ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eylem NAS

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA VE KOLON KANSER HÜCRELERİNDE MIR-105-5P'NIN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

ADANA, 2022

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA VE KOLON KANSER HÜCRELERİNDE MIR-105-5P'NIN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Eylem NAS

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER
Yıl: 2022, Sayfa: 53
Jüri : Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER
: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
: Doç. Dr. Dilek GÖKTÜRK

Son yıllardaki gen ekspresyon çalışmaları kanser hücrelerinde çarpıcı bir şekilde değişikliğe uğramış miRNA ekspresyonlarına dikkat çekmektedir. miRNA'lar hedefledikleri genin karakterine göre tümör baskılayıcı veya onkogen bir özellik gösterebilmektedirler. Bir miRNA olan miR-105'in de kanser tipine göre tümör baskılayıcı yada onkogen olarak işlev gördüğü bilinmektedir.

Araştırmamızda miR-105-5p'nin kolon ve hepatosellüler karsinomadaki (HCC) etkisini incelemek amacıyla; HCT116 ve Huh7 hücrelerine miR-105-5p-mimic, inhibitör ve negatif kontrolün transfeksiyonu gerçekleştirildi. miR-105-5p'nin transfeksiyonunun; HCT116 ve Huh7 hücre hatlarında; hücre proliferasyonuna, koloni oluşumuna, invazyonuna, hTERT, p21 ve p53 ekspresyonuna nasıl bir etkisi olduğu araştırıldı. miR-105'in downregülasyonunun HCC de kolonileşmeyi azalttığını upregülasyonunun ise HCT116 da kolonileşmeyi ve hTERT, p53, p21 genlerinin ekspresyonlarını azalttığı gözlemlendi. Ancak Huh7 hücrelerinde miR-105-5p'nin downgülasyonu hTERT ve p53'ün ekspresyonlarını azalttı. Ayrıca miR-105-5p'nin downregülasyonu ise her iki hücre hattının da proliferasyonunu arttırdı. Son olarak miR-105-5p'nin ekspresyonunun artışı hem Huh7 hem de HCT116 hücrelerinde kolonileşmeyi arttırmıştır. Ayrıca miR-105-5p'nin inhibisyonu her iki hücre hattında da proliferasyonunun artmasına neden olmuştur. Ek olarak transfeksiyon işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla transfekte Huh7 ve HCT116 hücrelerinde miR-105-5p ve let-7c gen ekspresyonları kontrol edildi ancak sonuç alınamadı.

Anahtar Kelimeler: miR-105-5p,miR-105, kanser, miRNA, HCC, kolon kanseri, HCT116, Huh7

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MIR-105-5P ON HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND COLON CANCER

Eylem NAS

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER
Year: 2022, Pages: 53
Jury : Assoc. Prof. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER
: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
: Assoc. Prof. Dr. Dilek GÖKTÜRK

Gene expression studies in recent years have drawn attention to strikingly altered miRNA expressions in cancer cells. miRNAs can show a tumor suppressor or oncogene feature depending on the character of the gene they target. It is known that mir-105, a miRNA, also functions as a tumor suppressor or oncogene, depending on the cancer type.

In our study, in order to examine the effect of miR-105-5p in colon and hepatocellular carcinoma (HCC); HCT116 and Huh7 cells were transfected with miR-105-5p-mimic, inhibitor and negative control. Transfection of miR-105-5p; In HCT116 and Huh7 cell lines; Its effects on cell proliferation, colony formation, invasion, hTERT, p21 and p53 expression were investigated. It was observed that downregulation of miR-105 reduces colonization in HCC, while upregulation reduces colonization in HCT116 and expression of hTERT, p53, p21 genes. However, downregulation of miR-105-5p in Huh7 cells decreased the expression of hTERT and p53 In addition, downregulation of miR-105-5p increased the proliferation of both cell lines. Finally, increased expression of miR-105-5p increased colonization in both Huh7 and HCT116 cells. In addition, inhibition of miR-105-5p resulted in increased proliferation in both cell lines. In October, the expression of miR-105-5p and let-7c genes were checked in transfected Huh7 and HCT116 cells to check whether the transfection process had occurred, but no results were obtained.

Key Words: miR-105-5p, miR-105, cancer, miRNA, HCC, colon cancer , HCT116, Huh7

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

miRNA bir dizi organizmada yaklaşık olarak 18-25 nükleotid büyüklüğünde intron veya ekzonlardan transkribe olabilen endojen kaynaklı gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel/translasyonel seviyede düzenleyen küçük kodlanmayan tek sarmallı düzenleyici RNA inhibitör moleküllerdir. miRNA'lar; hedef mRNA'ya bağlanarak onun yıkılmasını ya da translasyonel inhibisyonuna yol açarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. miRNA'ların ökaryotlar da birçok hücresel gelişim ve kontrol mekanizmasında yer alırlar. Bazı miRNA'lar tümör baskılama işlevine sahiptir ve kanser hücrelerinde tümörojenik fenotipi inhibe eder**.** Bazı miRNA'lar ise hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki aktivitesine bağlı olarak onkogen bir karakter taşıyabilmektedirler. Böyle miRNA'lar 'onkomiR' olarak bilinmektedir. Onkomirler tümör baskılayıcı genleri veya hücre farklılaşmasını kontrol eden genlerin ekspresyonunu etkileyerek tümör oluşumu, gelişimi vb. mekanizmalara katkı sağlarlar. Farklı dokulardaki miRNA ekspresyonları karakteristiktir ve bu durum; özgül dokuların özelliklerini ve işlevlerini şekillendirebilmektedir. Çok sayıdaki miRNA insan kanserlerinde hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre göçü, hücre istilası, anjiyogenez, farklılaşma dahil çoklu hücresel süreçleri düzenlediği bilinmektedir.

miR-105-5p'nin kolon kanseri ve hepatosellüler karsinomadaki (HCC) etkisini incelemek amacıyla; bir kolon kanseri hücre hattı olan HCT116 ve bir HCC hücre hattı olan Huh7 kullanılmıştır. Hücreler %10 FBS ve %1 antibiyotik ile desteklenen RPMI-1640 içerisinde %5 CO_2 ve %21 O_2 içeren 37 ^{0}C 'de büyütüldü. Transfeksiyon işlemi için Huh7 ve HCT116 hücreleri plate'lere bölündükten sonra CO_2 inkübatörüne 24 saat inkübasyon için kaldırılmıştır. %70-80 yoğunluğa ulaşan Huh7 ve HCT116 hücrelerinde sırası ile miR-105-5p-mimic, miR-105-5p-inhibitör ve miR-105-5p-negatif kontrol ile transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyon sonrası yeterli yoğunluğa ulaşan HCTT116 ve Huh7 hücrelerinden ilk olarak RNA izole edilip ardından ve cDNA sentezlenmiştir. RT-PCR ile hTERT, p21 ve p53

ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. 0h, 24h, 48h ve 72h'lik periyotlarda hücre proliferasyonunu gözlemlemek amacıyla; Huh7 ve HCT116 hücreleri 96'lık well-platelere ekilmiş, MTT boyası kullanılarak 570 nm absorbansta ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Transfekte edilmiş hücrelerin koloni oluşturma potansiyelini gözlemlemek amacıyla; 6'lık well-platelere HCT116 ve Huh7 hücreleri ekilmiş ve koloni oluşumları takip edildi. Ayrıca transfeksiyon işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemlemek için önce miRNA izole edildi ve ardından cDNA ve miR-AMP örnekleri hazırlandı. Hazırlanan miR-AMP örnekleri kullanılarak qPCR yöntemiyle miR-105 ve let-7c genlerinin ekspresyonları kontrol edildi.

Araştırmamızın sonucunda; Huh7' de hem miR-105-5p-mimic hem de miR-105-5p-inhibitör hücrelerinde negatif kontrol hücrelerine kıyasla daha az koloni meydan geldiği gözlemlenmiştir. Ancak HCT116'da mimic ve inhibitör verilen hücrelerde negatif kontrole kıyasla daha fazla koloni meydana geldiği görülmüştür. Huh7 hücrelerinde inhibitör kolonilerinin mimic kolonilerinden fazla olduğunu ve HCT116 hücrelerinde ise tam tersi şekilde mimic hücrelerinde kolonileşmenin daha fazla olduğu gözlenmiştir. PCR sonuçları incelendiğinde; hTERT, p53 ve p21 ekspresyonlarının miR-105-5p mimic transfekte edilen Huh7 arttığı HCT116 hücrelerinde ise azaldığı görülmüştür. miR-105-5p mimic transfekte edilen Huh7 hücrelerinde p21 geninin ekspresyonu artış gösterirken, hTERT ve p53 genlerinin ekspresyon seviyelerinde de azalma tespit edilmiştir. hTERT gen ekspresyonu, miR-105-5p mimic transfekte Huh7 hücrelerinde artarken, miR-105-5p inhibitör transfekte Huh-7 hücrelerinde azaldığı gözlemlenmiştir. p21 ekspresyonu ise mimic hücrelerinde, inhibitör hücrelerine kıyasla 16 kat artmıştır. p21 Huh7 hücresinde en fazla eksprese olan gendir. Hem miR-105-5p inhibitör hem de miR-105-5p mimic transfekte edilen HCT116 hücrelerinde hTERT, p53 ve p21 ekspresyonları azalmıştır. Ek olarak her iki hücre hattında da miR-105 ve let-7c gen ekspresyonunda sonuç alınamamıştır. miR-105-5p mimic ve miR-105-5p inhibitör transfekte edilen HCT116 ve Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızı ilk 24 saatte artış göstermiştir. miR-105-5p mimic ve miR-105-5p inhibitör transfekte HCT116 hücrelerinin

proliferasyon hızı 24-48 saatlerinde negatif kontrole kıyasla azalmış ve 48-72 saatlerinde artmıştır. Buna bağlı olarak HCT116 hücrelerinde inhibitör verilen hücrelerde proliferasyon hızı artmıştır. Huh7 hücrelerinde miR-105-5p mimic ile miR-105-5p inhibitör transfekte edilen hücrelerde negatif kontrole göre proliferasyon hızında 24-48 saatlerinde azalma, 48-72 saatlerinde ise mimic hücrelerinde azalma ve inhibitör hücrelerinde artış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak Huh7 hücrelerinde miR-105-5p ekspresyonu arttırıldığında proliferasyon baskılanmıştır.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında deneylerimin planlanmasında, yürütülmesinde, deneylerin her aşamasında birikim, bilgi deneyimlerini benimle paylaşan, her türlü desteği sağlayan ve bilimsel proje desteğinde yardımını esirgemeyen, beni yönlendiren değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tezimin konusu ile ilgili bana ilham veren Doç. Dr. Can Ali AĞCA' ya, deneysel çalışmalarımla ilgili gerek teori ve gerekse pratik bilgilerle desteklerini esirgemeyen Burcu SAYGIDEĞER DEMİR ve Aycan SEZAN' a teşekkür ederim. Deneysel çalışmamda kullandığım HCT116 hücrelerini temin ettiğim Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ' a, HuH7 hücrelerini sağlayan Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK'e ve IBG İzmir ekibine, proje için destek sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kurumuna ve Laboratuvar çalışmalarımız için olanak sağlayan Çukurova Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı (ÇÜMERLAB) yönetimine teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca karşılaştığım tüm sıkıntılarda ve zorluklarda benden desteğini eksik etmeyen canım annem Sürüyet NAS' a, abim Murat NAS' a ve diğer aile üyelerime, çalışma süresinde maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Sevda SAĞ' a teşekkür ederim.

Eylem NAS

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ XII
ŞEKİLLER DİZİNİ XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR XVI
1. GİRİŞ 1
1.1. miRNA 1
1.2. miRNA Biyogenezi 1
1.3. miRNA'ların Kanser Gelişimine Etkisi ve Önemi 3
1.3.1. HCC (Hepatocellular Carcinoma) de miRNA'ların Rolü 4
1.3.2. Kolon Kanserinde miRNA'ların Rolü 6
1.4. miR-105 ve miR-105-5p 7
1.5. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı 10
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 11
3. MATERYAL & YÖNTEMLER 17
3.1. Materyal 17
3.1.1. Kimyasallar 17
3.1.2. Cihazlar 19
3.2. Yöntemler 20
3.2.1. Hücre Hatları ve Hücre Kültürü 20
3.2.1.1. Hücrelerin Pasajlanması 21
3.2.1.2. Thoma Lamı ile Hücre Sayısını Belirleme 22
3.2.2. Huh7 ve HCT116 Hücrelerinde miR-105-5p'nin Upregülasyonu ve Downregülasyonu 22

3.2.3. Transfekte Huh7 ve HCT116 Hücrelerinden RNA İzolasyonu..... 26
3.2.4. Transfekte Huh7 ve HCT116 Hücrelerinden miRNA İzolasyonu ... 27
3.2.5. Proliferasyon Deneyi 27
3.2.6. Koloni Formasyon Deneyi 28
3.2.7. RNA ve miRNA Ölçümü ve Reverse-Transkriptaz PCR ile cDNA Sentezi 29
3.2.8. qPCR ile hTERT ve Apoptoz Genlerinin (p21 ve p53) Ekspresyonlarının ve Tranfeksiyonun Gerçekleşmesini Kontrol Etme 30
3.2.9. Transfeksiyon Sonucunda Hücrelerin Çekirdek Morfolojisinin Gözlemlenmesi 31
4. BULGULAR 33
4.1. Transfekte Huh7 ve HCT116 Hücrelerinin RNA Konsantrasyonları 80-160 ng/µl Arasında Bulundu 33
4.2. Transfekte Huh7 ve HCT116 Hücrelerinin miRNA Konsantrasyonları 5-75 ng/µl arasında bulundu. 33
4.3. Transfekte Huh7 ve HCT116 Hücrelerinde miR-105 ve let-7c Gen Ekspresyonları Gerçekleşmedi 34
4.4. miR-105-5p'nin Inhibisyonu HCT116 ve Huh7 Hücre Hatlarında Proliferasyonu Arttırdı 34
4.5. miR-105-5p upregülasyonu Huh7 Hücrelerinde hTERT, p21 ve p53'ün Ekspresyonlarını Arttırdı 35
4.6. miR-105-5p Upregülasyonu ve Downregülasyonu HCT116 Hücrelerinde hTERT, p21 ve p53'ün Ekspresyonlarını Bastırdı 36
4.7. miR-105-5p'nin Upregülasyonu HCT116 Hücrelerinde Koloni Sayısını Daha Fazla Arttırdı 36
4.8. miR-105-5p'nin Downregülasyonu Huh7 Hücrelerinde Koloni Sayısını Daha Fazla Arttırdı 37

4.9. Transfeksiyon Hücrelerin Çekirdek Morfolojisi Üzerinde Herhangi Bir Etki Göstermedi 38
5. TARTIŞMA 41
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 45
KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ 53

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Cihazlar ve kullanım amaçları 19
Çizelge 3.2. Ambion life technologies™ marka Anti-miR™ miRNA Inhibitors-Negative Control #1 24
Çizelge 3.3. Optimize edilen Ambion life technologies™ marka Anti-miR™ miRNA Inhibitors Negative Control #1 25
Çizelge 3.4. Proteaz inhibitörü mix'i komponentleri ve miktarları 27
Çizelge 4.1. RNA konsantrasyon ölçüm sonuçları 33
Çizelge 4.2. miRNA konsantrasyon ölçüm sonuçları 33

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1 miRNA biyogenezi 2
Şekil 1.2 *Homo sapiens* miR-105 gen sekans grafiği 7
Şekil 1.3. miR-105'in kanserde çeşitli rolleri ve düzenlenmesi..... 8
Şekil 1.4. Homo sapiens miR-105-5p gen sekans grafiği (miR-105-5p 9
Şekil 1.5. Homo sapiens hsa-mir-105 ve hsa-mir-150-5p'nin genom lokalizasyonu (3'-5'). Kırmızı: Timin=T, Mavi: Sitozin=C, Sarı: Guanin=G, Yeşil: Adenin=A 9
Şekil 3.1 Huh7 hücre hattı 20
Şekil 3.2. HCT116 hücre hattı 21
Şekil 4.1. miR-105-5p mimic, mir-105-5p inhibitor ve Negative Control ile transfekte edilen Huh 7 ve HCT116 hücrelerinin proliferasyon grafiği. (A-B) (****p <0,0001 ve **p=0,0010) 34
Şekil 4.2. miR-105-5p mimic, inhibitör ve negatif kontrol transfekte Huh7 hücrelerinin Real-Time PCR analizi. (A-B-C)(p>0.10). 35
Şekil 4.3. miR-105-5p mimic, inhibitör ve negatif kontrol transfekte HCT116 hücrelerinin Real-Time PCR analizi. (A-B-C)(p>0.10). 36
Şekil 4.4. (A-B)Transfekte HCT116 hücrelerinin methylen blue mix'i ile boyanması sonucu elde edilen koloni görüntüleri ve grafikleri.(B) (*p <0.05 ve p ≥0,1045) 37
Şekil 4.5. (A-B) Transfekte Huh7 hücrelerinin methylen blue mix'i ile boyanaması sonucu elde edilen koloni görüntüleri ve grafikleri.(B) (p>0,0657 ve p>0,1103) 38
Şekil 4.6. Huh7 hücrelerinde transfeksiyon sonrası hücrelerin 40X çekirdek görüntüleri..... 39
Şekil 4.7. HCT116 hücrelerinde transfeksiyon sonrası hücrelerin 40X çekirdek görüntüleri..... 40

