

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

(DOKTORA TEZİ)

**İNSAN SKUAMÖZ HÜCRELİ LARENKS KARSİNOMUNDA
KANSER KÖK HÜCRELERİNE ÖZGÜ MİRNA' LARIN
PROFİLLENMESİ VE MİR-145' İN LARENKS KANSERİ VE
KANSER KÖK HÜCRELERİNDEKİ FONKSİYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

ÖMER FARUK KARATAŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA ÖZEN**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Genetik Doktora Programında Ömer Faruk KARATAŞ tarafından hazırlanan İnsan Skuamöz Hücreli Larenks Karsinomunda Kanser Kök Hücrelerine Özgü miRNA'ların Profillenmesi ve miR-145'in Larenks Kanseri ve Kanser Kök Hücrelerindeki Fonksiyonunun Araştırılması başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

26 / 08 / 2014

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı	Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)	İmzası
1.Prof. Dr. Mustafa ÖZEN	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak.	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
2.Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK	İ. Ü. İstanbul Tıp Fak.	İç Hastalıkları Anabilim Dalı
3.Prof. Dr. Uğur GEZER	İ. Ü. İstanbul Tıp Fak.	Onkoloji Anabilim Dalı
4.Doç. Dr. Müge SAYITOĞLU	İ.Ü. Deneysel Tıp Araş. Enst.	Genetik Anabilim Dalı
5.Doç. Dr. Ömer Faruk BAYRAK	Yeditepe Üni. Tıp Fak.	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

BEYAN

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

ÖMER FARUK KARATAŞ



İTHAF

Anneme...
Babama...
Kardeşlerime...
ve Anneanneme...

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenen ve akademik çalışmalarımda desteğini esirgemeyip her konuda gösterdiği anlayış ve paylaştığı bilgi birikimiyle yanımda olan kıymetli hocam Sn. Prof. Dr. Mustafa Özen'e,

Doktora eğitimime katkıları olan Sn. Prof. Dr. Harun Cansız, Sn. Prof. Dr. Buge Öz, Sn. Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yılmaz, Sn. Doç. Dr. Hakan ULUCAN, Sn. Yrd. Doç. Dr. Gülgün S. GÜVEN, Sn. Prof. Dr. Mehmet Seven, Sn. Uz. Dr. Elif YOSUNKAYA'ya,

Bilimsel ve deneysel anlamda bilgilerini paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Esra GÜZEL, İlknur SUER, Betül YÜCETÜRK, Seda SALMAN, Murat POLAT, Derya AKYÜZ, Kemal KESEROĞLU, Esra AYDEMİR, Serhat SEVLİ, İrfan KILIÇ ve Nazlı BİLGE'ye,

Tıbbi Genetik Polikliniği asistanlarımız Dr. Alper GEZDİRİCİ, Dr. Asuman-Erkan KOPARIR, Dr. Bahtiyar MAMMADOV, Dr. Emre KIRAT, Dr. Buğrahan Düz ve Dr. Emrecan Kırtas'a

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanları olan Şenay SAYIN, Azize TURAN, Fatma ÖNER, Salih İSENÇ, Lütfiye ALTIN ve Hasan Yalçınkaya'ya,

Ve hep yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41315

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XIV
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanserin Tanımı ve Tarihçesi	4
2.2. Dünyada ve Türkiye’de Kanser Trendleri	10
2.3. Larenks Anatomisi, Fonksiyonu ve Larenks Skuamöz Hücreli Karsinomu.....	15
2.3.1. Larenks Anatomisi ve Fonksiyonu	15
2.4. Larenks Skuamöz Hücreli Karsinomu	17
2.5. Larenks Skuamöz Hücreli Karsinomu Etyolojisi, Semptomları Tanısı ve Tedavisi	22
2.6. MikroRNA’ lar.....	24
2.6.1. Onkogen ve Tümör Süpresör olarak miRNA’ lar	31
2.6.2. miR-145	33
2.7. Kanser Kök Hücreleri	35
2.8. Kanser Kök Hücre Regülatörleri olarak miRNA’ lar	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Gereç	41
3.1.1. Örneklerin Temini.....	41
3.1.2. Gereç ve Cihazlar.....	41
3.1.2.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri.....	41
3.1.2.2. Solüsyonlar.....	42

3.1.2.3. Bilgisayar Programları	44
3.2. Yöntem.....	45
3.2.1. Tümör Doku Örneklerinden CD133 yüzey işaretçisi ile Kök Hücre Ayırıştırması	45
3.2.2. Flow Sitometri Analizi.....	51
3.2.3. Ayırıştırılmış Hücrelerden RNA İzolasyonu	51
3.2.4. Dokulardan TRIzol ile RNA İzolasyonu	53
3.2.5. miRNA Mikroarray Analizi	55
3.2.6. miRNA Mikroarray Data Analizi	57
3.2.7. miRNA cDNA Sentezi.....	57
3.2.8. Seçilen miRNA' ların qRT-PCR ile Doğrulanması.....	58
3.2.9. Hep-2 Hücre Kültürü ve Hücrelerinin miR-145 ile transfeksiyonu.....	60
3.2.10. miR-145' in Hep-2 Hücrelerinin Proliferasiyonuna Etkisinin Araştırılması ...	61
3.2.11. miR-145' in Hep-2 Hücrelerinin Hücre Göçüne Etkisinin Araştırılması	61
3.2.11.1. Scratch (Yara) Assay.....	61
3.2.11.2. Tek Koloni Göçü Assayı.....	62
3.2.12. miR-145' in Hep-2 Hücrelerinin Hücre Siklusu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	62
3.2.13. miR-145' in Hep-2 Hücrelerinin Hücre Apoptozu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	63
3.2.14. cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu..	63
3.2.15. Western Blot Analizi.....	63
3.2.16. Kürecik Oluşturma Deneyi	65
3.2.17. Tek Hücre Klonlama	65
3.2.18. Aldehid Dehidrojenaz Aktivitesi	65
3.2.19. İstatistiksel Analiz.....	66
4. BULGULAR.....	67
4.1. Tümör Örneklerinden CD133 Yüzey İşaretçisi ile Hücre Ayırıştırması İşlemlerinin Akım Sitometrisi ile Doğrulanması	69
4.2. Tümör Örneklerinden CD133 Yüzey İşaretçisi ile Hücre Ayırıştırması İşlemlerinin qRT-PCR ile Doğrulanması.....	71
4.3. Tümör Örneklerinden CD133 Yüzey İşaretçisi ile Ayırıştırılan Hücrelerin Kök Hücre İşaretçileri Açısından Değerlendirilmesi.....	73

4.4. CD133 ile Ayrıştırılmış Kök Hücrelerde miRNA Profillemesi.....	77
4.5. Larenks Kanseri Tümör ve Normal Dokularda miRNA Profillemesi	87
4.6. Larenks Tümör ve Normal Dokularında miR-145 İfade Düzeyi Analizi	92
4.7. miR-145' in Hep2 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkisi	94
4.8. miR-145' in Hep2 Hücrelerinde Hücre Göçü Üzerine Etkisi	96
4.9. miR-145' in Hep2 Hücrelerinde Epitelyal Mezenkimal Geçiş Üzerine Etkisi.....	99
4.10. miR-145' in Hep2 Hücrelerinde Hücre Siklusu ve Apoptoz Üzerine Etkisi	101
4.11. miR-145' in Hedef Genlerinden SOX2' nin Hep2 Hücrelerinde mRNA Düzeyinde İfade Analizi	104
4.12. miR-145' in Hedef Genlerinden SOX2'nin Hep2 Hücrelerinde Protein Düzeyinde İfade Analizi	105
4.13. Larenks Tümör ve Normal Dokularında SOX2 İfade Düzeyi	106
4.14. CD133+ ve CD133- Larenks Kanseri Hücrelerinde miR-145 İfade Düzeyi.....	108
4.15. miR-145' in Hep2 Hücrelerinde Kök Hücre İşaretçilerinin İfade Düzeyleri Üzerine Etkisi.....	110
4.16. miR-145' in Hep-2 Hücrelerinde Kendini Yenileme Kapasitesi Üzerine Etkisi.....	112
4.17. miR-145' in Hep2 Hücrelerinde ALDH Aktivitesi Üzerine Etkisi	116
5. TARTIŞMA	117
KAYNAKLAR	125
ETİK KURUL KARARI	134
ÖZGEÇMİŞ	135

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. miRNA Hedef Tahmin Algoritmaları Listesi.....	30
Tablo 2. miR-145' in kanser patogenezindeki rolü.	34
Tablo 3. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalından temin edilen Larenks Kanseri tümör örneklerine ve hastalara ait bilgiler.	46
Tablo 4. CD133+ ve CD133- hücrelerden elde edilen RNA konsantrasyon ve saflıkları.	52
Tablo 5. Dokulardan elde edilen RNA konsantrasyon ve saflıkları.	54
Tablo 6. Primer listesi ve dizileri.....	64
Tablo 7. Hastaların klinik-patolojik bilgileri.	68
Tablo 8. CD133+ hücrelerde ifade düzeyinin arttığı tespit edilen 100 prob.	80
Tablo 9. CD133+ hücrelerde ifade düzeyinin azaldığı tespit edilen 100 prob.	83
Tablo 10. Tümör dokusunda deregülasyonu tespit edilen problemlerin listesi.	90

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kanseri bir organ ya da dokudaki hücrelerin kontrolsüz bölünmesi sonucunda oluşur.	4
Şekil 2. Toplamda 48 adet tıbbi vakanın kaydedildiği, Eski Mısır hiyeroglifi ile yazılan Edwin Smith Papirüsü'nden bir görüntü.	5
Şekil 3. Kanseri ilişkilendirilen risk faktörleri ve kanseri insidansına etkileri.	7
Şekil 4. Kanseri çok çeşitli genomik değişiklikler neticesinde ortaya çıkar.	8
Şekil 5. Transkripsiyonel regülasyon, hücre siklusu, apoptoz ve hücre bakım ve kararlılığından sorumlu genler ve bu genlerin regülasyonunda görülen hatalar hücre büyüme avantajı oluşturur.	9
Şekil 6. Dünya genelinde 2012 yılı insidans oranları.	11
Şekil 7. Dünya genelinde 2012 yılı mortalite oranları.	13
Şekil 8. 1975-2009 yılları arasında kanseri insidans ve mortalite oranları.	14
Şekil 9. Larenks, farinks ile ağız içi boşluğu, nefes borusu ve özofagus arasında yerleşiktir.	15
Şekil 10. Alt baş boyun bölgesinden orta hat kesiti.	16
Şekil 11. Etnisite ve cinsiyete göre 100.000 kişide görülen yeni LSHK tanı sayısı.	18
Şekil 12. Yaş gruplarına göre yeni vakaların dağılımı.	18
Şekil 14. Yıllara göre LSHK yeni vaka ve ölüm sayıları.	19
Şekil 13. Yaş gruplarına göre mortalitenin dağılımı.	19
Şekil 15. Yıllara göre LSHK 5 yıllık sağkalım oranları.	20
Şekil 16. Türkiye' de 2015-2030 yılları arasında tahmini yeni LSHK vaka sayısı.	21
Şekil 17. Türkiye' de 2015-2030 yılları arasında tahmini LSHK mortalitesi.	21
Şekil 18. miRNA' lar yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli RNA' lardır.	24
Şekil 19. miRNA' lar tek tek ya da polisistronik olarak eksprese olurlar.	25
Şekil 20. miRNA' ların oluşum aşamaları.	27
Şekil 21. miRNA' lar kanserde tanı belirteçleri ve tedavi hedefleri arasındadır.	29
Şekil 22. miRNA profilleri farklı kanserleri sınıflandırılabilir.	30
Şekil 23. miRNA' ların deregülasyonu onkogeneze den tümör progresyonu, metastaz ve invazyona kadar birçok aşamada tümör patogeneziyle ilişkilendirilmiştir.	32
Şekil 24. Kanseri kök hücreleri günümüz klinik tedavi stratejilerine karşı direnç gösterme kapasitesine sahiptirler.	35

Şekil 25. Kanser kök hücreleri normal kök hücre, progenitör ya da farklılaşmış hücrelerden köken alarak tümör progresyonuna yol açar.	36
Şekil 26. Kök hücre ayrıştırma yöntemleri.	37
Şekil 27. 100 kadar CD133+ hücre hayvan modellerinde tümör oluştururken 100.000'den fazla CD133- hücre tümör oluşturmaz.	38
Şekil 28. Kanser kök hücrelerini hedefleyerek kanserin tedavisini amaçlayan terapi yaklaşımları kanserin tedavisi adına önemlidir.	39
Şekil 29. Kanser kök hücre ve kanser hücre miRNA profillerinin belirlenmesi kanser kök hücre karakteristiklerinin belirlenmesi adına önemlidir.	40
Şekil 30. “Easy Sep Positive Selection Human PE Selection Kit” i kullanılarak gerçekleştirilen hücre ayrıştırma işlemi.	49
Şekil 31. Hücrelerin PE işaretli antikör ve manyetik nanoparçacıklarla işaretlenerek ayrıştırma işlemine hazırlanması.	50
Şekil 32. Mikrodizin hibridizasyon çemberi, gasket slide, slide holder ve Agilent SurePrint teknolojiyle üretilmiş mikrodizin çipi.	55
Şekil 33. Agilent miRNA mikrodizin prob dizaynı.	56
Şekil 34. Loop yapısı olan RT primerlerinin kullanımıyla miRNA cDNA sentez işlemi	57
Şekil 35. Hibridizasyon problemlerinin kullanımıyla mRNA qPCR işlemi.	59
Şekil 36. Doku örneklerinden manyetik hücre ayrıştırması sonrasında kontrol hücreleri, CD133- ve CD133+ hücrelerde yapılan akım sitometri analizi	70
Şekil 37. (A) CD133+ ve CD133- hücrelerde CD133 ifade düzeyi. (B) CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama CD133 ifade düzeyi.	72
Şekil 38. CD133+ ve CD133- hücrelerde SOX2 ifade düzeyi (A) ve bu hücrelerde ortalama SOX2 ifade düzeyi (B). CD133+ ve CD133- hücrelerde OCT4 ifade düzeyi (C) ve bu hücrelerde ortalama OCT4 ifade düzeyi (D). CD133+ ve CD133- hücrelerde KLF4 ifade düzeyi (E) ve bu hücrelerde ortalama KLF4 ifade düzeyi (F). CD133+ ve CD133- hücrelerde ABCG2 ifade düzeyi (G) ve bu hücrelerde ortalama ABCG2 ifade düzeyi (H).	74
Şekil 39. CD133 ifade düzeyinin (A) SOX2, (B) OCT4, (C) KLF4 ve (D) ABCG2 ifade düzeyi korelasyonlarının scatter plot gösterimi. (E) Analiz edilen genlerin ifade düzeylerinin heat-map gösterimi.	76

Şekil 40. CD133+ ve CD133- hücrelerde mikroRNA mikrodizin görüntüsü. Bütün slayt (A), bakılan tüm mikroRNA' lar (B) ve seçilmiş bir bölgedeki mikroRNA' lar (C) görüntülenmiştir. mikroRNA'lar yeşil renkli floresan veren Cy3 boyası ile işaretlenmiştir.....	78
Şekil 41. CD133+ ve CD133- hücelere ait miRNA profili heat-map gösterimi.	79
Şekil 42. Tümör ve normal dokularda mikroRNA mikrodizin görüntüsü. Bütün slayt (A), bakılan tüm mikroRNA' lar (B) ve seçilmiş bir bölgedeki mikroRNA' lar (C) görüntülenmiştir. mikroRNA' lar yeşil renkli floresan veren Cy3 boyası ile işaretlenmiştir.....	88
Şekil 43. Tümör ve normal dokulara ait miRNA profili heat-map gösterimi.....	89
Şekil 44. Larenks tümör ve normal doku örneklerinde miR-145 ifade düzeylerinin heat-map gösterimi.	92
Şekil 45. Larenks tümör ve normal doku örneklerinde miR-145 ifade düzeyleri.	93
Şekil 46. Hep-2 Hücrelerinde miR-145 transfeksiyonu sonrasında 1., 3., 4., ve 5. günlerde miR-145 ifade düzeyi.....	94
Şekil 47. miR-145' in Hep-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.	95
Şekil 48. miR-145' in Hep-2 hücrelerinin göçü üzerine etkisi (Yara assayı).....	97
Şekil 49. MiR-145' in Hep-2 hücrelerinin göçü üzerine etkisi (Tek koloni göçü assayı).	98
Şekil 50. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde EMT işaretçilerine mRNA düzeyinde etkisi.	100
Şekil 51. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde hücre siklusü üzerine etkisi.	102
Şekil 52. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi.	103
Şekil 53. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde SOX2 mRNA düzeyi üzerine etkisi.....	104
Şekil 54. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde SOX2 protein düzeyi üzerine etkisi.	105
Şekil 55. (A) Tümör ve normal hücrelerde SOX2 ifade düzeyi. (B) Tümör ve normal dokularda ortalama SOX2 ifade düzeyi.....	107
Şekil 56. (A) CD133+ ve CD133- hücre örneklerinde miR-145 ifade düzeyi. (B) CD133+ ve CD133- hücre örneklerinde ortalama miR-145 ifade düzeyi.....	109
Şekil 57. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde SOX2, OCT4, KLF4 ve ABCG2 mRNA düzeyi üzerine etkisi	111
Şekil 58. Kontrol miRNA (A) ya da miR-145 (B) ile transfekte edilen Hep-2 hücrelerinde oluşan kürecikler. Oluşan küreciklerin sayısı (C) ve çapları (D).	113

Şekil 59. Kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfeke edilen Hep-2 hücrelerinde oluşan kolonilerin sayısı (A) ve meroklonların tüm koloniler içerisindeki yüzdesi (B).	115
Şekil 60. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde ALDH aktivitesi üzerine etkisi.	116

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ALDH1	: Aldehid dehidrogenaz 1
bFGF	: Recombinant Human Fibroblast Growth Factor- Basic
CD	: Cluster of differentiation
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
Cy-3	: Cyanine-3
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EGF	: Epidermal Growth Factor
FACS	: Fluorescence-activated cell sorting
FBS	: Fetal Bovine Serum
IGF	: Insulin Growth Factor
kDa	: Kilo dalton
KKH	: Kanser kök hücre
KLF4	: Kruppel-like family of transcription factor 4
LKa	: Larenks Kanseri
LSHK	: Larenks Skuamöz hücreli karsinom
M	: Metastaz
miR	: Mikro-RNA
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
N	: Lenf nodu sayısı
OCT4	: Octamer-binding protein 4
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PE	: Phycoerythrine
PSA	: Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin
qRT-PZR	: Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RISC	: RNA İndüklenmiş Susturma Kompleksi
SOX2	: Sex determining region Y-box 2
SP	: Side population
T	: Tümör boyutu
µm	: Mikrometre
µl	: Mikrolitre

ÖZET

Karataş ÖF. İnsan Skuamöz Hücreli Larenks Karsinomunda Kanser Kök Hücrelerine Özgü miRNA' ların Profillenmesi ve miR-145' in Larenks Kanseri ve Kanser Kök Hücrelerindeki Fonksiyonunun Araştırılması.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2014.

Agresif bir kanser olan larenks kanseri (LKa), dünya genelinde en sık tanısı konan baş ve boyun kanserlerinden biridir. LKa insidansının son zamanlarda artış gösterdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada LKa kanser kök hücrelerinde (KKH) mikroRNA profillemesi ve miR-145' in LKa hücreleri ve KKH potansiyelleri üzerindeki biyolojik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu kapsamda ilk olarak, taze LKa tumor dokularından CD133+ kök hücre benzeri hücreler izole edildi ve akım sitometrisi ve gerçek zamanlı PCR ile karakterize edildi. CD133+ ve CD133- hücrelerin mikroRNA profilleri mikroRNA mikrodizini kullanılarak belirlendi. Tümör-normal dokular ve CD133+/CD133- hücrelerde miR-145 ifade düzeyi araştırıldı. Sonrasında, miR-145'in fonksiyonel analizi için Hep-2 hücreleri kullanıldı.

LKa tümör örnekleri ve KKH' lerinde miR-145 ifadesinin azaldığı gösterildi. Artmış miR-145 ifadesi Hep-2 hücrelerinde apoptozu indükleyerek ve hücre siklusu arrestine yol açarak hücre proliferasyon ve göçünü inhibe ettiği belirlendi. SOX2 ifadesinin ise tümör örneklerinde arttığı ve miR-145' in ektopik olarak ifade edildiği Hep-2 hücrelerinde azaldığı bulundu. Ektopik miR-145 ifadesi indüklenen Hep-2 hücrelerinde küre oluşturma deneyi, tek hücre klonlama deneyi, koloni oluşturma deneyi ve Aldehid Dehidrojenaz deneyi kullanılarak artmış miR-145 ifadesinin kök hücre potansiyelini inhibe ettiği belirlendi.

Sonuç olarak, miR-145' in LKa ve Hep-2 hücrelerinin kök hücre karakteristiği üzerinde düzenleyici rolü olduğu ortaya koyuldu. Bu sonuçlar dikkate alındığında, miR-145' in LKa karsinogenezi, prognozu, metastazı, kemorezistansı ve rekürensinde tümör hücrelerinin kök hücre potansiyellerini regüle ederek önemli rol oynadığı yönünde ilave kanıt elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Larenks Kanseri, Kanser Kök Hücre, mikroRNA, miR-145, Mikrodizin

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41315

ABSTRACT

Karatas OF. Tezin İngilizce Adı. MicroRNA Profiling in Cancer Stem Cells of Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Investigation of miR-145 Function in Larynx Cancer and Larynx Cancer Stem Cells.

Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Istanbul. 2014.

Larynx cancer (LCa), being an aggressive malignancy, is one of the most commonly diagnosed malignant types of head and neck squamous cell carcinoma worldwide. Incidences of LCa have been reported to increase recently. In this study, we aimed to profile microRNAs in cancer stem cells (CSCs) of LCa and explore the biological effects of miR-145 on LCa cells along with their CSC potency.

First of all, CD133+ stem-like cells from freshly resected LCa tumor specimens were isolated and characterized by flow cytometry and quantitative real time PCR. MicroRNA profile of CD133+ and CD133- cells were determined using microRNA microarray. Relative miR-145 level in LCa tumor-normal tissue samples and CD133+/CD133- cells were investigated. Then, Hep-2 cells were utilized for functional analysis of mir-145.

MiR-145 expression in LCa tumor samples and LCa CSCs were shown to be downregulated. MiR-145 overexpression caused inhibition of proliferation and migration in Hep-2 cells through apoptosis induction and cell cycle arrest. SOX2 was overexpressed in tumor samples and its expression was significantly decreased in miR-145-overexpressed Hep-2 cells. Further investigation of stem cell features of miR-145-overexpressing Hep-2 cells by sphere formation assay, single cell cloning assay, colony formation assay, and Aldehyde Dehydrogenase assay demonstrated inhibition of stem cell potency upon miR-145-overexpression.

In conclusion, we have demonstrated the regulatory role of miR-145 in LCa and stem cell characteristics of Hep-2 cells. Based on these results, we propose that mir-145 might carry crucial roles in LCa tumorigenesis, prognosis, metastasis, chemoresistance and recurrence through regulating stem cell properties of tumor cells.

Key Words: Larynx Cancer, Cancer Stem Cells, microRNA, miR-145, Microarray

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 41315

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser bir organ ya da dokudaki hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması neticesinde oluşan kötü huylu urlar olarak tanımlanmaktadır (1). Kanserli hücrelerde genetik ve epigenetik düzeyde hatalar hücre büyüme avantajı oluşturur ve kontrolsüz hücre bölünmesine yol açar (2).

Günümüzde, bulundukları organa ve köken aldıkları hücre türüne göre farklı isimler alan 100' den fazla sayıda kanser çeşidi tanımlanmış ve tahmini kanser çeşidinin 200' den fazla olabileceği ileri sürülmüştür (3). Kanser genomik araştırmaları da son yıllarda kanserin çok çeşitli genomik değişiklikler neticesinde ortaya çıktığı tezini doğrulamıştır. 2000' li yıllarda insan genomu projesinin sonuçlandırılması ve yeni nesil dizileme teknolojisi ile mikroarray teknolojilerinin geliştirilmesi bu savı güçlendirmiştir (4).

Türkiye'nin, Brezilya, Arjantin ve Japonya gibi ülkelerle kanser insidansının 100.000' de 172.3 ile 242.9 arasında olduğu grupta yer aldığı (5) ve 2009 yılında yaşa standart kanser hızının erkeklerde 100.000' de 269,7, kadınlarda 173,3 ve toplamda ise 221,5 olduğu tespit edilmiştir (6). 2009 yılı kanser istatistiklerine göre ülkemizde her yıl yaklaşık 98 bin erkek ve 63 bin kadın kansere yakalanmaktadır (6).

Kanser, bulaşıcı olmayan hastalıklar (BOH) grubundadır ve 2010 yılı WHO BOH Global Durum Raporu' na göre dünya genelinde ölümlerin %63' ünden (36 milyon) sorumlu olan BOH' lar arasında kanser, ölümlerin % 21' inden sorumludur (7). Yine aynı rapora göre 2010 yılı içerisinde kanser dolayısıyla ölenlerin sayısı 8 milyon civarında iken bu sayının 2030 yılında 13.1 milyonu bulması beklenmektedir. Bunlara ek olarak kanserin global ekonomi üzerindeki etkileri oldukça fazladır. Kanser dolayısıyla görülen üretkenlikteki kayıp, bakım masrafları ve erken ölümler nedeniyle gerçekleşen ekonomik kaybın 2008 yılında 895 milyar Amerikan doları bulduğu tahmin edilmektedir (8). Bu kayıp 2008 yılında dünya genelinde görülen trafik kazaları, diyabet, HIV/AIDS, tüberküloz ve sıtma sebebiyle görülen ekonomik kaybının tamamından daha fazladır. 2010 yılında ise kanser nedeniyle yapılan toplam harcamaların 1 ile 1,6 trilyon Amerikan doları arasında olduğu düşünülmektedir. Kanser tedavisine yönelik yapılan ilaç harcamalarının 2013-2016 yılları arasında %90' dan fazla artacağı tahmin edilmektedir (9).

Bütün bu bilgiler ışığında kanser tanısı, kanser moleküler patolojisinin aydınlatılması ve tedavisine yönelik yapılacak araştırmaların önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Şimdiye kadar yapılan araştırmaların kanser tedavisine yönelik çok büyük katkısı olduğunu, kanser insidansının 1975' ten günümüze düzenli bir artış trendinde olmasına rağmen mortalitenin aynı dönemde düşüş göstermesi ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, kanser dolayısıyla görülen ölümlerin azaltılabilmesi, kansere yakalanan bireylerin yaşam kalitelerinin artırılması adına kanserin moleküler patolojisinin aydınlatılması büyük önem arz etmektedir.

Larenks, boyun bölgesinde yemek borusuna paralel olarak yerleşik olan, farenks ile ağız içi boşluğu, nefes borusu ve özofagusun kesiştiği noktada bulunan, solunum/ses ve sindirim ile ilgili çok sayıda fonksiyon sahibi dinamik bir organdır (10). Larenks nefes alış verişi sırasında hava akımını kontrol edebilmesi sayesinde konuşma, nefes alıp verme ve yutkunma gibi işlevlerle ilintili birçok önemli ve hayati fonksiyon gerçekleştirmektedir.

LSHK, insan malinitelerinin %2' den az bir bölümünü oluşturmaktadır. LSHK insidansı yaklaşık 100.000' de 4' tür ve erkeklerde kadınlara göre (4-5 kat), siyah ırkta da beyaz ırka göre (1.5-2 kat) daha yüksektir. LSHK' nın insidansı son 30 yılda düşüş trendi göstermektedir, ne var ki ölüm oranlarındaki düşüş yeni vaka sayısındaki düşüş kadar güçlü olmamıştır (11). Ayrıca, LSHK 5 yıllık sağkalım oranları aynı süreçte %60' lar civarında seyretmiştir. Türkiye'de ise LSHK en sık görülen 7. kanser türüdür ve insidansı 2011 yılında 100.000' de 10,3 olarak tespit edilmiştir. 2004 ile 2011 yılları arasındaki insidans verileri incelendiğinde LSHK insidansının bazı yıllarda düşüş gösterse de 100.000'de 10 civarında seyretmiştir. Ülkemizde LSHK için 5 yıllık sağkalım oranı ise dünya ortalamasının altındadır ve sağlık bakanlığı verilerine göre % 42,8' dir (6). SEER 2012 verileri ve Türkiye' deki demografik etkenler göz önüne alındığında Türkiye' de 2015-2030 yılları arasında hem tahmini yeni LSHK vaka sayısında ve tahmini LSHK mortalitesinde özellikle erkeklerde önemli ölçüde artış beklenmektedir (11).

MikroRNA' lar (miRNA' lar) endojen olarak sentezlenen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli ve kodlamayan kısa ribonükleik asitlerdir (RNA) ve kanser araştırmaları alanında son zamanların en popüler konuları arasına girmiştir (12). Keşiflerinden beri, miRNA' larla ve miRNA' ların fonksiyonları ile ilgili çok önemli

gelişmeler kaydedilmiştir. miRNA oluşum yollarının aydınlatılmasının yanı sıra, binlerce miRNA ve bu miRNA'ların hedeflerinin bulunması, miRNA'ların fizyolojik ve patolojik durumlardaki biyolojik fonksiyonlarının tespit edilmesi birçok çalışmaya konu olmuştur (13).

miRNA'ların deregülasyonu kanser de dahil birçok hastalığın patogenezeine dahil oldukları ve hedefledikleri genlere bağlı olarak potansiyel onkogen ya da tümör süpresör olarak hareket edebildikleri gösterilmiştir (14, 15). Farklı tümörlerdeki özgün ekspresyon paternlerinin olması da miRNA'ları olası tanı belirteçleri ve tedavi hedefleri arasına koymuştur (16). Son yıllarda miRNA'ların kanser patogenezindeki rolleri üzerine çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen miRNA'ların karsinogenezdeki rolleri tam olarak aydınlatılamamıştır ve bu konuda ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

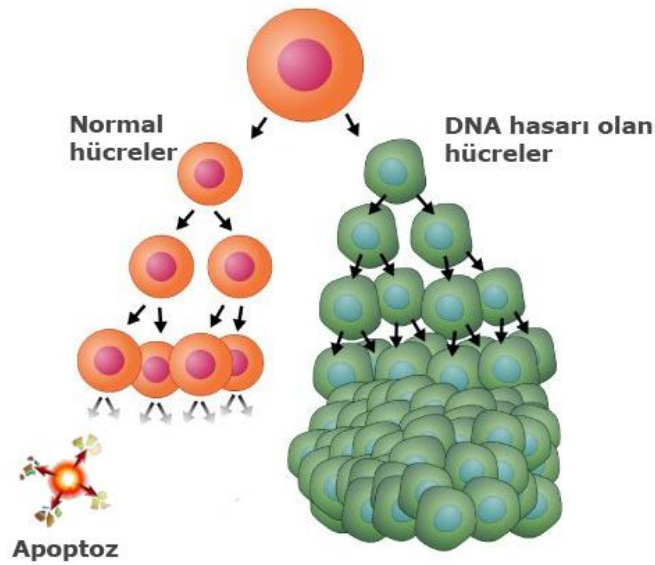
Kanser kök hücreleri kanser kitlesi içinde bulunan nadir hücre popülasyonudur ve kök hücre gibi davranarak tümör gelişiminden ve metastazından sorumlu oldukları düşünülmektedir (17). Kanser progenitör hücreleri ya da tümör başlatıcı hücreler olarak da bilinen kanser kök hücreleri tümör başlatma ve günümüz klinik tedavi stratejilerine karşı direnç gösterme kapasitesine sahiptirler (18). Standart bir kemoterapi tümördeki çoğu hücreyi öldürmekle birlikte kanser kök hücreleri yaşamlarını sürdürürler. Çok az sayıda olmalarına rağmen tümör rekürenslerine, hatta bazen başarılı bir tedaviden yıllarca sonra bile yol açabilirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar kanser kök hücrelerinin baş ve boyun, beyin, akciğer, meme, prostat ve over dahil birçok kanser türünde varlığını göstermiştir (19, 20). miRNA'ların kanser kök hücre regülasyonunda önemli roller üstlendikleri gösterilmiştir. miRNAların kanser kök hücre karakteristiğinin kazanılması ve devam ettirilmesi sürecindeki rollerinin aydınlatılması ve kanser kök hücrelere ait miRNA profillerinin belirlenmesi miRNA temelli terapötik yaklaşımların geliştirilebilmesi adına gereklidir.

Bu çalışmada total ya da parsiyel larenjektomi sonrasında temin edilen taze larenks tümör dokularından CD133 işaretçisi ile ayrıştırılan CD133+ hücrelerin miRNA profillerinin belirlenmesi ve miR-145'in Hep-2 hücrelerinde tümör hücre proliferasyonu, göçü, apoptozu, hücre siklusu ve kök hücre karakteristikleri üzerindeki fonksiyonel etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanserin Tanımı ve Tarihçesi

Kanser bir organ ya da dokudaki hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması neticesinde oluşan kötü huylu tümörler olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1) (1). Kanser kelimesi milattan önce 460-370 yılları arasında yaşayan Hipokrat tarafından ilk defa “*carcinos*” ve “*carcinoma*” olarak sırasıyla ülser oluşturmeyen ve ülser oluşturan tümörler için kullanılmıştır. Parmak benzeri uzantıları olan kanser hücrelerinin yengeçleri (cancer) andırması nedeniyle verilen “*carcinos*” ve “*carcinoma*” isimleri milattan önce 28-50 yılları arasında yaşamış olan Roma’lı hekim Celcus tarafından “*cancer*” olarak kullanılmaya başlanmıştır (21).

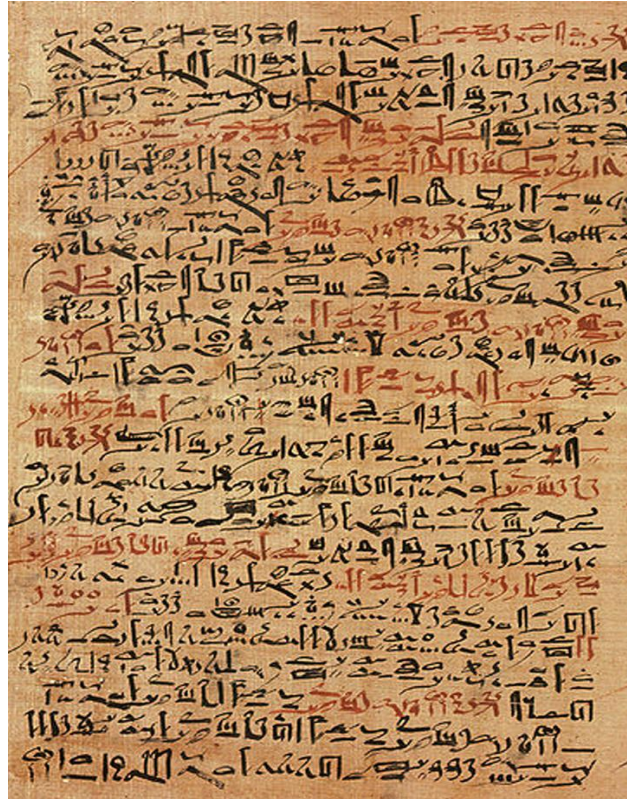


Şekil 1. Kanser bir organ ya da dokudaki hücrelerin kontrolsüz bölünmesi sonucunda oluşur.

<http://rise.duke.edu/seek/pages/page.html?0205> web adresinden değiştirilerek alınmıştır.

Yazılı tarih boyunca insan ve hayvan kanserlerine ait çok sayıda kayıt bulunmaktadır. En erken kayıtlar Eski Mısır medeniyetini gösterirken, mumyalarda tespit edilen fosilleşmiş kemik tümörü (osteosarkoma) izleri kansere ait en erken kanıtlar olarak kabul edilmektedir. Ayrıca aynı mumyalarda kafatası kemiklerinde baş ve boyun kanseri benzeri tahribatlar da bulunmuştur.

Kanserin ilk tanımı milattan önce 2000’ li yıllarda yine Eski Mısır’ da yapılmıştır (Şekil 2). Edwin Smith Papirüsü adı verilen yazıtta çoğu travmatik yaralanmalardan oluşan 48 vakadan 8’ inde meme kanseri (ülser) tanımlanmış, yüzeysel tümörlerin cerrahi olarak uzaklaştırıldığı, daha derinlerdeki tümörlerin ise dağlama yöntemi ile tedavi edilmeye çalışıldığı ifade edilmiş, ne var ki hastalık “tedavi edilemez” olarak belirtilmiştir (21, 22).



Şekil 2. Toplamda 48 adet tıbbi vakanın kaydedildiği, Eski Mısır hiyeroglifi ile yazılan Edwin Smith Papirüsü’ nden bir görüntü.

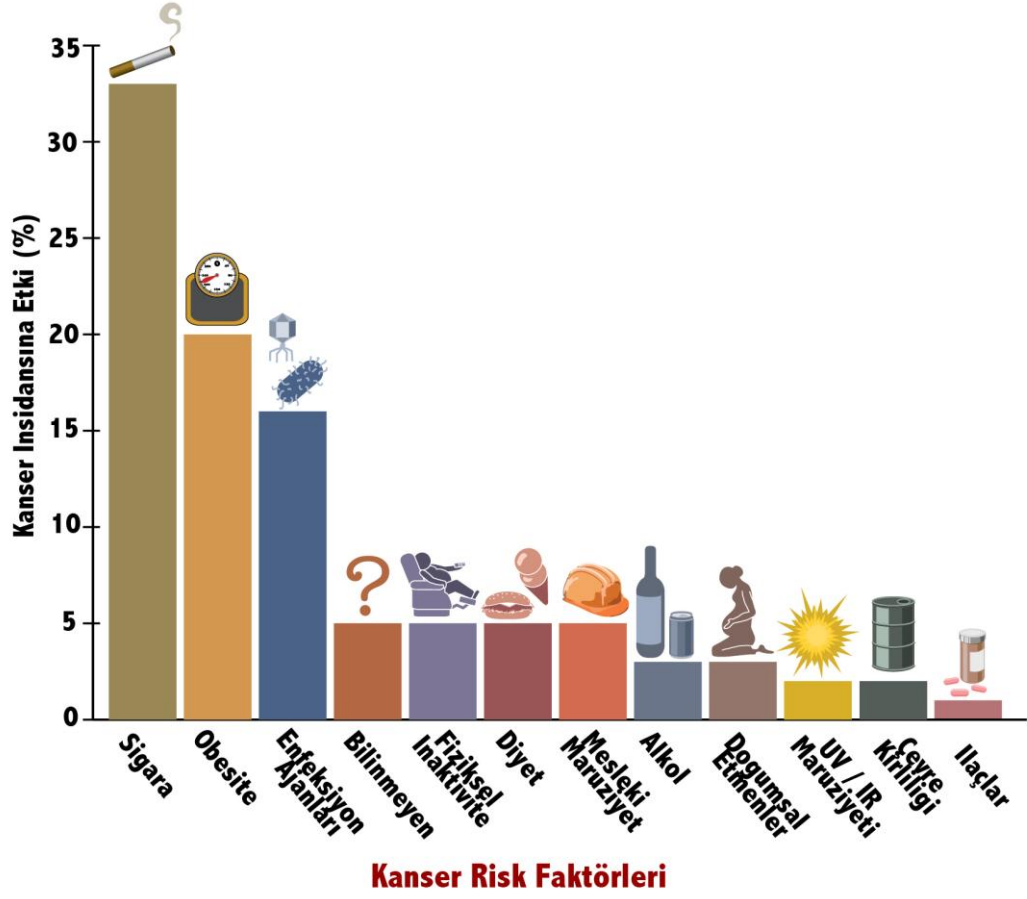
http://tr.wikipedia.org/wiki/Edwin_Smith_Papirusu web adresinden değiştirilerek alınmıştır.

1761 yılında hasta ölümleri sonrasında otopsi yaparak tespit ettiği patolojik bulguları hastalıklarla ilişkilendiren Padua' lı Giovanni Morgagni günümüzde rutin olarak kullanılan otopsi uygulamasını ilk defa kullanmış ve böylelikle bilimsel onkolojinin temellerini atmıştır (23). Aynı dönemde yaşayan ve modern İngiliz tıbbının kurucuları arasında gösterilen İskoç cerrah John Hunter (1728-1793) da bir kısım kanserlerin, özellikle yakınlarındaki dokulara nüfuz etmemiş olanların, cerrahi müdahaleyle uzaklaştırılıp tedavi edilebileceği üzerinde durmuştur (24).

1800' lü yıllarda modern mikroskobun keşfi sonrasında, hücre patolojisinin de kurucusu olarak bilinen Rudolf Virchow, kanserin patolojik incelenmesinin temellerini atmıştır. Hem Morgagni'nin hem de Virchow' un bilimsel onkolojiye katkıları kanser patolojisinin daha iyi anlaşılması, daha doğru tanı konulması ve kanser cerrahisinin gelişmesinde önemli adımlar atılmasına yardımcı olmuştur (21).

1915 yılında ise Tokyo Üniversitesi' nden Katsusaburo Yamagiwa ve Koichi Ichikawa tavşan derisine kömür katranı sürerek ilk defa laboratuvar ortamında deney hayvanlarında kanser oluşturmuş, böylelikle kanserin etyolojisinin çözülebilmesi adına önemli bir adım atmışlardır (21, 25). Sonraki zaman dilimlerinde de çok sayıda karsinojenin varlığı tespit edilmiştir ve kanser etyolojisinin aydınlatılması adına bu süreçte önemli mesafeler katedilmiştir.

Sigara kullanımı (özellikle larenks, akciğer, ve mesane kanserlerinin oluşumunda), obezite, enfeksiyon ajanları (virusler (EBV, HPV, HBV, HCV, HTLV1, HHV8, vb.), bakteriler (*Helicobacter pylori*) ve parazitler (Schistosoma), mesleki maruziyet (asbestos, ağır metaller, arsenik, benzen, vb.), diyet kaynaklı etmenler, alkol kullanımı, UV ve radyasyon maruziyeti kanserle ilişkilendirilen risk faktörleri olarak gösterilmektedir (Şekil 3) (26).

