olduğu bildirilmiş (164). Xie Z ve arkadaşlarının özofagus kanseri üzerine yayımladıkları çalışmada ise miR-625-5p ekspresyonundaki azalmanın, proliferasyonun ve invazyonun indüklenmesinde etkin olduğu gösterilmiştir (121). Yang J ve arkadaşlarının 2013 yılında yayımladıkları yayınlarında, mir-625-5p ekspresyondaki azalmanın kolorektal kanserde kötü prognozu ve metastazı işaret ettiği savunulmuştur (165). Bu çalışmada, HCT-116 KRK hücrelerinde miR-625-5p ekspresyonunda azalma saptanmış olup, gen ontoloji analizinde anjiyogenez sürecinde ilişkili olabileceği görülmüştür. Ancak, gen ontoloji analizindeki anjiyogenez sürecindeki görülen ve hedefi olan AKT-1 ve GPX-1'in ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler saptanmamıştır.

5.8.1.2. Apoptozun Negatif Düzenlenmesi (GO:0043066)

Gen ontoloji analizindeki biyolojik süreçler içinden apoptozun negatif olarak düzenlenmesi süreci (GO:0043066) anlamlı olarak karşımıza çıkmaktadır (p değeri 0.00004). Anlamlı ekspresyon değişimi gözlenen mRNA ve miRNA'ların, apoptozun negatif düzenlenmesi sürecinde yer alan 9 geni göstermesi sonucu bu süreç anlamlı saptanmıştır. Apoptozun negatif düzenlenmesi sürecinin anlamlı çıkmasında etkili olan 9 gen şunlardır: Anjiyopoyetin-benzeri-4 (Angiopoietin-like-4, Angptl4), glutamat-sistein ligaz, katalitik alt birimi (Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC), ısı şok protein ailesi- A üye 1B (Heat shock protein family A (Hsp70) member 1B, HSPA1B), trombospondin-1 (Thrombospondin-1, TSP-1), östrojen reseptör-2 (Estrogen receptor 2, ER-beta veya ESR2), tümör protein 53 (TP53 tumor protein p53, TP53), v-akt mürin timoma viral onkogen homolog 1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, AKT1), epidermal büyüme faktör reseptörü (epidermal growth factor receptor, EGFR) ve glutatyon peroksidaz-1 (glutathione peroxidase 1, GPX1). ESR2, TP53, AKT1, EGFR ve GPX1 genleri; anlamlı ekspresyon değişimi saptanan miR-181d-5p, miR-324-3p, miR-331-3p, miR-375, miR-501-3p ve miR-625-5p mikro-RNA'larının hedefleri olarak karşımıza

çıkılmaktadır. Ancak mikro-RNA'ların hedef genlerinden ESR2, TP53, AKT1, EGFR ve GPX1 istatistiksel olarak anlamlı gen listesi içinde bulunmamaktadır.

Apoptozun negatif düzenlenmesi süreci, apoptozun ve hücre ölümünü durduran, önleyen veya hızını azaltan biyolojik süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. Teorik olarak veri setimizin, anti-apoptotik süreç ile apoptozun negatif düzenlenmesi sürecini etkileme olasılığı olan genler aynıdır. Anti apoptotik süreçte bulunan 6 gen, apoptozun negatif düzenlenmesi sürecinde de bulunmaktadır. Apoptozun negatif düzenlenmesi sürecinde ANGPTL4, miR-324-3p'nin hedefi olan ve süreçte yer alan TP53 ve miR-375'in hedeflerinden biri olup yine bu süreçte yer alan EGFR ek olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak her iki süreç aynı genleri içerip aynı biyolojik işleve sahip olduğu için yoru birlikte yapılacaktır.

ANGPTL4'nin artan ekspresyonu tümör oluşumunu, invazyonu, anjiyogenezi, anoikise direnci ve metastazı artırır. Ancak bunun yanı sıra melanoma, prostat ve hepatoselüler kanserlerde metastazı inhibe ettiği yönünde yayınların mevcut oluşu da ANGPTL4'ün rolü hakkında soru işaretleri oluşturmaktadır (166- 168). ANGPTL4'ün KRK üzerinde metastazı indükleyip, apoptozu inhibe ettiği yönünde yayınlarda mevcuttur (146). Bizim çalışmamızda HCT-116 KRK hücrelerinde sürekli sıvı akışı ve bundan kaynaklanan sıvı basıncına maruz kalma doğrultusunda ANGPTL4 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Yapılan gen ontoloji analizleri doğrultusunda, bu artışın apoptozun negatif regülasyonu süreçlerinde ilişkili olabileceği bulunmuştur.

Glutamat-sistein ligaz, katalitik alt birimi (Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC), glutatyon sentezindeki ilk hız sınırlandırıcı basamak olarak karşımıza çıkmaktadır. GCLC ve glutatyondaki artış, kanserde ilaç direnci ve anti-apoptotik süreç ile ilişkilendirilmektedir. Glutatyon reaktif oksijen türleri ile proteinlerin ve DNA'nın hasar görmesini engelleyerek veya DNA'nın onarım sürecine katılarak, dirençte ve apoptozda etkin hale gelir (169). Over kanseri ve prostat kanserinde artan GCLC ekspresyonu, anti-apoptotik süreçlerle ilişkilendirilmiştir (170-172). Ancak Hyun JW ve arkadaşlarının 2015'te KRK hücre hatları ve tümör dokuları üzerinde yaptıkları çalışmada, GCLC'nin ve glutatyonun KRK'deki sentezlerinin yüksek olduğuna verileri yayınlanmış olsa da, bu artışın ilaç direnci ve apoptozdaki etkisi hakkında yayınlanmış bilgi mevcut değildir (173). Bizim çalışmamızda HCT-116 hücre

hatlarında, GCLC ekspresyonunda artış saptanmıştır. Bu artıştan dolayı apoptoik süreçlerle birlikte ilaç direnci proseslerinde de artış olabileceği düşünülmektedir.

Isı şok protein ailesi- A üye 1B (Heat shock protein family A (Hsp70) member 1B, HSPA1B), en çok çalışılmış olan Hsp70 ailesindendir. Hsp'ler, glukoz metabolizması, protein katlanması gibi farklı süreçlerde rolü olan bir protein ailesidir. Hücrelerde ani sıcaklık değişiklikleri, anoksi, reaktif oksijen metabolitleri ve glukoz düzeylerindeki değişiklikler gibi çevresel faktörlerde olabilecek değişiklikler sonucu ekspresyon durumları artar. Artan HSPA1B ekspresyonu, HCT-116'nın da dahil olduğu çeşitli hücre hatlarında (meme, prostat) p53'ün aktiflenip stabilize edilmesi üzerinden hücre senesensin baskılanmasında etkin bulunmuştur (174). Yine meme kanseri hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada, HSPA1B ekspresyonunun hücre proliferasyonunu arttırdığı yönünde bilgiler sunulmuştur (175). Prostat kanserinde ise HSPA1B ekspresyonunun ilaç direncini arttırdığı gözlemlenmiştir (176). Mesane kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada, HSPA1B inhibisyonunun Bortezomib-aracılı hücre ölümünü güçlendirdiği verisi üzerinden HSPA1B ekspresyonunun hücre ölümünü baskıladığı sonucuna varılmıştır. T-hücreli lösemi hücre hattında yapılan bir çalışma da ise, HSPA1B ekspresyonunun Fas-ligand aracılı apoptozu inhibe ettiği ancak aynı çalışmada SW-48 isimli KKR hücre hattında, ekspresyonun apoptozu inhibe etmediği gözlenmiştir (177). Buradan yola çıkılarak KKR'de HSPA1B ekspresyonu artışı- apoptozun baskılanması ilişkisinin literatürdeki gibi olmadığı veya başka mekanizmalar üzerinden yürüdüğü varsayımı yapılabilir (178). SW-48 isimli KKR kanser hücre hattında HSPA1B ekspresyonu ile apoptoz ilişkisinin diğer kanserlerde gibi olmaması bizim çalışmamızdaki HSPA1B ekspresyonun sürekli sıvı akışına ve basıncına maruz kalan HCT-116 KKR hücrelerinde azalması ile anti-apoptotik süreç ilişkisini açıklamasa da, KKR kanserlerde HSP aracılı ilaç direnci ve apoptoz süreçlerinin farklı olabilme ihtimali çerçevesinde ek çalışmalar yapılabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır.

THBS-1, ilk ve en çok çalışılan anjiyogenez inhibitörüdür. Diğer anjiyogenez inhibitörlerinde olduğu gibi, anjiyogenezin bloklanabilmesi için hücrede THBS-1 tarafından apoptotik bir süreç başlatılır (179, 180). THBS-1 ve reseptörünün, RAS protein eksprese eden kanser hücrelerinde otofaji üzerinden hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (181). Bu çalışmada HCT-116 hücre hattıyla yapılan gen ontoloji analizleri ile, THBS-1'in ekspresyonundaki azalmanın anjiyogenik süreçte etkisi olabileceğinin yanı sıra anti-apoptotik ve

apoptosun neatif düzenlenmsei süreçlerinde de etkili olabileceği gözlenmektedir. HCT-116 hücrelerinin *KRAS* proteinindeki mutasyon ile artan RAS ekspresyonu sonucu, THBS-1'in otofaji üzerinden hücre ölümünü indüklediği de düşünülebilir.

miR-181d-5p'nin gliomada, *KRAS* ve Bcl-2 ailesi üzerinden apoptozu indükleyerek tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı gösterilmiştir (112). Meme kanseri üzerinde yapılan çalışmada da, miR-181d-5p'nin pre-apoptotik ve pro-apoptotik proteinleri hedefleyerek apoptozu etkilediği belirtilmiştir (182). HCT-116 hücre hattından alınan miRNA ve mRNAekspresyon verileri üzerinden yapılan gen ontoloji analizinde, miR-181d-5p'nin hedeflerinden olan ESR2 anti-apoptotik ve apoptozun negative düzenlenmesi süreçlerinde yer alan genler arasındadır. Ancak ESR2, HCT-116 hücre hattında anlamlı ekspresyon farklılığı saptanmış genler arasında bulunmamaktadır. *KRAS* mutant HCT-116 hücre hattında, *KRAS* ile miR-181D-5p ekspresyonlarındaki değişimlerin birlikte apoptotik bir etki oluşturması söz konusu olabilir. Ancak sürekli sıvı akışı ve bununla ilişkili olarak artan sıvı basıncı durumunda, miR-181d-5p'nin ekspresyonunda azalma ile anti-apoptotik br süreç oluşabilir.

Nazofaringeal kanser olgularında miR-324-3'te ekspresyon artışının gözlemlendiği durumlarda hücre büyümesinin ve apoptozisin module edildiği gözlemlenmiştir (183). Fare adrenal bez hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada da, miR-324-3p artışının, kaspaz-3 üzerinden apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (184). Kanserli ve kanserli olmayan çeşitli dokularda artışının apoptozu module ettiği yönünde bilgiler, miR-324-3p artışının apoptozda rolü olduğunu güçlendirmektedir. HCT-116 KRK hücreleri üzerinde yaptığımız çalışmada, sürekli sıvı akışı ve sıvı basıncına maruz kalan hücrelerde, miR-324-3p azaldığı gözlenmektedir. Burada vucüt içinde bulunan kanser hücrelerinin artan interstisyel sıvı doğrultusunda apoptozun azalması olasılığı açığa çıkmaktadır. miR-324-3p'nin hedeflerinden TP53'ün apoptozun negatif düzenlenmesi sürecindeki genler arasında olması, miR-324-3p'nin bu yönde etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Ancak TP53, anlamlı ekspresyonu saptanan genler arasında değildir.

miR-331-3p artışında kanser hücresinde hücre döngüsünün ilerleyememesi, proliferasyonda azalma, anti-apoptotik süreçlerde azalma, anjiyogenezde azalma gözlenebilir. Zheng X ve arkadaşlarının KRK hücreleri ve dokuları üzerinde yaptıkları çalışmada miR-331-3p ekspresyonunun proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği raporlanmış (155). Zheng X ve arkadaşlarının, KRK üzerinde yürüttüğü çalışmada HER2'nin hedeflenmesi sonucu PI3K/Akt

ve ERK1/2 yolları üzerinden miR-331-3p'nin proliferasyonu inhibe ederek, apoptozu indüklediği görülmüştür (155). Bu çalışmada, sürekli sıvı akışı altında, sıvı basıncına maruz kalan HCT-116 kanser hücrelerinde miR-331-3p'nin ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Gen ontoloji analizlerinde bu azalmanın AKT-1 üzerinden anti-apoptotik (veya apoptozun düzenlenmesinde negatif bir etki) bir etkiye sahip olabileceği görülmüştür. Anlamlı ekspresyonu gözlenen genler arasında AKT-1 bulunmasa da değişimlerin hepsinin birlikte anti-apoptotik bir etki oluşturabileceği söz konusudur.

miR-375, bazı kanserlerin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Prostat kanseri, larinks kanserlerindeki miR-375 artışının hücre proliferasyonunu inhibe ettiği raporlanmıştır. Hücre proliferasyonundaki azalmayla birlikte apoptozunda indüklendiği gözlemlenmiştir (185, 186). HCT-116 KKK hücrelerinde yapılan bir çalışmada, miR-375 artışının apoptozu indüklendiği raporlanmış (187). Bizim çalışmamızda da, sürekli sıvı akışının ve sıvı basıncına maruz kalan HCT-116 hücrelerinde miR-375'te azalma saptanmıştır. Bu sonuçtan vücut içerisinde özellikle kanser kitlesi etrafında artan sıvı akışının ve bununla ilişkili olan artan sıvı basıncının, kanser hücrelerinde apoptozun azalması yönünde etki ettiği düşünülebilir.

miR-501-3p ile ilgili olarak literatürdeki kaynak sayısı yok denecek kadar azdır. Jiang N ve arkadaşlarının 2015 yılında hepatoselüler karsinoma üzerinde yaptıkları çalışmada, artan miR-501-3p ekspresyonunun siklin D'yi etkileyerek hücre proliferasyonunu arttırdığı raporlanmış (162). miR-501-3p'nin kanserlerdeki genel durumu ve ilişkili olduğu yollarla ilgili veri de bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda, HCT-116 KKK hücre hattında ekspresyonun azaldığı görüldü ve gen ontoloji analizleri sonucu bu ekspresyon azalmasının, AKT-1 üzerinden anti-apoptotik süreçte etkili olabileceği sonucu görüldü.