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	: mikrolitre
AGO2	: Argonaute RISC Catalytic Component 2
BOS	: Omurilik sıvısı
cdk-6	: Cyclin-dependent kinase 6
cDNA	: Komplementer DNA
cm^2	: santimetre kare
CO_2	: Karbondioksit
COX-1	: Cyclooxygenase-1
DGCR8	: Digeorge Critical Syndrome Region 8
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	: Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether) N,N,N′,N′tetraacetic acid
EMT	: Epitelyal-mezenkimal geçişi
FAP	: Familyal Adenomatöz Polipozis
FBS	: Fetal Bovine Serum
FOSL1	: Fos benzeri antijen 1
GABA	: gamaaminobütirik asit
GABRA3	: gamaaminobütirik asit (GABA) A reseptör alfa 3 alt birimi
GPC1	: Glypican 1
Gr	: gram
H_2O	: Su
HCC	: Hepatocellular carcinoma
HNPCC	: Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser
hTERT	: insan telomeraz ters transkriptazı

IncRNA	: long non-coding RNA
miRNA	: microRNA
ml	: mililitre
mM	: milimolar
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl
NaF	: Sodyum florür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NK	: Natural Killer
O_2	: Oksijen
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PD	: Parkinson hastalığı
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride
Pre-miRNA	: Prekürsör miRNA
pri-miRNA	: primer-miRNA
RNA	: Ribonükleik asit
RNPs	: Ribonükleoprotein kompleksleri
RPMI-1460	: Roswell Park Memorial Institute Medium-1460
SF	: Seyreltme Faktörü

1. GİRİŞ

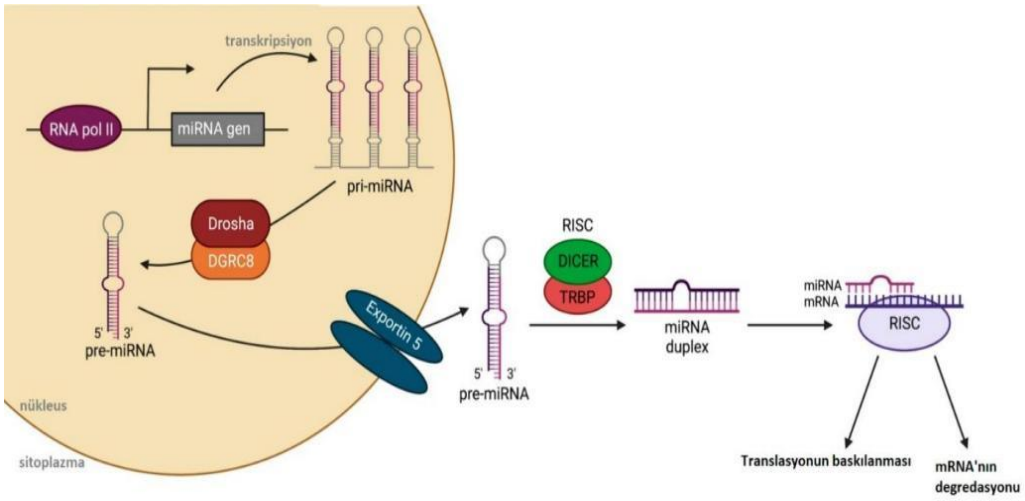
1.1. miRNA

miRNA'lar bir dizi organizmada yaklaşık olarak 18-25 nükleotid büyüklüğünde intron veya ekzonlardan transkribe olabilen endojen kaynaklı gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel/translasyonel seviyede düzenleyen küçük kodlanmayan tek sarmallı düzenleyici RNA inhibitör moleküllerdir. miRNA'lar 1990'ların başında *C. elegans'ta* keşfedilmiş, 1998'de ise transkripsiyon sonrası mRNA'lara spesifik bölgeden bağlanarak translasyonun baskılanması veya bağlandığı mRNA'nın yıkılmasını sağlayarak gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Bağcı ve Caner, 2020; Honeywell, 2010; Li ve ark, 2019; Lu ve ark, 2017; Wei ve ark, 2019; Honeywell ve ark, 2013; Guan ve ark, 2015; Gao ve ark, 2019; Jin ve ark, 2018; Zhang ve ark, 2017; Akkay Ulum, 2018). Ayrıca miRNA'lar epigenetik düzenleyicilerdir. miRNA'lar memelilerde genlerinin yaklaşık olarak %1'lik kısmını oluşturur ve insan vücudundaki genlerin üçte birini kontrol eder (Bağcı ve Caner, 2020). miRNA genleri, tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'unun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Li ve ark,2019).

1.2. miRNA Biyogenezi

miRNA genleri *Homo sapiens'te* Y kromozomunun dışında her kromozomda genellikle bağımsız miRNA gen kümeleri halinde bulunur ve miRNA'lar saç tokası şeklinde tek zincirli yapı içerirler (Honeywell, 2010; Zhang ve ark, 2017; Bağcı ve Caner, 2020). miRNA'lar hücre ve dokulara özgü miRNA genlerin intronlarından RNA polimeraz II veya III aracılığıyla primer miRNA (pri-miRNA) olarak sentezlenir. Ardından çekirdekte yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki pri-miRNA'nın, RNA polimeraz III enzimi (Drosha) ve Drosha'nın kofaktörü'nün (DGCR8) oluşturduğu enzim kompleksiyle intron bölgelerinde saç tokası şeklinde kıvrılıp eşleşerek prekürsör miRNA'ya (pre-miRNA) dönüşür ve eksportin-5 taşıyıcı proteini ile sitoplazmaya taşınırlar (Bağcı ve Caner,2020; Akkay

Ulum,2018). Sitozol'e aktarılan pre-miRNA'lar doğrudan RNaz III endonükleaz'a (Dicer) bağlanır. Dicer, pre-miRNA sap-ilmiğini keser ve ardından çift iplikli olgun miRNA'ların oluşumu gerçekleşir. Ayrıca Dicer, RISC' in (RNA-indüklenmiş susturma kompleksi) oluşumunu da başlatır. Çift iplikli olgun miRNA molekülünün bir ipliği yıkılır diğer ipliği ise RISC ile birleşir. RISC tek iplikli miRNA'yı, mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanması için yönlendirir ve mRNA'nın yıkılmasına veya translasyonun engellenmesine neden olur. Olgun miRNA'lar hücrede kalır ya da ekstrasellüler veziküller aracılığıyla dolaşıma geçerler (Bağcı ve Caner, 2020). miRNA'lar genellikle miRNA'ların 3'-UTR bölgesine bağlanırken ek olarak 5'-UTR (çevrilmemiş bölgesi) bölgesine ve farklı promoter bölgelerine de bağlanarak doğrudan genlere bağlanırlar. Yapılan araştırmalarda; her miRNA'nın 100-200 mRNA hedefi olduğu gösterilmiş ve her bir miRNA, mRNA'nın 3'-UTR bölgesine özel olarak bağlanıp hedeflenmiş olan yüzlerce mRNA'yı düzenleyebildiği ortaya çıkarılmıştır (Honeywell, 2010; Lu ve ark, 2017; Bağcı ve Caner, 2020). miRNA'lar, yalnızca kendi genleri içinde gen ekspresyonunu etkilemekle kalmaz, aynı zamanda hücreler arası iletişimi destekleyen sinyal molekülleri olarak da hareket ederler (Akkay Ulum, 2018).



Şekil 1.1 miRNA biyogenezi (Cerqueira ve ark, (2022)' den modifiye edilmiştir.)

1.3. miRNA'ların Kanser Gelişimine Etkisi ve Önemi

miRNA'nın ekspresyonu, genetik veya epigenetik seviyedeki farklı mekanizmalarla spesifik transkripsiyon faktörlerinin düzensizliği ile de düzenlenir (Li ve ark, 2019). Ayrıca miRNA'lar ya anormal seviyede eksprese edilirler ya da mutasyona uğramaktadır (Gao ve ark, 2019). miRNA'ların ökaryotlar da birçok hücresel gelişim ve kontrol mekanizmasında rolü vardır (Akkay Ulum, 2018). Bazı miRNA'lar tümör baskılama işlevine sahiptir ve kanser hücrelerinde tümörojenik fenotipi inhibe eder (Honeywell ve ark, 2013). Bazı miRNA'lar ise hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki aktivitesine bağlı olarak onkogen bir karakter taşıyabilmektedirler. Böyle miRNA'lar 'onkomiR' olarak bilinmektedir. Onkomirler tümör baskılayıcı genleri veya hücre farklılaşmasını kontrol eden genlerin aktivitesini etkileyerek tümör oluşumu, gelişimi vb. mekanizmalara katkı sağlarlar (Çelik ve ark, 2013) Birçok dokudaki miRNA ekspresyon seviyeleri incelendiğinde bu seviyelerin farklı olması dikkat çekicidir. Bu durum; özgül dokuların özelliklerini ve işlevlerini şekillendirebilmektedir (Akkay Ulum, 2018). Çok sayıdaki miRNA insan kanserlerinde hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre göçü, hücre istilası, anjiyogenez, farklılaşma dahil çoklu hücresel süreçleri düzenlediği bilinmektedir. Sonuçta tümör baskılayıcı ya da onkomiR olarak hareket ederek çok çeşitli fizyolojik veya patolojik olaylara hizmet ederler (Zhang ve ark, 2017; Gao ve ark, 2019; Jin ve ark, 2018; Bağcı ve Caner, 2020). Ek olarak miRNA'lar doğal ve kazanılmış immün yanıtların mekanizmasında, dendritik hücreler, makrofajlar, Natural Killer (NK) hücrelerinin gelişmesinde, Th1 hücre cevabının kısıtlanmasında, yüksek afinite'ye sahip antikorların sentezlenmesinde de görev alırlar (Bağcı ve Caner, 2020). Ayrıca nötrofil ve monositlerin proliferasyonu, B ve T hücrelerinin gelişme ve farklılaşması, inflamatuvar düzenleyicilerin salınımı, antikor aktivasyonu gibi immün cevap ile ilgili yolaklar da etkili olan çok sayıda miRNA tanımlanmıştır (Akkay Ulum, 2018). miRNA'lar diyabet, kalp hastalığı, nörodejeneratif-metabolik-enfeksiyon gibi birçok hastalıklar da ilişkilidir (Honeywell ve ark, 2013; Honeywell, 2010; Bağcı ve Caner, 2020).

miRNA serum, tükürük, gözyaşı, bronş lavajı, plazma, periton sıvısı, idrar, semen sıvısı, beyin omurilik sıvısı (BOS), ovarian foliküler, kan, anne sütü gibi neredeyse tüm vücut sıvılarında tespit edilebilmektedir (Bağcı ve Caner, 2020; Akkay Ulum, 2018). Plazmadaki miRNA'lar tükürük, serum, idrar miRNA'larına göre daha fazladır. Plazmada miRNA'lar dondurup-çözdürme, kaynatma, pH değişimlerine oldukça dayanıklı olup oda sıcaklığı koşullarında dört gün bozulmadan kalabilmektedir. Ayrıca miRNA'lar yalnızca hücre içerisinde bulunmaz ve ekstrasellüler sıvıya geçerek parakrin, otokrin etki ve kan dolaşımıyla endokrin etki de göstermektedir. Biyolojik sıvılarda yer alan miRNA'lar eksozom, mikrovezikül yapısında ve lipoproteinlere bağlı olarak taşınabilmektedir (Bağcı ve Caner, 2020; Lu ve ark, 2017).

Bugüne kadar yapılan bazı araştırmalar da tümör dokusu ile normal dokularda eksprese edilen bazı miRNA'ların ekspresyonlarının anlamı bir şekilde değiştiği görülmüştür. Bununla beraber miRNA'lar üzerine araştırmalar derinleştirilmiş ve tanı ve tedavide kullanılma potansiyelleri fark edilmiştir. Ayrıca miRNA'ların; dokuya spesifik özellik gösterebilmeleri; birçok biyolojik sıvıdan kolaylıkla elde edilebilmeleri ve kararlı yapılarını koruyabilen moleküller olmaları, başta kanser olmak üzere pek çok klinik durumun erken tanısında kullanılabilecek potansiyel biyobelirteç olarak umut vaat etmektedir. Tümör dokusu ile normal dokular karşılaştırıldığında buralarda eksprese edilen miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin tanımlanması ve elde edilen verilerin hastalıkla ilişkilendirilerek değerlendirilmesi, günümüzün en tehlikeli hastalıklarından olan kanserin erken tanısında ve tedavisi için yeni yöntemlerin geliştirilmesinde önemli katkılar sağlayabileceği öngörülmektedir (Çelik ve ark, 2013, Zhang ve ark, 2017; Li ve ark, 2017**)**.

1.3.1. HCC (Hepatocellular Carcinoma) de miRNA'ların Rolü

Karaciğer kanseri ölüm oranı yüksek agresif malign tümörlerden biridir ve kansere bağlı ölümlerde 4. sırada, dünya çapında ise 6. sırada yer alır (Li ve ark,

2021; Morishita ve ark, 2021). HCC, karaciğer kanserinin başlıca histolojik türü olup majör hepatocellular neoplazmlar arasında yer alır ve tüm karaciğer kanserlerinin yaklaşık %80-90'ını oluşturmaktadır (Alqahtani ve ark, 2019; Nagy ve ark, 2018**).** Kansere bağlı ölümlerde 2. sırada yer alan HCC dünyada 5. sırada bulunur **(**Nault ve ark, 2019; Li ve ark, 2021**).** Hepatositlerden köken alarak meydana gelen HCC'nin %90'ı ve daha fazlası hepatik yaralanma ve inflamasyona bağlı olarak ortaya çıkar ve oldukça ölümcüldür (Görür, 2010; Alqahtani ve ark, 2019). HCC'nin total 5 yıllık sağ kalım oranı %5'tir (Shen ve ark, 2014**).** HCC dikkate değer biyolojik ve klinik heterojenite sergiler. HCC'nin hepatokarsinogenez sürecinin genetik, viral ve çevresel faktörlerin kombinasyonuna bağlı olarak moleküler ve genetik bakımından karmaşık olup, farklı genetik değişimlerin gerçekleştiği son derece kompleks ve heterojen bir karakter göstermektedir (Nagy ve ark, 2018; Tüzün ve ark, 2014; Alqahtani ve ark, 2019; Yerli, 2019; Çokaklı, 2006). Bu karmaşıklığa bağlı olarak HCC çok aşamalı süreçte gerçekleşir (Alqahtani ve ark, 2019). HCC hastalarının %30-60'ında p53 kaybı tespit edilmiştir ve bir allelin nokta mutasyonu ile diğer allelin delesyonu en fazla bulunan p53 değişimleridir**.** p53 değişimleri çoğu durumda HCC başlangıcında etkili olmazken gelişiminde etkili olmaktadır (Çokaklı, 2006).

DGCR8, TRBP, DROSHA, DICER1, AGO2 gibi miRNA'ların biyogenezinde yer alan genlerin kaybı olgun miRNA'ların sentezini azaltır ve bu hepatokarsinogenez ve HCC gelişimiyle sonuçlanır**.** miR-222, miR-21, miR-221, miR-145, miR-122a, miR-223, miR-199a miRNA'ları HCC ile ilişkili olan bazı miRNA'lardır. Tümör baskılayıcı genleri hedefleyen miRNA'lar (oncomiR'ler) HCC de upregüle edilir (Morishita ve ark, 2021). HCC de miR-145, miR-223, miR-122, miR-122a, miR-199a, miR-199b, miR-26, let-7g, miR-29, miR-22, miR-139, miR-99a, miR-124 miRNA'ları downregüle edilirken miR-222, miR-21, miR-221, miR-17-5p, miR-135a, miR-10b, miR-182, miR-15 HCC de upregüle edilen bazı miRNA'lardır**.** miR-26, let-7g, miR-29, miR-122, miR-22, miR-139, miR-199b, miR-99a, miR-145, miR-124 miRNA'ları metastaz, hücre büyümesi, anjiogenez,

apoptoz, EMT, invazyon, karsinogenez, migrasyon, kötü prognoz ile ilişkilidir. miR-221 ve miR-222, HCC de en yüksek düzeyde düzensizliğe sahip miRNA'lardır ve Callegari ve ark.'larının hem karaciğerde bu iki miRNA'yı aşırı eksprese eden transgenik modeller geliştirdiğini hem de miR-221 ile miR-222'nin düzensizliğinin HCC'ye neden olduğunu doğruladığını bildirmiştir (Morishita ve ark, 2021; Callegari ve ark, 2012:Morishita ve ark, 2021'den).

1.3.2. Kolon Kanserinde miRNA'ların Rolü

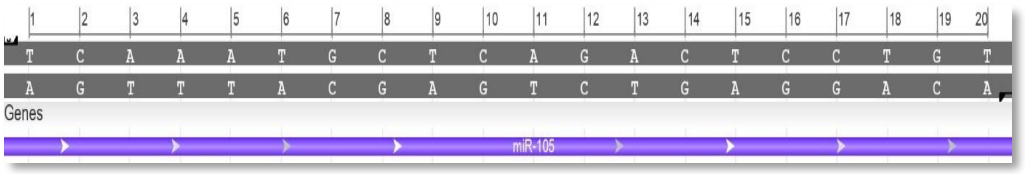
Kolon kanseri en yaygın karmaşık zararlı tümörlerinden biridir ve gastrointestinal tümörler arasında 2. sırasında yer alır (Xi ve ark, 2019; Francipane ve Lagasse, 2013; Wang ve ark, 2017; Cai ve ark, 2021). Kolon kanseri çok kötü prognoza, agresif davranışlara sahip hastalık olduğundan ve hedefe yönelik tedavilerin olmamasına bağlı olarak daha yüksek morbidite gösterir (Liang ve ark, 2020; Diao ve ark, 2021). Kolon kanserinin sağ kalımı üzerindeki en etkili faktörler arasında metastaz ve kanserin nüksü yer alır (Hsu ve ark, 2018).