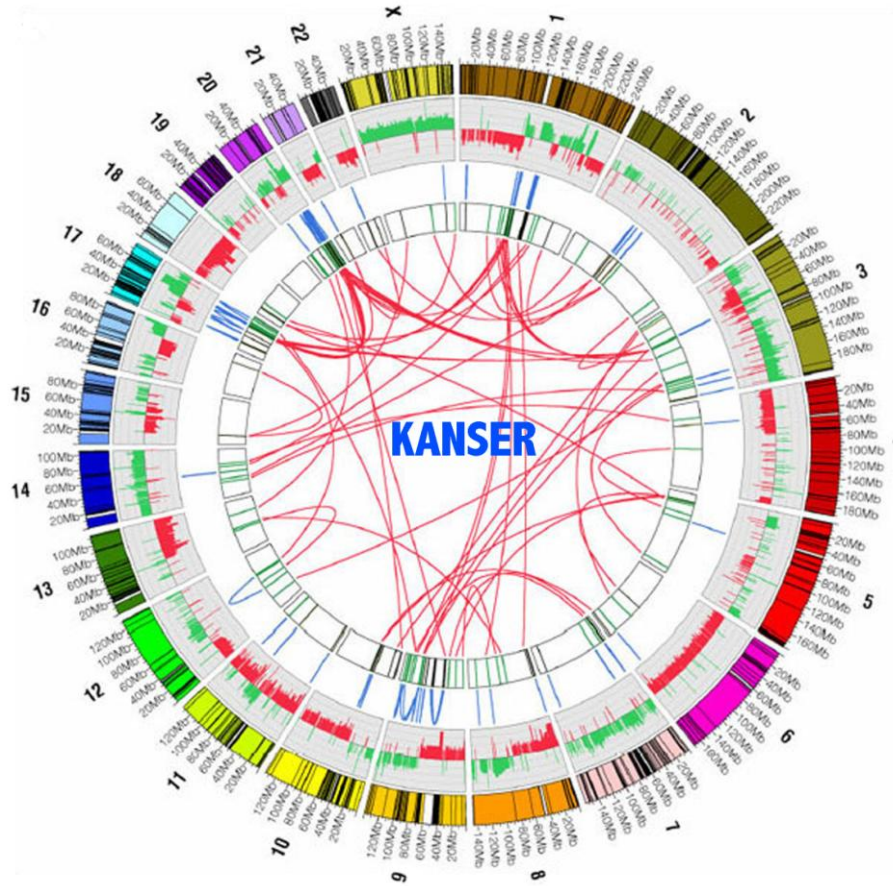


Şekil 3. Kanserle ilişkilendirilen risk faktörleri ve kanser insidansına etkileri.

(3)'ten değiştirilerek alınmıştır.

1900' lü yıllarda hücre biyolojisinin anlaşılması adına gerçekleştirilen çok sayıda önemli çalışma, aynı zamanda kanser patolojisinin de anlaşılmasına yardımcı olmuştur. 1970' li yıllarda onkogen ve tümör süpresör genlerin keşfedilmesiyle birlikte de kanserin modern manada moleküler tanımı yapılmaya başlanmıştır.

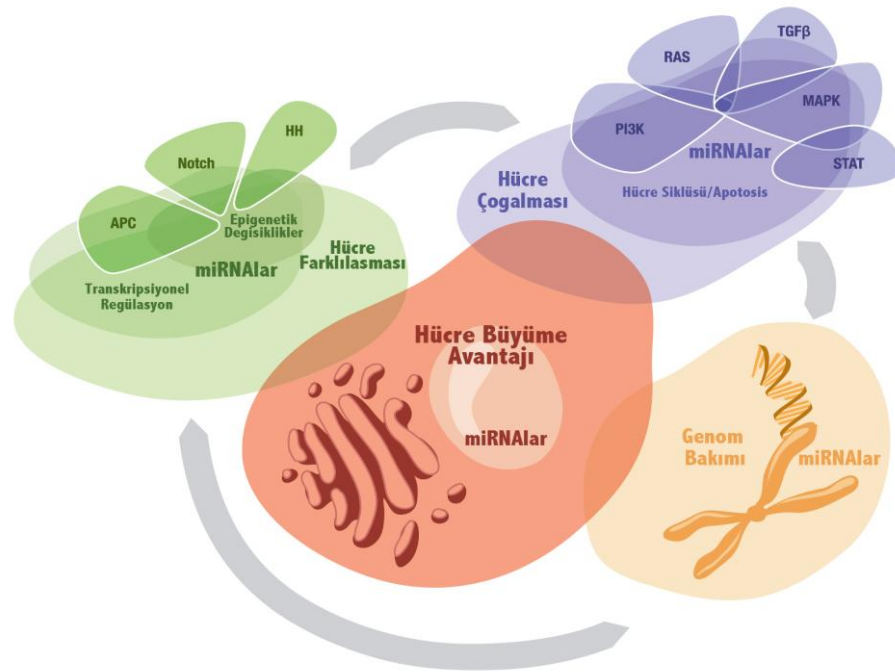
Günümüzde, bulundukları organa ve köken aldıkları hücre türüne göre farklı isimler alan 100’ den fazla sayıda kanser çeşidi tanımlanmış ve tahmini kanser çeşidinin 200’ den fazla olabileceği ileri sürülmüştür (3). Oldukça karmaşık bir hastalık olan kanser, popülasyonlardan, bireylere, moleküler düzeyden genetik materyaldeki değişikliklere kadar bir çok seviyede farklılıklar göstermektedir. Kanser genomik araştırmaları da son yıllarda kanserin çok çeşitli genomik değişiklikler neticesinde ortaya çıktığı tezini doğrulamıştır (Şekil 4). 2000’ li yıllarda insan genomu projesinin sonuçlandırılması ve yeni nesil dizileme teknolojisi ile mikroarray teknolojilerinin geliştirilmesi bu savı güçlendirmiştir (4).



Şekil 4. Kanser çok çeşitli genomik değişiklikler neticesinde ortaya çıkar.

http://www.nytimes.com/2008/12/25/science/25visual.html?8br&_r=0 web adresinden değiştirilerek alınmıştır.

Kanserli hücrelerde genetik ve epigenetik düzeyde hatalar hücre büyüme avantajı oluşturur ve kontrolsüz hücre bölünmesine yol açar (2). Hücre bölünmesinde zamanlama sıkı bir kontrol altındadır ve bu süreçte çok sayıda sinyal yolağı rol alır. Bu yolaklardaki genlerden bir ya da daha fazlasında meydana gelen mutasyonlar kanser oluşumunu tetikleyebilir. Başlıca kanser oluşumu mekanizmaları (i) DNA tamir yolaklarında meydana gelen sorunlar, (ii) normal bir genin onkogene dönüşmesi ya da (iii) tümör süpresör genlerde hata oluşması olarak sıralanabilir. Hücrede transkripsiyon regülasyonundan sorumlu genlerde, hücre siklüsü/apoptozunu düzenleyen genlerde ve de genomik bakım ve kararlılığından sorumlu genlerde ve bu genlerin regülasyonunda görülen sorunlar genetik ve epigenetik yolaklarda oluşan hatalardan başlıcalarıdır (Şekil 5) (27).



Şekil 5. Transkripsiyonel regülasyon, hücre siklüsü, apoptoz ve hücre bakım ve kararlılığından sorumlu genler ve bu genlerin regülasyonunda görülen hatalar hücre büyüme avantajı oluşturur.

(3)' ten değiştirilerek alınmıştır.

2.2. Dünyada ve Türkiye’de Kanser Trendleri

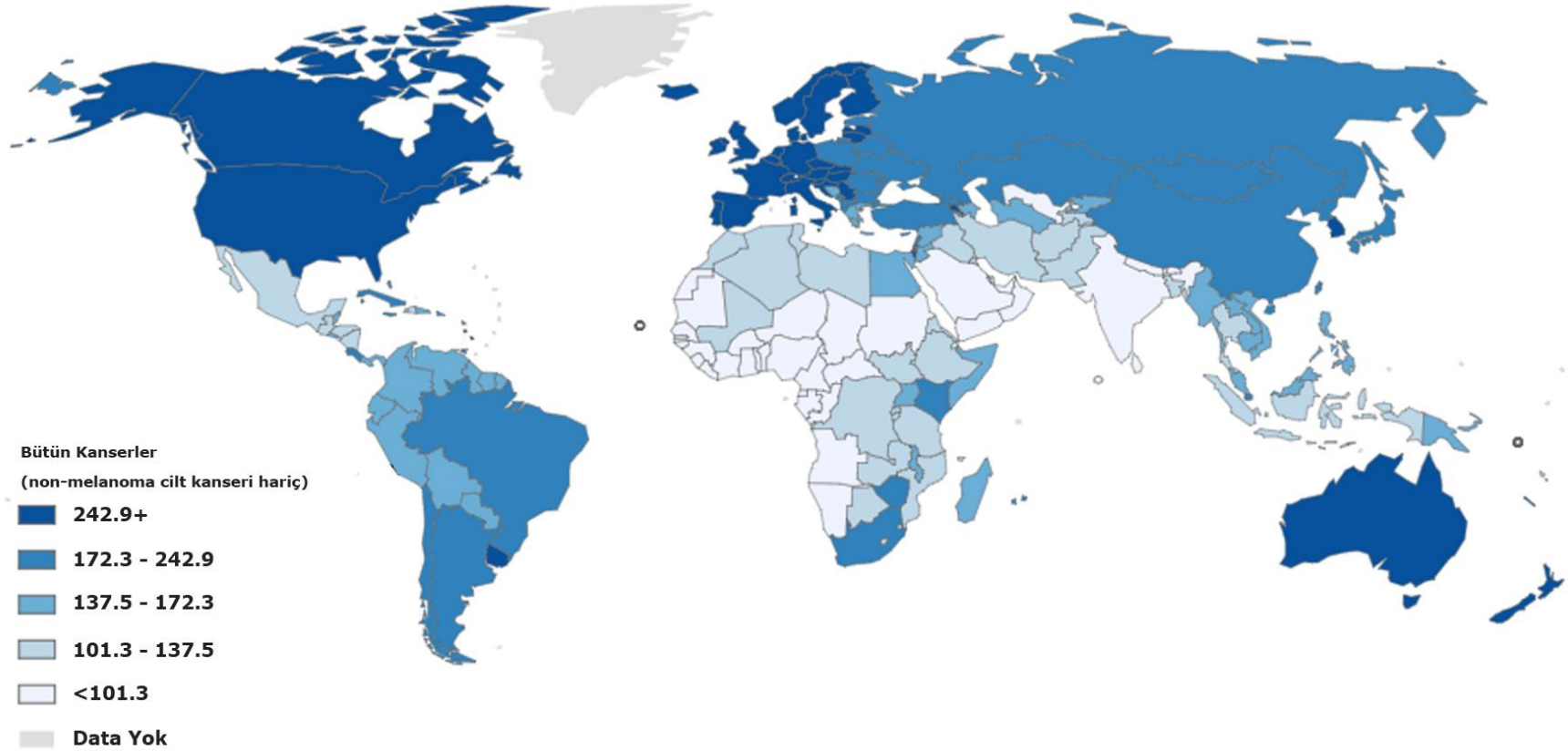
Dünya Sağlık Örgütü bünyesinde bulunan Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından 12 aralık 2013 tarihinde Lyon/Cenova’da dünya genelindeki kanser insidans, mortalite ve prevalans bilgileri ile ilgili en son veriler yayınlanmıştır. GLOBOCAN 2012 adlı sitede online olarak erişime sunulan verilerde, 185 ülkedeki toplamda 28 çeşit kanserle ilgili en kapsamlı bilgiler bulunmaktadır. Dünya genelinde 2012 yılı insidans bilgilerini gösteren harita Şekil 6’ da verilmektedir.

İnsidans, sağlıklı olan kişilerin belli bir zaman birimi içinde (kanser olguları için genellikle bir yıl) belirli bir hastalığa yakalanma olasılığıdır. Yani, risk altındaki toplumda bir yıl içinde gelişen yeni kanser vakaları sayısıdır (28).

Türkiye’nin, Brezilya, Arjantin ve Japonya gibi ülkelerle kanser insidansının 100.000’ de 172.3 ile 242.9 arasında olduğu grupta yer aldığı (5) ve 2009 yılında yaşa standart kanser hızının erkeklerde 100.000’de 269,7, kadınlarda 173,3 ve toplamda ise 221,5 olduğu tespit edilmiştir (6).

2009 yılı kanser istatistiklerine göre ülkemizde her yıl yaklaşık 98 bin erkek ve 63 bin kadın kansere yakalanmaktadır (6). GLOBOCAN verilerine göre ise 2012 senesi içerisinde dünya genelinde 14.1 milyon yeni kanser vakası kaydedilmiş, 8.2 milyon insan kanser nedeniyle ölmüş ve toplamda 32.6 milyon insan (5 yıl içerisinde tanısı konulmuş olan) için kanser teşhisi konulduğu belirtilmiştir. Yeni kanser vakalarının %57’ si (8 milyon), kanser ölümlerinin %65’ i (5.3 milyon) ve de 5-yıllık prevalent kanser vakalarının %48’ i (15.6 milyon) az gelişmiş bölgelerde görüldüğü rapor edilmiştir. Kanser insidans oranları Amerika ve birçok diğer gelişmiş ülkede düşüş trendinde olduğu halde daha az gelişmiş ülkelerde artış eğilimindedir. Bunun nedeni batı tarzı hayat tarzına ayak uydurmaya çalışan gelişmekte olan toplumlarda sigara içme, fiziksel aktivitede azlık ve kalorisi çok gıdalar tüketilmesi gibi alışkanlıkların yaygınlaşması gösterilmektedir (29).

İnsidans ASR



Şekil 6. Dünya genelinde 2012 yılı insidans oranları.

(5)' ten değiştirilerek alınmıştır.

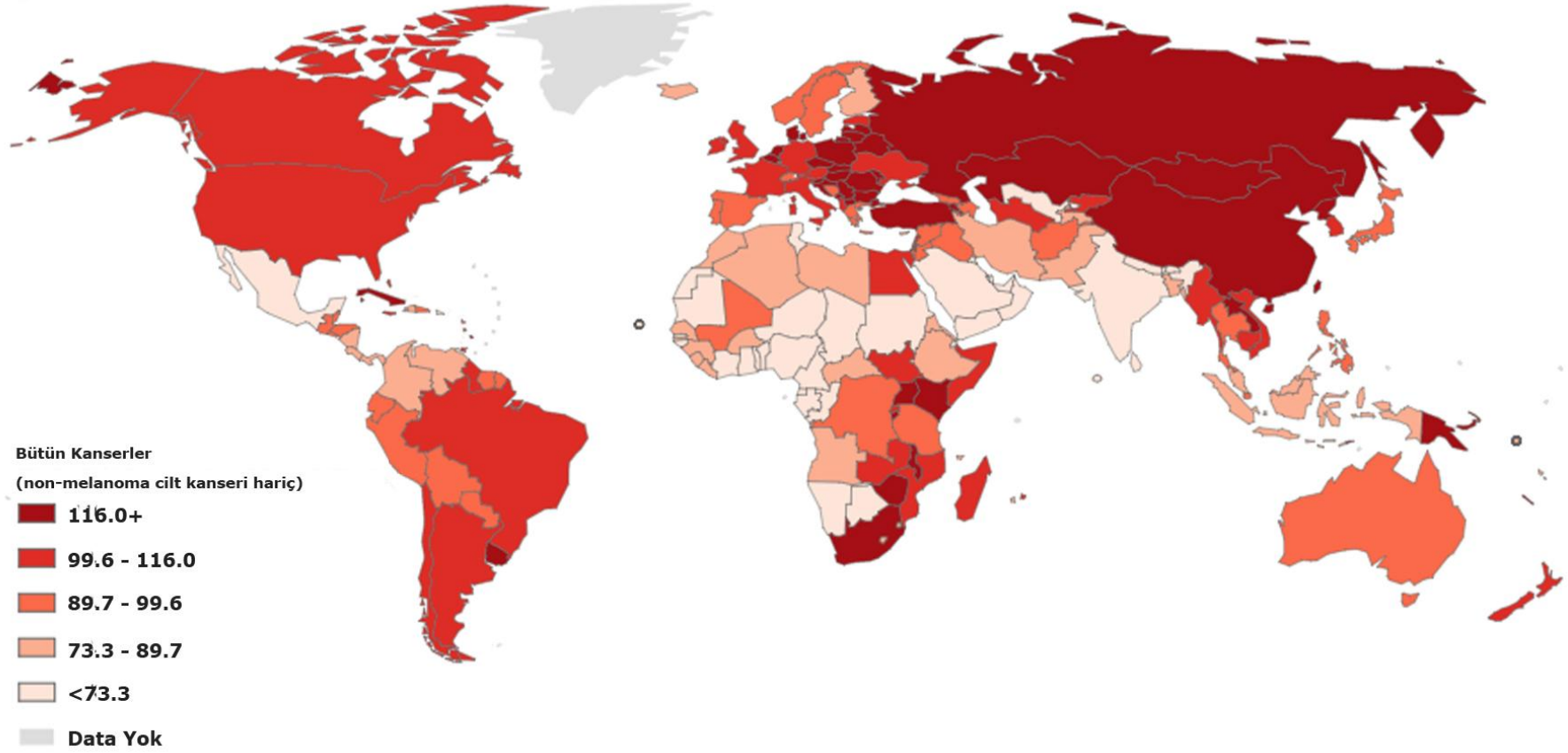
Mortalite oranlarına bakıldığında ise, bölgesel farklılıkların insidans oranlarına göre daha az farklı olduğu, yine de mortalite oranının gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre erkeklerde %15, kadınlarda ise %8 daha fazla olduğu bilinmektedir. En fazla mortalite oranı Orta ve Doğu Avrupa'da 100.000' de 173 olarak tahmin edilmektedir. Türkiye de mortalite oranının en yüksek olduğu ülkeler grubunda yer almaktadır (Şekil 7).

GLOBOCAN 2012 projeksiyonları baz alınarak yapılan tahminlere göre global popülasyonun büyümesi ve yaşlanması dolayısıyla 2025 yılında yeni kanser vakalarının sayısının 19.3 milyona ulaşması beklenmektedir. Ayrıca 2025 yılında, az gelişmiş ülkelerdeki kanser vakalarının ve kanser ölüm oranlarının gelişmiş ülkelere göre daha da artacağı öngörülmektedir (5).

Kanser, bulaşıcı olmayan hastalıklar (BOH) grubundadır ve 2010 yılı WHO BOH Global Durum Raporu'na göre dünya genelinde ölümlerin %63' ünden (36 milyon) sorumlu olan BOH' lar arasında kanser, ölümlerin % 21' inden sorumludur (7). Yine aynı rapora göre 2010 yılı içerisinde kanser dolayısıyla ölenlerin sayısı 8 milyon civarında iken bu sayının 2030 yılında 13.1 milyonu bulması beklenmektedir.

Bunlara ek olarak kanserin global ekonomi üzerindeki etkileri oldukça fazladır. Kanser dolayısıyla görülen üretkenlikteki kayıp, bakım masrafları ve erken ölümler nedeniyle gerçekleşen ekonomik kaybın 2008 yılında 895 milyar Amerikan doları bulunduğu tahmin edilmektedir (8). Bu kayıp 2008 yılında dünya genelinde görülen trafik kazaları, diyabet, HIV/AIDS, tüberküloz ve sıtma sebebiyle görülen ekonomik kaybının tamamından daha fazladır. 2010 yılında ise kanser nedeniyle yapılan toplam harcamaların 1 ile 1,6 trilyon Amerikan doları arasında olduğu düşünülmektedir. Kanser tedavisine yönelik yapılan ilaç harcamalarının 2013-2016 yılları arasında %90' dan fazla artacağı tahmin edilmektedir (9).

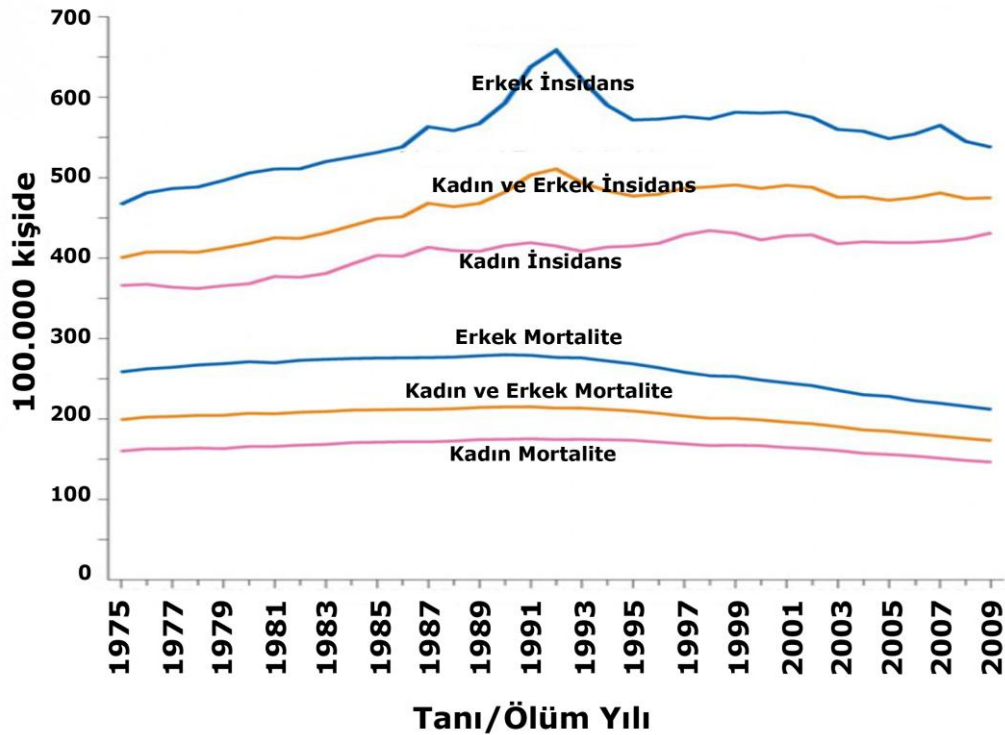
Mortalite ASR



Şekil 7. Dünya genelinde 2012 yılı mortalite oranları.

(5)' ten değiştirilerek alınmıştır.

Bütün bu bilgiler ışığında kanser tanısı, kanser moleküler patolojisinin aydınlatılması ve tedavisine yönelik yapılacak araştırmaların önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Şimdiye kadar yapılan araştırmaların kanser tedavisine yönelik çok büyük katkısı olduğunu, kanser insidansının 1975’ ten günümüze düzenli bir artış trendinde olmasına rağmen mortalitenin aynı dönemde düşüş göstermesi ortaya koymaktadır (Şekil 8). Sadece 1 Eylül 2012 ile 31 Temmuz 2013 yılları arasında kanser tedavisine yönelik 11 yeni ilaç FDA tarafından onaylanmış, mevcut 3 ilaç için ise farklı kanser türlerine yönelik kullanım izni verilmiştir. Bunlara ek olarak aynı süreçte 3 yeni görüntüleme teknolojisi geliştirilmiştir (3). Fakat halen birçok kanser türü için insidans, prevalans ve mortalite oranları oldukça yüksektir, ve sağkalım oranlarında gelişme görülmemektedir. Dolayısıyla, kanser dolayısıyla görülen ölümlerin azaltılabilmesi, kansere yakalanan bireylerin yaşam kalitelerinin artırılması adına kanserin moleküler patolojisinin aydınlatılması büyük önem arz etmektedir.



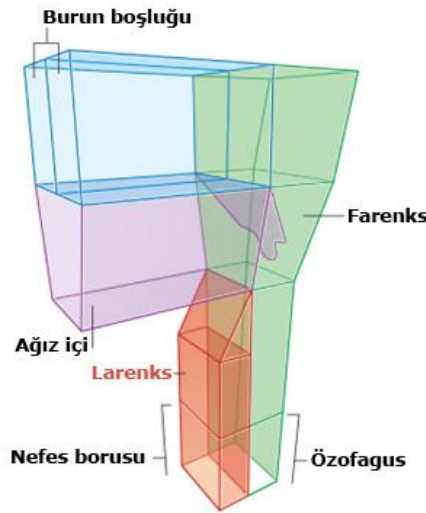
Şekil 8. 1975-2009 yılları arasında kanser insidans ve mortalite oranları.

(30)’ dan değiştirilerek alınmıştır.

2.3. Larenks Anatomisi, Fonksiyonu ve Larenks Skuamöz Hücreli Karsinomu

2.3.1. Larenks Anatomisi ve Fonksiyonu

Larenks, boyun bölgesinde yemek borusuna paralel olarak yerleşik olan, farenks ile ağız içi boşluğu, nefes borusu ve özofagusun kesiştiği noktada bulunan, solunum/ses ve sindirim ile ilgili çok sayıda fonksiyon sahibi dinamik bir organdır (Şekil 9) (10).

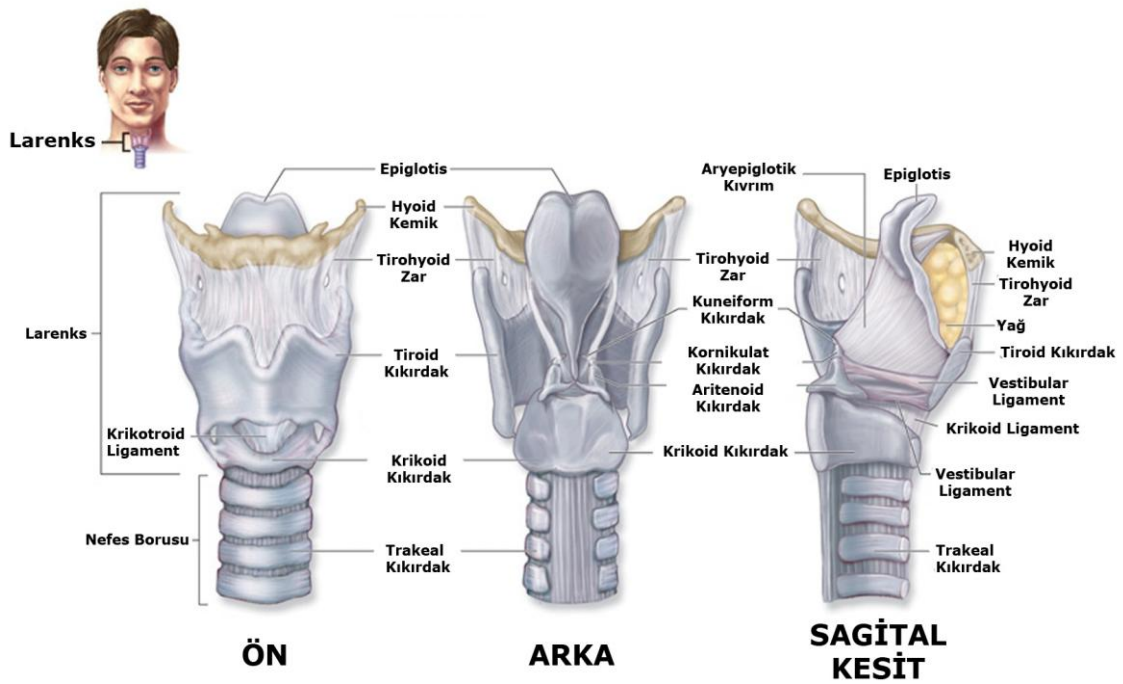


Şekil 9. Larenks, farenks ile ağız içi boşluğu, nefes borusu ve özofagus arasında yerleşiktir.

<http://medicinembbs.blogspot.com.tr/2011/03/anatomy-of-larynx.html> web adresinden değiştirilerek alınmıştır.

Anatomik olarak epiglottisten krikoid kıkırdağa kadar uzanan bölgede bulunmaktadır. Arka kısmında krikoid kıkırdağını kaplayan mukozal zar, aritenoid bölge ve aritenoidler arası boşlukla çevrelenen larenks, ön kısmında ise epiglottisin dile bakan yüzü, tirohyoid zar, krikotiroid zar ve krikoid kıkırdak ön kemeri ile çevrilidir (Şekil 10) (31).

Larenks supraglotik, glotik ve subglotik bölgelerden oluşmaktadır. Supraglottik larenkste epiglottisin uç kısmından gerçek ses tellerine kadar uzanır ve aryepglotik kıvrımlar, aritenoidler ve yalancı ses tellerini içerir. Glotik larenkste ise gerçek ses telleri bulunur. Subglotis ise ses tellerinin boştaki uçlarının 0.5 mm altından krikoid kıkırdağın alt sınırına kadarki bölgeyi oluşturmaktadır (10).



Şekil 10. Alt baş boyun bölgesinden orta hat kesiti.

(32)' den değiştirilerek alınmıştır.

Larenks nefes alış veriş sırasında hava akımını kontrol edebilmesi sayesinde konuşma, nefes alıp verme ve yutkunma gibi işlevlerle ilintili birçok önemli ve hayati fonksiyon gerçekleştirmektedir.

Larenksin fonksiyonları arasında en önceliklisi alt solunum yollarını korumasıdır. Yutkunma işlemi gerçekleşirken yiyeceklerin solunum yoluna gitmesi larenksin soluk borusunu kapatması ve solunumu geçici olarak durdurmasıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca larenks, solunum yolu mukozası ile yabancı bir partikülün temas etmesi durumunda oluşan öksürme refleksinin oluşmasında da birinci dereceden görev almaktadır.

Larenksin diğer görevleri arasında ses telleri vasıtasıyla konuşma fonksiyonunun gerçekleştirilmesi, nefes alıp verme işleminin düzenlenmesi ve göğüs kafesinin sabitlenmesi gösterilebilir. Göğüs kafesinin sabitlenmesi çok sayıda torasik ve abdominal kasın optimum çalışması için gerekli bir durumdur. Örneğin, öksürme, kusma, dışkı ve idrara çıkma ve doğum yapma glotisin kapanarak göğüs kafesinin sabitlenmesiyle gerçekleştirilebilmektedir (33).

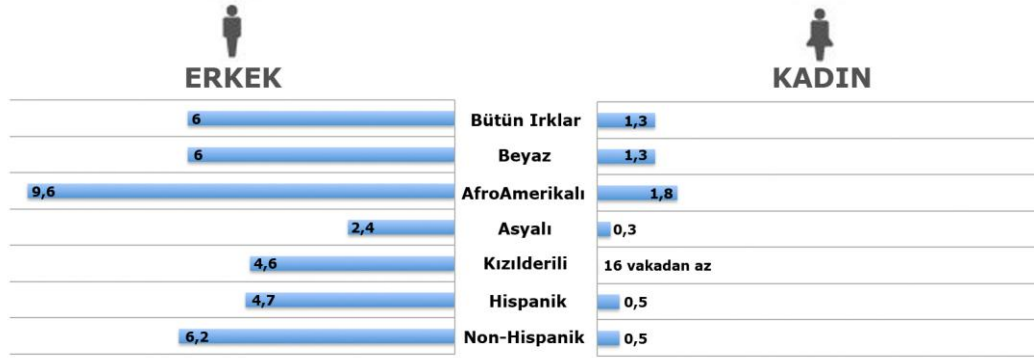
2.4. Larenks Skuamöz Hücreli Karsinomu

Larenks' te birçok çeşit benin ve malin tümör görülebilmektedir. Vokal nodüller, vokal polipler, Reinke ödemi, kontakt ülserler, duktal ve sakküler ülserler, laringoseller gibi non-neoplastik tümörler, kondroma, hemanjiyoma, skuamöz papiloma, granüler hücreli tümör, glandüler tümörler gibi neoplastik tümörler larenkste görülen ve çok yaygın olmayan benin tümörlerdir (34).

Larenkste görülen malin tümörler ise verüköz karsinom, adenokarsinom, fibrosarkom, kondrosarkom ve skuamöz hücreli karsinomdur (35). Bu tümörlerin %96' sını yüzey epitelinden köken alan skuamöz hücreli karsinom (LSHK) oluşturmaktadır (36).

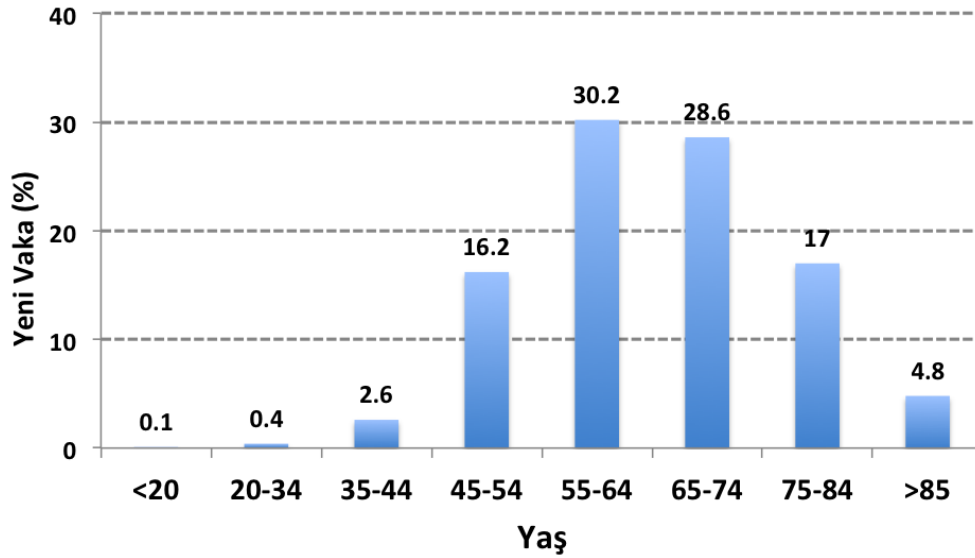
Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanseri Enstitüsü Sağlık Epidemiyolojisi ve Sonuçları (SEER) veritabanı verilerine göre Amerika' da 2008-2010 yılları arasındaki insidans ve mortalite bilgileri kullanılarak oluşturulan, hayat boyu kansere yakalanma riski ve kanserden ölme riski LSHK için erkeklerde sırasıyla % 0.6 (167' de 1) ve % 0.21 (476' da 1); kadınlarda ise % 0.14 (714' te 1) ve % 0.05 (2000' de 1) olarak hesaplanmıştır (37).

LSHK, insan malinitelerinin %2' den az bir bölümünü oluşturmaktadır. LSHK insidansı yaklaşık 100.000' de 4' tür ve erkeklerde kadınlara göre (4-5 kat), siyah ırkta da beyaz ırka göre (1.5-2 kat) daha yüksektir (Şekil 11).



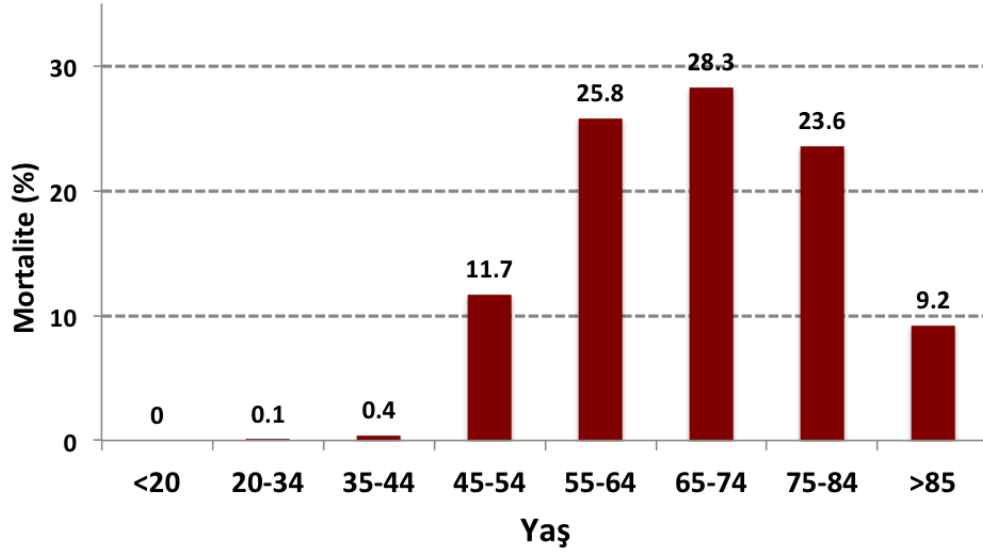
Şekil 11. Etnisite ve cinsiyete göre 100.000 kişide görülen yeni LSHK tanı sayısı
(11)' den değiştirilerek alınmıştır.

45-85 yaş arası bireylerde daha sık görülmektedir (10). LSHK tanısı en fazla 55-64 yaşları arasında koyulmaktadır ve medyan yeni tanı yaşı 65' tir (Şekil 12) (11).



Şekil 12. Yaş gruplarına göre yeni vakaların dağılımı.
(11)' den değiştirilerek alınmıştır.

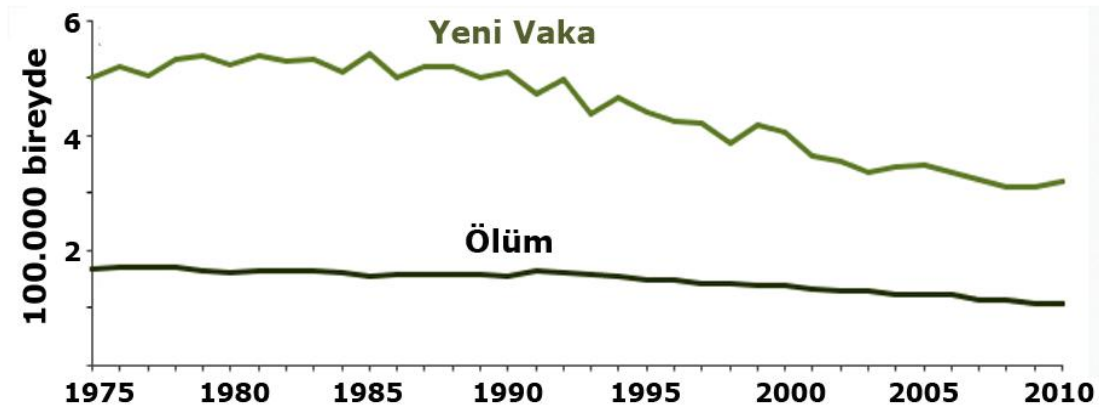
LSHK nedeniyle ölüm ise 55-85 yaş arası bireylerde daha sık görülmektedir (10). LSHK nedeniyle ölüm en fazla 65-74 yaşları arasında gerçekleşmektedir ve medyan ölüm yaşı 68’ dir (Şekil 13) (11).



Şekil 13. Yaş gruplarına göre mortalitenin dağılımı.

(11)’ den değiştirilerek alınmıştır.

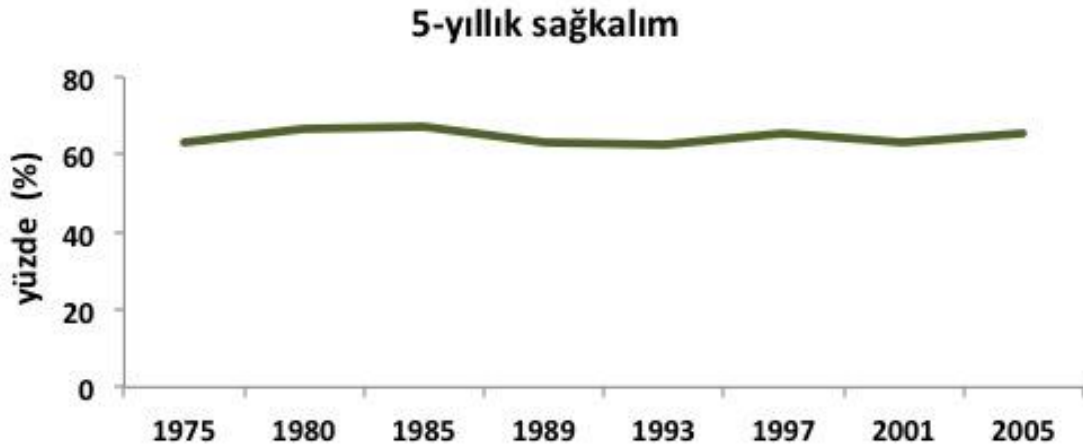
LSHK’ nın insidansı son 30 yılda düşüş trendi göstermektedir, ne var ki ölüm oranlarındaki düşüş yeni vaka sayısındaki düşüş kadar güçlü olmamıştır (11) (Şekil 14).



Şekil 14. Yıllara göre LSHK yeni vaka ve ölüm sayıları.

(11)’ den değiştirilerek alınmıştır.

LSHK 5 yıllık sağkalım oranları aynı süreçte %60' lar civarında seyretmiştir (Şekil 15).

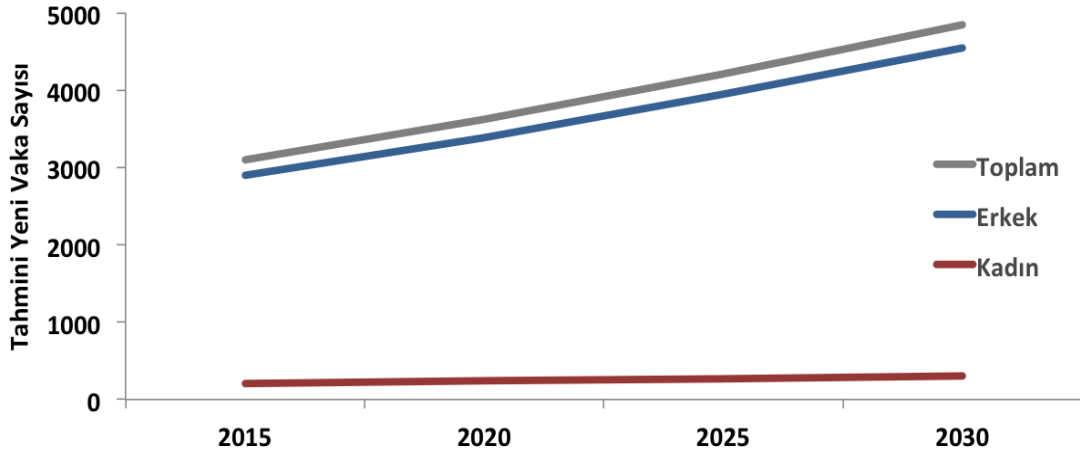


Şekil 15. Yıllara göre LSHK 5 yıllık sağkalım oranları.

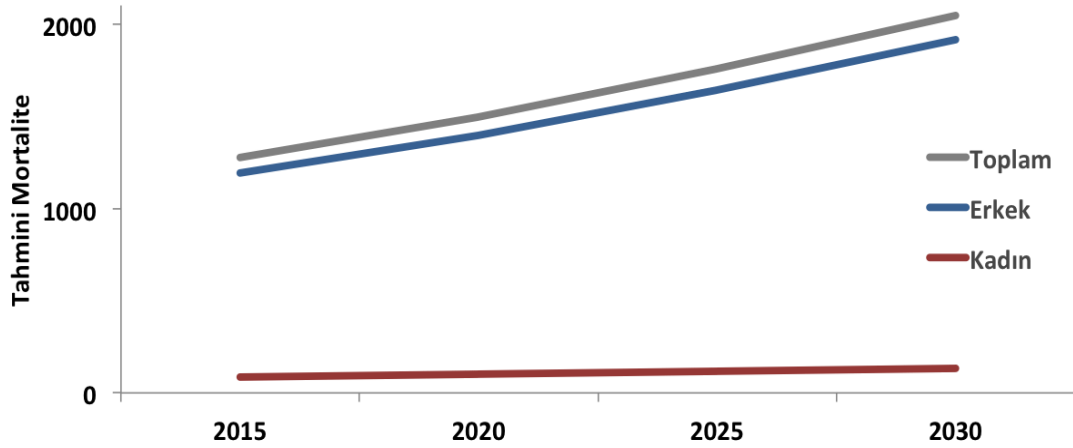
(11)' den değiştirilerek alınmıştır.

Türkiye'de ise LSHK en sık görülen 7. kanser türüdür ve insidansı 2011 yılında 100.000' de 10,3 olarak tespit edilmiştir. 2004 ile 2011 yılları arasındaki insidans verileri incelendiğinde LSHK insidansının bazı yıllarda düşüş gösterse de 100.000' de 10 civarında seyretmiştir. Ülkemizde LSHK için 5 yıllık sağkalım oranı ise dünya ortalamasının altındadır ve sağlık bakanlığı verilerine göre % 42,8' dir (6).

