



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OTOFAJİ İLE İLİŞKİLİ MİKRORNA'LARIN AKCİĞER KANSERİNDEKİ
ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seçil EROĞLU
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Feridun IŞIK

Gaziantep
2018

T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OTOFAJİ İLE İLİŞKİLİ MİKRORNA’LARIN AKCİĞER KANSERİNDEKİ
ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seçil EROĞLU

Tez Savunma Tarihi: 03.12.2018

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet Feridun IŞIK

İkinci Tez Danışmanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi
Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İmzası

Prof.Dr. Sultan CİNGÖZ

Prof.Dr. Muradiye NACAK

Dr. Öğr. Üyesi Elif PALA

Dr. Öğr. Üyesi Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR

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.

01.11.2018

SEÇİL EROĞLU

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince sabrını ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof.Dr. Sibel Oğuzkan Balcı'ya ve katkılarından dolayı ikinci danışmanım Prof.Dr. Ahmet Feridun Işık'a, teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Başım her sıkıştığında bana yardım isteme özgürlüğü tanıyan ve beni yoğunluğuna rağmen tereddütsüz laboratuvarına davet eden Ege Üniversitesi'nden sevgili hocam Prof.Dr. Petek Ballar Kırmızıbayrak'a ve çılgın yoğunluklarına rağmen yardımlarını esirgemeyen, iyi ki tanıdığım dediğim güzel insanlar Arş.gör.Sinem Yılmaz, Arş.gör.Recep İlhan, Arş.gör.Göklem Üner, hoş sohbetlerinden dolayı Selin Günal ve Dr.Öğr.Üyesi Yalçın Erzurumlu'ya sonsuz teşekkür ederim.

Bu süreçte bana her anlamda destek olan, sohbetiyle dayanma gücü veren yol arkadaşım Dr. Ceyda Okudu'ya, kahve molalarında beni yalnız bırakmayan Seçil Demiral, Zeynep Ulukütük, Dr. Demet Kahraman'a ve oda arkadaşım Murat Korkmaz'a çok teşekkür ederim.

Her anımda karşılıksız arkamda olan ve bunu bana her an hissettiren anneme, babama ve canım kardeşime, bana inandığınız, her anlamda destek olduğunuz için sonsuz teşekkürler.

Yıllardır elimi bırakmayan, bu süreçte tüm duygularıma ortak olan, her an yanımda olduğunu hissettiren en iyi arkadaşım, çocukluğum, sevgili eşim Hayri Eroğlu'na ve tabii ki evimizin neşesi, canım oğlumuz Behiç'e teşekkürlerin yetmeyeceğini bilsem de sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF.DT.18.05 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE ve KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri	3
2.1.1. Akciğer kanserinde anahtar tanı ve prognostik mutasyonlar	3
2.2. Otofaji	5
2.2.1. Otofaji Çeşitleri	7
2.2.1.1. Makrootofaji	7
2.2.1.2. Mikrotofaji.....	7
2.2.1.3. Şaperon aracılı otofaji (chaperone-mediated autophagy - CMA).....	7
2.2.2. Otofaji Oluşum ve Düzenlenme Mekanizmaları.....	8
2.2.3. Otofaji Süreci Basamakları.....	10
2.2.3.1. Uyarılma (indüksiyon) fazı.....	10
2.2.3.2. Çekirdeklenme (nükleasyon) fazı	10
2.2.3.3. Uzama fazı	11
2.2.3.4. Lizozomla birleşme ve yıkım fazı	12
2.2.3.5. ATG9A'nın Otofaji Sürecindeki Rolü.....	12
2.2.3.6. ATG4D'nin Otofaji Sürecindeki Rolü.....	13
2.3. Kanser ve Otofaji	13
2.4. MikroRNA'lar.....	14
2.5. Kanser ve mikroRNA.....	16
2.6. Otofaji ve mikroRNA.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Hücre hatları	19

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	20
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Plazmid	21
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	21
3.2. YÖNTEM.....	22
3.2.1. Hücre Kültürü	22
3.2.1.1. Hücre pasajı	22
3.2.1.2. Hücre sayımı	23
3.2.2. ATG4D ve ATG9A'yı hedefleyen mikroRNA'ların seçilmesi.....	23
3.2.3. Hücre hatlarına mimik transfeksiyonu	23
3.2.4. Hücre hatlarından total RNA izolasyonu	24
3.2.5. RNA Konsantrasyon Tayini	25
3.2.6. Komplementer DNA (cDNA) sentezi	26
3.2.7. Gerçek-Zamanlı Kantitatif PCR (Real-Time qPCR) ile Gen Ekspresyon Analizi	27
3.2.8. Western blot için hücre ekimi ve toplanması	28
3.2.9. Hücre lizatının hazırlanması	29
3.2.10. Protein Konsantrasyon Tayini	29
3.2.11. Western blotlama ile protein analizi	30
3.2.11.1. Örneklerin hazırlanması.....	30
3.2.11.2. SDS-PAGE jel elektroforezi	30
3.2.11.3. Proteinlerin membrana transferi	31
3.2.11.4. Membranı Bloklama ve Blotlama	31
3.2.11.5. Birincil antikor ile inkübasyon	32
3.2.11.6. İkincil antikor ile inkübasyon	32
3.2.11.7. Görüntüleme ve analiz	32
3.2.12. WST-1 Hücre Canlılığı Testi	32
3.2.13. Hücre Proliferasyonunun Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence) ile Test Edilmesi	33
3.2.14. Koloni Oluşum Deneyi	35
3.2.14.1 İki Boyutlu Koloni Oluşum Deneyi	35
3.2.14.2 Üç Boyutlu Yumuşak Agar Koloni Oluşum Deneyi	35
3.2.14.2.1. Alt agar tabakasının hazırlanması	35
3.2.14.2.2. Üst agar tabakasının hazırlanması	35
3.2.15. Hücre Göçü Deneyleri	36

3.2.15.1. Oris™ Hücre Göçü Analizi	36
3.2.15.2. Boyden Chamber Migrasyon Testi	37
3.2.15.3. İnvazyon Testi.....	38
3.2.16. Flow-sitometrik Apoptozis Tayini	39
3.2.17. LC3 Floresan Görüntüleme	40
3.2.17.1. Kompetent Bakteri Hazırlama	40
3.2.17.2. Plazmid Aktarımı (Transformasyon)	41
3.2.17.3. Plazmid İzolasyonu.....	41
3.2.17.4. Hücre Hatlarına Plazmid Verilmesi ve Görüntüleme	42
3.2.18. Verilerin istatistiksel analizi.....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. miR-96, miR-101 ve miR-138'in Beas2B, A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarındaki Ekspresyonları.....	44
4.2. Mimik transfeksiyonundan sonra A549 ve HTB-54 hücre hatlarında miRNA ekspresyon seviyesindeki değişimler	45
4.3. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 Hücre Hattında Otofaji üzerine Etkileri	47
4.4. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 Hücre Hattında Otofaji üzerine Etkileri	48
4.5. miR-96-5p'nin A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarında ATG9A'ya Etkisi.....	50
4.6. miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarında ATG4D'ye Etkileri.....	50
4.7. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarında Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	51
4.8. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarında Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkilerinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence) ile İncelenmesi	53
4.9. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HT-54 Hücre Hatlarında İki Boyutlu Koloni Oluşumu Üzerine Etkileri	56
4.10. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HT-54 Hücre Hatlarında Üç Boyutlu Yumuşak Agar Koloni Oluşumu Üzerine Etkileri	57
4.11. MiR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 Hücre Hattında Oris Hücre Göçü Üzerine Etkileri	59
4.12. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin Boyden Chamber Hücre Göçü Üzerine Etkileri	61
4.13. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarında Apoptozis Üzerine Etkileri.....	64

5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	67
6. KAYNAKLAR	72



SİMGE ve KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur. Eğer kullanılan terimin İngilizcesinin baş harflerinden oluşan kısaltma literatürde yaygın olarak kullanılıyorsa, çalışmada ilgili terimin İngilizce kısaltması tercih edilmiştir.

Kısaltma	Açıklama
NIH	National Institutes of Health (Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü)
KHDAK	Küçük hücre dışı akciğer kanseri
TKI	Tirozin kinaz inhibitörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ATG	Autophagy-related genes (Otofaji ilişkili genler)
ROS	Reactive oxygen species (Reaktif oksijen türleri)
CMA	Chaperone-mediated autophagy (Şaperon aracılı otofaji)
BCA	Bisinkoninik asit
bp	Base pair (Baz çifti)
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
DGCR8	Mikroışleyici kompleks altünite 8
dH ₂ O	Distile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
GAPDH	Gliserldehit-3 fosfat dehidrogenaz
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution (Dengeleyici Tuz Çözeltisi)
HRP	Horseradish Peroxidase (At turpu peroksidazı)
RNA	Ribonükleik asit
miRNA	Mikro-ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
PBS	Phosphate buffered saline (Fosfat tuz tamponu)
PVDF	Polyvinylidene difluoride (Poliviniliden florür)
RISC	RNA-induced silencing complex (RNA ile indüklenen susturma kompleksi)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Real-time PCR (Gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
siRNA	Small interfering RNA
TBS	Tris buffered solution (Tris- tuz tamponu)
TBST	Tris buffered solution-Tween 20 (Tris- tuz tamponu –Tween 20)
TEMED	Tetrametiletildiamin
UTR	Untranslated region (Kodlanmayan bölge)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Otofaji yolağı ve ana otofaji proteinlerinin şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.2. Otofaji çeşitleri	7
Şekil 2.3. Otofajinin mTOR ile düzenlenme mekanizması	9
Şekil 2.4. Otofajinin açlık koşullarında mTOR üzerinden aktive edilmesi.....	9
Şekil 2.5. Otofaji sürecinin şematik gösterimi	10
Şekil 2.6. Otofagozom oluşumunda çekirdeklenme fazı.	11
Şekil 2.7. Otofagozom oluşumunda uzama fazı	11
Şekil 2.8. Olgun miRNA oluşumu.....	16
Şekil 3.1. Mikroelektrotlarla kaplı plate kuyu görüntüsü	33
Şekil 3.2. Empedans elektrotların dizilimi	34
Şekil 3.3. Oris™ Hücre göçü analizi şematik ve mikroskopik görünümü	36
Şekil 3.4. Boyden Chamber hücre göçü deneyi şematik gösterimi	37
Şekil 4.1. miR-96, miR-101 ve miR-138'in Beas2B ve A549 hücre hatlarındaki ekspresyonları	44
Şekil 4. 2. miR-96, miR-101 ve miR-138'in Beas2B ve HTB-54 hücre hatlarındaki ekspresyonları	45
Şekil 4. 3. A549 hücre hattında mimik transfeksiyonlarının doğrulanması.	46
Şekil 4.4. HTB54 hücre hattında mimik transfeksiyonlarının doğrulanması.	46
Şekil 4. 5. miR-96-5p'nin A549 hücre hattında otofajiye etkisi	47
Şekil 4.6. miR-101-3p'nin A549 hücre hattında otofajiye etkisi	48
Şekil 4.7. miR-138-5p'nin A549 hücre hattında otofajiye etkisi	48
Şekil 4.8. miR-96-5p'nin HTB-54 hücre hattında otofajiye etkisi	49
Şekil 4.9. miR-101-3p'nin HTB-54 hücre hattında otofajiye etkisi	49
Şekil 4.10. miR-138-5p'nin HTB-54 hücre hattında otofajiye etkisi	49
Şekil 4.11. A549 ve HTB-54 hücre hatlarında miR-96-5p'nin ATG9A'ya etkisi. (A) miR-96-5p'nin ATG9A mRNA seviyesine etkisi. (B) miR-96-5p'nin ATG9A protein düzeyine etkisi.	50
Şekil 4.12. A549 ve HTB-54 hücre hatlarında miR-101-3p ve miR-138-5p'nin ATG4D'ye etkisi.....	51
Şekil 4.13. MiR-96-5p'nin A549 ve HTB-54 hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi	52
Şekil 4.14. MiR-101-3p'nin A549 ve HTB-54 hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi.	52
Şekil 4.15. MiR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi.	53
Şekil 4.16. MiR-96-5p'nin A549 hücre hattında proliferasyona etkisinin gerçek zamanlı izlenmesi.....	54
Şekil 4.17. MiR-96-5p'nin HTB-54 hücre hattında proliferasyona etkisinin gerçek zamanlı izlenmesi.....	54
Şekil 4.18. MiR-101-3p'nin A549 hücre hattında proliferasyona etkisinin gerçek zamanlı izlenmesi.....	55

Şekil 4.19. MiR-101-3p'nin HTB-54 hücre hattında proliferasyona etkisinin gerçek zamanlı izlenmesi.....	55
Şekil 4.20. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 Hücre Hattında İki Boyutlu Koloni Oluşumu Üzerine Etkileri	56
Şekil 4. 21. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 Hücre Hattında İki Boyutlu Koloni Oluşumu Üzerine Etkileri	57
Şekil 4.22. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında yumuşak agar 3-boyutlu koloni oluşturma üzerine etkileri.....	58
Şekil 4.23. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 hücre hattında yumuşak agar 3-boyutlu koloni oluşturma üzerine etkileri	58
Şekil 4.24. A549 hücre hattında Oris hücre göçü 0, 24 ve 48 saat alan görüntüleri	59
Şekil 4.25. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında Oris hücre göçü üzerine etkileri.....	60
Şekil 4.26. HTB-54 hücre hattında Oris hücre göçü	60
Şekil 4.27. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 hücre hattında Oris hücre göçü üzerine etkileri.....	61
Şekil 4.28. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 Hücre Hattında Migrasyona Etkileri	62
Şekil 4.29. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 Hücre Hattında İnvazyona Etkileri.	63
Şekil 4.30. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 Hücre Hattında Migrasyona Etkileri	63
Şekil 4.31. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 Hücre Hattında İnvazyona Etkileri.....	64
Şekil 4.32. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında apoptozis üzerine etkileri.	65
Şekil 4.33. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında apoptotik hücre yüzdelerine etkileri.....	65
Şekil 4.34. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 hücre hattında apoptozis üzerine etkileri	66
Şekil 4.35. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında apoptotik hücre yüzdelerine etkileri.....	66

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının karakteristikleri	19
Tablo 3.2. Transfeksiyon bileşenleri ve miktarları	24
Tablo 3.3. Örneklerin RNA konsantrasyonları	26
Tablo 3.4. cDNA sentezi için bileşenler ve miktarları.....	26
Tablo 3.5. MikroRNA'lar için qRT-PCR bileşenleri ve koşulları	27
Tablo 3.6. mikroRNA gen ekspresyonu için qRT-PCR Koşulları.....	28
Tablo 3.7. Otofaji gen ekspresyonu için qRT-PCR bileşenleri ve koşulları.....	28
Tablo 3.8. Otofaji gen ekspresyonu için qRT-PCR Koşulları	28
Tablo 3.9. BSA standartlarının hazırlanması	29
Tablo 4.1. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında apoptotik ve apoptotik olmayan hücre yüzdeleri.....	65
Tablo 4.2. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 hücre hattında apoptotik ve apoptotik olmayan hücre yüzdeleri.....	66

OTOFAJİ İLE İLİŞKİLİ MİKRORNA'LARIN AKCİĞER KANSERİNDEKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

SEÇİL EROĞLU

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İkinci Tez Danışmanı: Prof.Dr. Ahmet Feridun Işık

Temmuz 2018, 51 Sayfa

ÖZET

Akciğer kanseri, tüm kanser türleri arasında ülkemizde ve dünyada kansere bağlı ölümlerde ilk sırada yer almaktadır. Cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi, tümör büyümesini azaltabilir, ancak genellikle nüks görülür. Otofaji, hasarlı organallerin ve uzun ömürlü proteinlerin lizozomal yıkımını kapsayan hücresel bir süreçtir. Kanser erken evrelerinde tümör baskılayıcı olarak görev yapar ve genomik kararsızlığın azaltılması yönünde çalışarak kanser oluşumunu engeller, fakat ilerleyen evrelerde hasarlı protein ve organellerin yıkılıp, kanserli hücreye besin kaynağı olarak geri kazandırılmasına ve hücrenin kemoterapiye karşı direnç geliştirmesine katkı sağlar. Bu nedenle son yıllarda sitotoksik kemoterapi ile birlikte otofaji inhibisyon stratejileri de önerilmeye başlanmıştır. Bu tez çalışmasında, küçük hücre dışı akciğer kanseri modeli olan A549 ve HTB-54 hücre hatlarında miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin otofajiyi nasıl düzenlediklerinin araştırılması ile tedavi edici özelliklerinin olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla sitotoksisite, apoptozis, hücre proliferasyonu, koloni oluşumu, hücre göçü ve otofaji süreçleri üzerindeki olası etkilerinin araştırılması için çalışmalar yapılmış, her üç mikroRNA'nın da otofajiyi baskıladığı ve ayrıca tümör baskılayıcı gibi davranarak hücre proliferasyonu ve hücre göçünü azalttığı da gösterilmiştir. MiR-96-5p'nin otofaji genlerinden ATG9A'yı, miR-101-3p'nin ATG4D'yi hedefleyerek otofajiyi baskıladıkları gösterilmiş, miR-138-5p için hedef tanımlanamamıştır. Bu mikroRNA'ların otofajiyi inhibe ederek, akciğer kanseri hücrelerinin sağ kalımını azaltması, onların akciğer kanseri tedavisinde potansiyel yeni birer aday olabileceklerini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Otofaji, akciğer kanseri, mikroRNA, miRNA

ROLE OF AUTOPHAGY RELATED MICRORNAs IN LUNG CANCER

(PHD Thesis)

SEÇİL EROĞLU

Department of Medical Biology and Genetics

Supervisor: Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Second Supervisor: Prof.Dr. Ahmet Feridun Işık

July 2018, 51 pages

ABSTRACT

Lung cancer is leading cause of cancer-related deaths among all types of cancer in the world and our country as well. Survival rate is about 5 years despite treatment. Surgery, radiotherapy and chemotherapy may reduce tumor growth, but usually relapse occurs. Autophagy is a cellular process involving lysosomal degradation of damaged organelles and long-lived proteins. Autophagy acts as a tumor suppressor at early stages of cancer by removing damaged proteins and organelles and prevents cancer formation by reducing genomic instability. However, at later stages, it provides nutrients and energy to cancer cells by breaking down damaged proteins and organelles and it contributes resistance to cancer therapy via supporting cancer cells against cell stress conditions. Therefore, combination of cytotoxic chemotherapy and autophagy inhibition strategies have been proposed. In this study, it was aimed to investigate how miR-96, miR-101 and miR-138 regulate autophagy in A549 and HTB-54 lung cancer cell lines and whether they have therapeutic properties. To examine effects of these microRNAs on cytotoxicity, apoptosis, cell proliferation, colony formation, cell migration and autophagy processes, several assays were performed. All three miRNAs have been found to suppress autophagy and all act as a tumor suppressor, suppress cell proliferation and migration. MiR-96-5p was found to suppress autophagy by targeting ATG9A, miR-101-3p was shown to suppress autophagy by targeting ATG4D, the target for miR-138-5p was not identified. These microRNAs have shown to be potentially new candidates in treatment of lung cancer by reduction of lung cancer cell viability through inhibiting autophagy.

Keywords: Autophagy, lung cancer, microRNA, miRNA

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Akciğer kanseri, dünyada en yaygın görülen kanser türü olup, Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) verilerine göre 2012'de kanser tanısı alan tüm hastaların %13'ünü oluşturmaktadır. Akciğer kanserinin küçük hücreli ve küçük hücreli dışı olmak üzere başlıca iki türü vardır. Tüm akciğer kanserlerinin yüzde 85'inden sigara içmenin sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapi başlıca tedavi stratejilerdir fakat tedaviye rağmen sağkalım oranı yaklaşık 5 yıldır. Bu tedaviler, tümör büyümesini azaltabilir, ancak genellikle nüks oluşur. Çünkü genetik heterojenite ve tümör plastisitesi, mortaliteden sorumlu olan ilaç direnci ve metastazına katkıda bulunmaktadır (1).

Otofaji, hücre içi hasarlı protein ve organellerin, otofagozom adlı çift zarlı kesecikler içine alınarak, lizozoma yönlendirilmesini, burada lizozomal enzimler tarafından yıkılmasını ve ortaya çıkan yapı taşlarının hücrenin yeniden kullanımına sunulmasını kapsayan bir süreçtir. Büyüme faktörü eksikliği, oksijen yetersizliği ve açlık gibi hücrelerin strese maruz kaldığı koşullarda, otofajinin uyarılmasıyla organel ve proteinlerin yıkımı gerçekleşir ve ortaya çıkan yapı taşları hücreye besin ve enerji sağlayarak hücre homeostazisinde rol oynar (2). Son yıllarda yapılan çalışmalar, otofajinin hücre farklılaşması, hücre metabolizmasının düzenlenmesi, hücre içi patojenlerin yıkılması gibi fizyolojik süreçlere katkıda bulunduğunu göstermiştir (3). Bunun yanı sıra otofaji mekanizmasındaki aksaklıkların kanser, nörodejeneratif ve enfeksiyon hastalıklarıyla ilişkisi olduğu, dolayısıyla patofizyolojik durumlara da etkisi olduğu gösterilmiştir (4).

Otofajinin kanserde hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı rolü söz konusudur ve hangi yönde olduğuna tümörün tipi ve evresi gibi hücresel şartlara bağlı olarak karar verilir. Erken evrelerde hasar görmüş protein ve organelleri ortadan kaldırarak tümör baskılayıcı olarak görev yapar ve genomik kararsızlığın azaltılması yönünde çalışarak kanser oluşumunu engeller, fakat ilerleyen evrelerde karşılaşılan oksijen ve besin yetersizliği, endoplazmik retikulum ve mitokondriyal stres, kemoterapi, radyoterapi gibi hücresel streslerle, kanser hücresinin baş etmesi yönünde çalışır (5). Hasarlı protein ve organellerin yıkılıp, kanserli hücreye besin kaynağı olarak geri kazandırılmasına ve hücrenin kemoterapiye karşı direnç geliştirmesine katkı sağlar. Akciğer kanserinin

tedavisinde mevcut kullanılan kemoterapi ilaçları hücre ölümünü teşvik etmektedir, ancak nüks ve ilaç direnci sık görülmektedir. Bu yüzden sitotoksik kemoterapi ile birlikte otofaji inhibisyon stratejileri de önerilmeye başlanmıştır.

MikroRNA'lar (miRNA'lar) 17-25 nükleotid uzunluğunda tek zincirli kodlanmayan RNA'lardır. Hedefledikleri genlerin mRNA'ları ile baz eşleşmesi yaparak, hedef mRNA'nın yıkımına ya da proteine çevrilmelerinin (translasyon) baskılanmasına sebep olur. Bu sebeple miRNA'lar, genlerin transkripsiyon sonrası negatif düzenleyicileri olarak ifade edilebilir. miRNA'ların, kanser dahil birçok hastalıkla ilişkili oldukları gösterilmiştir (6). Tüm kanserlerde olduğu gibi akciğer kanserinde de kanserleşmeyi teşvik eden veya kanserinin oluşmasını baskılayan miRNA'lar bulunmaktadır ve her geçen gün bunlara yenileri eklenmektedir (7). Günümüzde biyobelirteç olarak saptanan ve patentlenen miRNA'lar ile bunların tedavi amaçlı kullanıldığı faz I ve faz II çalışmalar mevcuttur (8-9).

Bu tez çalışmasında, küçük hücre dışı akciğer kanseri modeli A549 ve HTB-54 hücre hatlarında, miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin otofaji yolağını baskılayıcı rollerinin olup olmadığının gösterilmesi ve bununla bağlantılı olarak, hücre proliferasyonu, hücre göçü ve koloni oluşumu gibi hücresel özelliklerin nasıl etkileneceğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla akciğer kanseri hücre hatlarına mikroRNA mimik transfeksiyonu yapılmış, gen ifadelerindeki artışın otofaji ve diğer hücresel süreçlere etkisi araştırılmıştır. Otofajinin hangi mekanizma üzerinden düzenlendiğinin gösterilmesi amacıyla otofaji genlerinden ATG4D'yi hedefleyen miR-101 ve miR-138 ile ATG9A'yı hedefleyen miR-96, biyoinformatik veri araçlarıyla seçilmiştir. MiR-96'nın ATG9A'yı, miR-101'in ATG4D'yi hedefleyerek otofajiyi baskıladıkları gösterilmiştir. MiR-138'in ATG4D'yi hedeflemediği gösterilmiş, dolayısıyla bu durum, onun başka mekanizmalar üzerinden otofajiyi baskıladığını düşündürmüştür. Her üç miRNA'nın da akciğer kanserinde hücre proliferasyonu, hücre göçü, koloni oluşumu gibi hücresel süreçleri baskıladığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, küçük hücre dışı akciğer kanserinde (KHDAK), miR-96, miR-101 ve miR-138'in hücre proliferasyonu ve hücre göçüne yol açan moleküler mekanizmalardan biri olduğu görülmektedir. Transfeksiyon sonrası gen ifade seviyelerindeki artışın, proliferasyon ve hücre göçünü baskılaması da göz önüne alındığında, akciğer kanseri tedavisi için potansiyel birer aday olabileceklerini söyleyebiliriz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünyadaki en yaygın ikinci kanser türü olup hem kadınlarda hem de erkeklerde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Akciğer kanserinin iki ana türü vardır. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 10-15'ini oluştururken, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) ise yaklaşık % 80-85 oranındadır. KHDAK, ayrıca adenokarsinoma (tüm akciğer karsinomlarının yaklaşık % 50'si), skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom şeklinde alt sınıflara ayrılır. Tüm akciğer kanserlerinin % 85'inden sigaranın sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Akciğer kanserinde medikal tedavilere rağmen sağkalım oranı düşüktür (10). Ortalama sağkalım süresi 5 yıl olsa da NIH 2008-2014 verilerine göre, hastaların sadece %18,6'sı 5 yıl hayatta kalmaktadır (NIH). Bunun temel sebebi erken tanı oranlarının düşük olmasıdır. Çoğu vakaya etkin bir tedavinin olmadığı ileri evrede teşhis konulmaktadır. Hastaların erken evrede (evre I ve II) tanısı konduğunda sağkalım oranı artar çünkü tümör ya da lobektomi rezeksiyonu erken dönemde mümkün olmaktadır. Bu nedenle erken tanı akciğer kanserinde çok önemlidir. Cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi, akciğer kanserinin başlıca tedavi yöntemleridir. Bu tedaviler, tümör büyümesini azaltmakta fakat, hastaların büyük bir kısmında genellikle nüks meydana gelmektedir. Genetik heterojenite ve tümör plastisitesi nüks nedenini açıklayan olası mekanizmalardandır. Her ikisi de mortaliteden sorumlu olan ilaç direnci ve metastazına katkıda bulunur (1).

2.1.1. Akciğer kanserinde anahtar tanı ve prognostik mutasyonlar

Tümör oluşumu ve gelişimi ile genetik değişiklikler arasında ilişki olduğu ilk olarak 1976'da Nowell tarafından önerilmiştir (11). Daha sonra sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik alanındaki ilerlemeler, kanserin çeşitli genomik değişimler tarafından yönlendirildiğini göstermiştir (12). Özellikle, sekanslama teknolojilerindeki gelişmeler, tüm kanserlerin yüksek çözünürlüklü genomik manzarasını ortaya çıkarmıştır. Birinci nesil sekans teknolojileri kullanılarak protoonkogenler ve onkojenik sürücü (driver) mutasyonlar tanımlanmıştır.

Sürücü mutasyonları genellikle, hücrenin proliferasyonu ve hayatta kalması için kritik olan ve normal bir hücrenin kansere dönüşmesine neden olan sinyal proteinlerinin genlerinde meydana gelir. KRAS ve TP53 mutasyonları, küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde en erken saptanan mutasyonlardır. Bununla birlikte, 2004 yılında epidermal büyüme faktörü reseptöründe (EGFR) klinik olarak anlamlı mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar özellikle tirozin kinaz inhibitörü (TKI) tedavisine cevap veren akciğer kanseri hastalarının tümör dokularında tespit edilmiştir (13). EGFR mutasyonu, Amerika ve Asya'da KRAS mutasyonundan sonra görülen en yaygın ikinci mutasyondur. Amerika'da akciğer adenokarsinomlu hastalar arasında, Afrika Amerikalı ve Kafkasyalılarda görülme oranı yaklaşık % 15 iken Asya popülasyonlarında görülme oranı yaklaşık % 60'tır (14-15).

