



**A549 İNSAN AKCİĞER ADENOKARSİNOM HÜCRE HATTINDA
RNA TEMELLİ P53 TÜMÖR SUPRESÖR GEN AKTİVASYONU
VE KRAS PROTO-ONKOGEN İNHİBİSYONUNUN KOMBİNE
OLARAK TERAPÖTİK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

Muhammed DÜNDAR

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

Doktora Tezi-2023

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

**A549 İNSAN AKCİĞER ADENOKARSİNOM HÜCRE HATTINDA RNA
TEMELLİ P53 TÜMÖR SUPRESÖR GEN AKTİVASYONU VE KRAS PROTO-
ONKOGEN İNHİBİSYONUNUN KOMBİNE OLARAK TERAPÖTİK
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

Muhammed DÜNDAR

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TDK-2022-3090 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2023**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. KRAS Onkogeni ve Kanserdeki Rolü	5
2.1.2. TP53 Tümör Supresör Geni ve Kanserdeki Rolü	8
2.2. Akciğer Kanseri	11
2.2.1. Akciğer Adenokarsinom	12
2.2.2. KRAS Onkogeninin Akciğer Adenokarsinomdaki Rolü.....	13
2.2.3. TP53 Tümör Supresör Geninin Akciğer Adenokarsinomdaki Rolü.....	15
2.3. Kolon Kanseri	16
2.4. siRNA ve Kanserdeki Rolü.....	17
2.5. saRNA ve Kanserdeki Rolü	19
2.6. Küçük RNA Modifikasyonu ve Etkili Taşınımı	22
3. MATERYAL VE METOT	26
3.1. Hücre Hatları.....	26
3.2. Hedef Gen ve Proteinler	26
3.3. Küçük RNA Moleküllerinin Tasarlanması ve Sentezi	27
3.4. AuNP Sentezi ve Karakterizasyonu	28
3.5. Konjugasyon	28
3.6. Hücre Kültürü	29
3.7. Transfeksiyon.....	30
3.8. RNA İzolasyonu ve Real Time qPCR Analizi.....	31
3.9. Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizi.....	33
3.10. Hücre Canlılığı Testi.....	36
3.11. Hücre Döngüsü Analizi	36
3.12. Apoptoz ve Nekroz Testleri	37
3.13. Koloni Oluşturma Deneyi.....	38

3.14. Yara İyileşmesi Deneyi.....	39
3.15. Migrasyon ve İnvazyon Deneyleri.....	39
3.16. İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	42
4.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Morfolojisi	42
4.2. AuNP Sentezi ve Karakterizasyonu.....	42
4.3. AuNP-küçük RNA Konjugasyonu ve Konjugasyonun Doğrulanması.....	44
4.4. RT-qPCR ile mRNA İfadeleme Analizi	48
4.5. Western Blot ile Protein İfadeleme Analizi.....	52
4.6. Hücre Canlılığı Testi.....	56
4.7. Hücre Döngüsü Analizi	60
4.8. Apoptoz ve Nekroz Testleri.....	63
4.9. Koloni Oluşturma Deneyi.....	65
4.10. Yara İyileşmesi Deneyi.....	67
4.11. Migrasyon ve İnvazyon Deneyleri.....	69
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	77
KAYNAKLAR	78
EKLER.....	96
Ek-1. Etik Kurul Kararına Gerek Olmadığına Dair Yazı	96

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım süresince benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, değerli bilgileriyle tezime katkı sağlayan kıymetli danışman hocam Prof.Dr. Ahmet KOÇ'a, doktora eğitimim boyunca kıymetli bilgi ve tecrübeleriyle bana katkı sağlayan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı tüm öğretim üyesi hocalarıma, tez izleme komitesinde yer alarak değerli katkılarıyla yol gösteren hocalarım Prof.Dr. Şengül YÜKSEL'e ve Dr.Öğr.Üyesi Dilek ÇAM DERİN'e,

Eğitimim süresince, engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, çok kıymetli hocam Prof.Dr. Ekrem ATALAN'a ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü diğer tüm çok değerli hocalarıma,

Eğitimim boyunca akademik disiplin ve duruşuyla örnek aldığım çok kıymetli hocalarım Prof.Dr. İsmail ÖZDEMİR'e ve Prof.Dr. Hakan ÖZDEMİR'e,

Doktora eğitimim boyunca değerli tecrübelerinden istifade ettiğim kıymetli hocalarım Öğr.Gör.Dr. Yağmur İNALKAÇ GEMİCİ'ye ve Dr.Öğr.Üyesi Gül Büşra KAYA'ya,

Laboratuvarda beraber çalıştığımız, deneylerimin her aşamasında benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım İrem Nur MENEVŞE'ye, Enes GÜLTEKİN'e, Beyza YILDIRIMA'a, Dr. Hüseyin KARCI'ye, Nazmi ÖZGEN'e, Nefsun DANIŞ'a, Bahar KIZILASLAN'a, Melike Büşra ALP'e, Furkan ELMAS'a, Sevim GÜRBÜZ'e ve İlayda ŞEKEROĞLU'na,

Doktora eğitimim boyunca, beni "TÜBİTAK-BİDEB 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı" ve "TÜBİTAK-BİDEB 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı" kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a,

TDK-2022-3090 nolu doktora tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Hayatım boyunca benden ilgi ve sevgilerini esirgemeyen, en zor zamanlarımda bana güç veren ve sonsuz sevgileri ile yanımda olduklarını hissettiren değerli aileme,

Hayatımın her anında yanımda olup, her anıma mutluluk katan, hem çalışma hem hayat arkadaşım, sevgili eşim Feyza YILMAZ DÜNDAR'a,

Çok teşekkür ederim...

Muhammed DÜNDAR

ÖZET

A549 İnsan Akciğer Adenokarsinom Hücre Hattında RNA Temelli p53 Tümör Supresör Gen Aktivasyonu ve KRAS Proto-onkogen İnhibisyonunun Kombine Olarak Terapötik Kullanımının Araştırılması

Amaç: Çalışmada, mutant KRAS ve yabani tip p53 taşıyan kanser hücrelerinde KRAS ekspresyonunu inhibe eden siRNA ile p53 ekspresyonunu aktive eden saRNA'nın birlikte kullanımının ayrı ayrı transfeksiyonlarına kıyasla antikanser etkisinin ortaya konması ve yeni bir RNA temelli terapötik yaklaşım geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada temel olarak A549 hücre hattı ve kontrol olarak HCT116 hücre hattı kullanıldı. AuNP sentezi gerçekleştirildi, sentezlenen AuNP'lerin küçük RNA'lar ile konjugasyonları yapıldı ve hücreler konjugatlar ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası mRNA ve protein ekspresyonu analizleri sırasıyla RT-qPCR ve Western Blot yöntemleri ile gerçekleştirildi. mRNA ve protein analizleri ile etkili küçük RNA konsantrasyonları belirlendi. Belirlenen konsantrasyonlar kullanılarak kombine ve ayrı ayrı olarak transfeksiyon işlemleri gerçekleştirildi ve hücre canlılığı testi, hücre döngüsü analizi, apoptoz ve nekroz testi, koloni oluşturma deneyi, yara iyileşmesi deneyi, invazyon ve migrasyon deneyleri yapılarak transfeksiyonun neden olduğu hücre düzeyinde olaylar incelendi. Student's t-test uygulanarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Her iki küçük RNA'nın birlikte 50 nM konsantrasyonla transfekte edilmesi, ayrı ayrı transfeksiyonlarına kıyasla sırasıyla A549 ve HCT116 hücre hatlarında p53 mRNA seviyelerinde ($p < 0.001$, $p < 0.01$) ve protein seviyelerinde ($p < 0.001$, $p < 0.01$) önemli bir artışa neden olduğu ve KRAS mRNA ve protein seviyelerini değiştirmediği saptandı ($p > 0.05$). Her iki hücre hattında, kombine tedavi yaklaşımının ayrı ayrı transfeksiyonlara kıyasla hücre döngüsünü G0/G1 fazında daha fazla durdurduğu, apoptozu daha çok tetiklediği ve hücre proliferasyonunu, koloni oluşturma yeteneğini, invazyonu ve migrasyonu daha fazla azalttığı belirlendi.

Sonuç: Çalışmamıza konu olan kombine yaklaşımın her iki hücre hattı için kontrol grubuna kıyasla antikanser etki sağladığı ve bu yaklaşımın her iki küçük RNA'nın ayrı ayrı sağlamış olduğu antikanser etkiye oranla çok daha fazla antikanser etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: A549, HCT116, siRNA, saRNA, KRAS, p53.

ABSTRACT

Investigation of the Combined Therapeutic Use of RNA-Based p53 Tumor Suppressor Gene Activation and KRAS Proto-oncogene Inhibition in the A549 Human Lung Adenocarcinoma Cell Line

Aim: The study aimed to reveal the anticancer effect of the combined use of siRNA, which inhibits KRAS expression, and saRNA, which activates p53 expression, in cancer cells carrying mutant KRAS and wild-type p53, compared to their separate transfections, and to develop a new RNA-based therapeutic approach.

Materials and Methods: In the study, A549 cell line was used as the basis and HCT116 cell line was used as a control. AuNP synthesis was performed, the synthesized AuNPs were conjugated with small RNAs and the cells were transfected with the conjugates. Post-transfection mRNA and protein expression analyzes were performed by RT-qPCR and Western Blot methods, respectively. Effective small RNA concentrations were determined by mRNA and protein analyses. Combined and separate transfection processes were carried out using the determined concentrations, and the events at the cellular level caused by transfection were examined by performing cell viability test, cell cycle analysis, apoptosis and necrosis test, colony formation experiment, wound healing experiment, invasion and migration experiments. The results were evaluated statistically by applying Student's t-test.

Results: Co-transfection of small RNAs at a concentration of 50 nM was found to result in a significant increase in p53 mRNA levels ($p < 0.001$, $p < 0.01$) and protein levels ($p < 0.001$, $p < 0.01$), and did not alter KRAS mRNA and protein levels ($p > 0.05$) in the A549 and HCT116 cell lines, respectively, compared to their individual transfections. In both cell lines, it was determined that the combined treatment approach more effectively arrested the cell cycle at the G0/G1 phase, triggered apoptosis to a greater extent, and significantly reduced cell proliferation, colony formation ability, invasion, and migration compared to individual transfections.

Conclusion: It has been demonstrated that the combined approach subject to our study provides an anticancer effect for both cell lines compared to the control group, and that this approach has a much greater anticancer effect than the anticancer effect provided by both small RNAs separately.

Key Words: A549, HCT116, siRNA, saRNA, KRAS, p53.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ADK	: Adenokarsinom
Ago	: Argonaute
AK	: Akciğer kanseri
AKT	: Protein kinaz B
ALK	: Anaplastik lenfoma kinaz
APS	: Amonyum persülfat
ARF	: Adenozin difosfat ribozilasyon faktörü
AuNP	: Altın nanopartikül
BAX	: Bcl-2 ile ilişkili X protein
BCA	: Bisinkoninik asit
BCL-2	: B-hücreli lenfoma 2
BHK	: Büyük hücreli karsinom
BRAF	: V-Raf Murin Sarcoma Viral Oncogene Homolog B
BSA	: Sığır serum albumini
C/EBPα	: CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein α
CDK4	: Siklin bağımlı kinaz 4
CDK6	: Siklin bağımlı kinaz 6
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CDNK1A	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1a
C_T	: Döngü eşiği
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPYSL3	: Dihidro-pirimidinaz benzeri 3
dsRNA	: Çift sarmallı RNA
dT	: Deoksitimidin
ECL	: Geliştirilmiş kemilüminesans
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERK	: Hücre dışı sinyal düzenlemeli kinaz
FBS	: Fetal sığır serumu

FITC	: Floresein izosiyanat
FSC	: İleri saçılım
FU	: Florourasil
GADD45	: Büyüme durması ve DNA hasarı indükleyici 45
GAP	: GTPaz aktive edici protein
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
GDP	: Guanozin difosfat
GEF	: Guanin nükleotit değişim faktörü
GTP	: Guanozin trifosfat
HIC1	: Kanserde hipermetillenmiş 1
HRP	: At kestanesi peroksidazı
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
KRAS	: Kirsten rat sarkomu viral onkogen homologu
KRK	: Kolorektal kanser
MAD2	: Mitotik durdurma eksikliği 2
MEK	: Mitojen aktivasyonlu protein kinaz kinaz
ml	: Mililitre
mM	: Millimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
mV	: Millivolt
NKX3-1	: NK3 homeobox 1
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PC	: Polikarbonat
PDADK	: Pankreas duktal adenokarsinom
PI	: Propidyum iyot
PI3K	: Fosfoinozitol 3-kinaz
Plk1	: Polo benzeri kinaz 1
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
PUMA	: Apoptozun p53 tarafından yukarı regüle edilen modülatörü
PVDF	: Poliviniliden florür