SEER 2012 verileri ve Türkiye'deki demografik etkenler göz önüne alındığında Türkiye' de 2015-2030 yılları arasında hem tahmini yeni LSHK vaka sayısında (Şekil 16) ve tahmini LSHK mortalitesinde (Şekil 17) özellikle erkeklerde önemli ölçüde artış beklenmektedir (11).



Şekil 16. Türkiye’ de 2015-2030 yılları arasında tahmini yeni LSHK vaka sayısı.



Şekil 17. Türkiye’ de 2015-2030 yılları arasında tahmini LSHK mortalitesi.

2.5. Larenks Skuamöz Hücreli Karsinomu Etiyolojisi, Semptomları Tanısı ve Tedavisi

LSHK vakalarının çoğusu sigara ve alkol tüketimi ile ilişkilendirilmiştir. Alkol ile benzoat ve diğer hidrokarbon karsinojenleri içeren sigaranın LSHK' ya yakalanma riskini toplamda 15 kata kadar artırdığı bildirilmiştir. Alkol tüketiminin daha çok supraglottik karsinomların oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir (10, 38). Yaş, cinsiyet, ırk, HPV enfeksiyonu, radyasyon maruziyeti, genetik faktörler, hava kirliliği, diyet yetersizliği (örneğin, vitamin A, C ve demir eksikliği), kronik gastrointestinal reflü ve iş kaynaklı karsinojen maruziyeti diğer önemli risk faktörleri arasındadır (31). LSHK' nın görülme oranının en yüksek olduğu ülkeler İspanya, Fransa ve İtalya'dır. Yüksek alkol tüketimi ile ilişkilendirilen bu durum LSHK insidansını bu ülkelerde dünya ortalamasının çok üzerine çekmektedir. LSHK insidansının en düşük olduğu bölgeler ise Japonya, İsveç ve Norveç sınırları içerisinde kalmaktadır. Bunların yanı sıra, genel olarak LSHK insidansı kentsel bölgelerde kırsal alanlara oranla daha yüksektir (31, 38).

Boğuk ses, ses değişimleri, kuru boğaz, sürekli öksürük, yutkunurken boğazda acı, yutkunma güçlüğü, kulak ağrısı, nefes almada zorluk, kilo kaybı ve boğaz bölgesinde yumru LSHK' nın en bilindik semptomları arasındadır. LSHK tanısının konulmasında direk ya da indirek larengoskopi, mikrolarengoskopi, biyopsi incelemesi, Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) taraması, bilgisayarlı tomografi (BT) taraması akciğer filmi, pozitron emisyon tomografisi (PET) taraması tekniklerinden faydalanılmaktadır (39).

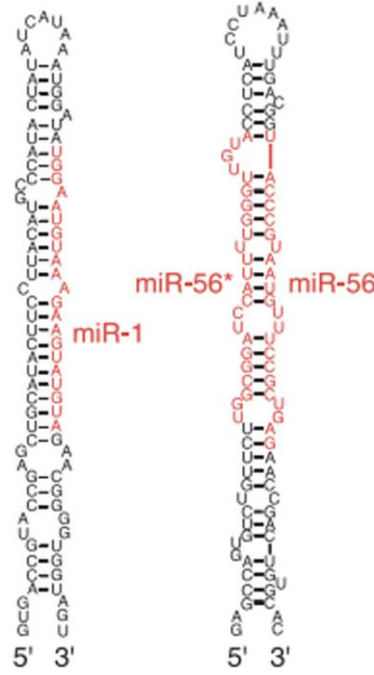
Larenks tümörlerinin büyük bir bölümü glottik bölgeye (%56) ve supraglottik bölgeye (%41) lokalizedir. Subglottik bölge tümörleri (%1-2) daha nadir görülmektedir. Tümörün orijininin belirlenmesi, klinik açıdan farklı davranan bu tümörlere yönelik tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde ve takibinde önem arz etmektedir. Örneğin, subglottik tümörlerin bilateral metataz geliştirme olasılıkları diğer bölge tümörlerine nazaran daha yüksektir (40).

Ayrıca tümörün ve yayılımının (T1, T2, vb.), bölgesel lenf nodu yayılımı ve büyüklüğünün (N0, N1, vb.) ve de uzak bölge metastazının (M0, M1) değerlendirildiği TNM evrelemesi de LSHK tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde önemlidir (38).

Konvansiyonel koruyucu cerrahi müdahale, endoskopik lazer cerrahisi, suprakrikoid parsiyel ya da total larenjektomi, radyoterapi ve kombine kemoterapi LSHK tedavisinde kullanılan seçenekler olarak görülmektedir. LSHK insidans ve mortalitesindeki düşüşün istenilen düzeyde olmaması, 5-yıllık sağ kalım oranlarının gelişmemesi, özellikle Türkiye için tahmini insidans ve mortalite oranlarındaki artış beklentisi yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla LSHK patogenezinin aydınlatılması bu süreçte büyük önem arz etmektedir.

2.6. MikroRNA' lar

MikroRNA' lar (miRNA' lar) endojen olarak sentezlenen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli ve kodlamayan kısa ribonükleik asitlerdir (RNA) (Şekil 18) ve kanser araştırmaları alanında son zamanların en popüler konuları arasına girmiştir (12).

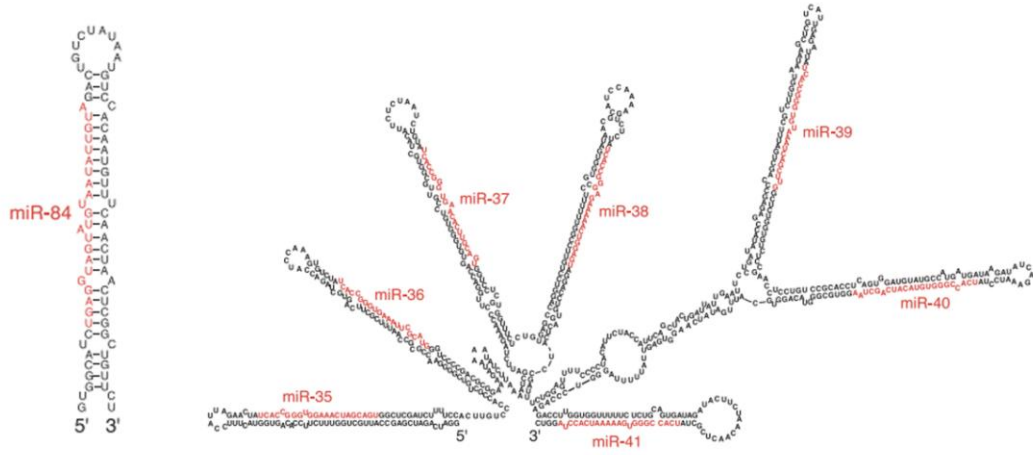


Şekil 18. miRNA' lar yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli RNA' lardır.

(41)' den değiştirilerek alınmıştır.

miRNA' lar ilk olarak 1993 yılında kodlamayan kısa RNA molekülü lin-4' ün *Caenorhabditis elegans* larvasında lin-14 proteinin ekspresyonunu baskılayarak larva gelişiminde rol aldığının gösterilmesi ile keşfedilmiştir (42, 43). *C. elegans*'ta kodlamayan diğer bir kısa RNA olan let-7' nin keşfedilmesi, bunun yanı sıra kodlamayan kısa RNA'ların gen ekspresyonunu kontrol edebildiğinin bulunması miRNA'ların kodlamayan genomun önemli bir parçası olduğunu ortaya koymuştur (44). Takip eden yıllarda let-7' nin eklembacaklılar, yumuşakçalar, bitkiler, virüsler ve omurgalılar gibi türlerde de tespit edilmesi miRNA'lar aracılığıyla gerçekleşen gen ekspresyon düzenlemesinin yaygın bir regülatör model olabileceği fikrini ortaya koymuştur (45-47). Keşiflerinden beri, miRNA' larla ve miRNA' ların fonksiyonları ile ilgili çok önemli gelişmeler kaydedilmiştir. miRNA oluşum yollarının

aydınlatılmasının yanı sıra, binlerce miRNA ve bu miRNA'ların hedeflerinin bulunması, miRNA'ların fizyolojik ve patolojik durumlardaki biyolojik fonksiyonlarının tespit edilmesi birçok çalışmaya konu olmuştur (13).



Şekil 19. miRNA'lar tek tek ya da polisistronik olarak eksprese olurlar.

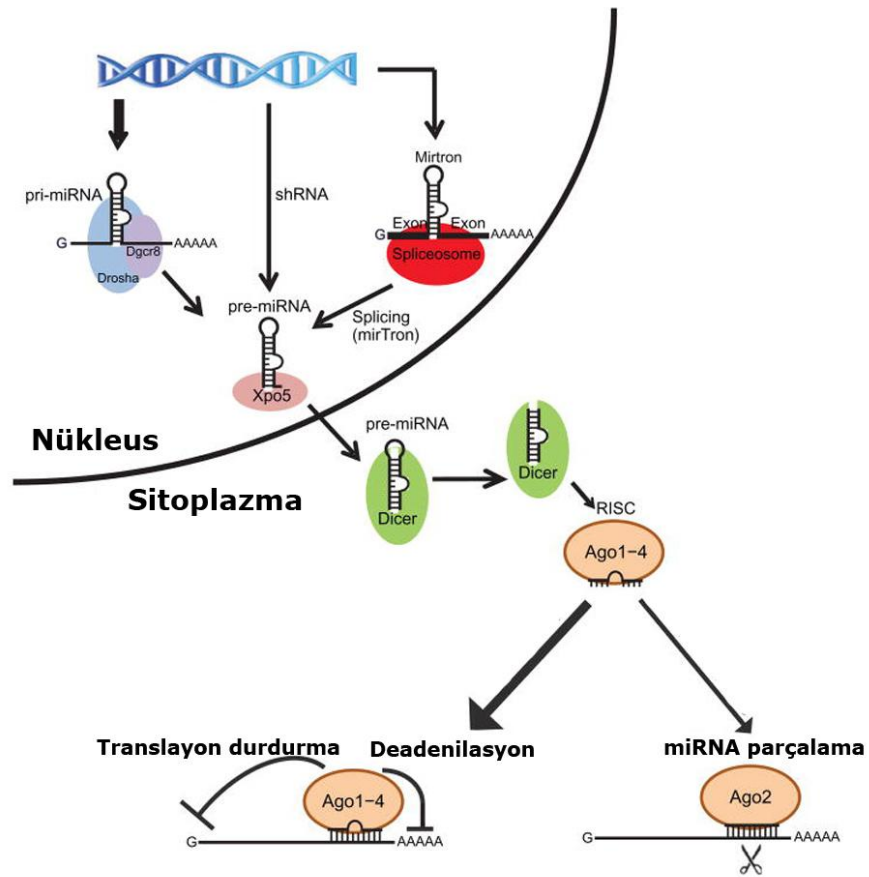
(41)'den değiştirilerek alınmıştır.

Intron ve ekzonlara yerleşimli olan miRNA'lar içerisinde oldukları genlerle birlikte eksprese olurken, diğerlerinin kendi promotörleri vardır ve tek tek ya da polisistronik olarak eksprese olurlar (Şekil 19). Kendi promotörleri olan miRNA'lar çoğunlukla RNA polimeraz II tarafından uzun primer transkript (pri-miRNA) olarak sentezlenir (48). Pri-miRNA'lar nükleusta RNase III Drosha enzimi ve Di George syndrome critical region 8 (DGCR8)'i de içerisinde barındıran bir protein kompleksi tarafından işlenir (49-51). Drosha pri-miRNA'yı çift zincirli RNA-bağlanma domaini aracılığıyla tanıır ve keserek prekürsör miRNA'yı (pre-miRNA) oluşturur (47, 52). Drosha ve DGRC-8'den bağımsız sentezlenen miRNA grubu da vardır ve mirtronlar olarak adlandırılırlar. Mirtronlar kodlayan genlerde intronlara lokalizedirler ve splice yolağı aracılığıyla pre-miRNA'lara dönüştürülürler (53). Intronlardan sentezlenen miRNA'larda olgun miRNA'ların oluşturulması kanonikal ve non-kanonikal yollarla gerçekleştirilir (54). Kanonikal yolda pre-miRNA'lar splice yolağına girmeden klasik miRNA oluşum yolağına dahil olurken non-kanonikal yolda splice işlemi ile oluşan intronlar pre-miRNA olarak işlev görür ve Drosha'dan bağımsız olarak olgun miRNAların oluşumu gerçekleşir (53, 54).

Klasik miRNA oluşum yolağında, pre-miRNA' lar Exportin-5 transporter proteini aracılığıyla sitoplazmaya taşınır (55, 56). Sitoplazmada, ikincil stem-loop yapıda olan pre-miRNA' lar (57), kendisi de miRNA' lar tarafından hedeflenen ve tümörlerin %39' unda düşük ifade düzeyine sahip olan RNase III endonükleaz Dicer tarafından işlenir (58). Dicer, transactivation-responsive RNA-binding protein (TRBP) ile birlikte geçici miRNA/miRNA* dubleks yapısını oluşturur (komplementer miRNA*' in önceleri degrade olduğu düşünülürken, son bulgular miRNA*' ın da fonksiyonel olduğunu ve birçok biyolojik sürece dahil olduğunu göstermiştir (59-62).

Sonrasında miRNA/miRNA* dubleks yapısı büyük bir protein kompleksi olan RNA-induced silencing complex (RISC) kompleksine yüklenir ve tek zincirli olgun miRNA bu komplekse tutunarak hedef mRNA' lara taşınır (63, 64).

Son dönemlerde yapılan bir çalışmada Dicer’ dan bağımsız olarak kısa uzunluktaki pre-miRNA’ nın (miR-451) direk Ago2’ ye yüklenerek olgun miRNA’ nın oluşturulabildiği bulunmuştur (65). Şekil 20’ de miRNA oluşum yolları kısaca özetlenmektedir.



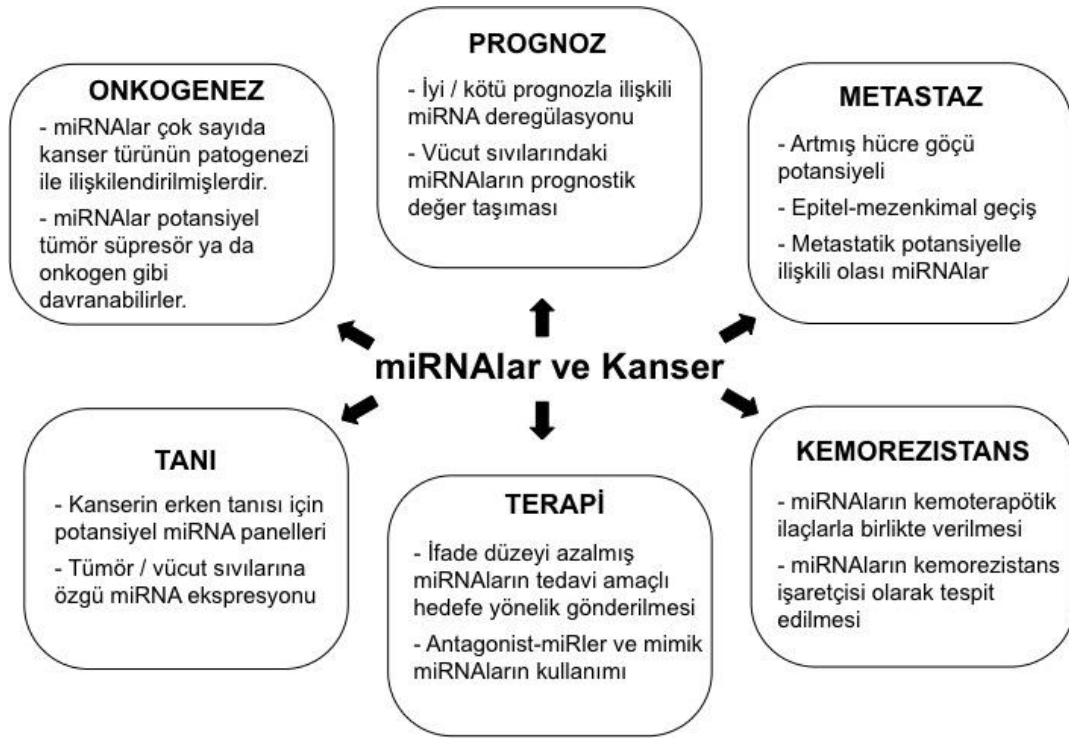
Şekil 20. miRNA' ların oluşum aşamaları.

(66)' dan değiştirilerek alınmıştır.

MiRNA' ların mRNA ifade düzeylerini düzenlemesi çoğunlukla hedef mRNAların 3' untranslated region (UTR) bölgelerine inkomplet hibridizasyonu ile gerçekleşir. RISC aracılığıyla gerçekleşen bu hibridizasyon mRNA degradasyonu, protein sentezinin inhibisyonu ve/veya hedef mRNA'nın deadenilasyonu gerçekleşir (Şekil 20).

Şimdiye kadar toplamda 30424 miRNA tanımlanmıştır. Bu miRNA' lardan hem omurgalı hem de omurgasız hayvanlarda yüksek oranda korunmuş dizilere sahip 2578 tane olgun miRNA (1872 prekürsör) insana aittir (miRBase: Release20.0) (67-69). Bu miRNAların insan genlerinden %60' ından fazlasını hedefleyerek bu genlerin ifadesini düzenlediği düşünülmektedir (70). Bu da miRNAlarla gerçekleştirilen gen regülasyonunun post-transkripsiyonel gen regülasyonu modelleri arasında en yaygın olduğunu göstermektedir (71). miRNA' lar tek tek çalışmak yerine birlikte etki göstererek mRNA seviyelerinin ince ayarlarının yapılmasında rol alırlar (72). Gelişim, proliferasyon ve apoptoz gibi birçok biyolojik işlevde görev aldıkları bilinmektedir.

miRNA' ların deregülasyonu kanser de dahil birçok hastalığın patogeneze dahil oldukları ve hedefledikleri genlere bağlı olarak potansiyel onkogen ya da tümör süpresör olarak hareket edebildikleri gösterilmiştir (14, 15). Farklı tümörlerdeki özgün ekspresyon paternlerinin olması da miRNA' ları olası tanı belirteçleri ve tedavi hedefleri arasına koymuştur (Şekil 21) (16).



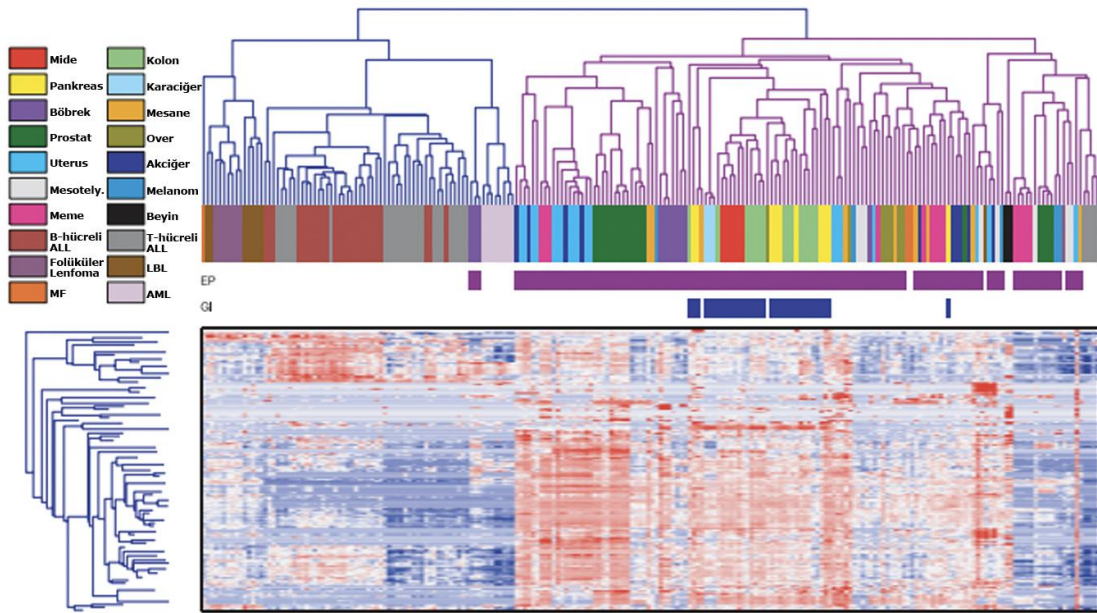
Şekil 21. miRNA' lar kanserde tanı belirteçleri ve tedavi hedefleri arasındadır.

(73)' ten değiştirilerek alınmıştır.

miRNA mikrodizin profillemeye çalışmaları doku ve hücre tüplerinde farklı ekspresyon düzeylerine sahip miRNA' ların belirlenmesinde önemli olanaklar sunmaktadır. Değişen miRNA düzeyleri çok sayıda tümör çeşidinde gözlemlenmiş ve miRNA ekspresyonunun çeşitli kanser tiplerini sınıflandırmada kullanılabileceği gösterilmiştir (Şekil 22) (74). Bu profillemeye çalışmaları neticesinde tespit edilen miRNA' ların olası hedefleri Tablo 1' de örnekleri verilen biyoinformatik yazılım ve programları kullanılarak belirlenerek kanser patogenezinin aydınlatılmasına imkan sağlanmaktadır. Hücrelerde ektopik miRNA ekspresyonu neticesinde de hem bu miRNALARın hedef mRNA' ların transkripsiyon ve translasyon düzeylerindeki değişimleri hem de hücrelerin proliferasyonu, hücre göçü, apoptoz, hücre siklusu ve diğer fonksiyonel özellikleri üzerinde analizleri yapılabilmektedir.

Tablo 1. miRNA Hedef Tahmin Algoritmaları Listesi.

İsim	Web Adresi	Referans
miRanda	http://www.microrna.org	(75)
miRBase	http://microrna.sanger.ac.uk	(76)
TargetScan	http://www.targetscan.org	(77)
miRecords	http://mirecords.biolead.org/	(78)
TarBase	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/	(79)
MirDB	http://mirdb.org/miRDB/	(80)

**Şekil 22. miRNA profilleri farklı kanserleri sınıflandırılabilir.**

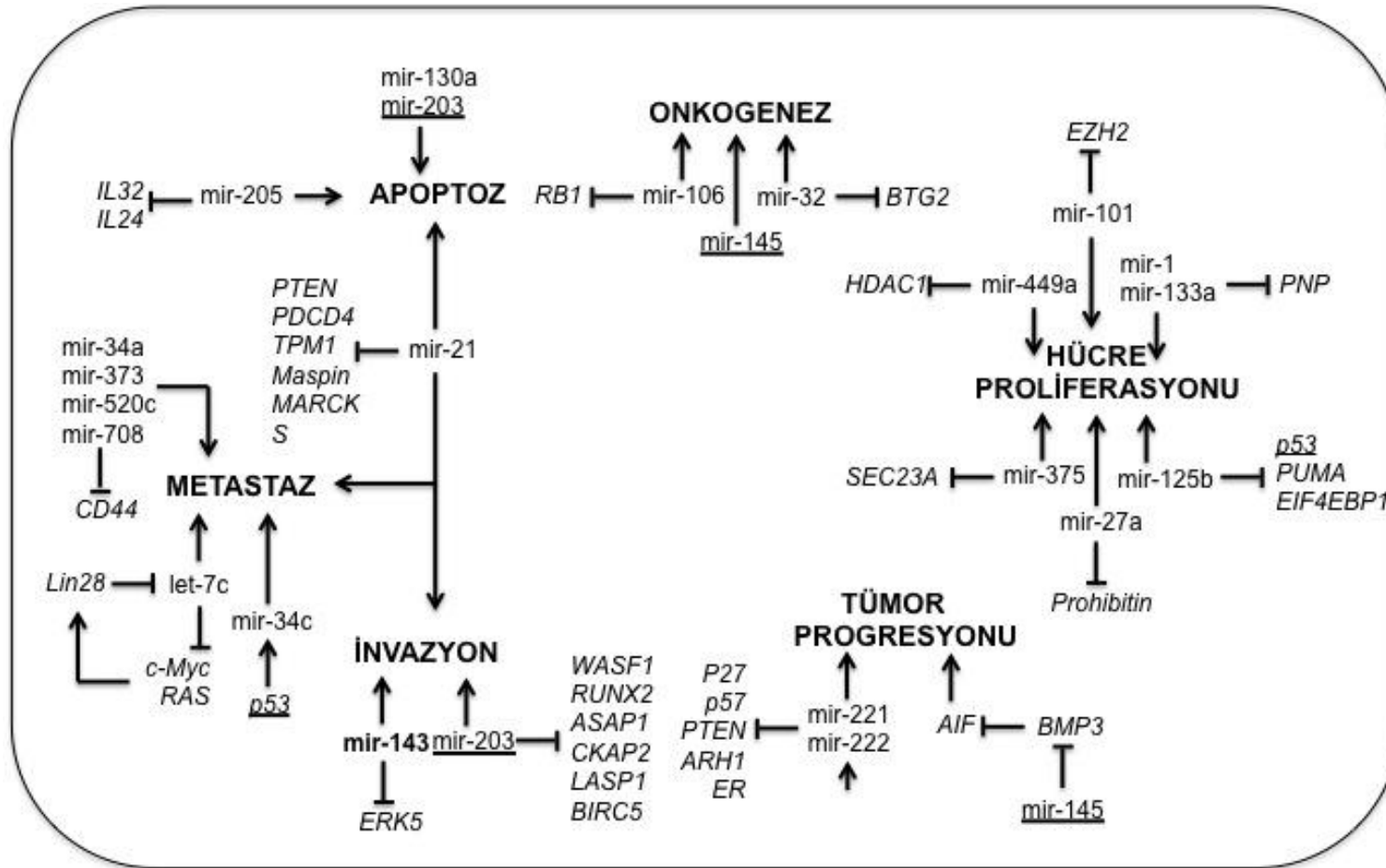
(74)' ten değiştirilerek alınmıştır.

2.6.1. Onkogen ve Tümör Süpresör olarak miRNA' lar

Tümör hücrelerinde artmış ifade düzeyine sahip olan Onkogenik miRNA' lar (onkomiR) birçok kanser türünde patogeneze önemli rol oynarlar. Genetik araçlarla bu onkomiR' lerin artmış ekspresyonu tümör süpresör genlerinin ifade düzeylerinin azalmasına yol açar ve karsinogenez ve tümör progresyonunu indükler. OnkomiR' lerin hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda ifadelerinin susturulmasının, kanser hücrelerinin proliferatif kapasitelerinin azalmasına, invaziv ve metastatik potansiyellerinin kaybolmasına ve apoptozun artmasına yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir (12). miR-125, miR-221/222, miR-21, miR-27a ve miR106 karsinogeneze önemli rolü olan başlıca onkogenik miRNA' lar arasındadır (Şekil 23) (81).

Tümör süpresör miRNA' lar (TSmiR) ise kanser hücrelerinde normal doku hücrelerine göre daha düşük seviyede ifade edilirler. TSmiR' lerin azalmış ekspresyonları onkogenlerin ifade düzeylerinin artmasına böylelikle tümör gelişimine yol açar. TSmiR' lerin etki mekanizmaları hücre proliferasyonu, hücre göçü ve apoptozunu etkileyerek karsinogeneze işlev gören tümör süpresör genlerle aynıdır. Bu miRNA' ların kanser hücrelerindeki ifade düzeylerinin normal seviyeye yükseltilmesi *in vivo* ve *in vitro* ortamda kanser hücrelerinin proliferatif, invaziv, klonogenik ve metastatik potansiyellerinin azalmasına yol açar. miR-145, miR-34c, let-7c, miR-205 and miR-200 aile üyeleri karsinogeneze önemli rolü olan başlıca tümör süpresör miRNA' lar arasındadır (Şekil 23) (81).

Son yıllarda miRNA' ların kanser patogenezindeki rolleri üzerine çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen miRNA' ların karsinogeneze rolleri tam olarak aydınlatılamamıştır ve bu konuda ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.



Şekil 23. miRNA'ların deregülasyonu onkogeneze, tümör progresyonu, metastaz ve invazyona kadar birçok aşamada tümör patogeneziyle ilişkilendirilmiştir.

(73)'ten değiştirilerek alınmıştır.

2.6.2. miR-145

MiR-145, yüksek korunmuşluk düzeyine sahip, transkripsiyonu p53 tarafından kontrol edilen önemli bir tümör süpresör miRNA'dır. İnsulin receptor substrate 1 (IRS1) mRNA' sının 3'UTR bölgesine komplementeritesinin tespit edilmesiyle (82). Mir-145 transkripsiyonu ayrıca p53 homologu olan p63 ve p73 tarafından da kontrol edilmektedir (83). miR-145, 5q32 kromozomal bölgesinde lokalize olan 2549 baz uzunluğundaki MIR145 geninden eksprese olmaktadır. Transkripsiyondan sonra işlenerek 88 nükleotit uzunluğundaki pre-miR-145' a dönüştürülen, sonrasında da kırılarak tek sarmallı hale getirilen olgun miR-145' in dizisi 5'-GUCCAGUUUCCCCAGGAAUCCCUU-3'dir (84).

Fare modellerinde mir-143/miR-145 homozigot delesyonun yaşamla bağdaşır olduğu, fertilitiyi etkilemediği ve de görünürde normal farelerin oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir. Bu farelerde mikroskopik incelemeler vasküler düz kas hücrelerinde yapısal bozulmaların olduğunu, ayrıca miR-143/miR-145 hedef genlerinin hem mRNA ve hem de protein düzeyinde ifadelerinin değiştiğini göstermiştir (85).

Meme kanseri, kolorektal kanser, hematolojik kanserler, over kanseri, prostat kanseri ve B-hücreli tümör gibi birçok tümör çeşidinde sıklıkla miR-145 ifade düzeyinin düştüğü gösterilmiştir (86, 87). Akciğer kanseri vakalarında da miR-145 ifade düzeyinin düştüğü, aynı zamanda ileri fonksiyonel analizlerin akciğer kanseri olan fare modellerinde miR-145 ifade düzeyinin artırılmasının tümör büyümesini yavaşlattığı bildirilmiştir (88).

Tablo 2. miR-145' in kanser patogenezindeki rolü.

	Kanser Tipi	Patogenezdeki Rolü	Referans
miR-145	Meme kanseri	Epitelyal-mezenkimal geçiş, Tümör damarlanması ve büyümesi	(89)
	Kolorektal kanseri	Tümör büyümesi	(90)
	Akciğer kanseri	İnvazyon ve Metastaz	(91)
	Over kanseri	Tümör büyümesi ve damarlanması	(92)
	Prostat kanseri	Apoptoz	(93)
	Hematolojik kanselerler	Apoptoz	(94)
	B-hücreli tümör	Proliferasyon	(95)

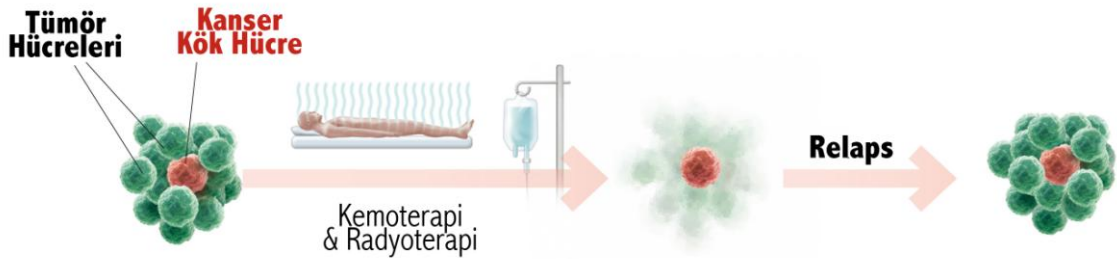
Hayvan modellerinin kullanıldığı diğer bir çalışmada, miR-145' in Mucin ifadesini baskılayarak invazyon ve metastazı engellediği belirtilmiştir (96). Bunun yanı sıra, rolü tam olarak aydınlatılamamış olsa da, mikrodizin çalışmaları neticesinde miR-145 ifade düzeyinin diğer kanserlere paralel olarak prostat kanserinde de azalma gösterdiği bulunmuştur (97, 98).

Kanserlerde miR-145' in ifade düzeyinin azalması promotör bölgesinden hipermetilasyona uğraması ve p53 mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir. Yabanıl tip p53' ün miR-145 promotör bölgesine bağlanarak miR-145' in ifade düzeyini artırdığı, buna karşılık, promotör bölgenin hipermetile olduğu ya da p53' ün mutasyona uğradığı durumlarda p53' ün miR-145 promotörüne bağlanmadığı için ifade düzeyinin azaldığı belirtilmiştir (99).

Larenks kanserinde de miR-145 ifadesinin düştüğü gösterilmiş, ne var ki miR-145 ile alakalı fonksiyonel çalışmalar yapılmamıştır.

2.7. Kanser Kök Hücreleri

Kanser kök hücreleri kanser kitlesi içinde bulunan nadir hücre popülasyonudur ve kök hücre gibi davranarak tümör gelişiminden ve metastazından sorumlu oldukları düşünülmektedir (17). Kanser kök hücre hipotezi ilk olarak 1983 yılında Mackillop tarafından ‘her tümörün fonksiyonel olarak tam bir kök hücre özelliğinde olan kanser kök hücre popülasyonu içerdiği’ şeklinde ortaya atılmıştır (100). Bu teori, bir tümördeki tüm hücrelerin büyümeyi sürdürme yeteneğine sahip olmaması, ayrıca çoğu kanser dokusunun kök hücre soylarındaki hiyerarşik yapıya benzerlik göstermesi, kanser kök hücrelerinin farklılaşabilme potansiyelleri, yavaş büyümeleri gibi özelliklerinden köken almaktadır (19). Kanser progenitör hücreleri ya da tümör başlatıcı hücreler (tumor initiating cells) olarak da bilinen kanser kök hücreleri tümör başlatma ve günümüz klinik tedavi stratejilerine karşı direnç gösterme kapasitesine sahiptirler (18). Standart bir kemoterapi tümördeki çoğu hücreyi öldürmekle birlikte kanser kök hücreleri yaşamlarını sürdürürler. Çok az sayıda olmalarına rağmen tümör rekürenslerine, hatta bazen başarılı bir tedaviden yıllarca sonra bile yol açabilirler (Şekil 24).

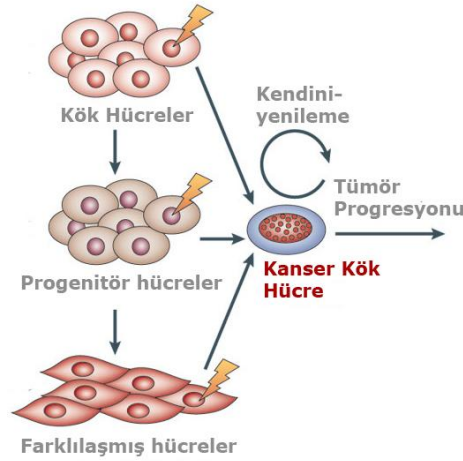


Şekil 24. Kanser kök hücreleri günümüz klinik tedavi stratejilerine karşı direnç gösterme kapasitesine sahiptirler.

(101)’ den değiştirilerek alınmıştır.

Kanser ile ilgili ilk düşünceler, kanserin mutasyon taşıyan bir hücreden köken alan homojen bir klondan oluştuğu yönündeydi. Ne var ki sonraki yıllarda bu görüşün aksine kanser kitlesinin farklı tümörjenik kapasiteleri olan heterojen bir hücre popülasyonundan oluştuğu ortaya çıktı.

Kanser kök hücre modeli, tümörün tümör başlatıcı (tümör initiating) olan, kendini yenileyebilme ve farklılaşma kapasitesine sahip kök hücre benzeri hücreler aracılığıyla oluştuğunu ileri sürmektedir (102). İlk görüşler normal kök hücrelerde mutasyon oluşması neticesinde tümörün oluştuğunu savunsa da sonraki yıllarda progenitör ya da farklılaşmış hücrelerden köken alan kanser kök hücrelerinden de oluştuğu gösterilmiştir (102-104) (Şekil 25).

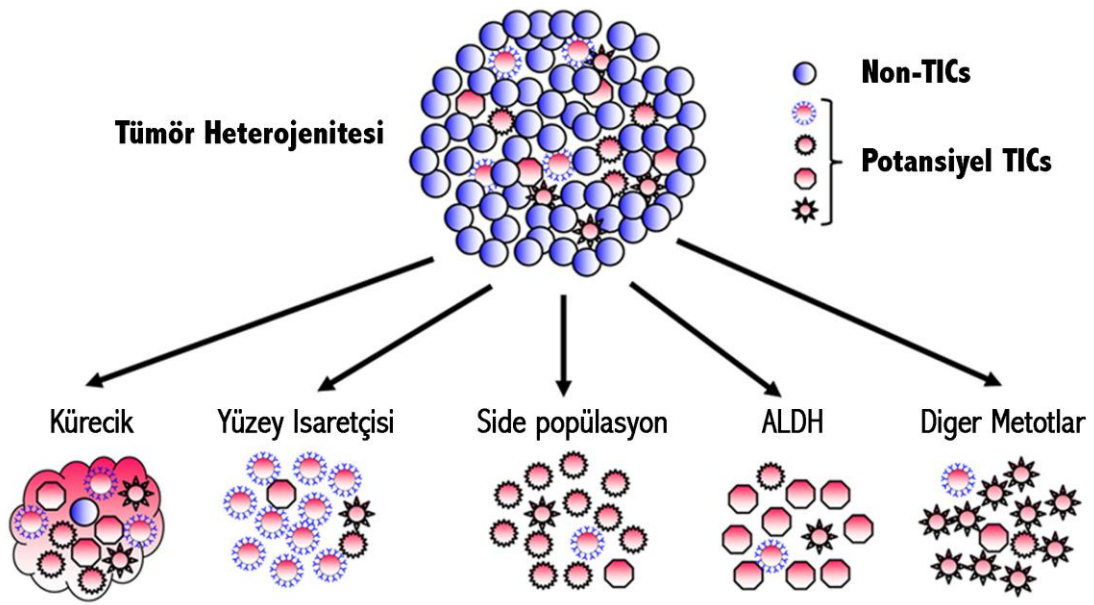


Şekil 25. Kanser kök hücreleri normal kök hücre, progenitör ya da farklılaşmış hücrelerden köken alarak tümör progresyonuna yol açar.

(105)' ten değiştirilerek alınmıştır.

Kanser kök hücreler primer tümör odağından uzak bölgelerde tümör hücrelerinin tutunup yeni bir odak oluşturmasında rol üstlenirler (104). Bunun yanı sıra kanser kök hücreleri tümör hücrelerinin proliferasyonu, tümör rekürensi, tümör hücrelerinin konvansiyonel kemoterapi ajanlarına karşı direnç geliştirilmesinden sorumludurlar (103).

Son yıllarda yapılan çalışmalar kanser kök hücrelerinin baş ve boyun, beyin, akciğer, meme, prostat ve over dahil birçok kanser türünde varlığını göstermiştir (19, 20). Kanser kök hücreleri dokuya özgü kök hücre özelliklerinin kullanılmasıyla geriye kalan hücrelerden ayrıştırılabilmekte ya da zenginleştirilebilmektedirler. En yaygın olarak kullanılan kök hücre ayrıştırma yöntemleri kürecik oluşturma yöntemi, yan (side) popülasyon ayrıştırma (Hoechst 33342 boyası yardımıyla), ALDH1 aktivitesi bazlı, yüzey işaretçilerinin kullanılması yöntemleridir (Şekil 26) (106).

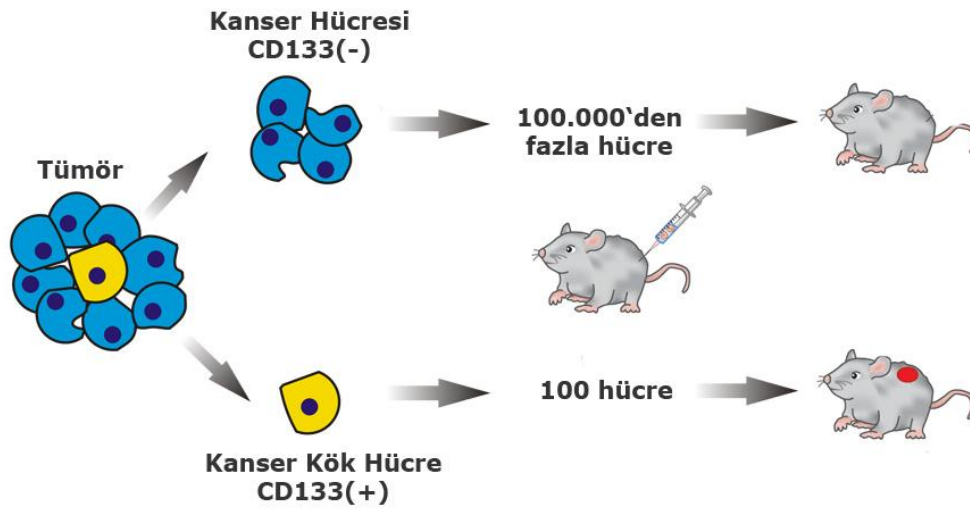


Şekil 26. Kök hücre ayrıştırma yöntemleri.

(106)' dan değiştirilerek alınmıştır.

Son yıllarda akım sitometrisi ve zenotransplantasyon tekniklerindeki gelişmeler kanser kök hücrelerinin moleküler patogenezelelerinin anlaşılmasında büyük kolaylıklar getirmiştir. Özellikle akım sitometrisi tekniğinin yardımıyla yüzey işaretçileri kullanılarak kanser kök hücre ayrıştırılması son yıllarda oldukça yaygın olarak kullanılmıştır. CD44, CD24, CD29, CD90, CD133, integrin-alpha (2) beta (1) ve ESA sıklıkla kullanılan yüzey işaretçileri arasında gösterilebilir (107-109).

CD133, farklı doku ve prostat, pankreas, böbrek, beyin, kolon benzeri tümörlerden kök hücre ayrıştırmada kullanılan 117 kDa moleküler ağırlığında bir membran proteinidir (110, 111). İlk olarak 2003 yılında Singh ve arkadaşları tarafından CD133+ hücre popülasyonunun kök hücre açısından zenginleştiği gösterilmiştir (107). Bu çalışmada 100.000'den fazla CD133- hücrenin hayvan modellerinde tümör oluşturmadığı gösterilirken, 100 kadar az sayıda CD133+ hücrenin tumor oluşturmak için yeterli olduğu ortaya koyulmuştur (Şekil 27).