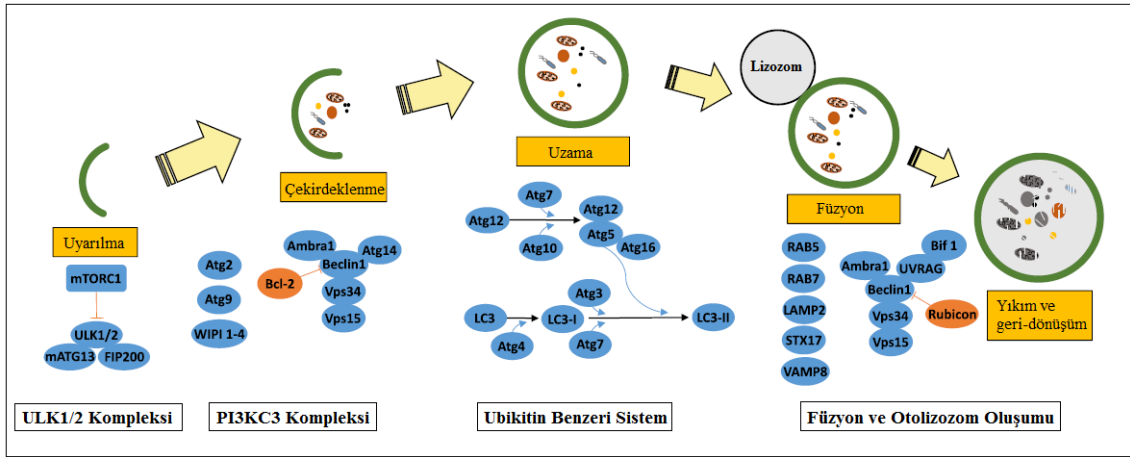
EGFR mutasyonları, genellikle 21. ekzonda meydana gelen ve aminoasit değişimine sebep olan bir mutasyon (L858R) ile 19. ekzonda küçük insersiyonlar ve delesyonlar şeklinde oluşan genetik değişiklikleri kapsamaktadır. L858R mutasyonu, EGFR mutasyonu saptanmış akciğer tümörlerinin yaklaşık %43'ünde görülmektedir (16). Bu mutasyonlar onkojenik sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu mutasyonu taşıyan farelerin, birinci nesil EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinden (TKI) gefitinib ve erlotinib gibi TKI'lere duyarlı oldukları gösterilmiştir (17). Daha az sıklıkta görülen ALK ve ROS1 mutasyonları, ilk olarak 2007'de akciğer adenokarsinomlarında tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar akciğer kanserlerinin % 5'inden daha azında saptanmaktadır (18-19). Bir proto-onkogen reseptör tirozin kinaz MET için tasarlanan bir inhibitör olan Crizotinib'in, ALK ve ROS1 mutasyonu olan, küçük hücre dışı akciğer kanserli hastalarda yanıt oluşturduğu bulunmuştur (20). Çünkü MET, ALK1 ve ROS1 moleküllerinin ATP bağlama bölgeleri %77 amino asit benzerliği taşımaktadır. ALK1 ve ROS'da meydana gelen genomik değişiklikler nadir olmakla birlikte, genellikle adenokarsinomlarda ve sigara içmeyenler arasında görülür (20-21). Bu nedenle, ilerlemiş akciğer adenokarsinomlu tüm hastaların sigara içme durumlarına bakılmaksızın ALK, ROS1 genomik düzenlenmeler ve EGFR mutasyonları açısından değerlendirilmesi önerilmektedir (22).

Diğer önemli onkojenik mutasyonlar BRAF, ERBB2, MET, RET ve KRAS'da görülmektedir. Ayrıca tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların prognostik değere sahip olduğu öne sürülmektedir. Örneğin TP53 ve RB1 mutasyonlarının adenokarsinomda EGFR TKI tedavisinden sonra küçük hücre dönüşümüne katkı

sağladığı düşünülmektedir. Her ne kadar tek başına bu genlerdeki mutasyonların küçük hücre dönüşümünü sağlamaya yetmeyeceği bilinse de, katkıları olduğu düşünülmüştür (23-24). EGFR mutasyonu taşıyan hastalarda, yanıt alınmış hedefe yönelik tedaviye rağmen, EGFR TKI tedavisini takiben yaklaşık bir yıl sonra genellikle nüks oluşmaktadır. ALK ve ROS1 mutasyonu olan ve ilk basamak hedefe yönelik tedavi alan hastalarda ise ortalama 8 ve 19 ay sonra nüks görülmektedir (21, 25). EGFR mutasyonlarından T790M mutasyonu, tedaviye direncin ana sebebidir. Nüks sırasında hastaların yaklaşık % 50-60'ında bu EGFR mutasyonu görülmektedir. Diğer direnç mekanizmaları olarak PIK3CA yolunun aktivasyonu, Met amplifikasyonu ve küçük hücre dışı akciğer kanserinin küçük hücreli akciğer kanserine dönüşümü (küçük hücre transformasyonu) sayılabilir (26). ALK mutasyonlu hastalarda Crizotinib direnci çoğunlukla sekonder ALK mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. ROS1 mutasyonu taşıyan hastalarda Crizotinib direncinin mekanizması henüz iyi tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, ROS1 mutasyonu taşıyan bazı vakalar bildirilmiştir (27-28).

2.2. Otofaji

Otofaji terimi ilk kez 1963 yılında, lizozomun keşfedilmesinden kısa bir süre sonra Christian de Duve tarafından kullanılmıştır. Bu kelime eski Yunanca'dan türetilmiş ve kendi kendini yemek anlamına gelmektedir (29). Otofaji, mayalardan memelilere kadar türler arası korunmuş önemli bir mekanizmadır. Mayalarda bugüne kadar tanımlanmış 42 farklı otofaji ilişkili gen (autophagy-related genes (ATG)) vardır ve bu otofajik genlerin memelilerde homologları veya ortologları bulunmaktadır (30). Hücrenin içinde bulunduğu şartlara göre hücrenin hayatta kalmasına ya da ölmesine karar verilmesinde rol alan bir mekanizmadır. Toksik olabilecek hücresel bileşenleri ortadan kaldırarak, hücre içi dengenin sağlanması yönünde çalışır (31).



Şekil 2.1. Otofaji yolağı ve ana otofaji proteinlerinin şematik gösterimi (91)

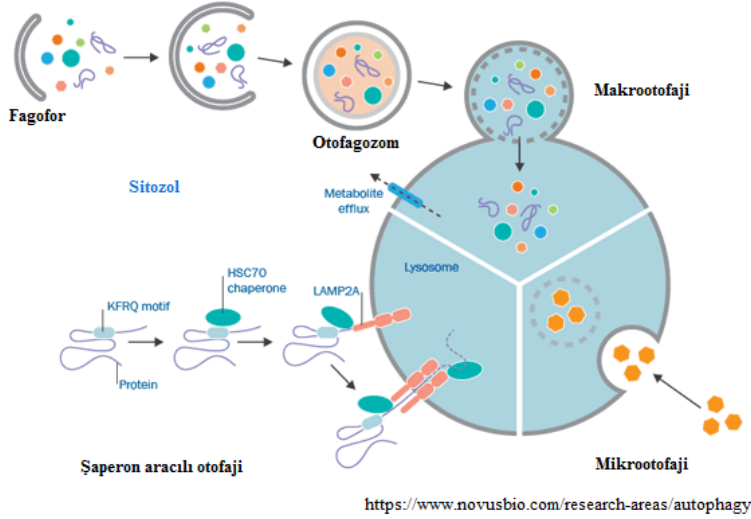
Otofaji, hücre içi proteinlerin ve organellerin, otofagozom adı verilen çift zarlı bir kesecik içine alınması, lizozomla kaynaşması (füzyon), otofagozom içeriğinin lizozomal enzimlerle yıkılması sürecidir (Şekil 2.1). Böylece yıkılan protein ve organellerinden ortaya çıkan yapı taşları hücrenin yeniden kullanımına kazandırılır.

Otofaji, protein agregatlarını ve hasarlı organelleri uzaklaştıran, hücre homeostasisi için gerekli olan ve hücrenin sağkalımı için çalışan bir mekanizma olarak iş görür. Böylece otofaji; DNA hasarını, reaktif oksijen türlerini (ROS) ve mitokondriyal bozuklukları azaltarak normal hücreleri tümör hücrelerine dönüşmekten korur (32). Diğer taraftan apoptozun mümkün olmadığı durumlarda, uyarıcının türü, süresi ve miktarı gibi değişkenlere bağlı olarak, otofajinin hücre ölümüne yol açtığı da gösterilmiştir. Bu yüzden otofajik hücre ölümü, tip II hücre ölümü olarak sınıflandırılmıştır. Otofaji için, hücrenin içinde bulunduğu şartlara göre hücrenin hayatta kalmasına ya da ölmesine karar verilmesinde rol alan bir mekanizma olarak tanımlanabilir (4-5).

Otofaji, hücrenin maruz kalabileceği açlık, oksijen yokluğu, patolojik stres, protein agregatlarının oluşması, enfeksiyon gibi farklı çevre koşullarına ayak uydurabilmesini sağlayan etkili ve içsel düzenleyici bir mekanizmadır. Protein agregatları ile organeller gibi büyük molekül ve yapılar otofaji ile yıkılmaktadır. Otofaji, bazal seviyede tüm hücrelerde meydana gelmektedir ve insanlarda doğumdan itibaren organizma ile hücresel seviyede normal sağlığın devam ettirilmesinde önemli rol oynar (33). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda otofajinin birçok farklı hastalıkla yakından ilişkili olabileceği gösterilmiştir (34). Nörodejeneratif hastalıklar, kanser, bağışıklık sistemi hastalıkları ve lösemi otofajinin rol oynadığı hastalıklara örnek olarak verilebilir (35-38).

2.2.1. Otofaji Çeşitleri

Otofaji, fizyolojik işleve ve paket dağıtımına bağlı olarak 3 grupta sınıflandırılır (Şekil 2.2). Bunlar; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofajidir (chaperone-mediated autophagy (CMA)) (31).



Şekil 2.2. Otofaji çeşitleri

2.2.1.1. Makrotofaji

Hasarlı organellerin ve uzun ömürlü proteinlerin yıkılmasında önemli role sahiptir ve bütün hücrelerde bazal düzeyde gerçekleşir. Genel olarak otofaji denildiğinde makrotofajiden bahsedilmektedir. Yıkımın gerçekleştiği yer ise lizozomla otofagozomun oluşturduğu enzimatik yıkımdan sorumlu ‘otofagolizozom’ yapısıdır (39).

2.2.1.2. Mikrotofaji

Lizozomal membranının içe doğru çökmesi ile sitoplazma içeriğinin lizozom içine alındığı ve doğrudan yıkımın gerçekleştiği otofaji çeşididir (40).

2.2.1.3. Şaperon aracılı otofaji (chaperone-mediated autophagy - CMA)

Şaperonlar tarafından tanınan KFERQ motifini (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) taşıyan proteinler şaperon-aracılı otofaji ile yıkılırlar. Bu proteinler lizozomal yıkım için ısı şok proteini 70 (hsp70) ile lizozoma yönlendirilirler. Daha sonra LAMP2A (lizozomla ilişkili membran proteini tip 2A) ile bağlanır. Son olarak lizozomal enzimler tarafından yıkım gerçekleştirilir (41)

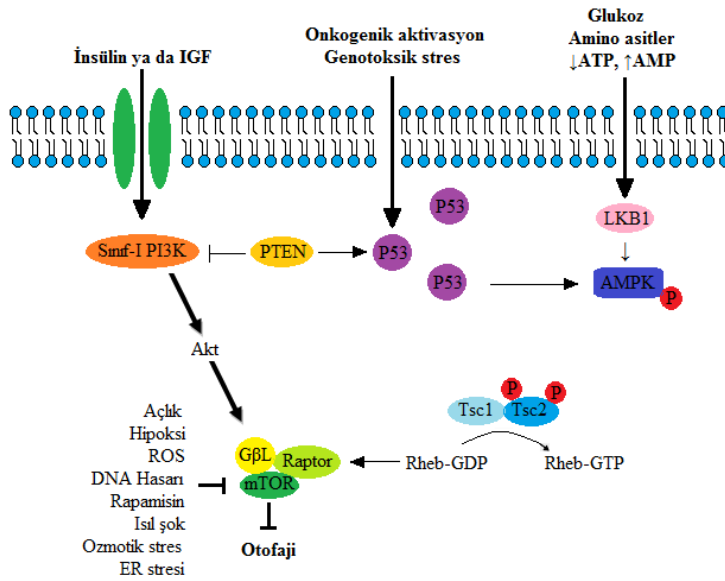
Hem makrotofaji hem mikrotofaji seçici ve seçici-olmayan şekilde çalışıyor olabilir. Seçici olmayan otofaji, paketlenmemiş sitoplazma yıkımından sorumludur. Gönderilen yere göre, seçici otofaji ise mitokondri için 'mitofaji', endoplazmik retikulum için 'ER-faji', lizozom için 'lizofaji', proteozom için 'proteofaji', çekirdek için 'nükleofaji', bakteri-virüsler için 'xenophagy' olarak ifade edilir (42-44). CMA ise sitoplazmik proteinlerin aracı moleküllerle lizozomlara gönderildiği 'seçici lizozomal yıkım yolağı'dır.

2.2.2. Otofaji Oluşum ve Düzenlenme Mekanizmaları

Otofajinin başlangıç aşamasında, sitoplazmada, hedef molekülün çevresinde otofagozom adı verilen çift veya çoklu membran kesecikler oluşur. Daha sonra otofagozomlar lizozomlarla birleşerek otolizozomları oluştururlar. Son olarak, lizozomlardaki hidrolitik enzimler otolizozom içeriğini parçalar ve ortaya çıkan yapı taşları hücrenin yeniden kullanımına kazandırılır (31).

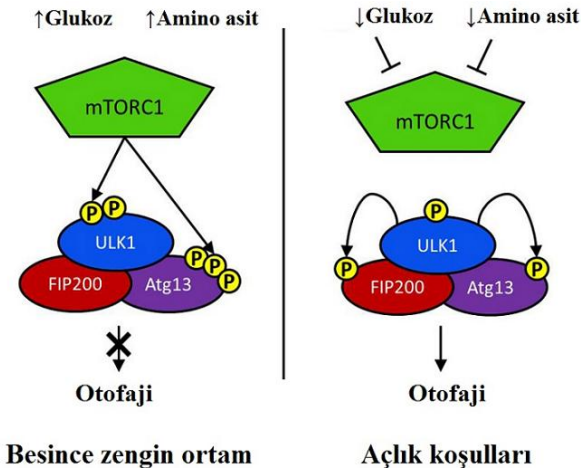
Otofajiyi düzenleyen en önemli protein mTOR'dur. mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki protein kompleksinin yapısında yer alır. mTORC1 altı proteinden oluşmaktadır. Bunlar; mTOR, Deptor, Raptor, Tti1/Tel2 kompleksi, PRAS40 and mLST8'dir. mTORC2 ise mTOR, Deptor, Rictor, mLST8, mSin1, Tti1/Tel2 kompleksi ve Protor1/2 olmak üzere 7 proteinden oluşmaktadır (39).

mTORC1 (Mammalian Target of Rapamycin Complex1), bir serin-treonin kinaz üyesi olup, hücre büyümesi, çoğalması ve metabolizmanın düzenlenmesinden sorumludur. Ayrıca otofajinin kontrolünde de önemli role sahiptir. mTORC1, besin/enerji/redoks sensörü olarak iş gören bir komplekstir. Aminoasit, glukoz, oksijen ve büyüme faktörü gibi hücre içi ve dışı uyarılar, lipid ve protein sentezini düzenlemesi için mTORC1'i uyarırlar (Şekil 2.3) (45).



Şekil 2.3. Otofajinin mTOR ile düzenlenme mekanizması

Hücrede normal şartlar altında, besin varlığında mTORC1 aktiftir ve otofaji proteinlerinden ULK1/2-ATG13 kompleksini fosforile ederek inaktif halde kalmalarını sağlayarak otofajinin uyarılmasını engeller. Hipoksi, büyüme hormonu eksikliği ve açlık gibi stres koşullarında ise mTORC1 inaktif hale gelir. İnaktif mTORC1, ULK1/2-ATG13'ü fosforile edemez ve mTORC1'den ayrılırlar ve böylece otofajinin ilk basamağı uyarılmış olur (Şekil 2.4) (46).

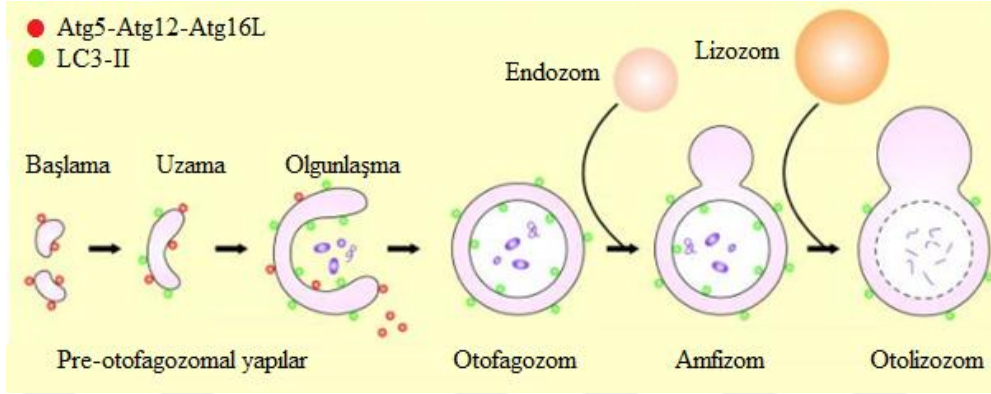


Şekil 2.4. Otofajinin açlık koşullarında mTOR üzerinden aktive edilmesi (47)

MTORC2, büyüme faktörleri tarafından uyarılmasına rağmen, besin maddelerine cevap vermez. MTORC2'nin biyolojik rolleri henüz çok iyi açıklanmamıştır. Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, hücre göçü ve sağkalımda rol aldığı gösterilmiştir (48).

2.2.3. Otofaji Süreci Basamakları

Otofaji mekanizması 4 adımda gerçekleşmektedir (Şekil 2.5). Bunlar; uyarılma (indüksiyon), çekirdeklenme (nükleasyon), uzama ve lizozomla birleşip yıkımın gerçekleştiği fazlardır (49).



Şekil 2.5. Otofaji sürecinin şematik gösterimi (39)

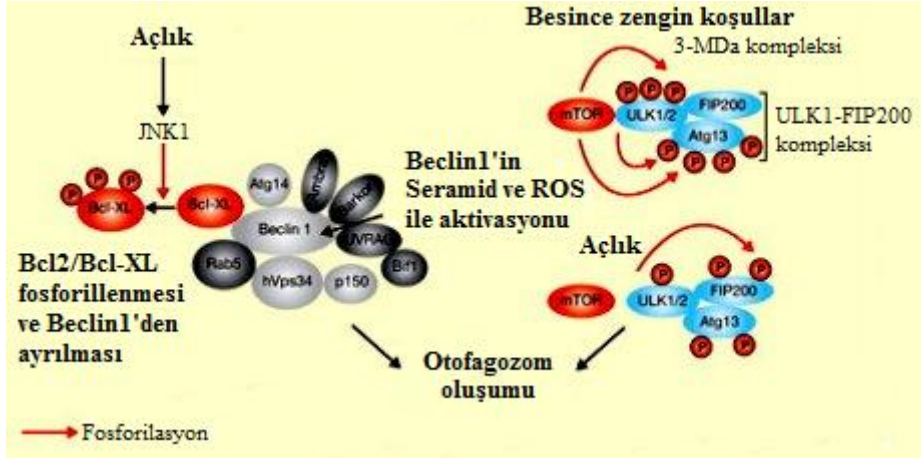
2.2.3.1. Uyarılma (indüksiyon) fazı

İlk adım, otofagozom adı verilen membran yapısının oluşması için uyarılmanın gerçekleştiği adımdır. Hücrenin besin ya da enerji ihtiyacı olduğunda mTORC1 inaktif hale gelir. İnaktif mTORC1, ULK1/2-ATG13'ü fosforile edemez ve mTORC1'den ayrılırlar (46). Daha sonra ULK1/2 kendi kendini, Atg13 ise FIP200'ü fosforilleyerek aktifleştirir ve böylece otofaji uyarılmış olur (Şekil 2.4) (50)

2.2.3.2. Çekirdeklenme (nükleasyon) fazı

Bu aşama, otofagozomal membran yapısının çekirdeklenmeye başladığı aşamadır. Membranın kaynağı ER, mitokondri veya Golgi olabilir. Bu aşamada fosfatidilinozitol 3-kinazlar (PI3K) rol oynamaktadır (51). Memelilerde sınıf I, sınıf II ve sınıf III olmak üzere üç sınıf PI3K vardır. Sınıf I PI3K otofaji inhibitörü olarak görev alırken, sınıf III PI3K aktivatör olarak davranır ve çekirdeklenme fazında önemli rol oynar. Sınıf II PI3K otofaji ile ilişkili değildir. (52)

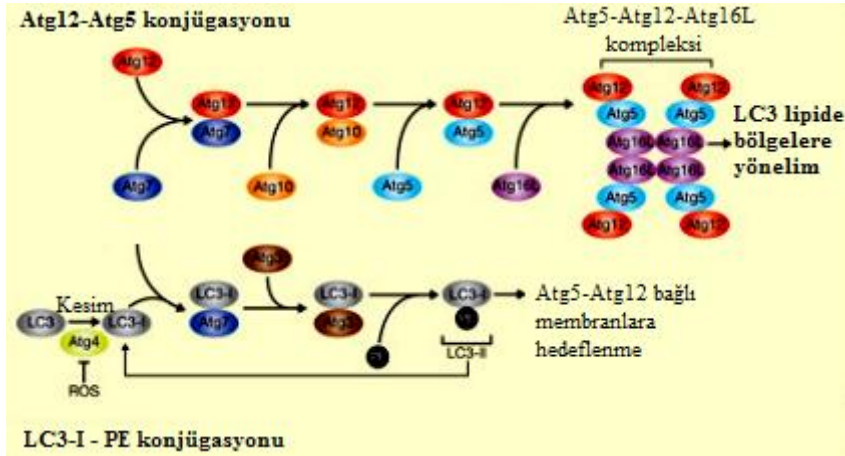
Çekirdeklenme aşaması birçok proteinin bir araya gelip kompleks oluşturmasıyla gerçekleşir (Şekil 2.6). Bu sürecin ilk adımında ATG6 olarak da bilinen Beclin1 ile Bcl-2, UVRAG, Bif-1, Ambra1, PI3K (Vps34), Vps15, Rubicon ve Atg14L gibi birçok proteinin etkileşimi gereklidir. Stres koşullarında mTORC1'in baskılanması, sınıf III PI3K (VPS34) aktivasyonunu sağlar. Böylece fosfatidilinozitol fosforillenir ve otofagozomal membran yapısına katılacak olan fosfolipidlerin üretilmesi sağlanır (39).



Şekil 2.6. Otofagozom oluşumunda çekirdeklenme fazı (39).

2.2.3.3 Uzama fazı

Lizozomda yıkılacak kargonun paketlenmesi için, çekirdeklenmeden sonra, otofagomal zarın uzayıp bir vezikül oluşturması gereklidir. Uzama aşamasında ubiquitin benzeri iki sistem görev almaktadır. Bunlar; Atg12- Atg5 ile ATG8/LC3 ubiquitin benzeri sistemlerdir (Şekil 2.7) (46).



Şekil 2.7. Otofagozom oluşumunda uzama fazı (39)

Birinci sistemde ilk olarak Atg12 ve Atg5 kovalent olarak birbirlerine bağlanır. Bu bağlanmanın gerçekleşebilmesi için E1 ve E2 benzeri olan ATG7 ve ATG10'a ihtiyaç vardır. İlk olarak ATG7, ATG12'yi aktive eder. ATG12 böylece ATG10 ile bağlanır. Bağlanmanın ardından ATG7 ayrılır. İkinci olarak ATG12, ATG5'e bağlanır ve bu bağlanmanın da ardından ATG10 ayrılır. Daha sonra ATG16L1, ATG5'e bağlanır (53).

İkinci sistemde bir sistein proteaz olan ATG4, sitoplazmada bulunan LC3'ün C ucundaki Arginini keserek Glisin kalıntısını ortaya çıkarır. Bu işlenmiş formuna LC3-I denir. Daha sonra E1-benzeri Atg7 ve E2-benzeri ATG3 tarafından, LC3-I'e fosfatidiletanolamin (PE) bağlanarak LC-II oluşturulur. Bu sürece ilk adımda oluşan Atg5-Atg12-Atg16 kompleksi, E3 benzeri enzimatik aktivite ile aracılık eder (39). Böylece lipid eklenen LC3-II formu otofagozom zarının hem iç hem de dış yüzeyine yerleşebilmektedir (54). Bu sebeple LC3-II otofaji belirteci olarak tanımlanmıştır (55).

Übikitin benzeri sistemler bu şekilde birlikte çalışarak otofagozom zarının uzayıp, vezikül yapısının oluşmasını sağlarlar. Vezikül kapandıktan sonra görevleri biter ve ayrılırlar (56).

2.2.3.4. Lizozomla birleşme ve yıkım fazı

Otofajinin son aşaması, otofagozom zarının lizozom zarı ile kaynaşarak otolizozomların oluşmasını ve otofagozom içeriğinin lizozomal enzimlerle yıkılmasını kapsar. Füzyonun tam olarak nasıl gerçekleştiği henüz açıklanmamıştır. UVRAG, sınıf C Vps proteinleriyle (Vps11, Vps16, Vps18, Vps33, Vps39) etkileşerek Rab7'nin katılmasını ve aktive edilmesini sağlar. LAMP2 ve ESCRT proteinlerinin de kaynaşma sürecine katkı sağladığı bilinmektedir (39, 57). Son olarak otofagozom içeriği lizozomal enzimler tarafından yıkılır ve ortaya çıkan yapı taşları hücrenin yeniden kullanımına sunulur.

2.2.3.5. ATG9A'nın Otofaji Sürecindeki Rolü

Atg9, otofagozom oluşumu için gerekli olan tek transmembran Atg proteindir. Öncül otofagozomal yapıların oluşumu için çekirdeklenme bölgesi organizasyonunda önemli bir rol oynar. ULK1/2 kinaz kompleksi, otofajiyi indüklemek için aktive edilirken; ATG9 sistemi, fagofor uzaması için gereklidir (58). Önceki çalışmalar, endoplazmik retikulum, golgi aparatı ve plazma zarı gibi otofagozom oluşumuna katkıda bulunan çok sayıda membran kaynağı olduğunu göstermiştir (59-61). ATG9'un otofagozom oluşumu için donör organellerden membranın yönlendirilmesinde önemli bir rol oynadığı

düşünülmektedir (62). Bu yüzden, ATG9'u düzenleyen mekanizmaları anlamak, otofajiye mekanik bir bakış açısı kazandırmak için önemlidir.

Atg9, insanlarda Atg9A ve Atg9B olmak üzere iki farklı izoformda bulunur. Atg9A tüm dokularda bulunurken, Atg9B, plasenta ve hipofizde yoğunlaşmıştır ve hipoksik koşullarla uyarılır (63-64). Çalışmamızda ATG9A'nın hedeflenmesi amaçlanmıştır.

2.2.3.6. ATG4D'nin Otofaji Sürecindeki Rolü

Atg4 ailesi otofagozom biyogenezinde rol alan bir sistein proteaz ailesidir. Otofagozom membran yapısına katılmak üzere sitoplazmada bulunan ATG8/LC3'ün C ucundaki Arginini keserek Glisin kalıntısını ortaya çıkarır ve LC3-I oluştururlar. Daha sonra LC3-I'e, E3 benzeri enzimatik aktivite gösteren Atg5-Atg12-Atg16 kompleksi tarafından fosfatidiletanolamin (PE) eklenerek LC3-II formuna dönüştürülür ve otofagozom membran yapısına katılması sağlanır. Eğer ATG4 tarafından LC3 aktive edilmezse otofagozom oluşumu engellenmiş olur (65). Atg4 ayrıca lizozomal füzyon aşamasında Atg8-PE arasındaki kovalent bağı yıkmakla da sorumludur. Böylece bir sonraki otofagozom oluşumu için Atg8 geri dönüştürülmüş olur. Atg8'in hem PE bağlanması için işlenmesi hem de delipidasyon reaksiyonları otofagozom oluşumu için oldukça önemlidir (66). Atg4, Atg8'in işlenmesi ve delipidasyonu yoluyla otofajiye düzenleyen tek proteazdır. Ayrıca Atg4 aktivitesi, oldukça otofaji-spesifik olduğundan, Atg4'ün inhibisyonu, otofajinin inhibisyonuna yol açar ve bu nedenle Atg4, otofajiye özgü inhibitörleri geliştirmek için çekici bir hedeftir (67).

ATG4 sistein proteaz ailesi, ATG4A, ATG4B, ATG4C ve ATG4D olmak üzere 4 homologdan oluşur. ATG4D tüm dokularda yaygın olarak bulunmaktadır (65). Çalışmamızda ATG4D'nin hedeflenmesi amaçlanmıştır.