RAB	: Ras ilişkili bağlanma proteini
RAD	: Diyabetle ilişkili Ras
RAF	: Hızla ilerleyen fibrosarkom
RAL	: Ras benzeri protein
RAN	: Ras ilişkili nükleer protein
RAP	: Ras yakını protein
RAS	: Rat sarkoma
RHEB	: Beyinde zenginleştirilmiş Ras homologu
RHO	: Ras homologu
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon analiz
RISK	: RNA ile indüklenen susturma kompleksi
RIT	: Dokulardaki Ras benzeri protein
RITA	: RNA ile indüklenen transkripsiyonel aktivasyon
RNA	: Ribonükleik asit
RNAa	: RNA aktivasyonu
RNAi	: RNA interferans
ROS1	: Proto-onkogen tirozin-protein kinaz ROS
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT-qPCR	: Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SA	: Serum albumini
saRNA	: Küçük aktive edici RNA
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SH	: Sülfidril
SHK	: Skuamöz hücreli karsinom
siRNA	: Küçük interferans RNA
SS	: Disülfid
SSC	: Yan saçılım
ssRNA	: Tek sarmallı RNA
TBS	: Tris tamponlu tuz çözeltisi
TCEP	: Tris(2-karboksietil)fosfin
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
TP53	: Tümör protein p53
VDUP1	: Endojen D3 vitamini yukarı regüle edilmiş protein 1
VEZT	: Vezatin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Dünya genelinde kanser görülme sıklığı ve ölüm oranları.....	4
Şekil 2.2. İnsan KRAS'ının moleküler modellemesi.	6
Şekil 2.3. KRAS GTPaz döngüsü.....	7
Şekil 2.4. Başlıca KRAS efektör yolları.....	8
Şekil 2.5. p53'ün domain yapısı.....	9
Şekil 2.6. p53 tümör baskılamasına aracılık eden yanıtlar.	10
Şekil 2.7. Farklı p53 mutasyonları, bunların fonksiyonu ve onkogenik aktivite üzerindeki potansiyel etkileri.....	11
Şekil 2.8. G12C mutasyonlu KRAS'ın onkogenik sinyal yolları ve inhibisyonu.....	14
Şekil 2.9. RNAi'nin moleküler mekanizması.....	18
Şekil 2.10. RNAa'nın moleküler yolağı.	20
Şekil 2.11. saRNA bazlı terapötiklerin antikanser mekanizması.	22
Şekil 2.12. Küçük RNA'larda gerçekleştirilen bazı modifikasyonlar.	23
Şekil 2.13. İlaç salınımı için nanotaşıyıcıların sınıflandırılması.	24
Şekil 3.1. Çalışmanın iş akış planı.....	26
Şekil 4.1. A549 hücresinin 1X (a), 4X (b), 16X (c) ve HCT116 hücresinin 1X (d), 4X (e), 16X (f) görüntüleri.	42
Şekil 4.2. AuNP sentez ve analiz görüntüleri. 20 nm AuNP çözeltisi (a), 3 kat konsantre edilmiş AuNP çözeltisi (b), spektrofotometrik analiz grafiğı (c), zeta boyut analizi grafiğı (d) ve zeta potansiyel analizi grafiğı (e).....	43
Şekil 4.3. AuNP-küçük RNA konjugatlarının konjugasyon öncesi ve sonrası görüntüleri.....	44
Şekil 4.4. AuNP-küçük RNA konjugatlarının konjugasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik veri grafikleri.....	45
Şekil 4.5. AuNP-küçük RNA konjugatlarının konjugasyon öncesi ve sonrası zeta boyut analizi veri grafikleri.....	46
Şekil 4.6. AuNP-küçük RNA konjugatlarının konjugasyon öncesi ve sonrası zeta potansiyel analizi veri grafikleri.	47

Şekil 4.7. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve KRAS rölatif mRNA ifadenme seviyeleri.....	49
Şekil 4.8. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve KRAS rölatif mRNA ifadenme seviyeleri.....	49
Şekil 4.9. A549 hücre hattında p53 ve KRAS alt yolaklarında görevli genlerin rölatif mRNA ifadenme seviyeleri.....	51
Şekil 4.10. HCT116 hücre hattında p53 ve KRAS alt yolaklarında görevli genlerin rölatif mRNA ifadenme seviyeleri.....	51
Şekil 4.11. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve KRAS rölatif protein ifadenme seviyeleri.....	53
Şekil 4.12. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve KRAS rölatif protein ifadenme seviyeleri.....	53
Şekil 4.13. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve alt yollarında görevli proteinlerin rölatif ifadenme seviyeleri.	55
Şekil 4.14. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında KRAS ve alt yollarında görevli proteinlerin rölatif ifadenme seviyeleri.	55
Şekil 4.15. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve alt yollarında görevli proteinlerin rölatif ifadenme seviyeleri.	56
Şekil 4.16. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında KRAS ve alt yollarında görevli proteinlerin rölatif ifadenme seviyeleri.	56
Şekil 4.17. A549 ve HCT116 hücre hatlarında farklı konsantrasyon AuNP (μM) uygulamasının hücre canlılığı (%)’na etkisi.	57
Şekil 4.18. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarının 5 günlük hücre canlılığı analizi.....	58
Şekil 4.19. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarının 5 günlük hücre canlılığı analizi.....	59
Şekil 4.20. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında hücre döngüsü analizi sonuçları.....	61
Şekil 4.21. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında hücre döngüsü analizi sonuçları.....	62
Şekil 4.22. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında apoptoz testi sonuçları. .	64
Şekil 4.23. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında apoptoz testi sonuçları.	64

Şekil 4.24. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında koloni oluşturma deneyi görüntü ve analizleri.	66
Şekil 4.25. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında koloni oluşturma deneyi görüntü ve analizleri.....	66
Şekil 4.26. A549 hücre hattında yara iyileşmesi deneyi görüntü ve analizleri.	68
Şekil 4.27. HCT116 hücre hattında yara iyileşmesi deneyi görüntü ve analizleri.	68
Şekil 4.28. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarının migrasyon ve invazyon sonuçları.....	70
Şekil 4.29. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarının migrasyon ve invazyon sonuçları.....	71



TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Küçük RNA'ların hedef ve sekans bilgileri.....	27
Tablo 3.2. RT-qPCR primer sekansları.....	32
Tablo 3.3. SDS-PAGE ayırıcı jel içeriği.....	34
Tablo 3.4. SDS-PAGE istifleme jeli içeriği.....	35
Tablo 3.5. Western Blot analizlerinde kullanılan antikor bilgileri.....	35



1. GİRİŞ

Akciğer kanseri (AK) en sık teşhis edilen kanser türlerinden biridir ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen kaynağıdır (1). Histopatolojik bulgulara göre AK, esas olarak iki alt tipten oluşur: küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) (2). KHDAK'ler tüm AK vakalarının %85'ini oluşturur (3) ve son yirmi yılın istatistikleri, KHDAK için 5 yıllık sağkalımın %20'den az olduğunu göstermiştir (2). KHDAK üç ana histolojik alt tip içerir: adenokarsinom (ADK), skuamöz hücreli karsinom (SHK) ve büyük hücreli karsinom (BHK) (4). KHDAK'nin çoğunluğunu temsil eden akciğer ADK tüm AK vakalarının %38.5'ini oluşturmaktadır (5). Akciğer ADK hastalığının patogenezinin anlaşılmasındaki başarılarla ve tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine rağmen, ne yazık ki, akciğer ADK, genel sağkalımı 5 yıldan az olan en agresif ve öldürme hızı en yüksek tümör tiplerinden biridir (6). Akciğer ADK'nin geleneksel radyoterapilere ve kemoterapilere karşı yüksek direnci, tedavi etkinliği için büyük bir zorluk teşkil etmektedir (7). Bu durum akciğer ADK'nin tedavisi için yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi gerektirdiği gerçeğini ortaya koymaktadır.

KHDAK'de hedefleme için rutin olarak araştırılan onkogenlerin arasında Kirsten rat sarkomu viral onkogen homologu (KRAS) bulunur (8). KHDAK hastalarının yaklaşık %30'u aktive edici KRAS mutasyonlarını barındırır ve bu da onu KHDAK tedavisi için potansiyel bir ilaç hedefi haline getirir (8). Mutant KRAS'ı hedefleyen ilaçlar uzun yıllardır geliştirilmekte ve klinik deneylerde değerlendirilmektedir. Bu çabalar, KRAS proteininin kendisini hedeflemenin yanı sıra, translasyon sonrası modifikasyonlarını, membran lokalizasyonunu, protein-protein etkileşimlerini ve alt sinyal yollarını da içermektedir (9). Fakat, KRAS hedefli ilaç çalışmalarının çoğu başarısız olmuştur (9). Tüm bu bilgiler, KRAS mutant KHDAK'ler için bu geni hedef alan spesifik yeni terapötik ajanlara ihtiyacın olunduğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

Son yıllarda, kanserin genetik temelini anlaşılması ve hücrelere fonksiyonel gen transferi için tekniklerin geliştirilmesi, klinik deneylerde gen tedavisinin kullanımını teşvik etmiştir. Bu heyecan verici strateji, tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu ve/veya tümör teşvik edici onkogenlerin gen tedavisi yöntemleri ile bloke edilmesine olanak sağlamıştır (10). Küçük (veya kısa) interferans RNA (siRNA), protein kodlayan genlerin kısa süreli susturulmasını indüklemek için en yaygın olarak kullanılan bir tür gen tedavisidir. Onkogenler, mutasyona uğramış tümör baskılayıcı genler ve tümör

ilerlemesine katkıda bulunan diğer genler, gen susturma için potansiyel hedeflerdir. siRNA kullanan hedef terapi, yakın zamanda kanserin gelişimi ve metastazında yer alan genlerin spesifik olarak hedeflenmesi yoluyla kanser tedavisi için yeni bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Bu strateji, özel hedefleme işleviyle geleneksel terapötik yaklaşımla ilişkili yan etkilerin üstesinden geleceği anlamı taşımaktadır (11). Bu anlamda, siRNA teknolojisi akciğer ADK'nin hedefe özgü tedavisi için potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada, KRAS mutasyonu taşıyan akciğer ADK hücre hattında mutant KRAS'ı hedef alan siRNA ile hücreler transfekte edilmiş ve hücre büyümesinin azaldığı gösterilmiştir (12).

KRAS mutasyonunun yanı sıra TP53 tümör baskılayıcı gen, KHDAK ve diğer kanserlerde sıklıkla mutasyona uğrar (11). KHDAK hastalarının yaklaşık %50'si p53 mutasyonlarını barındırır (7). p53 mutasyonlarının sıklığı, KHDAK tümör örnekleri arasında SHK'lerde en yüksek ve ADK'lerde ise daha düşüktür (13). p53'teki fonksiyon kaybı mutasyonları insan kanserlerinde, özellikle AK'de yaygın olmasına rağmen, mutant p53 proteinlerini fonksiyonel bir duruma dönüştüren kesin ilaçlar henüz elde edilebilmiş değildir (14). Mutasyona uğramış p53'ü eksprese eden AK hücre hatları ile yapılan klinik öncesi çalışmalarda, miR-34 ile mikroRNA aktarım tedavisi umut verici bir sonuç olmuştur (15). miR-34'ün yüksek ifadenmesi KHDAK'nin birçok modelinde tümör ve kanser ilerlemesini kısıtlamıştır (16). p53'ün alt yolağının hedef alınıp, kanserin ilerlemesinin kısıtlanmasındaki başarısı yabani tip (mutant olmayan) p53 içeren KHDAK'lerin tedavisi için bu genin hedef alınabileceği anlamını taşımaktadır.