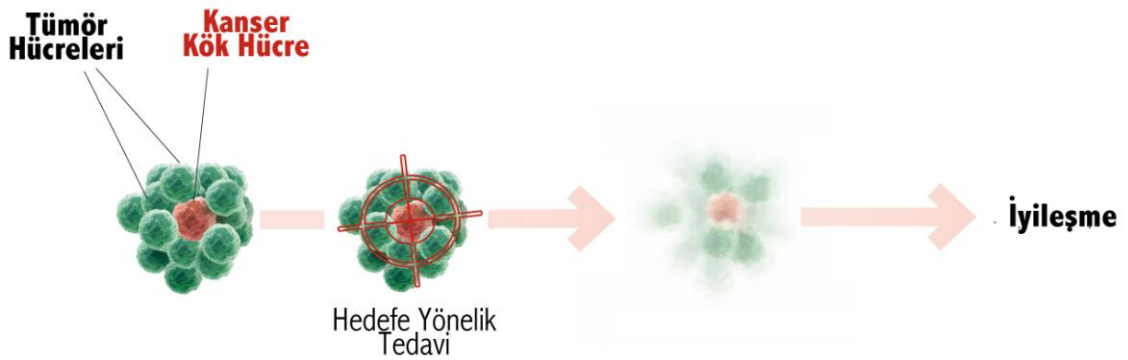


Şekil 27. 100 kadar CD133+ hücre hayvan modellerinde tümör oluştururken 100.000'den fazla CD133- hücre tümör oluşturmaz.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cancer_stem_cells_resized.svg web adresinden değiştirilerek alınmıştır.

Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* değişik çalışmalarda CD133+ hücrelerin artmış kendini yenileme ve farklı hücre türlerine farklılaşma potansiyeline sahip oldukları gösterilmiştir (107). CD133 larenks kanserinde de kök hücre işaretçisi olarak gösterilmiştir, ve özellikle Hep-2 hücreleri kullanılarak CD133 pozitif hücrelerin kanser kök hücreler açısından zenginleştikleri belirtilmiştir (110, 112, 113). CD133+ Hep-2 hücrelerinin artmış klonogenik ve invaziv potansiyelleri olduğu ve hem *in vivo* hem *in vitro* ortamda artmış kemorezistansla ilişkilendirildikleri gösterilmiştir (112).

Klasik tedaviler hızlı bölünen ve farklılaşmış kanser hücrelerini hedeflemektedirler, ne var ki, birçok terapi yöntemine karşı dirençli olan kanser kök hücreleri yavaş bölünen ve tümör gelişiminden sorumlu hücrelerdir. Terapi sonrasında, bu hücreler etkilenmeden kalarak tümör relapsı ve metastazına yol açarlar. Kanser kök hücrelerin tanımlanması ve karakterizasyonlarının doğru ve eksiksiz olarak yapılabilmesi özellikle kanser kök hücrelerini hedefleyerek kanserin tedavisini amaçlayan terapi yaklaşımları adına büyük önem arz etmektedir (Şekil 28).



Şekil 28. Kanser kök hücrelerini hedefleyerek kanserin tedavisini amaçlayan terapi yaklaşımları kanserin tedavisi adına önemlidir.

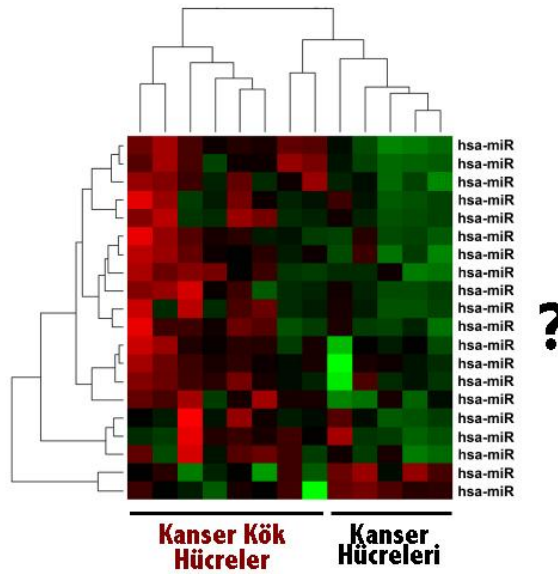
(101)' den değiştirilerek alınmıştır.

2.8. Kanser Kök Hücre Regülatörleri olarak miRNA' lar

Son zamanlarda yapılan ve global miRNA işleme yolağının devre dışı bırakıldığı *Dicer* ya da *Dgcr8* knock-out farelerin kullanıldığı bir çalışma hücrelerin kendini yenileyebilme özelliklerini kaybettiklerini, bunun da bir kısım kök hücre işaretçilerin ifade düzeylerinin azaltılamamasından kaynaklandığını göstermiştir. Bu çalışma miRNAların kök hücre karakteristiğinin oluşturulmasında öneme sahip olduklarına işaret etmesi açısından önem arz etmektedir (114, 115). Ayrıca birçok miRNA' nın da kanser kök hücrelerin yaşamları ile doğrudan ilintili oldukları gösterilmiştir. Örneğin, kanser kök hücreler için önemli bir işaretçi olarak kabul edilen CD44 açısından artmış ifade düzeyine sahip olan hücrelerde miR-34a düzeyinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiş ve CD44'in miR-34a' nın direk hedeflerinden biri olduğu bulunmuştur (116). CD44+ hücrelerde miR-34a düzeyinin artırılmasının bu hücrelerde klonogenitenin ve rekürens/metastaz kapasitesinin azalmasına yol açtığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, akciğer kanseri progenitor hücrelerinde miR-142-3p, miR-451, miR-

106a, miR-142-5p, miR-15b, miR-20a, miR-106b, miR-25 ve miR-486 gibi birçok miRNA' nın ifade düzeylerinin değişimi de kök hücre potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir (117). Meme kanseri kök hücrelerinde miR-200c, miR-203 ve miR-375'ün ifade düzeyinin azaldığı, miR-125b, miR-100, miR-221 ve miR-222 düzeylerinin ise anlamlı olarak arttığı rapor edilmiştir (118).

Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda miRNA' ların kanser kök hücre regülasyonunda önemli roller üstlendikleri söylenebilir. miRNA' ların kanser kök hücre karakteristiğinin kazanılması ve devam ettirilmesi sürecindeki rollerinin aydınlatılması ve kanser kök hücrelere ait miRNA profillerinin belirlenmesi (Şekil 29) miRNA temelli terapötik yaklaşımların geliştirilebilmesi adına gereklidir. Bu çalışmada total ya da parsiyel larenjektomi sonrasında temin edilen taze larenks tümör dokularından CD133 işaretçisi ile ayrıştırılan CD133+ hücrelerin miRNA profillerinin belirlenmesi ve miR-145' in Hep-2 hücrelerinde tümör hücre proliferasyonu, göçü, apoptozu, hücre siklusu ve kök hücre karakteristikleri üzerindeki fonksiyonel etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.



Şekil 29. Kanser kök hücre ve kanser hücre miRNA profillerinin belirlenmesi kanser kök hücre karakteristiklerinin belirlenmesi adına önemlidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örneklerin Temini

40 adet larenks skuamöz hücreli tümör doku ve normal doku örnekleri Istanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Tümör dokularının Istanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Bölümünde incelemesi yapılarak skuamöz hücreli karsinom oldukları doğrulandı. Dokulara ait patoloji raporları alınmış ve yapılan analizlerde kullanıldı. Elde edilen tümör dokularının patoloji inceleme sonuçları ve hastalarla ilgili bilgiler Tablo 3' te verilmektedir.

3.1.2. Gereç ve Cihazlar

3.1.2.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

- Buzdolabı (4 °C) (Vestel, Türkiye)
- Derin Dondurucu (-20°C) (Vestel, Türkiye)
- Derin Dondurucu (-80°C) (Wisd, DAIHAN Scientific, Kore)
- Nanodrop spektrofometre (Thermo Scientific-ND 2000c, Almanya)
- Laminar air-flow (Class II Safety Cabinet) (Metisafe, Türkiye)
- Mikropipet (Thermo Scientific, Almanya)
- Mini Santrifüj (Thermo Scientific, Almanya)
- Santrifüj (Hettich Retina 420R, Almanya)
- Hibridizasyon Etüvü (Shel Lab, Oregon, ABD)
- Termal döngü cihazı (PZR) (Techne-TC 5000, ABD)
- Vorteks (Wise Mix-VM10, Kore)

- 0.2-1.5 ml Eppendorf (Nest Biotechnology, Çin)
- Roche LightCycler 2.0 (Basel, İsviçre)
- RNA İzolasyon Kiti ("mirVana PARIS kit" (Ambion, Darmstadt, Almanya))
- Agilent miRNA Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Agilent Human miRNA Microarray (V4) Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Slayt koruyucu (Ozon bariyer) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Gasket slayt (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Pens
- Chamber (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Agilent Microarray Scanner with Surescan High Resolution Technology (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- LightCycler ® Capillaries (20 µl) - Roche Applied Science(Basel, İsviçre)

Moleküler Genetik uygulamaları için gerekli diğer sarf malzemeler

- Akım Sitometre (BD Biosciences, San Jose, ABD)

3.1.2.2. Solüsyonlar

- CD133 Antibody (CD133/1 (AC133)- PE Human, (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Almanya)
- Liyofilize kollajenaz (GIBCO Lyophilized Collagenase, 255,000 units/mg, ABD)
- Kök Hücre Ayırıştırma Kiti (EasySep Positive Selection Human PE Selection Kit, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada)

- RPMI 1640 besi yeri (Lonza, Verviers, Belçika)
- Trypsin (0.05 % Trypsin/0.53 mM EDTA, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
- Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin (PSA) (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
- L-Glutamine (L-Glu) (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
- cDNA Sentez Kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Basel Stadt, İsviçre)
- Eş Zamanlı PZR (LightCycler 480 SYBR Green I Master, Mannheim, Almanya)
- TRIzol (Ambion, ABD)
- Kloroform (Sigma-Aldrich, ABD)
- İzopropanol (Sigma-Aldrich, ABD)
- Etanol (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Epidermal Growth Factor (EGF) (0.1 mg/ml, Human Recombinant Protein, Almanya)
- Insulin Growth Factor (IGF) (Gibco, Human Recombinant Zinc, ABD)
- Recombinant Human Fibroblast Growth Factor- Basic (bFGF) (0.2 mg/ml, Millipore, Almanya)
- RNA İzolasyon Kiti ("mirVana PARIS kit" (Ambion, Darmstadt, Almanya))
- Agilent miRNA Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)

- TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD)
- TaqMan miRNA Assay (hsa-miR-145) (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD)
- TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD)
- GE Wash Buffer I (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- GE Wash Buffer II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
- Cyanine 3 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)

3.1.2.3. Bilgisayar Programları

- Feature Extraction v10.7.3.1 (Agilent Technologies, CA, ABD)
- Bioconductor Software
- BD CellQuest Pro Software (BD Biosciences, San Jose, CA)
- SPSS 15.0

3.2. Yöntem

3.2.1. Tümör Doku Örneklerinden CD133 yüzey işaretçisi ile Kök Hücre Ayırıştırması

Ameliyat sonrasında tümör dokuları hemen Fetal Bovin Serum (FBS) eklenmemiş ve %1 PSA içeren RPMI besi yeri içerisine alındı. Sonrasında tümör dokuları öncelikle fiziksel parçalamaya maruz bırakıldı. Bistüri yardımıyla iyice küçük parçalara ayrılan dokular 37°C’ de 400 µg/ml kollajenaz içerisinde 3 saat inkübasyona bırakıldı. Enzimatik parçalama sonrasında tek hücre solüsyonu elde edebilmek için hücreler 70 µm çaplı porları olan filtrelerden (cell strainer) geçirildi. 1500 rpm’ de 5 dakika santrifüj edilen hücreler PBS’le de yıkandıktan sonra hücre ayırıştırma işlemi için “Tavsiye Edilen Besi Yeri” (Recommended Medium, 1 mM EDTA ve %2 FBS içeren PBS) içerisinde çözüldü.

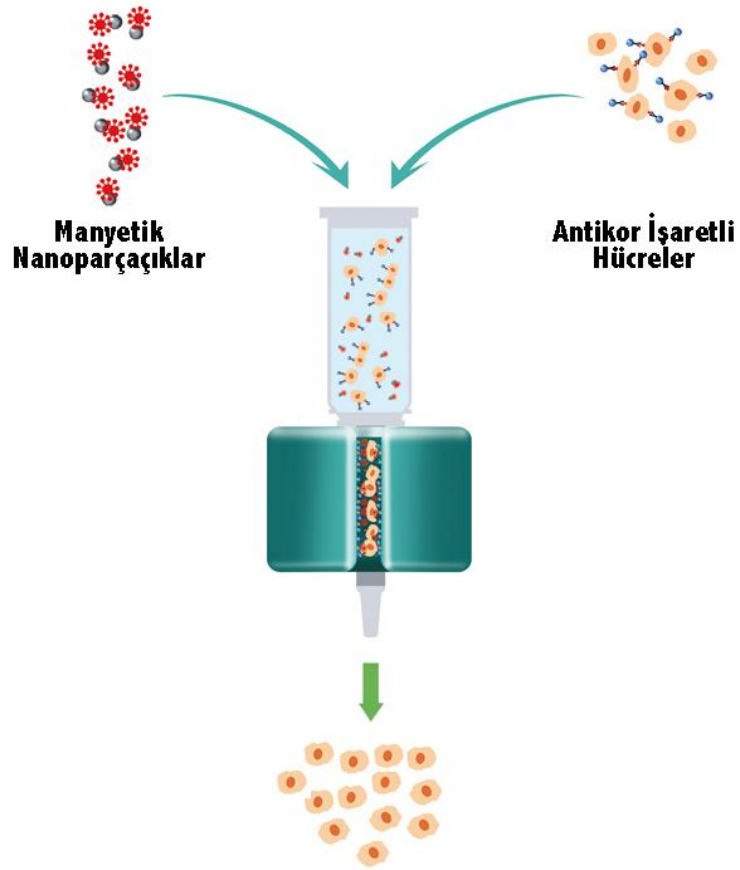
Hücre ayırıştırma işlemi “Easy Sep Positive Selection Human PE Selection Kit”i kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 30). Manyetik demir nanoparçacıklar aracılığıyla yapılan bu işlemde CD133/1 (AC-133)-PE antikoru kullanılarak kanser kök hücre ayırıştırması üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi.

Tablo 3. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalından temin edilen Larenks Kanseri tümör örneklerine ve hastalara ait bilgiler.

#	Örnek Adı	Yaşı / Cinsiyeti	Ameliyat Türü	Histolojik Grade	Tümör Yerleşimi	Nekroz
1	C4	47 / E	Total Larenjektomi	II	Sol vokal kord yerleşimli	%10
2	C5	50 / E	Parsiyel Larenjektomi	III	Sol parsiyel larenjektomi	%20
3	C7	67 / E	Larenjektomi	III	Sağ frontolateral parsiyel larenjektomi	-
4	C8	61 / E	Parsiyel Larenjektomi	III	Sağ supraglotik yerleşimli	%10
5	C9	75 / E	Total Larenjektomi	III	Supraglotik yerleşimli	%10
6	C10	64 / E	Total Larenjektomi	III	Epiglotik kök ve supraglotik yerleşimli	%10-20
7	C11	62 / E	Total Larenjektomi	III	Epiglotik kök ve supraglotik yerleşimli	%10>
8	C12	49 / K	Parsiyel Larenjektomi	III	Parsiyel larenjektomi	%10
9	C13	62 / K	Larenjektomi	III	Sol glottik bölge yerleşimli	%10
10	C14	63 / E	Total Larenjektomi	III	Sağ piriform sinüs yerleşimli	%30
11	C15	49 / E	Larenjektomi	III	Supraglottik bölge yerleşimli	%40
12	C16	60 / E	Total Larenjektomi	I	Sağ glottik bölge yerleşimli	%5
13	C17	56 / E	Total Larenjektomi	III	Glottik ve subglottik alan yerleşimli	%5
14	C18	65 / E	Total Larenjektomi	III	Transglottik yerleşimli	%20

#	Örnek Adı	Yaşı / Cinsiyeti	Ameliyat Türü	Histolojik Grade	Tümör Yerleşimi	Nekroz
15	C19	53 / E	Parsiyel Larenjektomi	II	Sağ frontolateral	%<20
16	C20	62 / E	Total Larenjektomi	III	Bilateral glottik yerleşimli	%20
17	C21	72 / E	Total Larenjektomi	II	Posterior krikoid bölge	İzlenmedi
18	C22	45 / E	Parsiyel Larenjektomi	III	Supraglottik bölge yerleşimli	Mevcut değil
19	C23	50 / E	Total Larenjektomi	II	Sağ glottik bölge yerleşimli	Mevcut değil
20	C24	64 / E	Parsiyel Larenjektomi (Epiglottektomi)	III	Supraglottik bölge yerleşimli	%30
21	C25	53 / E	Parsiyel Larenjektomi	II	Frontoanterior parsiyel Larenjektomi	Görülmedi
22	C26	58 / E	Total Larenjektomi	III	Sağ vokal kord kaynaklı	Mevcut değil
23	C27	61 / E	Total Larenjektomi	II	Sağ glottik bölge yerleşimli	%20
24	C28	54 / E	Total Larenjektomi	III	Sağ glottik bölge yerleşimli	Mevcut değil
25	C29	58 / E	Total Larenjektomi	III	Transglottik yerleşimli	%~20
26	C30	54 / E	Parsiyel Larenjektomi	-	Supraglottik larenjektomi	-
27	C31	63 / E	Parsiyel Larenjektomi	II	Sağ vokal kord yerleşimli nüks	Görülmedi
28	C32	66 / E	Parsiyel Larenjektomi	III	Sağ glottik, supraglottik yerleşimli	Görülmedi
29	C33	76 / E	Total Larenjektomi	II	Sağ infraglottik yerleşimli	Görülmedi
30	C34	51 / E	Total Larenjektomi	II	Transglottik yerleşimli	Fokal
31	C35	69 / E	Total Larenjektomi	I	Bilateral glottik supraglottik bölge yerleşimli	-

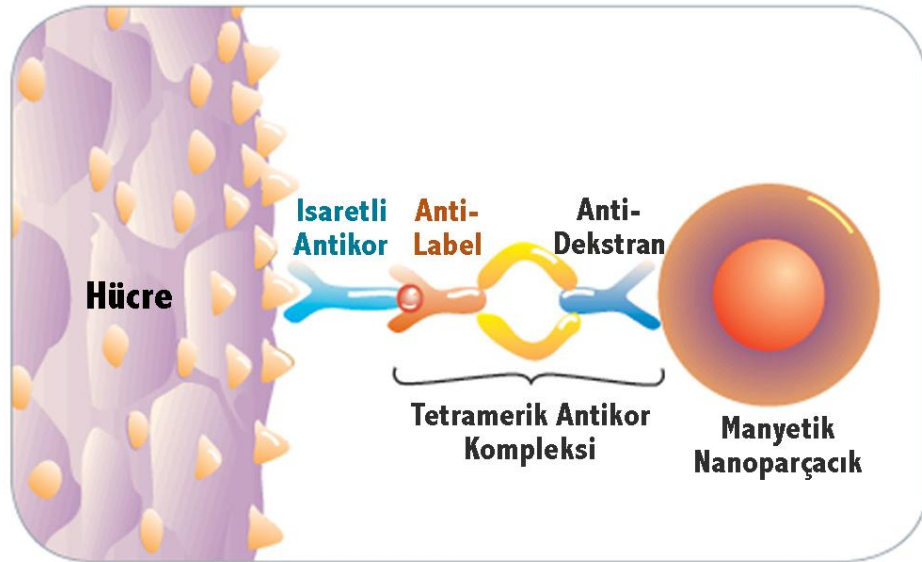
#	Örnek Adı	Yaşı / Cinsiyeti	Ameliyat Türü	Histolojik Grade	Tümör Yerleşimi	Nekroz
32	C36	68 / E	Total Larenjektomi	II	İnfraglottik yerleşimli	%10
33	C37	64 / E	Biyopsi	-	Peristomal bölge, biyopsi	-
34	C41	53 / E	Total Larenjektomi	III	Sağ hipofarenks yerleşimli	%30-40
35	C43	78 / E	Total Larenjektomi	II	Sol glottik yerleşimli	Mevcut
36	C46	59 / E	Total Larenjektomi	III	Bilateral glottik yerleşimli	%<10
37	C47	73 / E	Total Larenjektomi	III	Multipl odaklar halinde izlenen nüks	%~30
38	C48	63 / E	Biyopsi	-	Hafif Epitel Hiperplazi	-
39	C57	61 / E	Total Larenjektomi	III	Glottik posterior yerleşimli	%~20
40	C58	57 / E	Parsiyel Larenjektomi	II	Glottik yerleşimli	%10



Şekil 30. “Easy Sep Positive Selection Human PE Selection Kit” i kullanılarak gerçekleştirilen hücre ayırıştırma işlemi.

<http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/EasySep-Human-PE-Positive-Selection-Kit.aspx> web adresinden değiştirilerek alınmıştır.

Bu ayırıştırma işleminde kısaca Şekil 31’ de gösterildiği üzere hücreler PE işaretli yüzey işaretçi antikoruna ile (CD133) işaretlendi. Sonrasında “PE Selection Cocktail” adı verilen PE molekülüne spesifik bağlanma afinitesi olan aynı zamanda diğer ucundan manyetik nanoparçacığa bağlanabilecek tetramerik antikor kompleksi ile muamele edildi. Ardından manyetik nanoparçacıkların bağlanması ile hücrelerin işaretlenme işlemi tamamlanmış oldu. Yapılan işaretleme sonrasında hücreler manyetik alandan geçirilerek CD133 açısından pozitif olan hücreler ayırıştırıldı.



Şekil 31. Hücrelerin PE işaretli antikor ve manyetik nanoparçacıklarla işaretlenerek ayırıştırma işlemine hazırlanması.

<http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/EasySep-Human-PE-Positive-Selection-Kit.aspx> web adresinden değiştirilerek alınmıştır.

Ayırıştırma sonrasında faz-kontrast mikroskopta yapılan incelemelerde hücrelerin tek hücre olarak elde edildiği doğrulanarak hücre ayırıştırma işleminin başarıyla gerçekleştirildiği teyit edilmiştir.

3.2.2. Flow Sitometri Analizi

Hücre ayırıştırma işleminin verimliliğini test etmek için ayırıştırılan hücreler PBS içerisinde yıkandıktan sonra yeniden PBS içerisinde çözöldü ve FACSCalibur Flow Sitometri (BD Biosciences, San Jose, CA) cihazında analiz edildi. Sonuçlar BD CellQuest Pro Software (BD Biosciences, San Jose, CA) programı kullanılarak değeriendirildi.

3.2.3. Ayırıştırılmış Hücrelerden RNA İzolasyonu

Çok az miktarda örneklerden bile kaliteli ve yeterli konsantrasyonda ürün eldesi sağlayan “miRVana miRNA İzolasyon Kiti (Ambion, Darmstadt, Almanya)” kullanılarak CD133 pozitif ve CD133 negatif hücrelerden RNA izolasyonu üretici firmanın protokolü izlenerek gerçekleştirildi. Örneklere ait konsantrasyon ve A260/280 oranları Tablo 4’ te verilmektedir.

Tablo 4. CD133+ ve CD133- hücrelerden elde edilen RNA konsantrasyon ve saflıkları.

Örnek #	CD133- (ng/μl)	A260/280	CD133+ (ng/μl)	A260/280
1	52.7	2.06	15.7	2.1
2	4.1	2.07	8	2.08
3	93	1.91	75.1	1.92
4	49.8	1.5	12.8	1.56
5	7.5	2.16	4.4	2.09
6	5.4	1.98	35	2.03
7	843.3	1.99	35.4	1.79
8	37.4	2.1	30.3	1.73
9	181.3	2	8.6	1.83
10	90.6	1.91	3.9	1.92
11	230.8	1.96	5	2.25
12	268.7	2.03	6.4	2.28
13	27.9	1.9	18.8	1.85
14	291.7	2.02	91.1	1.9
15	215.7	1.91	40.4	1.94
16	285.8	1.94	1.2	2.84
17	312.9	1.94	13.3	1.96
18	24.5	2.01	2.6	2.22
19	112.7	1.99	32.2	2.1
20	108.6	1.95	7	1.77
21	16.6	1.72	10.5	1.59
22	659.2	2.08	279.8	1.94
23	219,3	2,06	25,5	1,96
24	100,9	2,04	11	1,89
25	133	1,94	24,9	1,86
26	47,5	2,09	2	-2,9
27	117,3	1,97	38,6	1,55
28	478,5	1,96	27,5	1,73
29	126,9	2,14	10,3	1,72
30	73,7	2,07	7,9	1,99
31	63	2,16	4,9	2,77

3.2.4. Dokulardan TRIzol ile RNA İzolasyonu

-80°C’ de saklanan doku örnekleri öncelikle sıvı nitrojen içerisinde havanda dövülerek toz haline getirildi ve 1 ml TRIzol solüsyonu içerisinde pipet yardımıyla iyice homojenize edildi. Homojenize dokular TRIzol’ de oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek dokuların iyice parçalanması ve nükleik asitlere bağlanan proteinlerin nükleik asitlerden tamamen ayrışması sağlandı. Sonrasında 200 µl kloroform eklendi ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildikten sonra 4°C’ de 12000g’ de 15 dakika santrifüjlendi. Faz ayrışması sonrasında üstteki RNA içeren organik fazlar yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Organik fazlara 500 µl izopropanol eklenerek örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 4°C’ de 12000g’ de 10 dakika santrifüjlendi. Beyaz renkte ya da renksiz çökelti şeklinde görülebilen RNA’lar %75 etil alkolle yıkanarak 4°C’ de 7500g’ de 5 dakika santrifüjlendi. Kurumaya bırakılan RNA’ lar iyice kuruduktan sonra nükleaz içermeyen moleküler grade su içerisinde çözüldü. RNA konsantrasyon ve saflıkları spektrofotometre yardımıyla ölçüldü ve RNA integriteleri jel elektroforez yardımıyla kontrol edildi. Örneklerle ait konsantrasyon ve A260/280 oranları Tablo 5’ te verilmektedir.

Tablo 5. Dokulardan elde edilen RNA konsantrasyon ve saflıkları.

Örnek #	Tümör Doku (ng/μl)	A(260/280)	Normal Doku (ng/μl)	A(260/280)
1	398.1	1.89	368.1	1.9
2	1944.4	1.97	66.2	1.8
3	371.2	1.91	177.4	1.85
4	1129.5	1.95	520.7	1.93
5	815.6	1.92	1619.7	1.96
6	839.6	1.92	375.2	1.9
7	144.5	1.85	457.3	1.89
8	53.6	1.76	819.6	1.93
9	596.9	2.02	1029.7	1.95
10	420.3	1.92	108.4	1.83
11	442.3	1.91	582.7	1.93
12	128.4	1.85	596.2	1.93
13	1555.8	1.97	468.9	1.92
14	208.7	1.88	202.6	1.87
15	256.1	1.89	473	1.94
16	357.4	1.89	453.2	1.92
17	618.9	1.97	137.9	1.9
18	491.2	1.94	916.1	2.07
19	274.7	1.96	218.1	1.96
20	109.7	2	329.2	1.89
21	114.6	1.96	453.8	1.94
22	954	1.97	584.6	1.95
23	122.6	1.9	616.3	2
24	3232.9	1.64	1014.9	1.98
25	458	1.9	656.7	1.97
26	519.7	1.93	501	1.93
27	771	1.99	25.8	1.87
28	1622.4	1.97	1742.9	1.99
29	735.3	1.98	551.7	1.93
30	394.3	1.92	221.7	1.92
31	94.8	1.75	77.6	1.81
32	1210.3	1.97	722.4	1.96
33	662.4	1.98	1288.5	2
34	1799.3	2	1368.5	1.99
35	297.9	1.83	97.9	1.7
36	648.6	1.98	1429.5	1.83
37	2110.7	1.99	1328.5	1.98
38	3466	2.02	1581.3	2
39	3207	2.02	2761.1	2.02
40	3444.2	2.02	26.6	1.89

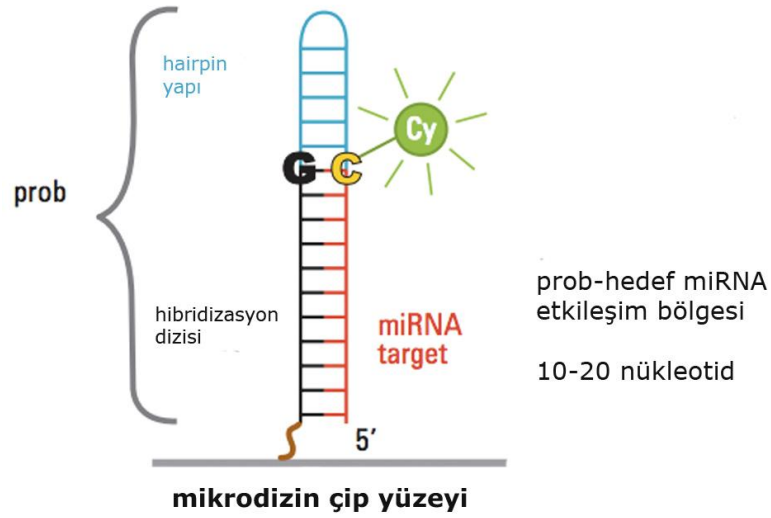
3.2.5. miRNA Mikroarray Analizi

Ayrıştırılmış kök hücrelerdeki miRNA profillerinin belirlenmesi ve bu profilin kanser/normal doku miRNA profil değişimine paralel olup olmadığının belirlenebilmesi için mikrodizin çalışmaları yapıldı. Mikrodizin analizlerinde Agilent firması tarafından oldukça hassas bir teknoloji kullanılarak hazırlanan çiplerden hem miRBase release 16' da belirtilen mikroRNA' ları kapsayan ve 1205 adet bilinen insan ve 144 adet insan viral mikroRNA' ları içeren V16 mikrodizin çipleri hem de miRBase release 19' da belirtilen mikroRNA' ları kapsayan ve 2006 adet bilinen insan mikroRNA' ları içeren V19 mikrodizin çipleri kullanıldı. Şekil 32' de Agilent SurePrint teknolojisiyle üretilmiş bir mikrodizin çipi ve hibridizasyon çemberi gösterilmektedir.



Şekil 32. Mikrodizin hibridizasyon çemberi, gasket slide, slide holder ve Agilent SurePrint teknolojisiyle üretilmiş mikrodizin çipi

Agilent miRNA mikrodizin çipleri 40-60-mer oligonükleotid probolar SurePrint teknolojisi ile özel olarak kodlanmış cam lamalar üzerine hassas bir şekilde basılmıştır. Ayrıca proboların 5' ucuna G ve hibridizasyon sırasının 3' ucuna da C rezidüsü işaretleme sırasında ilave edilerek doğru miRNA' ya bağlanma spesifisitesi artırılmıştır. Bu durum 1 nükleotidden fazla değişiklik gösteren miRNA' ları kroshibridizasyon ihtimalini anlamlı olarak azaltır (<1%). Üstelik her probdan birden fazla basılı olması ve kontrol probalarının varlığı tek nükleotid değişiklik gösteren miRNA' ların bile ayrımını analiz sırasında yapabilme yeteneği verir (Şekil 33).



Şekil 33. Agilent miRNA mikrodizin prob dizaynı.

(Agilent.com adresinden değiştirilerek alınmıştır.)

Çalışma kapsamında 12 tümör doku örneğinden yapılan ayrıştırma sonucunda elde edilen 12 adet CD133 pozitif ve 12 adet CD133 negatif hücre RNA örneği, ayrıca 12 adet tümör doku RNA örneği ve 4 adet normal doku RNA örneği mikrodizin çalışmasında kullanıldı. Örneklerden toplamda 100 ng kullanılarak “Agilent miRNA microarray system with miRNA complete labeling and Hyb Kit protocol” ünde verilen bilgilere göre Cy3 ile işaretleme yapıldı ve 55°C’ de 20 saat hibridizasyon yapılarak profillemeye çalışması gerçekleştirildi. Hibridizasyon ve hibridizasyon sonrası yıkama işlemleri yapıldıktan sonra mikrodizin çipleri “Agilent Microarray Scanner with SureScan High Resolution Technology, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)” cihazında tarandı.

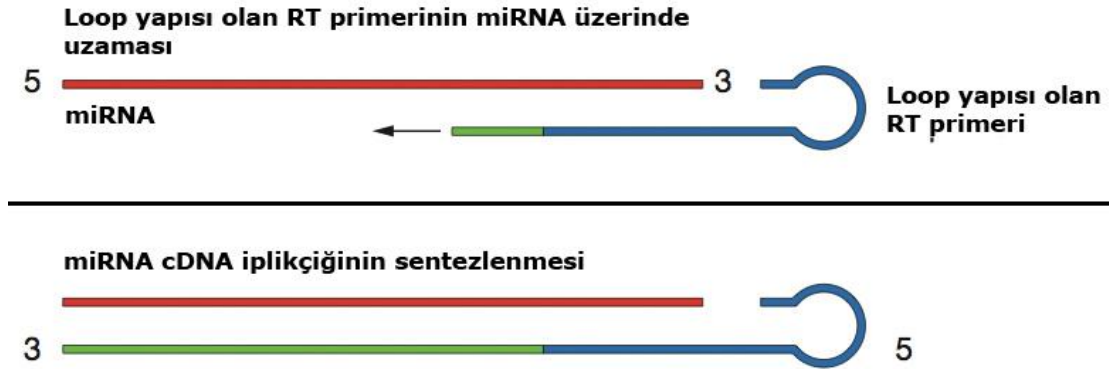
Taranan mikrodizin chip görüntüleri Feature Extraction v10.7.3.1 (Agilent Technologies, CA) and “Bioconductor 2.10 with R version 2.15” yazılımı kullanılarak analiz edildi.

3.2.6. miRNA Mikroarray Data Analizi

Kantitatif bir karşılaştırma yapılabilmesi için elde edilen veriler normalize edilmelidir. Normalizasyon deneysel çıkabilecek ikilemleri giderecek bir süreçtir. Elde edilen veriler kuantil normalizasyon metodu normalize edildi. P değerleri ve kat değişimleri her prob için log-transformed verileri kullanılarak hesaplandı. $P < 0.01$ ve en az 1.4 kat değişimi görülen probalar gerçek zamanlı PZR (qRT-PCR) işlemi ile validasyon işlemi için aday olarak seçildi.

3.2.7. miRNA cDNA Sentezi

Seçilen miRNA'ların qRT-PCR ile daha geniş bir örnek setinde doğrulanması için öncelikle RNA örnekleri kullanılarak miRNA cDNA sentezi yapıldı. Bunun için örneklerden elde edilen total RNA'lar konsantrasyonları 15 ng/μl olacak şekilde seyreltildi ve her örnekten 2' şer μl kullanıldı. Bütün miRNA cDNA sentez işlemleri loop yapıdaki miRNA RT primerleri ve "Taqman Reverse Transcriptase Kit" i kullanılarak üretici firmanın verdiği bilgilere göre gerçekleştirildi (Şekil 34).

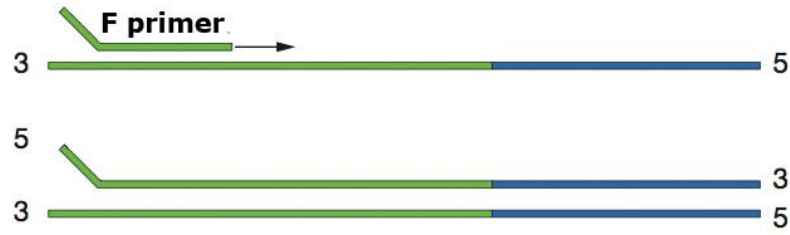


Şekil 34. Loop yapısı olan RT primerlerinin kullanımıyla miRNA cDNA sentez işlemi

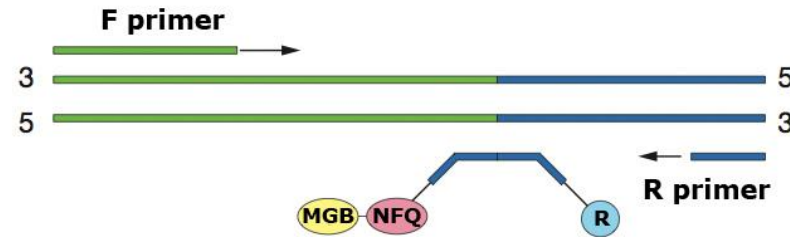
3.2.8. Seçilen miRNA' ların qRT-PCR ile Doğrulanması

İstatiksel olarak anlamlı farklılığı mikrodizin tekniği ile gösterilen miRNA' ların ifade değişimi farklı bir örnek setinde qRT-PCR ile konfirme edildi. Bunun için Taqman assayleri kullanıldı (Şekil 35). TaqMan hsa-miR-145 ve RNU43 problemleri Applied Biosystems (Foster City, CA)' den temin edildi. qRT-PCR işlemleri TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) kitiyle üretici firmanın protokolü izlenerek LightCycler480-II gerçek zamanlı PZR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Küçük nükleer RNA' lardan RNU43 kontrol olarak kullanıldı ve deneyler iki tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Rölatif kantitasyon analizi delta-delta-CT metodu kullanılarak yapıldı (119).

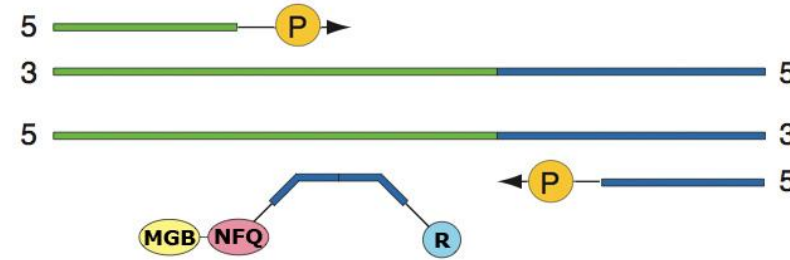
İkincil cDNA iplikçığının sentezlenmesi



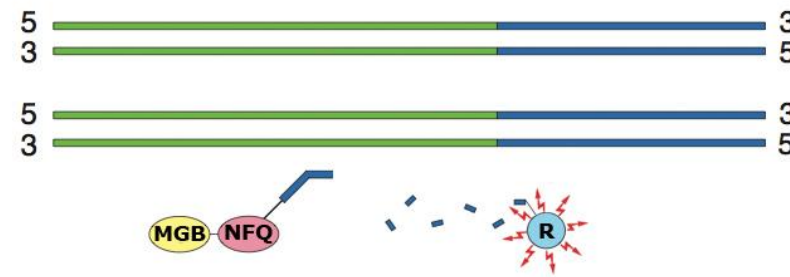
cDNA'nın PZR ile çoğaltılması



Polimerizasyon



Polimerizasyonun tamamlanması



Şekil 35. Hibridizasyon problemlerinin kullanımıyla mRNA qPCR işlemi

3.2.9. Hep-2 Hücre Kültürü ve Hücrelerinin miR-145 ile transfeksiyonu

Deneylerde Hep-2 larenks kanser hücre hattı (Şekil 37) kullanılmıştır. Hücreler %10 fetal bovin serumu (FBS) ve %1 PSA içeren RPMI (Gibco-BRL, Bethesda, MA) hücre medyumunda, %5 CO₂ içeren inkübatörlerde 37°C’ de kültür edilmişlerdir.

Yapılan çalışmalarla konfirme edilen miRNA’lardan en önemli olduğu düşünülen hsa-miR-145’ in (Ambion, Foster City, CA, USA) larenks kanseri hücrelerinde proliferasyon, hücre göçü, hücre siklüsü, gen ekspresyon ve apoptoz üzerindeki etkilerini görebilmek için hücreler hsa-miR-145 ile transfekte edilerek hücreler analiz edilmiştir. Kontrol olarak herhangi bir geni hedeflemeyen bir oligonükleotid dizisi (Kontrol miRNA) kullanılmıştır.

Transfeksiyon işlemi için X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche) kullanıldı. Hücreler 6-kuyucuklu platelerde kuyucuk başına 500.000 hücre düşecek şekilde ekilerek 1 gün boyunca inkübe edildikten sonra PBS ile yıkanarak transfeksiyon işlemi kısaca aşağıda tarif edildiği şekilde yapıldı.

6-kuyucuklu plateteki her kuyucuk için 2.5 µl transfeksiyon reaktifi (X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent) 250 µl Opti-MEM besi yeri ile, ayrı bir tüpte 10 pg öncül miR-145 (pre-miR-145) yine 250 µl Opti-MEM ile karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Daha sonra bu iki karışım birleştirilerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından hücreler 500 µl hacmindeki transfeksiyon karışımı ile muamele edildi ve 37°C’ de 1 saat bekletildi.

Sonrasında her bir kuyucuğa 500 µl daha Opti-MEM eklenerek hücreler 37°C’ de inkübasyona bırakıldı. 24, 48 veya 72 saat sonunda hücreler proliferasyon, hücre göçü, hücre siklüsü, gen ekspresyon ve apoptoz analizleri için kullanıldı.

3.2.10. miR-145' in Hep-2 Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisinin Araştırılması

Hep-2 hücreleri miR-145 ya da kontrol miRNA ile transfekte edildikten 24 ve 48 saat sonra miR-145' in hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri karşılaştırıldı. MTS hücre proliferasyon çalışması Cell Proliferation Reagent WST1 (Roche) ile üretici firmanın protokolü izlenerek yapıldı. Hücreler 96-kuyucuklu platelere kuyucuk başına 3000 hücre düşecek şekilde üç tekrarlı olarak ekildi. 24 saat sonra pre-miR-145 veya kontrol miRNA ile transfekte edilerek hücre proliferasyon değişimi takip eden 24 ve 48. saatlerde ölçüldü.

Ölçüm için WST1 solüsyonundan her kuyucuğa %10 oranında eklendi ve hücreler 37°C' de 3 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hücre canlılığı Multiskan FC Microplate Reader (Thermo) cihazı kullanılarak 490 nm'de abzorban ölçümü yapılarak değerlendirildi.

3.2.11. miR-145' in Hep-2 Hücrelerinin Hücre Göçüne Etkisinin Araştırılması

3.2.11.1. Scratch (Yara) Assay

Hep-2 hücreleri kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfekte edildikten 24 saat sonra miR-145' in hücre göçü üzerindeki etkileri karşılaştırıldı. 30 mm petri kaplarına 500.000 hücre ekildi ve hücreler %60-70 konfluensiye ulaşınca “X-treme GENE siRNA Transfection Reagent” kullanılarak kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfekte edildi. 24 saat sonra tek tabakalı hücrelere 200 µL' lik pipet ucu ile tek bir çizgi halinde “yara” oluşturuldu. Sonrasında petri kapları 3 kere PBS ile yıkandı ve hücrelerin göç etme potansiyelleri 24 saat sonra izlendi. Hücre fotoğrafları invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Almanya) kullanılarak çekildi.

3.2.11.2. Tek Koloni Göçü Assayı

Hep-2 hücrelerinin kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfeksiyonları sonrasındaki hücre göçü potansiyelleri bu tez çalışması kapsamında geliştirdiğimiz yeni bir teknik olan tek koloni göçü assayı ile değerlendirildi. 30 mm petri kaplarına 500.000 hücre ekildi ve hücreler %60-70 konfluensiye ulaşınca “X-treme GENE siRNA Transfection Reagent” kullanılarak kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfekte edildi. 24 saat sonra hücreler tripsinle kaldırılarak 96 kuyucuklu platelere kuyucuk başına bir hücre düşecek şekilde ekildi. Sonrasında tek hücreden oluşan kolonileri hücre göçü potansiyellerini değerlendirmek için hücreler iki hafta boyunca inkübasyona bırakıldı. İki hafta sonunda koloniler -20°C’ de 10 dakika metanol içerisinde bekletilerek fiksle edildi ve 15 dakika kristal viyole ile boyandı. Koloni göç fenotipleri, hücre göçü derecelerine göre “-”, “+”, “++” ve “+++” olarak kategorize edildi.