2.3. Kanser ve Otofaji

Normal hücrelerde otofaji, protein agregatlarını ve hasarlı organelleri uzaklaştırarak hücre sağkalımına katkı sağlayan bir mekanizma olarak işlev görür. Otofajinin kanserde hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı rolü söz konusudur ve hangi yönde olması gerektiği hücresel şartlara bağlı olarak karar verilir (5, 68). Otofaji kanserin erken ve geç evrelerine ve hücresel çevreye bağlı olarak, ROS kaynağı olan hasarlı veya

kümelenmiş protein, organelleri temizleyerek oksidatif ve genotoksik stresi baskılayarak, kötü ortam koşullarını yok ederek hücre canlılığına katkı sağlamaktadır. Bu nedenle otofaji, başlarda tümorojenik aktiviteyi baskılar ve otofajinin bu aşamada baskılanması tümör oluşumunu artırır (69-70). Kanseri oluşumundan sonra ise otofaji, kanser hücrelerinin hayatta kalmasına ve çoğalmasına katkı sağlayabilmektedir. Başka bir deyişle, otofaji tümörün evresine bağlı olarak çift yönlü etkiye sahiptir (5). Erken evrelerde hasar görmüş protein ve organelleri ortadan kaldırarak tümör baskılayıcı olarak görev yapar ve genomik kararsızlığın azaltılması yönünde çalışarak kanser oluşumunu engeller, fakat ilerleyen evrelerde karşılaşılan besin yetersizliği, endoplazmik retikulum ve mitokondriyal stres, kemoterapi, radyoterapi gibi hücresel streslerle kanser hücresinin baş etmesi yönünde çalışır. Hasarlı protein ve organellerin yıkılıp kanserli hücreye besin kaynağı olarak geri kazandırılmasına ve hücrenin kemoterapiye karşı direnç geliştirmesine katkı sağlar (71). Tümörlü hücrelerde otofajinin hayatta kalmayı sağlayabilmesinin yanı sıra, eğer tümörlü hücrede apoptoz mekanizması hatalıysa hücreyi ölüme götürebileceğini ve otofajinin düzenlenmesinin (modulation) tümör karşıtı bağışıklık yanıtta etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (72-73).

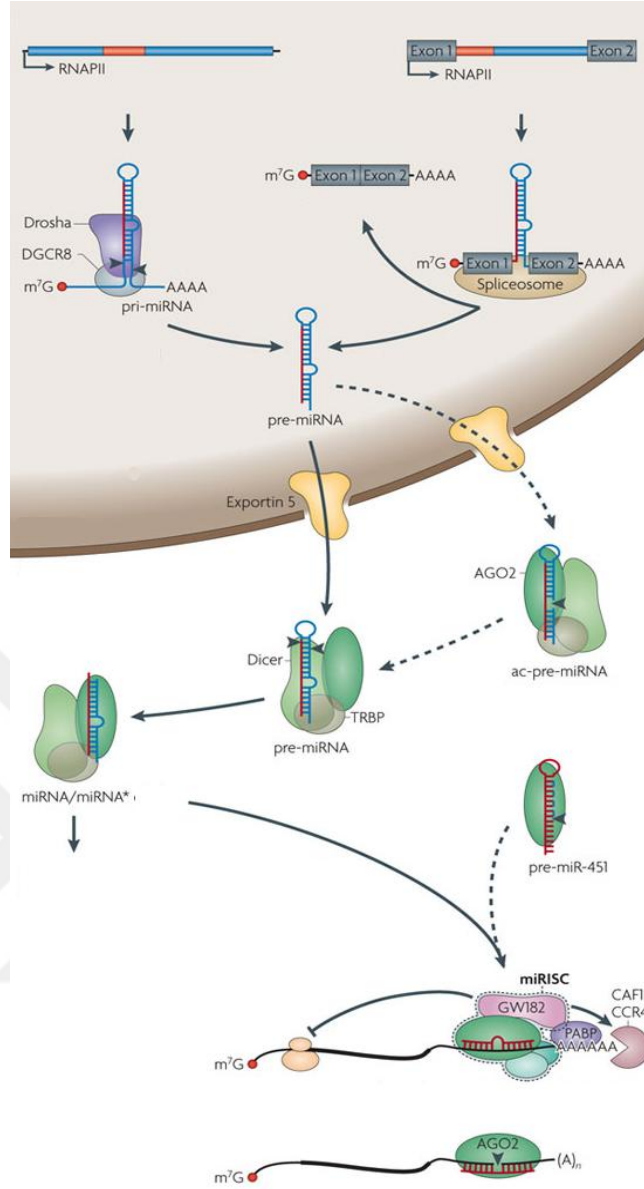
Yapılan bir çalışmada otofaji yolağında rol alan Fip200 molekülünün işlevselliğinin engellenmesinin farede tümör gelişimini azalttığı, Atg5 ve/veya Atg7 delesyonunun farede karaciğer tümörlerine sebep olduğu ifade edilmiştir (68, 74). Ayrıca, otofajide Beclin-VPS34 kompleksinin, Atg3-4-5-6-7-4-12 ve 16'nın rol aldığı basamaklarda problem olmasının tümör oluşumuna katkı sağladığını ifade eden çalışmalar söz konusudur (75).

2.4. MikroRNA'lar

MikroRNA'lar (miRNA'lar) 17-25 nükleotid uzunluğunda tek zincirli kodlanmayan RNA'lardır. Hedefledikleri mRNA'larla baz eşleşmesi yaparak etkileşirler. Bunun sonucunda üç farklı şekilde hedef genin susturulmasını sağlarlar. Bunlar; hedef mRNA'nın yıkımı, hedef mRNA'nın poly(A) kuyruğunun kısaltılmasıyla kararsızlaştırılması veya translasyonun baskılanması şeklindedir (76). Bir miRNA, hücrede birden fazla mRNA'ı hedefleyebildiği gibi benzer şekilde tek bir mRNA birden çok miRNA için de hedef olabilir. Bu etkileşim şekliyle insanlarda transkriptomunun

yarısının miRNA'larla düzenlendiği düşünülmektedir (77). Hücre büyümesi, bölünme, farklılaşma, hücre ölümü gibi birçok hücresel yolakta görev alan genlerin düzenlenmesinden sorumludurlar ve hücrede hemen hemen her yolakta görev almaktadırlar. miRNA'lar genelde genlerin negatif düzenleyicileri olarak davranırlar da mRNA'ların 3'ucu dışında farklı bölgelerine bağlanıp, gen ifadesini arttırdıklarına dair sonuçlar da gösterilmiştir (78).

MikroRNA'lar intron, ekzon veya intergenik olmak üzere genomda pek çok bölgeden sentezlenebilirler. Çoğunluğu RNA polimeraz II enzimi tarafından sentezlense de RNA polimeraz III tarafından sentezlenen miRNA'lar da vardır (79-80). Öncelikle birincil miRNA olarak adlandırılan ve uzunlukları 1 kb'dan daha fazla olan pri-miRNA sentezlenir. Olgun miRNA'nın oluşum aşamaları Şekil 2.8'de gösterilmiştir. İlk basamakta pri-miRNA, Drosha ve DGCR8'den oluşan bir mikroişleyici kompleks (microprocessor complex) tarafından kesilerek işlenir. Sonuç olarak 70-100 bp uzunluğunda öncül miRNA olarak adlandırılan saç tokası şeklinde pre-miRNA oluşur. Daha sonra pre-miRNA exportin-5 ile sitoplazmaya taşınır. Burada DICER isimli bir endonukleaz tarafından pre-miRNA'nın ilmek kısmı kesilir. Böylece 17-25 nükleotid uzunluğunda miRNA:miRNA çift sarmalı oluşur. Bu sarmalı oluşturan iki zincir birbirinden ayrılır ve olgun miRNA oluşumu tamamlanmış olur. İşlevsel olan zincir Argonat proteini (Ago) içeren RISC kompleksine (RNA-induced silencing complex) yüklenirken, işlevsel olmayan diğer zincir ise yıkılır. Genellikle her miRNA'nın bir tane baskın miRNA zinciri olmakla beraber, baskın miRNA'nın hangi zincir olacağı gelişimsel sürece veya dokudan dokuya değişebilir (81).



Şekil 2.8. Olgun miRNA oluşumu (81)

2.5. Kanser ve mikroRNA

Onkogen/tümör baskılayıcı genlerdeki genetik ve/veya epigenetik değişimlerin kansere sebep olduğu uzun süredir bilinmektedir. Bu yüzden onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin ifadelerininin çeşitli düzenleyici etkenlerle kontrol edilmesi bölünme, farklılaşma, apoptoz gibi süreçlerin normal işleyişlerinin devam ettirilmesi açısından çok önemlidir. Kanser gelişim sürecinde tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı olurken, onkogenlerin fonksiyonunda artış söz konusu olmaktadır (82). MiRNA'lar, mRNA'lara bağlanarak yüzlerce genin translasyonunu düzenleyebildiklerinden kanser

ile mikroRNA arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüş ve son yıllarda yapılan araştırmalarla böyle bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (83-85). İnsanda miRNA'ların yaklaşık %50'sinin genomun kanserle ilişkili kırılgan bölgelerinde bulunması bu ilişkiyi daha da güçlendirmiştir (86). MiRNA'ların tümör gelişiminde önemli rol oynadıkları ve tümörün evrelerine bağlı olarak miRNA'ların ifadelerinde değişiklikler gözlemlenmiştir (83, 85).

Kanserden dolayı ölümlerin en yaygın sebebi metastaza bağlı organ yetmezlikleridir. Metastaz çeşitli etkenlerle düzenlenir ve yeni küçük bir çevrede yayılımı tümörlerin genişlemesini sağlar (87). Metastazın ve tümör istilasının düzenlenmesinde de miRNA'ların önemli rolleri vardır (88). Akciğer kanserinde birçok miRNA tümör baskılayıcı ya da onkogen olarak tanımlanmış, hücre göçü ve ilaç dirençliliğinin önemli düzenleyicileri olarak gösterilmiştir (7, 89).

2.6. Otofaji ve mikroRNA

MikroRNA'lar birçok yolağı düzenledikleri gibi otofaji yolağında rol alan genleri (ATG genleri) de düzenlemektedirler. Otofaji düzenlenmesinin bozulması birçok hastalığa sebep olduğu için otofajinin sıkı kontrolü oldukça önemlidir (90). Otofaji sürecinin uyarılma aşamasından son yıkım aşamasına kadarki süreçte rol alan anahtar otofaji proteinleri çeşitli miRNA'lar ile düzenlenmektedir (91). Otofaji ve miRNA arasındaki ilişki oldukça önemli ve karmaşıktır. Otofajide miRNA'ların düzenleyici rolü ilk kez 2009 yılında BECN1'in miR30a tarafından post-transkripsiyonel olarak düzenlendiğinin gösterilmesi ile ortaya çıkarılmıştır (92). Bu bulgunun ardından, otofajide rol alan birçok miRNA kanser, kalp rahatsızlıkları, immün hastalıklar gibi birçok patofizyolojik durumla ilişkilendirilmiştir (91, 93-94). Akciğer kanserinde birçok otofaji ilişkili miRNA, tümör baskılayıcı ya da onkogen olarak tanımlandığı gibi diğer taraftan tümörü uyarıcı, invazyona ve metastaza katkı sağlayıcı ve ilaç dirençliliğinin önemli düzenleyicileri olarak da tanımlanmıştır (7, 91).

Bir çok kemoterapi ajanının ve radyasyonun genellikle otofajiyi uyardığı gösterilmiştir. Bu yüzden otofajiyi hedef alan ve kemoterapi ajanları ile kombine olarak otofajinin baskılanmaya çalışıldığı tedavi stratejilerinin etkinliğini araştıran NCT01023477 ve NCT00969306 kodlu klinik araştırmalar mevcuttur (clinicaltrials.gov). FDA onaylı tek otofaji inhibitörü bir klorokin türevi olan hidroksiklorokindir (95). Hidroksiklorokin

kimyasal bir bileşik olduğundan ve çeşitli yan etkilere yol açtığından, insan vücudunda zaten bulunan, dolayısıyla daha az yan etkiye yol açacağı düşünülen ve otofajiyi baskılayacak mikroRNA'lar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Otofajik aktiviteyi kontrol eden, diğer bir deyişle otofaji genlerini hedefleyerek otofajiyi baskılayan bazı miRNA'ların kemoterapi ajanlarıyla birlikte kanser hücrelerine verilmesi durumunda kanser hücrelerinin ilaca daha duyarlı hale geldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin miR-106'nın, akciğer adenokarsinom hücre hatlarında otofajiyi baskılayarak, Src tirozin kinaz inhibitörlerine karşı hücreleri hassaslaştırdığı gösterilmiştir (96). miR-101, osteosarkom hücrelerinin (U2OS) doksorubisine karşı hassasiyetini arttırmıştır (97). Bir başka örnek miR-30a, kronik myeloid lösemi hücrelerine imatinib ile kombine verildiğinde, BECN1 ve ATG5'i hedefleyerek otofajiyi baskıladığı ve bunu sonucunda da hücrelerin imatinibe karşı hassasiyetlerinin arttığı gösterilmiştir (98).

İnsanda tanımlanmış 2500 miRNA bulunmaktadır ve bu sayı yeni nesil dizileme teknolojileri sayesinde her geçen gün daha da artmaktadır (99). Günümüzde biyobelirteç olarak saptanan ve patentlenen miRNA'lar ile bunların tedavi amaçlı kullanıldığı faz I ve faz II çalışmaları mevcuttur (8-9). Bu çalışmada, potansiyel miRNA'ların otofajiyi hangi yönde düzenlediklerinin gösterilmesi, otofaji-kanser düzlemindeki rollerinin aydınlatılması ve böylece tedavi edici özelliklerinin olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma kapsamında yapılan WST-1 hücre canlılığı testi, hücre proliferasyonunun gerçek zamanlı izlenmesi, 3-boyutlu koloni oluşturma ve Oris hücre göçü analizi Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Prof.Dr. Petek Ballar Kırmızıbayrak'ın araştırma laboratuvarlarında, flow sitometrik apoptozis tayini İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü BİYOMER Araştırma Merkezi'nde, geriye kalan deneylerin tamamı ise Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yapılmıştır. Bu tez çalışması Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TF.DT.18.05). Deneylerde hücre hatları kullanıldığı için etik kurul onayı gerekmemektedir.

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre hatları

Çalışmamızda; Beas2B (CRL-9609) A549 (CCL-185), ve HTB-54 (Calu-1) hücre hatları kullanılmıştır. Hücre hatları, bu tez çalışmasının ikinci danışmanı olan Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Bilimdalı öğretim üyesi Prof.Dr. Ahmet Feridun Işık tarafından, ATCC (American Type Culture Collection, VA, Amerika) firmasından satın alınmıştır. Bu hücre hatlarının karakteristikleri Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının karakteristikleri

	Organizma	Tissue	Disease
Beas2B	Homo sapiens, insan	Akciğer, bronş	Normal
A549	Homo sapiens, insan	Akciğer	Küçük hücre dışı akciğer kanseri
HTB-54	Homo sapiens, insan	Akciğer; metastatik bölgeden elde edilen: plevra	Küçük hücre dışı, Grade III epidermoid kanseri

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

- Hücre sayımında
 - Tripan mavisi
- Hücre yıkamada
 - PBS
- RNA izolasyonu
 - miScript miRNeasy Mini Kiti (Kat no: 217004, Qiagen, Almanya)
 - QIAzol lizis çözeltisi Kat no: 79306, Qiagen, Almanya)
- Mimik transfeksiyonu
 - miR96-5p (Kat no: MSY0000095, Qiagen, Almanya)
 - miR101-3p (Kat no: MSY0000099, Qiagen, Almanya)
 - miR138-5p (Kat no: MSY0000430, Qiagen, Almanya)
 - AllStars Negative Control siRNA (Kat no: 333502, Qiagen, Almanya)
- cDNA sentezi
 - miScript II RT Kit (Kat no: 218161, Qiagen, Almanya)
- Total Protein İzolasyonu
 - Ripa lizis solüsyonu (Thermo, Amerika)
- SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için proteinlerin hazırlanması
 - %5 β -merkaptoetanol içeren yükleme tamponu (Laemli buffer)
- SDS-PAGE için
 - %4-20'lik poliakrilamid jel (Mini-Protean TGX™, BioRad)
 - Yürütme tamponu: pH=8.3 25mM Tris, 192mM Glisin, %0.1 SDS içeren 1X Tris-Glisin-SDS tamponu (BioRad)
- Proteinlerin jelden membrana transfer edilmesi
 - Transfer tamponu: pH=8.3 25mM Tris, 192mM Glisin, %0.1 SDS, %20 metanol
- Western blot bloklama adımı
 - %5 yağsız süt tozu çözeltisi
- Western blot yıkamalar
 - 10x TBS çözeltisi
 - 1X TBST çözeltisi
- Koloni oluşumu – Hücre boyama
 - %10 kristal viyole

- WST-1 hücre canlılık testi
 - Hücre proliferasyon reaktifi WST-1 (Kat no: 5015944001, Roche)
- Flow sitometrik apoptozis tayini
 - FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (Kat no:556547 BD Biosciences, Amerika)
- Kompetent E.Coli hazırlamak
 - %15 gliserol içeren 50 mM CaCl₂

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Plazmid

- pMRX-IP-GFP-LC3-RFP-LC3-ΔG plazmidi Tokyo Üniversitesi'nden Dr. Noboru Mizushima'nın armağanıdır.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Çözeltilerin hazırlanması
 - pH metre (Hanna, İtalya)
 - Hassas terazi (Hanna, İtalya)
 - Manyetik karıştırıcı (Hanna, İtalya)
- Hücre kültürü
 - Steril kabin (ThermoScientific, Amerika)
 - CO₂ inkübatörü (ThermoScientific, Amerika)
- Hücre sayımında
 - Hücre sayım cihazı (Eve NanoEntek, Kore)
- RNA konsantrasyon tayini
 - Spektrofotometre (ThermoScientific, Amerika)
- cDNA sentezi
 - Termal cyclers (Applied Biosystem, Amerika)
- Gen ekspresyonu analizi
 - Rotorgene RT-PCR cihazı (Qiagen, Almanya)
- SDS-PAGE ve proteinlerin jelden membrana transfer edilmesi
 - Mini PROTEAN Tetra Cell (BioRad) elektroforez tankı
- Antikor İnkübasyonu
 - Orbital çalkalayıcı (Stuart, İngiltere)
- Western blot membran görüntüleme

- Kemilüminesan görüntüleme cihazı (Vilmer Lourmat, Almanya)
- Floresan görüntüleme
 - Leica DMIL Led DFC450 mikroskop (Leica, Almanya)
- Bakteri kültürü
 - Etüv (Mettler, Almanya)
 - Çalkalayıcı (ThermoScientific, Amerika)
- WST-1 Hücre canlılığı testi
 - Thermo Scientific™ Varioskan™ Flash Multimode Reader
- Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi hücre proliferasyon
 - xCELLigence® RTCA MP (ACEA Biosciences)
- Flow sitometrik apoptozis tayini
 - BD FACSCanto™ flow-sitometre cihazı

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin laboratuvar ortamında belirli şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Bu amaçla hücreler, uygun besiyeri içerisinde steril kültür kaplarına ekilmektedir. Besiyeri içeriği hücre tipine göre değişmekle birlikte, temel olarak, hücrelerin büyüme ve gelişimi için gerekli olan amino asitleri, vitaminleri, inorganik tuzları ve glukoz gibi karbon kaynaklarını içermektedirler. Besiyerlerinin ayrıca serum ile desteklenmesi gerekmektedir. Serum; büyüme ve adezyon faktörleri içermekte, hormon, lipid, mineral ve eser element kaynağı olarak işlev görmektedir (100).

Beas2B ve HTB-54 için RPMI (Roswell Park Memorial Institute), A549 için DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) besiyeri kullanılmıştır. Her iki besiyerine de %10 fetal sıgır serum (FBS) ve 50 U/ml penisilin/streptomisin içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hücre hatları 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir.

3.2.1.1. Hücre pasajı

Hücreler %80-90 doygunluğa (confluency) ulaşınca pasaj yapılmıştır. Hücrelerin içinde olduğu eski besiyeri uzaklaştırılıp, T75 flask için 3 ml tripsin eklenerek 37°C inkübatörde yaklaşık 5dk bekletildi. Hücreler tamamen kalktıktan sonra, tripsinin ileri

yıkımını önlemek için, tripsin inhibitörlerini içeren %10 FBS'li besiyeri, tripsinin en az iki katı oranında eklendi. Hücreler 50 ml'lik falcon tüplere toplandı ve 1500 rpm'de 5 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Hücre pelleti %10 FBS ve %1 Pen/Strep içeren yeni besiyeri ile sulandırılıp istenen hücre yoğunluğuna göre tekrar T75 flaska ekim yapıldı.

3.2.1.2. Hücre sayımı

Hücreleri saymak için otomatik hücre sayım cihazı (EVE™ Automated Cell Counter) kullanılmıştır. Tripsinle kaldırılıp santrifüj edilen hücreler, süspanse edildikten sonra tripan mavi boyası ile 1:1 oranında karıştırılarak hücre sayım aparatına (*EVE™ Cell counting slides*) konuldu ve cihazda okuma yapıldı. Bu test, canlı hücrelerin zar bütünlüğünden dolayı tripan boyayı içine almayıp, ölü hücrelerin zar bütünlüğü bozulduğundan boyayı sitoplazmalarına geçirmesi esasına dayanmaktadır. Canlı hücreler parlak bir sitoplazmaya sahipken, ölü hücrelerin sitoplazmaları mavi görülmektedir.

3.2.2. ATG4D ve ATG9A'yı hedefleyen mikroRNA'ların seçilmesi

miRNA'lar hedefledikleri mRNA'larla baz eşleşmesi yaparak etkileşirler. miRBase TargetScan ve miRDB biyoinformatik veri tabanları kullanılarak, otofagozom oluşumunda rol oynayan ATG9A'yı hedefleyen miR-96-5p, ATG4D'yi hedefleyen miR-101-3p ve miR-138-5p seçilmiştir. MikroRNA seçimi yapılırken, yüksek oranda korunmuş olmasına, hedef genlerin mRNA'sı ile 7-8 mer'lik merkez eşleşmesinin olmasına dikkat edildi.

3.2.3. Hücre hatlarına mimik transfeksiyonu

miR-96, miR-101 ve miR-138'in otofaji ve akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu, koloni oluşturma ve hücre göçü gibi özellikler üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla bu mikroRNA'larla aynı nükleotid dizisine sahip "mimik" adı verilen sentetik diziler hücreye transfekte edildi. Mimikler, miRNA'ları taklit ederek, aynı genleri hedef alıp, o genlerin baskılanmalarına sebep olmaktadır. Ökaryotik hücrelere, viral yöntemler dışında kimyasal ajanlarla nükleik asit aktarılmasına transfeksiyon denir. Nükleik asitler negatif yüklü olduğundan hücre içine geçişini kolaylaştırmak için çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır (101). Bunlardan biri, bu çalışmada mimikleri transfekte etmek için kullanılmış transfeksiyon ajanı olan HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Almanya)'dır. Katyonik ve nötr lipidlerin bir karışımı olan bu ajan, negatif yüklü

nükleik asitleri ile etkileşerek lipozomal yapılar şeklinde hücre içine alınmalarını sağlar. Bu çalışmada ters transfeksiyon (reverse transfection) yöntemi tercih edilmiştir yani hücre ekimi ile transfeksiyon aynı gün yapılmıştır.

Mimik transfeksiyonu için miR96-5p (katalog no: MSY0000095), miR101-3p (katalog no: MSY0000099) ve miR138-5p (katalog no: MSY0000430) mimikleri (Qiagen, Almanya) kullanılarak geçici transfeksiyon yapılmıştır. Negatif kontrol olarak, herhangi memeli geni ile sekans homolojisi olmayan, dolayısıyla hiçbir geni hedeflemeyen AllStars Negative Control siRNA (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Transfeksiyon bileşen miktarlarının optimizasyon deneyleri sonrası Tablo 3.2’de gösterildiği gibi olmasına karar verilmiştir.

Tablo 3.2. Transfeksiyon bileşenleri ve miktarları

Bileşen Adı	Miktarı (her 12 well kuyucuk için)	Son konsantrasyon
DMEM/RPMI (antibiyotik ve serum içermeyen)	100 µl	-
HiPerFect Transfeksiyon Ajanı	4 µl	-
miRNA mimik ya da negatif kontrol siRNA	0,6 µl	5 nM
15 dak oda sıcaklığında inkübasyon		

Hücreler 12 well plate’e her bir kuyusunda 200.000 hücre olacak şekilde %10 FBS içeren fakat antibiyotik içermeyen besiyeri ile ekildi. Aynı gün; Tablo 3.2’de gösterildiği gibi hazırlanan transfeksiyon karışımı, 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra damla damla hücrelere verildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra tripsin ile kaldırılıp RNA izolasyonu yapıldı.

3.2.4. Hücre hatlarından total RNA izolasyonu

MikroRNA’lar da dahil tüm RNA’ların izole edilebilmesi için miScript miRNeasy Mini Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır.

-Hücreler, 3000 rpm’de 3 dk +4 °C’de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.

-Hücre pelleti üzerine 700 µl QIAzol lizis çözeltisi (Qiagen, Almanya) eklendi. İzolasyon hemen yapılamayacaksa bu aşamada -80'e kaldırılabilir.

-QIAzol lizis çözeltisi ekledikten sonra pipetaj yapılarak iyice homojenize edildi. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.

-140 µl kloroform eklendi ve vorteksle hızlıca karıştırıldı. 2 dk oda sıcaklığında bekletildi.

- 12.000 rpm'de 15 dk +4°C'de santrifüj edildi.

-Üst faz yeni tüplere toplandı ve üzerlerine toplanan hacmin 3 katı olacak şekilde %100 etanol eklendi, pipetaj yaparak karıştırıldı.

-Bu karışım RNaz mini kolona yüklendi (maksimum 700 ul) ve 12.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Tüm karışım bu şekilde tekrarlanarak kolondan geçirildi. Altta toplanan sıvı atıldı.

-RNaz mini kolona 700 µl RWT çözeltisi koyuldu ve 12.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı.

-500 µl RPE çözeltisi kolona eklendi ve 12.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı.

-Kolona tekrar 500 µl RPE çözeltisi eklendi ve bu sefer 2 dak 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı yine atıldı.

-Kolonu kurutmak için maksimum devirde (14.000 rpm) 1 dak santrifüj edildi.

-Kolonun altına yeni 1,5 ml'lik eppendorf tüp koyuldu ve kolonun tam ortasına gelecek şekilde 15 ul Rnaz içermeyen su koyuldu. 1 dk 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Tekrar 15 ul RNaz içermeyen su eklenerek santrifüj tekrarlandı.

-Kolonlar atıldı. Altta toplanan sıvı total RNA içermektedir. RNA konsantrasyon ölçüldükten sonra -80 °C'de saklandı.

3.2.5. RNA Konsantrasyon Tayini

RNA miktar ve kalite tayini spektrofotometrede (Thermo, Amerika) ölçülerek yapıldı. İzole edilen tüm RNA'ların konsantrasyonları Tablo 3.3'de verilmiştir. cDNA sentezi için hepsinin konsantrasyonu 100ng/ul olacak şekilde ara stoklar hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. Örneklerin RNA konsantrasyonları

Örnek adı	Konsantrasyon (ng/μl)
A549	354,96
A549 miR-kntrl	298,25
A549 miR-96-5p	158,41
A549 miR-101-3p	255,36
A549 miR-138-5p	240,03
HTB-54	302,78
HTB-54 miR-kntrl	367,01
HTB-54 miR-96-5p	133,42
HTB-54 miR-101-3p	287,13
HTB-54 miR-138-5p	304,05
Beas2B	395,76

3.2.6. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Bu çalışmada hem miRNA hem de mRNA ekspresyon seviyeleri çalışılacağından her iki molekülün de cDNA sentezini gerçekleştirebilecek bir cDNA sentez kiti olan miScript II RT Kit (Qiagen, Almanya) seçilmiştir. Tablo 3.4'te cDNA sentezi bileşenleri ve miktarları verilmiştir.

Tablo 3.4. cDNA sentezi için bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktarı	Son konsantrasyon
5x miScript HiFlex tamponu	2 μl	1x
10x miScript Nükleik asit karışımı	1 μl	1x
miScript Reverse Transcriptase Mix	1 μl	-
RNaz içermeyen su	1 ul	-
Kalıp RNA	5 ul (100ng/ul)	50ng/ul
Toplam Hacim	10 μl	

Tablo 3.4'deki karışım hazırlandıktan sonra PCR cihazında cDNA sentezi için 37 °C'de 60 dk, enzim inaktivasyonu için 95 °C'de 5 dak inkübe edildi. Sıcaklığın +4 °C'ye düşmesi beklendi ve sürenin sonunda -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.7. Gerçek-Zamanlı Kantitatif PCR (Real-Time qPCR) ile Gen Ekspresyon Analizi

Gerçek-Zamanlı Kantitatif PCR, amplifiye edilen hedef ürünün eş zamanlı olarak kantitatif analizini sağlar. Bu amaçla mikroRNA ve mRNA gen ekspresyon analizleri için miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. SYBR Green I, DNA çift sarmala bağlanarak, floresan ışıma yapan bir boyadır. Her PCR döngüsü sonunda ölçülen floresan, hedef DNA miktarı ile ilişkilendirilmektedir. SYBR Green boyasından alınan ışıma miktarının, sınır değeri aştığı ilk döngüye Ct (cycle threshold) denilmektedir. Gen ekspresyon sonuçları analiz edilirken Ct değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = \text{Hedef gen} - \text{Housekeeping gen}$) formülü içerisinde kullanılmıştır (102). mRNA ekspresyonlarının normalizasyonunda housekeeping gen olarak GAPDH, miRNA ekspresyonlarının normalizasyonunda ise RNU6 kullanılmıştır. Ayrıca SYBR Green I boyası, primer dimerleri ya da özgün olmayan diğer çift sarmal dizilere de bağlanan bir boya olduğundan, her PCR sonunda erime eğrisi (meltcurve) analizi yapılmıştır. Böylece hedef dizi dışında amplifikasyon ürünü olup olmadığı anlaşılmıştır. Erime eğrisi analizinin prensibi, her dizinin, büyüklüğü ve baz içeriğine bağlı olarak, kendine özgü farklı bir erime sıcaklığının olmasına dayanmaktadır. SYBR Green I kullanılarak çalışılan PCR sonuçlarının geçerli ve kabul edilebilir olabilmesi için, erime eğrisinde hedef diziye ait tek bir pikin oluşması gerekmektedir.