Gen tedavisinde RNA temelli başka bir yaklaşım ise gen transkripsiyonunun artırılmasıdır. Küçük (veya kısa) aktive edici RNA (saRNA)'lar, gen promotör bölgelerini spesifik olarak hedefleyerek transkripsiyonel gen aktivasyonuna yol açarlar. saRNA kullanan terapötik yaklaşımlar, son yıllarda farklı kanser türleri için p53 ve daha birçok gen hedef alınarak uygulanmaya devam etmektedir (17). Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada, saRNA tarafından aktive edilen p53'ün aşırı ekspresyonu, insan prostat kanseri hücrelerinin büyümesini baskıladığı bildirilmiştir (18). Yapılan diğer bir çalışmada ise, yabani tip p53'ün saRNA aracılı ifadesinin artırılması, insan mesane kanseri hücrelerinin büyümesini ve metastazı baskıladığı rapor edilmiştir (19). Daha sonra yapılan çalışmada ise, saRNA ile p53'ün hedef alınmasıyla, mide kanseri hücrelerinde *in vitro* proliferasyon ve migrasyon yeteneklerinin önemli ölçüde inhibe edildiği ve böylece biyolojik davranışlarını etkilediği ortaya konmuştur (20). Bu

örneklerden anlaşıldığı üzere mutant olmayan p53'ün saRNA aracılı gen ekspresyonunun artırılması akciğer ADK için de terapötik bir yaklaşım olarak uygulanabilecektir.

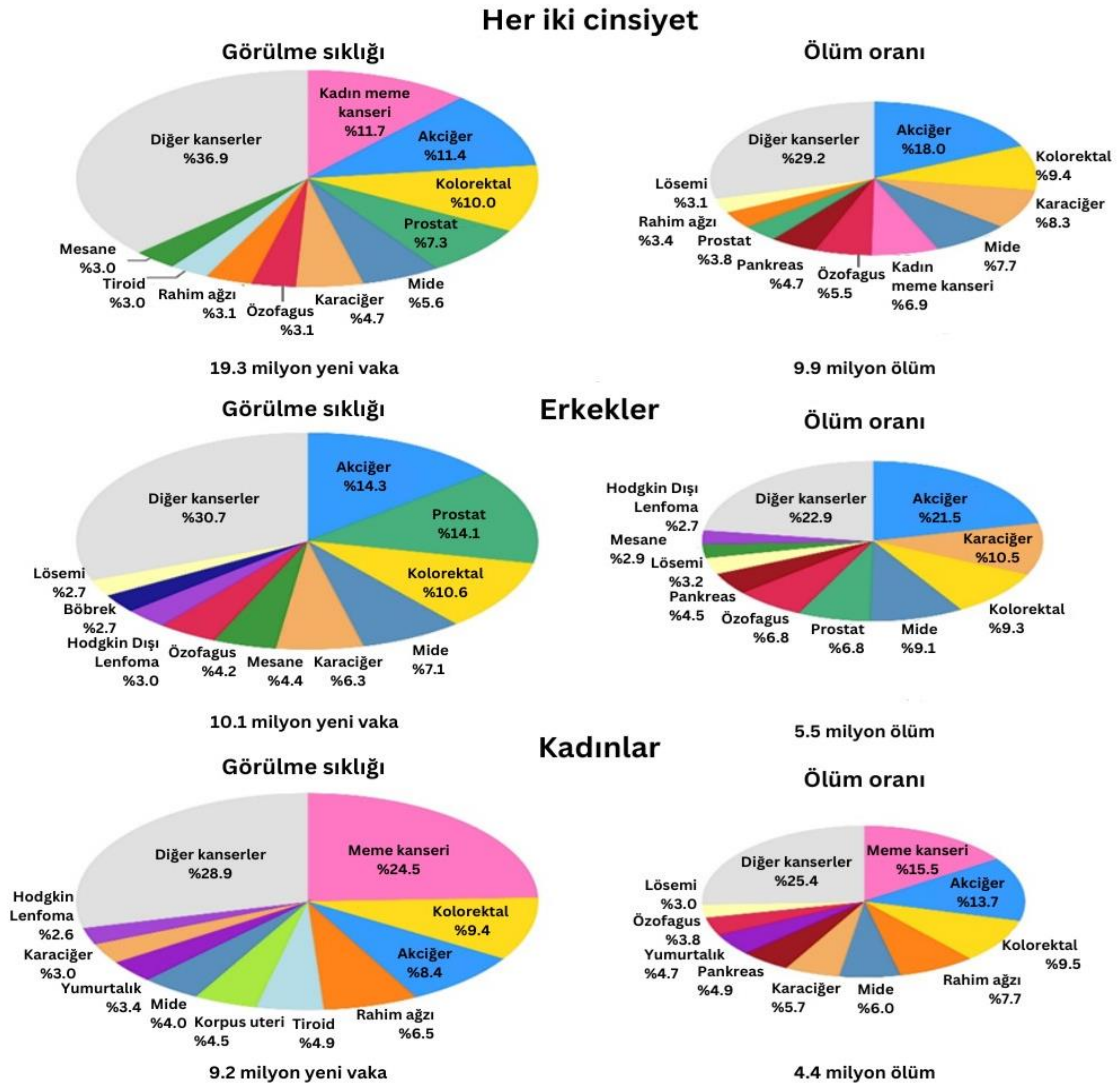
Bazı çalışmalar tek başına spesifik bir genin hedef alınmasının dışında KHDAK için belirli kombinasyon tedavi yaklaşımlarının daha verimli sonuçlar ortaya koyduğunu destekler niteliktedir. Bu doğrultuda, KHDAK'de KRAS ve onun alt sinyal yollarının bulunduğu birçok kombinasyon tedavi yaklaşımı rapor edilmiştir (21). Kombinasyon terapötik yaklaşımlar yalnızca KRAS ve onun alt sinyal yolağı ile sınırlı kalmayıp, birçok çalışmada farklı kombinasyonlar denenmiştir. Örneğin, bir çalışmada, p53'ün alt sinyal yolağı proteini olan p21'i hedef alan saRNA ve antikanser ajan olan sisplatin kombine olarak kullanılmış ve *in vitro* koşullarda A549 akciğer ADK hücre hattında sisplatinin duyarlılığının arttığını ve hücre büyümesinin engellendiğini ve *in vivo* koşullarda ise A549 ksenograft farelerde tümör büyümesini önemli ölçüde engelleyebileceği gösterilmiştir (22). Diğer bir kombinasyon terapötik yaklaşımında ise akciğer ADK'de p53'ün direkt transkripsiyonel hedef aldığı miR-34a ve KRAS'ı hedef alan siRNA birlikte kullanılmış ve iki ajanın ayrı ayrı kullanılmasıyla karşılaştırıldığında anti-tümör etkilerini arttırdığını ve tümör gerilemesine yol açtığı rapor edilmiştir (16).

Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, akciğer ADK'de spesifik hedefli kombinasyon tedavi yaklaşımlarının daha verimli olabileceği beklenmektedir ve yeni kombinasyon terapötik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Buradan hareketle, çalışmamızda mutant KRAS ve yabani tip p53 bulunduran A549 akciğer ADK hücre hattında RNA temelli yeni bir kombine terapötik strateji geliştirmeyi amaçlamaktayız. Bu amaç doğrultusunda, KRAS'ın mesajcı RNA'sını (mRNA) 3' kodlama yapmayan bölgesinden hedef alıp ekspresyonunu inhibe eden siRNA (16) ve p53'ün promotör bölgesini hedef alıp ekspresyonunu arttıran saRNA'yı (18-20) kombine olarak kullanarak, bu kombine yaklaşımın siRNA ve saRNA'nın ayrı ayrı uygulanmalarına oranla kontrol hücre grubuna kıyasla hücre döngüsünün durması, koloni oluşturma oranının azalması, apoptozun tetiklenmesi, migrasyon ve invazyonun engellenmesi gibi hücresel olayları daha fazla sağlayıp sağlamayacağını ortaya konması hedeflenmektedir. HCT116 insan kolorektal karsinom hücre hattı çalışmaya dahil edilerek, çalışmamıza konu olan kombine terapötik stratejinin, mutant KRAS ve yabani tip p53 taşıyan farklı hücre hattında aynı/benzer etkiler gösterip göstermeyeceği açısından kontrol edilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sırasında tüm deneysel aşamalar her iki hücre hattı için eşit şartlarda uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde çalışmamızın RNA temelli yeni kombinasyon terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde öncülük etmesi beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılmasıyla karakterize edilen karmaşık ve yıkıcı bir hastalık grubu olan kanser, önemli bir küresel sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (23). Kanser, 2020 yılında tahminen 19.3 milyon yeni vaka ve 9.9 milyon ölümlle dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenidir (1). Bazı kanser türlerine göre istatistik veriler Şekil 2.1’de (1) gösterilmiştir. Kanser vakalarının artmaya devam etmesi, sağlık sistemleri ve toplum için önemli zorluklar yaratmaktadır (1). Bu hastalığı anlamak ve önlemek, teşhisi ve tedavisi için etkili stratejiler geliştirmek amacıyla araştırmacılar, kanser gelişiminin altında yatan mekanizmalar ve risk faktörleri hakkında kapsamlı araştırmalar yürütmektedir (24).



Şekil 2.1. Dünya genelinde kanser görülme sıklığı ve ölüm oranları (1).

Kanser, vücudun hemen hemen her doku ve organında ortaya çıkabilir, bu da onu oldukça heterojen ve çok yönlü bir hastalık haline getirir (25). Kanser çeşitli doğası, tanımlanmış 200'den fazla farklı kanser türüne de yansımaktadır (1). Kanser çok çeşitli hastalıkları barındırır da, hepsinin ortak özelliği kontrolsüz hücre çoğalmasıdır (25). Bu kontrolsüz hücre büyümesi, iyi huylu veya kötü huylu tümörlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (26).

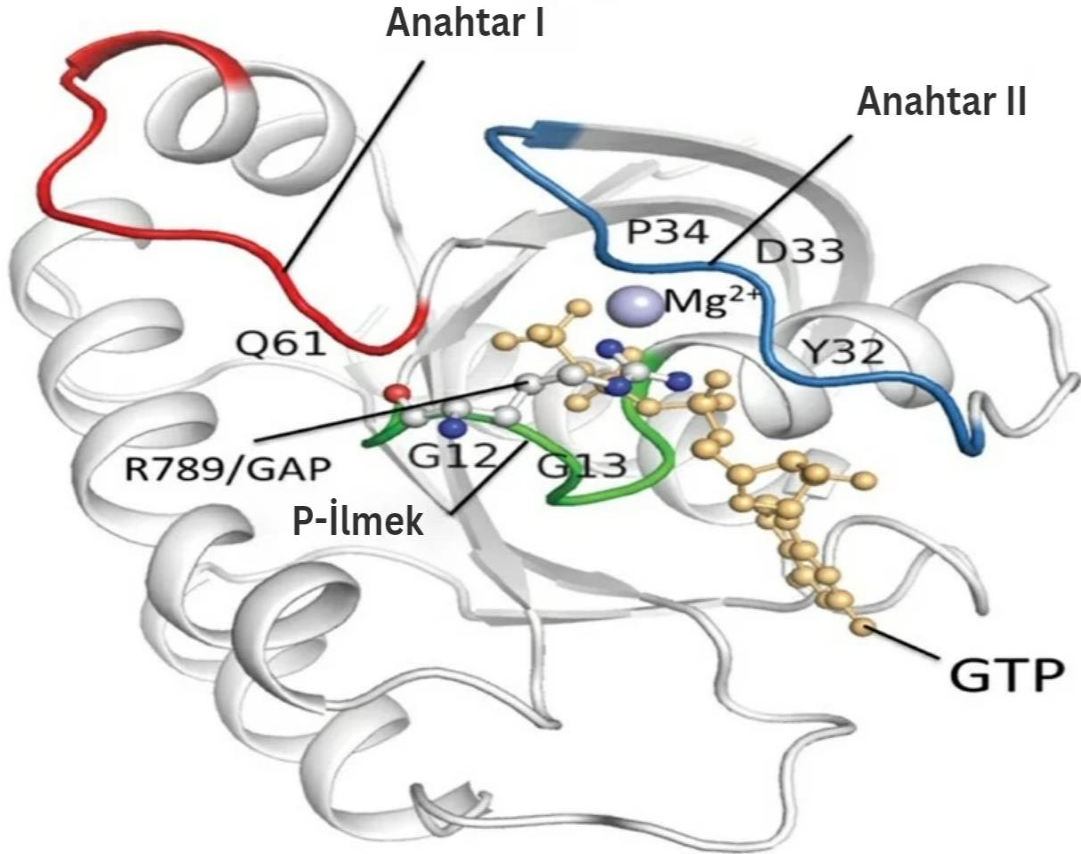
Kanserli tümörler olarak da bilinen kötü huylu tümörler, yakınındaki dokuları istila etme ve metastaz adı verilen bir süreçle vücudun uzak bölgelerine yayılma potansiyeline sahiptir (25). Kanser nedenleri çok faktörlüdür; genetik yatkınlık, çevresel etkenler, yaşam tarzı ve kanser riskine katkıda bulunan bulaşıcı ajanların birleşimi bu faktörler arasındadır (27). Tütün kullanımı, diyet ve karsinojenlere maruz kalma gibi çevresel faktörler kanser gelişimiyle güçlü bir şekilde bağlantılıdır (28). Kanser hücre gelişimi genetik mutasyonları, epigenetik değişiklikleri ve mikroçevre ile etkileşimleri içeren çok aşamalı bir süreçtir (24). Bu değişiklikler hücre büyümesini ve bölünmesini kontrol eden normal düzenleyici mekanizmaları bozabilir ve kanserde görülen kontrolsüz çoğalmaya yol açabilir (24). Kanser ilerlemesine neden olan genetik ve moleküler değişikliklerin anlaşılması, hedefe yönelik tedavilerin ve erken teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi açısından çok önemlidir (29). Son yıllarda genom bilimi ve moleküler biyolojideki ilerlemeler, kansere yatkınlığın genetik temeline ilişkin yeni bilgiler sunarak kalıtsal gen mutasyonlarının kanser riskindeki rolüne ışık tutmuştur (30).

