



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN PULMONER FİBROZİSİNDE ETKİLİ UZUN
KODLANMAYAN RNA'LARIN
İN VİTRO MODELDE BELİRLENMESİ**

Merve YILDIRIM

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

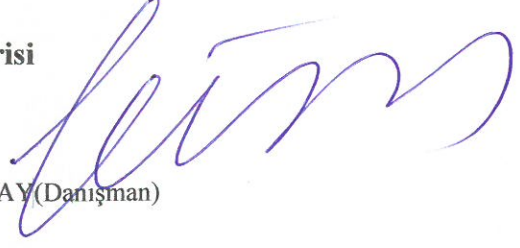
**DANIŞMAN
Prof. Dr. Füsün ÖZTAY**

Haziran, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 4.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Füsun ÖZTAY (Danışman)

İstanbul Üniversitesi

Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şehnaz BOLKENTİ

İstanbul Üniversitesi

Fen Fakültesi



Prof. Dr. Gül ÖNGENİ

İstanbul Üniversitesi

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Hasan BAYRAMI

Koç Üniversitesi

Tıp Fakültesi



Yrd. Doç. Dr. Ayşe KARATUĞ KAÇARI

İstanbul Üniversitesi

Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 20994 numaralı tez projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Kendini boşuna harcamış olur insan,
Dilediğine erer de sevinç duymazsa,
Yıktığın hayat kendininki olsun daha iyi,
Yıkmakla duyduğun şey kuşkulu bir mutluluksa.

William Shakespeare

Hayalini kurduğum ve başarılı olmak için adım attığım bu uzun yolda deneyimleri, yönlendirmeleri ve bilgi birikimiyle örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Füsün ÖZTAY'a çalışma esnasında her konuda bana desteğini esirgemeyip peşinden gidebileceğim bir amaç ve bilimsel bir bakış açısı kazandırdığı için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki büyük emeği dışında ekibinde oluşturduğu bilimsel tartışma ortamı, ilerletici eleştirel yaklaşımları ve etik özellikleri dolayısıyla kişisel gelişimime de katkısından dolayı teşekkür ve saygıyı bir borç bilirim.

Tez çalışmam esnasında hem manevi olarak hem de deneyimleriyle yol gösteren Dr. Öğr. Ü. Ayşe KARATUĞ KAÇAR'a, Uzman Biyolog Özgecan KAYALAR'a ve yine destekleriyle beni motive eden ve yardımcı olan Biyolog Ezgi SARI ve Biyolog Ertan ÇELİK'e de çok teşekkür ederim. Her zaman yanımda olduklarını bildiğim lisans arkadaşlarım Biyolog Alican Bahadır SEMERCİ, Biyolog Duygu ARSLAN ve Biyolog Selin ÖZCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında beni olduğum gibi kabul eden, her anlamda desteklerini esirgemeyen ve beni her zaman severek, yanımda olduklarını bildiğim en büyük motivasyon kaynağım sevgili aileme en büyük teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2018

Merve YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. İDİYOPATİK PULMONER FİBROZİS PATOGENEZİ.....	5
2.2. KANONİKAL WNT/B-KATENİN SİNYAL YOLU	6
2.3. LNCRNA'LAR VE GÖREVLERİ.....	7
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	12
3.1. İN VİTRO DENEYLER	12
3.2. HÜCRE CANLILIK TESTLERİ.....	12
3.2.1. MTT Testi.....	12
3.2.2. Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyama Yöntemi.....	13
3.3. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR)	13
3.4. PROTEİN İZOLASYONU VE ELEKTROFOREZ	15
3.5. WESTERN EMDİRİMİ.....	15
3.6. IMMUNFLORESAN YÖNTEMİ	16
3.7. BİYOİNFORMATİK ANALİZ	17
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	17
4. BULGULAR.....	18
4.1. HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI.....	18
4.1.1. MTT Bulguları.....	18
4.1.2. AO/EB Boyama Yöntemi Bulguları.....	19
4.2. QRT-PCR BULGULARI.....	23
4.3. WESTERN EMDİRİMİ BULGULARI	30
4.4. IF BULGULARI	32

4.5. BİYOİNFORMATİK ANALİZ BULGULARI.....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	64



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: LncRNA'nın görevleri.....	9
Şekil 4.1: 1µM, 5µM, 10µM ve 20µM konsantrasyonlardaki FH535'in hücre canlılığı üzerindeki 24 saatlik etkisi.....	18
Şekil 4.2: 1µM, 5µM, 10µM ve 20µM konsantrasyonlardaki FH535'in canlılık üzerine 48 saatlik etkisi.....	19
Şekil 4.3: A549 hücrelerinde 10 ve 20 µM FH535 uygulamalarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	20
Şekil 4.4: A549 hücrelerinde 10 µM FH535 uygulamasının 48. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi.....	21
Şekil 4.5: TGF-β ile uyarılan A549 hücrelerinde 10 µM FH535 uygulamasının 48. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi.....	21
Şekil 4.6: A549 hücrelerinde 20 µM FH535 uygulamasının 24. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi.....	22
Şekil 4.7: TGF-β ile uyarılan A549 hücrelerinde 20 µM FH535 uygulamasının 24. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi.....	22
Şekil 4.8: A549 hücrelerinde 20 µM FH535 uygulamasının 48. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok), erken apoptotik (beyaz ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi.....	23
Şekil 4.9: TGF-β ile uyarılan A549 hücrelerinde 20 µM FH535 uygulamasının 48. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi.....	23
Şekil 4.10: A549 hücrelerinde <i>HOTAIR</i> (a), <i>CARLo-5</i> (b) ve <i>CD99P1</i> (c) gen ekspresyonlarındaki değişimler.....	25
Şekil 4.11: A549 hücrelerinde TGF-β ve 20 µM FH535 uygulamaları sonrası <i>HOTAIR</i> , <i>CARLo-5</i> ve <i>CD99P1</i> ekspresyonlarının zamana bağlı değişimleri.....	26
Şekil 4.12: A549 hücrelerinde <i>ACTA2</i> (a), <i>COL1A1</i> (b) ve <i>VIM</i> (c) genlerinin ekspresyonundaki değişimler.....	27

Şekil 4.13: A549 hücrelerinde <i>ESRP1</i> ve <i>ESRP2</i> gen ekspresyonundaki değişimler.....	28
Şekil 4.14: A549 hücrelerinde <i>CTNNB1</i> ve <i>SNAIL</i> gen ekspresyonundaki değişimler.....	28
Şekil 4.15: A549 hücrelerinde <i>TCF4</i> ve <i>LEF1</i> gen ekspresyonundaki değişimler.....	29
Şekil 4.16: TGF- β ve FH535 uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde α -SMA protein miktarlarındaki değişiklikler ve α -SMA protein bandları gösterilmiştir.....	30
Şekil 4.17: TGF- β ve FH535 uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde E-kaderin protein miktarlarındaki değişiklikler ve E-kaderin protein bandları gösterilmiştir.....	31
Şekil 4.18: TGF- β ve FH535 uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde aktif β -katenin protein miktarlarındaki değişiklikler ve aktif β -katenin protein bandları gösterilmiştir.....	32
Şekil 4.19: TGF- β ve FH535 uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde α -SMA (FITC) ve E-kaderin (Cy3) proteinlerinin immünfloresan işaretlenmesi.....	33
Şekil 4.20: Pathway Studio analiz programı ile HOTAIR, CARLo-5 ve CD99P1'in ilişkili oldukları gen, protein ve miRNA'lar.....	37

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: QRT-PCR yönteminde kullanılan primerler.....	14
Tablo 3.2: Western emdirim (WB) ve immunfloresan (IF) işaretleme kullanılan anti-korlar ve kullanım şekilleri.....	16
Tablo 4.1: LncRNA ve miRNA erişim numaraları.....	34
Tablo 4.2: HOTAIR ile fiziksel olarak etkileşen miRNA'lar gösterilmiştir.....	35
Tablo 4.3: CARLo-5 ile fiziksel olarak etkileşen miRNA'lar gösterilmiştir.....	35
Tablo 4.4: CD99P1 ile fiziksel olarak etkileşen miRNA'lar gösterilmiştir.....	36

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μm	: Mikrometre
g	: Santrifüj değeri
kDA	: Kilodalton
mg	: Miligram
mm^2	: Milimetrekare
ng	: Nanogram
nm	: nanometre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
rpm	: Bir dakikadaki devir sayısı
ΔCt	: Siklus eşik değeri

Kısaltmalar	Açıklama
A549	: Akciğer adenokarsinoma hücre hattı
AO	: Akridin oranj
APC	: Adenomatosis poliposis coli proteini
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CK-1	: Kazein kinaz-1
DMEM/F12	: Dulbeco'nun modifiye edilmiş medyum ve Ham'ın F12
EB	: Etidyum bromür
ECM	: Ekstrasellular matriks
EMT	: Epitelial mezenşimal geçiş
ESRP1	: Epitelial splicing düzenleyici protein1
ESRP2	: Epitelial splicing düzenleyici protein 2
FBS	: Fötal sığır serumu
FZD	: Frizzled

GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GSK-3β	: Glikojen sentaz kinaz-3 β
IF	: İmmunfloresan
IPF	: İdiyopatik pulmoner fibrozis
LEF	: Lenfoid arttırıcı faktör
LncRNA	: Uzun kodlanmayan RNA
LRP	: Düşük yoğunluklu lipoprotein koreseptörüyle ilişkili proteinler
MRC5	: İnsan akciğer fibroblast hücresi
MTT	: 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolum bromid
PBS	: Fosfatla tamponlanan tuzlu su
PDGF	: Platelet kökenli büyüme faktörü
proSPC	: Prosurfaktan C
QRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
TCF	: T-hücre faktörü
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü- β
TNF-α	: Tümör nekroz faktör- α
WB	: Western emdirimi
Wnt	: Wingless-int
α-SMA	: Alfa-düz kas aktin

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN PULMONER FİBROZİSİNDE ETKİLİ UZUN KODLANMAYAN RNA'LARIN *İN VİTRO* MODELDE BELİRLENMESİ

Merve YILDIRIM

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr.Fusun ÖZTAY

Kanonikal Wnt sinyal aracılı epitelyal mezenşimal geçiş (EMT), alveolar epitelyal hücrelerde pulmoner fibrozise katkıda bulunur. Uzun kodlanmayan RNA'lar (LncRNA'lar) hücre çoğalmasını, hücre göçünü ve EMT'yi düzenler. Bu çalışmanın amaçları, transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ile EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasının uyarıldığı ve Wnt inhibitörü (FH535) ile durdurulduğu durumlarda, HOTAIR, CARLo-5 ve CD99P1 LncRNA'larının, Wnt sinyali, EMT ve miyofibroblast farklılaşması ile ilişkili gen ve proteinlerin ekspresyon profillerini belirlemek ve LncRNA'ların bu süreçteki muhtemel rollerini açıklamaktır.

İnsan A549 hücrelerinin bir kısmı, EMT'nin uyarımı için TGF- β (5ng/ml) ile muamele edildi. Diğer hücre grubu, TGF- β ilavesinden 24 saat sonra 20 μ M FH535 ile inkübe edildi. Tüm hücreler, deneylerin 0, 24, 36 ve 48. saatlerinde toplandı. LncRNA'lar ile ACTA2, VIM, COL1A1, SNAIL, CTNNB1, TCF4, LEF1, ESRP1 ve ESRP2 genlerinin ekspresyon profili, QRT-PCR ile alfa-düz kas aktin (α -SMA), E-kaderin ve aktif β -katenin protein düzeyleri ise Western emdirimi ile belirlendi. Ayrıca, HOTAIR, CARLo-5, CD99P1 LncRNA'ların, Wnt sinyali, EMT ve idiyopatik pulmoner fibrozis ile ilişkili kodlanan ve kodlanmayan genler ve ürünleri ile olan ilişkileri LncTar ve Pathway stüdyo mammalplus analiz programları ile analiz edildi.

TGF- β ile muamele edilen hücrelerde, LncRNA'lar, *ACTA2*, *VIM*, *COL1A1*, *SNAIL*, *CTNNB1*, *TCF4*, *LEF1*, *ESRP1* ve *ESRP2* gen ekspresyonu yanı sıra α -SMA ve aktif β -katenin proteinleri artarken, E-kaderin protein miktarı deneyin 24, 36 ve 48. saatlerinde azaldı. TGF- β tarafından uyarılan hücreler üzerindeki FH535 uygulamaları, deneyin 36.saatinde HOTAIR ekspresyonunu arttırırken, CARLo-5 ve geri kalan gen ve proteinlerin ekspresyonunu azalttı (E-kaderin proteini hariç). Bununla birlikte, TGF- β ile uyarılan hücreler üzerindeki FH535 uygulamaları, deneyin 48.saatinde α -SMA ve aktif β -katenin proteinleri ile LncRNA'lar, *ACTA2*, *VIM*, *COL1A1*, *SNAIL*, *CTNNB1*, *TCF4*, *LEF1*, *ESRP1* ve *ESRP2* genlerinin ekspresyonunu azalttı, ancak E-kaderin protein düzeyini arttırmadı. Biyoinformatik analizler, HOTAIR, CARLo-5 ve CD99P1'in, Wnt sinyali ve EMT ile ilgili transkripsiyon faktörleri, koaktivatörler, diğer etkili gen/protein ve en az 13 adet miRNA ile etkileşerek EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasını ve fibrotik cevabı düzenlediğini göstermiştir.

LncRNA'lann ekspresyonları, EMT ve Wnt sinyali varlığında artarken, A549 hücrelerinde azaltılmış Wnt sinyal aktivasyonu ve EMT'nin gerilemesine paralel olarak her üç LncRNA'nın da ekspresyonu azalmıştır. Buna göre, bu LncRNA'lar, TGF- β aracılı miyofibroblast farklılaşması, Wnt sinyali ve EMT'nin uyarılması üzerinde etkilidirler. HOTAIR, CARLo-5 ve CD99P1 LncRNA'ları idiyopatik pulmoner fibroziste EMT'nin geriletilmesi için potansiyel moleküller olarak önerilebilir.

Haziran 2018, 80 sayfa.

Anahtar kelimeler: İdiyopatik pulmoner fibrozis, Wnt sinyali, EMT, LncRNA

SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE DETERMINATION OF EFFECTIVE LONG NON-CODING RNA ON HUMAN PULMONARY FIBROSIS IN AN *IN VITRO* MODEL

Merve YILDIRIM

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr.Fusun OZTAY

Canonical Wnt signaling-mediated epithelial-mesenchymal transition (EMT) in alveolar epithelial cells contributes to pulmonary fibrosis. Long non-coding RNAs (LncRNAs) regulate cell proliferation, cell migration and EMT. The present study aims to determine the expression profile of HOTAIR, CARLo-5 and CD99P1 LncRNAs, when EMT mediated-myofibroblast differentiation was induced by transforming growth factor- β (TGF- β) and reduced by a Wnt inhibitor (FH535) to investigate the expressions of genes and proteins associated with the Wnt signaling, EMT and myofibroblast differentiation, and to explain the role of LncRNAs in this process.

A group of human A549 cells was treated with TGF- β (5ng/ml) to stimulate of EMT. The other group of cells was incubated with 20 μ M FH535 after 24 hours following TGF- β treatment. All of cells were collected at the 0th, 24th, 36th and 48th hours of the experiments. Expression profile of LncRNAs *ACTA2*, *VIM*, *COL1A1*, *SNAIL*, *CTNNB1*, *TCF4*, *LEF1*, *ESRP1* and *ESRP2*, and the levels of alpha smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin and active β -catenin were performed by QRT-PCR and Western blotting, respectively. In addition, the relationships between of HOTAIR, CARLo-5, CD99P1 LncRNAs and coding/noncoding genes and their product related to Wnt signaling, EMT and idiopathic pulmonary fibrosis were analysed by LncTar and Pathway studio mammalplus analysis programs.

TGF- β treated cells exhibited the increased expressions of LncRNAs, *ACTA2*, *VIM*, *COL1A1*, *SNAIL*, *CTNNB1*, *TCF4*, *LEF1*, *ESRP1* and *ESRP2* genes as well as α -SMA and active β -catenin proteins and the decreased E-cadherin protein at the 24th, 36th and 48th hours. While FH535 treatments on TGF- β induced cells resulted in the increased HOTAIR expression, decreased expression of CARLo-5 and the other tested genes 36th hours (except for E-cadherin protein). However, FH535 treatments on the cells induced by TGF- β resulted in decreased levels of α -SMA and active β -catenin proteins, and LncRNAs, *ACTA2*, *VIM*, *COL1A1*, *SNAIL*, *CTNNB1*, *TCF4*, *LEF1*, *ESRP1* and *ESRP2* genes at the 48th hours, but it did not increase E-cadherin protein levels. Bioinformatic analysis showed that HOTAIR, CARLo-5 and CD99P1 regulate EMT-mediated myofibroblast differentiation and fibrotic response by interacting with transcription factors, coactivators, other effective genes/proteins and at least 13 miRNAs related to Wnt signaling and EMT.

The expressions of LncRNAs increased in the presence of EMT and Wnt signaling, whereas their expressions decreased in parallel with decreasing activity of EMT through reduced Wnt signaling in A549 cells. Accordingly, these LncRNAs can be effective on TGF- β -mediated-myofibroblast differentiation, and induction of Wnt signaling and EMT. HOTAIR, CARLo-5 and CD99P1 LncRNAs can be thought as the potential molecules for decreasing of EMT activity in pulmonary fibrosis.

June 2018,80pages.

Keywords: Idiopathic pulmonary fibrosis, Wnt signalling, Epithelial-mesenchymal transition, LncRNA

1. GİRİŞ

İdiyopatik pulmoner fibrozis (**IPF**), ilerleyici tipte, kötü prognozlu ve bugün için kesin tedavisi olmayan ölümcül bir kronik akciğer hastalığıdır. IPF’de gelişen fibrotik odaklar nedeniyle akciğer sertleşir. Fibrotik odak oluşumu, akciğerde fibroblast ve miyofibroblastların aşırı proliferasyonu, kollagen, fibronektin gibi ekstrasellüler matriks (**ECM**) elemanlarının aşırı üretimi ve interstisiyel alanda birikimi sonucunda gerçekleşir (Yılmaz ve diğ., 2015). IPF hastalığı, dünyada her 100.000 insanın 27-29’unda gözlenmekte ve 100.000 insanın 7-11’inde ölümle sonuçlanmaktadır (Bouros ve Antoniou, 2005). IPF için yıllık insidans, Birleşik Devletler’de 100.000 kişide 6.8-8.8 ve 100.000 kişide 16.3-17.4 (sırasıyla dar ve geniş vaka tanımlama kriterlerine göre), Avrupa’da 100.000 kişide 0,22-74 aralığındadır (Demirögen-Çetinoğlu, 2014). Türk Solunum Dergisi tarafından 2011 yılında yayınlanan bir derlemede, bu hastalığın insidansı erkeklerde 10.7/100.000/yıl ve kadınlarda 7.4/100.000/yıl, prevalansı ise erkeklerde 20/100.000/yıl ve kadınlarda 13/100.000/yıl olarak bildirilmiştir (Okutan ve Çalışkan, 2011). Türkiye’de interstisiyel akciğer hastalıklarının epidemiyolojisini ortaya koyan Abdelaziz ve diğ. (2005) tarafından, bu sayıların son yıllarda arttığı ve Türkiye’de görülen interstisiyel akciğer hastalıklarının yüksek bir kısmının IPF olduğu dile getirilmektedir. IPF’de yaşam süresi 2-5 yıl arasında değişmektedir. Prostat ve meme kanseri gibi kanser vakalarında bile yaşam ömrünün daha uzun olduğu düşünüldüğünde, bu sayısal veriler dünya ve ülkemiz için IPF’in ciddi, ölümcül bir risk faktörü olduğunu açıkça gösterir.

Miyofibroblastlar, pek çok fibrotik hastalıkta olduğu gibi IPF’de de fibrotik lezyonların oluşumunda etkili olan hücrelerdir. Bu hücreler, α -düz kas aktin (**α -SMA**) proteini sentez eden kasılğan hücreler olarak bilinirler. Miyofibroblastlar, fibrotik şartlarda apoptoza karşı direnç göstermelerinin yanı sıra, kollagen ve fibronektin gibi ECM elemanlarını çok miktarda üreterek fibrotik odak oluşumuna katkı sağlarlar (Hinz ve diğ., 2012). Patolojik sinyaller akciğerdeki fibroblastların, inaktif fibrositlerin, bazı lökositlerin, kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücrelerin, hatta alveolar epitel hücrelerin miyofibroblastlara farklılaşmasına neden olur (Direkze ve diğ., 2003). IPF’li hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda alveolar epitel hücrelerinin epitel fenotiplerini kaybedip miyofibroblastlara farklılaştıkları ve bu yolun IPF patogenezinin oluşumunda baskın olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Cholankeril ve diğ., 2016). Epitelial mezenşimal geçiş (**EMT**), genel olarak, epitel hücrelerinin epitelial fenotiplerini kaybedip

mezenşimal fenotip kazanmaları şeklinde tanımlanır. Alveolar epitel hücrelerinden biri olan tip II pnömositler, fibrotik sinyaller varlığında EMT aracılığıyla miyofibroblastlara farklılaşabilirler (Morbini ve diğ., 2011). Bu durum, IPF'li hastaların akciğer biyopsi örnekleri ve deneysel pulmoner fibrozisli kemirgen akciğerleri üzerinde yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. IPF'li hastalardan alınan akciğer biyopsilerinin immunfloresan boyamaları sonrasında bu dokularda interstisiyumda zayıf reaksiyon veren prosurfaktan C (**proSPC**, tip II pnömosit belirteci) immunreaktif hücrelere rastlanmıştır. Ayrıca, bu hücrelerin bir mezenşimal hücre belirteci olan N-kaderin sentezini gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Araştırmacılar bu durumu “alveolar epitel hasarı sonrası bazal membranın yıkımı nedeniyle bir grup tip II pnömosit epitel katmandan ayrılarak interstisiyuma göç ederler, bu hücreler epitel fenotiplerini kaybederek mezenşimal hücre fenotipi kazanırlar ve fibrotik lezyon oluşumuna doğrudan katkı sağlarlar” şeklinde açıklamışlardır (Kim ve diğ., 2006). Sıçan akciğerinden izole edilen tip II pnömositlerin transforme edici büyüme faktörü- β 'ya (**TGF- β** , önemli bir fibrotik ajan) maruz bırakıldıklarında, bu hücrelerin α -SMA ve kollagen sentezledikleri ve *in vitro* 'da miyofibroblastlara farklılaştıkları tespit edilmiştir (Yao ve diğ., 2004). Ayrıca insan akciğer adenokarsinoma hücre hattı (**A549**) üzerinde yapılan pek çok çalışmada bu hücrelerin TGF- β varlığında proSPC, E-kaderin, sitokeratin, zonula okludens-1 gibi epitelial hücre belirteçlerini sentezlemeyi bırakıp vimentin, dezmin, N-kaderin, α -SMA, fibronektin ve kollagen üretmeye başladıkları, diğer bir ifadeyle epitel fenotiplerini mezenşimal fenotiplere dönüştürdükleri gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2007; Li ve diğ., 2016). Dolayısıyla, pulmoner fibrozis patogeneğinde tip II pnömositlerin EMT-aracılı miyofibroblastlara farklılaşmaları ve aşırı miktarda kollagen üreterek fibrotik alanların oluşumuna direkt katkı sağladıkları kabul edilmiştir. EMT sürecinin uyarılması ve bu sürecin pulmoner fibroze katkısını ortaya koyan çalışmalar, Wingless-Int (**Wnt**)/ β -katenin sinyal yoluna dikkatleri çekmektedir. IPF'li hastalarda Wnt/ β -katenin sinyal yolu aşırı aktive olur (Sato ve diğ., 2006). Fibrozisle ilgili olarak hipertrofik insan ve fare skar dokularında TGF- β tarafından β -katenin'in aktivasyonu aracılığıyla Wnt/ β -katenin sinyal yolu uyarılmaktadır (Kim ve diğ., 2009; Zhou ve diğ., 2012). TGF- β ile uyarılan insan A549 hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolunun devreye girmesiyle EMT aracılı-miyofibroblast farklılaşmasının gerçekleştiği tespit edilmiştir (Checa ve diğ., 2016).

IPF tedavisinde bosentan, pirfenidon, imatinib ve nintedanib gibi çeşitli terapötiklerin kullanımı klinikte devam etmektedir (Daniels ve diğ., 2010; Richeldi ve diğ., 2014). Ancak, bu ajanların neden olduğu yan etkiler ve bu ilaçlara karşı gelişebilecek muhtemel direnç, IPF tedavisinde

yeni terapötik ajan arayışının devam etmesine neden olmakta ve bu hastalık için kesin etkili bir ilacın olmadığı fikri bugün için kabul edilmektedir. Bu nedenle IPF moleküler patogenezinde etkili yeni hedef moleküllerin bulunması, IPF ile mücadelede yeni ve daha etkili bir tedavi yaklaşımının oluşmasına katkı sağlayacaktır.

Son 10 yılda dizileme tekniklerinin hızlı gelişimi ve ENCODE projesinin tamamlanması uzun kodlanmayan RNA (**LncRNA**) olarak bilinen yeni bir grup RNA'nın keşfine yol açmıştır. LncRNA'lar 200 baz çiftinden 1000 kilobaza kadar çeşitlilik gösteren kodlama yapmayan RNA molekülleridir (Min ve diğ., 2015). LncRNA'ların ekspresyonları doku tipine, hastalık durumlarına ve zamana bağlı olarak değişebilir. LncRNA'lar hücre farklılaşması, büyümesi, proliferasyonu, göçü ve apoptozu ile tümör metastazı gibi çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde kritik rol oynarlar. LncRNA'ların normal gelişimde, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde etkili oldukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Tong-Hong ve diğ., 2015; Wan ve diğ., 2016). LncRNA'ların hastalık tipine göre hücredeki ekspresyonları farklılık gösterdiğinden, diagnostik ve prognostik belirteç olarak kullanılırlar (Tian ve diğ., 2015). LncRNA'larla ilgili çalışmalar genellikle kanserli dokularda yapılmıştır. Pek çok çalışmada LncRNA'ların kanserli dokuda epitel karakterli kanser hücrelerinin mezenşimal fenotip kazanmalarını sağlayarak tümör metastazına neden oldukları ortaya çıkarılmıştır (Xiao ve diğ., 2016). Yukarıda bahsedildiği gibi EMT, IPF'de fibrozis patogenezinde katkı sağlayan önemli bir süreçtir. Son 5 yıldan beri, pulmoner fibrozisle ilişkili LncRNA'ların saptanmasına yönelik çalışmalar yapılmasına rağmen, bu çalışmalarda EMT ile ilişkili LncRNA'lar üzerinde durulmamıştır. Bu çalışmalarda, insan ve hayvan akciğerlerinde fibrotik şartlarda LncRNA ekspresyon profilinin değiştiği gösterilmektedir (Guohong ve diğ., 2013; Huang ve diğ., 2015). Biyoinformatik analizler, fibrotik şartlarda aşırı miktarda anlatımı yapılan bazı LncRNA'ların, pulmoner fibrozisle ilişkili bazı kodlanmayan RNA'lar ile etkileşebileceğini, ayrıca A549 hücreleri ve IPF'li hastaların akciğerlerinden izole edilen primer fibroblastlarda, LncRNA'ların EMT ile ilişkili bazı genlerin ekspresyonunu kontrol edebileceklerini göstermektedir (Huang ve diğ., 2015). Diğer yandan, sadece, pulmoner fibrozisli fare ve sıçan akciğerlerinde LncRNA'ların ekspresyon profili mikroarray analizlerle tanımlanırken, IPF'li hastaların akciğerlerinden alınan biyopsilerde, belirli sayıda seçilen LncRNA'ların ekspresyon analizi yapılmış ve bu LncRNA'lardan sadece 23 tanesinin gen ekspresyonunun değiştiği saptanmıştır (Huang ve diğ., 2015). İnsan genomunda 16.000 LncRNA geni olduğu düşünüldüğünde, IPF'de etkili oldukları ileri sürülen 23 LncRNA dışında bu süreçte etkili, keşfedilecek yeni LncRNA'ların olabileceği

tahmin edilebilir. Bu konuda az sayıda yapılan çalışmaların sonuçlarından da anlaşılabileceği üzere, bilinen ve yeni keşfedilecek LncRNA'ların IPF patogenezindeki rollerinin açıklanmasına ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, Wnt/EMT-aracılı miyofibroblast farklılaşmasında etkili olabileceğini düşündüğümüz, bu süreçle ilişkisi daha önce test edilmeyen HOTAIR, CARLo-5 ve CD99P1 LncRNA'larının etkili olup olmadıkları ve bu süreçteki rollerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu LncRNA'lardan HOTAIR ve CARLo-5, çeşitli kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinin EMT'sinde etkili oldukları belirlenmesine rağmen, bu LncRNA'ların pulmoner fibrozis patogenezi ve pulmoner fibroziste etkili EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasındaki rolleri araştırılmamıştır. Seçtiğimiz üç LncRNA içinden sadece CD99P1'in IPF'li hastaların akciğerlerinde miktarının arttığı bulunmuş ve IPF patogenezinde etkili olabileceği öne sürülmüştür, ancak etki mekanizması açıklanmamıştır. Araştırmacılar, insan LL29 akciğer fibroblast hücre hattında, CD99P1'in susturulmasıyla α -SMA ve kollagen miktarının azaldığını belirlemişlerdir (Huang ve diğ., 2015). Ancak IPF patogenezinde, Wnt/ β -katenin sinyal yolu ve EMT-aracılı miyofibroblast farklılaşmasındaki etkisi ve hangi moleküllerle etkileşime geçtiği bilinmemektedir. Çalışmamızda HOTAIR, CARLo-5 ve CD99P1'in A549 hücrelerinde Wnt/EMT-aracılı miyofibroblast farklılaşmasındaki etkileri ilk kez gösterilmiştir. Çalışma kapsamında HOTAIR, CARLo-5 ve CD99P1'in Wnt/EMT aracılı-miyofibroblast farklılaşmasında etkili olup olmadıkları gösterilmiştir. Wnt/ β -katenin sinyal yolunun uyarıldığı ve durdurulduğu durumlarda, üç LncRNA'nın ekspresyon proliferindeki değişimler Wnt sinyal yolu, EMT ve miyofibroblast farklılaşmasıyla ilişkili gen ve proteinlerin ekspresyonundaki değişimlerle ilişkilendirilerek süreçteki rolleri açıklanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. İDİYOPATİK PULMONER FİBROZİS PATOGENEZİ

IPF baskın olarak orta yaş ve yaşlı bireylerde görülen ilerleyici bir hastalıktır. IPF, kötü bir seyir göstermesi ve geleneksel tedavilere cevap vermemesinden dolayı agresif bir hastalık olarak kabul edilir ve genellikle ilerleyici tipte olup solunum yetersizliği sonrasında ölüm ile sonuçlanır. IPF patogenezinde kronik inflamasyon, ağır alveolar epitel hasarı, dokuda bozulan onarım ve gelişen aşırı fibroproliferatif yanıt oldukça önemlidir. Ancak, yüksek doz kortikosteroidler gibi anti-inflamatuvar terapilerin bir yararının olmaması, IPF tedavisinde kronik inflamasyonun rolünü şüpheyne düşürmektedir. Dolayısıyla tekrarlı ya da kalıcı alveolar epitel/endotel hasarı ile dokunun hatalı onarım yanıtı pulmoner fibrozisin ilerlemesine yol açan en önemli mekanizmalar olarak karşımıza çıkmaktadır (Blackwell ve diğ., 2014).

