



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRE DİZİLERİNDE CCT3 GENİNİ HEDEF ALAN
MİRNA'LARIN TERAPÖTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ebru TEMİZ
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emel ŞAHİN

Gaziantep
2020

BEYAN

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

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (BAPYB) tarafından TF.DT.19.26 proje numarası ile desteklenmiştir.

Ebru TEMİZ

03.11.2020

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmamın bütün aşamalarında bilgi, tecrübe, destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Emel ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Doktora dönemim boyunca önerileri ile bize yol gösteren değerli hocamız Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI'ya, tez çalışmam süresince katkı ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN ve Doç. Dr. İsmail KOYUNCU hocalarıma teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Uzm. Biy. Özgür YÜKSEKDAĞ, Uzm. Biy. Mehmet ENEŞ, İlyas POLAT, Öğr. Gör. Kadir EĞİ ve Rabia MİLLİ'ye teşekkür ederim.

Bugünlere gelmeme vesile olan, beni yetiştirip büyüten, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli AİLEM'e teşekkür ederim.

Tüm sevgisi ve sabrı ile her zaman yanımda ve kalbimde olan değerli EŞİM'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamı yapmam için maddi destek veren Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (BAPYB)'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGE VE KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kanser	5
2.1.1. Kanser Biyolojisi	6
2.1.2. Kanserin Genetik Yapısı.....	7
2.1.2.1. Çoğalma Sinyalinin Sürdürülmesi	7
2.1.2.2. Büyüme Baskılayıcılarından Kaçış.....	8
2.1.2.2.1. Hücre Döngüsü	9
2.1.2.3. Bağışıklık Sisteminden Kaçma	10
2.1.2.4. Hücreölümlüğü Etkinleştirilmesi	11
2.1.2.5. Kansereleşmeyi Destekleyen İnflamasyon.....	11
2.1.2.6. İnvasyon ve Metastazın Aktivasyonu.....	12
2.1.2.7. Anjiyogenezin Tetiklenmesi	12
2.1.2.8. Genetik Kararsızlık ve Mutasyonlar	13
2.1.2.9. Hücreölümlüğü Direnç	13
2.1.2.10. Enerji Metabolizmasını Değiştirme	14
2.2. Şaperonlar	14
2.2.1. CCT3 Geni	15
2.3. Kodlamayan RNA'lar	16
2.4. miRNA (Mikro RNA)	17
2.4.1. miRNA'nın Genomik Organizasyonu.....	18
2.4.2. miRNA'nın Biyogenezi	19
2.4.3. miRNA'nın Fonksiyonları.....	20
2.4.4. miRNA'nın Hedef mRNA ile Eşleşmesi ve Veri Tabanları	21
2.4.5. miRNA'nın Düzenlenmesi	22
2.4.6. miRNA ve Kansere İlişkisi	23

2.4.7. Hsa-miR-24-3p	24
2.4.8. Hsa-miR-128-3p	26
2.4.9. Hsa-miR-149-5p	28
2.5. Apoptozis	30
2.5.1. Apoptoziste Görev Alan Başlıca Mediatorler	32
2.5.1.1. Kaspazlar	32
2.5.1.2. BCL-2 Ailesi (Pro /Anti -Apoptotik Genler).....	33
2.5.1.3. Apoptozis İnhibitör Proteinleri (IAP)	34
2.5.1.4. TP53/TRP53 ve PARP	36
2.5.2. Apoptozis Mekanizmaları	38
2.5.2.1. Mitokondriyal Yolak (Intrinsic Pathway).....	39
2.5.2.2. Ölüm Reseptör Yolu (Extrinsic Pathway)	40
2.5.2.3. Stres Kaynaklı Yolak (ER Pathway)	41
2.5.2.4. Sitotoksik T Lenfosit Aracılı Apoptozis (Perforin/Granzyme pathway) 42	
3. GEREÇ ve YÖNTEM	44
3.1. Hücre Kültürü ve Koşulları.....	45
3.1.1. Sterilizasyon	45
3.1.2. Hücre Kültürü.....	45
3.1.2.1. Besiyerinin Hazırlanması.....	45
3.1.2.2. Hücrelerin Çözülmesi	46
3.1.2.3. Hücre Sayımı	49
3.1.2.4. Hücrelerin Stoklanması.....	49
3.1.2.5. Hücre Ekimi.....	49
3.2. Real Time PCR	49
3.2.1. Total RNA İzolasyonu.....	49
3.2.2. mRNA'dan cDNA Sentezi	50
3.2.3. Real-Time PCR (qPCR-mRNA)	51
3.2.3.1. Primer Tasarımı	52
3.2.3.2. mRNA Real-Time PCR Sonuçlarının Analizi	54
3.2.3.3. Transfeksiyon Öncesi miRNA Ekspresyon Tayini.....	54
3.3. CCT3 geni ile ilişkili miRNA seçimi.....	54
3.4. miRNA (mimik) transfeksiyonu	55
3.4.1. Transfekte hücre soylarından miRNA izolasyonu ve transfeksiyonun doğrulanması	56
3.4.2. miRNA'dan cDNA sentezi.....	57

3.4.3. Real-Time PCR (qPCR-miRNA)	57
3.4.3.1. miRNA primer dizileri.....	58
3.5. Akridin Oranj / Etidyum Bromür (AO/EB) Boyaması	59
3.6. Akım Sitometri Yöntemi ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi	59
3.7. Akım Sitometri Yöntemi ile Hücre Döngüsü Analizi.....	60
3.8. Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü (JC-1)	60
3.9. Hücre İçi Serbest Reaktif Oksijen (ROS) Seviyelerinin Ölçümü	61
3.10. Hücre İçi Serbest Aminoasit Profiline İncelenmesi (LC-MS/MS).....	62
3.11. İstatistiksel Analizler.....	62
4. BULGULAR.....	63
4.1. Farklı Hücre Soylarında CCT3 Profillemesi.....	63
4.2. Akridin Oranj / Etidyum Bromür (AO/EB) Boyaması	65
4.3. Akım Sitometride Apoptotik Hücre Oranları.....	67
4.4. Akım Sitometride Hücre Döngüsü Analizi	70
4.5. Mitokondri Membran Potansiyeli Oranları ($\Delta\Psi_m$).....	72
4.6. Hücre İçi Serbest Reaktif Oksijen (ROS) Seviyesinin Ölçümü.....	74
4.7. Apoptotik Gen Ekspresyonları.....	76
4.8. Hücre İçi Serbest Aminoasit Profiline İncelenmesi.....	79
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	81
6. KAYNAKLAR	88

SİMGE VE KISALTMALAR

AGO	Argonaute
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
AO	Akridin oranj
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
Bç	Baz çifti
bFGF	Basit fibroblast büyüme faktörü
BH	Bcl-2 homoloji bölgesi
CAS	Caspase
CASPASE	Cysteine containing aspartate specific proteases
CCT3	Chaperonin containing tcp1 subunit 3
CDK	Siklin bağımlı kinazlar
CDKI	Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
cDNA	Kalıp DNA
CTL	Sitotoksik T lenfositleri
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dsRNA	Double stranded RNA
EB	Etidyum bromür
ECM	Hücre dışı matriks
EMT	Epitelyal-mezenkimal geçiş
FADD	Fas-iliskili ölüm domain
FASL	FAS ligand
FASR	FAS reseptör
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
HBSS	Hank's balanced salt solutions
IAP	Apoptozis inhibitör proteinleri

IL	Interleukin
KLL	Kronik lenfositik lösemili
LCMS-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi
LncRNA	Uzun kodlanmayan RNA
miRISC	Mirna ile indüklenen susturma kompleksi
miRNA	Mikrorna
MMP	Mitokondriyal membran potansiyeli
mRNA	Mesajcı RNA
ncRNA	Non-coding RNA
NK	Doğal öldürücü
ORF	Open reading frame
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Propidyum iyodür
piRNA	Piwi-etkileşimli RNA
qPCR	Real-time pcr
RB1	Retinoblastoma 1
RISC	Rna-induced silencing complex
RNAi	RNA interference
ROS	Reaktif oksijen seviyesi
RPMI	Roswell park memorial institute
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Küçük müdahaleci rna
TCGA	The cancer genome atlas
TEM	Transmisyon elektron mikroskopisi
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TP53	Tümör proteini 53
TRiC/ TCP-1	T kompleksi protein-1
TSG	Tümör süpresör gen
UTR	Untranslated region
VEGFA	Vasküler endotelyal büyüme faktörü A
XPO5	Exportin 5

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Kanserleşen bir hücrenin gösterdiği özelliklerin şematik gösterimi	7
Şekil 2.2. Hücre döngüsü fazları ve bu fazların kontrolünde rol oynayan siklinler, CDK ve CDKI'nın şematik gösterimi.	10
Şekil 2.3. CCT / TRiC kompleksinin moleküler yapısı	15
Şekil 2.4. CCT3 geninin kromozomda bulunduğu kısım, ekzon ve intron kısımlarının şekilsel gösterimi.	16
Şekil 2.5. Kromozomlar üzerindeki lokasyonlarına göre miRNA'ların sınıflandırılması	18
Şekil 2.6. miRNA Biyogenezisi	20
Şekil 2.7. miRNA-mRNA komplementerliği	21
Şekil 2.8. mRNA'nın etkileşime girdiği uyuşum (seed-matched) dizileri	22
Şekil 2.9. miRNA'nın düzenlemesinde	23
Şekil 2.10. miR-24-3p ikincil yapısı ve CCT3 geni ile uyuşum bölgesi.	26
Şekil 2.11. miR-128-3p ikincil yapısı ve CCT3 geni ile uyuşum bölgesi.	28
Şekil 2.12. miR-149-5p ikincil yapısı ve CCT3 geni ile uyuşum bölgesi.	30
Şekil 2.13. Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ile alınan detaylı apoptotik hücre görüntüsü	31
Şekil 2.14. Başlatıcı/Efektör kaspazlar ve görev aldıkları yollar.	33
Şekil 2.15. Bcl-2 gen ailesi üyeleri.	34
Şekil 2.16. IAP ailesi üyeleri	35
Şekil 2.17. IAP, IAP inhibitörleri ve kaspazların etkileşimi.	36
Şekil 2.18. DNA hasarı veya diğer stres faktörlerinin etkisi ile değişen TP53 gen ekspresyonu.	37
Şekil 2.19. Kaspaz bağımsız hücre ölümü.	38
Şekil 2.20. Apoptozis mekanizmaları.	39
Şekil 2.21. Ölüm Reseptör Yolu	41
Şekil 2.22. ER stresi.	42
Şekil 2.23. Perforin/Granzim Yolağı.	43
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bazı hücrelerin morfolojik görüntüleri	48
Şekil 3.2. Mimik transfeksiyon deney dizaynı.	55

Şekil 4.1. Tüm hücrelerde CCT3 gen profillemesi	63
Şekil 4.2. Transfeksiyon öncesi ve sonrası miRNA'ların ekspresyonları..	64
Şekil 4.3. CRL-2329 hücrelerinin mimik transfeksiyonu sonrası AO/EB boyaması.	66
Şekil 4.4. PC-3 hücrelerinin mimik transfeksiyonu sonrası AO/EB boyaması.	67
Şekil 4.5. CRL-2329 hücrelerinin mimik transfeksiyonları sonrası Annexin-V/PI boyama sonuçları	68
Şekil 4.6. PC-3 hücrelerinin mimik transfeksiyonları sonrası Annexin-V/PI boyama sonuçları	69
Şekil 4.7. CRL-2329 hücrelerinin tüm gruplardaki PI boyama sonuçları.	71
Şekil 4.8. PC-3 hücrelerinin tüm gruplardaki PI boyama sonuçları	72
Şekil 4.9. CRL-2329 hücrelerinin tüm gruplardaki mitokondri membrane potansiyeli ölçümü sonuçları	73
Şekil 4.10. PC-3 hücrelerinin tüm gruplardaki mitokondri membran potansiyeli ölçümü sonuçları	74
Şekil 4.11. CRL-2329 hücrelerinin tüm gruplardaki reaktif oksijen seviyesi ölçümü sonuçları	75
Şekil 4.12. PC-3 hücrelerinin tüm gruplardaki reaktif oksijen seviyesi ölçümü sonuçları.	76
Şekil 4.13. CRL-2329 hücresinde CCT3'ün baskılanmasının apoptotik genler üzerine etkisi.....	77
Şekil 4.14. PC-3 hücresinde CCT3'ün baskılanmasının apoptotik genler üzerine etkisi.	78
Şekil 4.15. CRL-2329 hücresinde serbest amino asit profili	79
Şekil 4.16. PC-3 hücresinde serbest amino asit profili	80

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. miR-24-3p'nin dizilimi ve sap ilmiik şeklini oluşturması.	25
Tablo 2.2. miR-128-3p'nin dizilimi ve sap ilmiik şeklini oluşturması.	27
Tablo 2.3. miR-149-5p'nin dizilimi ve sap ilmiik şeklini oluşturması.	29
Tablo 3.1. Besiyeri kimyasal ve miktarları.	45
Tablo 3.2. Farklı kanser ve normal hücre soyları.....	47
Tablo 3.3. Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımı-1.adım.....	51
Tablo 3.4. Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımı-2.adım.....	51
Tablo 3.5. Gen Primer dizileri.	52
Tablo 3.6. Tasarımı yapılan primerlerin özellikleri.	52
Tablo 3.7. qPCR karışımı.....	53
Tablo 3.8. qPCR Tepkime koşulları.....	54
Tablo 3.9. Revers Transkriptaz PCR karışımı.	57
Tablo 3.10. miRNA qPCR karışımı.	58
Tablo 3.11. qPCR Tepkime koşulları.....	58
Tablo 3.12. miRNA primer dizileri.....	58

ÖZET

ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRE DİZİLERİNDE CCT3 GENİNİ HEDEF ALAN MİRNA'LARIN TERAPÖTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ebru TEMİZ

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Prof. Dr. Emel ŞAHİN

Ekim 2020, 120 sayfa

Moleküler şaperon proteinleri ve hatalı protein katlanması kanser patogeneğinde kritik bir rol oynamaktadır. Ökaryotik şaperonların sekiz alt ünitesinden biri olan CCT3, hücre bölünmesi, proliferasyon ve apoptozis yolağında görevli proteinlerin doğru katlanmasını katalizler. Ayrıca, CCT3 ifadesi karsinogenez ile uyumlu bir biçimde artmaktadır. Bununla birlikte, CCT3'ün kanserleşme sürecine nasıl etki ettiği henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada, CCT3'ün apoptotik yollar ve hücre stresörleri ile arasındaki mekanistik ve fonksiyonel ilişki araştırılmıştır. İlk olarak, 16 farklı hücre hattının CCT3 gen ekspresyonu seviyeleri belirlenmiş ve CCT3 ifadesinin CRL-2329 ve PC-3 hücre hatlarında anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Daha sonra, miR-24-3p, miR-128-3p ve miR-149-5p mimikleri aracılığı ile CRL-2329 ve PC-3 hücre hatlarının CCT3 gen ekspresyonu baskılanmış ve acridin orange/ethidium bromide (AO/EB) ve AnnexinV/PI boyaması, hücre döngüsü ve mitokondri membran potansiyeli (MMP) analizi, hücre içi reaktif oksijen seviyesi (ROS) ölçümü ve apoptotik modülatör gen ekspresyon analizleri ile hücrelerin CCT3 baskılanmasına karşılık gelişen apoptotik yanıtlar ölçülmüştür. CCT3'ün baskılanmasından sonra, hücre döngüsünün G0/G1 fazında tutulduğu, MMP'nin bozulduğu ve hücre içi ROS seviyesinin arttığı görülmüştür. Bu apoptotik akış işaretleri morfolojik görüntülerle, apoptotik genlerin (FADD, CAS8, CAS3, P53, BAX, BCL-2, NOXA, CAS9, APAF1 ve CYCS) istatistiksel olarak artan ifadeleri ile ve hücre içi serbest amino asit profilindeki değişimlerle doğrulanmıştır. Çarpıcı bir şekilde, CCT3'ün baskılanması, enerji metabolizmasında rol alan glutamin, beta-alanin, glisin, serin, asparagin ve sarkozin aminoasit seviyelerinde değişikliğe yol açmıştır. Sonuç olarak, CCT3'ün miRNA mimik transfeksiyonu ile baskılanması, hücre içi ROS homeostazını ve enerji metabolizmasındaki serbest aminoasit profilini değiştirerek apoptozisi tetiklemiştir. Birlikte ele alındığında, CCT3'ün miRNA-aracılı baskılanmasının, ROS-aracılı geleneksel hücre toksisitesi yaklaşımının yanında enerji yoksunluğu etkisiyle “ikili terapötik strateji” sağlayabileceği ön görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: CCT3, Şaperon, miR-24-3p, miR-128-3p, miR-149-5p, Apoptozis

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE THERAPEUTIC EFFECTS OF MIRNAS TARGETING CCT3 GENE IN VARIOUS CANCER CELL LINES

Ebru TEMİZ

Ph.D. Thesis, Department of Medical Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Emel ŞAHİN

October 2020, 120 pages

Molecular chaperone proteins and protein misfolding play a critical role in cancer pathogenesis. CCT3, one of the eight subunits of eukaryotic chaperons, catalyzes the correct folding of proteins involved in cell division, proliferation, and apoptosis pathways. Moreover, CCT3 expression is increased responsively with carcinogenesis. However, how CCT3 drives the cancerous process has not been known. In this study, the mechanistic and functional interactions among CCT3, apoptotic pathways and cell stressors were probed. First, CCT3 expression levels of different 16 cell lines were profiled and CCT3 expressions of CRL-2329 and PC-3 were found to be significantly increased. Then, CCT3 expressions of CRL-2329 and PC-3 lines were suppressed by miR-24-3p, miR-128-3p, and miR-149-5p mimics, and the apoptotic responses of the cell lines to the knockdown of CCT3 were measured by acridine orange/ethidium bromide and Annexin V/PI staining, cell-cycle and mitochondria membrane potential (MMP) analyses, intracellular reactive oxygen species (ROS) measurement and expression levels of the apoptotic gene. After having suppressed CCT3, the cell cycle was arrested in the G0/G1 phase, MMP was impaired, and the intracellular ROS level was increased. These signs of apoptotic flux were corroborated by morphological images, statistically enhanced expression levels of the apoptotic genes (FADD, CAS8, CAS3, P53, BAX, BCL-2, NOXA, CAS9, APAF1, and CYCS), and intracellular free amino acids profile. Strikingly, the suppressed-CCT3 shifted intracellular levels of glutamine, beta-alanine, glycine, serine, asparagine and sarcosine, which are employed in energy metabolism. Consequently, suppression of CCT3 by miRNA mimic transfection spurs apoptosis by unbalancing the homeostasis of intracellular ROS and the profile of free amino acids in energy metabolism. Taken together, it was anticipated that miRNA-mediated inhibition of CCT3 might provide “dual therapeutic strategy” through the conventional ROS-mediated cellular toxicity approach as well as energy withdrawal effect.

Keywords: CCT3, Chaperon, miR-24-3p, miR-128-3p, miR-149-5p, Apoptosis.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hatalı protein katlanması, kanser dahil olmak üzere birçok hastalığın moleküler temelini oluşturmaktadır (1, 2). Hücrelerde protein katlanması, şaperon adı verilen proteinler aracılığıyla gerçekleşir (3). Ökaryotik grup II şaperon TRiC (ayrıca CCT ya da c-cpn olarak da bilinir), sitozolik proteinlerin katlanması ve üç boyutlu yapılarının oluşmasında anahtar rol oynamaktadır (4). CCT/TRiC; CCT1 (α), CCT2 (β), **CCT3 (γ)**, CCT4 (δ), CCT5 (ϵ), CCT6 (ζ), CCT7 (η) ve CCT8 (θ)’den oluşan ve her biri yaklaşık 60 kDa ağırlığında sekiz farklı alt birim içeren arka arkaya iki tane halkadan meydana gelen 16 alt birimli bir komplekstir (5). CCT/TRiC, hücrede yeni sentezlenen polipeptitlerin yaklaşık %15’inin doğru katlanmasında rol oynamaktadır. Tanımlanmış CCT/TRiC substratlarından bazıları; hücre iskelet proteinlerinden α , β ve γ -tubulinler, α ve β -aktinler (6, 7), sinyal proteinlerinden cyclin E (8), cyclin B ve p21ras (9), polo-benzeri kinazlar 1 (Plk1) (10), Von Hippel-Lindau tümör supresör proteini (VHL) (11), cdc20 (12), histon deasetilaz (13) ve STAT3 proteinleridir (14). Ayrıca, CCT/TRiC kompleksinin ifadesi hücre döngüsünün G1/S faz geçişi sırasında artış göstermektedir. (15). Kompleks seviyesinin azaldığı durumlarda hücre proliferasyonunun inhibisyonu, hücre canlılığının azalması, hücre siklusunun durması ve hücrel apoptozis gözlenebilir (16). Tüm bu bulgular, CCT/TRiC kompleksinin hücre döngüsü ilerlemesinde ve tümör gelişiminde rol oynayabileceğini önermektedir (9).

CCT/TRiC kompleksinin alt birimlerinden biri (17) olan CCT3; hücre bölünmesi, proliferasyonu ve apoptozis yollarında görevli proteinlerin doğru katlanmasını katalizler (18, 19). Bununla birlikte, CCT3’ün hücre ölüm yollarını nasıl etkilediği tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, ilk kez mikroRNA (miRNA)-aracılı post-transkripsiyonel mRNA düzenleme stratejisi kullanılarak CCT3 gen ifadesi modüle edilmiş ve bunun hücre sağ kalımına etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda, kısıtlı CCT3 literatüründe önerilen anti-proliferatif etkinin mekanizması gen ve serbest aminoasit seviyesinde ilk kez aydınlatılmıştır. Ayrıca, CCT3’ü hedefleyen tedavi stratejilerinin etkinliği 20 farklı hücre hattında test edilerek, CCT3’ü hedefleyen gelecek kanser terapilerinin etkililiği hakkında önermeler sunulmuştur.

CCT3 literatüründe, bu şaperon proteinin çoğunlukla kanser patogenezinde rol oynadığı vurgulanmıştır (20). CCT3 protein seviyesindeki artışın gelişen ilaç direnci ile doğru

orantılı olduğu belirlenmiş ve hücre içi serbest radikal düzeyi (ROS) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (21). Etki mekanizmasının araştırıldığı çalışmalarda, CCT3' n baskılanmasının hücrelerde mitotik tutuluma neden olduğu ve hücreyi apoptozise yönlendirdiği bulunmuş, ayrıca CCT3' n mitoz sürecinde düzgün mikrotübül-kinetokor etkileşimi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Bununla bağlantılı olarak, CCT3 baskılanmasının kanser hücrelerini mikrotübül destabilize edici bir ajan olan vinkristine karşı duyarlı hale getirdiği tespit edilmiştir (22). Bu bulgular CCT3' n potansiyel bir biyobelirteç ve ifade seviyesi değiştirici-anti-proliferatif ilaç hedefi olabileceği fikrini desteklemektedir.

Bu kapsamda bu çalışmanın amacı, transkripsiyonel gen susturmada yaygın bir biçimde başvurulan miRNA-aracılı mRNA düzenleme yöntemi kullanılarak CCT3 gen ifadesini baskılamak ve bu baskılamanın apoptozis ile ilişkili genler ve hücresel fonksiyonlar üzerine olası etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, dünya genelinde en önemli sağlık problemlerinden biri olup kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm oranı en yüksek olan hastalıktır. 2019 yılı kanser istatistiklerine göre, ABD’de, yaklaşık 1,7 milyon insanda yeni kanser vakası teşhis edilirken kansere bağlı ölüm oranı ise yaklaşık 607 bin olduğu kaydedilmiştir (23). Son on yılda, kanser insidans oranı (2006-2015) kadınlarda değişmezken erkeklerde yıllık yaklaşık % 2 oranında azaldığı ve kanser ölüm oranının (2007-2016) yıllık kadınlarda % 1,4 ve erkeklerde % 1,8 oranında azaldığı raporlanmıştır (23).

Sağlık Bakanlığının verilerine göre, Türkiye’de her yıl ortalama 163 bin kanser vakası görülmektedir. 2015 yılında her 100 bin kadından 177'sine, her 100 bin erkekten 247'sine kanser teşhisi konulduğu ve 2030 yılında yaklaşık 22 milyon yeni vakanın ortaya çıkması öngörülmektedir. Türkiye’de erkeklerde en sık akciğer ve prostat, kadınlarda ise meme kanseri en sık görülen kanser türüdür (hsgm.saglik.gov.tr).

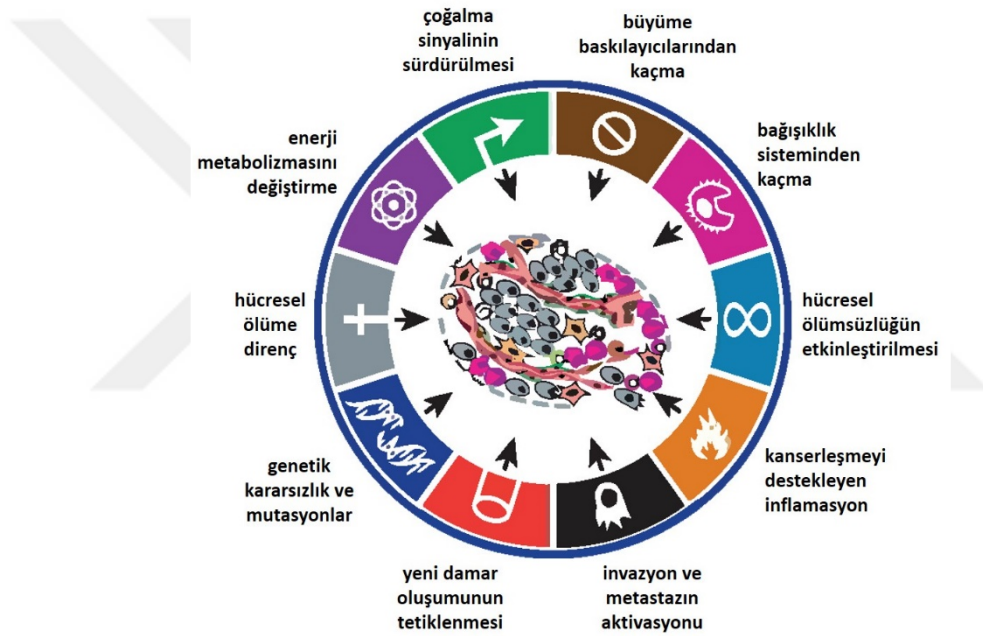
Kanser, hücrelerin hayati fonksiyonlarını düzenleyen mekanizmalarında meydana gelen mutasyonlar sonucu, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması ve yayılması ile oluşan genetik bir hastalıktır (24). Modern anlamda ise “*disease of the genome*”- “genom hastalığı” olarak tanımlamaktadır (25). Normal koşullarda hücreler büyür ve vücudun ihtiyaç duyduğu şekilde yeni hücreler oluşturmak için bölünürler aksi durumda ise hücreler yaşlandığında veya hasar gördüğünde ölürler. Ancak kanser geliştiğinde, bu düzenli süreç bozulur. Hücreler gittikçe daha fazla anormal hale gelir, eski veya hasarlı hücreler ölmeleri gerektiğinde hayatta kalır ve ihtiyaç duyulmadığı halde yeni hücreler oluştururlar. Bu fazla hücreler durmaksızın bölünür ve vücudun diğer bölümlerine kan veya lenf sistemi yoluyla yayılarak orijinal tümörden uzakta yeni tümör oluşumunu tetiklerler (24). Normal hücrelerde meydana gelen değişimler incelendiğinde kansere sebep olan iki ana gen türü - onkogenler ve tümör baskılayıcı genler- tanımlanmıştır (26).

2.1.1. Kanser Biyolojisi

Kanser, genomda bir dizi hatanın birikmesi ile oluşan genetik bir hastalıktır. Bu tür genetik bozukluklar, etkilenen genlerin fonksiyonlarının düzensizliği ile sonuçlanır. Etkilenen bu genler “onkogenler” ve “anti-onkogenlerin-tümör baskılayıcı genler (TSG'ler)” olarak adlandırılmıştır (27). Bu genlerin fonksiyonel düzensizlikleri, onkogenlerin etkinleşmesi veya tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı ile oluşmaktadır (28). Proto-onkogenler, hücrelerin büyüme, çoğalma ve farklılaşma gibi mekanizmalarında işlev gören birçok proteinin sentezinden sorumlu olan genlerdir. Bu genlerin maruz kaldığı nokta mutasyonu, insersiyon, translokasyon veya gen amplifikasyonu gibi genomik değişimler onkogenlerin aktif olmasına sebep olmaktadır (29). Onko-proteinlerin (onkogen ürünleri) ortak özellikleri hücre bölünmesi ve büyümesinin düzenlendiği yolları etkileyerek malignitenin oluşması ve ilerlemesine katkı sağlamaktır. Onkogenlerden bazıları; büyüme faktör reseptörü (EGFR, ERB-B2); G proteinleri (RAS, GSP, GİP); sitoplazmik tirozin kinazlar (SRC, ABL, LCK); Ser/Thr kinazlar (RAF-1 MOS, PİN-1); transkripsiyon faktörleri (C-MYC, FOS, JUN, ERBA-1) olarak tanımlanmıştır (30). 1969'da Knudson ilk olarak sporadik ve kalıtsal retinoblastomların gelişim kinetiklerine dayanarak TSG'lerin varlığını ortaya atmıştır (31). İlerleyen yıllarda ise retinoblastoma 1 (RB1) geninin klonlanmasıyla birlikte karsinogenez için “iki vuruş (two-hit)” modeli açıklanmış ve klasik olarak, TSG'lerin inaktivasyonu sadece genin her iki kopyası da kaybolduğunda fenotipte etkisini göstereceği tespit edilmiştir (32). Kanserde, TSG'nin bir kopyasının inaktivasyonu, genellikle genin geri kalan kopyasının kaybı ve ardından tümör fenotipinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (33). TSG'lerden bazıları; apoptozis/ hücre döngüsü CDKI 2A (sikline bağlı kinaz inhibitörü 2A) (34), TP53 (tümör proteini 53) (35), RB1, TRAF7 ve CASP8; kromatin modifikasyonu (ARID1A/B/2, ASXL1, ATRX, CREBBP, KDM5C, KDM6A, MEN1, MLL2/3, SETD2, TET2, WT1, BAP1); DNA hasarı onarımı (ataksi telanjiektazi mutasyona uğramış [ATM], ataksi telanjiektazi ve Rad3 ile ilişkili [ATR], BRCA1/2, mutL homolog 1 [MLH1] ve MSH2/6; hedgehog (PTCH1); Notch (FBXW7 ve NOTCH1); fosfosinositid 3-kinaz (PI3K) / AKT / rapamisin memeli hedefi (mTOR), (PIK3R1, PTEN ve TSC1); Ras (CEBPA, von Hippel Lindau [VHL] ve NF1); dönüştürücü büyüme faktörü- β (SMAD2 / 4); ve transkripsiyonel düzenleme (GATA3 ve RUNX1) olarak tanımlanmıştır (27).

2.1.2. Kanserin Genetik Yapısı

Kanser gelişimi genellikle genetik mutasyon ve çoklu genlerin anormal ekspresyonu ile ilişkilidir. Kanserleşen bir hücrenin sahip olduğu özellikler, çoğalma sinyalinin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılarından kaçış, bağışıklık sisteminden kaçma, hücresel ölümsüzlüğün etkinleştirilmesi, kanserleşmeyi destekleyen inflamasyon, invazyon ve metastazın aktivasyonu, yeni damar oluşumunun tetiklenmesi, genetik kararsızlık ve mutasyonlar, hücresel ölüme direnç ve enerji metabolizmasını değiştirme olarak sayılabilir. Kanserleşen bir hücrenin gösterdiği özellikler şekil 2.1’de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Kanserleşen bir hücrenin gösterdiği özelliklerin şematik gösterimi.

2.1.2.1. Çoğalma Sinyalinin Sürdürülmesi

Kanser hücrelerinin en temel özelliği, kronik proliferasyonu sürdürme yeteneklerinin olmasıdır (36). Normal hücreler, hücre büyümesi ve bölünme döngüsüne girmeyi ve ilerlemeyi uyaran büyümeyi teşvik edici sinyallerin üretimini ve salınmasını dikkatlice kontrol eder, böylece hücre sayısının homeostazisini ve normal doku fonksiyonunun korunmasını sağlar. Bunun aksine kanser hücreleri, bu sinyallerin kontrolsüzce

salınmasını sağlayarak büyüme ve çoğalmayı sürekli hale getirir (37). Ayrıca kanser hücreleri büyümeyi teşvik edici sinyallerin olmadığı durumlarda dahi bu sinyallerin bağlandığı reseptörlerin mutasyona uğraması ile sürekli bölünme halini devam ettirir. Kanser hücreleri, çoğalma sinyallerini bir dizi alternatif yolla sürdürme kabiliyeti kazanabilir: Bunlardan ilki, kendileri büyüme faktörü ligandları üretebilirler, bu da otokrin proliferatif uyarıya yol açar. Alternatif olarak, kanser hücreleri, kanser hücrelerine çeşitli büyüme faktörleri sağlayarak, tümörle ilişkili stroma içindeki normal hücreleri uyarmak için sinyaller gönderebilir, bu da parakrin proliferatif uyarıya yol açar (37, 38).

2.1.2.2. Büyüme Baskılayıcılarından Kaçış

Kanser hücreleri, büyüme teşvik edici sinyallerini indüklemeye ve sürdürme özelliğinin yanı sıra, hücre proliferasyonunu baskılayıcı genlerden (TSG) kaçma ve hayatta kalma eğilimindedir. En iyi tanımlanmış ve hücre bölünmesindeki görevleri aydınlatılmış TSG'ler RB ve TP53 genleridir ve hücre döngüsünün kontrolü ve düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Her ikisinde hücrelerin çoğalma kararını onaylayan ya da aksi durumda yaşlanma ve apoptotik programları aktive emrini veren merkezi kontrol noktalarıdır (36). RB proteini, çeşitli hücre dışı ve hücre içi kaynaklardan gelen sinyalleri birleştirir ve yanıt olarak, bir hücrenin büyüme ve bölünme döngüsü boyunca ilerleyip ilerlemeyeceğine karar verir (39, 40). RB, büyük ölçüde hücre dışından kaynaklanan etmenlere karşı büyüme baskılayıcı etki gösterirken TP53, hücrenin hücre içi denetim sistemlerinde fonksiyon gösteren stres ve anormallik durumlarında (genom hasarında artış, glikoz veya oksijenasyon yetersizse) koşullar normale dönene kadar hücre döngüsünün ilerlemesini baskılayıcı etki gösterir (41). Ayrıca hücrel kararsızlık devam ettiği sürece TP53, DNA onarım mekanizmasını tetikleyerek hasarın ortadan kalkmasını sağlar aksi durumda ise programlı ölüm yolağını "apoptozis" tetikleyerek hücrenin ölmesi kararını verir (42). Normal hücrede, hücre döngüsü hücre sayısını dengede tutabilmek birçok aşamada kontrol edilir. Kanser hücrelerinde ise bu kontrol noktalarında kritik görevleri olan genlerde meydana gelen mutasyonlar hücre döngüsünün kontrol noktalarından kolaylıkla geçmesini ve hatta hiçbir büyüme teşvik edici sinyaline gerek duymadan döngüyü tamamlamasına sebep olur (35). Böylelikle kanser hücreleri sınırsız bölünme özelliğini kazanmış olur.

2.1.2.2.1. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, bir hücrenin genomunu çoğalttığı, büyüttüğü ve iki yeni hücreye böldüğü olaylar dizisidir. Yaşamın en temel özelliklerinden birini kapsar. Hücre bölünmesinin asıl amacı, bir sonraki kuşağa genetik bilginin doğru ve eksiksiz olarak aktarılmasıdır. Hücre döngüsü genel olarak G1-S-G2 (interfaz) ve mitotik (M) fazlarına ayrılır (43). İnterfaz sırasında hücre, büyüme ve DNA replikasyonu yoluyla bölünmeye hazırlanır. G1 (Gap1) fazı, sitokinezin sonu ile S fazının başlangıcı arasındaki boşluktur. Hücrenin DNA replikasyonu ve yeni oluşacak hücre için gerekli proteinlerin sentezinin yapıldığı ve aynı zamanda bir hücrenin tekrar bölünmesine veya dinlenme fazı G0'a geçmesine karar verildiği fazdır. G1'i DNA sentezi (S) fazı takip eder. S fazı sırasında DNA replikasyonu meydana gelir ve her kromozom birbirine bağlı iki kardeş kromatidden oluşur. G2 fazı, S fazının sonu ile mitoz başlangıcıdır. Bu fazda hücre, RNA ve proteinler gibi mitoz için gerekli proteinleri sentezler ve DNA yoğunlaşarak paketlenir. M fazında kardeş kromatidler hizalanır ve profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere beş mitotik aşamayı geçirdikten sonra sitokinez ile hücrenin bölünmesi tamamlanır. G1, S, G2 evreleri (interfaz) hücre döngüsünün %90'nını kapsar ve 16-22 saat sürer, mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir (44).

Hücre döngüsü, G1/S, S/G2 ve G2/M geçişlerinde kontrol edilerek, hücre döngüsünün ve bölünmesinin kaderi belirlenir. Hücre döngüsünün kontrolü genel olarak protein kinazların fosforillenmesi tarafından kontrol edilir. Kontrolde görevli protein kinazlar; siklinler (siklin D, E, A, B), siklin bağımlı kinazlar (CDK) (CDK4, CDK6, CDK2, CDK1) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) (INK4/ARF; p15^{INK4}, p16^{INK4}, p18^{INK4}, p19^{INK4} ve CIP/KIP; p21^{Cip}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) dir (45).

Siklinlerin, MPF (olgunlaşmayı ilerleten faktör (düzenleyici “siklin” ve katalitik birimden “siklin bağımlı kinaz”)) tarafından periyodik yapım/yıkımları ve ilişkide bulundukları siklin bağımlı kinazların fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlar. Hücre döngüsü ilerlemesini yürüten merkezi makineler, sikline bağlı kinazlardır (CDK'ler). Bunlar DNA sentezini ve mitotik ilerlemeyi teşvik etmek için anahtar substratları fosforile eden serin / treonin protein kinazlardır (46). Hücre döngüsünde, siklin bağımlı kinazlar kendi başlarına bulunduklarında inaktiftir, ancak siklinlere bağlandıklarında etkinleşir ve böylece işlevsel MPF (siklin-CDK) bileşenleri oluşur. CDKI'ler; siklin-

bireylerde aniden artış göstermesi neo-plazilerde bozuk bağışıklık cevabına kanıt olarak gösterilebilir (48). Özellikle, CD8⁺ sitotoksik T lenfositleri (CTL'ler), CD4⁺ T_H1 yardımcı T hücreleri veya doğal öldürücü (NK) hücrelerin geliştirilmesi veya işlevindeki eksikliklerin her biri tümör insidansında belirgin artışa sebep olmaktadır. Ayrıca immün yetmezlik kanser oluşumuna ve tümör görülme sıklığının artmasına neden olabilir (49).