Mide kanserinde miRNA-625'deki ekspresyon artışının, ILK'yi hedefleyerek invazyon ve metastazı indüklediği gözlemlenmiştir (188). Özofagus kanserinde ise ekspresyondaki azalmanın Sox-2'yi hedefleyerek proliferasyon ve invazyonu indüklediği gözlemlenmiştir (121). Mide kanseri ve özofagus kanseri her ne kadar gastrointestinal sistem tümörlerinden olsalarda miRNA ekspresyon paternleri ve açısından değişiklik gözlenmektedir. HCT-116 KKK hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada ise ektopik mir-625-5p ekspresyonunun invazyon ve metastazı inhibe ettiği raporlanmıştı (122). KKK hastaları üzerinde yapılan başka bir çalışmada da mir-625 ekspresyonunun metastazla ilişkili olarak kötü prognostik faktör olduğu sunulmuştur (189).

KRK hücre hatları ile hasta örnekleri arasında bile ekspresyon durumları ve biyolojik fonksiyonları açısından mir-625-5p farklılık göstermektedir. Bizim çalışmamızda ise, HCT-116 hücre hattından alınan miRNA ve mRNA ekspresyon verileri eşliğinde yapılan gen ontoloji analizi ile miR-625-5p ekspresyonundaki azalmasının apoptozun negatif düzenlenmesi yani anti-apoptotik süreçle ilişkili olabileceği yargısına varılmıştır.

5.8.1.3. Apoptozun Düzenlenmesi Süreci (GO:0042981)

Gen ontoloji analizindeki biyolojik süreçler içinden apoptozun düzenlenmesi süreci (GO:0042981) anlamlı olarak karşımıza çıkmaktadır (p değeri 0.004). Anlamlı ekspresyon değişimi gözlenen mRNA ve miRNA'ların, apoptozun düzenlenmesi sürecinde yer alan 12 geni göstermesi sonucu bu süreç anlamlı saptanmıştır. Bu sürecin anlamlı çıkmasında etkili olan 12 gen şunlardır: Anjiyopöietin-benzeri- 4 (Angiopoietin-like-4, Angptl4), glutamat-sistein ligaz, katalitik alt birimi (Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC), nükleer reseptör ailesi 4, grup A üye 1 (nuclear receptor subfamily 4 group A member 1, NR4A1), ısı şok protein ailesi- A üye 1B (Heat shock protein family A (Hsp70) member 1B, HSPA1B), trombospödin-1 (Thrombospödin-1, TSP-1), östrojen reseptör-2 (Estrogen receptor 2, ER-beta veya ESR2), interferon gama (IFNG), tümör protein 53 (TP53 tumor protein p53, TP53), v-akt mürin timoma viral onkogen homolog 1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, AKT1), epidermal büyüme faktör reseptörü (epidermal growth factor receptor, EGFR), runt- bağımlı transkripsiyon faktör 3 (Runt-related transcription factor 3, RUNX3) ve glutatyon peroksidaz- 1 (glutathione peroxidase 1, GPX1). ESR2, IFNG, TP53, AKT1, EGFR, RUNX3, ve GPX1 genleri; anlamlı ekspresyon değişimi saptanan miR-181d-5p, miR-324-3p, miR-331-3p, miR-375, miR-501-3p ve miR-625-5p mikro-RNA'larının hedefleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak mikro-RNA'ların hedef genlerinden ESR2, IFNG, TP53, AKT1, EGFR, RUNX3 ve GPX1 istatistiksel olarak anlamlı gen listesi içinde bulunmamaktadır.

Apoptozun regülasyonu-düzenlenmesi sürecinde apoptoz hücrenin ölümünün engellenmesi açısından negatif olarak da düzenlenebilir, ya da ölümün artması yönünde pozitif olarak da düzenlenebilir. Yapılan GO analizleri sonucu anti-apoptotik ve apoptozun negatif düzenlenmesi süreçlerinin öne çıkmasından sonra, apoptozun düzenlenmesi sürecinde apoptozun negatif yönünde düzenlenmesi beklenir bir sonuç olacaktır. Apoptozun düzenlenmesi sürecinde etkili

olan genlere bakıldığında, apoptozun negatif düzenlenmesi sürecindeki genlerle hemen hemen aynıdır. Aralarındaki farklar, NR4A1, IFNG (miR-181d-5p'in hedefi) ve RUNX3 (miR-625-5p'in hedefi) genlerinin apoptozun düzenlenmesi basmağında ek olarak gözlenmesidir.

NR4A1, sinyalin iletilmesi, transkripsiyonel düzenlenme, hücre büyümesinin düzenlenmesi, apoptozun indüksiyonu ve hücre büyümesinin kontrolü gibi çeşitli moleküler süreçlerde görevlidir (190). NR4A1, hücre sağkalımının ve apoptozun yönetildiği çeşitli yollarda yer alır (191). NR4A1, anti-apoptotik Bcl-2'yi pro-apoptotik şekle dönüştürür ve kendisi de nukleustan mitokondri membranına transfer olur. Burada Bcl-2 ile etkileşime girerek apoptozu indükler. NR4A1'in B-hücreli lenfomada apoptozu indüklediği bildirilmiştir (192). PC-3 prostat kanseri hücrelerinde, NR4A1 ekspresyon azalmasının, apoptozun azalmasıyla birlikte dosetaksel direnci gelişiminde etkin olduğu raporlanmıştır (193). Sürekli sıvı akışı ve bununla ilişkili olarak sıvı basıncına maruz kalan HCT-116 KKK hücrelerinde, NR4A1 geninin ekspresyonunda anlamlı olarak azalma karşımıza çıkmaktadır. Bu durum, KKK hücrelerinde apoptozun negatif yönde düzenlenmesi ile hücre ölümünün azalması şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

KKK hasta dokuları üzerinde yapılan bir çalışmada, tümör baskılayıcı protein olan mitokondriyal tümör baskılayıcı-1 (mitochondrial tumor suppressor 1, MTUS1) ekspresyonun artmış olduğu örneklerde miR-181d-5p'de de artan bir ekspresyon profili gözlenmiş (194). MTUS1'in ATIP ile birlikte apoptotik etki gösterdiği bilinmektedir (195). Aktarılan literatür eşliğinde, miR-181d-5p'nin ekspresyonunun azaldığı durumda anti-apoptotik etkisinin olabileceği yönünde yorum yapılabilir. Sürekli sıvı akımına ve buna bağlı olarak gelişen sıvı basıncına maruz kalan HCT-116 KKK hücre hattından alınan verilerde mir-181d-5p'de anlamlı azalma gözlenmiş. Yapılan gen ontoloji analizlerinde miR-181d-5p'nin hedeflerinden biri olan IFNG'nin apoptozun düzenlenmesi sürecinde yer almasından ötürü bu süreçte etkili olabileceği yargısına varılabilir. Ancak, IFNG'de anlamlı ekspresyonun saptanmamasından dolayı, miR-181d-5p'nin hedefi olan IFNG ile birlikte sürekli sıvı akışının oluşturduğu dinamizmde etkili olmadığı söylenilebilir.

miR-625'in kanserle ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin KKK hastalarında, miR-625'in azalan ekspresyon düzeyleri, tümör metastazı ve kötü prognoz le ilişkilendirilmiştir (122). Mide kanserinde ise ILK üzerinden invazyon ve metastazın baskılandığı

gösterilmiştir (188). Özofagus kanseri dokuları ve hücre hattı üzerinde yapılan çalışmada, miR-625 ekspresyonundaki azalmanın tümörde proliferasyonu arttırdığının gözlemlenmesinin ardından yapılan apoptoz deneyin, miR-625 azalmasının apoptozu inhibe etmediği gözlemlenmiş (121). HCT-116 KRK hücre hattında miR-625-5p’de azalma olduğu görüldü. Yapılan gen ontoloji analizleri sonucu apoptozun düzenlenmesi sürecinde yer alan genlerden, miR-625-5p’nin, hedefi olan RUNX3’ün bulunması, miR-625-5p’nin RUNX3 üzerinden apoptozun düzenlenmesinde rol alabileceğini düşündürüyor. Ancak elde edilen mRNA ekspresyon verilerinde, RUNX3’de anlamlı bir ekspresyon değişiminin gözlemlenmemesi, bu yargıyı zayıflatmaktadır.

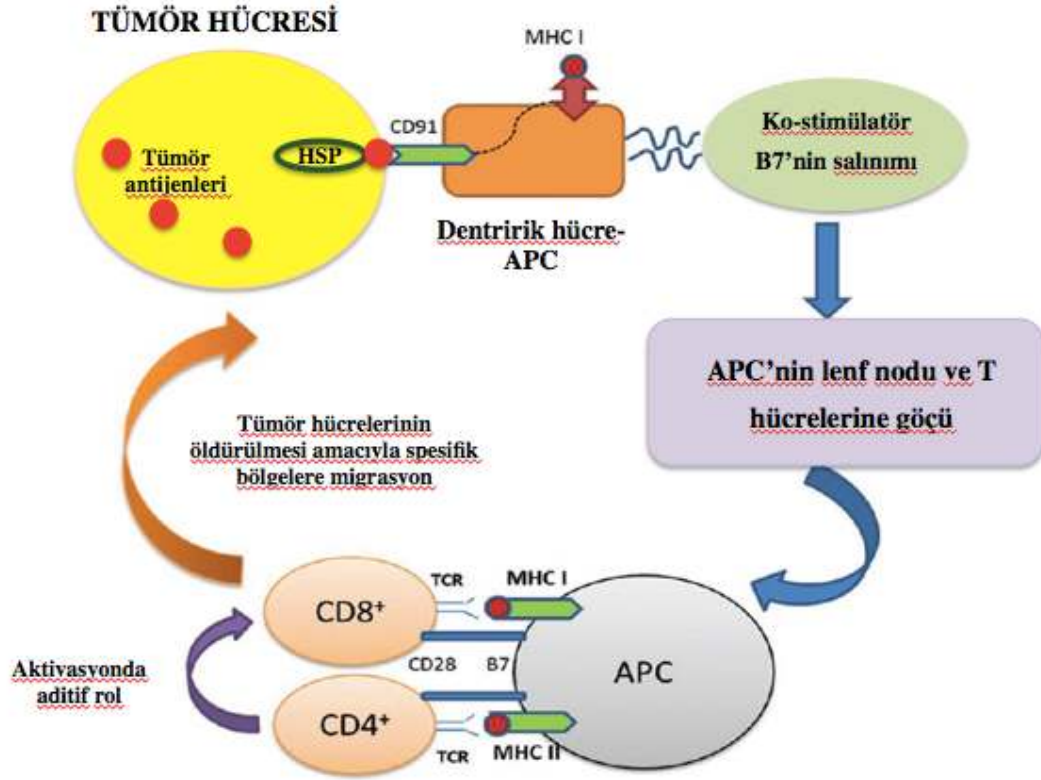
5.8.1.4. Antijen İşlenmesi ve Sunumu Yolağı (KEGG Pathway hsa04612)

Elde edilen miRNA ve mRNA verileri eşliğinde yapılan KEGG yolak analizinde, antijen işlenmesi ve sunumu yolağı (hsa04612) anlamlı olarak karşımıza çıkmaktadır (p değeri 0.0007). Anlamlı ekspresyon değişimi gözlenen mRNA ve miRNA’ların, antijen işlenmesi ve sunumu sürecinde yer alan 6 geni göstermesi sonucu bu süreç anlamlı saptanmıştır. Bu sürecin anlamlı çıkmasında etkili olan 6 gen şunlardır: ısı şok protein ailesi- A üye 1B (Heat shock protein family A (Hsp70) member 1B, HSPA1B), katil hücre lektin benzeri reseptör C4 (killer cell lectin like receptor C4, KLRC4), majör histokompatibilite kompleks, sınıf 1, B (major histocompatibility complex, class I, B; HLA-B), majör histokompatibilite kompleks, sınıf 1, C (major histocompatibility complex, class I, C; HLA-C), ısı şok protein 90kDa alfa ailesi, sınıf B üye 1 (heat shock protein 90kDa alpha family class B member 1, HSP90AB1), katil hücre lektin benzeri reseptör D1 (killer cell lectin like receptor D1, KLRD1). HLA-B, HLA-C, HSP90AB1 ve KLRD1 genleri; anlamlı ekspresyon değişimi saptanan miR-181d-5p ve miR-324-3p mikro-RNA’larının hedefleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak mikro-RNA’ların hedef genleri istatistiksel olarak anlamlı gen listesi içinde bulunmamaktadır.