Yaşlı fareler üzerinde yapılan çalışmalar, endoplazmik retikulum stresine bağlı olarak tip II pnömositlerde apoptozun arttığını (Torres-Gonzalez ve diğ., 2012), akciğer fibroblastlarında ise apoptoza karşı direnç geliştiğini göstermektedir (Naik ve diğ., 2012). Apoptoz paradoksu olarak adlandırılan epitel hücrelerin apoptoza yatkınlığı, fakat mezenşimal hücrelerin apoptoza karşı gösterdikleri direnç, IPF'in karakteristik özelliklerinden biridir (Thannickal ve Horowitz, 2006). Diğer yandan, pulmoner fibroziste endoplazmik retikulum stresine bağlı gelişen alveolar epitel hasarı yanı sıra, çeşitli etmenlerden kaynaklanan alveolar epitel ve endotel hasarı da gerçekleşir. Solunum epitelinde başlayan/tekrarlayan hasar alveolar yüzeyin büyük bir kısmını kapsayan tip I pnömositlerin kaybı ile sonuçlanır (Gunther ve diğ., 2012). Normal koşullar altında, tip I pnömositlerin hücre-hücre etkileşimleri ve salgıladıkları çeşitli mediatörlerle mezenşimal hücre gruplarını kontrol altında tuttıkları bilinir. Tip I pnömositlerde hasar veya kayıp durumunda, tip II pnömositlerin bir kısmı çoğalarak alveolar epitel bütünlüğünü korumaya çalışır ve alveolar epitelde azalan tip I pnömositlere farklılaşır (Kayalar ve Oztay, 2014). Eğer bu süreç yeterli olmazsa alveol bütünlüğü bozularak alveoller kollabe olabilir. IPF'in patolojisine bakıldığında, alveolar yüzeye paralel olarak düzenlenmiş, fibroblastların ve miyofibroblastların oluşturduğu, fibrotik odak denilen çok sayıda diagnostik lezyonun varlığı gözlenir. Bu fibrotik odakların yakınındaki tip II pnömositler, normal onarım koşullarındaki durumlarından çıkarak çok hızlı bir şekilde çoğalırlar ve anormal onarım durumuna katkı sağlarlar (Noble ve diğ., 2012). Hasar durumunda epitel hücrelerinden salınan

nükleer faktör kappa-B, tümör nekroz faktör- α (**TNF- α**) ve TGF- β gibi inflamatuvar ajanlar dokuda inflamasyonu, hücre apoptozunu ve ECM elemanlarının üretimini artırır. İnflamatuvar hücrelerle birlikte dokunun epitel ve mezenşimal hücrelerinden salınan çeşitli sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, fibrojenik faktörler, koagülant proteinler ve oksidantlar direkt veya dolaylı olarak fibroblastların yara bölgesine göçüne neden olur (van Moorsel ve diğ., 2010). Dokuda sayıca artan fibroblastlar ve çeşitli hücrelerin miyofibroblastlara farklılaşması ile akciğerde ECM elemanlarının aşırı üretimi başlar. Matriks dönüşümünde görevli matriks metalloproteinazları ve onların düzenleyici proteinleri, aşırı üretilen ve interstisiyel alanda biriken kollagen, fibronektin, matriks glikozaminoglikanları gibi ECM elemanlarını yeterli miktarda ortadan kaldıramaz. Bu nedenlere bağlı olarak da dokuda fibrotik odaklar oluşur.

IPF patogenezinde rol oynayan en önemli mekanizmalardan biri de tip II pnömositlerin fibrotik sinyaller varlığında miyofibroblastlara farklılaşmasıdır. EMT'ye uğrayan tip II pnömositler, ECM elemanlarının üretimine katkı sağlar. TGF- β 1'in akciğeri de içeren birçok organ sisteminde EMT'nin düzenleyicisi ve indükleyicisi olduğu gösterilmiştir (Willis ve diğ., 2005 ve 2006). TGF- β 1'in *in vitro* da insan ve hayvan tip II pnömositlerinde (Kim ve diğ., 2007; Xu ve diğ., 2007) ve *in vivo* 'da transgenik farelerde (Kim ve diğ., 2006) EMT indükleyicisi olduğu saptanmıştır. EMT'nin ayırıcı özelliklerinden biri E-kaderin ekspresyonunun azalması ile hücre-hücre adhezyonunun kaybıdır. TGF- β , Wnt ve Notch gibi çeşitli sinyal yolları aracılığı ile snail/slug, zeb1/zeb2 ve twist gibi transkripsiyon faktörleri tarafından tip II pnömositlerde E-kaderin sentezinin azaldığı gösterilmiştir (Matsuno ve diğ., 2012). Fibrotik sinyaller varlığında tip II pnömositler proSPC, E-kaderin, sitokeratin, zonula okludens-1 gibi epiteliyal hücre belirteçlerini sentezlemeyi bırakıp vimentin, dezmin, N-kaderin, α -SMA, fibronektin ve kollagen üretmeye başlamakta, diğer bir ifadeyle miyofibroblastlara farklılaşmaktadırlar (Kim ve diğ., 2007; Li ve diğ., 2016).

2.2. KANONİKAL WNT/B-KATENİN SİNYAL YOLU

Wnt sinyallenmesi, gelişimsel bir sinyal yolu olmasına rağmen, IPF patogenezinde etkili spesifik bir sinyal yolu olarak karşımıza çıkar. IPF'li akciğer biyopsilerinde yapılan mikroarray analizler Wnt sinyal yolunda etkili çeşitli Wnt ligandlarının, reseptörlerinin, transkripsiyon faktörlerinin ve hedef genlerinin ekspresyonunun arttığını göstermektedir (Königshoff ve diğ., 2008). Wnt sinyallenmesi, bir Wnt ligandının Frizzled (**FZD**) olarak adlandırılan bir transmembran proteini ve onun düşük yoğunluklu lipoprotein koreseptörüyle ilişkili proteinlere

(LRP) bağlanmasıyla aktifleşir. Aktifleşen FZD reseptörü LRP5/6'nın fosforilasyonu ile birlikte Dishevelled proteinlerini aktive ederek hücre içi sinyallenmeyi başlatır. Hücre içi sinyallenmenin başlatılması adenomatosis poliposis coli (APC), axin, glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β), kazein kinaz-1 (CK-1) ve protein fosfatazlardan oluşan “ β -katenin yıkım kompleksinin” inaktivasyonu ile sonuçlanır (Logan ve Nusse, 2004; Clevers, 2006; MacDonald ve diğ., 2009). Wnt ligandlarının bulunmadığı durumda, yıkım kompleksi aktiftir ve yıkım kompleksi, kanonik Wnt sinyallenmesinin kilit efektörü olan sitozolik β -katenini fosforilleyerek proteozomal yıkıma yönlendirir. Ancak, Wnt sinyallenmesi aktifleşirse, yıkım kompleksinin fonksiyonu inhibe edilir ve serbest, fosforillenmemiş ve stabilize β -katenin sitozolde birikerek ardından nukleusa geçer. Bir transkripsiyon ko-aktivatörü olan β -katenin, nukleusta, bir transkripsiyon faktor kompleksi olan T-hücre faktörü/lemfoid arttırıcı faktör (TCF/LEF) ile çeşitli hücresel süreçlerde rol oynayan hedef genlerinin promotor bölgelerinde ilişki kurarak ilgili genin ekspresyonunu arttırır ya da azaltır (Logan ve Nusse, 2004; Angers ve Moon, 2009; MacDonald ve diğ., 2009). Kanonik Wnt sinyal yolunun ko-aktivatörü olan β -katenin, nukleus zarında yer alan importin- α/β reseptörü aracılığıyla nukleusa taşınır. β -katenin ve TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerinin aşırı ekspresyonu β -kateninin nukleusa geçişini arttırır. Buna göre, fizyolojik koşullar altında, β -kateninin nukleusa taşınması ek bir Wnt bağımlı sinyal içeren LEF-1 aracılığıyla yönetilmektedir (Hsu ve diğ., 1998). TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörleri ailesi β -kateninin nukleus dışına çıkmasını inhibe ederek onun nukleusta kalmasını sağlar (Krieghoff ve diğ., 2006). β -kateninin TCF/LEF-1 kompleksiyle ilişkisini önleyen moleküller, aynı zamanda β -kateninin nukleusta kalmasını önlemektedir (Shi ve diğ., 2012). Wnt hedef genlerinin sayısı bu alanda yapılan hemen hemen her çalışmayla artmaktadır ve sayıları 100'leri aşmıştır. Birçoğu β -katenin bağımlıdır ve TCF/LEF-1 etkileşimini gerektirir. IPF'de β -katenin bağımlı gerçekleşen hedef gen transkripsiyonu ile üretilen transkripsiyon faktörleri (snail, twist ve zeb2 gibi) aracılığıyla EMT uyarımı ile alveolar epitel hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşması uyarılır (Kim ve diğ., 2007).

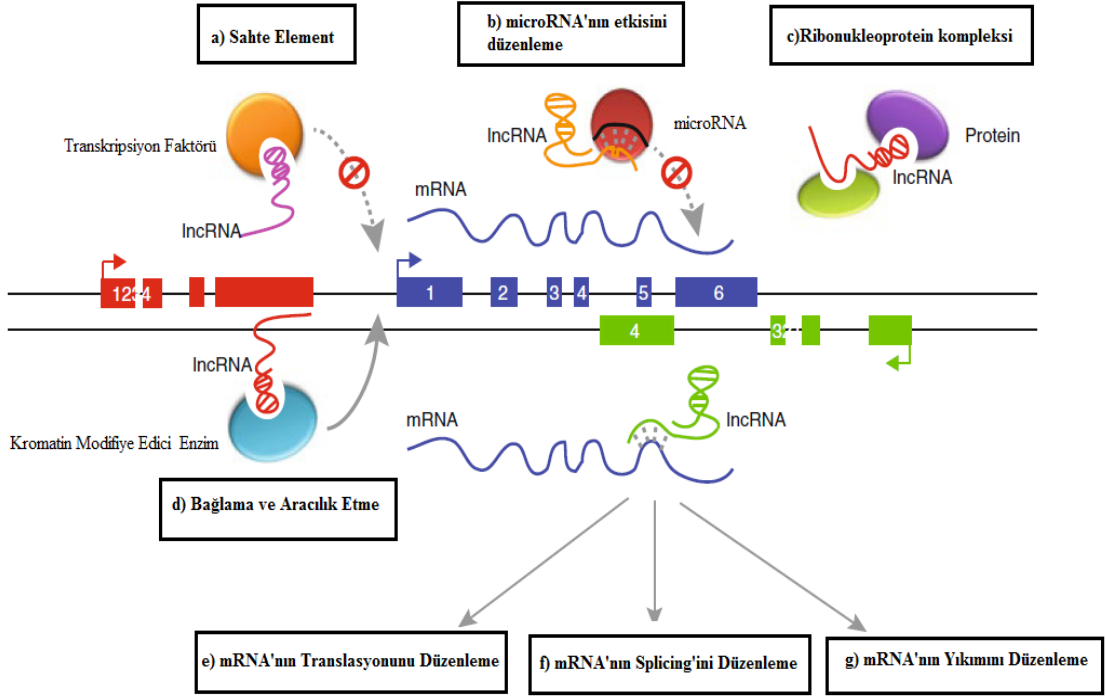
2.3. LNCRNA'LAR VE GÖREVLERİ

Son dönemde, yüksek çıktılı dizileme tekniklerinin hızla gelişmesi ve uygulanması, bilinen klasik RNA çeşitlerine ilaveten pek çok kodlanmayan RNA çeşidinin varlığını ortaya koymaktadır (Rabani ve diğ., 2014). İnsan genomunda bulunan yaklaşık 20.000 protein

kodlayan gen, total genom dizisinin % 2'sinden azını oluşturur. Genomun en az %90'ı ise aktif olarak kodlanmayan RNA'lara transkripte olur.

Kodlanmayan RNA'lar, görevleri dikkate alınarak yapılan sınıflamada iki grup altında toplanırlar. Bu gruplardan ilki, yapıya katılan RNA'lardır ve bu kodlanmayan RNA'lar arasında ribozomal RNA (rRNA), taşıyıcı RNA (tRNA), küçük nuklear RNA (snRNA) ve küçük nukleolar RNA (snoRNA)'lar yer alır. İkinci grubu oluşturan RNA'larda, düzenleyici RNA'lar olarak adlandırılır. Bu grupta mikroRNA'lar (miRNA), piwi ilişkili RNA (piRNA), küçük interferens RNA (siRNA) ve uzun kodlanmayan RNA (LncRNA)'lar yer alır. Son yıllarda düzenleyici RNA'lara, promotör ile ilişkili RNA'lar ve kuvvetlendirici (enhancer) RNA'lar olmak üzere iki yeni üye daha eklenmiştir. Kodlanmayan RNA'ların kayıtlı olduğu veritabanlarında 1229 organizmada 73.370 LncRNA'nın olduğu ve gün geçtikçe de sayılarının arttığı bilinmektedir (Bu ve diğ., 2012). LncRNA'lar uzunlukları 200 nukleotid ve yaklaşık 1000 baz arasında değişen ve evrimsel açıdan iyi korunmamış transkriptlerdir. Sınıflandırılırken genomik bölgedeki protein kodlayan genlere yakınlıklarına göre 5'e ayrılırlar: (1) sense, (2) antisense, (3) bidirectional, (4) intronic ve (5) intergenik (Mattick, 2009). DNA ile ilişkilerine göre de kuvvetlendirici ve promotör ile ilişkili LncRNA'lar, upstream antisense RNA ve telomerik tekrarlı RNA olarak farklı gruplandırılabilirler (St Laurent ve diğ., 2015).

LncRNA'lar RNA polimeraz II tarafından transkripte edilen, çoğunlukla mRNA ile benzer olarak 5'ucunda 7-metilguanozin şapkası ve 3'ucunda poli-A kuyruğu bulunduran, ancak kodlama kapasitesini kaybetmiş RNA molekülleridir. "ENCODE Projesi" kapsamında insan genomunda bulunan 16.000'e yakın LncRNA genin yaklaşık 40.000 farklı LncRNA'yı oluşturduğu açıklanmıştır. Ancak bu sayı her geçen gün yeni bulunan LncRNA'lar ile birlikte artmaktadır. LncRNA'lar sıklıkla stabil ikincil ve daha yüksek yapılar oluşturarak, gen ekspresyonunu farklı mekanizmalar yoluyla kromatin modifiye edici komplekslerle etkileşime geçerek, hedef genlerin transkripsiyonunu *cis* ya da *trans* etkili faktörler olarak düzenlerler. Ayrıca, transkripsiyon sonrası mRNA'nın alternatif kesimi, RNA editing, translasyon ve mRNA yıkımı gibi süreçleri de kontrol ederek gen anlatımının çeşitli basamaklarında etkili oldukları bilinmektedir (Tripathi ve diğ., 2010; Gong ve Maquat, 2011; Yoon ve diğ., 2013) (Şekil 2.1:).



Şekil 2.1: LncRNA'nın görevleri (Alvarez-Dominguez ve diğ., 2013). **(a)** Birçok LncRNA transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanma bölgelerini taklit ederek, ilgili transkripsiyon faktörünün DNA'ya bağlanmasını engeller. **(b)** Posttranskripsiyonal düzeyde miRNA'lara bağlanarak, miRNA'ların mRNA'daki hedef bölgelerine bağlanmalarını engellerler. Bu şekilde bir LncRNA'nın miRNA ile yarışarak onun mRNA'ya bağlanma kapasitesini değiştirmesine yarışmalı endojen RNA hipotezi (ceRNA) denir (Salmena ve diğ., 2011). **(c)** LncRNA'lar kromatin modifiye edici ya da transkripsiyon faktörü gibi spesifik proteinlere bağlanarak ribonukleoprotein kompleksini oluştururlar. **(d)** Kromatin modifiye edici enzimlerin DNA'nın hedef bölgesine bağlanmasına aracılık ederek, bağlanmanın gerçekleşmesini sağlar. Kromatin modifiye edici enzimlerin RNA bağlanma bölgeleri içerdikleri bilinmektedir. Ortamda ilgili LncRNA'nın olmamasının kromatin modifiye edici enzimin DNA'daki hedefine bağlanmasını engellediği bulunmuştur. **(e)** mRNA'nın translasyonunu **(f)** mRNA'nın alternatif kesimi ve **(g)** mRNA'nın yıkımını düzenlerler.

LncRNA'lar gen anlatımının kontrolünü farklı basamaklar üzerinden gerçekleştirir. Gen anlatımının düzenlenmesindeki ilk basamak olan kromatin remodellenmesinde LncRNA'ların etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır. LncRNA'lar çoğunlukla nukleusta kromatin fraksiyonunda bulunurlar; enzimatik modifikasyonlarla kromatin remodellenmesini düzenlerler (Derrien ve diğ., 2012; Djebali ve diğ., 2012) ve böylece çeşitli gen bölgelerinin transkripsiyonunun açık veya kapalı hale getirilmesinde görev alırlar (Ponting ve diğ., 2009). Kromatin modifiye edici enzimlerin de spesifik genomik bölgeye ve diğer efektör proteinlere hedeflenebilmeleri için LncRNA'lara ihtiyaçları vardır. Örneğin H3K27'nin trimetilasyonunu katalizleyen proteine LncRNA'nın bağlanması, ilgili gen bölgesinin transkripsiyona kapalı hale

gelmesine neden olur (Rada-Iglesias ve diğ., 2012). İlâveten, HOTAIR esas olarak iki farklı baskılayıcı kompleksi kromatine bağlayarak H3K27 metilasyonunu ve H3K4 demetilasyonunu sağlar (Tsai ve diğ., 2010) ve kromatinin durumunu epigenetik olarak düzenler (Rinn ve diğ., 2007; Gupta ve diğ., 2010). LncRNA'nın DNA ile hibridizasyonu kromozomal DNA için transkripsiyon boyunca kritik bir rol oynar; tripleks LncRNA:DNA yapısı özellikle DNA metiltransferaz DNMT3B tarafından tanınmayı ve *de novo* DNA metilasyonunu sağlayabilir ve epigenetik düzenlemeye katkı sağlar (Schmitz ve diğ., 2010).

LncRNA'lar, gen ekspresyonunu epigenetik mekanizmalarla kontrol edebildikleri gibi, gen anlatımının ikinci ve önemli bir kontrol basamağı olan transkripsiyon aşamasında da etkilidirler. Birçok LncRNA'nın, transkripsiyonun negatif düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. LncRNA'ların gen promotörleri ve transkripsiyon faktörleriyle doğrudan etkileşime geçerek kromatin modifiye edici kompleksleri ilgili bölgeye bağladıkları ve transkripsiyon faktörü ile kompleks oluşturarak gen anlatımının uyarılmasına neden oldukları gösterilmiştir (Feng ve diğ., 2006). Diğer yandan bazı LncRNA'lar bazal transkripsiyon ve düzenleyici faktörlerinin bağlanma noktalarında DNA ile etkileşime geçebilirler. Bu etkileşim genin transkripsiyonunun durdurulması ile sonuçlanabilir. Örneğin, insan dihidrofolat redüktaz geninin minor promotöründen transkripte olan LncRNA'ların bu geninin major promotörü ve TFIIB transkripsiyon faktörüne bağlanarak triplex bir yapı oluşturarak gen lokusundan transkripsiyonu başlatıcı kompleksi uzaklaştırdığı bulunmuştur (Martianov ve diğ., 2007). Diğer bazı LncRNA'lar transkripsiyon faktörlerinin hücrel lokalizasyonlarını kontrol ederek transkripsiyonu düzenler (Zeini ve diğ., 2009).

İntronik LncRNA'lar, mRNA transkriptlerinin alternatif kesimi ve editing işlevinde görev alabilirler (Gong ve diğ., 2011). LncRNA'lar mRNA transkriptlerinin nukleustan sitoplazmaya taşınması, translasyonu ve degradasyonu gibi posttranskripsiyonal süreçlerin düzenlenmesi ile de ilişkilidir. Transkripsiyon faktörü Zeb2'nin translasyonunun Zeb2 geninin antisensinden transkripte edilen bir LncRNA ile uyarıldığı belirlenmiştir (Beltran ve diğ., 2008). Yapılan çalışmalar miRNA'ların fonksiyonunun LncRNA'lar tarafından düzenlendiğini göstermektedir (Salmena ve diğ., 2011). Bazı LncRNA'lar miRNA'ların fonksiyonunu zayıflatabilir ve dolaylı olarak mRNA'nın stabilitesini arttırarak translasyonun devamını sağlar (Cesana ve diğ., 2011; Karreth ve diğ., 2011).

LncRNA genlerinin anlatımlarındaki anormal değişimler, kanser, kardiovaskular hastalıklar ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda saptanmıştır (Wapinski ve Chang, 2011). LncRNA'lar çeşitli genlerin anlatımını düzenlediklerinden, normal fizyolojik ve patolojik durumlarda meydana gelen farklı hücrel yanıtın oluşumunda direkt etkili moleküller olarak kabul edilirler (Pauli ve diğ., 2011). LncRNA'lar hücre bölünmesi, farklılaşması, göçü ve ölümü, gelişim, metastaz gibi birçok hücrel sürece etki ederler (Moran ve diğ., 2012). EMT hem embriyonik gelişim ve tümör metastazı hem de pulmoner fibrozisde görülür. Birçok LncRNA transkripsiyonu indükleyerek ya da RNA-protein komplekslerinin oluşumuna etki ederek EMT ile ilişkili genlerin transkripsiyonal ya da posttranskripsiyonal olarak ekspresyonunu düzenler (Yuan ve diğ., 2014). ZEB1-AS1 LncRNA, çeşitli kanser hücre hatlarında zeb1 promotör aktivitesini bilinmeyen bir mekanizmayla artırır. Zeb1, E- kaderin, okludin ve zonula okludens'in ekspresyonunu baskılayarak epitelial fenotipi azaltır; böylece ZEB1-AS1 LncRNA, zeb1 aracılığı ile EMT'yi engelleyebilir (Su ve diğ., 2017).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. *İN VİTRO* DENEYLER

İnsan A549 hücreleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan temin edildi. Hücreler % 10 fetal sıgır serumu (**FBS**), 50 U/ml penisilin ve 50 µg/ml streptomisin (Gibco) içeren Dulbeco'nun modifiye edilmiş medyum ve Ham'ın F12 (**DMEM/F12**) medyumunda (Gibco), 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂'de inkübe edildi. Çoğalan hücreler pasajlandı ve 6 kuyulu kültür kaplarına ekildi (400.000 hücre/kuyu). Hücrelerin ortama tutunması ve yayılması beklendikten sonra, hücreler 2. gün serumu azaltılmış medyumda kültüre edildi. Bir gün sonra medyum değiştirildi ve medyuma 5ng/ml TGF-β ilave edildi. Hücreler, TGF-β uygulamasını takip eden 24, 36 ve 48. saatlerde toplandı. TGF-β uygulanmasından önce toplanan hücreler (0.saat) kontrol olarak kabul edildiler. Diğer deney grubundaki hücreler, TGF-β ile uyarıldıktan 24 saat sonra Wnt sinyal yolu inhibitörü olan FH535 (20 µM) ile muamele edildi ve hücreler inhibitör uygulamasını takip eden 12 ve 24. saatlerde (TGF-β uygulamasını takip eden 36 ve 48. saatlerde) toplandılar. Deneyler ve ölçümler 3 kez tekrarlandı.

3.2. HÜCRE CANLILIK TESTLERİ

3.2.1. MTT Testi

Yöntemin esası, sarı renkli ve suda çözünür boya olan 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolyum bromid (**MTT**)'nin mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından mor renkli formazan kristallerine indirgenmesine ve oluşan renk reaksiyonunun kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır (Mosmann, 1983).

A549 hücreleri 96 kuyucuklu kültür kabı içine her kuyucukta 100 µl'de 10.000 hücre olacak şekilde ekildi ve uygun inkübasyon şartlarında DMEM/F12 içinde kültüre edildiler. TGF-β ile uyarılan ve uyarılmayan hücrelerde, farklı konsantrasyonlardaki (1 µM, 5 µM, 10 µM ve 20 µM) FH535'in sitotoksitesi belirlendi. Deneyin son 4. saatinde medyuma 30µl fosfatla tamponlanan steril tuzlu su (**PBS**) içinde hazırlanmış MTT (5mg/ml) ilave edildi. Hücreler 4 saat 37°C'lik inkübatörde bekletildiler ve 4. saatin sonunda medyum kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Daha sonra her kuyucuğa 100µl dimetilsülfoksit ilave edildi. Kültür kabı çalkalayıcıda 3 dakika süresince 270 rpm'de çalkalandı. Oluşan formazan miktarı, mikropilaka okuyucuda (BioTek µQuant) 550 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.2.2. Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyama Yöntemi

MTT deneyi sonuçlarına göre, hücre canlılığının % 50'nin altına düştüğü deney saatinde (TGF- β uygulamasını takip eden 72. saat) hücrelerin hangi yolla öldüklerini belirlemek amacıyla, hücreler akridin oranj (AO)/etidyum bromür (EB) ile boyandılar.

AO, nükleik asitlere afinitesi olan katyonik floresan bir boyadır. Hücre zarı geçirgen olan hücrelerde RNA ve DNA ile interkalasyon yapar ya da elektrostatik olarak etkileşir. Canlı hücrelerde DNA'ya bağlandığında yeşil renkte floresan ışımaya verir. EB, yalnızca hücre membranı bütünlüğünü kaybetmiş hücrelerin DNA'sı ile etkileşerek turuncu-kırmızı floresan ışımaya verir. Membran bütünlüğü bozulmamış canlı hücreler EB ile boyanmaz. Oysa membran geçirgenliği bozulan ve apoptozun son aşamasındaki hücreler (geç apoptotik hücreler) ve membran bütünlüğünü tamamen kaybetmiş nekrotik hücreler kırmızı renkte boyanırlar (Kasibhatla ve diğ., 2006).