Kanser araştırmaları son yıllarda önemli ilerlemeler kaydetmiş ve birçok kanser hastası için tedavilerin ve sonuçların iyileştirilmesine yol açmıştır (31). Ancak kanserin karmaşıklığını daha iyi anlama, daha etkili önleme ve tedavi stratejileri geliştirme arayışında zorluklar devam etmektedir. Devam eden araştırmalar, kanser biyolojisinin inceliklerini çözmeyi, yeni terapötik yaklaşımları keşfetmeyi ve bu hastalığın küresel yükünü azaltma nihai hedefiyle erken teşhis yöntemlerini geliştirmeyi amaçlamaktadır (1).

2.1.1. KRAS Onkogeni ve Kanserdeki Rolü

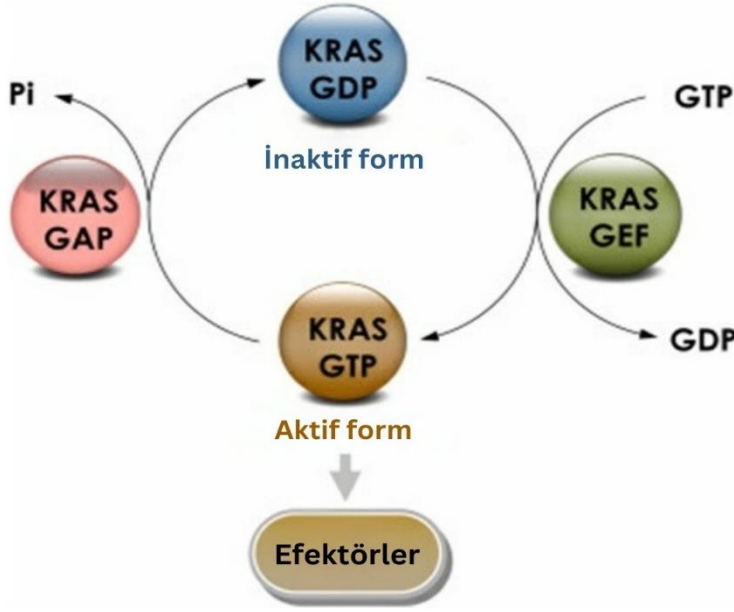
KRAS, çeşitli kanser türlerinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynayan bir proto-onkogendir. Bu gen, hücre büyümesi, hayatta kalması ve farklılaşması için kritik olan hücre sinyal yollarını düzenleyen KRAS adında bir proteinini kodlar (32). KRAS, RAS süper ailesi veya RAS benzeri GTPazlar olarak bilinen bir grup küçük guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı proteindir. RAS süper ailesinin üyeleri yapılarına, sekanslarına

ve işlevlerine göre ailelere ve alt ailelere ayrılır. Beş ana aile RAS, RHO, RAN, RAB ve ARF GTPazlardır. RAS ailesinin kendisi ayrıca 6 alt aileye (RAS, RAL, RAP, RHEB, RAD ve RIT) bölünmüştür ve her alt aile, temel GTPaz ve nükleotit değişim aktivitesini sağlayan ortak çekirdek G alanını paylaşır. RAS, RAS alt ailesinde en sık çalışılan proteindir. İnsanlarda oldukça homolog olan üç RAS proteini HRAS, NRAS ve KRAS bulunur (33). İnsan KRAS proteinin yapısı Şekil 2.2’de (34) gösterilmiştir.



Şekil 2.2. İnsan KRAS'ının moleküler modellemesi (34).

KRAS proteini sırasıyla guanozin difosfata (GDP) ve GTP'ye bağlanarak aktif olmayan (inaktif) formdan aktif forma geçiş yapar (35). Fizyolojik koşullar altında, KRAS düzenlemesi, GTP ile GDP değişimini katalize eden guanin nükleotit değişim faktörlerinin (GEF'ler) ve GTP 'den GDP'ye hidroliz oranını artıran GTPaz aktive edici proteinlerin (GAP'ler) karşıt aktiviteleri tarafından kontrol edilen bir GDP-GTP döngüsü yoluyla gerçekleşir. GTP'ye bağlı KRAS, çeşitli efektör proteinlerle etkileşime girerek bu efektörlerin aktivitesine ve/veya lokalizasyonuna etki eder ve sonuçta geniş bir hücrel yol yelpazesini etkiler (36). KRAS düzenleme döngüsü Şekil 2.3’de (33) gösterilmiştir.

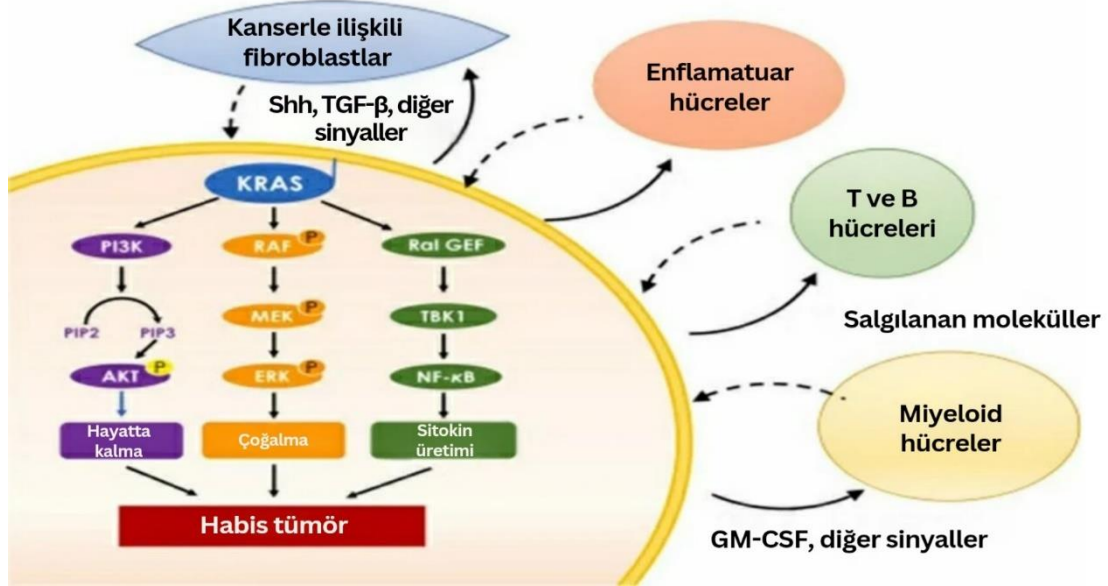


Şekil 2.3. KRAS GTPaz döngüsü (33).

RAS genleri, aktive edici mutasyonlar veya yukarı ve aşağı sinyal bileşenlerindeki değişiklikler nedeniyle çoğu insan tümöründe anormaldirler (37). RAS genlerinin kanser biyolojisindeki önemi kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve bilimsel olarak belgelenmiştir. Üç ras geninden (HRAS, NRAS ve KRAS) birinin kodon 12, 13 veya 61'indeki mutasyonlar, bu genleri aktif onkogenlere dönüştürür (38). Bu nokta mutasyonlarının tespitine yönelik hızlı analizler yakın zamanda geliştirilmiş ve mutasyona uğramış RAS genlerinin insan tümörlerinin patogeneğinde oynadığı rolü araştırmak için kullanılmıştır (38). Ras gen mutasyonlarının çeşitli tümör tiplerinde bulunabileceği, ancak görülme sıklığının büyük ölçüde değişebileceği ortaya çıkmıştır. En yüksek insidanslar pankreas (%90), kolon ve tiroid (%50) ve akciğer ADK'lerinde (%30) bulunur (38). Bazı tümör tipleri için, RAS mutasyonunun varlığı ile tümörün klinik veya histopatolojik özellikleri arasında bir ilişki olabilir. Mutasyonların tetiklenmesinde çevresel ajanların rol oynayabileceğine dair bazı kanıtlar vardır (38).

RAS gen ailesinin bir üyesi olan KRAS geni insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğrar (38) ve RAS mutasyonlarının %86'sını oluşturur (33). KRAS genindeki mutasyonlar, RAS sinyal yolunun yapısal aktivasyonuna yol açarak kontrolsüz hücre çoğalmasını ve apoptoza karşı direnci teşvik eder (37). KRAS'ın onkogenik potansiyeli, hücrenin hayatta kalması ve çoğalması için çok önemli olan RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT yolları dahil olmak üzere aşağı yöndeki efektörleri aracılığıyla sağlanır (39). KRAS mutasyonları agresif tümör fenotipleri, kemoterapiye karşı artan direnç ve çeşitli

kanser türlerinde kötü prognosis ile ilişkilidir (40). Tümör büyümesini teşvik etmenin yanı sıra, KRAS mutasyonları aynı zamanda metastaz ve anjiyogeneze de katkıda bulunarak kanserin malignitesini daha da körükler (32). KRAS mutasyonları kaynaklı kanser oluşumunun ana yolları Şekil 2.4’de (33) gösterilmiştir .



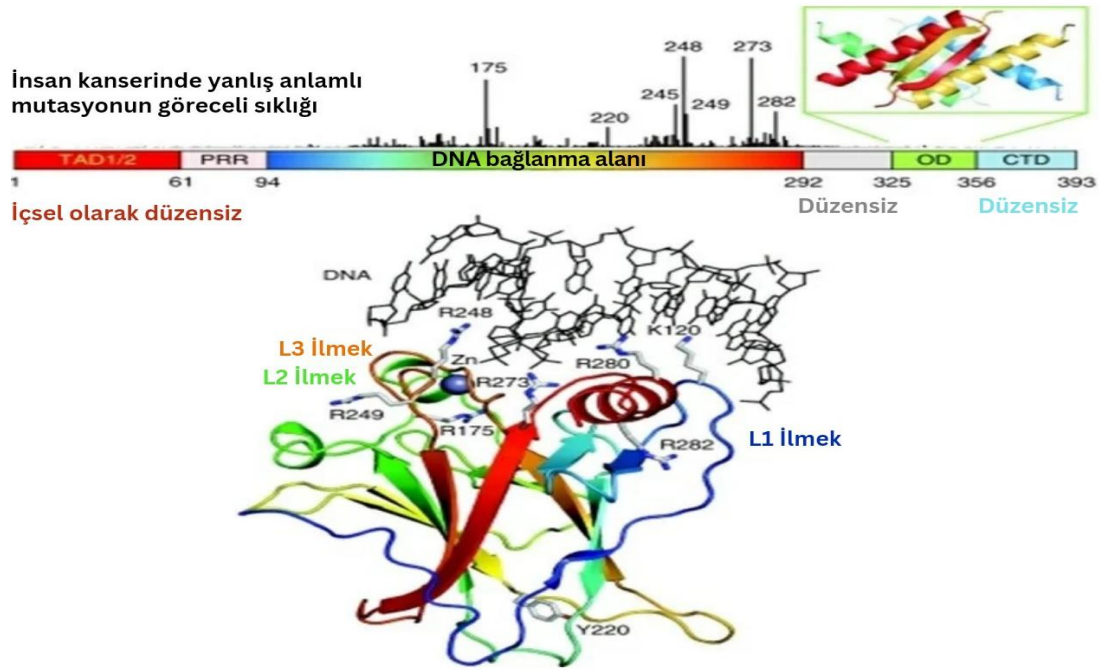
Şekil 2.4. Başlıca KRAS efektör yolları (33).