MiRNA ve mRNA ekspresyonu için hazırlanan PCR karışım oranları ile sıcaklık ve süre koşulları aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 3.5-3.8).

Tablo 3.5. MikroRNA'lar için qRT-PCR bileşenleri ve koşulları

Bileşenler	Miktarı	Son konsantrasyon
2x QuantiTect SYBR Green PCR Mix	6.25 µl	1x
10x miScript Universal Primer	1.25 µl	1x
10x miScript Primer Assay	1.25 µl	1x
RNaz içermeyen su	2.5 µl	-
Kalıp cDNA	1.25 µl	-
Toplam hacim	12.5 µl	

Tablo 3.6. mikroRNA gen ekspresyonu için qRT-PCR Koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman(dk)		
95	15	}	40 döngü
94	15		
55	30		
70	30		

Tablo 3.7. Otofaji gen ekspresyonu için qRT-PCR bileşenleri ve koşulları

Bileşenler	Hacim	Son konsantrasyon
2x QuantiTect SYBR Green PCR mix	6.25 µl	1x
10x Quantitect Primer Assay	1.25 µl	1x
RNaz içermeyen su	3.75 µl	-
Kalıp cDNA	1.25 µl	-
Toplam hacim	12.5 µl	

Tablo 3.8. Otofaji gen ekspresyonu için qRT-PCR Koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman(dk)		
95	15	}	40 döngü
94	15		
60	30		
72	30		

3.2.8. Western blot için hücre ekimi ve toplanması

- Western blot analizleri için 12-well plate'e 200.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.

-5 nM mimik veya negatif kontrol siRNA ile muamale edildikten 72 saat sonra tripsin ile hücreler toplandı.

- 1 defa PBS ile yıkandı. 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.

- Üst faz pelletle değmeden dikkatlice alınıp atıldı.

3.2.9. Hücre lizatının hazırlanması

- Elde edilen pellete 3 katı hacminde Ripa lizis solüsyonu (Thermo, Amerika) ilave edildi.
- Pelletler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Her 10 dakikada bir vortekslendi.
- Bu sürenin sonunda 13.000 rpm, 10 dakika 4 °C de santrifüj edildi.
- Üst faz mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve hücre lizatları kullanılabilecek kadar -80 °C de saklandı.

3.2.10. Protein Konsantrasyon Tayini

Protein konsantrasyon tayini için Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo, Amerika) kullanılmıştır. Bu yöntem, alkali ortamda proteinlerin Cu^{2+} 'yi Cu^{+} 'e indirgemesi (biüret reaksiyonu) ile Cu^{+} katyonunun bikinkoninik asit (BCA) içeren bir reaktifle saptanmasına dayanır. Bir bakır iyonunun iki BCA molekülü ile şelat oluşturması sonucu mor renkli bir ürün ortaya çıkmaktadır. Bu mor bileşiğin 562 nm'de absorpsiyonunun ölçülmesi, total protein miktarı hakkında bilgi vermektedir (103).

Öncelikle konsantrasyonu 2000 ng/ul olan BSA stok çözeltisinden yola çıkarak seri dilüsyon yapıldı ve Tablo 3.9'da gösterildiği gibi BSA standartları hazırlandı.

Tablo 3.9. BSA standartlarının hazırlanması

Tüpler	Su hacmi (ul)	BSA hacmi (ul)	Son konsantrasyon (ng/ul)
A	0	300 stoktan	2000
B	125	375 stoktan	1500
C	325	325 stoktan	1000
D	175	175 B tüpünden	750
E	325	325 C tüpünden	500
F	325	325 E tüpünden	250
G	325	325 F tüpünden	125

-Hazırlanan BSA standartlarından ve konsantrasyonu bilinmeyen hücre lizatlarından 10'ar ul alınarak 96-well plate'in kuyucuklarına koyuldu.

-50:1 oranında A ve B reaktifleri karıştırıldı. Bu karışımdan 200 ul alınıp, 96-well plate'deki örnekler üzerine koyuldu.

- 37 °C'de 30 dak inkübe edildi.

-Sürenin sonunda 562 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü.

-BSA standartlarından elde edilen absorbans değerlerinden bir standart grafik oluşturuldu ve bu grafiğin denkleminde absorbansı bilinen ama konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyon değerleri hesaplandı.

3.2.11. Western blotlama ile protein analizi

3.2.11.1. Örneklerin hazırlanması

- Mikrosantrifüj tüplerine 20 µg protein içerecek şekilde hücre lizatından alındı.

- 1:1 oranında %5 β-merkaptoetanol içeren yükleme tamponu (Laemli buffer) ilave edildi.

- Örnekler ısı bloğunda 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre olmaları sağlandı.

-Hazırlanan örnekler ve marker %4-20'lik poliakrilamid jele (Mini-Protean TGX™, BioRad) yüklendi.

3.2.11.2. SDS-PAGE jel elektroforezi

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için Mini PROTEAN Tetra Cell (BioRad) elektroforez tankı kullanılmıştır. Yürütme tamponu olarak pH=8.3 25mM Tris, 192mM Glisin, %0.1 SDS içeren 1X Tris-Glisin-SDS tamponu (BioRad) kullanılmıştır. Örnekler ve marker yüklendikten sonra 100 V gerilimde yürütüldü. Yükleme tamponundaki bromfenol mavisi, jelin alt kısmına gelince yürütme sonlandırıldı.

3.2.11.3. Proteinlerin membrana transferi

Sabit düşük akım altında, sabaha kadar (overnight) +4 °C’de ıslak transfer yöntemi ile jeldeki proteinler PVDF membrana aktarıldı.

- Elektroforez bittikten sonra jel, pH dengelenmesi için transfer tamponunda 15 dak bekletildi.

-Jel büyüklüğünde kesilen PVDF membran kullanılmadan önce metanol ile 30sn aktive edildi.

- Sandviç oluşturmak için süngerler ve filtre kağıtları transfer tamponu ile ıslatıldı.

- Sırasıyla sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı, sünger olacak şekilde sandviç hazırlandı ve tranfer kaseti kapatıldı.

- Sabit 130 mA akım altında sabaha kadar (overnight) +4 °C’de transfer gerçekleştirildi. Transfer tamponu olarak pH=8.3 25mM Tris, 192mM Glisin, %0.1 SDS, %20 metanol içeren 1X Tris-Glisin-SDS tamponu (BioRad) kullanılmıştır.

3.2.11.4. Membranı Bloklama ve Blotlama

Transfer bittikten sonra membran, % 5 yağsız süt tozu + TBST içeren bloklama çözeltisi içerisinde 1,5 saat inkübe edildi.

-1X TBST hazırlamak için önce 10X TBS hazırlandı.

- 1 litre 10X TBS çözeltisi
 - 31.5 g Tris
 - 80 g NaCl
- 1 litre 1X TBST çözeltisi
 - 100 ml 10x TBS + 900 ml dH₂O + 1 ml Tween 20
- 100 ml % 5 yağsız süt tozu
 - 5 g yağsız süt tozu + 100 ml dH₂O

- İnkübasyon sonunda membran 3 defa TBST solüsyonu ile 5 dakika yıkandı.

3.2.11.5. Birincil antikor ile inkübasyon

-1/1000 oranında dilüe edilmiş birincil antikor ile bir gece +4 °C’de inkübe edildi.

-Bu sürenin sonunda membran 3 defa TBST solüsyonu ile 5 dakika yıkandı.

3.2.11.6. İkincil antikor ile inkübasyon

-1/3000 oranında dilüe edilmiş ikincil antikor ile 1,5 saat oda ısısında inkübe edildi.

-Bu sürenin sonunda membran 3 defa TBST solüsyonu ile 5 dakika yıkandı.

3.2.11.7. Görüntüleme ve analiz

Membrandaki proteinlerin görüntülenmesi için Pierce ECL Western Blotting Substrate kiti (Thermo, Amerika) kullanılmıştır. Sekonder antikorlara konjuge edilmiş horseradish peroxidase (HRP) enziminin kemilüminesan substratıdır.

Kitte bulunan 1 ve 2 numaralı reaktifler 1:1 oranında karıştırılarak membranın her yerine eşit dağılacak şekilde 500 ul dağıtıldı. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra kemilüminesan görüntüleme cihazında (Vilmer Lourmat, Almanya) görüntüler kaydedildi.

3.2.12. WST-1 Hücre Canlılığı Testi

Hücre metabolik aktiviteyi ölçmeye yarayan dolayısıyla hücre canlılığı hakkında fikir veren kolorimetrik ölçüme dayalı bir yöntemdir. Hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve sitotoksisiteyi analiz etmeyi sağlar. Tetrazolyum tuzu WST-1’in, hücre metabolik mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından formazana yıkılmasına dayanır. Oluşan bu renkli bileşiğin absorbansı 500-600 nm dalga boyları arasında spektrofotometrik olarak ölçülür. Canlı hücre sayısı arttıkça, mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi yükselmekte, oluşan formazan miktarı ve ölçülen absorbans artmaktadır (104).

-12-well plate’e ekim yapılan ve mimik transfeksiyonu gerçekleştirilen hücreler, 1 gün sonra tripsinle kaldırıldı, sayım yapıldı ve 96-well plate’in her kuyusuna 6.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı zaman aralığında, 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe bekletildi.

-WST-1 konsantrasyonu %10 olacak şekilde DMEM/RPMI içerisinde hazırlandı.

-24, 48 ve 72 saatin sonunda morfolojik gözlem yapıldıktan sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 ul WST-1 çözeltisi koyuldu.

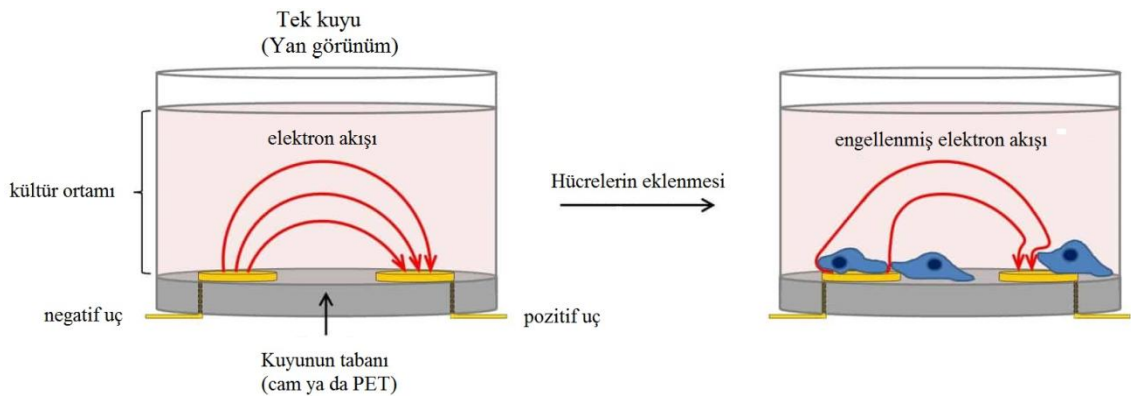
-0, 1, 2, 3 ve 4. Saatlerde 440 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Thermo, Amerika) absorbans ölçümü yapıldı. Ölçüm aralarında 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe bekletildi.

-Analiz için 4. saat sonunda doygunluğa ulaşıldığı görülen absorbans değerleri kullanıldı. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edilerek normalizasyon yapıldı.

-3 biyolojik, 9 teknik tekrarlı çalışılmıştır.

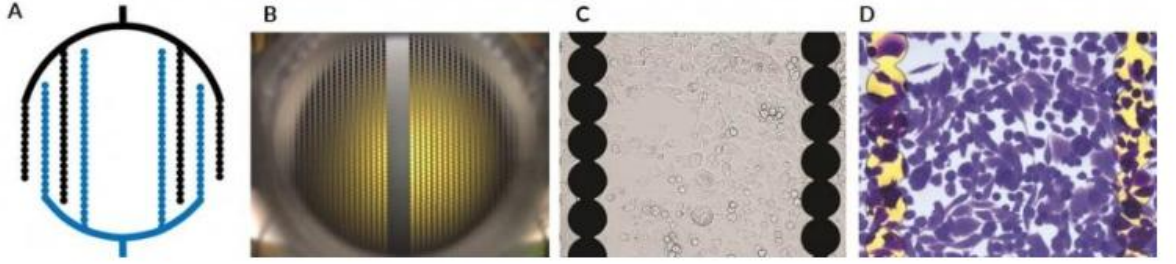
3.2.13. Hücre Proliferasyonunun Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence) ile Test Edilmesi

A549 ve HTB-54 hücrelerinin mimik transfeksiyonu sonrası proliferasyonları eş zamanlı olarak hücre analiz sistemi olan xCELLigence® RTCA MP (ACEA Biosciences) ile izlenmiştir. Bu sistem, hücrelerin altın mikroelektrotlarla kaplı plate kuyularına ekilmesi sonucu hücresel impedansın ölçüldüğü bir sistemdir. Bu plate, elektriksel olarak iletken bir çözelti içine daldırıldığında (tampon veya standart hücre kültür ortamı gibi), bu elektrotlar boyunca bir elektrik potansiyelinin uygulanması ile, elektronların negatif uçtan pozitif uca göç ederek devreyi tamamlaması sağlanmaktadır. Bu olay iletken çözeltiyle etkileşime giren elektrotlara bağlı olduğundan, elektrot çözeltisi arayüzündeki yapışan hücrelerin varlığı elektron akışını engellemektedir (Şekil 3.1). Ölçülen impedansın büyüklüğü, hücre sayısına, hücre büyüklük ve şekline ve hücre-yüzey etkileşiminde bağlanmanın kalitesine bağlıdır (www.aceabio.com).



Şekil 3.1. Mikroelektrotlarla kaplı plate kuyu görüntüsü (www.aceabio.com).

Elektronik plate'lerin her bir kuyusunda yer alan altın mikroelektrot biyosensörleri, yüzey alanının % 70-80'ini kaplar. Bu elektrotlar, düz bir sıra oluşturacak şekilde birbirine bağlanmıştır (Şekil 3.2). Bu düzenleme, hücre popülasyonunun aynı anda izlenmesini sağlar ve böylece kuyulara eklenen hücrelerin sayısı, hücrelerin büyüklüğü/morfolojisi ve hücre-substrat bağlanma kalitesi için hassasiyet sağlar (105).



Şekil 3.2. Empedans elektrotların dizilimi (www.aceabio.com). (A) Altın mikroelektrot biyosensörlerin şematik gösterimi. Kuyunun ortasında bulunan elektrotsuz bölge mikroskopik görüntüleme (parlak alan, floresan vb.) yapabilmek için bırakılmıştır. (B) 96 kuyucuklu elektronik plate'in tek bir kuyusunun fotoğrafı. (C) İnsan hücrelerini görüntülemek için yakınlştırılmış fotoğraf. Elektrotların gölgesi siyah daireler olarak görülmektedir. (D) Altın elektrotlar ve kristal viyole ile boyanmış insan hücrelerinin görüntüsü

MiR-96 ve miR-101 transfeksiyonundan 24 saat sonra 96-well plate'in her kuyucuğuna 6000 hücre olacak şekilde ekim yapılmış, 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiş ve her 30 dakikada bir ölçüm almak kaydıyla toplam 48 saat veri toplanmıştır. Sonuçlar hücre indeksi olarak ifade edilen bir değer olarak üçlü tekrarın ortalaması şeklinde verilmiştir. Hücre indeksi, hücre içermeyen kuyuların impedansının (arka plan impedansı), hücre içeren kuyuların impedansından çıkarılması ile tanımlanmaktadır. MiR-138 mimiğinin, tez çalışmasının sonlarına doğru tükenmesi nedeniyle bu sistem ile analiz edilmesi mümkün olmamıştır.

3.2.14. Koloni Oluşum Deneyi

Koloni oluşum deneyi, hücrelerin neslinin devamlılığını ne ölçüde sağlayabildiği hakkında yorum yapmamızı sağlayan bir deneydir. Tek bir hücrenin 50 hücrelik koloniler oluşturabilme yeteneğini test eder (106). Çalışmamızda hem 2 boyutlu hem de 3 boyutlu koloni oluşum deneyleri kullanılmıştır.

3.2.14.1 İki Boyutlu Koloni Oluşum Deneyi

-12-well plate'e ekim yapılan ve mimik transfeksiyonu gerçekleştirilen hücreler, 1 gün sonra tripsinle kaldırılmış, sayım yapılmış ve 6-well plate'in her kuyucuğuna 1000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

- Hücreler koloni oluşturmaya başlayıp, her kolonideki hücre sayısı 50'yi geçtikten sonra (yaklaşık 2 hafta sonra) %10 kristal viyole ile boyanıp fotoğraflandı.

3.2.14.2 Üç Boyutlu Yumuşak Agar Koloni Oluşum Deneyi

Ankoraj-bağımsız büyüme, hücrelerin katı bir yüzeye tutunmalarından bağımsız olarak gerçekleştirdikleri büyümedir ve kanser hücrelerinin ayırt edici özelliği olarak kabul edilir. Yumuşak agar koloni oluşturma deneyi, malign hücrelerin tümörijenik potansiyelinin saptanması için hücresel ankoraj-bağımsız büyümeyi değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Kanser hücreleri bir alt tabakaya bağlanmadan çoğalma yeteneğine sahip olduğundan in vitro olarak bu kabiliyeti karakterize etmek için yumuşak agar koloni oluşturma deneyi geliştirilmiştir (107). Bu deney, iki tabaka halinde agar dökülmesi ve üst tabakadaki agarda, hücrelerin herhangi bir yüzeye tutunmadan 3-boyutlu koloniler oluşturmaya esasına dayanmaktadır.

3.2.14.2.1. Alt agar tabakasının hazırlanması

-%1,2'lik agar çözeltisi 37 °C'ye ısıtılıp akışkanlık kazandırılarak 2X RPMI ile 1:1 oranında karıştırıldı. Böylece besiyerinin son konsantrasyonu 1X olmuştur.

-96-well plate'in her kuyucuğuna 50'şer ul döküldü ve +4°C'de 30 dak agarın katılaşması için beklendi.

3.2.14.2.2. Üst agar tabakasının hazırlanması

-37 °C'ye ısıtılıp akışkanlık kazandırılan %0,6'lık agar çözeltisi, 2X RPMI ve ml'sinde 6×10^5 hücre içeren süspansiyon ile eşit oranlarda karıştırıldı.

-Önceki adımda hazırlanmış ve dondurulmuş alt agar tabakasının üzerine bu karışımdan 75 ul koyuldu ve +4⁰C’de 15 dak agarın katılaşması için beklendi.

-Agarın katılaşmasının hemen ardından üzerine 100 ul besiyeri eklenerek inkübatöre kaldırıldı.

-Ara ara gözlem yapmak kaydıyla 2 hafta boyunca kolonilerin oluşması beklendi.

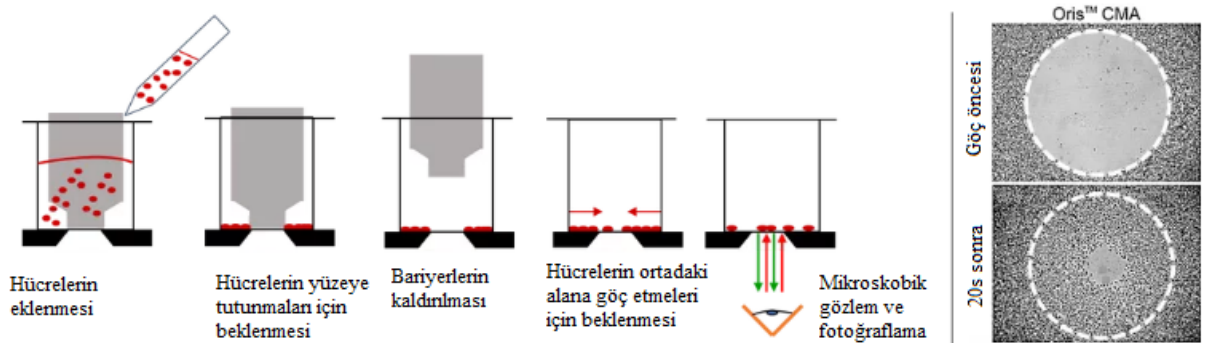
-Son olarak mikroskopta fotoğraflanarak koloniler sayıldı. Sonuçlar 3 biyolojik tekrar, 9 teknik tekrarın ortalaması şeklinde verilmiştir.

3.2.15. Hücre Göçü Deneyleri

Hücre göçü, mikroakışkan bazlı deneyler, yara iyileşmesi, cell-exclusion zone assays ve Boyden Chamber gibi çeşitli tekniklerle değerlendirilmektedir.

3.2.15.1. Oris™ Hücre Göçü Analizi

Hücre göçü analizi için Oris™ Hücre göçü analiz kiti (Platypustech, Amerika) kullanılmıştır. Bu yöntem, 96-well plate kuyularının merkezinde, hücreleri durduran bariyerler kullanılarak, hücre geçirmeyen bir alan oluşturulmasına dayanır. Bariyerlerin çıkarılması ile hücreler, kuyunun merkezinde bulunan bu boş alana doğru göç etmeye başlamaktadırlar (www.platypustech.com) (Şekil 3.3). Ortadaki alanın göç öncesi ve sonrası boyutları hesaplanıp, kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.3. Oris™ Hücre göçü analizi şematik ve mikroskobik görünümü (www.platypustech.com)

-12-well plate'e ekim yapılan ve mimik transfeksiyonu gerçekleştirilen hücreler, 1 gün sonra tripsinle kaldırıldı, sayım yapıldı ve 96-well plate'in bariyer içeren her kuyusuna 30.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.

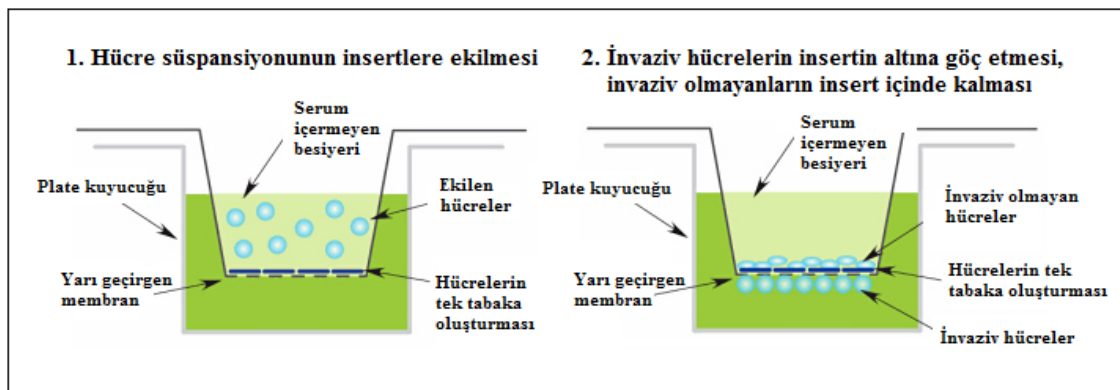
-24 saat sonra bariyerler kaldırıldı ve 0. saat mikroskop görüntüleri alındı.

-Hücre göçü için 24 ve 48 saat olmak üzere iki ayrı zaman diliminde 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe bekletildi. Bu süreler sonunda da yine mikroskoptan görüntüler alındı.

-ImageJ 1.51k programı kullanılarak ortadaki alanın göç öncesi ve sonrası boyutları hesaplandı. Buna göre hangi mimiğin, hücre göçünü ne oranda etkilediği gösterildi. Sonuçlar üçlü tekrarın ortalaması şeklinde verilmiştir.

3.2.15.2. Boyden Chamber Migrasyon Testi

Boyden Chamber yönteminin uygulanması için CytoSelect 24-Well Cell Migration and Invasion Assay (Cell Biolabs, Amerika) kiti kullanılmıştır. Alt tarafı 8µm por genişliğine sahip gözenekli bir zar ile kapatılmış içi boş insertler içine hücreler FBS içermeyen besiyeri ile ekildi. Insert, 24-well plate kuyucuğunda FBS içeren besiyeri üzerinde askıya alındı. Böylece hücreler kemoatraktanlar aracılığıyla zarın diğer tarafına geçtiler (Şekil3.4). Göç eden bu hücreler daha sonra kit içerisinde bulunan boyama çözeltisi ile boyandı ve mikroskop altında görüntülendi. Daha sonra bu hücrelerden bir çözücü (extraction solution) yardımıyla boya ekstrakte edildi ve yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçüldü. Boyanın yoğunluğu hücre sayısı ile doğru orantılı olduğundan, böylece göç eden hücre yoğunluğunu gruplar arası kıyaslamak mümkün olmuştur.



Şekil 3. 4. Boyden Chamber hücre göçü deneyi şematik gösterimi

-12-well plate'e ekim yapılan ve mimik transfeksiyonu gerçekleştirilen hücreler, 1 gün sonra tripsinle kaldırıldı, sayım yapıldı ve 24-well plate'in her kuyucuğuna yerleştirilmiş olan insertlere 30.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe bekletildi.

-24 saatin sonunda göç edemeyen ve insert içinde kalan hücreler nazıkçe pamuklu çubuklarla uzaklaştırıldı.

-Insert, 400 ul boyama çözeltisi içeren 24-well plate'in kuyucuğuna yerleştirildi ve 10 dak oda sıcaklığında göç eden ve insertin alt kısmında bulunan hücrelerin boyanması için bekledi.

-Sürenin sonunda 3 kere yıkama yapılarak fazla boya uzaklaştırıldı ve kurumaya bırakıldı.

-Kurumadan sonra mikroskop altında 10X büyütmede görüntülendi.

-Daha sonra bir de kantitatif değerlendirme yapabilmek için insert, 200 ul ekstraksiyon çözeltisi içeren 24-well plate'in kuyucuğuna yerleştirildi ve 10 dak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Ekstraksiyon çözeltisi, önceki aşamada boyanmış olan hücrelerden boyanın geri çıkarılmasını sağlamaktadır.

-Ekstraksiyon ürününden 100 ul alınıp 96-well plate kuyucuğuna koyuldu. 560nm dalga boyunda spektrofotometrede (Thermo, Amerika) absorbans ölçümü yapıldı.

3.2.15.3. İnvazyon Testi

Metastaz ve invazyon deneyleri aynı aşamalardan oluşmaktadır. İnvazyon testinde migrasyon testinden farklı olarak invaziv özelliklerin değerlendirilebilmesi için hücreler insertlere ekilmeden önce, insert'lerin içi hücre dışı matriksi taklit eden Matrigel (Corning, Amerika) matriks ile kaplandı. Böylece invaziv hücreler Matrigel proteinlerini parçalayan enzimler salgılayarak insert'ün diğer tarafına geçmeyi başarmışlardır.

-DMEM ile 1:30 oranında sulandırılan matrigel, insert tabanını kaplayacak şekilde insert içine koyuldu. 3 saat oda sıcaklığında steril kabin içinde polimerizasyon için bekletildi. Sürenin sonunda insert içinde kalan matrigel çözeltisi uzaklaştırıldı ve her

inserte 30.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe bekletildi.

-24 saatin sonunda göç edemeyen ve insert içinde kalan hücreler nazıkçe pamuklu çubuklarla uzaklaştırıldı.

-Insert, 400 ul boyama çözeltisi içeren 24-well plate'in kuyucuğuna yerleştirildi ve 10 dak oda sıcaklığında göç eden ve insertin alt kısmında bulunan hücrelerin boyanması için beklendi.

-Sürenin sonunda 3 kere yıkama yapılarak fazla boya uzaklaştırıldı ve kurumaya bırakıldı.

-Kurumadan sonra mikroskop altında 10X büyütmede görüntülendi.

-Daha sonra bir de kantitatif değerlendirme yapabilmek için insert, 200 ul ekstraksiyon çözeltisi içeren 24-well plate'in kuyucuğuna yerleştirildi ve 10 dak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Ekstraksiyon çözeltisi, önceki aşamada boyanmış olan hücrelerden boyanın geri çıkarılmasını sağlamaktadır.

-Ekstraksiyon ürününden 100 ul alınıp 96-well plate kuyucuğuna koyuldu. 560nm dalga boyunda spektrofotometrede (Thermo, Amerika) absorbans ölçümü yapıldı.