A549 hücreleri 6 kuyulu kültür kaplarına ekildiler (30.000 hücre/kuyu) ve uygun inkübasyon şartlarında DMEM/F12 içinde kültüre edildiler. TGF- β ile uyarımından 24 saat sonra 10 ve 20 μ M FH535 ile muamale edilen hücreler, inhibitör uygulamasını takip eden 24. ve 48. saatin sonunda, medyumun uzaklaştırılmasından sonra, PBS içinde hazırlanan 1mg/ml AO ve 10mg/ml EB karışımı (1:1) ile boyandılar. Boyanın ortamdaki uzaklaştırılmasından sonra hücreler, floresan mikroskopta incelendi ve fotoğrafları çekildi (Nikon Eclips HG00L). Canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücreler sayılarak yüzdeleri hesaplandı.

3.3. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR)

Hücreler (400.000 hücre/kuyu), 350 μ l soğuk lizis tamponunda homojenize edildi ve lizat steril bir tüpe aktarıldı. Tüp 13.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant total RNA izolasyonu için ayrıldı. Total RNA izolasyonu, trizol/kloroform ve kit kullanılarak gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'lar tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezinde kullanıldı.

RNA'nın cDNA'ya çevrilmesinde 20 μ l'lik kalıp RNA karışımı hazırlanarak bu karışım 200 μ l'lik reaksiyon tüplerine aktarıldı ve 10 dakika süreyle 70°C'de inkübe edildikten sonra tüpler 1 dakika buzda bekletildi. Daha sonra 10 saniye süreyle spin yapıldıktan sonra tüpler tekrar buza alınıp karışıma ters transkriptaz enzimi ilave edildi ve 40 μ l son hacimli cDNA reaksiyon

tüpleri hazır hale getirildi. Tüpler nazikçe karıştırıldıktan sonra 20°C’de 10; 43°C’de 75 dakika; 99°C’de 5 dakikaya programlanmış ters transkriptaz programıyla PCR cihazında cDNA sentez işlemi gerçekleştirildi. cDNA kalıplarının eldesinin kontrolü ise %1’lik agaroz jel elektroforezinde yapıldı. cDNA kalıpları bir süre +4°C’de bırakıldıktan sonra QRT-PCR yapılmaya kadar -20°C’de saklandı. *HOTAIR*, *CARLo-5* ve *CD99P1* LncRNA’larının ve *ACTA2* (α -SMA), *COL1A* (kollagen1a), *VIM* (vimentin), *ESRP1* (epiteliyal splicing düzenleyici protein1), *ESRP2* (epiteliyal splicing düzenleyici protein2), *CTNNB* (β -katenin), *SNAIL*, *TCF4*, *LEF1* ve *GAPDH* (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) genlerinin ve QRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi (**Tablo 3.1:**).

Tablo 3.1: QRT-PCR yönteminde kullanılan primerler.

PRİMER	FORWARD	REVERSE
HOTAIR	5'-CAGTGGGGAAGCTCTGACTCG-3'	5'-GTGCCTGGTGCTCTCTTACC-3'
CARLo-5	5'-GCCACAAATCAACAACAACAAC AACA-3'	5'-AGAGTGATGCCAAGGCTGTTATTG TCAA-3'
CD99P1	5'-CAAGACCCCCTACAGAAGCC-3'	5'-TTTTGGTGGGGAAGCGACT-3'
ACTA2	5'-CGAGATCTCACTGACTACCTCATGA-3'	5'-AGAGCTACATAACACAGTTTC TCCTTGA-3'
COL1A1	5'- CAAGAGGAAGGCCAAGTCGAG-3'	5'-TTGTCGCAGACGCAGATCC-3'
VIM	5'-GGACCAGCTAACCAACGACA-3'	5'-AAGGTCAAGACGTGCCAGAG-3'
CTNNB1	5'- AAGTGGGTGGTATAGAGGCTCTTG-3'	5'-GATGGCAGGCTCAGTGATGTC-3'
TCF4	5'-CGAGGGTGATGAGAACCTGC-3'	5'-CCCATGTGATTCGATGCGT-3'
LEF1	5'-CATCAGGTACAGGTCCAAGAATGA-3'	5'- GTCGCTGCCTTGGCTTTG-3'
SNAIL	5'-CCACATCAGCCCCACAGGACTTT-3'	5'-GCAGACAGGCCAGCTCAGGAATC- 3'
ESRP1	5'-TTGCAGCAAGATGGAAGTTATTG-3'	5'-TTGATCTGAAGACTGCCATGGT-3'
ESRP2	5'-CAAATCGCTGGTTCGTGCC-3'	5'- ATAGCTGCTGCCCATCAGTG-3'
GAPDH	5'-ATGACATCAAGAAGGGGTG-3'	5'-CTACCAGGAAATGAGCTTG-3'

PCR reaksiyonu, üretici firmanın Syber Green Master mix karışımı ile tamamlandı. Örnek sayısına göre 1x PCR karışımı hazırlandı ve hazırlanan karışım 15µl hacimler ile 96 kuyucuklu playtlere eklendi. Pleyt kuyucuklarının içerisindeki bu karışıma 5 µl kalıp cDNA eklenerek son hacim 20 µl’ye tamamlandı. Reaksiyon karışımı pleytlere eklendikten sonra pleytlerin üzeri

şeffaf yapışkan bir film ile kapatıldı. Hazırlanan bu pleytler, 96 kuyucuklu pleytlere uygun adaptör yerleştirilmiş santrifüjde 700 x g'de 5 saniye santrifüjlendikten sonra, pleytler Onestep one plus applied biosystem cihazına yerleştirilerek QRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Öncelikle ilgili genin bilinen miktarları ve titrasyonları kullanılarak standart eğri saptandı ve her grubun hücrelerinde, ilgili genlerin ekspresyonunun kantitatif miktarı, her gen için referans gene göre belirlenen siklus eşik değeri (ΔC_t , cycling threshold) değeri ($\Delta C_t = C_t^{\text{referans gen}} - C_t^{\text{hedef gen}}$)'ne göre belirlenen transkript seviyesindeki relatif değişiklikler kontrol gen (GAPDH) ile normalize edildi

3.4. PROTEİN İZOLASYONU VE ELEKTROFOREZ

Medyum uzaklaştırıldıktan sonra hücreler üzerine lizis tamponu ilave edildi. Hücreler kazındıktan sonra toplandı ve ultrasonikatörde tekrar parçalandılar. Lizat 13.000 x g'de 15 dk +4°C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlarda Bradford yöntemi kullanılarak total protein ölçümü yapıldı (Bradford, 1976). Örnekler -20°C'de saklandı. Eşit miktardaki protein örnekleri (40 µg) % 5-10 sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jele yüklendi ve kademeli olarak 70, 100 ve 120 Volt'da ortalama 2 saat yürütüldü.

3.5. WESTERN EMDİRİMİ

Elektroforez ile yürütülen protein örnekleri yarı ıslak aktarım ile (Biorad Transblot-Turbo) jelden nitroselüloz membrana aktarıldı. Aktarımın etkinliğini kontrol etmek için membranlar Ponceau S ile boyandı. Membranlar antikor uygulaması yapılmadan önce yağsız süt tozu ile hazırlanan blocklama solusyonu ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi. Bu işlemten sonra membranlar uygun dilüsyonlarda hazırlanmış α -SMA, E-kaderin ve aktif β -katenin primer antikorları ile bir gece +4°C'de inkübe edildi (**Tablo 3.2**). İşlem sonrasında Tween-20 içeren Tris tamponu (pH:7,6; 0.5 M) ile yıkanan membranlar uygun sekonder antikorlar ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi. Bu uygulamayı takiben membranlar Tris tamponu ve Tween-20 içeren Tris tamponu solüsyonları ile yıkandı. Kemilüminesan solusyonu uygulamasından sonra protein bantları Kodak GL 1500 jel görüntüleme sisteminde görüntülendi ve densitometrik analizleri yapıldı. Bant yoğunlukları, Gapdh proteininin yoğunluğu ile normalize edilerek protein miktarındaki değişimler gruplar arasında analiz edildi.

Tablo 3.2: Western emdirim (WB) ve immunfloresan (IF) işaretleme kullanılan antikorlar ve kullanım şekilleri.

Primer Antikorlar	Dilüsyon oranı	İnkübasyon Süresi ve Koşul	Firma
Fare anti-α-SMA	1:200 (WB) 1:100 IF	Gece boyunca, +4°C Gece boyunca, +4°C	Novus
Tavşan anti-E-kaderin	1:500 (WB) 1:100 (IF)	Gece boyunca, +4°C Gece boyunca, +4°C	Santa Cruz
Fare anti aktif-β-katenin	1:500 (WB)	Gece boyunca, +4°C	Millipore
Gapdh	1:500 (WB)	1 saat, oda sıcaklığı	Santa Cruz

3.6. İMMUNFLORESAN YÖNTEMİ

Hücreler, 24 kuyucuklu pleytler içine yerleştirilen lameller üzerine ekildi (60.000 hücre/kuyu) ve kuyucuklara 1'er ml büyüme medyumı konuldu. Ertesi gün büyüme medyumı ortamdan uzaklaştırıldı ve serumu azaltılmış medyum konuldu. Bir gün sonra 5 ng/ml TGF- β ve 20 μ M FH535 ile muamele edilen hücreler, TGF- β uygulamasını takip eden 48 saatin sonunda soğuk (+4°C) aseton-metanol karışımı (1:1) ile 10 dk süresince fikse edildi. Lameller % 0.1 sığır serum albumin içeren PBS ile 3 kez yıkandı. Sonrasında % 5 sığır serum albumin içeren PBS ile 30 dakika bloklama işlemi yapıldı. Ardından tavşan anti-E-kaderin ve fare anti- α -SMA primer antikor uygulamaları 1:100 konsantrasyonlarda gerçekleştirildi ve +4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, hücreler % 0.1 sığır serum albumin ve Tween 20 içeren PBS solusyonu ile 3 kez yıkandı. Daha sonra hücreler, keçi anti-tavşan IgG-FITC ve keçi anti-fare IgG-Cy3 sekonder antikorları ile 1 saat karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edildiler. Yıkamalardan sonra hücrelerin nükleusları DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 1 μ M) ile işaretlendi (karanlıkta 10 dk) ve %4 paraformaldehit ile postfiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Son yıkamadan sonra immunfloresan kapatıcı ile lameller kapatıldı ve kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminden sonra görüntüleme yapıp, hücrelerin fotoğrafları Nikon floresan mikroskopta çekildi.

3.7. BİYOİNFORMATİK ANALİZ

LncRNA'lar bir RNA hedefine bağlandığında, muhtemelen eşleştirilmemiş bir konformasyona sahiptir. Bununla birlikte, mevcut RNA-RNA etkileşim tahmin yöntemlerinin çoğu, eşleştirilmemiş konformasyonu değerlendirilirken çoklu bağlanma alanlarını hesaba katmaz. LncTar analiz programı, LncRNA-RNA etkileşim tahmini için hassas erime sıcaklığı ve primer-dimer eşleşmesini temel alan bir algoritma temel alınmıştır. LncTar, iki RNA molekülünün birbiriyle etkileşip etkileşmediğini otomatik olarak belirlemek için kantitatif bir standart sağlar. Önemli olarak da, LncTar programının doğruluğu 10 deneysel destekli çalışma ile LncRNA-mRNA etkileşimlerine bakılmış ve LncTar sonuçları deneysel sonuçlar ile % 80 olarak eşleşmiş ve başarı sağlamıştır (Li ve diğ., 2014). HOTAIR, CARLo-5 ve CD99P1 LncRNA'larının Wnt, EMT ve pulmoner fibroziste önemli olduğu bilinen miRNA'lar ile ilişkileri 2 ve üzeri katlı artış ve 0.5 ve aşağısı katlı azalış gösterenler Pubmed GEO Data setlerindensağlanan veriler kullanılarak LncTar analiz programı ile analiz edildi.

HOTAIR, *CARLo-5* ve *CD99P1* LncRNA'larının *ACTA2*, *COL1A1*, *VIM*, *CTNNB1*, *CDH1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1*, *TCF4*, *LEF1*, *ESRP1* ve *ESRP2* genleri, onların ürünleri ve mir148b, mir218-1 miRNA'ları ile muhtemel ilişkileri Pathway Studio Mammalplus v12.0 analiz programı ile analiz edildi. Bu analizde LncRNA'ların Wnt ve EMT ile ilişkili proteinler ile kodlanan ve kodlanmayan genler arasındaki ilişkiler, fiziksel bağlanma, doğrudan düzenlenme, ekspresyon kontrolü, promotöre bağlanma ve miRNA ile etkileşimleri belirlendi. İlgili moleküller için ağ ve yolak haritası çıkarıldı.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

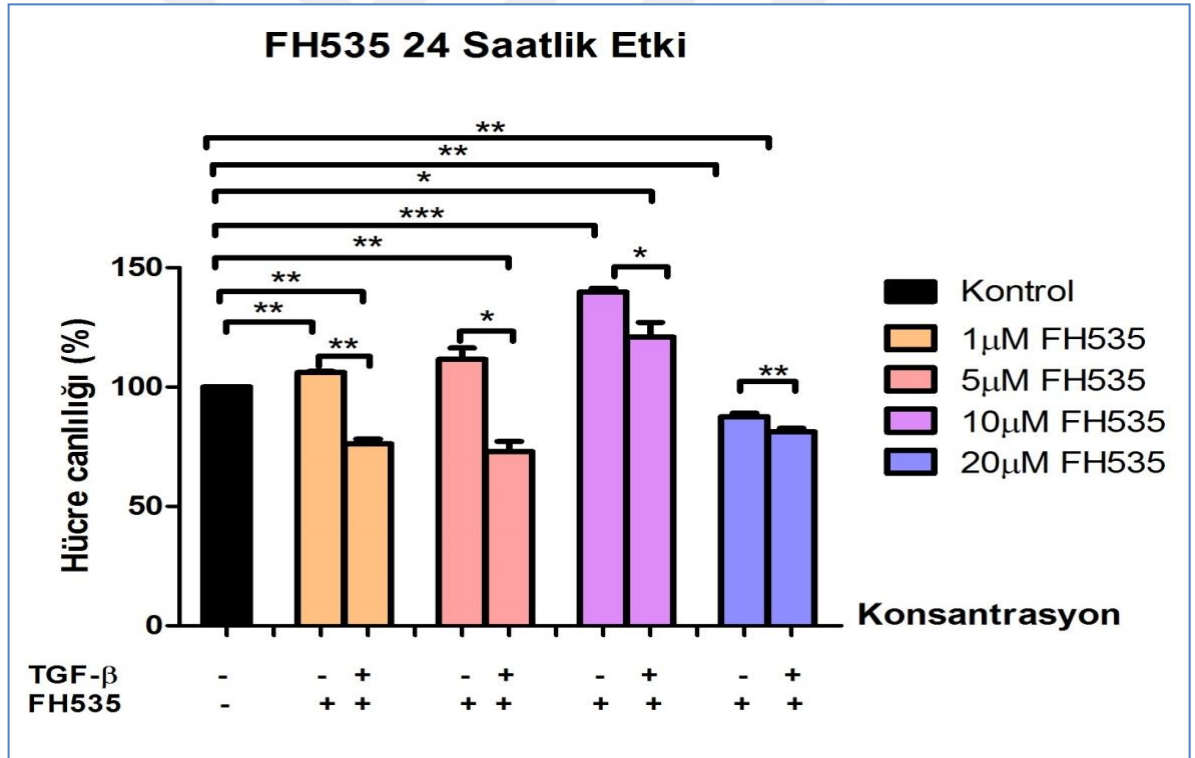
MTT, AO/EB boyama, QRT-PCR ve Western emdirimi bulgularının istatistiksel olarak anlamlılığı Graphpad Prism 5.0 programı ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılığına bakılan gruplar arasındaki karşılaştırmalar One way Anova ve Student *T*-testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak değeri 0.05'ten küçük olan farklılıklar ($p < 0.05$; $p < 0.01$ ve $p < 0.001$) anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1.HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI

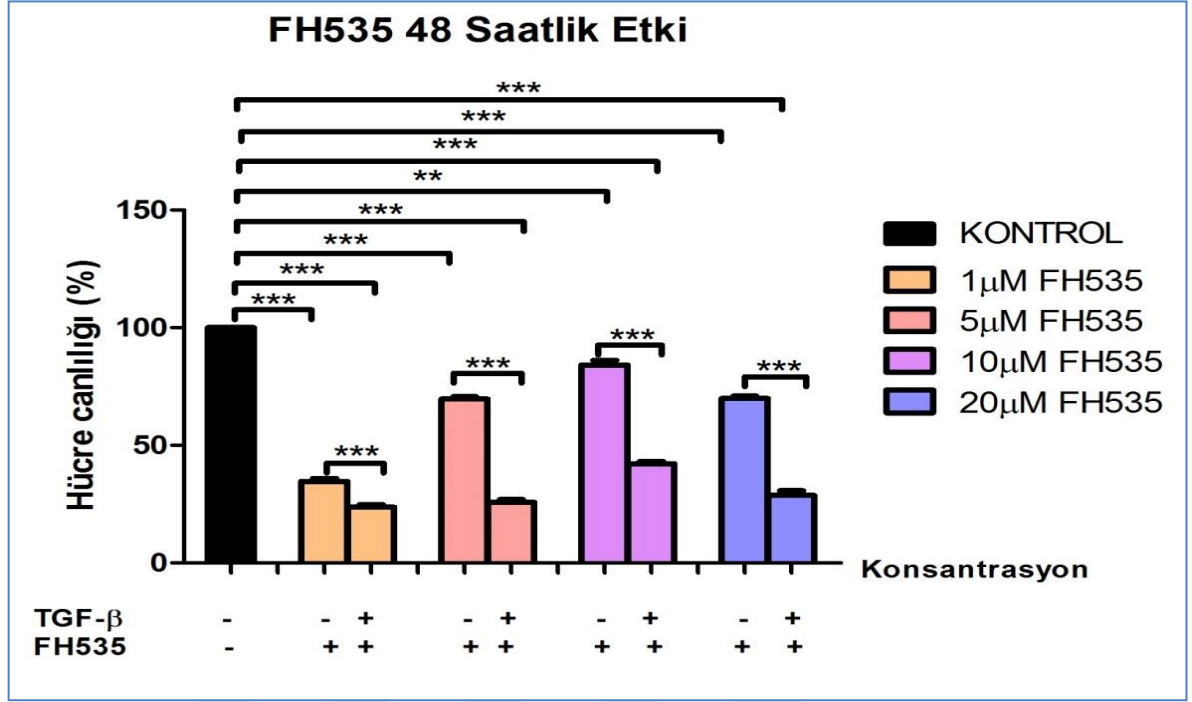
4.1.1. MTT Bulguları

Farklı konsantrasyonlarda (1, 5 ve 10 μ M) FH535 uygulamalarını takip eden 24 saat sonunda A549 hücrelerinin canlılığında kontrole (0. saat) kıyaslandığında olumsuz bir etkinin olmadığı, sadece 20 μ M konsantrasyonda FH535 uygulamalarının 24.saatın sonunda hücre canlılığını % 87,5'e düşürdüğü saptandı. TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde ise 1 ve 5 μ M FH535 uygulamalarını takip eden 24 saat sonunda hücre canlılığının kontrolle kıyaslandığında % 70'lere; 20 μ M FH535 uygulamasında ise kontrole kıyasla hücre canlılığının % 81'e düştüğü belirlendi (Şekil 4.1:).



Şekil 4.1: 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonlardaki FH535'in hücre canlılığı üzerindeki 24 saatlik etkisi. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$.

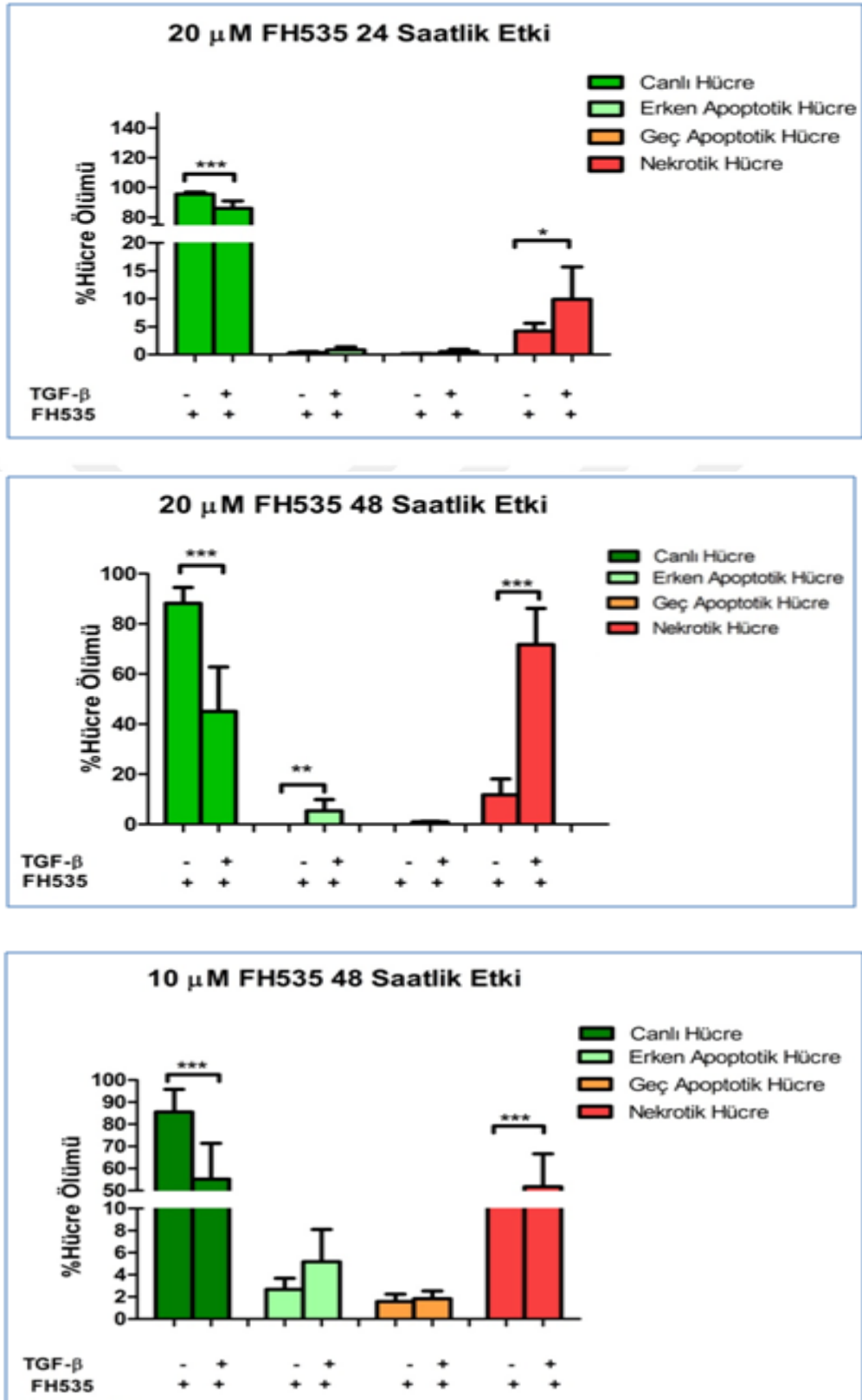
TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, farklı konsantrasyonlardaki FH535 uygulamaları, 48.saatın sonunda, hücre canlılığının kontrolle kıyaslandığında %50'nin altına düşürdü (Şekil 4.2:). Bu nedenle, deneyde FH535'in 24 saatlik inhibitör etkisinin değerlendirilmesine karar verildi.



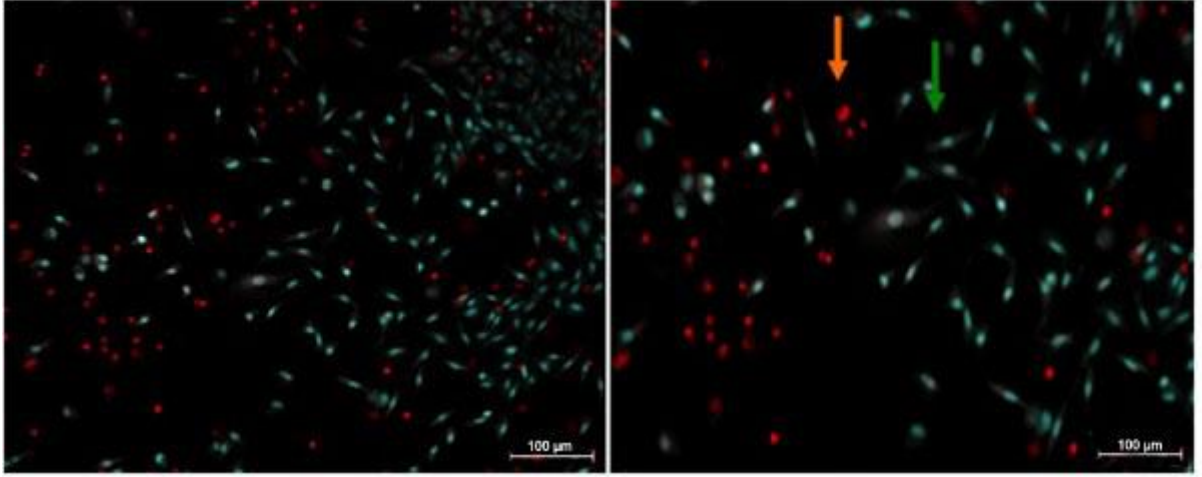
Şekil 4.2: 1µM, 5 µM, 10 µM ve 20 µM konsantrasyonlardaki FH535'in canlılık üzerine 48 saatlik etkisi. Anlamlılık p değerleri: ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$.

4.1.2. AO/EB Boyama Yöntemi Bulguları

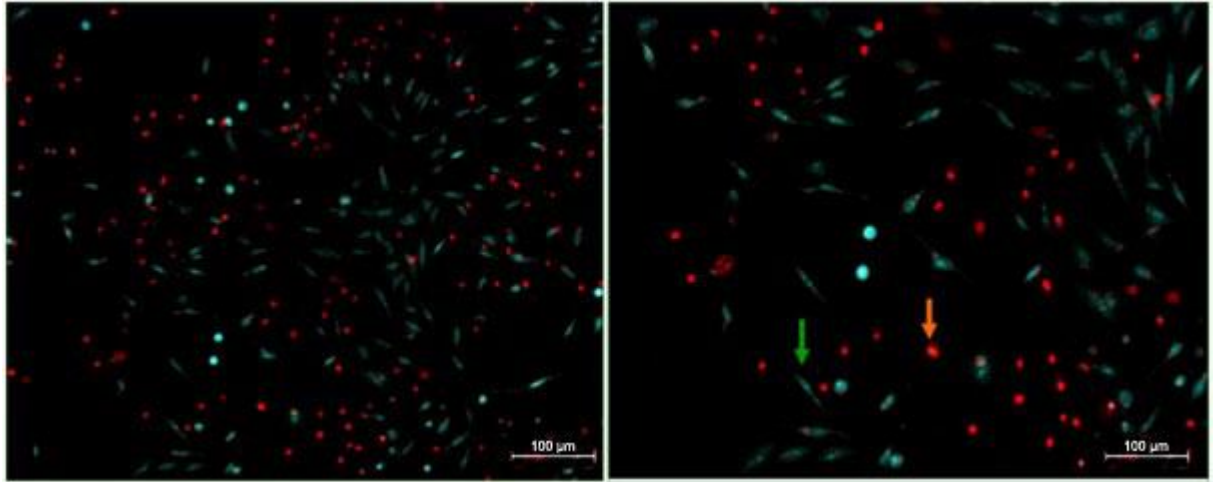
AO/EB boyamaları ile hücre bütünlüğü bozulmamış canlı hücreler ve apoptotik blebler içeren erken apoptotik hücreler AO ile yeşil renk ışıma verirken; apoptotik blebler içeren geç apoptotik hücreler ve hücre bütünlüğü bozulmamış nekrotik hücreler EB ile kırmızı renkte ışıma verir. 20µM FH535'in 24 saatlik etkisinde, hücrelerin % 85.9'unun canlı, % 9.89'unun nekrotik ve geri kalanının apoptotik süreçlerde olduğu belirlendi. Ölmekte olan hücrelerde nekrotik ölüm tipi baskındı. Ancak, TGF-β ile uyarılan A549 hücrelerinde 10 ve 20 µM FH535'in 48 saatlik etkisi, FH535'in 24 saatlik etkisiyle kıyaslandığında canlı hücre oranının % 55-45'e düştüğü, % 51-71 oranda da nekrotik ve daha az olmak üzere apoptotik hücrelerin varlığı saptandı. Sonuç olarak hücreler, TGF-β ile uyarılan A549 hücrelerinde FH535 uygulamaları sonrası uygulamayı takip eden 48 saatte hücre canlılıklarını büyük ölçüde kaybetmekte, baskın olarak nekroz ile ölmektedirler (Şekil 4.3- 9:).