Kolon kanserinde miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde kalıcı tutarsızlık vardır (Sun ve ark, 2017). miR-451, miR-320b, miR-146a, miR-34a, miR-203, miR-124, miR-187, miR-101 gibi miRNA'lar kolon kanserinin ilerlemesini düzenler (Wang ve ark, 2017). Qin ve ark.'ları kolon kanserinde miR-133a-3p, miR-138-5p, miR-124-3p, miR-378a-3p, miR-133b, miR-422a, miR-150-5p'nin ekspresyon seviyelerinin azaldığını, miR-422a ve miR-138-5p'nin hTERT ile potansiyel olarak etkileşime girdiğini ve hTERT proteininin ile miR-422a ve miR-138-5p ekspresyon seviyeleri arasında önemli negatif korelasyon olduğunu bildirdi (Qin ve ark, 2015). Son zamanlarda artarak yayınlanan makaleler kolon kanseri metastazı ve tümörogenezi ile IncRNA (long non-coding RNA) ekspresyonlarının düzensizlikleri arasında ilişki olduğunu göstermiştir (Liu ve ark, 2020). Ek olarak primer kolon kanserinde karaciğere metastatik kolon kanserine kıyasla miRNA düzensizliği tespit edilmiştir (Salehi ve ark, 2019). Adenom ve kolon adenokarsinomu dahil birçok solid tümörde miR-21 aşırı seviyede eksprese olur (Yang ve ark, 2009). Yang ve

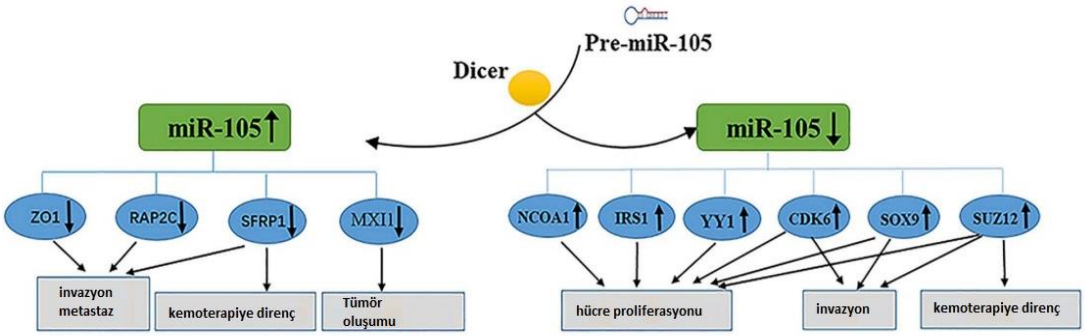
ark.'ları Schetter ve ark.'larının kolon kanserinin kemoterapötilere daha zayıf yanıtı ve daha kötü prognozu ile miR-21'in aşırı ekpresyonu arasında ilişki olduğunu gösterdiğini bildirmiştir (Schetter ve ark, 2008:Yang ve ark, 2009'dan). Strillacci ve ark.'ları, kolon kanseri hücre dizilerinde miR-101'in down regüle edildiğini ve miR-101 ekspresyonu ile COX-1 arasında ters bir korelasyon ilişkisi olduğunu bildirmiştir (Strillacci ve ark, 2019: Lin ve ark, 2011'den**).** Yakın tarihli bir çalışmanın sonucuna göre evre II kolon kanseri hastalarında miR-96-5p ve miR-149 düzeylerinin azaldığı, kolon kanseri dokularında GPC1 ekspresyonunun önemli ölçüde upregüle ediliği bulunmuştur (Li ve ark 2017).

1.4. miR-105 ve miR-105-5p

miR-105 Mourelatos ve ark.'ları 2002'de farklı ribonükleoprotein kompleksleri (RNPs) ile ilişkili moleküller üzerinde inceleme yapılırken keşfedilmiştir. miR-105, gamaaminobütirik asit (GABA) A reseptör alfa 3 alt birimi (GABRA3) geninin intron 1 bölgesinin içinde, X kromozomu (Xq28) üzerinde yer almaktadır. miR-105, 20 nükleotid uzunluğuna ve 5'-TCAAATGCTCAGACTCCTGT -3' sekansına sahiptir (şekil 1.2) (Lee ve ark, 2008; Honeywell, 2010; Honeywell ve ark, 2013; ncbi.nlm.nih.gov). Üç üyeden oluşan miR-105 (miR-105-1, miR-105-2 ve miR-767) insan kromozomunda Xq28 üzerinde lokalize haldedir (Li ve ark, 2019).



Şekil 1.2 *Homo sapiens* miR-105 gen sekans grafiği (GenBank: AF480503.1 ncbi.nlm.nih.gov)

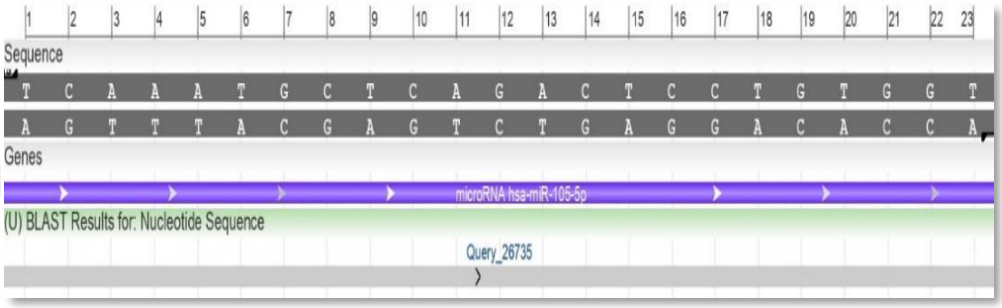


Şekil 1.3. miR-105'in kanserde çeşitli rolleri ve düzenlenmesi (Li ve ark, 2019 dan modifiye edilmiştir.)

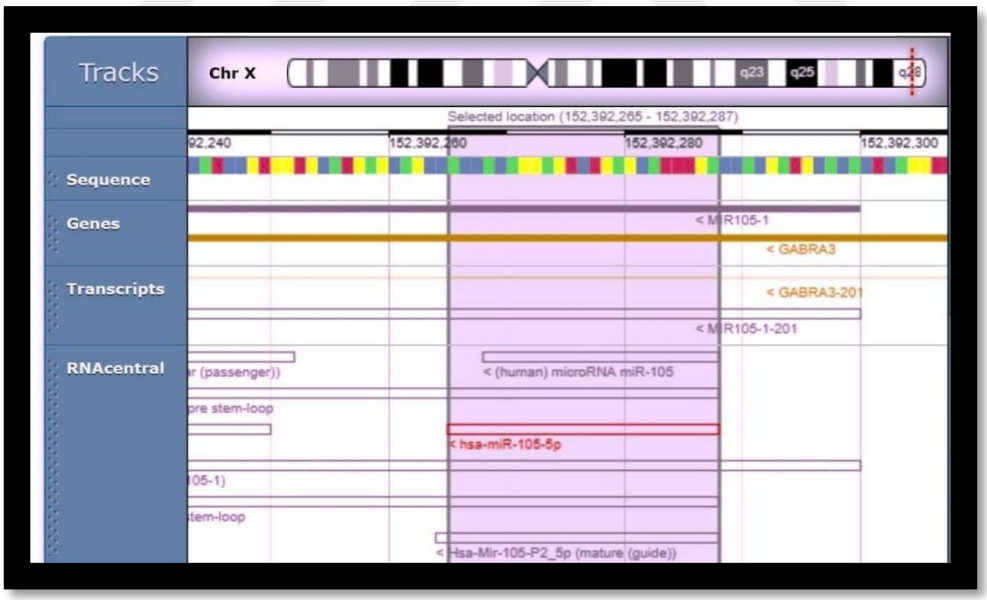
miR-105 kanser hücrelerinde eksozomal olarak salgılanır ve bu da uzak kanser metastazıyla sonuçlanır (Hsu ve ark, 2018). miR-105'in ayrıca hücre proliferasyonunda, koloni oluşumunda, hücre döngüsü ve hücre göçünde baskılayıcı olarak görev aldığı bilinmektedir (Shang ve ark, 2019). Genom çapında yapılan miRNA ekspresyon profilleme çalışmaları, miR-105'in çeşitli doku ve organlarda eksprese edildiğini ortaya koymuş, özellikle yaygın olarak eksprese edildiği kolorektal kanser, hepatosellüler karsinoma (HCC), meme kanseri, akciğer kanseri, mide kanseri vb. malign karakterli hücrelerde anormal bir şekilde eksprese edildiği tespit edilmiştir. Özellikle meme kanseri, küçük hücreli olamayan akciğer kanseri, HCC ve kolorektal kanser dahil çeşitli kanserlerde tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Shang ve ark, 2019). Bununla birlikte, miR-105'in bir onkomiR veya tümör baskılayıcı olup olmadığı ve bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağı konusu net değildir. Çünkü yapılan önceki araştırmalarla elde edilen sonuçlar çoğunlukla birbirleriyle çelişkili sonuçları içermektedir (Li ve ark, 2019).

miR-105 ile aynı lokalizasyon da bulunan miR-105-5p; 23 nükleotid uzunluğunda 5'-TCAAATGCTCAGACTCCTGTGGT-3' sekansına sahip bir miRNA'dır (ncbi.nlm.nih.gov; (şekil 1.4). Literatürde miR-105-5p ile ilgili mevcut bilgiler sınırlıdır. miR-105-5p üzerinde yapılan araştırmalar doğrultusunda hem

nörodejeneratif hem de karsinogenez gibi hastalıklarla ilişkilendirildiği bilinmektedir (Yang ve ark, 2019). miR-105-5p üzerine yapılan araştırmalarda ise miR-105-5p, meme ve melanom kanserlerinde metastazı teşvik ederken glioma da proliferasyonu baskıladığı görülmüştür (Wei ve ark, 2019).



Şekil 1.4. Homo sapiens miR-105-5p gen sekans grafiği (miR-105-5p (GenBank: LM378789.1); ncbi.nlm.nih.gov)



Şekil 1.5. Homo sapiens hsa-mir-105 ve hsa-mir-150-5p'nin genom lokalizasyonu (3'-5'). Kırmızı: Timin=T, Mavi: Sitozin=C, Sarı: Guanin=G, Yeşil: Adenin=A (*rnacentral.org'dan alınmıştır.)*

1.5. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Son yıllarda yapılan araştırmalarda miRNA'ların kanser hücrelerinde belirgin ekspresyon değişimleri gösterilmiş, ayrıca karsinogenez ile ilişkili mekanizmalara olumsuz veya olumlu etkisi de ortaya konulmuştur. Bazı miRNA onkogen özellik gösterirken bazılarının ise tümör supressordür. miR-105-5p ile yapılan az sayıda çalışmada bazı çalışmalarda onkogen bazı çalışmalarda ise tümör supressor olduğu gösterilmiştir. Tümör dokusu ile normal dokular karşılaştırıldığında buralarda eksprese edilen miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin tanımlanması ve elde edilen verilerin hastalıkla ilişkilendirilerek değerlendirilmesi, günümüzün en tehlikeli hastalıklarından olan kanserin tedavisi için yeni yöntemlerin geliştirilmesinde önemli katkılar sağlayabileceği öngörülmektedir. Bu kapsamla birlikte araştırmamızda:

- HCT116 ve Huh7 kanser hücre hatlarında miR-105-5p ekspresyonunun arttırılması ve baskılanmasını sağlayarak miR-105-5p'nin apoptotik ve proliferatif yolaklara etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Jin ve ark, (2011); araştırmalarında kanserlerde çokça sık downregüle edilen miRNA-138 kullanmışlardır. 51 aday ile yapılan araştırmada ilk olarak skuamöz hücreli karsinom da Fos benzeri antijen 1 (FOSL1)'in miRNA aracılığı ile down-regülasyonunu tespit etmişlerdir. 51 aday üzerinde yapılan bu araştırmada miRNA-138 FOSL1'nin downstream genleri (Snail2, E-caderin) üzerine etkisi ve tümör oluşumuna katkılarını göstermişlerdir. Sonuç olarak kanserin başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynayabilecek miR-138'i tanımlamaya çalışmışlardır.

Zhou ve ark, (2014); araştırmalarında metastatik meme kanseri hücreleri tarafından karakteristik olarak eksprese edilen ve salgılanan miR-105'in junction protein olan ZO-1'i hedefleyerek güçlü bir şekilde göçü düzenlediğini bildirmişlerdir. Metastatik olmayan kanser hücrelerinde miR-105'in aşırı ekspresyonunun, uzak organlarda metastaz ve vasküler geçirgenliği indüklediğini gözlemlemişlerdir. Ancak yüksek metastatik kanser hücrelerinde ise miR-105'in inhibisyonu bu etkileri hafiflettiğini eklemişlerdir. Anti- miR-105'in bir tedavi şekli olarak kullanımının metastazı baskıladığı ve tümör kaynaklı miR-105'in niş adaptasyonu üzerindeki sistemik etkisini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. Son olarak elde edilen araştırma sonuçları kapsamında miR-105'in meme kanseri metastazı için terapötik bir hedefin yanı sıra erken tanıda kullanılabilecek kan kaynaklı bir marker olarak kullanılmasını tavsiye etmektedirler.

Loriot ve ark, (2014); araştırmalarında melanom ve akciğer karsinomu dahil çeşitli tümörlerde DNA hipermetilasyonuna bağlı aktivasyon gösteren kanser-germline transkriptini (CT-GABRA3) tanımlamışlardır. CT-GABRA3, vasküler endotelyal bariyeri zayıflatma yeteneği ile kanser metastazının bir promotörü olan bir miRNA'yı (miR-105) barındırdığı, ayrıca 5-metilsitozinlerin hidroksimetiloksine (5hmC) dönüştürülmesinde rol oynayan bir translokasyon tümör baskılayıcı gen ailesinin üyesi olan TET1 ve TET3'te öngörülen hedef bölgeleri olan bir miRNA daha taşıdığını (miR-767), tüm bunlar ışığında azalan TET aktivitesinin kanserin bir

özelliği olduğunu ve miR-767'nin aşırı ekspresyonunun bu duruma katkı sağladığını bildirmişlerdir. Yüksek CT-GABRA3 transkripsiyonunun, akciğer tümörlerinde in vivo olarak düşük TET1 mRNA seviyesi ile korele olduğunu ve miR-767'nin TET1/3 mRNA ve protein ekspresyonunu baskıladığını genomik 5hmC seviyelerini düzenlediğini göstermişlerdir.

Qin ve ark, (2015) araştırmalarında insan telomeraz ters transkriptazın (hTERT) aşırı ekspresyonunu kolorektal kanserin invazyonu ve metastatik özelliği ile ilişkilendirmişlerdir. Ancak bunun altında yatan mekanizma açıklanmış değildir. Burada hTERT ekspresyonunu inhibe eden ve klinik olarak değerlendirilebilecek tümör baskılayıcı miRNA'ları taramayı hedeflemişlerdir. Kolorektal kanser dokularında downregüle edilen miRNA'yı taramışlar ve RT-PCR ile bu sonuçları doğrulamışlardır. Ardından immünohistokimya yöntemiyle hTERT protein ekspresyonunu saptamaya çalışmışlardır. Ardından hTERT ile etkileşim potansiyeline sahip miRNA'lar sağ kalım açısından değerlendirilerek öne çıkan miRNA'ları tespit etmişlerdir. Öne çıkan miR-138-5p ve miR-422a'nın potansiyel olarak hTERT ekspresyonunu inhibe ettiği, özellikle miR-422a'nın kolorektal kanserinde prognostik olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Wang ve ark, (2017) kolon kanserinde yeni miRNA'ların ekspresyon profilini belirlemek amacıyla miRNA mikrodizileri kullanarak kolon kanserli hastalarda ve sağlıklı kontrollerin serumlarındaki miRNA'ların ekspresyonundaki farklılıklarını ortaya koymaya çalışmışlardır. Sonuç olarak hem hasta hem de sağlıklı kontroller arasında 87 miRNA'nın farklı şekilde eksprese edildiğini; bu 87 miRNA'nın 39 tanesi upregüle edilirken, 48 tanesi de downregüle edildiğini göstermişlerdir. Yaptıkları RT-PCR analizi sonucunda anlamlı derecede eksprese olan 5 tane miRNA'nın (miR-31, miR-141, miR-224-3p, miR-576-5p ve miR4669) kolon kanseri erken teşhisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Nagy ve ark, (2018); araştırmalarında HCC prognozu için, daha önceki çalışmalarda potansiyel bir biyobelirteç olarak yayınlanmış olan tüm prognostik biyobelirteçlerin, bağımsız doğrulama yaparak oluşturacakları bir miRNA

ekspresyon kütüphanesi oluşturmayı hedeflemişlerdir. HCC de prognostik miRNA'ların literatür araştırılması için NCBI PubMed veri tabanını (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) kullanmışlardır. HCC için potansiyel prognostik biyobelirteç olarak tanımlanan 223 miRNA içeren 214 tane yayını ortaya çıkarmışlardır. Sonuç olarak; burada yer alan verileri analiz etmişler ve HCC de kullanılabilecek prognostik miRNA'ları değerlendirmek üzere miRNA ekspresyon entegreli bir veri tabanı oluşturmuşlardır.