3.2.16. Flow-sitometrik Apoptozis Tayini

MiR-96-5p, miR-101-3p, miR-138-5p'nin apoptoz üzerine etkilerini test etmek amacıyla FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (Kat no:556547 BD Biosciences, Amerika) kullanılmıştır. FITC Annexin V, bir popülasyondaki apoptotik hücrelerin yüzdesini belirlemek için kullanılır. Bu boyanın çalışma prensibi, apoptozisin erken evrelerinde hücrelerin zar asimetrisini kaybetme özelliklerine dayanır. Apoptotik hücrelerde, membran fosfolipit fosfatidilserin (PS), plazma membranının iç zarından dış zarına aktarılır ve böylece hücre dışı ile etkileşime açık hale gelir. Annexin V, kalsiyum-bağımlı bir fosfolipit bağlayıcı proteindir ve PS için yüksek afiniteye sahiptir. Böylece hücre membranının dış yüzeyine yerleşmiş olan PS ile etkileşerek, apoptotik hücrelerin tanımlanmasını sağlar. Propidium İyodür (PI) ise standart bir flow-sitometrik canlılık probudur ve ölü hücrelerle canlı olanları ayırt etmek için kullanılır. Canlı hücrelerin membran yapısı bozulmamıştır, bu yüzden PI hücre içine giremez. Fakat ölü

ve hasarlı hücrelerin membranları PI'e karşı geçirgendir. Bu yüzden FITC Annexin V için pozitif ve PI için negatif olan hücreler apoptotik hücrelerdir. Hem FITC Annexin V hem de PI için pozitif olan hücreler apoptozun son aşamasındadır. Hem FITC Annexin V hem de PI için negatif olan hücreler canlıdır ve ölçülebilir apoptozisten bahsedilmez. FITC Annexin V için negatif, PI için pozitif olan hücreler ise nekrotik hücrelerdir (www.bdbiosciences.com).

- Hücreler 12 well plate'e her bir kuyusunda 200.000 hücre olacak şekilde ekildi ve miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p mimikleri ile transfekte edildi.
- 24 saat sonra tripsin ile kaldırıldı ve 400 rpm'de 5 dak santrifüj edildi.
- Soğuk PBS ile yıkama yapılarak tripsin uzaklaştırıldı.
- Hücre pelleti 1X Binding Buffer ile 1×10^6 cells/ml olacak şekilde süspanse edildi.
- Hücre süspansiyonundan 100 ul (1×10^5) alındı, üzerine 5 µl of FITC Annexin V ve 5 µl PI eklendi.
- 15 dak oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.
- 400 ul 1X Binding Buffer eklenerek BD FACSCanto™ flow-sitometre cihazında analiz edildi.

3.2.17. LC3 Floresan Görüntüleme

Otofaji marker'ı LC3'ün floresan mikroskopunda görüntülenebilmesi için öncelikle pMRX-IP-GFP-LC3-RFP-LC3-ΔG plazmidi çoğaltılmıştır. Bu amaçla öncelikle kompetent bakteri hazırlandı, plazmid transformasyonu ve plazmid izolasyonu yapıldı. Daha sonra mimiklerle birlikte transfeksiyon yapılarak (cotransfection) hücrelere aktarıldı. 48 saat sonra otofagozomlara karşılık gelen GFP noktalarının sayımı yapıldı.

3.2.17.1. Kompetent Bakteri Hazırlama

- Öncelikle *E.coli* bakterilerini çoğaltmak amacıyla, 100 ml LB Broth(Miller) besiyerinde, 37°C'de çalkalayıcıda bakteriler inkübe edildi.
- Hücre yoğunluğunun spektrofotometrede 0,6 OD (optic density) ölçüldüğü anda bakteriler 50 ml'lik falkonlara alındı ve 5 dk 4°C'de 3500 rpm'de santrifüj edildi.

- Santrifüj sonunda süpernatant atıldı, pellet üzerine 1 ml 50 mM CaCl₂ eklendi.
- 30 dk buzda bekletildikten sonra 10 dk 4°C’de 4000 rpm’de santrifüj edildi.
- Süpernatant tekrar atıldı ve üzerine 2,5 ml %15 gliserol içeren 50 mM CaCl₂ eklenip çözündürüldü. 1,5 ml’lik tüplere 100 ul dağıtılıp -80°C ‘ye kaldırıldı.

3.2.17.2. Plazmid Aktarımı (Transformasyon)

100 ul kompetenet *E.coli* içeren tüpler -80°C’den alınıp buzda çözünmesi için bekletildiler.

-100 ng pMRX-IP-GFP-LC3-RFP-LC3-ΔG plazmidini, steril bir eppendorf tüp içerisindeki 100 µl’lik kompetent *E.coli* hücresi üzerine eklenip buz üzerinde 20 dk inkübe edildi.

-İnkübasyon sonunda *E.coli* şoklanmak üzere 37°C’de 15 sn tutuldu.

-Şoklanan *E.coli* oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.

-1 ml LB eklendi ve 1 saat çalkalayıcıda 37°C’de inkübe edildi.

-12000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi, süpernatant tüpte yaklaşık 150 µl kalacak şekilde uzaklaştırıldı.

-Eppendorf tüpün alt kısmına çöken hücreler pipet yardımıyla homojenize edildi.

-Homojenize edilen *E.coli*’ler Ampisilin içeren agar petriye steril boncuklar yardımıyla ekilerek 37°C’de yaklaşık 18 saat inkübe edildi.

3.2.17.3. Plazmid İzolasyonu

-Transormasyondan sonra ekim yapılan petriden öze ile koloniler alındı ve son konsantrasyonu 100 ug/ml ampisilin içerecek şekilde hazırlanmış 200 ml LB içine ekim yapıldı.

-Gece boyunca 37°C’de ve çalkalayıcıda çoğalmaları için inkübe edildi.

-50 ml’lik falkonlara dağıtılarak 20 dk 4000 rpm 4°C’de santrifüj edildi.

-Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet üzerine 2 ml P1 çözeltisi eklenerek pellet yeniden süspanse hale getirildi.

-2 ml P2 çözeltisi eklenip 4-6 kez alt-üst edilerek 5dk oda sıcaklığında bekletildi.

- 2 ml P3 çözeltisi eklenip, 4-6 kez alt-üst edilerek 15dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 30 dk 4000 rpm 4°C’de santrifüj edildi.
- Filtreli kolona 4 ml QBT eklendi.
- Santrifüj sonrası süpernatant kolona bitene kadar eklendi ve kolonun altında toplanan sıvı atıldı.
- 2 kere 10 ml QC çözeltisi eklenip, altta toplanan sıvı atıldı. Filtreli kolonun altına yeni 50 ml’lik falkon koyuldu.
- Filtreye 5 ml QF solüsyonu eklenerek, kolonda tutunan plazmidlerin QF çözeltisi ile birlikte kolonun altındaki falkon tüpe geçmesi sağlandı.
- Falkon tüpe 3,5 ml izopropanol eklendi ve 30 dk 13000 rpm 4°C’de santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 2 ml %70’lik etanol eklendi. 10 dk 13000 rpm +4°C’de santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırılarak tüpler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- 100 µl RNase içermeyen su eklendi, konsantrasyon ölçümü yapıldıktan sonra -20°C’de muhafaza edildi.

3.2.17.4. Hücre Hatlarına Plazmid Verilmesi ve Görüntüleme

-Hücreler 12 well plate’e her bir kuyusunda 200.000 hücre olacak şekilde ekildi ve mimikle transfeksiyonu yapıldı.

-24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa plazmid konsantrasyonu 2 µg/ µl olacak şekilde plazmid transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyon ajanı olarak Lipofectamine 3000 transfeksiyon ajanı (Thermo, Amerika) kullanılmıştır.

-24 saat 37°C’de CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Transfeksiyonun başarılı olup olmadığı GFP proteininin floresan mikroskobu altında var olup olmamasına göre karar verildi.

3.2.18. Verilerin istatistiksel analizi

Gruplar arasındaki karşılaştırmalar ve veriler, SPSS Statistics V22.0 ve GraphPad Prism V6.00 yazılımları kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arası farklanmaların anlamlı olup olmadığının gösterilmesi için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), ikili grupların kendi aralarındaki değişimlerin anlamlılığını etmek için ise Student t test veya non-parametric Mann-Whitney U kullanılmıştır. p<0.05 olan değerler istatistik olarak

anlamalı kabul edilmiştir. Grafiklerin üzerinde yer alan yıldızların sayısı anlamlılık derecesini göstermektedir. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, ****p<0,0001.

Gen ekspresyon sonuçları analiz edilirken $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($\Delta C_t = \text{Hedef gen} - \text{Housekeeping gen}$) formülü kullanılmıştır. Her PCR döngüsü sonunda ölçülen floresan ışıma miktarının, sınır değeri aştığı ilk döngüye C_t (cycle threshold) denilmektedir (102). Örnekler arası ekspresyon farklılıklarının gösterilmesi için sonuçlar kat değişimi şeklinde verilmiştir.



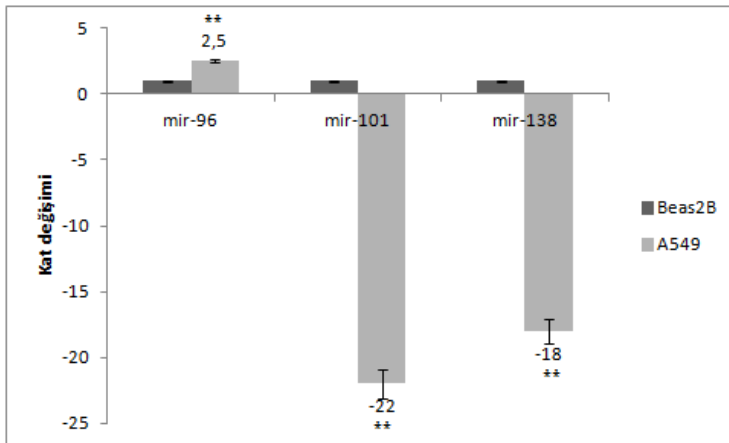
4. BULGULAR

4.1. miR-96, miR-101 ve miR-138'in Beas2B, A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarındaki Ekspresyonları

Çalışmada ilk olarak A549, HTB-54 ve BEAS2B hücre hattında miRNA ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Ekspresyon seviyesindeki değişimlerin analiz edilmesi için; normal akciğer hücre hattı ile akciğer kanser hücre hatları kıyaslanmıştır ve değerler RNA-U6 ile normalize edilmiştir.

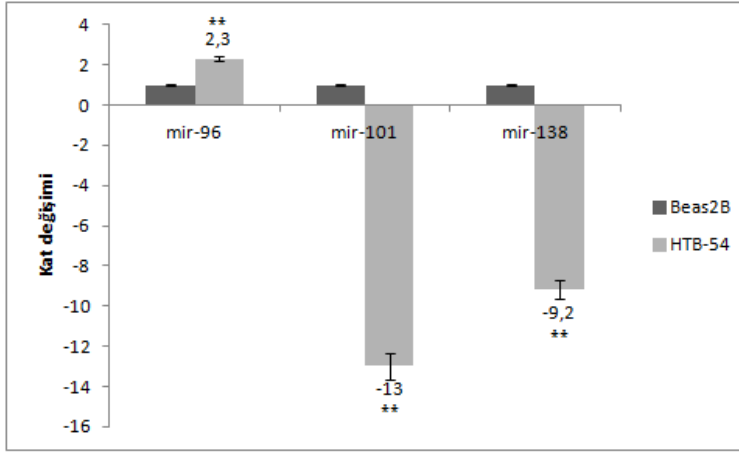
Öncelikle qRT-PCR yöntemiyle; hücre hatlarında miR-96, miR-101 ve miR-138'in Ct değerleri bulundu. Normalizasyon yapılarak ΔCt değerleri hesaplandı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri de hesaplanarak normal akciğer hücre hattına kıyasla akciğer kanseri hücre hatlarındaki miRNA ekspresyon seviyeleri kat değişimi (fold change) şeklinde verilmiştir. Hesaplama kontrol grubu olarak Beas2B hücre hattı kullanılmıştır. Beas2B kontrol grubu hücre hattı olduğu için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri 1 kabul edildi.

miR-96 ekspresyon seviyesi A549 hücre hattında, Beas2B hücre hattına kıyasla 2,5 kat artmış bulunurken, miR-101 ve miR-138 ekspresyon seviyeleri yaklaşık 20 kat azalmış bulundu (Şekil 4.1). Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0,0023, 0,0052 ve 0,0044)



Şekil 4.1. miR-96, miR-101 ve miR-138'in Beas2B ve A549 hücre hatlarındaki ekspresyonları. p değerleri sırasıyla 0,0023, 0,0052 ve 0,0044 olarak hesaplanmıştır.

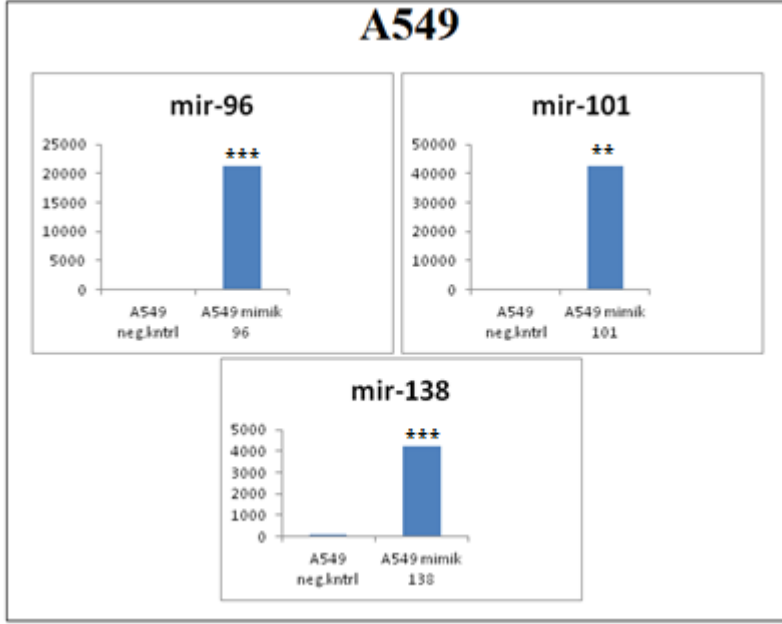
HTB-54 hücre hattında ise miR-96 ekspresyon seviyesi Beas2B hücre hattına kıyasla 2,3 kat artmış bulunurken, miR-101 ve miR-138 ekspresyon seviyeleri, sırasıyla 13 ve 9,2 kat azalmış bulundu (Şekil 4.2). Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p= 0,0053$, $p=0,0022$ ve $p=0,0068$).



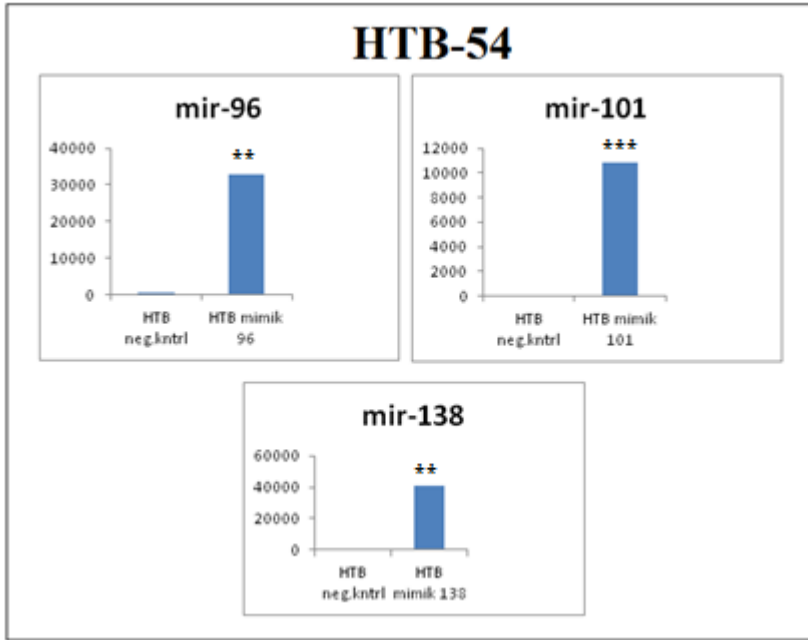
Şekil 4.2. miR-96, miR-101 ve miR-138’in Beas2B ve HTB-54 hücre hatlarındaki ekspresyonları. p değerleri sırasıyla 0,0053, 0,0022 ve 0,0068 olarak hesaplanmıştır.

4.2. Mimik transfeksiyonundan sonra A549 ve HTB-54 hücre hatlarında miRNA ekspresyon seviyesindeki değişimler

miR-96, miR-101 ve miR-138 mimikleri A549 ve HTB-54 hücre hatlarına transfekte edildikten sonra, gen ekspresyon seviyelerinde artış olması gereklidir. Ancak bu şekilde daha sonra yapılacak olan analizler anlamlı olur. Bu yüzden transfeksiyonun doğrulanması için mimikle transfekte edilen ve edilmeyen hücrelerden miRNA ekspresyon analizi yapılmış ve transfeksiyonların iki hücre hattında da tüm mimikler için başarılı olduğu ve sonuçların istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.3 ve 4.4). A549 hücre hattında miR-96, miR-101 ve miR-138 karşılaştırmalı kat değişimi analizine ait p değerleri sırasıyla 0,00082, 0,0071 ve 0,00033 olarak hesaplanmıştır. HTB-54 hücre hattında miR-96, miR-101 ve miR-138 karşılaştırmalı kat değişimi analizine ait p değerleri sırasıyla 0,0043, 0,00021 ve 0,0039 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. A549 hücre hattında mimik transfeksiyonlarının doğrulanması. miR-96, miR-101 ve miR-138 karşılaştırmalı kat değişimi analizine ait p değerleri sırasıyla 0,00082, 0,0071 ve 0,00033 olarak hesaplanmıştır.

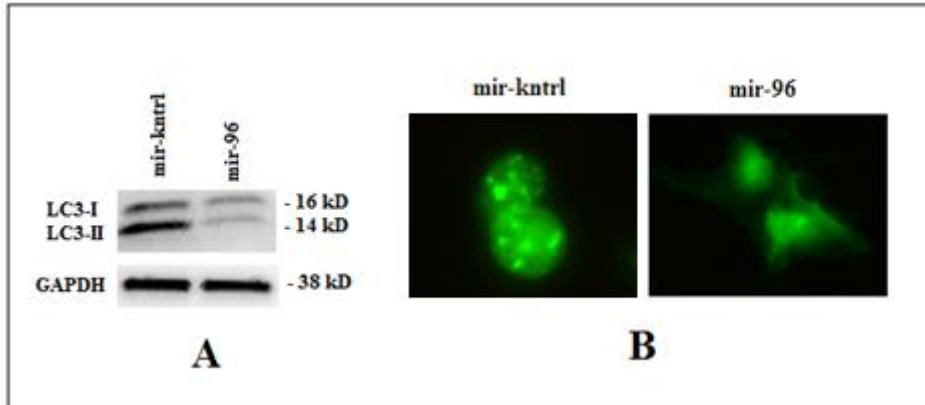


Şekil 4.4. HTB54 hücre hattında mimik transfeksiyonlarının doğrulanması. miR-96, miR-101 ve miR-138 karşılaştırmalı kat değişimi analizine ait p değerleri sırasıyla 0,0043, 0,00021 ve 0,0039 olarak hesaplanmıştır.

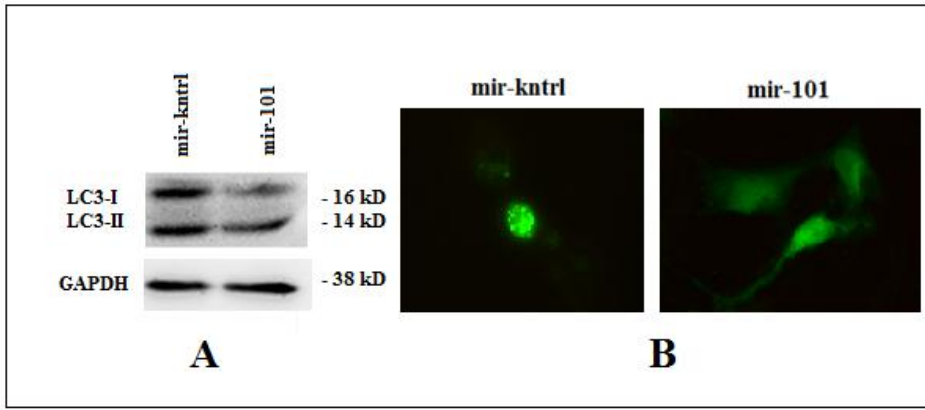
4.3. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 Hücre Hattında Otofaji üzerine Etkileri

miR-96-5p'nin otofajiyi nasıl etkilediğini göstermek amacıyla otofaji marker olan LC3'ün protein seviyeleri hem western blot ile gösterilmiş hem de hücrelere mimikle birlikte GFP-LC3 içeren plazmid aktarılarak, hücredeki otofagozom sayısındaki değişim değerlendirilmiştir. Otofaji uyarıldığı zaman LC3'ün C ucundaki arginin amino asidi, Atg4 (sistein proteaz) enzimi tarafından kesilir ve LC3-I tipi oluşturulur. LC3-I'e, fosfatidiletanolamine (PE) bağlanarak LC3-II oluşturulur. LC3-I bant yoğunluğunun azalıp, LC3-II'nin bant yoğunluğunun artması otofajinin uyarıldığını gösterir.

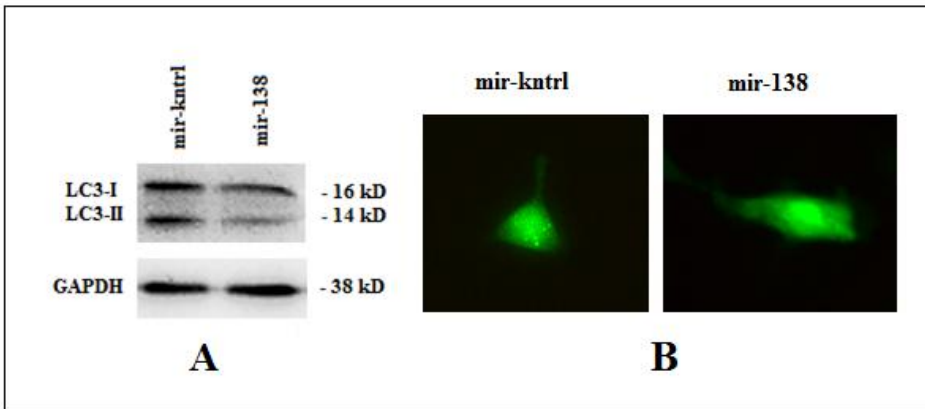
Immunfloresan analizde ise GFP-LC3'ün yoğunlaştığı yeşil noktalar otofagozomlara karşılık gelmektedir. Otofagozom sayısındaki artış otofajinin uyarılması şeklinde yorumlanır. MiR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin mimikleri GFP-LC3 içeren plazmidle aynı anda transfekte edilir (cotransfection). Otofajinin uyarılması için, hücreler fikse edilmeden önce 4 saat açlığa maruz bırakılmıştır. Her üç mimiğin de A549 hücre hattında otofajiyi baskıladığı hem western blot hem de immunfloresan ile gösterilmiştir (Şekil 4.5-4.7).



Şekil 4.5. miR-96-5p'nin A549 hücre hattında otofajiye etkisi



Şekil 4.6. miR-101-3p'nin A549 hücre hattında otofajiye etkisi

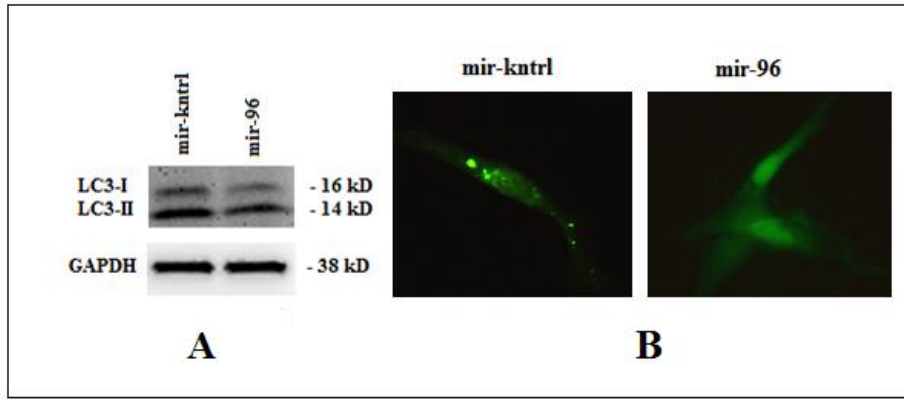


Şekil 4.7. miR-138-5p'nin A549 hücre hattında otofajiye etkisi

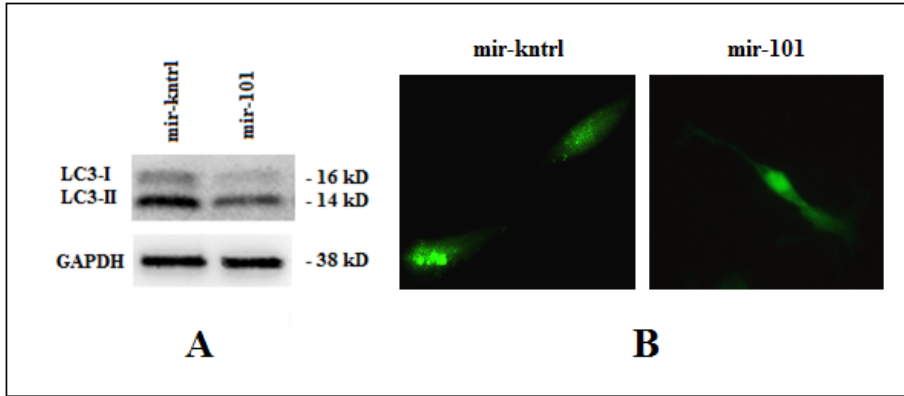
4.4. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 Hücre Hattında Otofaji üzerine Etkileri

miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin mimikleri HTB-54 hücre hattına transfeke edilmiş, LC3-I ve LC3-II bant yoğunluğu değerlendirilmiştir.

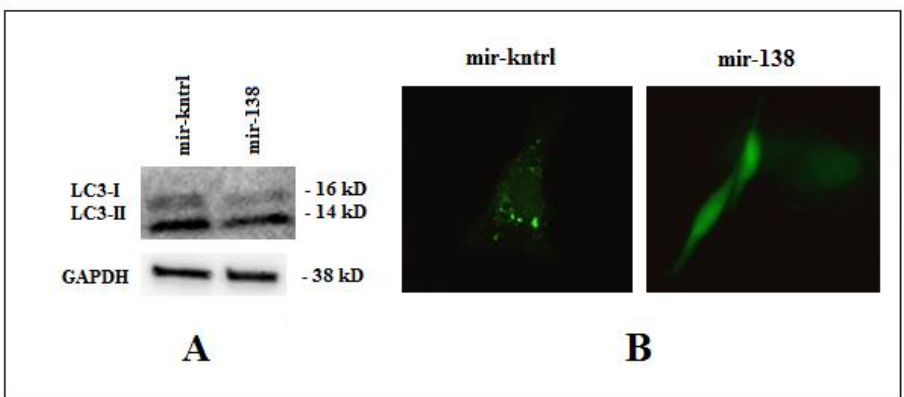
Immunfloresan analiz için ise miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin mimikleri GFP-LC3 içeren plazmidle aynı anda transfeke edilmiş, otofajinin uyarılması için, hücreler fikse edilmeden önce 4 saat açlığa maruz bırakılmıştır. Her üç mimiğin de HTB-54 hücre hattında otofajiyi baskıladığı hem western blot hem de immunfloresan ile gösterilmiştir (Şekil 4.8-4.10).



