



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNDE  
BIBR1532 VE RESVERATROL  
KOMBİNASYONUNUN LNCRNA EKSPRESYON  
DEĞİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

Selin ÇEŞMELİ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir  
2019

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNDE  
BIBR1532 VE RESVERATROL  
KOMBİNASYONUNUN LNCRNA EKSPRESYON  
DEĞİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Selin ÇEŞMELİ

Danışman(lar)  
Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir  
2019

**DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ**

(Adı Soyadı)

(İmza)

**Başkan** : Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI

(Danışman)

**Üye** : Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ

**Üye** : Doç.Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ

Yüksek Lisans Tezinin Kabul edildiği tarih: 23.01.2020

## Önsöz

İki sene önce çıktığım bu yolculukta, büyük küçük birçok zorlukla karşılaştım. Bu zorluklar ilk anda bir sorun olarak görünse de zaman içinde bana akademik dünyayı öğreten birer ders haline geldiler. İnsanın kendi çizgisinden asla ödün vermemesi gerektiğini, çalışmanın nihayetinde iyi sonuçlar doğuracağını ama bunun için umutsuzluğa kapılmadan başarı için her daim çabalamak gerektiğini anladım.

Bana ne mutlu ki, yanımda beni destekleyen ailem, arkadaşlarımla yanında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda tanıdığım ve kendimi onları tanıdığım için şanslı hissettiğim insanlar oldu. Yaşadığım her zorlukta benimle olan, sorunlarımı dinleyen ve çözüm üretmek için ellerinden geleni yapan değerli hocalarımla tanıştım. İnsanın hayatının her döneminde olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de iniş ve çıkışlar vardı. Fakat bana bu yolculuk süresince eşlik eden tüm bu insanlar sayesinde kendimi yalnız hissetmedim ve bu dönemde yaşadığım tüm sorunlara karşı daha da güçlenerek yoluma devam ettim.

Bu iki yıl hem bilimsel hem kişisel anlamda hayatıma birçok katkıda bulunmuştur. Bu yolda üzerimde emeği olan tüm hocalarıma, sevgili arkadaşlarıma ve yakınlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Bu proje, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

İzmir, 29.01.2020

Selin ÇEŞMELİ

## Özet

### **Kolorektal Kanser Hücrelerinde BIBR1532 Ve Resveratrol Kombinasyonunun LncRNA Ekspresyon Değişimi Üzerindeki Etkisi**

Kolorektal kanser en sık rastlanan üçüncü kanser tipi ve dördüncü ölüm nedeni olarak bilinmektedir ve hedefe yönelik yeni tedavi yöntemleri araştırılmaya devam etmektedir. Kanser hücrelerinde; belirli uzun kodlanmayan RNA'lar olarak bilinen lncRNA'ların ekspresyonunun yüksek olduğu; karsinomların gelişmesi ve progresyonundan sorumlu olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, lncRNA'ların kanser tedavisinde hedef olarak ele alınabileceği düşünülmektedir. BIBR1532 bir telomeraz inhibitörüdür ve tümörlerdeki aktif telomerazı inhibe etme amaçlı kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Resveratrol ise doğal bir fitoaleksindir, proliferasyon ve apoptozda rol oynayan molekülleri hedeflediği bilinmektedir. Ayrıca spesifik olarak KRAS-aracılı sinyalleşmeyi inhibe ederek apoptozu indüklediği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, HT-29 kolorektal kanser hücrelerine BIBR1532 ve resveratrol maddeleri uygulanmasının ardından; maddelerin sitotoksitesi, olası apoptotik etkileri ve lncRNA ekspresyonlarındaki değişimi incelemek hedeflenmektedir. Proliferasyon deneyi ile her kuyucuk için uygun HT-29 hücre miktarı belirlenmiştir. WST-1 analizi ile BIBR1532 ve resveratrol maddelerinin sitotoksik etkisi doza ve zamana bağlı olarak değerlendirilmiştir. Ardından, belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarında tekli ve kombine olarak ilaç uygulanmış ve ilaç uygulanmayan hücreler kontrol olarak ele alınarak apoptoz analizi Annexin V ile gerçekleştirilmiştir. LncRNA analizi için, apoptoz deneyinde uygulandığı şekilde dozlar hücrelere uygulanmış, ilaç eklenmeyen hücreler kontrol olarak ele alınmıştır. Tüm hücre gruplarından RNA izolasyonu gerçekleştirilerek cDNA sentezlenmiş ve lncRNA ekspresyonundaki değişiklikler RT-PCR ile değerlendirilmiştir.

HT-29 hücreleri için uygun hücre konsantrasyonu  $2 \times 10^4$  hücre / ml olarak belirlenmiş, ardından sitotoksite testleri yapılmıştır. BIBR1532 ve resveratrol için IC<sub>50</sub> dozları sırasıyla 50.81  $\mu$ M (48. saat) ve 86.23  $\mu$ M (72 saat) olarak belirlenmiştir. İki madde için CI 1.7 olarak belirlenmiştir. BIBR1532 ve resveratrol

ajanlarının her ikisi de hücrelerin canlılık oranını düşürürken, apoptozu indükleyici bir etkileri tespit edilmemiştir.

BIBR1532 ve resveratrol kombinasyonunun kolorektal kanser hücrelerinde uygulanmasına dair literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda bu maddelerin uygulamasının kanser ilişkili lncRNA ekspresyonlarında yarattığı değişiklikler ekspresyon analizleri ile araştırılmasının, daha önce incelenmemiş olan lncRNA'ların CRC ile ilişkilendirilerek tedavi stratejilerinin oluşturulmasında yeni bir bakış açısı kazandıracağını düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler; Kolorektal kanser; BIBR1532; resveratrol; lncRNA**



## **Abstract**

### **The Effect of Combination of Resveratrol and BIBR1532 on the lncRNA Expression in Colorectal Cancer Cells**

Colorectal cancer is known as the third most common cancer type and the fourth most common cause of death and thus new targeted therapies are continuously investigated. In cancer cells; it is known that certain types of long non-coding RNAs are highly expressed, and these lncRNAs are involved in development and progression of carcinomas. Therefore, lncRNAs are thought as a target for cancer therapies. BIBR1532 is a telomerase inhibitor and in cancer research, it is used to inhibit active telomerase in tumours. Resveratrol is a natural phytoalexin and it targets the molecules that are involved in proliferation and apoptosis. In addition, resveratrol induces apoptosis by inhibiting KRAS-mediated signalling.

In this study, the aim is to apply BIBR1532 and resveratrol agents to HT-29 colorectal cancer cells and to determine cytotoxicity of these agents. Following this, possible apoptotic effects of BIBR1532 and resveratrol will be investigated. Finally, after exposure to these two agents, lncRNA expression changes will be determined in HT-29 cells. The concentration of HT-29 cells in each well of a 96-well plate was determined with the proliferation experiment. With WST-1 analysis cytotoxic effects of BIBR1532 and resveratrol were investigated depending on time and dose. After this, pre-determined IC<sub>50</sub> doses were applied to HT-29 cells both single and in combination and the cells with no drug application, were taken as control. Then apoptosis test was performed via Annexin V assay. For lncRNA analysis, agents were applied as in the apoptosis test and again the cells with no drug application, were taken as control. RNA isolation from all cell groups was carried out and cDNA was synthesized, then RT-PCR was performed for the examination of changes in lncRNA levels.

For HT-29 cells, optimal cell concentration was determined as  $2 \times 10^4$  cells/ml and according to cytotoxicity assay IC<sub>50</sub> doses were decided for BIBR1532 and resveratrol to be 50.81  $\mu$ M (48. hour) and 86.23  $\mu$ M (72 hour) respectively. CI was 1.7 for these two agents. Viability of cells after exposure to both BIBR1532 and resveratrol agents, decreased; however there was no apoptosis inducing effect found for both agents.

There is no study about the application of BIBR1532 and resveratrol combination on CRC cells in literature. We suggest that the investigation of the effects of these agents on cancer related lncRNAs and linking lncRNAs with CRC will give new point of view in generating new treatment strategies.

**Keywords; Colorectal cancer; BIBR1532; resveratrol; lncRNA**



## İçindekiler

|   |      |
|---|------|
| Önsöz.....  | I    |
| Özet.....   | III  |
| Abstract.....                                     | V    |
| İçindekiler .....                                 | VII  |
| Tablolar Dizini.....                              | X    |
| Şekiller Dizini .....                             | XI   |
| Grafikler Dizini .....                            | XII  |
| Kısaltma Listesi .....                            | XIII |
| Giriş .....                                       | 1    |
| 1.1. Araştırmanın Problemi.....                   | 1    |
| 1.2. Araştırmanın Sorusu .....                    | 1    |
| 1.3. Araştırmanın Hipotezleri .....               | 1    |
| 1.4. Araştırmanın Varsayımları.....               | 1    |
| 1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları .....            | 2    |
| 1.6. Araştırmanın Amacı .....                     | 2    |
| Genel Bilgiler .....                              | 3    |
| 1. Kolorektal Kanser                              |      |
| 1.1. Kolorektal Kanserde Genetik Değişimler       |      |
| 2. Uzun kodlamayan RNA (lncRNA)'lar               |      |
| 2.1. Wnt/ $\beta$ -catenin Yolağındaki lncRNA'lar |      |
| 2.2. EGFR/IGF-IR Sinyal Yolağındaki lncRNA'lar    |      |
| 2.3. TGF- $\beta$ Sinyal Yolağındaki lncRNA'lar   |      |
| 2.4. p53 Yolağındaki lncRNA'lar                   |      |
| 3. Kullanılan İlaçlar                             |      |
| 3.1. Resveratrol                                  |      |
| 3.2. BIBR1532                                     |      |
| 4. Hücre Ölüm Mekanizmaları                       |      |
| 4.1. Apoptoz                                      |      |
| 4.2. Nekroz                                       |      |
| Gereç ve Yöntem .....                             | 11   |
| 1. Hücrelerin Çoğaltılması ve Takibi              |      |
| 2. Hücre Canlılık Testi                           |      |

|  |           |
|--|-----------|
| 3. Hücrelerin Pasajlanması   |           |
| 4. Hücrelerin Dondurulması   |           |
| 5. Hücrelerin Çözülmesi  |           |
| 6. Hücre Proliferasyon Deneyi  |           |
| 7. Etken Madde Hazırlanması  |           |
| 8. Sitotoksosite Deneyi  |           |
| 9. İzobologram Analizi   |           |
| 10. Apoptoz Deneyi   |           |
| 11. lncRNA Ekspresyon Analizi  |           |
| 11.1. Total RNA İzolasyonu   |           |
| 11.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi  |           |
| 11.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)  |           |
| <b>Bulgular.....</b>   | <b>38</b> |
| 1. Proliferasyon Deneyi ile Uygun Hücre Konsantrasyonunu Saptanması  |           |
| 2. Sitotoksosite Deneyi  |           |
| 2.1. BIBR1532 ajanının HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Etkisi  |           |
| 2.2. Resveratrol ajanının HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Etkisi   |           |
| 2.3. BIBR1532 ve Resveratrol Kombinasyonunun HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi                        |           |
| 3. Apoptoz Deneyi  |           |
| 3.1. BIBR1532, Resveratrol ve BIBR1532 + Resveratrol Kombinasyonunun Kolorektal Kanser Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri |           |
| 4. BIBR1532 ve Resveratrolün HT-29 Hücreleri Üzerindeki lncRNA Ekspresyon Değişimlerinin Değerlendirilmesi                       |           |
| 4.1. BIBR1532 Ajanının HT-29 Hücreleri Üzerindeki lncRNA Ekspresyon Değişimlerinin Değerlendirilmesi                             |           |
| 4.2. Resveratrol Ajanının HT-29 Hücreleri Üzerindeki lncRNA Ekspresyon Değişimlerinin Değerlendirilmesi                          |           |
| 4.3. BIBR1532 ve Resveratrol Kombinasyonunun HT-29 Hücreleri Üzerindeki lncRNA Ekspresyon Değişimlerinin Değerlendirilmesi       |           |
| <b>Tartışma.....</b>   | <b>52</b> |
| <b>Sonuç ve Öneriler.....</b>  | <b>57</b> |
| <b>Kaynaklar .....</b>   | <b>58</b> |

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| <b>Teşekkür .....</b> | <b>62</b> |
| <b>Özgeçmiş .....</b> | <b>64</b> |



## **Tablolar Dizini**

**Tablo 1: HT-29 hücre hattı özellikleri**

**Tablo 2: BIBR1532 özellikleri**

**Tablo 3: Resveratrolün özellikleri**

**Tablo 4: Genomik DNA eliminasyon karışımı**

**Tablo 5: Ters transkripsiyon karışımı**

**Tablo 6: PCR karışımı**

**Tablo 7: PCR programı**

**Tablo 8: LncRNA PCR Array Düzeni**

**Tablo 9: LncRNA PCR Array Gen İsimleri ve Açıklamaları**

**Tablo 10: HT-29 hücrelerinde BIBR1532 ve resveratrol ajanlarının tekli ve kombine şekilde apoptoz sonuçları**

**Tablo 11: HT-29 hücrelerinde kontrol grubunun apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi**

**Tablo 12: HT-29 hücrelerinde BIBR1532 uygulanan grubun apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi**

**Tablo 13: HT-29 hücrelerinde resveratrol uygulanan apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi**

**Tablo 14: HT-29 hücrelerinde BIBR1532 + Resveratrol kombinasyonu uygulanan grubun apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi**

## Şekiller Dizini

Şekil 1: Kolon anatomisi ve Kolorektal kanser evreleri

Şekil 2: Kolorektal kanserde adenom karsinom dizisi

Şekil 3: Inverted mikroskop

Şekil 4: HT-29 hücrelerinin mikroskopta görünümü. Düşük yoğunluk (sol), yüksek yoğunluk (sağ)

Şekil 5: Scraper

Şekil 6: Neubauer Lamı

Şekil 7: WST-1 çalışma prensibi

Şekil 8: BIBR1532 Kimyasal Yapısı

Şekil 9: *cis*- ve *trans*- resveratrolün kimyasal yapısı

Şekil 10: Mikroplas okuyucu

Şekil 11: BD Acruri-C6 akım sitometri cihazı

Şekil 12: PCR array (RF:referans genler, GDC: genomik DNA kontrol, RTC: revers transkriptaz kontrol, PPC: pozitif PCR kontrol)

## **Grafikler Dizini**

**Grafik 1: HT-29 Kolorektal Kanseri Hücresi Proliferasyon grafiği**

**Grafik 2: HT-29 hücrelerinde BIBR1532'nin IC50 doz grafiği**

**Grafik 3: HT-29 hücrelerinde resveratrol maddesinin IC50 doz grafiği**

**Grafik 4: HT-29 hücrelerinde BIBR1532 + resveratrol kombinasyonunun IC50 doz grafiği**

**Grafik 5: BIBR1532 ajanının HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'lar üzerindeki etkisini gösteren ısı haritası**

**Grafik 6: BIBR1532 ajanının HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'ların clustergram analizi**

**Grafik 7: Resveratrol ajanının HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'lar üzerindeki etkisini gösteren ısı haritası**

**Grafik 8: Resveratrol ajanının HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'ların clustergram analizi**

**Grafik 9: BIBR1532 ve Resveratrol kombinasyonunun HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'lar üzerindeki etkisini gösteren ısı haritası**

**Grafik 10: BIBR1532 ve Resveratrol kombinasyonunun HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'ların clustergram analizi**

## Kısaltma Listesi

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>°C</b>             | : Santigrat                                      |
| <b>μ</b>              | : Mikro  |
| <b>ACF</b>            | : Anormal kript odağı                            |
| <b>APAF1</b>          | : Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1        |
| <b>AFAP</b>           | : Atenüe familyal adenomatöz polipozis           |
| <b>APC</b>            | : Adenomatöz polipozis koli                      |
| <b>BMP</b>            | : Kemik morfojenetik proteini                    |
| <b>BRRS</b>           | : Bannayan- Riley- Ruvalcaba sendromu            |
| <b>CCAL</b>           | : Kolorektal kanser bağlantılı lncRNA            |
| <b>CCAT1- L</b>       | : CRC- spesifik lncRNA                           |
| <b>CI</b>             | : Kombinasyon indeksi                            |
| <b>CIMP</b>           | : Promotör metilasyonu                           |
| <b>CIN</b>            | : Kromozomal instabilite                         |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | : Karbon Dioksit                                 |
| <b>CRC</b>            | : Kolorektal kanser                              |
| <b>CS</b>             | : Cowden sendromu                                |
| <b>DCC</b>            | : Deleted in colorectal cancer                   |
| <b>DISC</b>           | : Ölüm indükleyen sinyal kompleksi               |
| <b>dk</b>             | : Dakika   |
| <b>DMSO</b>           | : Dimetil sülfoksit                              |
| <b>DR</b>             | : Ölüm reseptörü                                 |
| <b>EGFR</b>           | : Epidermal büyüme faktör reseptörü              |
| <b>EMT</b>            | : Epitelyal mezankimal dönüşüm                   |
| <b>EpCAM</b>          | : Epitel hücre adezyon molekülü                  |
| <b>FISH</b>           | : Floresan in situ hibridizasyon                 |
| <b>FAP</b>            | : Familyal adenomatöz polipozis                  |
| <b>FBS</b>            | : Fetal sığır serumu                             |
| <b>FITC</b>           | : Floresan izotiyosiyanat                        |
| <b>H<sub>2</sub>O</b> | : Su   |
| <b>HNPCC</b>          | : Herediter polipozis- olmayan kolorektal kanser |
| <b>hnRNP-K</b>        | : Heterojen nükleer ribonükleoprotein K          |
| <b>IAP</b>            | : Apoptoz inhibe edici protein                   |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>IC<sub>50</sub></b> | : İnhibitör konsantrasyon oranı                 |
| <b>IGF-IR</b>          | : İnsülin benzeri büyüme faktörü tip 1 reseptör |
| <b>JPS</b>             | : Jüvenil polipozis sendromu                    |
| <b>lincRNA</b>         | : Uzun intergenik kodlamayan RNA                |
| <b>lncRNA</b>          | : Uzun kodlamayan RNA                           |
| <b>lncRNA- ATB</b>     | : TGF- $\beta$ ile aktive olan lncRNA           |
| <b>LOH</b>             | : Heterozigotluk kaybı                          |
| <b>LS</b>              | : Lynch sendromu                                |
| <b>MAP</b>             | : Mutyh ilişkili polipozis                      |
| <b>MAPK</b>            | : Mitojen aktive edici protein kinaz            |
| <b>MDM2</b>            | : Mouse doubleminute 2                          |
| <b>MDR1</b>            | : Çoklu ilaç direnci -1                         |
| <b>MEG3</b>            | : Maternal ifade edilen gen 3                   |
| <b>MLH1</b>            | : mutL homolog 1                                |
| <b>MMP9</b>            | : Matriks metalloproteinaz-9                    |
| <b>MMR</b>             | : Hatalı eşleşme tamiri                         |
| <b>MRP1</b>            | : Çoklu ilaç direnç proteini 1                  |
| <b>MSH2</b>            | : mutS protein homolog 2                        |
| <b>MSH6</b>            | : mutS protein homolog 6                        |
| <b>MSI</b>             | : Mikrosatellit instabilitesi                   |
| <b>MSI-H</b>           | : Mikrosatellit instabilitesi – yüksek          |
| <b>mTOR</b>            | : Memeli rapamisin hedefi                       |
| <b>MTX</b>             | : Metotreksat                                   |
| <b>NCCN</b>            | : Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı                    |
| <b>NGS</b>             | : Yeni nesil dizileme                           |
| <b>nm</b>              | : Nanometre                                     |
| <b>NSAID</b>           | : Non-steroid anti-inflamatuvar ilaç            |
| <b>PBS</b>             | : Fosfat tampon tuz çözeltisi                   |
| <b>PCAT1</b>           | : Prostat kanser ilişkili transkript-1          |
| <b>PHTS</b>            | : PTEN hamartom tümör sendromu                  |
| <b>PI</b>              | : Propidyum iyodür                              |
| <b>PI3K</b>            | : Fosfoinositid-3-kinaz                         |
| <b>PJS</b>             | : Peutz- jeghers sendromu                       |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>PMS2</b>                     | : PMS1 homolog 2                                  |
| <b>PS</b>                       | : Fosfatidil serin                                |
| <b>PTEN</b>                     | : Fosfataz ve tensin homolog                      |
| <b>RIP3</b>                     | : Reseptör etkileşimli protein kinaz 3            |
| <b>RNA</b>                      | : Ribonükleik asit                                |
| <b>RNA-seq</b>                  | : RNA dizileme                                    |
| <b>RNA- TERRA</b>               | : Telomerik tekrar içeren RNA                     |
| <b>Rpm</b>                      | : Dakikada devir sayısı                           |
| <b>RT- PCR</b>                  | : Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu |
| <b>Smac</b>                     | : İkinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü     |
| <b>SNHG16</b>                   | : SnoRNA host gen 16                              |
| <b>SPS</b>                      | : Serrated polipozis sendromu                     |
| <b>STKR</b>                     | : Serin- treonin kinaz reseptörü                  |
| <b>TCR</b>                      | : T hücre reseptörü                               |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>   | : Tümör büyüme faktörü beta                       |
| <b>TGF<math>\beta</math>RII</b> | : TGF- $\beta$ reseptör tip II                    |
| <b>TLR</b>                      | : Toll benzeri reseptör                           |
| <b>TNF</b>                      | : Tümör nekroz faktörü                            |
| <b>TUSC7</b>                    | : Tümör baskılayıcı aday1 7                       |
| <b>V600E</b>                    | : Val600Glu                                       |
| <b>WST-1</b>                    | : Water soluble tetrazolium                       |

## Giriş

### 1.1. Araştırmanın Problemi

Gelişen teknoloji ile birlikte ortaya çıkan tüm yeni tanı ve tedavi yöntemlerine karşın, CRC hala üçüncü en sık görülen kanser tipi olmaya devam etmektedir. Kolorektal kanserde yeni moleküler hedefler araştırılmaya ve tedavi yöntemlerine yönelik çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir. Geliştirilecek olan tedavi yöntemleri CRC'nin karmaşık genetik yapısı ve ilaç dirençlerinin oluşması nedeniyle sınırlı bir hal almaktadır. Bu nedenle düşüncelerimiz, çalışmamızda planladığımız kombine ajan uygulamasının ileriki *in vivo* çalışmalar ile desteklenerek CRC tedavisine katkı sağlayacağı yönündedir.