Shen ve ark, (2019); karsinogenez de miRNA'nın altında yatan mekanizmaların açıklanması ve miRNA etki mekanizmasının düzensizliğinden yola çıkarak yaptıkları araştırmada; sağlıklı veya kanserle ilişkili olmayan dokularla karşılaştırıldığında, miR-105'in HCC dokularında anlamlı bir şekilde downregüle edildiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca miR-105'in, HCC hücre proliferasyonunu baskıladığını ve PI3K/AKT sinyalini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Sonuçlar doğrultusunda miR-105'in HCC hastaları için tümör baskılayıcı bir işlev görmesi, onun potansiyel bir terapötik hedefi temsil edebileceğini bildirmişlerdir.

Li ve ark, (2020); araştırmalarında miR-137'in kanser hücresini baskılayıcı ya da teşvik edici özellikte olabileceğini ancak; mesane, meme, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde up regüle edilerek invazyonu teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Kou ve ark, (2021); yumurtalık kanserinde gelişen sisplatin direncinin mekanizmasını araştırmak amacıyla hsa-miR-105-1'in sisplatine dirençli yumurtalık kanseri hücrelerinde nasıl etki ettiğini incelemişlerdir. Öncelikle sisplatine duyarlı yumurtalık kanseri hücrelerinde miR-105-1 ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile ölçmüşlerdir. miR-105-1'in hedef genini ANXA9 olarak tanımlamışlar ve ANXA9 ekspresyonunu RT-PCR, western blot ve immünofloresan ile değerlendirmişlerdir. miR-105-1'in işlevini doğrulamak amacıyla hem miR-105-1 susturma deneyleri yapılmış, hem de aşırı eksprese olmasını sağlamışlardır. Ayrıca apoptozla ilgili pek çok proteinin ekspresyon seviyelerini western blot yöntemi ile analiz etmişler, sonuç olarak; miR-105-1 ekspresyon seviyelerinin, sisplatine dirençli hücrelerde anormal

şekilde downregüle olduğu, ANXA9 ekspresyonunun ise büyük ölçüde bu hücrelerde upregüle edildiğini, miR-105-1 ekspresyonunun downregülasyonu sisplatin direncini arttırdığı, upregülasyonunun ise sisplatine duyarlılığını geri kazandırdığını bulmuşlardır.

Morishita ve ark, (2021); araştırmalarında miR-21'in, tümör gelişimi ile ilişkili olan onkojenik miRNA'lardan biri olduğunu ve fibrozu teşvik etmekle birlikte HCC hastalarında dokularda ve serumda önemli ölçüde upregüle edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca miR-181b ve miR-21'in gelişmiş ekspresyonu HCC de doxorubicin ve IFN-5-florouracil tedavisinde ilaç direncine neden olduğunu ve miR-195, miR-15, miR-16, miR-322, miR-497 hepatokarsinogenezi ve hepatik fibrozisi düzenlediğini ortaya koymuşlardır.

Yang ve ark, (2019); Parkinson hastalığı (PD) üzerine yaptıkları araştırmada, bu hastalıkta tanıya yardımcı olacak ayırt edici bir biyobelirteç bulmayı amaçlamışlardır. Bu çalışmada PD biyobelirteci olarak kullanılabilecek miRNA'ları taramışlar ve bunun için bir PD miRNA-mRNA veri ağı oluşturmuşlardır. Yapılan biyoinformatik analizi sonucunda PD için potansiyel biyobelirteç olarak miR-105-5p'yi tanımlamışlardır. Ayrıca idiyopatik PD, nörolojik hastalık kontrolleri ve sağlıklı kontrollerin plazmasındaki miR-105-5p ekspresyon seviyesi RT-PCR ile ölçmüş, idiyopatik PD hastalarının plazmalarında miR-105-5p'nin aşırı eksprese olduğunu göstermişlerdir. Araştırmalarının sonucunda miR-105-5p'in idiyopatik Parkinson hastalarında güçlü bir biyobelirteç adayı olduğunu bildirmişlerdir.

Honeywell ve ark, (2013); miRNA ekspresyonunun prostat tümörü büyümesine ve ilerlemesine nasıl katkıda bulunduğunu daha iyi anlamak amacıyla yürüttükleri araştırmalarında; iki invaziv prostat tümörü hattı olan PC3 ve DU145'te miRNA ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonucunda araştırmalarını, daha önce prostat kanseri ile bağlantılı olmayan yeni bir miRNA olan miR-105 üzerinde devam ettirmişlerdir. miR-105 ekspresyon seviyelerinin normal prostat epitel hücrelerine kıyasla her iki tümör hücre hattında önemli ölçüde azaldığını gözlemlemişlerdir. miR-105'in aşırı ekspresyonunun; tümör hücresi

proliferasyonunu, ankrajdan bağımsız üç boyutlu koşullarda tümör büyümesini, in vitro tümör invazyonunu ve agresif tümör özelliklerini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca miR-105'in aşırı ekspresyonunun ksenograft modelleri üzerinde yapılan analizler sonucunda da tümör büyümesini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

Shang ve ark, (2019)**;** mide kanserinde miR-105 ve cinsiyet belirleyici Y-box 9 (SOX9)'un moleküler mekanizmasını araştırmayı amaçlamışlardır. Araştırmalarında E-cadherin, N-cadherin, Vimentin ve SOX9'un protein düzeyini western blot ile göstermişler, göç ve invazyon kapasitesini ölçmek için transwell analizini kullanmışlardır. Mide kanserinde SOX9'u hedefleyen miR-105'i belirlemek amacıyla Lusiferase analizini kullanmışlardır. Analizlerin sonucunda; miR-105'in mide kanseri doku ve hücrelerinde downregüle edildiğini, mide kanserinde hücre göçü, invazyon ve epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) baskıladığını göstermişlerdir. SOX9'un ise mide kanseri hücrelerinde upregüle olduğu, miR-105'ın SOX9'a bağlanarak mide kanserinde tümör baskılayıcı olara görev yaptığını bildirmişlerdi.

Miliotis ve Slack (2021); araştırmalarında miR-105-5p'nin mide kanserinde aşırı ekspresyonunun hem toplam hem de yüzey ekspresyon seviyelerinde PD-L1 (programlanmış ölüm ligandı 1) ekspresyonunun azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir. miR-105-5p'nin aşırı ekspresyonunun uyarılması, kansere özgü GABRA3 promotorünün hipometilasyonu yoluyla gerçekleştirildiğini, son olarak miR-105-5p'nin aşırı ekspresyonu, PD-L1'nin downregülasyonu ile kanser hücrelerinin immünojenitesini artırdığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL & YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

3.1.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve hazırlanmaları

- **%10 FBS ve %1 antibiyotik içerikli RPMI-1460:** 500 ml RPMI-1460 içerisine 56 ml FBS ve 5,6 ml antibiyotik eklendi ve pipetajlandı.
- **PMSF:**0,174 g PMSF 10 ml DMSO (Amresco, 67-68-5) içerisinde çözdürülerek 100 mM stok çözelti hazırlandı.
- **EDTA:** 1,86 gr EDTA (TEKKİM, TK.930072.01002) ile 5 ml distile su karıştırılır ve yavaşça NaOH (AROMEL Kimya, 215-185-5) eklenerek çözdürülür. Ardından pH'si 8'e ayarlanır ve son hacmi 10 ml' ye tamamlanarak 100 mM stok çözelti hazırlandı.
- **EGTA:** 0,380 gr EGTA (Sigma-Aldrich, 67-42-5) ile 5 ml distile su karıştırılır ve yavaşça NaOH eklenerek çözdürülür. Ardından pH' si 8'e ayarlanır ve son hacmi 10 ml'ye tamamlanarak 100 mM stok çözelti hazırlandı.
- **NaF:** 0,42 gr NaF (AROMEL Kimya, 7681-49-4) 10 ml distile su içerisinde çözdürülerek stok çözelti hazırlandı.
- **%5 MTT Boyasının hazırlanması:** 0,125 g MTT (BioFroxx, 298-93-1) tartılarak 25 ml 1X PBS içerisinde vortekslenerek çözünmesi sağlandı ve antibakteriyel filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Böylece stok MTT boyası hazırlandı alikotlanarak -20°C'ye kaldırıldı.
- **Methylene blue mix:** 0,4 gr Methylene blue (MERCK,7498622) %50 metanol (MERCK, 6008.2500), %50 distile su içerisinde çözdürülerek 10 ml stok çözelti hazırlandı.
- **%75 etanol hazırlama:** 15 ml %96 etanol (ALLTEK, 64-17-5) ile 5 ml nükleaz free su karıştırılarak hazırlandı.

- **Aprotinin:** 5 ml aprotinine (5 mg/µl) 1 ml distile su eklendi ve karıştırılarak homojen hale getirildi.
- **Löpeptin:** 5 mg löpeptine (5 mg/µl) 1 ml distile su eklendi ve karıştırılarak homojen hale getirildi.
- Distile su Thermo scientific Pasific III cihazından elde edildi.

3.1.2. Cihazlar

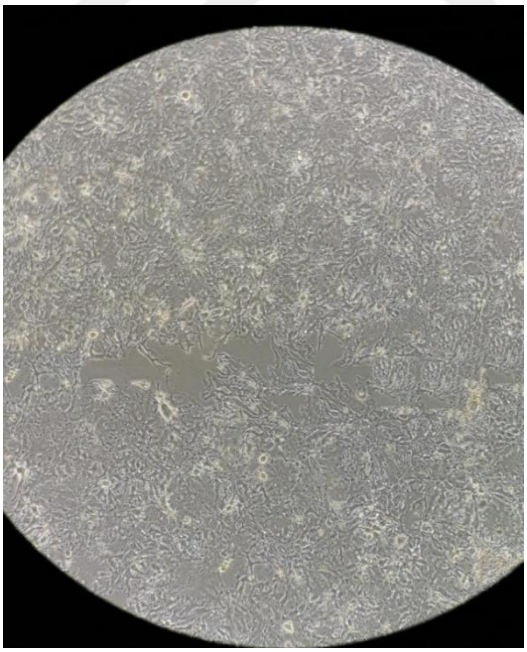
Çizelge 3.1. Cihazlar ve kullanım amaçları

Cihazın adı/ modeli	**Çalışmadaki kullanım amacı**
Hassas terazi (NECKLİFE, FLY-2004 (FA2004))	MTT'yi tartmak
Soğutmalı santrifüj (Beckman (Allegra)),21R Centrifuge)	Çöktürme işlemleri
Vorteks (VELP scientifica, C17)	Karıştırma işlemleri
-20 derin dondurucu (Bosh, GSD1140NE)	cDNA örneklerinin uzun süreli saklanması
Elisa reader (biochrom, EZ Read 400)	Proliferasyon çalışmalarında canlı hücre sayısını belirlemek
Cerrahi aspiratör (Elmaslar (Life Time) SA0820020345)	Hücre kültürü çalışmalarında plate'lerdeki RPMI ve PBS'nin aspire edilmesi
Mikroskop (OLYMPUS, CKX53)	Hücre kültüründe hücreleri kontrol etmek, transfekte hücrelerin çekirdeklerini gözlemlemek
Termal cycler ((Applied Biosystem), 2720)	RNA örneklerinden çift zincirli cDNA sentezi
Su banyosu (Thermomac, WB15)	Hücre kültürü için RPMI, FBS, PBS'nin oda sıcaklığına getirmek
Quantus Floumeter (Promega, TM396)	RNA miktarını ölçmek
Mini centrifuge (Operation manual) (ALLSHENG, Mini-6KC)	Mikrosantrifüj tüplerinin çeperlerindeki kimyasalları tüpün dibinde toplamak
Manyetik karıştırıcı (Shaker) (OSCİLLATOR, TYZD-IIIA)	Proliferasyon deneyi
Termal cycler (Applied Biosystem, seri no:7500)	Real-Time PCR
Cerrahi aspiratör (Plusmed, Seri no: YT15062207)	Proliferasyon okutması ve RNA izolasyonu
Bilgisayar (LG, exper)	Proliferasyon okutması
+4 dolap (UĞUR, Elektrolux ZANUSSİA)	Proliferasyon okutması
Hücre kültürü kabini (TEZ SAN Laboratuvar tezgah)	Hücre kültürü
CO_2 inkübatörü (Thermo Electron Corporation, RS 485)	Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin inkübasyonu
Pipetor	Hücre kültürü
Buz makinesi (Automatic Ice Marker, IMS 50)	RNA izolasyonu
Etüv (Nüve, EN 500)	Koloni formasyon deneyinde kolonileşen hücrelerin metilen blue mix'i ile inkübasyonu

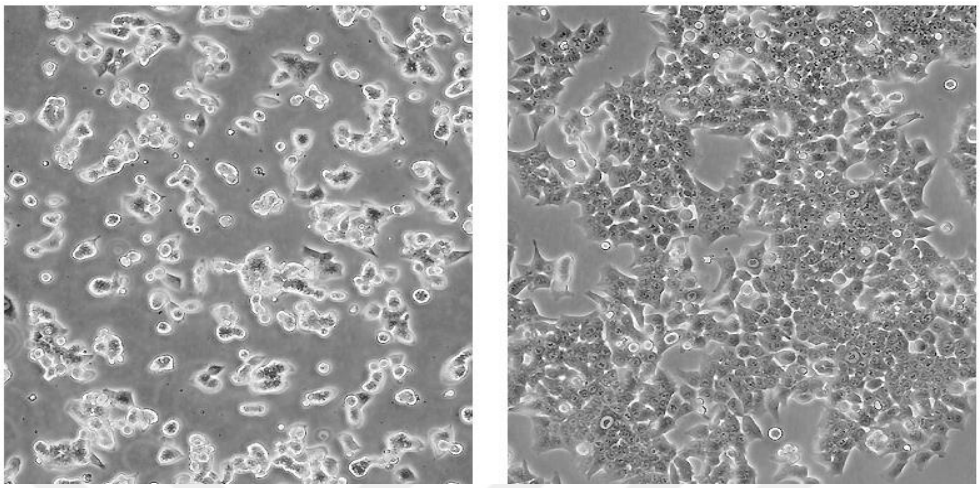
3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Hatları ve Hücre Kültürü

Araştırmamızda hepatosellüler karsinom hücre hattı olan Huh7 (IBG İzmir Prof. Mehmet ÖZTÜRK'ten) ve kolon kanseri hücre hattı olan HCT116 (Prof. Dr. M. Bertan Yılmaz'dan) kullanıldı. Hücreler %10 FBS (Fetal Bovine Serum) (HyClone Cat. No: SV30160.03), %1 antibiyotik (HyClone Cat. No: SV30079.01) ve 2.05 mM L-Glutamine ile desteklenen (Roswell Park Memorial Institute Medium) RPMI-1640 (1X)(HyClone Cat. No: SH30027.01) içerisinde büyütülüp, %5 CO_2 ve %21 O_2 içeren 37^0C inkübatör de (Thermo Electron Corporation) muhafaza edildi. Plate'yi kaplayan hücreleri gerektiğinde yıkamak için 1X PBS Phosphate Buffered Saline (HyClone Cat. No: SH30256.01), kaldırmak için ise Tripsin (HyClone Cat. No: SH30042.01) kullanıldı. İzolasyon sonunda elde edilen RNA peletleri nükleaz free H_2O ile resüspanse edildi. Deneyde kullanılan bütün çözücüler ve reaktifler ticari olarak temin edilmiştir.



Şekil 3.1. Huh7 hücre hattı



Şekil 3.2. HCT116 hücre hattı

3.2.1.1. Hücrelerin Pasajlanması

37℃'ye ayarlı su banyosunda %1 antibiyotik ve %10 FBS içerikli RPMI-1640 mediumu (1X) ısıtıldı ve hücre kültürü kabinine alındı. İnkübatör de büyümeye bırakılan HCT116 ve Huh7 hücreleri mikroskop altında incelendi ve pasajlanmaları için yeterli yoğunluğa (yaklaşık olarak %70-80) ulaştığı gözlemlendi. Ardından bu hücreler, hücre kültürü kabinine alındı. Serolojik pipetler kullanılarak hücrelerin ortamları çekildi ve PBS (1X)(HyClone Cat No: SH30256.0) ile hücrelerin yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işleminin ardından büyüme ortamlarından PBS'ler çekildi. Plate'nin tabanına yapışık halde bulunan hücreler enzimatik olarak süspansiyon halde elde etmek amacıyla tripsin (HyClone Cat No: SH30042.01) ile muamele edildi ve inkübatör de 37℃'de 5 dakika inkübe edildi. Tripsin ile muamele edilen hücrelerde enzimatik parçalanmanın gerçekleşme durumu mikroskopta incelendi. Hücrelerin süspansiyon halde olması enzimatik parçalanmanın bir göstergesidir ve hücre kabininde tripsin miktarının 4 katı oranında %1 antibiyotik ve %10 FBS içerikli RPMI-1640 mediumu (1X) eklendi. Elde edilen hücre süspansiyonu pipetajlanarak homojen hale getirildi ve plate içerisinde bir miktar bırakılarak 3 adet 3 cm^2'lik plate'lere (TPP Cat No: 93040) bölündü. Ardından

plate'lere %1 antibiyotik ve %10 FBS içerikli RPMI-1640 mediumu (1X) eklendi ve pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Ardından hücrelerin büyümesi için plate'ler tekrar %5 CO_2 içerikli 37°C'ye ayarlı inkübatöre alındı.