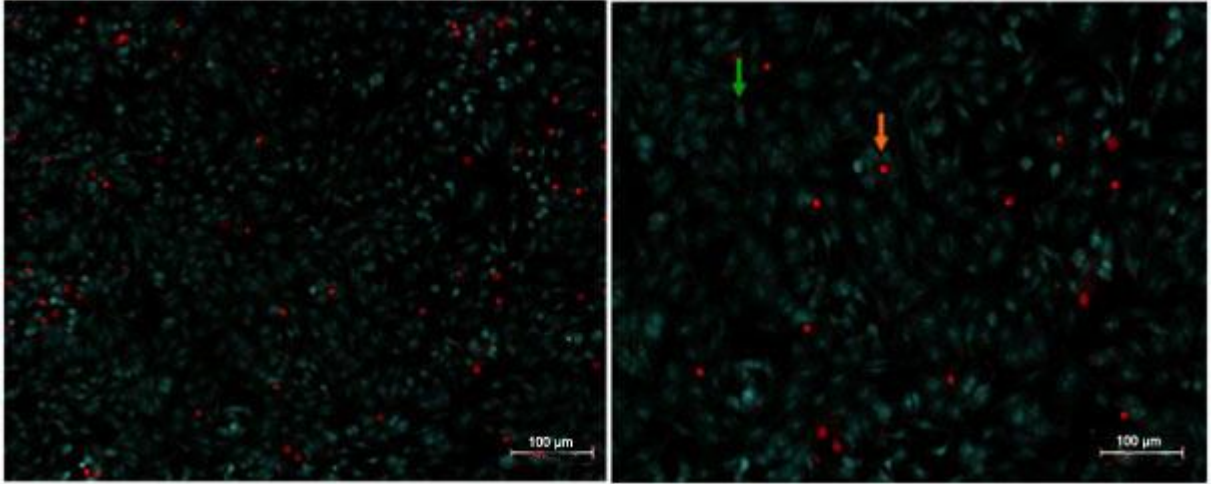
Şekil4.3: A549 hücrelerinde 10 ve 20 μ M FH535 uygulamalarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0.05$ ve *** $p < 0.001$.



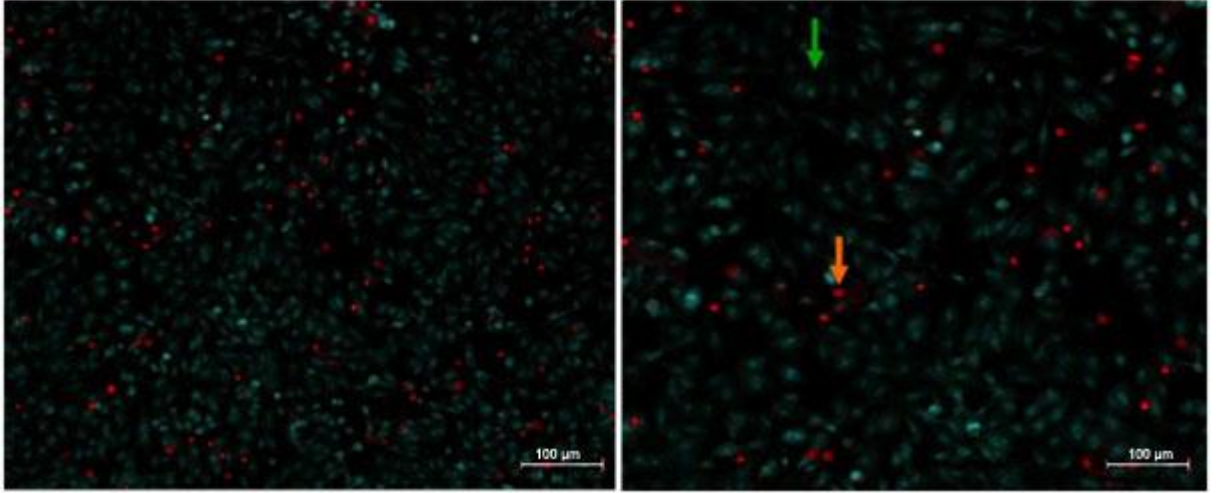
Şekil 4.4: A549 hücrelerinde 10 μ M FH535 uygulamasının 48. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi (100 μ m bar büyüklüğü).



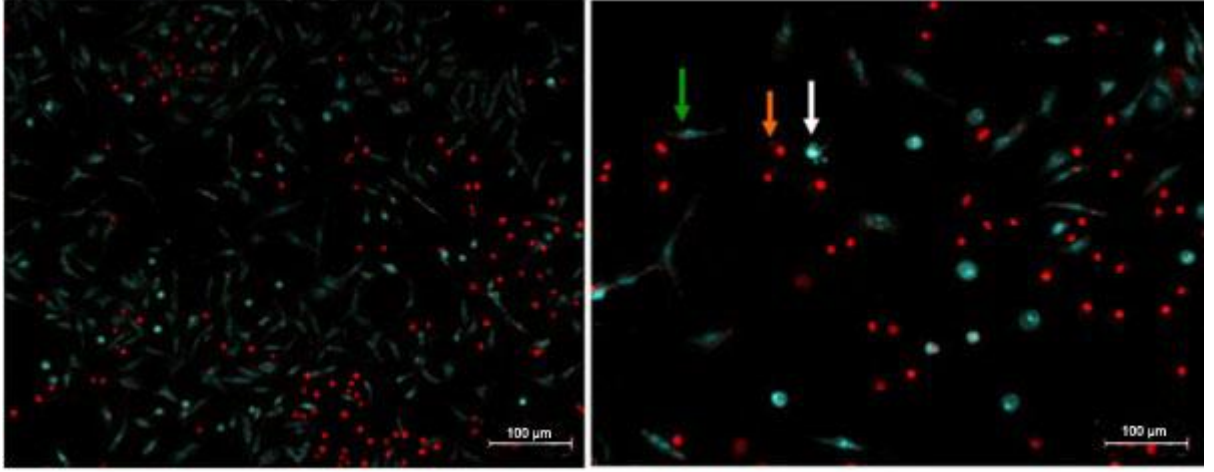
Şekil 4.5: TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde 10 μ M FH535 uygulamasının 48. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi (100 μ m bar büyüklüğü).



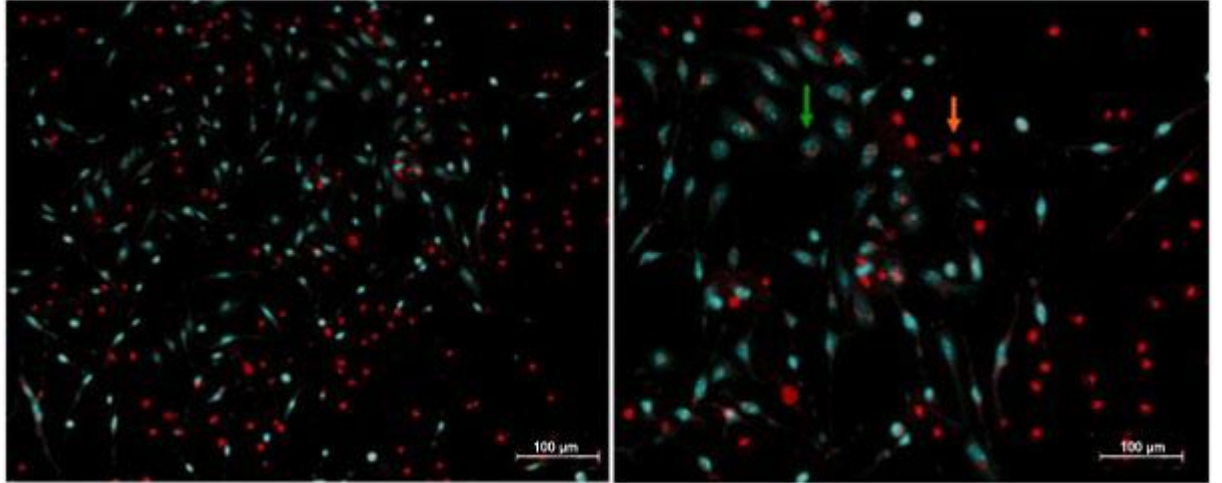
Şekil 4.6: A549 hücrelerinde 20 μ M FH535 uygulamasının 24. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi (100 μ m bar büyüklüğü).



Şekil 4.7: TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde 20 μ M FH535 uygulamasının 24. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi (100 μ m bar büyüklüğü).



Şekil 4.8: A549 hücrelerinde 20 μM FH535 uygulamasının 48. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok), erken apoptotik (beyaz ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi (100 μm bar büyüklüğü).



Şekil 4.9: TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde 20 μM FH535 uygulamasının 48. saatinde AO/EB boyaması ile canlı (yeşil ok) ve nekrotik (kırmızı ok) hücrelerin gösterilmesi (100 μm bar büyüklüğü).

4.2. QRT-PCR BULGULARI

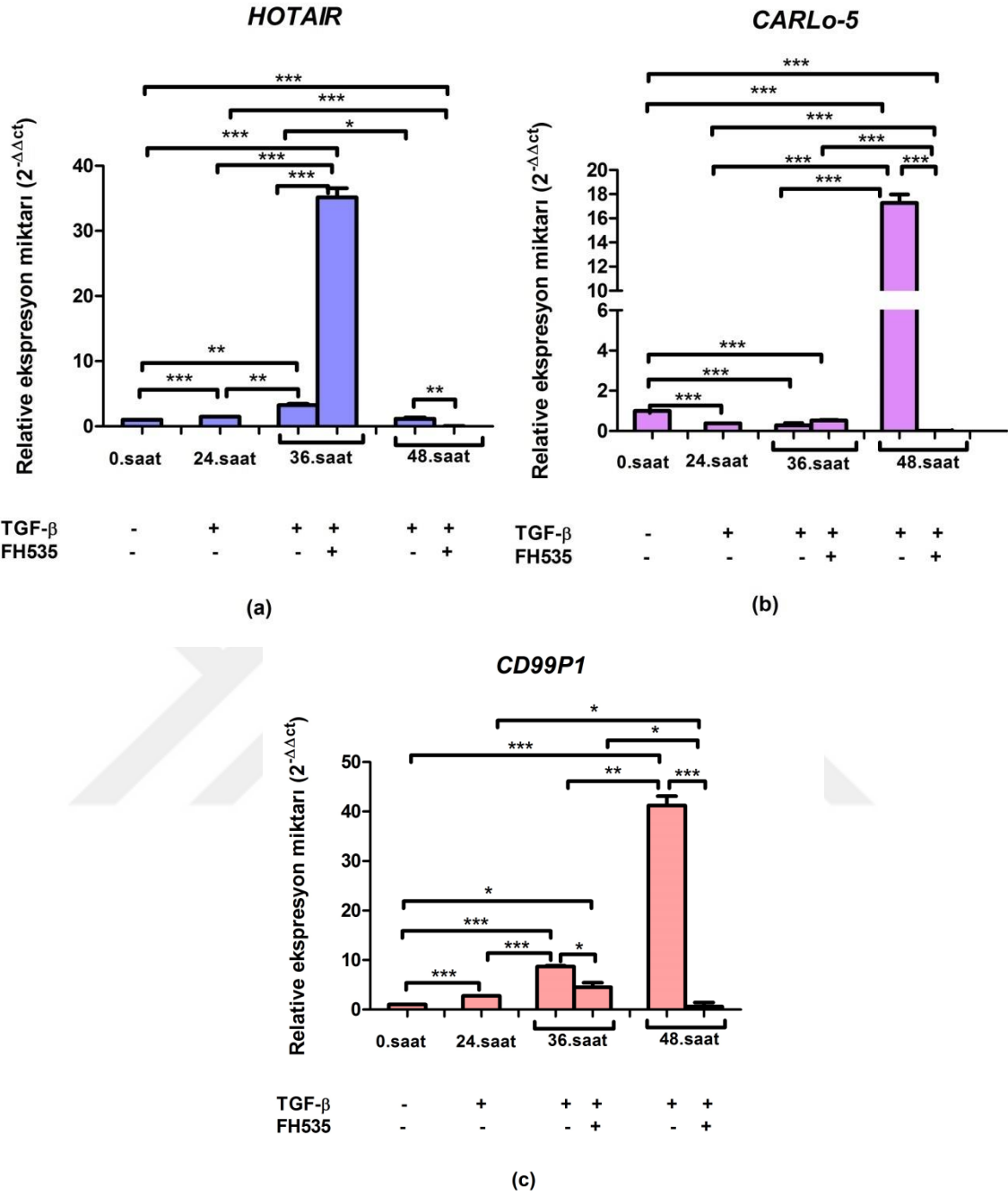
TGF- β uygulamaları A549 hücrelerinde, zamana bağlı olarak deneyin 36. saatine kadar *HOTAIR* ekspresyonunu arttırırken, deneyin 48. saatinde *HOTAIR* ekspresyonu azalttı; bu azalma 36. saate göre anlamlıyken 0 ve 24. saatlerle karşılaştırıldığında herhangi bir anlamlılık taşımadığı belirlendi. FH535 uygulamaları, TGF- β tarafından uyarılan A549 hücrelerinde *HOTAIR* ekspresyonunun 36. saatte önemli ve anlamlı miktarlarda artmasına neden olurken

deneyin 48. saatinde ise, FH535 inhibitörünün 24 saatlik etkisinde, *HOTAIR* ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. FH535 uygulamasıyla beraber inhibitörün 12 saatlik etkisinde *HOTAIR* ekspresyonunun arttığı, FH535'in 24 saatlik etkisinde ise artan bu ekspresyonun anlamlı derecede düştüğü görüldü (**Şekil 4.10a:**).

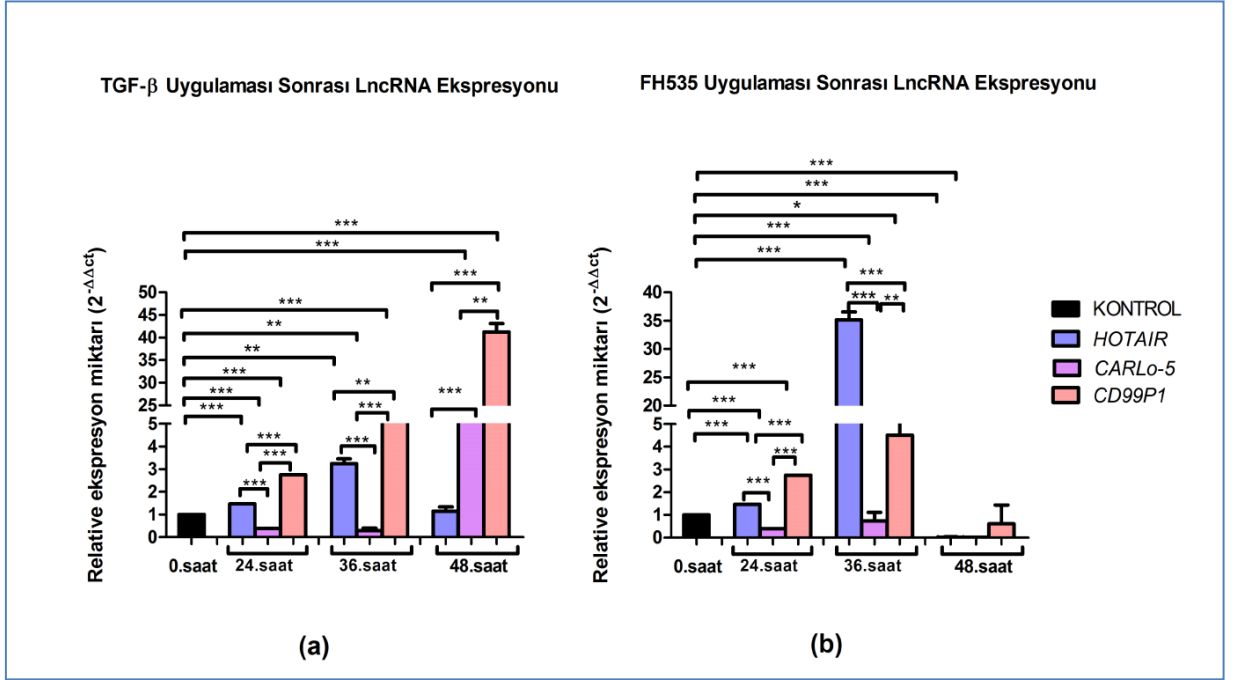
TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde deneyin 24. ve 36. saatlerinde *CARLo-5* ekspresyon seviyesinin kontrole kıyaslandığında azaldığı, ancak deneyin 48.saatinde bu azalmanın tam tersi ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu görüldü. TGF- β uyarımının 24. saatinde gerçekleştirilen FH535 uygulamasının ise 12 saatlik etkisinin *CARLo-5* ekspresyonunu değiştirmedığı, ancak 24 saatlik etkisinin inhibisyona bağlı olarak *CARLo-5* ekspresyonunu önemli derecede azalttığı bulundu (**Şekil 4.10b:**).

A549 hücrelerinde TGF- β uyarımıyla birlikte *CD99P1* ekspresyonu zamana bağlı olarak artarken, FH535 uygulamasının ardından inhibisyona paralel olarak zamana bağlı artmış olan *CD99P1* ekspresyonu anlamlı bir biçimde azaldı (**Şekil 4.10c:**).

Tek başına TGF- β uygulamasında *HOTAIR* ekspresyonu 24 ve 36.saatlerde artış gösterirken 48.saatte azaldı; *CARLo-5* ekspresyonu deneyin 48. saatinde, *CD99P1* ekspresyonu ise deneyin 24, 36 ve 48. saatlerinde zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttı (**Şekil 4.11a:**). TGF- β uyarımını takip eden 24. saatteki FH535 uygulaması sonrasında, FH535'in 12 saatlik etkisinde, *HOTAIR* ekspresyonu pik yaparken, *CARLo-5* ekspresyonu değişmemiş ve *CD99P1* ekspresyonu ise anlamlı bir şekilde düştü. FH535'in 24 saatlik etkisinde ise tüm LncRNA'ların ekspresyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (**Şekil 4.11b:**).

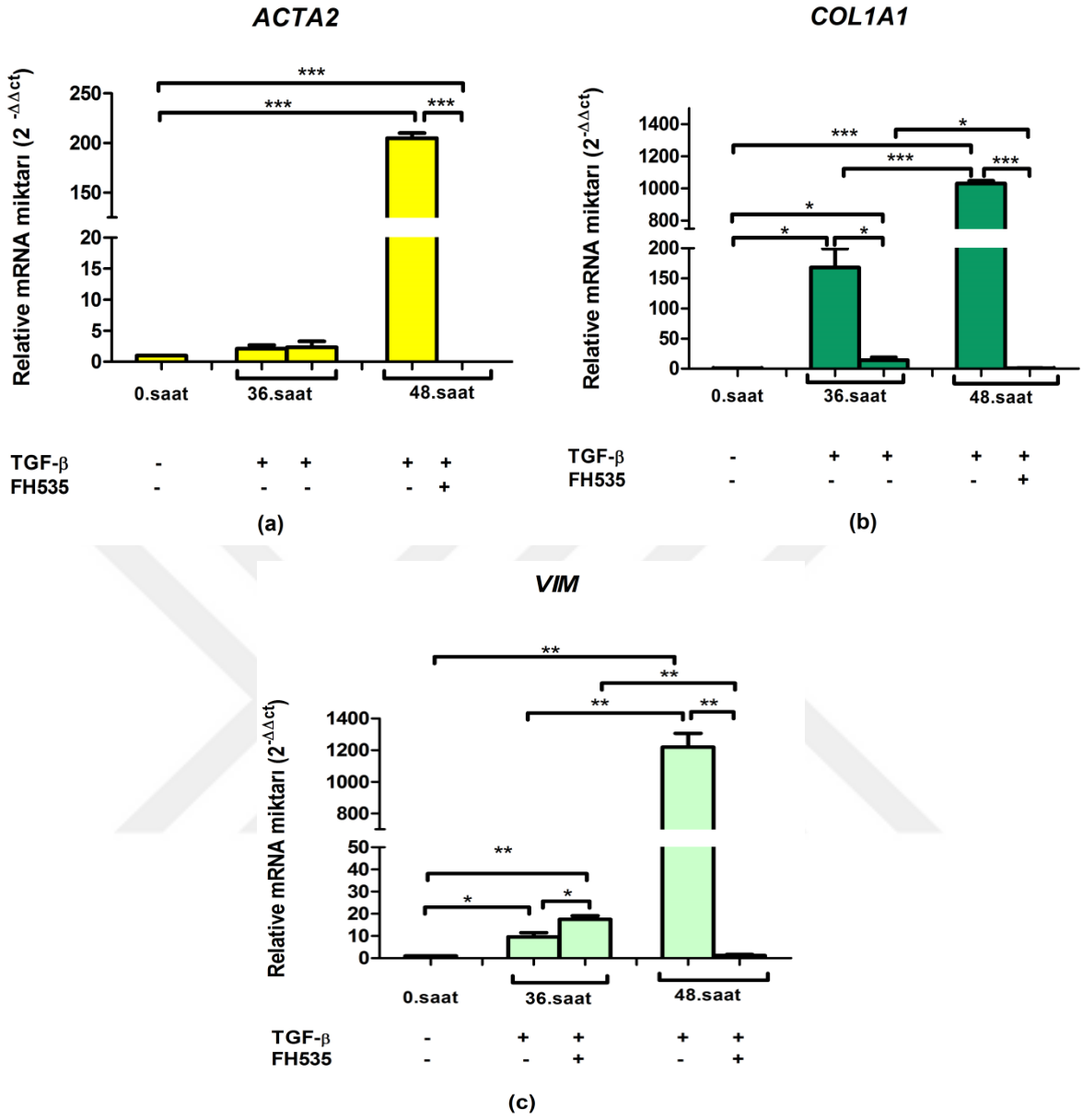


Şekil 4.10: A549 hücrelerinde *HOTAIR* (a), *CARLo-5* (b) ve *CD99P1* (c) gen ekspresyonlarındaki değişimler. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$.

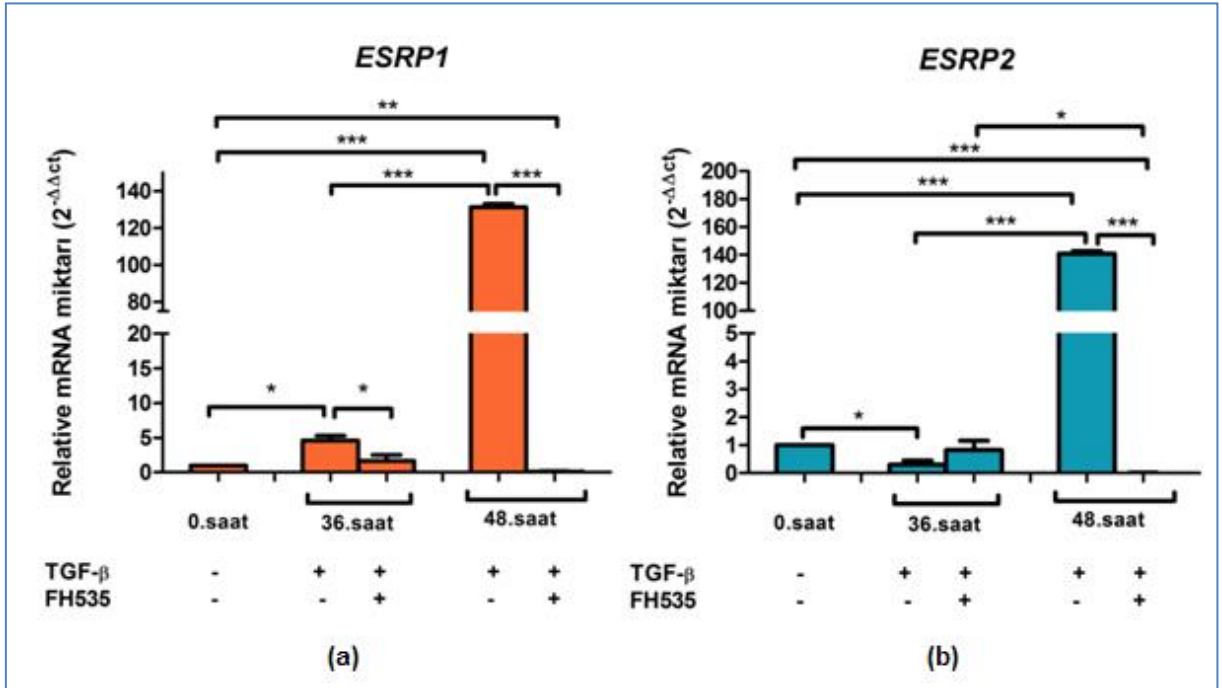


Şekil 4.11: A549 hücrelerinde TGF-β (a) ve 20μM FH535 (b) uygulamaları sonrası *HOTAIR*, *CARLo-5* ve *CD99P1* ekspresyonlarının zamana bağlı değişimleri. Anlamlılık p değerleri: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$.

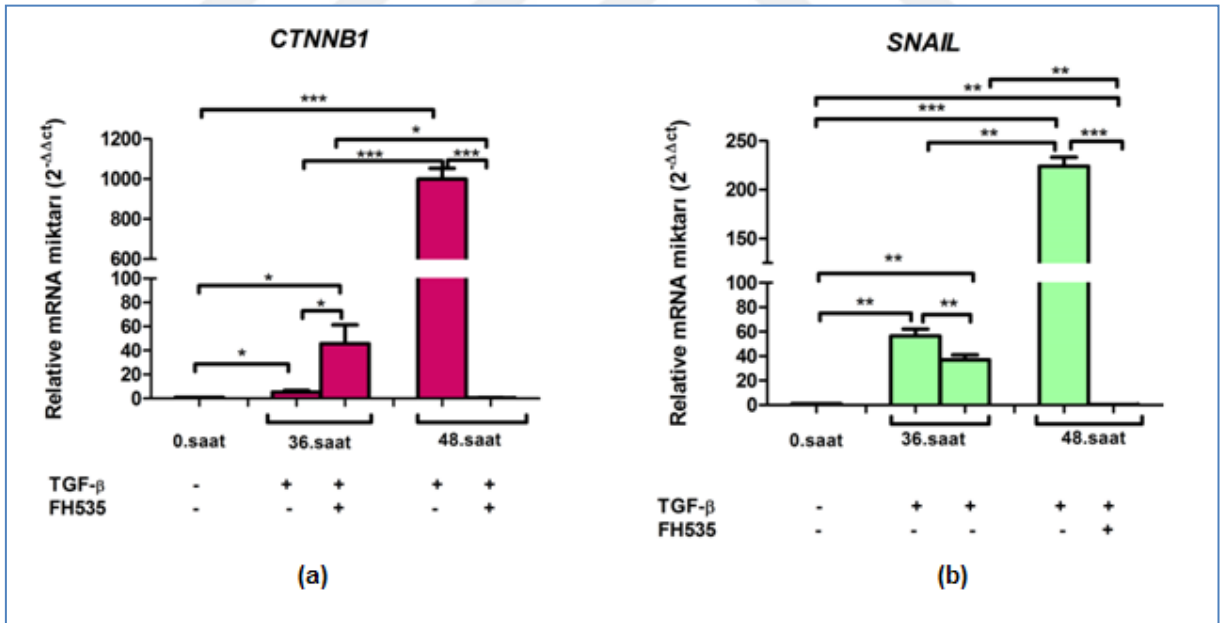
TGF-β uygulamalarının A549 hücrelerinde *ACTA2*, *COL1A1*, *VIM*, *ESRP1*, *ESRP2*, *CTNNB1*, *SNAIL*, *TCF4* ve *LEF1* genlerinin ekspresyonlarını uyardığı bulundu. Bu uyarımın deneyin 48. saatinde maksimuma ulaştığı saptandı. TGF-β ile uyarılan A549 hücrelerinde FH535 uygulamalarının, artan gen ekspresyonlarını genel olarak anlamlı ölçüde azalttığı belirlendi. FH535'in 12 saatlik inhibitör etkisinde TGF-β tarafından uyarılan *COL1A1*, *ESRP1* ve *SNAIL* gen ekspresyonlarının azaldığı, *CTNNB1*, *VIM*, *ESRP2* ve *LEF1* gen ekspresyonunun arttığı, *ACTA2* ve *TCF4* gen ekspresyonunun ise değişmediği görüldü. FH535'in 24 saatlik inhibitör etkisinde ise *ACTA2*, *COL1A1*, *VIM*, *ESRP1*, *ESRP2*, *CTNNB1*, *SNAIL*, *TCF4* ve *LEF1* gen ekspresyonlarının anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi (Şekil 4.12-15:).