### 1.2. Araştırmanın Sorusu

Kolorektal kanser en sık görülen üçüncü kanser ve dördüncü ölüm nedenidir. Genetik ve çevresel birçok etken CRC için risk oluşturmaktadır. Literatürde tanı ve tedaviye yönelik birçok çalışmaya rastlansa da CRC'nin önüne kesin olarak geçilememektedir. Hedeflenmesi gereken gereken, ilaç direncinin yenilmesi, CRC ile ilişkili hangi yollara yönelik tedavilerin geliştirilmesi gerektiği gibi sorunlar ışığında CRC hücreleri üzerinde antikanser ajanların en etkili şekilde kullanımıyla ilgili sorular tespit edilmiştir.

### 1.3. Araştırmanın Hipotezleri

BIBR1532 ve resveratrol bu çalışmadaki bağımsız değişkenlerdir; bu maddelerin kolorektal kanser hücrelerindeki olası apoptotic etkisi ve lncRNA değişim düzeyleri bağımlı değişkenlerdendir. Dolayısıyla hipotezimiz; telomeraz aktivitesinin yüksek olduğu ve CRC'de bir hedef olan Akt yolağı aktivitesi ile ilişkilendirilerek, telomeraz inhibitörü BIBR1532 ve resveratrolün tekli ve combine uygulamasının kanser ilişkili lncRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır.

### 4Araştırmanın Varsayımları

Araştırmamızda, telomeraz inhibitörü BIBR1532 ve resveratrolün tekli ve kombinasyon şeklinde uygulanmasının ardından HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'ların ekspresyon seviyelerinde değişikliğe yol açacağı beklenmektedir.

#### **1.4. Araştırmanın Sınırlılıkları**

Araştırma in vitro Őartlarda uygulandığından tam olarak bir organizmayı temsil edemeyeceği için kapsamlı bir analiz yapmayı sınırlandırmaktadır.

#### **1.5. Araştırmanın Amacı**

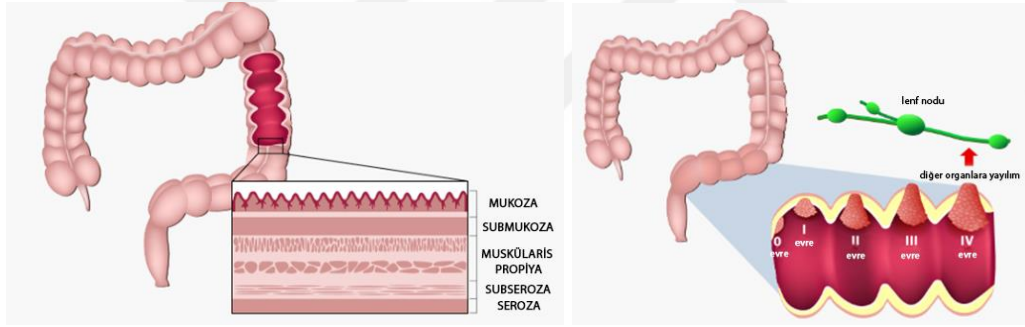
Telomeraz inhibitşoru olan BIBR1532 ve resveratrolün kombine ve tekli Őekillerde HT-29 hşcrelerinde lncRNA ekspresyonlarına etkisi bilinmediğinden, HT-29 hşcrelerine, BIBR1532 ve resveratrol in vitro olarak uygulanarak, kanser ilişkili olan lncRNA'ların ekspresyon değişiminin belirlenmesi ve potansiyel lncRNA'ların CRC ile ilişkilendirilmesi amaçlanmaktadır.



## Genel Bilgiler

### 1. Kolorektal Kanser (CRC)

Kolorektal kanser (CRC) dünya genelinde yıllık ölüm oranının % 8'den fazlasını kapsamaktadır (American Cancer Society ve ark. 2015). Kesin nedenleri bilinmemekle birlikte; yaş, kişisel ve ailesel CRC geçmişi ve beslenme CRC için risk oluşturmaktadır. Kadın ve erkekler hayat süreleri boyunca eşit oranda CRC riskine sahiptir ve bu oran % 4,3 olarak belirlenmiştir (International Agency for Research on Cancer 2012). Diyabet, yaş, obezite, adenomatöz polipler gibi intrinsik ve sigara kullanımı, yetersiz lif, balık ve D vitamini, aşırı alkol kullanımı gibi ekstrinsik faktörlerin CRC riski ile ilişkilendirildiği bilinmektedir. CRC oluşumunda farklı yollarla bulunmakla beraber, çoğunluğu genetik instabilite, hücre proliferasyonu ve kripto niş mikro çevresinin düzenlenmesinde rol oynayan tek gen hattı mutasyonu ile tanımlanmaktadır (Ma ve ark. 2018).



**Şekil 1: Kolon anatomisi ve Kolorektal kanser evreleri** (Mycoloncancercoach n.d.)

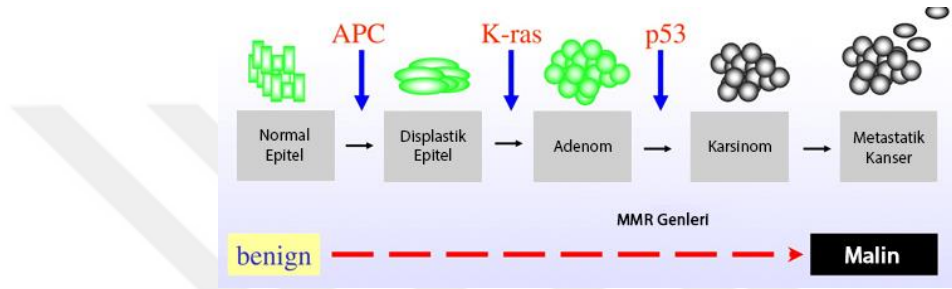
Şekil 1'de kolorektal kanserin evreleri gösterilmekte olup 0. Evrede kanser kolon duvarının dış katmanında yalnızca mukozadadır, evre 1'de ise tümör kolon duvarının ikinci ve üçüncü katmanları olan submukoza ve muskularis propiyaya ilerlemiş durumdadır. Lenf nodlarına ilerlemeden kolon duvarının tamamına yayılan kanserler ise evre 2 olarak adlandırılmaktadır ve evre 3'te kolon duvarı ve lenf nodlarına ilerlemiş bir tümör vardır. Evre 4 ise metastaz yapmış bir kolon kanserini göstermektedir.

#### 1.1. Kolorektal Kanserde Genetik Değişimler

DNA tamir genlerindeki defektler, epigenetik değişimler ve genom bütünlüğü CRC ile ilişkilendirilmektedir.

Endotelyal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) ligantı EGF bağlandığında reseptör dimerizasyonu ve sonrasında EGFR otofosforilasyonu gerçekleşmektedir; böylece RAS/RAF/MAPK proteinleri ve PI3K/AKT yolağı aktive olmaktadır. KRAS ve BRAF mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK) yolağının üyeleridir ve bu yolak hücre proliferasyonu, farklılaşması, senesans ve apoptozu düzenlemektedir. RAS, fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) ve RAF ile kaskadı aktive etmektedir. PI3K apoptozu inhibe ederken RAF proliferasyonu aktive etmektedir. Ekzon 2 kodon 12 ve kodon 13'te ve ekzon 3 kodon 61'deki KRAS mutasyonları, EGFR'den bağımsız olarak proliferasyonu ve sağkalımı arttırmaktadır, bu nedenle EGFR'ye yönelik tedavi yaklaşımları yetersiz kalmaktadır. RAF serin treonin kinaz ailesinin bir üyesi olan BRAF, büyüme sinyallerine karşı RAS-RAF-MAP kinaz yolağı ile yanıt oluşturmaktadır ve sporadik CRC'lerde mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyonların büyük çoğunluğunu V600E (Val600Glu) mutasyonları oluşturmaktadır ve familial ile sporadik CRC'lerin ayırımında yardımcıdır (Armaghany ve ark. 2012). Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) / AKT/ rapamisin memeli hedefi (mTOR), alternatif EGFR- aracılı sinyal yoludur; PI3K lipid kinaz ailesidir ve AKT'yi fosforilleyerek aktive etmektedir, AKT ise mTOR dahil neredeyse 100 adet proteini fosforillemektedir. PI3K'nin katalitik altünitesini kodlayan gen olan PIK3CA'nın kolorektal kanserlerde %25'in üzerinde mutasyona uğradığı bilinmektedir. Genomu instabiliteden koruyan PTEN, PI3K/AKT yolunu negatif olarak düzenleyen bir fosfatazdır ve kanserlerde aktive durumdadır. PTEN kaybı, monoklonal inhibitör tedavilerinde eksik tümör yanıtına ve toplam sağkalımda azalışa neden olmaktadır. Tümör büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ), reseptörlerine bağlanarak birçok hücre işlevi düzenleyen multifonksiyonel proteinlerdir. Üç farklı TGF $\beta$  reseptörü tanımlanmış olup, transforme edici büyüme faktörü reseptör tip II 'nin (TGF $\beta$ RII) MSI kolon kanserlerinin %90 oranında mutasyona uğradığı saptanmıştır (Markowitz ve ark., 1995). TGF $\beta$ RII tümör oluşumunun ilk aşamalarında tümör baskılayıcı etkilere sahip iken, geç aşamalarda hücre ölümünü azaltıp immünrepressyonu sağlayarak tümör ilerlemesini hızlandırmaktadır. Ayrıca, invazyonu ve metastazı destekleyen bir mekanizma olan epitelyal- mezankimal dönüşümünü (EMT) hızlandırmaktadır. TGF $\beta$ RII mutasyonu olmayan MSI tümörler TGF $\beta$ RII 'ye yanıt

olarak EMT geçirebilirler; bu da TGF $\beta$ R2 ve MSI olmayan durumun invazyon, metastaz ve prognozda anahtar role sahip olduğunu göstermektedir. Kök hücreler zarar gördüklerinde onarım yerine apoptoza yönelmeyi tercih etmekte; mutajenik maddeleri, çoklu ilaç direnci 1 (multidrug resistance 1- MDR1) adı verilen plazma proteini ile dışarı pompalamaktadır ve diğer yandan kök hücrelerin yüzeyinde yüksek oranda MDR1 eksprese edilmesi, kök hücrelerin kemoterapiye direnç göstermelerinde bir etken olduğunu düşündürmektedir (Armaghany ve ark. 2012). Kolon kanserinde genomik instabilitenin; kromozomal instabilite, mikrosatelit instabilitesi, CpG adacık metilasyon fenotipi olmak üzere üç farklı yolu bulunmaktadır.



**Şekil 2: Kolorektal kanserde adenom karsinom dizisi** (Smith ve ark. 2002)

Kromozomal instabilite (chromosomal instability- CIN), adenom- karsinom dizisi olarak da bilinmektedir ve genetik ve histolojik değişiklikleri tanımlamaktadır. Genomik değişiklikler K-Ras gibi proto-onkogenlerin aktivasyonu ve p53 ve adenomatöz polipozis koli (Adenomatous Polyposis Coli-APC) gibi tümör baskılayıcıların inaktivasyonunu kapsamaktadır (Armaghany ve ark. 2012). APC/Wnt/  $\beta$ -katenin yolağı sporadik ve herediter CRC karsinogenezinde önemli rol oynamaktadır (De Filippo ve ark., 2002). MMR enzimlerinin inaktivasyonu; DNA tamir geni olan mutL homolog 1 (MLH1) geninin CpG adalarının metilasyonu ile ya da MMR ailesi üyelerinin nokta mutasyonu ile gerçekleşmektedir. Yüksek DNA mikrosatelit instabilitesi (MSI-H) ise, markırların %30'unda ya da fazlasında olan instabilite ile tanımlanmaktadır. CpG adaları normalde metile olmamış durumdadırlar, promotör metilasyonu olduğu durumlarda ise bu gen transkripsiyonel olarak susturulmuş durumdadır ve bu gen bir tümör baskılayıcı gen ise iki allelde meydana gelen promotör hipermetilasyonu ile susturma gerçekleşebilmektedir. MLH1'in anormal metilasyonu sporadik MSI CRC'lerin %80'inde görülmektedir.

## 2. Uzun kodlamayan RNA (lncRNA)'lar

Yapılan çalışmalar ışığında insan genomunun yalnızca %2'lik kısmının proteine dönüştüğü ve kalan kısmın protein kodlamayan ribonükleik asitleri (non-coding RNA-ncRNA) oluşturduğu bilinmektedir. 'Housekeeping'- referans- ncRNA'lar haricinde düzenleyici ncRNA'lar da bulunmakta bu ncRNA'lar kısa ncRNA'lar ve uzun ncRNA'lar olarak ikiye ayrılmaktadır. Uzun kodlamayan RNA (lncRNA)'lar, 200 baz çiftinden uzun olan ve epigenetik, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeylerde gen ekspresyonunu düzenleyebilen RNA molekülleri olarak tanımlanmaktadır. Protein kodlayan genlere uzaklıklarına göre; uzun intergenik kodlamayan RNA (lincRNA)'lar, intronik, overlapping, sens ve antisens olarak gruplandırılmaktadırlar. Birçok kanserde olduğu gibi CRC'de de lncRNA ekspresyon değişimleri gözlenmektedir. CRC-ilişkili tanımlanan ilk lncRNA 1996 yılında tanımlanan H19 olmakla birlikte, aşırı ekspresyonu CRC gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Birçok lncRNA, Wnt/  $\beta$ -katenin, EGFR (epidermal growth factorreceptor) / IGF-IR), KRAS ve PI3K, TGF- $\beta$ , p53 gibi CRC patogenezinde görev alan sinyal yollarında görev almakta ve EMT'de rol oynamaktadır.

### 2.1.Wnt/ $\beta$ -catenin Yolağındaki lncRNA'lar

LncRNA H19 11p15.5'te lokalizedir ve sporadik CRC'lerin %80'inde inaktif şekilde görülen APC geninin H19 tarafından modüle edildiği bilinmektedir (Yanfei Yang ve ark. 2017). Yoshimizu ve ark. çalışmalarında, H19 knockout farelerin tümör geliştirmedeği görülmüş ve H19'un onkogenden çok onkobaskılayıcı (oncosuppressive) gen olduğunu göstermişlerdir (Yoshimizu ve ark. 2008). Diğer bir yandan,  $\beta$ -katenin yıkım kompleksine ait olan AP-2 $\alpha$  proteinin onkobaskılayıcı (oncosuppressive) olarak görev aldığı çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca, kolorektal kanser-bağılantılı lncRNA (CCAL- colorectal cancer-associated lncRNA)'nın AP-2 $\alpha$ 'yı negatif olarak düzenlediği ve Wnt sinyalini başlatmaya neden olduğu gösterilmektedir. Xiang ve ark. 8q24.21 lokusunda lokalize olan, CRC-spesifik lncRNA (CCAT1-L) kodlayan super-enhancer tanımlamışlardır (Xiang ve ark. 2014). CCAT1-L, CRC'lerde upregüle olan CCAT1'in izoformudur ve diğer yandan MYC transkripsiyonunun pozitif kontrolünde yer almaktadır. Ling ve ark. (Ling ve ark. 2013) ise Wnt'nin downstream hedefi olan ve mikrosatelit- stabil (MSS)

CRC'lerde aşırı eksprese olan kolon kanser-bağlantılı transkript-2 (CCAT2)'yi tanımlamışlardır. Yüksek oranda CCAT2 eksprese eden CRC'lerde MYC ekspresyonunun yüksek olduğu görülmektedir ve geçici CCAT2 knockdownu ile MYC ekspresyonu azaltılmaktadır. CCAT2 TCF7L2'ye bağlanarak Wnt aktivitesini artırabilirken, TCF7L2 knockdownu CCAT2 ekspresyonunu düşürmektedir; bu nedenle TCF7L2'nin yüksek CCAT2 ekspresyonu için gerekli olduğu bilinmektedir (Yanfei Yang ve ark. 2017).

## **2.2. EGFR/IGF-IR Sinyal Yolağındaki lncRNA'lar**

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR- epidermal growth factorreceptor) EGFR tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir, IGF-IR ise transmembran tirozin kinazdır. EGFR reseptörlerinin uyarılması CRC dahil olmak üzere birçok kanserde görülürken, IGF-IR'nin kolorektal tümör oluşumu ve gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Yongzhi Yang ve ark. 2017). IGF-IR, KRAS/Raf/MAPK (mitojen-aktive edici protein kinaz) ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarının aktivasyonunu sağlamaktadır, sonucunda ise kontrolsüz proliferasyon, adezyon, anjiyogenez, migrasyonu, metastaz ve sağ-kalıma neden olmaktadır. IGF-odaklı gen olan CRNDE, CRC'nin erken evrelerinde aktive edilmekte ve kromatin-modifiye edici kompleksler ile etkileşime girerek gen ekspresyonunu düzenleyebilmektedir. Ellis ve ark. çalışmasında (Ellis, Graham, and Molloy 2014); CRNDE, PI3K ve KRAS'ın downstream hedefleri arasında yer aldığı ve upregülasyonu neoplastik kolon hücrelerinin oksidatif metabolizmadan aerobik glikolize şekilde metabolik shiftine neden olduğu gösterilmektedir, bu da Warburg etkisi ile açıklanmaktadır. CRC patogenezinde yer alan diğer bir lncRNA ise PTENP1 (phosphataseans tensin homolog pseudogene 1)'dir ve PI3K sinyal yolağının bir inhibitörüdür.

## **2.3. TGF-β Sinyal Yolağındaki lncRNA'lar**

TGF-β, transmembran serin-treonin kinaz reseptörleri (STKR) ve Smad ailesinin intraselüler araçlar ile sinyalleşen bir sitokindir ve CRC gelişiminde ikili role sahiptir. Tümör oluşumunun ilk aşamalarında baskılayıcı olarak rol oynayan TGF-β, daha geç aşamalarda ise CRC'nin invazivliğini arttırmaktadır (Li and Kang 2014). LncRNA PVT-1 kanser patofizyolojisi ile ilgilidir ve Takahashi ve ark. çalışmasında PVT-1 knockdown CRC hücre hatlarını kullanarak gen ekspresyon microarray analizi gerçekleştirmiş ve PVT-1 knockdownunun apoptoz ile TGF-β sinyal

proteinlerinin aktivasyonunu sağladığını göstermiştir (Takahashi ve ark. 2014). TGF- $\beta$ , lncRNA-ATB (TGF- $\beta$  ile aktive olan lncRNA) gibi lncRNA'ları aktive edebilmektedir ve Yuan ve ark. Çalışmasına (Yuan ve ark. 2014) göre bu lncRNA'nın hepatoselüler karsinomda invazyon ile metastazı başlattığı bilinmektedir.

#### **2.4.p53 Yolağındaki lncRNA'lar**

p53'ün, kendisini düzenleyen ve etkileyen birçok lncRNA ile ilişkili olduğu bilinmektedir. MEG3, MALAT1, p53-eRNA, Wrap53, Loc285184, lncRNA-p21, H19 ve PANDA bu lncRNA'lardır. MEG3 (maternally-expressed gene-3), p53 negatif düzenleyicisi olan MDM2 (Mouse doubleminute 2)'nin ekspresyonunu azaltmakta ve CRC patogenezi ve gelişimini engellemektedir. MEG3 promotör bölge hipermetilasyonundan dolayı, CRC dahil olmak üzere birçok kanserde ve HCT116, H29 gibi kanser hücre hatlarında MEG3 kaybı gözlenmektedir. Loc285194 p53 efektörüdür ve osteosarkomda ve CRC'de ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir. Liu ve ark. Loc285194'ün p53 tarafından hedeflendiğini ve onkogenik miR-211'e bağlanıp ve baskılayarak CRC'de hücre büyümesini engellediğini göstermiştir (Liu ve ark. 2013). Bu sonuçlar, Loc285194'ün potansiyel CRC baskılayıcısı olabileceğini düşündürmektedir. Huarte ve ark. apoptozda önemli rolü bulunan lincRNA-p21'i tanımlamış ve lincRNA-p21'in p53 transkripsiyon hedefi olduğunu bildirmiştir (Huarte ve ark. 2010).