Isı şok proteinleri (Heat shock proteins- HSP), yüksek düzeyde korunmuş ve hasarlı proteinlerin yeniden katlanmasında veya birikiminin önlenmesinde hücresel homeostazın düzenlenmesinde önemli role sahip proteinlerdir. Isı şok proteinleri, HSP40, HSP70, HSP90, şaperoninler ve küçük HSP’ler olacak şekilde beş temel gruba sahip olan geniş bir protein ailesini oluşturmaktadırlar. En çok bilinen HSP’lerden biri olan HSP70’de sadece hücresel homeostazın

devamında değil aynı zamanda da proinflatuar sitokinlerin, antijen işlenmesi ve sunulmasının artışında görevlidir. HSP70 ailesinin hücre içindeki yerleşimi ve ekspresyon paternlerine bağlı olarak en az 8 olacak şekilde çeşitli homolog üyeleri mevcuttur. HSPA1A (HSP72 veya HSP70-1a) ve HSPA1B (HSP72 veya HSP70-1b) aynı intronsuz genler tarafından sentezlenen, ve genellikle stres altında olmayan hücrelerde ve dokularda oldukça az miktarda sentezlenen ve çeşitli fiziksel ve kimyasal stresleri tetikleyen HSP'lerdir (195). MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, HSP70 ailesinin proliferasyonu arttırıcı yönde çalıştıkları saptanmış ve bu nedenle iyi bir terapötik hedef olabileceği üzerinde durulmuş (175). Yine kanser hücrelerinde HSP70'in apoptozu ve onkogen ile indüklenen senesensi inhibe ettiği tanımlanmış (196). HSP70'in kanser açısından proliferasyonu arttırıcı ve apoptozu inhibe edici yönde etkilerinin olmasına rağmen; tümör immünolojisi açısından oldukça önemli olan antijen işlenmesi ve sunumu basamaklarında da etkin rol oynamaktadırlar (197).

Aşağıdaki şekilden de anlaşılacağı gibi antijen sunumu süreci için öncelikle tümör hücrelerinin immün sistem hücreleri (makrofajlar, dendritik hücreler) ile karşılaşmaları ile başlamaktadır. İmmün sistem hücrelerinin, tümörden sunulan antijenle etkileşime geçebilmesi için HSP'lerin etkin olması gereklidir. İmmün sistem hücreleri yabancı antijen/hücreyi yutarlar ve olgunlaşma fazına girerler. Böylece hareket kabiliyetleri artar ve asıl görevleri T hücrelerine antijen sunmak olan profesyonel 'antijen sunan hücreler'e (ASH ya da APC, önde gelen tipleri dendritik hücreler) dönüşürler. Hücre içinde proteolitik yolla parçalanan antijenler endoplazmik retikulumda sentezlenen MHC'ler ile MHC-peptid kompleksini oluştururlar. Lenf noduna giden antijen sunan hücrelerin yüzeyinden, MHC-peptid kompleksi CD4-pozitif T-hücrelerine sunulur. T-hücreleri antijenleri sadece Antijen sunumu aşaması T hücre aktivitesi için elzemdir, çünkü T hücrelerinin büyük bir kısmı protein yapıdaki antijenleri yalnız APC'ler tarafından MHC molekülleri aracılığıyla sunulduğunda tanıyabilirler (MHC kısıtlılığı). T hücrelerde klonal çoğalma başlar ve antijene özgü klonal CD4+ (Thelper 1, Th1) ve CD8+ (sitotoksik T hücre, CTL) hücreler oluşur (Şekil 59) (197).



Şekil 59. Tümör immünolojisinde ısı şok proteinlerinin (HSP) rolü (Kaynak-197'den modifiye edilmiştir.)

HSP'ler tümör tarafından antijenlerin, immün sistem hücrelerine sunulmasında etkin rol oynarlar. HSP'ler tümör antijenlerine bağlanarak bunların antijen sunan immün sistem hücreleri tarafından alınmasını sağlarlar. Bu noktada HSP70 miktarındaki eksiklik ya da yok olması durumunda, tümör antijenleri immün sistem hücreleri tarafından alınamayacağı için antijen işlenmesi ve sunumu süreci ilk basamaktan sekteye uğrayabilir. Tümör antijeninin sunumundaki azalmanın, antijen işlenmesi sürecini olumsuz olarak etkileyeceği bilinmektedir. Bu açıdan HSPA1B'in ekspresyonundaki azalmanın ve onunla ilişkili olarak azalan antijen işlenmesi, sunumu sürecine bağlı olarak tümöre karşı oluşturulabilecek potansiyel immün sistem yanıtında azalmalar olabilir. Bu da tümörün immün sistemden kaçısına yardımcı olabilirken, apoptozun negatif düzenlenmesi süreçleriyle ilişkili olarak tümör hücresine dolaylı bir sağkalım avantajı sağlayabilir.

ECM bileşenleri ve dokular arası sıvı akışı gibi ortamın fiziksel yapısını belirleyen parametreler, nedeniyle immün sistem hücreleri ile tümör hücrelerinin hareketlerinde kısıtlılıklar olabilmektedir. Bu da tümörün antijen sunumunu aksatmaktadır. Yukarıdaki gibi sürekli sıvı akışının HSPA1B ekspresyon paternleri üzerinden veya hücre hareketindeki kısıtlamalar üzerinden tümör antijen işlenişi ve sunumu süreçlerinde tümörün sağkalımı açısından avantaj haline gelebilecek değişiklikler oluşturabilmektedir (198).

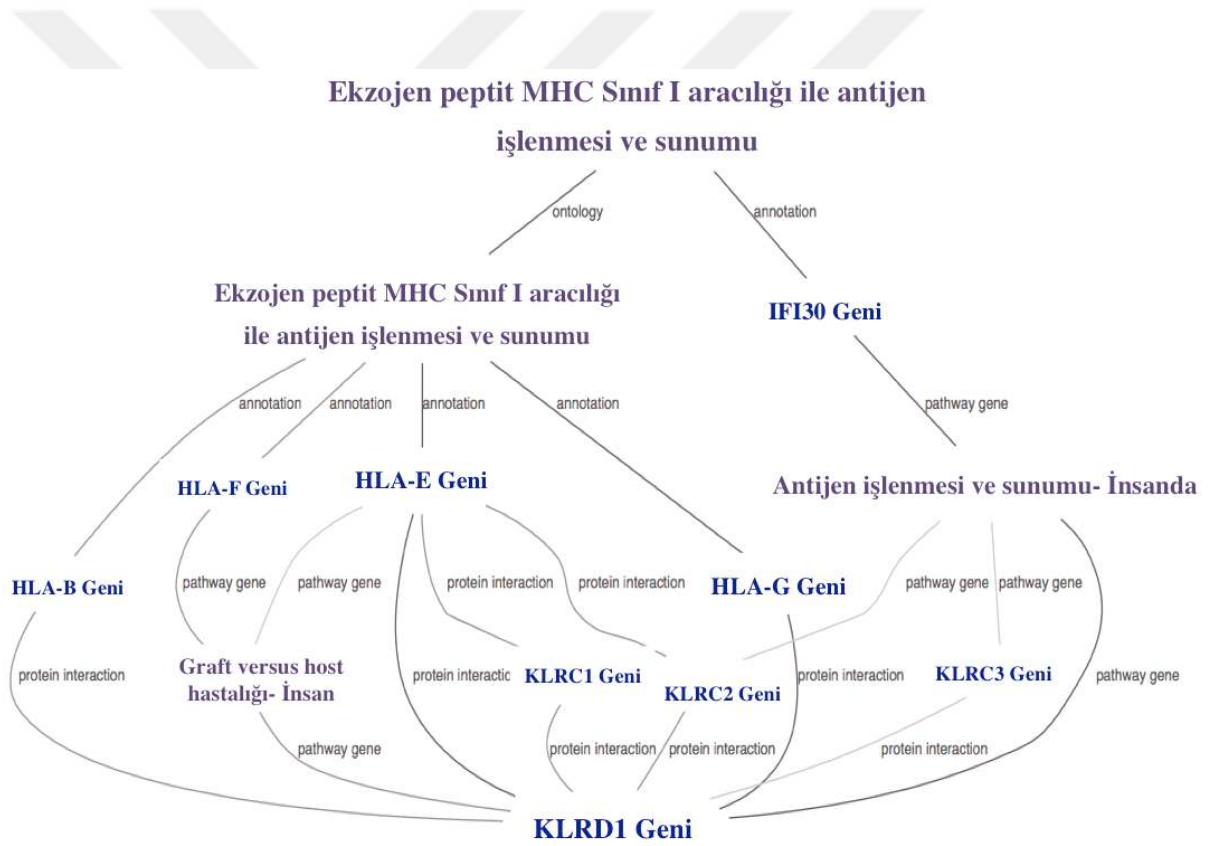
Doğal katil hücreler (Natural killer cells, NK), lenfosit olup herhangi bir aktivasyona gerek olmaksızın tümör hücrelerinin ve virüs tarafından enfekte edilmiş hücrelerin lizis edilmesini sağlar. Hücre aracılı spesifik immüniteyi düzenlerler. NK hücreleri, NK fonksiyonunun düzenlenmesinde etkin olan kalsiyum-bağımlı lektinleri salgılar. KLRC4, öncelikli olarak NK hücrelerinde sentezlenen ve hedef hücrenin tanınmasında, NK'ların aktivasyonunda ve inhibisyonunda etkin olan NKG2 reseptör ailesine ait bir transmembran reseptör proteindir.

HSP90 proteinleri, HSP ailesinin bir diğer grubunu oluşturmaktadırlar ve HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1 ve TRAP1 (TNF reseptör ilişkili protein 1) olacak şekilde 4 alt grubu bulunmaktadır. HSP90AA1, HSP90AB1 sitoplazma; HSP90B1 endoplazmik retikulum ve TRAP1 ise mitokondride bulunmaktadır. Kanser hücrelerinde HSP90AB1 ekspresyonunda artış ile, sağkalım ve proliferasyonda artış gözlenmiştir. Bu nedenle HSP90AB1 potansiyel terapötik hedef olarak görülmektedir. HSP90AA1-knockout farede, antijen sunumunun ilk adımı olan tümör hücresindeki antijen ile dentrik hücrenin buluşmasında azalma olduğu gösterilmiştir. Ancak antijen sunumunun HSP90AA1 aracılığı ile değil de, HSP90AB1'den ötürü olduğu üzerinde durulmuş (200).

HSP90AB1'in miRNA hedeflerinden biri olan miR-181d-5p'in ekspresyonu çalışmamızda azalmıştır. Ancak HSP90AB1'in ekspresyonunda değişiklik saptanmamıştır. Yine gerçekleştirilen biyoinformatik analizlerde, miR-181d-5p'nin hedeflerinden olan HLA-B ve HLA-C'nin antijen işlenmesi ve sunumunda yer almasından ötürü, antijen sunumunda miR-181d-5p üzerinden değişiklik olabileceği görülmüştür. Ancak sürekli sıvı akışına maruz kalan HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde HLA-B ve HLA-C'de anlamlı ekspresyon değişikliği saptanmamıştır.

HCT-116 hücre hattının, sürekli laminar sıvı akışına maruz kalması ardından gerçekleştirilen mRNA ve miRNA ekspresyon analizleri sonucu, miR-324-3p'de anlamlı bir azalma görülmüştür. Yapılan gen ontoloji analizleriyle, antijen işlenmesi ve sunumu yolağında

değişiklik olabileceği yorumlanmıştır. miR-324-3p'nin hedeflerinden KLRD1 bu yolak üzerinde görevi olan bir protein olmasından dolayı süreçte ismi geçmektedir. KLRD1, CD94 tarafından kodlanan ve doğal katil hücrelerin yüzeyinde bulunan hücre bağışıklığında ve sinyalizasyonunda görev alan bir reseptör proteindir. Doğal katil hücrelerin membranındaki KLRD1 ile NKG2 molekülü heterodimer yaptığı zaman İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen, HLA-E) ile etkileşime girer ve antijen sunumunu ilişkilendiren hücresel bağışıklığın basamakları başlar (201). KLRD1'in bu şekilde başta HLA-E olmak üzere, HLA'lar ile iletişimi sonucu antijen işlenmesi ve sunumunda rol oynar (Şekil 61) (202).