3.2.1.2. Thoma Lamı İle Hücre Sayısını Belirleme

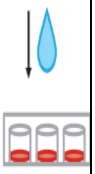
İhtiyaç duyulan sayıda hücreleri elde etmek amacıyla kullanılan Thoma Lamı ile hücre sayımı yönteminde Thoma Lamı; 16 büyük kare ve her büyük karede 25 tane küçük kare olacak şekilde toplamda 400 küçük kareden oluşan özel bir lamdır. Thoma lamı üzerinde sayılan hücreler A x SF x 10.000 formülü kullanılarak hesaplanmaktadır. A= 16 büyük karede sayılan hücre sayısını, SF= seyreltme faktörünü ifade etmektedir. 10.000 ise 0,1 mm^3'deki sayımda elde edilen sonucun 1 ml' deki sayıya dönüştürmek ve standard bir sonuç elde etmek amacıyla kullanılan bir sabittir (Dilek, 2017). Transfekte hücreler tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı ve seyreltme işlemi gerçekleştirilmeden thoma lamının her bölmesine 10'ar µl eklenerek mikroskop altında hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Ardından A x SF x 10.000 formülü ile hücre sayısı hesaplandı.

3.2.2. Huh7 ve HCT116 Hücrelerinde miR-105-5p'nin Upregülasyonu ve Downregülasyonu

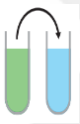
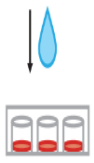
Hem kötü prognoza sahip olduklarından hem de tanısı geç konulduğundan ölüm insidansı ve mortalitesi yüksek olan karaciğer (Huh7) ve kolon kanseri (HCT116) hücre hatlarında miR-105-5p'nin hTERT ekspresyonu ve hücreler üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla IBG İzmir'den elde edilen Huh7 ve Prof. Dr. M. Bertan Yılmaz'dan elde edilen HCT116 hücre hatlarında transfeksiyon işlemi için hsa-miR-105-5p mirVana miRNA mimic (Ambion life technologies Cat No:4464066), hsa-miR-105-5p mirVana™ miRNA Inhibitors (Ambion life technologies Cat No: 4464066), anti-miR™ Negative Control # 1 (Ambion life technologies Cat No:AM17010) satın alındı. hsa-miR-105-5p-mimic ve hsa-miR-

105-5p-inhibitör'ün sekansları aşağıdaki gibidir: 5'-UCAAAUGCUCAGACUC CUGUGGU-3'. Pasajlamadan 24 saat sonra %60-80 konfulense ulaşan hücreler anti-miR™ Negative Control # 1 protokolü ile Lipofectamine® RNAiMAX Reagent (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Cat No: 13778-030) kullanılarak çizelge 3.3'teki adımlar izlenerek transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyon esnasında FBS ve antibiyotik içermeyen RPMI-1460 kullanılarak miR-105-5p-mimic, miR-105-5p inhibitör, miRNA negatif kontrol ve lipofektaminler seyreltildi. Transfeksiyon işlemi uygulanırken protokolden farklı olarak 4. adımdan sonra hazırlanan mix'ler yavaşça 1 defa pipetajlanarak hücrelere verildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra 500 µl Tripsin ve 2 ml %10 FBS ve %1 antibiyotik içerikli RPMI-1460 kullanılarak hücreler kaldırıldı ve kendi plate'lerinde de bir miktar hücre süspansiyonu bırakılarak 2 6 cm2'lik plate'ye (TPP Cat No:93060) bölündü

Çizelge 3.2 Ambion life technologies™ marka Anti-miR™ miRNA Inhibitors-Negative Control #1

Zaman	**Basamaklar**			**Prosedür ayrıntıları**			
0.h	**1**		Transfeksiyon için hücreler %60-80 konfulense ulaşmalı	**Bileşen**	**96-well**	**24- well**	**6-well**
				Adherent hücreler	1-4 x10^4	0.5-2 x10^5	**0.25-1 x10^6**
24.h	**2**		Lipofectamine® RNAiMAX Reagent'ini Opti-MEM® Medium ile seyreltme	Opti-MEM® Medium	25 µl	50 µl	**150 µl**
				Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	1.5 µl	3 µl	**9 µl**
	3		miRNA'yı Opti-MEM® Medium içinde seyreltme	Opti-MEM® Medium	25 µl	50 µl	**150 µl**
				miRNA (10 µl)	0.5 µl (5 pmol)	1 µl (10 pmol)	**3 µl (30 pmol)**
	4		Seyreltilmiş miRNA'yı Lipofectamine® RNAiMAX Reagent'ine Ekleme (1:1 oranında)	Seyreltilmiş miRNA	25 µl	50 µl	**150 µl**
				Seyreltilmiş Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	25 µl	50 µl	**150 µl**
	5		İnkübasyon	Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon			
	6		Hücrelere miRNA-lipit kompleksi ekleme	**Bileşen**	**96-well**	**24- well**	**6-well**
				Kuyucuk başına miRNA-lipit kompleksi	10 µl	50 µl	250 µl
				Kuyucuk başına kullanılan son miRNA	1 pmol	5 pmol	25 pmol
				Kuyucuk başına kullanılan son Lipofectamine® RNAiMAX	0.3 µl	1.5 µl	7.5 µl
48.h - 96.h	**7**		Transfekte hücrelerin görselleştirilmesi/analiz edilmesi	Hücreler 1-3 gün 37° C'de inkübe edilir. Ardından transfekte edilmiş hücreler analiz edilir.			

Çizelge 3.3. Optimize edilen Ambion life technologies™ marka Anti-miR™ miRNA Inhibitors Negative Control #1

Zaman	Basamaklar			Prosedür ayrıntıları			
0.h	**1**		Transfeksiyon için hücreler %60-80 konfulense ulaşmalı	**Bileşen**	**96-well**	**24-well**	**6-well**
				Adherent hücreler	1-4 x10^4	0.5-2x10^5	**0.25-1 x10^6**
24.h	**2**		Lipofectamine® RNAiMAX Reagent'ini Opti-MEM® Medium ile seyreltme	Opti-MEM® Medium	25 µl	50 µl	**150 µl**
				Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	1.5 µl	3 µl	**9 µl**
	3		miRNA'yı Opti-MEM® Medium içinde	Opti-MEM® Medium	25 µl	50 µl	**150 µl**
				miRNA (10 µl)	0.5 µl (5 pmol)	1µl (10 pmol)	**3µl (30 pmol)**
	4		Seyreltilmiş miRNA'yı Lipofectamine® RNAiMAX Reagent'ine Ekleme (1:1 oranında)seyreltme	Seyreltilmiş miRNA	25 µl	50 µl	**150 µl**
				Seyreltilmiş Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	25 µl	50 µl	**150 µl**
	5		İnkübasyon	Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon			
	6		Hücrelere miRNA-lipit kompleksi ekleme	**Bileşen**	**96-well**	**24-well**	**6-well**
				Kuyucuk başına miRNA-lipit kompleksi	10 µl	50 µl	**300 µl**
				Kuyucuk başına kullanılan son miRNA	1 pmol	5 pmol	**25 pmol**
				Kuyucuk başına kullanılan son Lipofectamine® RNAiMAX	0.3 µl	1.5 µl	**7.5 µl**
48.h-96.h	**7**		Transfekte hücrelerin görselleştirilmesi/analiz edilmesi	Hücreler 1-3 gün 37° C'de inkübe edilir. Ardından transfekte edilmiş hücreler analiz edilir.			

3.2.3. Transfekte Huh7 ve HCT116 Hücrelerinden RNA İzolasyonu

Transfekte Huh7 ve HCT116 hücrelerinde hTERT ve apoptoz genlerinin (p53 ve p21) ekspresyon düzeylerini kontrol etmek amacıyla transfeksiyon işleminden 48 saat sonra Hibrizol reaktifi (Hibrigen Cat No:MG-HBRZ-01) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. 6 cm^2'lik plate'ye ekili transfekte hücrelerinin izolasyonu RNA yıkanma basamağına kadar buz üzerinde gerçekleştirildi ve homojenizasyon aşamasında hücrelerin ortamları çekildikten sonra 3 kez 20X'ten 1X'e seyreltilen PBS (Thermo Scientific Cat No: 28348) ile yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra protein izolasyonu gerçekleştirilme durumu olma ihtimaline bağlı olarak çizelge 3.4'teki proteaz inhibitörleri kullanılarak proteaz inhibitörlü Hibrizol mix'i hazırlandı ve hücrelere 625,8'er µl eklenip hücreler kendi kültür kaplarında pipetajlanarak lize edildi. Ardından izolasyona Hibrizol reaktifinin protokol adımları izlenerek izolasyon devam ettirildi. Ancak protokolün faz ayrımı aşamasında 120 µl kloroform (Riedel-deHaën Cat No: 22216) yerine 1200 µl kloroform kullanıldı. RNA çöktürme aşamasında örnek tüplerinin diplerinde pelet oluşumu gözlemlenmediği için ekstra 5 dakika daha santrifüjleme yapıldı. İzolasyon sonunda pelet olarak elde edilen RNA örnekleri 40 µl nükleaz free su (HyClone Cat No: SH30538.02) içerisinde resüspanse edildikten sonra -86°C'ye kaldırıldı.

Çizelge 3.4. Proteaz inhibitörü mix'i komponentleri ve miktarları

Proteaz inhibitörü	**Kons.**	**1 ml için (µl)**	**600 µl (0,6 ml) için [1 plate] (µl)**	**3.5 plate [1800 µl] için (µl)**
Aprotinin	5 mg/ml	1	1000 µl için 1 µl kullanılacaksa 600 µl için X **µl** X: 600/1000 = 0,6	3,5*0,6 = 2,1
Löpeptin	5 mg/ml	2	1000 µL için 2 µl kullanılacaksa 600 µl için X µl X: (600*2) / 1000 = 1,2	3,5*1,2 = 4,2
PMSF	100 mM	10	1000 µl için 10 µl kullanılacaksa 600 µl için X µl X: (600*10) / 1000= 6	3,5*6= 21
EDTA	500 mM	10	1000 µl için 10 µl kullanılacaksa 600 µl için X µl X: (600*10) / 1000 = 6	3,5*6= 21
EGTA	100 mM	10	1000 µl için 10 µl kullanılacaksa 600 µl için X µl X: (600*10) / 1000 = 6	3,5*6 = 21
NaF	500 mM ya da 1M	10	11000 µl için 10 µl kullanılacaksa 600 µl için X µl X: (600*10) / 1000 = 6	3,5*6 = 21
Toplam	**Toplam**	**Toplam**	**25,8**	**25,8 *3,5 = 90,3**

3.2.4. Transfekte Huh7 ve HCT116 hücrelerinden miRNA İzolasyonu

hsa-miR-105-5p-mimic, hsa-miR-105-5p-Inhibitors, Negative Control 'ün transfekte edilen **Huh7** ve HCT116 hücrelerine girip girmediğini kontrol etmek için transfeksiyondan 48 saat sonra Quick-RNA™ Miniprep Plus Kiti (Zymo Research Cat No:R1057) ile small RNA'ların sentezi gerçekleştirildi. Hücreler tripsin ile kaldırılıp pelet olarak elde edildikten sonra peletlere 300'er µl RNA Lysis Buffer (Zymo Research Cat No: R1060-1-50) ve DNA/RNA Shield (Zymo Research Cat No: R1200-25) eklenip pipetajlanarak lize edildi. Ardından kitin basamakları izlenerek önce hücrelerdeki total RNA'lar elde edildi. Daha sonra bu total RNA'lardan yalnızca small RNA'lar (17-200 nt) pelet olarak elde edildi ve 50 µl nükleaz free su ile resüspanse edildi. Total RNA'lardan small ve large RNA izolasyonu aşamasında 100'er µl Lysis Buffer ve 100'er µl etanol kullanıldı.

3.2.5. Proliferasyon Deneyi

Transfekte edilen ve 6 cm^2'lik plate'ye split edilen adherent Huh7 ve HCT116 hücrelerinin proliferasyon hızlarını ölçmek için hücreler 1 ml tripsin ve 4

ml %10 FBS ve %1 antibiyotik içerikli RPMI-1460 kullanılarak kaldırıldı. Ardından elde edilen bu hücre süspansiyonu pipetajlanarak homojen hale getirildi. Elde edilen homojen Huh7 hücre süspansiyonundan bir miktar alınarak thoma lamında (Precicolor HBG) hücre sayımı gerçekleştirildi. Sayım sonucunda elde edilen değer kullanılarak her kuyucuğa 3000 hücre düşürebilmek için hesaplama yapıldı ve %10 FBS ve %1 antibiyotik içerikli RPMI-1460 ile hücre süspansiyonu mix'i hazırlandı ve pipetajlanarak homojen hale getirildi. Ardından yeni hazırlanan hücre süspansiyonu 0h, 24h, 48h 72h şeklinde etiketlenen 4 adet 96 well-plate'nin kuyucuklarına (TPP Cat No:92096) 3000 hücre/well olacak şekilde 4 tekrarlı olarak kuyucuklara 200 µl eklenerek mikroskop altında incelendi ve inkübatöre kaldırıldı. Aynı işlemler HCT116 hücrelerine de uygulandı ve böylece 0h (kontrol grubu), 24h, 48h ve 72h koşullarında proliferasyon deneyi düzenekleri hazırlandı. Her 2 hücrenin 0. saat plate'sinde hücreler yapıştıktan sonra plate'lerin kuyucuklarına 20'er µl %5 MTT boyası eklendi ve 4 saatlik inkübasyon için inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyonun ardından kuyucukların ortamları çekildi ve 50'şer µl izopropanol (Sigma Cat No: 200-661-7) eklendi. Plate'ler manyetik karıştırıcı da (shacker)(OSCİLLATOR Seri No.TYZD-IIIA) 15 dakika çalkalanarak inkübe edildi ve ardından eliza reader de (biochrom Seri No: EZ Read 400) 570 nm dalga boyunda okutularak canlı hücrelerin sayısı belirlendi. Diğer plate'ler de koşullarına deney düzeneği hazırlandıktan 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonra koşul etiketlemesine bağlı olarak 0h saatte olduğu gibi canlı hücrelerin değerleri belirlendi. Bu değerlerin kat farkları ve yüzdelikleri hesaplanarak GraphPad Prism 9 ile grafikleri elde edildi.

3.2.6. Koloni Formasyon Deneyi

miR-105-5p'nin Huh7 ve HCT116 hücrelerinde koloni oluşturma özelliği üzerindeki etkisi gözlemlemek ve miR-105-5p'nin bu kanser hücrelerindeki onkojenik potansiyelini ölçmek amacıyla miR-105-5p-mimic, miR-105-5p-inhibtör ve negatif kontrol transfekte Huh7 ve HCT116 hücreleri ile koloni formasyon deneyi gerçekleştirildi. Bunun için aşağıdaki adımlar izlendi. Transfekte Huh7 ve HCT116

hücrelerinin thoma lamı sayımıyla elde edilen hücre miktarı kullanılarak kuyucuk başına 300 ve 500 hücre düşürebilmek için hesaplama yapıldı. Bu hesaplama baz alınarak %10 FBS ve %1 antibiyotik içerikli RPMI-1460 ile hücre süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan bu hücre süspansiyonu pipetajlanarak homojen hale getirilip koşullarına göre etiketlenen 4 adet 6 well-plate'nin (TPP Cat No:92006) kuyucuklarına 3'er ml eklenerek mikroskopta incelendi. Ardından plate'ler inkübatöre kaldırıldı ve böylece koloni formasyon deneyi düzenekleri hazırlandı. Hücrelerin ortamları kontrol edilerek %10 FBS ve %1 antibiyotik içerikli RPMI-1460 ile 2 günde bir değiştirildi. Deney düzenekleri kurulduktan 4 gün sonra HCT116 hücrelerinde kolonileşme gerçekleşirken Huh7 hücrelerinde 12 gün sonra hücre kolonileri meydana geldi. Kolonileşen hücrelerin ortamları çekilip atıldı ve her kuyucuğa 900'er µl metilen blue mix' eklenerek 1 saat 37℃ 'de (etüvde) inkübe edildi ve ardından kuyucuklar yıkandı. Well-plate'ler kuruduktan sonra her kuyucuğun resmi çekilerek kuyucuklardaki hücre kolonilerinin görüntüleri kaydedildi. Deney sonunda kuyucuklarda elde edilen kolonilerin sayısı Image J programı ile sayılarak belirlendi ve kat farkları hesaplanarak GraphPad Prism 9 ile grafikleri elde edildi.