### **5. Kullanılan İlaçlar**

#### **5.1. Resveratrol**

Resveratrol, birçok bitkide bulunan doğal bir polifenolik bileşiktir ve antioksidan, antiinflamatuvar, anti-kanser etkilere sahiptir. Birçok çalışmada, terapötik ve kemopreventif özellikleri gösterilmektedir. Resveratrolün kolonda birikmesi ve zayıf biyoyararlanımı, kolonda uygulanmasının önünü açmakta ve böylelikle kolon kanser çalışmalarında kullanımı yaygınlaşmaktadır. Yapılan bir çalışmada, pro-apoptotik Bax proteinin induksiyonu ve mukozadaki p21 ekspresyonunu engelleyip anormal kript odak sayısını azaltarak kolon kanserinin başlamasını engellediği saptanmıştır (Tessitore ve ark. 2000). Diğer bir çalışmada ise kolon kanser oluşumunun engellenmesi, hücre döngüsü progresyonunda ve proliferasyonda

görevli genlerin downregülasyonu ile gerçekleştirilmiştir (Schneider ve ark. 2001). Ayrıca yüksek resveratrol konsantrasyonun, telomeraz aktivitesini düşürerek HT-29 ve WiDr kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği belirlenmiştir (Fuggetta ve ark. 2006). Diğer bir çalışmada ise, resveratrol ve antimetabolit bir kemoterapötik ilaç olan 5-fluorourasilin kombinasyonunun kolorektal kanser hücrelerinde STAT3 ve Akt fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Aktive olmayan STAT3, hTERT promotörüne bağlanmayı zayıflatarak telomeraz aktivitesini düşürmekte olduğu ve Akt fosforilasyonunun engellenmesinin ise anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkilere yol açtığı saptanmıştır (Chung ve ark. 2018).

## **5.2. BIBR1532**

Ökaryotik kromozomların uç kısımları, telomerik tekrar içeren RNA (telomeric region-containing- RNA-TERRA)'yı da kapsayan uzun kodlamayan RNA bölgelerinden oluşmakta ve bu bölgeler RNA polimeraz iki tarafından kodlanmaktadır (Farnung ve ark. 2012). Telomeraz enzimi bir ribonükleoprotein olup revers transkriptaz görevi görmektedir ve kendi RNA alt ünitesi hTR'yi kalıp olarak kullanarak telomerik DNA sentezini gerçekleştirmektedir. Telomerazın protein alt ünitesi, hTERT ise revers transkripsiyon işlemini katalizlemektedir. Telomeraz enziminin reaktivasyonu kanser hücrelerinde görülen bir değişimdir ve bu şekilde malign hücre oluşumu ve büyümesi için gerekli olan limitsiz proliferasyon sağlanabilmektedir. İnsan kanserlerinde %90'a varan oranda telomeraz aktivitesinin rolü bilinmemekte ve immortalizasyondaki işlevi kanıtlanmaktadır. Diğer yandan telomeraz aktivitesinin engellenmesi, telomerlerde kısalmaya yol açarak hücrelerde büyümenin durmasına yol açmaktadır. BIBR1532, sentetik ve non-nükleosidik bir bileşiktir ve seçici bir şekilde telomerazı inhibe edebilmektedir. BIBR1532, telomeraz enzim DNA substrat kompleksinin translokasyonunu sağlamakta ya da template kopyalama sırasında, DNA substratı ile enzimin ayrılmasına yol açmaktadır. Bu basamakların telomeraza özgü olduğu bilindiğinden, BIBR1532'nin telomeraza karşı yüksek spesifite gösterdiği doğrulanmaktadır (Pascolo ve ark. 2002). Antikanser aktiviteleri yapılan birçok çalışmada kanıtlanmış, tümör hücre büyümesini baskıladığı gösterilmiştir. Ek olarak, BIBR1532'nin kemoterapide kombinasyon tedavisi olarak yararlı olacağı bilinmektedir. Over, meme kanserleri ve

lösemi gibi birçok tümörde antikanser etkiye sahip olduğu, kanser hücrelerini sensitize ederek kemoterapiyi desteklediği gösterilmiştir (Bashash ve ark. 2017).

## **6.Hücre Ölüm Mekanizmaları**

Hücrelerde yoğun hasar durumunda, spesifik sinyaller sonucunda hücre ölümü gerçekleşmektedir. Hücre ölüm mekanizmaları apoptoz (tip I), otofaji (tip II) ve nekroz (tip III) olmak üzere genel olarak üç sınıfa ayrılmaktadır.

### **6.1. Apoptoz**

Apoptoz; hücre büzülmesi, membranda kabarcıklaşma ve yoğunlaşmış kromatinlerle karakterizedir. Kaspaz proteazların aktivitesi ile gerçekleşen bir hücre ölüm çeşidi olarak da bilinmektedir. Apoptotik hücre ölümü iki sinyal yolağıyla aktive olabilmektedir: Mitokondriyal (intrinsik) yolak ve ölüm reseptörü (ekstrinsik) yolak. Apoptoz, başka yolağlara ek olarak ölüm reseptörü (DR)'ler ya da mitokondriyal yol ile başlatılabilir. Mitokondriyal yolak, proapoptotik faktörlerin sitozole salınımını sağlayan mitokondri dış membranındaki bütünlük kaybı ile başlatılmakta ve bu süreç Bcl-2 tarafından kontrol edilmektedir. Sitokrom C, sitozolde kaspaz aktive edici kompleksin (apoptozom) oluşmasını sağlamakta ve her iki yolak bu kompleksin oluşumuna ve kaspaz proteazlara bağlı olarak ilerlemektedir (Green and Llambi 2015).Kaspazlar, sistein proteazlardır ve memelilerde en az 17 farklı kaspaz bulunmaktadır. Kaspaz-3, 6, ve 7 sonlandırıcı kaspazlar olarak bilinmekle birlikte protein ile etkileşen bölgelerden eksik olarak üretilmekte ve hücreysel yıkımı etkilemektedirler. Büyük ve küçük altüniteler arasındaki parçalanma ile konformasyonel değişiklikler meydana gelerek olgun proteazda iki aktif bölge oluşmaktadır.

### **6.2.Nekroz**

Nekroz; şişmiş hücreler, plazma membranında bozulmalar ve organel yapılaşmasının kaybı ile karakterize edilmektedir. Bir dizi onarılamaz hücre hasarı sonucunda nekroz olmasına karşın, en az bir aktif nekroz yolağı bulunmaktadır; bu hücreysel ölüm çeşidi nekroptoz olarak adlandırılmakta ve RIP3 (receptor interacting protein

kinase 3) 'ün aktivasyonunu içeren birçok sinyal yolu ile sağlanmaktadır. DNA hasarının RIP3 aktivasyonunu uyarmasının yanında DR'ler, Toll-benzeri reseptörler (TLRs- Tool-like Receptors) ve T-hücre reseptörleri (TCR- T-cell Receptor), RIP3 aktivasyonunda görev almaktadırlar (Moriwaki and Chan 2013).



## Gereç ve Yöntem

### 1. Hücrelerin Çoğaltılması ve Takibi

Araştırmada kullanılacak HT-29 hücre hattı Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır. HT-29 hücreleri; 75 cm<sup>2</sup> lik flasklarda, final konsantrasyonda %10 FBS içeren McCoy's 5A (Modified) Medium ile yeterli miktarda hücre elde edilene kadar 37°C ve 5 % CO<sub>2</sub> koşullarını sağlayan etüvlerde üretilmiştir.

|                           |                            |
|---------------------------|----------------------------|
| <b>Organizma</b>          | İnsan, <i>Homo sapiens</i> |
| <b>Doku</b>               | Kolon                      |
| <b>Hastalık</b>           | Kolorektal adenomakarsinom |
| <b>Yaş</b>                | 44 yaş, yetişkin           |
| <b>Cinsiyet</b>           | Kadın                      |
| <b>Morfoloji</b>          | Epitelyal                  |
| <b>Büyüme özellikleri</b> | Aderent                    |

**Tablo 1: HT-29 hücre hattı özellikleri (ATCC 2019)**

## 2. Hücree Canlılık Testi

Kültüre edilen hücrelerin canlılığını belirleme ve hücreleri sayma amacıyla tripan mavisini boyası kullanılmıştır. 50 µl süspanse hücre ile 50 µl tripan mavisini boyası karıştırılarak Neubauer lamına aktarılmıştır. 4x4'lük lam ışık mikroskobu altında incelenerek hücre sayımı ve canlılık testi yapılmıştır. Boyayı içine alarak mavi renkte görülen hücreler ölü, boyayı içine almayan beyaz hücreler ise canlı olarak sayılmıştır. Canlı hücre sayısı  $2 \times 10^4$  (20000) ile çarpılarak 1 mililitredeki toplam canlı hücre sayısı bulunmuştur. Ölü hücre sayısının aynı şekilde bulunmasının ardından, canlı hücre sayısının toplam hücre sayısına oranlanması ile yüzde olarak hücre canlılığı belirlenmiş oldu.

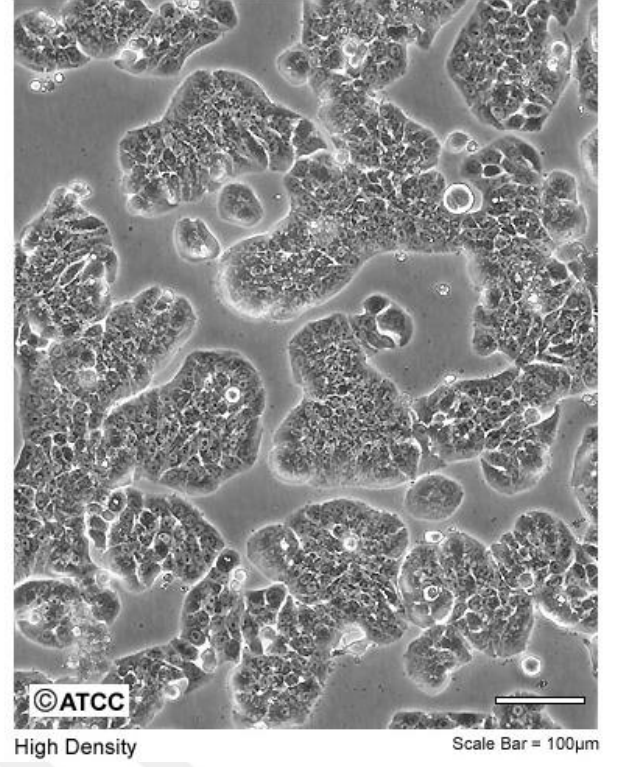
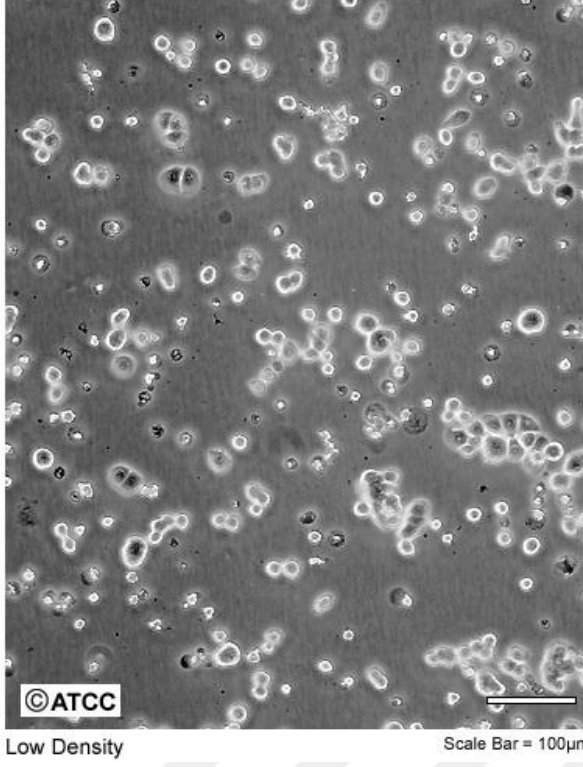


**Şekil 3: Inverted mikroskop (MFIMEDICAL n.d.)**

### **3. Hücrelerin Pasajlanması**

Hücreler flaskın tüm yüzeyini kaplayarak yaklaşık % 80-90 yoğunluk sağlandığında, yeni 75 cm<sup>2</sup> lik flaslara pasajlanmıştır. Çalışmada kullanılan HT-29 hücreleri adherent özelliğe sahip olduğundan, hücrelerin flasktan kaldırılması için scraper kullanılmıştır.

ATCC Number: **HTB-38**  
Designation: **HT-29**



**Şekil 4: HT-29 hücrelerinin mikroskopta görünümü. Düşük yoğunluk (sol), yüksek yoğunluk (sağ) (HT-29 (ATCC® HTB-38™), 2019)**



**Şekil 5: Scraper (ecatalog 2019)**

**Pasaj Protokolü:**

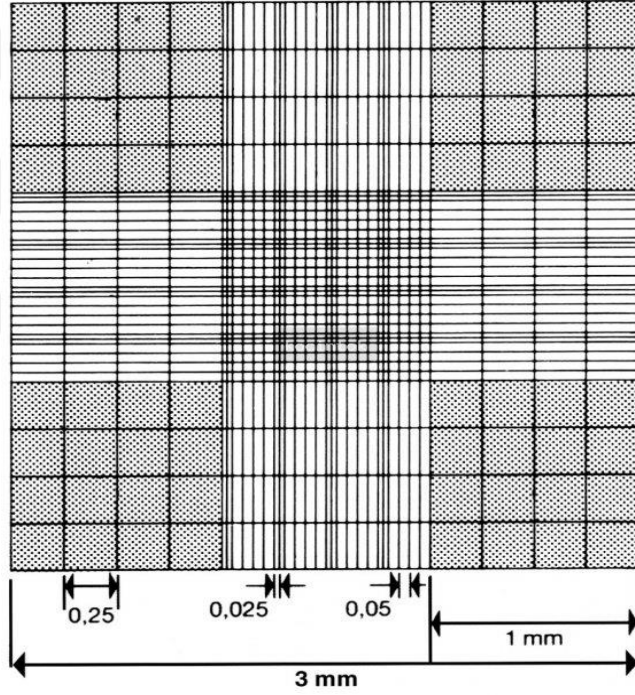
- Flaskların içlerindeki ortam dökülmeden scraper yardımıyla hücreler kazınarak flasktan kaldırılmıştır.
- Elde edilen hücre-besi yeri süspansiyonu falkon tüpe (15 ml'lik) aktarılmıştır.
- 5 dk, 1200 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
- Süpernatant uzaklaştırılarak falkon tüpe yeni besi yeri eklenmiştir.
- Hücre- besi yeri süspansiyonu 2 adet 75 cm<sup>2</sup> lik flasklara dağıtılmıştır.
- Flasklara 10 ml daha besi yeri eklenerek inkübatöre kaldırılmıştır.

#### **4. Hücrelerin Dondurulması**

Yeterince üretildikten sonra saklanmak istenen hücreler dondurulmuştur.

##### **Dondurma Protokolü:**

- Hücreler flask yüzeyinden scraper ile kaldırılmıştır.
- Elde edilen hücre-besi yeri süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüpe aktarılmıştır.
- 1200 rpm'de 5 dk. santrifüj yapılmıştır.
- Diğer yandan, 9:1 serum: DMSO içeren dondurma solüsyonu buz üzerinde hazırlanmıştır.
- Santrifüjden alınan falkon tüpten süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler 1 ml dondurma solüsyonu ile karıştırılarak kriyotüplere aktarılmıştır.
- Kriyotüpler -86 °C'ye kaldırılmıştır.



Şekil 6: Neubauer Lamı (Kurul Laboratuvar n.d.; neubauer lamı n.d.)

## 5. Hücrelerin Çözülmesi

### Cözme Protokolü:

- -86 °C'deki hücreler oda sıcaklığına alınmıştır.
- DMSO'nun hücreler üzerindeki toksik etkisinden kaçınma amaçlı, kriyotüpe besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe (15 ml'lik) alınmıştır.

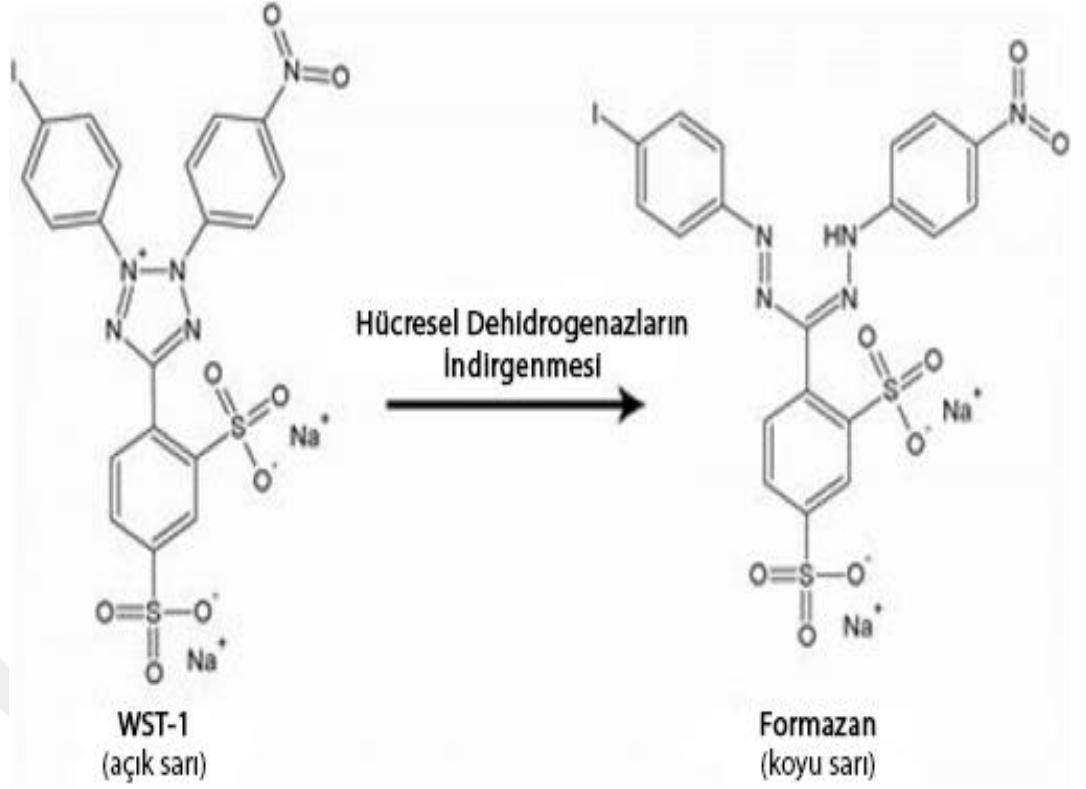
- 10 dk, 1200 rpm'de santrifüj yapılmıştır
- Süpernatant uzaklaştırılıp falkon tüpe besi yeri eklenerek tekrar 10 dk, 1200 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
- Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler 15 ml besiyeri eklenerek 75 cm<sup>2</sup>'lik flaska ekilmiştir.
- Flasklar; 37 °C sıcaklıkta, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 95 nem içeren inkübatöre kaldırılmıştır.

## 6. Hücre Proliferasyon Deneyi

Sonraki aşamalarda deneylerde kullanılmak üzere, optimal hücre konsantrasyonunu belirleme amaçlı proliferasyon deneyi gerçekleştirilmiştir.

WST-1 (water- soluble tetrazolium-1) reaktifi hücre proliferasyonu, büyüme, canlılık ve kemosenitivitenin spektrofotometrik kantifikasyonu için kullanılmaktadır. WST-1 prensibi: Tetrazolyum tuzları enzimler aracılığıyla formazana bağlanmakta ve canlı hücrelerin artmasıyla beraber mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi artmaktadır. Bu artış ise oluşan formazan boyasının miktarını arttırmaktadır, bu da metabolik olarak aktif hücre sayısı ile ilişkilidir. Üretilen formazan boyasının kantifikasyonu scanning multiwell spectrophotometer ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, hücreler 3 tekrarlı şekilde azalan hücre miktarlarında 96-well platelere ekilmiştir. Her kuyucukta 100 µl olacak şekilde, 5x10<sup>4</sup> hücreden başlanılarak seri dilüsyon yapılmıştır. Etüvde 96 saatlik inkübasyon süresinden sonra, her kuyucuğa 100 µl WST-1 eklenerek tekrar 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 3 saat boyunca 30 dakikalık aralıklarla mikropalak okuyucuda (Multiskan Fc, Thermo) 450 nm ve 620 nm'de ölçüm yapılacak ve optik dansite değerlerinin ölçümü ise fotometrik olarak yapılmıştır.



Şekil 7: WST-1 çalışma prensibi (GBiosciences 2019)

## 7. Etken Madde Hazırlanması

Moleküler kütlesi 331.36 g/mol olan 10 mg BIBR1532 maddesi 603.6 µl DMSO'da çözülerek 50 mM BIBR1532 stok solüsyon elde edilmiştir.

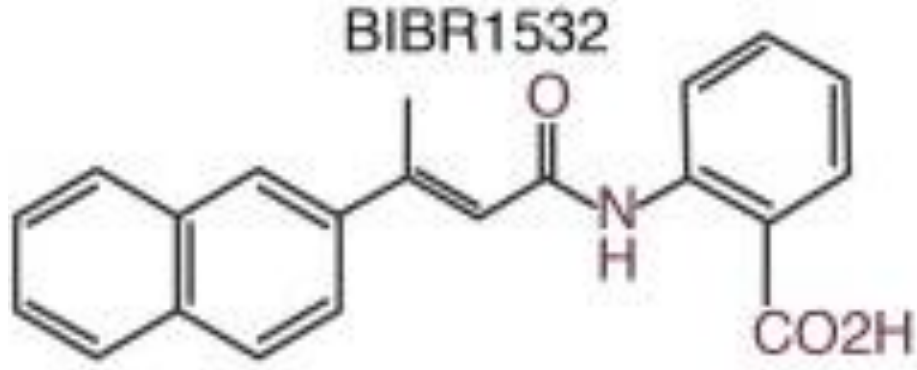
Ara stoklar medium ile hazırlanarak deneylerde kullanılmıştır. Moleküler kütlesi 228.25 g/mol olan resveratrol etken maddesinden 2.28 mg tartılmış ve 1ml DMSO'da çözülerek 1 mM resveratrol stok solüsyonu hazırlanmıştır. Stok solüsyonlar -20°C'de saklanmıştır. Medium ile ara stoklar hazırlanarak deneylerde kullanılmıştır.