2.1.2.4. Hücresel Ölümsüzlüğün Etkinleştirilmesi

Normal vücut hücrelerinin yaşam döngüsü “büyüme, farklılaşma ve ölüm” üçgeninden oluşurken kanser hücreleri bu kuralı yok sayarak limitsiz bir şekilde çoğalabilme eğilimindedir. Normal hücrelerin yaşam döngüsü sonunda yaşlanması ve yaşlanmaya bağlı ölmesi telomer kısalmasına bağlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar telomerler uzunluğunun hücre ölümsüzlüğü ile orantılı olduğunu göstermektedir (50). Telomerler, birçok ardışık hekzanükleotid tekrarlarından oluşur ve özel bir DNA polimeraz enzimi olan telomeraz tarafından replike edilir (50). Telomeraz enzim etkinliği hücre yaşlanmasına bağlı olarak azalır. Ancak, kanser hücreleri gibi ölümsüz ve sınırsız bölünme kabiliyetine sahip hücrelerde önemli derecede etkin olan bir enzimdir. Kanser hücrelerinde artmış telomeraz aktivitesi hücre yaşlanmasını durdurarak apoptoza karşı direnç geliştirmektedir. Kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesi durdurulduğunda ise telomer boylarında kısalma sonucu yaşlanma ve hücre ölümüne neden olmaktadır (36).

2.1.2.5. Kanserleşmeyi Destekleyen İnflamasyon

İnflamasyon, neoplastik dokunun oluşması için tümör mikro-çevresine biyo-aktif moleküller sağlayarak (büyüme teşvik edici faktörler, hücre ölümünü baskılayıcı sağkalım faktörleri, anjiyogenezi uyarıcı faktörler, anjiyogenezi, istila ve metastazı kolaylaştıran hücre dışı matrisi modifiye edici enzimler) zemin hazırlar. İltihaplanma bazı durumlarda neoplastik ilerlemenin en erken aşamalarında belirgindir ve yeni başlayan neoplazilerin gelişimini, tam gelişmiş kanserlere teşvik edebilir (51). Ayrıca inflamasyonlu hücreler, yakındaki kanser hücreleri için aktif olarak mutajenik olan kimyasalları, özellikle reaktif oksijen türlerini serbest bırakabilir ve yüksek malignite durumlarına doğru genetik değişimleri hızlandırabilir. Bu haliyle, inflamasyon, hücrelerin kanserleşmesine teşvik edici bir özellik olarak düşünülmektedir (36).

2.1.2.6. İnvazyon ve Metastazın Aktivasyonu

Kanser hücreleri, lokal invazyon ve uzak metastaz yapabilmeleri için, hücrelerinin tipik olarak şekillerini, diğer hücrelerle olan bağlantılarını ve hücre dışı matrikse bağlanmalarını (ECM) değiştirerek uyum sağlarlar. Kanser hücrelerine bu süreçte epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve E-cadherin molekülü aracılık eder. İyi tanımlanmış bir hücre-hücre yapışma molekülü olan E-cadherin, tümör baskılayıcı protein olarak fonksiyon görmekle birlikte, tümör hücrelerinde ekspresyonunun kaybı, EMT ile ilişkili olarak, tümör ilerlemesi ve metastazı sırasında sıklıkla görülür (52, 53). Sonuçta ortaya çıkan hücre-hücre yapışma kaybı ve E-cadherinin zayıf hücre bağlantılarının oluşmasına ve hücrelerin primer tümörden ayrılarak çevre dokuları istila etmesine ve uzak bölgelere göç etmesine izin verdiğine inanılmaktadır (54, 55).

EMT; embriyonik gelişim, yara iyileştirme gibi normal biyolojik koşullarda ve kanser ilerlemesi (invazyonu, metastazı ve anjiyogenezi) sırasında olağanüstü bir hücresel plastisite örneği gösterir (56). Epitel hücrelerinin komşu hücrelere bağlantılarını gevşettiği, apiko-basal polariteyi kaybettiği ve invazyon-metastaz kaskadının ilk adımını oluşturduğu dramatik hücresel değişiklikleri içerir (57). EMT'nin göstergesi olarak birçok molekül tanımlanmış ve bunlardan en önemlisi E-cadherin'dir. E-cadherin en iyi bilinen epitel hücre belirtecidir ve EMT sürecinde çoğunlukla az ifade edilmektedir. Hücrelerde E-cadherin azalması, epitel hücrelerin göç kapasitesi kazanması ile doğrudan ilişkilidir. Mezenkimal hücre belirteçlerinden olan Snail, Slug, ZEB1, Twist, Vimentin ve fibronektin; E-cadherin ifadesini baskılayarak hücrelere esnek bir yapı kazandırır ve hücre göçüne zemin hazırlar. Kanser hücreleri uzak doku ve organlara göç etmek için EMT'yi aktifleştirdiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca kanser tedavisi için EMT'nin baskılanmasının oldukça önemli olduğu önerilmiştir (58).

2.1.2.7. Anjiyogenezin Tetiklenmesi

Anjiyogenez ya da vaskülojenez, fizyolojik bir süreç olup var olan kan damarlarından tomurcuklanma yolu ile yeni kapiller damar oluşumu veya tümör hücrelerinin yeni damar oluşturması olarak tanımlanabilir. Büyüme/gelişme, yara iyileşmesi ve menstirüyal döngüsü gibi birçok fizyolojik süreç için normal bir mekanizma olan anjiyogenez, sedef hastalığı, diyabetik retinopati ve kanser gibi patolojik durumlarda da görülür. Tümör oluşumunda her oluşan yeni damar hayati öneme sahiptir, çünkü kanser hücrelerinin

çoğalması, metastatik yayılması, yeterli miktarda oksijen ve besin kaynağına ve hatta atık ürünlerin çıkarılmasına bağlıdır (59). Anjiyogenez hem aktivatör hem de inhibitör molekülleri tarafından düzenlenir. En iyi bilinen pro-anjiyogenik faktörler: Vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGFA), basit fibroblast büyüme faktörü (bFGF), anjiyojen, dönüştürücü-transforming büyüme faktörü (TGF)- α , TGF- β , tümör nekroz faktörü (TNF)- α 'dır. Anti-anjiyogenik faktörler ise: Anjiyostatin, angiopoietin-2, endostatin, interferon, trombosit faktörü 4, thrombospondin-1 (TSP-1), -2 (TSP-2), prolaktin, Interleukin-1 (IL-1), -4 (IL-4), -12 (IL-12), fibronectin , metalloproteinase inhibitor (TIMPs) olarak tanımlanmıştır (60). Anjiyogenik aktivatör ve inhibitör faktörleri arasındaki denge bozulduğunda invazyon ve metastaz kapasitesinde artışa neden olmaktadır. Kanser tedavi stratejileri arasında anjiyogenezin baskılanması ve tümör büyüme durdurucu yeni ilaçlar kullanılmaktadır (60).

2.1.2.8. Genetik Kararsızlık ve Mutasyonlar

Normal bir hücrenin kanserleşmesi, büyük ölçüde neoplastik hücrelerin genomlarında meydana gelen mutasyonlara bağlıdır. Buna göre, çok aşamalı tümör progresyonu, etkin bir mutant genotipin elde edilmesiyle tetiklenen bir dizi klonal artış olarak ifade edilebilir (36). Kalıtsal fenotipin oluşması, mutajenik ajanların yanı sıra tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalara da bağlıdır (61). Genomik kararlılık, DNA hasarını tespit etme ve çözme yeteneği sayesinde, her oluşan yeni hücreye aktarılabilecek DNA'nın mutasyon oranının çok düşük olmasını sağlar (34). Kanser hücreleri tümör oluşumunu düzenlemek için gerekli olan mutant genlerini elde ederken, sıklıkla mutasyon oranlarını artırır ve hücrelerde genomik kararsızlığı tetikler. Bu durum kritik genlerde mutajenik maddelere karşı artan duyarlılık ve DNA onarım sisteminde (örn.TP53- genom bekçisi) bir veya daha fazla hatanın oluşması ile meydana gelmektedir. Ayrıca bu süreçte yaşlanma ve apoptozisten kaçış gibi denetim mekanizmalarından taviz verilerek mutasyon birikimi sağlanır (62).

2.1.2.9. Hücresel Ölüme Direnç

Apoptoz ile hücre ölümünün programlanması, kanser gelişimine doğal bir engel teşkil etmektedir. Kanser hücreleri, DNA onarım mekanizmasının asıl sorumlusu olan TP53'ün

etki mekanizmasını ortadan kaldırarak apoptozise karşı direnç geliştirir (63). Bu şekilde hasarlı DNA'ya sahip sınırsız çoğalma kapasitesiyle sağ kalım sürelerini uzatarak kontrolsüz hücre bölünmesini devam ettirirler (64).

2.1.2.10. Enerji Metabolizmasını Değiştirme

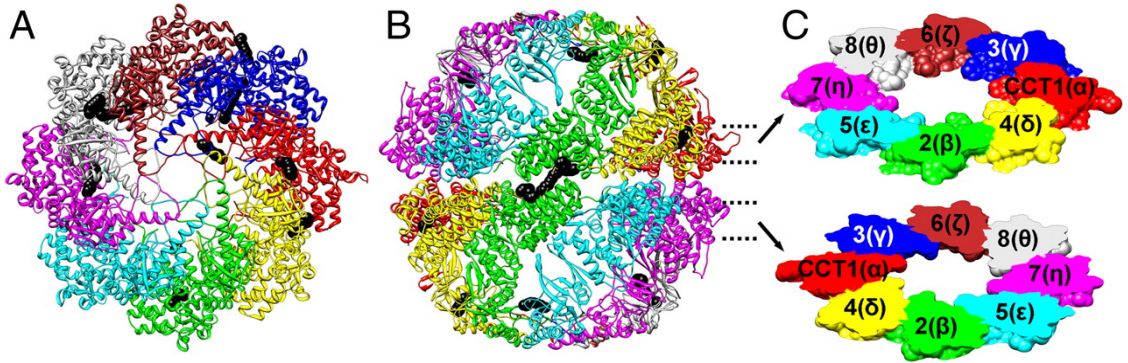
Neoplastik hastalığın temelini oluşturan kronik ve sıklıkla kontrolsüz hücre proliferasyonu, sadece hücre çoğalmasının düzensiz kontrolünü değil, aynı zamanda hücre büyümesi ve bölünmesini hızlandırmak için enerji metabolizmasının ayarlamasını içerir. Aerobik koşullar altında, normal hücreler glikozu sitozolde glikoliz yoluyla ve daha sonra da mitokondride enerjiye dönüştürür; anaerobik koşullar altında ise, glikoliz tercih edilir ve mitokondriye nispeten daha az gönderilir. Otto Warburg'a göre kanser hücresinin enerji metabolizması, oksijenin varlığında glikoz metabolizmasını yeniden düzenleyerek enerji üretimini glikoliz yoluyla sınırladığını açıklamış ve bu mekanizmayı "aerobik glikoliz" olarak isimlendirmiştir (65).

Kanser hücrelerinin enerji metabolizmasını yeniden programlaması oksijenin varlığında/yokluğunda tek enerji üretim sistemini tetikleyerek hayatta kalmasına ve gerekli enerjiyi üretmesine olanak sağlamaktadır. Kanser hücrelerinin oksijenin varlığında sadece glikoliz yolağını tercih etmesi, mitokondriyal oksidatif fosforilasyona göre yaklaşık 18 kat daha az ATP verimliliği mantıksız gelse de kanser hücreleri enerji verimini arttırmak için glikoz taşıyıcılarından olan GLUT1'i aşırı ifade ederek glikozun sitoplazmaya geçişini artırır (65). Glikolize dayalı bu enerji metabolizmasına "Warburg etkisi" denilmektedir.

2.2. Şaperonlar

Moleküler şaperonlar, proteinlerin katlanmasını kolaylaştıran veya polipeptitleri stabilize ederek hatalı katlanmalarını engelleyen protein ailesidir (66). Proteinler, çok yönlü ve yapısal olarak karmaşık biyolojik makromoleküller olup hemen hemen tüm biyolojik süreçlere dahil olmaktadır. Memeli hücreleri tipik olarak, ribozomlar üzerinde sentezlenen 200.000 farklı protein türünü eksprese ettiği bilinmektedir (2). Bu proteinlerin fonksiyonel olması için "native state-ilk hal" yapılarının üç boyutlu (3D) hallerine katlanması gerekmektedir (2). Protein katlanması ve proteom bütünlüğünün

korunması (proteostaz) şaperonların karmaşık ağına bağlıdır (67). Şaperonlar, protein katlanması sırasında eksik veya yanlış katlanmış proteinlerin belirlenmesi, onların tutulması ve daha sonra kendiliğinden yeniden katlanması için serbest bırakılması veya ortadan kaldırılması için moleküler makineler olarak iş görmektedir (68). Ökaryotik grup II şaperon TRiC (ayrıca CCT ya da c-cpn olarak da bilinir), sitozolik protein katlanması ve üç boyutlu yapısını kazanmasında hayati rol oynamaktadır (Şekil 2.3)(4)(69) . CCT/TRiC; CCT1 (α), CCT2 (β), **CCT3 (γ)**, CCT4 (δ), CCT5 (ϵ), CCT6 (ζ), CCT7 (η) ve CCT8 (θ)’den oluşan ve her biri yaklaşık 60 kDa ağırlığında sekiz farklı alt birim içeren arka arkaya iki tane halkadan meydana gelen 16 alt birimli bir komplekstir (5). CCT/TRiC, hücrede yeni sentezlenen polipeptitlerin yaklaşık %15’inin doğru katlanmasında rol aldığı bilinmektedir. Tanımlanmış CCT/TRiC substratlarından bazıları; hücre iskelet proteinlerinden α , β ve γ -tubulinler, α ve β -aktinler (6, 7), sinyal proteinlerinden cyclin E (8), cyclin B ve p21ras (9), polo-benzeri kinazlar 1 (Plk1) (10), von Hippel-Lindau tümör supressor proteini (VHL) (11), cdc20 (12), histon deasetilaz (13) ve STAT3 proteinleridir (14). Ayrıca, CCT/TRiC kompleksi hücre döngüsünün G1/S faz geçişi sırasında (15), hücre proliferasyonunun inhibisyonunda, hücre canlılığının azalmasında, hücre döngüsünün durmasında ve hücrel apoptozisin tetiklenmesinde oldukça önemli olduğu gösterilmiştir (16).

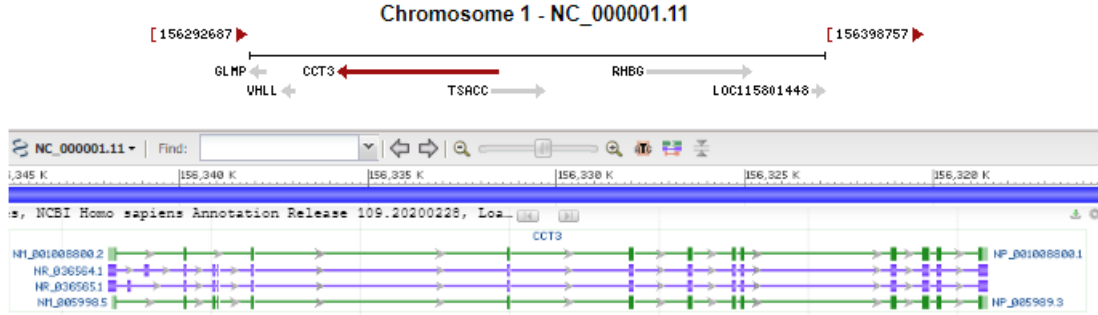


Şekil 2.3. CCT/TRiC kompleksinin moleküler yapısı (69).

2.2.1. CCT3 Geni

CCT3 geni (CCTG; PIG48; TRIC5; CCT-gamma; TCP-1-gamma) 1. kromozomun p kolunda, NC_000001.11 (NC_000001.11 chromosome 1 reference GRCh38.p13 Primary

Assembly) sürümü kullanılarak 156292687-156398757 bölgeleri arasında bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 2.4.) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/CCT3>).



Şekil 2.4. CCT3 geninin kromozomda bulunduğu kısım, ekzon ve intron kısımlarının şekilsel gösterimi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/CCT3>).

CCT3, hücrel proteostazisin korunmasında merkezi rol oynayan moleküler şaperon CCT/TRiC kompleksinin alt birimlerinden biridir (17). CCT3; hücre bölünmesi, proliferasyonu ve apoptozis yollarında görevli proteinlerin doğru katlanmasını katalizleyen bir şaperon proteindir (18, 19).

2.3. Kodlamayan RNA'lar

İnsan genom projesi sonucuna göre, genomun yaklaşık %2'lik kısmı protein kodlayan gen bölgelerini oluştururken diğer kısımlarının protein kodlamayan bölgeler olduğu tespit edilmiş ve bu bölgeler “çöp (junk) DNA” olarak isimlendirilmiştir. Amerikan Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü (The National Human Genome Research Institute, NHGRI), 2007 yılında insan genom dizisinde tüm fonksiyonel kısımlarını belirlemek için, ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements Project) projesi adında bir kamu araştırma konsorsiyumu başlattı (70). Bu projenin amacı, insan genomunun %98'ini oluşturan ve kodlanmayan RNA (noncoding-RNA) olarak adlandırılan bu bölgelerin tanımlanmasıdır. İlk başlarda yardımcı moleküller olarak bilinen nc-RNA'lar, ökaryotik hücrelerin moleküler mekanizmalarının düzenlenmesinde kritik rollerinin olduğu gösterilmiştir. Bu RNA molekülleri, karmaşık üçüncül yapıları nedeniyle proteinlerin belirli bölgelerine bağlanarak onların fonksiyonel olarak düzenlenmesinde rol oynayan çok yönlü moleküllerdir. Dahası, farklı proteinler ile ribo-kompleks oluşturarak veya özel

DNA-RNA dizilimlerine bağlanarak birçok farklı moleküler yolakda gen ifadesinin düzenlenmesinde görev alırlar (71). Nc-RNA'lar incelendiğinde, normal hücrelerde birçok moleküler olaylarda etkin rol (gelişimsel olarak düzenlenme) oynadığı ve X-inaktivasyonu, kromatin yapısal düzenleme, kromozom organizasyonu, genomik imprinting (damgalanma) ve DNA/histon metilasyonu, embriyonik gelişim, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen ifadesinin düzenlenmesinde işlevlerinin olduğu bildirilmiştir (72). Tanımlanmış bazı nc-RNA'lar; miRNA (MikroRNA), siRNA (Küçük Müdahaleci RNA), lncRNA (Uzun kodlanmayan RNA) ve piRNA(Piwi-etkileşimli RNA)'lardır (73).

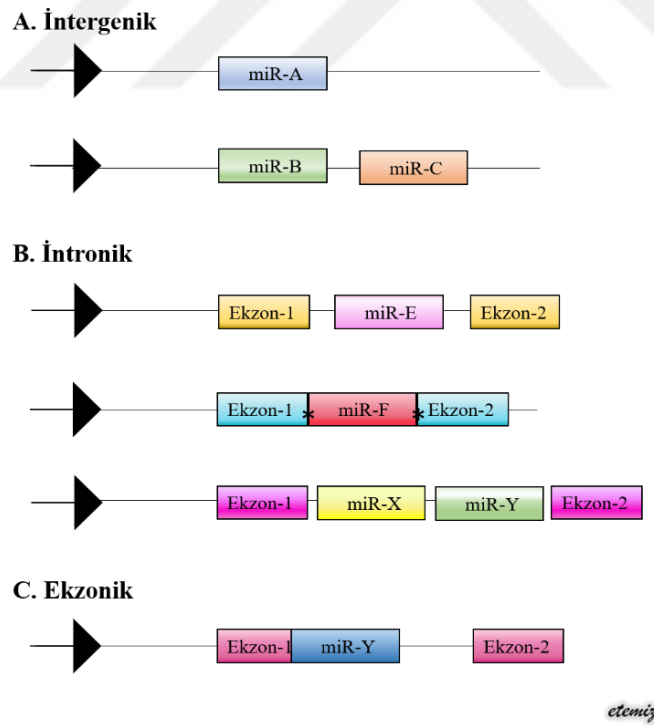
2.4. miRNA (Mikro RNA)

miRNA, 1993 yılında iki bağımsız grup tarafından yürütülen çalışmada toprak solucanın (*Caenorhabditis elegans*)'da gen ekspresyonunun transkripsiyonel düzenleyicisi olarak keşfedilmiştir (74-78). Yapılan çalışmalarla yüzlerce miRNA, virüs, bitki ve hayvanlarda tanımlanmış ve bu sayı her geçen gün artmaktadır (76, 79-87). miRNA'lar 18-24 nükleotit uzunluğunda, protein kodlamayan tek iplikçikli RNA molekülleridir. miRNA'lar transkripsiyon sonrası salınan RNA moleküllerinin işlenmesi sonucu oluşur ve post-transkripsiyonel modifikasyonda görev yapmaktadır. Dahası; miRNA'lar embriyogenez, organogenez, gelişme, hücre farklılaşması, sağkalım, hücre ölümü I (apoptozis), hücre ölümü II (otofaji), hücre yaşlanması, metabolizma gibi çeşitli biyolojik olayların kontrolünde de görev aldıkları yapılan çalışmalar ile bulunmuştur (88-90). Hücre tipi ve fonksiyonuna göre miRNA'ların birçok hedef mRNA'sı olduğu artık bilinmektedir (91, 92). Böylelikle insan mRNA kütüphanesinin (transkriptom) neredeyse yarısı miRNA'lar tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. miRNA-mRNA etkileşiminin araştırıldığı bazı çalışmalara göre miRNA'ların, hedef mRNA'nın sıklıkla 3'UTR (translasyon olmayan-un-translated region) bölgesine bağlanarak mRNA'nın yıkılmasına veya translasyonel olarak baskılanmasına sebep olduğu bildirilmiştir (93). Ancak son yıllarda yapılan çalışma sonuçlarına göre miRNA'lar mRNA'ların farklı bölgelerine bağlanıp, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki özelliğine göre tümör baskılayıcı veya onkogenik özellik kazanabildiği raporlanmıştır. Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu miRNA'ları "tümör baskılayıcı miRNA'lar" olarak isimlendirilmiştir. Bu miRNA'ların fonksiyonları araştırıldığında ekspresyonlarının

azalması hedefledikleri onkogenin ekspresyonunun artışına sebep olarak tümör oluşumunu tetikledikleri tespit edilmiştir (89, 94-96). Bunun tersi fonksiyon gösteren miRNA'lar ise, “onko-mir” olarak isimlendirilmiş ve bu grupta yer alan bazı miRNA'lar incelendiğinde kanser gelişiminde etkin rol oynadıkları bulunmuştur. Ayrıca bu miRNA'lar bir tümör baskılayıcı genin baskılanmasını sağlayarak kanserleşmeyi arttırdığı bildirilmiştir (94-96).

2.4.1. miRNA'nın Genomik Organizasyonu

miRNA'lar kromozomlar üzerinde tek tek veya kümelenmiş olarak konumlanmıştır. Bu durum miRNA'ların gen ifadelerini ve hücre için fonksiyonlarını etkilemektedir (74, 80, 85, 97). miRNA genleri tüm kromozomlarda (Y kromozomu hariç) dağınık halde yerleşik (97) olup yaklaşık yarısı polisistronik olarak transkripsiyona uğradıkları tespit edilmiştir (97, 98). Kromozomlar üzerindeki lokasyonlarına göre; intergenik, ekzonik ve intronik olarak sınıflandırılmaktadırlar (Şekil 2.5.) (99).



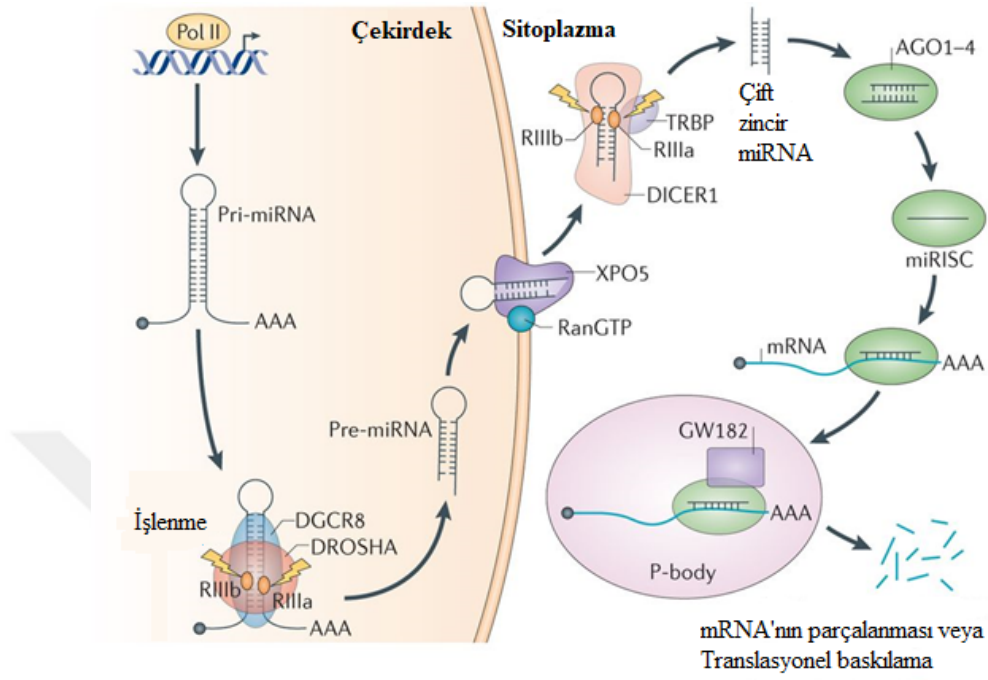
Şekil 2.5. Kromozomlar üzerindeki lokasyonlarına göre miRNA'ların sınıflandırılması. **A.** İntergenik miRNA'ların genomik bölgelerdeki yerleşimi. **B.** İntronik miRNA'lar, ekzon aralarında bir veya daha fazla sayıda bulunmaktadır. **C.** Ekzonik miRNA'lar, diğer

yerleşim bölgelerine göre çok daha nadirdir ve çoğu zaman bir ekzonik bölgede bulunmaktadır (99, 100).

2.4.2. miRNA'nın Biyogenezi

MiRNA'lar kodlamayan RNA ailesinden olup, mRNA'ların 3'UTR dizilerine bağlanarak mRNA'ların parçalanması veya translasyonel olarak baskılanması şeklinde görev alırlar (91, 101). miRNA genlerinin %30'nun ekspresyonları intronik bölgelerde olurken yarısında fazlasının ekspresyonları miRNA'ların bulunduğu gen lokuslarından sentezlenmektedir (90). MiRNA genlerinin çoğunluğu, çekirdekteki RNA polimeraz II (Pol II) tarafından sentezlenir (DNA polimeraz III tarafından sentezlenen miRNA'larda tanımlanmıştır) (Şekil 2.6.) (102, 103). İlk sentezlenen miRNA'lar, primer (pri-miRNA'lar) olarak sentezlenir (yaklaşık 1kb'dan daha uzun) ve 5' ucuna 7mG şapkası, 3' ucunda poliA kuyruğu eklenerek enzim yıkımından korunur (91, 101, 104-106). Bu ilk transkriptten tek bir miRNA yada ortak bir birincil transkriptten işlenen iki veya daha fazla miRNA sentezlenmektedir (101). Dahası, uzun pri-miRNA'lar, RNaz III enzim ailesine üye olan Drosha ve bu enzimin esas kofaktörü, çift sarmallı RNA (dsRNA-double stranded RNA) bağlayıcı protein DGCR8 (DiGeorge Syndrome critical region 8) tarafından işlenir (107-109). İki adet RNAaz III (IIIa ve IIIb) domaini içeren Drosha enzimi, her biri yaklaşık 60-70 bç uzunluğunda firkete (saç tokası) şeklinde öncül RNA (pre-miRNA)'ların oluşmasını ve 3' ucunda bir çıkıntıya sahip olmalarını katalizler (107, 108, 110, 111). Sonrasında bu pre-miRNA'lar Ran-GTP bağımlı bir protein olan exportin 5 (XPO5) tarafından sitoplazmaya taşınır (112-114). Sitoplazmaya geçen pre-miRNA ileri işlenme basamağı için, Dicer1 (endonükleaz) enzimi tarafından kesilir ve tam komplementer olmayan yaklaşık 20-21 baz uzunluğunda miRNA/miRNA dubleksleri oluşturur (115). Dicer1 enzimi ayrıca TRBP (Transactivation- responsive RNA-binding protein) ile ilişkilidir. Pre- miRNA'ların işlenmesinde ve miRNA ile indüklenen susturma kompleksinin (miRISC) oluşmasında, Dicer'in Argonaute proteinleri (AGO1, AGO2, AGO3 veya AGO4) ile fiziksel olarak köprülenmesinde görev yapmaktadır (116-118). Memelilerde AGO2 proteini oldukça güçlü RNaz benzeri endonükleaz aktiviteye sahiptir ve pre-miRNA'nın işlenmesinde Dicer1 enzimi ile birlikte çalıştığı düşünülmektedir (109, 119). miRNA/miRNA dubleksinin, bir zinciri işlevsel diğeri ise rehber olarak isimlendirilir ve TRBP, Dicer ve AGO 1-4 enzimleri yardımıyla hangi miRNA zincirinin miRISC'e aktarılacağı bu enzimler tarafından belirlenir (89, 101). Bu enzimlerin aktarılabilecek olan miRNA zincir seçimi ise zincirlerden 5'ucu daha kararlı olanın seçilmesi

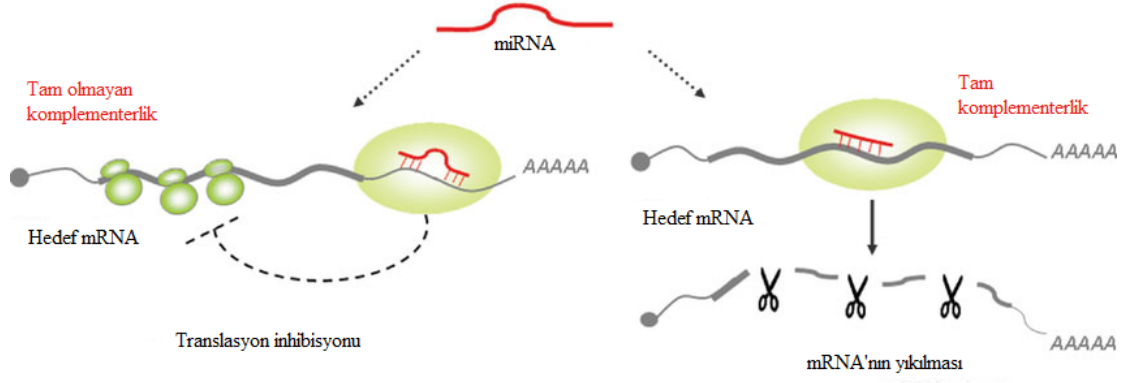
yönündedir (102, 109, 118). MiRISC kompleksi hedef mRNA ile eşleşme sağlayarak transkripsiyonel veya post-translasyonel modifikasyonda işlev göstermektedir (101).



Şekil 2.6. miRNA Biyogenezi (102,103).

2.4.3. miRNA'nın Fonksiyonları

Olgun miRNA'ların fonksiyonel olarak aktivite göstermesi hedef mRNA ile olan dizi komplementerliğine bağlı olarak değişiklik gösterir (120). Olgun miRNA'nın miRISC kompleksine eklenmesiyle, mRNA'nın hücre içi fonksiyonunu etkileyerek ilgili genin protein traslasyonunun engellenmesine yada mRNA'nın yıkılmasına neden olmaktadır (120). MiRNA- mRNA etkileşimi (Şekil 2.7.), mRNA'nın 3'UTR, ORF(open reading frame) veya 5'UTR bölgelerine tam olmayan komplementerlik translasyonun baskılanmasına veya bu etkileşim tam komplementerlik göstermesi halinde ise miRISC/Ago-2 enzim aktivitesi ile mRNA'nın yıkılmasına sebep olmaktadır (121, 122).

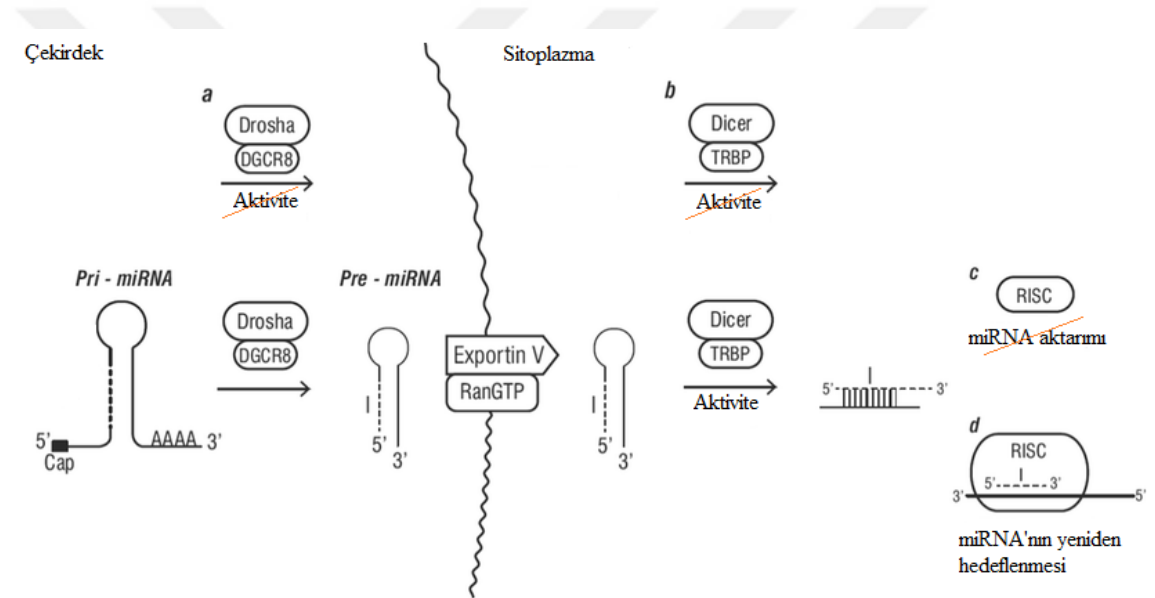


Şekil 2.7. miRNA-mRNA komplementerliği (123).

2.4.4. miRNA'nın Hedef mRNA ile Eşleşmesi ve Veri Tabanları

MiRNA hedef mRNA'ya standart olmayan baz çifti ile etkileşime girer (92). MiRNA'ların 5' nükleotid bölgeleri oldukça korunmuş ve 2-7 pozisyonunda (yaklaşık 6-7 nükleotid) hedef mRNA'ya bağlanmada oldukça önemlidir (97). MiRNA ile hedef mRNA'nın etkileşime girmesi için dört çeşit uyuşum (seed-matched) dizisi vardır ve bu diziler 6mer, 7mer-m8, 7mer-A1 ve 8mer olarak isimlendirilmiştir (Şekil 2.8.A) (124-126). 6mer dizi, miRNA uyuşum bölgesinde 6 nükleotidlik mükemmel eşleşme, iki tip 7mer dizisi içinde en iyi tanımlanmış 7mer-m8 dizisi 8. nükleotid pozisyonunda eşleşme sağlarken ,diğer etkili 7mer dizisi ise 7mer-A1 dizisi olup miRNA'nın 1. pozisyonunda bulunan Adenin nükleotidi ile eşleşme yapmaktadır (91, 92, 127). Son uyuşumlu dizi olan 8mer dizisinde de 8.pozisyonda eşleşmenin yanısıra 1. pozisyonda bulunan Adenin nükleotidi ile eşleşme yaptığı bilinmektedir (91, 92, 126, 128). Yapılan araştırmalar ve elde edilen bulgular doğrultusunda bu gruplar genişletilmiş ve yeniler eklenmiştir (Şekil 2.8.B). Bu uyuşum dizilerinden olan Offset 6mer dizisi miRNA'nın 5'ucunun 3. veya 8. nükleotidleriyle eşleşme yapmaktadır (129). Bu dizilerin uyuşum etkililiği hiyerarşisine bakıldığında; 8mer> 7mer-m8> 7mer-A1> 6mer olarak sıralanmaktadır (128, 130). Ayrıca çok sık rastlanmayan miRNA'ların yaklaşık %4'ünde görülen alışılmamış 3'ucunda 6-8 nükleotid bölgesine ek olarak (13-16 pozisyonlarında) Watson-Crick eşleşmesi yapmaktadır (127, 131). Bir diğeri ise 3' ucunda yine 13-16 pozisyonlarında

işlenmesine benzer olarak düzenlenir (109). mRNA'ların yapısal düzenine benzer şekilde miRNA genlerinde promotor bölgeleri (CpG adacıkları), korunmuş dizileri (TATA kutusu), enhancer ve baskılayıcı elementlere sahiptir (109). miRNA genlerinde yapısal değişiklikler ve uğradıkları modifikasyon tipine göre hücre ve dokularda gösterdikleri etkileri değişmektedir. Promotor bölgesinde yer alan CpG adacıklarının metilasyon paterni miRNA'nın hücre içi fonksiyonu ve ekspresyonunu değiştirmektedir (135). MiRNA'nın hücresel fonksiyonlarının düzenlenmesinde birçok kontrol basamağı ile denetlenmektedir. Olgun miRNA oluşum sürecinde görevli enzimlerin (Drosha, Dicer, exportin-5, Ago1-4 vs.) aktivitelerinin düzenlemesi ilgili miRNA'nın ekspresyonunu artırıcı veya azaltıcı yönde değiştirmektedir (Şekil 2.9.) (136).



Şekil 2.9. miRNA'nın düzenlenmesi (136).

2.4.6. miRNA ve Kanser İlişkisi

miRNA'ların, hücre proliferasyonu başta olmak üzere birçok biyolojik süreçte etkili oldukları bilinmektedir. Bugüne kadar tanımlanmış miRNA'ların birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (137). Kanseri hücrelerinde düzensiz ifade edilen miRNA'lar, hücrenin proliferasyonu (138), farklılaşması (137) ve apoptozisin (139) düzenlenmesin, metastaz (140) ve anjiyogenezis mekanizmalarında görev

yaptıkları bilinmektedir (141). Bu şekilde miRNA'ların düzensiz ifade edilmesi; kromozom delesyonları, onko-miRNA'ların aşırı ekspresyonu, miRNA'nın bulunduğu bölgedeki mutasyonlar, epigenetik baskılanmalar, hedefe özel miRNA'ların transkripsiyon faktörlerindeki düzensizlikler gibi çeşitli mekanizmalarla kanser gelişimini tetikledikleri gösterilmiştir (142, 143).

Kanserleşme sürecine miRNA'ların katkıda bulunduğunun ilk kanıtı, 2001 yılında kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalarında yapılan bir çalışma ile gösterilmiş ve KLL hastalarının %68'inde miR-15-a ve miR-16-1 ekspresyonlarının farklılığı tespit edilmiştir (144). miRNA'ların kanser patogenezindeki rollerini belirlemek için yapılan çalışmalar hız kazanmış ve kanser hücrelerinde miRNA ekspresyonu, normal hücrelere kıyasla düzensiz olduğu belirlenmiştir (145). Örneğin, meme kanserinde (146), burkitt's lenfomada (147), malign beyin tümörlerinde (148), tiroid kanserinde (149), akciğer kanserinde (150), prostat kanserinde (151) ve hepatosellüler karsinomda (152) kanser ve normal doku ve/veya miRNA ekspresyonları arasında farklılıklar bulunmuştur.

miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak sınıflandırılmıştır (153, 154). Onkogen mRNA'ların ekspresyonlarını kontrol eden ve düzenlenmesinde görevli miRNA'lara "tümör baskılayıcı", (örneğin; miR-145 (155), let-7 ailesi (156) ve miR-205 (157)) bunun tersi mekanizmayla çalışarak hücrelerin kanserleşmesine sebep olan miRNA'lara ise "onko-miR" (örneğin; miR-221/222 (158), miR-27a (159) ve miR-21 (160, 161) olarak isimlendirilmiştir (162).