Şekil 60. Antijen işlenmesi ve sunumu ile KLRD1 geni arasındaki ilişki (Kaynak-202'den modifiye edilmiştir.)

Ancak KLRD1'in ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Mir-324-3p'deki değişikliğin, miR-324-3p'nin başka hedefleri üzerinden antijen işlenmesi ve sunumunda etki olabileceği de düşünülmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

KRK tümörün yerleşim gösterdiği kolorektal anatomisi, oluşan asidik akımlar ve tümörün kendi mikroçevresinde artan interstisyel sıvı akımı sebeplerinden dolayı oldukça dinamik bir fiziksel mikroçevre oluşmaktadır. KRK’de mikroçevrenin fiziksel dinamizminin EMT ile ilişkili metastaza olan etkisi bilinmemektedir. KRK hücre hatlarıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, vücudun doğası gereği sonsuz olan ve kanser hücresine agresif karakter kazandıran interstisyel sıvı akımının ve bu sıvı akışının oluşturduğu sıvı geriliminin (shear stress) indüklediği EMT sürecinde etkin olan mRNA ve mikro-RNA profillerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

İmmünohistokimyasal boyanmadaki değişimlere bakıldığında, dinamik kültürde sürekli sıvı akışına ve sıvı gerilimine- shear stress maruz kalan HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde, statik kültürde çoğalan hücrelere göre E-kaderin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma; N-kaderin ve vimentin ekspresyonlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p-değeri $\leq 0,05$). Bu değişim paternleri, bize mikrofluidik sıvı akışının HCT-116 ve HT-29 hücrelerine EMT benzeri fenotip kazandırdığını göstermektedir.

EMT-benzeri fenotip kazanan KRK hücrelerindeki miRNA değişimlerine bakıldığında; HCT-116 hücre hattı ile yapılan deneylerde, 12 miRNA’da istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlemlendi. Bunlardan 2’sinde ekspresyon artışı (miR-320e, miR-4419a), 10’unda ise ekspresyon azalışı (miR-1255a, miR-331-3p, miR-10b-5p, miR-181d-5p, miR-501-3p, miR-192-5p, miR-10a-5p, miR-375, miR-625-5p, miR-324-3p) gözlemlendi. Anlamlı olarak saptanan miRNA değişikliklerinin, literatür verileri eşliğinde değerlendirilmesi sonucu, miR-320e, miR-181d, miR-192, miR-375, miR-625, miR-324’teki değişimlerinin invazyon, metastaz ve EMT ile ilişkileri olduğu gözlemlendi (102, 112, 113, 117, 120, 123). Bu durum tümör mikroçevresindeki fiziksel sıvı akış paternlerindeki değişimlerin ve bu sıvı akışı ile oluşan sıvı geriliminin hücreye EMT açısından avantaj kazandırdığını göstermektedir. Ancak her bir miRNA’nın çok çeşitli hedefleri ve fonksiyonları olduğu için, her bir miRNA’ya yönelik olan deney planları deneyler sürdürülmelidir.

İnvazyon ve metastaz süreçlerindeki rolü açısından iyi tanımlanmış bir belirteç olan miR-10b’nin KRK’in primer tümörlerinde arttığı, karaciğer metastazlarında da azaldığı gösterilmiştir (108). Tümörün primer ya da metastaz olmasına göre değişim paterni sergilediği gösterilen miR-10b’nin, sıvı akışı ile indüklenen EMT-benzeri fenotipin indüklendiği KRK hücrelerinde

azalması literatürü desteklemektedir. Ayrıca literatürde damar dolaşımdaki tümör hücrelerinde miR-10b ekspresyonu açısından heterojenlik saptanmıştır (109). Fiziksel çevre koşullarının gen ve protein ifadelerine etki ettiği göz önünde bulundurulursa, miR-10b gibi birçok protein ekspresyonu için geçerli olan heterojenitenin temel sebeplerinden biri kanser hücresinin sürekli sıvı akışına ve sıvı gerilimine artan maruziyeti olabilir. Bu nedenle, sıvı akışına maruz kalan kanser hücrelerindeki miRNA ekspresyon paternlerine yönelik araştırmalara odaklanılması, kanserin heterojenitesi hakkında bilgi sahibi olmak açısından önemlidir.

Sürekli sıvı akışına ve bu sıvı akışına bağlı olarak sürekli sıvı gerilimine maruz kalan HT-29 hücrelerinde, 14 miRNA'da istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlemlendi. Bunlardan 12'sinde ekspresyon artışı (hsa-miR-1244, hsa-miR-4286, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-4461, hsa-miR-3613-5p, hsa-miR-1972, hsa-miR-3065-5p, hsa-miR-4458, hsa-miR-6744-5p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-378f, hsa-miR-3651); 2'sinde ise ekspresyon azalışı (hsa-miR-4649-5p, hsa-miR-3178) gözlemlendi. Anlamlı olarak saptanan miRNA değişikliklerinin, literatür verileri eşliğinde değerlendirilmesi sonucu, miR-1244, miR-3178, miR-3651, miR-4458, miR-338, miR-4286'teki değişimlerinin invazyon, metastaz ve EMT ile ilişkileri olduğu saptandı (124, 127, 128, 130, 138, 141). Literatürde, miR-4649-3p ekspresyonundaki artışın hücre proliferasyonunun inhibe ettiği gösterilmiştir (140). Bizim çalışmamızda sürekli sıvı akışı, sıvı gerilimine maruz kalan ve EMT fenotipini sunan HT-29 hücrelerinde miR-4649-3p'nin ekspresyonunda anlamlı azalma saptandı. Bu durum dinamik kültür altındaki hücrelerde proliferasyon yönünde destekleyici bilgi vermektedir. Çalışmamızda gerçekleştirilen proliferasyon canlılık analizlerinde dinamik koşullar altındaki hücrelerde hücre sayısının arttığı gösterilmesi de bu sonucu desteklemektedir.

Literatürde EMT'deki etkinliği kanıtlanmış valide miR-21, ekspresyonu bu çalışmada da gösterilmiştir. Çeşitli kanserler üzerinde yapılan çalışmalarda, miR-21'in artan ekspresyonunun hücre proliferasyonu, apoptozu, invazyonu ve metastazında etkili olduğu gösterilerek terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir (131-134). Literatürdeki, miR-21 ile metastaz ve EMT arasında ilişki olduğunu savunan yayınlarından yola çıkılarak, vücut içindeki sürekli sıvı akışı ve buna bağlı olan sıvı geriliminin kanser hücresine metastaz ve EMT yönünde avantaj sağladığı görüldü.

miRNA ve mRNA çalışmalarından elde edilen ekspresyon profilleri ile gerçekleştirilen gen ontoloji analizlerinden; HCT-116 hücrelerinde anjiyogenezin düzenlenmesi (GO:0001525),

apoptozun negatif düzenlenmesi (GO:0043066), apoptozun düzenlenmesi süreci (GO:0042981) ve antijen işlenmesi ve sunumu yolağında (KEGG Pathway hsa04612) anlamlı değişiklikler saptandı. Anjiyogenez sürecinin anlamlı çıkmasını sağlayan genler Angptl4, CYR61, TSP-1, AKT1, ANPEP ve GPX1; apoptozun negatif düzenlenmesi sürecinin anlamlı olmasını sağlayan genler Angptl4, GCLC, HSPA1B, TSP-1, ESR2, TP53, AKT1, EGFR ve GPX1; apoptozun düzenlenmesi sürecinin anlamlı olmasını sağlayan genler Angptl4, GCLC, NR4A1, HSPA1B, TSP-1, ESR2, IFNG, TP53, AKT1, EGFR, RUNX3 ve GPX1; antijen işlenmesi ve sunumu yolağının anlamlı olmasını sağlayan genler ise HSPA1B, KLRC4, HLA-B, HLA-C, HSP90AB1 ve KLRD1 olarak saptandı. Bu tez çalışmasında, mikrofluidik sıvı akışlarının, anjiyogenezin indüklenmesine ve apoptozun negatif düzenlenmesine etki ederek EMT süreciyle metastaza gidecek KKK hücrelerinin proliferasyonunu ve metastatik süreçlerini etkilediği gösterilmiştir. Vücuttaki sıvı akışları ve sıvı akışı etkisiyle oluşn sıvı gerilimleri, EMT sürecinde metastaza gidecek kanser hücresinin canlılığını garanti altına almaktadır. Biyoinformatik analizler sonucu mikrofluidik sıvı akışının antijen işlenmesi ve sunumlarında değişiklik olduğu gözlemlendi. Kanser hücresinin yüzeyi ile doğrudan ilişkili olan fiziksel koşulların değişmesi sonucu hücrenin antijenlerinin sunumunda değişiklik olması beklenen bir durumdur. Bu değişiklikler, antijen temelli metotlarla doğrulanmalıdır.

Kanserin gelişimi süresince hücreler apoptozdan kaçış, anjiyogenez, kemoterapötiklere direnç, invazyon, epitelyal ve mezenşimal fenotipler arasındaki geçişlerle metastazın indüklenmesi gibi fenotipik değişikliklerle fiziksel koşullardaki değişikliklere adaptasyon sergilerler. Bu noktada, doğal dinamik mikroçevrede kanser hücrelerinin doğasını anlamak önemlidir. Kanser hücresinin, intertisyel sıvı akışı ve buna bağlı olarak gerçekleşen sıvı gerilimine adaptasyonu ile agresif, motil, invaziv ve daha metastatik bir fenotip kazandığı literatürde sınırlı sayıda yayında gösterilmiştir. Ancak başta anatomisi gereği oldukça dinamik olan KKK'lerdeki metastatik fenotip üzerindeki etkisi ve bu süreçteki post-genomik değişiklikler üzerine odaklanılmamıştır. Tanımlayıcı amaçlı olan bu çalışmada, intertisyel sıvı akışının ve sıvı geriliminin KKK'lerde EMT benzeri fenotip kazandırdığı, proliferasyonu arttırdığı, apoptozu negatif yönde düzenlediği, anjiyogenezi arttırdığı ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmanın en önemli sonuçlarından biri, mikrofluidik dinamik kültür altında hücre davranışları ve buna bağlı analizler ile statik kültür koşulları altında gerçekleştirilen deneylerin sonuçlarında farklı

olduğudur. Bu durum, statik *in vitro* kültürlerinde yürütülen çalışma sonuçlarının, *in vivo*'da farklı çıkmasının en önemli nedenlerinden biri olarak gösterilebilir. İntertisyel sıvı akışı ve buna bağlı olarak gerçekleşen sıvı gerilimi gibi intrinsik mekanik güçler, *in vitro* ve klinik araştırmalar arasındaki farklılıkların temel nedenlerinden biridir. Bu nedenle, hücre davranışının çalışıldığı analizlerin dinamik kültürlerde gerçekleştirilmesi gereklidir. Mikrofluidik çip teknolojilerinin kullanılması ile dinamik tümör mikroçevresinin taklit edilmesiyle gerçekleştirilen deneyler geleneksel koşullarda gerçekleştirilen deneylere göre daha güvenilir sonuçlar vermektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1.American Cancer Society.
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-044738.pdf>
(Erişim tarihi 30 Mayıs 2016)
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin, 2015; 65(1): 5-29.
- 3.T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlıklı Kurumu- Kanser Daire Başkanlığı Resmi İnternet Sitesi. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/1710-2012-türkiye-kanser-istatistikleri.html> (Erişim tarihi: 25 Ocak 2016)
- 4.Corman ML. Carcinoma of the Colon. In: Corman ML, Editor. Colon & Rectal Surgery. 5th Ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2005. p. 767-903.
- 5.Baxter NN, Guillem JG. Colorectal Cancer: Epidemiology, Etiology, and Molecular Basis. In: Wolff BG, Fleshman JW, Beck DE, Pemberton JH, Wexner SD, Editors. The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery. New York: Spriger, 2007, pp 335-352.
- 6.Mensink PB, Kolkman JJ, Van Baarlen J, Kleibeuker JH. Change in anatomic distribution and incidence of colorectal carcinoma over a period of 15 years: clinical considerations. Dis Colon Rectum. 2002; 45(10): 1393-6.
- 7.Gourley EJ, Gering SA. The meandering mesenteric artery: A historical review and surgical implications. Diseases of the Colon and Rectum. 2005; 48(5): 996-1000.
- 8.Edge SB, Byrd DB, Compton CC, Fritz AG, ve ark. Colon and rectum. In: Edge SB, Byrd DB, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, Editors. AJCC cancer staging manual. 7th ed. New York: Springer, 2010. P. 143- 164.
- 9.Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. J Gastrointest Oncol. 2012; 3(3): 153-73.
- 10.Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. Mod Pathol. 2003; 16(4): 376-88.
- 11.Xing M, Koooby DA, El-Rayes BF, Kokabi N, ve ark. Locoregional therapies for metastatic colorectal carcinoma to the liver--an evidence-based review. J Surg Oncol 2014; 110(2): 182-196.
- 12.Mahnken AH, Pereira P, de Baère T. Interventional oncologic approaches to liver metastasis. Radiology. 2013; 266: 407-430.