**Tablo 2: BIBR1532 özellikleri** (Cayman Chemical n.d.)

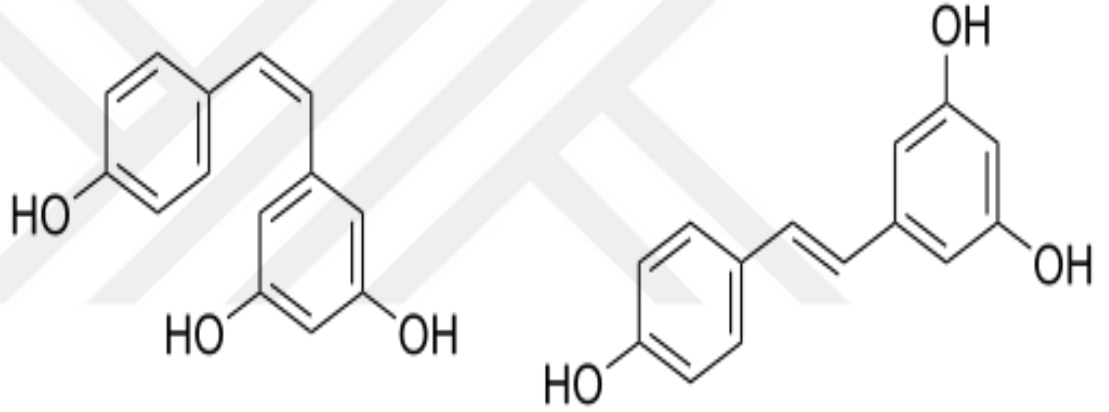
| <b>BIBR1532</b>          |   |
|--------------------------|---|
| <b>Sinonim</b>           | 2-[[ <i>(2E)</i> -3-(2-naphthalenyl)-1-oxo-2-buten-1-yl]amino]-benzoic acid |
| <b>Formülü</b>           | C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>                             |
| <b>Moleküler ağırlık</b> | 331.4 g/mol   |

**Tablo 3: Resveratrolün özellikleri** (Aldrich 2019)

| <b>Resveratrol ≥99% (HPLC)</b> |  |
|--------------------------------|--|
| <b>Sinonim</b>                 | 3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene,<br>5-[[ <i>(1E)</i> -2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol |
| <b>Formülü</b>                 | C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>   |
| <b>Moleküler ağırlık</b>       | 228.24 g/mol   |



**Şekil 8: BIBR1532 Kimyasal Yapısı** (Bryan ve ark. 2015)



**Şekil 9: *cis*- ve *trans*- resveratrolün kimyasal yapısı** (Camont ve ark. 2009)

## 8. Sitotoksisite Deneyi

BIBR1532 ve resveratrol maddelerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için sitotoksisite deneyi, önceki bölümde anlatılan yöntem doğrultusunda ve WST-1 kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla, proliferasyon deneyi sonucunda belirlenen hücre sayısı kadar ve 3 tekrarlı şekilde her kuyucuğa HT-29 hücreleri ekilecek; iki etken madde olduğundan bu işlem tekrarlanmıştır ve 24saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

BIBR1532 ve resveratrol maddeleri literatüre göre seçilmiş konsantrasyon değerlerinden başlanarak seri dilüsyon yapılarak kuyucuklara eklenmiştir, ilaç eklenmeyen kuyucuk daha sonra kontrol olarak ele alınmıştır. 24., 48., ve 72. saatlerde, proliferasyon deneyinde olduğu gibi her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 eklenecek ve sonrasında mikropalak okuyucuda (Multiskan Fc, Thermo) absorban değerleri fotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda hücre proliferasyonunun % 50 azalmasına yol açan etken madde konsantrasyonları, IC<sub>50</sub> değerleri, Graphpad kullanılarak belirlenmiştir.



**Şekil 10: Mikropalak okuyucu (Scientific 2019)**

## **9. İzobologram Analizi**

Kullanılacak olan etken maddelerin, reveratrol ve BIBR1532'nin, birbirleriyle sinerjistik, aditif ya da antagonistik etkisini inceleme amaçlı izobologram analizi yapılmıştır.

Maddelerin önceden sitotoksosite deneyinde hesaplanan IC<sub>50</sub> dozları ile HT-29 hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlik kombinasyon uygulaması yapılmıştır

Sitotoksosite ve proliferasyon deneylerinde olduğu şekilde WST-1 uygulanacak ve mikropalak okuyucuda (Multiskan Fc, Thermo) absorbans ölçümleri yapılmıştır. CalcuSyn version 2.0 programı kullanılarak ilaçların kombine IC<sub>50</sub> dozları, birbiri ile etkileşim eğrileri ve kombinasyon indeksi (CI) belirlenmiştir.

## 10. Apoptoz Deneyi

Ölen hücreler Annexin V yöntemi ile belirlenebilmektedir; bu yöntemin mekanizması şöyledir: Apoptotik hücrelerin membranlarının dış yüzeyinde apoptozun erken fazında fosfatidil serin (PS) açığa çıkmaktadır ve Annexin V'in , Ca<sup>2+</sup> bağımlı fosfolipid bağlayan bir protein olduğu ve PS'ye karşı yüksek affiniteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu yüzden apoptoz durumunda açığa çıkan PS, hücre membranına bağlanan Annexin V ile belirlenebilmektedir. Akış sitometrisi kullanılarak, yeşil fluoresan ışması yapan FITC (Fluorescein Isothiocyanate) işaretli Annexin V, ile apoptotik hücrelerin varlığı detekte edilip, kantifikasyonu yapılabilmektedir. Ayrıca PI (Propidium Iodide) ile boyama yapılarak intakt hücrelerin erken/ geç apoptotik ya da nekrotik olarak ayrışması sağlanmaktadır. İntakt hücreler Annexin V-FITC negatif, PI negatiftir; Annexin V-FITC pozitif ve PI negatif olanlar erken apoptotik hücrelerdir; nekrotik ve geç apoptotik hücreler ise Annexin V-FITC pozitif, PI pozitifdir.

Annexin V testi ile BIBR1532, resveratrol ve BIBR1532 + resveratrol kombinasyonunun HT-29 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi araştırılacaktır. Hücreler önceden izobologram analizinde belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerine belirlenen süre boyunca maruz bırakılmış, etken madde kullanılmayan hücreler ise kontrol olarak değerlendirilmiştir.

### **Annexin V-FITC Yöntem Protokolü:**

- Hücrelere etken madde uygulanarak apoptoz indüklenmiştir.
- Hücrelerin üzerindeki ilaçlı ortamlar (kontrol için yalnızca ortam) uzaklaştırılmıştır.
- Plate yüzeyi serumsuz ortam ile yıkanmıştır.
- Trypsin ile hücreler plate yüzeyinden kaldırılmıştır.

- Serumlu ortam eklenerek 5 dk, 1200 rpm’de santrifüj yapılmıştır.
- Süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 1X PBS ile yıkama yapılarak santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.
- Süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Her hücre grubu tüpe alınmış ve kontrol grubu 2 ayrı tüpe ayrılmıştır.
- Diğer yandan 10X binding buffer (BB) distile su ile 1X olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Her tüpe 100 µl BB eklenmiştir.
- Doz hücrelerini içeren tüplere ve kontrol tüplerinden birine 2.5 µl PI eklenmiştir.
- Doz hücrelerini içeren tüplere 2.5 µl Annexin V eklenmiştir.
- 15 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- İkinci kontrol tüpü BD Acuri- C6 akım sitometri cihazında okutulmuştur.
- İkinci kontrol tüğüne 2.5 µl Annexin V eklenmiştir.
- 15 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- Doz içeren tüplerin ve ilk kontrol tüpünün cihazda okutulmuştur.
- İkinci kontrol tüpü okutulmuştur.
- Hücrelerin apoptoz analizleri BD Acuri- C6 akım sitometri cihazı ile yapılmıştır.



**Şekil 11: BD Acuri-C6 akım sitometri cihazı (Agarwal, Sharma, and Ahmad 2019)**

## 11. lncRNA Ekspresyon Analizi

Resveratrol ve BIBR1532 etken maddelerinin tekli şekilde ve kombine olarak IC50 dozları HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde lncRNA ekspresyon düzeylerinde oluşturduğu değişiklikler, doz uygulanmayan kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır.

### 11.1. Total RNA İzolasyonu

Resveratrol ve BIBR1532 etken maddelerinin tekli şekilde ve kombine olarak IC50 dozları HT-29 kolorektal kanser hücrelerine uygulanmış ve doz uygulanmayan hücreler kontrol olarak ele alınmıştır.

RNeasy Plus Mini Kit ile tüm gruplardan RNA izolasyonu yapılmıştır.

RNA izolasyonu yönteminin prensibi; RNaz'ları inaktif hale getirerek RNA'ların bozulmadan izolasyonunu sağlayan yüksek guanidin-izotiyosiyanat içeren tampon ile liziz ve homojenize edilip, lizatın önce yüksek tuz içeriğine sahip olan ve DNA'yı seçici olarak uzaklaştıran dönüş kolonundan, sonra etanol ile RNA'nın bağlandığı membrandan oluşan dönüş kolonundan geçirilerek elde edilmesine dayanmaktadır.

#### **Protokol:**

- Hücre sayısı  $1 \times 10^7$ 'den fazla olmayacak şekilde kullanılmıştır.
- Ortam uzaklaştırılarak serumsuz ortam ile hücreler yıkanmıştır..
- Serumsuz ortam içinde % 0.25 tripsin eklenmiştir.
- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlanmış serumlu ortam eklenmiştir.
- Hücreler santrifüj tüpüne toplanmıştır.
- 1200 rpm 5 dk santrifüj yapılmıştır.
- PBS ile yıkama yapılarak santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.
- Süpernatant kısmı dökülüp, hücelere 350 µl RLT Plus Buffer eklenmiştir.
- 30 saniye vorteks yapılmıştır.
- Oluşan lizat 2 ml tüp içine yerleştirilen gDNA spin kolona aktarılmıştır.
- 8000 g'de 30 sn santrifüj yapılmıştır.

- gDNA kolonu atılmış, 350 µl %70'lik etanol eklenecek ve pipetaj yapılacaktır.
- 700 µl örnek 2 ml tüp içine yerleştirilen RNeasy spin kolona aktarılmıştır.
- Ardından 15 s 8000 g'de santrifüj yapılmıştır.
- Tüp içindeki kısım uzaklaştırılmış 700 µl RW1 Buffer eklenmiş ve 15 s 8000 g'de santrifüj yapılmıştır.
- Tüp içindeki kısım uzaklaştırılmış 500 µl RPE Buffer eklenmiş ve 15 s 8000 g'de santrifüj yapılmıştır.
- Tüp içindeki kısım uzaklaştırılarak 500 µl RPE Buffer eklenmiş ve 2 dk 8000 g'de santrifüj yapılmıştır.
- Kolonun tamamen kuruması için, RNeasy spin kolonu yeni bir 2 ml tüpe konulmuştur.
- 1 dk 8000 g'de santrifüj yapılmıştır.
- RNeasy spin kolonu yeni bir 1.5 ml'lik tüpe yerleştirilmiştir.
- 31 µl Rnaz içermeyen su eklenerek ve 1 dk 8000 g'de santrifüj yapılmıştır. Bu aşamada RNA'yı elde etmek amaçlanmaktadır.
- Santrifüj sonrası toplama tüpünde kalan total RNA olacaktır ve komplementer DNA elde edilecek süreye kadar -20°C'de buzdolabında saklanacaktır.
- Nanodrop cihazı kullanılarak 260/280 ve 230/260 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülerek elde edilen total RNA örneğinin konsantrasyon ve saflıkları belirlenmiştir. (Bu değerlerin 1.9- 2.1 aralığında olması gerekmektedir.)

## 11.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Önceki aşamada sentezlenen total RNA örneklerinden, lncRNA ekspresyonu analizlerinde kullanılmak üzere cDNA sentezi yapılacaktır, bu amaçla Qiagen RT<sup>2</sup> First Strand Kit kullanılacaktır.

**Protokol:**

- Kit manuelinde belirtildiği şekilde (Tablo 4) genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlanacaktır.
- Pipetaj ve santrifüj ile homojen bir karışım elde edilecektir.

**Tablo 4: Genomik DNA eliminasyon karışımı**

|                                 | 1 örnek için | BIBR1532          | RSV             | Kombinasyon    | Kontrol         |
|---------------------------------|--------------|-------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| RNA                             | 25 ng        | 25 ng<br>(1.5 µl) | 25 ng<br>(1 µl) | 25 ng<br>(8µl) | 25 ng<br>(1 µl) |
| GE tamponu                      | 2 µl         | 2 µl              | 2 µl            | 2 µl           | 2 µl            |
| Rnaz içermeyen H <sub>2</sub> O | değişken     | 6.5 µl            | 7 µl            | 0 µl           | 7 µl            |
| <b>TOPLAM</b>                   | 10 µl        | 10 µl             | 10 µl           | 10 µl          | 10 µl           |

**Tablo 5: Ters transkripsiyon karışımı**

|                | 1 örnek için | 4 örnek için |
|----------------|--------------|--------------|
| 5X BC3 tamponu | 4 µl         | 16 µl        |
| Kontrol P2     | 1 µl         | 4 µl         |
| RE3 mix        | 2 µl         | 8 µl         |

|                                 |       |              |
|---------------------------------|-------|--------------|
| RNaz içermeyen H <sub>2</sub> O | 3 µl  | <b>12 µl</b> |
| <b>TOPLAM</b>                   | 10 µl | <b>40 µl</b> |

- 42°C’de 5 dk inkübasyona bırakılacaktır.
- Daha sonra hemen buz üzerine alınıp en az 1 dk bekletilecektir.
- Kit manuelinde belirtildiği şekilde (Tablo 5) ters transkripsiyon karışımı hazırlanacaktır.
- 10 µl genomik DNA eliminasyon karışımı içeren her tüpe, 10 µl ters transkripsiyon karışımı eklenecektir. Pipetaj ve santrifüj ile kabarcıklar önlenecek ve tüm örneğin tüpün alt kısmında toplanması sağlanacaktır.
- Bu karışım 42°C’de 60 dk bekletilecek, hemen 95 °C’de 5 dk beklemeye alınıp reaksiyon durdurulacaktır.
- Her örneğe 80 µl RNaz içermeyen su eklenmiştir.
- cDNA örnekleri buz üzerinde bekletilerek PCR aşamasına geçilmiştir. (Bir gece bekletilecekse, -20 °C dondurucuda bekletilmelidir.)

### 11.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Gerçek zamanlı PCR, gen ekspresyon analizleri için güvenilir ve hassas bir yöntemdir. RT<sup>2</sup> lncRNA PCR Array’leri gerçek zamanlı PCR ile lncRNA ekspresyonlarını sağlayarak büyük bir avantaj sağlamaktadır. RT<sup>2</sup> lncRNA PCR Array, belli bir hastalık ya da bir yolak ile ilgili lncRNA’ları analiz etmektedir. Hastalık/ yolak ilişkili gen, referans gen, genomik kontrol, 3 revers transkripsiyon kontrolleri ve pozitif PCR kontrolleri içermektedir.

Çalışmamızda RT<sup>2</sup> lncRNA PCR Array kullanılarak lncRNA ekspresyon değişimleri analiz edilecektir. Sonuçlar  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi ile değerlendirilecektir, bunun için Qiagen GeneGlobe Data Analysis Center/ PCR/ gene expression analysis sistemi kullanılacaktır. Kontrol ve doz örneklerinin karşılaştırılması için student t testi yapılacak ve  $p < 0.05$  anlamlı kabul edilecektir.

**Protokol:**

- RT<sup>2</sup> SYBR Green Master Mix santrifüj yapılacak ve PCR karışımı Tablo 6'ya göre hazırlanacaktır.

**Tablo 6: PCR karışımı**

|                           | Her örnek için; |
|---------------------------|-----------------|
| RT2 SYBR Green Mastermiks | 650 µl          |
| cDNA sentez reaksiyonu    | 100 µl          |
| <b>TOPLAM</b>             | <b>750 µl</b>   |

- PCR karışımı RT<sup>2</sup> lncRNA PCR Array'de kuyucuklara 10'ar µl olacak şekilde çoklu pipetle dağıtılacaktır.
- RT<sup>2</sup> lncRNA PCR Array dikkatlice kapatılarak, kabarcıkları önleme amaçlı 1000 g 1 dk santrifüj yapılacaktır.
- PCR array buzda bekletilecek, real time cycler ayarlanacak ve reaksiyon başlatılacaktır.

**Tablo 7: PCR programı**

| Döngü sayısı | Süre          | Sıcaklık     |  |
|--------------|---------------|--------------|--|
| 1            | 10 dk         | 95°C         | HotStart DNA Taq polimeraz aktivasyonu |
| 45           | 15 sn<br>1 dk | 95°C<br>60°C | Floresans ışıması                      |

**Tablo 8: LncRNA PCR Array Düzeni**

|   | 1             | 2               | 3             | 4             | 5             | 6             | 7              | 8             | 9             | 10            | 11          | 12              |
|---|---------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|-------------|-----------------|
| A | ACTA2-<br>AS1 | ADAMT<br>S9-AS2 | AFAP1-<br>AS1 | AIRN          | BANCR         | BCAR4         | BLACA<br>T1    | CAHM          | CBR3-<br>AS1  | CCAT1         | CCAT<br>2   | CDKN2<br>B-AS1  |
| B | CRNDE         | DGCR5           | DLEU2         | DLX6-<br>AS1  | EMX2O<br>S    | FTX           | GACAT<br>1     | GAS5          | GAS6-<br>AS1  | GNAS-<br>AS1  | H19         | HAND2<br>-AS1   |
| C | HEIH          | HIF1A-<br>AS1   | HIF1A-<br>AS2 | HNF1A-<br>AS1 | HOTA1<br>R    | HOTAIR<br>M1  | HOTTI<br>P     | HOXA1<br>1-AS | HOXA-<br>AS2  | HULC          | IPW         | JADRR           |
| D | KCNQ1<br>OT1  | KRAS1           | LINC00<br>152 | LINC00<br>261 | LINC003<br>12 | LINC005<br>38 | LINC00<br>887  | LINC00<br>963 | LINC01<br>233 | LINC01<br>234 | LSINC<br>T5 | LUCAT<br>1      |
| E | MALAT<br>1    | MEG3            | MIR155<br>HG  | MIR17H<br>G   | MIR31H<br>G   | MIR7-<br>3HG  | MRPL2<br>3-AS1 | NAMA          | NBR2          | NEAT1         | NRON        | PANDA<br>R      |
| F | PCA3          | PCAT1           | PCGEM<br>1    | POU5F1<br>P5  | PRNCR1        | PTCSC1        | PTCSC3         | PTENP1        | PVT1          | RMRP          | RMST        | RPS6K<br>A2-AS1 |
| G | SNHG16        | SPRY4-<br>IT1   | SUMO1<br>P3   | TERC          | TRERN<br>A1   | TSIX          | TUG1           | TUSC7         | UCA1          | WT1-AS        | XIST        | ZFAS1           |
| H | ACTB          | B2M             | RPLP0         | RN7SK         | SNORA7<br>3A  | HGDC          | RTC            | RTC           | RTC           | PPC           | PPC         | PPC             |

|   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | 01  | 02  | 03  | 04  | 05  | 06  | 07  | 08  | 09  | 10  | 11  | 12  |
| B | 13  | 14  | 15  | 16  | 17  | 18  | 19  | 20  | 21  | 22  | 23  | 24  |
| C | 25  | 26  | 27  | 28  | 29  | 30  | 31  | 32  | 33  | 34  | 35  | 36  |
| D | 37  | 38  | 39  | 40  | 41  | 42  | 43  | 44  | 45  | 46  | 47  | 48  |
| E | 49  | 50  | 51  | 52  | 53  | 54  | 55  | 56  | 57  | 58  | 59  | 60  |
| F | 61  | 62  | 63  | 64  | 65  | 66  | 67  | 68  | 69  | 70  | 71  | 72  |
| G | 73  | 74  | 75  | 76  | 77  | 78  | 79  | 80  | 81  | 82  | 83  | 84  |
| H | RF1 | RF2 | RF3 | RF4 | RF5 | GDC | RTC | RTC | RTC | PPC | PPC | PPC |

**Şekil 12: PCR array (RF:referans genler, GDC: genomik DNA kontrol, RTC: revers transkriptaz kontrol, PPC: pozitif PCR kontrol) (Sybr 2018)**