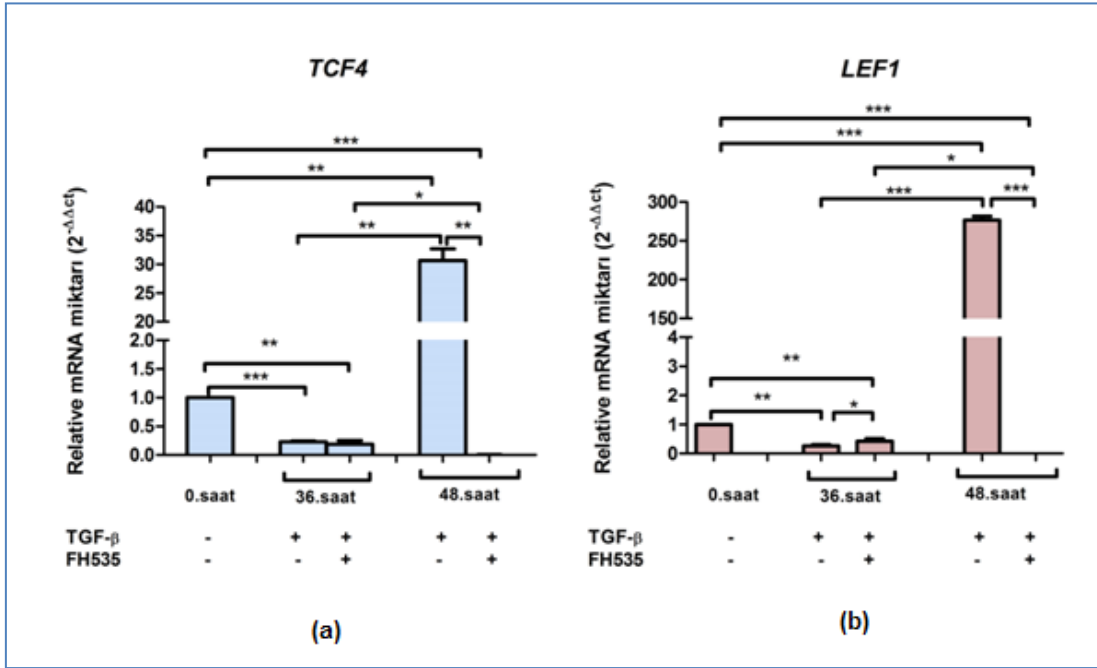
Şekil 4.12: A549 hücrelerinde *ACTA2* (a), *COL1A1* (b) ve *VIM* (c) genlerinin ekspresyonundaki değişimler. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$.



Şekil 4.13: A549 hücrelerinde *ESRP1* (a) ve *ESRP2* (b) gen ekspresyonundaki değişimler. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$.



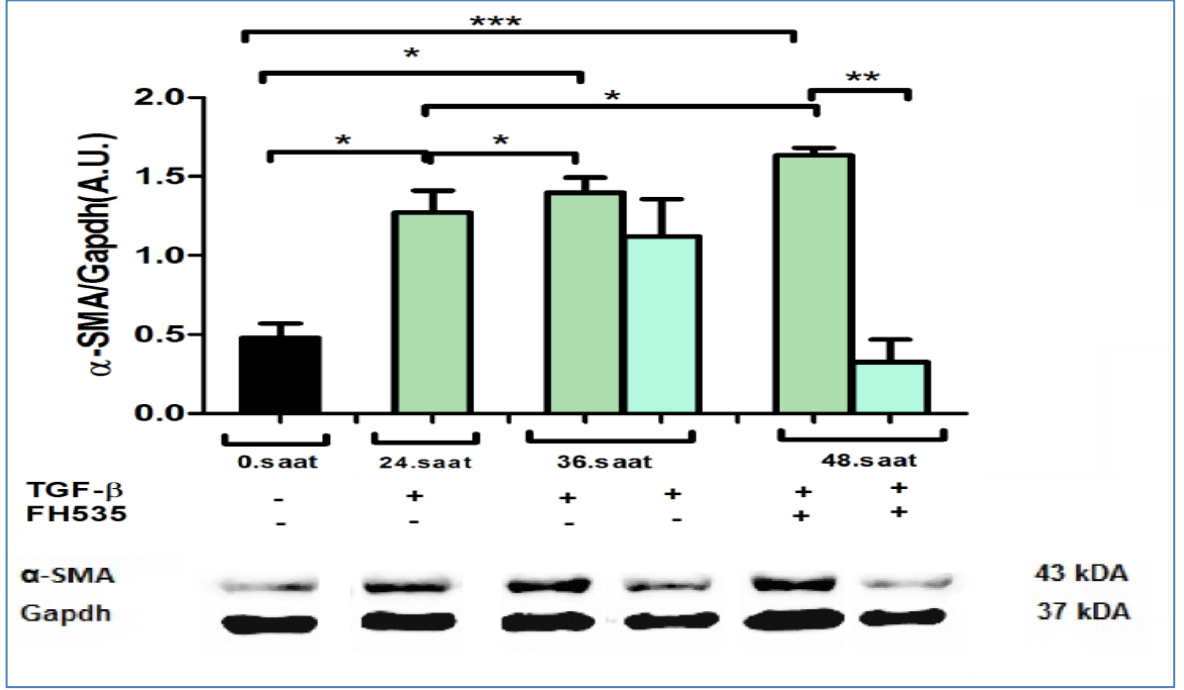
Şekil 4.14: A549 hücrelerinde *CTNNB1* (a) ve *SNAIL* (b) gen ekspresyonundaki değişimler. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$.



Şekil 4.15: A549 hücrelerinde *TCF4* (a) ve *LEF1* (b) gen ekspresyonundaki değişimler. Anlamlılık p değerleri: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$.

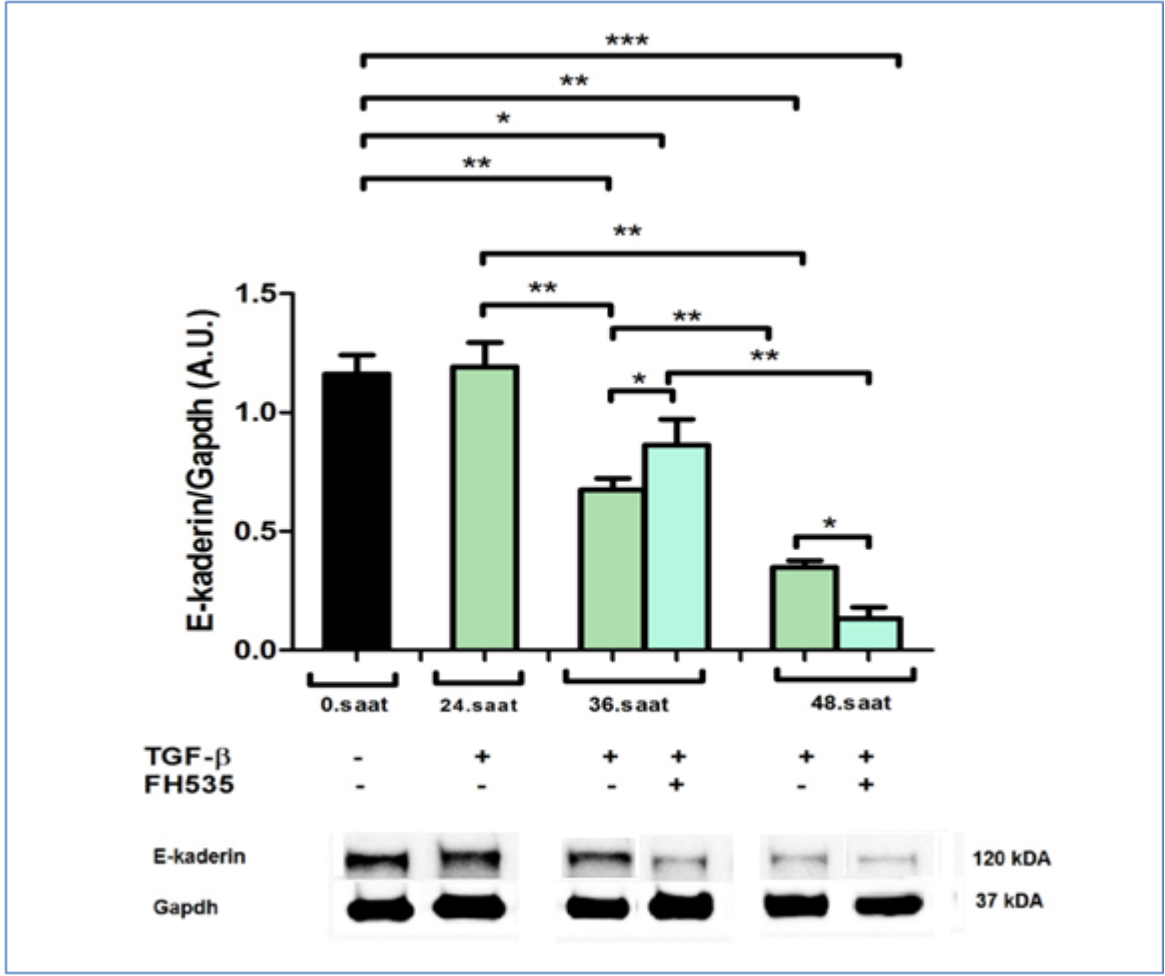
4.3. WESTERN EMDİRİMİ BULGULARI

TGF- β ile uyarımın 24, 36 ve 48. saatlerinde zamana bağlı olarak α -SMA protein miktarında 0. saate kıyasla bir artma gözlemlenirken, inhibitörlü grubun 36 ve 48. saatlerinde α -SMA miktarında azalma olduğu bulundu (Şekil 4.16:).



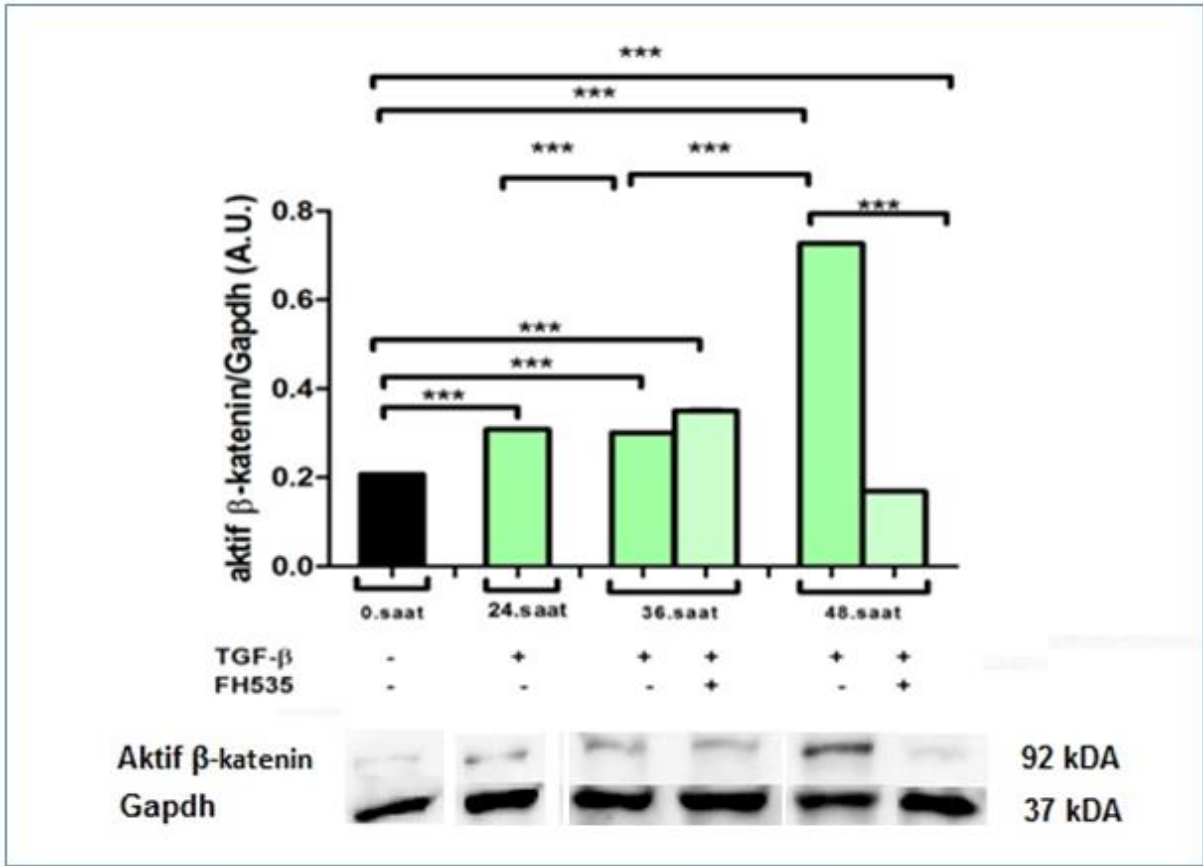
Şekil 4.16: TGF- β ve FH535 uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde α -SMA protein miktarlarındaki değişiklikler ve α -SMA protein bandları gösterilmiştir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0.05$ ve ** $p<0.01$.

A549 hücrelerinin TGF- β ile uyarımı sonrası zamana bağlı olarak E-kaderin protein miktarının azaldığı tespit edildi. FH535'in 12 saatlik etkisinde TGF- β tarafından azaltılmış olan E-kaderin miktarının anlamlı şekilde arttığı, ancak FH535'in 24 saatlik etkisinde ise E-kaderin miktarının azaldığı belirlendi (Şekil 4.17:).



Şekil 4.17: TGF- β ve FH535 uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde E-kaderin protein miktarlarındaki değişiklikler ve E-kaderin protein bandları gösterilmiştir. Anlamlılık p değerleri: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$.

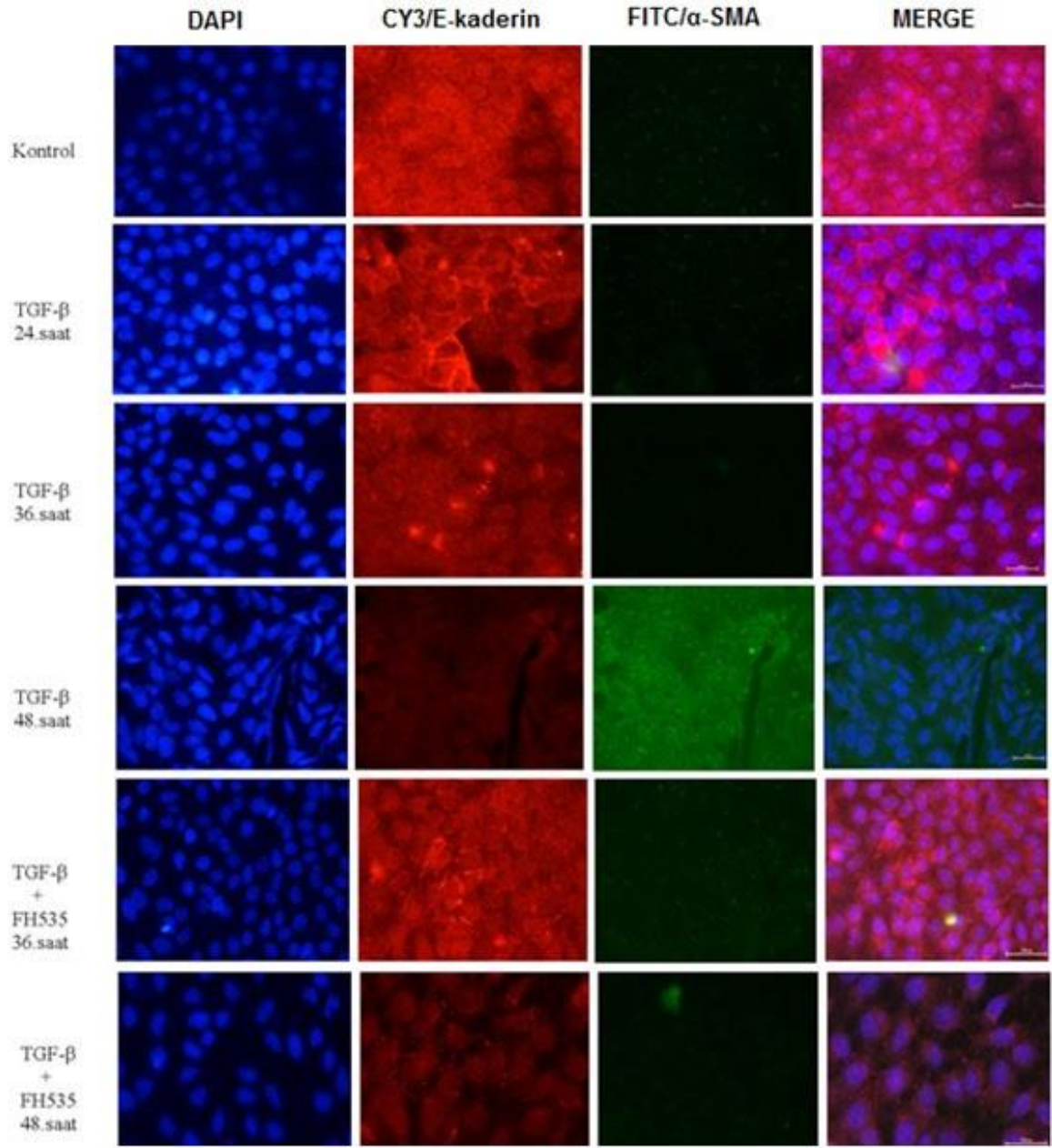
TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde uyarımın 24, 36 ve 48. saatlerinde aktif β -katenin proteininin miktarı artarken, FH535 uygulaması ile inhibitörün 24 saatlik etkilerinde aktif β -katenin protein miktarının azaldığı tespit edildi (**Şekil 4.18:**).



Şekil 4.18: TGF- β ve FH535 uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde aktif β -katenin protein miktarlarındaki değişiklikler ve aktif β -katenin protein bandları gösterilmiştir. Anlamlılık p değeri: *** $p < 0.001$.

4.4. IF BULGULARI

A549 hücrelerinde TGF- β ile uyarım sonrasında α -SMA miktarının zamana bağlı arttığı, FH535'in ise artan α -SMA miktarını inhibitör uygulamalarının 12 ve 24.saatlerinde azalttığı immunfloresan boyama ile gösterilmiştir. E-kaderin miktarı TGF- β uygulamasının 24, 36 ve 48.saatlerini takiben azalırken, FH535 uygulaması da 48.saat de E-kaderin miktarını azalttı (Şekil 4.19:).



Şekil 4.19: TGF- β ve FH535 uygulamaları sonrası A549 hücrelerinde α -SMA (FITC) ve E-kaderin (Cy3) proteinlerinin immünfleurosan işretlenmesi (100 μ m bar büyüklüğü).

4.5. BİYOİNFORMATİK ANALİZ BULGULARI

LncRNA-miRNA etkileşimleri LncTar analiz programında yapılarak, HOTAIR, CARLo-5 ve CD99P1 LncRNA'larının Wnt, EMT ve pulmoner fibroziste etkili olduğu bilinen miRNA'lar ile ilişkileri araştırılmıştır. Aşağıdaki tabloda (**Tablo 4.1:**) LncTar programında kullanılan LncRNA ve miRNA erişim numaraları bulunmaktadır.

Tablo 4.1:LncRNA ve miRNA erişim numaraları.

HOTAIR	NR_047517.1	mir218-1	NR_029631.1
CARLo-5	NR_108049.1	mir218-2	NR_029632.1
CD99P1	NR_033380.1	mir29b-1	NR_029517.1
mir143	NR_029684.1	mir326	NR_029891.1
mir148a	NR_029597.1	mir34a	NR_029610.1
mir205	NR_029622.1	mir454	NR_030411.1
mir206	NR_029713.1	mir613	NR_030344.1
mir214	NR_029627.1	mir663b	NR_031608.1
mir217	NR_029630.1	mir7-1	NR_029605.1

LncTar programı kullanılarak yapılan analize göre HOTAIR'in, mir29b-1, mir218-1, mir218-2, mir206, mir663b, mir217, mir326, mir214, mir143, mir205, mir148a ve mir7-1 ile bağlanma bölgelerinin olduğu bulundu (**Tablo 4.2:**).

CARLo-5'in, mir29b-1, mir218-1, mir218-2, mir206, mir663b, mir217, mir326, mir214, mir148a, mir7-1, mir143, mir205 ve mir214 ile fiziksel etkileşimi vardır (**Tablo 4.3:**).

LncTar program analizi ile CD99P1'in mir29b-1, mir218-1, mir218-2, mir206, mir663b, mir217, mir326, mir214, mir613, mir148a, mir7-1, mir205 ve mir143 ile bağlanma bölgeleri ile etkileşimi tespit edildi (**Tablo 4.4:**).

Tablo 4.2: HOTAIR ile fiziksel olarak etkileşen miRNA'lar gösterilmiştir.

Query	Length_Query	Target	Length_Target	dG	ndG	Start_Position_Query	End_Position_Query	Start_Position_Target	End_Position_Target
NR_047517.1	2370	NR_029517.1	81	-12.13	-0.1838	1517	1597	1	81
NR_047517.1	2370	NR_029632.1	110	-14.22	-0.1598	172	281	1	110
NR_047517.1	2370	NR_029631.1	110	-12.25	-0.1408	47	156	1	110
NR_047517.1	2370	NR_031608.1	115	-23.67	-0.2367	340	454	1	115
NR_047517.1	2370	NR_029630.1	110	-11.96	-0.1259	1473	1582	1	110
NR_047517.1	2370	NR_029891.1	95	-20.39	-0.2683	2	96	1	95
NR_047517.1	2370	NR_029627.1	110	-16.33	-0.2437	1609	1718	1	110
NR_047517.1	2370	NR_029597.1	68	-10.39	-0.2165	164	231	1	68
NR_047517.1	2370	NR_029605.1	110	-11.60	-0.1261	335	444	1	110
NR_047517.1	2370	NR_029684.1	106	-17.79	-0.1873	1095	1200	1	106
NR_047517.1	2370	NR_029622.1	110	-17.37	-0.2093	1428	1537	1	110
NR_047517.1	2370	NR_029627.1	110	-16.33	-0.2437	1609	1718	1	110

Tablo 4.3: CARLo-5 ile fiziksel olarak etkileşen miRNA'lar gösterilmiştir.

Query	Length_Query	Target	Length_Target	dG	ndG	Start_Position_Query	End_Position_Query	Start_Position_Target	End_Position_Target
NR_108049.1	2795	NR_029517.1	81	-11.14	-0.1428	1223	1303	1	81
NR_108049.1	2795	NR_029632.1	110	-11.68	-0.2049	1222	1331	1	110
NR_108049.1	2795	NR_029631.1	110	-9.97	-0.1146	1498	1607	1	110
NR_108049.1	2795	NR_031608.1	115	-16.28	-0.1985	954	1068	1	115
NR_108049.1	2795	NR_029630.1	110	-9.46	-0.1296	507	616	1	110
NR_108049.1	2795	NR_029891.1	95	-14.68	-0.3262	1782	1876	1	95
NR_108049.1	2795	NR_029627.1	110	-14.23	-0.1355	1858	1967	1	110
NR_108049.1	2795	NR_029597.1	68	-9.20	-0.1586	405	472	1	68
NR_108049.1	2795	NR_029605.1	110	-14.33	-0.1541	1661	1770	1	110
NR_108049.1	2795	NR_029684.1	106	-14.44	-0.1641	371	476	1	106
NR_108049.1	2795	NR_029622.1	110	-13.93	-0.1393	657	766	1	110
NR_108049.1	2795	NR_029627.1	110	-14.23	-0.1355	1858	1967	1	110

Tablo 4.4:CD99P1 ile fiziksel olarak etkileşen miRNA'lar gösterilmiştir.

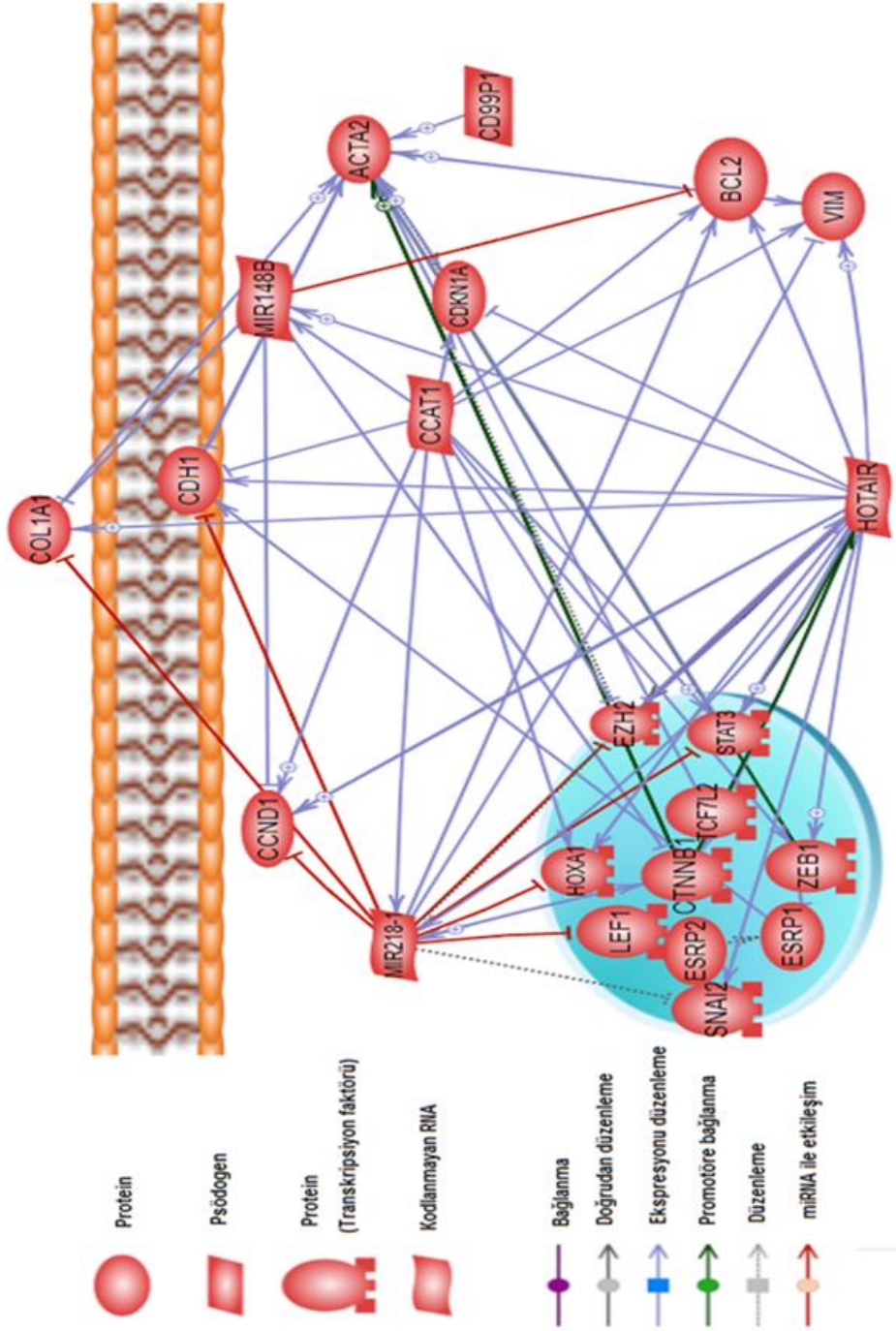
Query	Length_Query	Target	Length_Target	dG	ndG	Start_Position_Query	End_Position_Query	Start_Position_Target	End_Position_Target
NR_033380.1	2915	NR_029517.1	81	-11.77	-0.1509	1559	1639	1	81
NR_033380.1	2915	NR_029631.1	110	-13.16	-0.1357	143	252	1	110
NR_033380.1	2915	NR_029632.1	110	-20.81	-0.2191	59	168	1	110
NR_033380.1	2915	NR_029713.1	86	-13.61	-0.2127	50	135	1	86
NR_033380.1	2915	NR_031608.1	115	-28.39	-0.2704	34	148	1	115
NR_033380.1	2915	NR_029630.1	110	-12.67	-0.2640	181	290	1	110
NR_033380.1	2915	NR_029891.1	95	-25.87	-0.5624	45	139	1	95
NR_033380.1	2915	NR_029627.1	110	-15.25	-0.1495	167	276	1	110
NR_033380.1	2915	NR_030344.1	95	-14.43	-0.1924	63	157	1	95
NR_033380.1	2915	NR_029622.1	110	-13.56	-0.1559	1566	1675	1	110
NR_033380.1	2915	NR_029684.1	106	-16.37	-0.1605	158	263	1	106
NR_033380.1	2915	NR_029597.1	68	-11.07	-0.2214	2618	2685	1	68
NR_033380.1	2915	NR_029605.1	110	-13.22	-0.1406	79	188	1	110

CD99P1'in mir218-1 ve mir148b miRNA'ları başta olmak üzere HOTAIR ve CARLo-5 ile ortak olarak etkileştiği birçok miRNA bulunmaktadır.