13. Nowell PC. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol.* 2002; 12(4): 261-6.
14. Komarova NL, Sengupta A, Nowak MA. Mutation-selection networks of cancer initiation: tumour suppressor genes and chromosomal instability. *J Theor Biol.* 2003; 223(4): 433-50.
15. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1): 57-70.
16. Takayama, T, Miyamishi K, Hayashi T, Sato Y, ve ark. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol.* 2006; 41(3): 185-92.
17. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(28): 3784-91.
18. Cheah PY. Recent advances in colorectal cancer genetics and diagnostics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009; 69(1): 45-55.
19. Davies RJ, Miller R, Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(3): 199-209.
20. McNeill H, Woodgett JR. When pathways collide: collaboration and connivance among signalling proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11(6): 404-13.
21. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(1): 84-93.
22. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7(12): 979-87.
23. Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol.* 2004; 22(16): 3420-8.
24. Shankaran V, Obel J, Benson AB. Predicting response to EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer: current practice and future directions. *Oncologist.* 2010; 15(2): 157-67.
25. Frémin C, Meloche S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol.* 2010; 3: 8.
26. Thiel A, Ristimäki A. Toward a molecular classification of colorectal cancer: The role of BRAF. *Front Oncol.* 2013; 3: 281.
27. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, Cros J, ve ark. MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2014; 141(2): 160-71.

28. Yu Z, Ye S, Hu G, Lv M, ve ark. The RAF-MEK-ERK pathway: targeting ERK to overcome obstacles to effective cancer therapy. *Future Med Chem.* 2015; 7(3): 269-89.
29. Pandurangan AK. Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(4): 2201-5.
30. Holmes D. PI3K pathway inhibitors approach junction. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(8): 563-4.
31. Silvestris N, Tommasi S, Petriella D, Santini D, ve ark. The dark side of the moon: the PI3K/PTEN/AKT pathway in colorectal carcinoma. *Oncology.* 2009; 77(Supp 1): 69-74.
32. Francipane MG, Lagasse E. mTOR pathway in colorectal cancer: an update. *Oncotarget.* 2014; 5(1): 49-66.
33. Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, ve ark. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer.* 2011; 12(1): 39-50.
34. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, ve ark. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract.* 2015; 211(8): 557-69.
35. He X, Chen Z, Jia M, Zhao X. Downregulated E-cadherin expression indicates worse prognosis in Asian patients with colorectal cancer: evidence from meta-analysis. *PLoS One.* 2013; 8(7): e70858.
36. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, Tanaka K, ve ark. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2013; 34(11): 2548-57.
37. Gomez I, Peña C, Herrera M, Muñoz C, ve ark. TWIST1 is expressed in colorectal carcinomas and predicts patient survival. *PLoS One.* 2011; 6(3): e18023.
38. Kahlert C, Lahes S, Radhakrishnan P, Dutta S, ve ark. Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in vitro. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(24): 7654-63.
39. Welch-Reardon KM, Ehsan SM, Wang K, Wu N, ve ark. Angiogenic sprouting is regulated by endothelial cell expression of Slug. *J Cell Sci.* 2014; 127(Pt 9): 2017-28.
40. Shih JY, Yang PC. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2011; 32(9): 1299-304.
41. Pohl M, Radacz Y, Pawlik N, Schoeneck A, ve ark. SMAD4 mediates mesenchymal-

- epithelial reversion in SW480 colon carcinoma cells. *Anticancer Res.* 2010; 30(7): 2603-13.
42. Xiong H, Hong J, Du W, Lin YW, ve ark. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2012; 287(8): 5819-32.
43. Losi L, Bouzourene H, Benhattar J. Loss of Smad4 expression predicts liver metastasis in human colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2007; 17(5): 1095-9.
44. Voorneveld PW, Kodach LL, Jacobs RJ, Liv N, ve ark. Loss of SMAD4 alters BMP signaling to promote colorectal cancer cell metastasis via activation of Rho and ROCK. *Gastroenterology.* 2014; 147(1): 196-208.
45. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006; 127(3): 469-80.
46. Makrodouli E, Oikonomou E, Koc M, Andera L, ve ark. BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Mol Cancer.* 2011; 10: 118.
47. Li X, Stevens PD, Liu J, Yang H, ve ark. PHLPP is a negative regulator of RAF1, which reduces colorectal cancer cell motility and prevents tumor progression in mice. *Gastroenterology.* 2014; 146(5): 1301-12.
48. Wang H, Quah SY, Dong JM, Manser E, ve ark. PRL-3 down-regulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2007; 67(7): 2922-6.
49. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, ve ark. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res.* 2011; 71(9): 3246-56.
50. Chen ML, Liang LS, Wang XK. miR-200c inhibits invasion and migration in human colon cancer cells SW480/620 by targeting ZEB1. *Clin Exp Metastasis.* 2012; 29(5): 457-69.
51. Chang CJ, Chao CH, Xia W, Yang JY, ve ark. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(3): 317-23.
52. Rokavec M, Öner MG, Li H, Jackstadt R, ve ark. IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest.* 2014; 124(4):

1853-67.

53. Li XL, Hara T, Choi Y, Subramanian M, ve ark. A p21-ZEB1 complex inhibits epithelial-mesenchymal transition through the microRNA 183-96-182 cluster. *Mol Cell Biol*. 2014; 34(3): 533-50.
54. Han HB, Gu J, Zuo HJ, Chen ZG, ve ark. Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer. *J Pathol*. 2012; 226(3): 544-55.
55. Yang MH, Yu J, Chen N, Wang XY, ve ark. Elevated microRNA-31 expression regulates colorectal cancer progression by repressing its target gene SATB2. *PLoS One*. 2013; 8(12): e85353.
57. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013; 19(11): 1423-37.
58. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13(7): 497-512.
59. Herrera M, Islam AB, Herrera A, Martín P, ve ark. Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature. *Clin Cancer Res*. 2013; 19(21): 5914-26.
60. Bates RC, DeLeo MJ 3rd, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis. *Exp Cell Res*. 2004; 299(2): 315-24.
61. Torres S, Bartolomé RA, Mendes M, Barderas R, ve ark. Proteome profiling of cancer-associated fibroblasts identifies novel proinflammatory signatures and prognostic markers for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013; 19(21): 6006-19.
62. Zeng X, Yang P, Chen B, Jin X, ve ark. Quantitative secretome analysis reveals the interactions between epithelia and tumor cells by in vitro modulating colon cancer microenvironment. *J Proteomics*. 2013; 89: 51-70.
63. Munson JM, Shieh AC. Interstitial fluid flow in cancer: implications for disease progression and treatment. *Cancer Manag Res*. 2014; 6: 317-28.
64. Shieh AC. Biomechanical forces shape the tumor microenvironment. *Ann Biomed Eng*. 2011; 39(5): 1379-89.

65. Gomez EW, Chen QK, Gjorevski N, Nelson CM. Tissue geometry patterns epithelial-mesenchymal transition via intercellular mechanotransduction. *J Cell Biochem*. 2010; 110(1): 44-51.
66. Tang X, Kuhlenschmidt TB, Zhou J, Bell P, ve ark. Mechanical force affects expression of an in vitro metastasis-like phenotype in HCT-8 cells. *Biophys J*. 2010; 99: 2460–2469.
67. Tilghman, RW, Cowan CR, Mih JD, Koryakina Y, ve ark. Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype. *PLoS One*. 2010; 5: e12905.
68. Yu H, Mouw JK, Weaver VM. Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. *Trends Cell Biol*. 2011; 21(1): 47–56.
69. Sleeman J, Schmid A, Thiele W. Tumor lymphatics. *Semin Cancer Biol*. 2009; 19(5): 285–297.
70. Butler TP, Grantham FH, Gullino PM. Bulk transfer of fluid in the interstitial compartment of mammary tumors. *Cancer Res*. 1975; 35(11 Part 1): 3084–3088.
71. Hofmann M, Guschel M, Bernd A, Bereiter-Hahn J, ve ark. Lowering of tumor interstitial fluid pressure reduces tumor cell proliferation in a xenograft tumor model. *Neoplasia*. 2006; 8(2): 89-95.
72. Jain RK. Transport of molecules in tumor interstitium: a review. *Cancer Res*. 1987; 47: 3039–3051
73. Rofstad EK, Ruud EB, Mathiesen B, Galappathi K. Associations between radiocurability and interstitial fluid pressure in human tumor xenografts without hypoxic tissue. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(3): 936-45.
74. Polacheck WJ, Charest JL, Kamm RD. Interstitial flow influences direction of tumor cell migration through competing mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(27): 11115-20.
75. Shieh AC, Rozansky HA, Hinz B, Swartz MA. Tumor cell invasion is promoted by interstitial flow-induced matrix priming by stromal fibroblasts. *Cancer Res*. 2011; 71(3): 790-800.
76. Rofstad EK, Galappathi K, Mathiesen BS. Tumor interstitial fluid pressure-a link between tumor hypoxia, microvascular density, and lymph node metastasis. *Neoplasia*. 2014; 16(7): 586-94.
77. Rizvi I, Gurkan UA, Tasoglu S, Alagic N, ve ark. Flow induces epithelial-mesenchymal

transition, cellular heterogeneity and biomarker modulation in 3D ovarian cancer nodules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(22): E1974-83.

78. Lunt SJ, Kalliomaki TM, Brown A, Yang VX, ve ark. Interstitial fluid pressure, vascularity and metastasis in ectopic, orthotopic and spontaneous tumours. *BMC Cancer*. 2008; 8: 2.

79. Sugarbaker PH. Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Seminars in Surgical Oncology*. 1998; 14(3): 254–261.

80. Sugarbaker PH. Observations concerning cancer spread within the peritoneal cavity and concepts supporting an ordered pathophysiology. In: Sugarbaker PH, editor. *Peritoneal Carcinomatosis: Principles and Management*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1996. p. 79–100.

81. Yonemura Y, Nojima N, Kawamura T. Mechanisms of formation of peritoneal dissemination. In: Yonemura Y, editor. *Peritoneal Dissemination: Molecular Mechanisms and the Latest Therapy*. Japan: Maeda Shoten; 1998. p. 1–46.

82. de Cuba EM, Kwakman R, van Egmond M, Bosch LJ, ve ark. Understanding molecular mechanisms in peritoneal dissemination of colorectal cancer : future possibilities for personalised treatment by use of biomarkers. *Virchows Arch*. 2012; 461(3): 231-43.

83. Chaudhuri PK, Ebrahimi Warkiani M, Jing T, ve ark. Microfluidics for research and applications in oncology. *Analyst*. 2016; 141(2): 504-24.

84. Zhang Z, Nagrath S. Microfluidics and cancer: are we there yet? *Biomed Microdevices*. 2013; 15(4): 595-609.

85. Ritchie MD, Holzinger ER, Li R, Pendergrass SA, ve ark. Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions. *Nat Rev Genet*. 2015; 16(2): 85-97.

86. American Tissue Cell Culture, HT-29 (HTB-38) Cell Line. <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx> (Erişim tarihi: 30 Mayıs 2016)

87. American Tissue Cell Culture, HCT-116 (CCL- 247) Cell Line <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-247.aspx> (Erişim tarihi: 30 Mayıs 2016)

88. Wang H, Shi J, Luo Y, Liao Q, ve ark. LIM and SH3 protein 1 induces TGF β -mediated epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer by regulating S100A4 expression. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(22): 5835-47.