**Tablo 9: LncRNA PCR Array Gen İsimleri ve Açıklamaları**

| Pozisyon | Sembol       | Açıklama  |
|----------|--------------|---|
| A1       | ACTA2- AS1   | ACTA2 antisens RNA 1                                      |
| A2       | ADAMTS9- AS2 | ADAMTS9 antisens RNA 2                                    |
| A3       | AFAP1- AS1   | AFAp1 antisens RNA 1                                      |
| A4       | AIRN         | IGF2R antisens protein kodlamayan RNA                     |
| A5       | BANCR        | BRAF tarafından aktive edilen protein kodlamayan RNA      |
| A6       | BCAR4        | Meme kanseri anti- östrojen direnci 4                     |
| A7       | BLACAT1      | Mesane kanseri ilişkili transkript 1 (protein kodlamayan) |
| A8       | CAHM         | Kolon adenokarsinomu hipermetile (protein kodlamayan)     |
| A9       | CBR3 -AS1    | CBR3 antisens RNA 1                                       |
| A10      | CCAT1        | Kolon kanser ilişkili transkript 1 (protein kodlamayan)   |

|     |             |   |
|-----|-------------|---|
| A11 | CCAT2       | Kolon kanser ilişkili transkript 2 (protein kodlamayan)               |
| A12 | CDKN2B- AS1 | CDKN2B antisens RNA 1   |
| B1  | CRNDE       | Kolorektal neoplazi farklı şekilde ifade edilmiş (protein kodlamayan) |
| B2  | DGCR5       | DiGeorge sendromu kritik bölge geni 5 (protein kodlamayan)            |
| B3  | DLEU2       | Lenfositik lösemide silinmiş (protein kodlamayan)                     |
| B4  | DLX6- AS1   | DLX6 antisens RNA 1   |
| B5  | EMX2OS      | EMX2 zıt iplik (protein kodlamayan)                                   |
| B6  | FTX         | FTX transkript, XIST düzenleyici (protein kodlamayan)                 |
| B7  | GACAT1      | Gastric cancer associated transcript 1 (protein kodlamayan)           |
| B8  | GAS5        | Büyüme arresti-spesifik 5 (protein kodlamayan)                        |
| B9  | GAS6- AS1   | GAS6 antisens RNA 1   |
| B10 | GNAS- AS1   | GNAS antisens RNA 1   |

|     |            |  |
|-----|------------|--|
| B11 | H19        | H19, damgalanmış maternal olarak eksprese edilen transkript (protein kodlamayan) |
| B12 | HAND2- AS1 | Nbla00301  |
| C1  | HEIH       | Hepatoselüler karsinom yukarı düzenlenmiş EZH2- ilişkili uzun kodlamayan RNA     |
| C2  | HIF1A- AS1 | HIF1A antisens RNA 1   |
| C3  | HIF1A- AS2 | HIF1A antisens RNA 2   |
| C4  | HNF1A- AS1 | HNF1A antisens RNA 1 (protein kodlamayan)  |
| C5  | HOTAIR     | Hox transkript antisens RNA (protein kodlamayan)                                 |
| C6  | HOTAIRM1   | HOXA transkript antisens RNA, myeloid- spesifik 1                                |
| C7  | HOTTIP     | HOXA distal transkript antisens RNA  |
| C8  | HOXA11- AS | HOXA11 antisens RNA 1 (protein kodlamayan)                                       |
| C9  | HOXA- AS2  | HOXA cluster antisens RNA 2  |

|     |           |   |
|-----|-----------|---|
| C10 | HULC      | Hepatoselüller karsinoma yukarı düzenlenmiş uzun kodlamayan RNA |
| C11 | IPW       | Prader-Willi sendromunda damgalanmış (protein kodlamayan)       |
| C12 | JADRR     | JADE1 bitişik düzenleyici RNA                                   |
| D1  | KCNQ1OT1  | KCNQ1 örtüşen transkript 1 (protein kodlamayan)                 |
| D2  | KRAS P1   | Kirsten rat sarkom viral onkogen homolog psödogen 1             |
| D3  | LINC00152 | Protein kodlamayan RNA 152                                      |
| D4  | LINC00261 | Uzun intergenik protein kodlamayan RNA 261                      |
| D5  | LINC00312 | Protein kodlamayan RNA 312                                      |
| D6  | LINC00538 | Uzun intergenik protein kodlamayan RNA 538                      |
| D7  | LINC00887 | Hipotetik LOC100131551  |
| D8  | LINC00963 | Uzun intergenik protein kodlamayan RNA 963                      |
| D9  | LINC01233 | Uzun intergenik protein kodlamayan RNA 1233                     |
| D10 | LINC01234 | Uzun intergenik protein kodlamayan RNA 1234                     |

|     |             |  |
|-----|-------------|--|
| D11 | LSINCT5     | Uzun, stresle indüklenen protein kodlamayan transkript 5                   |
| D12 | LUCAT1      | Akciğer kanseri ilişkili transkript 1 (protein kodlamayan)                 |
| E1  | MALAT1      | Metastaz ilişkili akciğer adenokarsinom transkripti 1 (protein kodlamayan) |
| E2  | MEG3        | Maternal olarak eksprese edilen 3 (protein kodlamayan)                     |
| E3  | MIR155HG    | MIR155 konakçı gen (protein kodlamayan)                                    |
| E4  | MIR17HG     | MiR-17-92 cluster konakçı gen (protein kodlamayan)                         |
| E5  | MIR31HG     | MIR31 konakçı gen (protein kodlamayan)                                     |
| E6  | MIR7- 3HG   | Protein kodlamayan RNA 306   |
| E7  | MRPL23- AS1 | MRPL23 antisens RNA 1  |
| E8  | NAMA        | Protein kodlamayan RNA, MAP kinaz yolağı ve büyüme arresti ilişkili        |
| E9  | NBR2        | BRCA1 geninin komşusu 2 (protein kodlamayan)                               |
| E10 | NEAT1       | Nükleer paraspeckle kurucu transkript 11 (protein                          |

|     |          |  |
|-----|----------|--|
|     |          | kodlamayan)  |
| E11 | NRON     | Protein kodlamayan RNA, NFAT baskılayıcı                           |
| E12 | PANDAR   | CDKN1A antisens DNA hasarı aktive edici RNA promotörü              |
| F1  | PCA3     | Prostat kanser antijeni 3 (protein kodlamayan)                     |
| F2  | PCAT1    | Prostate cancer associated transcript 1 (protein kodlamayan)       |
| F3  | PCGEM1   | Prostat-spesifik transkript 1                                      |
| F4  | POU5F1P5 | POU sınıf 5 homeobox-1 psödojen 5                                  |
| F5  | PRNCR1   | Prostat kanser ilişkili kodlamayan RNA 1                           |
| F6  | PTCSC1   | Papiller tiroid karsinom suseptibilite aday-1 (protein kodlamayan) |
| F7  | PTCSC3   | Papiller tiroid karsinom suseptibilite aday-3 (protein kodlamayan) |
| F8  | PTENP1   | Fosfataz ve tensin homolog psödojen-1                              |

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
| F9  | PVT1         | Pvt1 onkogeni (protein kodlamayan)                            |
| F10 | RMRP         | Mitokondriyal RNA işleyen endoribonükleaz RNA bileşeni        |
| F11 | RMST         | Rabdomiyosarkom 2- bağlantılı transkript (protein kodlamayan) |
| F12 | RPS6KA2- AS1 | RPS6KA2 antisens RNA 1  |
| G1  | SNHG16       | Küçük nükleolar RNA konakçı gen (protein kodlamayan)          |
| G2  | SPRY4- IT1   | SPRY4 intronik transkript 1 (protein kodlamayan)              |
| G3  | SUMO1P3      | SUMO1 psödogen 3  |
| G4  | TERC         | Telomeraz RNA bileşeni  |
| G5  | TRERNA1      | Translasyon düzenleyici uzun kodlamayan RNA-1                 |
| G6  | TSIX         | TSIX transkript, XIST antisens RNA (protein kodlamayan)       |
| G7  | TUG1         | Taurin yukarı düzenlenmiş 1 (protein kodlamayan)              |
| G8  | TUSC7        | Tümör baskılayıcı adayı 7 (protein kodlamayan)                |

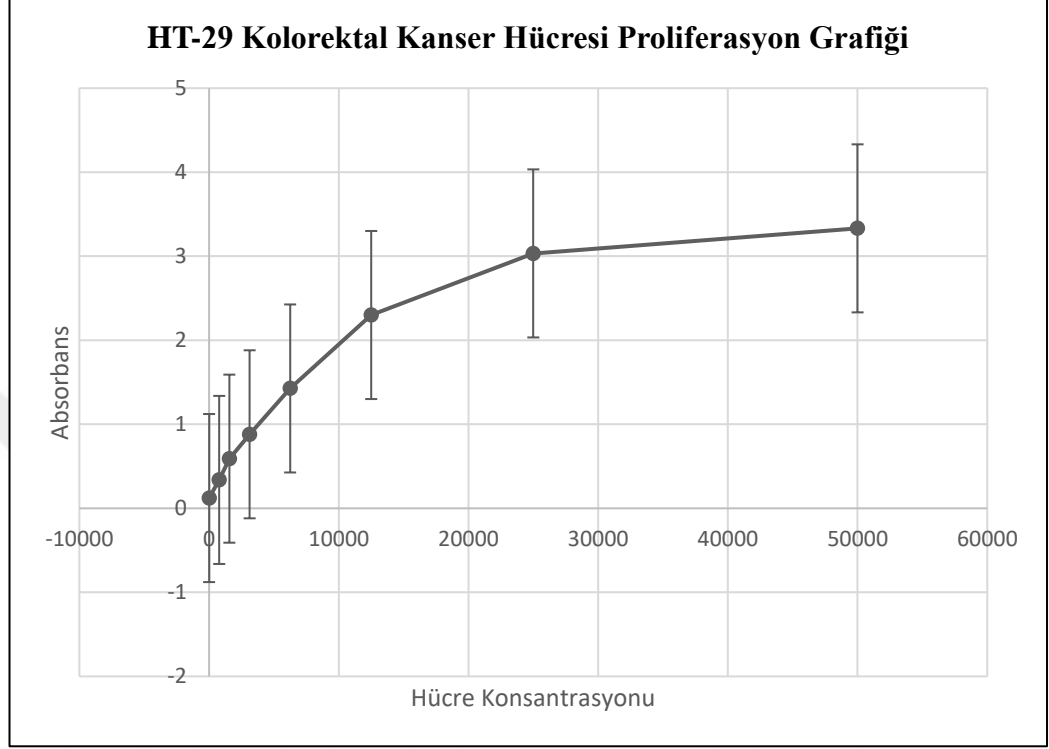
|     |          |  |
|-----|----------|--|
| G9  | UCA1     | Ürotelyal kanser bağlantılı-1 (protein kodlamayan)     |
| G10 | WT1- AS  | WT1 antisens RNA (protein kodlamayan)                  |
| G11 | XIST     | X (inaktif) - spesifik transkript (protein kodlamayan) |
| G12 | ZFAS1    | ZNFX1 antisens RNA 1                                   |
| H1  | ACTB     | Aktin, beta  |
| H2  | B2M      | Beta-2- mikroglobulin                                  |
| H3  | RPLP0    | Ribozomal protein, büyük, P0                           |
| H4  | RN7SK    | RNA, 7SK küçük nükleer                                 |
| H5  | SNORA73A | Küçük nükleolar RNA, H/ACA box 73A                     |
| H6  | HGDC     | İnsan genomik DNA Kontaminasyonu                       |
| H7  | RTC      | Ters transkripsiyon kontrolü                           |
| H8  | RTC      | Ters transkripsiyon kontrolü                           |

|     |     |                              |
|-----|-----|------------------------------|
| H9  | RTC | Ters transkripsiyon kontrolü |
| H10 | PPC | Pozitif PCR kontrolü         |
| H11 | PPC | Pozitif PCR kontrolü         |
| H12 | PPC | Pozitif PCR kontrolü         |



## Bulgular

### 1. Proliferasyon Deneyi ile Uygun Hücre Konsantrasyonunu Saptanması



**Grafik 1: HT-29 Kolorektal Kanser Hücresi Proliferasyon Grafiği**

HT-29 hücre hattı için mililitredeki uygun hücre konsantrasyonunu belirlemek amacıyla proliferasyon testi yapılmıştır. Hücreler  $5 \times 10^4$  - 781 hücre/ ml yoğunluklarda olacak şekilde 100  $\mu$ l'lik kuyucuklara seri dilüsyon ile ekilmiş ve 96 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Ardından her kuyucuğa 10'er  $\mu$ l WST-1 eklenmiştir. Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu kullanılarak, her 30 dk.da bir 450 ve 620 nm'de absorbans değerleri fotometrik olarak ölçülmüş ve sonuçlar analiz edilmiştir. HT-29 hücre hattı için uygun hücre konsantrasyonu  $2 \times 10^4$  hücre / ml olarak belirlenmiştir.

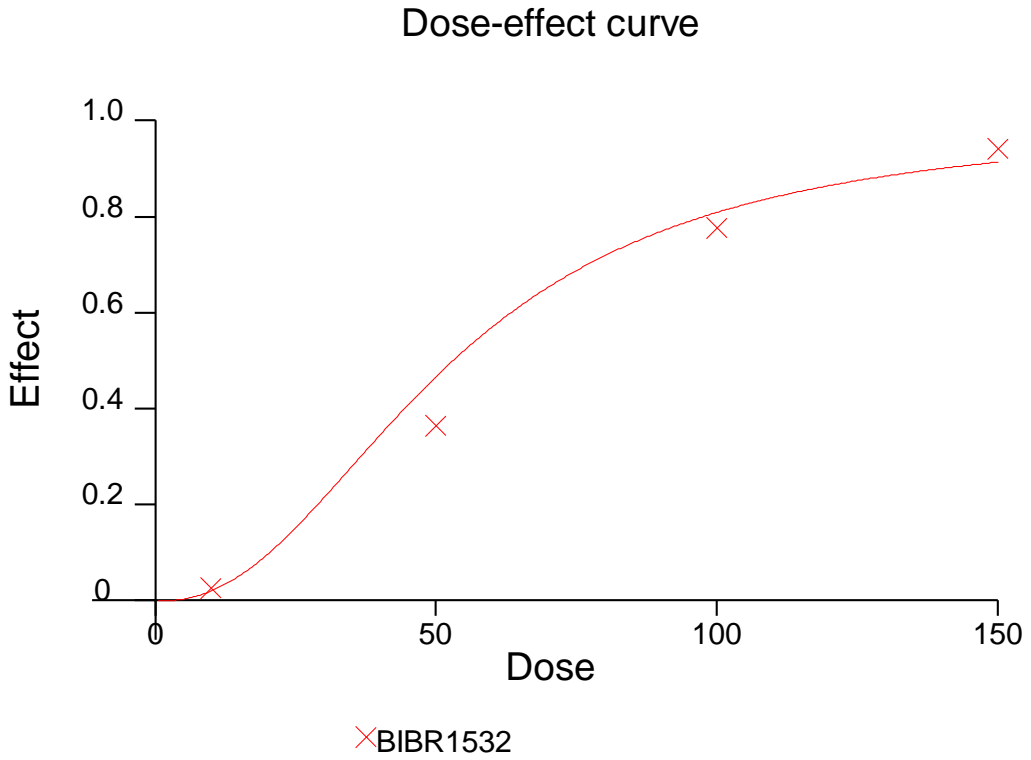
### 2. Sitotoksosite Deneyi

WST-1 yöntemi kullanılarak HT-29 hücre hattında sitotoksosite analizi gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda BIBR1532 ve resveratol ajanları hücrelere verilmiş, ardından sitotoksik etkileri incelenmiştir. Etken madde

içermeyen hücreler kontrol grubu olarak alınmıştır. Etken maddelerin IC<sub>50</sub> dozları, hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonları, belirlenmiştir.

### 2.1.BIBR1532 ajanının HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Etkisi

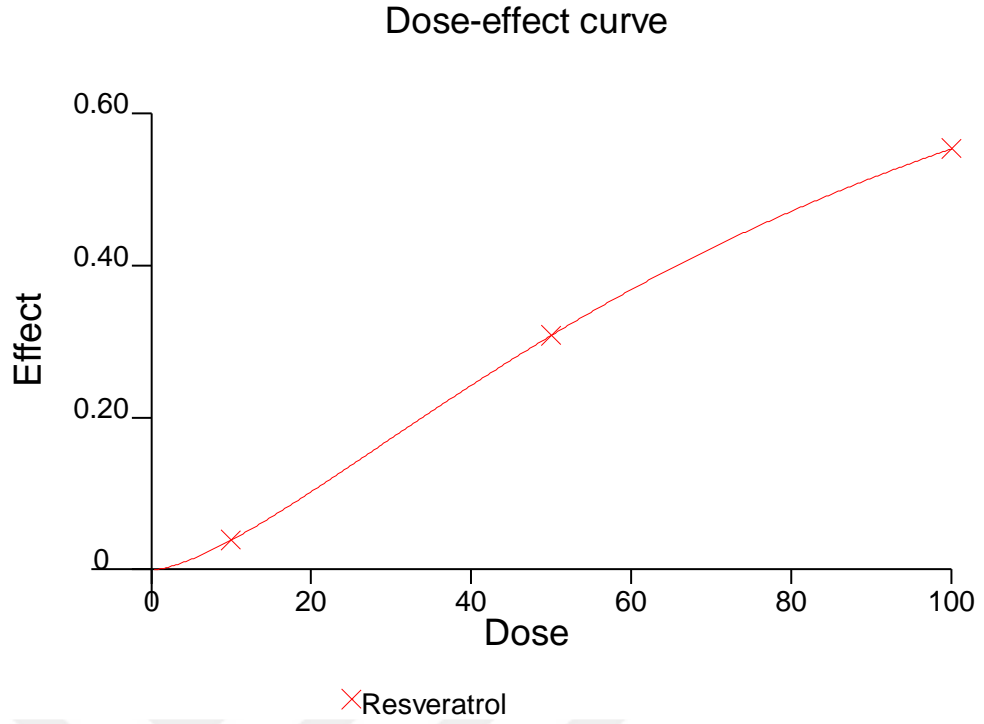
Literatür araştırmasının doğrultusunda, BIBR1532 telomeraz inhibitörünün 150 µM, 100 µM, 50 µM, 10 µM, 1 µM, 0.1 µM ve 0.01 µM'lık dilüsyonları hücrelere uygulanmış ve 24, 48, 72. saatlerde WST- 1 analizi yapılmıştır. HT-29 hücreleri için IC<sub>50</sub> dozu 48. saatte 50,81 µM olarak bulunmuştur.



**Grafik 2: HT-29 hücrelerinde BIBR1532'nin IC<sub>50</sub> doz grafiği**

### 2.2.Resveratrol ajanının HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Etkisi

Literatür araştırmasına göre resveratrol ajanı 150 µM, 100 µM, 50 µM, 10 µM, 1 µM, 0.1 µM ve 0.01 µM'lık dozlar şeklinde HT-29 hücrelerine uygulanmış ve WST- 1 deneyi 24, 48, 72. saatlerde yapılmıştır. HT-29 hücreleri için IC<sub>50</sub> dozu 72 saatte için 86.23 µM olarak belirlenmiştir.

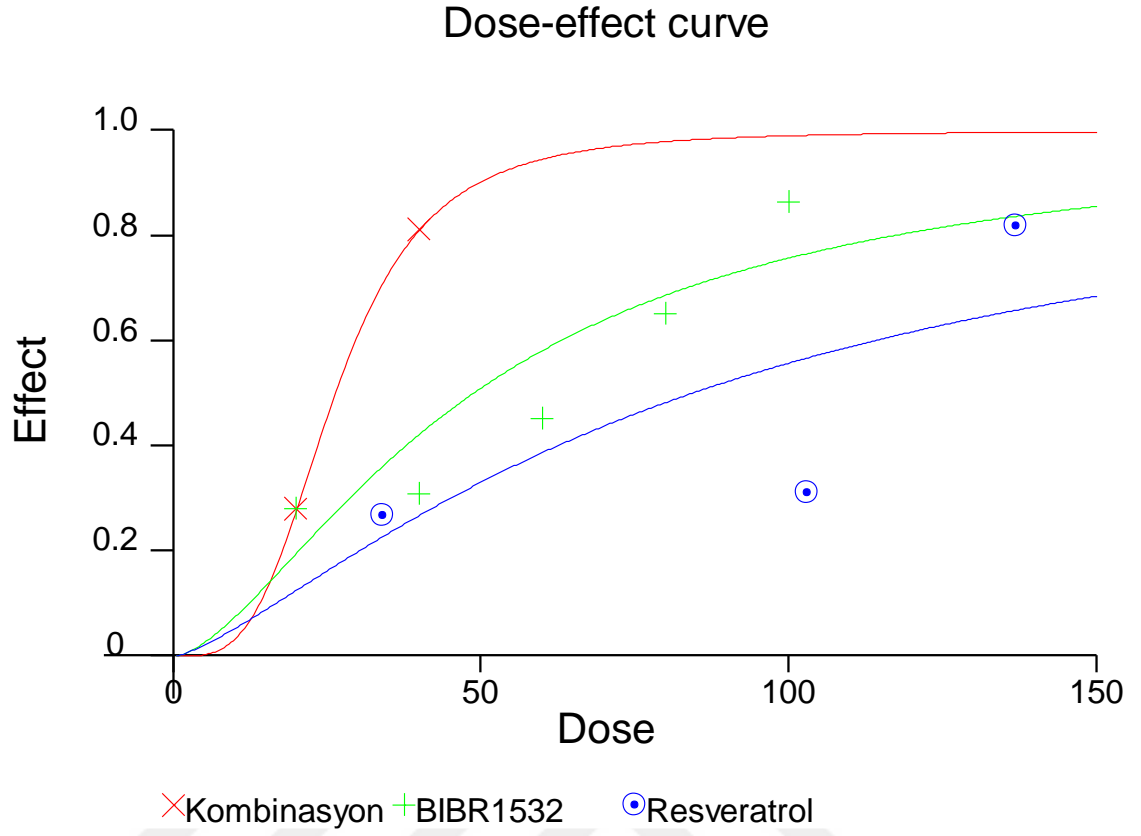


**Grafik 3: HT-29 hücrelerinde resveratrol maddesinin IC<sub>50</sub> doz grafiği**

### **2.3.BIBR1532 ve Resveratrol Kombinasyonunun HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi**

BIBR1532 ve resveratrol kombinasyonunun sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde, bu ajanların çeşitli oranlarda kombinasyonlarını içeren karışımları hazırlanarak HT-29 hücreleri üzerindeki etkileri 24, 48, 72. Saatlerde WST-1 testi ile değerlendirilmiştir.

Kombine olarak ilaç dozları BIBR1532 için 26.25  $\mu$ M, resveratrol için ise 45.15  $\mu$ M olarak ve CI değeri 1.7 olarak belirlenmiştir.