Şekil 4.8. miR-96-5p'nin HTB-54 hücre hattında otofajiye etkisi



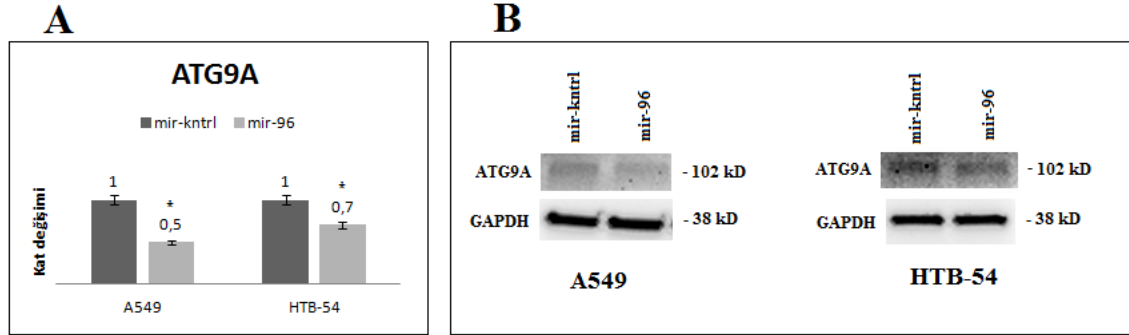
Şekil 4.9. miR-101-3p'nin HTB-54 hücre hattında otofajiye etkisi



Şekil 4.10. miR-138-5p'nin HTB-54 hücre hattında otofajiye etkisi

4.5. miR-96-5p'nin A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarında ATG9A'ya Etkisi

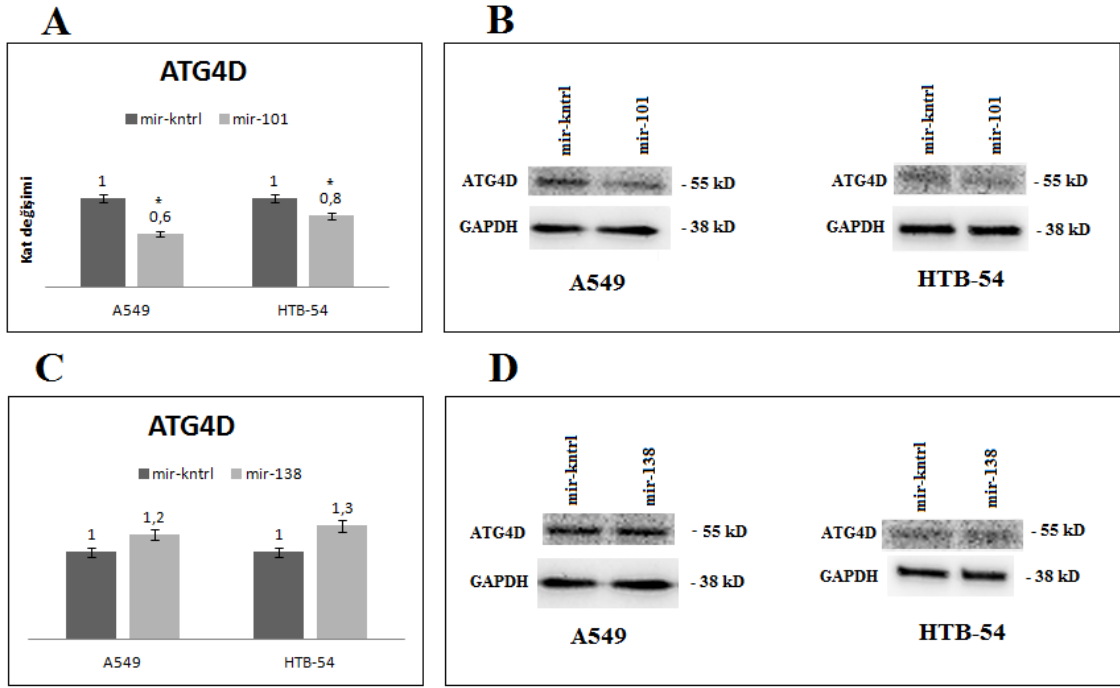
miR-96 mimik transfeksiyonu yapılan A549 ve HTB-54 hücre hatlarının ikisinde de, kontrole kıyasla ATG9A mRNA ve protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür (p değerleri sırasıyla 0,0478 ve 0,0491)



Şekil 4.11. A549 ve HTB-54 hücre hatlarında miR-96-5p'nin ATG9A'ya etkisi. (A) miR-96-5p'nin ATG9A mRNA seviyesine etkisi. (B) miR-96-5p'nin ATG9A protein düzeyine etkisi.

4.6. miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarında ATG4D'ye Etkileri

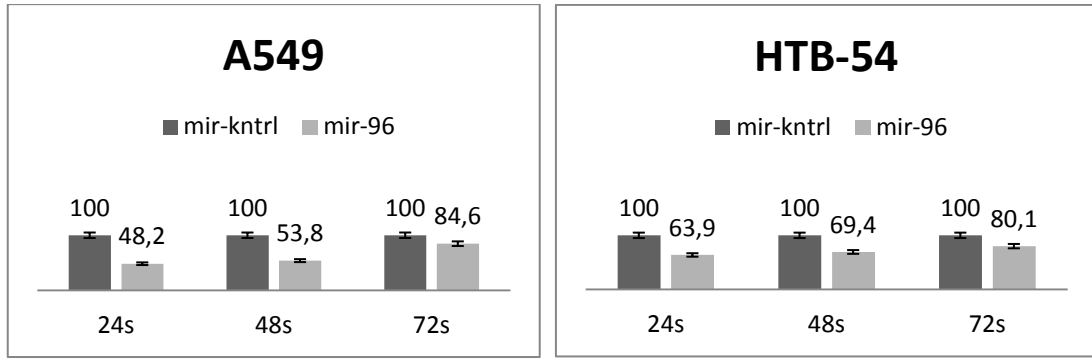
miR-101-3p ve miR-138-5p mimikleri ayrı ayrı A549 ve HTB-54 hücre hatlarına transfekte edilmiş ve ATG4D protein seviyeleri western blot ile değerlendirilmiştir. miR-101 transfekte edilen her iki hücre hattında da kontrole kıyasla ATG4D mRNA ve protein seviyesinde azalma gözlenmiş ve azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0,0398 ve 0,0457). MiR-138 uygulanan grupta her iki hücre hattında da kontrole kıyasla ATG4D mRNA ve protein seviyesinde herhangi bir değişim görülmemiştir.



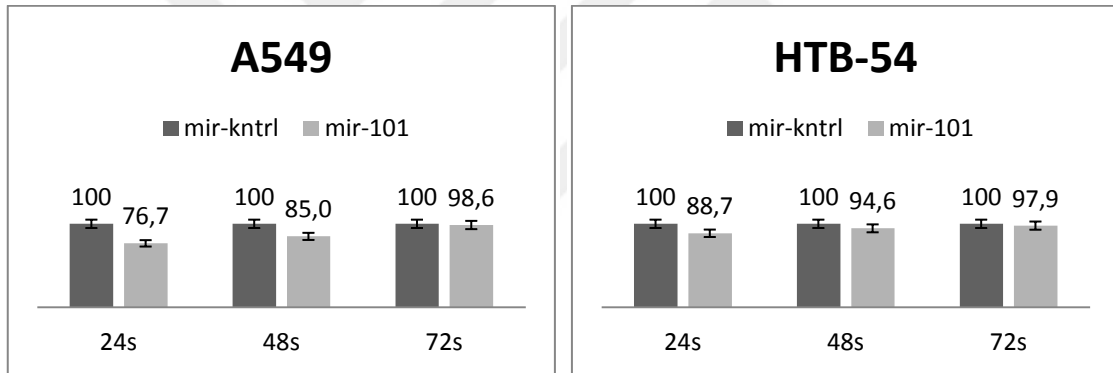
Şekil 4.12. A549 ve HTB-54 hücre hatlarında miR-101-3p ve miR-138-5p'nin ATG4D'ye etkisi. (A) miR-101-3p'nin ATG4D mRNA seviyesine etkisi. (B) miR-101-3p'nin ATG4D protein düzeyine etkisi. (C) miR-138-5p'nin ATG4D mRNA seviyesine etkisi. (D) miR-138-5p'nin ATG4D protein düzeyine etkisi.

4.7. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarında Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

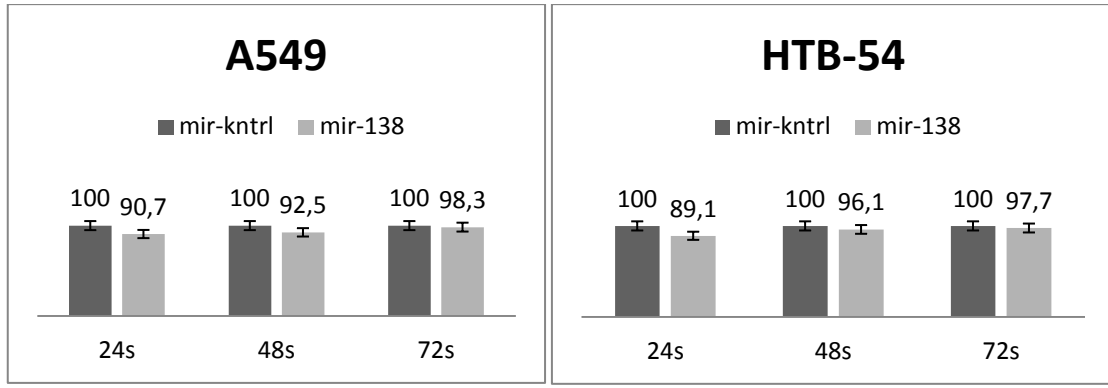
miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin mimikleri, A549 ve HTB-54 hücre hattına transfekte edilmiş ve transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra WST-1 reaktifi kullanılarak hücre canlılıkları değerlendirilmiştir. Her üç mimiğin de hücre canlılığını belirli ölçülerde azalttığı görülmüştür (Şekil 4.13-4.15). Bu etkinin zamana bağımlı olarak giderek azaldığı görülmüştür. Hücre canlılığını her iki hücre hattında da en çok etkileyen miRNA, miR-96-5p olmuştur (Şekil 4.13). MiR-101-3p'nin, A549 hücre hattında canlılığı azaltırken, HTB-54 hücre hattında o kadar etkili olmadığı gösterilmiştir. MiR-138-5p ise her iki hücre hattında da hücre canlılığını en az etkileyen miRNA olmuştur.



Şekil 4.13. miR-96-5p'nin A549 ve HTB-54 hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi. 24, 48 ve 72 saatin sonunda morfolojik gözlem yapıldıktan sonra WST-1 reaktifi kullanılarak 440 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Şekilde kontrole göre normalize edilmiş değerler görülmektedir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. A549 hücre hattındaki karşılaştırmalı analize ait p değeri 0,047, HTB-54 hücre hattında $p=0,035$ olarak hesaplanmıştır.



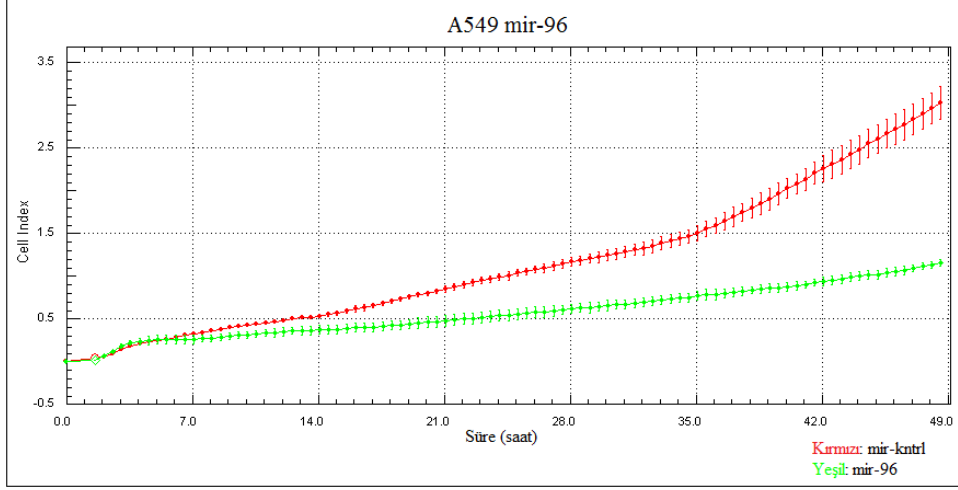
Şekil 4.14. miR-101-3p'nin A549 ve HTB-54 hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi. 24, 48 ve 72 saatin sonunda morfolojik gözlem yapıldıktan sonra WST-1 reaktifi kullanılarak 440 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Şekilde kontrole göre normalize edilmiş değerler görülmektedir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. A549 hücre hattındaki karşılaştırmalı analize ait p değeri 0,027, HTB-54 hücre hattında $p=0,043$ olarak hesaplanmıştır.



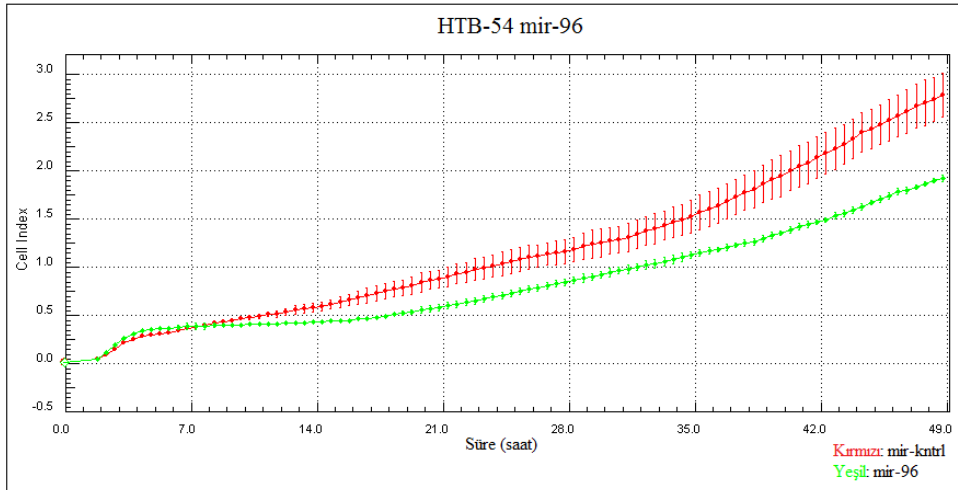
Şekil 4.15. miR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi. 24, 48 ve 72 saatin sonunda morfolojik gözlem yapıldıktan sonra WST-1 reaktifi kullanılarak 440 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Şekilde kontrole göre normalize edilmiş değerler görülmektedir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. A549 hücre hattındaki karşılaştırmalı analize ait p değeri 0,033, HTB-54 hücre hattında $p=0,036$ olarak hesaplanmıştır.

4.8. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarında Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkilerinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence) ile İncelenmesi

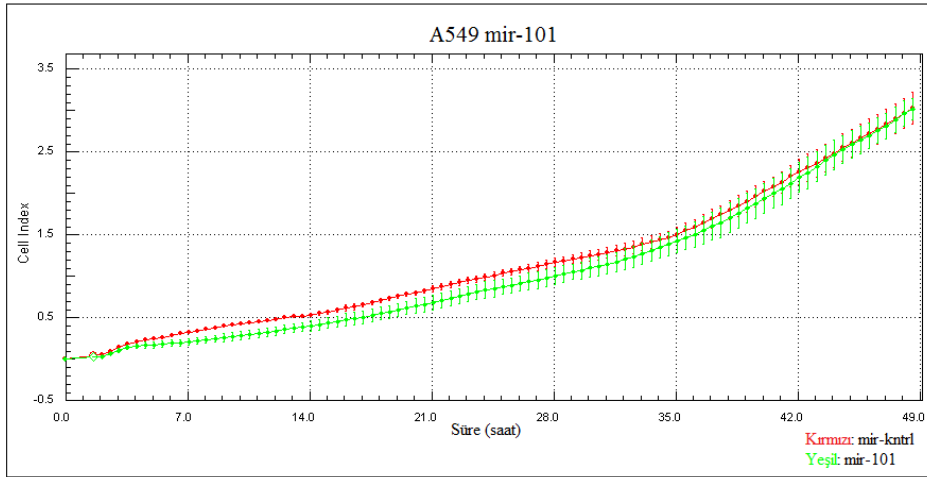
A549 ve HTB-54 hücrelerinin mimik transfeksiyonu sonrası proliferasyonları eş zamanlı olarak hücre analiz sistemi olan xCELLigence® RTCA MP (ACEA Biosciences) ile izlenmiştir. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi verilerine göre miR-96 her iki hücre hattında da proliferasyonu baskılamıştır (Şekil 4.16 ve 4.17). Bu sonuçlar WST-1 hücre canlılık testi sonuçlarını doğrulamaktadır. MiR-96'nın, A549 hücre hattında proliferasyonu, HTB-54 hücre hattındakine göre daha çok baskıladığı görülmüştür. MiR-101'in iki hücre hattında da proliferasyonu baskıladığı bulunmuş fakat bu baskılayıcı etkinin miR-96 kadar olmadığı görülmüştür (Şekil 4.18 ve 4.19). Yine bu sonuç da WST-1 hücre canlılık testi sonuçları ile tutarlılık göstermiştir. MiR-138 mimiğinin, tez çalışmasının sonlarına doğru tükenmesi nedeniyle bu sistem ile analiz edilmesi mümkün olmamıştır.



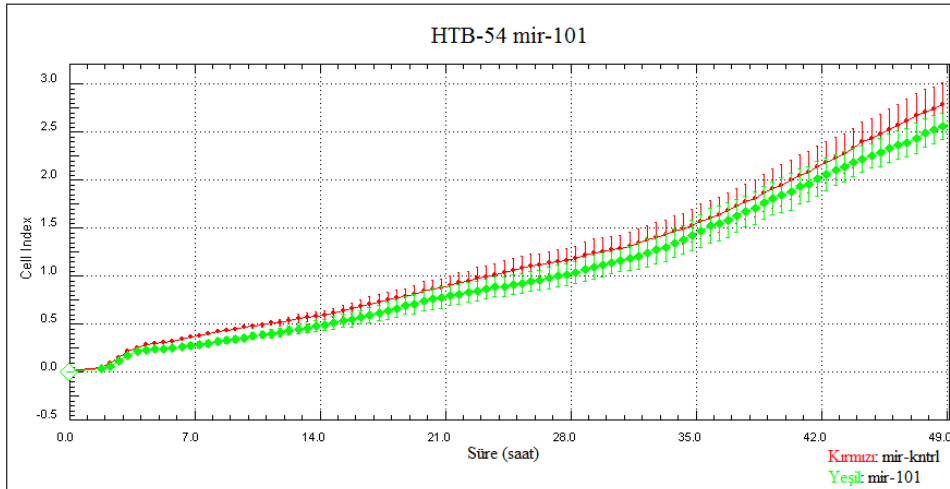
Şekil 4.16. miR-96-5p'nin A549 hücre hattında proliferasyona etkisinin gerçek zamanlı izlenmesi. Hücre indeksi, üçlü tekrarın ortalaması şeklinde verilmiştir. Her 30 dakikada bir ölçüm almak kaydıyla toplam 48 saat veri toplanmıştır. Dikey çizgiler, ölçüm alınan her noktadaki standart sapmayı göstermektedir. Yatay ilerleyen kırmızı çizgi miR-kntrl grubunun hücre indeksini gösterirken, yeşil çizgi miR-96-5p ile transfekte edilen grubun hücre indeksini göstermektedir.



Şekil 4.17. miR-96-5p'nin HTB-54 hücre hattında proliferasyona etkisinin gerçek zamanlı izlenmesi. Hücre indeksi, üçlü tekrarın ortalaması şeklinde verilmiştir. Her 30 dakikada bir ölçüm almak kaydıyla toplam 48 saat veri toplanmıştır. Dikey çizgiler, ölçüm alınan her noktadaki standart sapmayı göstermektedir. Yatay ilerleyen kırmızı çizgi miR-kntrl grubunun hücre indeksini gösterirken, yeşil çizgi miR-96-5p ile transfekte edilen grubun hücre indeksini göstermektedir.



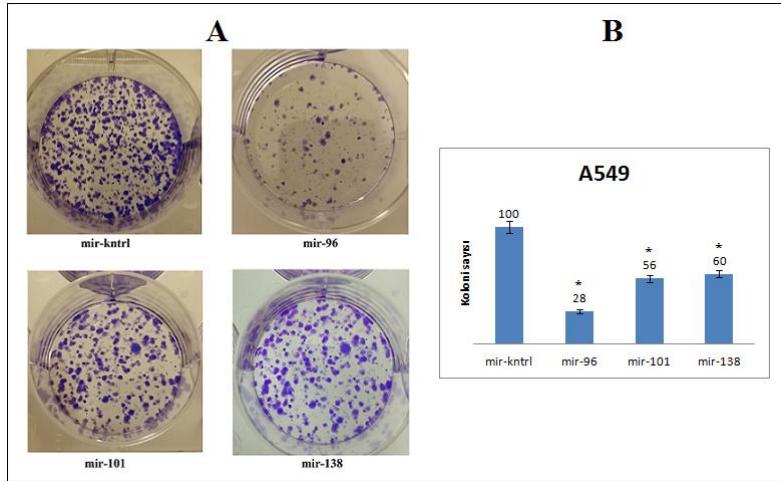
Şekil 4.18. miR-101-3p'nin A549 hücre hattında proliferasyona etkisinin gerçek zamanlı izlenmesi. Hücre indeksi, üçlü tekrarın ortalaması şeklinde verilmiştir. Her 30 dakikada bir ölçüm almak kaydıyla toplam 48 saat veri toplanmıştır. Dikey çizgiler, ölçüm alınan her noktadaki standart sapmayı göstermektedir. Yatay ilerleyen kırmızı çizgi miR-kntrl grubunun hücre indeksini gösterirken, yeşil çizgi miR-101-3p ile transfekte edilen grubun hücre indeksini göstermektedir.



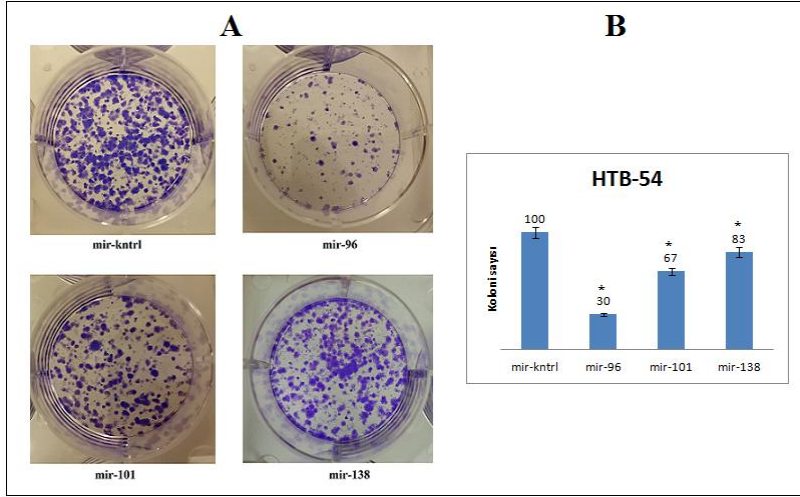
Şekil 4.19. miR-101-3p'nin HTB-54 hücre hattında proliferasyona etkisinin gerçek zamanlı izlenmesi. Hücre indeksi, üçlü tekrarın ortalaması şeklinde verilmiştir. Her 30 dakikada bir ölçüm almak kaydıyla toplam 48 saat veri toplanmıştır. Dikey çizgiler, ölçüm alınan her noktadaki standart sapmayı göstermektedir. Yatay ilerleyen kırmızı çizgi miR-kntrl grubunun hücre indeksini gösterirken, yeşil çizgi miR-101-3p ile transfekte edilen grubun hücre indeksini göstermektedir.

4.9. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarında İki Boyutlu Koloni Oluşumu Üzerine Etkileri

miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin mimikleri, A549 ve HTB-54 hücre hatlarına transfekte edilmiş ve hücrelerin koloni oluşturması için yaklaşık 2 hafta beklenmiştir. Bu sürenin sonunda 50'den fazla hücre içeren koloniler sayılmıştır. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin iki hücre hattında da kontrole kıyasla koloni oluşumunu baskıladıkları bulunmuştur (Şekil 4.20 ve 4.21). p değerleri A549 hücre hattı için sırasıyla 0,02, 0,031 ve 0,028; HTB-54 hücre hattı için 0,047, 0,039 ve 0,025 olarak hesaplanmış ve bulguların istatistiksel olarak da anlamlı oldukları gösterilmiştir.



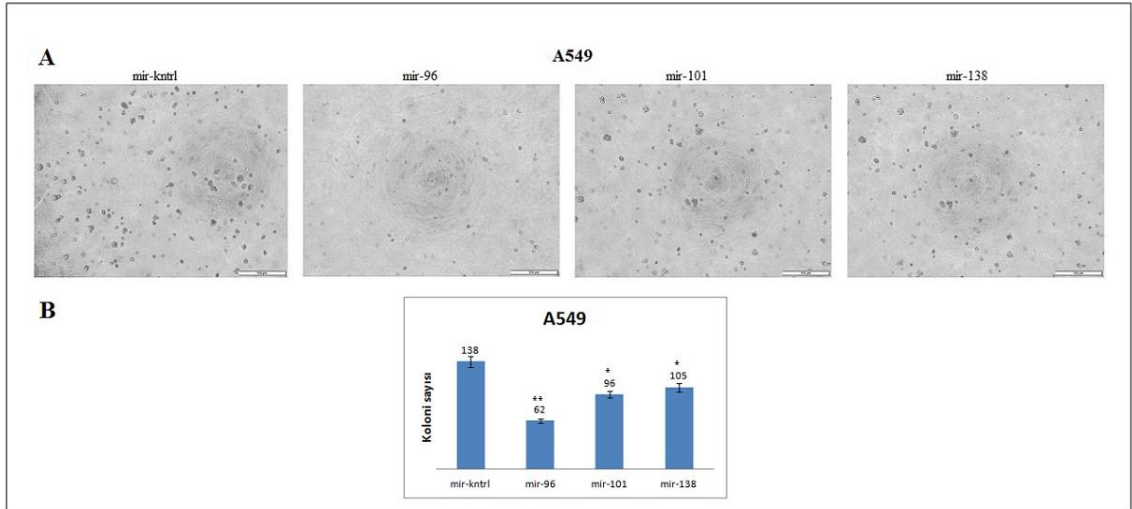
Şekil 4.20. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 Hücre Hattında İki Boyutlu Koloni Oluşumu Üzerine Etkileri. (A) Kristal viyole ile boyanmış koloni görüntüleri. (B) Kontrol grubuna göre normalize edilmiş koloni sayıları (p değerleri sırasıyla 0,02, 0,031 ve 0,028)



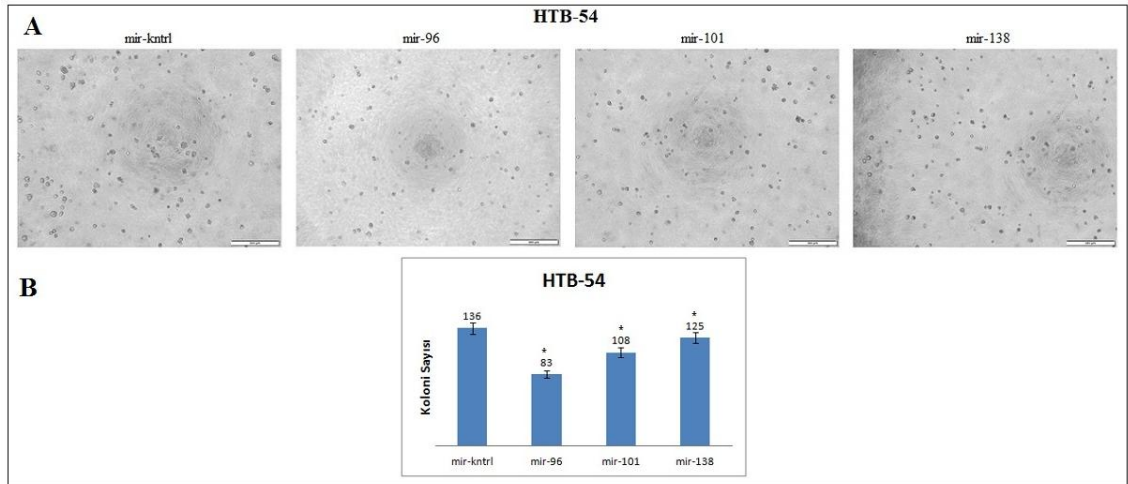
Şekil 4.21. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 Hücre Hattında İki Boyutlu Koloni Oluşumu Üzerine Etkileri. (A) Kristal viyole ile boyanmış koloni görüntüleri. (B) Kontrol grubuna göre normalize edilmiş koloni sayıları (p değerleri sırasıyla 0,047, 0,039 ve 0,025)

4.10. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HT-54 Hücre Hatlarında Üç Boyutlu Yumuşak Agar Koloni Oluşumu Üzerine Etkileri

Yumuşak agar koloni oluşturma deneylerinin sonuçlarına göre miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 hücre hatlarında 3 boyutlu koloni oluşturma kabiliyetini azalttığı gösterilmiştir (Şekil 4.22 ve 4.23). Özellikle miR-96-5p'nin her iki hücre hattında da koloni sayı ve büyüklüklerini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Koloniler morfolojik olarak incelendiğinde herhangi bir farklanmaya rastlanmamıştır.



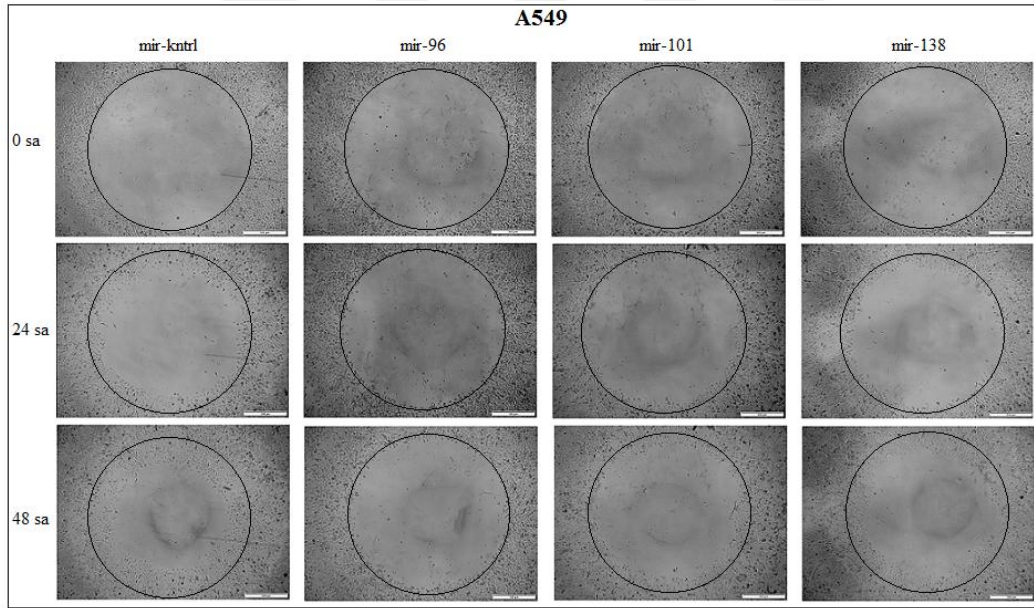
Şekil 4.22. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında yumuşak agar 3-boyutlu koloni oluşturma üzerine etkileri. (A) Kolonilerin 4X büyütme ile çekilen fotoğrafları görülmektedir. (B) Koloni sayısında meydana gelen değişimler. (p değerleri sırasıyla 0,0012, 0,048 ve 0,034 hesaplanmış olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.)