Pathway Studio analiz programından elde edilen verilere göre *HOTAIR*, *CARLo-5* ve *CD99P1* LncRNA'ları ile Wnt ve EMT ile ilişkili gen ve proteinle arasındaki ilişkiler şöyle sıralanabilir:

1. *HOTAIR*'ın *CTNNB1*, *ZEB1*, *SNA2*, *EZH2*, *STAT3*, *COL1A1*, *VIM* ve *CDH1* genleri ile doğrudan ilişkisinin olduğu, mir148b ve mir218-1 miRNA'ları aracılığıyla da *SNAIL* ve *LEF1* genlerinin ekspresyonunu kontrol ettiği bulundu.
2. *CARLo-5* (*CCAT1*) LncRNA'sının *ZEB1*, *VIM*, *CDH1*, *EZH2* ve *STAT3* genleriyle doğrudan etkileştiği; *HOTAIR* gibi mir148b ve mir218-1 miRNA'ları aracılığıyla da *CTNNB1*, *COL1A1* ve *LEF1* genlerinin ekspresyonlarını uyarma yönünde düzenlediği bulundu.
3. *CD99P1* LncRNA'sının ise sadece *ACTA2* ile etkileştiği görülmektedir.

Sonuç olarak, Pathway Studio analiz verilerine göre, *HOTAIR* ve *CARLo-5* LncRNA'larının Wnt ve EMT sinyal yolu ile ilişkili olan transkripsiyon faktörleri, ko-aktivatörler, diğer etkili gen/protein ve miRNA'lar ile etkileşerek, *CD99P1*'in ise direkt *ACTA2* gen ekspresyonunun kontrolü ile miyofibroblast farklılaşmasını düzenledikleri belirlenmiştir (**Şekil 4.20:**).



Şekil 4.20: *HOTAIR*, *CARLo-5* ve *CD99P1* lncRNA'ları ile Wnt sinyali ve EMT ile ilişkili gen ve proteinler arasındaki ilişki

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Miyofibroblastlar pekçok fibrotik hastalıkta olduğu gibi IPF’de de fibrotik lezyonların oluşumunda etkili hücrelerdir. Miyofibroblastlar, fibrotik şartlarda apoptoza karşı gösterdikleri direnç ve kollagen, fibronektin gibi ECM elemanlarını çok miktarda üretmeleri nedeniyle fibrotik odakların oluşumundan birinci derecede sorumludurlar (Yılmaz ve diğ., 2015). Patolojik sinyaller akciğerdeki fibroblastların, inaktif fibrositlerin, bazı lökositlerin, kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücrelerin ve pnömositlerin miyofibroblastlara farklılaşmasına neden olur (Phan, 2002). TGF- β , miyofibroblast farklılaşmasını kontrol eden önemli moleküllerden biridir. IPF hastalarının akciğerlerinde pnömositlerde ve alveolar makrofajlarda TGF- β üretiminin arttığı gözlenmiştir (Khalil ve diğ., 1991). Alveolar makrofajlar, nötrofiller, pnömositler, endotel hücreleri ve fibroblastlar tarafından üretilen TGF- β , platelet kökenli büyüme faktörü (**PDGF**) sentezini uyararak fibroblastların TNF- α , interlökin-1b ve interlökin-13 gibi proinflatuvar ve fibrotik sitokinleri üretmelerine neden olur. Başta TGF- β olmak üzere, üretilen bu moleküller fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşmasını uyarır (Fernandez ve Eickelberg, 2012). Ayrıca, TGF- β , kollagen genlerinin transkripsiyonunu uyararak ve matriks metalloproteinazlar ile onları düzenleyen proteinlerin aktivitelerini kontrol ederek, ECM devinimini düzenler ve fibrozis oluşumunu sağlarlar (Ovet ve Oztay, 2014; Oruçaj ve diğ., 2015). İntratrakeal yoldan bleomisin uygulanan farelerde, TGF- β sinyalinin inhibisyonunun fareleri pulmoner fibroze karşı koruduğu rapor edilmektedir (Warburton ve diğ., 2013). Diğer yandan, IPF’li hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda TGF- β varlığında pnömositlerin epitel fenotiplerini kaybedip miyofibroblastlara farklılaştıkları (EMT aracılığı ile) ve bu yolun IPF patogenezinin oluşumunda baskın olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Jayachandran, 2009). Alveolar epitel hücrelerinden biri olan tip II pnömositler, fibrotik sinyaller varlığında EMT aracılığıyla miyofibroblastlara farklılaşabilirler (Morbini ve diğ., 2011). Bu durum IPF’li hastaların akciğer biyopsi örnekleri ve deneysel pulmoner fibrozisli kemirgen akciğerleri üzerinde yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. IPF’li hastalardan alınan akciğer biyopsilerinin immunfloresan boyamaları sonrasında bu dokularda interstisyumda zayıf reaksiyon veren proSPC immunreaktif hücelere rastlanmıştır, ayrıca bu hücrelerin bir mezenşimal hücre belirteci olan N-kaderin sentezini gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Kim ve diğ., 2006). Marmai ve diğ. (2011), IPF’li hastaların akciğerlerindeki fibrotik alanlardan izole ettikleri epitel hücrelerinde α -SMA, kollagen ve kalponin1 mRNA ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Sıçan akciğerinden izole edilen tip II pnömositlerin TGF- β ’ya maruz bırakıldıklarında, bu

hücrelerin α -SMA ve kollagen sentezledikleri ve *in vitro* 'da miyofibroblastlara farklılaştıkları tespit edilmiştir (Yao ve diğ., 2004). Ayrıca insan A549 hücre hattı üzerinde yapılan pek çok çalışmada bu hücrelerin TGF- β varlığında proSPC, E-kaderin, sitokeratin, zonula okludens-1, aquaporin-5 gibi epiteliyal hücre belirteçlerini sentezlemeyi bırakıp vimentin, dezmin, N-kaderin, α -SMA, fibronektin ve kollagen üretmeye başladıkları diğer bir ifadeyle epitel fenotiplerini mezenşimal fenotiplere dönüştürdükleri gösterilmiştir (Kasai ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2007; Li ve diğ., 2016). Akciğer biyopsisi yapılan ve histolojik olarak değerlendirilerek IPF'li olduğu belirlenen 12 hastanın serumlarında kontrol gruba göre vimentin miktarının anlamlı derecede arttığı bulunmuştur (Yang ve diğ., 2002). IPF'li hastaların akciğer doku ve bronkoalveolar sıvıları (BAL)'nda da vimentin miktarının sağlıklı kontrollerden daha yüksek olduğu son yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Li ve diğ., 2017). O'Beirne ve diğ. (2015), A549 hücrelerinde TGF- β ile EMT uyarımını gerçekleştirdiklerinde, uyarımın 48.saatinde mezenşimal belirteçler olan α -SMA, vimentin ve kollagen mRNA'larının kontrol grupla karşılaştırıldığında önemli derecede arttığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da yukarıdaki bulgularla uyumlu bir şekilde, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, TGF- β uygulamasını takip eden 24, 36 ve 48. saatlerde α -SMA proteini ile *VIM*, *ACTA2* ve *COL1A* genlerinin ekspresyonunun uyarıldığı ve bu genlerin mRNA miktarlarında zamana bağlı olarak doğrusal bir artış belirlendi. Bu verilere dayanarak, TGF- β ile uyarımının A549 hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşmasını sağladığını söyleyebiliriz.

EMT sürecinin pulmoner fibrozise katkısını ortaya koyan çalışmalar, Wnt/ β -katenin sinyal yoluna dikkatleri çekmektedir. IPF'li hastalarda Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aşırı aktive olduğu gösterilmiştir (Sato ve diğ., 2006). Uyarılan Wnt sinyalinde aktifleşen β -katenin nukleusta TCF4 ve LEF1 ile etkileşerek bir kompleks oluşturur. Bu kompleks hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozu ile ilişkili birçok genin transkripsiyonunu düzenler (Yue ve diğ., 2010). IPF'li hastalarda *WNT-1*, *WNT-7B*, *WNT-10B*, *FZD2*, *FZD3*, *CTNNB1* ve *LEF1* genlerinin ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Königshoff ve diğ., 2008). Son zamanlarda, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun smad bağımlı-TGF- β sinyal yolu ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmaktadır. Fibrozisle ilgili olarak hipertrofik skar dokularında TGF- β tarafından β -kateninin aktivasyonunun sağlandığı ve Wnt/ β -katenin sinyal yolunun uyarıldığı tespit edilmiştir (Kim ve diğ., 2009; Zhou ve diğ., 2012). TGF- β tarafından uyarılan A549 hücrelerinde EMT ile ilişkili α -SMA, vimentin, kollagen protein miktarlarının artması ile paralel olarak Wnt sinyal yolunda görevli olan β -katenin aktivitesinin de kontrol

gruba göre arttığı, β -kateninin mRNA'sının siRNA ile susturulduğu durumda TGF- β sinyali ile ilişkili proteinlerin miktarının azaldığı bulunmuştur (Xu ve diğ., 2017). Diğer bir çalışmada, smad proteinlerinin β -katenin ile bağlanan LEF transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu uyardığı rapor edilmektedir (Vincent ve diğ., 2009). Bizim çalışmamızda da A549 hücrelerinin TGF- β ile uyarılması, bu hücrelerde *CTNNB1*, *LEF*, *TCF4* genlerinin transkripsiyonunun ve β -katenin aktivasyonunun artmasına neden oldu. Bu veriler ışığında, diğer çalışmaların sonuçları ile benzer olarak, TGF- β uygulamalarının A549 hücrelerinde, Wnt/ β -katenin sinyalini aktivelediğini söyleyebiliriz. Wnt sinyal yolu inhibitörü olan FH535, β -katenin/TCF4/LEF1 kompleksinin oluşumunu engelleyerek β -katenin aracılı gen transkripsiyonunu durdurur. Ayrıca, FH535 uygulanan çeşitli akciğer, kolon ve karaciğer hücre hatlarında TCF4 transkripsiyonunun azaldığı, bununla birlikte Wnt sinyalinin de azaldığı bulunmuştur (Handeli ve Simon, 2008). Aynı zamanda FH535, β -kateninin transkripsiyon faktörü aracılı (TCF4 ve LEF1 üzerinden) nuklear taşınımını da engelleyebilmektedir (Shi ve diğ., 2014). Hepatosellüler kanser hücre hatlarında yapılan çalışmada FH535'in β -katenin transkripsiyonunu azaltarak Wnt sinyal yolunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Gedaly ve diğ., 2014). A549 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, TGF- β ile birlikte uygulanan FH535'in TGF- β tarafından uyarılan EMT'yi Wnt sinyalini azaltarak geriletmediği bulunmuştur (Ren ve diğ., 2013). Çalışmamızda, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinin kültür ortamına 24 saat sonra FH535 ilavesi, deneyin özellikle 48. saatinde *CTNNB1*, *LEF*, *TCF4* genlerinin transkripsiyonunun ve β -katenin aktivasyonunun azalmasına neden oldu. Bu veriler, FH535'nin A549 hücrelerinde TGF- β tarafından uyarılan Wnt/ β -katenin sinyal yolunu inhibe ettiğini bu inhibisyonun deneyin 48. saatinde çok güçlü olduğunu açıkça göstermektedir.

TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolunun devreye girmesiyle EMT aracılı-miyofibroblast farklılaşmasının gerçekleştiği pek çok çalışmada rapor edilmiştir (Checa ve diğ., 2016). TGF- β , smad proteinleri aracılığıyla β -katenin ile snail, slug, twist ve LEF1 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonunu uyarır (Kalluri ve Neilson, 2004; Vincent ve diğ., 2009). Snail, slug, Zeb1, Zeb2 ve twist transkripsiyon faktörleri, EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonunu kontrol eder (Peinado ve diğ., 2007). Bu transkripsiyon faktörleri epitel hücrelerinde ekspresyonu baskın olarak yapılan hücre-hücre adhezyon proteinlerini kodlayan genlerin promotör bölgelerine bağlanır ve onların transkripsiyonunu baskırlar (Zavadil ve diğ., 2005). Örneğin snail ve slug, E-kaderin geninin promotörüne bağlanarak E-kaderin transkripsiyonunu baskırlar (Busch ve diğ., 2016). Snail'in stabilizasyonunun Wnt/ β -katenin

sinyal yolu ile sağlanması bu sinyal yolunun EMT’de etkili bir sinyal yolu olduğunu açıkça göstermektedir. Wnt/ β -kateninin sinyalinin de devreye girmesiyle özellikle N-kaderin başta olmak üzere fibronektin ve matriks metalloproteinazların ekspresyonları uyarılmakta ve EMT hız kazanmaktadır (Aoyagi-Ikeda ve diğ., 2011). IPF’li hastaların akciğerlerinde TGF- β aktivasyonunun arttığı ve Wnt sinyal yolunun uyarıldığı ve her iki sinyal yolunun koordineli çalışmasıyla birlikte EMT’nin gerçekleştiğine dair veriler vardır. Bu çalışmada, IPF’li hastalardan alınan dokularda *CTNNB1*, *LEF* gen ekspresyonunun kontrol dokuyla kıyaslandığında önemli derecede arttığı tespit edilmiştir (Königshoff ve diğ., 2008). IPF’li hastalardan alınan akciğer dokularında immunohistokimyasal boyama sonrasında kontrol grup ile karşılaştırıldığında α -SMA, kollagen ve twist miktarlarının arttığı bulunmuştur (Lomas ve diğ., 2012). Benzer şekilde IPF’li hastalardan izole edilen alveolar epitel hücrelerin güçlü bir şekilde twist pozitif hücrelerin olduğu ve yine aynı hücrelerin E-kaderin ekspresyonlarının düşük olduğu gösterilmiştir (Pozharskaya ve diğ., 2009). Genel olarak, EMT sürecinin, hücrelere epitel fenotiplerini kaybettirerek ECM elemanları, vimentin, α -SMA ve N-kaderin gibi mezenşimal hücrelerde sentez edilen proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı onlara mezenşimal fenotip kazandırdığı bilinmektedir (Kalluri ve Weinberg, 2009). Bleomisinle uyarılmış fare akciğerinde E-kaderin ekspresyonunun azaldığı, TGF- β ile uyarılan hücrelerde vimentin, α -SMA ve N-kaderin protein miktarlarının ise arttığı gösterilmiştir (Chen ve diğ., 2015). IPF’li hastaların akciğerinden izole edilen alveolar tip II hücrelerde de vimentin, α -SMA ve N-kaderin protein miktarlarının arttığı (Marmai ve diğ., 2011) aynı zamanda snail ekspresyonunun hem bir grup IPF’li hastada hem de TGF- β ile uyarılan alveolar tip II hücrelerde arttığı bulunmuştur (Jayachandran ve diğ., 2009). Yao ve diğ (2004), TGF- β 1’ya maruz bırakılan sıçan tip II pnömositlerinin fibroblastlara farklılaştıklarını ve E-kaderin protein miktarını azaltarak, α -SMA ve kollajen sentezlemeye başladıklarını *in vitro*’da saptamıştır (Yao ve diğ., 2004). Çalışmamızda, Wnt/ β -katenin sinyal yolu ve EMT ile ilişkili çeşitli gen proteinler üzerinde yaptığımız analizler, TGF- β ile uyarılan hücrelerde Wnt sinyal yolunun aktive olduğunu, *ACTA2*, *COL1A1*, *VIM*, *CTNNB1*, *TCF4*, *LEF1* ve *SNAIL* genlerinin ekspresyonunun uyarıldığını, α -SMA protein miktarının arttığı, E-kaderin protein miktarının ise azaldığını, dolayısı ile A549 hücrelerinde EMT uyarımının gerçekleştiğini ve epitel hücrelerin miyofibroblastlara farklılaştıkları görülmektedir. TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, FH535 uygulamaları deneyin 36. saatinde *ACTA2* ve *TCF4* gen ekspresyonlarını TGF- β ile uyarımın 36. saati ile karşılaştırıldığında değiştirmezken; *COL1A1* ve *SNAIL* gen ekspresyonları

azaltmış, *VIM*, *CTNNB1* ve *LEF1* ekspresyonlarını ise arttırmıştır. Deneyin 48. saatinde ise FH535 uygulaması tüm genlerin ekspresyonunu azaltmıştır. Western emdirimi sonuçlarına göre ise; deneyin 36. saatinde FH535 uygulaması aktif β -katenin miktarını değiştirmemiş, α -SMA miktarını azaltmış ve E-kaderin miktarını ise arttırmıştır; deneyin 48. saatinde gen ekspresyon profili ile orantılı olarak tüm protein miktarlarını azaltmıştır. Dolayısıyla FH535 48. saatte *ACTA2*, *COL1A1* ve *VIM* gen ekspresyonlarını ve α -SMA protein miktarını azaltarak EMT'yi gerilettiğini söyleyebiliriz. Bu bulgularımızı destekleyen veriler çeşitli çalışmalarda da elde edilmiştir. Özefageal kanser hücre hattı KYSE-150 ve A549 hücre hattında yapılan çalışmalarda 20 μ M FH535 uygulamasının *VIM*, *CTNNB1* ve *SNAIL* gen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Ren ve diğ., 2013; Su ve diğ., 2015).

Epitel hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun azalması EMT başlangıcının işaretidir. Wnt/ β -katenin sinyali snail fosforilasyonunu engelleyerek snail yıkımının önüne geçer ve hücrede snail protein miktarının korunmasında ve dolayısı ile EMT uyarımının sağlanmasında etkilidir (Peinado ve diğ., 2007). Bu durum EMT indüklenmesinde Wnt/ β -katenin sinyal yolu ve snail transkripsiyon faktörünün birlikte çalıştığını açıkça göstermektedir. Snail direkt olarak E-kaderin promotörüne bağlanarak ekspresyonunu baskılayan güçlü bir transkripsiyon faktörü olduğu için, diğer transkripsiyon faktörleri arasında EMT'de en etkili olan transkripsiyon faktörü olarak düşünülmektedir. Çalışmamızda TGF- β 1 ile uyarılan A549 hücrelerinde E-kaderin miktarının deneyin 24, 36 ve 48. saatlerinde düzenli bir azalış gösterdiği saptanmıştır. FH535 uygulamaları A549 hücrelerinde E-kaderin protein miktarını 36. saatte TGF- β 'nin tek başına uyarımı ile karşılaştırıldığında arttırırken; 48. saatte E-kaderin miktarını düşürmüştür. Analizlerimiz, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde FH535 uygulamalarının deneyin 48. saatinde Wnt sinyalini, α -SMA protein, *ACTA2*, *VIM*, *COL1A* gen ekspresyonlarını azaltmasına rağmen, E-kaderin protein miktarını arttıramamıştır. Bu durumda, miyofibroblast farklılaşmasında bir gerileme olmasına rağmen deneyin 48. saatinde hücrelerin epitel fenotiplerini tam olarak kazanamadıklarını söyleyebiliriz. Benzer durum sigara ekstraktı uygulanan insan bronşiyol epitel hücrelerinde de gözlenmiştir (Lu ve diğ., 2017). *ESRP1* ve *ESRP2* epitel hücrelerde alternatif kesimi düzenleyen iki gendir. *ESRP*'ler hücre motilitesi, hücre iskeleti, hücre-hücre bağlantıları ve EMT ile ilişkili epitel hücre özelliğinin oluşmasını sağlayan birçok gen transkriptini hedefler (Dittmar ve diğ., 2012). Yapılan çalışmalarda EMT'nin uyarılması *ESRP1* ve *ESRP2* gen ekspresyonunun azalmasına yol açmaktadır (Claude ve diğ., 2009). Ancak bizim çalışmamızda *ESRP1* gen ekspresyonu TGF- β ile EMT'nin

uyarımını takiben artmakta ve FH535 uygulaması ile de *ESRP1* gen ekspresyonu azaltmaktadır. Sadece *ESRP2* gen ekspresyonu TGF- β tarafından azaltılırken, FH535 uygulamaları sonrasında aynı deney saatinde *ESRP2* gen ekspresyonunun arttığı görülmektedir. Bu deney saatinde FH535 uygulamaları TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde E-kaderin miktarının artmasına neden olmuştur. Ancak, deneyin 36. saatinde gözlenen bu beklenen etki deneyin 48. saatine gelince tam tersi bir duruma dönmüştür. Bu sonuçlara göre, epitel fenotipin kazanılmasında *ESRP2*'nin *ESRP1*'e göre daha etkili olduğunu söyleyebiliriz. TGF- β uyarılan A549 hücrelerinde FH535 uygulamaları, uygulamayı takip eden 12 saat içinde (deneyin 36. saatinde), *ESRP2* gen ekspresyonunun ve E-kaderin protein miktarının artmasını sağlayabilmiştir.

LncRNA'ların ekspresyonları doku tipine, hastalık durumlarına ve zamana bağlı olarak değişebilir. LncRNA'lar hücre farklılaşması, büyümesi, proliferasyonu, göçü ve apoptozu ile tümör metastazı gibi çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde kritik rol oynarlar. LncRNA'ların normal gelişimde, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde etkili oldukları pekçok çalışmada gösterilmiştir (Tong-Hong ve diğ., 2015; Wan ve diğ., 2016). LncRNA'larla ilgili çalışmalar genellikle kanserli doku veya hücre hatlarında yapılmaktadır. Bu çalışmalarda LncRNA'ların epitel karakterli kanser hücrelerinin mezenşimal fenotip kazanmalarını sağlayarak tumor metastazına neden oldukları ortaya çıkarılmıştır. Yukarıda bahsedildiği gibi EMT, IPF'de fibrozis patogenezinde katkı sağlayan önemli bir süreçtir. Son 5 yıldan bu yana pulmoner fibrozis ve pulmoner fibrozis ile ilişkili LncRNA'ların belirlenmesine çalışılmasına rağmen, bu çalışmalarda EMT ile ilişkili LncRNA'lar üzerinde çok durulmamıştır. Bu konuya yönelik yapılan çalışmaların ilki 2013 yılında yapılmış olup; bleomisinle pulmoner fibrozisi uyarılan sıçan akciğerlerinde LncRNA'ların ekspresyon profili mikroarray analizlerle ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada fibrotik sıçan akciğerinde 568 adet LncRNA'nın ekspresyon profilinin değiştiği; 210 tanesinin ekspresyonunun arttığı, 358 tanesinin ise ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır. Ekspresyonu uyarılan LncRNA'lardan 2 tanesi seçilerek, AJ00539 ve S69206 LncRNA'ların hücrelerdeki kollagen mRNA'ları ile etkileşebilecekleri biyoinformatik analizlerle belirlenmiştir (Guohong ve diğ., 2013). Bir başka çalışmada bleomisin ile pulmoner fibrozisi uyarılan sıçan akciğerlerinde MRAK088388 ve MRAK081523 LncRNA genleri ile miyofibroblast büyümesi ile ilişkili N4bp2 geni ve fibrotik şartlarda arttığı bilinen *Plxna4* geninin ekspresyon düzeyinin arttığı saptanmıştır. Aynı zamanda biyoinformatik analizlerle, bu LncRNA'ların pulmoner fibrozis ile ilişkili miRNA'lar (mir200, mir429, mir229 ve mir30, mir141, mir98 ve let7) ile bağlanma bölgelerinin oldukları ve

birbirleri ile etkileşebilecekleri rapor edilmiştir (Xiaodong ve diğ., 2014). Diğer bir çalışmada IPF'li hastaların akciğerlerinde eksprese edilen 9 adet LncRNA'dan (n370929, CD99P1, NR_003085, n338680, n341773, n364035, n342143, n373263, NR_045756) en fazla eksprese olan 2 tanesi seçilerek IPF patogenezindeki rolleri *in vitro*'da test edilmiştir. IPF hastalarının akciğerinden izole edilen fibroblastlarda CD99P1 LncRNA'nın α -SMA ekspresyonunu arttırdığı, n341773 LncRNA'sının susturulmasının kollagen gen ekspresyonunu arttırdığı bulunmuş ve bu LncRNA'ların akciğer fibroblastlarında proliferasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesiyle ilişkili olabilecekleri öne sürülmüştür (Huang ve diğ., 2015). Paraquat ile pulmoner fibrozisi uyarılan fare akciğerlerinde uc.77 ve 05Rik LncRNA'larının ekspresyonlarının arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca A549 hücrelerinde zeb2 mRNA'sının siRNA ile susturulması durumunda, uc.77 LncRNA geninin ekspresyonunun uyarıldığının saptanması ile uc.77 LncRNA'nın zeb2 geninin ekspresyonunu uyarabileceği rapor edilmiştir. İlave olarak uc.77 ve 05Rik LncRNA genlerinin overeksprese edildiği durumda A549 hücrelerinde E-kaderin mRNA'sında bir azalma görülürken, ACTA2, MMP2 ve MMP9 genlerinin ekspresyonunda bir artış tespit edilmiş ve bu LncRNA'ların IPF patogenezinde etkili olan EMT'yi uyarabilecekleri sonucuna varılmıştır (Hao ve diğ., 2017). Bleomisinle pulmoner fibrozisi uyarılan fare akciğerinde yapılan bir çalışmada, H19 LncRNA'sı susturulduğunda COL1A1 ve ACTA2 mRNA ekspresyonlarının da azaldığı bulunmuştur (Tang ve diğ., 2016). TGF- β ile uyarılan A549 ve MRC5 hücrelerinde mikroarray ile mRNA, miRNA ve LncRNA ekspresyonlarına bakılmış, kontrol gruba göre kıyaslandığında farklı eksprese olan 242 mRNA'dan 139 tanesinin ekspresyonun uyarıldığı; 103 tanesinin ekspresyonun azaldığı bulunmuştur (Liu ve diğ., 2017a). Aynı araştırmacı grubunun *in vitro* (RLE-6TN hücre hattı yapmış olduğu bir çalışmada TGF- β ile uyarılmış epitelial hücrelerde LncRNA-PCF'nin mir344a-5p miRNA'sı ile map3k11 regulasyonunu düzenleyerek pulmoner fibrozisteki proliferasyonu düzenlediğini bulmuşlardır (Liu ve diğ., 2017b). Bu çalışmaların sonuçlarına göre; *in vivo*'da (insan ve hayvan akciğerlerinde) ve *in vitro*'da fibrotik şartlarda LncRNA ekspresyon profilinin değişebileceği, biyoinformatik analizlerle fibrotik şartlarda aşırı eksprese olan bazı LncRNA'ların, pulmoner fibrozisle ilişkili bazı miRNA'lar ile etkileşebileceği, ayrıca *in vitro* deneysel çalışmalarda LncRNA'ların EMT ile ilişkili bazı genlerin ekspresyonunu kontrol edebilecekleri açıkça görülmektedir. Diğer yandan, sadece pulmoner fibrozisli fare ve sıçan akciğerlerinde LncRNA'ların ekspresyon profili mikroarray analizlerle tanımlanırken, IPF'li hastaların akciğerlerinden alınan biyopsilerde, belirli sayıda seçilen LncRNA'ların

ekspresyon analizi yapılmış ve bu LncRNA'lerden sadece 23 tanesinin gen ekspresyonunun değiştiği saptanmıştır. İnsan genomunda 15000 LncRNA geni olduğu düşünüldüğünde, IPF'de etkili oldukları ileri sürülen 23 LncRNA dışında bu süreçte etkili, keşfedilecek yeni LncRNA'ların olabileceğini tahmin etmek güç değildir. Yukarıdaki çalışmaların sonuçlarından da anlaşılacağı üzere, bilinen ve yeni keşfedilecek LncRNA'ların IPF patogenezindeki rollerinin açıklanmasına ihtiyaç vardır. Bu nedenle projemizde, Wnt/EMT aracılı-miyofibroblast farklılaşmasının uyarıldığı ve durdurulduğu durumlarda, HOTAIR, CARLo-5 ve CD99P1 LncRNA'larının ekspresyonlarının nasıl değiştiği ve hedef proteinlerin ekspresyonlarındaki değişimler birbiri ile ilişkilendirilerek, bu LncRNA'ların Wnt/EMT aracılı-miyofibroblast farklılaşmasında etkili olup olmadıkları ve bu süreçteki rolleri araştırılmıştır. Wnt/EMT-aracılı miyofibroblast farklılaşmasında etkili olabileceğini düşündüğümüz bu LncRNA'ların bu süreçle ilişkisinin daha önce test edilmemiş olması, çalışmamızın verilerini önemli kılmaktadır. Çalışmamızın verileri, TGF- β uyarımı ile aktive olan Wnt sinyali varlığında ve EMT uyarımında her üç LncRNA'nın da ekspresyon profilinn değiştiğini, HOTAIR ve CARLo-5 LncRNA'larının Wnt ve EMT sinyal yolunu ilişkili olan transkripsiyon faktörleri, ko-aktivatörler, diğer etkili gen/protein ve miRNA'lar ile etkileşerek, CD99P1'in ise direkt ACTA2 gen ekspresyonunun kontrolü ile düzenlediklerini göstermektedir.