**Grafik 4: HT-29 hücrelerinde BIBR1532 + resveratrol kombinasyonunun IC<sub>50</sub> doz grafiği**

### 3. Apoptoz Deneyi

Etken maddelerin IC<sub>50</sub> dozlarının HT-29 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri 48. saatte değerlendirildi. Tüm apoptoz deneylerine hücre sayısı her kuyucukta  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde başlandı. Etken madde uygulanmayan hücreler ise kontrol grubu olarak kabul edilerek kontrol grubuna göre etken maddelerin oluşturduğu apoptoz artışı belirlendi. Apoptoz analizleri Annexin V yöntemi ile gerçekleştirildi.

### 3.1.BIBR1532, Resveratrol ve BIBR1532 + Resveratrol

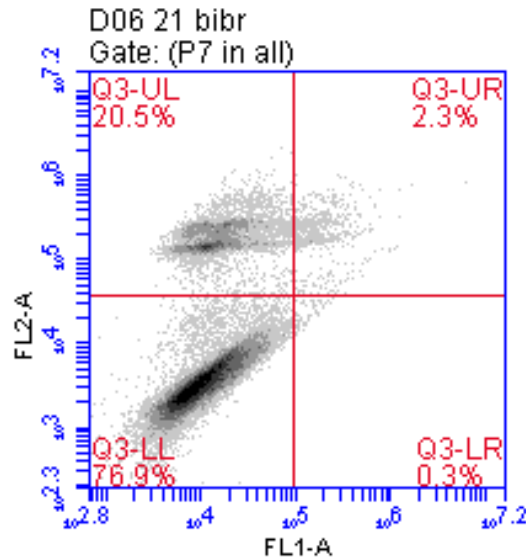
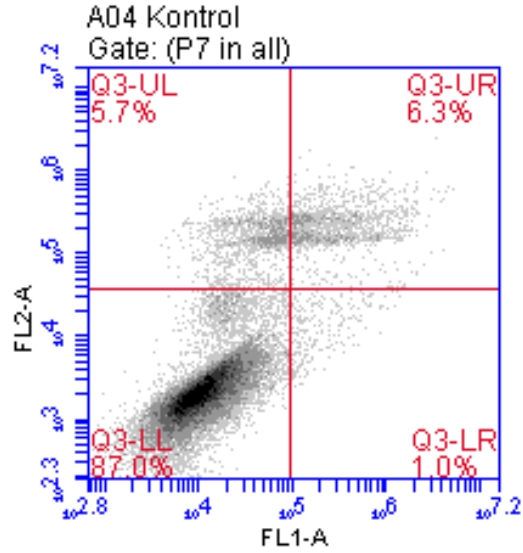
#### Kombinasyonunun Kolorektal Kanser Hücre Hattı Üzerindeki

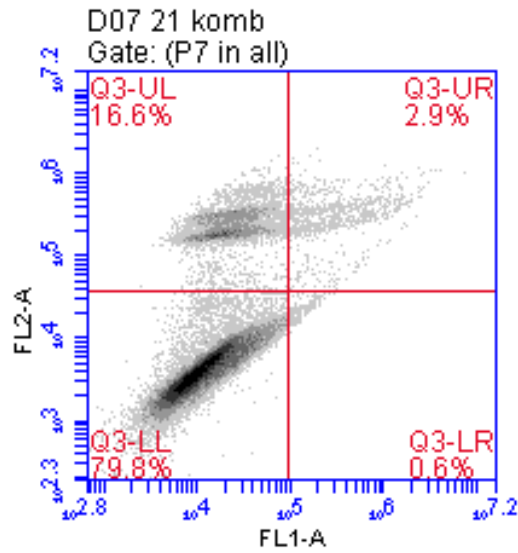
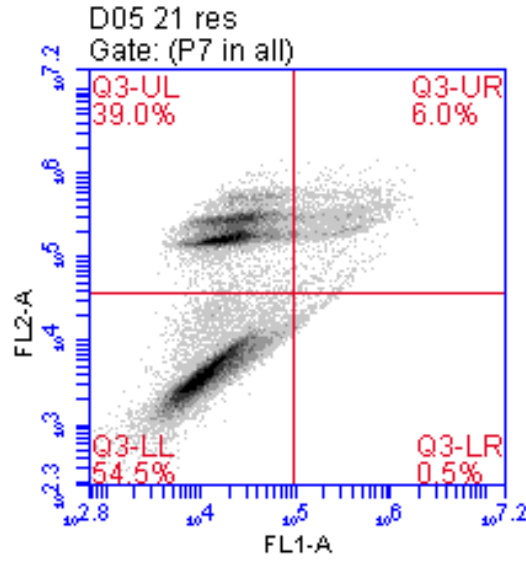
#### Apoptotik Etkileri

HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde BIBR1532 ve resveratrol ajanlarının tekli ve kombine olarak IC<sub>50</sub> dozlarının 48. saatteki apoptoz sonuçları Annexin V yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kontrol olarak hiç etken madde uygulanmamış hücreler kullanılmıştır.

**Tablo 10: HT-29 hücrelerinde BIBR1532 ve resveratrol ajanlarının tekli**

**ve kombine şekilde apoptoz sonuçları**





Annexin V analizinin sonuçlarına göre kontrol grubu hücrelerde ve BIBR1532 uygulanan hücrelerde sırasıyla canlılık oranları %87 ve %76.9 olarak belirlenmiştir. Bu hücrelerde apoptoz oranları ise sırasıyla % 7.3 ve %2.6 olarak tespit edilmiştir. Kontrol hücrelerinde 5,0 nekroz, 6,3 geç apoptoz, 1,0 erken apoptoz gözlenirken dozda 20,5 nekroz, 2,3 geç apoptoz, 0,3 erken apoptoz gözlenmiştir. Resveratrol uygulanan hücrelerde ise; canlılık oranı % 54.5 değerine düşerken, apoptoz oranı % 6.5 olarak bulunmuştur. Nekroz 39,0, geç apoptoz 6,0 ve erken apoptoz 0.5 olarak belirlenmiştir. Kombine dozların uygulandığı hücrelerde ise canlılık oranı % 79.8, apoptoz oranı ise % 3.5'tur. Nekroz 16,6, geç apoptoz 2,9 ve erken apoptoz 0,6 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak BIBR1532 ve resveratrol

ajanlarının her ikisi de hücrelerin canlılık oranını düşürürken, apoptoz indükleyici bir etkilerinin olmadığı gösterilmiştir.

**Tablo 11: HT-29 hücrelerinde kontrol grubunun apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi**

| <b>Kontrol Hücre Grubu</b> |                        |
|----------------------------|------------------------|
| Nekroz<br>% 5.7            | Geç apoptoz<br>% 6.3   |
| Canlı hücreler<br>% 87.0   | Erken apoptoz<br>% 1.0 |

**Tablo 12: HT-29 hücrelerinde BIBR1532 uygulanan grubun apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi**

| <b>BIBR1532 Uygulanan Hücre Grubu</b> |                        |
|---------------------------------------|------------------------|
| Nekroz<br>% 20.5                      | Geç apoptoz<br>% 2.3   |
| Canlı hücreler<br>% 76.9              | Erken apoptoz<br>% 0.3 |

**Tablo 13: HT-29 hücrelerinde resveratrol uygulanan apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi**

| <b>Resveratrol Uygulanan Hücre Grubu</b> |                        |
|--|------------------------|
| Nekroz<br>% 39.0                         | Geç apoptoz<br>% 6.0   |
| Canlı hücreler<br>% 54.5                 | Erken apoptoz<br>% 0.5 |

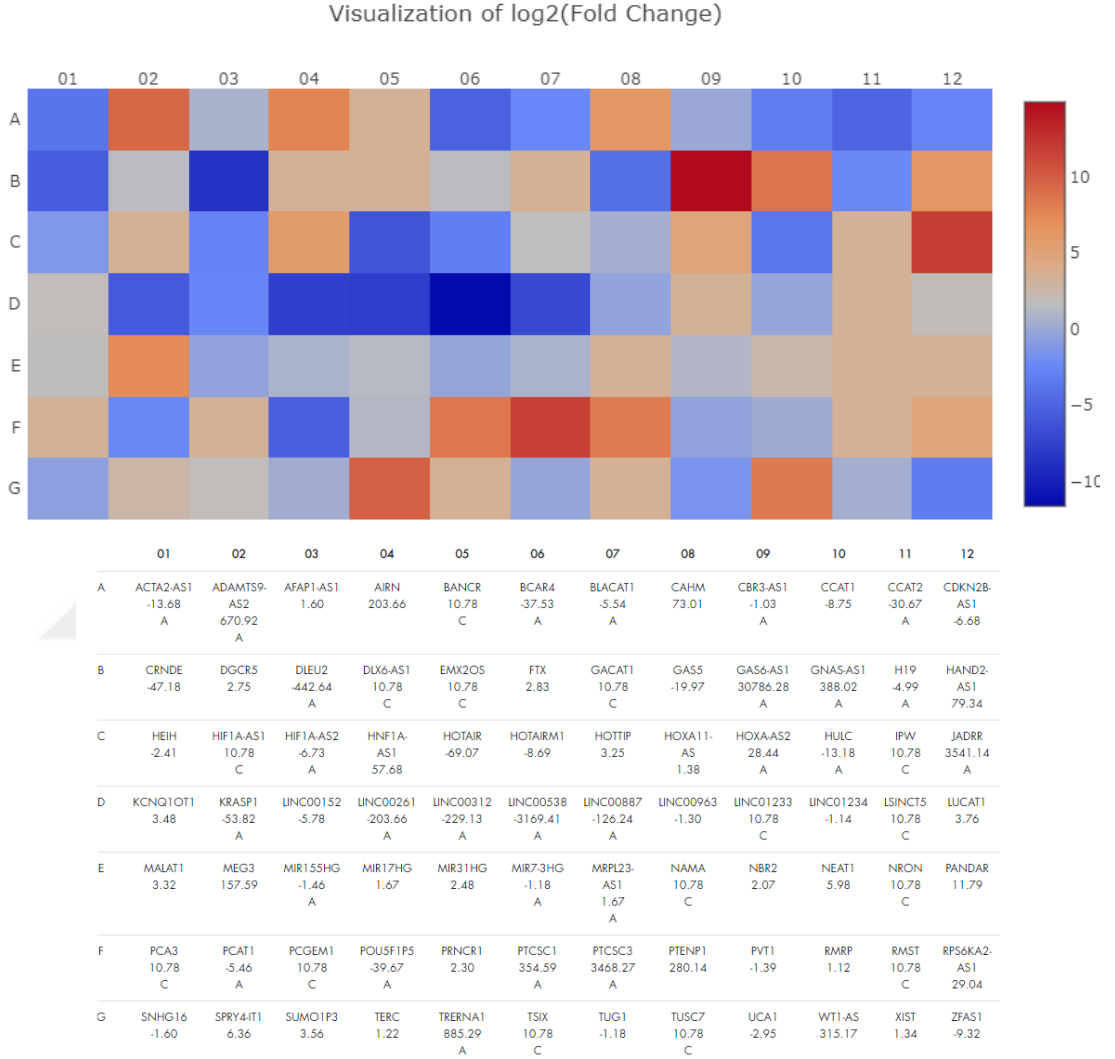
**Tablo 14: HT-29 hücrelerinde BIBR1532 + Resveratrol kombinasyonu uygulanan grubun apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi**

| <b>BIBR1532 + Resveratrol Kombinasyonu Uygulanan Hücre Grubu</b> |                        |
|--|------------------------|
| Nekroz<br>% 16.6   | Geç apoptoz<br>% 2.9   |
| Canlı hücreler<br>% 79.8   | Erken apoptoz<br>% 0.6 |

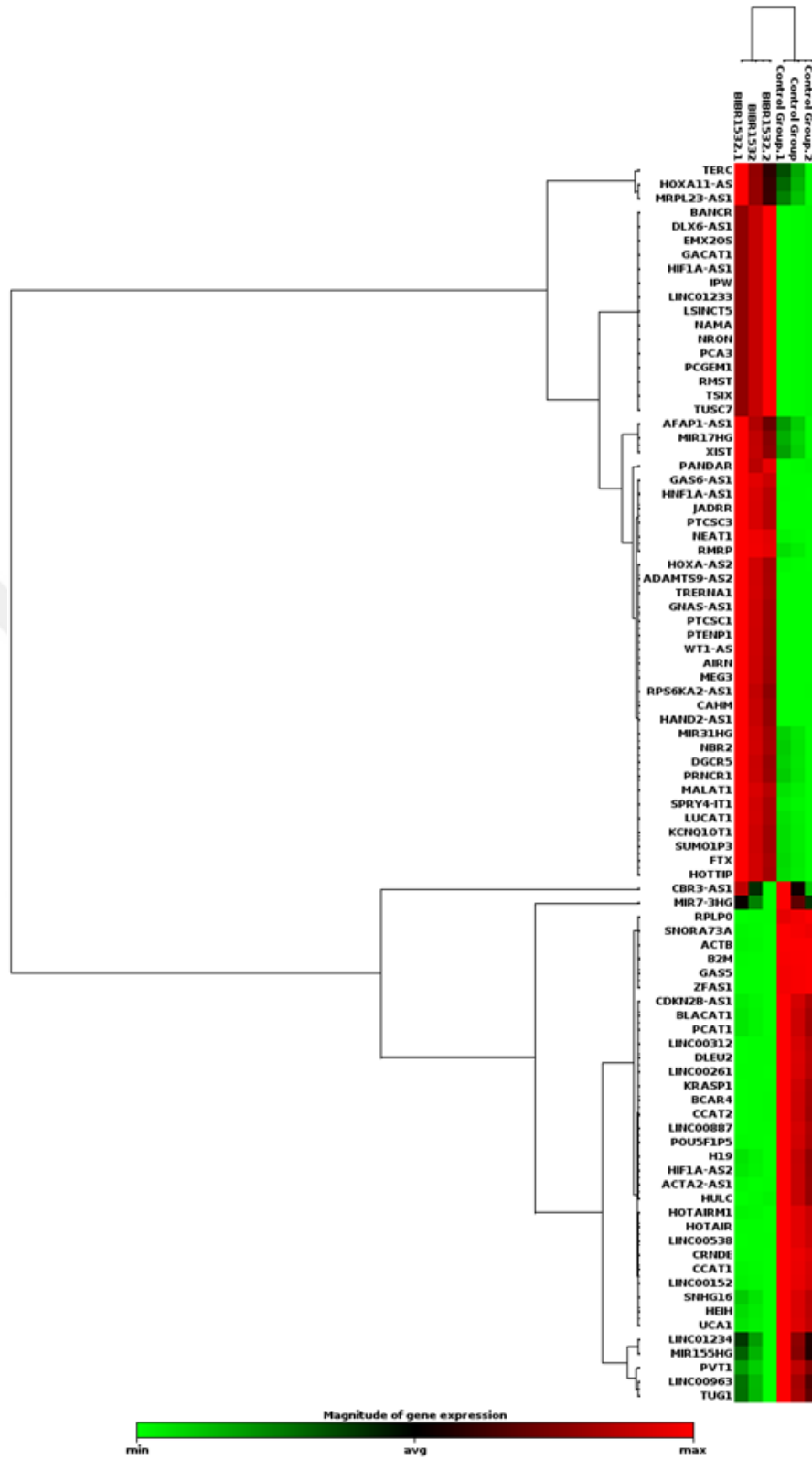
#### 4. BIBR1532 ve Resveratrolün HT-29 Hücreleri Üzerindeki LncRNA Ekspresyon Değişimlerinin Değerlendirilmesi

Etken maddelerin IC50 dozlarının HT-29 hücrelerinde lncRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkileri 48 saat doz uygulamasının ardından gerçekleştirildi.

#### 4.1. BIBR1532 Ajanının HT-29 Hücreleri Üzerindeki LncRNA Ekspresyon Değişimlerinin Değerlendirilmesi



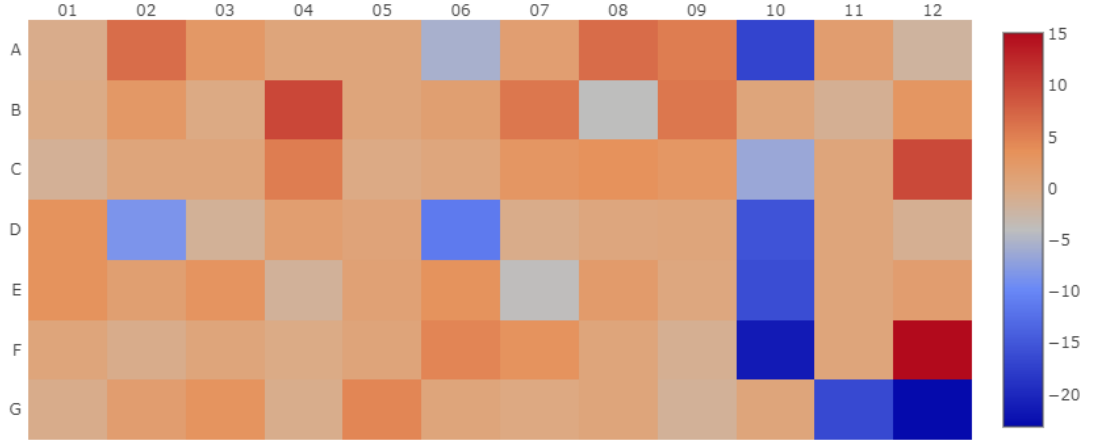
**Grafik 5: BIBR1532 ajanının HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'lar üzerindeki etkisini gösteren ısı haritası**



Grafik 6: BIBR1532 ajanının HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'ların clustergram analizi

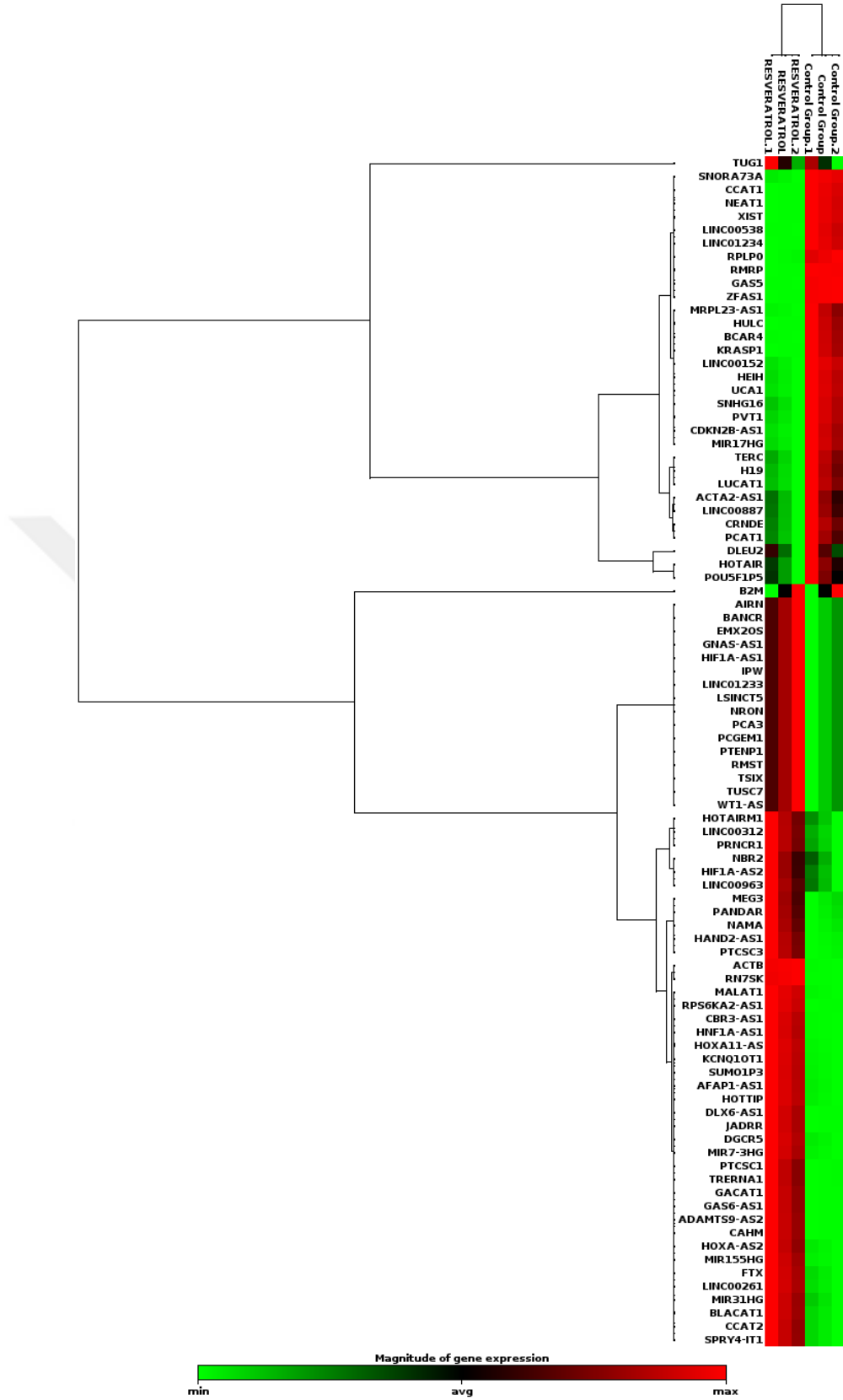
## 4.2. Resveratrol Ajanının HT-29 Hücreleri Üzerindeki lncRNA Ekspresyon Değişimlerinin Değerlendirilmesi