2.4.7. Hsa-miR-24-3p

MiR-24, miR-189, miR-24-1 ve miR-24-2 kümesine ait olup 9. kromozomun q kolu (9q22.32) ve 19. kromozomun p kolundan (19p13.12) sentezlenmektedir. Tablo 2.1'de miR-24-3p'nin dizilimi verilmiştir.

miR-24-3p'nin ikincil yapısı (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) ve CCT3 geni ile uyum bölgesi (<http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/starmir.pl>) Şekil 2.10'da gösterilmiştir.

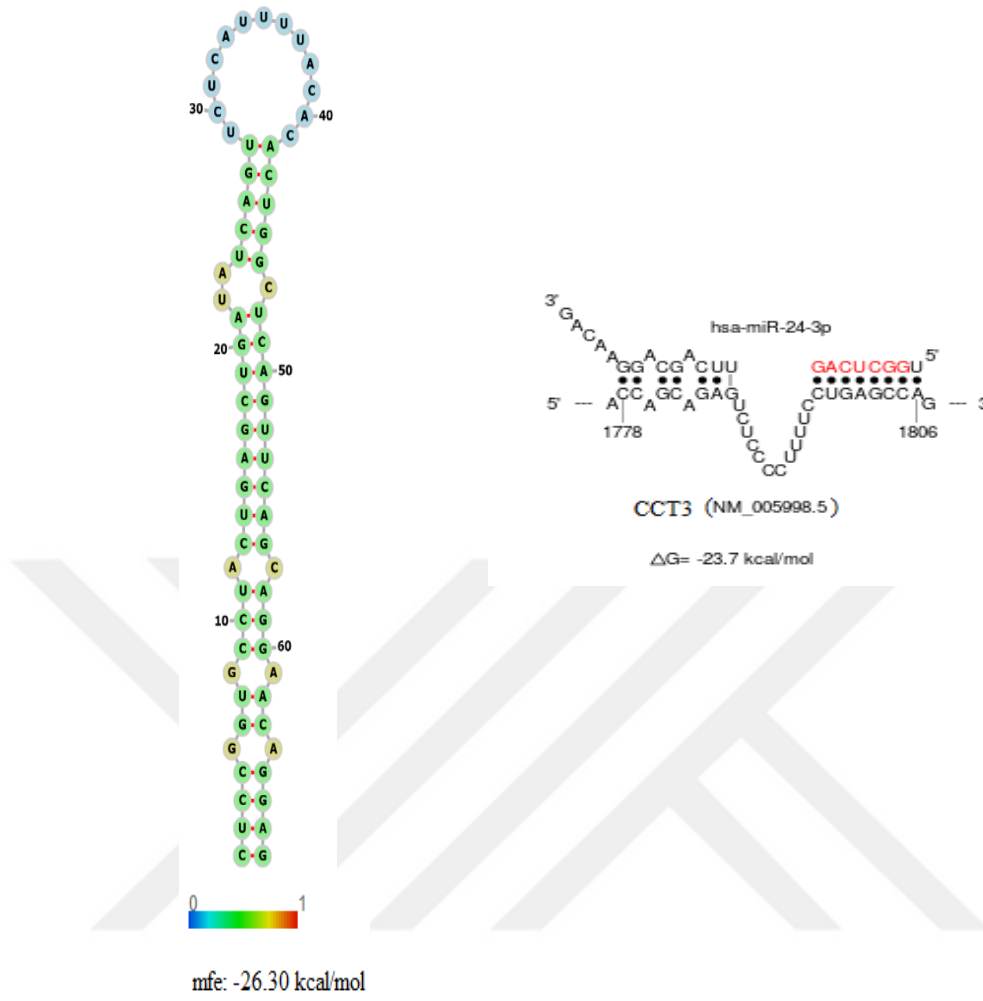
Tablo 2.1. miR-24-3p'nin dizilimi ve sap ilmik şeklini oluşturması.

miRNA	miR-24 Dizisi
miR-24-1	CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUAUCAGUUCUCAUUUUAC ACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGGAG
miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
Pre-miR-24	5p → g g a ua ucua 5' cucc gu ccu cugagcuga ucagu u u 3' gagg ca gga gacuugacu gguca u a a c -c cacau ← 3p

*Pre-miR-24 (saç tokası)'ün koyu renkli kısımları 5p ve 3p kolunun dizilimlerini vermektedir.

miR-24-3p ile ilgili yapılan çalışmaların bazıları, akciğer kanseri (163), kolon kanseri (164), lakrimal adenoit sistik karsinoma (165), prostat kanseri (166) ve pankreatik duktal karsinomada (167) yürütülmüş ve kanser patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon, apoptozis ve ilaç dirençliliğinde rol oynayan genlerin negatif düzenleyicisi olarak kullanılmış ve tümör baskılayıcı gibi davrandığı tespit edilmiştir.

Bu kanser türlerinde miR-24-3p'nin kanserli dokularda ekspresyon seviyesinin düşük olduğu ve karsinoma hücrelerinde bu miRNA'nın artışı hücre proliferasyonu ve koloni oluşumunu yavaşlatarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (164, 166).



Şekil 2.10. miR-24-3p ikincil yapısı (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) ve CCT3 geni ile uyuşum bölgesi (<http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/starmir.pl>).

2.4.8. Hsa-miR-128-3p

MiR-128, miR-128A, miR-128-B, miR-128-1 ve miR-128-2 kümesine ait olup 2. kromozomun q kolu (2q21.3) ve 3. kromozomun p kolundan (3p22.3) sentezlenmektedir. Tablo 2.2’de miR-128-3p’nin dizilimi verilmiştir.

miR-128-3p ikincil yapısı (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) ve CCT3 geni ile uyuşum bölgesi (<http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/starmir.pl>) Şekil 2.11’de gösterilmiştir.

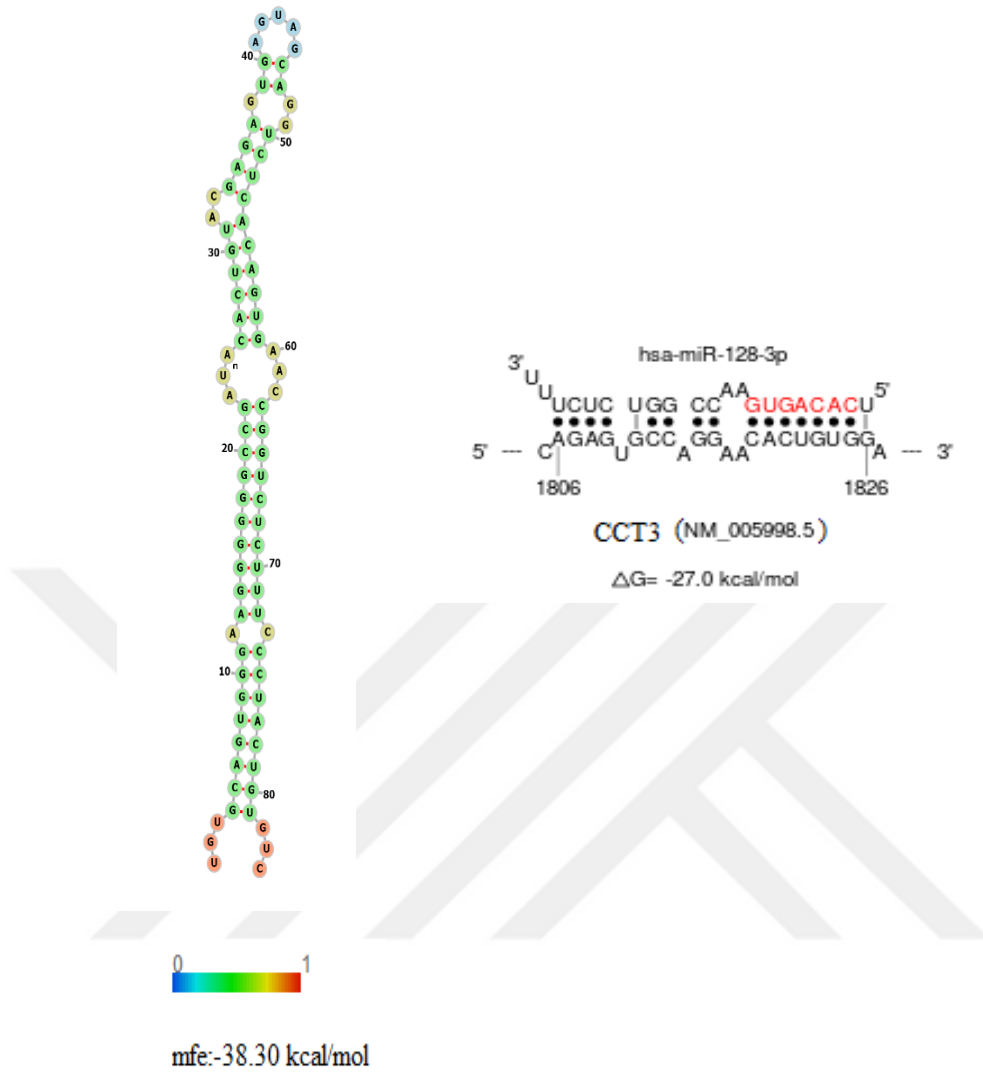
Tablo 2.2. miR-128-3p'nin dizilimi ve sap ilmik şeklini oluşturması.

miRNA	miR-128 Dizisi
miR-128-1	UGAGCUGUUGGAUUCGGGGCCGUAGCACUGUCUGAGAGG UUUACAUUUCUCACAGUGAACCGGUCUCUUUUUCAGCUG CUUC
miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU
Pre-miR-128	5p u u uuc uag cu u 5' gagc guugga ggggccg cacugu gagaggu u 3' uucg cgacuu cucuggc gugaca cucuuua a c u uuu caa -- c 3p

*Pre-miR-128 (saç tokası)'in koyu renkli kısımları 5p ve 3p kolunun dizilimlerini vermektedir.

miR-128-3p'nin fonksiyonunu belirlemek için yürütülen çalışmaların bazılarında, prostat (166), neuroblastoma (168), glioma (169), retinoblastoma (170), tiroid (171) ve meme kanserinin (172) prognozunda rolü olduğu belirlenmiştir. Kanser hücrelerinin bölünmesi, çoğalması, göçü, istilas, enerji metabolizması ve ölümü ile ilişkili birçok genin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. İn vivo ve in vitro koşullarında yürütülen bir çalışmada artmış olan gen ekspresyonunun baskılanması sonucu tümör büyümesini yavaşlattığı ve hücre proliferasyonunu durdurduğu bulunmuştur (169).

Ayrıca diğer kodlamayan RNA'ların hücre içi fonksiyonunu düzenleyerek metastazı ve hücre sağ kalımı düzenlediği tespit edilmiştir (170). Meme kanserinde yürütülen bir çalışmada, hücrelerde miR-128-3p'nin aşırı ekspresyonu hücre döngüsünde görevli siklin ve siklin bağımlı kinazların fonksiyonunu etkileyerek hücrelerin bölünmesini ve motilite yeteneklerini baskıladığı bulunmuştur (172).



Şekil 2.11. miR-128-3p ikincil yapısı (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) ve CCT3 geni ile uyuşum bölgesi (<http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/starmir.pl>).

2.4.9. Hsa-miR-149-5p

MiR-149 kümesine ait olup 2. kromozomun q kolundan (2q37.3) sentezlenmektedir. Tablo 2.3.'de miR-149-5p'nin dizilimi verilmiştir.

miR-149-5p ikincil yapısı (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) ve CCT3 geni ile uyuşum bölgesi (<http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/starmir.pl>) Şekil 2.12'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. miR-149-5p'nin dizilimi ve sap ilmik şeklini oluşturması.

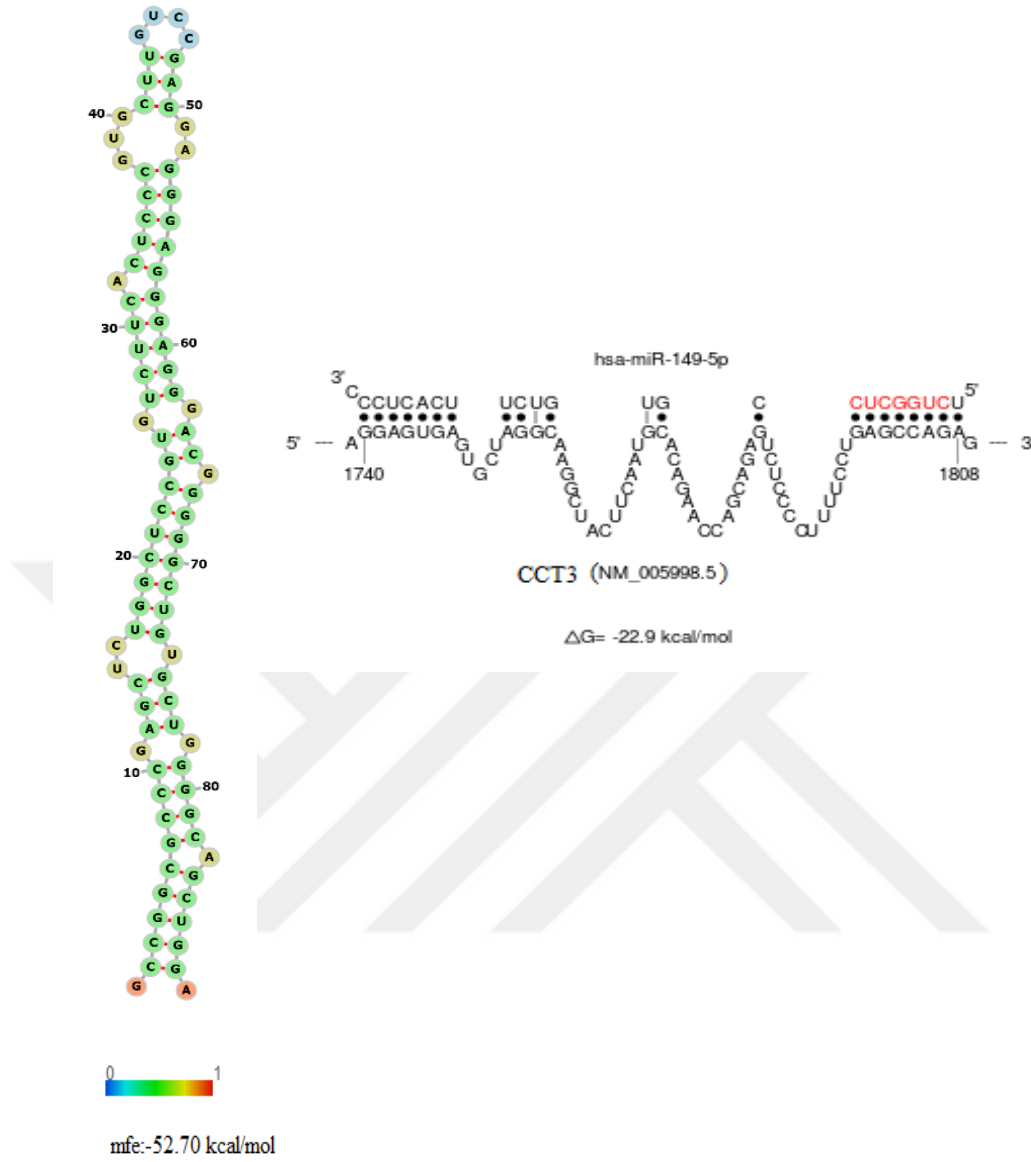
miRNA	miR-149 Dizisi
miR-149	GCCGGCGCCCGAGCUCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCCGUG CUUGUCGAGGAGGGAGGGAGGGACGGGGGCUGUGCUGGG GCAGCUGGA
miR-149-5p	UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC

Pre-miR-149	5p g - g u u g g a g g g 5' ccggc gccc agc c g cuccgu ucuuc cuccc ucuu 3' ggucg cggg ucg g c ggggca ggagg gaggg agag a a g u u g g - - g 3p
-------------	--

*Pre-miR-149 (saç tokası)'un koyu renkli kısımları 5p ve 3p kolunun dizilimlerini vermektedir.

miR-149-5p'nin fonksiyon analizinin test edildiği çalışmalardan bazıları, tiroid kanseri (171), kolon adenokarsinoma (173), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (174) ve hepatoselüler karsinomanın (173) gelişmesine ve ilerlemesine katkısı sağladığı gösterilmiştir. Bu miRNA'nın hücrede ekspresyonunun artması hücre proliferasyonu ve invazyonunu azalttığı bulunmuştur. Ayrıca kanserleşme sürecinde etkili olan diğer kodlanmayan RNA'ların fonksiyonlarını etkileyerek siklin, siklin bağımlı kinaz, pro- ve anti- apoptotik genlerin ekspresyonlarını düzenlediği tespit edilmiştir (173).

Tümör başlanmasında ve ilerlemesinde kritik role sahip olan dairesel (circular) RNA'nın AKT/mTOR yolağını düzenleyerek, enerji homeostazisi, otofaji, proliferasyon, invazyon, apoptozis ve EMT geçişi üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. ciRNA'nın miR-149-5p tarafından baskılanması sonucu hücrelerin malign özelliklerini bloke ettikleri tespit edilmiştir (175).

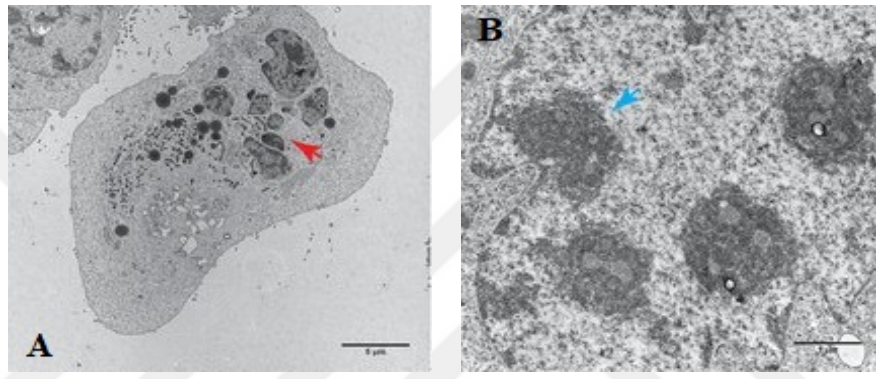


Şekil 2.12. miR-149-5p ikincil yapısı (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) ve CCT3 geni ile uyuşum bölgesi (<http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/starmir.pl>).

2.5. Apoptozis

Apoptozis terimi (a-po-toe-sis) ilk kez 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından apoptotik bir hücrenin, hücre membranı ile çevrili fragmanlara bölünmesini, bir ağacın yapraklarını dökmesine benzeterek Yunanca'da “düşmek, dökülmek” ve Latince'de “ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması” anlamında kullanmışlardır (176-178). Apoptozis yada programlı hücre ölümü; inflamatuvar bir yanıtı tetiklemeden hücrelerin genetik olarak belirlenmiş bir şekilde ortadan kaldırılmasını içeren “programlanmış”, çok

iyi regüle edilen ve evrimsel olarak korunmuş enerji bağımlı bir “hücre intiharı” programıdır (177). Apoptoziste hücre morfolojisi; çekirdek zarına yakın kromatin yoğunlaşması görülür ve kromatin yarımay/hilal şeklini alır (179). DNA endonükleazlar tarafından 180-200 bp veya katları şeklinde nükleozomal bölgelerinde kırılır. Ayrıca hücre zarında bulunan iyon kanallarının aktivasyonu bozulur ve hücre-hücre intraksiyonunu kaybedip büzülerek hacimlerinin 3’te 1’ini kaybederler. Hücre zarı tomurcuklanarak, sitoplazma ve parçalanmış kromatinden oluşan apoptotik cisimcikleri oluşturur (Şekil 2.13.)(180)(181).



Şekil 2.13. Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ile alınan detaylı apoptotik hücre görüntüsü. **A.** Apoptotik hücre (2800x). **B.** Apoptotik hücre çekirdeğinin detaylı görüntüsü (5600x) (181).

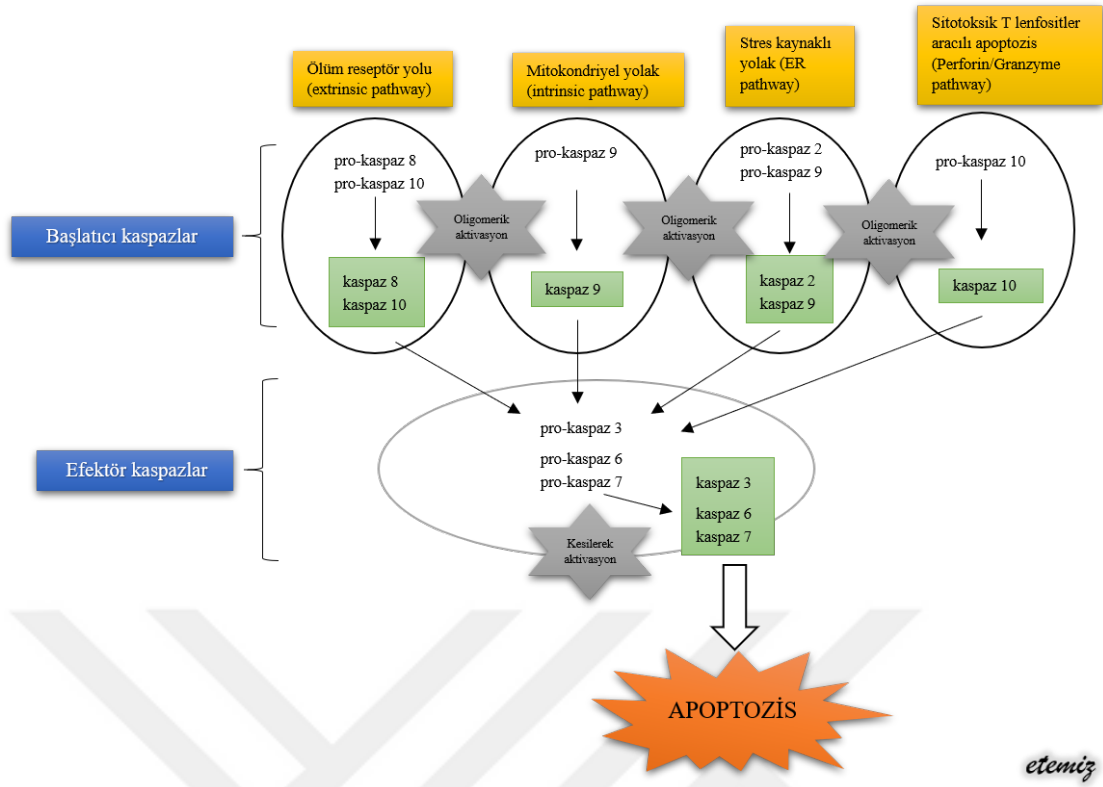
Çok hücreli canlılarda apoptozis, normal gelişim ve yaşlanma sırasında dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca immün reaksiyonlarda olduğu gibi savunma mekanizması olarak veya hücrelerin zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde meydana gelen bir mekanizmadır (182). Apoptozisi tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücrelerin aynı uyarana yanıt olarak ölmesi beklenmemektedir (180). Radyasyon, sıcaklık, yetersiz oksijen ve kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar gibi hücreye zarar veren uyaranlar düşük dozlarda apoptozisi uyarırken yüksek dozda maruziyet nekroza sebep olmaktadır (183).

2.5.1. Apoptoziste Görev Alan Başlıca Mediatörler

2.5.1.1. Kaspazlar

Memeli hücrelerinde, apoptozise farklı biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerden sorumlu olan bir dizi sistein proteaz aktivasyon kaskadı (kaspaz- Caspase: Cysteine-Containing **A**spartate Specific Proteases) aracılık etmektedir (184). Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonra gelen peptid bağını kırarak aktivasyon gösterirler. Yapısal olarak bir pro-domain ve iki aktif alt birimden oluşan inaktif öncüllerden (zimojenler) oluşurlar. Pro-domain uzunluğuna ve aktivasyon mekanizmasına göre, “başlatıcı” ve “efektör” kaspazlar olarak iki gruba ayrılırlar. Başlatıcı kaspazlar, kaspaz aktive edici kompleksler içine alımlarına izin veren uzun bir pro-domain varlığı ile karakterize olup memelilerde dört apoptotik başlatıcı kaspaz vardır (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) (185, 186). Efektör kaspazlar (-3, -6 ve -7), iki büyük ve iki küçük alt birimin bir tek aktif tetramerde birleştirilmesine yol açan proteolitik bölünme ile aktive edilir (Şekil 2.14.). Hücrel bütünlük kaybına neden olan geniş bir yelpazedeki hücrel proteinleri parçalayabilme (187) ve hücrel proliferasyonun yanısıra enflamatuar yanıt gibi diğer apoptotik olmayan işlemlere de aracılık ettikleri bilinmektedir (184).

Kaspaz-aracılı apoptozun başlatılması dört yolak üzerinden gerçekleşmektedir; (1) mitokondriyal yolak (intrinsik yol), mitokondri zar yapısının bozularak geçirgenleşmesi ve sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması ile karakterize edilir. Sitokrom c daha sonra "apoptozom" olarak bilinen çok proteinli bir kompleks oluşturur ve kaspaz kaskadı (kaspaz-9 ve -3)'nin aktivasyonunu sağlar; (2) Ölüm reseptörü yolu (ekstrinsik yol), hücre zarı üzerindeki ölüm reseptörlerine (FasR, TNFR1) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa), bağlanmasıyla (kaspaz 8 ve 3) aktive edilen yolak; (3) Endoplazmik retikulum (ER)'da kaspaz 2 ve 9'u aktive eden stres kaynaklı apoptotik yol; (4) Sitotoksik T lenfositleri ve doğal öldürücü hücreleri (Naturel killer-NK) tarafından salgılanan bir protez olan perforin/granzim B enziminin efektör kaspazları (kaspaz 10) aktifleştirdiği yolak (188).

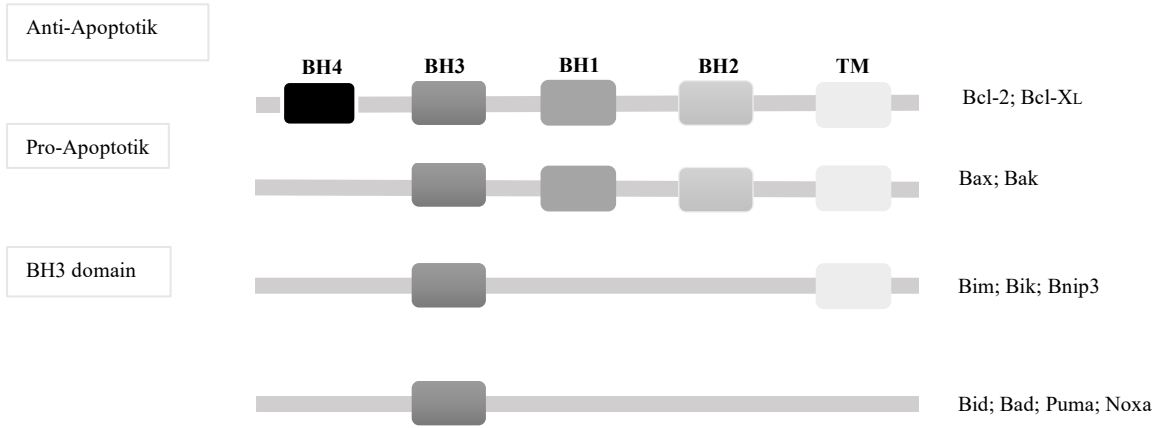


Şekil 2.14. Başlatıcı/Efektör kaspazlar ve görev aldıkları yollar.

2.5.1.2. BCL-2 Ailesi (Pro /Anti -Apoptotik Genler)

Hücrede apoptozisin regülasyonu Bcl-2 gen ailesi tarafından sağlanmaktadır. Bu ailenin üyeleri; apoptozisi tetikleyen (pro-apoptotik); Bax, Bak, (BH 1, 2 ve 3 domain) Bin, Bik, Bnip3, Bid, Bad, Puma ve Noxa; apoptozisi inhibe eden (anti-apoptotik), Bcl-2, Bcl-xL (BH 1,2,3 ve 4 domain) genler olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.15.) (189).

Anti-apoptotik genler; çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitokondrinin dış zarında yer alan, uyarılmaları durumunda membranda por oluşumunu sağlayarak iyon transportunu arttıran düzenleyicilerdir. Ayrıca Ca^{++} konsantrasyonunu kontrol altında tutmanın yanı sıra apoptoz indükleyici faktörler (AIF) ve sitokrom c'nin salınımını inhibe ederek apoptozisi engellerler. Pro-apoptotik genler ise tersi yönde çalışarak hücrenin programlı ölüm kaskadını aktifleştirici yönde çalışırlar (190).



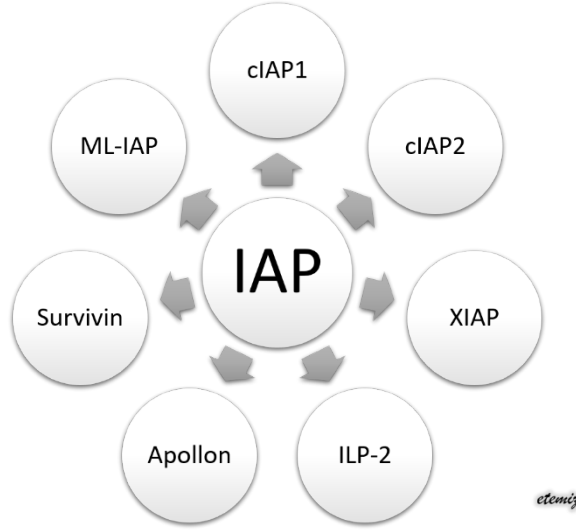
etemiç

Şekil 2.15. Bcl-2 gen ailesi üyeleri.

2.5.1.3. Apoptozis İnhibitör Proteinleri (IAP)

Apoptozis, değişken endojen ve eksojen uyaranlara cevap olarak tetiklenir ve üç kritik faktörün etkisi altında düzenlenir; IAP (apoptozis inhibitör proteinleri), IAP inhibitörleri ve kaspazlar. Bu faktörlerin düzenlenmesi, hücrel homeostazisi için oldukça önemlidir (180, 191). Tanımlanan ilk hücrel IAP, memeli nöronal apoptoz inhibitör proteindir (NAIP). NAIP'nin keşfedilmesinden bu yana, insan IAP gen ailesine yedi üye daha eklenmiştir; hücrel cIAP1; hücrel cIAP2; X'e bağlı apoptoz inhibitörü (XIAP); IAP benzeri protein 2 (ILP-2); Ubikuitin eşlenik enzimi içeren BIR (BRUCE / Apollon); Survivin ve Livin (ML-IAP) (Şekil 2.16.) (192).

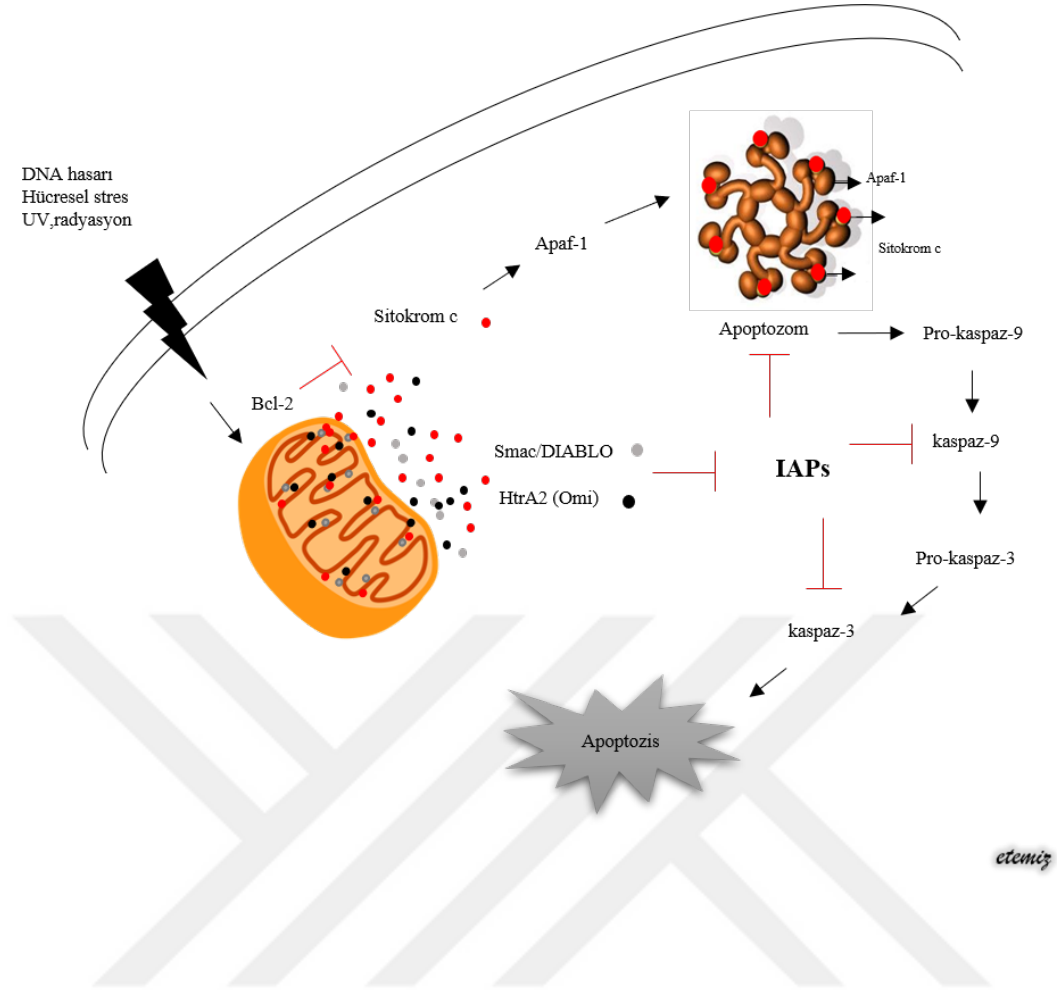
IAP'lerin, apoptozisin temel uygulayıcıları olan hem başlatıcı hem de efektör kaspazlarını baskılayabilen tek endojen proteinlerdir. Hücrel IAP'ler (cIAP1 ve cIAP2) ve XIAP kaspaz aktivitesinin düzenlenmesinde benzer rollere sahiptir, aynı zamanda NF-kB yolağının düzenlenmesinde de rol oynarlar. Bu inhibitör proteinleri, kaspazların (-2,-3,-7 ve -9) aktif bölgesine bağlanarak proteolitik fonksiyonlarını inhibe ederler (193).



Şekil 2.16. IAP ailesi üyeleri

IAP inhibitörleri, sağlıklı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan ve çekirdek tarafından transkripte edilen hücre içi protein ailesidir. IAP inhibitörlerinden ikisi; Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI) ve HtrA2(Omi) (high temperature- regulated A2/Omi)'dir. Smac/DIABLO: Hücrede apoptozis tetiklendiğinde sırada sitoplazmaya salınan (sitokrom c ile birlikte) bir mitokondri proteinidir. Sitokrom c'nin salınması mitokondri zar yapısının bozulduğunu ve kaspaz -9 /-3'ün aktivasyonunun olduğunu gösterir. Sitokrom c ile birlikte salınan bu protein IAP'lerin inhibisyonunu sağlar ve kaspaz aktivasyonu ile apoptozisin tetiklenmesine olanak sağlar (194).

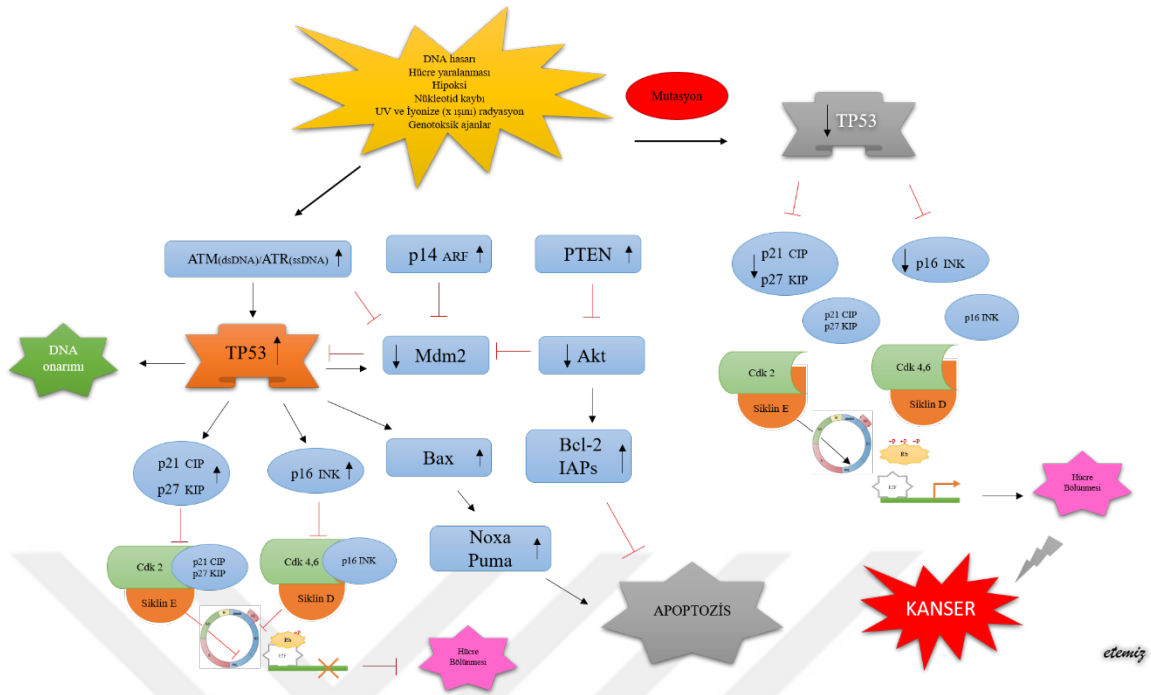
HtrA2 (Omi): kaspaz aktivasyonu sağlayan protein olarak tanımlanmış ve sağlıklı hücrelerin mitokondri zarları arasında yer alarak proteolitik hasarı engelleyen protein grubudur. Hücrede apoptozis uyarısından sonra bozulan mitokondriden sitoplazmaya geçerek, XIAP (X'e bağımlı IAP)'nin kaspaz -9 üzerindeki etkisini inhibe ederek çalışır (Şekil 2.17.) (195).



Şekil 2.17. IAP, IAP inhibitörleri ve kaspazların etkileşimi.