89. Zhu S, Zhang J, Xu F, Xu E, ve ark. IGFBP-rP1 suppresses epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2015; 6: e1695.
90. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, ve ark. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003; 4: 249–264.
91. Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(1): 31-6.
92. Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol.* 2006; 342: 129-138.
93. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, ve ark. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(Database issue): D447-52.
94. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009; 4(1): 44-57.
95. Kapur S, Baylink DJ, Lau KH. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. *Bone.* 2003; 32(3): 241-51.
96. Kaiser S, Jossen V, Schirmaier C, Eibl D, ve ark. Fluid Flow and Cell Proliferation of Mesenchymal Adipose-Derived Stem Cells in Small-Scale, Stirred, Single-Use Bioreactors. *Chemie Ingenieur Technik.* 2013; 85 (1-2): 95–102.
97. Yu T, Liu K, Wu Y, Fan J, ve ark. High interstitial fluid pressure promotes tumor cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med.* 2013; 32(5): 1093-100.
98. Demou ZN. Gene expression profiles in 3D tumor analogs indicate compressive strain differentially enhances metastatic potential. *Ann Biomed Eng.* 2010; 38(11): 3509–3520.
99. Leber MF, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis. *Int J Oncol.* 2009; 34(4): 881-95.
100. Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol Cancer.* 2016; 15: 18.
101. Piotrowski-Daspit AS, Tien J, Nelson CM. Interstitial fluid pressure regulates collective

- invasion in engineered human breast tumors via Snail, vimentin, and E-cadherin. *Integr Biol (Camb)*. 2016; 8(3): 319-31.
102. Perez-Carbonell L, Sinicrope FA, Alberts SR, Oberg AL, ve ark. MiR-320e is a novel prognostic biomarker in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015; 113(1): 83-90.
 103. Chang RM, Yang H, Fang F, Xu JF, ve ark. MicroRNA-331-3p promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase. *Hepatology*. 2014; 60(4): 1251-63.
 104. Chen L, Chu F, Cao Y, Shao J, ve ark. Serum miR-182 and miR-331-3p as diagnostic and prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*. 2015; 36(10): 7439-47.
 105. Baffa R, Fassan M, Volinia S, O'Hara B, ve ark. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *J Pathol*. 2009; 219(2): 214-21.
 106. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007; 449(7163): 682-8.
 107. Wang YF, Li Z, Zhao XH, Zuo XM, ve ark. MicroRNA-10b is upregulated and has an invasive role in colorectal cancer through enhanced Rhoc expression. *Oncol Rep*. 2015; 33(3): 1275-83.
 108. Hur K, Toiyama Y, Schetter AJ, Okugawa Y, ve ark. Identification of a metastasis-specific MicroRNA signature in human colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015; 107(3): dju492.
 109. Gasch C, Plummer PN, Jovanovic L, McInnes LM, ve ark. Heterogeneity of miR-10b expression in circulating tumor cells. *Sci Rep*. 2015; 5: 15980.
 110. Zhang W, Zhang J, Hoadley K, Kushwaha D, ve ark. miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression. *Neuro Oncol*. 2012; 14(6): 712-9.
 111. Li R, Li X, Ning S, Ye J, ve ark. Identification of a core miRNA-pathway regulatory network in glioma by therapeutically targeting miR-181d, miR-21, miR-23b, β -Catenin, CBP, and STAT3. *PLoS One*. 2014; 9(7): e101903.
 112. Wang XF, Shi ZM, Wang XR, Cao L, ve ark. MiR-181d acts as a tumor suppressor in glioma by targeting K-ras and Bcl-2. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012; 138(4): 573-84.
 113. Geng L, Chaudhuri A, Talmon G, Wisecarver JL, ve ark. Mir -192 suppresses liver metastasis of colon cancer. *Oncogene*. 2014; 33(46): 5332-40.

114. Zeng T, Li G. MicroRNA-10a enhances the metastatic potential of cervical cancer cells by targeting phosphatase and tensin homologue. *Mol Med Rep*. 2014; 10(3): 1377-82.
115. Yan Y, Wang Q, Yan XL, Zhang Y, ve ark. miR-10a controls glioma migration and invasion through regulating epithelial-mesenchymal transition via EphA8. *FEBS Lett*. 2015; 589(6): 756-65.
116. Khan S, Wall D, Curran C, Newell J, ve ark. MicroRNA-10a is reduced in breast cancer and regulated in part through retinoic acid. *BMC Cancer*. 2015; 15: 345.
117. Jia L, Huang Y, Zheng Y, Lyu M, ve ark. miR-375 inhibits cell growth and correlates with clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2015; 33(4): 2061-71.
118. Li Y, Jiang Q, Xia N, Yang H, ve ark. Decreased expression of microRNA-375 in nonsmall cell lung cancer and its clinical significance. *J Int Med Res*. 2012; 40(5): 1662-9.
119. Shen Y, Zhou J, Li Y, Ye F, ve ark. miR-375 mediated acquired chemo-resistance in cervical cancer by facilitating EMT. *PLoS One*. 2014; 9(10): e109299.
120. Zhou X, Zhang CZ, Lu SX, Chen GG, ve ark. miR-625 suppresses tumour migration and invasion by targeting IGF2BP1 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2015; 34(8): 965-77.
121. Wang Z, Qiao Q, Chen M, Li X, ve ark. miR-625 down-regulation promotes proliferation and invasion in esophageal cancer by targeting Sox2. *FEBS Lett*. 2014; 588(6): 915-21.
122. Lou X, Qi X, Zhang Y, Long H, ve ark. Decreased expression of microRNA-625 is associated with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2013; 108(4): 230-5.
123. Cao L, Xie B, Yang X, Liang H, ve ark. MiR-324-5p Suppresses Hepatocellular Carcinoma Cell Invasion by Counteracting ECM Degradation through Post-Transcriptionally Downregulating ETS1 and SP1. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0133074.
124. Zhang R, Zhang Y, Li H. miR-1244/Myocyte Enhancer Factor 2D Regulatory Loop Contributes to the Growth of Lung Carcinoma. *DNA Cell Biol*. 2015; 34(11): 692-700.
125. Li W, Wang W, Ding M, Zheng X, ve ark. MiR-1244 sensitizes the resistance of non-small cell lung cancer A549 cell to cisplatin. *Cancer Cell Int*. 2016; 16: 30.
126. Drahos J, Schwameis K, Orzolek LD, Hao H, ve ark. MicroRNA Profiles of Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma: Differences in Glandular Non-native Epithelium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016; 25(3): 429-37.

127. Zhai R, Wei Y, Su L, Liu G, ve ark. Whole-miRNome profiling identifies prognostic serum miRNAs in esophageal adenocarcinoma: the influence of Helicobacter pylori infection status. *Carcinogenesis*. 2015; 36(1): 87-93.
128. Huang N, Wu Z, Lin L, Zhou M, ve ark. MiR-338-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells by targeting ZEB2 and MACC1/Met/Akt signaling. *Oncotarget*. 2015; 6(17): 15222-34.
129. Sun K, Su G, Deng H, Dong J, ve ark. Relationship between miRNA-338-3p expression and progression and prognosis of human colorectal carcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 2014; 127(10): 1884-90.
130. Qin Y, Cheng C, Lu H, Wang Y. miR-4458 suppresses glycolysis and lactate production by directly targeting hexokinase2 in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 469(1): 37-43.
131. Wong ST, Zhang XQ, Zhuang JT, Chan HL, ve ark. MicroRNA-21 inhibition enhances in vitro chemosensitivity of temozolomide-resistant glioblastoma cells. *Anticancer Res*. 2012; 32: 2835-2841.
132. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, ve ark. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007; 26: 2799-2803.
133. Zhu H, Luo H, Li Y, Zhou Y, ve ark.. MiroRNA-21 in Scleroderma Fibrosis and its Function in TGF- β - Regulated Fibrosis-Related Genes Expression. *J Clin Immunol*. 2013; 33: 1100-1109.
134. Xiong B, Cheng Y, Ma L, Zhang C. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells. *Int J Oncol*. 2013; 42(1): 219-28.
135. Fukushima Y, Iinuma H, Tsukamoto M, Matsuda K, ve ark. Clinical significance of microRNA-21 as a biomarker in each Dukes' stage of colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2015; 33(2): 573-82.
136. Zaravinos A. The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer. *J Oncol*. 2015; 2015: 865816.
137. Bornachea O, Santos M, Martínez-Cruz AB, García-Escudero R, ve ark. EMT and induction of miR-21 mediate metastasis development in Trp53-deficient tumours. *Sci Rep*.

2012; 2: 434.

138. Wang C, Guan S, Chen X, Liu B, ve ark. Clinical potential of miR-3651 as a novel prognostic biomarker for esophageal squamous cell cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 465(1): 30-4.

139. Ries J, Vairaktaris E, Agaimy A, Kintopp R, ve ark. -186, miR-3651 and miR-494: potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma extracted from whole blood. *Oncol Rep.* 2014; 31(3): 1429-36.

140. Pan X, Peng G, Liu S, Sun Z, ve ark. MicroRNA-4649-3p inhibits cell proliferation by targeting protein tyrosine phosphatase SHP-1 in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Mol Med.* 2015; 36(2): 559-64.

141. Li W, Shen S, Wu S, Chen Z, ve ark. Regulation of tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma tumor endothelial cells by microRNA-3178 and underlying mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 464(3): 881-7.

142. Zhu P, Tan MJ, Huang RL, Tan CK, ve ark. Angiopoietin-like 4 protein elevates the prosurvival intracellular O₂(-):H₂O₂ ratio and confers anoikis resistance to tumors. *Cancer Cell.* 2011; 19(3): 401-15.

143. Katanasaka Y, Kodera Y, Kitamura Y, Morimoto T, ve ark. Epidermal growth factor receptor variant type III markedly accelerates angiogenesis and tumor growth via inducing c-myc mediated angiopoietin-like 4 expression in malignant glioma. *Mol Cancer.* 2013; 12: 31.

144. Nakayama T, Hirakawa H, Shibata K, Abe K, ve ark. Expression of angiopoietin-like 4 in human gastric cancer: ANGPTL4 promotes venous invasion. *Oncol Rep.* 2010; 24(3): 599-606.

145. Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, ve ark. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell.* 2008; 133(1): 66-77.

146. Li X, Chen T, Shi Q, Li J, ve ark. Angiopoietin-like 4 enhances metastasis and inhibits apoptosis via inducing bone morphogenetic protein 7 in colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 467(1): 128-34.

147. Huang XF, Han J, Hu XT, He C. Mechanisms involved in biological behavior changes associated with Angptl4 expression in colon cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2012; 27(5): 1541-7.

148. Wu G, Zhu YZ, Zhang JC. Sox4 up-regulates Cyr61 expression in colon cancer cells. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 34(2): 405-12.

149. Jeong D, Heo S, Sung Ahn T, Lee S, ve ark. Cyr61 expression is associated with prognosis in patients with colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2014; 14: 164.
150. Liu Y, Zhou YD, Xiao YL, Li MH, ve ark. Cyr61/CCN1 overexpression induces epithelial-mesenchymal transition leading to laryngeal tumor invasion and metastasis and poor prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16(7): 2659-64.
151. John AS, Hu X, Rothman VL, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: exploring the functional significance in tumor cell invasion. *Exp Mol Pathol*. 2009; 87(3): 184-8.
152. Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, ve ark. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis*. 2010; 13(4): 305-15.
153. Donmez G, Sullu Y, Baris S, Yildiz L, ve ark. Vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and thrombospondin-1 (TSP-1) expression in urothelial carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2009; 205(12): 854-7.
154. Jayachandran A, Anaka M, Prithviraj P, Hudson C, ve ark. Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma. *Oncotarget*. 2014; 5(14): 5782-97.
155. Zhao D, Sui Y, Zheng X. miR-331-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting HER2 through the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2016; 35(2): 1075-82.
156. Epis MR, Giles KM, Barker A, Kendrick TS, ve ark. miR-331-3p regulates ERBB-2 expression and androgen receptor signaling in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2009; 284(37): 24696-704.
157. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, ve ark. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4(12): 988-1004.
158. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci*. 2011; 4: 51.
159. Dai X, Chiang Y, Wang Z, Song Y, ve ark. Expression levels of microRNA-375 in colorectal carcinoma. *Mol Med Rep*. 2012; 5(5): 1299-304.

160. Xu Y, Jin J, Liu Y, Huang Z, ve ark. Snail-regulated MiR-375 inhibits migration and invasion of gastric cancer cells by targeting JAK2. *PLoS One*. 2014; 9(7): e99516.
161. Reddi HV, Driscoll CB, Madde P, Milosevic D, ve ark. Redifferentiation and induction of tumor suppressors miR-122 and miR-375 by the PAX8/PPAR γ fusion protein inhibits anaplastic thyroid cancer: a novel therapeutic strategy. *Cancer Gene Ther*. 2013; 20(5): 267-75.
162. Huang DH, Wang GY, Zhang JW, Li Y, ve ark. MiR-501-5p regulates CYLD expression and promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2015; 45(8): 738-44.
163. Li E, Ji P, Ouyang N, Zhang Y, ve ark. Differential expression of miRNAs in colon cancer between African and Caucasian Americans: implications for cancer racial health disparities. *Int J Oncol*. 2014; 45(2): 587-94.
164. Li C, Li DC, Che SS, Ma K, ve ark. The decreased expression of miR-625 predicts poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(6): 9560-4.
165. Lou X, Qi X, Zhang Y, Long H, ve ark. Decreased expression of microRNA-625 is associated with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2013; 108(4): 230-5.
166. Ng KT, Xu A, Cheng Q, Guo DY, ve ark. Clinical relevance and therapeutic potential of angiopoietin-like protein 4 in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. 2014; 13: 196.
167. Galaup A, Cazes A, Le Jan S, Philippe J, ve ark. Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(49): 18721-6.
168. Ifon ET, Pang AL, Johnson W, Cashman K, ve ark. U94 alters FN1 and ANGPTL4 gene expression and inhibits tumorigenesis of prostate cancer cell line PC3. *Cancer Cell Int*. 2005; 5: 19.
169. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, ve ark. Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 972913.
170. Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Apr 1;89(7):3070-4.