KRAS'ın inhibisyonu uzun süredir kanser tedavisi için önemli bir hedef olmuştur, ancak etkili KRAS hedefli tedavilerin geliştirilmesinin, KRAS proteininin anlaşılması zor doğası ve onun sayısız aşağı yönlü efektörleri nedeniyle zorlu olmuştur. Ancak ilaç geliştirmedeki son atılımlar, KRAS mutasyonlu kanserlerin tedavisinde umut vadetmektedir (41). Böyle bir atılım, 2020 yılında ilk seçici KRASG12C inhibitörü olan sotorasibin, KRASG12C mutasyonları barındıran KHDAK hastalarında klinik etkinliğini göstermesiyle gerçekleşmiştir (42). Bu yeni KRAS inhibitörlerinin etkinliğini değerlendirmek ve faydalarını diğer kanser türlerine genişletmek için daha fazla araştırma ve klinik denemeler devam etmektedir (43).

2.1.2. TP53 Tümör Supresör Geni ve Kanserdeki Rolü

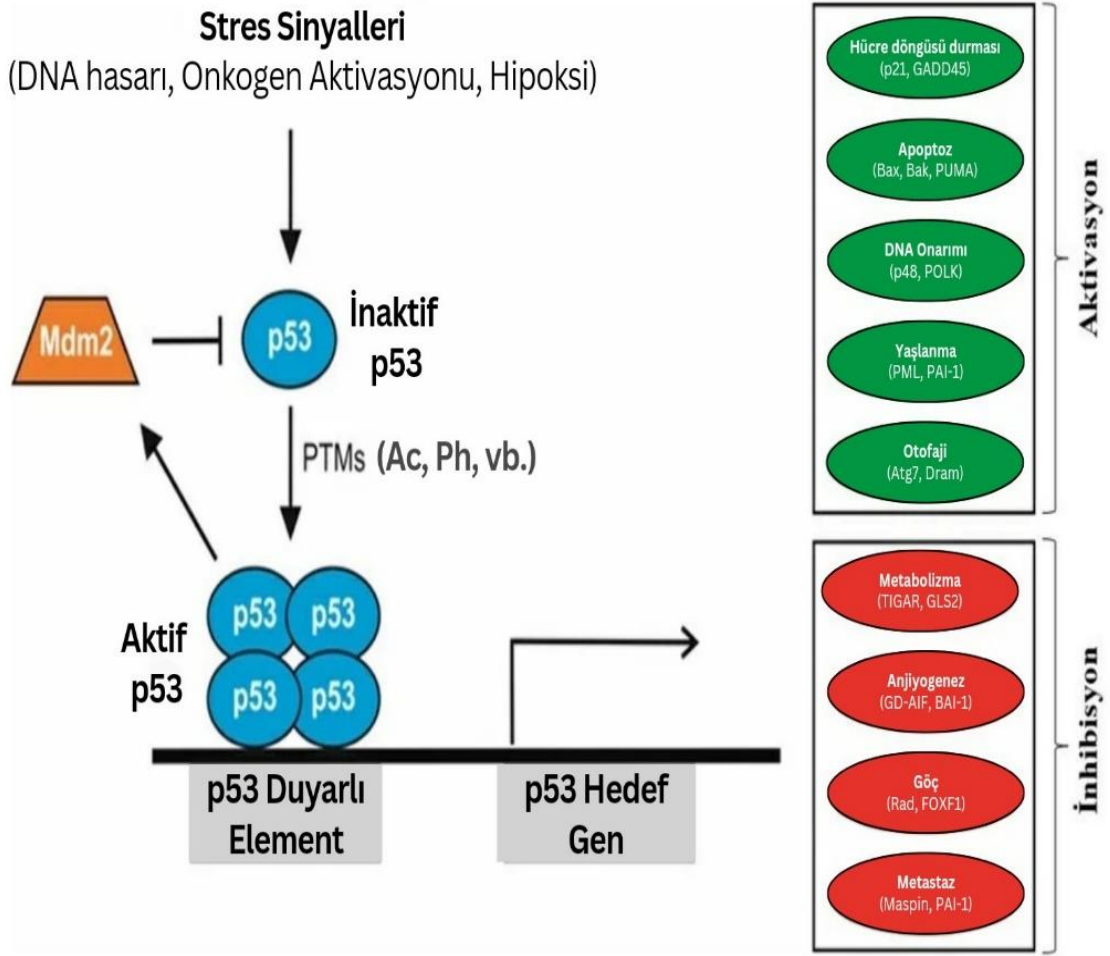
Tümör proteini 53 veya p53 olarak da bilinen TP53, bir transkripsiyon faktörüdür. Çeşitli genotoksik stres türlerine yanıt olarak p53, spesifik DNA sekanslarına bağlanarak bir dizi geni işlemeye geçirir, böylece hücre döngüsünü durdurur, hasarlı DNA'yı onarır veya hücre kaderi olarak apoptozu indükler (44). p53, katlanmış DNA bağlama ve

tetramerizasyon domainlerinden oluşan, hem amino hem de karboksi terminallerinde doğası gereği düzensiz bölgelerle çevrelenmiş modüler bir alan yapısına sahiptir ve 4x393 amino asit dizisi içeren bir homotetramer olarak biyolojik fonksiyonunu yerine getirir (45). p53 proteinin domain yapısı Şekil 2.5’de (45) gösterilmiştir. p53’ün transaktivite fonksiyonlarını yerine getirebilmesinde, fosforilasyon, asetilasyon ve prolin izomerasyonu veya protein-protein etkileşimi gibi translasyon sonrası mekanizmalar önemli rol oynamaktadır (44).



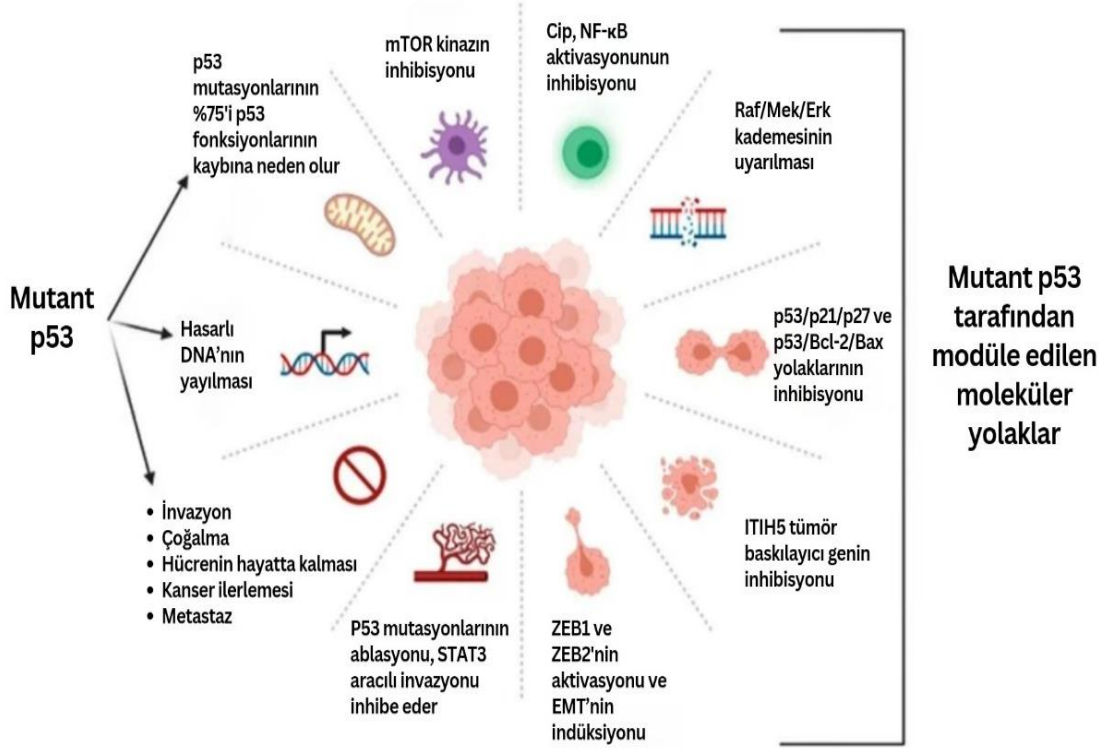
Şekil 2.5. p53'ün domain yapısı (45).

TP53'ün birincil işlevlerinden biri, DNA hasarı oluştuğunda DNA onarımını kolaylaştırmaktır. Bunu, GADD45 ailesi gibi onarım sürecine dahil olan çeşitli aşağı yöndeki genleri aktive ederek ve onarım mekanizmalarının çalışması için zaman sağlamak üzere hücre döngüsü durmasını tetikleyerek yapar (46). Bu geçici durma, hücrenin DNA'yı onarmasına veya hasar onarılamayacak durumdaysa apoptoza uğramasına olanak tanır. Böylelikle programlanmış hücre ölümü süreci olan apoptozun önemli bir düzenleyicisi olma görevini üstlenmiş olur (47). Bu durum, genomun bütünlüğünü sağlar ve kansere yol açabilecek mutasyonların yayılmasını önler. Tümör gelişiminin durdurulmasında, p53 hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun tetiklenmesi dışında farklı birçok görev üstlenir ve bunları birçok farklı gen ve proteini hedef alarak yerine getirir (48). Bu görevlerden bazıları Şekil 2.6’de (49) gösterilmiştir.



Şekil 2.6. p53 tümör baskılamasına aracılık eden yanıtlar (49).

TP53 fonksiyonunun kaybı, başta mutasyonlar yoluyla, kanserde sık görülen bir durumdur (50). İşlevsiz TP53, tümör baskılayıcı aktivitelerini bozarak hücrelerin apoptozdan kaçmasına, DNA hasarına rağmen çoğalmasına ve mutasyon biriktirmesine olanak tanır. Bu olaylar kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine yol açabilir (51). Mutant p53'ün kanser oluşumuna sebep olabileceği bazı durumlar Şekil 2.7'de (52) gösterilmiştir. TP53 mutasyonları tek bir kanser türüyle sınırlı değildir; diğerlerinin yanı sıra meme, kolorektal, akciğer ve yumurtalık kanserini de içeren geniş bir aralıkta gözlemlenmiştir (46). Bazı TP53 mutasyonları yalnızca tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybıyla sonuçlanmakla kalmaz, aynı zamanda sıklıkla fonksiyon kazanımı mutasyonları olarak adlandırılan yeni onkogenik özellikler de kazandırabilir. Bu mutasyonlar tümörün ilerlemesini ve tedavi direncini tetikleyebilir (53). Ancak mutasyonların yokluğunda bile p53'ün aktivitesi, translasyon sonrası modifikasyonlar veya düzenleyici yollardaki değişiklikler gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla tehlikeye girebilir (54).



Şekil 2.7. Farklı p53 mutasyonları, bunların fonksiyonu ve onkogenik aktivite üzerindeki potansiyel etkileri (52).

TP53 mutasyon durumunun, kanser prognozunu ve tedavi stratejilerini etkileyen önemli klinik etkileri vardır. TP53 mutasyonlarına sahip tümörler genellikle daha agresiftir ve tedaviye daha az yanıt verir, bu da onları zorlu bir klinik sorun haline getirir (55). Araştırmacılar, kanser hücrelerinde p53 fonksiyonunu yeniden sağlamak için hedefe yönelik tedavileri aktif olarak araştırmaya devam etmektedirler. p53 proteinini yeniden aktive etmek veya stabilize etmek için yeni ilaç geliştirme stratejileri takip edilmekte ve kanser tedavisinin iyileştirilmesi için potansiyel yollar sunulmaktadır (46).

2.2. Akciğer Kanseri

AK, akciğer dokusundaki hücrelerin kontrolsüz büyümesinden kaynaklanan malign bir neoplazmdir ve yüksek insidans ve mortalite oranları nedeniyle önemli bir küresel sağlık sorunudur (23). Dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir ve meme, kolon ve prostat kanserlerinin toplamından daha fazla ölümden sorumludur (56). AK genel olarak iki ana türe ayrılır: KHDAK ve KHAK, bu kanserlerden her biri farklı özelliklere ve tedavi yaklaşımlarına sahiptir (57). KHDAK, tüm vakaların yaklaşık %85'ini oluşturan daha yaygın bir formdur, KHAK ise daha

agresif bir hastalık seyri ile ilişkilidir (58). Moleküler biyolojideki ilerlemeler, KHDAK'nin, her biri farklı klinik özelliklere ve tedavi seçeneklerine sahip olan ADK, skuamöz hücreli karsinom (SHK) ve büyük hücreli karsinom (BHK) gibi farklı alt tiplere göre sınıflandırılmasını daha da geliştirmiştir (59). Bu alt tiplerin hem tanı hem de tedavi stratejilerini etkileyen farklı histolojik ve genetik özellikleri vardır (60).