Visualization of log<sub>2</sub>(Fold Change)



|   | 01                 | 02                             | 03                  | 04                      | 05                  | 06                         | 07                            | 08                     | 09                     | 10                          | 11                     | 12                               |
|---|--------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|----------------------------------|
| A | ACTA2-AS1<br>-1.53 | ADAMTS9-<br>AS2<br>102.54<br>A | AFAP1-AS1<br>5.86   | AIRN<br>1.58<br>C       | BANCR<br>1.58<br>C  | BCAR4<br>-44.63<br>A       | BLACAT1<br>3.01               | CAHM<br>112.21<br>A    | CBR3-AS1<br>41.64      | CCAT1<br>-131072.00<br>A    | CCAT2<br>3.39          | CDKN2B-AS1<br>-3.76              |
| B | CRNDE<br>-1.21     | DOCR5<br>5.78                  | DLEU2<br>-1.09      | DLX6-AS1<br>982.29<br>A | EMX2OS<br>1.58<br>C | FTX<br>2.87                | GACAT1<br>57.68<br>A          | GAS5<br>-15.45         | GAS6-AS1<br>59.71<br>A | GNAS-AS1<br>1.58<br>C       | H19<br>-2.27           | HAND2-AS1<br>7.73                |
| C | HEIH<br>-2.55      | HIF1A-AS1<br>1.58<br>C         | HIF1A-AS2<br>1.55   | HNF1A-<br>AS1<br>39.67  | HOTAIR<br>-1.17     | HOTAIRM1<br>1.35           | HOTTIP<br>7.16                | HOXA11-<br>AS<br>11.39 | HOXA-AS2<br>6.87<br>A  | HULC<br>-89.88<br>A         | IPW<br>1.58<br>C       | JADRR<br>861.08<br>A             |
| D | KCNQ1OT1<br>10.34  | KRASP1<br>-367.09<br>A         | LINC00152<br>-2.68  | LINC00261<br>3.20       | LINC00312<br>1.80   | LINC00538<br>-2521.38<br>A | LINC00887<br>-1.45            | LINC00963<br>1.31      | LINC01233<br>1.58<br>C | LINC01234<br>-44453.21<br>A | LSINCT5<br>1.58<br>C   | LUCAT1<br>-2.19                  |
| E | MALAT1<br>10.63    | MEG3<br>2.87                   | MIR155HG<br>8.75    | MIR17HG<br>-3.01        | MIR31HG<br>2.27     | MIR7-3HG<br>10.27          | MRPL23-<br>AS1<br>-14.62<br>A | NAMA<br>4.35           | NBR2<br>1.25           | NEAT1<br>-69272.73<br>A     | NRON<br>1.58<br>C      | PANDAR<br>3.34                   |
| F | PCA3<br>1.58<br>C  | PCAT1<br>-1.57                 | PCGEM1<br>1.58<br>C | POU5F1P5<br>-1.26       | PRNCR1<br>1.66      | PTCSC1<br>24.93            | PTCSC3<br>9.85                | PTENP1<br>1.58<br>C    | PVT1<br>-2.19          | RMRP<br>-2904785.09<br>A    | RMST<br>1.58<br>C      | RF56KA2-<br>AS1<br>35857.82<br>A |
| G | SNHG16<br>-1.55    | SPRY4-IT1<br>3.36              | SUMO1P3<br>9.25     | TERC<br>-1.65           | TRERNA1<br>24.08    | TSIX<br>1.58<br>C          | TUG1<br>1.01                  | TUSC7<br>1.58<br>C     | UCA1<br>-2.85          | WT1-AS<br>1.58<br>C         | XIST<br>-88906.42<br>A | ZFAS1<br>-9179600.90<br>A        |

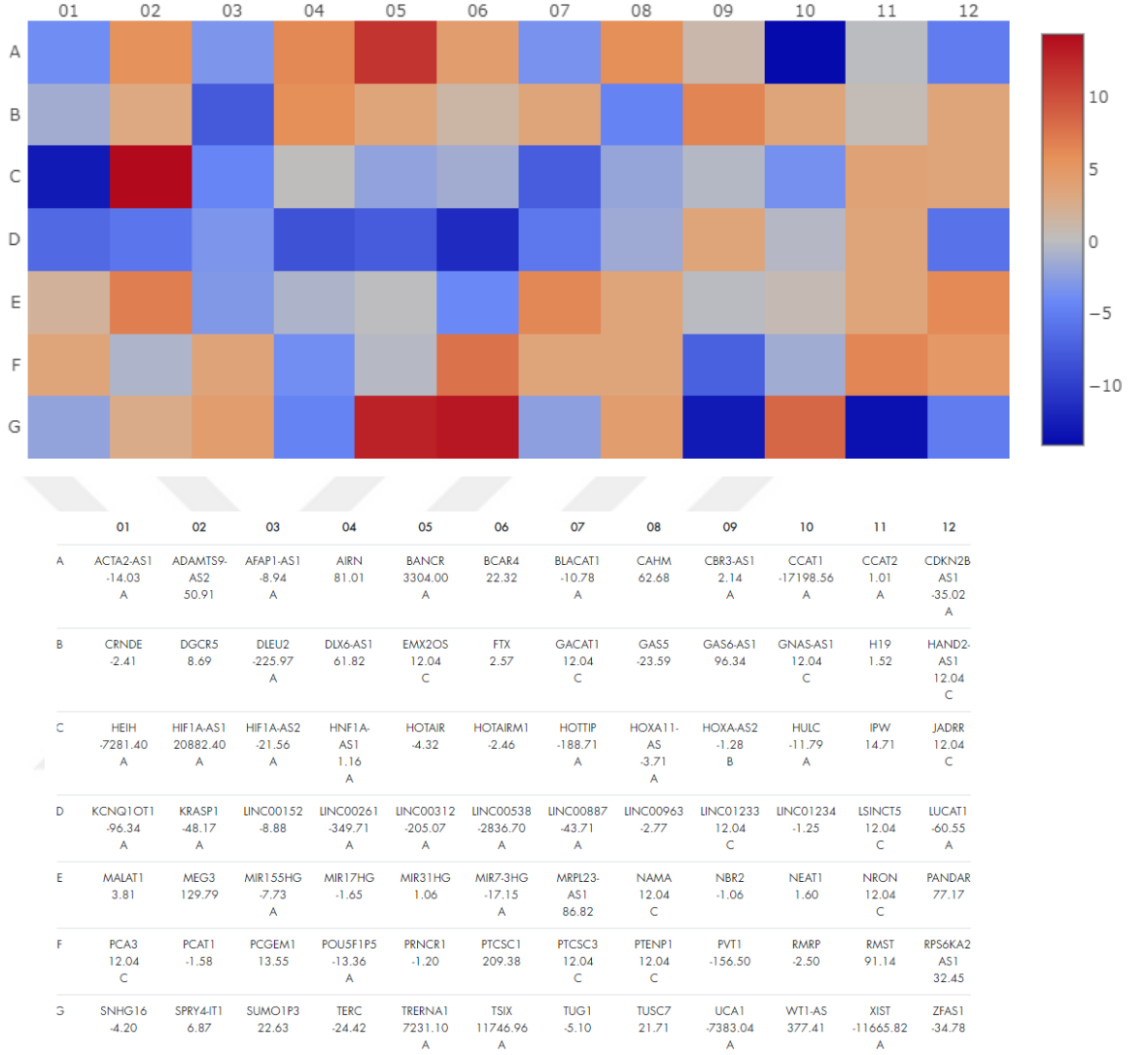
**Grafik 7: Resveratrol ajanının HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'lar üzerindeki etkisini gösteren ısı haritası**



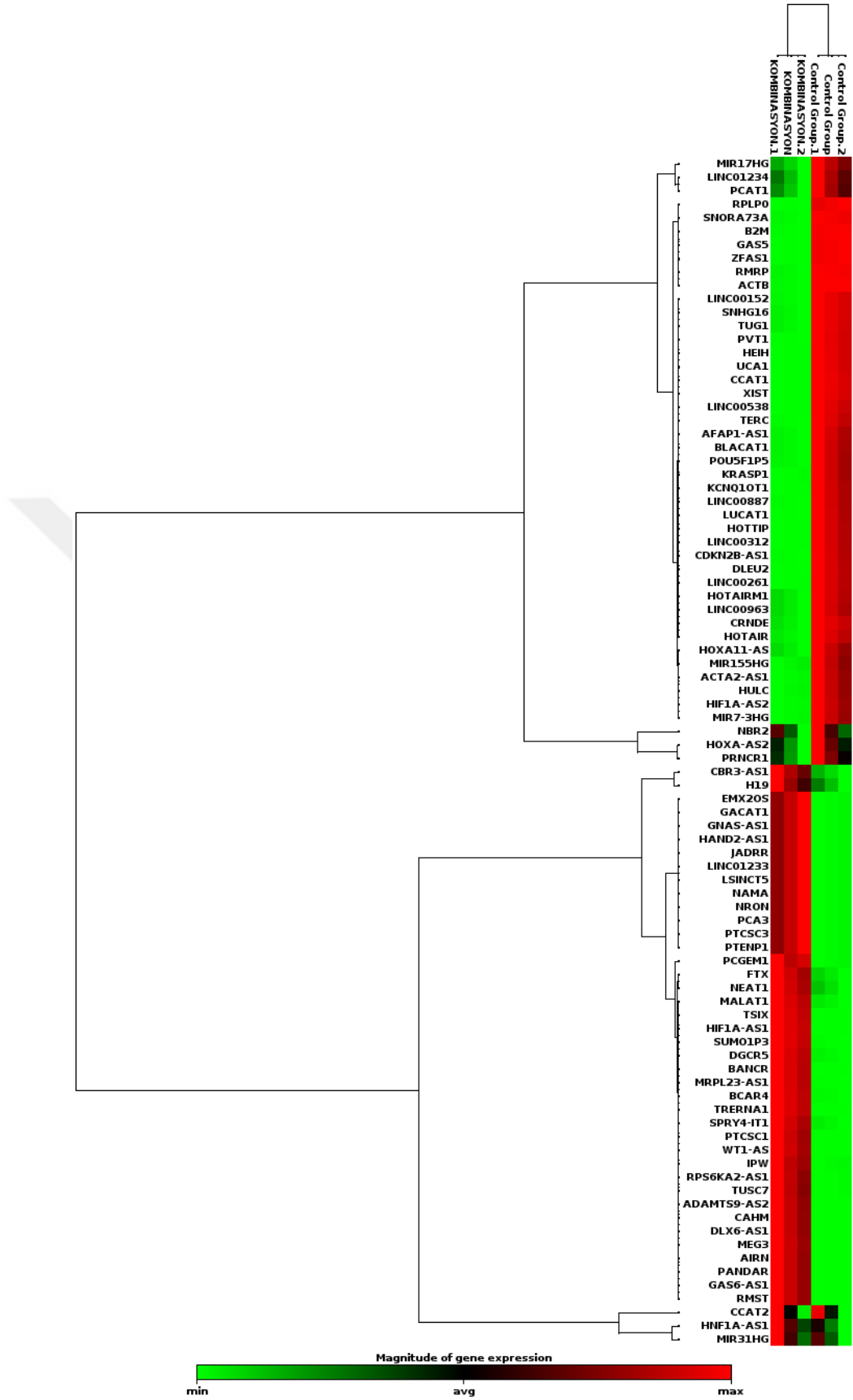
**Grafik 8: Resveratrol ajanının HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'ların clustergram analizi**

### 4.3. BIBR1532 ve Resveratrol Kombinasyonunun HT-29 Hücreleri Üzerindeki lncRNA Ekspresyon Değişimlerinin Değerlendirilmesi

Visualization of log<sub>2</sub>(Fold Change)



**Grafik 9: BIBR1532 ve Resveratrol kombinasyonunun HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'lar üzerindeki etkisini gösteren ısı haritası**



Grafik 10: BIBR1532 ve Resveratrol kombinasyonunun HT-29 hücrelerinde kanser ilişkili lncRNA'ların clustergram analizi

## Tartışma

Kolorektal kanser (CRC), erkek ve kadınlarda en sık rastlanan üçüncü kanserdir, CRC'de proksimal kolonda oluşan tümörler % 41'lik oranla en çok rastlanan tümörler iken distal kolondaki tümörler % 22'lik orana sahiptir ve tümörlerin % 28'lik kısmına ise rektumda rastlanmaktadır. Yeni gelişen tedavi ve görüntüleme yöntemleri sayesinde mortalite ve insidansta azalış olmasına karşın, halen birçok insan yeni CRC tanısı almakta ve her yıl birçok hasta bu hastalıktan hayatını kaybetmektedir. Genetik faktörler kadar çevresel faktörlerin de etkili olduğu CRC'de, tümörlerin %80'i lokalize şekilde iken %20'si metastaza uğramıştır. Tedavi aşamasında, cerrahi yöntemlerin yanısıra adjuvan kemoterapi, kemoradyasyon ve metastatik CRC'de Pembrolizumab ile immunoterapi uygulanmaktadır (Thanikachalam and Khan 2019).

CRC'nin % 85 oranında karakterize edildiği özellik CIN'dir ve CIN'nin en büyük nedeni telomer disfonksiyonu olarak bilinmektedir ve bu nedenle de telomer durumunun ve telomeraz aktivitesinin CRC'de prognostik bir faktör olabileceği düşünülmektedir (Fernández-Marcelo ve ark. 2016). BIBR1532 maddesi telomeraz inhibitörü olarak işlev görmektedir ve kanser araştırmalarında sıkça kullanılmaktadır. Genel anlamda CRC hücrelerinde telomeraz inhibitörlerinin kullanımıyla ilgili kısıtlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Fakat HT-29 hücrelerinde kullanımıyla ilgili bir çalışma literatürde mevcut değildir, bu nedenle BIBR1532 maddesinin HT-29 hücrelerindeki sitotoksik etkisi, dolayısıyla da IC50 dozu bilinmemektedir. Resveratrol antioksidan özelliklere sahip olan bitkisel bir bileşiktir ve kanser hücrelerinde AKT/STAT3 sinyal yolağını hedef alarak hücre proliferasyonunu ve koloni büyümesini azalttığı çalışmalarda gösterilmiştir (Li ve ark., 2019). Literatürde CRC hücreleri üzerinde resveratrol ile yapılan başka birçok çalışma bulunmasıyla birlikte, bu maddenin HT-29 kanser hücrelerindeki etkisi ve hücrelerin büyümesini baskılayıcı özelliğinin mekanizması, tam olarak bilinmemektedir.

Resveratrolün HT-29 hücrelerinde ve çeşitli CRC hücrelerinde IC50 dozları yapılan çalışmalarda bulunmuş olmasına rağmen çalışmamızda hem BIBR1532 hem de resveratrol ajanları için optimal konsantrasyondaki HT-29 hücrelerinde sitotoksikite deneyleri WST-1 testi ile analiz edilmiş ve IC50 dozları belirlenmiştir. Proliferasyon

deneyinde optimal hücre konsantrasyonu  $2 \times 10^4$  hücre/ ml olarak bulunmuş, ardından bu konsantrasyondaki hücelere uygulanan maddelerin IC50 dozları BIBR1532 için 48.saatte  $50.81 \mu\text{M}$ , resveratrol için ise 72.saatte  $86.23 \mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Ardından bu iki ajanın farklı miktardaki dozlarının kombinasyonu ile yapılan izobologram analizinin sonucunda; kombine şekilde en uygun sitotoksik değere sahip olan konsantrasyon değerleri BIBR1532 için  $26.25 \mu\text{M}$ , resveratrol için ise  $45.15 \mu\text{M}$  olarak bulunmuş ve CI değeri 1.7 olarak saptanmıştır.

Sonrasında Annexin V deneyi ile apoptotik özellikleri tespit edilen ajanların apoptozu indükleyici bir özelliğe sahip olmadıkları sonucuna varılmıştır. Buna; bazı lncRNA'ların ekspresyonunda artış, bazılarındaki azalış neden olabilmektedir. Örneğin; DGCR5, FTX, MALAT1, SPRY4-IT1 ve SUMO1P3 gibi lncRNA'ların ekspresyonlarındaki artış apoptozu baskılayıcı etkiye sahip olabilmektedir. Çünkü, normal koşullarda bu lncRNA'ların knockdown'u ve aşağı düzenlenmesi apoptozu indüklemektedir, dolayısıyla artışlarının apoptozu azaltıcı ya da baskılayıcı etkiye sahip olacağı düşünülmektedir. Diğer yandan GAS5 gibi aşırı eksprese olduğunda apoptozu uyaran lncRNA'lar, çalışmamızda olduğu gibi ekspresyonu azaldığında apoptozu baskılamaktadır. Canlılık oranı her hücre grubunda (BIBR1532, resveratrol ve kombine doz uygulanan) kontrole göre azalmış, özellikle resveratrol uygulanan hücrelerdeki canlılık oranı %87'den % 54.5'a düşmüştür. Bunun nedeni hücrelerin nekroza gitmesiyle açıklanabilmektedir.

Çalışmamızda doz uygulanan hücrelerde kanser ilişkili lncRNA'lar incelenmiş ve ilaç uygulanmayan hücreler ile lncRNA'lardaki ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Literatüre göre, lncRNA PCAT1'in aşağı düzenlenmesinin CRC'de hücre döngüsü geçişini, proliferasyonu engellediği ve c-Myc ile siklinleri baskıladığı gösterilmiştir. Böylece, CRC hücrelerini apoptoza yönlendirdiği ve büyümenin durmasını sağladığı saptanmıştır (Qiao ve ark. 2017). Çalışmamızda ise BIBR1532 uygulanmış HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde PCAT1'in ekspresyonunun 5.46 kat azaldığı görülmekte ve bu nedenle BIBR1532 ajanının apoptozu indükleyici ve kanser hücrelerinin büyümesini azaltıcı etki gösterdiği düşünülmektedir.

CRC ile ilişkili olan diğer bir lncRNA olan SNHG16, RNA sekanslama yöntemleriyle analiz edilmiş ve adenomlarda yüksek oranda eksprese edildiği belirlenmiştir. Wnt sinyal yolağı tarafından düzenlendiği bilinen SNHG16,

sitoplazmada bulunmakta ve baskılandığı durumda apoptoza neden olmakta ve migrasyonu engellemektedir (Christensen ve ark. 2016). Tez kapsamında SNHG16'nın ekspresyonu incelenmiş olup, BIBR1532 ve resveratrol ajanlarının combine şekilde uygulandığı HT-29 hücre grubunda bu lncRNA'nın 4.2 kat aşağı düzenlenmiş olduğu görülmektedir. Bu bilgi ışığında iki ajanın uygulamasının CRC'de ilerleyen çalışmalarla desteklenerek terapötik yanıt oluşturabileceği öngörülmektedir.

TUSC7 'nin CRC'de aşağı düzenlenmiş olduğu yapılan çalışmada gösterilmiş olup genel sağkalım ve tümör derecesiyle ilişkilendirilmektedir. Ek olarak, miR-10a ekspresyonunu düzenleyerek proliferasyon ve invazyonu baskılamaktadır (Ren ve ark. 2017). Çalışma kapsamında ekspresyon seviyesindeki değişiklik incelenmiş, ancak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Tez kapsamında ekspresyon değişimleri incelenen CCAT1 ve CCAT2 lncRNA'ların yüksek ekspresyonu, düşük nüksüz sağkalım ve toplam sağkalım oranları ile kuvvetli ölçüde ilişkilendirilmekte ve birbirlerinden bağımsız ya da birlikte ekspresyonları önemli bir prognostik belirteç olarak kullanılmaktadır (Ozawa ve ark. 2017). Çalışmamızda CCAT1'in ekspresyonunun BIBR1532 uygulanmış ve kombine olarak BIBR1532 ve resveratrol uygulanmış hücre gruplarında sırasıyla 8.75 ve 17198.56 kat azaldığı tespit edilmiştir. CCAT2 ekspresyonunun ise yalnızca BIBR1532 ajanının uygulandığı hücrelerde azaldığı belirlenmiştir (-30.67 kat). Bu veriler ışığında BIBR1532 maddesinin CCAT1 ekspresyon seviyesini değişikliğe uğratici etkiye sahip olduğu söylenebilmekte ve destekleyici çalışmalar ile kolorektal kanserde kullanımının önünün açılacağı düşünülmektedir.

Diğer bir lncRNA olan CRNDE kolorektal kanserlerde yüksek ekspresyona sahiptir ve CRC'nin ilerlemesi ile ilişkilidir. CRNDE, epigenetik olarak CRC hücrelerinin proliferasyonuna ve tümör oluşumuna katkı sağlamakta ve bu nedenlerden dolayı teşhis ve tedavide potansiyel hedef olarak düşünülmektedir (Ding ve ark. 2017). Çalışmada ise CRNDE ekspresyon seviyesinin, CCAT1'de olduğu gibi, BIBR1532 uygulanmış ve kombine olarak BIBR1532 ve resveratrol uygulanmış hücre gruplarında azalma gösterdiği belirlenmiştir. Sırasıyla 47.18 ve 2.41 kat kadar azalma gösteren CRNDE'nin CRC'de önemli bir belirteç olduğu ve BIBR1532 ajanının bu lncRNA'nın ekspresyonunu baskılayarak tümör oluşumunu ve proliferasyonunu engelleyebileceği öne sürülmektedir.