3.2.7. RNA ve miRNA Ölçümü ve Reverse-Transkriptaz PCR ile cDNA Sentezi

İzole edilen RNA ve miRNA örneklerinin miktarlarını ölçmek amacıyla QuanFluor® RNA Sample Kiti (Promega Cat No: E3311) kullanıldı. Ölçüm esnasında Quantus Floumeter (Promega Seri No: TM396) cihazı RNA standart %10 seyreltilerek kalibre edildi. RNA'ların Real-Time PCR da kullanılabilmesi için çift zincirli hale getirmek için ölçüm sonucu elde edilen konsantrasyonlar baz alınarak RNA örnekleri One Script® cDNA Synthesis Kitinin (abm Cat No:6234) protokolü ile Bio-rad iCycler kullanılarak 1000 ng konsantrasyonlarında cDNA'lar elde edildi. miRNA örnekleri ise TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kiti (Applied Biosystems Cat No: A25576) kullanılarak önce cDNA'sı ardından da miR-

AMP örnekleri hazırlandı. miRNA örnekleri deneye başlanmadan önce 5 ng'ye seyreltildi. Hazırlanan miRNA örneklerinin cDNA'ları önce her uçtan 3' poli (A) kuyruklama ve bir adaptör sekansının 5' ligasyonu ile genişletilerek sentezlendi.

3.2.8. qPCR ile hTERT ve Apoptoz Genlerinin (p21 ve p53) Ekspresyonlarının ve Tranfeksiyonun Gerçekleşmesini Kontrol Etme

miR-105-5p'nin Huh7 ve HCT116 hücrelerinde hTERT, p21, p53 gen ekspresyonları üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla Transfekte Huh7 ve HCT116 RNA örneklerinden elde edilen cDNA örnekleri ile RealQ Plus 2X Master Mix Green (AMPLİQON Cat No: A324402) protokolü kullanılarak transfeksiyon ardından hücrelerdeki hTERT (), p21 (), p53 () genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendi. Gen ekspresyonları 18S rRNA'ya normalleştirildi ve karşılaştırmalı BT yöntemi kullanılarak kat farkları hesaplandı: $2^{-(\Delta\Delta CT)}$, burada ΔΔCT (normalize kontrol örneği) - (normalize edilmiş muamele edilmiş örnek) anlamına gelir. Ayrıca tranfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin gözlemlenmesi amacıyla da miRNA-AMP örneklerinde RealQ Plus 2X Master Mix Green (AMPLİQON Cat No: A324402) protokolü ile Oligomer Biyoteknoloji tarafından sentezlenen URP (Oligomer, 20210413/2-109), let7c-F (Oligomer, 20210413/2-110), let-7c-R (Oligomer, 20210413/2-111), 105-5p-F (Oligomer, 20210413/2-112) ve 105-5p-R (Oligomer, 20210413/2-113) primerleri kullanılarak let-7c ve miR-105-5p genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendi. Real-Time PCR reaksiyonları MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate'de (Applied Biosystems Cat No: 4306737) 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Cat No:4351105) kullanılarak üç tekrarlı şekilde yapıldı. Reaksiyonlar sırasında RNA'ların için kontrol grubu olarak 18S kullanılırken let-7c miRNA'lar için pozitif kontrol olarak kullanıldı. 18S, hTERT, p21, p53, URP, let7c-F, let-7c-R, 105-5p-F ve 105-5p-R primerlerinin sekansları aşağıdaki gibidir: 18S rRNA: sense: 5′-cttagagggacaagtggcg-3′, antisense: 5′-acgctgagccagtcagtgta-3′; p21: sense: 5′-

cgaggcacaagggtacaaga-3′, antisense: 5′-cccgtgagccatggact-3′; p53: sense: 5′-cctggttagtacggtgaagtg-3′, antisense: 5′-agggatgtttgggagatgtaag-3′; URP: 5’-gtgcagggtccgaggt-3’; let-7c: sens: 5′-tgtgtttgtgaggtagtaggttgt-3′, antisense: 5’-gggtgaggtagtaggttgt-3’; 105-5p: sense: 5’-ttgtttttttttttttcaaatgctcagactc-3’, antisense: 5’-ggtcaaatgctcagactcc-3’; hTERT; sense: 5’-caacatctggtcacatcccg-3’, antisense: 5’-ggccgtgtggcttctactg-3’.

3.2.9. Transfeksiyon Sonucunda Hücrelerin Çekirdek Morfolojisinin Gözlemlenmesi

Literatürde miR-105-5p’nin kolon ve karaciğer kanseri hücrelerinin çekirdek morfolojilerini etkileyip etkilemediğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Buna bağlı olarak miR-105-5p’nin böyle bir etkisinin olup olmadığını belirlemek için transfeksiyon koşulları bir hafta hücrelerin bulunduğu plate’lerin belirli alanları mikroskop altında 40X’lik objektifteki görüntüleri çekilerek hücrelerin çekirdek morfolojilerindeki değişimler kaydedildi. Bu hücrelerine transfeksiyon işleminin yapıldığı gün kontrol grubu olarak ve 0. saat olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Transfekte Huh7 ve HCT116 Hücrelerinin RNA Konsantrasyonları 80-160 ng/µl Arasında Bulundu

Transfekte edilen Huh7 ve HCT116 hücrelerinden izole edilen RNA ve miRNA'ların konsantrasyon değerleri çizelge 4.1'de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. RNA konsantrasyon ölçüm sonuçları

Transfekte hücre	Koşul	RNA konsantrasyonu(ng/µl)
Huh 7	**Negatif Kontrol**	127
	miR-105-5p mimic	158
	miR-105-5p inhibitör	85
HCT116	**Negatif Kontrol**	82,1
	miR-105-5p mimic	95,2
	miR-105-5p inhibitör	93,9

4.2. Transfekte Huh7 ve HCT116 hücrelerinin miRNA konsantrasyonları 5-75 ng/µl arasında bulundu.

Transfekte edilen Huh7 ve HCT116 hücrelerinden izole edilen RNA ve miRNA'ların konsantrasyon değerleri çizelge 4.2'de yer almaktadır.

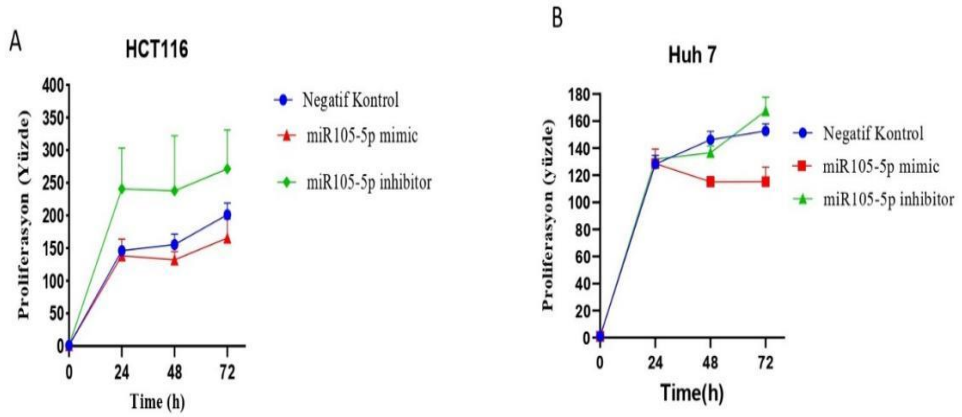
Çizelge 4.2. miRNA konsantrasyon ölçüm sonuçları

Transfekte hücre	Koşul	miRNA konsantrasyonu(ng/µl)
Huh 7	**Negatif Kontrol**	15
	miR-105-5p mimic	9.4
	miR-105-5p inhibitör	9
HCT116	**Negatif Kontrol**	71,2
	miR-105-5p mimic	22
	miR-105-5p inhibitör	10

4.3. Transfekte Huh7 ve HCT116 Hücrelerinde miR-105 ve let-7c Gen Ekspresyonları Gerçekleşmedi

Transfekte HCT116 ve Huh7 hücrelerinde miR-105 ve let-7c gen ekspresyonlarının ölçümü gerçekleştirilemediği için transfeksiyon sonucunda miR-105-5p-mimic, miR-105-5p-inhibitör ve negatif kontrolün hücre içerisine girip girmediği kontrol edilemedi.

4.4. miR-105-5p'nin Inhibisyonu HCT116 ve Huh7 Hücre Hatlarında Proliferasyonu Arttırdı

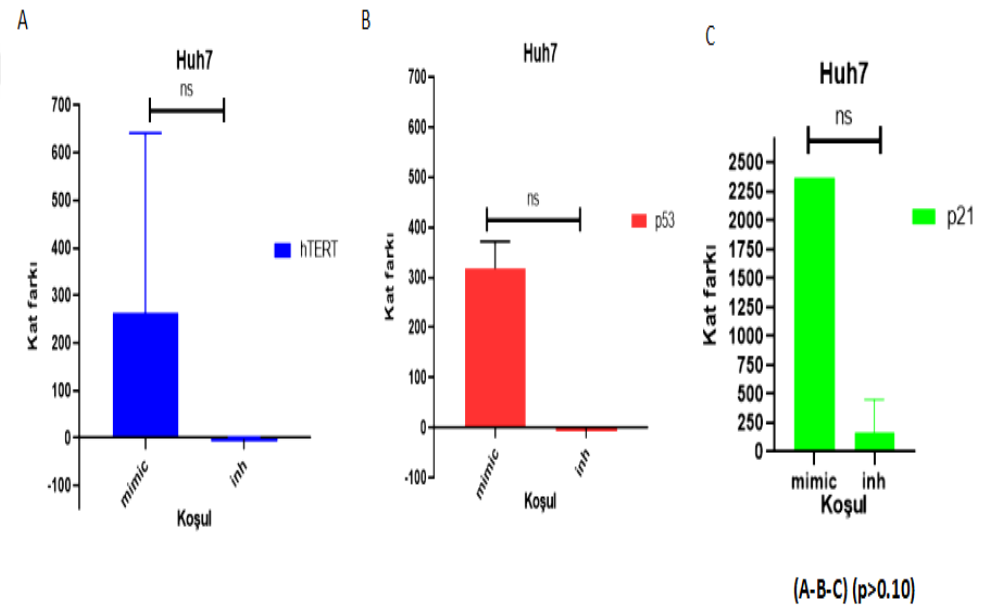


Şekil 4.1. miR-105-5p mimic, mir-105-5p inhibitor ve Negative Control ile transfekte edilen Huh 7 ve HCT116 hücrelerinin proliferasyon grafiği. (A-B) (****p <0,0001 ve **p=0,0010)

miR-105-5p mimic ve miR-105-5p inhibitör transfekte edilen HCT116 ve Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızı ilk 24 saatte artış göstermiştir. miR-105-5p mimic ve miR-105-5p inhibitör transfekte HCT116 hücrelerinin proliferasyon hızı 24-48 saatlerinde Negatif Kontrole kıyasla azalmış ve 48-72 saatlerinde artmıştır. Buna bağlı olarak HCT116 hücrelerinde inhibitör verilen hücrelerde proliferasyon hızı artmıştır. Huh7 hücrelerinde miR-105-5p mimic ile miR-105-5p inhibitör transfekte edilen hücrelerde negatif kontrole göre proliferasyon hızında 24-48

saatlerinde azalma, 48-72 saatlerinde ise mimic hücrelerinde azalma ve inhibitör hücrelerinde artış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak huh7 hücrelerinde miR-105-5p ekspresyonu mimic transfeksiyonu ile arttırıldığında proliferasyon baskılanır.

4.5. miR-105-5p upregülasyonu Huh7 Hücrelerinde hTERT, p21 ve p53'ün Ekspresyonlarını Arttırdı

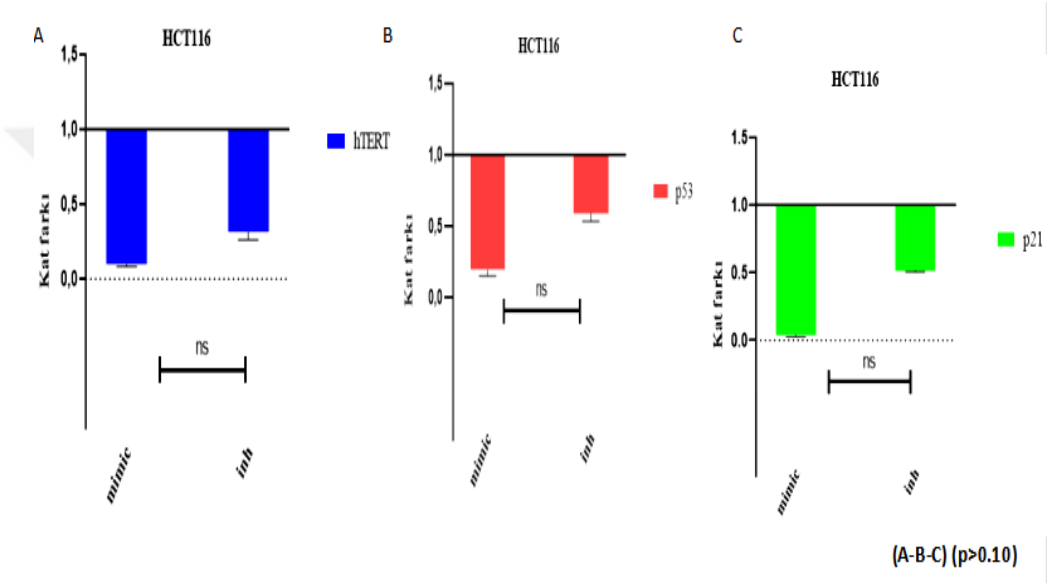


Şekil 4.2. miR-105-5p mimic, inhibitör ve negatif kontrol transfekte Huh7 hücrelerinin Real-Time PCR analizi. (A-B-C)(p>0.10).

hTERT, p53 ve p21 genlerinin ekspresyonları miR-105-5p mimic transfekte edilen Huh7 hücrelerinde artış gösterdi. miR-105-5p inhibitör ile transfekte edildiğinde ise p21 geninin ekspresyonunda artma gerçekleşirken hTERT ve p53 genlerinin ekspresyonlarında azalma gözlemlendi. hTERT gen ekspresyonu, miR-105-5p mimic transfekte Huh7 hücrelerinde artarken miR-105-5p inhibitör transfekte huh 7 hücrelerinde azalmıştır. p53 gen ekspresyonu, hTERT gen ekspresyonunda olduğu mimic hücrelerinde artarken inhibitör hücrelerinde

ekspresyon grafikte görülmeyecek kadar azalmıştır. p21 ekspresyonu ise mimic hücrelerinde inhibitör hücrelerine kıyasla 16 kat artmıştır.

4.6. miR-105-5p Upregülasyonu ve Downregülasyonu HCT116 Hücrelerinde hTERT, p21 ve p53'ün Ekspresyonlarını Bastırdı



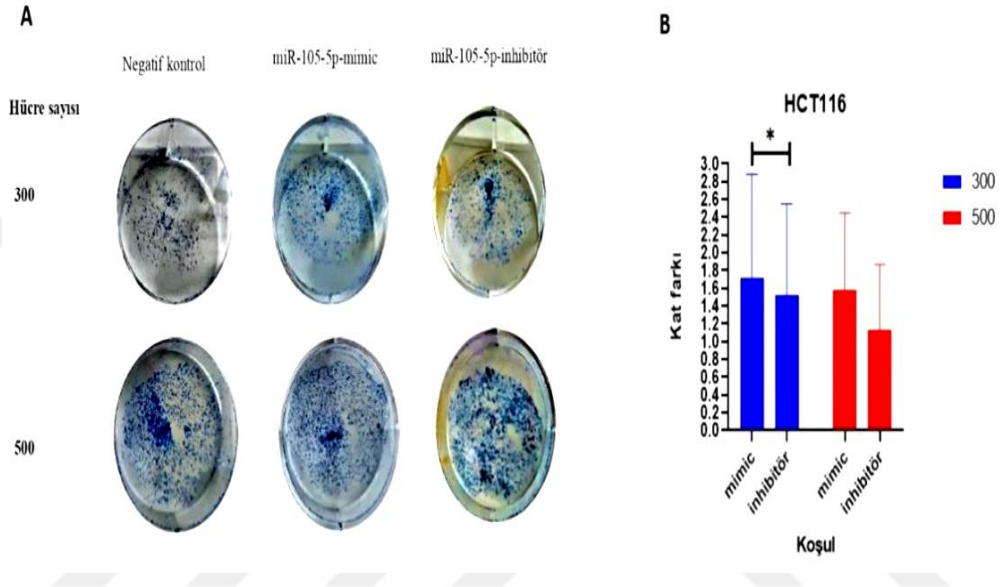
Şekil 4.3. miR-105-5p mimic, inhibitör ve negatif kontrol transfekte HCT116 hücrelerinin Real-Time PCR analizi. (A-B-C)(p>0.10).

miR-105-5p mimic ve inhibitör ile transfekte edilen HCT116 hücrelerinde hTERT, p53 ve p21 genlerinin ekspresyonları azalma gösterdi. Mimic transfekte hücrelerinde inhibitör hücrelerine kıyasla daha fazla azalma gerçekleşmiştir.