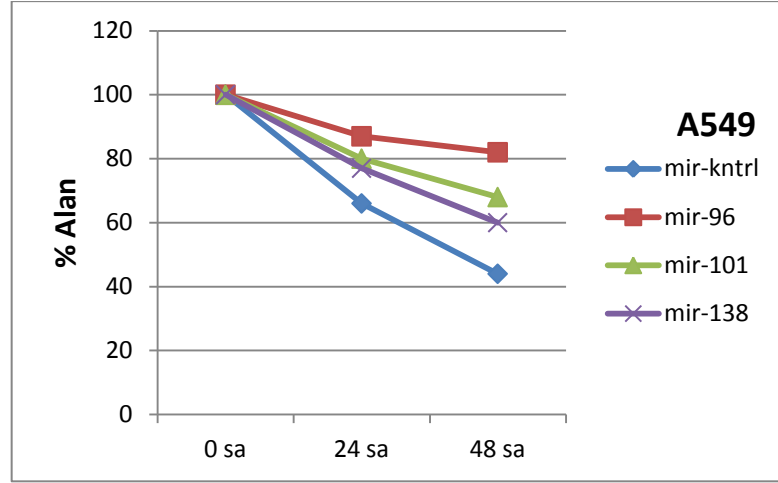
Şekil 4.23. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 hücre hattında yumuşak agar 3-boyutlu koloni oluşturma üzerine etkileri. (A) Kolonilerin 4X büyütme ile çekilen fotoğrafları görülmektedir. (B) Koloni sayısında meydana gelen değişimler (p değerleri sırasıyla 0,04, 0,042 ve 0,023 hesaplanmış olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.)

4.11. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 Hücre Hattında Oris Hücre Göçü Üzerine Etkileri

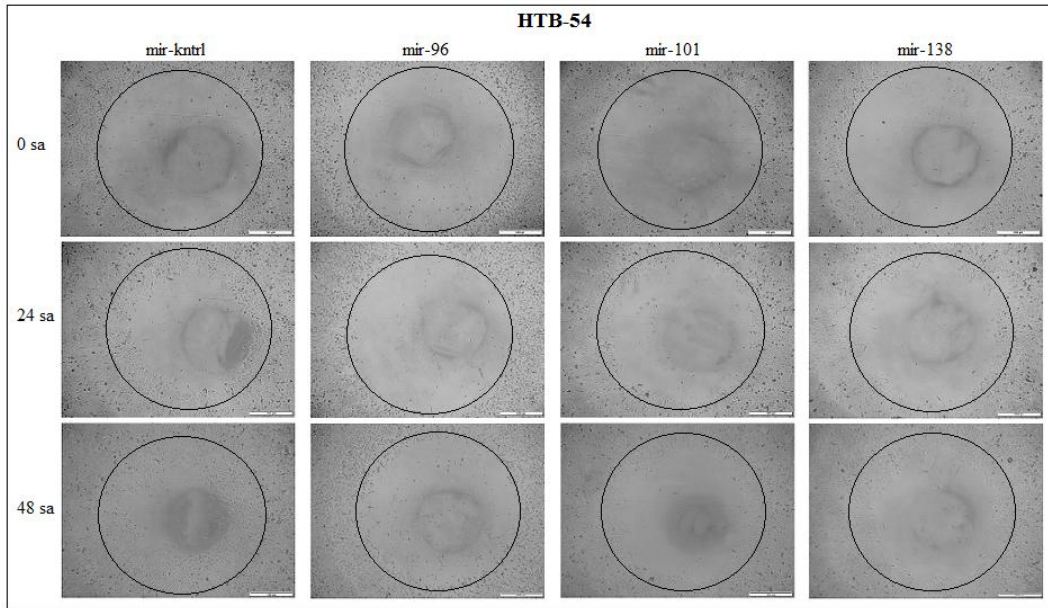
A549 ve HTB-54 hücre hatlarına miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p transfekte edilmiş ve bariyerli Oris hücre göçü plate kuyularına 3×10^5 hücre ekilmiştir. 24 ve 48 saat hücrelerin ortadaki alana göçmesi beklenmiş ve mikroskop görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.24 ve 4.26). ImageJ alan hesaplamaları sonucu A549 ve HTB-54 hücre hatlarında miR-96, miR-101 ve miR-138'in hücre göçünü baskıladığı gösterilmiştir (p değerleri sırasıyla A549 hücre hattı için 0,0034, 0,0052 ve 0,02; HTB-54 hücre hattı için 0,008, 0,049 ve 0,0056 olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur). Başlangıçta hücresiz, % 100 boş kabul edilen orta alanın, hücrelerin göçü ile giderek daralması ve kontrole göre bu daralmanın daha az olması, hücre göçünün baskılandığını göstermektedir (Şekil 4.25 ve 4.27). MikroRNA'lar arasında her iki hücre hattında da en yüksek etkiyi gösteren miR-96-5p olmuştur.



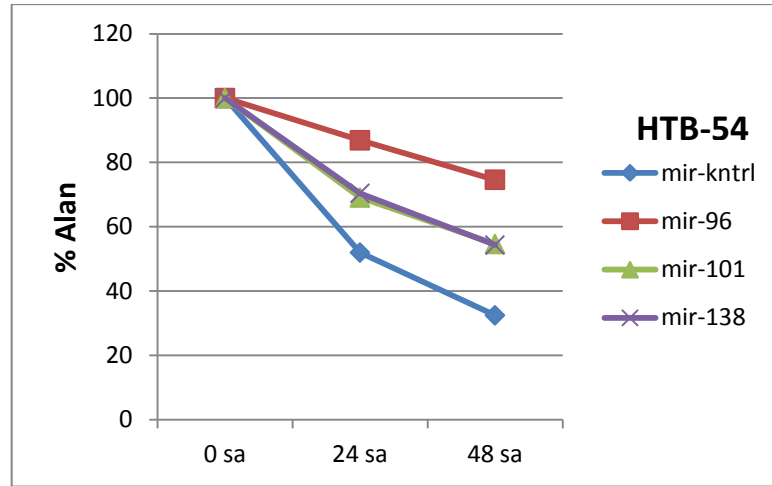
Şekil 4.24. A549 hücre hattında Oris hücre göçü 0, 24 ve 48 saat alan görüntüleri. 4X büyütme ile fotoğraflanmıştır.



Şekil 4.25. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında Oris hücre göçü üzerine etkileri. ImageJ programı kullanılarak ortadaki alanın göç öncesi ve sonrası boyutları hesaplandı. Sonuçlar üçlü tekrarın ortalaması şeklinde verilmiştir. Başlangıçta hücre, % 100 boş kabul edilen orta alanın, hücrelerin göçü ile giderek daralması ve kontrole göre bu daralmanın daha az olması, hücre göçünün baskılandığını göstermektedir. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p için p değerleri sırasıyla 0,0034, 0,0052 ve 0,02 hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.26. HTB-54 hücre hattında Oris hücre göçü 0, 24 ve 48 saat alan görüntüleri. 4X büyütme ile fotoğraflanmıştır.



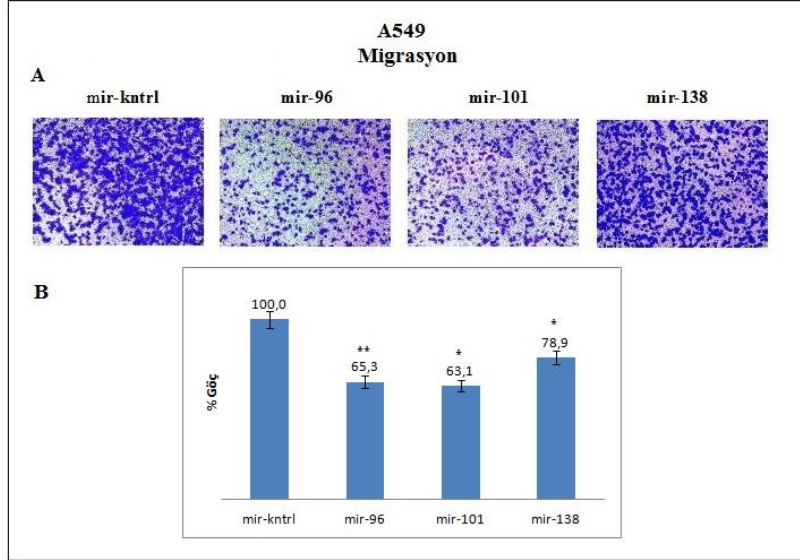
Şekil 4.27. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 hücre hattında Oris hücre göçü üzerine etkileri. ImageJ programı kullanılarak ortadaki alanın göç öncesi ve sonrası boyutları hesaplandı. Sonuçlar üçlü tekrarın ortalaması şeklinde verilmiştir. Başlangıçta hücre, % 100 boş kabul edilen orta alanın, hücrelerin göçü ile giderek daralması ve kontrole göre bu daralmanın daha az olması, hücre göçünün baskılandığını göstermektedir. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p için p değerleri sırasıyla 0,008, 0,049 ve 0,0056 hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.12. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin Boyden Chamber Hücre Göçü Üzerine Etkileri

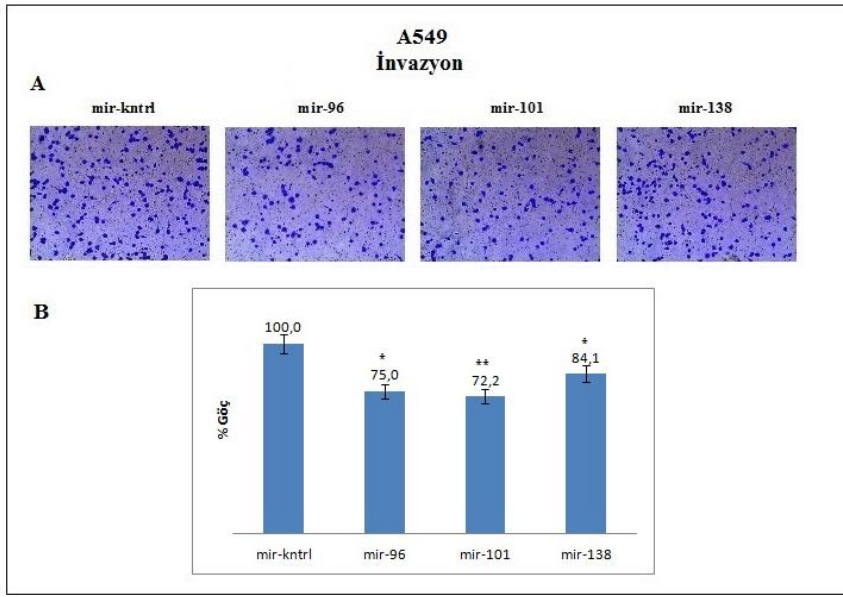
miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin, hücre göçüne etkilerini araştırmak için Boyden Chamber yöntemi ile Yara İyileşme Metodu (Wound Healing Assay) kullanılmıştır. Boyden Chamber Yöntemi'nde mimik transfeksiyonu yapılan hücreler, gözenekli bir zar ile kapatılmış insertlere ekilmiştir. Göç yeteneği fazla olan hücreler 24 saat içinde porlu zar yapısını aşarak alta tarafa geçmiş, geçemeyen hücreler ise uzaklaştırılmıştır. Alta geçmiş olan hücreler önce boyanarak görüntülenmiş, daha sonra hücrelerden boya ekstrakte edilerek, yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Boyanın yoğunluğu hücre sayısı ile doğru orantılı olduğundan, göç eden hücre yoğunluğunu gruplar arası kıyaslamak mümkün olmuştur.

A549 hücre hattına miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p transfekte edilmiş, metastaz için matrigelsiz, invazyon için matrigel kaplı insertlere ekim yapılmış ve 24 saat sonra hücre göçüne olan etkilerine bakılmıştır. A549 ve HTB-54 hücre hatlarında miR-96, miR-101 ve miR-138'in metastaz ve invazyonu baskıladığı gösterilmiştir (Şekil 4.28 - 4.31). Sonuçlar üçlü tekrarın ortalaması şeklinde verilmiştir. Migrasyon analizi için p

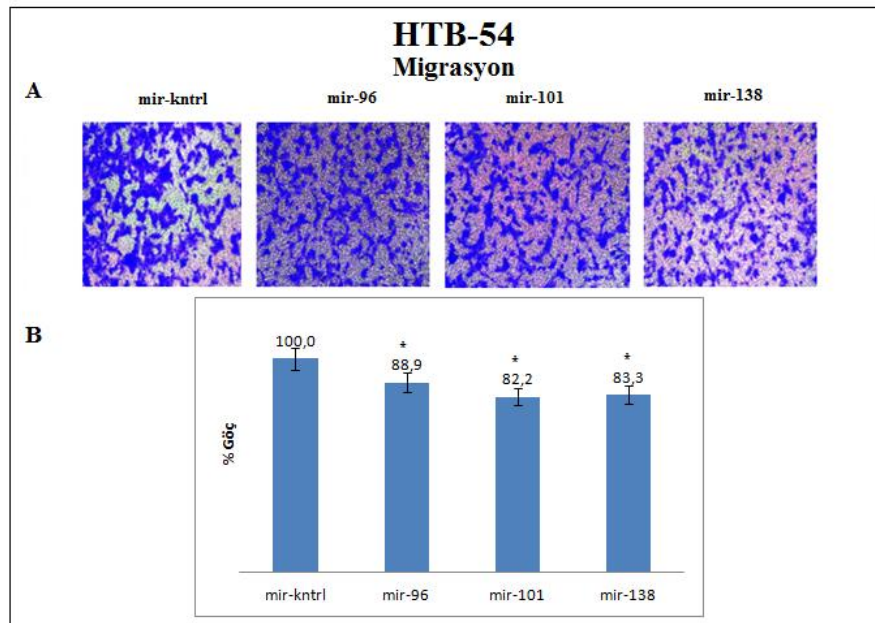
değerleri sırasıyla A549 hücre hattı için 0,0072, 0,031 ve 0,04; HTB-54 hücre hattı için 0,041, 0,024 ve 0,034 olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmiştir. İnvazyon analizi için p değerleri sırasıyla A549 hücre hattı için 0,023, 0,002 ve 0,016; HTB-54 hücre hattı için 0,039, 0,023 ve 0,027 olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmiştir.



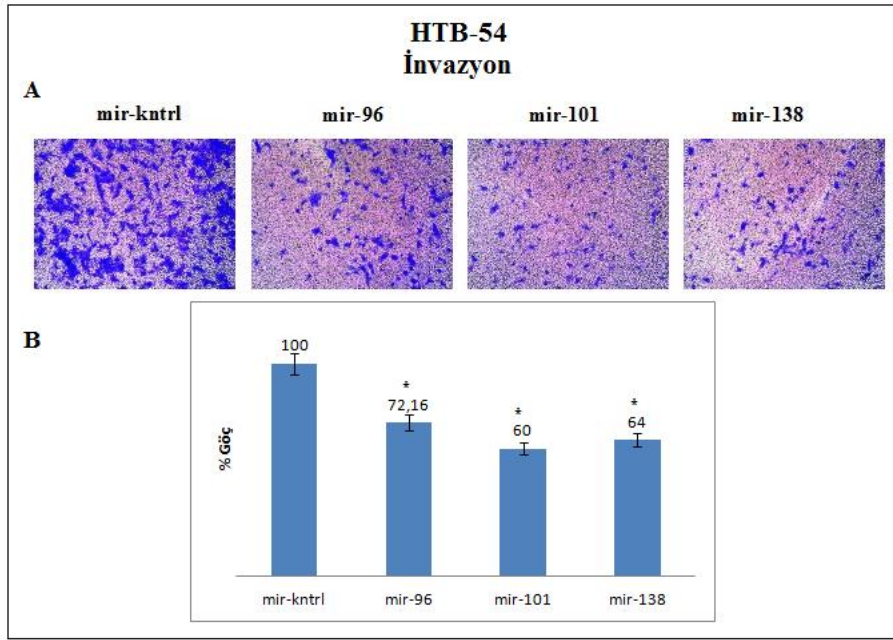
Şekil 4.28. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 Hücre Hattında Migrasyona Etkileri. (A) Göç eden hücrelerin 10X büyütme ile çekilen fotoğrafları görülmektedir. (B) Göç eden hücre yüzdeleri (p değerleri sırasıyla 0,0072, 0,031 ve 0,04 hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmiştir.)



Şekil 4.29. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 Hücre Hattında İnvazyona Etkileri. (p değerleri sırasıyla 0,023, 0,002 ve 0,016 hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmiştir.)



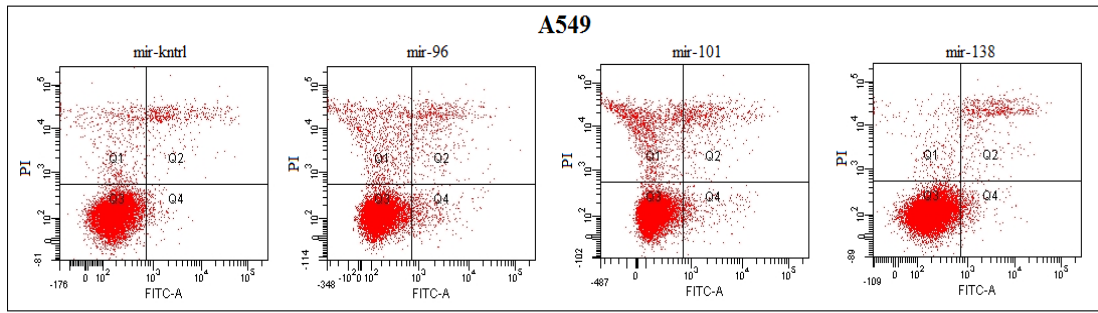
Şekil 4.30. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 Hücre Hattında Migrasyona Etkileri. (p değerleri sırasıyla 0,041, 0,024 ve 0,034 hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmiştir.)



Şekil 4.31. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 Hücre Hattında İnvazyona Etkileri. (p değerleri sırasıyla 0,039, 0,023 ve 0,027 hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmiştir.)

4.13. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 ve HTB-54 Hücre Hatlarında Apoptozis Üzerine Etkileri

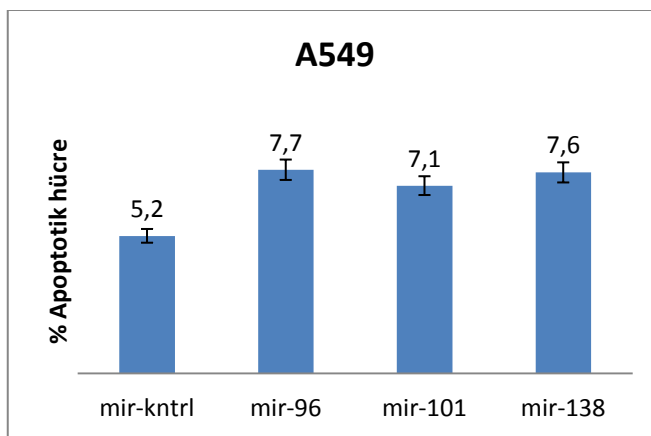
miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (Şekil 4.32 ve 4.33). Bu uyarılma çok belirgin bir artış şeklinde olmasa da sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0,041, 0,049 ve 0,03). HTB-54 hücre hattında ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (p değerleri sırasıyla 0,12, 0,065 ve 0,087) (Şekil 4.34 ve 4.35). Canlı hücre yüzdesine bakıldığında (Tablo 4.1 ve 4.2), miR-96-5p'nin her iki hücre hattında da canlı hücre yüzdesinde azalmaya neden olduğu görülmektedir. Bu azalmanın sebebi sadece apoptotik hücre sayısındaki artıştan değil, nekrotik hücre ölümlerinden de kaynaklanmaktadır. MiR-101-3p, sadece A549 hücre hattında canlı hücre yüzdesinde azalmaya sebep olurken, miR-138-5p iki hücre hattında da canlılık yüzdesini etkilememiştir.



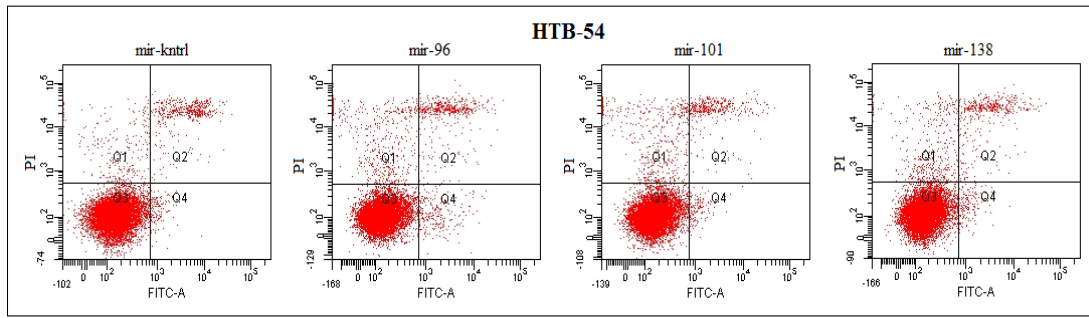
Şekil 4.32. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında apoptozis üzerine etkileri. FITC Annexin V için pozitif ve PI için negatif olan hücreler apoptotik hücrelerdir (Q4). Hem FITC Annexin V hem de PI için pozitif olan hücreler apoptozun son aşamasındadır (Q2). Hem FITC Annexin V hem de PI için negatif olan hücreler canlıdır ve ölçülebilir apoptozisten bahsedilmez (Q3). FITC Annexin V için negatif, PI için pozitif olan hücreler nekrotik hücrelerdir (Q1).

Tablo 4.1. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında apoptotik ve apoptotik olmayan hücre yüzdeleri

%	kntrl-miR	miR-96	miR-101	miR-138
Q1	4,8	7,5	11,2	2,4
Q2	3,9	4,6	4,6	4,9
Q3	75,5	63,2	62,1	75,4
Q4	1,3	3,1	2,5	2,7
Q2+Q4	5,2	7,7	7,1	7,6



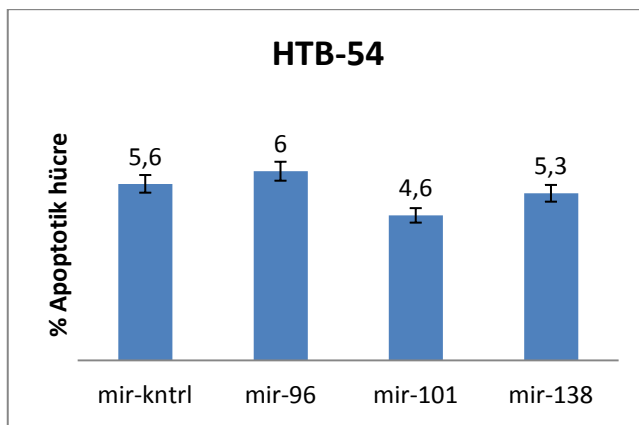
Şekil 4.33. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında apoptotik hücre yüzdelere etkileri. (p değerleri sırasıyla 0,041, 0,048 ve 0,03)



Şekil 4.34. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 hücre hattında apoptozis üzerine etkileri. FITC Annexin V için pozitif ve PI için negatif olan hücreler apoptotik hücrelerdir (Q4). Hem FITC Annexin V hem de PI için pozitif olan hücreler apoptozun son aşamasındadır (Q2). Hem FITC Annexin V hem de PI için negatif olan hücreler canlıdır ve ölçülebilir apoptozisten bahsedilmez (Q3). FITC Annexin V için negatif, PI için pozitif olan hücreler nekrotik hücrelerdir (Q1).

Tablo 4.2. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin HTB-54 hücre hattında apoptotik ve apoptotik olmayan hücre yüzdeleri

%	kntrl-miR	miR-96	miR-101	miR-138
Q1	2,3	4,5	4,4	3,8
Q2	4,4	4	3,4	3,9
Q3	82,9	78,1	82	82,3
Q4	1,2	2	1,2	1,4
Q2+Q4	5,6	6	4,6	5,3



Şekil 4.35. miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin A549 hücre hattında apoptotik hücre yüzdelerine etkileri. (p değerleri sırasıyla 0,12, 0,065 ve 0,087)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Otofajinin hem hücre sağkalımı hem de hücre ölümü ile ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur ve bu yüzden otofajinin kanser hücre ölümüne katkısı da tartışmalıdır (108). Kemoterapi, radyoterapi ve hedefe yönelik tedaviler dahil olmak üzere birçok anti-kanser tedavinin otofajiyi indüklediği gösterilmiştir (109-111). Bu anti-kanser tedavilere yanıt olarak, hücreyi strese bağlı hasarlardan korumak için otofaji aktive edilir. Böylece otofaji, kanser hücrelerinde ilaç direncinin artmasına katkı sağlayan bir mekanizma olarak karşımıza çıkar (112-113). Bu yüzden kanser tedavi sürecinde otofajinin hedeflenmesi, yeni bir strateji olarak sunulmakta ve bu yaklaşımı esas alan klinik çalışmalar yapılmaktadır (95). Otofajinin baskılanması, kanser hücrelerini kemoterapiye ve radyoterapiye karşı daha duyarlı hale getirmiştir (112, 114). Yukarıda bahsedilen veriler, özellikle miRNA'lara dayanan otofaji inhibisyonu ve kemoterapi kombinasyonunun, kanser tedavisi için etkili bir yaklaşım olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

MikroRNA'lar, transkripsiyonel düzeyde veya transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen, küçük, protein kodlamayan RNA'lardır. MiRNA'ların otofaji dahil birçok hücresel süreci düzenlediği ve kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilendirildiği bulunmuştur (115-116). Son yıllarda miRNA'lara dayalı otofaji inhibisyonunu hedefleyen tedavi stratejileri geliştirilmeye başlanmıştır (96, 117). MiR-502'nin kolon kanseri, miR-375'in hepatoselüler karsinom (HCC) hücrelerinde otofaji ve hücre proliferasyonunu baskılayabildiği gösterilmiştir (118-119). Ayrıca miRNA'lar tarafından otofajinin düzenlenmesinin, ilaç dirençliliğini tersine çevirdiği ve kanser hücrelerini kemoterapiye karşı hassaslaştırdığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (120). Örneğin miR-30a'nın Beclin-1'i hedefleyerek otofajiyi inhibe ettiği ve bu inhibisyonun sonucunda, kronik myeloid lösemi (KML) hücrelerinde imatinibin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (98). Yine miR-30a'nın Beclin-1'i hedefleyerek otofajiyi inhibe ettiği ve farklı kanserlerde cisplatin duyarlılığını arttırdığı hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (121). Diğer bir örnek olarak miR-101 verilebilir. MiR-101, otofajiyi inhibe ederek meme kanseri hücrelerinin tamoksifene, HCC hücrelerinin ise doksorubisin ve fluorourasile duyarlılığını arttırmıştır (122-123). Otofajinin miRNA'lar tarafından düzenlenmesi sadece

kemoterapi direncinin değil, radyoterapi direncinin de kırılmasını sağlamıştır. MiR-23b, otofaji genlerinden ATG12'yi hedefleyerek otofajiyi baskılamış ve pankreatik kanser hücrelerini radyoterapiye karşı daha duyarlı hale getirmiştir (124). miRNA'lar tarafından otofajinin düzenlenmesi genelde baskılanma şeklinde olsa da uyarılma yoluyla da kanser hücrelerinin tedaviye karşı daha hassas hale getirildiği durumlar bulunmaktadır. Örneğin otofagozom oluşumunda önemli bir rolü olan ATG7, miR-17'nin hedefidir. MiR-17 inhibitörü; anti-miR-17'nin kullanılarak ATG7'nin ve dolayısıyla otofajinin baskılanması önlenmiştir. Sonuç olarak glioblastoma hücreleri radyoterapi ve temozolomid tedavisine karşı daha hassas hale gelmişlerdir (125).

Kanser tedavisinde miRNA'ların aracılık ettiği otofajinin rolü tartışmalıdır. Otofajinin baskılanması mı yoksa uyarılması mı gerektiği tümör tipine, evresine ve tümör mikroçevresine göre karar verilmelidir. Bu yüzden bu tez çalışmasında miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin akciğer kanserinde otofajiyi nasıl düzenledikleri ve bunun sonucunda kanser hücrelerinin sağkalımı, proliferasyonu ve hücre göçü gibi özelliklerin nasıl etkileneceğinin araştırılması amaçlandı. Sonuç olarak çalışma kapsamında analiz edilmiş olan miRNA'ların (miR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p) otofaji üzerinde baskılayıcı rollerinin olduğu, ayrıca bu miRNA'ların tümör baskılayıcı etkiye sahip oldukları ve hücre göçünü baskıladıkları gösterilmiştir.