2.5.1.4. TP53/TRP53 ve PARP

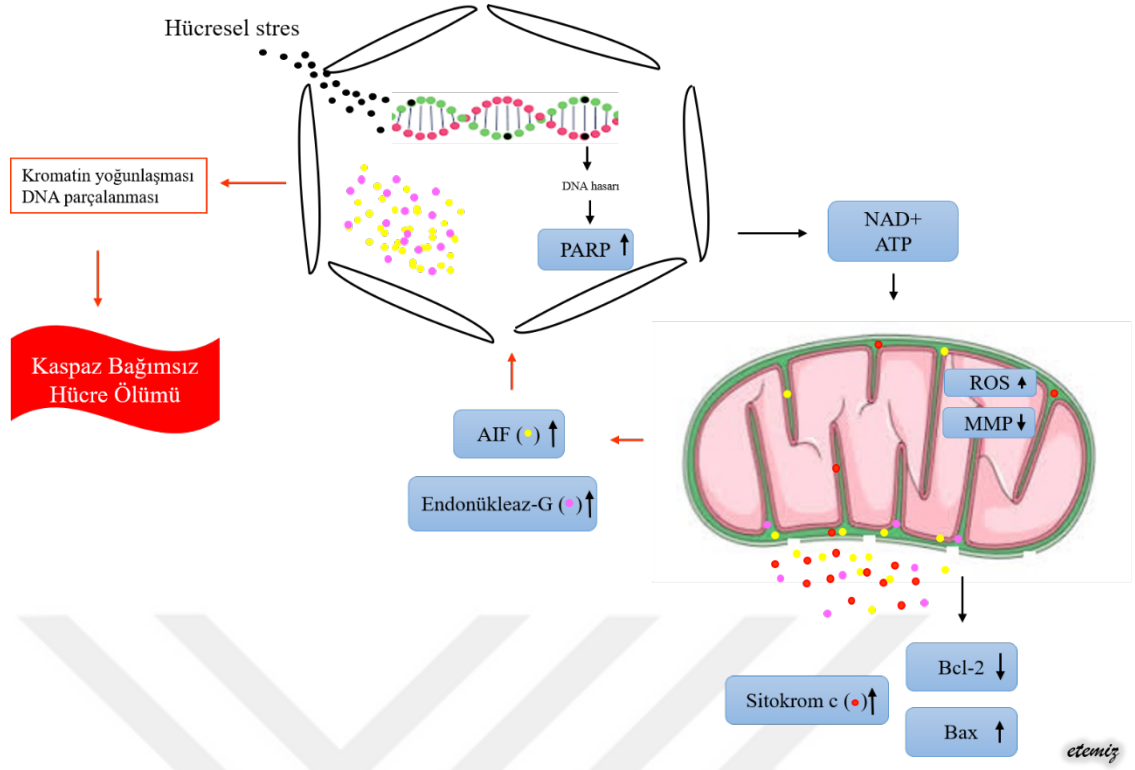
Tümör protein 53/ Transformasyonla ilişkili protein 53 (OMIM no. 191117), hücrel stres formlarına cevap olarak aktive edilen ve apoptozis, yaşlanma, DNA onarımı, hücre proliferasyon ve otofaji dahil olmak üzere çeşitli hücre fonksiyonlarını düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (196). Hücrede DNA hasarı olduğunda, TP53 proteini doğrudan DNA'ya bağlanarak hasarı tanımlar ve ilk olarak S fazına geçişi bloke ederek tamir için gerekli zamanı kazanır hasar tamiri olmadığı durumda ise apoptozisi uyarak hasarlanmış hücreler yok edilir (197). Bunun yanısıra bir tümör baskılayıcı gen olarak çalışan TP53 mutasyona uğradığı zaman hücre kontrolsüz bir şekilde bölünmeye devam eder ve yaşam süresini uzatır (Şekil 2.18.). Kanseri, nörodejeneratif hastalıklar, iskemi, kolestaz ve ateroskleroz gibi patolojik durumların tümü, TP53 disfonksiyonunun belirgin bir rol oynadığı düzensiz apoptozis seviyeleri ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu raporlanmıştır (198).



Şekil 2.18. DNA hasarı veya diğer stres faktörlerinin etkisi ile değişen TP53 gen ekspresyonu.

Poli(ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) (OMIM no. 173870); DNA tamir mekanizması, genomik stabilite kontrolü, apoptozis ve hücre proliferasyonu gibi anahtar hücresel işlevlerde görev yapan bir enzim ailesinin üyesidir (199). PARP, tek zincir DNA kırıklarına (SSB'ler) cevap olarak baz eksizyon onarımında (BER) yer almakla birlikte DNA ligaz III, DNA polimeraz β 'dan oluşan BER kompleksinin bir bileşenidir (200).

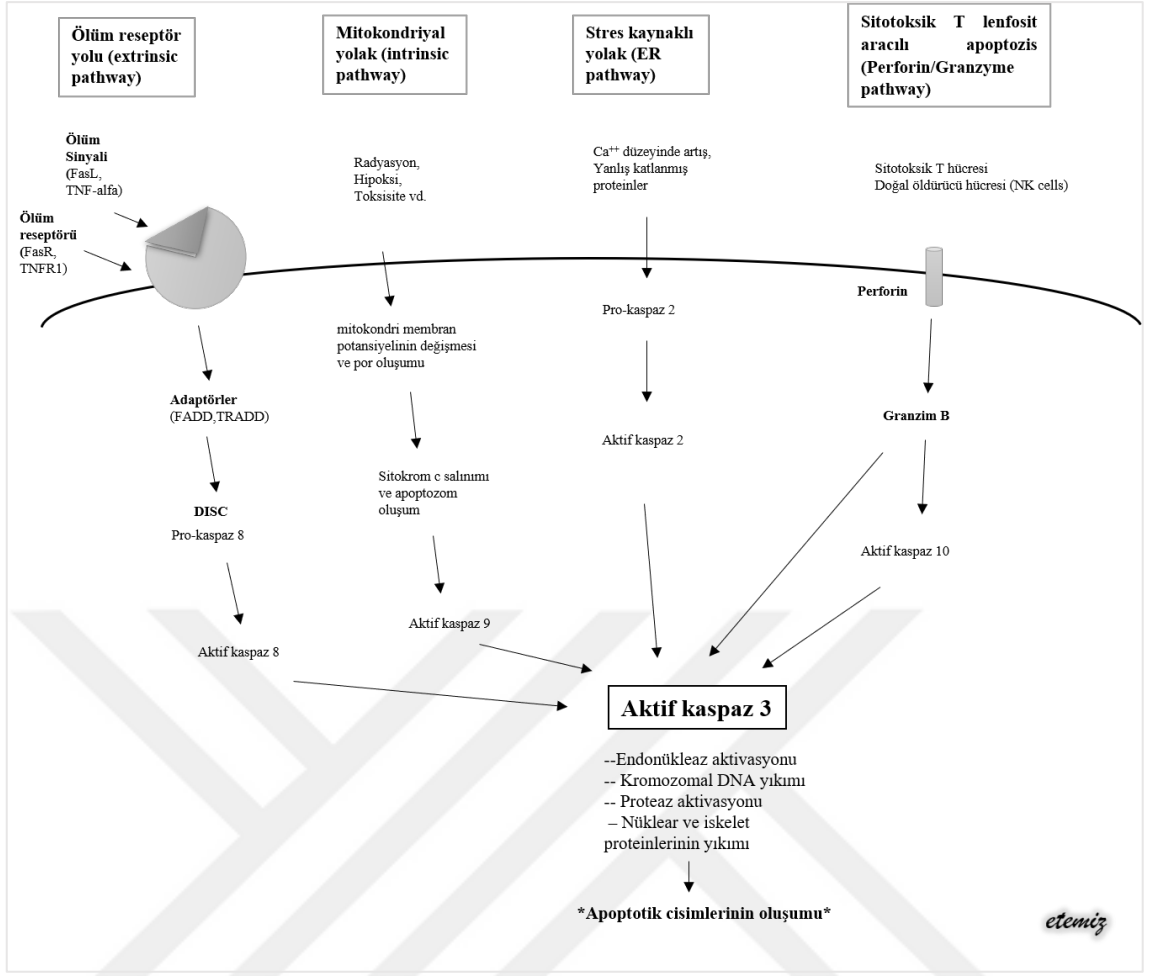
Hücre içerisinde aşırı PARP aktivasyonu; NAD^+ /ATP'nin tükenmesine, kalsiyum dengesizliğine, mitokondriyal membran potansiyelinin (MMP) ve fonksiyonunun kaybına ve apoptoz-indükleyici faktörün (AIF) salınmasına neden olarak spesifik bir programlanmış hücre ölüm yolunu aktive etmektedir (kaspaz bağımsız hücre ölüm yolu) (Şekil 2.19.) (201).



Şekil 2.19. Kaspaz bağımsız hücre ölümü.

2.5.2. Apoptozis Mekanizmaları

Hücrede apoptozisin başlatılması için hücrenin çeşitli uyarılar tarafında uyarılması gerekir. Bu hücresel uyarılar; hücre içi uyarılarla (hücre içi; Ca^{++} düzeyinde artış, pH seviyesinde ve oksijen seviyesinde azalış (hipoksi), hücre döngüsünde bozukluklar ve DNA hasarı) olduğu gibi hücre dışı uyarılardan da (büyüme faktörleri ve hayatta kalma sinyallerinin azlığı, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FasR/FasL ve TNFR1/ TNF-alfa, sitotoksik T lenfosit/ NK hücreleri tarafından granzim B/perforin enzim aktivasyonu ve kimyasal/çevresel faktörler) kaynaklanabilmektedir (Şekil2.20.) (202).



Şekil 2.20. Apoptozis mekanizmaları.

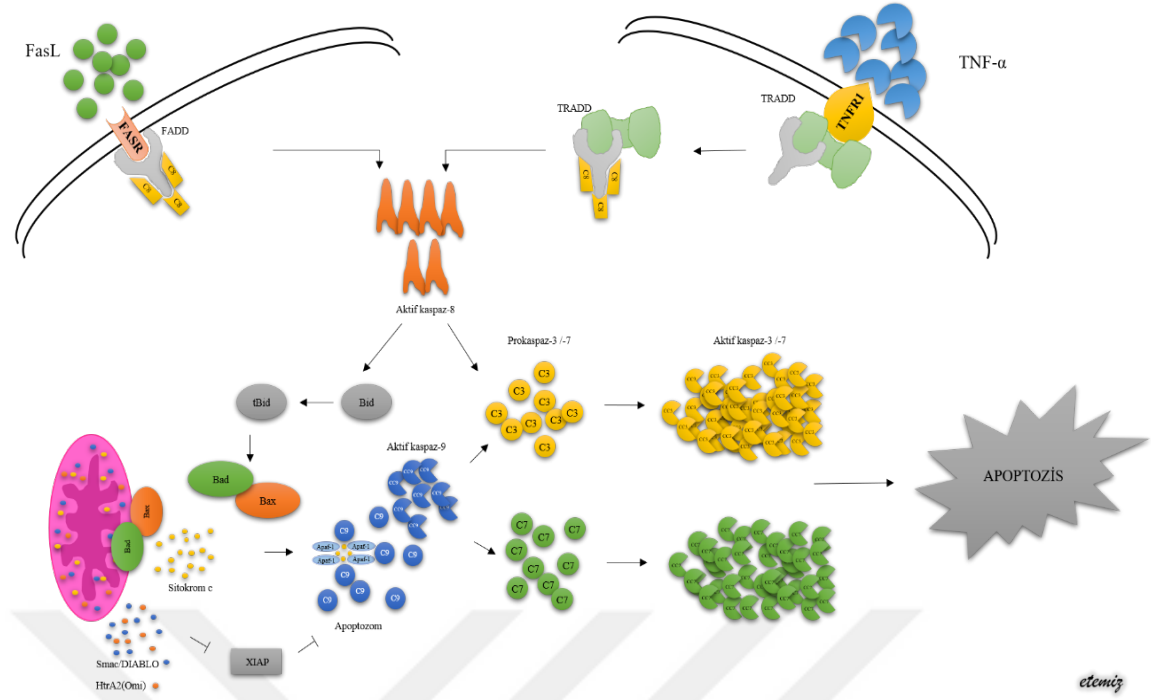
2.5.2.1. Mitokondriyal Yolak (Intrinsic Pathway)

Mitokondriyal yolak, mitokondride çok çeşitli sinyallerin üretilmesi ve bu sinyallerin hücre içi hedeflere doğrudan etki etmesi ile uyarılan hücre ölüm tipidir. Bu yolağın uyarılmasında negatif uyarılar olan büyüme faktörleri ve hormonların (trofik faktörler) bulunmaması apoptotik baskılama kaybını sağlarken, pozitif uyarılardan, uv/iyonize (x ışını) radyasyon, hipoksi, genotoksik ajanlar ve serbest radikaller ise doğrudan apoptozisin uyarılmasını sağlar (180). Bu uyarıların tamamı, mitokondri membran potansiyelinin (MMP) bozulmasına, mitokondri dış zarında por açılmasına ve pro-apoptotik proteinlerin zarlar arası yüzeyden sitozole salınmasına sebep olur (203). Apoptotik uyarının alınmasından sonra pro-apoptotik proteinlerden Bid, Bcl-2'yi baskılayarak Bax/Bak'ı aktiveleştirir. Aktifleşen bu pro-apoptotikler, mitokondri zarında por oluşumunu uyarak zar potansiyelinin değişmesine, iç ve dış mitokondri zarı

arasından proteinlerin salınmasına neden olurlar. Mitokondriden sitozole; sitokrom c, IAP inhibitörleri (Smac/DIABLO ve HtrA2(Omi)), Endo-G (Endonükleaz-G) ve AIF'nin salınımını uyarır (204). Sitokrom c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör)'e bağlanarak apoptozom kompleksini (heptamerik protein halkası) oluşturur. Bu kompleks, sitozolde bir kaspaz kaskadı oluşumunu uyararak kaspaz-9 ve 3'ün aktivasyonunu sağlar (205). IAP inhibitörleri, IAPs'leri inhibe ederek apoptozisin hızlanmasını sağlar (206). AIF ve Endo-G proteinleri çekirdeğe yerleşerek, DNA'nın (~50-300kb) parçalanmasına ve kromatinin yoğunlaşmasına neden olur (207). Mitokondriyal yolda apoptozun tetiklenmesi, kontrolü ve düzenlenmesi Bcl-2 protein ailesi üyeleri ve mitokondride görevli proteinler aracılığıyla gerçekleşmektedir (180).

2.5.2.2. Ölüm Reseptör Yolu (Extrinsic Pathway)

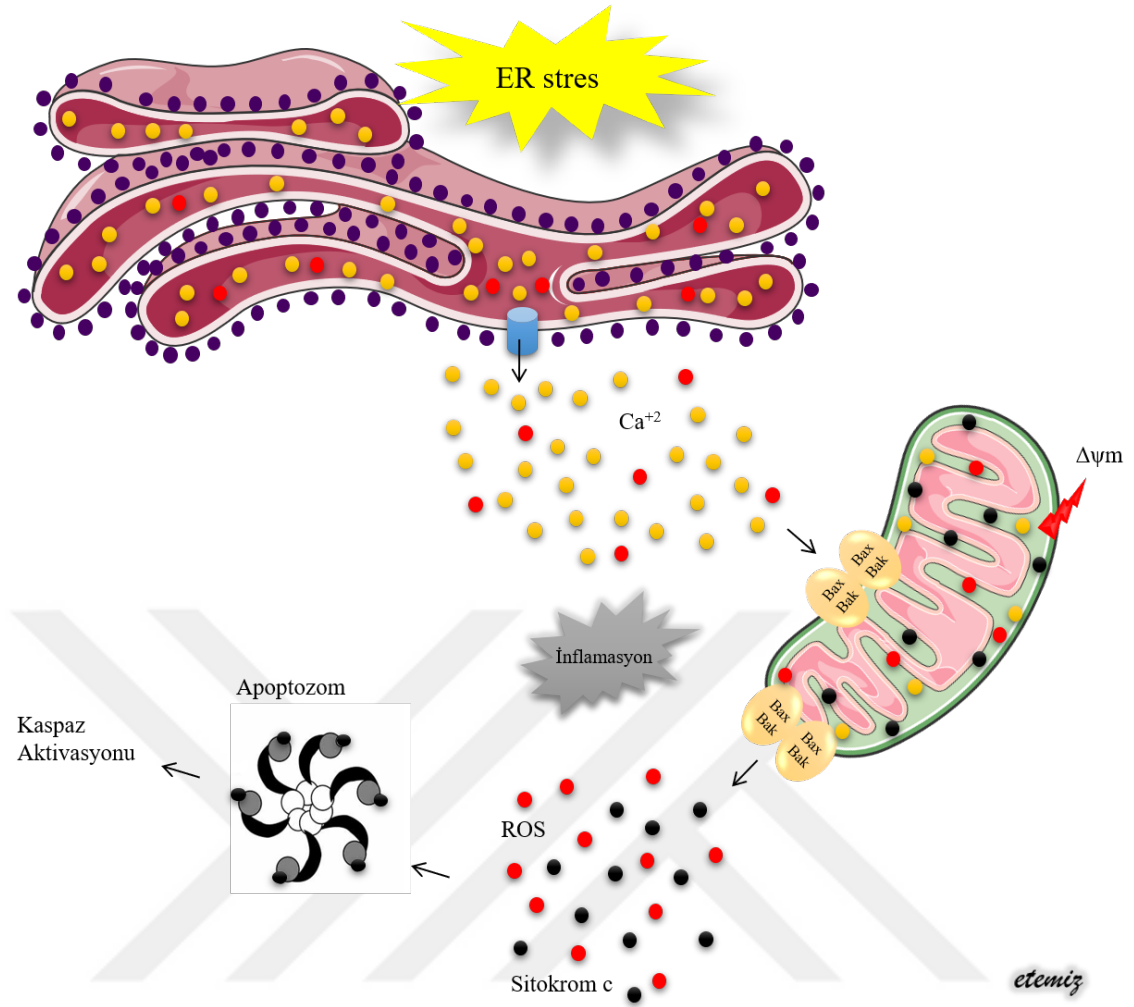
Ekstrinsik yolak, transmembran reseptör-aracılı etkileşimleri sonucu meydana gelir ve en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri FasL/FASR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5 olarak tanımlanmıştır (180). Reseptör aracılı ölüm yolağında mekanizması en iyi aydınlatılmış olanları; FasL/FASR ve TNF- α /TNFR1 modelleridir. FasL, TNF- α gibi ölüm ligandlarının plazma membranındaki reseptörlerine ((TNFR1+ TNF- α) ve (FASR+ FasL)) bağlandıkları zaman reseptörlerin homolog trimerizasyonuna neden olurlar (208). FASR ve TNFR1 sitoplazmik adaptör proteinleri olan FADD (Fas-ilişkili ölüm domain- Fas-associated death domain protein) ve TRADD (TNF reseptör-ilişkili ölüm domain- TNF receptor-associated death domain) ile ölüm efektör bölgesinin dimerizasyonu ile pro kaspaz-8 ile birleşir. Prokaspaz-8'in otokatalitik aktivasyonu ile sonuçlanan bir ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Prokaspaz-8 üzerinden efektör kaspaz (kaspaz -7 ve -3) aktivasyonu sağlayarak apoptozisi tetikler veya aktif kaspaz-8'in pro-apoptotik gen aktivasyonu (Bid --> tBid) ile mitokondri membran potansiyelini bozarak sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması ve sırasıyla başlatıcı (kaspaz -9) / efektör (kaspaz -7 ve -3) kaspaz aktivasyonu ile hücre ölümünü aktifleştirir (Şekil 2.21.)(209).



Şekil 2.21. Ölüm Reseptör Yolu. ((FASR+ FasL) ve (TNFR1+ TNF- α)) bağlanması ile aktif kaspa-8'in hem aktif kaspa-3'ün substratlarına yönelmesi hemde Bid'in mitokondriye transportu- Bax ve Bad'in apoptozom oluşumu için prokaspaz-9 ve Apaf-1'i uyarması- Mitokondriden sitokrom c salınımı- Apoptozom oluşumu- Hücrenin apoptoze girmesi.

2.5.2.3. Stres Kaynaklı Yolak (ER Pathway)

Endoplazmik retikulum (ER); proteinlerin sentezlenmesi, katlanması, olgunlaşması ve taşınmasında görev yapan çift zarlı bir organeldir. ER'yi etkileyen fonksiyonel ve yapısal bozulmalar, ağır koşullarda apoptotik programı aktive edebilen veya hücre döngüsünü durdurabilen spesifik bir stres tepkisi vermektedir (210). ER stresi, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna, Bax/Bcl-2 ailesi proteinlerinin ve ER ile ilişkili kaspazların (kaspaz -2 ve -3) da dahil olduğu çeşitli sinyallerin salgılanmasına neden olmaktadır (211). ER stresi, Ca^{++} 'nın ER lümeninden salınmasını ve mitokondri matriksinde birikmesi ile mitokondriyal membran potansiyeli (MMP)'nin bozulmasına sebep olan en güçlü indükleyicilerinden biridir (212). Sonuç olarak ER stresi; Pro-apoptotik gen ailesinin aktif olmasına ve “geri dönüşü olmayan” apoptotik ölüme neden olan fizyolojik ve pato-fizyolojik stres uyarıcılarını oluşturur (Şekil 2.22.) (213).

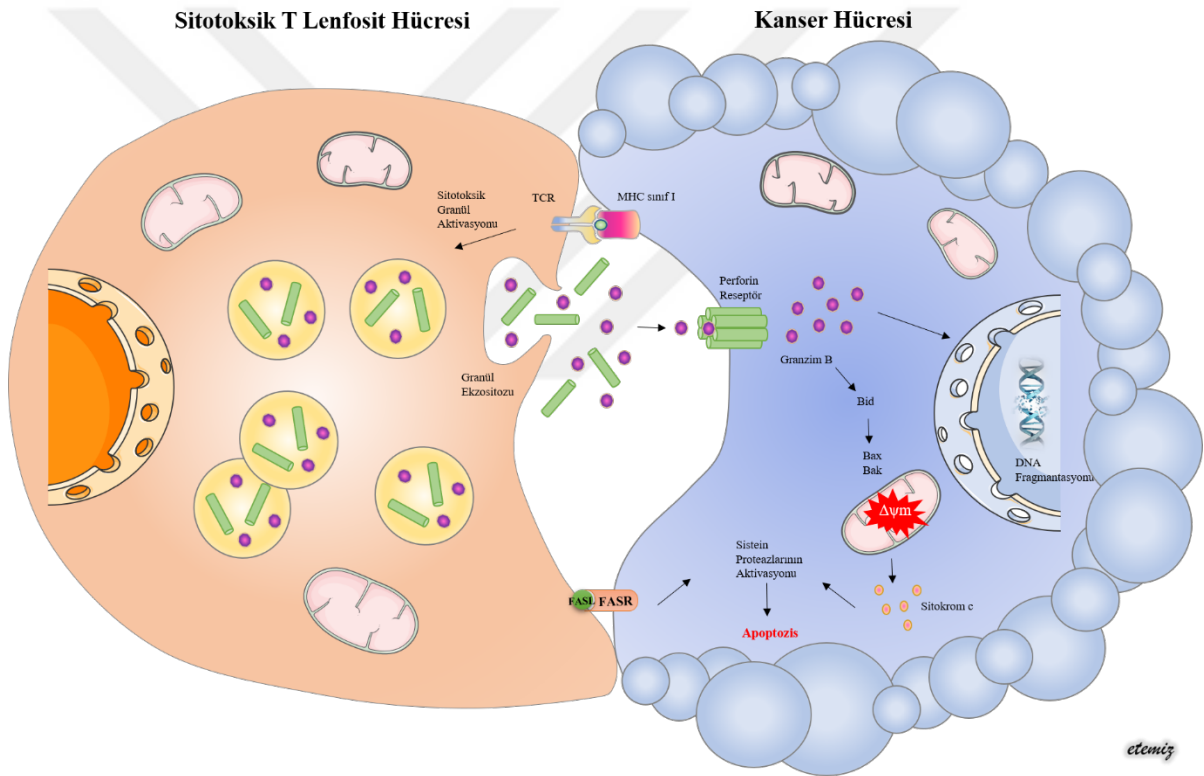


Şekil 2.22. ER stresi.

2.5.2.4. Sitotoksik T Lenfosit Aracılı Apoptozis (Perforin/Granzyme pathway)

Sitotoksik T lenfositleri (CTL'ler) ve doğal öldürücü (NK) hücreleri, viral patojen veya transforme olmuş hücelere karşı savunma için gerekli olan ortak sitotoksik yolları paylaşan efektör lenfositlerdir. Her iki hücre tipinde ölüm mekanizmasını, efektör (örn. Fas ligand) ve hedef hücre arasında doğrudan temas sağlayarak gerçekleştirir (214). İlk olarak, (Granül-ekzositoz yolu) sitoplazmik granül toksinler - perforin olarak bilinen membranı parçalayan bir protein - ve yapısal olarak ilişkili serin proteaz ailesinden olan granzimler, çeşitli substrat özelliklerine sahip bir ekzositoz tarafından salgılanır ve birlikte hedef hücrenin apoptoze (apoptotik sistein proteazlarının (kaspazlar) aktivasyonu ile) gitmesini sağlarlar (215). İkinci yol ise, FASR gibi hedef hücre ölüm reseptörlerinin, FAS ligand (FasL) gibi ligandları ile, klasik kaspaza bağımlı apoptozu

aktive ederek hedef hücrenin çekirdek zarının bozunmasına ve DNA fragmentasyonuna sebep olur (Şekil 2.23.) (216). Granzim, hedef hücrelerin apoptozunu tetiklemek için gereklidir, ancak bunlar uygun şekilde perforin tarafından iletmeye bağlıdır. Granzim B, kaspaz aktivasyonunu dolaylı olarak tetikler. Bunu, Bid gibi Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerini aktive ederek sağlar. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi Bax/Bak proteinlerini aktive ederek mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına ve sitokrom c gibi pro-apoptotik mitokondriyal mediyatörlerinin sitozole sızmasına ve akış aşağı kaspaz aktivasyonuna sebep olurlar. Bununla birlikte granzim A ise perforinle sinerjik olarak kaspaz bağımsız olarak apoptozun tetiklenmesinde görev almaktadır (217).



Şekil 2.23. Perforin/Granzim Yolağı.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Kronolojik Olarak Yapılan Deneylerin Sıralaması;

- Hücrelerin kültüre edilmesi
- mRNA izolasyonu ve CCT3 gen ekspresyon profilinin çıkartılması ve data analizi
- CCT3 gen ifadesi yüksek olan hücrelere miRNA'ların kendilerinin (mimik) transfeksiyonu
- miRNA transfeksiyonun doğrulanması
- Apoptosis yolağının tetiklendiğinin veya susturulduğunun gösterilmesi

Çalışmada Kullanılan Cihazlar;

- Sınıf II biyogüvenlik kabini (Tel Star)
- CO2'li 37°C inkübatör (Thermo Scientific)
- İnverted ışık mikroskobu (Olympus CKX41)
- Su banyosu (Mettler)
- 37°C inkübatör (Mettler)
- Floresans mikroskop ve görüntüleme sistemi (Olympus U-RFL-T)
- Soğutmalı santrifüj (Thermo Scientific)
- PCR (Applied Biosystems)
- Real time PCR (Qiagen RotorGene)
- Vorteks ve Mini santrifüj (Isolab)
- Spektrofotometre (Nano Drop)
- Flow sitometri (BD FACS Via)
- -80 Buzdolabı (Nüve)
- -20 Buzdolabı (Arçelik)

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar;

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose-DMEM (Sigma Aldrich)
- RPMI 1640 (Sigma Aldrich)

- Hank's Balanced Salt Solutions-HBSS (Sigma Aldrich)
- Fetal Bovine Serum-FBS (Sigma Aldrich)
- Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich)
- L-Glutamine (Sigma Aldrich)
- Trypsin EDTA (%2.5)(Sigma Aldrich)
- %0,5'lik Trypan-Blue (Sigma Aldrich)

3.1. Hücre Kültürü ve Koşulları

3.1.1. Sterilizasyon

Hücreler açılmadan ve besiyeri hazırlanmadan önce laminar kabin sterilizasyonu için 30 dk UV ve %70'lik etil alkol (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Steril edilen laminar kabinde kullanılacak malzemeler %70 alkolle silinerek içeri alınmıştır. Hücre kültürü çalışmaları için temin edilen sarf malzemeler 0,22 µm ve 0,45 µm por çapına sahip filtreler (Sartorius AG, Almanya) kullanılarak kullanılacak olan sıvı malzemelerin (Fetal Bovine Serum, Penicillin/Streptomycin ve L-Glutamine) (Sigma Aldrich, ABD) sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.1.2. Hücre Kültürü

3.1.2.1. Besiyerinin Hazırlanması

Hücreleri kültür kaplarında büyütmek için gerekli olan kimyasallar tablo 3.1.'deki miktarlara göre hazırlanmıştır. Her hücre hattı için besiyeri ortamı (DMEM-F12 ve RPMI 1640) ayrı ayrı hazırlanarak kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Besiyeri kimyasal ve miktarları.

Besiyeri İçeriği	Hacim
DMEM-F12/RPMI 1640	500ml
FBS(Fetal Bovine Serum)	50ml (%10)
Penicillin/Streptomycin (Antibiyotik)	5ml (%1)
L-Glutamine	5ml (%1)

3.1.2.2. Hücrelerin Çözülmesi

Çalışmada ATCC'den temin edilip stokladığımız tablo 3.2'de belirtilen hücreler kullanılmış olup morfolojik görüntüleri şekil 3.1'deki gibidir. Sıvı azot tankından çıkarılan donmuş haldeki hücreler 37 °C'de çözülerek laminar kabin içerisine alınmıştır. Hücrelerin büyümesi için hazır hale getirilen DMEM-F12/RPMI 1640 (Sigma Aldrich, ABD) besiyerine hücreler aktararak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır.

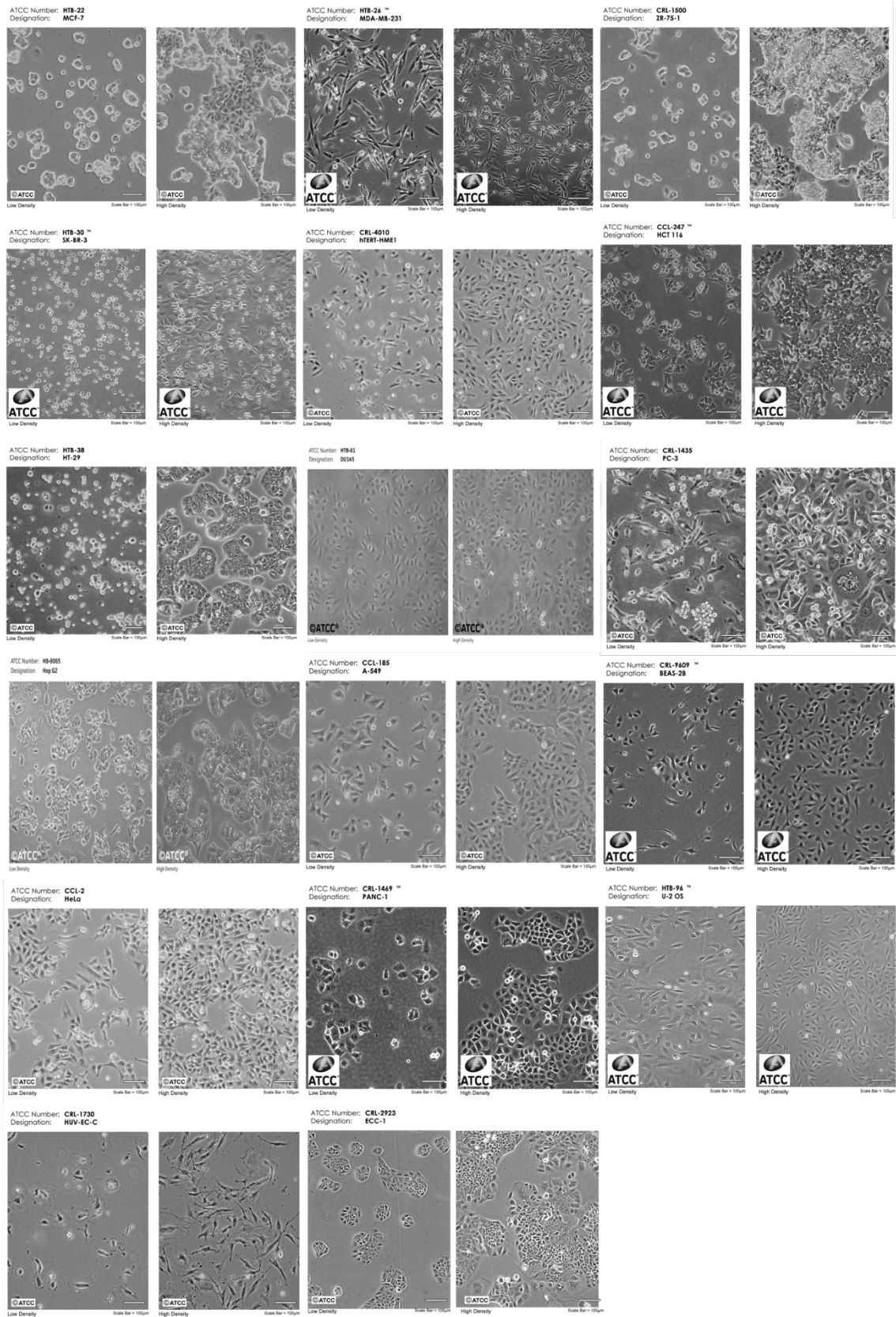
Pellet el yardımı ile hafifçe vurularak homojenize edilip 4 ml besiyerinde süspanse hale getirilmiştir. Süspansiyondan alınan hücreler (10 μ l) ve %5'lik Tripan-Blue (10 μ l) (Sigma Aldrich, ABD) karıştırılarak thoma lamında (Marienfeld, Almanya) hücre canlılığı değerlendirilerek 25 cm²'lik flaska 5 ml DMEM-F12/RPMI 1640 besiyeri eklenip 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 nemli ortam içeren inkübatörde kapağı hafif açık olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler tüm flaskın yüzeyini kapladıktan sonra 75 cm²'lik flaska almak için, 25 cm²'lik flask içerisindeki besiyeri çekilerek flaskın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücreler 2 ml HBSS (Sigma Aldrich, ABD) ile yıkanmıştır.

HBSS uzaklaştırıldıktan sonra 1ml tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, ABD) ilave edilerek flask yaklaşık 2 dk inkübatörde bekletilip mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlendikten sonra, besiyeri eklenerek hücrelerin flask yüzeyinden kalkması sağlanmıştır.

Falkon tüpe aktararak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılarak pellet el yardımı ile hafifçe vurularak homojenize edilmiştir. Falkon tüpe yaklaşık 10-12 ml besiyeri eklenip 75 cm²'lik flaska aktararak 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 nemli ortam içeren inkübatörde %80-90 konfluens olana kadar inkübe edilmiştir. Hücre çoğalması tamamlandıktan sonra deney grupları oluşturmak için ilgili plakalara ekim yapılmıştır.

Tablo 3.2. Farklı kanser ve normal hücre soyları.

Hücre Soyu	ATCC Adı	Kanser	Histopatolojisi
MCF-7	HTB-22	Meme Kanseri	Adenokarsinom
MDA-MB-231	HTB-26	Meme Kanseri	Adenokarsinom
HCC-1500	CRL-2329	Meme Kanseri	Duktal karsinom
SK-BR-3	HTB-30	Meme Kanseri	Adenokarsinom
184A1	CRL-8798	Meme Epitel Hücresi	Normal
CRL-4010	hTERT-HME1	Meme Epitel Hücresi	Normal
HCT-116	CCL-247	Kolon Kanseri	Kolorektal Karsinom
HT-29	HTB-38	Kolon Kanseri	Kolorektal Karsinom
DLD-1	CCL-221	Kolon Kanseri	Kolorektal Karsinom
DU-145	HTB-81	Prostat Kanseri	Karsinom
PC-3	CRL-1435	Prostat Kanseri	Karsinom
PNT-1A	CRL-11609	Prostat Epitel Hücresi	Normal
HEPG-2	HB-8065	Karaciğer Kanseri	Hepatoselüler Karsinom
SNU-423	CRL-2238	Karaciğer Kanseri	Hepatoselüler Karsinom
HGC-27	-	Mide Kanseri	Gastrik Karsinom
A549	CCL-185	Akciğer Kanseri	Karsinom
BEAS-2B	CRL-9609	Akciğer Epitel Hücresi	Bronş Normal
HELA	CCL-2	Rahim Kanseri	Adenokarsinom
ECC-1	CRL-2923	Rahim Kanseri	Adenokarsinom
HUVEC	CRL-1730	Göbek Kordon Endotel Hücresi	Normal



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bazı hücrelerin morfolojik görüntüleri (<http://www.atcc.org/> internet sitesinden alınmıştır).

3.1.2.3. Hücre Sayımı

Santrifüj işleminin ardından elde edilen pellet tüpün kenarlarına yavaşça vurularak homojenize hale getirilip üzerine 5 ml besiyeri eklenmiştir. Hücre sayımı için 10 µl hücre süspansiyonu ve 10 µl %0,5'lik Trypan-Blue karışımı hazırlanarak thoma lamında ışık mikroskobu altında boyanmamış (canlı) hücreler sayılmıştır. Elde edilen hücre sayısı kullanılarak hücre süspansiyonunun mililitresindeki (ml) hücre sayısı belirlenmiştir. Sonuca göre DMEM-F12/RPMI1640 besiyeri ile seyreltilerek deney için uygun steril plaklara ekim yapılmıştır.

$$1 \text{ ml'deki hücre sayısı} = A \times B \times 10^4$$

A: Canlı hücre sayısı

B: Dilüsyon faktörü (Trypan-Blue)(x2)

3.1.2.4. Hücrelerin Stoklanması

Çoğaltılan hücreler deneylere başlamadan önce stok solüsyonu eklenerek 2ml'lik cryo tüplere aktarılıp sıvı azotta muafaza edilmiştir. Stok solüsyonu hazırlamak için 25 ml FBS, 20 ml DMEM-F12/RPMI1640 (Antibiyotik ve L-glutamin eklenmemiş) ve 5 ml DMSO (Sigma Aldrich) kullanılarak hazırlanmıştır.

3.1.2.5. Hücre Ekimi

Hücreler 75 cm²'lik flasklarda %80-90 oranında çoğalınca, tripsinizasyon ile kaldırılıp 1 ml'de 1x10⁵ hücre/kuyucuk (yapılacak deneye göre hücre sayısı ayarlandı) olacak şekilde steril plaklara ekilmiştir.

3.2. Real Time PCR

3.2.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu üretici firmanın önerdiği protokol takip edilerek yapılmıştır. Bu aşamada ticari adı Qiagen RNeasy mini Kit (Cat No./ID:74104) (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) olan izolasyon kiti kullanılmıştır. Kit seti içerisinde 50 RNeasy MinElute Spin

Columns, Collection Tubes (1.5 ml-2 ml), QIAzol Lysis Reagent, RNase-free Reagents ve Wash Buffers bulunmaktadır. Kitin iş akış prosedürü aşağıdaki gibidir;

1. Hücreler 75 cm²'lik flasklarda %80-90 oranında çoğalınca, tripsinizasyon ile kaldırılıp 6 kuyucuklu steril plaklara ml'de 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılarak bir gece 37 °C' de %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda inkübe edilmiştir.
2. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsin enzimi kullanılarak kaldırılıp santrifüj yardımıyla çöktürülerek pellet üzerine 350-400 µl RLT (başlangıçta kullanılan hücre miktarı 5×10^6 - 1×10^7 arasında ise RLT miktarı 600 µl 'ye çıkartıldı) eklenmiştir. Homojenizatörde 30 sn -1 dk homojen hale getirilmiştir.
3. 1X katı kadar %70 etanol eklenerek pipetaj yapılarak tek seferde en fazla 700 µl örnek olacak şekilde 2 ml RNeasy Mini kolona yüklenmiştir. Oda sıcaklığında 15-20 sn boyunca 8000 g'de santrifüj edilerek bu aşamaya tüm örnek bitene kadar devam edilmiştir.
4. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 700 µl Buffer RWT çözeltisi eklenip oda sıcaklığında 20 sn boyunca 8000 g'de santrifüj yapılarak toplama tüpünde biriken kalıntı atılmıştır.
5. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklenerek yine oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000 g'de santrifüj edilmiştir.
6. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona tekrar 500 µl Buffer RPE çözeltisi eklenip oda sıcaklığında 2 dk boyunca 8000 g'de santrifüj yapılarak toplama tüpünde biriken kalıntı atılmıştır.
7. 1,5 ml'lik toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 30-50 µl RNase içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletilip 1 dk boyunca 8000g'de santrifüj yapılarak total RNA elde edilmiştir (bu işlem 2 aşamalı olarak yapılmıştır).