“-” hücre göçü olmadığını, “+” hücre göçü olduğunu gösterirken, “++” ve “+++” daha agresif hücre göçü fenotipinin temsil etmektedir. Kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfekte edilen Hep-2 hücrelerinin göç fenotipleri arasındaki farklılık “++” ve “+++” fenotipe sahip kolonilerin toplam oluşan koloniler içerisindeki yüzde oranı hesaplanarak değerlendirildi.

3.2.12. miR-145’ in Hep-2 Hücrelerinin Hücre Siklüsü Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Hücre siklüsü analizi miR-145’in Hep-2 hücrelerinin hücre siklüsü dağılımı üzerindeki etkisinin araştırılması için gerçekleştirildi. Hücrelerin kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfeksiyonundan 24 saat sonra hücreler toplandı ve -20°C’ de %80 etanol içerisinde fiksle edildi. Sonrasında PBS ile yıkanan hücreler propidium iodide ile 5 dakika inkübe edildi. Hücreler FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) akım sitometrisi ile analiz edildi ve sonuçlar BD CellQuest Pro Software (BD Biosciences, San Jose, CA) yazılımı kullanılarak değerlendirildi.

3.2.13. miR-145' in Hep-2 Hücrelerinin Hücre Apoptozu Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Kaspaz assayı miR-145' in Hep-2 hücrelerinde apoptotik aktivite üzerindeki etkisinin araştırılması için gerçekleştirildi. Hücreler 96-kuyucuklu platelere kuyucuk başına 3000 hücre düşecek şekilde iki tekrarlı olarak ekildi. Hücrelerin kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfeksiyonundan 24 saat sonra hücrelerdeki apoptotik aktivite kolorimetrik Kaspaz-3 aktivite assayı “CaspACE™ Assay System, Colorimetric (Promega)” kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek ölçüldü. Ölçümler için hazırlanan kaspaz assay karışımları kuyucuklara eklendi ve karanlık ortamda 37°C' de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Renk değişimi Multiskan FC micro plate reader (Thermo, Rockford USA) kullanılarak 405 nm yapılan abzorban ölçümleri ile değerlendirildi.

3.2.14. cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elde edilen RNA örneklerinden eşit miktarlarda kullanılarak “Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit” (Roche, Switzerland) kitiyle üretici firmanın protokolü izlenerek cDNA sentezi yapıldı. Gen ekspresyon analizleri gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) SYBR Green metodu ile üretici firmanın protokolüne göre LightCycler480-II qRT-PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. β -actin internal kontrol olarak kullanıldı ve deneyler iki tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Rölatif kantitasyon analizi delta-delta-CT metodu kullanılarak yapıldı (119). Çalışma kapsamında kullanılan primer dizileri Tablo 6' da verilmektedir.

3.2.15. Western Blot Analizi

miR-145 ile transfekte edildikten Hep-2 hücrelerin transfeksiyon işleminden 48 saat sonra RIPA lysis buffer içerisinde parçalanarak protein izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Protein ekstraktları %10 SDS'de yürütülerek, PVDF membrana aktarıldı ve bloklama işlemi %3 süt tozu içeren 1x TBST içerisinde gerçekleştirildi. Örnekler total protein miktarı kuyucuk başına 20 μ g olacak şekilde ayarlandı. Primer antikor olarak mouse anti SOX2 (Abcam) ve rabbit anti Tübülin (Cell Signalling) antikorları sırasıyla 1/2000 ve 1/ 3000 konsantrasyonlarda kullanıldı. Sinyal tespiti “Pierce ECL western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)”

kullanılarak uygun HRP-konjüge edilmiş sekonder antikorlar (1/3000) aracılığıyla gerçekleştirildi.

Tablo 6. Primer listesi ve dizileri.

Gen	Dizi	PZR ürün boyu	Ref
Beta-actin-F	5'-GCCTCGCCTTTGCCGATC-3'	157 bç	(20)
Beta-actin-R	5'-CCCACGATGGAGGGGAAG-3'		
CD133-F	5'-CGGCACCATTGGTCTCTGG-3'	246 bç	(20)
CD133-R	5'-CAGCACACTCCACACATGGC-3'		
Sox2-F	5'-CTCCGGGACATGATCAGC-3'	88 bç	(20)
Sox2-R	5'-GGTAGTGCTGGGACATGTG-3'		
KLF4-F	5'-CCCAATTACCCATCCTTCCTG-3'	121 bç	(20)
KLF4-R	5'-GTCTTCCCCTCTTTGGCTTG-3'		
OCT4-F	5'-CTGGAGAAGGAGAAGCTGGA-3'	79 bç	(20)
OCT4-R	5'-CAAATTGCTCGAGTTCTTTCTG-3'		
ABCG2-F	5'- AGCAGCAGGTCAGAGTGTGG-3'	281 bç	(20)
ABCG2-R	5'-GATCGATGCCCTGCTTTACC-3'		
E-Cad-F	5'- TGCCCAGAAAATGAAAAAGG-3'	200 bç	(120)
E-Cad-R	5'-GTGTATGTGGCAATGCGTTC-3'		
N-Cad-F	5'- ACAGTGGCCACCTACAAAGG-3'	201 bç	(120)
N-Cad-R	5'-CCGAGATGGGGTTGATAATG-3'		
SNAIL1-F	5'- AAGATGCACATCCGAAGCC-3'	164 bç	(120)
SNAIL1-R	5'-CGCAGGTTGGAGCGGTCAGC-3'		
SNAIL2-F	5'- ATACCACAACCAGAGATCCTCA-3'	139 bç	(120)
SNAIL2-R	5'-GACTCACTCGCCCCAAAGATG-3'		
ZEB1-F	5'- GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3'	86 bç	(120)
ZEB1-R	5'-ACAGCAGTGTCTTGTGTTGTAG-3'		
ZEB2-F	5'- AACAAACGAGATTCTACAAGCCTC-3'	176 bç	(120)
ZEB2-R	5'-TCGCGTTCCTCCAGTTTTCTT-3'		
Fibronectin-F	5'- TCCCTCGGAACATCAGAAAC-3'	168 bç	(120)
Fibronectin-R	5'-CAGTGGGAGACCTCGAGAAG-3'		
Vimentin-F	5'- GAGAACTTTGCCGTTGAAGC-3'	163 bç	(120)
Vimentin-R	5'-GCTTCCTGTAGGTGGCAATC-3'		

3.2.16. Kürecik Oluşturma Deneyi

30 mm petri kaplarına 500.000 Hep-2 hücresi ekildi ve hücreler %60-70 konfluensiye ulaşınca “X-treme GENE siRNA Transfection Reagent” kullanılarak kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfekte edildi. 24 saat sonra hücreler tripsinle kaldırılarak 96 kuyucuklu ultra-düşük bağlanma kapasiteli platelere kuyucuk başına 1000 hücre düşecek şekilde üç tekrarlı olarak ekildi. Besi yeri olarak serum içermeyen bFGF: 20 ng/mL; epidermal growth factor (EGF, 20 ng/mL), and insulin (5 µg/mL) içeren RPMI 1640 kullanıldı. 14 gün sonra oluşan kürecikler (kürecik çapı > 50 µm) sayıldı kürecik fotoğrafları invert mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) kullanılarak çekildi. Ayrıca her kuyucuktan rastgele üç farklı bölgede bulunan küreciklerin çapları ölçülerek kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfekte edilmiş örnekler birbirleriyle karşılaştırıldı.

3.2.17. Tek Hücre Klonlama

30 mm petri kaplarına 500.000 hücre ekildi ve hücreler %60-70 konfluensiye ulaşınca “X-treme GENE siRNA Transfection Reagent” kullanılarak kontrol miRNA’ ya da miR-145 ile transfekte edildi. 24 saat sonra hücreler tripsinle kaldırılarak 33 mm’ lik platelere plate başına 100 hücre düşecek şekilde ekildi. 14 gün sonra oluşan koloniler sayıldı ve morfolojik (holoklon, meroklon ve paraklon) açıdan değerlendirildi.

3.2.18. Aldehid Dehidrojenaz Aktivitesi

30 mm petri kaplarına 500.000 hücre ekildi ve hücreler %60-70 konfluensiye ulaşınca “X-treme GENE siRNA Transfection Reagent” kullanılarak kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfekte edildi. 24 saat sonra hücreler tripsinle kaldırılarak toplandı ve “Aldehyde Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (SIGMA)” kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek aldehid dehidrojenaz (ALDH) aktiviteleri açısından değerlendirildi.

3.2.19. İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi, ve istatistiksel anlamlılıklar Student's t test kullanılarak değerlendirildi. 0,05' ten küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Genlerin ifade düzeyleri arasındaki korelasyonlar Pearson Korelasyon testi kullanılarak analiz edildi. Ayrıca, Kruskal Wallis testi birden fazla değişkenin korelasyonunun analiz edildiği durumlarda kullanıldı. Cluster histogramı Matrix2png arayüzü kullanılarak oluşturuldu (121).

4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı' na başvuran 40 hasta çalışmaya dahil edildi. Total ya da parsiyel larenjektomi uygulanan bu hastalardan ameliyat sonrasında tümör dokuları ve tümör dokularına yakın bölgeden alınan normal larenks doku örnekleri hücre ayrıştırması ya da RNA eldesi işlemleri için alındı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü' nde tümör dokularının incelemesi yapılarak skuamöz hücreli karsinom oldukları doğrulandı.

Elde edilen tümör dokularının patoloji inceleme sonuçları ve hastalarla ilgili bilgiler Tablo 7' de verilmektedir. Özetle, çalışmaya dahil edilen hastalardan 38'i erkek 2' si kadındır. Bu hastalardan 23' ü 60 yaşından büyük hastalardır. Bu gruptaki hastaların yaş ortalaması $66,31 \pm 5,32$ iken, 60 yaşından küçük hastaların yaş ortalaması $49 \pm 4,07$ ' dir. Bütün hastalar göz önüne alındığında yaş ortalamasının $60,37 \pm 8,20$ olduğu görülmektedir. 12 hastada tümör supraglottik yerleşimliken, 2 hastada subglottik, 12 hastada da glottik yerleşimlidir. 14 hastada ise tümör yerleşimi larenksin diğer bölgelerindedir. Tümör evrelemesinde 16 hastanın T1 ya da T2 evresinde, 24 hastanın ise T3 ya da T4 evresinde olduğu tespit edilmiştir. Tümör büyüklüğü 19 hastada 2 cm^3 ' ten küçüktür. Hastaların 14 tanesinde grade I ya da II tümör mevcutken, 23 tanesi grade III olarak belirlenmiştir. Tümör örneklerinden 26 tanesinde nekroz tespit edilmiştir, 9 tanesinde ise nekroz görülmemiştir.

Tablo 7. Hastaların klinik-patolojik bilgileri.

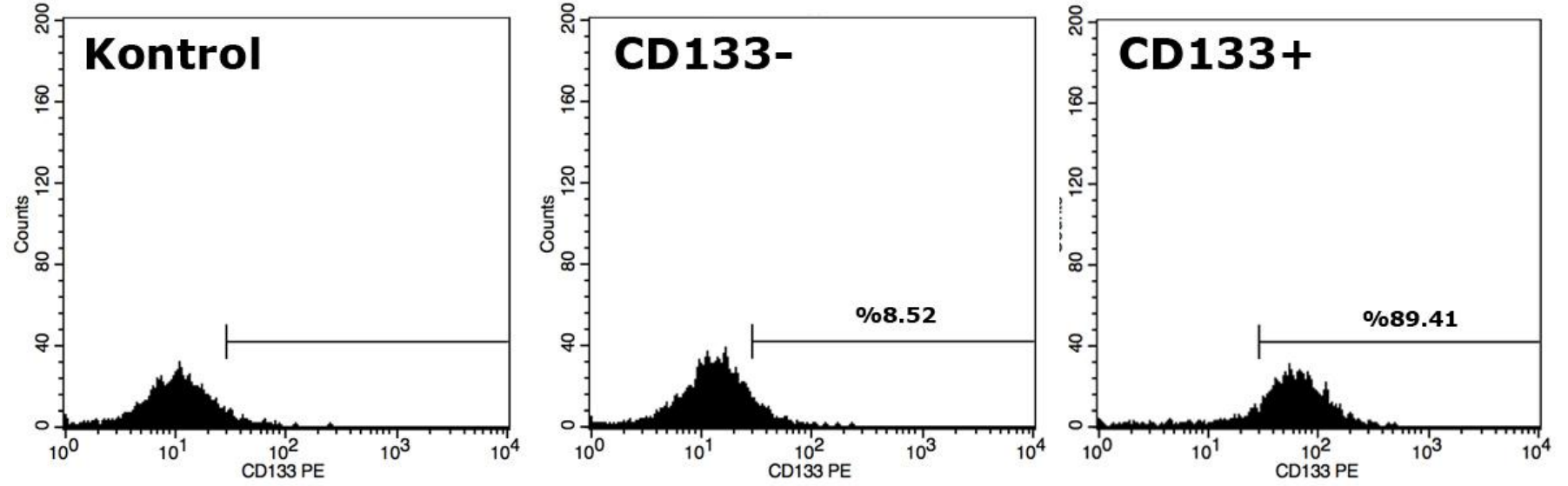
Larenks Kanseri Örnekleri	
Yaş	
≤ 60	17
> 60	23
Cinsiyet	
Erkek	38
Kadın	2
Tümör Yeri	
Supraglottik	12
Subglottik	2
Glottik	12
Diğer	14
T Sınıflandırması	
T1 ve T2	16
T3 ve T4	24
Tümör Büyüklüğü	
≤ 2 cm ³	19
> 2 cm ³	21
Histolojik Grade	
I	2
II	12
III	23
Bilgi yok	3
Nekroz	
yok	9
<%20	14
≥%20	12
Bilgi yok	5

4.1. Tümör Örneklerinden CD133 Yüzey İşaretçisi ile Hücre Ayırıştırması İşlemlerinin Akım Sitometrisi ile Doğrulanması

Çalışma kapsamında öncelikle larenks skuamöz hücreli karsinom örneklerinden CD133 yüzey işaretçisi yardımıyla hücrelerin ayrıştırılarak kök hücre zenginleştirilmesi yapılması ve kök hücreler açısından zengin olduğu düşünülen bu hücre popülasyonunda diğer tümör hücreleri ile karşılaştırmalı olarak miRNA profilinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Bu doğrultuda ilk olarak manyetik ayırıştırma sonrasında elde edilen CD133 pozitif (CD133+) hücrelerin verimli bir şekilde ayrıştırıldıklarını kontrol etmek için akım sitometri çalışmaları gerçekleştirildi. Ayırıştırma işlemleri PE konjüge CD133 antikorları ile gerçekleştirildiği için ayırıştırma sonrasında hücreler direk akım sitometri deneylerinde kullanıldı. Kontrol olarak CD133 işaretlemesi yapılmamış hücreler (kontrol) ve “ayırıştırma sonucunda CD133 negatif olarak elde edilen hücreler (CD133-) kullanıldı.

Akım sitometrisi sonuçları, CD133+ olarak elde edilen hücrelerin %89,41 saflıkla elde edildiğini gösterdi (Şekil 36). Ayrıca CD133- hücre popülasyonunda da az miktarda da olsa CD133+ hücrelerin kaldığı da görülmektedir (%8,52). Bu sonuç literatürde aynı yöntemle beyin tümör dokusundan CD133 hücre ayırıştırılması yapılan makalede verilen saflık sınırları (%70-91) içerisinde yer almaktadır (107).

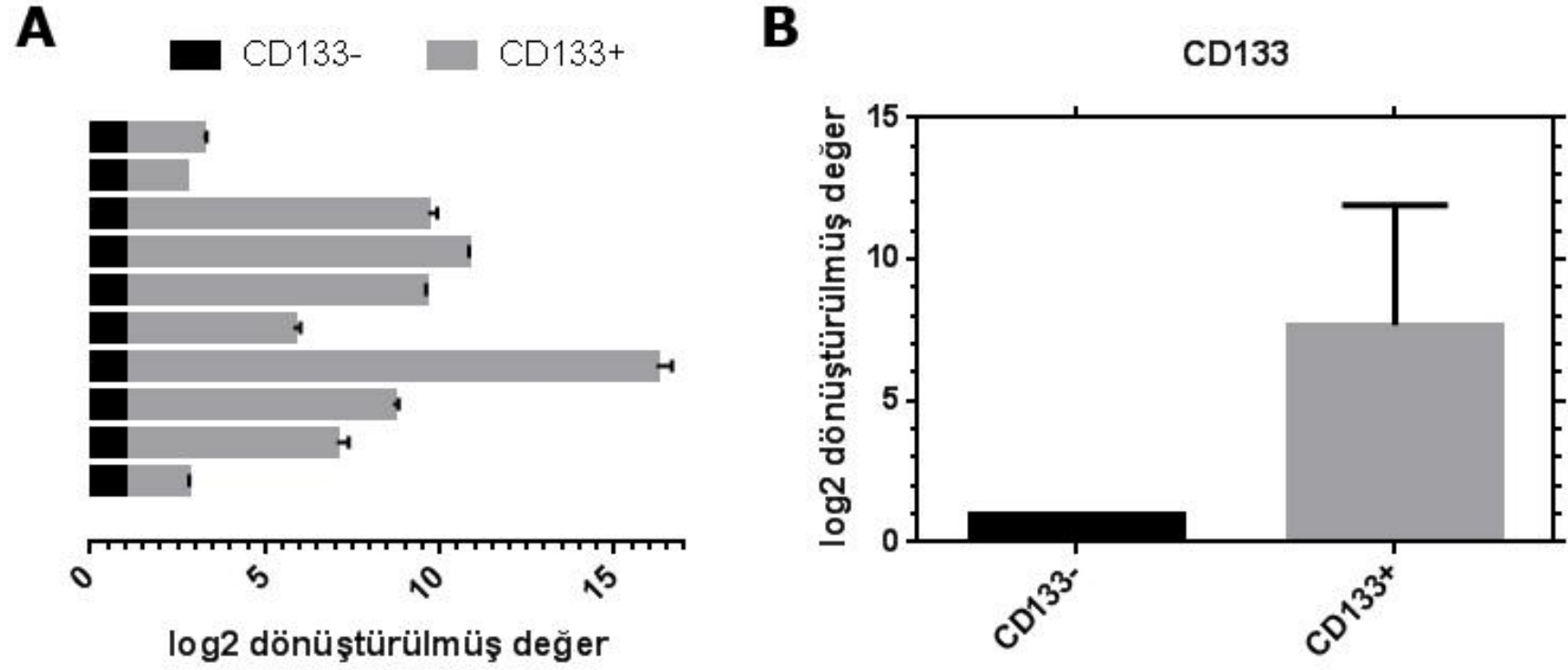


Şekil 36. Doku örneklerinden manyetik hücre ayrıştırması sonrasında kontrol hücreleri, CD133- ve CD133+ hücrelerde yapılan akım sitometri analizi

4.2. Tümör Örneklerinden CD133 Yüzey İşaretçisi ile Hücre Ayırıştırması İşlemlerinin qRT-PCR ile Doğrulanması

Manyetik ayırıştırma sonrasında elde edilen CD133 pozitif (CD133+) hücrelerin verimli bir şekilde ayırıştırıldıklarını kontrol etmek için qRT-PCR çalışmaları gerçekleştirildi. qRT-PCR işlemi için 10 adet tümör dokusundan elde edilen CD133+ ve CD133- hücre örneklerinde CD133 mRNA düzeyleri incelendi.

Elde edilen sonuçlar CD133+ hücrelerde CD133 ifade düzeyinin bütün örneklerde CD133- olanlara kıyasla artmış olduğunu gösterdi (Şekil 37A). 10 örnek birlikte değerlendirildiğinde CD133+ hücrelerde CD133 ifadesinin CD133- hücrelere kıyasla $7,66 \pm 1,32$ kat artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 37B, $p < 0.0001$). Bu şekilde CD133 yüzey işaretçisi ile hücre ayırıştırma işleminin başarıyla gerçekleştirilmiş olduğu hem akım sitometrisi deneyi ile hem de qRT-PCR ile doğrulanmış oldu.



Şekil 37. (A) CD133+ ve CD133- hücrelerde CD133 ifade düzeyi. (B) CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama CD133 ifade düzeyi.

4.3. Tümör Örneklerinden CD133 Yüzey İşaretçisi ile Ayrıştırılan Hücrelerin Kök Hücre İşaretçileri Açısından Değerlendirilmesi

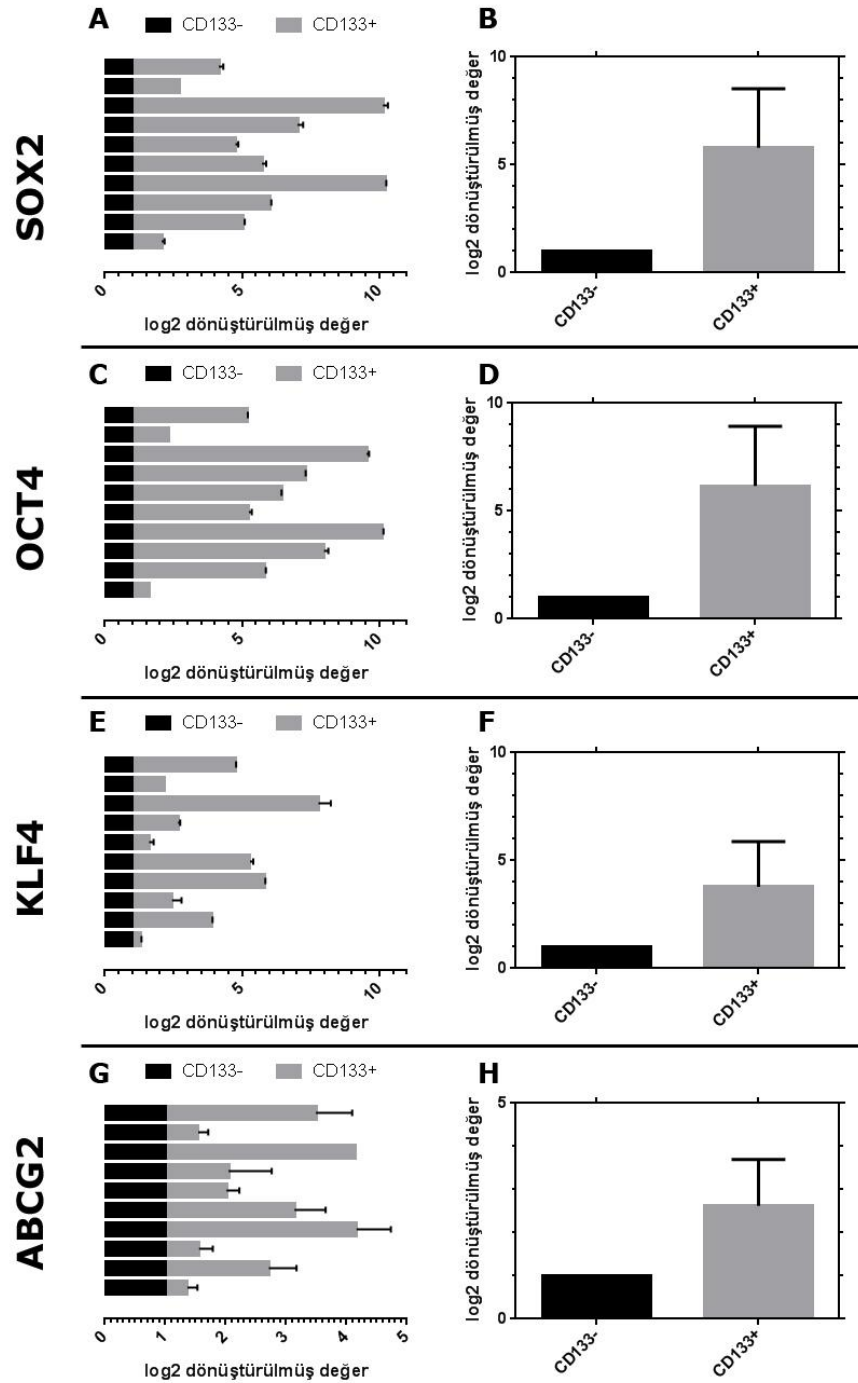
CD133 yüzey işaretçisi ile ayrıştırılan hücrelerin kök hücreler açısından zenginleştiğini doğrulamak için hücreler kök hücre işaretçilerinin ifade düzeyleri açısından incelendi.

SOX2, OCT4, KLF4 ve ABCG2 ifade düzeylerinin qRT-PCR ile analizi sonuçları SOX2 ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde ortalama $5,78 \pm 0,85$ kat arttığını gösterdi (Şekil 38A-B, $p < 0.0001$).

Bir diğer kök hücre işaretçisi olan OCT4 ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde ortalama $6,15 \pm 0,86$ kat arttığı gösterildi (Şekil 38C-D, $p < 0.0001$).

Kök hücre işaretçilerinden KLF4 ifade düzeyinin ise CD133+ hücrelerde ortalama $3,77 \pm 0,65$ kat arttığı gösterildi (Şekil 38E-F, $p < 0.001$).

Kök hücre işaretçileri olarak bilinen aynı zamanda tümörlerde kemorezistans ile ilişkilendirilmiş önemli bir faktör olan ABCG2 ifade düzeyinin de CD133+ hücrelerde ortalama $2,62 \pm 0,33$ kat arttığı gösterildi (Şekil 38G-H, $p < 0.001$).



Şekil 38. CD133+ ve CD133- hücrelerde SOX2 ifade düzeyi (A) ve bu hücrelerde ortalama SOX2 ifade düzeyi (B). CD133+ ve CD133- hücrelerde OCT4 ifade düzeyi (C) ve bu hücrelerde ortalama OCT4 ifade düzeyi (D). CD133+ ve CD133- hücrelerde KLF4 ifade düzeyi (E) ve bu hücrelerde ortalama KLF4 ifade düzeyi (F). CD133+ ve CD133- hücrelerde ABCG2 ifade düzeyi (G) ve bu hücrelerde ortalama ABCG2 ifade düzeyi (H).

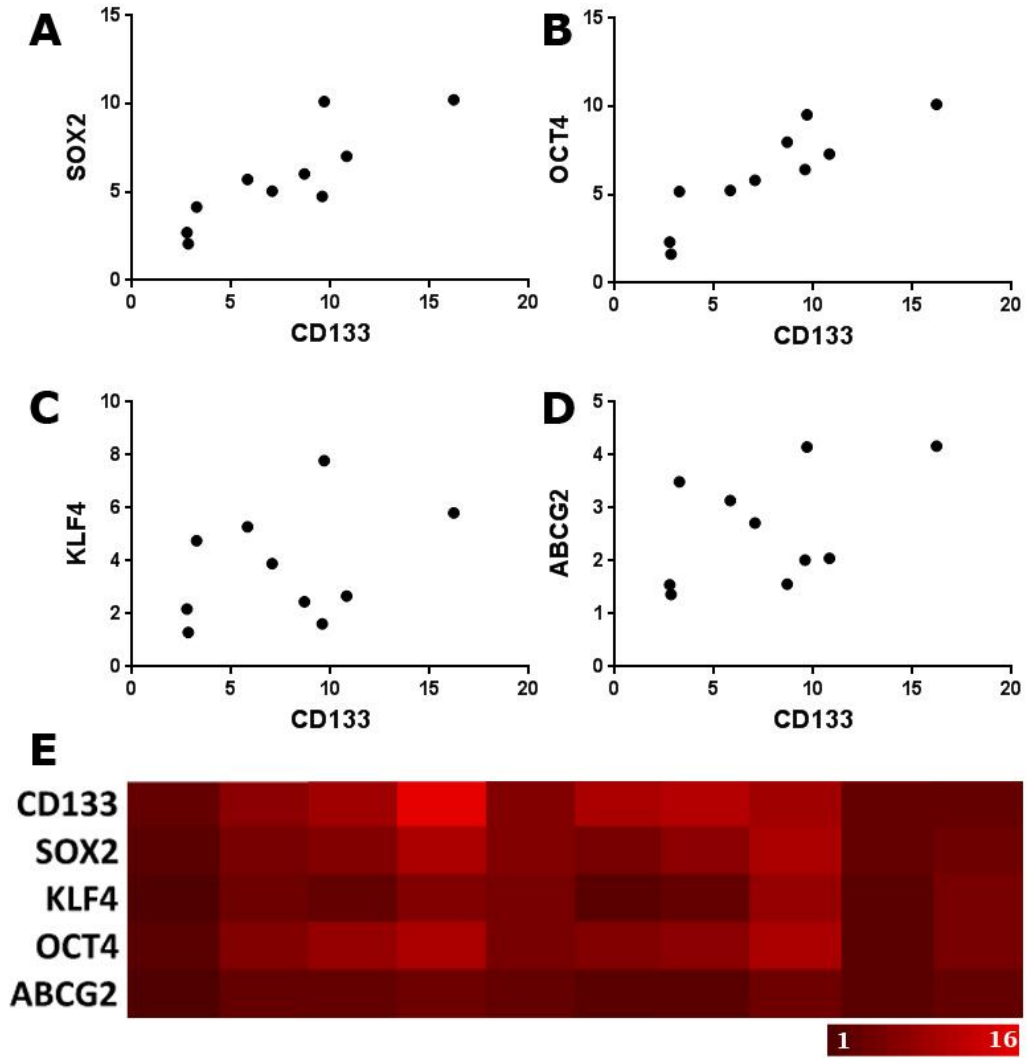
CD133+ hücrelerde kök hücre işaretçilerinin ifadelerinin CD133 ile korelasyonu incelendiğinde, SOX2 ifadesinin CD133 ile kuvvetli bir korelasyona sahip olduğu gösterildi (Şekil 39A, $R=0,85$).

OCT4 ifadesinin CD133 ile kuvvetli bir korelasyona sahip olduğu da Pearson korelasyon testi kullanılarak gösterildi (Şekil 39B, $R=0,88$).

Ayrıca, KLF4 (Şekil 39C, $R=0,36$) ve ABCG2 (Şekil 39D, $R=0,45$) ifadelerinin de, SOX2 ve OCT4 kadar kuvvetli olmasa da, CD133 ifadesi ile pozitif bir korelasyona sahip olduğu kullanılarak gösterildi.

Elde edilen veriler incelenen kök hücre işaretçisi genlerin kanser kök hücreleri açısından zenginleşmiş olan CD133+ hücrelerde birbirleri ile de yüksek korelasyon gösterdiğini ortaya koydu (Şekil 39E). Bu korelasyon Kruskal-Wallis testi kullanılarak gösterildi ($p<0.0001$).

Sonuç olarak, CD133 yüzey işaretçisinin tümör dokusundan kanser kök hücrelerini ayırtmada başarılı olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 39. CD133 ifade düzeyinin (A) SOX2, (B) OCT4, (C) KLF4 ve (D) ABCG2 ifade düzeyi korelasyonlarının scatter plot gösterimi. (E) Analiz edilen genlerin ifade düzeylerinin heat-map gösterimi.

4.4. CD133 ile Ayırıştırılmış Kök Hücrelerde miRNA Profillemesi

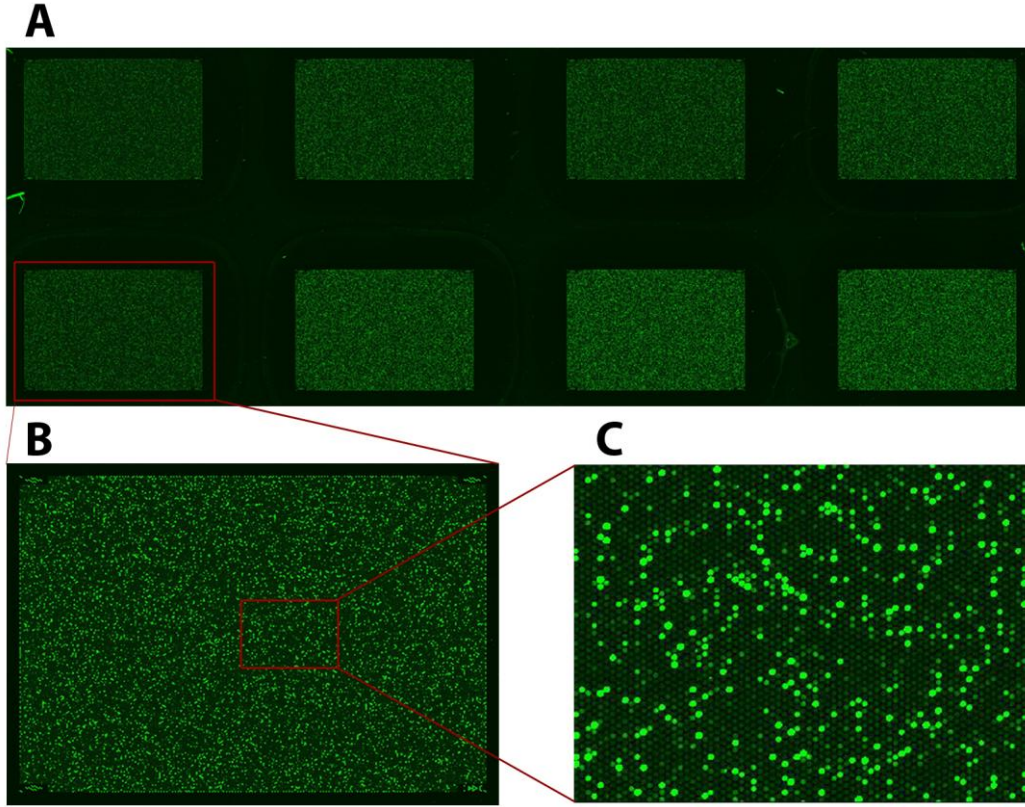
Ayırıştırılmış kök hücrelerdeki miRNA profillerinin belirlenmesi amacıyla Agilent firması tarafından oldukça hassas bir teknoloji kullanılarak hazırlanan çipler kullanılarak miRNA mikrodizin çalışması yapıldı.

Tümör doku örneklerinden yapılan ayırıştırma sonucunda elde edilen 12 CD133+ ve 12 CD133- hücre örneği olmak üzere toplamda 24 örnekte miRNA profillemesi yapıldı. Yapılan mikrodizin çalışmalarına örnek bir mikroçip görüntüsü Şekil 40' da verilmektedir.

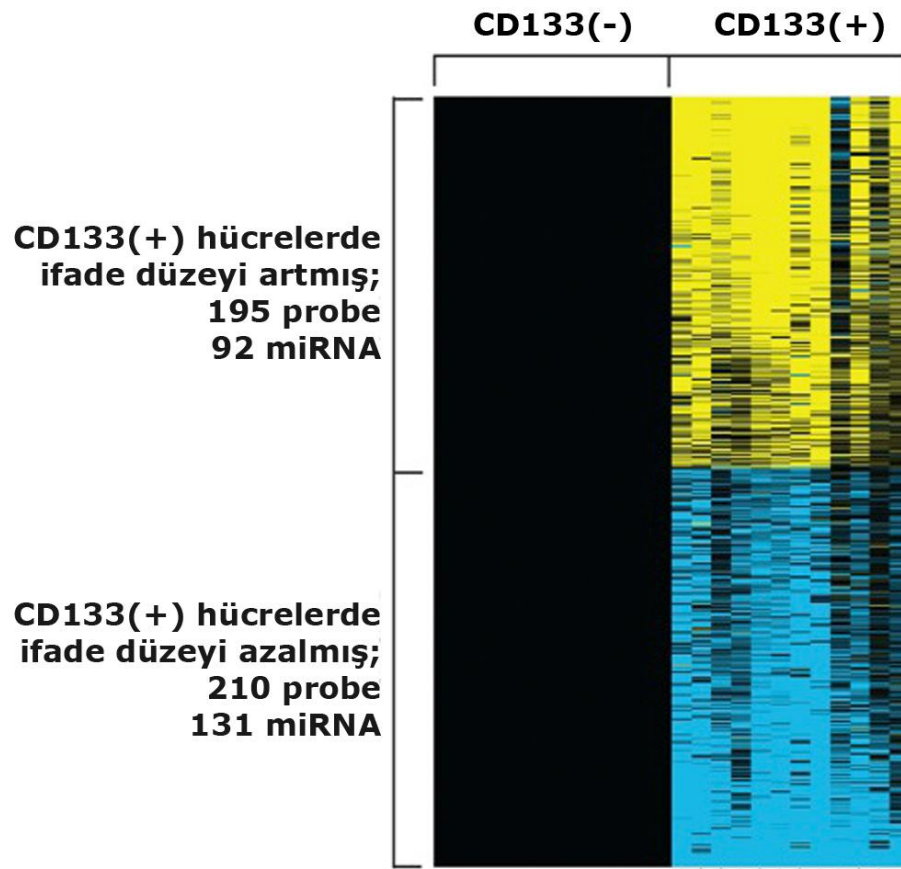
Çip üzerinde bulunan pozitif ve negatif kontrol noktaları beklenen şekilde hibridize olmuş ve kalite kontrol standartlarını sağladığı görüldü. Feature Extraction v10.7.3.1 (Agilent Technologies, CA) yazılımı kullanılarak taranmış çip görüntülerinden ham data çıkarıldı ve Bioconductor yazılımı kullanılarak ham datalar analiz edildi. Normalizasyon kuantil normalizasyonu yöntemi ile gerçekleştirildi. Log-2 dönüştürülmüş değerleri kullanılarak *p* değerleri (student t-test) ve kat değişim oranları hesaplandı. *p* değeri 0,05' in altında olan kat değişimi 0,7' den küçük ya da 1,4' ten fazla olanlar anlamlı kabul edildi.

93 farklı miRNA' nın (195 prob) ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde anlamlı olarak arttığı, 131 farklı miRNA' nın (210 prob) ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde anlamlı olarak azaldığı görüldü. CD133+ ve CD133- hücrelere ait miRNA profilinin heat-map gösterimi Şekil 41' de gösterilmektedir.

Kontrollere göre normalize edilen ve CD133+ hücrelerde anlamlı olarak ifade düzeyi değişen miRNA' lardan (prob) ifade düzeyleri artanlardan 100 tanesi Tablo 8' de, ifade düzeyleri azalanlardan 100 tanesi ise Tablo 9' da verilmektedir.



Şekil 40. CD133+ ve CD133- hücrelerde mikroRNA mikrodizin görüntüsü. Bütün slayt (A), bakılan tüm mikroRNA' lar (B) ve seçilmiş bir bölgedeki mikroRNA' lar (C) görüntülenmiştir. mikroRNA'lar yeşil renkli floresan veren Cy3 boyası ile işaretlenmiştir.



Şekil 41. CD133+ ve CD133- hücrelere ait miRNA profili heat-map gösterimi.

Tablo 8. CD133+ hücrelerde ifade düzeyinin arttığı tespit edilen 100 prob.

Probe İsmi	Sistematiik İsim	t-test (ikili)	Ort. Kat değışimi (+/-)
A_25_P00010836	hsa-miR-197-3p	0.000700825	4.975594434
A_25_P00010835	hsa-miR-197-3p	0.000449256	4.939031597
A_25_P00012730	hsa-miR-574-3p	0.002264244	4.821254096
A_25_P00014895	hsa-miR-574-3p	0.00128669	4.749650945
A_25_P00012991	hsa-miR-885-5p	0.000209989	4.054660402
A_25_P00014914	hsa-miR-885-5p	0.00032763	3.935521206
A_25_P00012462	hsa-miR-483-3p	8.73435E-05	3.819282881
A_25_P00015233	hsa-miR-1281	2.96278E-05	3.790361142
A_25_P00010262	hsa-miR-328	0.00012397	3.726031934
A_25_P00015729	hsa-miR-4254	0.00069617	3.697753897
A_25_P00015733	hsa-miR-4290	0.000249135	3.691135641
A_25_P00015728	hsa-miR-4254	0.000496746	3.644360911
A_25_P00010263	hsa-miR-328	8.39575E-05	3.634123626
A_25_P00011965	hsa-miR-766-3p	0.000469404	3.604686786
A_25_P00015273	hsa-miR-1825	1.51862E-05	3.501604516
A_25_P00012461	hsa-miR-483-3p	5.10529E-05	3.388754574
A_25_P00010361	hsa-miR-485-3p	0.000390994	3.388734961
A_25_P00015594	hsa-miR-466	0.003350426	3.36662142
A_25_P00015732	hsa-miR-4290	0.000180255	3.364071732
A_25_P00015232	hsa-miR-1281	5.38191E-05	3.359896549
A_25_P00015432	hsa-miR-449c-3p	0.000302064	3.356457194
A_25_P00013078	hsa-miR-937-3p	0.000197106	3.334288768
A_25_P00010360	hsa-miR-485-3p	0.000372163	3.29193636
A_25_P00013079	hsa-miR-937-3p	0.000843099	3.260560564
A_25_P00015431	hsa-miR-449c-3p	0.000348327	3.257797188
A_25_P00015433	hsa-miR-449c-3p	0.000605435	3.215370944
A_25_P00011964	hsa-miR-766-3p	0.000323124	3.125119519
A_25_P00015272	hsa-miR-1825	2.28046E-05	3.121475533
A_25_P00015001	hsa-miR-877-3p	6.18558E-05	3.106012231

A_25_P00015592	hsa-miR-466	0.002015679	2.907367614
A_25_P00015593	hsa-miR-466	0.003377239	2.848437613
A_25_P00014911	hsa-miR-1224-3p	0.000272132	2.828178412
A_25_P00016204	hsa-miR-3935	0.000621162	2.777750218
A_25_P00012886	hsa-miR-300	0.000601024	2.760179218
A_25_P00013076	hsa-miR-937-3p	0.000190695	2.738049026
A_25_P00013077	hsa-miR-937-3p	0.000785051	2.725623355
A_25_P00015000	hsa-miR-877-3p	5.86324E-05	2.664487345
A_25_P00012887	hsa-miR-300	0.000505656	2.634665358
A_25_P00015172	hsa-miR-1260a	0.000714806	2.634342904
A_25_P00011410	hsa-miR-766-3p	0.000144428	2.628789489
A_25_P00015591	hsa-miR-466	0.002315608	2.595285762
A_25_P00013127	hsa-let-7d-3p	0.000187222	2.565551925
A_25_P00010362	hsa-miR-609	0.000902103	2.563722124
A_25_P00015039	hsa-miR-1296	0.000110762	2.518737788
A_25_P00011411	hsa-miR-766-3p	0.000770499	2.515930786
A_25_P00014965	hsa-miR-1238-3p	3.55526E-05	2.505271827
A_25_P00011304	hsa-miR-609	0.000378258	2.486773733
A_25_P00010182	hsa-miR-381-3p	0.001097503	2.461126333
A_25_P00013126	hsa-let-7d-3p	0.001132316	2.44357677
A_25_P00012885	hsa-miR-300	0.000981952	2.437586094
A_25_P00015612	hsa-miR-4297	0.000422343	2.423668176
A_25_P00014910	hsa-miR-1224-3p	0.000171835	2.405424236
A_25_P00012791	hsa-miR-615-3p	0.000442086	2.402183428
A_25_P00011303	hsa-miR-609	0.001547676	2.393243242
A_25_P00015375	hsa-miR-449b-3p	0.000682364	2.391890357
A_25_P00013117	hsa-let-7b-3p	9.18787E-05	2.388478681
A_25_P00014999	hsa-miR-877-3p	0.000115573	2.384745016
A_25_P00014853	hsa-miR-381-3p	0.001293136	2.337640446
A_25_P00016203	hsa-miR-3935	0.002475072	2.292097346
A_25_P00013119	hsa-let-7b-3p	3.48352E-05	2.289544962
A_25_P00015440	hsa-miR-764	0.001267	2.239050539

A_25_P00013125	hsa-let-7d-3p	0.00140754	2.234735441
A_25_P00013060	hsa-miR-933	1.8294E-05	2.218926928
A_25_P00016260	hsa-miR-3646	0.000382457	2.202085647
A_25_P00011368	hsa-miR-647	0.00060578	2.190817305
A_25_P00013124	hsa-let-7d-3p	0.000436272	2.163346307
A_25_P00012884	hsa-miR-300	0.003331413	2.158881939
A_25_P00013118	hsa-let-7b-3p	3.20726E-05	2.154446498
A_25_P00016004	hsa-miR-3940-3p	0.000274836	2.153393014
A_25_P00010398	hsa-miR-605	0.000439102	2.148370882
A_25_P00015611	hsa-miR-4297	0.00094618	2.140203818
A_25_P00015038	hsa-miR-1296	0.000194333	2.135403706
A_25_P00010248	hsa-miR-630	0.001434045	2.134519459
A_25_P00015439	hsa-miR-764	0.001238055	2.121938558
A_25_P00010249	hsa-miR-630	0.001665291	2.119969936
A_25_P00011597	hsa-miR-609	0.000891651	2.116239995
A_25_P00010397	hsa-miR-605	0.000374612	2.105243975
A_25_P00012281	hsa-miR-34b-3p	0.002195277	2.049748375
A_25_P00014998	hsa-miR-877-3p	0.002815374	2.031629002
A_25_P00012790	hsa-miR-615-3p	0.00075153	2.029820975
A_25_P00013399	hsa-miR-130a-5p	0.002002925	2.014654486
A_25_P00012789	hsa-miR-615-3p	0.00031784	1.996007659
A_25_P00010766	hsa-miR-454-5p	0.001978329	1.960707499
A_25_P00016259	hsa-miR-3646	0.000869678	1.960231856
A_25_P00013133	hsa-let-7f-1-3p	5.59829E-05	1.954031468
A_25_P00013135	hsa-let-7f-1-3p	7.19301E-05	1.953280608
A_25_P00014685	hsa-miR-454-5p	0.000924664	1.947834685
A_25_P00012788	hsa-miR-615-3p	0.000260621	1.940457545
A_25_P00015865	hsa-miR-4312	8.64841E-05	1.940026369
A_25_P00015293	hsa-miR-1910	0.00064549	1.935961207
A_25_P00013398	hsa-miR-130a-5p	0.001835982	1.933785723
A_25_P00016003	hsa-miR-3940-3p	0.000820348	1.93027685
A_25_P00012234	hsa-miR-149-5p	8.91419E-06	1.919854706

A_25_P00013116	hsa-let-7b-3p	3.69495E-05	1.917043229
A_25_P00014956	hsa-miR-1236-3p	0.001430947	1.914340532
A_25_P00013061	hsa-miR-933	1.02737E-05	1.913838712
A_25_P00015298	hsa-miR-1909-5p	0.000775723	1.908599218
A_25_P00016161	hsa-miR-3613-3p	5.97523E-05	1.903634559
A_25_P00010765	hsa-miR-454-5p	0.004463501	1.901994798
A_25_P00014964	hsa-miR-1238-3p	7.13554E-05	1.894950604

Tablo 9. CD133+ hücrelerde ifade düzeyinin azaldığı tespit edilen 100 prob.