Homeobox (HOX) ailesi 39 HOX geni içerir ve bunlar 4 ayrı sınıf şeklinde (A-D) farklı kromozomlarda yerleşmişlerdir. HOX ailesi hücre bölünmesi, apoptoz, transformasyon ve survival gibi birçok biyolojik süreci düzenler (Ibanez de Caceres ve diğ., 2010). HOTAIR 12.kromozomda bulunan HOXC lokusundan sentezlenir; 6 eksondan oluşan, 6449 baz çiftlik gen bölgesinden transkripte edilen ve ana transkripti 2364 baz çifti olan bir LncRNA'dır. HOTAIR, HOXD ve HOXA1 lokusundaki genlerin susturulmasında etkili susturucu özellikte bir LncRNA olarak tanımlanır (Fang ve diğ., 2016). HOTAIR, kromatin remodelleyici komplekslerle etkileşime geçerek hedef genlerin transkripsiyonunu veya transkriptlerinin proteine çevrimini baskılar (Wu ve diğ., 2013). Sistemik sklerozisli hastaların derilerinden izole edilen fibroblastlarda α -SMA, kollagen-1 ve fibronektin mRNA'ları ile HOTAIR LncRNA ekspresyonunun yüksek olduğu tespit edilmiştir (Abignano ve diğ., 2013). Bu gözlemler, HOTAIR'ın fibrozis sürecinde önemli olabileceğini göstermektedir. HOTAIR ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu kanserle ilişkilidir. Bu çalışmalarda HOTAIR'ın bazı gastrik ve servikal kanser hücre hatlarında EMT'yi uyardığı ve tümör metastazına neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu kanser hücre hatlarında HOTAIR'ın siRNA uygulamaları ile susturulması, bu

hücrelerde vimentin, N-kaderin gibi mezenşimal hücre belirteçlerinin miktarlarının azalmasına, buna karşın E-kaderin, zonula okludens gibi epiteliyal hücre belirteçlerinin miktarının artmasına neden olmuştur (Kim ve diğ., 2006; Xu ve diğ., 2007). Ayrıca, HOTAIR'ın siRNA aracılı susturulması SGC-7901 gastrik kanser hücre hattında EMT süreciyle ilişkili olduğu bilinen özellikle snail ve slug, twist, zeb1 gibi transkripsiyon faktörlerinin miktarlarında bir azalma ile sonuçlanmıştır (Kim ve diğ., 2007). Mesane kanseri hücre hattı T24'lerde yapılan bir çalışmada, hücreler TGF- β 1 ile uyarılmış ve 48 saatlik uyarım sonrasında hücrelerde HOTAIR, N-kaderin ve Twist ekspresyonunu arttırırken, E-kaderin ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur. Çalışmada TGF- β 1'in HOTAIR ekspresyonunu arttırdığı, diğer gen ekspresyon sonuçlarına göre de EMT ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (De Oliveira Brito ve diğ., 2016). Diğer yandan HOTAIR'ın Wnt inhibitörü olan WIF-1'in gen ekspresyonunu azaltarak Wnt/ β -katenin sinyal yolunu uyarabileceği özofagiyal kanser hücre hattında belirlenmiştir (Ge ve diğ., 2013). Bu sonuçlar, HOTAIR'ın EMT ve Wnt/ β -katenin sinyal yolunda etkili olduğunu ve dolayısıyla kanserin progresyonu, migrasyonu ve invazyonuyla ilişkili olduğunu göstermektedir. HOTAIR'ın IPF'de etkili olduğuna dair bir veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda IPF'de baskın olarak görülen Wnt/EMT aracılı-miyofibroblast farklılaşmasında HOTAIR'ın etkili olup olmadığı, ilk kez araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, uyarımı takip eden 24 ve 36.saatlerde, HOTAIR ekspresyonu ile birlikte α -SMA, kollagen, aktif β -katenin ve snail mRNA seviyelerinin arttığını göstermektedir. Bu durum, yukarıdaki çalışmaların sonuçlarına benzer olarak, Wnt sinyal yolu ve EMT'nin uyarıldığı durumda HOTAIR ekspresyonun da arttığı yönündedir. Ancak, uyarımın 48.saatinde α -SMA, kollagen, aktif β -katenin ve snail mRNA seviyesi artmaya devam ederken, HOTAIR ekspresyonu azalması ilginç bir veri olarak karşımıza çıkmaktadır. TCF4/LEF1 kompleksine bağlanan β -kateninin insan aortik kapakçık hücrelerinde HOTAIR'ın ekspresyonunu uyarabildiği saptanmıştır (Carrion ve diğ., 2014). Biz de çalışmamızda TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyalinin aktif olduğu, ilk 36 saatte β -katenin transkripsiyonunun ve HOTAIR ekspresyonunun zamana bağlı olarak arttığını gördük. Dolayısı ile TGF- β uygulamaları ve bu uygulama sonrasında etkinliği artan Wnt sinyali A459 hücrelerinde HOTAIR ekspresyonunun artmasına neden olduğunu düşünmekteyiz. FH535, β -kateninin hem nukleusa taşınmasında hem de TCF4 ve LEF1 kompleksi ile bağlanmasına engel olarak Wnt sinyal yolunu inhibe eder. HOTAIR ve β -katenin ekspresyonunun inhibitörün 12.saatinde (deneyin 36.saati) artmasındaki amaç, Wnt sinyalini devam ettirmeye yönelik olabilir şeklinde

yorumlamaktayız. Ayrıca, FH535 tarafından Wnt sinyalinin kesilmesiyle 48. saatte HOTAIR ekspresyonu da azalmıştır.

Diğer yandan HOTAIR mir218-1 miRNA'sının ekspresyonunu baskılaması ile de LEF1 gen ekspresyonunun artmasına neden olur (Wu ve diğ., 2018). Bununla paralel olarak biz de çalışmamızda TGF- β ve FH535 uygulamalarında 36. saatte LEF1 mRNA'sının arttığını gördük. LEF1 mRNA'sının artmasındaki amaç ortamda hala TGF- β olduğu için Wnt sinyalinin devam ettirmeye çalışması olabilir. HOTAIR'ın aynı zamanda özefageal kanser hücrelerinde mir148a ile sponge oluşturarak, hepatoselular karsinomada da mir218'in ekspresyonunu azaltarak EMT'de önemli bir transkripsiyon faktörü olan snail ekspresyonunun artmasını sağlar (Xu ve diğ., 2017). TGF- β uygulamalarında da artan HOTAIR ekspresyonuna paralel olarak snail mRNA'sının da artmış olduğunu gördük. Ancak, FH535 uygulamalarında bizim çalışmamızda 36. saatte HOTAIR ekspresyonu yüksek olmasına rağmen, snail mRNA'sını arttıramadı. Bu nedenle de E- kaderin protein miktarının bu grupta arttığını düşünüyoruz. Çalışmamızda, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, FH535 uygulamasının yapıldığında, uyarımı takip eden 48. saatte HOTAIR ve β -katenin gen ekspresyonunun aniden düştüğü görülmektedir. Bu durumda, deneyin 48. saatinde Wnt sinyalinin kesilmesine bağlı olarak β -kateninin HOTAIR'ın ekspresyonunu uyaramadığını, HOTAIR'ın azalmasıyla birlikte de LEF ekspresyonunun azalmasıyla Wnt sinyalinin kesildiğini söyleyebilmekteyiz. FH535 uyarımından sonra deneyin 48. saatinde Wnt sinyalinin durdurulmasında HOTAIR'ın azalması ve HOTAIR aracılı LEF1 ekspresyonunun uyarılmamasının yanı sıra inhibitörün, aktif β -kateninin TCF4/LEF1 kompleksine bağlanmasını engellemesi ile de Wnt sinyalinin 48. saatte kesilmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

CARLo-5 8. kromozomda bulunan ve ilk olarak kolon kanserinde bulunmuş (sinonim: CCAT1) bir LncRNA'dır. CARLo-5'in, HOTAIR gibi EMT'yi indüklemeye yoluyla MGC-803, BGC-823, SGC-7901, HCCLM3, MHCC97-L, HepG2, SNU387 ve H1975 gibi çeşitli kanser hücre hatlarında metastazı uyardığı açığa çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, CARLo-5'in siRNA aracılı susturumu ile hücre proliferasyonu ve progresyonu ile ilişkisi araştırılmış ve gastrik kanser hücrelerinin proliferasyonunu düzenlediği ve gastrik kanser gelişiminde EMT uyarımı yolu ile tumor metastazında önemli rol oynayabileceği bulunmuştur (Zhang ve diğ., 2014). Hepatoselular karsinoma çalışmasında CARLo-5'in karsinoma hücrelerinde proliferasyonu ve migrasyonu düzenlediği açığa çıkarılmıştır (Wang ve diğ., 2017). CARLo-5'in küçük hücreli

olmayan akciğer kanserinde (H1975 kanser hücre hattında) de ekspresyon düzeylerine bakılmış ve CARLo-5'in susturulması ile EMT ile ilişkili proteinlerin miktarlarına bakılarak, bu durumda E-kaderin ekspresyonunun arttığı, fibronektin, vimentin ve snail ekspresyonunun önemli derecede azaldığı bulunmuştur (Luo ve diğ., 2014). Kolonjiokarsinoma da yapılan bir çalışmada CARLo-5'in susturulmasının bu hücrelerde invazyon ve metastazı azalttığı, ayrıca EMT fenotipini geri döndürdüğü bulunmuştur. Yapılan biyoinformatik analizlerle CARLo-5'in mir152 ile bağlanarak etkisini gösterdiği bilinmektedir (Zhang ve diğ., 2017). Çok yeni olarak küçük hücreli olmayan akciğer kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada CARLo-5'in Wnt sinyal yolunu baskıladığı bilinen let-7c miRNA'sı ile sponge oluşturarak Wnt sinyalini arttırıcı yönde düzenlediği gösterilmiştir (Xu ve diğ., 2018). CARLo-5 de HOTAIR gibi mir218-1 miRNA'sını baskılamak yolu ile LEF1 gen ekspresyonunun artmasına neden olarak ve ayrıca DKK-2 ekspresyonunu azaltarak Wnt sinyali aktifleştirmektedir (Ma ve diğ., 2015). Şimdiye kadar CARLo-5 ile ilişkili yapılan çalışmalarda CARLo-5'in pulmoner fibrozis ve IPF patogenezi ile ilişkisi hakkında bir veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda CARLo-5'in IPF patogenezinde Wnt/ β -katenin sinyal yolu ve EMT aracılı-miyofibroblast farklılaşmasında etkili proteinlerle ilişkisi ilk kez araştırılmıştır. TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde uyarımı takip eden ilk 36 saat içinde, Wnt sinyali ve EMT'nin uyarıldığı durumlarda, CARLo-5 ekspresyonu çok değişmezken, 48. saatte pik yapmaktadır. TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde 36. saate kadar HOTAIR'ın artmış olması CARLo-5 ekspresyonunun değişmemesine neden olmuş olabilir, aynı zamanda 48. saatte HOTAIR'ın azalmasıyla CARLo-5 ekspresyonunun bu saat diliminde pik yapmış olabileceğini düşünmekteyiz. İlaveten, bu ekspresyon profilindeki değişimlerin TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde Wnt sinyalinin uyarımını devam ettirmek amacıyla yapılmış olabilir. CARLo-5'in hepatosellüler karsinomada EMT'yi uyardığı bunu da twist, zeb1 ve vimentin ekspresyonunu uyararak yaptığı bilinmektedir (Dou ve diğ., 2017). Bizim çalışmamızda da TGF- β ile uyarılan hücrelerde 48. saatte Wnt sinyalinin ve EMT'nin pik yaptığı durumda CARLo-5 ekspresyonu bu sonuçlara paralel olarak yüksekti. CARLo-5, snail ekspresyonunu da mir218-1 miRNA'sı aracılığıyla arttırıyor olabilir. Kanserli dokular veya hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalar CARLo-5'in susuturulduğu durumlarda Wnt sinyalinin ve EMT'nin gerilediğine dair veriler sunmakta, ancak CARLo-5 ve Wnt sinyali arasındaki karşılıklı ilişkiye dair bir açıklama getirmemektedir. Çalışmamızda, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, uyarımı takip eden 48. saatte Wnt sinyalinin ve EMT'nin artmasına paralel olarak CARLo-5 ekspresyonu artarken, FH535 uygulamasının yapıldığı durumlarda,

Wnt sinyalinin ve EMT'nin azalmasına paralel olarak CARLo-5 ekspresyonunun da düşmesi, CARLo-5 ve Wnt sinyali arasında dğrusal bir ilişki olabileceğini göstermektedir.

Bir psödogen olan CD99P1'in IPF'li hastalarda çok miktarda eksprese olduğu bulunmasına ve IPF patogenezinde etkili olabileceği öne sürülmesine rağmen, etki mekanizması bilinmemektedir. Araştırmacılar, insan LL29 fibroblast hücre hattında, CD99P1'in susturulmasıyla α -SMA miktarının azaldığını belirlemişlerdir (Huangve diğ., 2015). Ancak IPF patogenezinde, Wnt/ β -katenin sinyal yolu ve EMT–aracılı miyofibroblast farklılaşmasındaki etkisi ve hangi proteinlerle etkileşime geçtiği bugüne kadar araştırılmamıştır. Çalışmamızda CD99P1'in A549 hücrelerinde IPF patogezinde Wnt/ β -katenin sinyal yolu ve EMT–aracılı miyofibroblast farklılaşmasındaki etkisi ve bu süreçte etkili hedef proteinlerle ilişkisi ilk kez araştırılmıştır. TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde, Wnt sinyalinin ve EMT'nin uyarıldığı durumlarda, CD99P1 ekspresyonunu uyarımın 36 ve 48.saatlerinde düzenli bir artış gösterirken; FH535 uygulamasıyla Wnt sinyalinin ve EMT'nin azaltıldığı durumlarda ekspresyonu kademeli olarak düşmektedir. ACTA2 ekspresyonu TGF- β uygulamasının 36.saatinde anlamlı bir artış göstermezken 48. saatte pik yapmaktadır; FH535 uygulaması ise ACTA2 ekspresyonunu 48.saatte düşürmüştür. Daha önce yapılan bir çalışmada CD99P1 yalnızca ACTA2 ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, biyoinformatik veriler CD99P1 LncRNA'sının Wnt sinyali, EMT ve pulmoner fibrozisde etkili en az 13 adet miRNA ile bağlanma bölgesi bulunduğunu göstermektedir. CD99P1'in etkileşime geçtiği bilinen mir29b-1, mir218-1, mir218-2, mir206, mir663b, mir217, mir326, mir214, mir613, mir148a, mir7-1, mir205 ve mir143'ün Wnt sinyali ve EMT ile ilişkili gen ve proteinlerin ekspresyonunu kontrol ettiği bilinmektedir. CD99P1in bağlandığı miRNA'lar Wnt sinyali ve EMT'de görevli olan CDH1 (E-kaderin), CTNNB1, SNAIL, ZEB, TCF4 ve VIM gen ve protein ekspresyonlarının kontrolünü düzenlerler. Dolayısıyla CD99P1'in bu miRNA'lar ile etkileşerek ACTA2'den farklı olarak diğer moleküller üzerinde de etkili olduğu söylenebilir.

IPF'de LncRNA'ların görevlerinin açıklanmasına ilişkin *in vivo* çalışmalar, bleomisin ve paraquat gibi çeşitli ajanlarla pulmoner fibrozisi uyarılan fare ve sıçan akciğerlerinde yapılmış ve mikroarray analizlerle fibrotik akciğerlerdeki LncRNA ekspresyon profili araştırılmıştır. Seçilen az sayıdaki LncRNA'nın hedef genleri, transkriptleri, miRNA ile olan ilişkileri biyoinformatik analizlerle analizlerle belirlenmiştir. IPF'li hastalardan alınan dokularda sadece 23 adet LncRNA'nın ekspresyon profili belirlenmiştir. *In vitro* çalışmalar incelendiğinde,

sadece birkaç çalışmada Wnt ve EMT sinyal yolu ile ilişkilendirilmiş olan LncRNA'lar bu yolaklar üzerindeki mekanizmalarına değinilmeden geçilmiştir. Bizim çalışmamızda daha önce pulmoner fibrozis ve pulmoner fibroziste Wnt/EMT aracılı miyofibroblast farklılaşması üzerinde çalışılmamış HOTAIR, CARLo-5 ve CD99P1 LncRNA'larının süreçteki rolleri ilk kez açıklanmıştır. HOTAIR hedef genlerinin ekspresyonunu epigenetik olarak kromatin modifiye edici komplekslerle etkileşime geçerek düzenler. LncRNA'ların hedeflerini gen ekspresyonunu transkripsiyonal, translasyonel ve posttranslasyonel olarak çeşitli şekillerde düzenledikleri göz önüne alınırsa, bir LncRNA'nın etkisini nasıl gösterdiğini bilmek hedef molekülleri belirlemek ve LncRNA'ların etkinliğinin hangi noktada düzenlenebileceğini bilmek açısından önemlidir. HOTAIR birçok kanserde prognostik hedef olarak önerilmektedir. HOTAIR'ın fibrotik sinyaller varlığında (TGF- β) Wnt/ β -katenin sinyal yolu/EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasındaki etkisi ilgili protein miktarlarındaki değişimlerle ilişkilendirilerek ilk kez IPF'deki etkisi açıklanmıştır. Çalışmalar, CARLo-5'in kanser hücre hatlarında EMT'yi uyardığını açıkça göstermektedir. CARLo-5'in fibrotik sinyaller varlığında (TGF- β) Wnt/ β -katenin sinyal yolu/EMT aracılı miyofibroblast farklılaşmasındaki etkisi ilgili gen ve protein miktarlarındaki değişimlerle ilişkilendirilerek ilk kez IPF'de Wnt/EMT aracılı-miyofibroblast farklılaşmasındaki etkisi rapor edilmiştir. CD99P1 ise, *in vitro*'da akciğer fibroblastlarında α -SMA ekspresyonunu arttırdığı bilinen, ancak IPF'de etkili olarak kullanılan Wnt/ β -katenin sinyal yolu/EMT aracılı-miyofibroblast farklılaşmasında etkisi henüz test edilmemiş LncRNA'dır. Çalışmamızda CD99P1'in de α -SMA dışında süreçteki etkisi farklı gen ve proteinler ve biyoinformatik analizlerle belirlenmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- TGF- β , A549 hücrelerinde zamana bağlı olarak CTNNB1, SNAIL, TCF4 ve LEF gen ekspresyonları; aktif β -katenin protein miktarının artmasına neden olarak Wnt sinyalini uyarır.
- TGF- β A549 hücrelerinde zamana bağlı olarak ACTA2, COL1A1 ve VIM ekspresyonlarını arttırıp; E-kaderin protein miktarını azaltarak ve α -SMA protein miktarını da arttırarak EMT'yi uyarır.
- A549 hücrelerinde TGF- β uygulamasıyla artan Wnt sinyal yolu ve EMT uyarımına paralel olarak CD99P1 ekspresyonu (24, 36 ve 48.saatlerde) ile CARLo-5 ekspresyonu (24 ve 36. saatler arasında zamana bağlı artış olmasa da 48. saatte) artarken; HOTAIR

ekspresyonu 24 ve 36 saatlerde artmış ancak 48. saatte azalmaktadır. Buna göre Wnt sinyal aktivasyonu ve EMT uyarımının başladığı ve aktif olduğu ilk 36 saatte her 3 LncRNA ekspresyonunda da bir artış gözlenir. Bu artış, CARLo-5 ve CD99P1 de uyarımın 48. saatinde de devam etse de HOTAIR ekspresyonu bu zaman diliminde azalmaktadır. Dolayısıyla uyarımın aktif olduğu saatlerde 3 LncRNA ekspresyonu artarken, HOTAIR yalnızca bu artışta görevliken CD99P1 ve CARLo-5 uyarımın atmasına bağlı olarak ekspresyonları artarak sürecin ilerlemesinde görevli bir LncRNA olabilir.

- A549 hücrelerinde FH535 uyarımının özellikle 24. saatinde (deneyin 48. saati), *CTNNB1*, *SNAIL*, *TCF4* ve *LEF1* ekspresyonlarındaki düşüşler dikkate alındığında, FH535'in Wnt sinyalini kesme ve EMT'yi azaltmadaki etkisini 24 saat sonra gösterdiğini söyleyebiliriz.
- Aynı zamanda FH535 uyarımı *ACTA2*, *COL1A1* ve *VIM* ekspresyonunu, α -SMA protein miktarını deneyin 48. saatinde azaltarak EMT sinyalini de azaltmıştır. Ancak E-kaderin protein miktarı 36. saatte bir miktar artış gösterse de inhibitör uygulaması deneyin 48. saatinde E-kaderin ekspresyonunu arttıramamıştır. Bu durum FH535'in Wnt sinyali aracılı EMT'yi geriletmesine rağmen, deneyin 48. saatinde mezenşim özellik kazanan hücrelere epitel fenotiplerini tekrar kazandıramadığını düşünmekteyiz.
- FH535 uyarımı ile Wnt sinyali ve EMT sürecinin azaltılmasına paralel olarak CARLo-5 ve CD99P1 deneyin 36 ve 48. saatlerinde azalırken, HOTAIR ekspresyonu 36. saatte bir pik yaparak 48. saatte azalmıştır. Bu sonuçlara göre CARLo-5 ve CD99P1 ekspresyonu Wnt ve EMT süreci tarafından kontrol edilirken; HOTAIR ekspresyonunun 36. saatte pik yapması Wnt ve EMT sürecini arttırmaya ve devam ettirmeye çalışması şeklinde açıklanabilir. HOTAIR her ne kadar süreci devam ettirmeye çalışsa da β -katenin ekspresyonunun azalmasından dolayı bunu devam ettirememiş ve 48. saatte ekspresyonu azalmıştır.

Çalışmamızın verileri, TGF- β uyarımı ile aktive olan Wnt sinyali varlığında ve EMT uyarımında her üç LncRNA'nın da ekspresyon profilinin değiştiğini, HOTAIR ve CARLo-5 LncRNA'larının Wnt ve EMT sinyal yolu ile ilişkili olan transkripsiyon faktörleri, ko-aktivatörler, diğer etkili gen/protein ve miRNA'lar ile etkileşerek, CD99P1'in ise direkt *ACTA2* gen ekspresyonunun kontrolü ile düzenlediklerini göstermektedir. Dolayısıyla, üç LncRNA'nın

ekspresyonlarının azaltılmasına yönelik uygulamalar IPF’de görülen EMT’nin geriletilmesinde kullanılabilir.



KAYNAKLAR

- Abdelaziz, M.M., Samman, Y.S., Wali, S.O., Hamad, M.M.A., 2005, Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: Is there anything new?, *Respirology*, 10, 284-289.
- Abignano, G., Cuomo, G., Buch, M.H., Rosenberg, W.M., Valentini, G., Emery, P., Del-Galdo, F., 2013, The enhanced liver fibrosis test: a clinical grade, validated serum test, biomarker of overall fibrosis in systemic sclerosis, *Annals of the Rheumatic Disease*, 73(2), 420-7.
- Alvarez-Dominguez, J.R., Hu, W., Lodish, H.F., 2013, *Regulation of Eukaryotic Cell Differentiation by Long Non-coding RNAs*, Molecular Biology of Long Non-coding RNAs, In: Khalil A.M., Collier, J. (ed), Chapter 2, Springer, USA, 15-68.
- Ana, Y.M., Coelho, L., Jarai, G., Westwick, J., Hogaboam, C.M., 2012, Notch signaling mediates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through the induction of Snai1, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44, 776-789.
- Angers, S., Moon, R.T., 2009, Proximal events in Wnt signal transduction, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), 468-477.
- Aoyagi-Ikeda, K., Maeno, T., Matsui, H., Ueno, M., Hara, K., Aoki, Y., Aoki, F., Shimizu, T., Doi, H., Kawai-Kowase, K., Iso, T., Suga, T., Arai, M., Kurabashi, M., 2011, Notch Induces Myofibroblast Differentiation of Alveolar Epithelial Cells via Transforming Growth Factor β -Smad3 Pathway, *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*, 45, 136-144.
- Beltran, M., Puig, I., Peña, C., García, J.M., Álvarez, A.B., Peña, R., Bonilla, F., Herreros, A.G., 2008, A NAT regulates ZEB2/Sip1 gene exp during snail 1-induced EMT, *Genes&Development*, 22, 756-769.
- Blackwell, T.S., Tager, A.M., Borok, Z., Moore, B.B., Schwartz, D.A., Anstrom, K.J., Bar-Joseph, Z., Bitterman, P., Blackburn, M.R., Bradford, W., Brown, K.K., Chapman, H.A., Collard, H.R., Cosgrove, G.P., Deterding, R., Doyle, R., Flaherty, K.R., Garcia, C.K., Hagood, J.S., Henke, C.A., Herzog, E., Hogaboam, C.M., Horowitz, J.C., King, T.E., Loyd, J.E., Lawson, W.E., Marsh, C.B., Noble, P.W., Noth, I., Sheppard, D., Olsson, J., Ortiz, L.A., O'Riordan, T.G., Oury, T.D., Raghu, G., Roman, J., Sime, P.J., Sisson, T.H., Tschumperlin, D., Violette, S.M., Weaver, T.E., Wells, R.G., White, E.S., Kaminski, N., Martinez, F.J., Wynn, T.A., Thannickal, V.J., Eu, J.P., 2014, Future directions in idiopathic pulmonary fibrosis research: an NHLBI workshop report, *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 189(2): 214-222.
- Bouros, D., Antoniou, K.M., 2005, Current and future therapeutic approaches in idiopathic pulmonary fibrosis: Is there anything new?, *European Respiratory Journal*, 26(4), 693-702.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Bu, D., Yu, K., Sun, S., Xie, C., Skogerbo, G., Miao, R., Xiao, H., Liao, Q., Luo, ., Zhao, G., Zhao, H., Liu, Z., Liu, C., Chen, R., Zhao, Y., 2012, Noncode v3.0: integrative annotation of Long noncoding RNs, *Nucleic Acids Research*, 40, 210-215.
- Busch, E.L., Keku, T.O., Richardson, D.B., Cohen, S.M., Eberhard, D.A., Avery, C.L., Sandler, R.S., 2016, Evaluating markers of epithelial-mesenchymal transition to identify cancer patients at risk for metastatic disease, *Clinical&Experimental Metastasis*, 33(1), 53–62.
- Carrion, K., Dyo, J., Patel, V., Sasik, R., Mohamed, S.A., Hardiman, G., Nigam, V., 2014, The long non-coding HOTAIR is modulated by cyclic stretch and WNT/ β -CATENIN in human aortic valve cells and is a novel repressor of calcification genes, *PLoS One*, 9(5), e96577.
- Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., Bozzon, I., 2011, A Long Noncoding RNA Controls Muscle Differentiation by Functioning as a Competing Endogenous RNA, *Cell*, 147, 358–369.
- Checa, M., Hagood, J.S., Velazquez-Cruz, R., Ruiz, V., García-De-Alba, C., Rangel-Escareño, C., Urrea, F., Becerril, C., Montañó, M., García-Trejo, S., Cisneros-Lira, J., Aquino-Gálvez, A., Pardo, A., Selman, M., 2016, Cigarette Smoke Enhances the Expression of Profibrotic Molecules in Alveolar Epithelial Cells, *PLoS One*, 11(3), e0150383.
- Chen, L.C., Ye, H., Zhang, Q., Li, F.Z., Song, J.L., Yang, J., Mu, Q., Rao, S.S., Cai, P.C., Xiang, F., Zhang, J.C., Su, Y., Xin, J.B., Ma, W.L., 2015, Bleomycin induced epithelial–mesenchymal transition (EMT) in pleural mesothelial cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 283, 75–82.
- Cholankeril, G., Morais, S., Swami, S., Meharg, J., Dubielecka, J., 2016, Role of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 193, a2416.
- Claude, C.W., Sato, T.K., Nabet, B., Hogenesch, J.B., Carstens, R.P., 2009, ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell type-specific regulators of FGFR2 splicing, *Molecular Cell*, 33(5), 591–601.
- Clevers, H., 2006, Wnt/beta-catenin signaling in development and disease, *Cell*, 127(3), 469–80.
- Daniels, C.E., Lasky, J.A., Limper, A.H., Mieras, K., Gabor, E., Schroeder, D.R., 2010, Imatinib treatment for idiopathic pulmonary fibrosis: Randomized placebo-controlled trial results, *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 181, 604–610.
- de Oliveira Brito, R.B., Malta, C.S., Matos, Y.S.T., Souza, D.M., Matheus, L.H.G., Dalboni, M.A., Dellelong, H., 2016, Non-coding RNA HOTAIR activation by TGF-beta1 induces epithelial mesenchymal transition (EMT) in T24 bladder carcinoma cells, *Pathology*, 30(1), 439.