171. Mulcahy RT, Untawale S, Gipp JJ. Transcriptional up-regulation of gamma glutamylcysteine synthetase gene expression in melphalan-resistant human prostate carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 1994; 46(5): 909-14.
172. Manna SK, Kuo MT, Aggarwal BB. Overexpression of gamma-glutamylcysteine synthetase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappa B and activator protein-1. *Oncogene*. 1999; 18(30): 4371-82.
173. Kim AD, Zhang R, Han X, Kang KA, ve ark. Involvement of glutathione and glutathione metabolizing enzymes in human colorectal cancer cell lines and tissues. *Mol Med Rep*. 2015; 12(3): 4314-9.
173. Kim AD, Zhang R, Han X, Kang KA, ve ark. Involvement of glutathione and glutathione metabolizing enzymes in human colorectal cancer cell lines and tissues. *Mol Med Rep*. 2015; 12(3): 4314-9.
174. Yaglom JA, Gabai VL, Sherman MY. High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways. *Cancer Res*. 2007; 67(5): 2373-81.
175. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, ve ark. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev*. 2005; 19(5): 570-82.
176. Gabai VL, Budagova KR, Sherman MY. Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents. *Oncogene*. 2005; 24(20): 3328-38.
177. Clemons NJ, Buzzard K, Steel R, Anderson RL. Hsp72 inhibits Fas-mediated apoptosis upstream of the mitochondria in type II cells. *J Biol Chem*. 2005; 280(10): 9005-12.
178. Qi W, White MC, Choi W, Guo C, ve ark. Inhibition of inducible heat shock protein-70 (hsp72) enhances bortezomib-induced cell death in human bladder cancer cells. *PLoS One*. 2013; 8(7): e69509.
179. Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med*. 2002, 6: 1-12.
180. Mirochnik Y, Kwiatek A, Volpert OV. Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments. *Curr Drug Targets*. 2008; 9(10): 851-62.
181. Kalas W, Swiderek E, Switalska M, Wietrzyk J, ve ark. Thrombospondin-1 receptor

mediates autophagy of RAS-expressing cancer cells and triggers tumour growth inhibition. *Anticancer Res.* 2013; 33(4): 1429-38.

182. Venkatadri R, Muni T, Iyer AK, Yakisich JS, ve ark. Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell Death Dis.* 2016; 7: e2104.

183. Xu J, Ai Q, Cao H, Liu Q. MiR-185-3p and miR-324-3p Predict Radiosensitivity of Nasopharyngeal Carcinoma and Modulate Cancer Cell Growth and Apoptosis by Targeting SMAD7. *Med Sci Monit.* 2015; 21: 2828-36.

184. Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, ve ark. MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PLoS One.* 2013; 8(11): e79467.

185. Zhou J, Song S, Cen J, Zhu D, ve ark. MicroRNA-375 is downregulated in pancreatic cancer and inhibits cell proliferation in vitro. *Oncol Res.* 2012; 20(5-6): 197-203. PubMed PMID: 23581226.

186. Luo J, Wu J, Li Z, Qin H, ve ark. miR-375 suppresses IGF1R expression and contributes to inhibition of cell progression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 374598.

187. Liu B, Wu B, Huang S, Li D. Effect of miR-375 on viability, cell cycle and apoptosis of colon cancer HCT116 cells. *Chin J Pathophysiol.* 2015; 31(4), 609-614.

188. Wang M, Li C, Nie H, Lv X, ve ark. Down-regulated miR-625 suppresses invasion and metastasis of gastric cancer by targeting ILK. *FEBS Lett.* 2012; 586(16): 2382-8.

189. Rasmussen MH, Jensen NF, Tarpgaard LS, Qvortrup C, ve ark. High expression of microRNA-625-3p is associated with poor response to first-line oxaliplatin based treatment of metastatic colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2013; 7(3): 637-46.

190. Mohan HM, Aherne CM, Rogers AC, Baird AW, ve ark. Molecular pathways: the role of NR4A orphan nuclear receptors in cancer. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(12): 3223-8.

191. Li QX, Ke N, Sundaram R, Wong-Staal F. NR4A1, 2, 3--an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis. *Histol Histopathol.* 2006; 21(5): 533-40.

192. Deutsch AJ, Rinner B, Wenzl K, Pichler M, ve ark. NR4A1-mediated apoptosis suppresses lymphomagenesis and is associated with a favorable cancer-specific , survival in patients with aggressive B-cell lymphomas. *Blood.* 2014; 123(15): 2367-77.

193. Yu L, Su YS, Zhao J, Wang H, ve ark. Repression of NR4A1 by a chromatin modifier promotes docetaxel resistance in PC-3 human prostate cancer cells. *FEBS Lett.* 2013; 587(16): 2542-51.
194. Ozcan O, Kara M, Yumrutas O, Bozgeyik E, ve ark. MTUS1 and its targeting miRNAs in colorectal carcinoma: significant associations. *Tumour Biol.* 2015, 37(5): 6637-45.
195. Kuang D, Chen W, Song YZ, Yu YY, ve ark. Association between the HSPA1B $\pm$ 1267A/G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 14 case-control studies. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(16): 6855-61.
196. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis.* 2013; 34(6): 1181-8.
197. Tyagi N, Tyagi R. The wonderful chaperones: A highlight on therapeutics of cancer and potentially malignant disorders. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2015; 19(2): 212-20.
198. Blankenstein T, Coulie PG, Gilboa E, Jaffee EM. The determinants of tumour immunogenicity. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12(4): 307-13.
199. Brostjan C, Sobanov Y, Glienke J, Hayer S, ve ark. The NKG2 natural killer cell receptor family: comparative analysis of promoter sequences. *Genes Immun.* 2000; 1(8): 504-8.
200. Imai T, Kato Y, Kajiwarra C, Mizukami S, ve ark. Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(39): 16363-8.
201. García P, Llano M, de Heredia AB, Willberg CB, ve ark. Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E. *Eur J Immunol.* 2002; 32(4): 936-44.
- 202 . Liekens AM, De Knijf J, Daelemans W, Goethals B, ve ark. BioGraph: unsupervised biomedical knowledge discovery via automated hypothesis generation. *Genome Biol.* 2011; 12(6): R57.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/18-04	Tarih:02.06.2011			
	Doç.Dr.Yasemin BASKIN'ın sorumlusu olduğu "Kolorektal Kanselerde Metastazı Kontrol Eden Potansiyel Post Genomik Süreçler" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	

8.2. Özgeçmiş ve Yayın Listesi

ÖZGEÇMİŞ

GİZEM ÇALIBAŞI KOÇAL, Araştırma Görevlisi

Doğum Yılı/Yeri	1986/ İzmir
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İZMİR
İletişim	0 (232) 412 5801
e-posta :	gizemcalibasi@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Temel Onkoloji	Doktora	2016
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Temel Onkoloji	Yüksek Lisans	2011
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya	Lisans	2008

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Sağlık Bilimleri, Enstitüsü Onkoloji ABD	Araştırma Görevlisi	2012- Devam
Stanford University	ABD	Palo Alto, CA	Canary Center for Early Cancer Detection, California	Researcher	2014- 2015
Harvard University	ABD	Boston, MA	Brigham and Women's Hospital	Pre-doctoral Research Fellow	2013- 2014
Harvard-MIT (Massachusetts Institute of Technology) Health Sciences and Technology	ABD	Boston, MA	Medicine and Health Sciences and Technology	Pre-doctoral Research Fellow	2013- 2014

UZMANLIK ALANLARI

Sağlık Bilimleri
Kolorektal kanser metastazı, gastrointestinal stromal tümörler ve c-kit mutasyonları, Translasyonel onkoloji, farmakogenomik, bireyselleştirilmiş tıp Mikroakışkan teknolojileri, Lab-on-a-chip, DNA sekanslama, microarray, hücre kültürü teknikleri

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş
Bilim İnsanı Destekleme Programı	TÜBİTAK
TÜBİTAK-International Research Fellowship Program	TÜBİTAK
Kongre katılım-konaklama bursu	EFLM- European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
Poster birincilik ödülü	Dokuz Eylül Üniversitesi
Poster birincilik ödülü	Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Araştırma Ödülü İkinciliği	Türk Kanser Savaş ve Araştırma Kurumu
Yüksek lisans mezuniyet ikinciliği	Dokuz Eylül Üniversitesi

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indeklerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Baskin, Y; Calibasi Kocal, G; Bolat Kucukzeybek, B; Akbarpour, M; Kayacik, N; Sagol, O; Ellidokuz, H; Oztop, I., PDGFRA and KIT mutation status and its association with clinicopathological properties, including DOG1., 2016, Oncology Research
Baskin, Yasemin; Amirfallah, Arsalan; Calibasi, Gizem; Olgun, Nur, Hepatopathy-Thrombocytopenia Syndrome During Actinomycin D Treatment May Be Related to MDR1 (ABCB1) Gene Polymorphisms, 2016, AMERICAN JOURNAL OF THERAPEUTICS
Durmus, Naside Gozde; Tekin, Cumhuri; Guven, Sinan; Sridhar, Kaushik; Yildiz, Ahu Arslan; Calibasi, Gizem; Ghiran, Ionita; Davis, Ronald W.; Steinmetz, Lars M.; Demirci, Utkan, Magnetic levitation of single cells, 2015, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA
Baskin, Yasemin; Amirfallah, Arsalan; Unal, Olcun Umit; Calibasi, Gizem; Oztop, Ilhan, Dihydropyrimidine Dehydrogenase 85T>C Mutation Is Associated With Ocular Toxicity of 5- Fluorouracil: A Case Report, 2015, AMERICAN JOURNAL OF THERAPEUTICS
Calibasi, Gizem; Baskin, Yasemin; Alyuruk, Hakan; Cavas, Levent; Oztop, Ilhan; Sagol, Ozgul; Atila, Koray; Ellidokuz, Hulya; Yilmaz, Ugur, Molecular Analysis of the KIT

Gene in Gastrointestinal Stromal Tumors With Novel Mutations, 2014, APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY & MOLECULAR MORPHOLOGY
Alyuruk, Hakan; Calibasi, Gizem; Cavas, Levent; Baskin, Yasemin; Oztop, Ilhan; Ellidokuz, Hulya; Yilmaz, Ugur, Protein modelling of a novel KIT mutation (N567Y) in the gastrointestinal stromal tumour, 2013, EUROPEAN JOURNAL OF CANCER
Unal, Olcun Umit; Oztop, Ilhan; Calibasi, Gizem; Baskin, Yasemin; Koca, Dogan; Demir, Necla; Akman, Tulay; Ellidokuz, Hulya; Yilmaz, Ahmet Ugur, Relationship between Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations and Clinicopathological Features in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer in Western Turkey, 2013, ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION
Calibasi, G; Baskin, Y; Oztop, I; Sagol, O; Atila, K; Ellidokuz, H; Yilmaz, AU. , The frequency of c-kit proto-oncogene (KIT) mutations in gastrointestinal stromal tumours: A population based study from Aegean Region of Turkey., 2012, TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY-TURK BIYOKIMYA DERGISI

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Diniz, G; Baskin, Y; Calibasi, G; Aktas, S., Relationship of c-Kit Gene and Microsatellit Instability in the Pathogenesis of Wilms Tumors, 2016, Turkish Journal of Pathology
Calibasi, G; Kacar, KG; Dogan, Y; Tari, M; Sari, B; Tonc, S; Bsaran, B; Alizade, N; Alayci, B; Engin, OT; Canbeldek, C; Alashqar, A; Amirfallah, A; Dagdeviren, K; Akbrpour, M; Uysal, T; Cakiroglu, E; Baskin, Y; Ellidokuz, H., İnciraltı Yerleşkesinde Biyoistatistik ve Biyoinformatik Program Kullanım Sıklığı ve Farkındalığı, 2014, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi
Cehreli, C; Alacacioglu, I; Piskin, O; Ates, H; Cehreli, R; Calibasi, G; Yuksel, E; Ozkal, S; Ozsan, GH., Mast cell leukemia associated with undefined morphology and chronic basophilic leukaemia., 2014, BMC Hematology
Baskin, Y; Dagdeviren, YK; Calibasi, G; Canda, AE; Sarioglu, S; Ellidokuz, H; Oztop, I., KRAS mutation profile differences between rectosigmoid localized adenocarcinomas and colon adenocarcinomas., 2014, J Gastrointest Oncol
Calibasi, Gizem; Baskin, Y., DNA sequencing technologies used in medical field., 2013, International Journal of Chemical Science and Technology
Calibasi, G; Baskin Y., Pharmacogenetic applications and pharmacoeconomics in cancer patients, 2013, Turk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Hakemli konferans/ sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

In vitro systems in cancer research, 2nd International Medical Congress for Students and Young Doctors, 2015
Role of RAS/RAF/MAP Kinase Pathway in Personalized Management of Metastatic