Erken evre AK sıklıkla asemptomatiktir ve tanı tipik olarak ileri bir aşamada ortaya çıkar, bu da tedavi seçeneklerinin sınırlı olmasına ve sonuçların daha kötü olmasına neden olur (61). Gelişmiş görüntüleme tekniklerinin ve biyobelirteçlerin geliştirilmesi, erken teşhis çabalarını iyileştirerek potansiyel olarak daha çok hayatta kalma oranlarına yol açmıştır (62). AK'nin tedavisi, cerrahi, radyasyon terapisini, kemoterapiyi, hedefe yönelik tedavileri ve immünoterapileri kapsayan multidisipliner bir yaklaşımı içerir (63). Son on yılda yenilikçi ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi, AK'ye karşı mücadelede yeni umutlar sunmuştur (64). AK'ye yönelik tedavi stratejileri, umut verici potansiyel gösteren siRNA gibi yenilikçi yaklaşımların entegrasyonu ile yıllar içinde gelişmiştir (65). Bunlara ek olarak, devam eden çalışmalar hasta sonuçlarını daha da iyileştirmek için kombinasyon tedavilerini araştırmaktadır (66). Bu önemli ilerlemelere rağmen AK tedavisinde ilaç direnci, tedaviye bağlı yan etkiler ve nadir görülen genetik değişikliklere yönelik daha fazla araştırma ihtiyacı gibi zorluklar devam etmektedir (67-69).

2.2.1. Akciğer Adenokarsinom

Akciğer ADK, KHDAK'nin en yaygın histolojik alt tipidir ve tüm AK vakalarının yaklaşık %40'ını oluşturur (70). Akciğer ADK, farklı genetik ve histopatolojik özelliklere sahip karmaşık ve çeşitli bir malignite grubunu temsil eder (57). Akciğer ADK'nin histolojik özelliği, lepidik, papiller, asiner veya katı büyüme modelleri olarak ortaya çıkabilen, glandüler yapıların varlığıdır (71). Bu farklı morfolojik modeller, akciğer ADK'sinin tanı ve tedavide zorluklar yaratabilen heterojenliğini vurgulamaktadır (72).

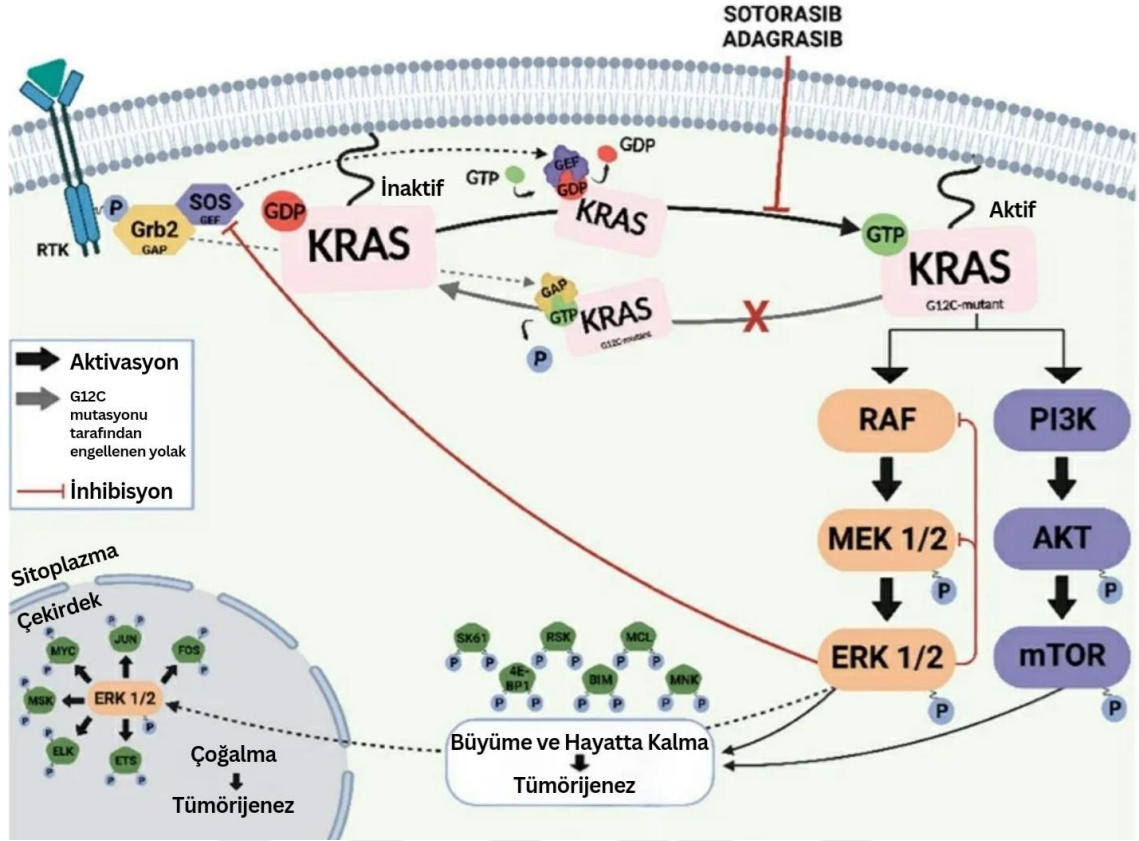
Akciğer ADK'nin görülme sıklığındaki artış, bu hastalığın moleküler ve genetik temelleri konusunda, kapsamlı araştırmalara yol açmıştır. Genomik çalışmalar, KRAS, EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) ve ALK (anaplastik lenfoma kinaz) gibi genlerdeki mutasyonlar dahil olmak üzere çok sayıda sürücü mutasyon ve değişikliği ortaya çıkarmıştır (73, 74). EGFR, KRAS, ALK, ROS1 ve BRAF'taki mutasyonlar gibi genetik olaylar, hasta sonuçlarını önemli ölçüde iyileştiren hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine yol açmıştır (75).

Biyolojisi ve moleküler temellerinin giderek daha iyi anlaşılmasıyla akciğer ADK, hasta sonuçlarını iyileştirmeyi amaçlayan yenilikçi tedavi stratejilerinin odak noktası haline gelmiştir (76). Genomik araştırmalardaki ilerlemeler, akciğer ADK’de sürücü mutasyonlar ve değişikliklerin karmaşık bir manzarasını ortaya çıkararak kişiselleştirilmiş tıbbın önünü açmıştır (75). Bu ilerlemelere rağmen, akciğer ADK’nin klinik yönetimi halen bir zorluk olmaya devam etmektedir. Ayrıca, birçok hastaya tedavi seçenekleri sınırlıken ileri evrelerde tanı konulabilmektedir (59). Bu nedenle, devam eden araştırmalar, yeni biyobelirteçleri ve terapötik hedefleri ortaya çıkarmaya çalışmakta ve bu ölümcül hastalıktan etkilenen bireylerin hayatta kalma oranlarını ve yaşam kalitesini artırmayı hedeflemektedir (76).

2.2.2. KRAS Onkogeninin Akciğer Adenokarsinomdaki Rolü

KRAS, KHDAK’nin yaygın bir alt tipi olan akciğer ADK’sinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. KRAS genindeki mutasyonlar, tüm akciğer ADK vakalarının yaklaşık %30’unda tespit edilmiştir ve bu da KRAS değişikliklerini bu kanser türünde en sık gözlemlenen genetik değişikliklerden biri haline getirmektedir (77). KRAS mutasyonlu akciğer ADK’leri, onları diğer alt tiplerden ayıran ayırt edici biyolojik özelliklere sahiptir. Bu tümörler sıklıkla artan invazivlik, apoptoza karşı direnç ve gelişmiş anjiyogenez sergiler. Ek olarak, geleneksel kemoterapi ve radyasyon tedavisine daha az yanıt verme eğilimi gösterirler ve bu da KRAS mutasyonları olan hastalarda daha kötü prognoza yol açar (78).

Akciğer ADK’de KRAS mutasyonlarının rolü kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Örneğin, yapılan bir çalışma KRAS mutasyonlarının, KHDAK tedavisinde yaygın olarak kullanılan EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine direnç ile ilişkili olduğunu göstermiştir (79). Diğer bir çalışma da, akciğer ADK’de KRAS mutasyonlarının klinik önemini vurgulamıştır. Çalışma, KRAS mutasyonu olan hastaların, EGFR mutasyonu olanlara kıyasla hedefe yönelik tedavilere daha zayıf yanıt verdiğini göstermiştir (80). Tarihsel olarak, akciğer ADK’de KRAS mutasyonlarını hedeflemek zorlu bir süreç olmuştur ancak son gelişmeler umut verici sonuçlar vermiştir. Örneğin, sotorasib gibi KRASG12C inhibitörlerinin geliştirilmesi, klinik deneylerde dikkate değer bir etkinlik göstererek, bu spesifik mutasyonu barındıran hastalar için umut sağlamıştır (42). G12C mutasyonlu KRAS’ın onkogenik sinyal yolları ve doğrudan inhibitörler tarafından inhibisyonu Şekil 2.8’de (81) özetlenmiştir.



Şekil 2.8. G12C mutasyonlu KRAS'ın onkogenik sinyal yolları ve inhibisyonu (81).

Araştırmacılar, mutant KRAS genini seçici olarak susturmak için RNA interferansı (RNAi) dahil olmak üzere yenilikçi yaklaşımlar geliştirmektedir. RNAi, KRAS mutasyonlu akciğer ADK'sinin tedavisi için umut verici bir yol sunan güçlü bir gen susturma tekniğidir. Mutant KRAS mRNA'yı spesifik olarak hedefleyebilen ve bozabilen, böylece onkogenik KRAS proteininin sentezini önleyebilen siRNA moleküllerinin kullanımını içerir (82). Bu yaklaşım hedefe yönelik bir tedavi olarak ümit vadetmektedir. Çalışmalar, mutant KRAS'ın siRNA aracılı yıkılmasının, hücre proliferasyonunda bir azalmaya, tümör büyümesinin inhibisyonuna ve akciğer ADK hücre hatlarında kemoterapiye duyarlılığın artmasına yol açabileceğini göstermiştir (83). Bu alanda araştırmalar devam etmektedir ve çok sayıda klinik öncesi ve klinik çalışma, KRAS mutant akciğer ADK için siRNA bazlı tedavilerin fizibilitesini ve etkinliğini araştırmıştır. Bu çalışmalar, siRNA taşıma sistemlerinin geliştirilmesine, uygun siRNA dizilerinin tanımlanmasına ve bunların tümör büyümesi ve hasta sonuçları üzerindeki terapötik etkilerinin değerlendirilmesine odaklanmaktadır (84).

Akciğer ADK'de KRAS mutasyonlarının inceliklerini anlamak, etkili terapötik stratejilerin geliştirilmesi için hayati öneme sahiptir. Araştırmacılar ve klinisyenler,

KRAS mutasyonlu akciğer ADK'sinin yarattığı zorluklara karşı koymak için hedefe yönelik tedavileri ve kombinasyon tedavilerini aktif olarak araştırmaya devam etmektedir (85).

2.2.3. TP53 Tümör Supresör Geninin Akciğer Adenokarsinomdaki Rolü

Tümör proteini 53 veya p53 olarak da bilinen TP53, akciğer ADK'de çok önemli rol oynar. TP53 geninde mutasyon meydana geldiğinde p53 proteini tümör baskılayıcı fonksiyonlarını kaybeder ve kanser gelişme riskinin artmasına neden olur. Bu mutasyonlar birçok kanser türünde ortak bir özelliktir ve akciğer ADK de bir istisna değildir (86). TP53 mutasyonları akciğer ADK bağlamında kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve kötü prognoz ve kemoterapiye karşı artan direnç ile ilişkili olduğu bulunmuştur (87). p53 mutasyonları ADK'lerin %50'sinde mevcuttur ve hayatta kalma oranının azalmasıyla ilişkilidir (75). p53 mutasyonlarının sıklığı, KHDAK tümör numuneleri arasında SHK'lerde en yüksek ve ADK'lerde ise daha düşüktür (13). p53'teki fonksiyon kaybı mutasyonları insan kanserlerinde, özellikle AK'de yaygın olmasına rağmen, mutant p53 proteinlerini fonksiyonel bir duruma dönüştüren kesin ilaçlar henüz elde edilebilmiş değildir (14).