3.2.2. mRNA'dan cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA içindeki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için kullanılmıştır. mRNA'dan cDNA elde etmek için Qiagen RT² First Strand Kit (Cat No./ID:330404) (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılmıştır. Kitin iş akış prosedürüne göre; Revers Transkriptaz PCR reaksiyonu 2 adımda gerçekleştirilmiştir (karışımının içerikleri tablo 3.3. ve tablo 3.4.'de belirtilen şekilde hazırlanmıştır).

Tablo 3.3. Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımı-1.adım.

Bileşenler	Miktar
RNA	25-5000ng (1000ng kullanıldı)
Buffer GE(genomik DNA eliminasyonu)	2 µl
Rnaz/Dnaz içermeyen su	Total 10 µl

1. Tablo 3.3’de belirtilen bileşenler karıştırılıp 42°C’de 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde deney tüpleri, 1 dk soğuk blok üzerinde tutularak 2.adım karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3.4. Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımı-2.adım.

Bileşenler	Miktar
5X Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Revers Transkriptaz Mix	2 µl
Rnaz/Dnaz içermeyen su	3 µl
Toplam	10 µl

2. Tablo 3.4’te belirtilen bileşenler kullanılarak hazırlanan karışım (her bir örnek için 10 µl) 1.adım tüplerine eklenerek karıştırılmıştır.
3. 42°C’de 15 dk ve 95 °C’de 5 dk’lık PCR koşulları uygulandıktan sonra cDNA elde edilmiştir. Real-Time PCR analizleri için her örnekten 1µl cDNA kullanılmıştır.

3.2.3. Real-Time PCR (qPCR-mRNA)

Polimeraz zincir reaksiyonu, genetik materyaller üzerinde seçilen bölgenin, kimyasal olarak sentezlenmiş olan oligonükleotid primerler ve polimeraz enzimleri kullanılarak, ısı döngüsü (thermocycle system) ile canlı dışı (in vitro) koşullarda çoğaltma yöntemidir. qPCR; denatürasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olmak üzere üç basamakta oluşur. Arka arkaya tekrarlanan bu basamaklar ile cDNA parçacıklarının kopya sayısı üstel olarak artmaktadır.

3.2.3.1. Primer Tasarımı

Gen ekspresyon primerleri; genin ifade edilip edilmediğini anlamak için kodlanan bölgelerin herhangi bir yerinde olabilir. Bu bağlamda primerler, NCBI veritabanında yer alan “Gene” arayüzü (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) kullanılarak tasarlanmıştır. Kullanılan primerlerin ileri ve geri primer dizilimleri tablo 3.5.’de gösterilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH geni kullanılmıştır. Apoptozis yolağı ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyine miRNA transfeksiyonu sonrasında bakılmıştır.

Tablo 3.5. Gen Primer dizileri.

Primer	İleri Primer (5'-3')	Geri Primer (3'-5')
CCT3	ATTGGCCCGCATAAGGTAGT	ACGAGGGTGGGTGATTTGTT
CASP-3	TGTCGGCATACTGTTTCAGCA	TGGCGAAATTCAAAGGATGGC
CASP-8	TGGGAGAAGGAAAGTTGGACA	CGTTGATTATCTTCAGCAGGCTC
CASP-9	GCCCTGGCCTTATGATGTTTT	GCTGTTTCGGTGAAAGGGATTT
FADD	TGGCTCGTCAGCTCAAAGTC	ATTCTCAGTGA CTCCCGCAC
BAX	GCTGACATGTTTTCTGACGGC	TTGAGCACCAGTTTGCTGGC
BCL-2	TGACCCCAACCGAACTCAAAG	GACTTCGCCGAGATGTCCA
NOXA	AGGAGATTTGGAGACAACTGAAC	CTGAGCAGAAGAGTTTGGATATCAG
APAF	GGGAATCCTCACAGACCTTCTAC	ATGTTTTGAAGTCAGGGGACACG
CYC-S	TCTTCCGCCCAAAGAGACCA	CCAGTGCCACACCGTTGAAA
P53	TAACAGTTCCTGCATGGGCG	ACCTCAAAGCTGTTCCGTCC
GAPDH	CCTGACCTGCCGTCTAGAAA	TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC

Tasarımı yapılan primerlerin % GC oranı, Tm değerleri, ürün uzunlukları ve primer uzunlukları gibi primer özellikleri Tablo 3.6.’da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. Tasarımı yapılan primerlerin özellikleri.

Primer Adı	Ürün boyutu (bç)	Tm (°C)	% GC	Primer uzunluğu (bç)
CCT3	159	F	58.02	50
		R	58.01	50
CASP-3	70	F	60.27	47.62
		R	59.80	47.62

CASP-8	75	F	58.87	47.62	21
		R	59.75	47.83	23
CASP-9	93	F	58.89	47.62	21
		R	59.70	45.45	22
FADD	97	F	60.32	55	20
		R	59.75	55	20
BAX	80	F	60.40	52.38	21
		R	61.74	55	20
BCL-2	139	F	59.89	55	20
		R	57.89	57.89	19
NOXA	70	F	58.93	41.67	24
		R	59.25	44	25
APAF	75	F	59.87	52.17	23
		R	61.30	47.83	23
CYC-S	74	F	61.13	55	20
		R	61.38	55	20
P53	102	F	60.68	55	20
		R	60.25	55	20
GAPDH	141	F	59.10	55	20
		R	60.53	55	20

Eş zamanlı PCR reaksiyonu Rotor Gene 6000 Real-Time PCR cihazı (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak mRNA ekspresyonunu belirlemek için Tablo 3.7.'de belirtilen miktarlara göre qPCR karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3.7. qPCR karışımı.

Bileşenler	Hacim (µl)
SYBR Green Mastermix	5
İleri Primer (10 µM)	0,3
Geri Primer (10 µM)	0,3
Rnaz/Dnaz içermeyen su	3,9
cDNA	1
Total	10,5

Hazırlanan karışım 9.5 µl olacak şekilde uygun tüplere dağıtılarak, her hücre soyuna ait cDNA qPCR karışımı tüplere eklenmiştir. Tablo 3.8.'de belirtilen PCR koşullarında çalışılmıştır.

Tablo 3.8. qPCR Tepkime koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre	
Enzim aktivasyonu	95	10 dk	
Denatürasyon	95	15 sn	} 40 döngü
Primer bağlanması	58	60 sn	
Primer uzaması	72	30 sn	
Erime eğrisi	72	5 dk	

3.2.3.2. mRNA Real-Time PCR Sonuçlarının Analizi

Kısmi miktarlara dayalı yöntemde her hücre için ölçümü yapılan CCT3 genine ait Ct değerleri GAPDH genine ait Ct değerleri ile normalize edilmiştir. qRT-PCR gen ekspresyon düzeylerinin analizi için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change-katlı değişim) formülü kullanılmıştır. Ekspresyonu artan hücre soylarına miRNA mimikleri transfekte edilmiştir.

$$\Delta Ct = \text{Hedef Gen} - \text{Housekeeping Gen}$$

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

3.2.3.3. Transfeksiyon Öncesi miRNA Ekspresyon Tayini

CCT3 ekspresyonunun arttığı tespit edilen hücrelerden elde edilen total RNA'lar kullanılarak mi-cDNA sentezi yapılmıştır. qPCR ile hücrelere göre ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

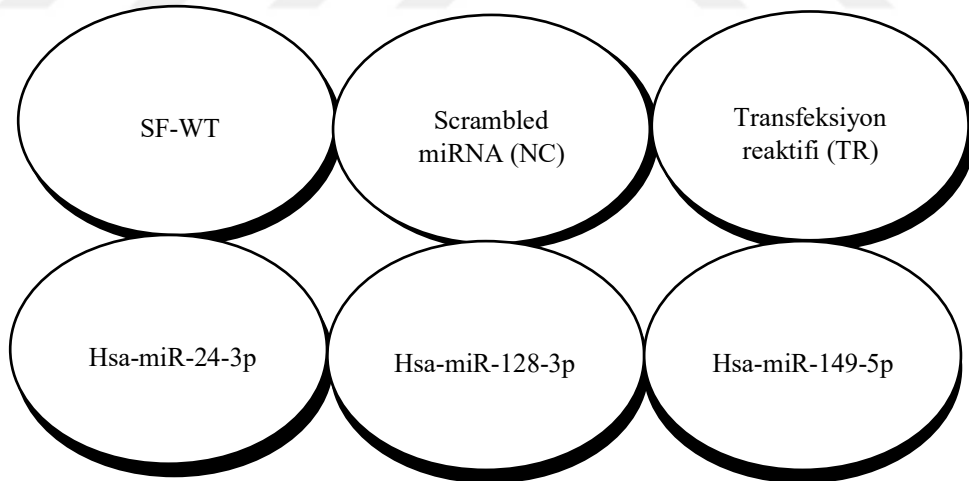
3.3. CCT3 geni ile ilişkili miRNA seçimi

miRNA databaseleri (<http://www.targetscan.org>), (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>), (<http://www.microrna.org>), (www.exiqon.com) ve (<http://mirdb.org>) kullanılarak gen ile ilişkilendirilmiş tüm databaselerde ortak olan miRNA'lar tespit edilmiştir.

3.4. miRNA (mimik) transfeksiyonu

CCT3 geni ile ilişki olan Qiagen miScript miRNA mimikleri (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-128-3p ve hsa-miR-149-5p) (Cat No./ID: 219600), Qiagen AllStars negatif kontrol siRNA-scrambled miRNA (Cat No./ID: 1027415) (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) ve tranfeksiyon reagent Lipofectamine 3000 (Cat No./ID: L3000001) (ThermoFisher, Massachusetts, ABD) aşağıda belirtilen protokole göre hücrelere transfekte edilmiştir.

1. Hücreler 75 cm²'lik flasklarda %80-90 oranında çoğaldıktan sonra tripsinizasyon ile kaldırılıp 12 kuyucuklu steril plaklara 0.8-3.10⁵ hücre/ml (250.000) olacak şekilde ekim yapılarak transfeksiyon işlemine geçilmiştir (Reverse Transfection).
2. (0,4 µl/1nmol) mimik-kontrol-scrambled miRNA transfeksiyonu için, 200µl hücre kültür medyumuna ve 6 µl transfeksiyon reagent karıştırılarak 5-10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (Deney grupları şekil 3.2'de gösterilmiştir.).
3. İnkübasyon sonrasında hazırlanan bu karışım hücre ekili plaklara damla damla verilerek karıştırılmış ve 48 saat inkübe edilmiştir.
4. Transfeksiyon kontrolü total RNA izolasyonu yapılarak ilişkilendirilmiş miRNA'nın ekspresyonuna bakılarak doğrulanmıştır.



Şekil 3.2. Mimik transfeksiyon deney grupları (SF-WT:Hücre-Wild Type; NC:Negatif Kontrol-Scrambled miRNA; TR:Transfeksiyon Reaktifi).

3.4.1. Transfekte hücre soylarından miRNA izolasyonu ve transfeksiyonun doğrulanması

Hsa-miR-24-3p, hsa-miR-128-3p ve hsa-miR-149-5p miRNA transfeksiyonu yapılmış hücre soylarından miRNA izolasyonu üretici firmanın önerdiği protokol takip edilerek yapılmıştır. Bu aşamada ticari adı Qiagen miRNeasy mini Kit (Cat No./ID:217004) (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılmıştır. Kit seti içerisinde 50 RNeasy MinElute Spin Columns, Collection Tubes (1.5ml-2ml), QIAzol Lysis Reagent, RNase-free Reagents ve Wash Buffers bulunmaktadır. Kitin iş akış prosedürü;

1. Transfekte hücreler tripsinizasyon ile kaldırılarak santrifüj yardımıyla çöktürülüp üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent eklenmiştir.
2. Elde edilen homejenat oda sıcaklığında (15-25°C) 5 dakika boyunca muhafaza edilerek, üzerine 140 µl kloroform eklenip, 10 sn boyunca vorteksenerek açık pembe renk gözlenmiştir. 2-3 dakika boyunca oda sıcaklığında tutulup 15 dakika boyunca 4°C'de 12.000 g'de santrifüj edilip üst faz yeni bir tüpe alınmıştır.
3. Tüpteki miktarın 1,5 katı (yaklaşık 600 µl) 100% etanol eklenerek karışım homojen hale getirilmiştir. Bu karışımdan en fazla 700 µl olacak şekilde 2 ml'lik toplama tüplerine (miRNeasy Mini kolona) yüklenmiştir.
4. Oda sıcaklığında 20 sn boyunca 8000 g'de santrifüje tabi tutularak, toplama tüpünde biriken kalıntı atılmıştır (kalan örnek bitene kadar bu işlem tekrar edildi).
5. Temiz bir toplama tüpüne alınan miRNeasy Mini kolona 700 µl Buffer RWT çözültisi eklenerek oda sıcaklığında 20 sn boyunca 8000 g'de santrifüj edilmiştir.
6. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona bu sefer 500 µl Buffer RPE çözültisi eklenerek yine oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000 g'de santrifüj edilmiştir (Not: Kullanmadan önce Buffer RWT ve RPE çözültilerine %96-100 etanol eklenerek hazırlandı.).
7. Temiz bir toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona tekrar 500 µl Buffer RPE çözültisi eklenerek bu sefer oda sıcaklığında 2 dk boyunca 8000 g'de santrifüj edilmiştir.
8. 1,5 ml'lik toplama tüpüne alınan RNeasy Mini kolona 30-50 µl RNase içermeyen su eklenip oda sıcaklığında 1 dk bekletilerek 1 dk boyunca 8000g'de santrifüj edilmiştir. İzole edilen miRNA'lar kullanım sürecine kadar -80 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. RNA konsantrasyonu ve kalitesi tayini için NanoDrop ND-

1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ABD) cihazında spektrofotometrik ölçüm ile yapılmıştır.

3.4.2. miRNA'dan cDNA sentezi

miRNA'dan cDNA sentezi için üretici firmanın önerdiği protokol takip edilerek yapılmıştır. Bu aşamada ticari adı Qiagen miScript II RT Kit (Cat No./ID:218161) (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak tablo 3.9.'da belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3.9. Revers Transkriptaz PCR karışımı.

Bileşenler	Hacim (µl)
5x miScript HiSpec tamponu	2
10x miScript Nükleik asit karışımı	1
miScript Reverse Transcriptase Mix	1
Rnaz/Dnaz içermeyen su	1
Kalıp RNA	5
Toplam	10 µl

37°C'de 60 dk, 95°C'de 5 dk olan tepkime koşullarına göre PCR yapılarak cDNA miktarları 200 ng/µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan örnekler kullanılabilecek kadar -20°C de saklanmıştır.

3.4.3. Real-Time PCR (qPCR-miRNA)

Eş zamanlı PCR reaksiyonu Rotor Gene 6000 Real-Time PCR (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazında yapılacak PCR işleminden önce tablo 3.10.'da belirtilen miktarlarda qPCR karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3.10. miRNA qPCR karışımı.

Bileşenler	Hacim (µl)
SYBR Green PCR-(miRNA)	6.25
Universal Primer	1.25
Primer Assay (ilgili miRNA primer)	1.25
Rnaz/Dnaz içermeyen su	3.125
Kalıp cDNA (200ng/µl)	0.63
Total	12.5

Hazırlanan karışımdan 12.5 µl ve her örneğe ait cDNA'dan 1 µl karıştırılarak Tablo 3.11'de belirtilen PCR koşullarında reaksiyon yapılmıştır.

Tablo 3.11. qPCR Tepkime koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre(sn)	
Enzim aktivasyonu	95	15 dk	
Denaturasyon	94	15	} 40 döngü
Primer bağlanması/uzama	55	30	
Erime eğrisi	70	30	

3.4.3.1. miRNA primer dizileri

miRNA transfeksiyonunun doğrulanması için transfekte edilen miRNA'ların (miRNA primer dizileri tablo 3.12.'de listelenmiştir) ekspresyonları analiz edilmiştir.

Tablo 3.12. miRNA primer dizileri.

miRNA	Primer dizisi	Cat.No.
Hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	MS00006552
Hsa-miR-149-5p	UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC	MS00003570
Hsa-miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	MS00008582

3.4.3.2. miRNA Real-Time PCR Sonuçlarının Analizi

Hücre soylarına ait hsa-miR-24-3p, hsa-miR-128-3p ve hsa-miR-149-5p miRNA'larının transfeksiyonu sonrası ekspresyon düzeyleri ΔC_t ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5. Akridin Oranj / Etidyum Bromür (AO/EB) Boyaması

miRNA transfeksiyonu yapılmış hücrelerde apoptozisin morfolojik olarak tespit edilmesi için kullanılmıştır. Transfekte edilmiş hücreler inkübasyon sonrasında PBS ile yıkanarak %70 etanol ile fiks edilmiştir. Fiksasyonun sonunda hücreler distile su ile yıkanarak Akridin orange/Ethidium bromide (Cat No./ID:A6014-E1510) (Sigma Aldrich, Almanya) çalışma solüsyonu ile boyanarak floresans mikroskobu altında görüntü alınmıştır.

3.6. Akım Sitometri Yöntemi ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi

Akım sitometrik ölçümlerde kullanılan Annexin V boyası, apoptotik hücrelerin plazma zarının dış yüzeyinde bulunan ve bir apoptozis belirteci olarak bilinen fosfatidilserine bağlanma özelliğinden dolayı kullanılmaktadır. Transfekte edilen hücrelerde apoptozisi tespit etmek için Annexin V ve PI (Propidium İodide) boyalarını içeren BD FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Cat No./ID:556547) (BD, New Jersey, ABD) kullanılmıştır. Kit prosedürüne göre;

1. 6 kuyucuklu steril plakalara $1-6 \cdot 10^5$ hücre/ml ekim yapılarak hücreler yaklaşık 1 gün sonrasında belirlenen dozda miRNA mimik (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-128-3p ve hsa-miR-149-5p) ve negatif kontrol (scrambled miRNA) ile 48 saat inkübe edilmiştir.
2. Hücreler tripsin ile kaldırılarak 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak süspanse edilmiştir.
3. Hücre süspanسیونlarının üzerine 1ml PBS eklenip 2 kez yıkanmıştır.
4. 1X binding buffer (boyaların bağlanması için) eklenip 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek, 500 μ l 1X binding buffer ile süspanse edilmiştir.
5. 100 μ l hücre süspanسیونu üzerine 5 μ l Annexin V, 5 μ l PI eklenip, hafifçe karıştırılarak 15 dk karanlık ortamda inkübe edilmiştir.

6. Hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılarak 500 µl 1X binding buffer içerisinde BD FACS via (BD, New Jersey, ABD) akım sitometri cihazında analiz edilmiştir.

3.7. Akım Sitometri Yöntemi ile Hücre Döngüsü Analizi

Transfeksiyon sonrası hücrelerin DNA içeriğini tespit etmek için PI boyası içeren BD Cycletest™ Plus DNA Kit (Cat No./ID:340242) (BD, New Jersey, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

1. 6 kuyucuklu steril plakalara $1-6 \cdot 10^5$ hücre/ml ekim yapılarak hücreler yaklaşık 1 gün sonrasında belirlenen dozda miRNA mimik (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-128-3p ve hsa-miR-149-5p) ve negatif kontrol (scrambled miRNA) ile 48 saat inkübe edilmiştir.
2. Hücreler tripsin ile kaldırılarak 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak süspanse edilmiştir.
3. Hücre süspanسیونlarının üzerine 1ml PBS eklenip 2 kez yıkanmıştır.
4. 1X binding buffer (boyaların bağlanması için) eklenip 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
5. Hücre pelleti üzerine 250 µl solution A (Trypsin) eklenerek hafifçe karıştırılmış ve 10 dk karanlık ortamda inkübe edildikten sonra 200 µl solution B (Trypsin inhibitörü) eklenerek tekrar 10 dk karanlık ortamda inkübe edilmiştir.
6. Hücreler, 200 µl solution C (PI) ile 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra BD FACS via (BD, New Jersey, ABD) akım sitometri cihazında analiz edilmiştir.

3.8. Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü (JC-1)

Transfeksiyon sonrası hücrelerin mitokondri membran potansiyelini ölçmek için BD™ MitoScreen (JC-1) (Cat No./ID:551302) (BD, New Jersey, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

1. 6 kuyucuklu steril plakalara $1-6 \cdot 10^5$ hücre/ml ekim yapılarak hücreler yaklaşık 1 gün sonrasında belirlenen dozda miRNA mimik (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-128-3p ve hsa-miR-149-5p) ve negatif kontrol (scrambled miRNA) ile 48 saat inkübe edilmiştir.

2. Hücreler tripsin ile kaldırılarak 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak süspanse edilmiştir.
3. Liyofilize JC-1 boyası üzerine 125 µl DMSO eklenerek stok solüsyonu hazırlanmış ve her örnek için 500 µl stok boya ve 1X Assay buffer kullanılarak çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.
4. Çalışma solüsyonu eklenen hücre pelletleri 37 °C'de 15 dk inkübe edildikten sonra santrifüj edilerek 2 kez 1X Assay buffer ile yıkanmıştır.
5. Son aşamada 500 µl 1X Assay buffer eklenerek BD FACS via (BD, New Jersey, ABD) akım sitometri cihazında analiz edilmiştir.
6. Mitokondri membran potansiyeli bozulan hücreler ölen hücre yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.9. Hücre İçi Serbest Reaktif Oksijen (ROS) Seviyelerinin Ölçümü

Transfeksiyon sonrası hücre içi serbest reaktif oksijen seviyesini ölçmek için Muse™ Oxidative Stress Kiti (Cat No./ID: MCH100111) (Merc Millipore, Massachusetts, ABD) üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

1. 6 kuyucuklu steril plakalara $1-6 \cdot 10^5$ hücre/ml ekim yapılarak hücreler yaklaşık 1 gün sonrasında belirlenen dozda miRNA mimik (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-128-3p ve hsa-miR-149-5p) ve negatif kontrol (scrambled miRNA) ile 48 saat inkübe edilmiştir.
2. Hücreler tripsin ile kaldırılarak 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak süspanse edilmiştir.
3. Stok solüsyonu 1:100 dilüsyon (2µl of Muse® Oxidative Stress Reagent stock solution ve 198µl 1X Assay Buffer) ile ara çalışma solüsyonu ise stok solüsyonunun 1:80 oranında dilüsyon ile (23.25 µl of stok solüsyonu ve 1.876,25 µl 1X Assay Buffer) hazırlanmıştır.
4. 10 µl hücre pelleti ve 190 µl ara çalışma solüsyonu karıştırılıp 37 °C'de 30 dk inkübe edilerek BD FACS via (BD, New Jersey, ABD) akım sitometri cihazında analiz edilmiştir.
5. Değişen ROS oranı grafikte ROS+ olarak ifade edilmiştir.

3.10. Hücre İçi Serbest Aminoasit Profiline İncelenmesi (LC-MS/MS)

miRNA transfeksiyonu sonrası aminoasit değişimlerini belirlemek için hücre içi serbest aminoasit profillemesi (alanin, arginin, aspartik asit, asparagin, 2-amino-butirik asit, argininosükkininik asit, anserin, 2-amino-adipik asit, 3-amino-izobütirik asit, beta- alanin, etanolamin, fenilalanin, fosfosinolin, fosforerin, o-fosforil etanolamin, gama aminobütirik asit, glutamik asit, glisin, glutamin, hidroksiprolin, homosirkülin, homosistein, histidin, hirosilisin, izolösin, karnozin, lizin, lösin, metiyonin, 3-metilhistidin, 1-metilhistidin, norvalin, ornitin, prolin, sistin, sistatyonin, sarkosin, sitrulin, serin, taurin, triptofan, tirosin, treonin, valin) JASEM (Lot No:CL-5500420160830) (JASEM, Türkiye) kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

1. Transfekte hücreler Qiagen Tissue Lyser kullanılarak 1X PBS (500µl) içerisinde homojenize edilmiş ve süpernatant üzerine 25 µl internal standart + 350 µl R1 (Reagent 1) eklenerek karıştırılmıştır.
2. 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek 150-200 µl arası süpernatant insörtlü vial şişelere alınarak 3 tekrar 8045 LC-MS/MS cihazında çalışılmıştır.

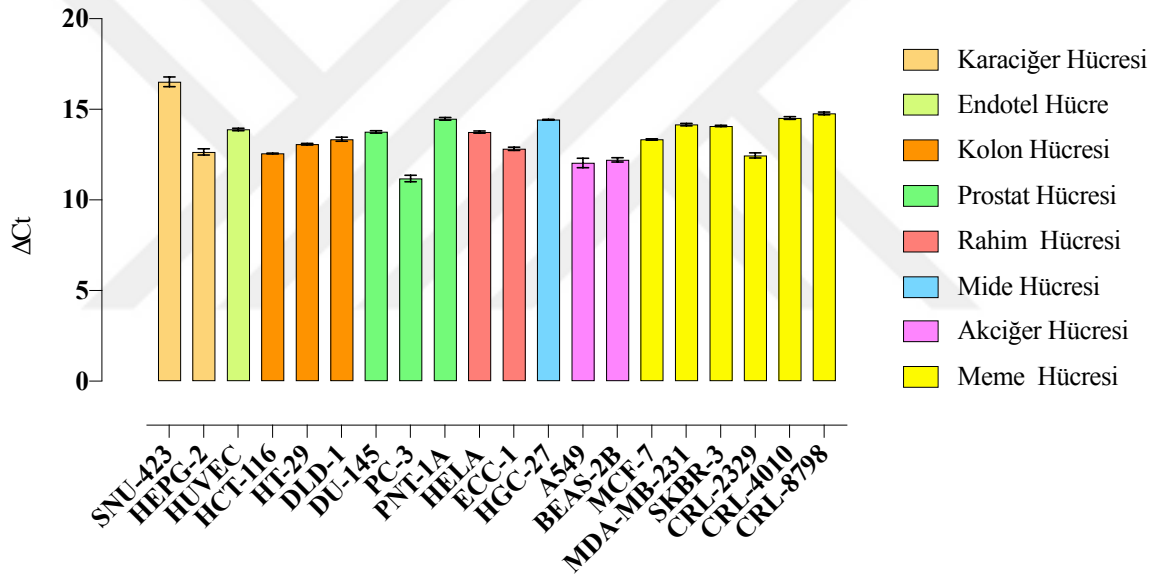
3.11. İstatistiksel Analizler

Deneyler sonrası elde edilen veriler GraphPad prism 8 (GraphPad Software, Inc, San Diego, ABD) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Verilerin ortalama ve standart sapma (SD) değerlerinin analizi en az üç bağımsız deney tekrarından sonra Column Statistics ile yapılmıştır. Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğunu test etmek için Shapiro-Wilk normality testi kullanılmıştır. Normal dağılıma uymayan bağımsız ikili grup kıyaslamalarında Mann-Whitney U testi, üçlü grup kıyaslamalarında Kruskal-Wallis H testi ve post-hoc testlerden Dunn's testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uyan bağımsız iki grup kıyaslamalarında Student-t testi ve üçlü grup kıyaslamalarında One-Way ANOVA ve post-hoc testlerden Tukey testi uygulanmıştır. Gruplar arası anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiş ve anlamlılık dereceleri * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Farklı Hücre Soylarında CCT3 Profillemesi

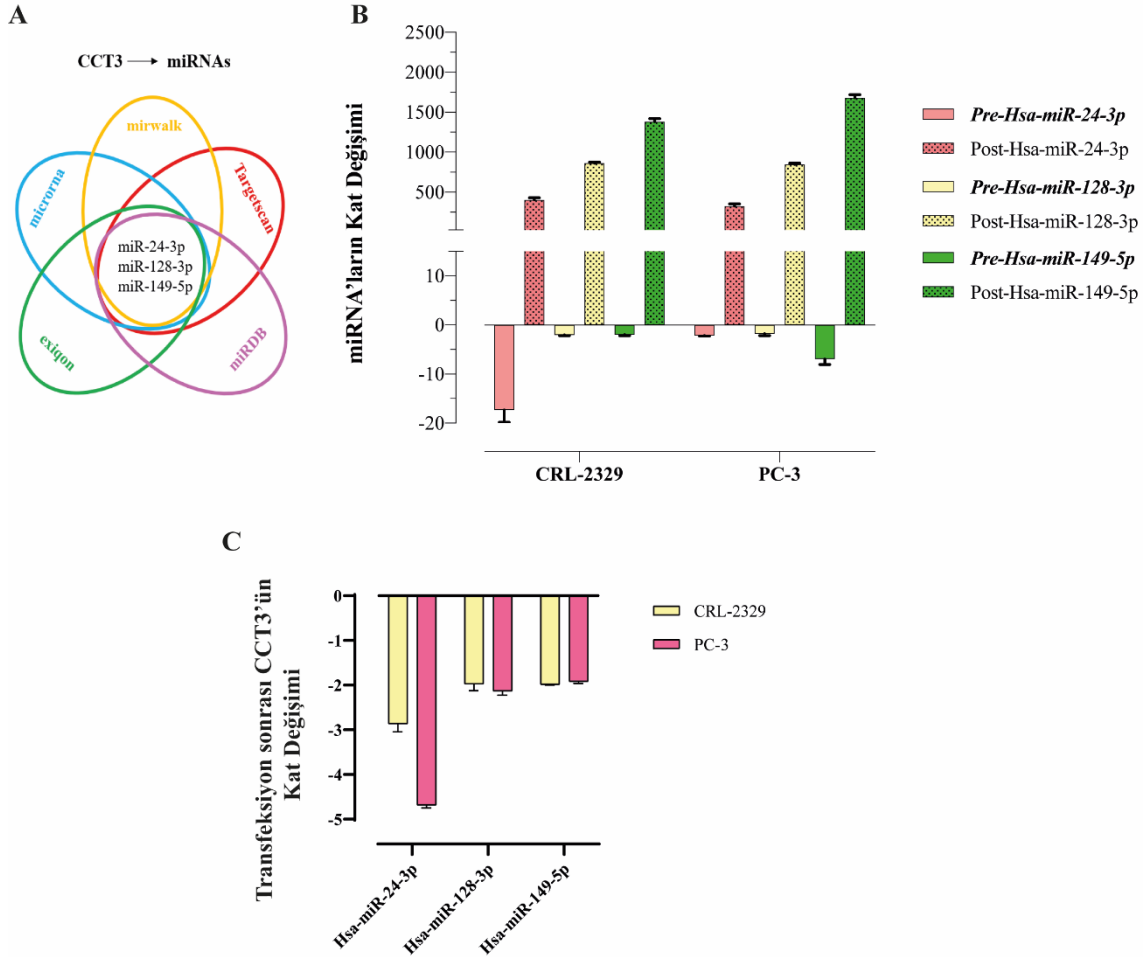
Kanser hücre hatları (SNU-423, HEPG-2, HCT-116, HT-29, DLD-1, DU-145, PC-3, HELA, ECC-1, HGC-27, A549, MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3, CRL-2329) ve normal hücre hatlarında (HUVEC, PNT-1A, BEAS-2B, CRL-4010 ve CRL-8798) CCT3 gen ekspresyon profillemesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, rölatif gen ifadesi (relative expression) hesaplanmıştır (Şekil 4.1.). $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sonucuna göre, CRL-2329 (kat değişimi: 4,34) ve PC-3 (kat değişimi: 10,5) hücre hatlarında CCT3 gen ekspresyonunun yüksek olduğu tespit edilmiştir (** $p<0,01$).



Şekil 4.1. Tüm hücrelerde CCT3 gen profillemesi (Bar: %95 güven aralığını göstermektedir).

CCT3 gen ekspresyonu yüksek olan hücre hatlarında belirlenen miRNA'ların (şekil 4.2A) ekspresyonları araştırılmıştır. CCT3 ekspresyonu yüksek olan hücre hatlarında miRNA ekspresyonlarının RNU6'ya göre düşük olduğu bulunmuştur (** $p<0,01$). Mimik transfeksiyonu yardımıyla düşük bulunan miRNA'ların ekspresyonları >500 kat artırılmıştır (Şekil 4.2B.). Transfeksiyon sonrası, CCT3 gen ekspresyonlarının azaldığı gösterilerek miRNA transfeksiyon etkililiği doğrulanmıştır (Şekil 4.2.C). Bu aşamada

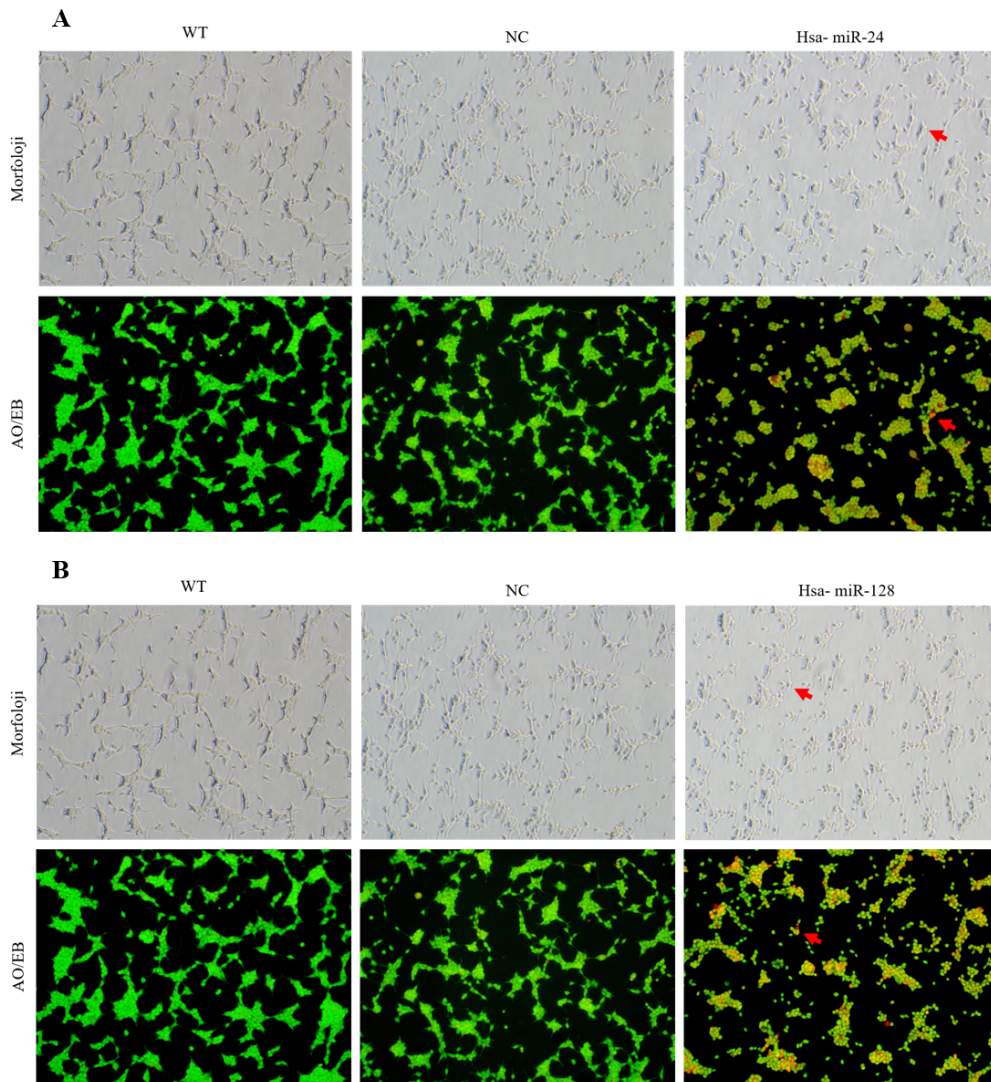
belirlenen mimik transfeksiyon koşulları, diğer deneylerde değiştirilmeden kullanılmıştır (**p<0,01).

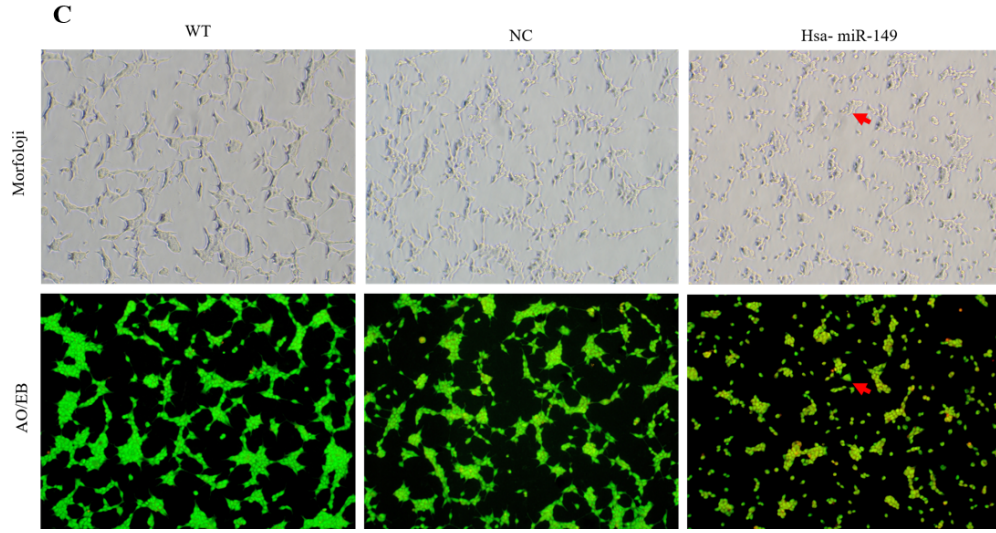


Şekil 4.2. Transfeksiyon öncesi ve sonrası miRNA'ların ekspresyon düzeyleri. **A.** Farklı veritabanları kullanılarak CCT3'ü hedefleyen miRNA'ların “venn şema” sında gösterimi. **B.** CRL-2329 ve PC-3 hücrelerinde miRNA transfeksiyonu öncesi ve sonrası kat değişim grafiği. **C.** miRNA transfeksiyonu sonrası CCT3 ekspresyonunun kat değişim grafiği.