Probe İsmi	Sistematik İsim	t-test (ikili)	Ort. Kat değişimi (+/-)
A_25_P00012447	hsa-miR-451a	1.23552E-08	0.021107543
A_25_P00012446	hsa-miR-451a	1.77816E-07	0.025189068
A_25_P00012188	hsa-miR-144-3p	1.13204E-06	0.047712963
A_25_P00012189	hsa-miR-144-3p	9.33322E-06	0.057162435
A_25_P00014064	hsa-miR-486-5p	3.25934E-07	0.075779764
A_25_P00014063	hsa-miR-486-5p	1.05545E-06	0.11076323
A_25_P00013423	hsa-miR-144-5p	7.74248E-07	0.131700529
A_25_P00013937	hsa-miR-142-3p	5.12095E-06	0.136167089
A_25_P00011016	hsa-miR-142-3p	6.93204E-06	0.141331256
A_25_P00012131	hsa-miR-223-3p	7.06799E-06	0.168510055
A_25_P00014847	hsa-miR-150-5p	0.000142473	0.172472137
A_25_P00012130	hsa-miR-223-3p	9.77412E-06	0.188651074
A_25_P00014846	hsa-miR-150-5p	9.81659E-05	0.233879177
A_25_P00012181	hsa-miR-142-5p	3.9296E-05	0.250537148
A_25_P00012239	hsa-miR-185-5p	4.58941E-06	0.255557168
A_25_P00011102	hsa-miR-15b-5p	1.59804E-05	0.257658536
A_25_P00010953	hsa-miR-363-3p	5.55795E-06	0.271898633
A_25_P00014844	hsa-miR-142-5p	1.94222E-05	0.272339672
A_25_P00010977	hsa-miR-425-5p	4.04101E-06	0.272637405
A_25_P00014865	hsa-miR-494	3.14751E-06	0.283174474

A_25_P00010599	hsa-miR-16-5p	4.80135E-05	0.284728261
A_25_P00011101	hsa-miR-15b-5p	4.82E-05	0.29548858
A_25_P00014818	hsa-miR-16-5p	1.18046E-05	0.299173262
A_25_P00012001	hsa-miR-26b-5p	0.000286407	0.302444565
A_25_P00010434	hsa-miR-106b-5p	7.01777E-05	0.306630764
A_25_P00012505	hsa-miR-494	2.23893E-07	0.327778035
A_25_P00010433	hsa-miR-106b-5p	7.24904E-05	0.328057918
A_25_P00010954	hsa-miR-363-3p	7.13168E-06	0.332564444
A_25_P00015450	hsa-miR-718	4.28802E-05	0.334206725
A_25_P00012238	hsa-miR-185-5p	1.61432E-05	0.33662959
A_25_P00012002	hsa-miR-26b-5p	0.000651247	0.342621299
A_25_P00011981	hsa-let-7d-5p	0.000287321	0.344095635
A_25_P00010614	hsa-miR-20b-5p	6.59014E-05	0.344816443
A_25_P00011068	hsa-miR-107	0.000253344	0.346073881
A_25_P00010615	hsa-miR-20b-5p	2.36204E-05	0.347495464
A_25_P00011005	hsa-miR-103a-3p	0.000821445	0.354051423
A_25_P00010989	hsa-miR-25-3p	0.000252579	0.358491031
A_25_P00012141	hsa-let-7g-5p	0.000311158	0.359790437
A_25_P00013841	hsa-miR-17-5p	8.68914E-05	0.359989334
A_25_P00015801	hsa-miR-4306	0.000585034	0.361534055
A_25_P00014045	hsa-miR-425-5p	8.21914E-06	0.37122327
A_25_P00012271	hsa-miR-155-5p	0.000236479	0.371411179
A_25_P00011980	hsa-let-7d-5p	4.00366E-05	0.373630398
A_25_P00010990	hsa-miR-25-3p	0.000317083	0.379021078
A_25_P00012039	hsa-miR-101-3p	0.001190401	0.381997609
A_25_P00010089	hsa-let-7f-5p	0.000858199	0.382357939
A_25_P00012406	hsa-miR-345-5p	2.14979E-05	0.391010234
A_25_P00014819	hsa-miR-17-5p	0.000297687	0.392315618
A_25_P00011069	hsa-miR-107	0.000681848	0.394229981
A_25_P00012142	hsa-let-7g-5p	0.000419987	0.397979895
A_25_P00010611	hsa-miR-93-5p	3.18824E-05	0.405932447
A_25_P00010612	hsa-miR-20a-5p	0.000621039	0.407297886

A_25_P00013995	hsa-miR-374a-5p	0.000125395	0.40732825
A_25_P00010613	hsa-miR20a-5p	0.000947827	0.40978774
A_25_P00010610	hsa-miR-93-5p	0.000389447	0.410258546
A_25_P00011004	hsa-miR-103a-3p	0.00291668	0.410943377
A_25_P00010628	hsa-miR-203a	0.000638876	0.412178685
A_25_P00010386	hsa-miR-146b-5p	0.000588685	0.418243873
A_25_P00010629	hsa-miR-203a	0.001313292	0.421768979
A_25_P00011000	hsa-miR-19b-3p	0.002830683	0.422932605
A_25_P00010088	hsa-let-7f-5p	0.000869873	0.423856582
A_25_P00011584	hsa-let-7a-5p	0.000591831	0.430709081
A_25_P00010839	hsa-miR-301a-3p	2.66925E-05	0.430734911
A_25_P00010998	hsa-miR-19a-3p	0.001162041	0.435547842
A_25_P00012871	hsa-miR-454-3p	3.49563E-05	0.437390504
A_25_P00012177	hsa-miR-140-3p	0.003314307	0.439705596
A_25_P00010086	hsa-let-7a-5p	0.003040609	0.440471288
A_25_P00013996	hsa-miR-374a-5p	4.89391E-05	0.445025342
A_25_P00012038	hsa-miR-101-3p	0.000397584	0.445253493
A_25_P00011998	hsa-miR-26a-5p	0.002429901	0.446212967
A_25_P00014257	hsa-miR-590-5p	9.90268E-05	0.447841376
A_25_P00010437	hsa-miR-130b-3p	0.000260432	0.454899105
A_25_P00010997	hsa-miR-19a-3p	0.005660084	0.457387333
A_25_P0011007	hsa-miR-194-5p	1.03772E-05	0.460082152
A_25_P00015287	hsa-miR-1471	3.54084E-05	0.473400131
A_25_P00010078	hsa-miR-146a-5p	0.005296011	0.475396856
A_25_P00012176	hsa-miR-140-3p	3.69155E-05	0.478358275
A_25_P00012265	hsa-miR-200c-3p	0.001902359	0.478380169
A_25_P00014915	hsa-miR-374b-5p	0.000181215	0.480876739
A_25_P00011994	hsa-miR-18a-5p	0.000196989	0.484388309
A_25_P00010868	hsa-miR-192-5p	9.60031E-05	0.485996947
A_25_P00015286	hsa-miR-1471	9.327E-06	0.487759928
A_25_P00013407	hsa-miR-135a-3p	0.001369826	0.490097479
A_25_P00014916	hsa-miR-374b-5p	0.000132206	0.491868479

A_25_P00013406	hsa-miR-135a-3p	0.002775456	0.497431882
A_25_P00010490	hsa-miR-150-5p	2.60229E-05	0.497767748
A_25_P00013883	hsa-miR-30c-5p	0.001577366	0.498057968
A_25_P00013422	hsa-miR-144-5p	0.000248727	0.498109958
A_25_P00012099	hsa-miR-183-5p	0.00090483	0.51235692
A_25_P00012301	hsa-miR-30e-5p	0.004351891	0.514436507
A_25_P00012098	hsa-miR-183-5p	0.001003852	0.514670665
A_25_P00012138	hsa-miR-200b-3p	0.002663242	0.515507452
A_25_P00012357	hsa-miR-342-3p	0.000165402	0.517750406
A_25_P00010438	hsa-miR-130b-3p	8.40594E-05	0.517870496
A_25_P00012834	hsa-miR-652-3p	3.82137E-05	0.5182051
A_25_P00013922	hsa-miR-30b-5p	0.003181078	0.523350497
A_25_P00010073	hsa-let-7c	0.000197472	0.524867202
A_25_P00014611	hsa-miR-30e-3p	0.000849225	0.527353483
A_25_P00010047	hsa-miR-98-5p	6.97192E-05	0.528183306
A_25_P0010054	hsa-miR-29b-3p	0.009987359	0.528888576

4.5. Larenks Kanseri Tümör ve Normal Dokularda miRNA Profillemesi

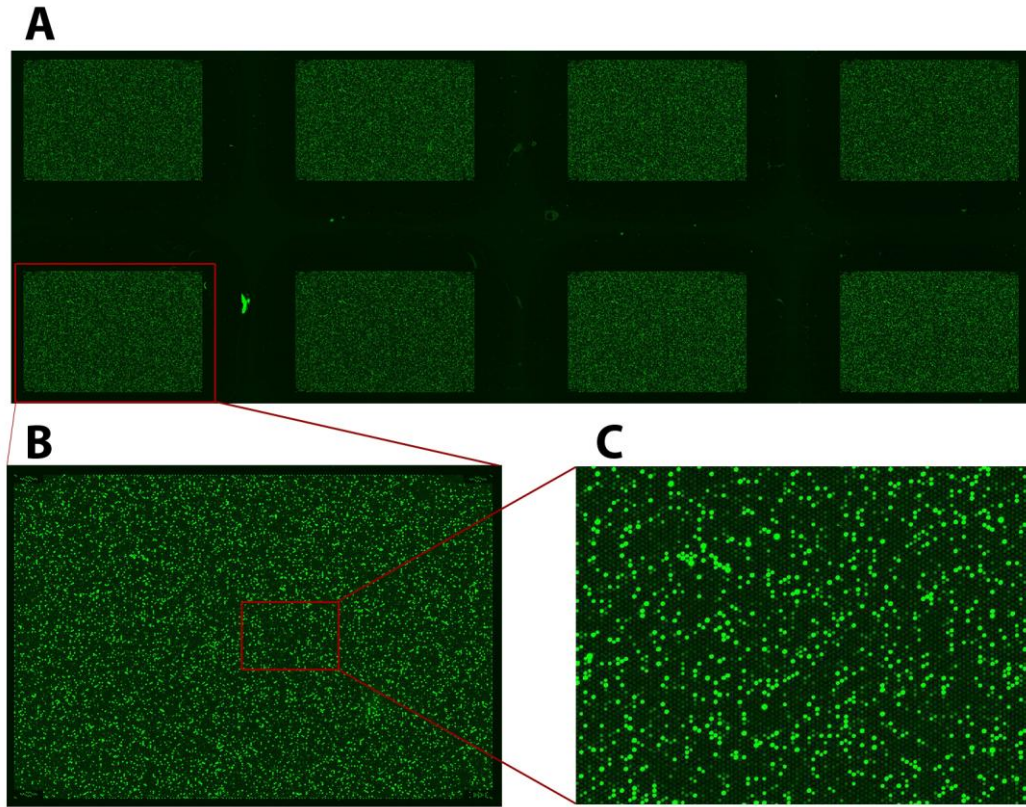
Larenks tümör ve normal dokulardaki miRNA profillerinin belirlenmesi amacıyla Agilent firması tarafından oldukça hassas bir teknoloji kullanılarak hazırlanan çipler kullanılarak miRNA mikrodizin çalışması yapıldı.

12 tümör ve 4 normal doku örneği olmak üzere toplamda 16 örnekte miRNA profillemesi yapıldı. Yapılan mikrodizin çalışmalarına ait mikroçip görüntüleri Şekil 42’ de verilmektedir.

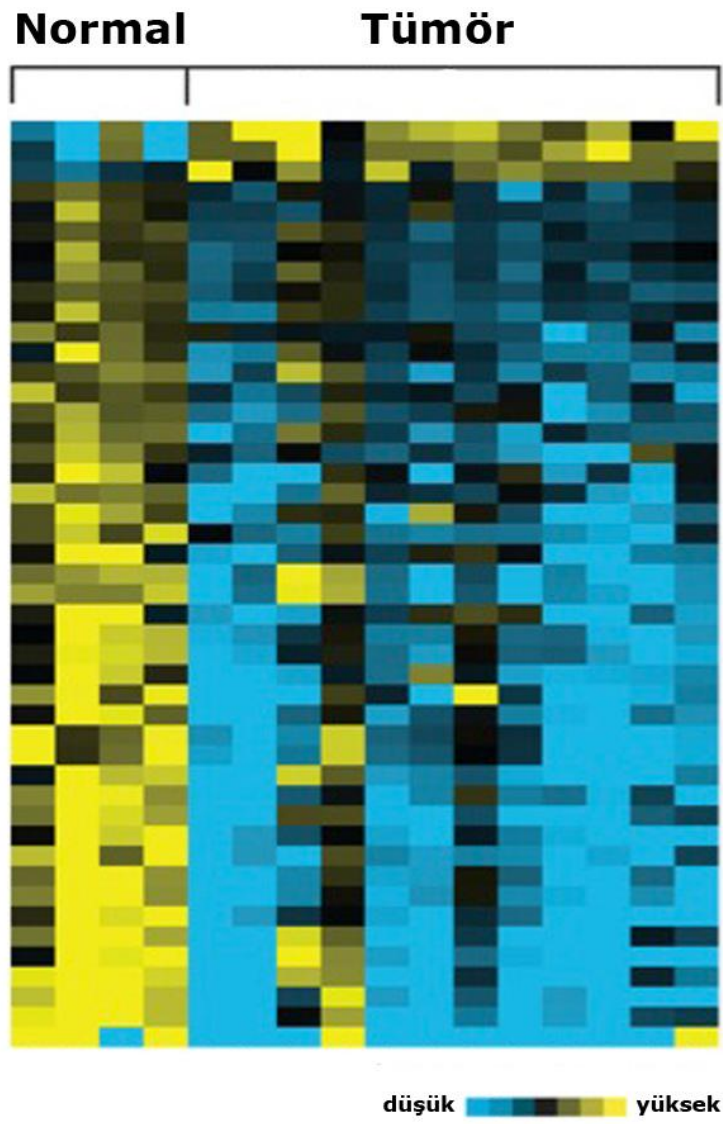
Çip üzerinde bulunan pozitif ve negatif kontrol noktaları beklenen şekilde hibridize olmuş ve kalite kontrol standartlarını sağladığı görüldü. “Feature Extraction v10.7.3.1 101 (Agilent Technologies, CA)” yazılımı kullanılarak taranmış çip görüntülerinden ham data çıkarıldı ve Bioconductor yazılımı kullanılarak ham datalar analiz edildi. Normalizasyon kuantil normalizasyonu yöntemi ile gerçekleştirildi. Log-2 dönüştürülmüş değerleri kullanılarak *p* değerleri (student t-test) ve kat değişim oranları hesaplandı. *p* değeri 0,05’ in altında olan kat değişimi 0,7’ den küçük ya da 1,4’ ten fazla olanlar anlamlı kabul edildi.

2 farklı miRNA’ nın (3 prob) ifade düzeyinin tümör dokusunda anlamlı olarak arttığı, 29 farklı miRNA’ nın (43 prob) ifade düzeyinin tümör dokusunda anlamlı olarak azaldığı görüldü. Tümör ve normal dokulara ait miRNA profilinin heat-map gösterimi Şekil 43’ te gösterilmektedir.

Kontrollere göre normalize edilen ve tümör dokusunda anlamlı olarak ifade düzeyi değişen miRNA’ lar Tablo 10’ da verilmektedir.



Şekil 42. Tümör ve normal dokularda mikroRNA mikrodizin görüntüsü. Bütün slayt (A), bakılan tüm mikroRNA' lar (B) ve seçilmiş bir bölgedeki mikroRNA' lar (C) görüntülenmiştir. mikroRNA' lar yeşil renkli floresan veren Cy3 boyası ile işaretlenmiştir.



Şekil 43. Tümör ve normal dokulara ait miRNA profili heat-map gösterimi.

Tablo 10. Tümör dokusunda deregülasyonu tespit edilen problemlerin listesi.

Probe İsmi	Sistematiik İsim	t-test (ikili)	Ort. Kat değışimi (+/-)
A_25_P00010976	hsa-miR-21-5p	2.646309203	0.002793086
A_25_P00010975	hsa-miR-21-5p	2.291113558	0.004931458
A_25_P00015689	hsa-miR-4257	1.687549614	0.003454427
A_25_P00010113	hsa-miR-487b	0.710932362	0.004908923
A_25_P00012070	hsa-miR-139-5p_v18.0	0.709651045	0.002297441
A_25_P00010182	hsa-miR-381-3p	0.707923127	0.002664346
A_25_P00015877	hsa-miR-4324	0.698359639	0.001488361
A_25_P00014342	hsa-miR-654-3p	0.693866328	0.005695699
A_25_P00012508	hsa-miR-495-3p	0.66608314	0.000131005
A_25_P00010583	hsa-miR-154-5p	0.632642268	0.001864957
A_25_P00010071	hsa-let-7b-5p	0.630274165	0.006754446
A_25_P00013427	hsa-miR-145-3p	0.599153286	0.004824236
A_25_P00010276	hsa-miR-376a-3p	0.581093858	0.007518275
A_25_P00010070	hsa-let-7b-5p	0.580215059	0.001428964
A_25_P00013484	hsa-miR-29c-5p	0.554943676	0.00171384
A_25_P00014853	hsa-miR-381-3p	0.547740146	0.001714404
A_25_P00010072	hsa-let-7c	0.528449083	0.002283656
A_25_P00010490	hsa-miR-150-5p	0.498590786	0.005619726
A_25_P00012013	hsa-miR-29a-3p	0.483104476	0.002495321
A_25_P00011999	hsa-miR-26a-5p	0.478993546	0.009750453
A_25_P00012395	hsa-miR-338-3p	0.460654976	0.000123211
A_25_P00012215	hsa-miR-126-3p	0.450663287	0.004903663
A_25_P00010275	hsa-miR-376a-3p	0.431539107	0.006344005
A_25_P00012317	hsa-miR-376c-3p	0.430984409	0.005206878
A_25_P00012216	hsa-miR-126-3p	0.429966682	0.008948519
A_25_P00013930	hsa-miR-140-5p	0.411201961	0.000192737
A_25_P00010607	hsa-miR-140-5p	0.405241594	0.000208727

A_25_P00012071	hsa-miR-139-5p_v18.0	0.401447947	0.001198089
A_25_P00010399	hsa-miR-204-5p	0.381803977	0.009009787
A_25_P00010130	hsa-miR-497-5p	0.376559552	0.000131878
A_25_P00012274	hsa-miR-29c-3p	0.35925273	0.002483125
A_25_P00012275	hsa-miR-29c-3p	0.347701268	0.002145101
A_25_P00012192	hsa-miR-145-5p	0.32535663	0.003343656
A_25_P00010769	hsa-miR-195-5p	0.325095044	0.000252474
A_25_P00015878	hsa-miR-4324	0.314008097	0.000450928
A_25_P00012176	hsa-miR-140-3p	0.313242278	2.4338E-05
A_25_P00012396	hsa-miR-338-3p	0.306216609	2.03246E-05
A_25_P00014866	hsa-miR-497-5p	0.300899631	0.000163981
A_25_P00010770	hsa-miR-195-5p	0.295104757	5.17015E-05
A_25_P00012177	hsa-miR-140-3p	0.285544797	3.11003E-05
A_25_P00010980	hsa-miR-125b-5p	0.276444363	0.00424114
A_25_P00012193	hsa-miR-145-5p	0.262940753	0.004228795
A_25_P00010979	hsa-miR-125b-5p	0.233138273	0.00299726
A_25_P00010475	hsa-miR-100-5p	0.227594315	0.000261999
A_25_P00010474	hsa-miR-100-5p	0.217633848	0.000989286
A_25_P00010986	hsa-miR-375	0.166933043	0.007732613

4.6. Larenks Tümör ve Normal Dokularında miR-145 İfade Düzeyi Analizi

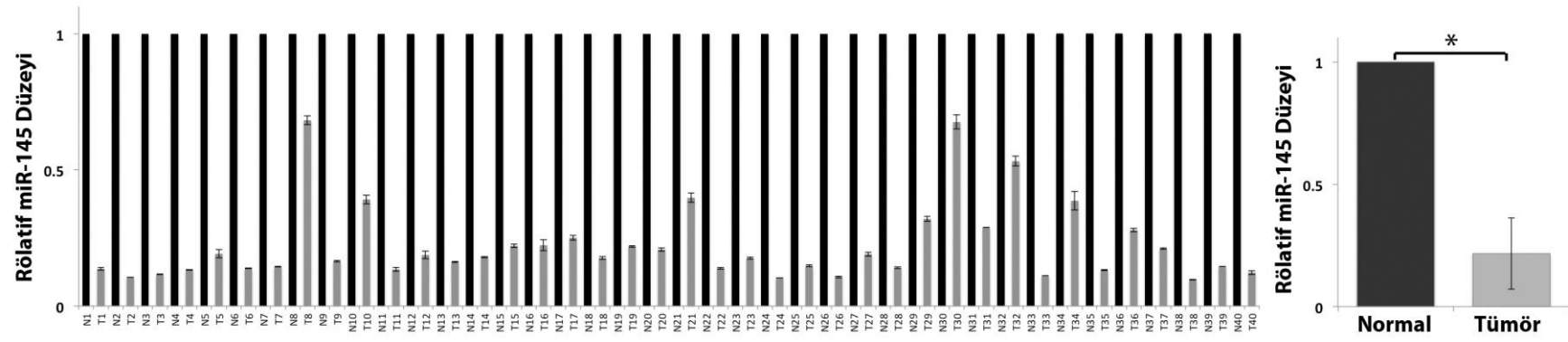
Mikrodizin çalışmasının sonuçları larenks tümör dokularında miR-145 ifadesinin anlamlı olarak azaldığını gösterdi. 2 ayrı prob için miR-145 ifadesinin 2 kattan fazla azaldığı bulundu (Şekil 44).

Bunun üzerine daha geniş bir örnek grubunda bu değişimi doğrulamak için 40 adet tümör ve 40 adet normal larenks dokusunda qRT-PCR ile miR-145 ifade analizi yapıldı. miRNA cDNA sentez prosedürleri “Taqman Reverse Transcriptase Kit”leri kullanılarak ve bu kitlerde üretici firmanın verdiği bilgilere göre gerçekleştirildi ve kantitatif analiz gerçek-zamanlı PZR kullanılarak yapıldı. Deneyler 2 ya da 3 tekrarlı olarak uygulandı. Küçük nükleer RNA’ lardan RNU43 kontrol olarak kullanıldı. Elde edilen sinyaller kontrol sinyallerine oranla normalize edildi ve rölatif ifade değerleri delta-delta-Ct yöntemi kullanılarak hesaplandı.

İncelenen tüm tümör dokusu örneklerinde miR-145 ifade düzeyinin aynı hastalardan temin edilen normal doku örneklerine göre anlamlı olarak azaldığı ve ortalama ifade düzeylerinin normal dokularda 1, tümör dokusunda 0.21 ± 0.14 olduğu tespit edildi (Şekil 45, $p < 0.0001$).



Şekil 44. Larenks tümör ve normal doku örneklerinde miR-145 ifade düzeylerinin heat-map gösterimi.

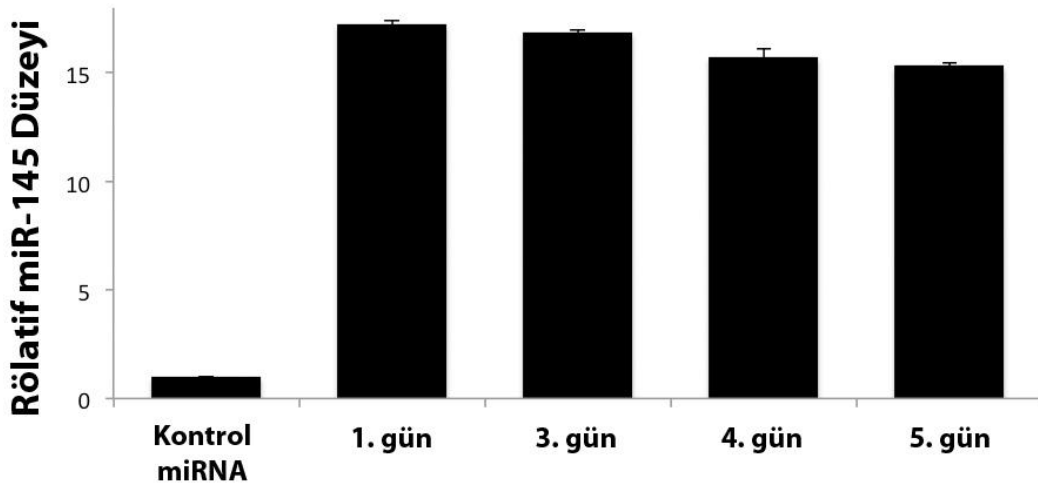


Şekil 45. Larenks tümör ve normal doku örneklerinde miR-145 ifade düzeyleri.

4.7. miR-145' in Hep2 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkisi

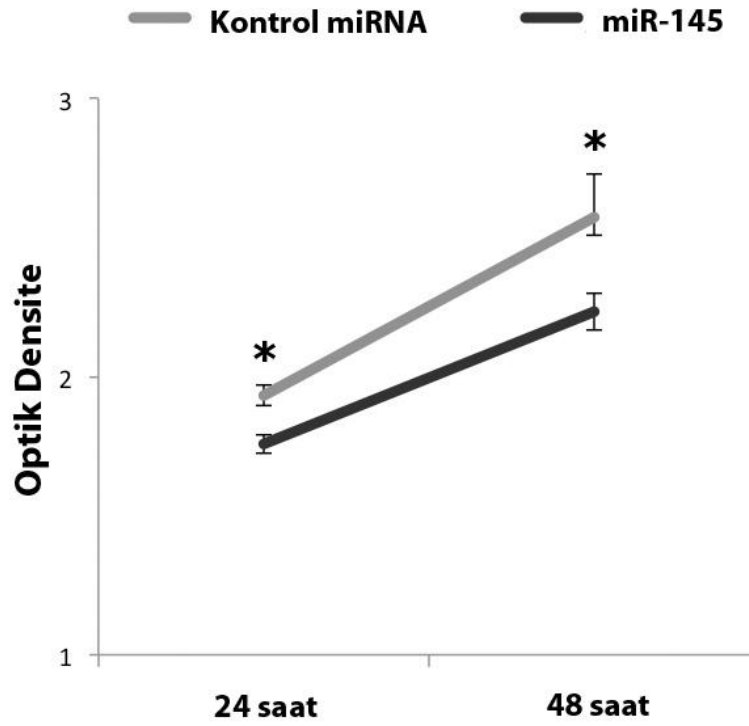
miR-145 ya da kontrol miRNA ile transfeke edilen Hep-2 hücrelerinin proliferasyon kapasiteleri MTS assay kullanılarak ölçüldü.

Öncelikle miR-145 transfeksiyonunun verimliliği ve miR-145 ekspresyonunun stabilitesi gerçek zamanlı PZR ile kontrol edildi. Olgun miR-145' in transfeksiyon sonrasında Hep-2 hücrelerinde verimli bir şekilde ifade edildiği görülürken, kontrol miR-145' le transfeke edilen Hep-2 hücrelerinde miR-145 ifadesinin artmadığı görüldü. Ayrıca, transfeksiyondan 5 gün sonra bile miR-145' le transfeke edilen Hep-2 hücrelerinde miR-145 ifade düzeyinin yüksek kaldığı tespit edildi (Şekil 46). Bu da miR-145 overekspresyonunun etkilerinin uzun periyotlarda analiz edilebilmesine imkan sağlamaktadır.



Şekil 46. Hep-2 Hücrelerinde miR-145 transfeksiyonu sonrasında 1., 3., 4., ve 5. günlerde miR-145 ifade düzeyi.

Hep-2 hücrelerinde ektopik miR-145 ekspresyonunun hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde, miR-145 ifadesinin artmasının hücre proliferasyonunda anlamlı bir azalmaya yol açtığı görüldü. Hep-2 hücre canlılığı hem 24. saatte hem de 48. saate azalmıştır (Şekil 47).



Şekil 47. miR-145' in Hep-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.

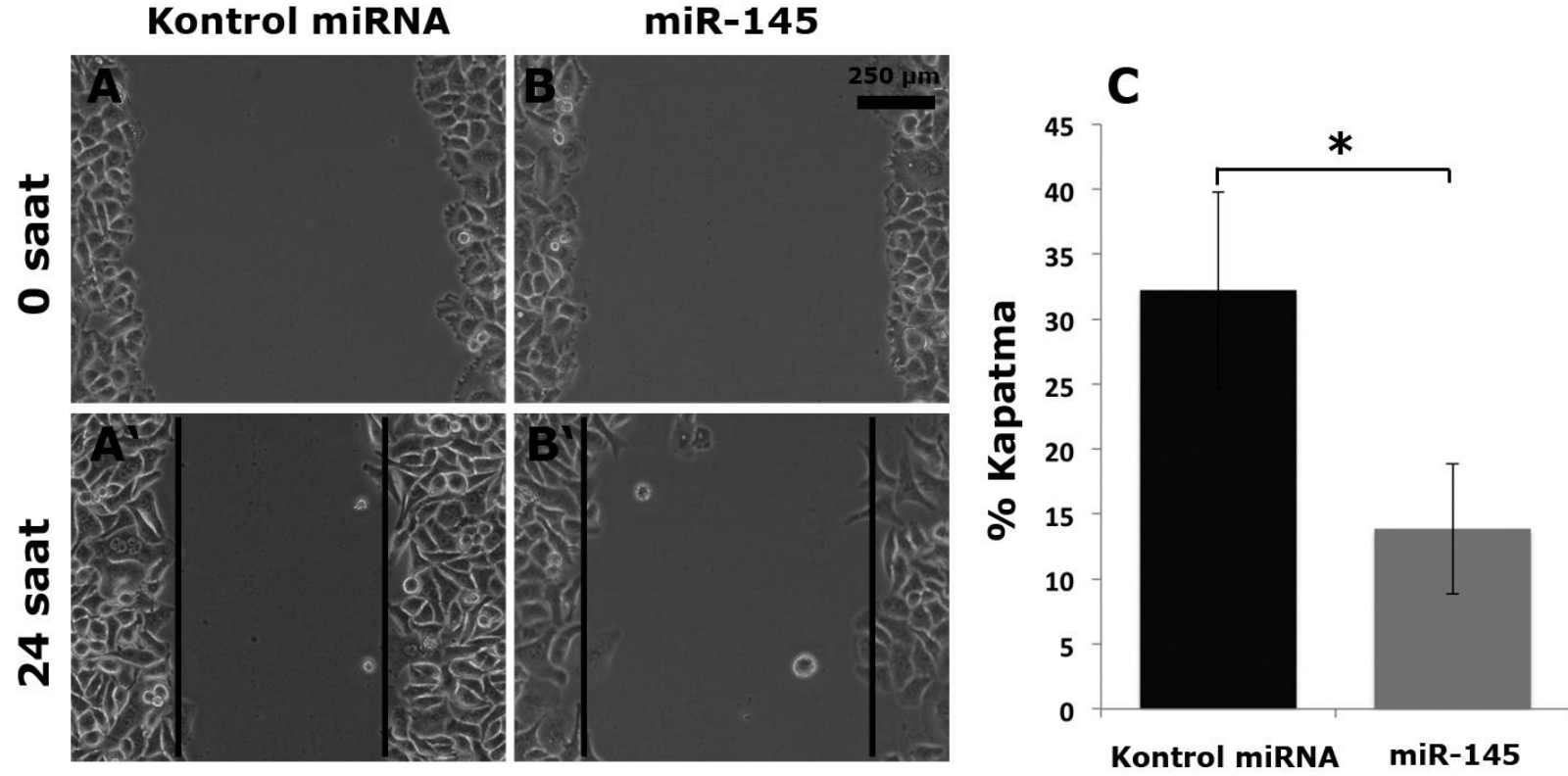
4.8. miR-145' in Hep2 Hücrelerinde Hücre Göçü Üzerine Etkisi

miR-145' in larenks kanser hücrelerinin hücre göçüne etkisinin araştırılması için kontrol miRNA ve miR-145 ile transfeke edilmiş hücrelere öncelikle “Scratch (yara) Assay” yapıldı.

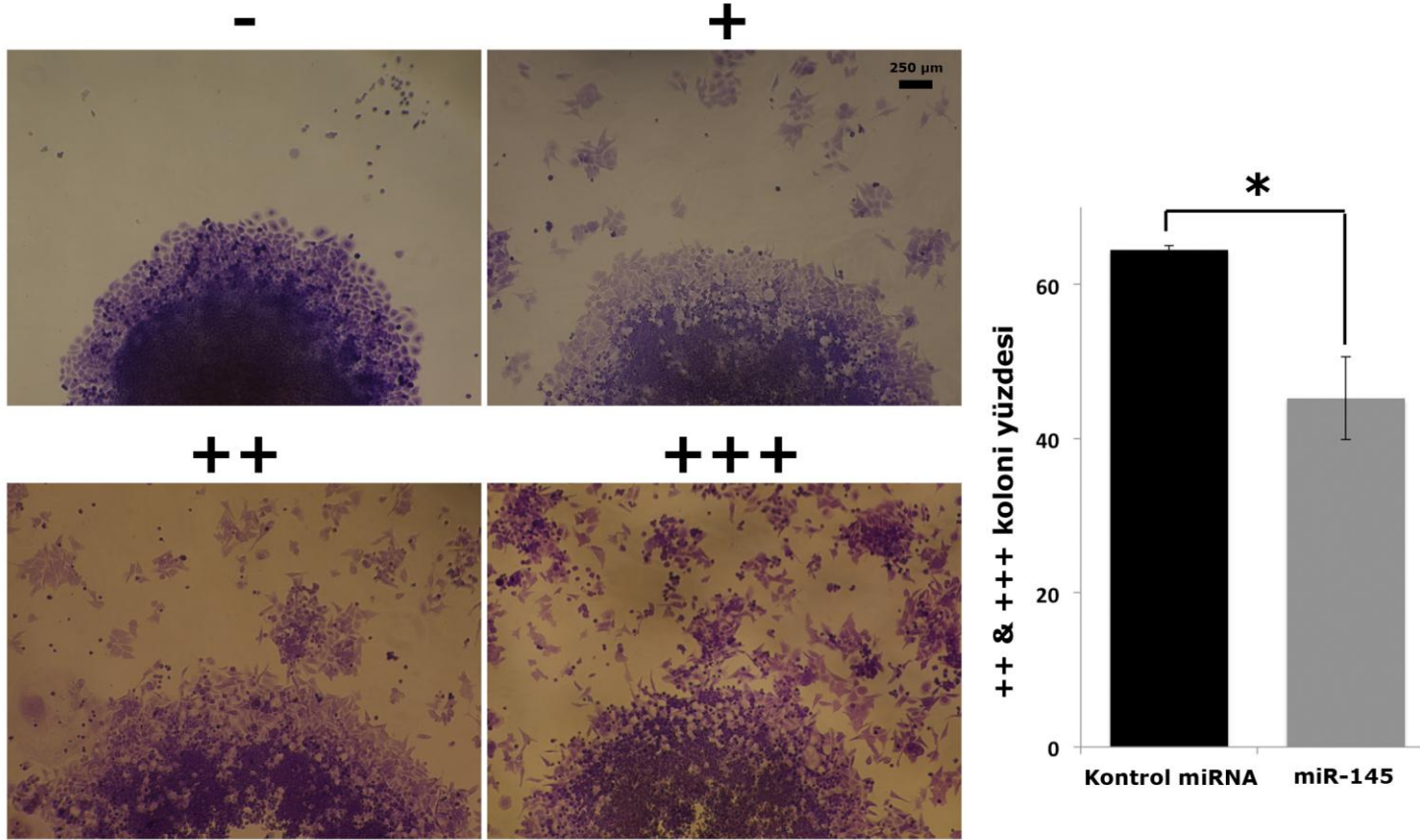
Yara assayı miR-145' le transfeke edilmiş Hep-2 hücrelerinin hücre göçü potansiyellerinin kontrol miRNA ile transfeke edilen hücrelere göre azaldığı görüldü. Hücre göçü inhibisyonunun kantitatif değerlendirmesi için hücrelerin oluşturulan yaraları % kapatma hızları ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçlar kontrol miRNA ile transfeke edilen hücrelerde yaranın %30 oranında kapatıldığını gösterirken, miR-145 ile transfeke edilen hücrelerin yaranın sadece %15' ini kapattığı görüldü (Şekil 48, $p<0.001$).

miR-145' in Hep-2 hücrelerinin hücre göçü kapasitesini inhibe etme potansiyelini doğrulamak için tek koloni göçü deneyi yapıldı. MiR-145 ya da kontrol miRNA ile transfeke edilmiş olan hücreler 96 kuyucuklu platelere kuyucuk başına tek hücre düşecek şekilde ekildi ve iki hafta sonunda oluşan kolonilerin göç potansiyelleri değerlendirildi. Hiç göç etmemiş ve çok az göç etmiş koloniler sırasıyla “-” ve “+” olarak sınıflandırıldı. Yüksek göç potansiyeli olan koloniler ise göç eden hücre sayısı dikkate alınarak “++” ya da “+++” olarak kategorize edildi (Şekil 49). Oluşan koloniler göç etme potansiyelleri açısından değerlendirildiğinde “++” ve “+++” fenotipine sahip kolonilerin yüzdesi miR-145 ile transfeke edilmiş hücrelerde kontrol hücrelere kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 49, $p=0.02$).

Sonuç olarak yara assayı ve tek koloni göç assayı miR-145' in Hep-2 hücrelerinin hücre göçü potansiyelini inhibe ettiğini gösterdi.



Şekil 48. miR-145' in Hep-2 hücrelerinin göçü üzerine etkisi (Yara assayı).



Şekil 49. MiR-145' in Hep-2 hücrelerinin göçü üzerine etkisi (Tek koloni göçü assayı).