4.7. miR-105-5p'nin Upregülasyonu HCT116 Hücrelerinde Koloni Sayısını Daha Fazla Arttırdı

Methylen blue mix ile boyanması sonucunda miR-105-5p mimic ile transfekte HCT116 hücrelerinin şekil 4.4'teki plate görüntülerinde görüldüğü gibi miR-105-5p mimic ve miR-105 inhibitör hücrelerinde negatif kontrole kıyasla daha

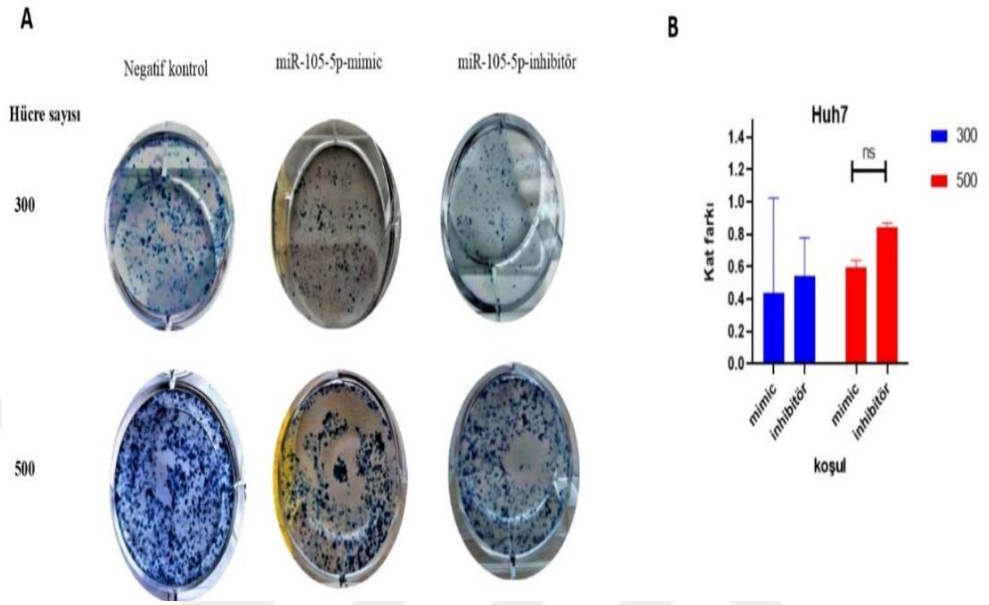
fazla kolonileşme meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ayrıca mimic kolonilerinin inhibitör kolonilerine göre daha fazla olduğu görülmektedir. Şekil 4.4'teki grafik ile plate görüntülerinin birbirlerini desteklediği de görülmektedir.



Şekil 4.4. (A-B)Transfekte HCT116 hücrelerinin methylen blue mix'i ile boyanması sonucu elde edilen koloni görüntüleri ve grafikleri.(B) (*p <0.05 ve p ≥0,1045)

4.8. miR-105-5p'nin Downregülasyonu Huh7 Hücrelerinde Koloni Sayısını Daha Fazla Arttırdı

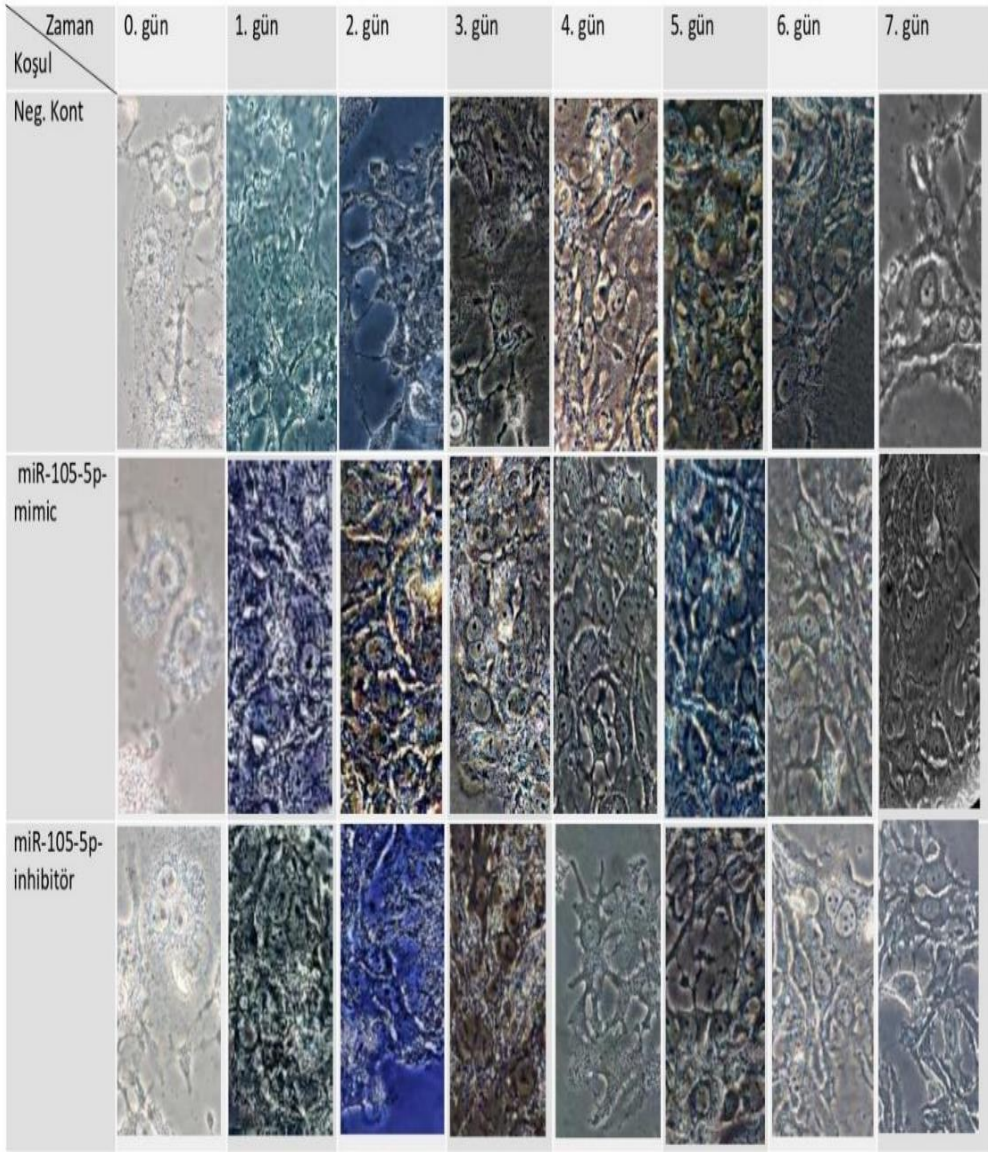
Şekil 4.5'te plate görüntüleri mimic ve inhibitör ile transfekte edilen Huh7 hücrelerinde negatif kontrole kıyasla daha az kolonileşme meydana gelirken inhibitör hücrelerinin mimic hücrelerine kıyasla oluşan kolonilerin daha fazla olduğunu göstermektedir. Ayrıca mimic ve inhibitör kuyucuklarındaki kolonileşmenin birbirine yakın olarak gerçekleştiği de gözlemlenmiştir.



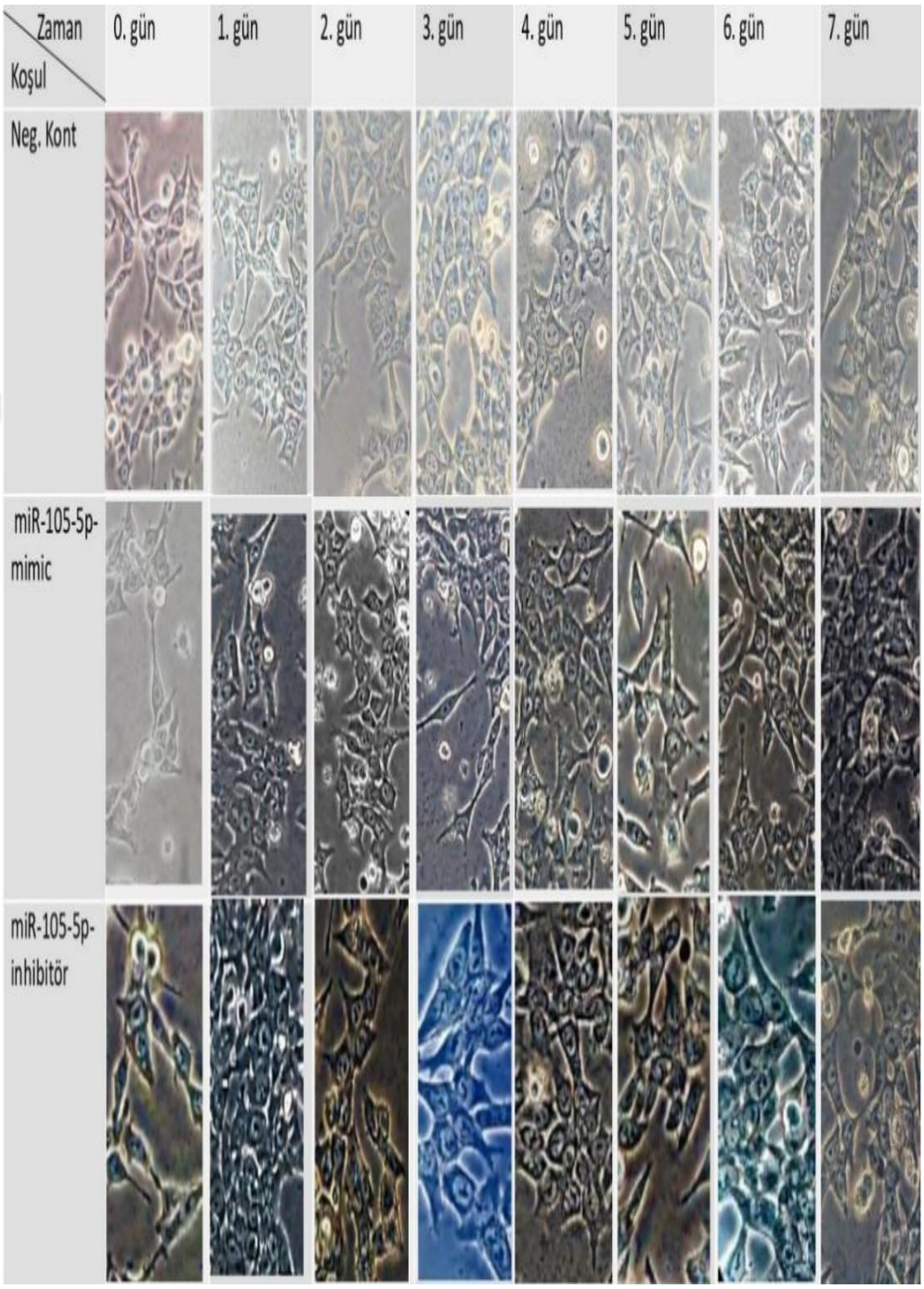
Şekil 4.5. (A-B) Transfekte Huh7 hücrelerinin methylen blue mix'i ile boyanaması sonucu elde edilen koloni görüntüleri ve grafikleri.(B) ($p>0,0657$ ve $p>0,1103$)

4.9. Transfeksiyon Hücrelerin Çekirdek Morfolojisi Üzerinde Herhangi Bir Etki Göstermedi

Transfeksiyon işleminin Huh7 ve HCT116 hücrelerinin çekirdek morfolojilerindeki değişiklikleri gözlemlemek için transfeksiyonun gerçekleştiği günden itibaren 7 gün boyunca mikroskopta 40X'lik objektifte çekirdek görüntüleri Şekil 4.6 ve şekil 4.7'deki gibi kaydedildi. Şekil-6 ve şekil-7'de de görüldüğü gibi hücrelerin çekirdek yapılarında herhangi bir değişiklik gözlemlenmedi ve transfeksiyon çekirdek morfolojisini etkilemedi.



Şekil 4.6. Huh7 hücrelerinde transfeksiyon sonrası hücrelerin 40X çekirdek görüntüleri



Şekil 4.7. HCT116 hücrelerinde transfeksiyon sonrası hücrelerin 40X çekirdek görüntüleri

5. TARTIŞMA

Bugüne kadar yapılan bazı araştırmalar da tümör dokusu ile normal dokularda ifade edilen bazı miRNA'ların ekspresyonlarının anlamı bir şekilde değiştiği görülmüştür. Bununla beraber miRNA'lar üzerine araştırmalar derinleştirilmiş ve tanı ve tedavide kullanılma potansiyelleri fark edilmiştir. Ayrıca miRNA'ların; dokuya spesifik özellik gösterebilmeleri; birçok biyolojik sıvıdan kolaylıkla elde edilebilmeleri ve kararlı yapılarını koruyabilen moleküller olmaları, başta kanser olmak üzere pek çok klinik durumun erken tanısında kullanılabilecek potansiyel biyobelirteç olarak umut vaat etmektedir. Tümör dokusu ile normal dokular karşılaştırıldığında buralarda eksprese edilen miRNA'ların ifade düzeylerinin tanımlanması ve elde edilen verilerin hastalıkla ilişkilendirilerek değerlendirilmesi, günümüzün en tehlikeli hastalıklarından olan kanserin erken tanısında ve tedavisi için yeni yöntemlerin geliştirilmesinde önemli katkılar sağlayabileceği öngörülmektedir (Çelik ve ark, 2013, Zhang ve ark, 2017; Li ve ark, 2017). Literatürde miR-105-5p ile ilgili mevcut bilgiler sınırlı olup, yapılan araştırmalar doğrultusunda bazı karsinogenez süreçleri ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (Yang ve ark, 2019). Karaciğer kanserinin histolojik bir türü olan HCC de onkomiR karakterde olan birçok miRNA'nın up regüle olduğu bilinmektedir (Morishita ve ark, 2021). Wei ve ark.'ları (2019) miR-105-5p ile yaptıkları araştırmada; miR-105-5p, meme ve melanom kanserlerinde metastazı teşvik ederken glioma da proliferasyonu baskıladığını, bununla birlikte miR-105-5p'nin HCC'nin tümör gelişiminde önemli bir rolü olduğunu bildirmişlerdir (Wei ve ark, 2019). Diğer taraftan kolon kanserinde yapılan araştırmalarda ise miRNA'ların ekspresyonlarında kalıcı bir tutarsızlık olduğu görülmüştür (Sun ve ark, 2017). Bu araştırmada miR-105-5p'nin birbirinden farklı iki kanser türü olan HCC ve kolon kanseri hücre hatlarına etkisini incelemiş, özellikte tanı ve tedavide kullanılabilecek potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilir olup olmadığı değerlendirdik.

Araştırmamızda; miR-105-5p'nin upregülasyonu hTERT ve p53'ün ekspresyonunu Huh7 hücrelerinde arttırırken HCT116 hücrelerinde inhibe etmiştir. p21 ekspresyonunu ise Huh7 de miR-105-5p'nin downregülasyonuna kıyasla daha fazla artış gösterirken HCT116 da azalmaya sebep olmuştur.

miR-105-5p'nin upregülasyonunun hTERT ekspresyonunu HCT116 hücrelerinde azaltması ve Huh7 hücrelerinde arttırmasına bağlı olarak Huh7 hücrelerinde telomeraz enzim aktivitesini arttırmasına ve bunun sonucunda da telomer uzunluğunun korunmasını sağladığı için kanser hücrelerinin ölümünü engelleyerek olumsuz etkiye neden olur. Ancak HCT116 hücrelerinde hTERT' in ekspresyonu baskılandığı için bu hücrelerde telomer uzunluğu her hücre bölünmesinde kısalarak sonunda hücre ölümünü indükler. Bu durum miR-105-5p'nin inhibisyonu için de geçerlidir. miR-105-5p'nin downregülasyonunun ve upregülasyonunun HCT116 hücrelerinde p21 ve p53'ün ekspresyonlarını bastırması hem de p53 ekspresyonunun miR-105-5p'nin downregüle edildiği Huh7 hücrelerinde azalması apoptozun inhibisyonuyla sonuçlanır. HCT116 hücrelerinde miR-105-5p'nin upregülasyonu bu apoptoz genlerinin daha fazla bastırdığı için miR-105-5p upregüle HCT116 hücrelerinde apoptozun inhibisyonu daha fazla artar ve hücre çoğalmaya, büyümeye devam eder. Ancak Huh7 hücrelerinde miR-105-5p'nin upregülasyonu p21'in daha fazla eksprese ettiği için apoptoz bu hücrelerde downregüle hücrelere kıyasla daha fazla indüklenir.

Koloni formasyon analizinde HCT116 da miR-105-5p upregülasyonunun koloni sayısını arttırdığı gözlenmiş, miR-105-5p downregülasyonunun ise Huh7 hücrelerinde koloni sayısını arttırdığı bulunmuştur. Az sayıda hücreye kıyasla çok sayıda hücre ile oluşturulan kolonilerde anlamlı artış gerçekleşmiştir. miR-105-5p'nin HCT116 hücrelerinde upregüle olarak Huh7 hücrelerinde ise downregüle olarak kanser hücrelerinin onkojenik potansiyelini anlamlı şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir. Ancak proliferasyon analizinde; miR-105-5p'nin downregülasyonunun HCT116 hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı şekilde

arttırdığı görülmüş, miR-105-5p'nin upregülasyonunun ise Huh7 hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı şekilde baskıladığı gözlemlenmiştir. miR-105-5p'nin upregülasyonu HCT116 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederken kolonileşmeyi arttırır. miR-105-5p'nin downregülasyonu ise Huh7 hücrelerinin proliferasyonunu ve kolonileşmesini arttırır. miR-105-5p mimic, miR-105-5p negatif kontrol ve miR-105-5p inhibitör ile transfeksiyon Huh7 ve HCT116 hücrelerinin çekirdek morfolojisi üzerinde bir etki göstermemiştir.