Colorectal Cancer, 2nd International Medical Congress for Students and Young Doctors, 2015
Microfluidic Regulation of Cancer Phenotype, 4th TERMIS World Congress, 2015
Molecular Distribution of Oncogenic KIT and PDGFRA mutation in Gastrointestinal Stromal Tumors, EUROMEDLAB 2015, 2015
Follistatin and EGF are Associated with Cell Proliferation in Colorectal Cancer, EUROMEDLAB 2015, 2015
Molecular Analysis of the Metastatic Phenotype on the microfluidic flow mediated EMT of the colorectal cancer, 4th International Congress on Molecular Medicine, 2015
Dynamic microenvironment modulates phenotypic plasticity of esophageal cancer cells, Canary Foundation Early Detection Symposium, 2015
Genomic analysis of Flow Induced EMT in Colorectal Cancer Cells, Canary Foundation Early Detection Symposium, 2015
Kolon Kanseri Proliferasyon Süreci KRAS ve BRAF Geni Mutasyon Durumuna Bağlı Olarak Farklı Yolaklarla İlişkilidir, 21.Ulusal Kanseri Kongresi, 2015
Pharmacogenomics and Pharmacoeconomics, Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 2014
Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (NSCLC) Olgularında EGFR Geni Mutasyon Tipleri ile Klinikopatolojik Özellikler ve Metastaz İlişkisi, 10. Onkolojik Araştırmalar Çalıştayı, 2014
KRAS Geni G13D Mutasyonu Kolorektal Kanseri Yavaş Seyirli Kanseri Davranışının Göstergesidir, 10. Onkolojik Araştırmalar Çalıştayı, 2014
Türk Toplumunda Gastro-İntestinal Stromal Tümörlerde PDGFRA Mutasyon Dağılımı, 10.Onkolojik Araştırmalar Çalıştayı, 2014
Dynamic cell culture alters the phenotype of cancer cells, Stanford University- Bio-X Interdisciplinary Initiatives Symposium, 2014
Anti-Proliferative Effects of Carvacrol on Human Cancer Cell Lines; Cell-Type Specific and Hormetic, 22.nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCCWorldLab, 2014
IL-6, IL-8 and TGF- β as a Prognostic Biomarker are Indicative of Proliferative Behavior in Colorectal Cancer, 22.nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC-WorldLab, 2014
Colorectal Cancer Treatment: Towards Personalized Medicine, 1st International Medical Congress for Student and Young Doctors, 2014
Importance of EGFR Pathway in Personalized Medicine of Lung Cancer, 1st International Medical Congress for Student and Young Doctors, 2014
In-Silico Protein Modelling and Predictability of KRAS Mutation on Behavior of Rectosigmoid Cancers, 1st International Medical Congress for Student and Young

Doctors, 2014
C-Kit Protoonkogeni Ekzon 11 DELW557-K558 Delesyonları Gastrointestinal Stromal Tümörlerde Metastatik ve Malign Davranış ile İlişkilidir, Nadir Tümörler Sempozyumu, 2014
C-Kit Protoonkogeni Ekzon 11 ve 13 Mutasyonları Gastrointestinal Stromal Tümörlerde Proliferatif Karakter ile İlişkilidir, Nadir Tümörler Sempozyumu, 2014
Biological behavior of rectosigmoid cancer may be related with KRAS genetic alterations, 3 rd International Gastrointestinal Cancer Conference, 2013
Using In silico Modelling of KIT Mutations for Prediction of Imatinib Responses, 17th Fritz Bender Foundaton Symposium: Progress Towards Individualized Cancer Treatments, 2013
MTHFR C>T Mutation Contributing To 5-Fluorouracil Mediated Toxicity Especially Hand and Feet Syndrome, 17th Fritz Bender Foundaton Symposium: Progress Towards Individualized Cancer Treatments, 2013
Serum Biomarkers For Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, 17th Fritz Bender Foundaton Symposium: Progress Towards Individualized Cancer Treatments, 2013
Genetic polymorphisms of 5-fluorouracil metabolic pathway related enzymes in the Turkish population, 17th Fritz Bender Foundaton Symposium: Progress Towards Individualized Cancer Treatments, 2013
The imaging characteristics of F-18 FDG PET-CT on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. , 26.Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2013
Tıbbi Laboratuvarlarda Metot Validasyonu, VII. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, 2013
The analysis process of DNA sequencing based tests from FFPE tumour tissues for targeted therapies in cancer management: Dokuz Eylul University Molecular Oncology Laboratory Experience, 20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and LaboratoryMedicine (EuroMedLab), 2013
Comparison of Kras Genotyping Methodologies: Dokuz Eylul University Molecular Oncology Laboratory Experience, 20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and LaboratoryMedicine (EuroMedLab), 2013
Antineoplastik İlaçlarda İlaç Adayı Yeni Moleküllerin Saptanması için Kullanılan In Vitro Modeller, Sağlıkta İnovasyon Üniversiteden Sanayiye- Eğitim Çalıştayı, 2013
Antineoplastik İlaçlarda İlaç Adayı Yeni Moleküllerin Saptanması için Kullanılan In Silico Modeller, Sağlıkta İnovasyon Üniversiteden Sanayiye- Eğitim Çalıştayı, 2013
Real-time cytotoxicity assay or cell proliferation assay, IV.Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, 2012
The dose-dependent variable effects of carvacrol on the cell proliferation, IV.

Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, 2012
Role of MDR1 (P-glycoprotein, ABC1) in personalized cancer treatments: with a clinical experience, IV. Multidisipliner kanser Araştırma Sempozyumu, 2012
Kanser tedavisinde çoklu ilaç direnci, 1.Ulusal Kamu Eczacıları Kongresi, 2012
Antikanser ilaçların tedavi izlemlerinde farmakogenetik yaklaşım, 1.Ulusal Kamu Eczacıları Kongresi, 2012
Araştırma makalesi nasıl yazılır?, 1.Ulusal Kamu Eczacıları Kongresi, 2012
Relationship of epidermal growth factor receptor gene mutations, clinico pathologic features in patients with nonsmall cell lung cancer, 1st Near East and Mid-Asia Association of Medical Oncology Societies Congress, 2012
Fluorourasil metabolic pathway genetic polymorphisms were associated with treatment related toxicity:Pharmacogenomic analysis, ISC Conference on Innovative Therapies- New Targets, Challenges, Drugs , 2012
The relationship between Kras-Braf mutations and resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer, ISC Conference on Innovative Therapies- New Targets, Challenges, Drugs, 2012
The correlation of F-18 FDG uptake and EGFR mutation in non small cell lung cancer, EANM-12, Annual Congress of European Association of Nuclear Medicine, 2012
Farkında mısınız? Kanser geliyorum der: Deri kanseri, VI.Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, DEÜ Tıp Fakültesi, 2012
Elektromanyetik alanlar ve kanser, VI.Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, DEÜ Tıp Fakültesi, 2012
İnciraltı kampüsü'nde çalışan hekimlerde bilgisayar ve istatistik programı kullanım sıklığı, VI. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, DEÜ Tıp Fakültesi, 2012
Tıp ve Biyoinformatik, VI.Özel çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, DEÜ Tıp Fakültesi, 2012
Siklofosfamid metabolik yolağında yer alan enzimlerin (CYP2C9, CYP2C8, ALDH1A, ALDH3A1) polimorfik özellikleri, 24.Ulusal Biyokimya Kongresi, 2012
Türkiye'nin Ege Bölgesi'nde küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde EGFR mutasyon sıklığı, 24.Ulusal Biyokimya Kogresi, 2012
Kişiselleştirilmiş Tıpta Kullanılan Bazı In Silico Araçlar, XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2012
Gastrointestinal stromal tümörlerde aktif KIT proteinini stabilize ederek imatinib sağaltımı yanıtlarını etkileyen yeni bir mutasyon (N567Y), 24.Ulusal Biyokimya Kongresi, 2012
Antikanser Ajanların Farmakogenomik özellikleri: Anti-EGRF tedavisi verilecek kolorektal kanserli hastaların seçilmesinde prediktif biyomarkerlar, 6.Cerrahi Araştırma Kongresi, 2011

Gastrointestinal stromal tümörlerde bireyselleştirilmiş hasta yönetiminde KIT geni mutasyonlarının önemi, 23.Ulusal Biyokimya Kongresi, 2011
Gastrointestinal stromal tümörlerde KIT geni mutasyonlarının dağılımı, XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2011
From genotype to tumour behavior: colon malignant neoplasm, EACR-Anticancer Agents research Congress, 2011
A novel KIT mutation is associated with inability of GIST cells inhibited the activation, EACR Anticancer Agents Research Congress, 2011
KRAS mutation status is associated with anti-EGFR therapy resistance in metastatic colorectal cancer, EACR Anticancer Agents Research Congress, 2011
Bireyselleştirilmiş tıpta kolorektal kanserli hastalardaki sağaltımın planlanmasında KRAS mutasyonlarının rolü, Dokuz Eylül Üniversitesi III. Bilim Şenliği- Onkolojide Güncel Yaklaşımlar 2011
Kolorektal karsinomlu hastalarda KRAS mutasyon analizleri ile bireyselleştirilmiş sağaltım kararı, Dokuz Eylül Üniversitesi III. Bilim Şenliği- Onkolojide Güncel Yaklaşımlar, 2011
Kolorektal Kanserlerdeki KRAS Mutasyonlarının Sağaltıma Etkisi, V. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, DEU Tıp Fakültesi, 2011
Türkiye'de Kanser ve Çevreyle İlişkisi, V. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu-DEU Tıp Fakültesi, 2011
Kanser farkındalığını arttırmaya yönelik yapılan çalışmaların önemi, V.Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu-Dokuz Eylül Üniversitesi, 2011
Unusual high frequency of KRAS mutations in female colorectal cancer patient, IV. International Congress of Molecular Medicine from Bench to Bedside, 2011
The role of DNA sequencing in pharmacogenetic applications, IV. International Congress of Molecular Medicine from Bench to Bedside, 2011
Pyrosequencing analysis for detection of KRAS mutations in colorectal cancer, IV. International Congress of Molecular Medicine from Bench to Bedside, 2011
Optimisation and validation of DNA sequencing for KIT mutation testing in gastrointestinal stromal tumours, IV. International Congress of Molecular Medicine from Bench to Bedside, 2011
Onkoloji Alanında Sağaltım Yanıtlarının Öngörülmesinde Teranostik Biyobelirteçler, 19. Ulusal Kanser Kongresi, 2011
Gastrointestinal Stromal Tümörlerde KIT Geni Ekzon 9, 11, 13, 17 Mutasyonları, 19. Ulusal Kanser Kongresi, 2011
Gastrointestinal Stromal Tümörlerde Biyobelirteç olarak KIT Geni Mutasyonlarının yeri, 3. Ulusal Gastrointestinal Onkoloji Kongresi, 2011
KRAS Mutation Screening In Colorectal Cancer: A Comparison Between ARMS PCR

and DNA Sequencing (as a gold standard), 22.Ulusal Biyokimya Kongresi, 2010
Kolorektal karsinomlu hastalarda anti-EBFR tedavisine yanıtın öngörülmesinde KRAS mutasyon testi: farmakogenomik teranostik bir belirteç, VII. Ulusal Tıbbi Onkoloji Kongresi, 2010
Kolorektal kanserlerde KRAS geni mutasyonlarının saptanmasında Mikroarray yönteminin kullanımı, Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği 6. Ulusal Kongresi, 2010
Pharmacogenomics of Anticancer Agents: Using Predictive Biomarkers to Select Patients with Colorectal Cancer for Treatment with Anti-EGFR Therapies, 5th International Conference of Asian Pacific Organisation for Cancer Prevention, 2010
Real-Time and Dynamic Monitoring Cell Proliferation and Viability for Hep-2 cell lines by xCELLigence System, 5th International Conference of Asian Pacific Organisation for Cancer Prevention, 2010
K-RAS Mutation Detection In Colorectal Cancer Using The Real-Time Polymerase Chain Reaction With Melting Curve Analysis, 5th International Conference of Asian Pacific Organisation for Cancer Prevention Conference, 2010
Optimisation and Validation of KRAS Mutation Testing in Colorectal Carcinomas, III. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, Teorik Metot Çalıştayı, 2010

Kitaplar/Kitap Bölümleri

Calibasi G, Baskin Y. Kanser Biyokimyası (Bölüm 34), Klinik Biyokimya (Editörler Nesrin Emekli, Türkan Yiğitbaşı), ISBN: 978-605-84521-0-7, 2015
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Lisansüstü Eğitim Kılavuzu, ISBN: 978-875- 441-408-0, 2013
Calibasi G, Baskin Y. Farmakogenomikle İlişkili Yöntemler (Bölüm 4), Temel Onkolojide Kullanılan Araştırma Yöntemleri (Editörler Yasemin Baskın, Gizem Çalıbaşı) ISBN: 978-975-441-330-4, 2011