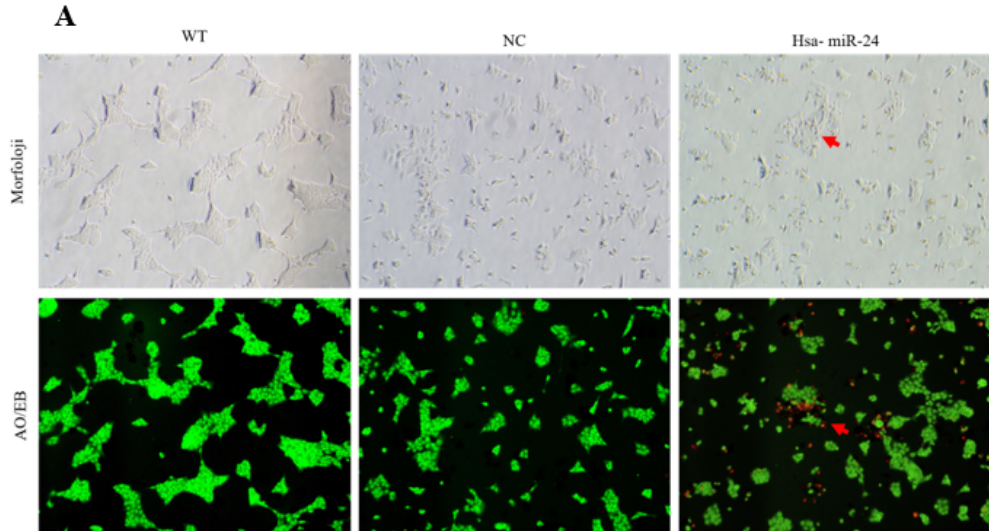
4.2. Akridin Oranj / Etidyum Bromür (AO/EB) Boyaması

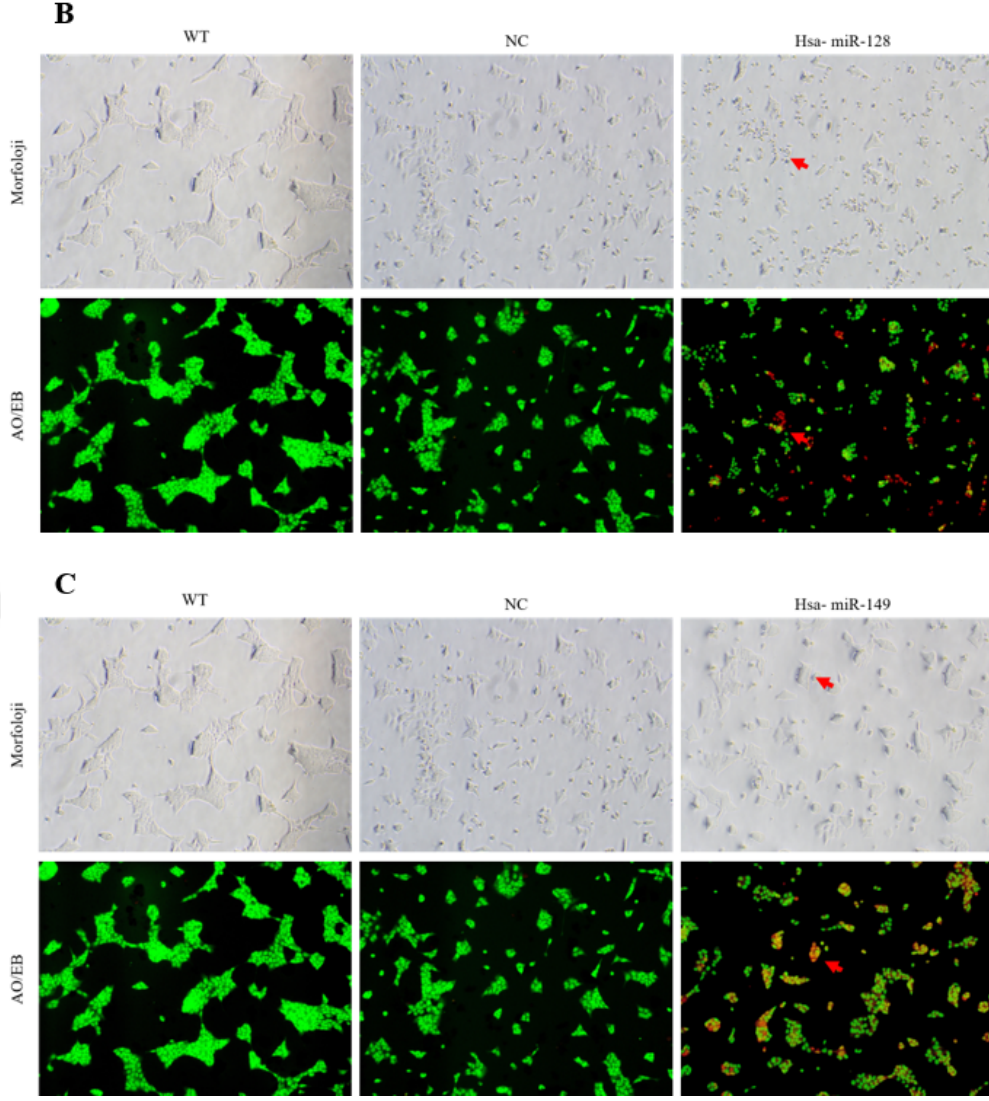
Hücre ölümüne özgü özelliklerin belirlenebilmesi için floresan mikroskobu ve spesifik boyalar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple kullanılan boyalardan biri olan akridin oranj boyası, hücrelerin DNA'sına bağlanarak yeşil floresans, etidyum bromür boyası ise membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin DNA'sına bağlanıp kırmızı floresans yaymaktadır (apoptozisin geç evresi ve nekroz). Yapılan ikili boyama sonucuna göre, mimik transfekte edilen hücrelerin kontrol hücrelerine (WT) kıyasla morfolojik olarak (daha yuvarlak ve hücre/hücre bağlantılarını kaybettikleri) değiştiği ve hücrelerin membran bütünlüğünü kaybederek turuncu-kırmızı floresans ışık yaydığı gözlenmiştir (Apoptotik hücre örneği kırmızı ok ile gösterilmektedir). Bu bulgular, hücrelerde CCT3 ekspresyonunun azalmasının hücre sağkalımını etkilediğini ve apoptotik mekanizmayı yeniden organize ettiğini önermektedir. Şekil 4.3'te CRL-2329 ve Şekil 4.4'te PC-3 hücrelerinin AO/EB boyama sonuçları verilmiştir.





Şekil 4.3. CRL-2329 hücrelerinin mimik transfeksiyonu sonrası AO/EB boyaması. **A.** miR-24-3p, hücrelerde apoptozisi tetiklemiştir (sarı-turuncu). **B.** miR-128-3p, hücrelerde geç apoptotik karakteri (daha yuvarlak ve turuncu-kırmızı) belirginleştirmiştir. **C.** miR-149-5p, hücrelerde erken apoptotik (sarı-turuncu) karakter oluşturmuştur. **Yeşil:** Canlı; **Sarı-turuncu:** Erken ve geç apoptotik; **Kırmızı:** Geç apoptotik ve nekrotik hücreler. Objektif 20X.



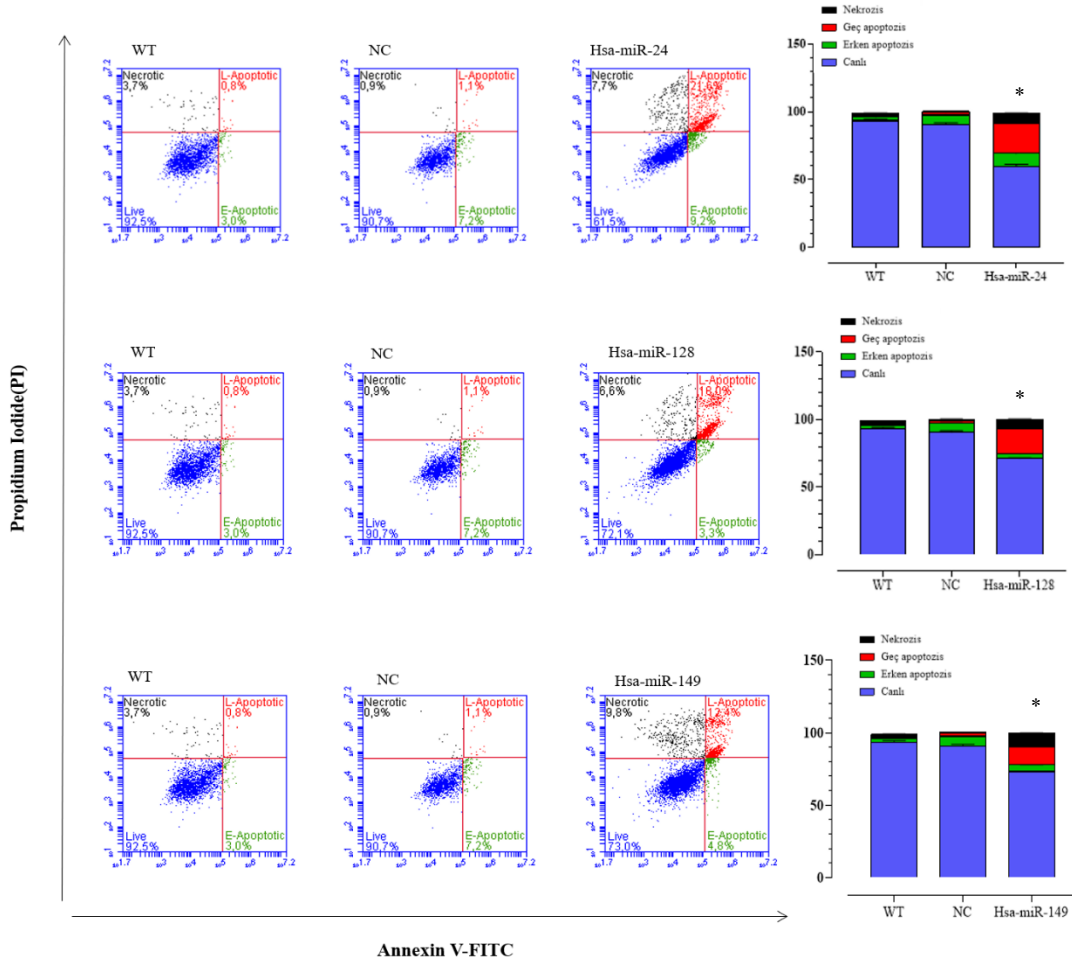


Şekil 4.4. PC-3 hücrelerinin mimik transfeksiyonu sonrası AO/EB boyaması. **A.** miR-24-3p, hücrelerde geç apoptotik karakter (yuvarlak ve turuncu-kırmızı) oluşturmuştur. **B.** miR-128-3p, hücrelerde geç apoptotik karakter (yuvarlak ve turuncu-kırmızı) tetiklemiştir. **C.** miR-149-5p, hücrelerde erken (sarı) ve geç apoptotik (yuvarlak ve turuncu-kırmızı) karakteri bir arada göstermiştir. **Yeşil:** Canlı; **Sarı-turuncu:** Erken ve geç apoptotik; **Kırmızı:** Geç apoptotik ve nekrotik hücreler. Objektif 20X.

4.3. Akım Sitometride Apoptotik Hücre Oranları

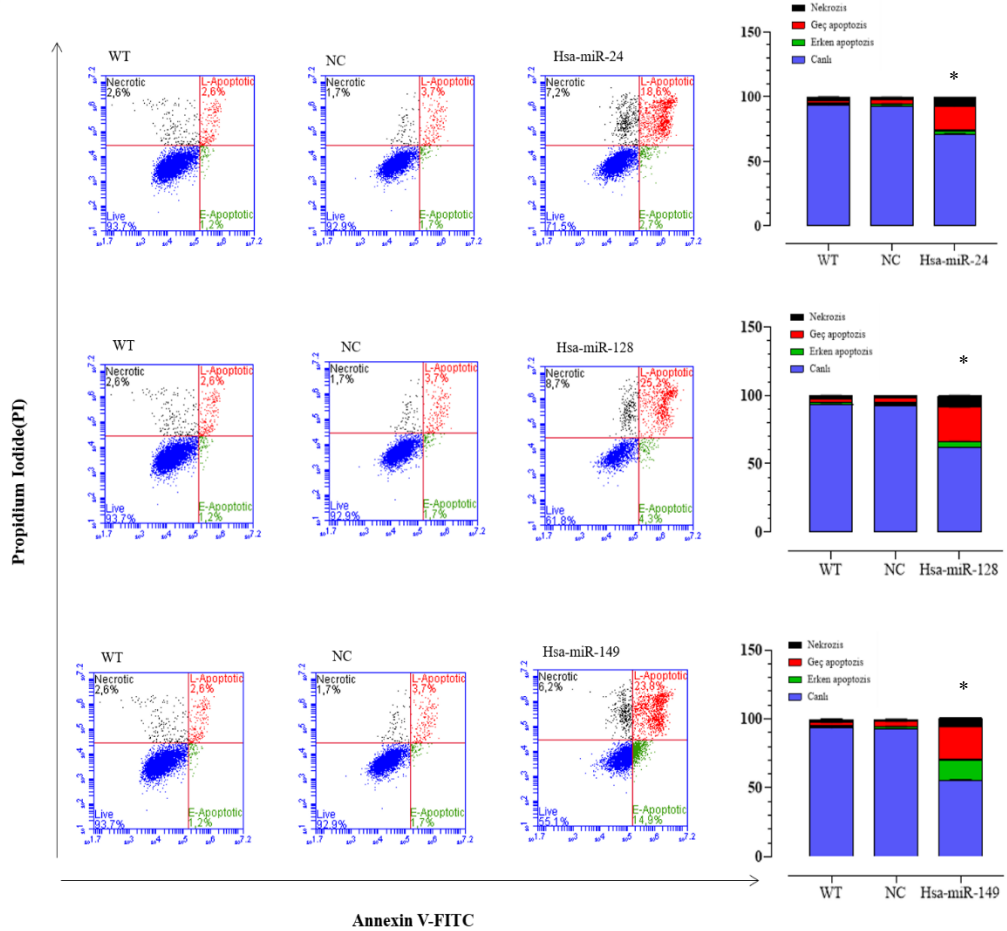
CRL-2329 ve PC-3 hücrelerine mimik transfeksiyonu sonrası yapılan Annexin/V-PI boyaması sonucuna göre; her iki hücre tipinde, kontrol grubuna kıyasla CCT3'ün baskılanması apoptotik hücre yüzdesini anlamlı düzeyde arttırmıştır. CRL-2329 hücresinde Annexin-V/PI boyama sonucuna göre hücre ölüm oranları sırasıyla WT (yabanıl tip)'de erken apoptotik hücre oranı %3, geç apoptotik hücre oranı %0,8, ve

toplam apoptotik hücre oranı %3,8; NC'de erken apoptotik hücre oranı %7,2, geç apoptotik hücre oranı %1,1 ve toplam apoptotik hücre oranı %8,3 olarak bulunmuştur. Bunun yanında, mimik transfeksiyonu yapılan gruplardan hsa-miR-24-3p'de erken apoptotik hücre oranı %9,2, geç apoptotik hücre oranı %21,6 ve toplam apoptotik hücre oranı %30,8; hsa-miR-128-3p'de erken apoptotik hücre oranı %3,3, geç apoptotik hücre oranı %18 ve toplam apoptotik hücre oranı %21,3; ve hsa-miR-149-5p'de erken apoptotik hücre oranı %4,8, geç apoptotik hücre oranı %12,4 ve toplam apoptotik hücre oranı %17,2 olarak bulunmuştur. Gruplar arası sonuçlar kıyaslandığında mimik transfeksiyonuyla inhibe edilen CCT3 ekspresyonunun apoptotik hücre oranını arttırdığı tespit edilmiştir (*p<0,05) (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. CRL-2329 hücrelerinin mimik transfeksiyonları sonrası Annexin-V/PI boyama sonuçları. **Mavi:** Canlı-[(FITC-)/(PI-)]; **Yeşil:** Erken apoptotik [(FITC+)/(PI-)]; **Kırmızı:** Geç apoptotik [(FITC+)/(PI+)]; **Siyah:** Nekrotik [(FITC+)/(PI+)] hücreleri göstermektedir.

PC-3 hücresinde Annexin-V/PI boyama sonucuna göre hücre ölüm oranları sırasıyla WT (yabanıl tip)'de erken apoptotik hücre oranı %1,2, geç apoptotik hücre oranı %2,6 ve toplam apoptotik hücre oranı %3,8; NC'de erken apoptotik hücre oranı %1,7, geç apoptotik hücre oranı %3,7 ve toplam apoptotik hücre oranı %5,4 olarak bulunmuştur. Bunun yanında, mimik transfeksiyonu yapılan gruplardan hsa-miR-24-3p'de erken apoptotik hücre oranı %2,7, geç apoptotik hücre oranı %18,6 ve toplam apoptotik hücre oranı %21,3; hsa-miR-128-3p'de erken apoptotik hücre oranı %4,3, geç apoptotik hücre oranı %25,2 ve toplam apoptotik hücre oranı %29,5; ve hsa-miR-149-5p'de erken apoptotik hücre oranı %14,9, geç apoptotik hücre oranı %23,8 ve toplam apoptotik hücre oranı %38,7 olarak bulunmuştur. Gruplar arası sonuçlar kıyaslandığında mimik transfeksiyonuyla inhibe edilen CCT3 ekspresyonunun apoptotik hücre oranını arttırdığı tespit edilmiştir (* $p < 0,05$) (Şekil 4.6.).



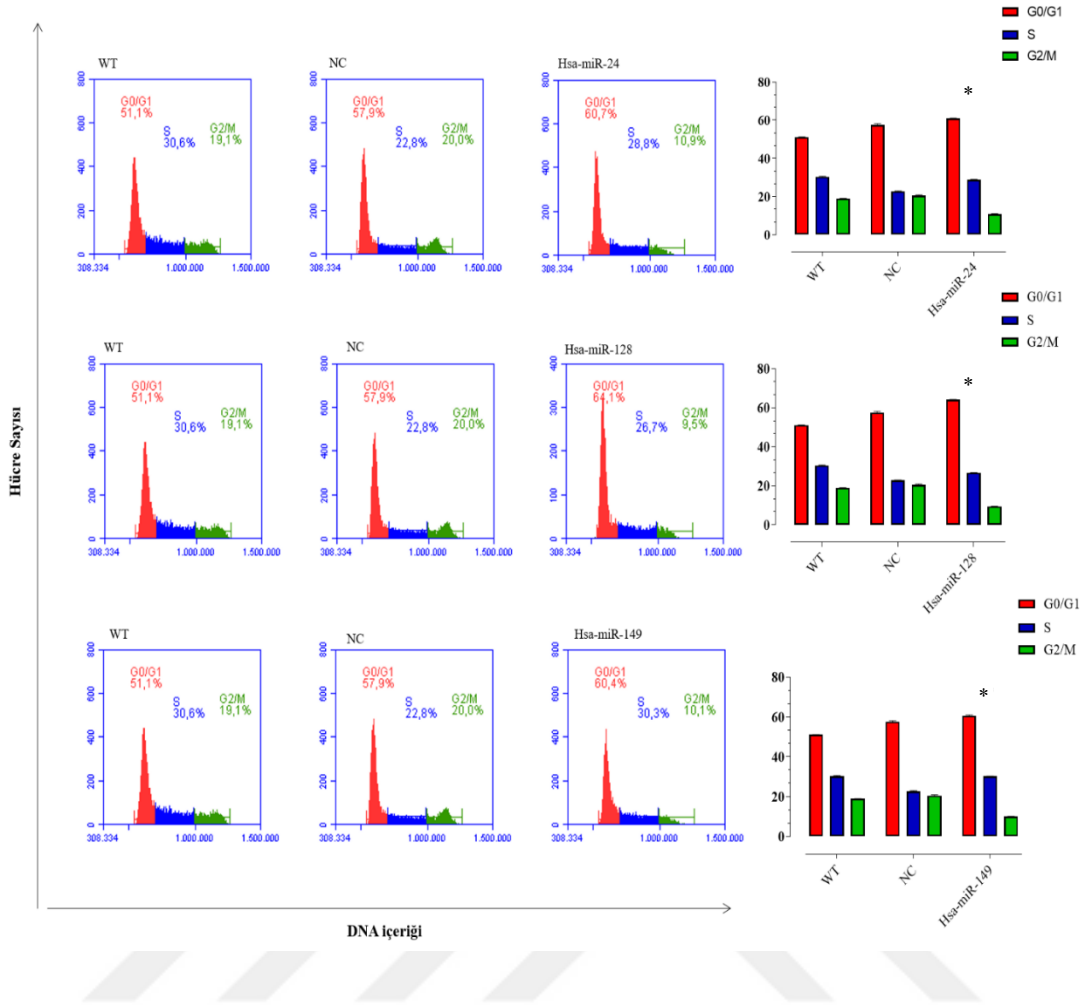
Şekil 4.6. PC-3 hücrelerinin mimik transfeksiyonları sonrası Annexin-V/PI boyama sonuçları. **Mavi:** Canlı-[(FITC-)/(PI-)]; **Yeşil:** Erken apoptotik [(FITC+)/(PI-)]; **Kırmızı:** Geç apoptotik [(FITC+)/(PI+)]; **Siyah:** Nekrotik [(FITC+)/(PI+)] hücreleri göstermektedir.

4.4. Akım Sitometride Hücre Döngüsü Analizi

CRL-2329 ve PC-3 hücrelerine mimik transfeksiyonu sonrası yapılan hücre döngüsü analiz sonuçlarına göre; her iki hücre tipinde, kontrol grubuna kıyasla CCT3'ün baskılanması hücrelerin G0/G1 fazında yoğunluğunu arttırmıştır.

CRL-2329 hücresinde PI boyama sonucuna göre hücre birikim oranları sırasıyla WT'de G0/G1 fazındaki oran %51,1; S fazındaki oran %30,6 ve G2/M fazındaki oran %19,1; NC'de G0/G1 fazındaki oran %57,9; S fazındaki oran %22,8 ve G2/M fazındaki oran %20 olarak bulunmuştur. Bunun yanında, mimik transfeksiyonu yapılan gruplardan hsa-miR-24-3p'de G0/G1 fazındaki oran %60,7; S fazındaki oran %28,8 ve G2/M fazındaki oran %10,9; hsa-miR-128-3p'deki G0/G1 fazındaki oran %64,1; S fazındaki oran %26,7 ve G2/M fazındaki oran %9,5; ve hsa-miR-149-5p'deki G0/G1 fazındaki oran %60,4; S fazındaki oran %30,3 ve G2/M fazındaki oran %10,1 olarak ölçülmüştür.

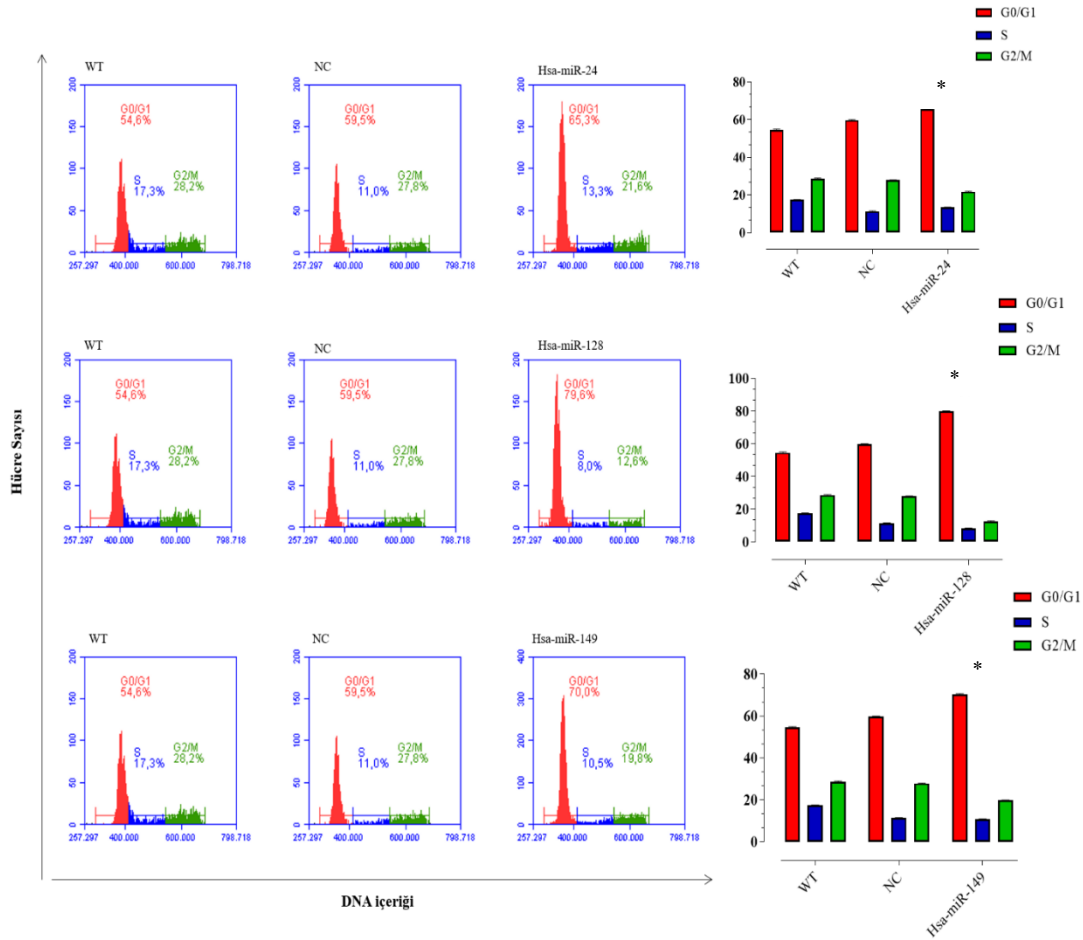
Gruplardaki hücre birikim oranları kıyaslandığında mimik transfeksiyonu yapılan gruplarda G0/G1 fazındaki hücre oranı artarken G2/M fazındaki hücre oranının azaldığı ve böylece hücre bölünmesinin durduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu mimik transfekste edilen grupların G0/G1 fazındaki hücre oranlarındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (* $p < 0,05$) (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. CRL-2329 hücrelerinin tüm gruplardaki PI boyama sonuçları. **Kırmızı:** G0/G1 fazı; **Mavi:** S fazı; **Yeşil:** G2/M fazı.

PC-3 hücresinde PI boyama sonucuna göre hücre birikim oranları sırasıyla WT’de G0/G1 fazındaki oran %54,6; S fazındaki oran %17,3 ve G2/M fazındaki oran %28,2; NC’de G0/G1 fazındaki oran %59,5; S fazındaki oran %11 ve G2/M fazındaki oran %27,8 olarak bulunmuştur. Bunun yanında, mimik transfeksiyonu yapılan gruplardan hsa-miR-24-3p’de G0/G1 fazındaki oran %65,3; S fazındaki oran %13,3 ve G2/M fazındaki oran %21,6; hsa-miR-128-3p’deki G0/G1 fazındaki oran %79,6; S fazındaki oran %8 ve G2/M fazındaki oran %12,6; ve hsa-miR-149-5p’deki G0/G1 fazındaki oran %70; S fazındaki oran %10,5 ve G2/M fazındaki oran %19,8 olarak ölçülmüştür. Gruplardaki hücre birikim oranları kıyaslandığında mimik transfeksiyonu yapılan gruplarda G0/G1 fazındaki hücre oranı artarken G2/M fazındaki hücre oranının azaldığı ve böylece hücre bölünmesinin durduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucu mimik transfekste edilen

grupların G0/G1 fazındaki hücre oranlarındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir (*p<0,05) (Şekil 4.8.).



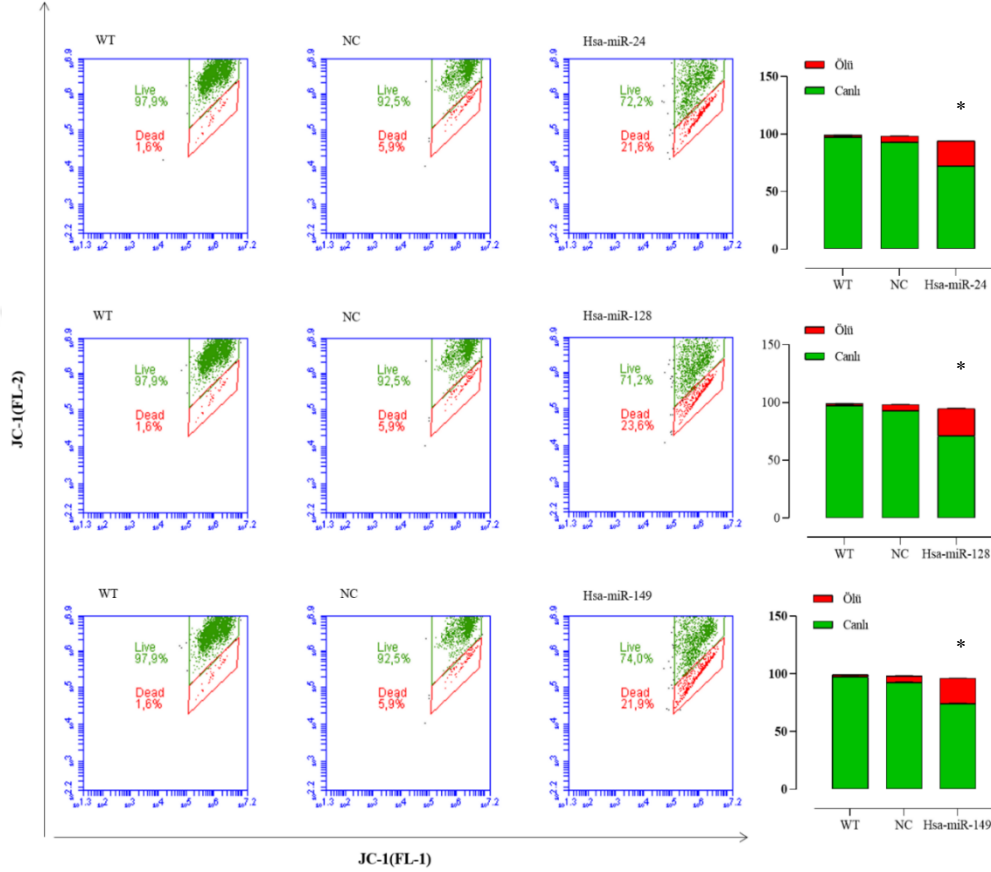
Şekil 4.8. PC-3 hücrelerinin tüm gruplardaki PI boyama sonuçları. **Kırmızı:** G0/G1 fazı; **Mavi:** S fazı; **Yeşil:** G2/M fazı.

4.5. Mitokondri Membran Potansiyeli Oranları ($\Delta\Psi_m$)

CRL-2329 ve PC-3 hücrelerine mimik transfeksiyonu sonrası yapılan mitokondri membran potansiyeli (MMP) analizi sonuçlarına göre; her iki hücre tipinde, kontrol grubuna kıyasla CCT3'ün baskılanmasının hücrelerin mitokondri membran potansiyelini bozduğu tespit edilmiştir.

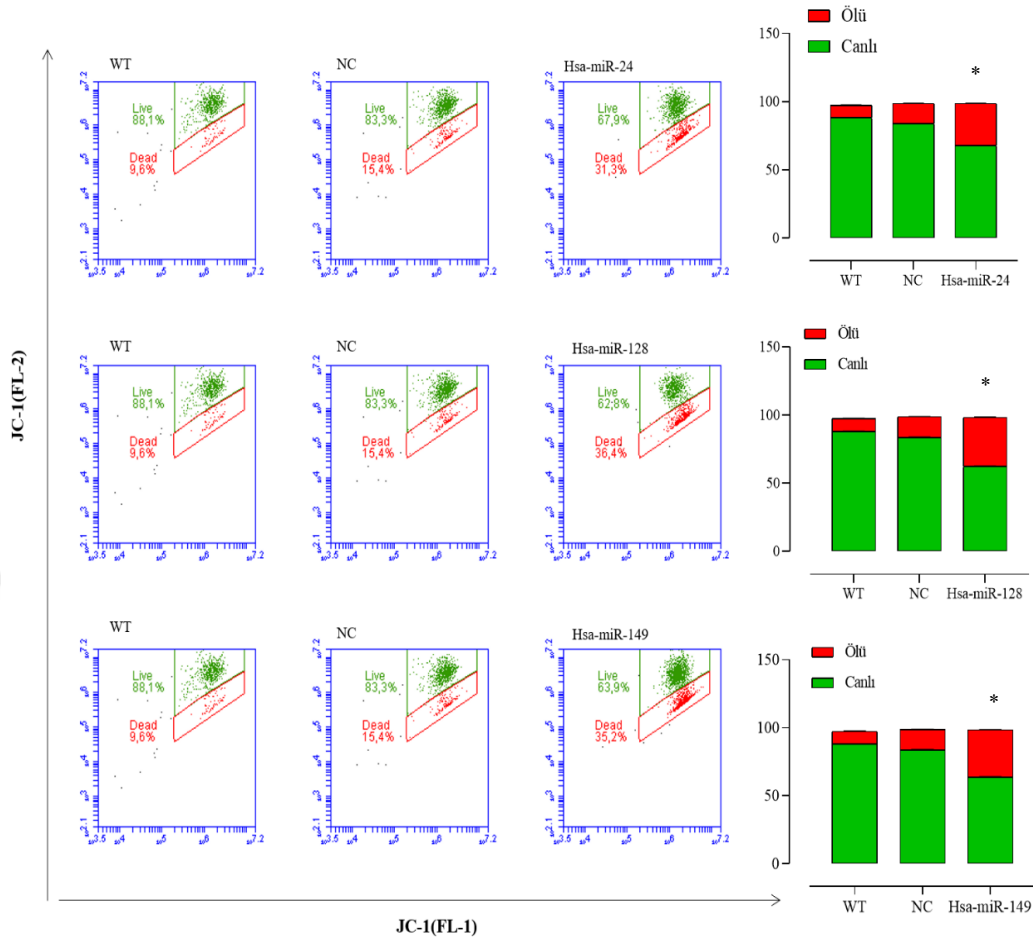
CRL-2329 hücresinde JC-1 boyama sonucuna göre sırasıyla WT'deki canlı hücre oranı %97,9 ve ölü hücre oranı %1,6; NC'deki canlı hücre oranı %97,9 ve ölü hücre oranı %5,9 olarak bulunmuştur. Bunun yanında, mimik transfeksiyonu yapılan gruplardan hsa-miR-

24-3p'deki canlı hücre oranı %72,2 ve ölü hücre oranı %21,6; hsa-miR-128-3p'deki canlı hücre oranı %71,2 ve ölü hücre oranı %23,6; ve hsa-miR-149-5p'deki canlı hücre oranı %74,0 ve ölü hücre oranı %21,9 olarak ölçülmüştür. Gruplar arası sonuçlar istatistiksel olarak kıyaslandığında mimik transfeksiyonu yapılan hücrelerde ölü hücre oranı artmıştır (* $p<0,05$) (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. CRL-2329 hücrelerinin tüm gruplardaki mitokondri membrane potansiyeli ölçümü sonuçları. **Yeşil:** Canlı; **Kırmızı:** Ölü hücre yüzdesini göstermektedir.

PC-3 hücrelerinde JC-1 boyama sonucuna göre sırasıyla WT'deki canlı hücre oranı %88,1 ve ölü hücre oranı %9,6; NC'deki canlı hücre oranı %83,3 ve ölü hücre oranı %15,4 olarak bulunmuştur. Bunun yanında, mimik transfeksiyonu yapılan gruplardan hsa-miR-24-3p'deki canlı hücre oranı %67,9 ve ölü hücre oranı %31,3; hsa-miR-128-3p'deki canlı hücre oranı %62,8 ve ölü hücre oranı %36,4 ve ve hsa-miR-149-5p'deki canlı hücre oranı %63,9 ve ölü hücre oranı %35,2 olarak ölçülmüştür. Gruplar arası sonuçlar istatistiksel olarak kıyaslandığında mimik transfeksiyonu yapılan hücrelerde ölü hücre oranı artmıştır (* $p<0,05$) (Şekil 4.10.).

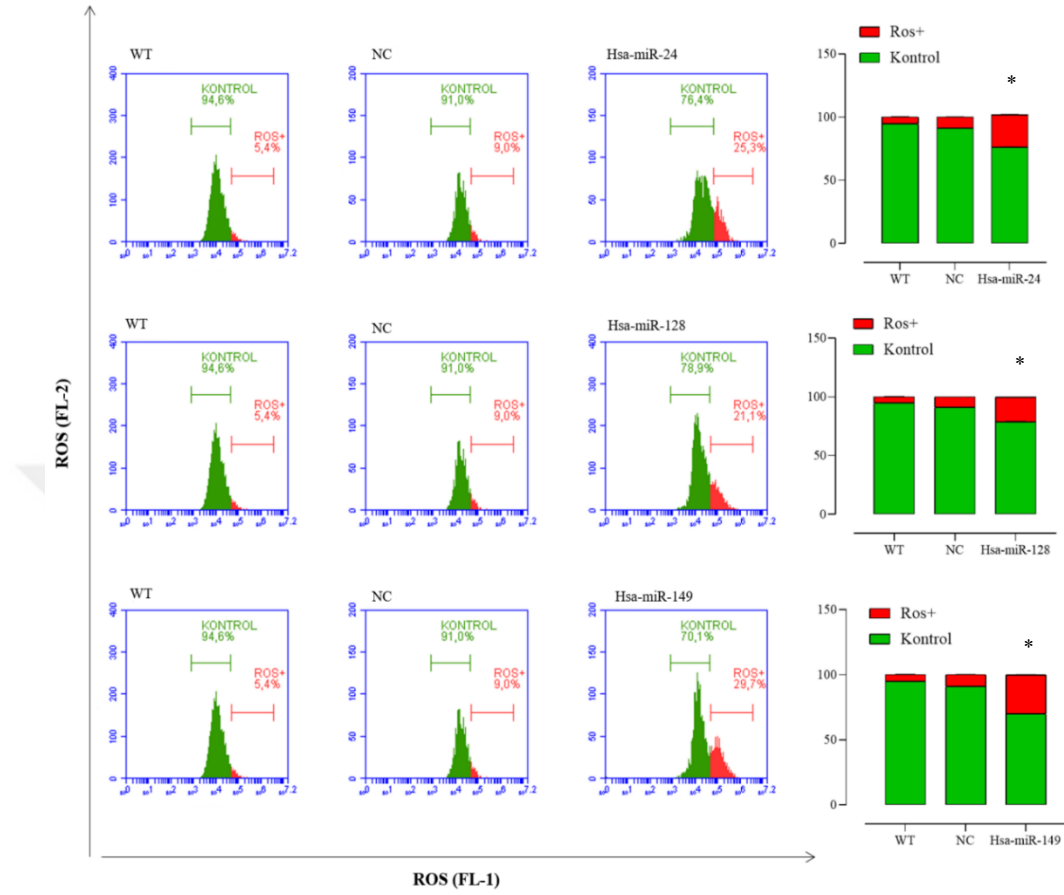


Şekil 4.10. PC-3 hücrelerinin tüm gruplardaki mitokondri membran potansiyeli ölçümü sonuçları. **Yeşil:** Canlı; **Kırmızı:** Ölü hücre yüzdesini göstermektedir.