4.9. miR-145' in Hep2 Hücrelerinde Epitelyal Mezenkimal Geçiş Üzerine Etkisi

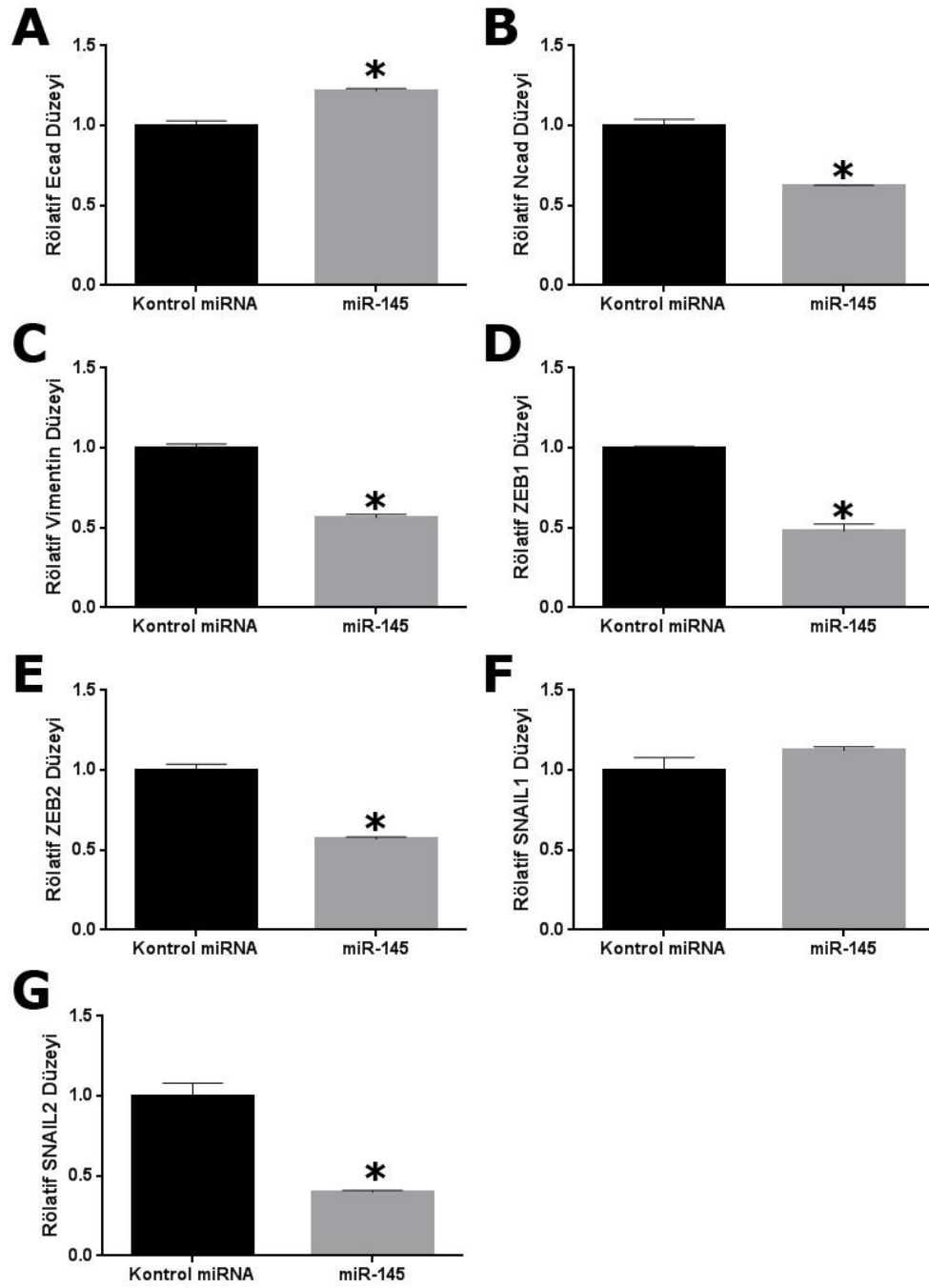
MiR-145 ile transfekte edilen Hep-2 hücrelerinde hücre göçü inhibisyonuna sebep olan mekanizmaların araştırılması için epitelyal mezenkimal (EMT) geçiş işaretçilerinin ifade düzeyleri qRT-PCR ile araştırıldı.

Yapılan analiz sonucunda Epitelyal hücre işaretçisi olan E-kaderin ifadesinin miR-145' le transfekte edilmiş Hep-2 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı olarak artış gösterdiği bulundu (Şekil 50A, $p<0,05$).

Bunun aksine mezenkimal hücre işaretçilerinden olan N-kaderin (Şekil 50B, $p<0,05$), Vimentin (Şekil 50C, $p<0,01$), ZEB1 (Şekil 50D, $p<0,01$), ZEB2 (Şekil 50E, $p<0,05$) ve SNAIL2 (Şekil 50G, $p<0,05$) ifadelerinin ise anlamlı olarak azaldığı görüldü.

Yine bir mezenkimal hücre işaretçisi olan SNAIL1 ifade düzeyinin ise değişmediği bulundu (Şekil 50F, $p=0,40$).

Sonuç olarak, miR-145' in Hep-2 hücrelerindeki hücre göçü inhibisyonuna sebep olan mekanizmalardan birinin mezenkimal epitelyal geçişe (MET) yol açması olduğu gösterildi.



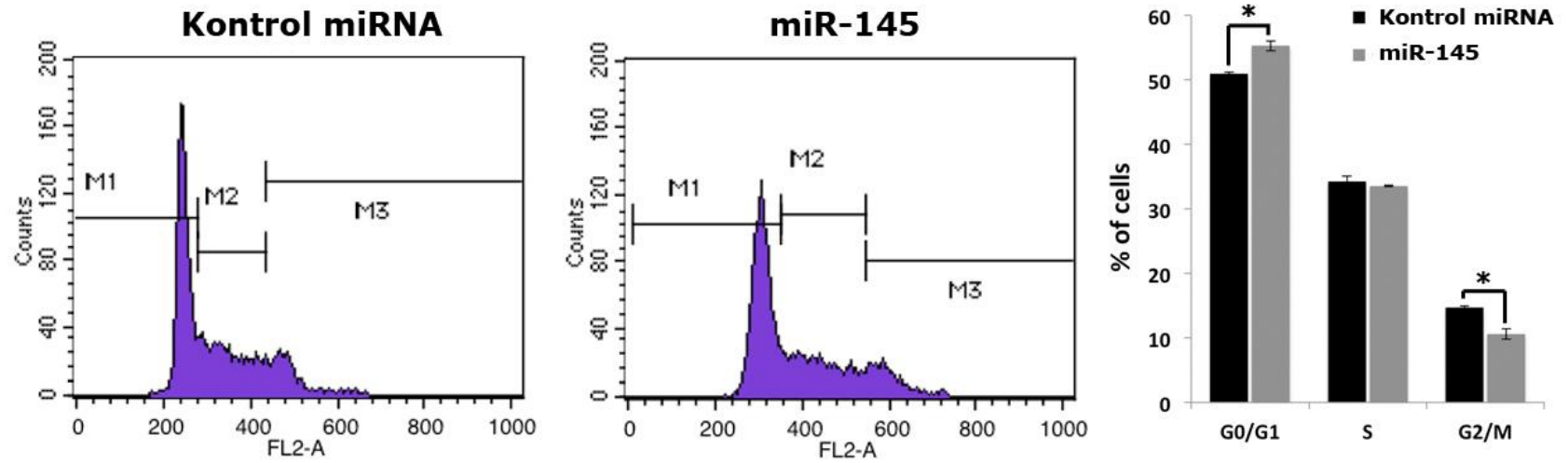
Şekil 50. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde EMT işaretçilerine mRNA düzeyinde etkisi.

4.10. miR-145' in Hep2 Hücrelerinde Hücre Siklüsü ve Apoptoz Üzerine Etkisi

MiR-145 ile transfeke edilen Hep-2 hücrelerinde proliferasyon inhibisyonuna sebep olan mekanizmaların araştırılması ve hücre siklüsü dağılımındaki değişimlerin değerlendirilmesi için hücre siklüsü ve apoptoz analizleri yapıldı.

Hücre siklüsü analizi için, miR-145 ve kontrol miRNA transfeksiyonundan 24 saat sonra hücreler toplandı ve propidium iodide ile boyanarak akım sitometri cihazında analiz edildi.

Sonuçlar miR-145 ile transfeke edilen hücrelerde G0/G1 fazındaki hücre sayısının anlamlı bir şekilde artış gösterdiği ($p=0.017$), bunun yanı sıra G2/M fazındaki hücrelerde ise azalma görüldüğü ($p=0.02$) tespit edildi (Şekil 51).

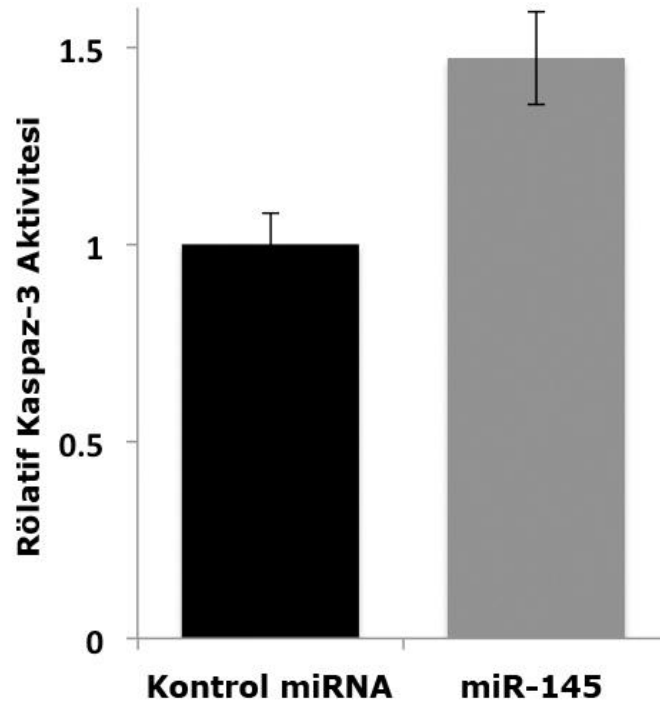


Şekil 51. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde hücre siklüsü üzerine etkisi.

Apoptoz analizi için ise Hep-2 hücreleri kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfekte edildikten sonra Kaspaz-3 aktivitesi ölçülerek değerlendirildi. Kaspaz-3 aktivitesi erken apoptotik hücrelerin artması neticesinde artış gösterir.

Hücrelerin apoptotik aktiviteleri kontrol miRNA ya da takip eden 24. saatte kolorimetrik “CaspACE Assay System, Colorimetric (Promega)” kiti kullanılarak ölçüldü.

Sonuçlar miR-145 ile transfekte edilen hücrelerde Kaspaz-3 aktivitesinin kontrol hücrelerine oranla 1,5 kat arttığını gösterdi (Şekil 52, $p<0.05$).



Şekil 52. miR-145’ in Hep-2 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi.

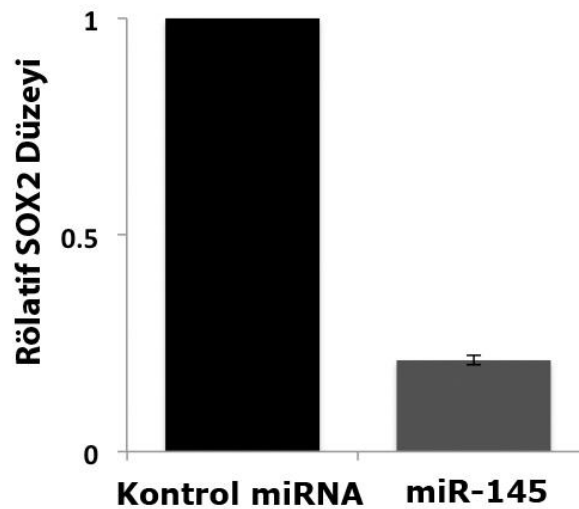
Sonuç olarak, hücre siklusu ve apoptoz assayleri miR-145’ le transfekte olan Hep-2 hücrelerinde görülen proliferatif inhibisyonunda hem hücre siklusu arrestinin hem de apoptoz indüklenmesinin rol aldığı tespit edilmiş oldu.

4.11. miR-145' in Hedef Genlerinden SOX2' nin Hep2 Hücrelerinde mRNA Düzeyinde İfade Analizi

Kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfekte edilen Hep-2 hücrelerinden 24 saat sonra izolasyonu yapılan RNA örnekleri hedef gen ekspresyon seviyesi analizi için kullanıldı. 1000 ng RNA kullanılarak cDNA sentezi “Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit” kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre yapıldı. Ekspresyon analizi real-time PCR SYBR Green metodu kullanılarak 2 ya da 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Optimizasyon çalışmaları hem β -aktin primerleri için hem de SOX2 primerleri için optimum bağlanma (annealing) sıcaklığının 60°C olduğunu gösterdi. qRT-PCR doğrulaması yapılan gen ifade değişim değerleri için artış ve azalışlar delta-delta-Ct analizi ile belirlendi.

Yapılan analiz sonucunda miR-145' in diğer kanser çeşitlerinde valide edilmiş hedeflerinden olan SOX2 ifadesinin miR-145' le transfekte edilmiş Hep-2 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı azalış gösterdiği bulundu (Şekil 53, $p < 0.001$).

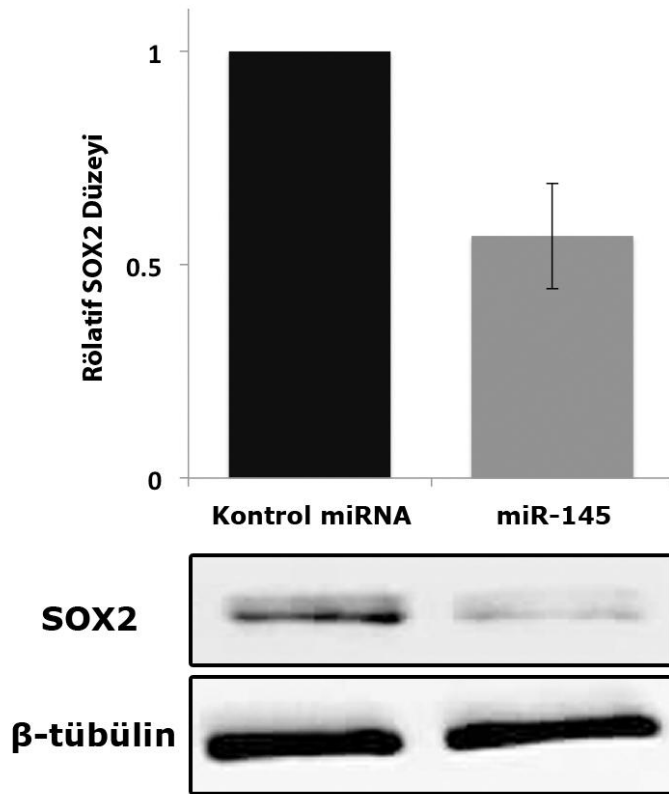


Şekil 53. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde SOX2 mRNA düzeyi üzerine etkisi.

4.12. miR-145' in Hedef Genlerinden SOX2'nin Hep2 Hücrelerinde Protein Düzeyinde İfade Analizi

miR-145 transfeksiyonu sonrasında SOX2 düzeyinin protein seviyesinde de azaldığını göstermek için western blot analizi yapıldı. Hep-2 hücreleri miR-145 ile transfekte edildikten 48 saat sonra hücreler RIPA lysis buffer içerisinde parçalanarak protein izolasyon yapılarak SOX2 seviyesi incelendi.

qRT-PCR sonucu ile paralel olarak western blot sonucu da SOX2 ifadesinin protein düzeyinde miR-145 ile transfekte edilmiş Hep-2 hücrelerinde anlamlı olarak azaldığını gösterdi (Şekil 54, $p < 0.05$).

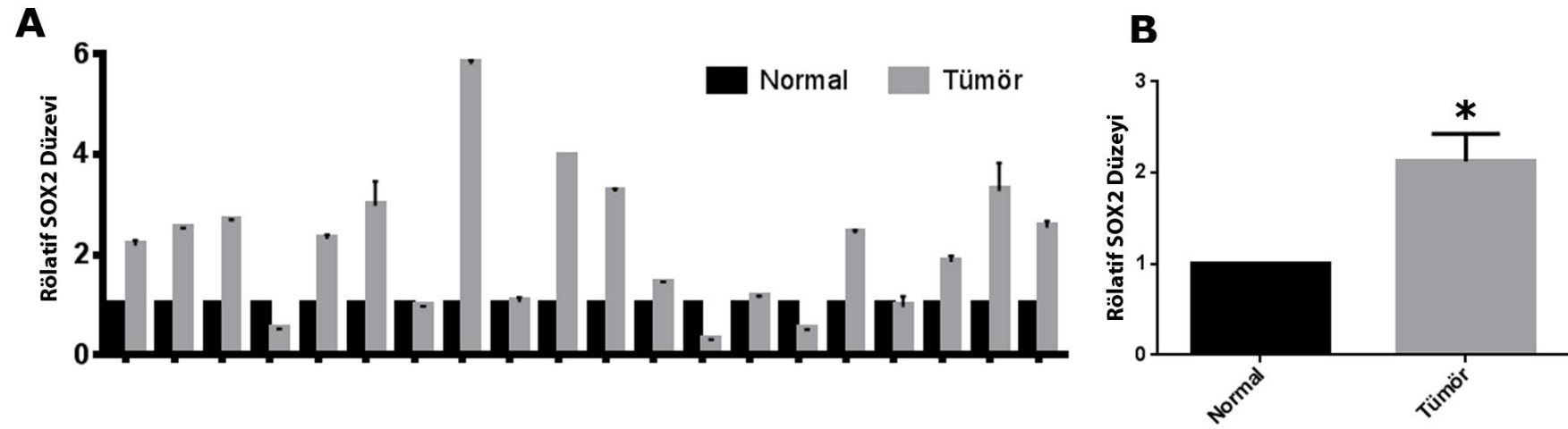


Şekil 54. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde SOX2 protein düzeyi üzerine etkisi.

4.13. Larenks Tümör ve Normal Dokularında SOX2 İfade Düzeyi

Larenks kanseri tümör dokusunda normal doku örneklerine göre miR-145 düzeyi anlamlı olarak azaldığı için miR-145' in hedefi olan SOX2 ifade düzeyleri 20 çift normal-tümör dokusunda gerçek zamanlı PZR ile araştırıldı.

Sonuçlar tümör dokularının çoğunda normal dokularla karşılaştırıldığında SOX2 ifade düzeyinin attığını ortaya koydu (Şekil 55A). β -aktin' e normalize edilen SOX2 mRNA ifade düzeyinin tümör dokularında ortalama $2,12 \pm 0,30$ kat artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 55B, $p < 0.001$).

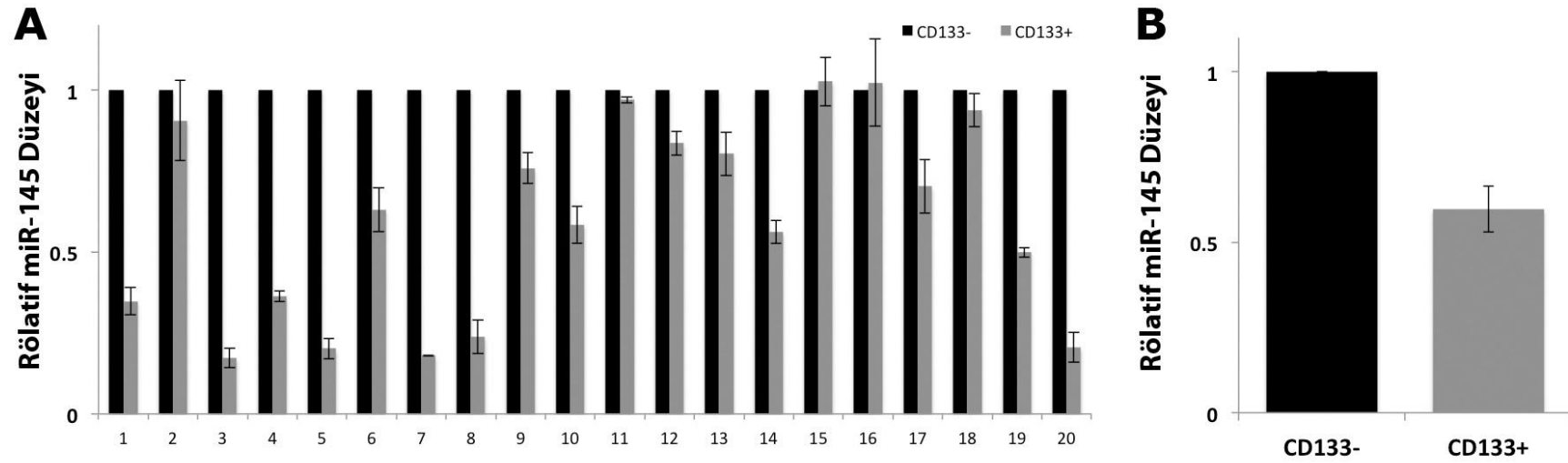


Şekil 55. (A) Tümör ve normal hücrelerde SOX2 ifade düzeyi. (B) Tümör ve normal dokularda ortalama SOX2 ifade düzeyi.

4.14. CD133+ ve CD133- Larenks Kanseri Hücrelerinde miR-145 İfade Düzeyi

miR-145' in kök hücre karakteristiği üzerindeki etkilerinin araştırılması için de öncelikle 20 çift CD133+ ve CD133- hücre örneklerinde miR-145 ifade düzeyi araştırıldı. Sonuçlar CD133+ hücrelerde CD133- hücrelerle karşılaştırıldığında miR-145 ifade düzeyinin azaldığını ortaya koydu (Şekil 56A). RNU43' e normalize edilen miR-145 ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde ortalama $0,59 \pm 0,06$ kat azaldığı tespit edildi (Şekil 56B, $p < 0.0001$).

Kanser kök hücreleri açısından zenginleştğini gösterdiğimiz CD133+ hücrelerde ifade düzeyinin azalmış olması, miR-145' in kanser kök hücrelerin karakteristikleri üzerinde etkisi olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 56. (A) CD133+ ve CD133- hücre örneklerinde miR-145 ifade düzeyi. (B) CD133+ ve CD133- hücre örneklerinde ortalama miR-145 ifade düzeyi.

4.15. miR-145' in Hep2 Hücrelerinde Kök Hücre İşaretçilerinin İfade Düzeyleri Üzerine Etkisi

CD133+ hücrelerde miR-145 ifade düzeyinin azaldığının gösterilmesinden sonra miR-145' in Hep-2 hücrelerinde kök hücre karakteristiği üzerindeki etkileri incelendi. Öncelikle miR-145 transfeksiyonu sonrasında kök hücre işaretçilerinden SOX2, OCT4, KLF4 ve de ABCG2 ifade düzeyleri qRT-PCR ile analiz edildi.

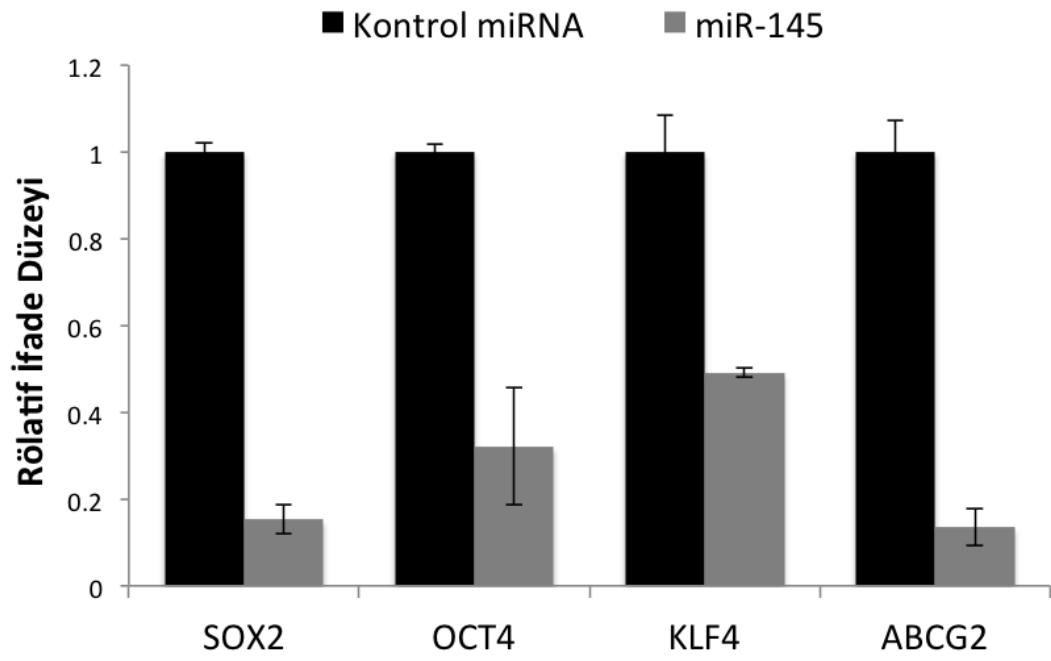
Yapılan analizler SOX2 ifadesinin miR-145' le transfekte edilmiş Hep-2 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı azalış gösterdiği ve ortalama $0,15 \pm 0,03$ kat değiştiği bulundu (Şekil 57, $p<0.001$).

Bir diğer kök hücre işaretçisi olan OCT4 ifade düzeyinin miR-145' le transfekte edilmiş Hep-2 hücrelerinde ortalama $0,32 \pm 0,13$ kata düştüğü gösterildi (Şekil 57, $p<0.01$).

Kök hücre işaretçilerinden KLF4 ifade düzeyinin ise miR-145' le transfekte edilmiş Hep-2 hücrelerinde ortalama $0,49 \pm 0,01$ kata gerilediği bulundu (Şekil 57, $p<0.05$).

Kök hücre işaretçileri olarak bilinen aynı zamanda tümörlerde kemorezistans ile ilişkilendirilmiş önemli bir faktör olan ABCG2 ifade düzeyinin de miR-145' le transfekte edilmiş Hep-2 hücrelerinde ortalama $0,13 \pm 0,04$ kata düştüğü gösterildi (Şekil 57, $p<0.001$).

Bu sonuçlar miR-145' in Hep-2 hücre popülasyonunda kanser kök hücre karakteristiğini inhibe ettiğine işaret etmektedir.



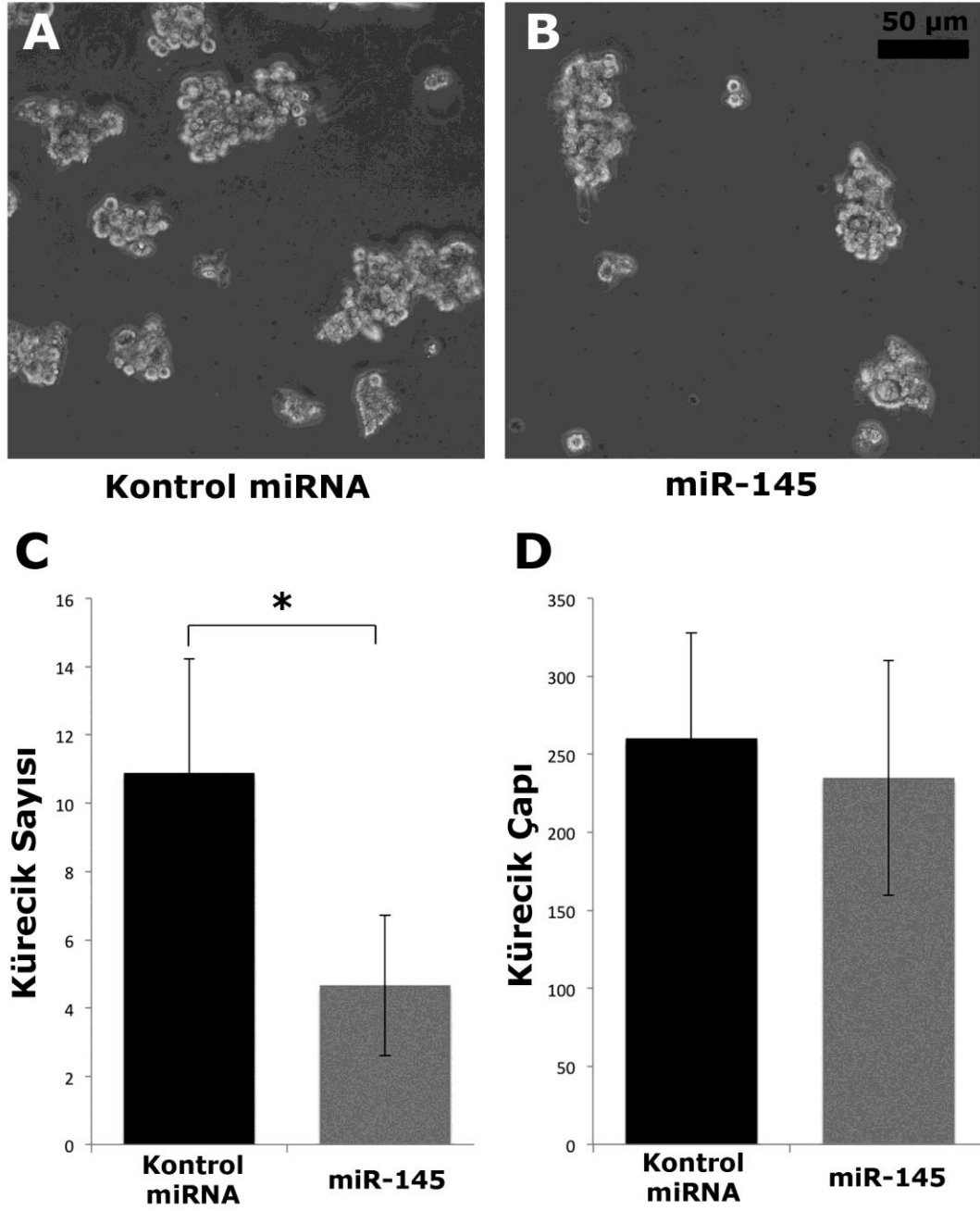
Şekil 57. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde SOX2, OCT4, KLF4 ve ABCG2 mRNA düzeyi üzerine etkisi

4.16. miR-145' in Hep-2 Hücrelerinde Kendini Yenileme Kapasitesi Üzerine Etkisi

Kanser kök hücrelerinin kendini yenileme kapasiteleri hücrelerin ultra-düşük bağlanma kapasiteli platelerde kök hücre besi yeri içerisinde kültür edilerek kürecik oluşumunun değerlendirilmesi ile ölçülebilmektedir. miR-145 'in Hep-2 hücre popülasyonu içerisindeki kök hücrelerin kendini yenileyebilme kapasiteleri üzerindeki etkisi kürecik oluşturma assayı yapılarak değerlendirildi.

Şekil 58A ve 58B' de görüldüğü gibi hem kontrol miRNA hem de miR-145 ile transfekte edilen ve ultra-düşük bağlanma kapasiteli platelerde kültür edilen Hep-2 hücrelerinin kürecik oluşturduğu görüldü. Bu Hep-2 hücre popülasyonunda kendini yenileyebilen hücrelerinin varlığını doğrulamıştır. Fakat, miR-145 ile transfekte edilen Hep-2 hücrelerinin yaklaşık 2,5 kat daha az kürecik oluşturduğu bulundu (Şekil 58C, $p<0,001$). Oluşan küreciklerin çapları değerlendirildiğinde ise iki grup arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi (Şekil 58D, $p=0,27$).

Bu sonuç miR-145' in kanser kök hücrelerinin kendini yenileme kapasitelerini inhibe ettiğini ortaya koydu.



Şekil 58. Kontrol miRNA (A) ya da miR-145 (B) ile transfekte edilen Hep-2 hücrelerinde oluşan kürecikler. Oluşan küreciklerin sayısı (C) ve çapları (D).

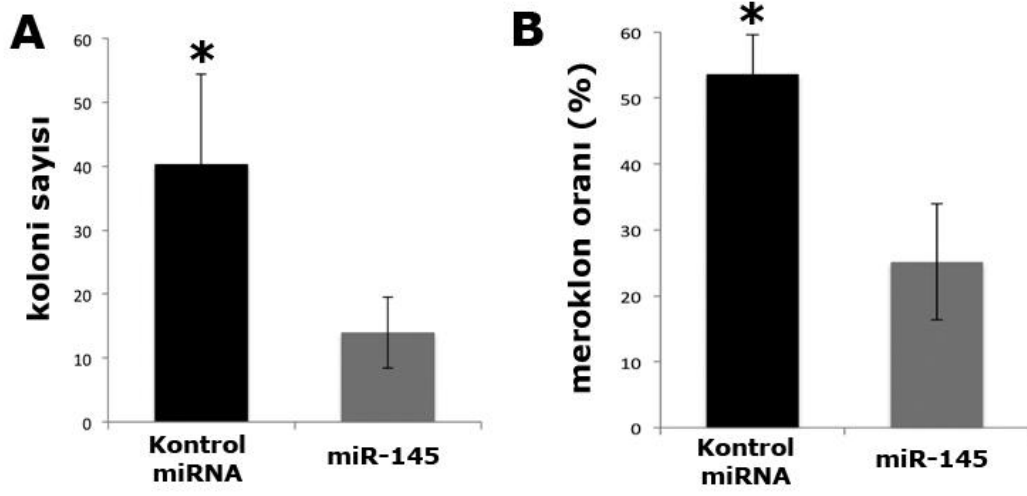
miR-145' in Hep-2 Hücrelerinde Koloni Oluşumu ve Koloni Morfolojisi Üzerine Etkisi

miR-145 'in Hep-2 hücre popülasyonu içerisindeki kök hücrelerin kendini yenileyebilme kapasiteleri üzerindeki etkisi tek hücre klonlama assayi yapılarak da değerlendirildi.

Öncelikle kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfekte edilen ve 33 mm platelere plate başına 100 hücre düşecek şekilde ekilen (3 tekrarlı) Hep-2 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri karşılaştırıldı. Her ki grupta da ekilen hücrelerin bir kısmı ölürken, kalan hücreler 3-4. günden itibaren koloni oluşturmaya başladılar ve yaklaşık birinci haftanın sonundan itibaren birbirlerinden morfolojik olarak ayırt edilebilir duruma geldiler. 14 gün sonunda miR-145 ile transfekte edilen Hep-2 hücreleri ortalama $40,33 \pm 12,66$ koloni oluşurken, kontrol miRNA ile transfekte edilen Hep-2 hücrelerinde $14,00 \pm 5,56$ koloni oluşumu gözlemlendi. Sonuç olarak, miR-145'in Hep-2 hücrelerinde koloni oluşturma kapasitesini azalttığı tespit edildi (Şekil 59C, $p < 0,05$).

Keratinositlerde yapılan ilk çalışmalarda yapılan tanımlamalara göre hücre kolonileri holoklonlar, meroklonlar ve paraklonlar olarak sınıflandırılabilir (122). Son dönemde yapılan çalışmalar kanser kök hücrelerinin normal kök hücreler tarafından oluşturulan hücre koloni morfolojilerine benzer morfolojide koloniler oluşturduğunu göstermiştir (123-126). Homojen, küçük ve sıkı hücrelerden oluşan holoklon her iki grupta da oluşmazken, dağınık olarak bulunan ve nispeten büyük hücrelerden oluşan paraklonlar (Şekil 59B) ve ara morfolojiye sahip meroklonların (Şekil 59A) varlığı gözlemlendi. Oluşan mero ve paraklonların sayısı değerlendirildiğinde meroklonların oluşan toplam koloniler içerisindeki yüzdesi kontrol miRNA ile transfekte edilen Hep-2 hücrelerinde $\% 53,61 \pm 6,00$ olurken, miR-145 ile transfekte edilen Hep-2 hücrelerinde bu yüzde sadece $\% 25,13 \pm 8,77$ de kalmıştır (Şekil 59D, $p = 0,01$).

Elde edilen bu sonuçlar miR-145'in Hep-2 hücrelerinde kanser kök hücrelerini inhibe ettiği savını güçlendirmektedir.



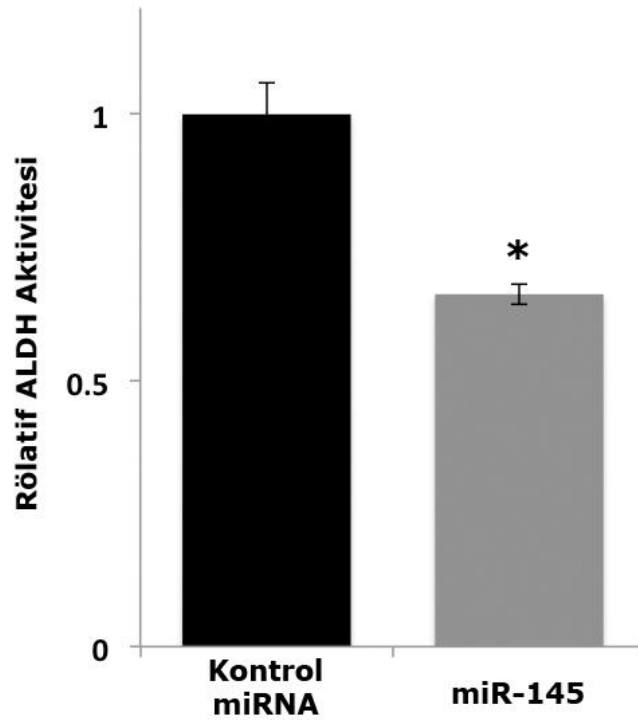
Şekil 59. Kontrol miRNA ya da miR-145 ile transfekte edilen Hep-2 hücrelerinde oluşan kolonilerin sayısı (A) ve meroklonların tüm koloniler içerisindeki yüzdesi (B).

4.17. miR-145' in Hep2 Hücrelerinde ALDH Aktivitesi Üzerine Etkisi

MiR-145 ile transfeke edilen Hep-2 hücreleri kanser kök hücre işaretçisi olan ALDH aktivitesi açısından değerlendirildi.

ALDH aktivitesi analizi için, miR-145 ve kontrol miRNA transfeksiyonundan 24 saat sonra hücreler toplandı ve üretici firmanın protokolü takip edilerek kolorimetrik bir yöntemle analiz edildi.

Sonuçlar miR-145 ile transfeke edilen hücrelerde ALDH aktivitesinin kontrol hücrelerine oranla 1,5 kat azaldığını gösterdi (Şekil 60, $p < 0.05$). Bu da miR-145' in Hep-2 hücrelerinde kanser kök hücrelerini baskılayıcı role sahip olduğunu doğruladı.



Şekil 60. miR-145' in Hep-2 hücrelerinde ALDH aktivitesi üzerine etkisi.

5. TARTIŞMA

Larenks kanserleri özellikle erkeklerde sık görülen kanser türlerinden olup baş-boyun kanserlerinin %45' ini oluşturur. Larenksin malinitelerinin çoğunluğu epitelyal kökenli olan yassı hücreli kanserlerdir (%95-98) (36). LSHK' nın insidansı dünya genelinde son 30 yılda düşüş trendi göstermektedir, ne var ki ölüm oranlarında görülen düşüş yeni vaka sayısındaki düşüş kadar güçlü olmamıştır (11). Önümüzdeki yıllarda da özellikle ülkemizde larenks kanseri insidansının ve larenks kanseri kaynaklı mortalitenin artma eğiliminde olacağı tahmin edilmektedir (11). Ayrıca erkek:kadın oranı 10:1 olmakla birlikte son zamanlarda kadınlarda sigara içimindeki artış, Avrupa ve ABD' deki kadınlardaki larenks kanseri insidansında artışa yol açmış ve son zamanlarda oranlar 5-6:1 şeklinde değiştiği konusunda bir çok çalışma mevcuttur (127-129).

Larenks kanserinin tedavisine yönelik terapötik metotlar da larenks kanserinin kompleks arka planından ötürü çok sınırlı kalmaktadır. Erken ve metastaz yapmamış larenks kanseri vakalarının tedavisine yönelik tedavi uygulamalarının geliştirilmesi için oldukça önemli mesafeler katedilmiş olsa da, ileri evre larenks kanser vakalarının tedavisine yönelik yaklaşımların geliştirilmesi halen çözümlenmesi gereken önemli bir ihtiyaçtır.

Ayrıca, larenks kanserinde larenjektomi işlemleri sonrasında hastalar kanserin tekrarlama sorunu ile karşılaşmaktadırlar. Bu, larenks kanserinde en büyük sorunlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanserın tekrarlamaından sorumlu hücrelerin total kanser dokusu içerisinde küçük bir grup hücre olmasından ötürü tekrarlayan hücrelerdeki (recurrent cells) genetik değişikliklerin araştırıldığı araştırmalar çok sınırlıdır.

Tümör başlatan bu kök hücre benzeri hücreler iyi anlaşılabilirse, hastaların yaşam süresinin artırılmasını sağlayacak daha iyi ve daha etkili destekleyici terapilerin geliştirilmesi mümkün olacaktır. Dolayısıyla larenks kanseri patogenezinin altında yatan mekanizmaların anlaşılması, yeni ve etkili terapötik yaklaşımların geliştirilmesi adına çok acil bir gerekliliktir.

Günümüzde larenks karsinogenezinde miRNA' ların rol aldığını gösteren çok sayıda kanıt ortaya konulmuştur. Klinik örnekler ve larenks kanseri hücre hatlarında miRNA' ların anormal ifade değişimleri tespit edilmiştir (130, 131). Bu değişimlerin larenks kanser patogeneğinde önemli rollere sahip olduğu ileri sürülmektedir.

Bu sebeple yeni nesil tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde miRNA' lar en umut vaadedici hedefler arasında yer almaktadır ve larenks karsinogenezinin anlaşılmasında miRNA' ların rollerinin aydınlatılması mühim bir adım olarak kalmaktadır.

MiRNA' lar ilk olarak 1993' te *Caenorhabditis elegans* larvasında kısa, kodlamayan bir RNA geni olan lin-4' ün, lin-14 proteininin birikimini baskılayarak nematod gelişimini kontrol ettiğinin tespit edilmesiyle keşfedilmişlerdir (42, 43). Sonraki yıllarda let-7' nin birçok canlı türünde tespit edilmesiyle miRNA' lar aracılığıyla gerçekleşen gen ekspresyon düzenlemesinin yaygın bir regülatör model olabileceği fikri ortaya atılmıştır (45-47). Günümüzde toplamda 30424 miRNA tanımlanmıştır ve bunların 2500' den fazlasının insanda varlığı gösterilmiştir. miRNA' ların insanda mevcut genlerin %60' ından fazlasını hedeflenerek bu genlerin ifadelerini düzenlendiği düşünülmektedir (70), bu da miRNA' ları en yaygın post-transkripsiyonel regülatör sınıfı yapmaktadır (71).

MiRNA' ların hücre proliferasyonunda, apoptozda ve kanser başkalaşımında önemli görevler üstlenen küçük RNA molekülleri olduğu bilinmektedir. Ne zaman ve nerede ifade edildiklerini anlamak protein kodlayan genlerin ifadesi kadar önemlidir.

Mikrodizin profillemeye çalışmaları değişik doku ve hücrelerde farklı ifade düzeylerine sahip miRNA' ların belirlenebilmesi için önemli bir fırsat sunmaktadır. Mikrodizin çalışmalarıyla anlamlı olarak ifade değişimi gösteren miRNA' ların tespit edilmesi, çeşitli *in silico*, *in vitro* ve *in vivo* araçların kullanılarak hastalık patogeneğlerinin aydınlatılmasına imkan sunmaktadır. Belirlenen miRNA' ların öncelikle biyoinformatik araçların kullanılmasıyla olası hedeflerinin belirlenmesi, sonrasında bu hedeflerdeki ifade değişimlerinin *in vitro* ve *in vivo* ortamda ektopik miRNA ekspresyonu sonrasında hem transkripsiyonel seviyede hem de translasyonel seviyede doğrulanması, miRNA' ların karsinogenezdeki rollerinin aydınlatılmasında önemli fonksiyonel yöntemlerdir.

Larenks kanserinde şimdiye kadar miRNA' ların rolü ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda larenks kanserinde miRNA ekspresyonu profilinin

çıkarılması ve kötü huylu dokunun iyi huylu dokudan farklarının bulunmasının yanı sıra, farklı ekspresyon paterni gösteren miRNA'(lar)ın tümör hücre proliferasyonu üzerine etkileri ve bu etkilerini hangi gen üzerinden gerçekleştirdikleri de saptanmış ve rapor edilmiştir (132-135).