- Demirögen-Çetinoglu, E., 2014, Interstitial lung disease epidemiology in Turkey and the world, *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, 3, 257-262.
- Derrien, T., Johanson, R., Busoti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgrer, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J.B., Lipovich, L., Gonzalez, J.M., Thomas, M., Davis, C.A., Shiekhata, Gingeras, T.R., Hubbard, T.J., Notredame, C., Harrow, J., Guigó, R., 2012, The Gencode v7 catalog of human lncRNAs: analyses of their gene structure evolution and expression, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 22, 1775–1789.
- Direkze, N.C., Forbes, S.J., Brittan, M., Hunt, T., Jeffery, R., Preston, S.L., Poulson, R., Hodivala-Dilke, K., Alison, M.R., Wright, N.A., 2003, Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice, *Stem Cell*, 21(5), 514-520.
- Dittmar, K.A., Jiang, P., Park, J.W., Amirikian, K., Wan, J., Shen, S., Xing, Y., Carstens, R.P., 2012, Genome-wide determination of a broad esrp-regulated posttranscriptional network by high-throughput sequencing, *Molecular and Cellular Biology*, 32, 1468–1482.
- Djebali, S., Davis, C.A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., et al, 2012, Landscape of transcription in human cells, *Nature*, 489, 101-108.
- Dou, C., Sun, L., Jin, X., Han, M., Zhang, B., Jiang, X., Lv, J., Li, T., 2017, Long non-coding RNA CARLo-5 promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma via suppressing miR-200b expression., *Oncotarget*, 8(41), 70172-70182.
- Fang, S., Gao, H., Tong, Y., Yang, J., Tang, R., Niu, Y., Li, M., Guo, L., 2016, Long noncoding RNA-HOTAIR affects chemoresistance by regulating HOXA1 methylation in small cell lung cancer cells, *Laboratory Investigation*, 96, 60–68.
- Feng, J., Bi, C., Clark, B.S., Mady, R., Shah, P., Kohtz, J.D., 2006, The Evf2 ncRNA is transcribed from the Dlx5-6 ultraconserved region and functions as a Dlx2 transcriptional coactivator, *Genes&Development*, 20, 1470-1484.
- Fernandez, I.E., Eickelberg, O., 2012, The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers, *Proceeding of the American Thoracic Society*, 3, 111-116.
- Ge, X.S., Ma, H.J., Zheng, X.H., Ruan, H.L., Liao, X.Y., Xue, W.Q., Chen, Y.B., Zhang, Y., Jia, W.H., 2013, HOTAIR, a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma, inhibits WIF-1 expression and activates Wnt pathway, *Cancer Science*, 104(12), 1675-1682.
- Gedaly, R., Galuppo, R., Daily, M.F., Shah, M., Maynard, E., Chen, C., Zhang, X., Esser, K.A., Cohen, D.A., Evers, B.M., Jiang, J., Spear, B.T., 2014, Targeting the Wnt/b-Catenin Signaling Pathway in Liver Cancer Stem Cells and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines with FH535, *PLoS One* 9(6), e99272.
- Gong, C., Maquat, L.E., 2011, lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements, *Nature*, 470, 284–288.

- Gunther, A., Korfei, M., Mahavadi, P., von der Beck, D., Ruppert, C., Markart, P., 2012, Unravelling the progressive pathophysiology of idiopathic pulmonary fibrosis, *European Respiratory Society*, 21, 152–160.
- Guohong, C., Jinjin, Z., Meirong, W., Xiadong, S., Wenbo, L., Cuiping, M., Changjun, L.V., 2013, Differential expression of long non-coding RNAs in bleomycin-induced lung fibrosis, *International Journal of Molecular Medicine*, 32, 355–364.
- Gupta, R.A., Shah, N., Wang, K.C., Kim, J., Harling, S., Wong, D.J., et al., 2010, Long noncoding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis, *Nature*, 464, 1071–1076.
- Handeli, S., Simon, J.A., 2008, A small-molecule inhibitor of Tcf/beta-catenin signaling down-regulates PPARgamma and PPAR delta activities, *Molecular Cancer Therapeutic*, 7, 521–529.
- Hao, X., Du, Y., Qian, L., Liu, X., 2017, Upregulation of long noncoding RNA AP003419.16 predicts high risk of aging-associated idiopathic pulmonary fibrosis, *Molecular Medicine Report*, 16(6), 8085–8091.
- Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., De Wever, O., Mareel, M., Gabbiani, G., 2012, Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling, *American Journal of Pathology*, 180(4), 1340–1355.
- Hsu, S.C., Galceran, J., Grosschedl, R., 1998, Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin, *Molecular and Cell Biology*, 18(8), 4807–4818.
- Huang, C., Yang, Y., Liu, L., 2015, Interaction of long noncoding RNAs and microRNAs in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis, *Physiol Genomics*, 47, 463–469.
- Ibanez de Caceres, I., Cortes-Sempere, M., Moratilla, C., Machado-Pinilla, R., Rodriguez-Fanjul, V., Manguán-García, C., Cejas, P., López-Ríos, F., Paz-Ares, L., de Castro Carpeño, J., Nistal, M., Belda-Iniesta, C., Perona, R., 2010, IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer, *Oncogene*, 29, 1681–1690.
- James, M.C., Hagood, J.S., Velazquez-Cruz, R., Ruiz, V., García-De-Alba, C., Rangel-Escareño, C., Urrea, F., Becerril, C., Montañó, M., García-Trejo, S., Lira, J.C., Aquino-Gálvez, A., Pardo, A., Selmán, M., 2016, Cigarette Smoke Enhances the Expression of Profibrotic Molecules in Alveolar Epithelial Cell, *PloS One*, 11(3), e0150383.
- Jayachandran, A., Konigshoff, M., Yu, H., Rupniewska, E., Hecker, M., Klepetko, W., Seeger, W., Eickelberg, O., 2009, SNAI transcription factors mediate epithelial–mesenchymal transition in lung fibrosis, *Thorax*, 64, 1053–1061.
- Kalluri, R., Neilson, E.G., 2004, Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis, *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1776–1784.

- Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 1420–1428.
- Karreth, F.A., Tay, Y., Perna, D., Ala, U., Tan, S.M., Rust, A.G., DeNicola, G., Webster, K.A., Weiss, D., Perez-Mancera, P.A., Krauthammer, M., Halaban, R., Provero, P., Adams, D.J., Tuveson, D.A., Pandolf, P.P., 2011, In Vivo Identification of TumorSuppressive PTEN ceRNAs in an Oncogenic BRAF-Induced Mouse Model of Melanoma, *Cell*, 147, 382–395.
- Kasai, H., Allen, J.T., Mason, R.M., Kamimura, T., Zhang, Z.T., 2005, TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT), *Respiratory Research*, 6(56), 1-15.
- Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G.P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., 2006, Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis, *Cold Spring Harbor Protocols*, doi: 10.1101/pdb.prot4493.
- Kayalar, O., Oztay, F., 2014, Retinoic acid induced repair in the lung of adult hyperoxic mice, reducing transforming growth factor-beta 1 mediated abnormal alterations, *Acta Histochemica*, 116(5), 810-819.
- Khalil, N., O'Connor, R.N., Unruh, H.W., Warren, P.W., Flanders, K.C., Kemp, A., Berezney, O.H., Greenberg, A.H., 1991, Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor- β in idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 5, 155–162.
- Kim, J.H., Jang, Y.S., Eom, K.S., Hwang, Y.I., Kang, H.R., Jang, S.H., Kim, C.H., Park, Y.B., Lee, M.G., Hyun, I.G., Jung, K.S., Kim, D.G., 2007, Transforming growth factor beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition of A549 cells, *Journal of Korean Medical Science*, 22(5), 898-904.
- Kim, K.K., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.N., Sheppard, D., Chapman, H.A., 2006, Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix, *Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America*, 103, 13180–10185.
- Kim, K.K., Wei, Y., Szekeres, C., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Hill, M.L., Frank, J.A., Brumwell, A.N., Wheeler, S.E., Kreidberg, J.A., Chapman, H.A., 2009, Epithelial cell $\alpha 3 \beta 1$ integrin links b-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis, *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 213–224.
- Konigshoff, M., Balsara, N., Pfaff, E.M., Kramer, M., Chrobak, I., Seeger, W., Eickelberg, O., 2008, Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis, *PloS One*, 3(5), e2142.
- Krieghoff, E., Behrens, J., Mayr, B., 2006, Nucleo-cytoplasmic distribution of β -catenin is regulated by retention, *Journal of Cell Science*, 119, 1453 –1463.

- Li, F.J., Surolia R., Li, H., Wang, Z., Kulkarni, T., Liu, G., Andrade J.A., Kass, D.J., Thannickal, V.J., Duncan, S.R., Antony, V.B., 2017, Autoimmunity to vimentin is associated with outcomes patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Journal of Immunology*, 199(5), 1596-1605.
- Li, J., Ma, W., Zeng, P., Wang, J., Geng, B., Yang, J., Cui, Q., 2014, LncTar: a tool for predicting the RNA targets of long noncoding RNAs, *Briefings in Bioinformatics*, 1–7.
- Li, Y., Gao, A., Yu, L., 2016, Monitoring of TGF- β 1-induced human lung adenocarcinoma A549 cells epithelial-mesenchymal transformation process by measuring cell adhesion force with a microfluidic device, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(1), 114-125.
- Liu, H., Wang, B., Zhang, J., Zhang, S., Wang, Y., Zhang, J., Lv, C., Song, X., 2017b, A novel lnc-PCF promotes the proliferation of TGF- β 1-activated epithelial cells by targeting miR-344a-5p to regulate map3k11 in pulmonary fibrosis, *Cell Death Disease*, 8(10), e3137.
- Liu, H., Zhao, X., Xiang, J., Zhang, J., Meng, C., Zhang, J., Li, M., Song, X., Lv, C., 2017a, Interaction network of coexpressed mRNA, miRNA, and lncRNA activated by TGF- β 1 regulates EMT in human pulmonary epithelial cell, *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 8045–8054.
- Logan, C.Y., Nusse, R., 2004, The Wnt Signalling Pathway in Development and Disease, *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 20, 781–810.
- Lomas, N.J., Watts, K.L., Khondoker, K., Akram, M., Forsyth, N.R., Spiteri, M.A., 2012, Idiopathic pulmonary fibrosis: immunohistochemical analysis provides fresh insights into lung tissue remodelling with implications for novel prognostic markers, *International Journal of Clinical Experimental Pathology*, 5(1), 58–71.
- Lu, L., Qi, H., Luo, F., Xu, H., Ling, M., Qin, Y., Yang, P., Liu, X., Yang, Q., Xue, J., Chen, C., Lu, J., Xiang, Q., Liu, Q., Bian, Q., 2017, Feedback circuitry via let-7c between lncRNA CCAT1 and c-Myc is involved in cigarette smoke extract-induced malignant transformation of HBE cells, *Oncotarget*, 8(12), 19285-19297.
- Luo, J., Tang, L., Zhang, J., Ni, J., Zhang, H.P., Zhang, L., Xu, J.F., Zheng, D., 2014, Long non-coding RNA CARLo-5 is a negative prognostic factor and exhibits tumor pro-oncogenic activity in non-small cell lung cancer, *Tumor Biology*, 35, 11541–11549.
- Ma, M.Z., Chu, B.F., Weng, M.Z., Qin, Y.Y., Gong, W., Quan, Z.W., Ma, M.Z., Zhang, Y., 2015, Long non-coding RNA CCAT1 promotes gallbladder cancer development via negative modulation of miRNA-218-5p, *Cell Death and Disease*, 8(6), e158.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X., 2009, Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases, *Developmental Cell*, 17(1), 9-26.
- Marmai, C., Sutherland, R.E., Kim, K.K., 2011, Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Physiology-Lung Cellular Molecular Physiology*, 301(1), 71–78.

- Martianov, I., Ramadass, A., Serra-Barros, A., Chow, N., Akoulitchev, A., 2007, Repression of the human dihydrofolate reductase gene by an interfering transcript, *Nature*, 445, 666-670.
- Matsuno, Y., Coelho, A.L., Jarai, G., Westwick, J., Hogaboam, C.M., 2012, Notch signaling mediates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through the induction of Snai1, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(5), 776-789.
- Mattick, J.S., 2009, The genetic signatures of noncoding RNAs, *PLoS Genetics*, 5, e1000459.
- Min, X., Feng-qi, N., Ming, S., Rui, X., Yan-wen, L., Peng, Z., Wei, D., Xiang-Hua, L., 2015, Decreased long noncoding RNA SPRY4-IT1 contributing to gastric cancer cell metastasis partly via affecting epithelial-mesenchymal transition, *Journal of Translational Medicine*, 13, 250.
- Moran, V.A., Perera, R.J., Khali, A.M., 2012, Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs, *Nucleic Acids Research*, 40(14), 6391-6400.
- Morbini, P., Inghilleri, S., Campo, I., Oggionni, T., Zorzetto, M., Luisetti, M., 2011, Incomplete expression of epithelial-mesenchymal transition markers in idiopathic pulmonary fibrosis, *Pathology- Research and Practice*, 207(9), 559-567.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods* 65, 55-56.
- Naik, P.N., Horowitz, J.C., Moore, T.A., Wilke, C.A., Toews, G.B., Moore, B.B., 2012, Pulmonary fibrosis induced by gamma-herpesvirus in aged mice is associated with increased fibroblast responsiveness to transforming growth factor-beta, *The Journal of Gerontology A Biological Sciences and Medical Science*, 67, 714-725.
- Noble, P.W., Barkauskas, C.E., Jiang, D., 2012, Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators, *Journal of Clinical Investigation*, 122, 2756-2762.
- O'Beirne, S.L., Walsh, S.M., Fabre, A., Reviriego, C., Worrell, J.C., Counihan, I.P., Lumsden, R.V., Cramton-Barnes, J., Belperio, J.A., Donnelly, S.C., Boylan, D., Marchal-Sommé, J., Kane, R., Keane, M.P., 2015, CXCL9 regulates TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in human alveolar epithelial cells, *Journal of Immunology*, 195(6), 2788-2796.
- Okutan, O., Çalışkan, T., 2011, Smoking-related interstitial lung diseases, *Solunum*, 13(3), 131-139.
- Oruqaj, G., Karnati, S., Vijayan, V., Kotarkonda, L.K., Boateng, E., Zhang, W., Ruppert, C., Günther, A., Shi, W., Baumgart-Vogt, E., 2015, Compromised peroxisomes in idiopathic pulmonary fibrosis, a vicious cycle inducing a higher fibrotic response via TGF- β signaling, *Proceeding of the National Academy Science*, 112(16), 2048-2057.
- Ovet, H., Oztay, F., 2014, The copper chelator tetrathiomolybdate regressed bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, by reducing lysyl oxidase expressions, *Biological Trace Element Research*, 162, 189-199.

- Pauli, A., Rinn, J.L., Shier, A.F., 2011, Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis, *Nature*, 12, 136-149.
- Peinado, H., Olmeda, D., Cano, A., 2007, Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?, *Nature Review Cancer* , 7(6), 415-428.
- Phan, S.H., 2002, The myofibroblast in pulmonary fibrosis, *Chest*, 122, 286–289.
- Ponting, C.P., Oliver, P.L., Reik, W., 2009, Evolution and functions of Long noncoding RNAs, *Cell*, 136, 629-641.
- Pozharskaya, V., Torres-González, E., Rojas, M., Gal, A., Amin, M., Dollard, S., Roman, J., Stecenko, A.A., Mora, A.L., 2009, Twist: a regulator of epithelial-mesenchymal transition in lung fibrosis, *PLoS One*, 4(10), e7559.
- Rabani, M., Raychowdury, R., Jovanovic, M., Rooney, M., Stumpo, D.J., Pauli, A., Acohen, N., Sciher, A.F., Blackshear, P.J., Friedman N., 2014, High resolution sequencing and modeling identifies distinct dynamic RNA regulatory strategies, *Cell*, 159, 1698-1710.
- Ren, J., Wang, R., Huang, G., Song, H., Chen, Y., Chen, L., 2013, sFRP1 Inhibits Epithelial–Mesenchymal Transition in A549 Human Lung Adenocarcinoma Cell Line, *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 7(4), 892-903.
- Richeldi, L., Bois, R.M., Raghu, G., Azuma, A., Brown, K.K., Costabel, U., Cottin, V., 2014, Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis, *New England Journal of Medicine*, 370, 2071–2082.
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., Pandolfi, P., 2011, A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language?, *Cell*, 146(3), 353-358.
- Sato, M., 2006, Upregulation of the Wnt/beta-catenin pathway induced by transforming growth factor-beta in hypertrophic scars and keloids, *Acta dermato-venereologica*, 86(4), 300–307.
- Schmitz, K.M., Mayer, C., Postepska, A., Grummt, I., 2010, Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes, *Genes&Development*, 24, 2264–2269.
- Shi, F., Hu, L., Jacques, B.E., Mulvaney, J.F., Dabdoub, A., Edge, A.S.B., 2014, β -Catenin Is Required for Hair-Cell Differentiation in the Cochlea, *Journal of Neuroscience*, 34(19), 6470-6479.
- Shi, Z., Qian, X., Li, L., Zhang, J., Zhu, S., Zhu, J., Chen, L., Zhang, K., Han, L., Yu, S., Pu, P., Jiang, T., Kang, C., 2012, Nuclear translocation of beta-catenin is essential for glioma cell survival, *Journal of Neuroimmune Pharmacology* , 7, 892–903.
- St Laurent, G., Wahlestedt, C., Kapranov, P., 2015, The Landscape of long noncoding RNA classification, *Trends Genetic*, 31, 239-251.

- Su, H., Jin, X., Zhang, X., Zhao, L., Lin, B., Li, L., Fei, Z., Shen, L., Fang, Y., Pan, H., Xie, C., 2015, FH535 increases the radiosensitivity and reverses epithelial-to-mesenchymal transition of radioresistant esophageal cancer cell line KYSE-150R, *Journal of Translational Medicine*, 13, 104.
- Su, W., Xu, M., Chen, X., Chen, N., Gong, J., Nie, L., Li, L., Li, X., Zhang, M., Zhou, Q., 2017, Long noncoding RNA ZEB1-AS1 epigenetically regulates the expressions of ZEB1 and downstream molecules in prostate cancer, *Molecular Cancer*, 16, 142.
- Tang, Y., He, R., An, J., Deeng, P., Huang, L., Yang, W., 2016, The effect of H19-miR-29b interaction on bleomycin-induced Mouse model of idiopathic pulmonary fibrosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479, 417-423.
- Thannickal, V.J., Horowitz, J.C., 2006, Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3, 350–356.
- Tian, Z.Z., Guo, X.J., Zhao, Y.M., Fang, Y., 2015, Decreased expression of long non-coding RNA MEG3 acts as a potential predictor biomarker in progression and poor prognosis of osteosarcoma, *International Journal of Clinical Experimental Pathology*, 8(11), 15138-15142.
- Tong-Hong, W., Yong-Shiang, L., Ying, C., Chau-Ting, Y., Yen-lin, H., Tsung-Han, H., Tzong-Ming, S., Chuen, H., Tse-Ching, C., 2015, Long non-coding RNA AOC4P suppresses hepatocellular carcinoma metastasis by enhancing vimentin degradation and inhibiting epithelial-mesenchymal transition, *Oncotarget*, 6(27), 23342-23357.
- Torres-Gonzalez, E., Bueno, M., Tanaka, A., Krug, L.T., Cheng, D.S., Polosukhin, V.V., Sorescu, D., Lawson, W.E., Blackwell, T.S., Rojas, M., Mora, A.L., 2012, Role of endoplasmic reticulum stress in age-related susceptibility to lung fibrosis, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 46, 748–756.
- Tripathi, V., Ellis, J.D., Shen, Z., Song, D.Y., Pan, Q., Watt, A.T., Freier, S.M., Bennett, F., Sharma, A., Bubulya, P.A., Blencowe, B.J., Prasanth, S.G., Prasant, K.V., 2010, The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation, *Molecular Cell*, 39(6), 925–938.
- van Moorsel, C.H., van Oosterhout, M.F., Barlo, N.P., et al., 2010, Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a Dutch cohort. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 182, 1419–1425.
- Vincent, T., Neve, E.P.A., Johnson, J.R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P.L., Crystal, R.G., de Herreros, A.G., Moustakas, A., Pettersson, R.F., Fuxe, J., 2009, A snail1-smad3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition, *Nature Cell Biology*, 11(8), 943–950.
- Wan, P., Su, W., Zhuo, Y., 2016, The Role of Long Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases, *Molecular Neurobiology*, 1-10.

- Wang, F., Xie, C., Zhao, W., Deng, Z., Yang, H., Fang, Q., 2017, Long non-coding RNA CARLo-5 expression is associated with disease progression and predicts outcome in hepatocellular carcinoma patients, *Clinical Experimental Medicine*, 17(1), 33-43.
- Wapinski, O., Chang, H.Y., 2011, Long noncoding RNAs and human disease, *Trends Cell Biology*, 21, 354-361.
- Warburton, D., Shi, W., Xu, B., 2013, TGF- β -Smad3 signaling in emphysema and pulmonary fibrosis: An epigenetic aberration of normal development?, *American Journal of Physiology- Lung Cell and Molecular Physiology*, 304(2):L83–L85.
- Willis B.C., Liebler, J.M., Luby-Phelps, K., et al., 2005, Induction of epithelial–mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Pathology*, 166:1321–1332.
- Willis, B.C., Dubois, R.M., Borok, Z., 2006, Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung, *Proceeding American Thoracic Society*, 3, 377–382.
- Wu, L., Murat, P., Matak-Vinkovic, D., Murrell, A., Balasubramanian, S., 2013, Binding interactions between long noncoding RNA HOTAIR and PRC2 proteins, *Biochemistry*, 52(52), 9519–9527.
- Wu, Y., Xiong, Q., Li, S., Yang, X., Ge, F., Wu, Y., Li, S., Yang, X., 2018, Integrated proteomic and transcriptomic analysis reveals long noncoding RNA HOX transcript antisense intergenic RNA (HOTAIR) promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by regulating opioid growth factor receptor (OGFr), *Molecular and Cellular Proteomics*, 17(1), 146-159.
- Xiao, C., Wu, C.H., Hu, H.Z., 2016, LncRNA UCA1 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) of breast cancer cells via enhancing Wnt/beta-catenin signaling pathway, *European Review of Medical and Pharmacological Science*, 13, 2819-2824.
- Xu, C., Xiao, G., Zhang, B., Wang, M., Wang, J., Liu, D., Zhang, J., Ren, H., Sun, X., 2018, CCAT1 stimulation of the symmetric division of NSCLC stem cells through activation of the Wnt signalling cascade, *Gene Therapy*, 25, 4–12.
- Xu, F., Zhang, J., 2017, Long non-coding RNA HOTAIR functions as miRNA sponge to promote the epithelial to mesenchymal transition in esophageal cancer, *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 90:888-896.
- Xu, G.P., Li, Q.Q., Cao, X.X., Chen, Q., Zhao, Z.H., Diao, Z.Q., Xu, Z.D., 2007, The effect of TGF-beta1 and SMAD7 gene transfer on the phenotypic changes of rat alveolar epithelial cells, *Cell and Molecular Biology Letters*, 12(3), 457-472.
- Yang, Y., Fujita, J., Bandoh, S., Ohtsuki, Y., Yamadori, I., Yoshinouchi, T., Ishida, T., 2002, Detection of antivimentin antibody in sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and non-specific interstitial pneumonia, *Clinical Experimental Immunology*, 128(1), 169-174.

- Yao, H.W., Xie, Q.M., Chen, J.Q., Deng, Y.M., Tang, H.F., 2004, TGF-beta1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro, *Life Science*, 76, 29–37.
- Yilmaz, Ö., Öztay, F., Kayalar, O., 2015, Dasatinib attenuated bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *Growth Factors*, 33, 366-375.
- Yoon, J.H., Abdelmohsen, K., Gorospe, M.J., 2013, Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA, *Molecular Biology*, 425(19), 3723-3730.
- Yuan, J.H., Yang, F., Wang, F., Ma, J.Z., Guo, Y.J., Tao, Q.F., Liu, F., Pan, W., Wang, T.T., Zhou, C.C., Wang, S.B., Wang, Y.Z., Yang, Y., Yang, N., Zhou, W.P., Yang, G.S., Sun, S.H., 2014, A Long noncoding RNA activated by TGF-beta promotes the invasion metastasis cascade in the hepatocellular carcinoma, *Cancer Cell*, 25, 666-681.
- Yue, X., Lan, F., Yang, W., Yang, Y., Han, L., Zhang, A., Liu, J., Zeng, H., Jiang, T., Pu, P., Kang, C., 2010, Interruption of beta-catenin suppresses the EGFR pathway by blocking multiple oncogenic targets in humanglioma cells, *Brain Respiratory*, 1366, 27–37.
- Zavadil, J., Böttinger, E.P., 2005, TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions, *Oncogene*, 24(37), 5764-5774.
- Zeini, M., Hang, C.T., Lehrer-Graiwer, J., Dao, T., Zhou, B., Chang, C.P., 2009, Spatial and temporal regulation of coronary vessel formation by calcineurin NFAT signalling, *Development*, 136, 3335-3345.
- Zhang, S., Xiao, J., Chai, Y., Du, Y.Y., Liu, Z., Huang, K., Zhou, X., Zhou, W., 2017, LncRNA-CCAT1 promotes migration, invasion, and EMT in intrahepatic cholangiocarcinoma through suppressing miR-152, *Digestive Disease and Science*, 62(11), 3050-3058.
- Zhang, Y., Ma, M., Liu, W., Ding, W., Yu, H., 2014, Enhanced expression of long noncoding RNA CARLo-5 is associated with the development of gastric cancer, *International Journal of Clinical Experimental Pathology*, 7(12), 8471-8479.
- Zhou, B., Liu, Y., Kahn, M., Ann, D.K., Han, A., Wang, H., Nguyen, C., Flodby, P., Zhong, Q., Krishnaveni, M.S., Liebler, J.M., Minoo, P., Crandall, E.D., Borok, Z., 2012, Interactions between β -catenin and transforming growth factor- β signaling pathways mediate epithelial-mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP), *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7026-7038.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Merve Yıldırım
Doğum Yeri	Şişli
Doğum Tarihi	16.06.1992
Uyruğu	■T.C.□ Diğer:
Telefon	(539)749 92 24
E-Posta Adresi	Merve.yildirim182@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	03.07.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Moleküler Biyoloji

Makale ve Bildiriler	
Sözlü Bildiriler	
Yıldırım, M., Kayalar, O., Oztay, F., 2018, İnsan Pulmoner Fibrozisinde Etkili Uzun Kodlanmayan RNA'ların Belirlenmesi, <i>Türk Toraks Derneği 21.Yıllık Kongresi</i> , 11-15 Nisan 2018 Antalya, 119.	
Yıldırım, M., Kayalar, O., Sarı, E., Atahan, E., Oztay, F., 2018, Atorvastatinin Anti-Fibrotik Etkisi, Hedef Hücreler: Akciğer Fibroblast ve Miyofibroblastları, <i>Türk Toraks Derneği 21. Yıllık Kongresi</i> , 11-15 Nisan 2018 Antalya, 66.	
Atmaca, E., Kayalar, O., Yıldırım, M., Oztay, F., 2016, A549 Hücre Hattında TGF- β ile Uyarılmış Epitelial-Mezenşimal Geçişte Atorvastatinin Koruyucu Etkisi, <i>Türk Solunum Derneği 38. Yıllık Kongresi</i> , 15-19 Ekim 2016 İzmir, Solunum 2016, 130.	
Kayalar, O., Yıldırım, M., Oztay, F., 2016, Pulmoner Amfizemde HDAC Enzimleri ve E-kaderin Etkileşimi, <i>Türk Solunum Derneği 38. Yıllık Kongresi</i> , 11-15 Ekim 2016, Solunum 2016, 84.	

Poster Bildirileri

Yildirim, M., Atmaca, E., Kayalar, O., Oztay, F., 2017, Prevention the TGF- β induced Epithelial-Mesenchymal Transition with Atorvastatin in Human A549 Cell Line, *ERS international congress 2017*, 9-13 Ekim İtalya, PA1024.

Kayalar, O., Yildirim, M., Oztay, F., 2017, The dysregulation of E-cadherin contributes to pulmonary emphysema, *ERS international congress 2017*, 9-13 Ekim İtalya, PA3931.

Karatug, K.A., Yildirim, M., Bolkent, Ş., Oztay, F., 2017, The effects of Atorvastatin on Renal Injury that occurs Associated with Pulmonary Fibrosis, *15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry-ICHC 2017*, 18-21 Nisan Antalya, PP-236.

Ödüller

Atmaca, E., Kayalar, O., Yildirim, M., Oztay, F., 2016, A549 Hücre Hattında TGF- β ile Uyarılmış Epiteliyal-Mezenşimal Geçişte Atorvastatinin Koruyucu Etkisi, *Türk Solunum Derneği 38. Yıllık Kongresi*, 15-19 Ekim 2016 İzmir, Solunum 2016, 130, Seçilmiş Sözlü Sunum.