TaqMan® Advanced miRNA Assay'in yönlendirmesine göre TaqMan® Advanced miRNA cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirilir. Ardından da miR-AMP örnekleri hazırlandıktan sonra TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X) protokolü ile 7500 and 7500 Fast Systems kullanılarak Real-Time PCR reaksiyonu gerçekleştirilerek miRNA'ların miktarları belirlenir. Bizler transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla transfekte Huh ve HCT116 hücrelerinden elde ettiğimiz miRNA'lardan TaqMan® Advanced miRNA cDNA sentez kiti ile elde ettiğimiz miR-AMP örneklerini kullanarak TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X) yerine RealQ Plus 2X Master Mix Green protokolünün adımları izlenerek 7500 and 7500 Fast Systems yerine 7500 Real-Time PCR Sistemini kullanarak miR-105-5p ve let-7c genlerinin ekspresyonlarını kontrol ettik. Ancak protokolün gerektirdiği şartlarda yerine getirilemediği için reaksiyondan sonuç alınamamış olabilir. Yada TaqMan® Advanced miRNA cDNA sentez kiti ile elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak RealQ Plus 2X Master Mix Green protokolünün adımları izlenerek ve 7500 Real-Time PCR Sistemini kullanılarak çalışma gerçekleştirilirse sonuç elde edilebilir.

Önceki çalışmalar ışığında miRNA'ların çalışma mekanizması incelendiğinde miRNA'ların dokuya spesifik bir çalışma mekanizmasına sahip oldukları görülmüştür. Kimi dokularda çok fazla eksprese olan miRNA'ların, kimi dokularda tam aksi şekilde eksprese edildiği literatür araştırmalarında da gösterilmiştir. Ek olarak farklı dokulardaki miRNA ekspresyon seviyelerinin dokuların özelliklerini ve işlevlerini de şekillendirebildikleri bilinmektedir (Akkay

Ulum, 2018). miRNA'ların insan kanserlerinin çeşitli biyolojik süreçlerinde önemli bir düzenleyici oldukları, yaklaşık miRNA'ların yarısının insan tümörleri ile ilişkili oldukları bilinmektedir. Birçok tümör türünün miRNA ekspresyon profillerinin normal dokulardan farklı olduğu görülmüştür (Wei ve ark, 2019).

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Araştırmamızda birbirinden farklı iki kanser türü olan HCC ve kolon kanseri hücre hatlarına miR-105-5p'nin etkisi incelenmiş, literatürle uyumlu olarak aynı miRNA'nın farklı kanser türlerine ait olan hücre hatlarında birbiri ile çok ilişkili olmayan ekspresyon seviyesi, proliferasyon ve koloni oluşturabilme yeteneklerine sahip olduklarını gözlemlenmiştir. miR-105-5p'nin tedavide kullanılabilme potansiyelini kolon ve HCC hücre hatlarında karşılaştırmalı olarak incelediğimiz araştırmamızda, bu kanser türleri için tedavide kullanılabilme durumu henüz belli olmadığı için daha ileri ve daha iyi çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Elde ettiğimiz verilerle özellikle Huh7 hücrelerinde miR-105-5p'nin upregülasyonu ile p21'de ekspresyonunda kritik bir artışının görülmesi, miR-105-5p ve p21 mekanizmanın spesifik ve ileri araştırmalarıyla aydınlatılması gerektiği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Akkay Ulum, Y.Z., 2018, Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığında Görülen İnflamasyon Sürecinde Rol Alan miRNA'ların Tanımlanması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.

Alqahtani, A., Khan, Z., Alloghbi, A., Ahmed, T., Ashraf, M., Hammouda, M.D., 2019, Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms And Targeted Therapies, Medicina, 55 (9), 526

Bağcı, Ö.U., Caner, A., 2020, MikroRNA'ların Parazitolojideki Yeri, Türkiye Parazitol , 44(2):102-8.

Cai, M., Hu, W., Huang, C., Zhou, C., Li, J., Chen, Y., Yu, Y., 2021, LncRNA Mcf2L-As1/Mir-105/Il-1β Axis Regulates Colorectal Cancer Cell Oxaliplatin Resistance, Cancer Management And Research, 13:8685–8694.

Callegari, E., Elamin, B.K., Giannone, F., Milazzo, M., Altavilla, G., Fornari, F., Giacomelli, L. D'Abundo, L., Ferracin, M., Bassi, C.,Zagatti, B., Corrà, F., Miotto, E., Lupini, L., Bolondi, L., Gramantieri, L., Croce, C.M., Sabbioni, S., Negrini, M., 2012, Liver Tumorigenicity Promoted by MicroRNA-221 in a Mouse Transgenic Model, Hepatology, 56, 1025–1033.

Cerqueira, D.M., Tayeb, M., Ho, J., 2022, MicroRNAs in kidney development and disease, JCI Insight, 7(9) :e158277.

Çelik, A.A., Koşar P.A., Özçelik, N., 2013, MikroRNA'lar ve Kanser İlişkisi, Tıbbi Biyoloji, 20(3):121-127.

Çokaklı, M., 2006, Hepatosellüler Karsinoma Dokularında ve Hücre Hatlarında Kaveol İn- c-Met İlişkisinin Belirlenmesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

Diao, C., Guo, P., Yang, W., Sun,Y., Liao, Y., Yan, Y., Zhao, A., Cai, X., Hao, J., Hu, S., Yu, W., Chen M., Wang, R., Li, W., Zuo, Y., Pan, J., Hua, C., Lu, X., Fan, W., Zheng, Z., Deng, W., Luo, G., Guo, W., 2021, Spt6 Recruits

Snd1 To Co-Activate Human Telomerase Reverse Transcriptase To Promote Colon Cancer Progression, Molecular Oncology, 15:1180–1202.

Francipane, M.G., Lagasse, E., 2013, mTOR Pathway In Colorectal Cancer: An Update, Oncotarget, 1-19.

Gao, R., Wang, Z., Liu, Q., Yang, C., 2019, MicroRNA-105 Plays An Independent Prognostic Role In Esophageal Cancer And Acts As An Oncogene, Cancer Biomarkers -1, 1–8.

Görür, A., 2010, Hepatosellüler Karsinomda Apoptosiz Mekanizması ve Bazı Benzimidazol Türevlerinin Hepatosellüler Karsinom Üzerine Etkisi,Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Mersin.

Guan, Y., Chen, L., Bao, Y., Li, Z., Cui, R., Li, G., Wang, Y., 2015, Identification Of Low MiR-105 Expression As a Novel Poor Prognostic Predictor For Human Glioma, International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 8(7): 10855-10864.

Honeywell, R.D., Cabrita, A.M., Zhao, H., Dimitroulakos, J., Addison L. C., 2013, MiR-105 Inhibits Prostate Tumour Growth By Suppressing Cdk6 Levels, Plos One, 8.

Honeywell,R.D., 2010, The Effect Of Hsa-MiR-105 On Prostate Cancer Growth, Bachelor Of Science, Queen's University, Yüksek Lisans, Canada .

Hsu, Y.L., Chen, Y.J., Chang, W.A., Jian, S.F., Fan, H.L., Wang, J.Y., Kuo, P.L., 2018, Interaction Between Tumor-Associated Dendritic Cells And Colon Cancer Cells Contributes To Tumor Progression Via Cxcl1, International Journal Of Molecular Sciences, 19(8), 2427

Jin, X., Yu, Y., Zou, Q., Wang, M., Cui, Y., Xie ,J., Wang, Z., 2018, MicroRNA-105 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition Of Nonsmall Lung Cancer Cells Through Upregulating Mcl-1, Journal Of Cellular Biochermistry, 120:5880–5888.

Jin, Y., Wang, C., Liu, Mu, W., Chen, Z., Yu, A.W., Dai, Y., Zhou, X., 2011, Molecular Characterization of the MicroRNA-138-Fos-like Antigen 1 (FOSL1) Regulatory Module in Squamous Cell Carcinoma, The Journal Of Bıologıcal Chemıstry, 286(46):40104 –40109.

Kou, X., Ding, H., Li, L., Chao, H., 2021, Hsa-miR-105-1 Regulates Cisplatin-Resistance in Ovarian Carcinoma Cells by Targeting ANXA9, Analytical Cellular Pathology, 2021: 6662486

Lee, E.J., Baek, M., Gusev, Y., Brackett, D.J., Nuovo, G.J., Schmittgen, T.D., 2008, Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors, RNA, 14(1):35-42.

Li, H.Y., Liang, J.L., Kuo, Y.L., Lee, H.H., Calkins, M.J., Chang, H.T., Lin, F.C., Yu-Chia Chen, Hsu, T.I., Hsiao, M., Ger, L.P., Lu, P.J., 2017, Mir-105/93-3p Promotes Chemoresistance And Circulating MiR- 105/93-3p Acts As a Diagnostic Biomarker For Triple Negative Breast Cancer, Breast Cancer, 19(1):133

Li, J., Liu, M., Zeng, B., Wang, Z., 2021, Propofol induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis via regulating miR-105/JAK2/STAT3 axis, Cytokine, 148, 155649.

Li, W., Kong, X., Huang, T., Shen, L., Wu, P., Chen, Q.F., 2020, Bioinformatic Analysis and İn Vitro Validation of a Five-MicroRNA Signature as a Prognostic Biomarker of Hepatocellular Carcinoma, Annals of Translational Medicine, 8(21):1422.

Liang, G., Zhu, Y., Ali, D.J., Tian, T., Xu, H., Si, K., Sun, B., Chen, B., Xiao, Z., 2020, Engineered Exosomes For Targeted Co-Delivery Of MiR-21 Inhibitor And Chemotherapeutics To Reverse Drug Resistance In Colon Cancer, Journal Of Nanobiotechnology, 18:10, 1-15.

Lin, M., Chen, W., Huang, J., Gao, H., Ye, Y., Song, Z., Shen, X., 2011, MicroRNA Expression Profiles In Human Colorectal Cancers With Liver Metastases, Oncology Reports, 25(3): 739-747.

Liu, S., Cao, Q., An, G., Yan, B., Lei, L., 2020, Identification Of The 3 LncRNA Signature As a Prognostic Biomarker For Colorectal Cancer, İnternational Journal Of Molecular Sciences, 21, 9359,1-17.

Lu, G., Fu, D., Jia, C., Chai, L., Han, Y., Liu, J., Wu, T., Xie, R., Chang, Z., Yang, H., Luo, P., Lv, Z., Yu, F., Zhong, C., Ma, Y., 2017, Reduced MiR-105-1 Levels Are Associated With Poor Survival Of Patients With Non-Small Cell Lung Cancer, Oncology Letters, 14: 7842-7848.

Loriot, A., Tongelen, A.V., Blanco, J., Klaessens, S., Cannuyer, J., Baren, N.V. Decottignies, A., De Smet, C., 2014, A novel cancer-germline transcript carrying pro-metastatic miR-105 and TET-targeting miR-767 induced by DNA hypomethylation in tumors, Epigenetics, 9(8), 1163–1171.

Miliotis, C., Slack, F.J., 2021, miR-105-5p regulates PD-L1 expression and tumor immunogenicity in gastric cancer, Cancer Letters, 518:115–126

Morishita, A., Oura, K., Tadokoro, T., Fujita, K., Tani, J., Masaki, T., 2021, MicroRNAs In The Pathogenesis Of Hepatocellular Carcinoma: A Review, Cancers, 13:514.

Nagy, A., Lánczky A., Menyhár, O., Győrfy,B., 2018,Validation Of MiRNA Prognostic Power In Hepatocellular Carcinoma Using Expression Data Of Independent Datasets, Nature-Scientific Reports, 8:9227.

Nault, C.J., Ningarhari, M., Rebouissou, S., Zucman-Rossi, J., 2019, The Role Of Telomeres And Telomerase In Cirrhosis And Liver Cancer, Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 544–558.

Qin, Y.Z., Xie, X.C., Liu, H.Z., Lai, H., Qiu, H., Ge, L.Y., 2015, Screening And Preliminary Validation Of miRNAs With The Regulation Of hTERT In Colorectal Cancer, Oncology Reports, 33(6):2728-2736,

Salehi, Z., Hadadi, P., Tavallaei, O., 2019, Prediction Of Biomarker MiRNAs Signature In Colorectal Cancer Metastasis To Liver Cancer, Electronic Journal Of General Medicine, 16(1),1-11.

Schetter, A.J., Leung, S.Y., Sohn, J.J., Zanetti, K.A., Bowman, E.D., Yanaihara, N., Yuen, S.T., Chan, T.L., Kwong, D.L.W., Au, G.K.H., Liu, C.G., Calin, G.A., Croce, C.M., Harris, C.C., 2008, MicroRNA Expression Profiles Associated With Prognosis and Therapeutic Outcome in Colon Adenocarcinoma, JAMA, 299(4), 425–436

Shang, j.C., Yu, G.Z., Ji, Z.W., Wang, X.Q., XIA, L., 2019, MiR-105 Inhibits Gastric Cancer Cells Metastasis, Epithelial-Mesenchymal Transition by Targeting SOX9, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 23: 6160-61.

Shen, G., Rong, X., Zhao, J.,Yang, X., Li, H., Jiang, H., Zhou, Q., Ji, T., Huang, S., Zhang, J., Jia, H., 2014, MicroRNA-105 Suppresses Cell Proliferation And Inhibits PI3K/AKT Signaling In Human Hepatocellular Carcinoma, Carcinogenesis, 35(12), 2748–2755.

Strillacci, A., Griffoni, C., Sansone, P., Paterini, P., Piazzi, G., Lazzarini, G., Spisni, E., Pantaleo, M.A., Biasco, G., Tomasi, V., 2019, MiR-101 Downregulation is Involved in Cyclooxygenase-2 Overexpression in Human Colon Cancer Cells, Experimental Cell Research, 315: 1439-1447, 2009.

Sun, M., Song, H., Wang, S., Zhang, C., Zheng, L., Chen, F., Shi, D., Chen, Y., Yang, C., Xiang, Z., Liu, Q., Chen Wei, C., Xiong, B., 2017, Integrated Analysis Identifies Microrna-195 As a Suppressor Of Hippo-Yap Pathway In Colorectal Cancer, Journal Of Hematology & Oncology, 10:79, 1-16.

Tüzün, S., Çakır, M., Savaş A. O., Tatar, C., 2014, Hepatoselüler Karsinom-Karaciğer Rezeksiyonları, Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, 1-9.

Wang, X., Zhao, Y., Cao, W., Wang, C., Sun, B., Chen, J., Li, S., Chen, J., Cui, M., Zhang, B., Yang, G., Liu, Y., Yu, X., Zhang, G., 2017, Mir-138-5p Acts As a Tumor Suppressor By Targeting hTERT In Human Colorectal Cancer, International Journal of Clinical and ExperimentalPathology,10(12):11516-11525

Wei, S., Liu, K., He, Q., Gao, Y., Shen, L., 2019, Pes1 Is Regulated By Cd44 In Liver Cancer Stem Cells Via Mir-105-5p, Febs Letters, 1777– 1786.

Xi, X., Teng, M., Zhang, L., Xia, L., Chen, J., Cui, Z., 2019, MicroRNA-204-3p Represses Colon Cancer Cells Proliferation, Migration, And Invasion By Targeting Hmga2, Journal Of Cellular Physiology, 235:1330–1338.

Yang, L., Belaguli, N., Berger D.H., 2009, MicroRNA And Colorectal Cancer, World Journal Of Surgery, 33:638–646.

Yerli, B., 2019, Hepatosellüler Karsinom Tanı Ve Tedavi, Bezelye,

Zhang, N., Zhang, R., Zou, K., Yu, W., Guo, W., Gao, Y., Li, J., Li, M., Tai, Y., Huang, W., Song, C., Deng, W., Cui, X., 2017, Keratin 23

Promotes Telomerase Reverse Transcriptase Expression And Human Colorectal Cancer Growth, Cell Death And Disease, 8(7),

Zhou, W., Fong, M.Y., Min Y., Somlo, G., Liu, L., Palomares, M.R., Yu, Y., Chow, A., O'Connor, S.T.F., Chin, A.R., Yen, Y., Wang, Y., Marcusson, E.G., Chu, P., Wu, X., Li, A.X., Li, Z., Gao, H., Ren, X., Boldin, M.P., Lin, Wang, S.E., 2014, Cancer-Secreted miR-105 Destroys Vascular Endothelial Barriers to Promote Metastasis, Cancer Cell, 25(4), 501–515.

ÖZGEÇMİŞ

1995 ‘te Adana’nın Ceyhan ilçesinde İlk ve orta öğrenimimi ve ve lise eğitimimi Ceyhan’da tamamladı. Liseden 2013 yılında mezun oldu ve 2015 yıllında Bingöl Üniversitesinde Fen Edebiyat Fakültesinde Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde eğitimine başladı. 2019 yılında lisans eğitimi tamamlayıp aynı yıl Çukurova Üniversitesinde Fen Bilimleri Enstitüsünde Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı’nda Tezli Yüksek Lisans eğitimime başladı ve hala devam etmektedir. Eğitim hayatım süresince Bingöl Üniversitesinde 2016 yılında düzenlenen Moleküler Science Day konferansına, 2018 yılında Erzurum Teknik Üniversitesinde düzenlenen Uluslararası Katılımlı Nobelyum Bilim Kongresine katıldı. Yine Bingöl Üniversitesinde 2017’de düzenlenen Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursuna katılarak Deney Hayvanları ile çalışabilmeyi hak kazandı. İn vitro anti-cancer effects of novel Schiff base metal complexes on NSCLC cells, Lavantinin HCC hücrelerinde Anti-kanser Etkinliği ve COVİD-19 Hasta Serumunun Bronş Epiteli Hücre Hasarına Etkisi ve Koruyucu Faktörler gibi bildirilerin çalışmalarında yer aldı.