MiR-96-5p daha önceki çalışmalarda pek çok kanserle ilişkili bulunmuştur. Örneğin miR-96-5p'nin ekspresyon seviyesi, meme, kolorektal, prostat ve mesane kanserlerinde normal dokuya kıyasla yüksek bulunmuş ve onkogenik miRNA olarak tanımlanmıştır (126-129). Ayrıca miR-96-5p'nin artmış ekspresyonun, meme ve prostat kanserinde hücre proliferasyonunu arttırdığı, meme kanserinde ayrıca hücre göçünü tetiklediği fonksiyonel analizlerle gösterilmiştir (127, 130). Diğer taraftan, böbrek kanseri ve osteosarkomlarda miR-96-5p'nin hücre göçünü baskıladığı gösterilmiş, tümör baskılayıcı olarak bildirilmiştir (131-132). Bizim çalışmamızda küçük hücre dışı akciğer kanseri ve küçük hücre dışı epidermoid kanseri hücre hatlarında, normal akciğer hücre hattına kıyasla miR-96-5p'nin ekspresyon seviyesinde artış saptanmıştır. Ayrıca miR-96-5p'nin mimik transfeksiyonu ile ekspresyonu arttırıldığında otofajiyi inhibe ettiği gösterilmiş, buna ek olarak azalan hücre göçü ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu tez planlandığında miR-96-5p'nin akciğer kanserindeki rolünü gösteren bir çalışma mevcut değildi fakat tez deneylerinin yürütüldüğü sırada Fei ve grubu tarafından miR-96-

5p'nin, bizim bulgularımızın aksine akciğer kanserinde hücre göçü ve proliferasyonu teşvik ettiği gösterildi (133). Farklı kanserler farklı genetik altyapılara sahip olduğundan aynı miRNA'nın değişik etkiler göstermesi anlaşılabilir fakat aynı hücre hattı için farklı sonuçlar bulmak düşündürücüdür. Bizim çalışmamızda Fei ve grubundan farklı olarak gözlenen etkinin doza bağımlı olduğunu düşünmekteyiz. Bu grubun çalışmasında vektör aracılı mimik transfeksiyonu yapılmıştır ve transfeksiyondan sonra miR-96-5p ekspresyonu 2,5 kat artmıştır (133). Ancak bizim çalışmamızda ticari olarak satılan sentetik diziler kullanılmıştır ve sonuç olarak kat değişimi çok daha fazla olmuştur. Bir diğer neden de hücrelerin pasaj sayıları olabilir. Artan pasaj sayısının, zaman içinde hücre morfolojisi, uyaranlara yanıt, büyüme hızı, protein ekspresyonu ve transfeksiyon etkinliği gibi hücresel özellikleri değiştirdiği bilinmektedir (134-137). Bu tez çalışmasında 25. pasajı geçmemiş hücreler kullanılmıştır.

Meme kanserinde yapılan bir çalışmada miR-96-5p'nin FOXO1 genini baskılayarak otofajiyi inhibe ettiği gösterilmiştir fakat akciğer kanserinde miR-96-5p'nin otofajiyi nasıl etkilediğini bizim dışımızda gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında otofajinin inhibe edilmesinin sebebi olarak, otofaji genlerinden ATG9A'nın baskılanması önerilmektedir. MiR-96-5p transfeksiyonu sonrası ATG9A'nın protein seviyesinde azalma olmuştur. ATG9A, öncül otofagozomal yapının oluşmasında ve çekirdeklenme bölgesinin organizasyonunda önemli bir rol oynar. Bu yüzden ATG9A'nın azalması, otofajinin neden inhibe olduğunu açıklayabilir. Bunun yanı sıra ATG9A'nın, direkt olarak miR-96-5p tarafından hedeflendiğinin gösterilebilmesi için, luciferase reporter assay yapılmalıdır.

MikroRNA-101, tümör baskılayıcı olarak tanımlanmaktadır. Çalışmamızda küçük hücre dışı akciğer kanseri ve küçük hücre dışı epidermoid kanseri hücre hatlarında, normal akciğer hücre hattına kıyasla miR-101-3p'nin ekspresyon seviyesinin azalmış olduğu saptandı. Benzer olarak Le Han ve ark. yaptığı bir çalışmada da küçük hücre dışı akciğer kanser dokularında ve hücre hatlarında düşük düzeyde eksprese olduğu bildirilmiştir. Yüksek miR-101 düzeylerine sahip KHDAK hastaları, düşük miR-101 ekspresyonuna sahip olanlardan daha uzun bir sağkalım sergilemişlerdir (138). Bu da miR-101'in KHDAK'de prognostik önemini göstermektedir. Birkaç çalışma, miR-101'in, farklı kanserlerde birçok geni hedef alarak tümör gelişimini ve hücre göçünü inhibe ettiğini ortaya koymuştur (138-140). Çalışmamızda her iki akciğer kanseri hücre

hattında da miR-101 otofajiyi baskılamış, hücre proliferasyonu ve hücre göçünü azaltmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada miR-101'in otofajiyi baskılama mekanizmasının aydınlatılması amacıyla olası hedefler taranmış ve RAB5A ve ATG4D'yi baskıladığı gösterilmiştir (122). Bu iki genin de otofagozom oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada da miR-101 transfeksiyonu sonrası ATG4D seviyesinde azalma bulunmuştur. ATG4D, otofagozom oluşumunda kritik düzenleyici rolleri olan ATG4 endopeptidaz ailesine aittir. Bu proteazlar, yeni sentezlenen LC3 proteinlerinin C-ucunu, fosfatidiletanolamin (PE) ile kovalent bağlanması için gerekli olan bir glisin kalıntısını ortaya çıkarmak için keserler ve daha sonra, aynı enzimler, otofagozom-lizozom füzyonu ve LC3 geri dönüşümünü kolaylaştırmak için dış zara bağlı LC3'den PE'yi keserler (141).

MiR-101'in akciğer kanseri hücre hatları ve dokularında düşük eksprese olması, hedef genlerinin ekspresyonlarında artışa ve bunun sonucunda da otofajinin yüksek düzeyde aktif kalmasına katkı sağlıyor olabilir. Böylece kanser hücrelerinin metabolik stres ile başa çıkmalarını ve tedaviyi takiben tümörün yeniden büyümesini teşvik etmelerini sağlayarak uzun süreli tümör hücresi sağkalımını mümkün kılıyor olabilir. Nitekim miR-101'in KHDAK'de prognostik önemini gösteren çalışmada, yüksek miR-101 düzeylerine sahip KHDAK hastaları, düşük miR-101 ekspresyonuna sahip olanlardan daha uzun bir sağkalım sergilemişlerdir (138). Meme kanserinde yapılan bir çalışmaya göre miR-101 otofajiyi baskılamış ve hücreleri tamoxifene karşı daha duyarlı hale getirmiştir. Bu bize, miR101'in sadece prognostik bir belirteç olarak değil, tedavi etkinliğini arttırmaya yönelik potansiyelinin de olduğunu göstermektedir.

MiR-138 ile ilgili çalışmalar, miR-138'ün ekspresyon seviyesinin birçok kanser türünde düşük olduğunu ve miR-138'in tümör gelişimini önleyebildiğini göstermiştir. Örneğin, Xiao ve arkadaşları miR-138'in, YAP1 geninin ekspresyonunu hedefleyip düzenleyebildiğini ve böylece akciğer kanseri hücrelerinin invazyonunu ve metastazını inhibe edebileceğini belirtmişlerdir (142). Sun ve arkadaşları, miR-138'ün, mesane kanserinde epitelden mezenkimale geçişi (EMT) azaltarak, tümör hücre metastazını inhibe ettiğini bulmuşlardır (143). Bir başka grup ise küçük hücre dışı akciğer kanserinde (KHDAK) miR-138'ün yine EMT'yi baskılayarak, tümör hücrelerinin kemoterapiye direncini düzenleyebileceğini bildirmiştir (144). Ayrıca aynı kanser

tipinde miR138'in LIMK1'i hedefleyerek hücre göçünü ve invazyonu baskıladığını gösteren bir çalışma da mevcuttur (145).

Bu çalışmalar bize miR-138'in tümör gelişiminde inhibitör olarak rol aldığını göstermektedir. Bu tez çalışmasına başlandığında miR-138'in akciğer kanserinde otofajiyi nasıl etkilediğini gösteren bir çalışma mevcut değildi fakat tez çalışmalarının yürütüldüğü sırada bir grup tarafından proliferasyon ve hücre göçünün yanısıra, otofajinin de miR-138 tarafından baskılandığı gösterildi (146). Bu sonuçlar, tez çalışmasının sonuçları ile tutarlı görünmekte ve miR-138'in tümör baskılayıcı bir gen olarak davrandığını desteklemektedir. Bu grup ayrıca miR-138'in KHDAK hücre hatları ve dokularındaki düşük ekspresyonunu, tümör farklılaşması ve lenf nodu metastazları açısından negatif olarak ilişkilendirmiştir. MiR-138'in Sirt1 ekspresyonunu azaltarak epitelden mezenkimala geçişi inhibe ettiğini, AMPK-mTOR'u inaktive ederek otofajiyi baskıladığını göstermişlerdir.

MiR-138'in otofajiyi hangi genler aracılığıyla baskıladığının gösterilmesi için biyoinformatik araçlarla hedeflediği genler saptanmış, bunlardan ATG4D seçilmiş, ancak ATG4D'nin mRNA ve protein seviyesinde anlamlı farklılık bulunmamıştır. Otofaji yolağının hangi mekanizmalar üzerinden baskılandığının gösterilebilmesi için otofaji yolağında görev alan ve miR-138'in hedefi olabilecek diğer adaylar seçilip çalışılmalıdır.

Sonuç olarak, küçük hücre dışı akciğer kanserinde (KHDAK), miR-101 ve miR-138'in azalmış ekspresyon seviyeleri, tümör nüksüne ve metastaza yol açan moleküler mekanizmalardan biri olabilir. MiR-96-5p, miR-101-3p ve miR-138-5p'nin ekspresyon seviyelerindeki artışın, proliferasyon ve hücre göçünü baskılaması da göz önüne alındığında, akciğer kanseri tedavisi için potansiyel birer aday olarak kullanılabileceklerini söyleyebiliriz.

6. KAYNAKLAR

1. Xue, Y., et al., Evolution from genetics to phenotype: reinterpretation of NSCLC plasticity, heterogeneity, and drug resistance. *Protein & cell*, 2017. 8(3): p. 178-190.
2. Klionsky, D.J., Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007. 8(11): p. 931.
3. Ravikumar, B., et al., Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 2010. 90(4): p. 1383-1435.
4. Shintani, T. and D.J. Klionsky, Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004. 306(5698): p. 990-995.
5. White, E. and R.S. DiPaola, The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clinical cancer research*, 2009. 15(17): p. 5308-5316.
6. Li, Y. and K.V. Kowdley, MicroRNAs in common human diseases. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 2012. 10(5): p. 246-253.
7. Inamura, K. and Y. Ishikawa, MicroRNA in lung cancer: novel biomarkers and potential tools for treatment. *Journal of clinical medicine*, 2016. 5(3): p. 36.
8. Rupaimoole, R. and F.J. Slack, MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 2017. 16(3): p. 203.
9. Chakraborty, C., et al., Therapeutic miRNA and siRNA: moving from bench to clinic as next generation medicine. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2017. 8: p. 132-143.
10. Torre, L.A., et al., Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2015. 65(2): p. 87-108.
11. Nowell, P.C., The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 1976. 194(4260): p. 23-28.
12. MacConaill, L.E., Existing and emerging technologies for tumor genomic profiling. *Journal of Clinical Oncology*, 2013. 31(15): p. 1815.
13. Paez, J.G., et al., EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 2004. 304(5676): p. 1497-1500.
14. Campbell, J.D., et al., Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nature genetics*, 2016. 48(6): p. 607.
15. Li, S., et al., Comprehensive characterization of oncogenic drivers in Asian lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 2016. 11(12): p. 2129-2140.
16. Mitsudomi, T. and Y. Yatabe, Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *The FEBS journal*, 2010. 277(2): p. 301-308.
17. Ji, H., et al., The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer cell*, 2006. 9(6): p. 485-495.
18. Rikova, K., et al., Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*, 2007. 131(6): p. 1190-1203.
19. Soda, M., et al., Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 2007. 448(7153): p. 561.
20. Awad, M.M. and A.T. Shaw, ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: crizotinib and beyond. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O*, 2014. 12(7): p. 429.

21. Shaw, A.T., et al., Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *Journal of Clinical Oncology*, 2009. 27(26): p. 4247.
22. Sholl, L., Molecular diagnostics of lung cancer in the clinic. *Translational lung cancer research*, 2017. 6(5): p. 560.
23. Niederst, M.J., et al., RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nature communications*, 2015. 6: p. 6377.
24. Oser, M.G., et al., Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *The Lancet Oncology*, 2015. 16(4): p. e165-e172.
25. Shaw, A.T., et al., Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 2013. 368(25): p. 2385-2394.
26. Sequist, L.V., et al., Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science translational medicine*, 2011. 3(75): p. 75ra26-75ra26.
27. Awad, M.M., et al., Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *New England Journal of Medicine*, 2013. 368(25): p. 2395-2401.
28. Drilon, A., et al., A novel crizotinib-resistant solvent-front mutation responsive to cabozantinib therapy in a patient with ROS1-rearranged lung cancer. *Clinical cancer research*, 2016. 22(10): p. 2351-2358.
29. Ktistakis, N.T., In praise of M. Anselmier who first used the term “autophagie” in 1859. 2017, Taylor & Francis.
30. Parzych, K.R., et al., A newly characterized vacuolar serine carboxypeptidase, Atg42/Ybr139w, is required for normal vacuole function and the terminal steps of autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 2018. 29(9): p. 1089-1099.
31. Mizushima, N., A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nature cell biology*, 2018: p. 1.
32. Zhi, X. and Q. Zhong, Autophagy in cancer. *F1000prime reports*, 2015. 7.
33. Kuma, A., et al., The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 2004. 432(7020): p. 1032-1036.
34. Jiang, P. and N. Mizushima, Autophagy and human diseases. *Cell research*, 2014. 24(1): p. 69.
35. Evangelisti, C., et al., Autophagy in acute leukemias: a double-edged sword with important therapeutic implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2015. 1853(1): p. 14-26.
36. Levine, B., N. Mizushima, and H.W. Virgin, Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 2011. 469(7330): p. 323.
37. Nixon, R.A., The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 2013. 19(8): p. 983.
38. Santana-Codina, N., J.D. Mancias, and A.C. Kimmelman, The role of autophagy in cancer. 2017.
39. Ravikumar, B., et al., Mammalian macroautophagy at a glance. *Journal of cell science*, 2009. 122(11): p. 1707-1711.
40. Li, W.-w., J. Li, and J.-k. Bao, Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012. 69(7): p. 1125-1136.
41. Kaushik, S. and A.M. Cuervo, The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2018: p. 1.

42. Youle, R.J. and D.P. Narendra, Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2011. 12(1): p. 9.
43. Bauckman, K.A., N. Owusu-Boaitey, and I.U. Mysorekar, Selective autophagy: xenophagy. *Methods*, 2015. 75: p. 120-127.
44. Zaffagnini, G. and S. Martens, Mechanisms of selective autophagy. *Journal of molecular biology*, 2016. 428(9): p. 1714-1724.
45. Rabanal-Ruiz, Y., E.G. Otten, and V.I. Korolchuk, mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays in biochemistry*, 2017. 61(6): p. 565-584.
46. Mizushima, N., Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell structure and function*, 2002. 27(6): p. 421-429.
47. Randall-Demllo, S., M. Chieppa, and R.D. ERI, Intestinal epithelium and autophagy: partners in gut homeostasis. *Frontiers in immunology*, 2013. 4: p. 301.
48. Catena, V. and M. Fanciulli, Deptor: not only a mTOR inhibitor. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2017. 36(1): p. 12.
49. Mizushima, N., Autophagy: process and function. *Genes & development*, 2007. 21(22): p. 2861-2873.
50. Feng, Y., et al., The machinery of macroautophagy. *Cell research*, 2014. 24(1): p. 24.
51. Tooze, S.A. and T. Yoshimori, The origin of the autophagosomal membrane. *Nature cell biology*, 2010. 12(9): p. 831.
52. LIANG, Z.q., Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005. 26(12): p. 1421-1434.
53. Mizushima, N., et al., A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 1998. 395(6700): p. 395.
54. Kabeya, Y., et al., LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal*, 2000. 19(21): p. 5720-5728.
55. Klionsky, D.J., et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 2016. 12(1): p. 1-222.
56. Suzuki, K., et al., The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO journal*, 2001. 20(21): p. 5971-5981.
57. Eskelinen, E.-L., Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular aspects of medicine*, 2006. 27(5-6): p. 495-502.
58. Feng, Y. and D.J. Klionsky, Autophagic membrane delivery through ATG9. *Cell research*, 2017. 27(2): p. 161.
59. Ge, L., et al., The ER–Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *Elife*, 2013. 2: p. e00947.
60. Geng, J., et al., Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 2010. 21(13): p. 2257-2269.
61. Hamasaki, M., et al., Autophagosomes form at ER–mitochondria contact sites. *Nature*, 2013. 495(7441): p. 389.
62. Zhou, C., et al., Regulation of mATG9 trafficking by Src-and ULK1-mediated phosphorylation in basal and starvation-induced autophagy. *Cell research*, 2017. 27(2): p. 184.

63. Yamada, T., et al., Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(18): p. 18283-18290.
64. Fish, J.E., et al., Hypoxia-inducible expression of a natural cis-antisense transcript inhibits endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. 282(21): p. 15652-15666.
65. Maruyama, T. and N.N. Noda, Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *The Journal of antibiotics*, 2018. 71(1): p. 72.
66. Yu, Z.-Q., et al., Dual roles of Atg8– PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy*, 2012. 8(6): p. 883-892.
67. Zhang, L., et al., Unraveling the roles of Atg4 proteases from autophagy modulation to targeted cancer therapy. *Cancer letters*, 2016. 373(1): p. 19-26.
68. Lin, L. and E.H. Baehrecke, Autophagy, cell death, and cancer. *Molecular & cellular oncology*, 2015. 2(3): p. e985913.
69. Liang, X.H., et al., Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer research*, 2001. 61(8): p. 3443-3449.
70. Takahashi, Y., et al., Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature cell biology*, 2007. 9(10): p. 1142-1151.
71. Chen, S., et al., Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2010. 1806(2): p. 220-229.
72. Kaminsky, V.O., et al., Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and-independent apoptosis by stimulating ROS formation. *Autophagy*, 2012. 8(7): p. 1032-1044.
73. Maycotte, P. and A. Thorburn, Targeting autophagy in breast cancer. *World journal of clinical oncology*, 2014. 5(3): p. 224.
74. Takamura, A., et al., Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & development*, 2011. 25(8): p. 795-800.
75. Hjelmeland, A. and J. Zhang, Metabolic, autophagic, and mitophagic activities in cancer initiation and progression. *Biomedical Journal*, 2016.
76. Huntzinger, E. and E. Izauralde, Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 2011. 12(2): p. 99.
77. Bartel, D.P., MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009. 136(2): p. 215-233.
78. Pasquinelli, A.E., MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*, 2012. 13(4): p. 271.
79. Bartel, D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004. 116(2): p. 281-297.
80. Borchert, G.M., W. Lanier, and B.L. Davidson, RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2006. 13(12): p. 1097.
81. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 2010. 11(9): p. 597.
82. Coyle, K.M., J.E. Boudreau, and P. Marcato, Genetic mutations and epigenetic modifications: driving cancer and informing precision medicine. *BioMed research international*, 2017. 2017.

83. Iorio, M.V. and C.M. Croce, MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine*, 2012. 4(3): p. 143-159.
84. Melo, S.A. and M. Esteller, Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS letters*, 2011. 585(13): p. 2087-2099.
85. Palanichamy, J.K. and D.S. Rao, miRNA dysregulation in cancer: towards a mechanistic understanding. *Frontiers in genetics*, 2014. 5: p. 54.
86. Calin, G.A., et al., Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. 101(9): p. 2999-3004.
87. Martin, T.A., et al., Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective. 2013.
88. Ma, L., MicroRNA and metastasis, in *Advances in cancer research*. 2016, Elsevier. p. 165-207.
89. Castro, D., et al., MicroRNAs in lung cancer. *Oncotarget*, 2017. 8(46): p. 81679.
90. Lorin, S., et al. Autophagy regulation and its role in cancer. in *Seminars in cancer biology*. 2013: Elsevier.
91. Gozuacik, D., et al., Autophagy-regulating microRNAs and cancer. *Frontiers in oncology*, 2017. 7: p. 65.
92. Zhu, H., et al., Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy*, 2009. 5(6): p. 816-823.
93. Sermersheim, M.A., et al., MicroRNA regulation of autophagy in cardiovascular disease. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 2017. 22: p. 48.
94. Wang, S., et al., The Role of Autophagy and Related MicroRNAs in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2018. 2018.
95. Chude, C.I. and R.K. Amaravadi, Targeting autophagy in cancer: update on clinical trials and novel inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 2017. 18(6): p. 1279.
96. Rothschild, S.I., et al., MicroRNA-106a targets autophagy and enhances sensitivity of lung cancer cells to Src inhibitors. *Lung cancer*, 2017. 107: p. 73-83.
97. Chang, Z., et al., Blocked autophagy by miR-101 enhances osteosarcoma cell chemosensitivity in vitro. *The Scientific World Journal*, 2014. 2014.
98. Yu, Y., et al., Targeting microRNA-30a-mediated autophagy enhances imatinib activity against human chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 2012. 26(8): p. 1752.
99. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*, 2013. 42(D1): p. D68-D73.
100. Alberts, B., et al., Isolating cells and growing them in culture. 2002.
101. Kim, T.K. and J.H. Eberwine, Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010. 397(8): p. 3173-3178.
102. Schefe, J.H., et al., Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C T difference" formula. *Journal of molecular medicine*, 2006. 84(11): p. 901-910.
103. Smith, P.e., et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 1985. 150(1): p. 76-85.

104. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 2005. 11: p. 127-152.
105. Ke, N., et al., The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability, in *Mammalian Cell Viability*. 2011, Springer. p. 33-43.
106. Franken, N.A., et al., Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 2006. 1(5): p. 2315.
107. Borowicz, S., et al., The soft agar colony formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2014(92).
108. Maes, H., et al., Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends in molecular medicine*, 2013. 19(7): p. 428-446.
109. Kim, S., R. Ramakrishnan, and D. Gabrilovich, Impact of Radiation-Induced Autophagy on the Efficacy of Combination Radiation Therapy and Immunotherapy. *International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics*, 2013. 87(2): p. S632.
110. Wang, R., et al., Stelletin B induces G1 arrest, apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer A549 cells via blocking PI3K/Akt/mTOR pathway. *Scientific reports*, 2016. 6: p. 27071.
111. Zhao, Z.Q., et al., Gefitinib induces lung cancer cell autophagy and apoptosis via blockade of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Oncology letters*, 2016. 12(1): p. 63-68.
112. Chen, K. and W. Shi, Autophagy regulates resistance of non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Tumor Biology*, 2016. 37(8): p. 10539-10544.
113. Zhao, Z., et al., CLDN1 Increases Drug Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer by Activating Autophagy via Up-Regulation of ULK1 Phosphorylation. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 2017. 23: p. 2906.
114. Gewirtz, D.A., M.L. Hilliker, and E.N. Wilson, Promotion of autophagy as a mechanism for radiation sensitization of breast tumor cells. *Radiotherapy and Oncology*, 2009. 92(3): p. 323-328.
115. Oznur, B. and G. Devrim, The Crosstalk Between miRNAs and Autophagy in Cancer Progression, in *Recent Trends in Cancer Biology: Spotlight on Signaling Cascades and microRNAs*. 2018, Springer. p. 279-291.
116. Paul, P., et al., Interplay between miRNAs and human diseases. *Journal of cellular physiology*, 2018. 233(3): p. 2007-2018.
117. Jing, Z., et al., Interaction of autophagy with microRNAs and their potential therapeutic implications in human cancers. *Cancer letters*, 2015. 356(2): p. 332-338.
118. Chang, Y., et al., miR-375 inhibits autophagy and reduces viability of hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions. *Gastroenterology*, 2012. 143(1): p. 177-187. e8.
119. Zhai, H., et al., Inhibition of autophagy and tumor growth in colon cancer by miR-502. *Oncogene*, 2013. 32(12): p. 1570.
120. Pan, B., J. Yi, and H. Song, MicroRNA-mediated autophagic signaling networks and cancer chemoresistance. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 2013. 28(8): p. 573-578.
121. Zou, Z., et al., MicroRNA-30a sensitizes tumor cells to cis-platinum via suppressing beclin 1-mediated autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. 287(6): p. 4148-4156.

122. Frankel, L.B., et al., microRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy. *The EMBO journal*, 2011. 30(22): p. 4628-4641.
123. Xu, L., et al., MicroRNA-101 inhibits human hepatocellular carcinoma progression through EZH2 downregulation and increased cytostatic drug sensitivity. *Journal of hepatology*, 2014. 60(3): p. 590-598.
124. Wang, P., et al., MicroRNA 23b regulates autophagy associated with radioresistance of pancreatic cancer cells. *Gastroenterology*, 2013. 145(5): p. 1133-1143. e12.
125. Comincini, S., et al., microRNA-17 regulates the expression of ATG7 and modulates the autophagy process, improving the sensitivity to temozolomide and low-dose ionizing radiation treatments in human glioblastoma cells. *Cancer biology & therapy*, 2013. 14(7): p. 574-586.
126. Guttilla, I.K. and B.A. White, Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. 284(35): p. 23204-23216.
127. Haflidadóttir, B.S., et al., Upregulation of miR-96 enhances cellular proliferation of prostate cancer cells through FOXO1. *PloS one*, 2013. 8(8): p. e72400.
128. Xu, X.M., et al., Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer. *Oncology letters*, 2012. 4(2): p. 339-345.
129. Wu, Z., et al., Upregulation of microRNA-96 and its oncogenic functions by targeting CDKN1A in bladder cancer. *Cancer cell international*, 2015. 15(1): p. 107.
130. Shi, Y., et al., Overexpression of microRNA-96-5p inhibits autophagy and apoptosis and enhances the proliferation, migration and invasiveness of human breast cancer cells. *Oncology letters*, 2017. 13(6): p. 4402-4412.
131. Yao, Q., et al., microRNA-96 acts as a tumor suppressor gene in human osteosarcoma via target regulation of EZRIN. *Life sciences*, 2018. 203: p. 1-11.
132. Yu, N., et al., miR-96 suppresses renal cell carcinoma invasion via downregulation of Ezrin expression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2015. 34(1): p. 107.
133. Fei, X., et al., miR-96 promotes invasion and metastasis by targeting GPC3 in non-small cell lung cancer cells. *Oncology letters*, 2018. 15(6): p. 9081-9086.
134. Briske-Anderson, M.J., J.W. Finley, and S.M. Newman, The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 1997. 214(3): p. 248-257.
135. Chang-Liu, C.-M. and G.E. Woloschak, Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer letters*, 1997. 113(1-2): p. 77-86.
136. Yu, H., T.J. Cook, and P.J. Sinko, Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharmaceutical research*, 1997. 14(6): p. 757-762.
137. Wenger, S.L., et al., Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Bioscience reports*, 2004. 24(6): p. 631-639.
138. Han, L., et al., MiR-101 inhibits the proliferation and metastasis of lung cancer by targeting zinc finger E-box binding homeobox 1. *American journal of translational research*, 2018. 10(4): p. 1172.

139. Li, J.-T., et al., MiRNA-101 inhibits breast cancer growth and metastasis by targeting CX chemokine receptor 7. *Oncotarget*, 2015. 6(31): p. 30818.
140. Zhang, J.-g., et al., MicroRNA-101 exerts tumor-suppressive functions in non-small cell lung cancer through directly targeting enhancer of zeste homolog 2. *Journal of Thoracic Oncology*, 2011. 6(4): p. 671-678.
141. Kaminsky, V. and B. Zhivotovsky, Proteases in autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2012. 1824(1): p. 44-50.
142. Xiao, L., et al., MicroRNA-138 acts as a tumor suppressor in non small cell lung cancer via targeting YAP1. *Oncotarget*, 2016. 7(26): p. 40038.
143. Sun, D.-K., et al., MicroRNA-138 regulates metastatic potential of bladder cancer through ZEB2. *Cellular physiology and biochemistry*, 2015. 37(6): p. 2366-2374.
144. Jin, Z., et al., MicroRNA-138 regulates chemoresistance in human non-small cell lung cancer via epithelial mesenchymal transition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016. 20(6): p. 1080-1086.
145. Tan, Y., et al., MicroRNA-138 inhibits migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by targeting LIMK1. *Molecular medicine reports*, 2016. 14(5): p. 4422-4428.
146. Ye, Z., et al., miR-138 suppresses the proliferation, metastasis and autophagy of non-small cell lung cancer by targeting Sirt1. *Oncology reports*, 2017. 37(6): p. 3244-3252.