Çalışma içeriğinde incelenen lncRNA HOTAIR kanser hücrelerinde migrasyon, invazyon ile ilişkilendirilmiştir. BIBR1532 ve kombinasyon doz uygulanan hücre gruplarında 69.07 ve 4.32 katlık azalış göstermektedir. Metastazdaki rolünün yanı sıra, HOTAIR proliferasyon, ilaç direnci ve anjiyogenezde de görev almaktadır. CRC'lerde yüksek oranda yukarı düzenlenmiş olduğu bilinmekte ve çalışmalar HOTAIR'in CRC'de tümör oluşumunda pro- onkogen olarak rol üstlendiğini göstermektedir (Huang ve ark. 2019). Bu bilgiler çalışmanın çıktıları ile birlikte değerlendirildiğinde; HOTAIR'in CRC dahil tüm kanser türlerinde ayrıntılı bir incelemeyi ve terapötik çalışmalar yapılmasının önemini göstermektedir.

H19 lncRNA'nın aşırı ekspresyonunun RAS aktivasyonu sonucunda CRC hücrelerinde migrasyon ve invazyonu arttırabildiği, bu yüzden de RAS-MAPK sinyal yolağının aktive olmasıyla H19'un metastaza yol açabileceği gösterilmiştir (W. Yang ve ark. 2018). Çalışma sonuçlarının ışığında BIBR1532 uygulanan HT-29 hücrelerinde yaklaşık 5 katlık ve resveratrol uygulanan hücrelerde 2.27 katlık bir azalma görülürken, bu ajanların kombine şekilde uygulanmasında H19 lncRNA ekspresyon sonucunda anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. İlave çalışmalar ile kombine etkinin de açıklığa kavuşturulması ile bu ajanların H19 lncRNA ekspresyonu üzerine etkisi tam olarak tespit edilerek, kanser hücrelerinin yayılmasındaki en kilit özellikler olan migrasyon, invazyon ve metastazda önemli rol oynayan H19'un baskılanması için yeni çalışmalara ışık tutulacaktır.

Tang D. ve arkadaşlarının çalışmasında (Tang ve ark. 2019); MALAT1 CRC ile ilişkilendirilen diğer bir lncRNA'dır ve bu lncRNA'nın susturulmasının CRC ilerlemesi ve metastazını baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca, HCT-116 hücrelerinde 5-FU maddesine karşı sensitivitesini arttırdığı görülmüştür. MicroRNA-20b-5p'nin MALAT1'in susturulmasında hedef olarak kullanılabilceği gösterilmiştir. Çalışmada ise MALAT1 ekspresyon seviyelerinin BIBR1532, resveratrol ve kombine doz uygulanan grupların her üçünde de arttığı sonucu elde edilmiştir. Bu artışlar BIBR1532 ve kombine doz gruplarında yaklaşık 3 kat iken, resveratrol uygulanan grupta 10.63 kattır. Bu nedenle bu iki ajanın tekli ve kombine doz olarak uygulamalarının MALAT1 ekspresyonunun baskılanmasında bir etki göstermediği görülmektedir.

Heng Fan ve ark., PVT1 susturulmasının 5-FU dirençli CRC hücrelerinde bu direnci geri çevirdiğini ve PVT1 aşırı ekspresyonunun apoptozu inhibe ederek ve MRP1,

mTOR, Bcl-2 gibi elemanları upregüle ederek MDR'ı teşvik ettiğini saptamışlardır (Fan, Zhu, and Yao 2018). PVT1 ekspresyonunun resveratrol ve kombine doz uygulanan hücrelerde sırasıyla 2.19, 156.5 kat azaldığı görülürken; BIBR1532 uygulanan hücrelerde ise değişimin 2 kattan az olması nedeniyle anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. İlaç direncinde önemli bir lncRNA olarak PVT1'in araştırılması ve PVT1'i baskılayabilen ajanların keşfedilmesi CRC'de karşılaşılan ilaç direnci ile başa çıkmada önemli bir basamak olacaktır.

Ekspresyon deneyinin sonuçlarından bir diğeri ise tümör baskılayıcı genlerdeki ekspresyon seviyesi artışıdır. BIBR1532 uygulanmış HT-29 hücrelerinde MIR31HG, NEAT1'da sırasıyla 2.48 ve 5.98 kat artış görülürken; PTCSC1, PTCSC3 ve PTENP1 lncRNA'larında sırasıyla 354.59, 3468.27 ve 280.4 katlık artış görülmektedir. Resveratrol uygulanmış hücrelerde GACAT1, LINC00261, MIR31HG, MIR7-3HG, PTCSC1 ve PTCSC3'te sırasıyla 57.68, 3.20, 2.27, 10.27, 24.93, 9.85 katlık artış gözlenmiştir. Kombinasyon grubunda ise; lncRNA ekspresyon düzeylerinde tespit edilen artışlar ADAMTS9-AS2'de 50.91, PTCSC1'de 209.38, PTCSC3'de 12.04, PTENP1'de 12.04 kattır. Ayrıca; daha önce CRC ile ilişkilendirilmemiş olan CDKN2B-AS1 , LINC00152 ve UCA1 onkogenlerine ait lncRNA'larının ortak olarak BIBR1532 uygulanan, resveratrol uygulanan ve kombine doz uygulanan hücre gruplarında ekspresyon seviyelerinde azalma görülmektedir. CDKN2B-AS1'in ekspresyonu BIBR1532 uygulanan hücrelerde 6.68, resveratrol uygulanan grupta 3.76 kat zılırken; kombine doz grubunda 35.02 kat azalmıştır. LINC00152 için ise aynı sıralamayla 5.78, 2.68 ve 8.88 kat şeklinde azalma görülmektedir. UCA1 ise 2.95, 2.85 ve 7383 katlık azalma göstermiştir. Bu veriler kombine olarak uygulanan BIBR1532 ve resveratrol dozlarının tekli dozlardan çok daha etkili bir şekilde bu üç onkogenik özellik gösteren lncRNA'nın ekspresyonunu ciddi oranda azalttığı görülmektedir.

## Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda; BIBR1532, resveratrol ve bu ajanların kombinasyonunun kolorektal kanser hücresi olan HT-29 hücrelerindeki sitotoksik etkisi, apoptozu indükleyip indüklediği ve bu ajanların kanser ilişkili lncRNA'ların seviyelerinde oluşturduğu değişiklikleri araştırdık. BIBR1532 ve resveratrolün, HT-29 hücre hattındaki IC50 değeri sırasıyla 48. saatte 50.81  $\mu$ M ve 72. saatte 86.23  $\mu$ M olarak belirlenmiştir. Kombinasyon uygulaması hem 48 hem 72. saatler için uygulanmış, 48.saat sonuçlarının daha etkili ve güvenilir olması nedeniyle çalışmaya bu uygulamayla devam edilmiştir. Bunun sonucunda kombine olarak hücrelere uygulanan dozların kombinasyon indeksi (CI) 1.7 olarak tespit edilmiştir. İzobologram analizi sonucunda bulunan 26.25  $\mu$ M BIBR1532 ve 45.15  $\mu$ M resveratrol şeklindeki kombinasyon dozları hücrelere uygulanmış ve apoptoz deneyi gerçekleştirilmiştir; fakat her iki ajanın da apoptotik bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bu duruma apoptoz ile ilişkili lncRNA'ların bazılarının ifade seviyelerindeki değişikliğin neden olduğunu düşünmekteyiz. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında doz uygulanan hücrelerde canlılık oranı azalmıştır, bunun nedeninin nekroz olduğu görülmektedir. Belirli lncRNA seviyelerindeki artış ve azalma kullanılan ajanların verimliliği ile ilişkilendirilmektedir. Onkogenlerin baskılanmasında en etkili uygulamanın BIBR1532'nin tekli ve resveratrol ile kombinasyonu ile görülürken tümör baskılayıcı lncRNA'ların ekspresyon artışında en büyük katkı resveratrol tarafından sağlanmıştır. Bu ilaçların kombinasyonunun çalışıldığı araştırma literatürde yer almamaktadır. Bu nedenle çalışmamız literatüre kazandıracığı yeni verilerle katkı sağlamış olacaktır. BIBR1532 ve resveratrol maddelerinin tek ya da kombine kullanımının çalışmalara ışık tutarak in vivo çalışmalarla desteklenip ilerleyen yıllarda klinikte önemli yer tutabileceğini düşünmekteyiz.

## Kaynaklar

- Agarwal, Ashok, Rakesh K Sharma, and Gulfam Ahmad. 2019. "Sperm Chromatin Assessment." In *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*, Taylor & Francis.
- Aldrich, Sigma. 2019. "Resveratrol." <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r5010?lang=en&region=TR>.
- American Cancer Society et al. 2015. "Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012." *International journal of cancer*.
- Armaghany, Tannaz, Jon D. Wilson, Quyen Chu, and Glenn Mills. 2012. "Genetic Alterations in Colorectal Cancer." *Gastrointestinal Cancer Research*.
- ATCC. 2019. "HT-29." *ATCC*: 1–2.
- Bashash, Davood et al. 2017. "Inhibition of Telomerase Using BIBR1532 Enhances Doxorubicin-Induced Apoptosis in Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cells." *Hematology* 22(6): 330–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28054503> (June 22, 2019).
- Bryan, Christopher et al. 2015. "Structural Basis of Telomerase Inhibition by the Highly Specific BIBR1532." *Structure*.
- Camont, Laurent et al. 2009. "Simple Spectrophotometric Assessment of the Trans-/Cis-Resveratrol Ratio in Aqueous Solutions." *Analytica Chimica Acta*.
- Cayman Chemical. "BIBR1532." <https://www.caymanchem.com/product/16608/bibr-1532>.
- Christensen, Lise Lotte et al. 2016. "SNHG16 Is Regulated by the Wnt Pathway in Colorectal Cancer and Affects Genes Involved in Lipid Metabolism." *Molecular Oncology*.
- Chung, Seyung S. Pranabananda Dutta David Austin, Piwen Wang, Adam Awad, and Jaydutt V. Vadgama. 2018. "Combination of Resveratrol and 5-Fluorouracil Enhanced Antitelomerase Activity and Apoptosis by Inhibiting STAT3 and Akt Signaling Pathways in Human Colorectal Cancer Cells." *Oncotarget* 9(68): 32943–57.
- Ding, Jie et al. 2017. "Long Noncoding RNA CRNDE Promotes Colorectal Cancer Cell Proliferation via Epigenetically Silencing DUSP5/CDKN1A Expression."

*Cell death & disease.*

- ecatalog. 2019. "Falcon® Cell Scrapers."
- Ellis, Blake C., Lloyd D. Graham, and Peter L. Molloy. 2014. "CRNDE, a Long Non-Coding RNA Responsive to Insulin/IGF Signaling, Regulates Genes Involved in Central Metabolism." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.
- Fan, Heng, Jian Hua Zhu, and Xue Qing Yao. 2018. "Knockdown of Long Non-Coding RNA PVT1 Reverses Multidrug Resistance in Colorectal Cancer Cells." *Molecular Medicine Reports*.
- Farnung, Benjamin O. et al. 2012. "Telomerase Efficiently Elongates Highly Transcribing Telomeres in Human Cancer Cells." *PLoS ONE*.
- Fernández-Marcelo, Tamara et al. 2016. "Clinical Relevance of Telomere Status and Telomerase Activity in Colorectal Cancer." *PLoS ONE*.
- Fuggetta, M P et al. 2006. "Effect of Resveratrol on Proliferation and Telomerase Activity of Human Colon Cancer Cells in Vitro." *J Exp Clin Cancer Res*.
- GBiosciences. 2019. "WST-1 Cell Proliferation Assay."
- Green, Douglas R., and Fabien Llambi. 2015. "Cell Death Signaling." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Huang, Kai bin et al. 2019. "Hotair Mediates Tumorigenesis through Recruiting EZH2 in Colorectal Cancer." *Journal of Cellular Biochemistry*.
- Huarte, Maite et al. 2010. "A Large Intergenic Noncoding RNA Induced by P53 Mediates Global Gene Repression in the P53 Response." *Cell*.
- International Agency for Research on Cancer. 2012. "GLOBOCAN 2012: Estimated Stomach Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012." *GLOBOCAN Cancer Fact Sheets*.
- Kurul Laboratuvar. "Neubauer."
- Li, Wenyang, and Yibin Kang. 2014. "A New Lnc in Metastasis: Long Noncoding RNA Mediates the Prometastatic Functions of TGF- $\beta$ ." *Cancer Cell*.
- Ling, Hui et al. 2013. "CCAT2, a Novel Noncoding RNA Mapping to 8q24, Underlies Metastatic Progression and Chromosomal Instability in Colon Cancer." *Genome Research*.
- Liu, Qian et al. 2013. "LncRNA Loc285194 Is a P53-Regulated Tumor Suppressor." *Nucleic Acids Research*.

- Ma, Huiying et al. 2018. "Pathology and Genetics of Hereditary Colorectal Cancer." *Pathology*.
- MFIMEDICAL. "Inverted Microscope."
- Moriwaki, Kenta, and Francis Ka Ming Chan. 2013. "RIP3: A Molecular Switch for Necrosis and Inflammation." *Genes and Development*.
- Mycoloncancercoach. "Colon Cancer 101." 2019. <https://www.mycoloncancercoach.org/Colon-Cancer-101/Understanding-Pathology-Report>.
- neubauer lam1. "Neubauer Lam1."
- Ozawa, T. et al. 2017. "CCAT1 and CCAT2 Long Noncoding RNAs, Located within the 8q.24.21 'Gene Desert', Serve as Important Prognostic Biomarkers in Colorectal Cancer." *Annals of Oncology*.
- Pascolo, Emanuelle et al. 2002. "Mechanism of Human Telomerase Inhibition by BIBR1532, a Synthetic, Non-Nucleosidic Drug Candidate." *Journal of Biological Chemistry* 277(18): 15566–72.
- Qiao, Lei et al. 2017. "Down Regulation of the Long Non-Coding RNA PCAT-1 Induced Growth Arrest and Apoptosis of Colorectal Cancer Cells." *Life Sciences* 188: 37–44.
- Ren, Weidan et al. 2017. "TUSC7 Acts as a Tumor Suppressor in Colorectal Cancer." *American Journal of Translational Research*.
- Saud, Shakir M. et al. 2014. "Resveratrol Prevents Tumorigenesis in Mouse Model of Kras Activated Sporadic Colorectal Cancer by Suppressing Oncogenic Kras Expression." *Carcinogenesis*.
- Schneider, Y. et al. 2001. "Resveratrol Inhibits Intestinal Tumorigenesis and Modulates Host-Defense-Related Gene Expression in an Animal Model of Human Familial Adenomatous Polyposis." *Nutrition and Cancer*.
- Scientific, Fisher. 2019. "Multiskan."
- Smith, Gillian et al. 2002. "Mutations in APC, Kirsten-Ras, and P53 - Alternative Genetic Pathways to Colorectal Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Sybr, R T. 2018. "RT 2 Profiler PCR Array Handbook." (November).
- Takahashi, Y. et al. 2014. "Amplification of PVT-1 Is Involved in Poor Prognosis via Apoptosis Inhibition in Colorectal Cancers." *British Journal of Cancer* 110(1):

164–71.

- Tang, Dongxin et al. 2019. “Inhibition of MALAT1 Reduces Tumor Growth and Metastasis and Promotes Drug Sensitivity in Colorectal Cancer.” *Cellular Signalling*.
- Tessitore, Luciana, Annalisa Davit, Ivana Sarotto, and Giovanna Caderni. 2000. “Resveratrol Depresses the Growth of Colorectal Aberrant Crypt Foci by Affecting Bax and P21(CIP) Expression.” *Carcinogenesis*.
- Thanikachalam, Kannan, and Gazala Khan. 2019. “Colorectal Cancer and Nutrition.” *Nutrients*.
- Xiang, Jian Feng et al. 2014. “Human Colorectal Cancer-Specific CCAT1-L lncRNA Regulates Long-Range Chromatin Interactions at the MYC Locus.” *Cell Research*.
- Yang, Weiwei, Rajkumar Ezakiel Redpath, Chongyou Zhang, and Ning Ning. 2018. “Long Non-Coding RNA H19 Promotes the Migration and Invasion of Colon Cancer Cells via MAPK Signaling Pathway.” *Oncology Letters*.
- Yang, Yanfei et al. 2017. “lncRNAs: The Bridge Linking RNA and Colorectal Cancer.” *Oncotarget*.
- Yang, Yongzhi, Peng Junjie, Cai Sanjun, and Yanlei Ma. 2017. “Long Non-Coding RNAs in Colorectal Cancer: Progression and Future Directions.” *Journal of Cancer* 8(16): 3212–25.
- Yoshimizu, Tomomi et al. 2008. “The H19 Locus Acts in Vivo as a Tumor Suppressor.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Yuan, Ji hang et al. 2014. “A Long Noncoding RNA Activated by TGF- $\beta$  Promotes the Invasion-Metastasis Cascade in Hepatocellular Carcinoma.” *Cancer Cell*.

## Teşekkür

Bilgisi ve donanımıyla yüksek lisans eğitimim boyunca yol gösteren, her sorunumu çekinmeden paylaşabildiğim, desteğini ve güvenini hiçbir koşulda esirgemeyen, her durumda yanımda olup motivasyonumu eksik etmeyen, her daim çalışmaya teşvik eden sevgili ve saygıdeğer hocam, **Sn. Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI'** ya,

Tecrübeleriyle ve bilgisiyle her an yol gösteren, her ihtiyaç duyduğumda çekinmeden kapısını çalabildiğim, tüm sorunlarıma ve sorularıma zaman ayırıp çözüm bulabilen, değerli hocam, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Sn. Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'** e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, güleryüzleriyle her zaman destek olan anabilim dalımızın saygı değer hocalarım **Sn. Doç. Dr. Zuhale EROĞLU'** na, **Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'** a, **Sn. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL'** e, **Sn. Doç. Dr. Buket KOSOVA'** ya, **Doç. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ'** a, **Doç. Dr. Aslı TETİK VARDARLI'** ya, **Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER'** e

Eğitimim süresince tecrübelerini paylaşarak yardımcı olan ve neşesini esirgemediğim yol gösteren, **Sn. Arş. Gör. Dr. Duygu AYGÜNEŞ'** e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca, ellerinden gelen gerek akademik gerek sosyal her türlü desteği veren ve motivasyonları ve yardımlarıyla her daim yanımda hissettiğim **Sn. Dok. Öğr. Bakiye GÖKER BAĞCA'** ya ve **Sn. Dok. Öğr. Pınar ÖZATEŞ AY'** a,

Her zaman yardımcı olan başta ekip arkadaşlarım **Sn. Dok. Öğr. Cansu ÇALIŞKAN'** a, **Sn. Dok. Öğr. Fatma SÖĞÜTLÜ'**, **Sn. Dok. Öğr. Vahidreza KARAMAD'**, **Sn. Yük. Lis. Öğr. Ali Haydar KAYGUSUZ** olmak üzere bu tüm eğitimim boyunca birlikte olduğum değerli arkadaşlarım, **Sn. Dok. Öğr. Eda DOĞAN'** a, **Sn. Dok. Öğr. Röya Gasımlı'** ya, **Sn. Dr. Çağla KAYABAŞI'** na, **Sn. Dr. Besra ÖZMEN YELKEN'** e, **Sn. Dok. Öğr. Latife Merve OKTAY'** a, **Sn. Dok. Öğr. Sezgi KIPÇAK'** a, **Sn. Dok. Öğr. Buket ÖZEL'** e, **Sn. Arş. Gör. Zekeriya DÜZGÜN'** e, **Sn. Dok. Öğr. Metin ÇALIŞKAN'** a,

Yüksek lisans eğitimim sırasında birlikte olduğumuz arkadaşlarım **Sn. Çağlar ÇELEBİ'** ye, **Sn. Buşra BARA'** ya, **Sn. İlayda ALÇİTEPE'** ye, **Sn. Zafer YILDIRIM'** a, **Sn. Melike BAYINDIR'** a, **Sn. Mehmet ERASLAN'** a, **Sn. Semahat ÇELİKİTEN'** e,

Laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan çok değerli teknikerimiz **Sn. Hale GÜNDÜZ'** e, her işimize koşturan sekreterimiz **Sn. Bahar BİLGİLİ'** ye, değerli personelimiz **Sn. Ahmet YANYALI'** ya,

Gerek manevi destekleri gerekse dostluklarıyla yüksek lisans eğitimim ve tez dönemim süresince ortak duyguları paylaşıp birbirimize moral verdiğimiz arkadaşlarım **Sn. Alican KUŞOĞLU**'na, Sn. **Eda TAYFUR**'a, **Sn. İlknur KARATEKİN**'e,

Hayatıma girdiği ilk andan itibaren her daim güven duyduğum ve güvenini hissettiğim, birlikte kötü zamanları atlattığımız, iyi zamanlarımızı paylaşarak mutluluğumuzu arttırdığımız, her zaman yanımda olduğunu bildiğim, iyi kalbi ve sonsuz sevgisiyle her an yardımına koşan sevgilim **Sn. Arda TOSUN**'a,

Hayatımın her alanında her an güven ve desteklerini hissettiğim, onlardan dolayı kendimi hep şanslı ve mutlu hissettiğim, üzerimdeki emekleri ve sevgileriyle hayatımda olmazsa olmazlarım, annem **Sn. Seral ÇEŞMELİ**' ye, babam **Sn. Ertuğrul ÇEŞMELİ**'ye, ağabeyim **Sn. Engin Barış ÇEŞMELİ**'ye ve eşi benim de yengemden öte ablam olan **Sn. Deniz KOCABOZ ÇEŞMELİ**'ye,

*Sonsuz teşekkürler...*

İzmir, 29.01.2020

Selin ÇEŞMELİ

## Özgeçmiş

İlkokul ve ortaokulu Agâh Efendi İlköğretim okulunda okuduktan sonra, Bornova Anadolu Lisesi'nde (BAL) ortaöğrenimimi tamamladım. 2013 yılında tam burslu olarak başladığım Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünden 2017 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Yabancı dil olarak İngilizce bilmekteyim.

e-posta:selcesmeli.sc@gmail.com