4.6. Hücre İçi Serbest Reaktif Oksijen (ROS) Seviyesinin Ölçümü

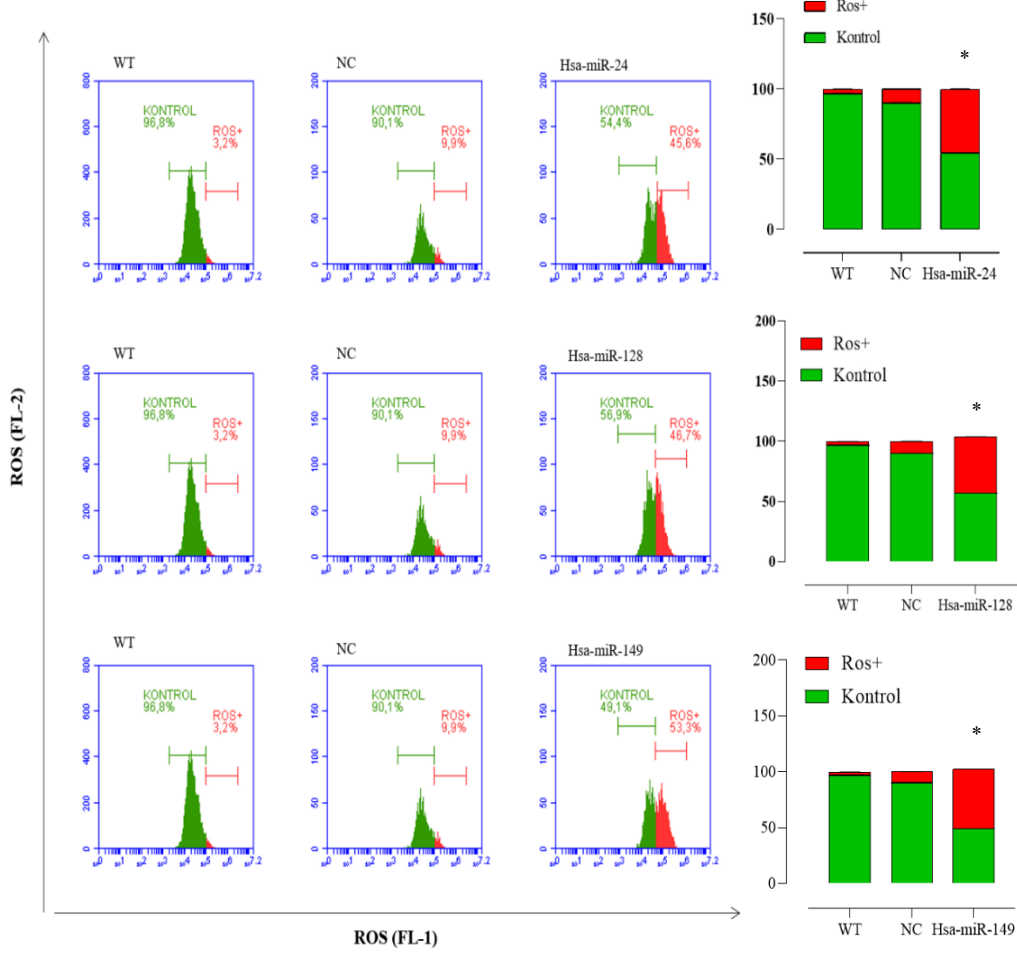
CRL-2329 ve PC-3 hücrelerine mimik transfeksiyonu sonrası yapılan hücre içi ROS seviyesi ölçümü sonuçlarına göre; her iki hücre tipinde, kontrol grubuna kıyasla CCT3'ün baskılanması hücre içi ROS seviyesini arttırmıştır. CRL-2329 hücresinde tüm gruplar sırasıyla WT'deki kontrol (ROS-) hücre oranı %74,6 ve ROS+ hücre oranı %5,4; NC'deki kontrol (ROS-) hücre oranı %91,0 ve ROS+ hücre oranı %9,0 olarak bulunmuştur. Bunun yanında, mimik transfeksiyonu yapılan gruplardan hsa-miR-24-3p'deki kontrol (ROS-) hücre oranı %76,4 ve ROS+ hücre oranı %25,3; hsa-miR-128-3p'deki kontrol (ROS-) hücre oranı %78,9 ve ROS+ hücre oranı %21,1; ve hsa-miR-149-5p'deki kontrol hücre oranı %70,1 ve ROS+ hücre oranı %29,7 olarak ölçülmüştür. Gruplar arası sonuçlar

istatistiksel olarak kıyaslandığında mimik transfeksiyonu yapılan hücrelerde ROS seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (*p<0,05) (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. CRL-2329 hücrelerinin tüm gruplardaki reaktif oksijen seviyesi ölçümü sonuçları. **Yeşil:** Kontrol (ROS-); **Kırmızı:** ROS+ hücre yüzdesini göstermektedir.

PC-3 hücresinde, WT'deki kontrol (ROS-) hücre oranı %96,8 ve ROS+ hücre oranı %3,2; NC'deki kontrol (ROS-) hücre oranı %90,1 ve ROS+ hücre oranı %9,9 olarak bulunmuştur. Bunun yanında, mimik transfeksiyonu yapılan gruplardan hsa-miR-24-3p'deki kontrol (ROS-) hücre oranı %54,4 ve ROS+ hücre oranı %45,6; sa-miR-128-3p'deki kontrol (ROS-) hücre oranı %56,9 ve ROS+ hücre oranı %46,7; ve hsa-miR-149'teki kontrol hücre oranı %49,1 ve ROS+ hücre oranı %53,3 olarak ölçülmüştür. Gruplar arası sonuçlar istatistiksel olarak kıyaslandığında mimik transfeksiyonu yapılan hücrelerde ROS seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (*p<0,05) (Şekil 4.12.).

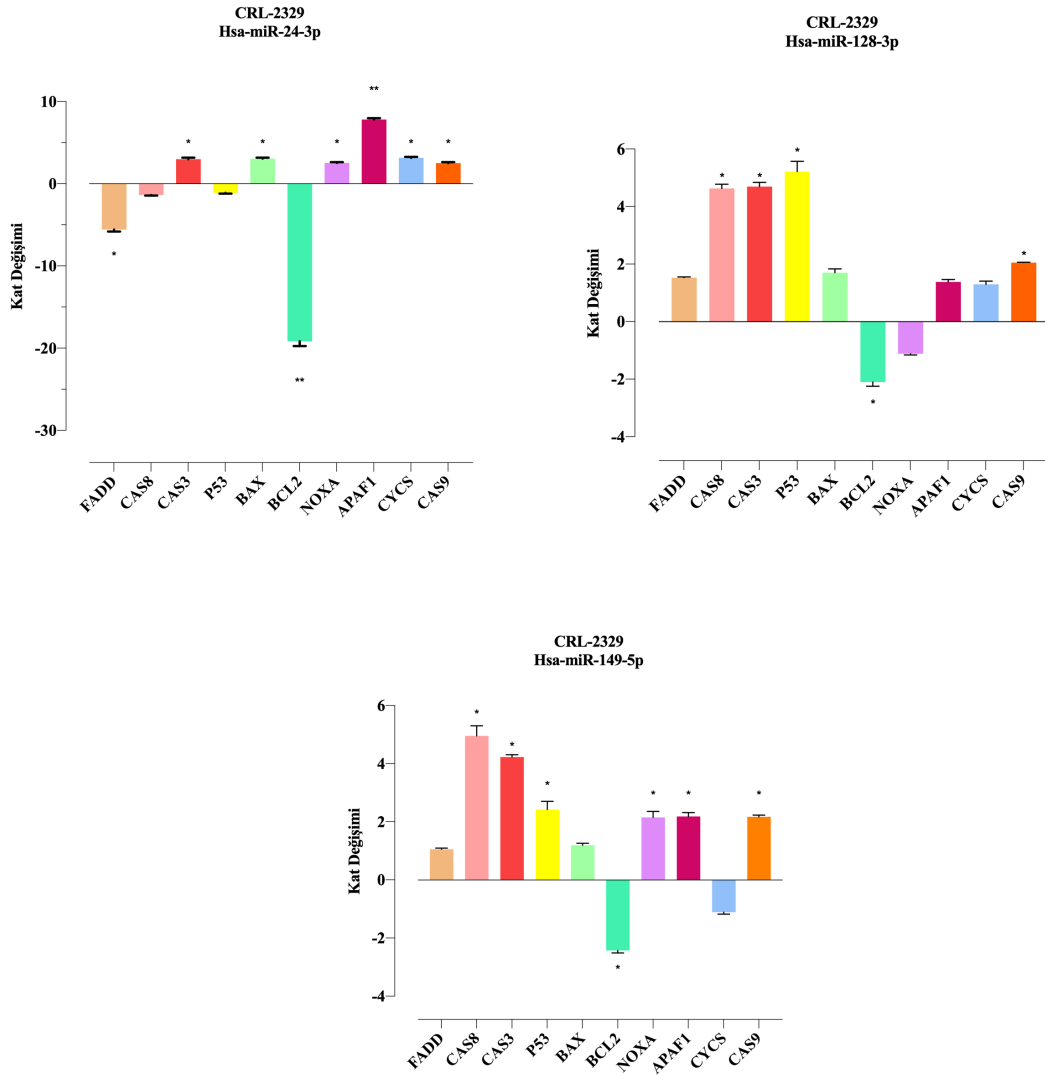


Şekil 4.12. PC-3 hücrelerinin tüm gruplardaki reaktif oksijen seviyesi ölçümü sonuçları. **Yeşil:** Kontrol (ROS-); **Kırmızı:** ROS+ hücre yüzdesini göstermektedir.

4.7. Apoptotik Gen Ekspresyonları

CRL-2329 ve PC-3 hücrelerinin miRNA transfeksiyonu sonrası apoptotik yolak mediyatör genlerinden FADD, CAS8 (kaspaz-8), CAS3 (kaspaz-3), P53, BAX, BCL-2, NOXA, APAF-1, CYCS (sitokrom c) ve CAS9 (kaspaz-9) genlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. RT-PCR sonucunda elde edilen Ct değerleri GAPDH geni ile normalize edilerek kat değişim analizleri yapılmıştır. CRL-2329 hücrelerinde hsa-miR-24-3p transfeksiyonu pro-apoptotik genlerden BAX ve NOXA'nın artmasına ve anti-apoptotik gen olan BCL-2'nin azalmasına sebep olmuştur (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Ayrıca hücrelerde; APAF-1, CYCS, CAS3 ve CAS9 ekspresyonları iki kattan fazla artış FADD ekspresyonu ise iki kattan fazla azalış göstermiştir (* $p < 0,05$) (Şekil 4.13.A). Hsa-miR-128-3p transfeksiyonuyla birlikte hücrelerde P53, CAS9, CAS8 ve CAS3'ün

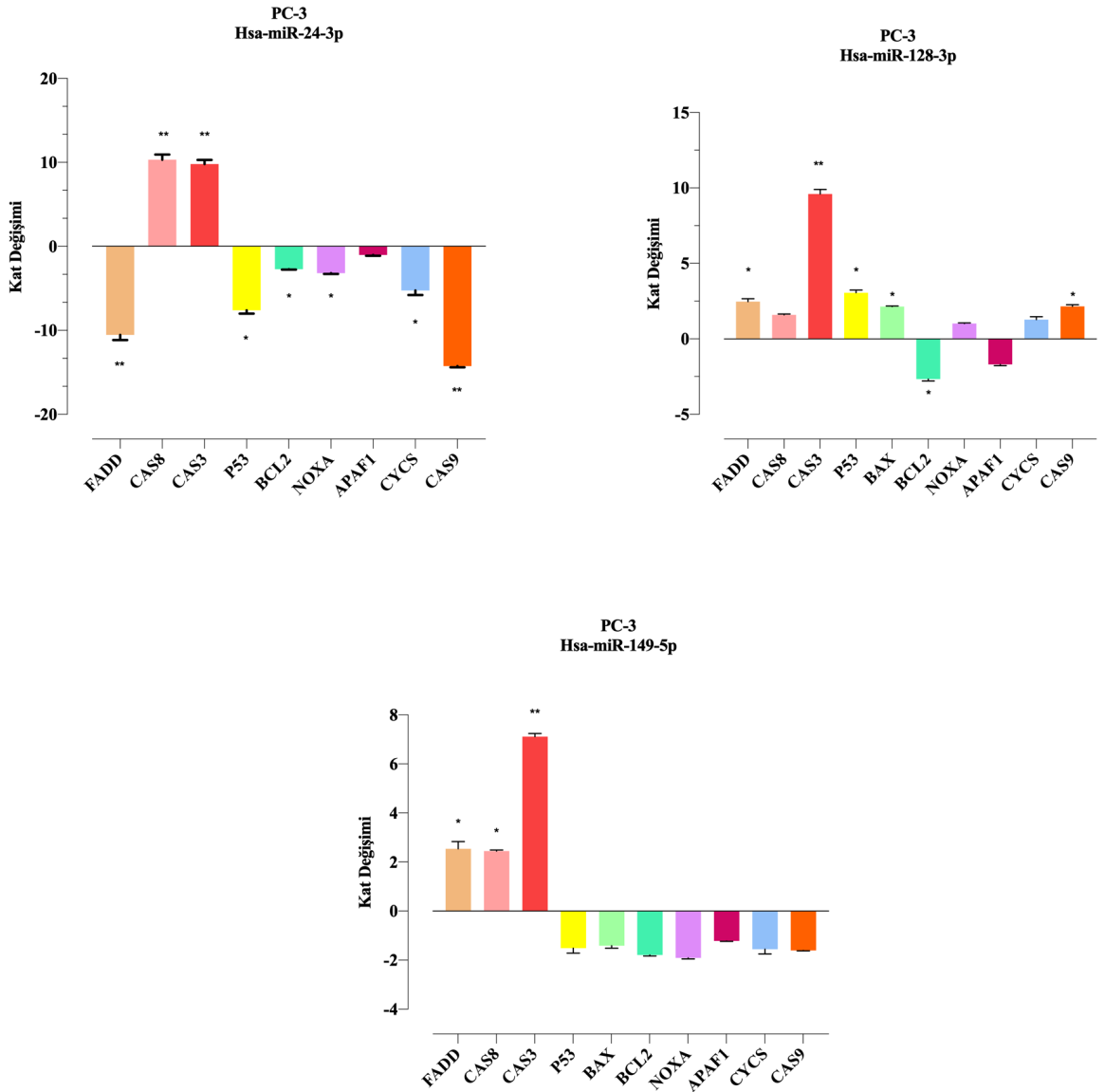
ekspresyonlarında iki kattan fazla artış görülürken, BCL-2 ekspresyonunda iki kattan fazla azalma gözlenmiştir (* $p<0,05$) (Şekil 4.13.B). Hsa-miR-149-5p transfeksiyonuyla birlikte hücrelerde NOXA, P53, ARAF-1, CAS9, CAS8 ve CAS3 ekspresyonlarında artış görülürken, BCL-2 ekspresyonunda azalma görülmüştür (* $p<0,05$) (Şekil 4.13.C).



Şekil 4.13. CRL-2329 hücresinde CCT3'ün baskılanmasının apoptotik genler üzerine etkisi. **A.** Hsa-miR-24-3p transfeksiyonu. **B.** Hsa-miR-128-3p transfeksiyonu. **C.** Hsa-miR-149-5p transfeksiyonu (Bar: Standart sapma oranını göstermektedir).

PC-3 hücrelerinde hsa-miR-24-3p transfeksiyonu apoptozis ile ilişkili genlerden CAS8 ve CAS3 ekspresyonlarını iki kattan fazla arttırdığı, BCL-2, FADD, P53, NOXA, CYCS ve

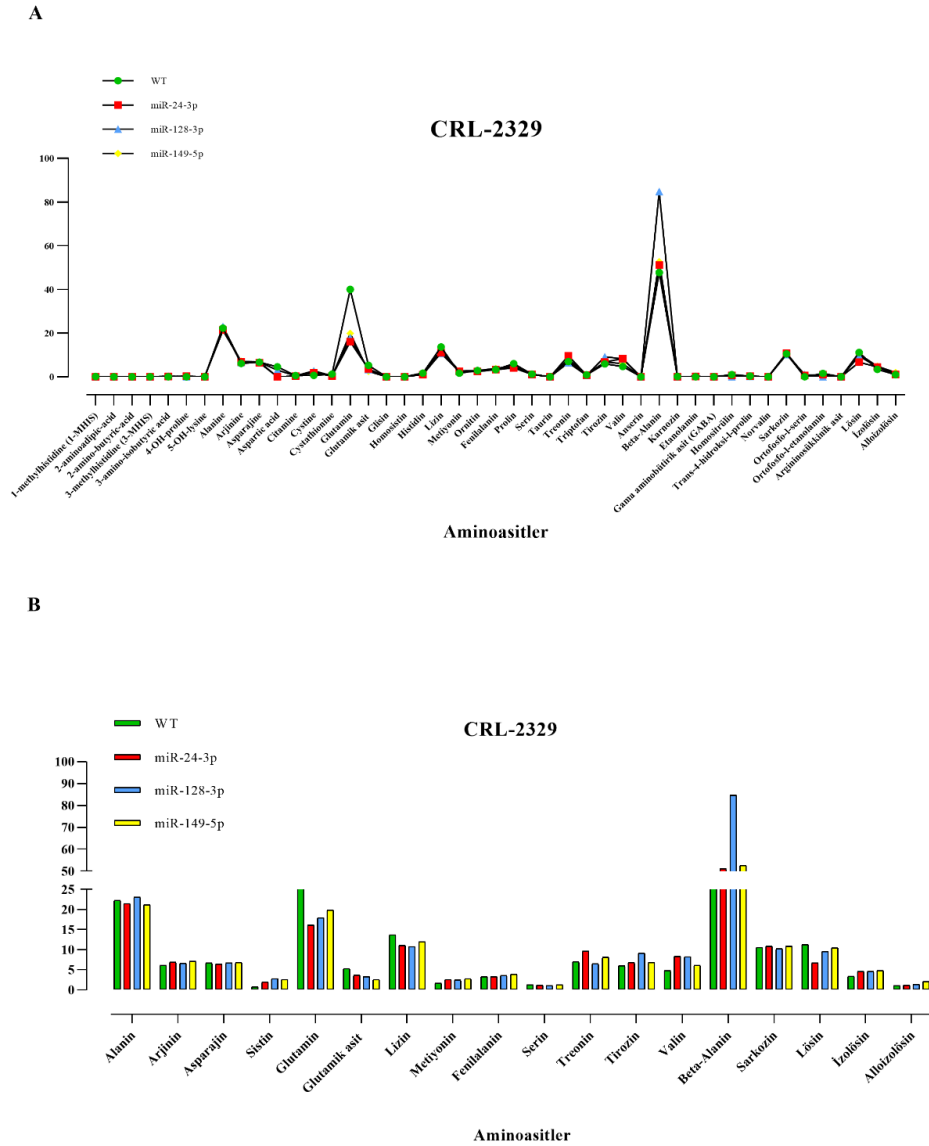
CAS9 ekspresyonlarında iki kattan fazla azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$; $**p < 0,01$) (Şekil 4.14.A). Hsa-miR-128-3p transfeksiyonuyla birlikte hücrelerde, FADD, CAS3, P53, BAX ve CAS9'un ekspresyonlarında iki kattan fazla artış görülürken, BCL-2 ekspresyonunda iki kattan fazla azalma gözlenmiştir ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$) (Şekil 4.14.B). Hsa-miR-149-5p transfeksiyonuyla birlikte hücrelerde FADD, CAS8 ve CAS3 ekspresyonlarında artış görülmüştür ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$) (Şekil 4.14.C).



Şekil 4.14. PC-3 hücresinde CCT3'ün baskılanmasının apoptotik genler üzerine etkisi. **A.** Hsa-miR-24-3p transfeksiyonu. **B.** Hsa-miR-128-3p transfeksiyonu. **C.** Hsa-miR-149-5p transfeksiyonu (Bar: Standart sapma oranını göstermektedir).

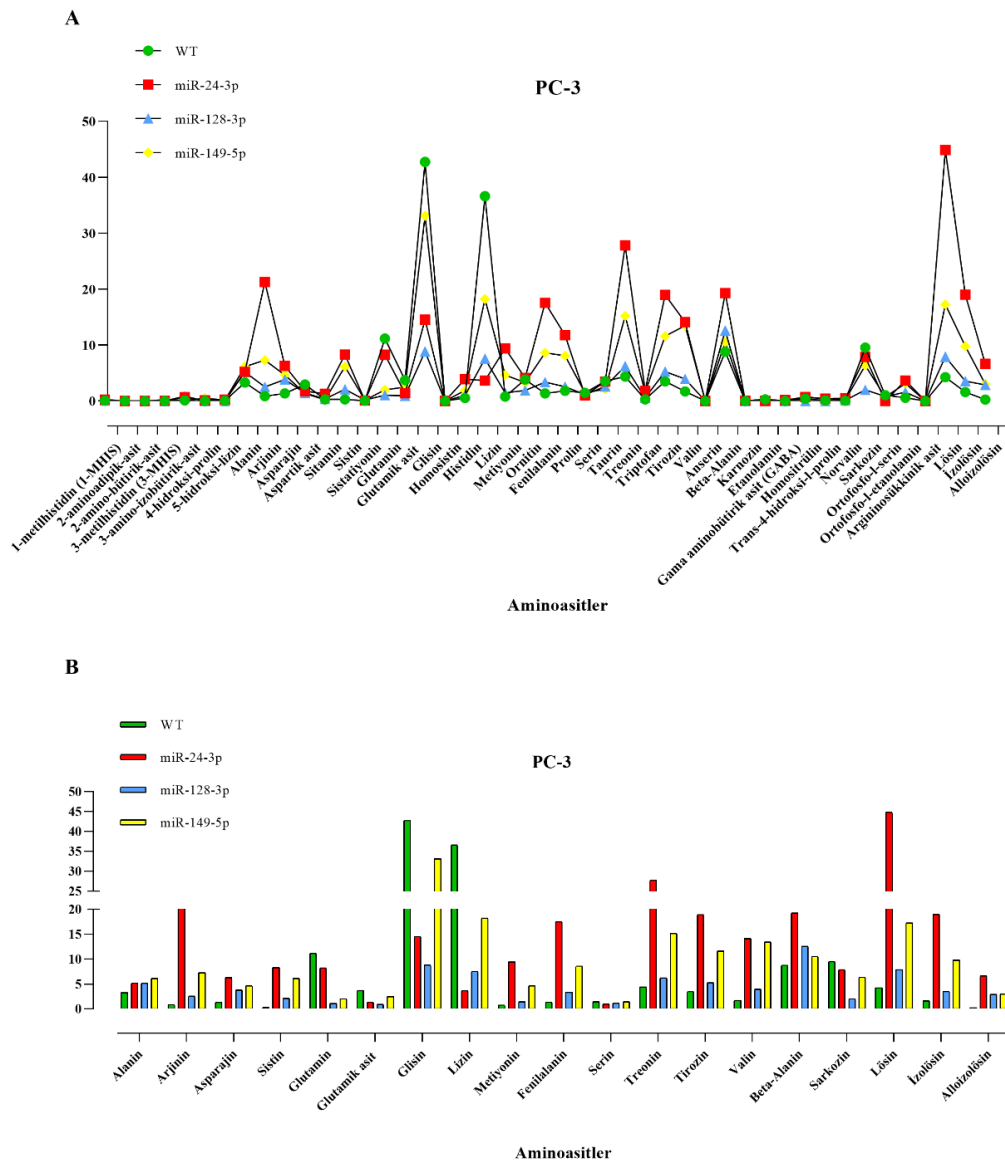
4.8. Hücre İçi Serbest Aminoasit Profiline İncelenmesi

CRL-2329 ve PC-3 hücre hatlarında miRNA transfeksiyonu sonrası serbest aminoasit profilindeki değişim incelenmiştir. Buna göre, CRL-2329 hücresinde CCT3'ün baskılanması ile glutamin, glutamik asit, lizin ve lösin aminoasit seviyeleri azalırken (**** $p < 0,0001$); treonin, tirozin, valin ve beta-alanin aminoasit seviyeleri artmıştır (**** $p < 0,0001$). Ayrıca, alanin, arjinin, asparajin, fenilalanine, sarkosin, izolösin, alloizolösin ve serin aminoasit seviyelerinin değişmediği bulunmuştur (Şekil 4.15A-B).



Şekil 4.15. CRL-2329 hücresinde serbest amino asit profili (µmol/L). **A.** CRL-2329 hücresinde CCT3'ün baskılanmasıyla birlikte değişen serbest aminoasit profili. **B.** CRL-2329 hücresinde anlamlı değişim gösteren aminoasitler.

PC-3 hücresinde CCT3'ün baskılanması ile glutamin, glutamik asit, lizin, glisin ve sarkosin aminoasit seviyeleri azalırken (****p<0,0001); alanin, arjinin, asparajin, fenilalanine, treonin, tirozin, valin, beta-alanin, lösin, izolösin, alloizolösin aminoasit seviyeleri artmıştır (****p<0,0001). Ayrıca, serin aminoasit seviyesinin değişmediği bulunmuştur (Şekil 4.16A-B).



Şekil 4.16. PC-3 hücresinde serbest amino asit profili (µmol/L). **A.** PC-3 hücresinde CCT3'ün baskılanmasıyla birlikte değişen serbest aminoasit profili. **B.** PC-3 hücresinde anlamlı değişim gösteren aminoasitler.

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

CCT/TRİC kompleksinin alt birimlerinden biri olan CCT3 (17) hücre bölünmesi, proliferasyonu ve apoptozis yollarında görev alan proteinlerin doğru katlanmasını katalizleyen şaperon proteinidir (18, 19). Hücre proliferasyonunda rol oynadığı anlaşıldıktan sonra, CCT3 geninin kanser patogenezi ile ilişkisini aydınlatmayı hedefleyen çalışmalar literatürde yer almaya başlamıştır.

Söz konusu çalışmalardan ilki, Midorikawa ve ark. (218) tarafından 2002 yılında farklı evrelerdeki karaciğer kanser dokuları üzerinde yürütülmüş olup, CCT3 gen ifadesinin ilerlemiş evrelere paralel bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Karaciğer hücrelerinde kaydedilen bu bulgular Midorikawa ve ekibinden kısa bir süre sonra, Wong ve ark. (219) tarafından da doğrulanmıştır (20). Hepatoselüler karsinomanın yanında, ovaryum kanser dokusunda yürütülen bir gen ekspresyonunun seri analizinde (SAGE) CCT3 gen ifadesinin anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir (220). Bununla birlikte, CCT3'ün hücre ölüm yolları ve sağ kalım proteinleri ile nedensel ilişkisini ortaya çıkaran ayrıntılı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada CCT3'ün farklı kanser hücre hatlarındaki apoptotik mekanizmalar ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, ilk olarak mekanik bir ilişki kurmak için farklı kanser hücre hatlarında CCT3 profillemesi yapılmıştır. Daha sonra, yaygın olarak kullanılan miRNA-aracılı gen baskılama yöntemi ile CCT3 geni baskılanmış ve hücre ölüm genlerinin ifadesi, serbest aminoasit seviyesi, organel bütünlüğü (mitokondri) ve hücre morfolojisi (membran bütünlüğü)'ndeki değişimler incelenmiştir.

Çalışmamızda seçilen 20 farklı hücre hattında yapılan profillemeye neticesinde CRL-2329 ve PC-3 hatlarında CCT3'ün istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttığı görülmüştür (Şekil 4.1). Bu bulguyla uyumlu olarak, Benmammad ve ark., CCT/TRİC kompleks ifadesini 18 farklı kanser hücre hattında (meme, kolorektal, serviks vs.) profilemiş ve PC-3'de dahil olmak üzere bazı hücre hatlarında anlamlı bir biçimde arttığını göstermiştir (9). Bu farklılığın nedeninin ise CCT/TRİC modülatörleri (PhLP3, Hop/P60 ve Hsc/Hsp70) olabileceği belirtilmiştir. Ancak bu çalışmada kaydedilen kanser hücre hatları ve CCT/TRİC kompleksi arasında varsayılan ilişkinin nedeni aydınlatılmamış ve CCT3 alt biriminin CCT/TRİC kompleksi ile birlikte korele yanıt gösterip göstermediği

ortaya çıkarılmamıştır. miRNA'ların hücrel farklılaşma, metabolizma, büyüme, metastaz ve ilaç dirençliliğini düzenleyerek kanserleşme sürecinde etkili olduğu ve anormal ekspresyonlarının sıklıkla kanserin ayırt edici özelliği olduğu artık bilinmektedir (103, 221). Bu çalışmada, CCT3 gen ekspresyonunun CRL-2329 ve PC3 hatlarında gösterdiği spesifik artışın altında yatan hücrel olayları aydınlatmak için CCT3'ü hedefleyen miRNA'ların (Şekil 4.2.A) ifadeleri incelendiğinde miR-24-3p, miR-128-3p ve miR-149-5p ifade seviyelerinin azaldığı bulunmuştur. CCT3 hedeflerinden ilki olan miR-24-3p'nin akciğer (163) ve kolon adenokarsinom (164), lakrimal adenoid cystic carcinoma (165), prostat kanseri (166) ve pankreatik duktal adenokarsinoma (167) patogenezi katıldığı gösterilmiştir. İkinci hedefi olan miR-128-3p'nin prostat kanseri (166), neuroblastoma (168), glioma (169), retinoblastoma (170), tiroid (171) ve meme (172) kanseri oluşmasında rolü olduğu belirlenmiştir. Diğer hedefi olan ve çalışmaya dahil edilen miR-149-5p'nin tiroid (171), kolon adenokarsinoma (173), küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (174) ve hepatoselüler karsinomanın (173) gelişmesinde ve ilerlemesinde katkısı olduğu gösterilmiştir. Bu veriler ışığında meme ve prostat kanseri hücrelerinde CCT3'ün ekspresyonunu baskılamak için CCT3'ü hedefleyen miRNA mimiklerinin transfeksiyonu yapılmıştır. Mimik transfeksiyonuyla miR-24-3p, miR-128-3p ve miR-149-5p ifadeleri CRL-2329 ve PC3 hücre hatlarında anlamlı olarak (>500 kat) artırılmış (Şekil 4.2.B) ve bu artışın CCT3 ifadesine etkisi değerlendirilmiştir. Sonuç olarak mimik transfeksiyonlarının CCT3 ifadesini anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2.C). Çalışmadan elde ettiğimiz bu bulgular, artmış CCT3 ifadesi ve kanser patogenezi arasındaki ilişkiyi bildiren diğer çalışmalarla uyumludur (20, 222, 223). miR-24-3p tarafından CCT3'ün baskılanması ile CRL-2329 ve PC3 hücrelerinde apoptozisin morfolojik ipuçları kaydedilmiştir (Şekil 4.3.; 4.4.). Ayrıca, apoptotik boyama sonuçları ve hücre döngüsü bulguları, baskılanmış CCT3'ün CRL-2329 (Şekil 4.5.;4.7.) ve PC-3 (Şekil 4.6.; 4.8.) hücre hatlarında apoptozisi tetiklediğini ve hücrelerin G0/G1 fazında tutulduğunu göstermektedir. Son olarak, baskılanmış CCT3'ün gen, organel ve apoptotik mekanizmalara etkisi değerlendirildiğinde, pro-apoptotik gen ifadesi (BAX) artarken, anti-apoptotik gen ifadesinin (BCL-2) azaldığı (Şekil 4.13.; 4.14.A), mitokondri membran bütünlüğünün bozulduğu (Şekil 4.9.; 4.10.) ve önemli bir apoptozis mediatörü olan ROS seviyesinin arttığı bulunmuştur (Şekil 4.11.; 4.12.). Diğer bir ifadeyle, CRL-2329 ve PC-3 hücrelerinde CCT3'ün miR-24-3p ile susturulması,

mitokondri membran potansiyelini bozarak ROS seviyesini arttırmış ve apoptotik modulator genleri tetikleyerek hücrelerde apoptozisi uyardığı görülmüştür.

miR-24-3p aracılı CCT3'ün baskılanmasıyla ortaya çıkan bulgular literatürle uyumludur. Cui ve ark., hepatoselüler karsinom hücrelerinde normal dokulara kıyasla CCT3 gen ifadesinin anlamlı bir biçimde arttığını tespit etmiştir (224). Dört farklı karaciğer hücre hattında, CCT3 genini hedefleyen siRNA transfeksiyonu yapılarak CCT3'ün gen ifadesi baskılanmış ve hücre canlılığı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. CCT3 gen ifadesinin baskılanmasıyla hücre proliferasyonunun durduğu ve apoptozisin tetiklendiği gösterilmiştir. Hepatoselüler karsinomaya ek olarak Su ve ark., özofagus kanser dokusunda mikroarray analizi sonucunda CCT3 gen ifadesinin en çok artan üç genden biri olduğunu bulmuştur; bununla birlikte, CCT3'ün klinik etkisi gösterilmemiştir (225). miR-24-3p'ye ek olarak, miR-128-3p aracılığıyla CCT3'ün baskılanmasının CRL-2329 ve PC3 hücrelerinde morfolojik değişikliğe neden olduğu ve ölü/canlı hücre oranını arttırdığı bulunmuştur (Şekil 4.3.; 4.4.). Apoptozisin habercisi olan bu bulgular AnnexinV/PI boyaması ile değerlendirildiğinde, hücrelerin geç apoptotik evrede fazla biriktiği (Şekil 4.5.; 4.6.) ve bununla uyumlu olarak hücrelerin G0/G1 fazında tutulduğu görülmüştür (Şekil 4.7.; 4.8.). Bunun yanında, miR-128-3p aracılı CCT3 baskılanmasının organel (JC-1) ve ROS homeostazisine etkisi değerlendirilmiş ve azalmış CCT3'ün her iki hücre hattında da bozulmuş mitokondri membran potansiyeli ve dramatik olarak artmış ROS miktarı ile karakterize olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9.; 4.11.; 4.10.; 4.12.). Son olarak, CCT3'ün baskılanmasıyla görülen anti-proliferatif etkinin apoptotik yolakla ilişkisini aydınlatmak için, apoptotik yolda rol oynayan genlerin ifadeleri değerlendirilmiştir. Buna göre, CRL-2329 hücre hattında görülen apoptotik yanıt P53 ile endikeyken, PC3 hücre hattında kaspaz 3 ile endike olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.13.; 4.14.B).

Her geçen gün bilimsel bilginin yarılanma ömrü kısalmaktadır. CCT3 ile ilgili araştırmaların yakın tarihine bakıldığında üç çalışma dikkat çekmektedir. Bunlardan ilki Li ve ark. tarafından BGC-823 ve MGC-803 gastrik kanser hücre hatlarında yürütülmüştür (226). Buna göre, gastrik kanserde artmış bulunan CCT3'ün gen ve protein seviyesi siRNA ile susturulduğunda hücrelerde belirgin apoptotik yanıt görülmüştür. CCT3'ün hücre içi etki mekanizmasını araştırdıklarında; CCT3 baskılanmasıyla birlikte mitojenle aktive protein kinaz 7, hücre bölünmesi kontrol proteini 42 ve Siklin D3'ün aktivitesi azalırken; Siklin-bağımlı kinaz 2-6'nın aktivitesinde artış olduğu tespit

edilmiştir. İkinci çalışmada papiller tiroid kanser ve normal tiroid dokusu arasında CCT3 gen ifadesi kıyaslanmış ve papiller tiroid kanser dokusunda anlamlı bir biçimde arttığı tespit edilmiştir (227). Artan CCT3 ifadesi shRNA ile susturulduğunda apoptozisin tetiklendiği tespit edilmiştir. Sonuncusu ise 2019 yılında yayınlanan bir meta-analiz çalışmasıdır (228). Analizde TCGA portalı kullanılarak karaciğer kanser ve normal dokuda CCT3 gen ekspresyonları arasındaki farklılık araştırılmış ve hepatoselüler karsinomada CCT3 gen ifadesinin yüksek bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca, Kyoto Gen Ansiklopedisine ve Genom yolları analizlerinde CCT3'ün karaciğer kanseri oluşumu ve gelişimini, hücre döngüsünü ve DNA replikasyonunu modüle ederek etkilediği vurgulanmıştır.

Literatürde birçok kez vurgulanan CCT3 ve karsinogenez arasındaki ilişki bu çalışmada son kez miR-149-5p kullanılarak test edilmiştir. miR-149-5p transfeksiyonu sonucunda CRL-2329 ve PC3 hücre hatlarında artan CCT3 gen ifadesi baskılanmıştır. Bu manipülasyonun hücre homeostazisine etkisi değerlendirildiğinde, apoptotik morfolojinin belirginleştiği (Şekil 4.3.; 4.4.), hücrelerin geç apoptotik evrede biriktiği (Şekil 4.5.; 4.6.), hücre döngüsünün G0/G1 fazında tutulduğu (Şekil 4.7.;4.8.), mitokondri membran bütünlüğünün bozulduğu (Şekil 4.9.; 4.10.) ve ROS salınımının toksik seviyeye ulaştığı (Şekil 4.11.; 4.12.) görülmüştür. CCT3 geninin susturulması sonucu ortaya çıkan bu anti-proliferatif etkinin apoptotik yolakla etkileşimi araştırıldığında ise, miR-149-5p'nin CRL-2329'da hem iç hem de dış apoptotik yolağı düzenleyen genleri tetikleyerek hücrelerde apoptozisi başlattığı görülmüştür (Şekil 4.13.C). Bununla birlikte, PC3 hücre hattında CCT3'ün baskılanması dış yolakta düzenleyici görevleri olan genleri (FADD, CAS8, CAS3) tetikleyerek apoptozise yol açtığı bulunmuştur (Şekil 4.14.C).

CCT3'ün karsinogenez ile yakın ilişkisi, biyobelirteç olarak kullanılabileceğini gündeme getirmiştir. Qian ve ark. hepatoselüler karsinomalı hastalar, sirozlu vakalar ve sağlıklı bireylerden kan örnekleri toplanarak ELISA analizi ile CCT3 protein seviyesini ölçmüştür (229). CCT3 seviyesinin hepatoselüler karsinomalı hastalarda, sirozlu vakalar ve kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca CCT3'ün hastalardaki karaciğer kanser etiyolojisi, tümör hacmi ve TNM (T(tümör), N (nod: lenf nodu) ve M (metastaz)) aşaması ile korele olarak değiştiği tespit edilmiştir. Bu ikna edici bulgular CCT3'ün hepatoselüler karsinomanın izlenmesinde ve tanısında kullanılabilecek potansiyel bir marker olduğunu önermektedir. Bu önerme yakın zamanda Zhang ve ark. tarafından yürütülen bir çalışma ile desteklenmiştir (22). Bu çalışmada CCT3'ün

baskılanmasının karaciğer hücrelerinde mitotik tutuluma neden olduğu ve apoptoza yönlendirdiği bulunmuş, ayrıca CCT3'ün mitoz boyunca düzgün mikrotübül-kinetokor etkileşimi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu projeden elde ettiğimiz bulgular ve daha önce hepatoselüler karsinoma hücreleri ile yapılmış olan çalışmalar CCT3'ün potansiyel bir biyobelirteç ve anti-proliferatif ilaç hedefi olabileceği görüşünü desteklemektedir.

MiRNA'lar tarafından CCT3'ün baskılanmasının hücre içi serbest aminoasit profiline etkisi incelenerek değişen aminoasitler tespit edilmiştir. Bu aminoasitlerden ilki olan glutamin, enerji oluşumuna, redoks homeostazına, makromoleküler sentezine ve kanser hücrelerinde sinyalizasyona katılan bir aminoasittir. Mitokondri yapısının bozulması sonucu enerji metabolizması etkilenen tümör hücrelerinin enerji ihtiyaçlarını karşılamak için, glutamin biyosentetik bir öncü olarak görev yaptırdığı tespit edilmiştir (230). Ayrıca glukozun yokluğunda glutamin, kanser hücrelerinin ana besini olarak davrandığı ve yokluğunda hücrelerin apoptozise girdiği bildirilmiştir (231). Bu çalışmada CRL-2329 ve PC3 hücre hatlarında CCT3'ün baskılanması ile apoptozisin tetiklendiği ve tüm mimik transfeksiyonu yapılan hücre gruplarında glutamin aminoasit miktarının anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15.; 4.16.). Diğer bir aminoasit olan β -Alaninin, hücre göçünün ve proliferasyonun düzenlediği metabolik yollarda görev aldığı bilinmektedir. Vaughan ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada, β -Alaninin hücre metabolizması ve hücre asitliğinin düzenlenmesinde görev aldığı ve hem hücre göçünü hem de malign hücrelerinin proliferasyonunu düzenlediği bildirilmiştir (232). Ayrıca diğer bir çalışmada, metastatik osteosarkom hücrelerinde invazyon ve migrasyonun baskılanması dahil olmak üzere çeşitli anti-tümör etkilerinin olduğu gösterilmiştir (233). β -Alanin aminoasitinin azalması mide kanserinde metastatik şiddetin ve nüks sıklığının artmasına sebep olduğu tersi durumda ise nüks önlenmesine ve genel sağkalım süresinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (234). Bu çalışmada, CCT3'ün baskılandığı CRL-2329 ve PC3 hücre gruplarında β -alanin aminoasit seviyesinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu bulgular doğrultusunda hücrelerde artmış β -alaninin hücre proliferasyonunu azaltabileceği ve apoptozisi tetikleyebileceğini önermekteyiz (Şekil 4.15.; 4.16.). Diğer aminoasitlerden, glisin ve serin aminoasitlerinin, makromolekül biyosentezinde, sitozolik ve mitokondriyal enzimatik yolların düzenlenmesinde ve ayrıca kanser metabolizmasında görev alan onko-metabolitler olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (235).