TP53 genindeki mutasyonların, akciğer ADK de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı iyice belirlenmiş olsa da (88), mutant olmayan TP53 ile yapılan çalışmalarla kanserin ilerlemesindeki azaltıcı yönde etkileri gösterilmiştir. Örneğin bir çalışmada, p53 geninde bir homozigot delesyon (NCI-H358) veya bir yanlış anlamlı mutasyon (NCI-H23) taşıyan AK hücre hatlarına, mutant olmayan bir p53 tamamlayıcı DNA ekspresyon vektörünün transfer edilmesi, tümör hücresi büyümesini büyük ölçüde baskıladığı rapor edilmiştir (89). Diğer bir çalışmada ise, yabancı tip p53 geninin, p53'ün homozigot silinmesine sahip olan akciğer ADK hücre hattında rekombinant adenovirüs aracılı transferinin, bu hücrelerin kemoterapötik ajan olan sisplatine karşı duyarlılığını belirgin şekilde arttırdığını göstermiştir (90). Yabancı tip p53 geninin transferi KHDAK'de klinik deneylerde de araştırılmış ve apoptozu artırır yöndeki etkisi ortaya konmuştur (91). Başka çalışmalarda ise akciğer ADK hücre hattında p53 protein-protein ilişkisi hedef alınmış ve bu yaklaşımın hücre canlılığını azalttığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (92). Bu yaklaşımlar mutant olmayan p53 taşıyan akciğer ADK'de p53'ün hedef alınarak tedavi stratejilerini geliştirmek için umut olmaktadır.

2.3. Kolon Kanseri

Kolon kanseri, dünya çapında kanser ölümlerinin dördüncü önde gelen nedenidir ve ilerlemesine karmaşık bir dizi genetik varyasyon eşlik eder (93). Kolon kanserinin ilerlemesi dört gelişim aşamasında tanımlanabilir. Başlangıçta, 0 ve 1. aşamalarda tümör, "polip" adı verilen kolonun iç katmanlarında büyür. 2. evrede kanser kolon duvarlarının ötesine geçerek dış katmanlarda gelişmeye başlar ve "adenom" olarak tanındığı bu evrede lenf düğümlerine ilerlememiş olur. Tümör 3. evrede lenf bezlerine ulaşarak "karsinom"u oluşturur; sonunda 4. aşama vücutta metastaz yapar (94). Poliplerin invaziv karsinoma dönüşmesi yaklaşık 10-15 yıllık bir zaman diliminde neoplastik değişiklikler gerektirir (95).

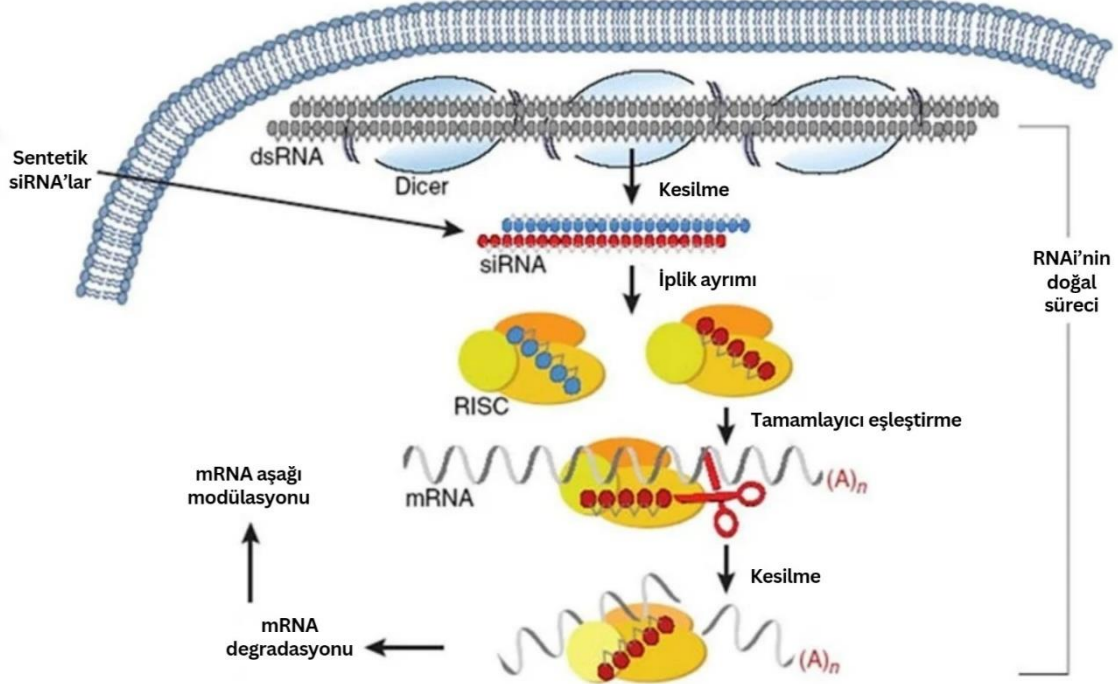
Kolon kanserinin yaklaşık %60-65'i sporadiktir ve çeşitli çevresel faktörlerin getirdiği genetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklanır (96). Bu değişikliklerin, tümör baskılayıcıların (APC ve p53 vb.) kaybını ve onkogenlerin (KRAS, SMAD4 vb.) fonksiyonunun artmasını içeren ardışık ilerleyen genetik olayları içerdiği düşünülür (97). Sporadik kolon kanseri vakalarının yaklaşık %40'ında KRAS mutasyonu görülmektedir (98). TP53 geni, tüm kolorektal kanser (KRK) vakalarının yaklaşık %60'ında mutasyona uğramıştır (99). TP53 geninde çoğu değişiklik ekson 5-8'de meydana gelir. p53 proteini durumunda mutasyonlar L2 ilmek, L3 ilmek ve ilmek-yaprak-sarmal yapısal alanlarında meydana gelir (100). Mutasyonlar, DNA'ya bağlanma yeteneğini kaybeden ve DNA hasarını onarmak için hedef genleri etkinleştiremeyen çok kararlı bir p53 proteinin oluşmasıyla sonuçlanarak kanserin ilerlemesine olanak tanır (101).

Tespit edilen mutasyonlar kolon kanserinde terapötik stratejiler geliştirilmesine yol gösterici olmuştur. Örneğin, adagrasib ve sotorasib ile hedefe yönelik tedavi son zamanlarda umut verici bir aktivite göstermiştir. Bu küçük moleküller, KRASG12C'yi hedef alırlar ve onu geri dönülemez şekilde engellerler (102). Diğer bir terapötik yaklaşım sürecinde, küçük moleküllerin farklı kombinasyonlarının etkili olduğu gösterilmiştir. Şu anda, adagrasib ve setuksimabın bir kombinasyonu ve bir başka yaklaşım olan sotorasib ve panitumumab kombinasyonu, faz III denemeleri için değerlendirilmektedir (103). Bunların dışında, siRNA kullanılıp mutant KRAS hedeflenerek yapılan bir çalışmada, KRAS ekspresyonunun güçlü ve spesifik bir şekilde baskılandığı, kolon kanseri hücrelerinde çoğalma ve canlılığın azaldığı, *in vitro* apoptozunun indüklendiği ve kolon kanseri ksenograft fare modellerinde tümör büyümesini önemli ölçüde yavaşlattığı gösterilmiştir (104).

Kolon kanserinde bir diğerk hedef ise TP53 geni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu anlamda bir çalışmada, mutant TP53 taşıyan kolon kanseri hücre hattında yabancı tip p53'ün yeniden ekspresyonunun büyüme inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (105). Diğerk bir çalışmada ise, TP53 mutasyonlu kolon kanserinin bir fare modelinde, yabancı tip TP53'ü kodlayan bir adenovirüsün deri altı tümörlere doğrudan enjeksiyonu (intratümöral enjeksiyon), kontrollerle karşılaştırıldığında tedavi edilen farelerde tümör gerilemesi ve hayatta kalma sürelerinin iki katına çıkmasıyla sonuçlandığı rapor edilmiştir (106). Mutant olmayan TP53 ve onun protein-protein ilişkisi birçok defa hedef alınmış ve kolon kanseri dahil birçok kanser türünde hücre büyümesinin engellenmesi ve apoptozun tetiklenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (92). Bu gelişmeler, yabancı tip p53 taşıyan kolon kanserinde p53'ün hedef alınacağı çalışmaların önünü açmıştır.

2.4. siRNA ve Kanserdeki Rolü

siRNA, 21-23 nükleotit uzunluğunda küçük RNA moleküllerinin bir alt sınıfıdır (107). Sentetik ve kodlamayan siRNA'lar, gen susturma için kullanılan genetik bir araçtır (108). siRNA'nın işlevini yeterince yerine getirebilmesi için hedef mRNA ile tam bir eşleşmeye ihtiyacı vardır (109). Eşleşme sağlayan siRNA, mRNA bozunması yoluyla hedef geninin transkripsiyon sonrası seviyede ekspresyonunu baskılar (110). Aktivasyon için siRNA, tek sarmallı RNA (ssRNA) üretmek üzere bir RNA ile indüklenen susturma kompleksine (RISC) yerleştirilir. Bu ssRNA, RISC kompleksi için bir antisens kılavuzu olarak işlev görür. Tamamlayıcı bir mRNA hedefine bağlanarak ssRNA, RISC kompleksi içinde yer alan Argonaute (Ago) proteinleri aracılığıyla bozulmaya neden olur (111, 112). RNAi olarak bilinen bu mekanizma ilk olarak *Caenorhabditis elegans*'ta, eksojen olarak aktarılan çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) gen ekspresyonunda geçici bir baskılamaya neden olduğu zaman keşfedilmiştir (113). siRNA'nın fonksiyonu ve işlev mekanizması Şekil 2.9'de (114) gösterilmiştir.



Şekil 2.9. RNAi'nin moleküler mekanizması (114).

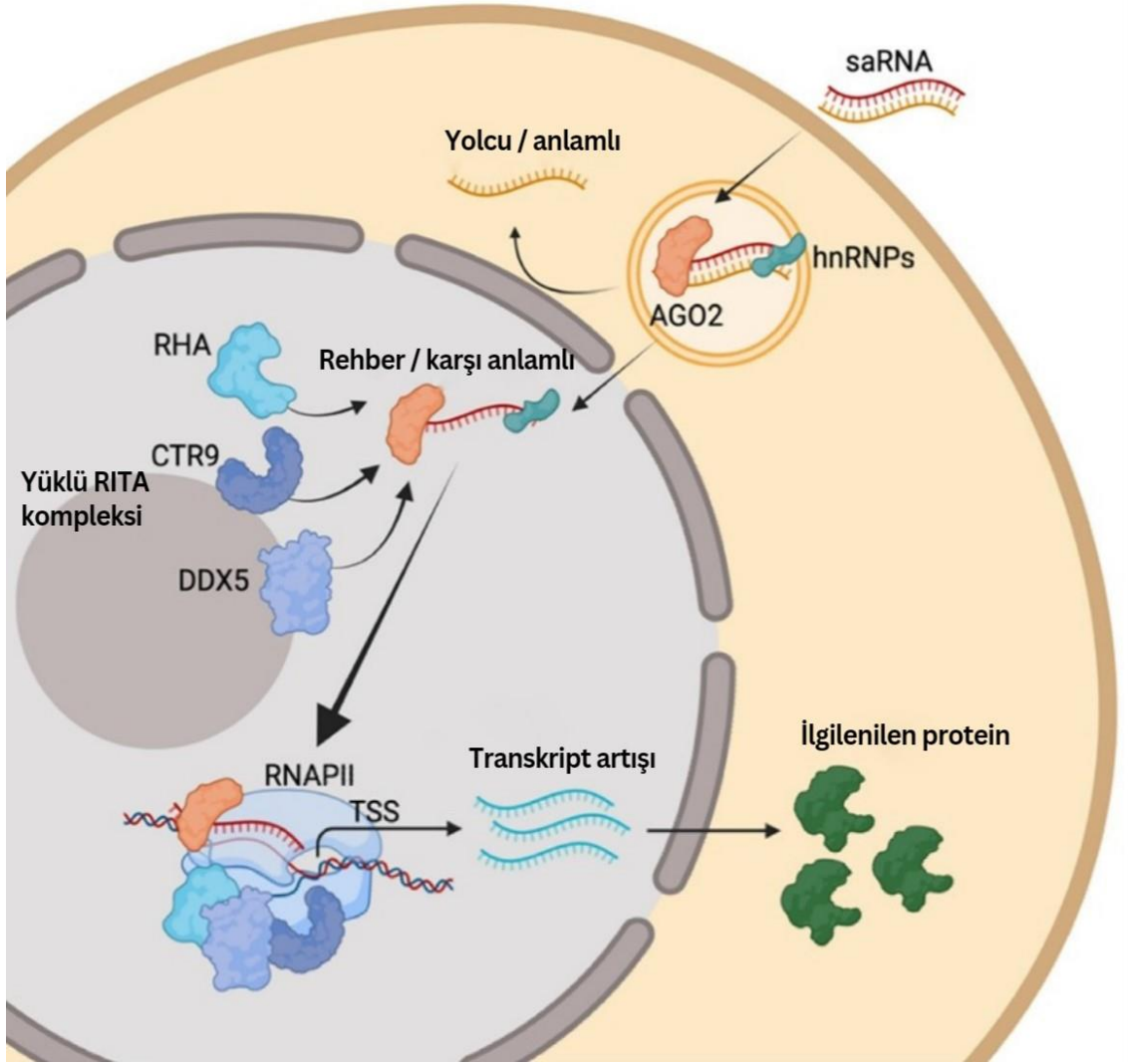
İlk sentetik siRNA'nın uygulanması, memeli hücrelerinde gen düzenleme için siRNA'nın kullanıldığı 2001 yılına kadar uzanır (115). Diğer çalışmalar, antikanser tedavisinde gen susturma için siRNA'yı kullanarak takip etmiştir (116, 117). siRNA'nın seçici hedefleme yeteneğinden dolayı, farklı kanserlerin tedavisinde kullanılmasına büyük ilgi gösterilmiştir (118). Çeşitli kanser karşıtı siRNA bazlı ilaçlar klinik deneylere girmiştir ve birçoğu klinik öncesi araştırmalarda aktif olarak aranmaktadır (119). Klinik deneylerdeki siRNA bazlı terapötiklerin neredeyse üçte biri kanser tedavileri içindir. siRNA'lar, hücre büyümesi, anjiyogenez, metastaz ve/veya ilaç direncinde rol oynayan genlerin ekspresyonuna müdahale ederek kanserle ilişkili genleri susturmayı amaçlar. Onkogenler, mutasyona uğramış tümör baskılayıcı genler ve tümörün ilerlemesine katkıda bulunan diğer genler, gen susturmanın potansiyel hedefleridir (11).