Literatürde miRNA'ların larenks kanserindeki rolünü araştıran ilk çalışmalardan biri olan çalışmada cerrahi olarak çıkarılan tümör dokusu ve komşu normal doku örneklerindeki miRNA profil farklılıklarının saptanması amacıyla mikrodizin yöntemi kullanılmış ve bir onkogenik miRNA olan miR-21' in tümörlü dokularda ekspresyonunun anlamlı olarak artmış olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada miR-21 ifadesi susturulunca Hep-2 hücrelerinin proliferasyon potansiyellerinin inhibe olduğu gösterilmiş, miR-21' in ekspresyonunun artırılmasının ise hücrelerde büyüme aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Aynı hücrelerde hücre siklusunu kontrol eden bir tümör süpresör gen olan BTG2' nin ekspresyonunun azaldığı da saptanmış, larenks kanserlerinde miR-21' in artmış ekspresyonunun BTG2 ekspresyonundaki azalmayla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (136).

Long ve arkadaşları da daha önce akciğer ve kolon gibi bir çok kanserle ilişkisi gösterilmiş let-7a' nın ekspresyonunun skuamöz hücreli larenks kanserinde ileri derecede azalmış olduğunu saptamıştır. let-7a' nın hücre büyümesini inhibe eden, apoptozu uyaran ve onkogenezi azaltan etkileri ile larenks kanseri için bir tümör süpresör olabileceği ortaya koyulmuştur (137). Bunların haricinde miR-34c (138), miR-16 (139), miR-106b (140) ve miR-1 (141) gibi çeşitli miRNA'ların da larenks kanserinde deregülasyonu gösterilmiştir.

Kanser kök hücrelerinin kanser kitlesi içinde bulunan nadir hücre popülasyonu olup, kök hücre gibi davranarak tümör gelişiminden ve metastazından sorumlu oldukları düşünülmektedir. Kanser kök hücre modelini bazı klinik gözlemler de desteklemektedir. Örneğin standart bir kemoterapi tümördeki çoğu hücreyi öldürmekle birlikte kanser kök hücreleri yaşamlarını sürdürürler. Çok az sayıda olmalarına rağmen tümör rekürenslerine bazen başarılı bir tedaviden yıllarca sonra bile yol açabilirler.

Kanser kök hücreleri ile ilgili de larenks kanserinde çok sınırlı sayıda çalışma yayımlanmıştır. İlk olarak 2008 yılında Wei ve arkadaşları tarafından Hep-2 hücre hattında CD133' ün olası kanser kök hücresi işaretçisi olarak incelenmesine yönelik bir çalışma yayınlanmış ve Hep-2 hücre hattında küçük bir bir hücre grubunun CD133+

oldukları, bu hücre grubunun artmış tümör formasyonu kapasitesine sahip oldukları gösterilmiştir (110).

Diğer bir çalışmada Hep-2 hücrelerinde ‘yan popülasyon’ karakterizasyonu yapılmış ve bu hücrelerde artmış kendini yenileme, proliferasyon, radyoterapi direnci ve tümörijeniteye varlığı gösterilmiştir (142).

Kanser kök hücrelerinde miRNA profilinin araştırılması ve belirli miRNA’ ların larenks kanser hücrelerine ve larenks kanser kök hücrelerine etkisinin fonksiyonel deneylerle araştırılması ise bildiğimiz kadarı ile henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Skuamöz hücreli larenks kanserindeki kanser kök hücrelerinde onkogenik ya da tümör süpresör etkileri olan miRNA’ ların profillerinin çıkarılması ve kanser kök hücre hatları üzerindeki etkilerinin araştırılması bu çalışmanın amaçlarından biridir.

miRNA işleme yolağının devre dışı bırakıldığı *Dicer* ya da *Dgcr8* knock-out farelerin kullanıldığı bir çalışmada hücrelerin kendini yenileyebilme özelliklerini kaybettikleri, aynı zamanda bir kısım kök hücre işaretçilerinin ifadelerinin de deregüle olduğu göstermiştir. Bu çalışma miRNA’ ların kök hücre karakteristiğinin oluşturulmasında önemli olduklarını göstermiştir (114, 115). Ayrıca birçok miRNA’ nın kanser kök hücrelerin yaşamları ile doğrudan ilintili oldukları gösterilmiştir.

CD44’ ün miR-34a’ nın direk hedeflerinden biri olduğu gösterilmiş ve kanser kök hücreler için önemli bir işaretçi olarak kabul edilen CD44 açısından artmış ifade düzeyine sahip olan hücrelerde miR-34a düzeyinin anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (116). CD44+ hücrelerde ektopik miR-34a ekspresyonun bu hücrelerde klonogenitenin ve rekürens/metastaz kapasitesinin azalmasına sebep olduğu belirtilmiştir.

Bunun yanı sıra, akciğer kanseri progenitör hücrelerinde miR-142-3p, miR-451, miR-106a, miR-142-5p, miR-15b, miR-20a, miR-106b, miR-25 ve miR-486 gibi birçok miRNA’ nın ifade düzeylerinin değişimi de kök hücre potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir (117). Ayrıca meme kanseri kök hücrelerinde miR-200c, miR-203 ve miR-375’ün ifade düzeyinin azaldığı, miR-125b, miR-100, miR-221 ve miR-222 düzeylerinin ise anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (118).

Yapılan çalışmada öncelikle larenks kanseri CD133+ ve CD133- hücre örneklerinden temin edilen RNA’ lar kullanılarak miRNA mikroçipi yapılmış ve bu örneklerde anlamlı olarak farklılık gösteren miRNA’ lar belirlenmiştir. İfade düzeyi en fazla artan 10 miRNA miR-197-3p, miR-574-3p, miR-885-5p, miR-483-3p, miR-1281, miR-328, miR-4254, miR-4290, miR-1825 ve miR-766-3p’ dir. İfade düzeyi en fazla

azalan 10 miRNA ise miR-451a, miR-144-5p, miR-486-5p, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-223-3p, miR-150-5p, miR-185-5p, miR-15b-5p ve miR-363-3p' dir.

Bu miRNA' lardan CD133+ hücrelerde ifadesi artmış olarak tespit edilen miR-1825, yakın zamanda yapılan bir çalışmada insan embriyonik hücrelerinde kopya sayısı artmış olarak gösterilen 20q11.21 kromozom bölgesinde yer almaktadır (143). miR-328 ise kolorektal kanser yan popülasyon hücrelerinde bir kök hücre işaretçisi olarak tanımlanmıştır (144). Sox-9 tarafından regüle ettiği gösterilen miR-574-39' nin de mezenkimal kök hücrelerde kondrojenik farklılaşmayı inhibe ettiği bulunmuştur (145).

İfade düzeyi azalan miRNA' lardan miR-451a' nın CD133+ hematopoetik kök hücrelerin eritroid farklılaşması sırasında ifadesinin arttığı bulunmuştur (146). miR-142-3p' nin CD133+ hematopoetik kök ve progenitör hücrelerde azalmış ifade düzeyine sahip olduğu aynı zamanda CD133' ün miR-142-3p' nin direk hedeflerinden biri olduğu gösterilmiştir (147). miR-150' nin CD133+ hücrelerde azalmış ifade düzeyi olduğu ve miR-150 seviyesindeki artışın hematopoetik kök hücrelerde T-lenfoid farklılaşmaya sebep olduğu bulunmuştur (148). Ayrıca CD133+ karaciğer kanser kök hücrelerinde de ifade düzeyi düşük olan miR-150' nin transkripsiyon faktörü c-Myb üzerinden kanser kök hücre karakteristiği üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (149). Bunun yanı sıra, ifadesi c-Myc tarafından kontrol edilen ve ekspresyonu baskılanan miR-363-3p' nin de hepatoselüler kanser kök hücrelerinde ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (150).

Yapılan mikrodizin sonuçları göz önüne alınarak ve literatürdeki bilgiler değerlendirilerek CD133+ hücrelerde anlamlı olarak ifade düzeyi değişen miRNA' ların ileri fonksiyonel analizlerle incelenmesi karsinogenez mekanizmalarının çözülmesi ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi adına önemli bir başlangıç noktası olacaktır.

Yapılan çalışmada ayrıca larenks kanseri tümör ve normal doku örneklerinden temin edilen RNA' lar kullanılarak miRNA mikroçipi yapılmış ve bu örneklerde anlamlı olarak farklılık gösteren miRNA' lar belirlenmiştir. İfade düzeyi artan 2 miRNA miR-21 ve 4257' dir. İfade düzeyi en fazla azalan 5 miRNA ise miR-375, miR-100-5p, miR-125b-5p, miR-145-5p ve miR-140-3p' dir.

İfade düzeyi artan miR-21' in larenks kanserinde onkogenik miRNA' lardan olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (136, 151, 152). İfadesi azalan miRNA' lardan miR-375 (153), miR-125b-5p (133) ve miR-145-5p' in (133) larenks kanser örneklerinde ifadelerinin azaldığı gösterilmiştir. NE var ki bu miRNA' ların çoğu için fonksiyonel çalışmalar yapılmamıştır.

Bu çalışmada larenks kanseri patogenezinde en anlamlı olduğunu düşündüğümüz miR-145 için Hep-2 hücrelerinde fonksiyonel analizler yapıldı ve miR-145' in yine aynı hücre hattında kanser kök hücre popülasyonu üzerindeki etkileri analiz edildi.

miR-145, ekspresyonu p53 tarafından kontrol edilen tümör süpresör özelliği olan bir miRNA' dır. Kolorektal, meme, prostat, over ve B-hücresi tümörleri gibi birçok kanser çeşidinde miR-145 ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir (86, 97). miR-145' in kanser patogenezindeki rol alabileceği olası çalışma mekanizmaları ile ilgili bir kısım çalışmalar yapılmıştır. Bir biyoinformatik analizinde miR-145 baskılanmasının BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3) seviyesinde artışa neden olabileceği, dolaylı olarak da Apoptosis inducing factor (AIF)' nin baskılanmasına yol açabileceği belirtilmiştir (86). Bir başka çalışmada miR-145 promotörünün DNA hipermetilasyonu ile susturulduğu ifade edilmiştir. Metillenme paternindeki bu değişikliğin miR-145 ekspresyonunu artıran P53' ün miR-145 promotörüne bağlanmasını engellediği belirtilmiştir (99).

Bu çalışmada, öncelikle miR-145' in ifade düzeyinin tümör dokusund azaldığı 40 adet tümör 40 adet normal larenks dokusunda yapılan qRT-PCR analizi ile doğrulanmıştır. Sonrasında miR-145' in larenks kanser hücre hattı Hep-2 üzerindeki etkisi araştırılmış ve hücrelerin proliferasyon, hücre göçü, hücre siklusü ve apoptozu üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Artmış miR-145 ekspresyonu Hep-2 hücre hattında proliferasyon hızını düşürmüş ve hücre göçü kapasitesi bu hücrelerde inhibe olmuştur. Sonrasında, hücre proliferasyonundaki azalmanın nedeninin tespit edilmesi amacıyla hücre siklusü ve apoptoz çalışmaları yapılmış ve miR-145 ile transfekte edilen prostat kanseri hücre hatlarında hücre siklusü arresti görülmesinin yanı sıra apoptotik hücrelerin sayısının arttığı kolorimetrik kaspaz-3 assayı yardımıyla gösterilmiştir. Ayrıca, miR-145' in Hep-2 hücrelerindeki hücre göçü inhibisyonuna mezenkimal epitelyal geçişi tetikleyerek yol açmış olabileceği gösterildi. Bütün bu fonksiyonel çalışmalar miR-145 deregülasyonunun larenks kanserinde agresyonun artmasına, kanserin erken nüks etmesine ve hızlı progresyona yol açabileceğini göstermektedir.

Larenks kanser patogenezinde miR-145' in rolünün aydınlatılmasında olası bir yol da miR-145' in larenks kanser hücrelerinde ektopik ekspresyonu sonrasında potansiyel hedef genlerinin tespit edilmesidir. Bu amaç doğrultusunda, biyoinformatik analizler ve miR-145 ile transfekte edilen larenks kanseri hücre hattı Hep-2' de gen

ekspresyon analizi yapılmıştır. miR-145' in valide edilmiş olan hedeflerinden olan SOX2 ifade düzeyi qRT-PCR ve western blot yöntemleri ile incelenmiş ve SOX2 ekspresyonunun artan miR-145 ekspresyonu neticesinde anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca 20' şer adet tümör ve normal dokuda da SOX2 ifadesi qRT-PCR ile incelenmiş ve tümör dokularında SOX2 ifadesinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur.

SOX2' nin embriyonik kök hücrelerin pluripotensi ve kendini yenileme özelliklerinin devam ettirilmesinde önemli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (154). Ayrıca, prostat kanser hücrelerinde, bu hücelere denk gelen normal prostat doku hücrelerine göre daha fazla SOX2 ekspresyonu tespit edildiği bildirilmiştir (155). Yapılan son çalışmalar neticesinde prostat kanser dokularından ve hücre hatlarından ayrıştırılan kanser kök hücrelerinde, SOX2 dahil birçok kanser kök hücre işaretçilerinin varlığı gösterilmiştir (156, 157). Ayrıca meme kanseri, rektal kanser ve prostat kanseri gibi birçok kanser çeşidinde SOX2'nun kanser patogenezinde rol oynadığı ifade edilmiştir (158).

Bu çalışmada da artan miR-145 ekspresyonuna paralel olarak SOX2 ifade seviyesinde azalma olduğunu gösterildi. Bu durum larenks kanser hücrelerinde azalmış miR-145 düzeyi neticesinde SOX2 ifadesinin artmasının ve bu şekilde larenks kanser patogenezinde anahtar bir rol oynamasının muhtemel olduğuna işaret etmektedir.

Teorik olarak bir miRNA yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilmektedir. Ne var ki bu hedefler hücre çeşitlerine özgü olabileceği gibi bir miRNA farklı dokularda farklı genleri de hedefleyebilir (12). Bu çalışmada bütün mikroRNome' un çözümlenmesi için yeterli olamayacağı akılda tutulmak kaydıyla, larenks kanserinde tümör süpresör bir miRNA' nın kök hücre işaretçisi olan SOX2 genini hedeflediğinin açığa çıkarılmış olması oldukça önem arz etmektedir.

miR-145' in larenks kanseri kanser kök hücreleri üzerindeki etkisi incelendiğinde de miR-145' in kanser kök hücrelerini inhibe ettiği görüldü.

Öncelikle larenks kanseri CD133+ hücrelerde miR-145 ifade seviyesi analiz edildi ve bu hücrelerde miR-145 düzeyinin azaldığı tespit edildi. Kanser kök hücreleri açısından zenginleşen CD133+ hücrelerde ifade düzeyinin azalmış olması, miR-145' in kanser kök hücrelerin karakteristikleri üzerinde etkisi olabileceği düşünüldü.

Bunun üzerine, Hep-2 hücreleri miR-145 ile transfekte edilerek bu hücrelerde kök hücre işaretçilerinin ifade düzeyleri incelendiğinde SOX2, OCT4, KLF4 ve

ABCG2 kök hücre işaretçilerinin baskılandığı tespit edildi. Yapılan kürecik oluşturma, tek hücre klonlama, ALDH aktivite assayleri de miR-145' in Hep-2 hücre popülasyonu içerisindeki kanser kök hücrelerini inhibe ettiğini gösterdi.

Literatürde miR-145' in kanser kök hücrelerini etkilediği yönünde çalışmalar mevcuttur. Hepatokarsinoma hücrelerinden ayrıştırılan kanser kök hücrelerinin tümörijenik potansiyellerinin miR-145 tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Kök hücre işaretçisi olan SOX2, OCT4 ve KLF4' ün miR-145 tarafından hedeflendiğinin gösterilmesi de miR-145' in kanser kök hücrelerinin devamlılığında rol aldığını doğrulamıştır (158). Ayrıca, miR-145' in ifadesinin embriyonik kök hücrelerde p53 tarafından kontrol edildiği ve bu hücrelerde kendini yenilemenin kontrol edilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (159). Buna ek olarak, p53'ü de hedeflediği bilinen miR-145' in ifadesinin azalmasının prostat kanserinde metastazı artırdığı, EMT' yi tetiklediği ve kanser kök hücre potansiyelini artırdığı bildirilmiştir. Adenokarsinoma kök hücrelerinde de miR-145' in OCT4' ü hedefleyerek hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (160).

Yapılan çalışmalara ek olarak ilerleyen çalışmalarda miRNA' ların larenks kanserinin patogeneziindeki rolünün tamamıyla aydınlatılması için kanser kök hücreleri aynı zamanda kanda sirküle olan tümör hücrelerinin ayrıştırılıp primer prostat tümörleri ile karşılaştırılarak miRNA profillerinin belirlenmesi yolu izlenilebilir. Bu şekilde kanser patogeneziinde ve progresyonunda miRNA' ların rollerinin daha açık bir şekilde aydınlatılması sağlanabilir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler larenks kanseri progresyonunda ve larenks kanseri kök hücrelerinin kök hücre karakteristiklerinin oluşmasında miRNA' ların, özellikle de miR-145' in rolünün olduğunu göstermiş ve bu rolün daha detaylı olarak anlaşılması için başka projelere öncülük edecek sonuçlara ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Sağlık B. <http://www.thsk.saglik.gov.tr/2013-10-01-11-00-51/halk-sagligina-yonelik-bilgiler/312-kanser-genel-tanimi.html>.
2. Koutsogiannouli E, Papavassiliou AG, Papanikolaou NA. Complexity in cancer biology: is systems biology the answer? *Cancer Med.* 2013;2(2):164-77.
3. Sawyers CL, Abate-Shen C, Anderson KC, Barker A, Baselga J, Berger NA, et al. AACR Cancer Progress Report 2013. *Clin Cancer Res.* 2013;19(20 Suppl):S4-98.
4. Arnedos M, Vielh P, Soria JC, Andre F. The genetic complexity of common cancers and the promise of personalized medicine: is there any hope? *J Pathol.* 2014;232(2):274-82.
5. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2013
6. M G, Guledal B. Türkiye Kanser İstatistikleri. 2014.
7. Global Status Report on Non-communicable Diseases 2010. Geneva: World Health Organization, 2011.
8. Feachem RG, Sekhri NK, White KL. Getting more for their dollar: a comparison of the NHS with California's Kaiser Permanente. *BMJ.* 2002;324(7330):135-41.
9. Coleman MP. Cancer survival: global surveillance will stimulate health policy and improve equity. *Lancet.* 2014;383(9916):564-73.
10. Reidenberg JS, Laitman JT. Morphophysiology of the Larynx. In: Van DWTR, Hinrich S, editors. *Otolaryngology*. New York: Thieme; 2006. p. 505-15.
11. SEER. SEER Cancer Statistics Factsheets: Larynx Cancer. . Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2011.
12. Sevli S, Uzumcu A, Solak M, Ittmann M, Ozen M. The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases.* 2010;13(3):208-17.
13. Iorio MV, Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J.* 2012;18(3):215-22.
14. Majid S, Dar AA, Saini S, Yamamura S, Hirata H, Tanaka Y, et al. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer.* 2010;116(24):5637-49.
15. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews Genetics.* 2008;9(2):102-14.
16. Di Leva G, Croce CM. miRNA profiling of cancer. *Current opinion in genetics & development.* 2013;23(1):3-11.
17. Reyes T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105-11.
18. Masters JR, Kane C, Yamamoto H, Ahmed A. Prostate cancer stem cell therapy: hype or hope? *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2008;11(4):316-9.
19. Ozen M, Sevli S. **The Role of Cancer Stem Cells and MicroRNAs in Human Prostate Cancer.** Prostate Cancer, From Bench to Bedside. Hırvatistan: INTECH; 2011.
20. Suer I, Karatas OF, Yuceturk B, Yilmaz M, Guven G, Buge O, et al. Characterization of Stem-Like Cells Directly Isolated From Freshly Resected Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Specimens. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014.

21. The History of Cancer. <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/index?sitearea:> American Cancer Society.
22. Stiefel M, Shaner A, Schaefer SD. The Edwin Smith Papyrus: the birth of analytical thinking in medicine and otolaryngology. *Laryngoscope*. 2006;116(2):182-8.
23. Gaspare de Santo N, Bisaccia C, Cirillo M, Salvatore de Santo L, Richet G. Constructing clinical science. *Med Secoli*. 2005;17(1):65-93.
24. Young RH. The history of British gynaecological pathology. *Histopathology*. 2009;54(2):144-55.
25. Henschen F. Yamagiwa's tar cancer and its historical significance. From Percival Pott to Katsusaburo Yamagiwa. *Gann*. 1968;59(6):447-51.
26. Clavel J. Progress in the epidemiological understanding of gene-environment interactions in major diseases: cancer. *C R Biol*. 2007;330(4):306-17.
27. NCBI. Cancer. Genes and Diseases: NCBI; 1998. p. 1-17.
28. S T. Epidemiyoloji Tıbbi Aras̃tırmaların Yöntem Bilimi. Hacettepe Halk Sağ̃ılg̃ı Vakfı. 1992.
29. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(8):1893-907.
30. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(1):11-30.
31. Leon B. Diseases of the Larynx, Hypopharynx, and Esophagus. In: Leon B, editor. *Surgical Pathology of the Head&Neck*. 1. 2 ed. New York: Marcel Dekker; 2001. p. 127-239.
32. Ira FS. *Human Physiology*. 12 ed. Los Angeles: McGraw-Hill; 2010.
33. PL D. Anatomy and Physiology of Larynx. In: PL D, editor. *Diseases of Ear Nose and Throat*. 4 ed: Elsevier; 2007.
34. PL D. Benign Tumours of Larynx. In: PL D, editor. *Diseases of Ear Nose and Throat*. 4 ed: Elsevier; 2007.
35. Charlotte J. Laryngeal carcinoma, genetic changes In: Manfred S, editor. *Encyclopedic references of cancer*: Springer; 2001. p. 487-90.
36. Farhadieh RD, Rees CG, Yang JL, Salardini A, Russell P, Smee R. Radiotherapy in larynx squamous cell carcinoma is not associated with an increased diagnosis of second primary tumours. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2009;21(4):315-9.
37. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010*. 2013.
38. PL D. Cancer Larynx. In: Dhingra P, editor. *Diseases of Ear Nose and Throat*: Elsevier; 2007.
39. Laryngeal and Hypopharyngeal Cancer [Internet]. American Cancer Society. 2012.
40. Carew JF. The Larynx: Advanced Stage Disease. In: Shah JP, editor. *Atlas of Clinical Oncology Cancer of the Head and Neck*. New York: BC Decker; 2001. p. 156-68.
41. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858-62.
42. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.

43. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol.* 1999;216(2):671-80.
44. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403(6772):901-6.
45. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294(5543):853-8.
46. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000;408(6808):86-9.
47. Nikitina EG, Urazova LN, Stegny VN. MicroRNAs and human cancer. *Exp Oncol.* 2012;34(1):2-8.
48. Mo YY. MicroRNA regulatory networks and human disease. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(21):3529-31.
49. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004;432(7014):231-5.
50. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004;432(7014):235-40.
51. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med.* 2012;4(3):143-59.
52. Gregory RI, Shiekhata R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res.* 2005;65(9):3509-12.
53. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature.* 2007;448(7149):83-6.
54. Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Molecular cell.* 2007;28(2):328-36.
55. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 2004;10(2):185-91.
56. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 2004;303(5654):95-8.
57. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425(6956):415-9.
58. Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *The New England journal of medicine.* 2008;359(25):2641-50.
59. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001;409(6818):363-6.
60. Bhayani MK, Calin GA, Lai SY. Functional relevance of miRNA sequences in human disease. *Mutat Res.* 2012;731(1-2):14-9.
61. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 2001;293(5531):834-8.
62. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2001;15(20):2654-9.

63. Lee YS, Kim HK, Chung S, Kim KS, Dutta A. Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *J Biol Chem.* 2005;280(17):16635-41.
64. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007;318(5858):1931-4.
65. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature.* 2010;465(7298):584-9.
66. Yi R, Fuchs E. A miR image of stem cells and their lineages. *Curr Top Dev Biol.* 2012;99:175-99.
67. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D109-11.
68. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D140-4.
69. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Database issue):D154-8.
70. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-33.
71. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol.* 2012;6(6):590-610.
72. Mallory AC, Vaucheret H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet.* 2006;38 Suppl:S31-6.
73. Seven M, Karatas OF, Duz MB, Ozen M. The role of miRNAs in cancer: from pathogenesis to therapeutic implications. *Future Oncol.* 2014;10(6):1027-48.
74. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834-8.
75. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* 2010;11(8):R90.
76. Griffiths-Jones S. miRBase: microRNA sequences and annotation. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2010;Chapter 12:Unit 12 9 1-0.
77. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120(1):15-20.
78. Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D105-10.
79. Papadopoulos GL, Reczko M, Simossis VA, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG. The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D155-8.
80. Wang X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA.* 2008;14(6):1012-7.
81. Ozen M, Karatas OF. MicroRNAs in Human Prostate Cancer: From Pathogenesis to Therapeutic Implications. In: Lawrie CH, editor. *microRNAs in Medicine.* USA: Wiley-Blackwell; 2013. p. 311-28.
82. Shi B, Sepp-Lorenzino L, Prisco M, Linsley P, deAngelis T, Baserga R. Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells. *J Biol Chem.* 2007;282(45):32582-90.

83. Boominathan L. The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(4):613-39.
84. miRNAmap. The pre-miRNA of MI0000461. http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/php/mirna_entry.php?acc=MI0000461.
85. Boettger T, Beetz N, Kostin S, Schneider J, Krüger M, Hein L, et al. Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2634-47.
86. Chen X, Gong J, Zeng H, Chen N, Huang R, Huang Y, et al. MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression. *Cancer Res.* 2010;70(7):2728-38.
87. Wang Y, Lee CG. MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. *J Cell Mol Med.* 2009;13(1):12-23.
88. Liu X, Sempere LF, Galimberti F, Freemantle SJ, Black C, Dragnev KH, et al. Uncovering growth-suppressive MicroRNAs in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(4):1177-83.
89. Zou C, Xu Q, Mao F, Li D, Bian C, Liu LZ, et al. MiR-145 inhibits tumor angiogenesis and growth by N-RAS and VEGF. *Cell Cycle.* 2012;11(11):2137-45.
90. Schepeler T, Reinert JT, Ostensfeld MS, Christensen LL, Silahatoglu AN, Dyrskjot L, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res.* 2008;68(15):6416-24.
91. Zhao C, Xu Y, Zhang Y, Tan W, Xue J, Yang Z, et al. Downregulation of miR-145 contributes to lung adenocarcinoma cell growth to form brain metastases. *Oncol Rep.* 2013;30(5):2027-34.
92. Xu Q, Liu LZ, Qian X, Chen Q, Jiang Y, Li D, et al. MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(2):761-74.
93. Zaman MS, Chen Y, Deng G, Shahryari V, Suh SO, Saini S, et al. The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *Br J Cancer.* 2010;103(2):256-64.
94. Havelange V, Stauffer N, Heaphy CC, Volinia S, Andreeff M, Marcucci G, et al. Functional implications of microRNAs in acute myeloid leukemia by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling. *Cancer.* 2011;117(20):4696-706.
95. Akao Y, Nakagawa Y, Kitade Y, Kinoshita T, Naoe T. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci.* 2007;98(12):1914-20.
96. Sachdeva M, Mo YY. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res.* 2010;70(1):378-87.
97. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene.* 2008;27(12):1788-93.
98. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67(13):6130-5.
99. Suh SO, Chen Y, Zaman MS, Hirata H, Yamamura S, Shahryari V, et al. MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2011;32(5):772-8.
100. Mackillop WJ, Ciampi A, Till JE, Buick RN. A stem cell model of human tumor growth: implications for tumor cell clonogenic assays. *J Natl Cancer Inst.* 1983;70(1):9-16.
101. Cancer stem cells: promising targets.

102. Wang ZA, Shen MM. Revisiting the concept of cancer stem cells in prostate cancer. *Oncogene*. 2011;30(11):1261-71.
103. Lam JS, Reiter RE. Stem cells in prostate and prostate cancer development. *Urol Oncol*. 2006;24(2):131-40.
104. Miki J, Rhim JS. Prostate cell cultures as in vitro models for the study of normal stem cells and cancer stem cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2008;11(1):32-9.
105. Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(11):899-904.
106. Adhikari AS, Agarwal N, Iwakuma T. Metastatic potential of tumor-initiating cells in solid tumors. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:1927-38.
107. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821-8.
108. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell*. 2007;1(5):555-67.
109. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-8.
110. Wei XD, Zhou L, Cheng L, Tian J, Jiang JJ, Maccallum J. In vivo investigation of CD133 as a putative marker of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Head Neck*. 2009;31(1):94-101.
111. Schneider M, Huber J, Hadaschik B, Siegers GM, Fiebig HH, Schuler J. Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker. *BMC Cancer*. 2012;12:96.
112. Yang JP, Liu Y, Zhong W, Yu D, Wen LJ, Jin CS. Chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in laryngeal carcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(7):1055-60.
113. Zhou L, Wei X, Cheng L, Tian J, Jiang JJ. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope*. 2007;117(3):455-60.
114. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(12):2144-51.
115. Martinez NJ, Gregory RI. MicroRNA gene regulatory pathways in the establishment and maintenance of ESC identity. *Cell stem cell*. 2010;7(1):31-5.
116. Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med*. 2011;17(2):211-5.
117. Qian S, Ding JY, Xie R, An JH, Ao XJ, Zhao ZG, et al. MicroRNA expression profile of bronchioalveolar stem cells from mouse lung. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(2):668-73.
118. Wang L, Zhang D, Zhang C, Zhang S, Wang Z, Qu C, et al. A microRNA expression signature characterizing the properties of tumor-initiating cells for breast cancer. *Oncology letters*. 2012;3(1):119-24.
119. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
120. Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res*. 2011;71(1):245-54.

121. Pavlidis P, Noble WS. Matrix2png: a utility for visualizing matrix data. *Bioinformatics*. 2003;19(2):295-6.
122. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(8):2302-6.
123. Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol*. 1999;145(4):769-82.
124. Papini S, Cecchetti D, Campani D, Fitzgerald W, Grivel JC, Chen S, et al. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. *Stem Cells*. 2003;21(4):481-94.
125. Li H, Chen X, Calhoun-Davis T, Claypool K, Tang DG. PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Res*. 2008;68(6):1820-5.
126. Zhou ZH, Ping YF, Yu SC, Yi L, Yao XH, Chen JH, et al. A novel approach to the identification and enrichment of cancer stem cells from a cultured human glioma cell line. *Cancer Lett*. 2009;281(1):92-9.
127. Braakhuis BJ, Leemans CR, Visser O. Incidence and survival trends of head and neck squamous cell carcinoma in the Netherlands between 1989 and 2011. *Oral Oncol*. 2014.
128. Igissinov N, Zatoskikh V, Moore MA, Igissinov S, Aldiyarova G, Tokmurziyeva G, et al. Laryngeal cancer in Kazakhstan - ethnic, age and gender differences over time. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(11):7033-8.
129. Wienecke A, Barnes B, Lampert T, Kraywinkel K. Changes in cancer incidence attributable to tobacco smoking in Germany, 1999-2008. *Int J Cancer*. 2014;134(3):682-91.
130. Wang Y, Chen M, Tao Z, Hua Q, Chen S, Xiao B. Identification of predictive biomarkers for early diagnosis of larynx carcinoma based on microRNA expression data. *Cancer Genet*. 2013;206(9-10):340-6.
131. Xu CZ, Xie J, Jin B, Chen XW, Sun ZF, Wang BX, et al. Gene and microRNA expression reveals sensitivity to paclitaxel in laryngeal cancer cell line. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(7):1351-61.
132. Zhao XD, Zhang W, Liang HJ, Ji WY. Overexpression of miR -155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3. *PLoS One*. 2013;8(2):e56395.
133. Cao P, Zhou L, Zhang J, Zheng F, Wang H, Ma D, et al. Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013;35(5):720-8.
134. Saito K, Inagaki K, Kamimoto T, Ito Y, Sugita T, Nakajo S, et al. MicroRNA-196a is a putative diagnostic biomarker and therapeutic target for laryngeal cancer. *PLoS One*. 2013;8(8):e71480.
135. Xu Y, Wang K, Gao W, Zhang C, Huang F, Wen S, et al. MicroRNA-106b regulates the tumor suppressor RUNX3 in laryngeal carcinoma cells. *FEBS Lett*. 2013;587(19):3166-74.
136. Liu M, Wu H, Liu T, Li Y, Wang F, Wan H, et al. Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma. *Cell Res*. 2009;19(7):828-37.
137. Long XB, Sun GB, Hu S, Liang GT, Wang N, Zhang XH, et al. Let-7a microRNA functions as a potential tumor suppressor in human laryngeal cancer. *Oncol Rep*. 2009;22(5):1189-95.

138. Cai KM, Bao XL, Kong XH, Jinag W, Mao MR, Chu JS, et al. Hsa-miR-34c suppresses growth and invasion of human laryngeal carcinoma cells via targeting c-Met. *Int J Mol Med*. 2010;25(4):565-71.
139. Wu H, Liu T, Wang R, Tian S, Liu M, Li X, et al. MicroRNA-16 targets zyxin and promotes cell motility in human laryngeal carcinoma cell line HEp-2. *IUBMB Life*. 2011;63(2):101-8.
140. Cai K, Wang Y, Bao X. MiR-106b promotes cell proliferation via targeting RB in laryngeal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:73.
141. Wang F, Song G, Liu M, Li X, Tang H. miRNA-1 targets fibronectin1 and suppresses the migration and invasion of the HEp2 laryngeal squamous carcinoma cell line. *FEBS Lett*. 2011;585(20):3263-9.
142. Wan XY, Zheng LL, Gao PF, Yang XX, Li CM, Li YF, et al. Real-time light scattering tracking of gold nanoparticles- bioconjugated respiratory syncytial virus infecting HEp-2 cells. *Sci Rep*. 2014;4:4529.
143. Nguyen HT, Geens M, Mertzaniadou A, Jacobs K, Heirman C, Breckpot K, et al. Gain of 20q11.21 in human embryonic stem cells improves cell survival by increased expression of Bcl-xL. *Mol Hum Reprod*. 2014;20(2):168-77.
144. Xu XT, Xu Q, Tong JL, Zhu MM, Nie F, Chen X, et al. MicroRNA expression profiling identifies miR-328 regulates cancer stem cell-like SP cells in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(7):1320-30.
145. Guérit D, Philipot D, Chuchana P, Toupet K, Brondello JM, Mathieu M, et al. Sox9-regulated miRNA-574-3p inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2013;8(4):e62582.
146. Kouhkan F, Soleimani M, Daliri M, Behmanesh M, Mobarra N, Mossahebi Mohammadi M, et al. miR-451 Up-regulation, Induce Erythroid Differentiation of CD133+cells Independent of Cytokine Cocktails. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;16(6):756-63.
147. Bissels U, Wild S, Tomiuk S, Hafner M, Scheel H, Mihailovic A, et al. Combined characterization of microRNA and mRNA profiles delineates early differentiation pathways of CD133+ and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*. 2011;29(5):847-57.
148. Fallah P, Arefian E, Naderi M, Aghaee-Bakhtiari SH, Atashi A, Ahmadi K, et al. miR-146a and miR-150 promote the differentiation of CD133+ cells into T-lymphoid lineage. *Mol Biol Rep*. 2013;40(8):4713-9.
149. Zhang J, Luo N, Luo Y, Peng Z, Zhang T, Li S. microRNA-150 inhibits human CD133-positive liver cancer stem cells through negative regulation of the transcription factor c-Myb. *Int J Oncol*. 2012;40(3):747-56.
150. Han H, Sun D, Li W, Shen H, Zhu Y, Li C, et al. A c-Myc-MicroRNA functional feedback loop affects hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2013;57(6):2378-89.
151. Ren J, Zhu D, Liu M, Sun Y, Tian L. Downregulation of miR-21 modulates Ras expression to promote apoptosis and suppress invasion of Laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2010;46(18):3409-16.
152. Liu J, Lei DP, Jin T, Zhao XN, Li G, Pan XL. Altered expression of miR-21 and PTEN in human laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(10):2653-7.
153. Hu A, Jin X. [Expression of mir-21 and mir-375 in laryngeal squamous cell carcinoma]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2012;26(18):788-92.

154. Bylund M, Andersson E, Novitch BG, Muhr J. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci.* 2003;6(11):1162-8.
155. Bae KM, Su Z, Frye C, McClellan S, Allan RW, Andrejewski JT, et al. Expression of pluripotent stem cell reprogramming factors by prostate tumor initiating cells. *J Urol.* 2010;183(5):2045-53.
156. Gu G, Yuan J, Wills M, Kasper S. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo. *Cancer Res.* 2007;67(10):4807-15.
157. Kasper S. Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. *Stem Cell Rev.* 2008;4(3):193-201.
158. Jia X, Li X, Xu Y, Zhang S, Mou W, Liu Y, et al. SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. *J Mol Cell Biol.* 2011;3(4):230-8.
159. Jain AK, Allton K, Iacovino M, Mahen E, Milczarek RJ, Zwaka TP, et al. p53 regulates cell cycle and microRNAs to promote differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS Biol.* 2012;10(2):e1001268.
160. Zhang S, Wu Y, Feng D, Zhang Z, Jiang F, Yin R, et al. [miR-145 inhibits lung adenocarcinoma stem cells proliferation by targeting OCT4 gene]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2011;14(4):317-22.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 83045809/604/02-6012
Konu:

İstanbul/...../.....

Dahili Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

06 Mart 2014

İlgi: 14.02.2014 tarihli, 19451483/1043 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Mustafa ÖZEN'in danışmanlığında Doktora Öğrencisi Biy.Ömer Faruk KARATAŞ'ın yürütücülüğünde Yard.Doç.Dr. Mehmet YILMAZ'ın yardımcılığında "İnsan Skuamöz Hücreli Larenks Karsinomunda Kanser Kök Hücrelerine Özgü miRNA'ların Profillenmesi ve miR-145'in Larenks Kanseri ve Kanser Kök Hücrelerindeki Fonksiyonun Araştırılması" başlıklı Doktora Tezi (Araştırma Fonu) hakkında ilgi yazınız ve ekleri 04 Mart 2014 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim

Prof.Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Klinik Araştırmalar Etik
Kurulu Başkanı

Eki:
1 dosya

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ömer Faruk	Soyadı	Karataş
Doğ.Yeri	Olur/Erzurum	Doğ.Tar.	
Uyruğu	T.C	TC Kim No	
Email	karatasfaruk@gmail.com	Tel	0507 198 1181

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	Yeditepe Üniversitesi	2009
Lisans	Boğaziçi Üniversitesi	2007
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Erzurum Teknik Üniversitesi	2012- ...
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) TOEFL Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	93.75	100

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

SCI kapsamında indekslenen yayınlar

1. **Karatas OF**, Yuceturk B, Suer I, Yilmaz M, Cansiz H, Ittmann M, and Ozen M., The role of miR-145 in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Head & Neck (Değerlendirmede)
2. Guzel E, **Karatas OF**, Duz MB, Ittmann M and Ozen M., Differential Expression of Stem Cell Markers and ABCG2 in Recurrent Prostate Cancer. The Prostate (Kabul edildi)
3. Flici H, Cattenoz PB, Komonyi O, Laneve P, Erkosar B, **Karatas OF**, Reichert H, Berzsenyi S and Giangrande A., Interlocked loops trigger lineage specification and stable fates in the *Drosophila* nervous system. Nature Communications, 2014 Jul 28;5:4484.
4. **Karatas OF**, Guzel E, Suer I, Ekici ID, Caskurlu T, Creighton CJ, Ittmann M and Ozen M., miR-1 and miR-133b are Differentially Expressed in Patients with Recurrent Prostate Cancer. Plos One, 2014 Jun 26;9(6):e98675.
5. Seven M, **Karatas OF**, Duz MB and Ozen M., Roles of MicroRNAs in Cancer: From Pathogenesis to Therapeutic Implications. Future Oncology, 2014 May;10(6):1027-48.
6. Suer I, **Karatas OF**, Yuceturk B, Yilmaz M, Guven G, Buge O, Cansiz H, Ozen M. Characterization of Stem-Like Cells Directly Isolated From Freshly Resected Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Specimens. Curr Stem Cell Res Ther. 2014 Mar 30.
7. Yilmaz M, **Karatas OF**, Yuceturk B, Dag H, Yener M, Ozen M., α B-Crystallin expression in human laryngeal squamous cell carcinoma tissues. Head&Neck. 2014 May 12, [Epub ahead of print]
8. Seven M, Koparir E, Gezdirici A, Aydin H, Skladny H, Fenercioğlu E, Güven G, **Karatas OF**, Koparir A, Ozen M, Ulucan H., A novel frameshift mutation and infrequent clinical findings in two cases with Dyggve–Melchior–Clausen syndrome, Clinical Dysmorphology, 23(1) (2014) 1-7.
9. **Karatas OF**, Guzel E, Karaca E, Sevli S, Soyucen E, Yuksel A, Ozen M, MicroRNA profiling in lymphocytes and serum of tyrosinemia type-I patients, Molecular Biology Reports, 40(7) (2013) 4619-23.
10. Seven M, Gezdirici A, Ulucan H, **Karatas OF**, Yosunkaya E, Yuksel A, Ozen M, A novel EFNB1 mutation in a patient with craniofrontonasal syndrome and right hallux duplication, GENE, 527(2) (2013) 675-8.
11. Flici H, Erkosar B, Komonyi O, **Karatas OF**, Laneve P, and Giangrande A, Gcm/Glide-dependent conversion into glia depends on neural stem cell age, but not on division, triggering a chromatin signature that is conserved in vertebrate glia, Development, 138 (2011) 4167-4178
12. Culha M, **Karatas OF**, Aydin O, Kahraman M, Keseroglu K, Sayin I, Bayrak OF, Towards PCR-free mutation detection based on surface-enhanced Raman scattering, SPIE Proceedings, 7192 (2009) DOI: 10.1117/12.808267
13. **Karatas OF**, Sezgin E, Aydin O, Culha M, Interaction of Gold Nanoparticles with Mitochondria, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 71(2) (2009) 315-318
14. Sezgin E, **Karatas OF**, Cam D, Sur I, Sayin I, Avci I, Keseroglu K, Sulek S, Culha M, Interaction of gold nanoparticles with living cells, SIGMA, 26 (2008) 227-246

Kitap Bölümleri

1. **Karatas OF**, Yuceturk B, and Ozen M: “On The Verge of Being a Tumor Suppressor Gene or an Axonal Guidance Molecule: DCC”, Tumor Suppressor Genes: Functions, Regulation and Health Effects, Nova Book, New York, USA, (Ed: G. Mehmet, G. Esra) 2013, 195-206.
2. **Karatas OF**, Guzel E, and Ozen M: “The Functions and Roles of the UNIQUE Tumor Suppressor Gene: PTEN” Tumor Suppressor Genes: Functions, Regulation and Health Effects, Nova Book, New York, USA, (Ed: G. Mehmet, G. Esra) 2013, 233-251.
3. Ozen M and **Karatas OF**: “MicroRNAs in Human Prostate Cancer: From Pathogenesis to Therapeutic Implications”, microRNAs in Medicine, Wiley-Blackwell, USA, (Ed: C. H. Lawrie) 2013, 311-328.
4. Culha M, Kahraman M, **Karatas OF**, Aydin O, “Nanoplasmonics in biosensing and nanobiomedicine”, Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, American Scientific Publishers, California, USA, (Ed: H. S. Nalwa) 2009.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):