Glisin aminoasitinin biyosentezindeki artış tümöregenezi hızlandırdığı (236), hücre proliferasyonunu ve metastazını arttırdığı tespit edilmiş ve bu aminoasiti kanser tedavisi için açık hedef haline getirmiştir (237). Çalışmamızda, CCT3'ün baskılandığı PC3 hücrelerinde, glisin seviyesi anlamlı olarak azalmış; CRL-2329 hücresinde ise değişmediği bulunmuştur. Lee ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada sarkozinin, glisin sentezi ve yıkımı için gerekli ara metabolitlerinden biri olduğu ve prostat kanserinin biyobelirteci olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (238). Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda, idrar örneklerinde yüksek seviyede tespit edilen sarkozin aminoasitinin iyi huylu prostat epitel hücrelerinde invaziv bir fenotipi indüklediği gösterilmiştir (239). Ayrıca artan sarkozin seviyesinin hücre proliferasyonunu ve metastazı arttırdığı tespit edilmiştir (240). Bu çalışmada, PC3 hücresinde sarkozin aminoasitinin anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.16.). Yapılan çalışmalarda, asparajin aminoasitinin, hücre aminoasit değişim faktörü olarak çalıştığı ve hücre dışı (arjinin, serin ve histidin) amino asitlerle hücre içi asparajin değişimini organize ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca normal hücre açlığı olmayan koşullar altında mTORC1 aktivasyonunu, protein/nükleotit sentezini ve hücre çoğalmasını teşvik etmek için hücre içi asparajinin hücre dışı amino asitlerle değiş tokuş ettiği gösterilmiştir (241). Bu çalışmada, CRL-2329 hücresinde asparajin, serin, arjinin ve histidin aminoasitlerinin değişmediği bulunmuştur (Şekil 4.15.). PC3 hücrelerinde ise asparajin ve arjinin aminoasitlerinin anlamlı olarak arttığı, serin ve histidin aminoasitlerinin değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.16.).

Özetle, CCT3'ün kanser etiyolojisiyle etkileşimini araştıran çalışmaların çoğunluğu karsinogenez ile CCT3 arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, CCT3'ün kanser patogenezi ile arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tablonun olası nedenlerinden biri gen fonksiyon karakterizasyonunda kullanılan, gen susturma (miRNA-aracılı susturma) tekniklerinin yakın zamanda geliştirilmesi ve rutin kullanıma girmesidir. İlk kez bu projede, CRL-2329 ve PC3 hücre hatlarında üç farklı miRNA ile artan CCT3 gen ifadesi baskılanmış ve hücrede CCT3 ekspresyonunun azalmasının iki hücre hattında da apoptotik genlerin ifadelerinde anlamlı artışa neden olduğu, mitokondri membran bütünlüğünü bozduğu ve ROS seviyesini arttırarak apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir. Bu bulgulardan hareketle, CCT3'ün modüle ettiği yolların duktal meme kanseri ve prostat kanseri için terapötik hedefler sunabileceği önerilmektedir. Bununla birlikte, CCT3'ün protein seviyesinin burada kaydedilen

apoptotik yanıtlara korele değişimler gösterdiği doğrulanmalıdır. Ayrıca, profillemeye yaptığımız 20 hücre hattı dışında, daha geniş spektrumlu çalışmalar ile CCT3'ün anlamlı düşüş gösterdiği kanser hücre hatları araştırılmalıdır. “CCT3 semptomu” gösteren hücre hatlarında, yani azalmış CCT3 ifadesine sahip hücrelerde, fonksiyon kazandırma yaklaşımı ile CCT3 ifadesi arttırılmalı ve artmış CCT3'ün kanser patogeneğinde oynadığı rol aydınlatılmalıdır. Son olarak, susturulmuş CCT3'ün apoptotik etkisini ve tümör prognozundaki önemini aydınlatmak için, sırasıyla, hayvan modellerinde yürütülecek apoptoz deneyleri ve farklı evrelerde alınmış insan dokularında CCT3 profillemesi yapmanın bu genin fonksiyonunu göz önüne sermek için etkili ve sistematik karşılığı olan strateji olacağı önerilmektedir.



6. KAYNAKLAR

1. Broadley SA and Hartl FU. The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS letters*. 2009; 583(16):2647-2653.
2. Hartl FU, Bracher A and Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011; 475(7356):324-332.
3. Horwich AL, Fenton WA, Chapman E and Farr GW. Two families of chaperonin: Physiology and mechanism. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007; 23:115-145.
4. Kabir MA, Uddin W, Narayanan A, Reddy PK, Jairajpuri MA, Sherman F and Ahmad Z. Functional subunits of eukaryotic chaperonin cct/tric in protein folding. *J Amino Acids*. 2011; 2011:843206.
5. Melki R, Batelier G, Soulié S and Williams RC. Cytoplasmic chaperonin containing tcp-1: Structural and functional characterization. *Biochemistry*. 1997; 36(19):5817-5826.
6. Lewis SA, Tian G and Cowan NJ. The α - and β -tubulin folding pathways. *Trends in cell biology*. 1997; 7(12):479-484.
7. Lewis SA, Tian G, Vainberg IE and Cowan NJ. Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin. *The Journal of cell biology*. 1996; 132(1):1-4.
8. Won K-A, Schumacher RJ, Farr GW, Horwich AL and Reed SI. Maturation of human cyclin e requires the function of eukaryotic chaperonin cct. *Molecular and cellular biology*. 1998; 18(12):7584-7589.
9. Boudiaf-Benmammar C, Cresteil T and Melki R. The cytosolic chaperonin cct/tric and cancer cell proliferation. *PLoS One*. 2013; 8(4):e60895.
10. Liu X, Lin C-Y, Lei M, Yan S, Zhou T and Erikson RL. Cct chaperonin complex is required for the biogenesis of functional plk1. *Molecular and cellular biology*. 2005; 25(12):4993-5010.
11. Melville MW, McClellan AJ, Meyer AS, Darveau A and Frydman J. The hsp70 and tric/cct chaperone systems cooperate in vivo to assemble the von hippel-lindau tumor suppressor complex. *Molecular and cellular biology*. 2003; 23(9):3141-3151.
12. Camasses A, Bogdanova A, Shevchenko A and Zachariae W. The cct chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional cdc20. *Molecular cell*. 2003; 12(1):87-100.

13. Guenther MG, Yu J, Kao GD, Yen TJ and Lazar MA. Assembly of the smrt–histone deacetylase 3 repression complex requires the tcp-1 ring complex. *Genes & development*. 2002; 16(24):3130-3135.
14. Kasembeli M, Lau WC, Roh SH, Eckols TK, Frydman J, Chiu W and Tweardy DJ. Modulation of stat3 folding and function by tric/cct chaperonin. *PLoS Biol*. 2014; 12(4):e1001844.
15. Yokota S, Yanagi H, Yura T and Kubota H. Cytosolic chaperonin is up-regulated during cell growth. Preferential expression and binding to tubulin at g(1)/s transition through early s phase. *J Biol Chem*. 1999; 274(52):37070-37078.
16. Liu X, Lin CY, Lei M, Yan S, Zhou T and Erikson RL. Cct chaperonin complex is required for the biogenesis of functional plk1. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(12):4993-5010.
17. Qian E-N, Han S-Y, Ding S-Z and Lv X. Expression and diagnostic value of cct3 and iqgap3 in hepatocellular carcinoma. *Cancer cell international*. 2016; 16(1):55.
18. Li L-J, Zhang L-S, Han Z-J, He Z-Y, Chen H and Li Y-M. Chaperonin containing tcp-1 subunit 3 is critical for gastric cancer growth. *Oncotarget*. 2017; 8(67):111470.
19. Zhang Y, Wang Y, Wei Y, Wu J, Zhang P, Shen S, Saiyin H, Wumaier R, Yang X and Wang C. Molecular chaperone cct3 supports proper mitotic progression and cell proliferation in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer letters*. 2016; 372(1):101-109.
20. Zhang Z, Xu L and Sun C. Comprehensive characterization of cancer genes in hepatocellular carcinoma genomes. *Oncol Lett*. 2018; 15(2):1503-1510.
21. Sinha P, Poland J, Kohl S, Schnolzer M, Helmbach H, Hutter G, Lage H and Schadendorf D. Study of the development of chemoresistance in melanoma cell lines using proteome analysis. *Electrophoresis*. 2003; 24(14):2386-2404.
22. Zhang Y, Wang Y, Wei Y, Wu J, Zhang P, Shen S, Saiyin H, Wumaier R, Yang X, Wang C and Yu L. Molecular chaperone cct3 supports proper mitotic progression and cell proliferation in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2016; 372(1):101-109.
23. Siegel RL, Miller KD and Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2019; 69(1):7-34.

24. Stratton MR, Campbell PJ and Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009; 458(7239):719.
25. Garraway LA and Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell*. 2013; 153(1):17-37.
26. Macconail LE and Garraway LA. Clinical implications of the cancer genome. *Journal of Clinical Oncology*. 2010; 28(35):5219.
27. Morris LG and Chan TA. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer*. 2015; 121(9):1357-1368.
28. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991; 64(2):235-248.
29. Croce CM. Oncogenes and cancer. *New England journal of medicine*. 2008; 358(5):502-511.
30. Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1994; 44(3):160-170.
31. Knudson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1971; 68(4):820-823.
32. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM and Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 1986; 323(6089):643.
33. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976; 194(4260):23-28.
34. Negrini S, Gorgoulis VG and Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11(3):220-228.
35. Carlebach M, Amiel A, Gaber E, Radnay J, Manor Y, Fejgin M and Lishner M. Multiple myeloma: Monoallelic deletions of the tumor suppressor genes tp53 and rb1 in long-term follow-up. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2000; 117(1):57-60.
36. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-674.
37. Witsch E, Sela M and Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*. 2010; 25(2):85-101.
38. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A and Moses HL. Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research*. 2008; 6(10):1521-1533.

39. Burkhart DL and Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*. 2008; 8(9):671-682.
40. Deshpande A, Sicinski P and Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: A perspective. *Oncogene*. 2005; 24(17):2909-2915.
41. Dick FA and Rubin SM. Molecular mechanisms underlying rb protein function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013; 14(5):297-306.
42. Muñoz-Fontela C, Mandinova A, Aaronson SA and Lee SW. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. *Nature Reviews Immunology*. 2016; 16(12):741-750.
43. Wenzel ES and Singh AT. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. *In vivo*. 2018; 32(1):1-5.
44. Schafer K. The cell cycle: A review. *Veterinary pathology*. 1998; 35(6):461-478.
45. Lim S and Kaldis P. Cdks, cyclins and ckis: Roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 2013; 140(15):3079-3093.
46. Malumbres M and Barbacid M. Cell cycle, cdks and cancer: A changing paradigm. *Nature reviews cancer*. 2009; 9(3):153-166.
47. Tyson JJ. Modeling the cell division cycle: Cdc2 and cyclin interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991; 88(16):7328-7332.
48. Kim R, Emi M and Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007; 121(1):1-14.
49. Teng MW, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD and Smyth MJ. Immune-mediated dormancy: An equilibrium with cancer. *Journal of leukocyte biology*. 2008; 84(4):988-993.
50. Blasco MA. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005; 6(8):611-622.
51. Qian B-Z and Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010; 141(1):39-51.
52. Huang RY-J, Guilford P and Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*. 2012; 125:4417-4422.
53. Petrova YI, Schecterson L and Gumbiner BM. Roles for e-cadherin cell surface regulation in cancer. *Molecular biology of the cell*. 2016; 27(21):3233-3244.

54. Cheung KJ, Gabrielson E, Werb Z and Ewald AJ. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell*. 2013; 155(7):1639-1651.
55. Shamir ER, Pappalardo E, Jorgens DM, Coutinho K, Tsai W-T, Aziz K, Auer M, Tran PT, Bader JS and Ewald AJ. Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires e-cadherin. *Journal of Cell Biology*. 2014; 204(5):839-856.
56. Saitoh M. Involvement of partial emt in cancer progression. *The Journal of Biochemistry*. 2018; 164(4):257-264.
57. Scheel C and Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Cancer biology*. 2012; 22(5-6):396-403.
58. Wu Q, Hou X, Xia J, Qian X, Miele L, Sarkar FH and Wang Z. Emerging roles of pdgf-d in emt progression during tumorigenesis. *Cancer treatment reviews*. 2013; 39(6):640-646.
59. Tonini T, Rossi F and Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*. 2003; 22(42):6549-6556.
60. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T and Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*. 2006; 2(3):213.
61. Berdasco M and Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: How cellular identity goes awry. *Dev Cell*. 2010; 19(5):698-711.
62. Jackson SP and Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461(7267):1071-1078.
63. Mowat MR. P53 in tumor progression: Life, death, and everything. *Adv Cancer Res*. 1998; 74:25-48.
64. Evan G and Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*. 1998; 281(5381):1317-1322.
65. Jones RG and Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes & development*. 2009; 23(5):537-548.
66. Aufricht C. Heat-shock protein 70: Molecular supertool. *Pediatric Nephrology*. 2005; 20(6):707-713.
67. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M and Ulrich Hartl F. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry*. 2013; 82:323-355.

68. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013; 14(10):630-642.
69. Kalisman N, Adams CM and Levitt M. Subunit order of eukaryotic tric/cct chaperonin by cross-linking, mass spectrometry, and combinatorial homology modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012; 109(8):2884-2889.
70. Consortium EP. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the encode pilot project. *Nature*. 2007; 447(7146):799.
71. Mattick JS. Rna regulation: A new genetics? *Nature Reviews Genetics*. 2004; 5(4):316-323.
72. Zaratiegui M, Irvine DV and Martienssen RA. Noncoding rnas and gene silencing. *Cell*. 2007; 128(4):763-776.
73. Mattick JS and Makunin IV. Non-coding rna. *Human molecular genetics*. 2006; 15:17-29.
74. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG and Bartel DP. An abundant class of tiny rnas with probable regulatory roles in *caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001; 294(5543):858-862.
75. Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. The *c. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small rnas with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5):843-854.
76. Grad Y, Aach J, Hayes GD, Reinhart BJ, Church GM, Ruvkun G and Kim J. Computational and experimental identification of *c. Elegans* micrnas. *Molecular cell*. 2003; 11(5):1253-1263.
77. Lee RC and Ambros V. An extensive class of small rnas in *caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001; 294(5543):862-864.
78. Wightman B, Ha I and Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *c. Elegans*. *Cell*. 1993; 75(5):855-862.
79. Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J and Tuschl T. The small rna profile during *drosophila melanogaster* development. *Developmental cell*. 2003; 5(2):337-350.
80. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W and Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed rnas. *Science*. 2001; 294(5543):853-858.

81. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A and Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *Rna*. 2003; 9(2):175-179.
82. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W and Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology*. 2002; 12(9):735-739.
83. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB and Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science*. 2003; 299(5612):1540-1540.
84. Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, Cao X, Carrington JC, Chen X and Green PJ. Criteria for annotation of plant microRNAs. *The Plant Cell*. 2008; 20(12):3186-3190.
85. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M and Dreyfuss G. Mirnps: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development*. 2002; 16(6):720-728.
86. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D and Sander C. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 2004; 304(5671):734-736.
87. Thatcher EJ, Bond J, Paydar I and Patton JG. Genomic organization of zebrafish microRNAs. *BMC genomics*. 2008; 9(1):253.
88. Gebeshuber CA, Zatloukal K and Martinez J. Mir-29a suppresses tristetraptolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO reports*. 2009; 10(4):400-405.
89. Kala R, Peek GW, Hardy TM and Tollefsbol TO. MicroRNAs: An emerging science in cancer epigenetics. *J Clin Bioinforma*. 2013; 3(1):6.
90. Xu J, Wang Y, Tan X and Jing H. MicroRNAs in autophagy and their emerging roles in crosstalk with apoptosis. *Autophagy*. 2012; 8(6):873-882.
91. Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136(2):215-233.
92. Raisch J, Darfeuille-Michaud A and Nguyen HTT. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2013; 19(20):2985-2996.
93. Standart N and Jackson RJ. MicroRNAs repress translation of m⁷Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. *Genes & development*. 2007; 21(16):1975-1982.

94. Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, Tari A, Sanguino A, Kondo Y, Kondo S, Arun B, Lopez-Berestein G and Ozpolat B. Silencing of bcl-2 expression by small interfering rna induces autophagic cell death in mcf-7 breast cancer cells. *Autophagy*. 2008; 4(5):669-679.
95. Cowland JB, Hother C and Grønbaek K. Micrnas and cancer. *Apmis*. 2007; 115(10):1090-1106.
96. Pasquinelli AE. Micrnas and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*. 2012; 13(4):271-282.
97. Kim VN and Nam J-W. Genomics of micrna. *Trends in Genetics*. 2006; 22(3):165-173.
98. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S and Kim VN. Micrna maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*. 2002; 21(17):4663-4670.
99. Olena AF and Patton JG. Genomic organization of micrnas. *Journal of cellular physiology*. 2010; 222(3):540-545.
100. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL and Bradley A. Identification of mammalian micrna host genes and transcription units. *Genome research*. 2004; 14(10a):1902-1910.
101. Lin S and Gregory RI. Micrna biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews cancer*. 2015; 15(6):321.
102. Sana J, Faltejskova P, Svoboda M and Slaby O. Novel classes of non-coding rnas and cancer. *Journal of translational medicine*. 2012; 10(1):103.
103. Bartel DP. Micrnas: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116(2):281-297.
104. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH and Kim VN. Micrna genes are transcribed by rna polymerase ii. *The EMBO journal*. 2004; 23(20):4051-4060.
105. Davis-Dusenbery BN and Hata A. Mechanisms of control of micrna biogenesis. *The journal of biochemistry*. 2010; 148(4):381-392.
106. Cai X, Hagedorn CH and Cullen BR. Human micrnas are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mrnas. *Rna*. 2004; 10(12):1957-1966.
107. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF and Hannon GJ. Processing of primary micrnas by the microprocessor complex. *Nature*. 2004; 432(7014):231.

108. Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N and Shiekhattar R. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004; 432(7014):235.
109. Krol J, Loedige I and Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*. 2010; 11(9):597.
110. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H and Kim VN. The drosha-dgcr8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*. 2004; 18(24):3016-3027.
111. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O and Kim S. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003; 425(6956):415.
112. Yi R, Qin Y, Macara IG and Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 2003; 17(24):3011-3016.
113. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE and Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004; 303(5654):95-98.
114. Bohnsack MT, Czapinski K and Görlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004; 10(2):185-191.
115. Park J-E, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, Patel DJ and Kim VN. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*. 2011; 475(7355):201.
116. Lee HY and Doudna JA. Trbp alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA*. 2012; 18(11).
117. Kim Y, Yeo J, Lee JH, Cho J, Seo D, Kim J-S and Kim VN. Deletion of human trbp2 reveals cellular microRNA targets and cell-cycle function of trbp. *Cell reports*. 2014; 9(3):1061-1074.
118. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K and Shiekhattar R. Trbp recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005; 436(7051):740.
119. O'carroll D, Mecklenbrauker I, Das PP, Santana A, Koenig U, Enright AJ, Miska EA and Tarakhovsky A. A slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes & development*. 2007; 21(16):1999-2004.

120. Shenouda SK and Alahari SK. MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? *Cancer and Metastasis Reviews*. 2009; 28(3-4):369-378.
121. Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ and Chien S. MicroRNA: A master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2010; 12:1-27.
122. Pillai RS. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny rna? *Rna-a Publication of the Rna Society*. 2005; 11(12):1753-1761.
123. Supic G, Jagodic M and Magic Z. Epigenetics: A new link between nutrition and cancer. *Nutrition and Cancer-an International Journal*. 2013; 65(6):781-792.
124. Brennecke J, Stark A, Russell RB and Cohen SM. Principles of microRNA–target recognition. *PLoS biology*. 2005; 3(3):e85.
125. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, Macmenamin P, Da Piedade I, Gunsalus KC and Stoffel M. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics*. 2005; 37(5):495.
126. Lewis BP, Burge CB and Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120(1):15-20.
127. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB and Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009; 19(1):92-105.
128. Grimson A, Farh KKH, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP and Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*. 2007; 27(1):91-105.
129. Van Peer G, Mets E, Claeys S, De Punt I, Lefever S, Ongenaert M, Rondou P, Speleman F, Mestdagh P and Vandesompele J. A high-throughput 3'utr reporter screening identifies microRNA interactomes of cancer genes. *PloS one*. 2018; 13(3):e0194017.
130. Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J and Burge CB. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *Rna*. 2007; 13(11):1894-1910.
131. Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP and Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*. 2007; 27(1):91-105.

132. Krol J, Loedige I and Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*. 2010; 11(9):597-610.
133. Siomi H and Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell*. 2010; 38(3):323-332.
134. Mingardi J, Musazzi L, De Petro G and Barbon A. Mirna editing: New insights into the fast control of gene expression in health and disease. *Molecular Neurobiology*. 2018; 55(10):7717-7727.
135. Breving K and Esquela-Kerscher A. The complexities of microRNA regulation: Mirandering around the rules. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010; 42(8):1316-1329.
136. Heo I, Joo C, Kim Y-K, Ha M, Yoon M-J, Cho J, Yeom K-H, Han J and Kim VN. Tut4 in concert with lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell*. 2009; 138(4):696-708.
137. Sekar TV, Mohanram RK, Foygel K and Paulmurugan R. Therapeutic evaluation of microRNAs by molecular imaging. *Theranostics*. 2013; 3(12):953-974.
138. Chivukula RR and Mendell JT. Circular reasoning: MicroRNAs and cell-cycle control. *Trends in biochemical sciences*. 2008; 33(10):474-481.
139. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y and Yu Q. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*. 2015; 6(11):8474.
140. Lou W, Liu J, Gao Y, Zhong G, Chen D, Shen J, Bao C, Xu L, Pan J and Cheng J. MicroRNAs in cancer metastasis and angiogenesis. *Oncotarget*. 2017; 8(70):115787.
141. Wagner S, Willenbrock S, Nolte I and Murua Escobar H. Comparison of non-coding rnas in human and canine cancer. *Front Genet*. 2013; 4:46.
142. Kosaka N, Iguchi H and Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Science*. 2010; 101(10):2087-2092.
143. Ma R, Jiang T and Kang X. Circulating microRNAs in cancer: Origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012; 31:38.
144. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M and Rai K. Frequent deletions and down-regulation of micro-rna genes mir15 and mir16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2002; 99(24):15524-15529.

145. Caldas C and Brenton JD. Sizing up mirnas as cancer genes. *Nature medicine*. 2005; 11(7):712-714.
146. Le Quesne J and Caldas C. Micro-rnas and breast cancer. *Molecular oncology*. 2010; 4(3):230-241.
147. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S and Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/bic rna in children with burkitt lymphoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2004; 39(2):167-169.
148. Chan JA, Krichevsky AM and Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer research*. 2005; 65(14):6029-6033.
149. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Franssila K and Suster S. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102(52):19075-19080.
150. Sevli S, Uzumcu A, Solak M, Ittmann M and Ozen M. The function of micrnas, small but potent molecules, in human prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2010; 13(3):208-217.
151. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y and Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, mir-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer research*. 2005; 65(21):9628-9632.
152. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T and Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*. 2006; 25(17):2537-2545.
153. Bautista-Sánchez D, Arriaga-Canon C, Pedroza-Torres A, De La Rosa-Velázquez IA, González-Barrios R, Contreras-Espinosa L, Montiel-Manríquez R, Castro-Hernández C, Fragoso-Ontiveros V and Álvarez-Gómez RM. The promising role of mir-21 as a cancer biomarker and its importance in rna-based therapeutics. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2020.
154. Zhang B, Pan X, Cobb GP and Anderson TA. Micrnas as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*. 2007; 302(1):1-12.
155. Fuse M, Nohata N, Kojima S, Sakamoto S, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Nakagawa M, Naya Y and Ichikawa T. Restoration of mir-145 expression

- suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting fscn1. *International journal of oncology*. 2011; 38(4):1093-1101.
156. Mizuno R, Kawada K and Sakai Y. The molecular basis and therapeutic potential of let-7 micrnas against colorectal cancer. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018; 2018.
 157. Gulei D, Magdo L, Jurj A, Raduly L, Cojocneanu-Petric R, Moldovan A, Moldovan C, Florea A, Pasca S and Pop L-A. The silent healer: Mir-205-5p up-regulation inhibits epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells by indirectly up-regulating e-cadherin expression. *Cell death & disease*. 2018; 9(2):1-16.
 158. Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, M Croce C and Condorelli G. Mir221/222 in cancer: Their role in tumor progression and response to therapy. *Current molecular medicine*. 2012; 12(1):27-33.
 159. Guttilla IK and White BA. Coordinate regulation of foxo1 by mir-27a, mir-96, and mir-182 in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284(35):23204-23216.
 160. Calin GA and Croce CM. Microrna signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6(11):857-866.
 161. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD and Patel T. Involvement of human micro-rna in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006; 130(7):2113-2129.
 162. Zaheer U, Faheem M, Qadri I, Begum N, Yassine HM, Al Thani AA and Mathew S. Expression profile of microrna: An emerging hallmark of cancer. *Current pharmaceutical design*. 2019; 25(6):642-653.
 163. Jing P, Zhao N, Xie N, Ye M, Zhang Y, Zhang Z, Li M, Lai X, Zhang J and Gu Z. Mir-24-3p/fgfr3 signaling as a novel axis is involved in epithelial-mesenchymal transition and regulates lung adenocarcinoma progression. *Journal of immunology research*. 2018; 2018.
 164. Yin Y, Zhong J, Li S-W, Li J-Z, Zhou M, Chen Y, Sang Y and Liu L. Trim11, a direct target of mir-24-3p, promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(52):86755.

165. Zhang M-X, Zhang J, Zhang H and Tang H. Mir-24-3p suppresses malignant behavior of lacrimal adenoid cystic carcinoma by targeting prkch to regulate p53/p21 pathway. *PloS one*. 2016; 11(6).
166. Hao S, Ma J, Liu Y, Liu P and Qin Y. Long non-coding tug1 accelerates prostate cancer progression through regulating mir-128-3p/yes1 axis. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2020; 24(2):619.
167. Huang W, Gu J, Tao T, Zhang J, Wang H and Fan Y. Mir-24-3p inhibits the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma through lamb3 downregulation. *Frontiers in Oncology*. 2019; 9.
168. Bao J, Zhang S, Meng Q and Qin T. Snhg16 silencing inhibits neuroblastoma progression by downregulating hoxa7 via sponging mir-128-3p. *Neurochemical Research*. 2020:1-12.
169. Qu C, Yan C, Cao W, Li F, Qu Y, Guan K, Si C, Yu Z and Qu Z. Mir-128-3p contributes to mitochondrial dysfunction and induces apoptosis in glioma cells via targeting pyruvate dehydrogenase kinase 1. *IUBMB life*. 2019.
170. Yang L, Zhang L, Lu L and Wang Y. Long noncoding rna snhg16 sponges mir-182-5p and mir-128-3p to promote retinoblastoma cell migration and invasion by targeting lasp1. *OncoTargets and therapy*. 2019; 12:8653.
171. Ye X and Chen X. Mir-149-5p inhibits cell proliferation and invasion through targeting git1 in medullary thyroid carcinoma. *Oncology letters*. 2019; 17(1):372-378.
172. Zhao J, Li D and Fang L. Mir-128-3p suppresses breast cancer cellular progression via targeting limk1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 115:108947.
173. Ji D, Wang Y, Li H, Sun B and Luo X. Long non-coding rna linc00461/mir-149-5p/lrig2 axis regulates hepatocellular carcinoma progression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019; 512(2):176-181.
174. Liu L, Chen Y, Li Q and Duan P. Lncrna hnfla-as1 modulates non-small cell lung cancer progression by targeting mir-149-5p/cdk6. *Journal of cellular biochemistry*. 2019; 120(11):18736-18750.
175. Zhang X, Wang S, Wang H, Cao J, Huang X, Chen Z, Xu P, Sun G, Xu J and Lv J. Circular rna circnrip1 acts as a microrna-149-5p sponge to promote gastric cancer progression via the akt1/mtor pathway. *Molecular cancer*. 2019; 18(1):20.

176. Paweletz N. Walther Flemming: Pioneer of mitosis research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001; 2(1):72.
177. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972; 26(4):239.
178. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. 2002; 181:471-474.
179. Van Cruchten S and Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia*. 2002; 31(4):214-223.
180. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007; 35(4):495-516.
181. Balvan J, Krizova A, Gumulec J, Raudenska M, Sladek Z, Sedlackova M, Babula P, Sztalmachova M, Kizek R and Chmelik R. Multimodal holographic microscopy: Distinction between apoptosis and oncosis. *PloS one*. 2015; 10(3):e0121674.
182. Norbury CJ and Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2001; 41(1):367-401.
183. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini G, Capaccioli S and Zecchi Orlandini S. Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of cellular physiology*. 2000; 182(1):41-49.
184. Chowdhury I, Tharakan B and Bhat GK. Caspases—an update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2008; 151(1):10-27.
185. Mace PD and Riedl SJ. Molecular cell death platforms and assemblies. *Current opinion in cell biology*. 2010; 22(6):828-836.
186. Würstle ML, Laussmann MA and Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Experimental cell research*. 2012; 318(11):1213-1220.
187. Berthelet J and Dubrez L. Regulation of apoptosis by inhibitors of apoptosis (iaps). *Cells*. 2013; 2(1):163-187.
188. Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM and Ali AG. Inhibitors of apoptosis: Clinical implications in cancer. *Apoptosis*. 2017; 22(12):1487-1509.

189. Chao DT and Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: Regulators of cell death. Annual review of immunology. 1998; 16(1):395-419.
190. Adams JM and Cory S. Life-or-death decisions by the bcl-2 protein family. Trends in biochemical sciences. 2001; 26(1):61-66.
191. Wong RS. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2011; 30(1):87.
192. Listen P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, Mclean M, Mackenzie A and Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by naip and a related family of iap genes. Nature. 1996; 379(6563):349.
193. Silke J and Meier P. Inhibitor of apoptosis (iap) proteins—modulators of cell death and inflammation. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2013; 5(2):a008730.
194. Wang K and Lin B. Inhibitor of apoptosis proteins (iaps) as regulatory factors of hepatic apoptosis. Cellular signalling. 2013; 25(10):1970-1980.
195. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL and Dingwall C. The serine protease omi/htra2 regulates apoptosis by binding xiap through a reaper-like motif. Journal of Biological Chemistry. 2002; 277(1):439-444.
196. Vousden KH and Lane DP. P53 in health and disease. Nature reviews Molecular cell biology. 2007; 8(4):275.
197. Petitjean A, Achatz M, Borresen-Dale A-L, Hainaut P and Olivier M. Tp53 mutations in human cancers: Functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene. 2007; 26(15):2157.
198. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ and Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. Discovery medicine. 2010; 9(45):145-152.
199. Jagtap P and Szabó C. Poly (adp-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. Nature reviews Drug discovery. 2005; 4(5):421.
200. Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P and Shall S. Xrcc1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly poly (adp-ribose) polymerase, and DNA ligase iii is a novel molecular ‘nick-sensor’ in vitro. Nucleic acids research. 1996; 24(22):4387-4394.

201. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J and Boothman DA. Review of poly (adp-ribose) polymerase (parp) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2014; 24(1).
202. Danial NN and Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points. *Cell*. 2004; 116(2):205-219.
203. Saelens X, Festjens N, Walle LV, Van Gurp M, Van Loo G and Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004; 23(16):2861.
204. Newmeyer DD and Ferguson-Miller S. Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003; 112(4):481-490.
205. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM and Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal*. 2004; 23(10):2134-2145.
206. Ekert PG and Vaux DL. The mitochondrial death squad: Hardened killers or innocent bystanders? *Current opinion in cell biology*. 2005; 17(6):626-630.
207. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng H-YM and Ravagnan L. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001; 410(6828):549.
208. Sayers TJ. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2011; 60(8):1173-1180.
209. Koff JL, Ramachandiran S and Bernal-Mizrachi L. A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015; 16(2):2942-2955.
210. Schröder M and Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem*. 2005; 74:739-789.
211. Deniaud A, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C and Brenner C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*. 2008; 27(3):285.
212. Rizzuto R and Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca^{2+} : Molecular determinants and functional consequences. *Physiological reviews*. 2006; 86(1):369-408.

213. Puthalakath H, O'reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, Mckimm-Breschkin J and Motoyama N. Er stress triggers apoptosis by activating bh3-only protein bim. *Cell*. 2007; 129(7):1337-1349.
214. Trapani JA, Jans DA, Jans PJ, Smyth MJ, Browne KA and Sutton VR. Efficient nuclear targeting of granzyme b and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme b and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(43):27934-27938.
215. Trapani JA and Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2(10):735.
216. Smyth MJ and Trapani JA. Granzymes: Exogenous porteinases that induce target cell apoptosis. *Immunology today*. 1995; 16(4):202-206.
217. Liu J, Zhu L and He W. Killing cell by granzyme. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*. 2002; 24(4):442-444.
218. Midorikawa Y, Tsutsumi S, Taniguchi H, Ishii M, Kobune Y, Kodama T, Makuuchi M and Aburatani H. Identification of genes associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with expression profiling analysis. *Jpn J Cancer Res*. 2002; 93(6):636-643.
219. Wong N, Chan A, Lee SW, Lam E, To KF, Lai PB, Li XN, Liew CT and Johnson PJ. Positional mapping for amplified DNA sequences on 1q21-q22 in hepatocellular carcinoma indicates candidate genes over-expression. *J Hepatol*. 2003; 38(3):298-306.
220. Peters DG, Kudla DM, Deloia JA, Chu TJ, Fairfull L, Edwards RP and Ferrell RE. Comparative gene expression analysis of ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium by serial analysis of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14(7):1717-1723.
221. Croce CM and Calin GA. Mirnas, cancer, and stem cell division. *Cell*. 2005; 122(1):6-7.
222. Skawran B, Steinemann D, Weigmann A, Flemming P, Becker T, Flik J, Kreipe H, Schlegelberger B and Wilkens L. Gene expression profiling in hepatocellular carcinoma: Upregulation of genes in amplified chromosome regions. *Mod Pathol*. 2008; 21(5):505-516.

223. Keenan J, Murphy L, Henry M, Meleady P and Clynes M. Proteomic analysis of multidrug-resistance mechanisms in adriamycin-resistant variants of dlkp, a squamous lung cancer cell line. *Proteomics*. 2009; 9(6):1556-1566.
224. Cui X, Hu ZP, Li Z, Gao PJ and Zhu JY. Overexpression of chaperonin containing tcp1, subunit 3 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(28):8588-8604.
225. Su P, Wen S, Zhang Y, Li Y, Xu Y, Zhu Y, Lv H, Zhang F, Wang M and Tian Z. Identification of the key genes and pathways in esophageal carcinoma. *Gastroenterol Res Pract*. 2016; 2016:2968106.
226. Li LJ, Zhang LS, Han ZJ, He ZY, Chen H and Li YM. Chaperonin containing tcp-1 subunit 3 is critical for gastric cancer growth. *Oncotarget*. 2017; 8(67):111470-111481.
227. Shi X, Cheng S and Wang W. Suppression of cct3 inhibits malignant proliferation of human papillary thyroid carcinoma cell. *Oncol Lett*. 2018; 15(6):9202-9208.
228. Hou JY, Wu HY, He RQ, Lin P, Dang YW and Chen G. Clinical and prognostic value of chaperonin containing t-complex 1 subunit 3 in hepatocellular carcinoma: A study based on microarray and rna-sequencing with 4272 cases. *Pathol Res Pract*. 2019; 215(1):177-194.
229. Qian EN, Han SY, Ding SZ and Lv X. Expression and diagnostic value of cct3 and iqgap3 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int*. 2016; 16:55.
230. Hensley CT, Wasti AT and Deberardinis RJ. Glutamine and cancer: Cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of clinical investigation*. 2013; 123(9):3678-3684.
231. Still ER and Yuneva MO. Hopefully devoted to q: Targeting glutamine addiction in cancer. *British journal of cancer*. 2017; 116(11):1375-1381.
232. Vaughan RA, Gannon NP, Garcia-Smith R, Licon-Munoz Y, Barberena MA, Bisoffi M and Trujillo KA. B-alanine suppresses malignant breast epithelial cell aggressiveness through alterations in metabolism and cellular acidity in vitro. *Molecular cancer*. 2014; 13(1):14.
233. Li S, Chen P, Zheng K, Wang W, Pei Y, Qiu E and Zhang X. B-alanine mediated inhibition of pthr1 suppresses the proliferation, invasion and tumorigenesis in metastatic human osteosarcoma u2os cells. *International journal of biological macromolecules*. 2018; 111:1255-1263.

234. Kaji S, Irino T, Kusuhara M, Makuuchi R, Yamakawa Y, Tokunaga M, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T and Kami K. Metabolomic profiling of gastric cancer tissues identified potential biomarkers for predicting peritoneal recurrence. *Gastric Cancer*. 2020;1-10.
235. Chattopadhyay E and Roy B. Altered mitochondrial signalling and metabolism in cancer. *Frontiers in oncology*. 2017; 7:43.
236. Vickers NJ. Animal communication: When i'm calling you, will you answer too? *Current biology*. 2017; 27(14):R713-R715.
237. Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza AL, Kafri R, Kirschner MW, Clish CB and Mootha VK. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*. 2012; 336(6084):1040-1044.
238. Lee B, Mahmud I, Marchica J, Dereziński P, Qi F, Wang F, Joshi P, Valerio F, Rivera I and Patel V. Integrated rna and metabolite profiling of urine liquid biopsies for prostate cancer biomarker discovery. *Scientific reports*. 2020; 10(1):1-17.
239. Khan AP, Rajendiran TM, Bushra A, Asangani IA, Athanikar JN, Yocum AK, Mehra R, Siddiqui J, Palapattu G and Wei JT. The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression. *Neoplasia*. 2013; 15(5):491-IN413.
240. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, Laxman B, Mehra R, Lonigro RJ and Li Y. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*. 2009; 457(7231):910-914.
241. Krall AS, Xu S, Graeber TG, Braas D and Christofk HR. Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. *Nature communications*. 2016; 7(1):1-13.

ÖZGEÇMİŞ

Ebru TEMİZ 1990 yılında Kahramanmaraş Elbistan’da doğdu. Lise öğrenimini Elbistan Mükrimin Halil Lisesi’nde tamamladı. Lisans eğitimine 2008 yılında Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde başladı ve 2012 yılında mezun oldu. 2013 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2016 yılında, “PINK1-AS lncRNA’sının HCT116 kolon kanseri hücre hattındaki teröpatik etkisinin araştırılması” isimli tez konusu ile yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2016 yılında, aynı anabilim dalında doktora eğitimine başladı. 2017 yılında, Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO’da Öğretim Görevlisi olarak çalışmaya başladı.