siRNA ile hedeflenen genler arasında KRAS mutant geni çok kez yer almıştır. KRAS, tüm kanserler arasında yüksek mutasyon oranına sahip en iyi bilinen onkogendir ve KRK ve KHDAK dahil olmak üzere bir dizi yüksek derecede ölümcül kanserle ilişkilidir ve bu sebeple kanserde hedef olarak ilgi çekici olmuştur (120). Örneğin bir çalışmada, KRAS'ı hedef alan siRNA, KRAS mutant akciğer ve kolon ADK hücre hatlarında canlılığı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada AK modelinde KRAS siRNA tedavisi, birincil tümör büyümesinde ve uzak metastatik hastalıkta önemli

azalmalar gösterdiği ve kolon kanseri modelinde KRAS siRNA'nın, deri altı tümör büyümesinin yanı sıra karaciğer metastazlarının büyümesini de önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (121). Mutant KRAS'ı hedef alan bazı çalışmalar KRAS siRNA ile kombine yaklaşım ortaya koymuştur. Örneğin bir çalışmada, miR-34a ve KRAS siRNA ile kombinasyon tedavisi, ortalama akciğer tümörünün ilk hacminin %63'ü kadar gerilemesi ve apoptotik hücrelerin artmasıyla sonuçlandığı rapor edilmiştir ve hem sisplatin hem de miR-34a ve KRAS siRNA kombinasyonundan oluşan formülasyonla tedavi edilen fareler, tek tedaviyle tedavi edilen farelerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha uzun süre hayatta kaldığı gösterilmiştir (16). Mutant KRAS'ı hedefleyen ilaçlar uzun yıllardır geliştirilmekte ve klinik deneylerde değerlendirilmektedir. Bu çabalar, KRAS proteininin kendisini hedeflemenin yanı sıra, translasyon sonrası modifikasyonlarını, membran lokalizasyonunu, protein-protein etkileşimlerini ve alt sinyal yollarını da içermektedir (9). Fakat, KRAS hedefli ilaç çalışmalarının çoğu başarısız olmuştur (9). Tüm bu bilgiler KRAS mutant kanserler için bu geni hedef alan spesifik yeni kombinasyon terapötik yaklaşımlara ihtiyacın olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

2.5. saRNA ve Kanserdeki Rolü

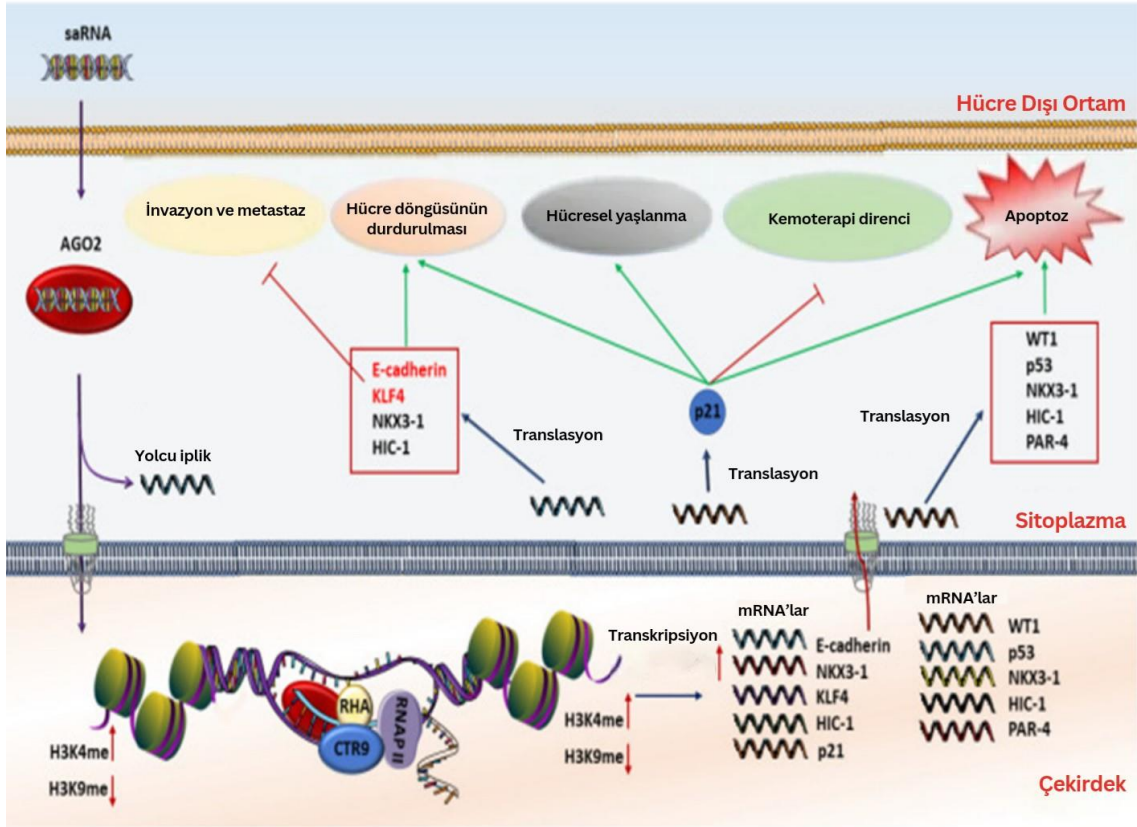
Küçük aktive edici RNA'lar (saRNA'lar), hem transkripsiyonel hem de epigenetik seviyelerde gen promotörlerinde seçilen dizileri hedefleyerek, hedefe özgü gen ekspresyonunu arttıran küçük çift sarmallı RNA'lardır (122). saRNA'lar her ipliğin 3' ucunda 2 nükleotit çıkıntısı ile birlikte tipik olarak 21 nükleotit uzunluğundadır ve memelilerde RNAi'ye benzer şekilde Ago2'ye bağımlı bir şekilde etki gösterir (123). Ancak RNAi'den farklı olarak, saRNA aracılı gen manipülasyonu yalnızca hücrelerin çekirdeğinde yer alır ve gen ekspresyonunu düzenlemek için transkripsiyonel elemanları toplayacak şekilde hareket eder (124). saRNA'nın RNA ile İndüklenmiş Transkripsiyonel Aktivasyon (RITA) kompleksi olarak bilinen kofaktör proteinlerinin toplanmasını sağlayarak kromatinin yeniden modellenmesine ve modifikasyonuna yardımcı olduğuna ve böylelikle hedef genin artan ekspresyonuna neden olduğuna inanılmaktadır (125, 126). saRNA'nın öngörülen etki mekanizması Şekil 2.10'de (127) gösterilmiştir.



Şekil 2.10. RNAa'nın moleküler yolağı (127).

Bu gen manipülasyonu, RNA bazlı gen terapötikleri için yeni bir yol açan RNA aktivasyonu (RNAa) olarak bilinir (128). RNAa başlangıçta tesadüfen keşfedilmiş (124) ve sonrasında günümüze kadar bir çok çalışmada gen transkripsiyonunu artırmaya yönelik farklı yaklaşımların geliştirilmesinde fonksiyon almıştır. Dahası, giderek artan kanıtlar, saRNA'ların yalnızca gen fonksiyonunu incelemek ve transkripsiyonel aktiviteyi düzenlemek için yeni bir yaklaşım sağlamakla kalmayıp aynı zamanda başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı klinik tedavi için büyük bir potansiyel vadettiğini göstermektedir (122). Kanserle ilişkili genler, hücre döngüsünü ve çoğalmasını modüle etmek, hücre yaşlanmasını ve apoptozu tetiklemek, kanser hücresi istilasını ve göçünü engellemek ve kemoterapi direncini tersine çevirmek için saRNA'lar tarafından düzenlenebilmektedir (122).

saRNA aracılı RNAa, kanser baskılayıcı genler hedef alınarak kanserle mücadelede yeni ve güçlü bir yöntem sağlayabilir (129). saRNA'nın kanserde hedef aldığı bazı genler ve yolaklar Şekil 2.11'de (130) gösterilmiştir. Tümör baskılayıcı genlerin RNAa yoluyla hedefe yönelik aktivasyonunun, mesane, akciğer, meme, böbrek, pankreas, lenfoma ve prostat kanseri dahil olmak üzere farklı kanser hücreleri üzerinde *in vitro* anti-büyüme veya *in vivo* antitümör etkileri ortaya çıkardığı gösterilmiştir; bu da RNAa'nın kanser için terapötik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir (131). Örneğin bazı çalışmalarda, C/EBP α (CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein α) saRNA ile hedef alınarak pankreas kanseri (132) ve karaciğer kanserinde (133) kansere karşı terapötik yaklaşım olarak olumlu sonuçlar alınmıştır. Dahası, C/EBP α hedef alan MTL-CEBPA adlı saRNA, karaciğer kanseri olan hastalar için klinik denemesindedir ve saRNA terapötikine ilişkin ilk insan çalışmasını temsil etmektedir (134-136). Diğer bazı çalışmalarda ise, saRNA ile CDKN1A (Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A, p21) geni hedef alınarak, mide kanseri hücrelerinde çoğalmayı, istilayı ve göçü engellediği (137), T24 insan mesane kanseri hücrelerinde G1 fazı durmasını ve apoptozu indüklediği (138), KRK hücre hatlarında G0/G1'de hücre döngüsü durmasına ve apoptoza neden olduğu, hücrelerde anti-proliferasyon etki oluşturduğu, koloni oluşumunda azalmaya ve hücre yaşlanmasına sebep olduğu, ayrıca farelerde kolorektal hücre kaynaklı tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği (139), farelerde geliştirilen insan KRK'nin ortotopik bir modelinde antitümör etkinliği gösterdiği (131), *in vitro* koşullarda A549 akciğer ADK hücre hattında sisplatine olan duyarlılığı arttırdığı ve hücre büyümesini engellediği ve *in vivo* koşullarda ise A549 ksenograft farelerde tümör büyümesini önemli ölçüde engelleyebileceği (22), rapor edilmiştir. Kanserde saRNA ile hedeflenen genler C/EBP α ve p21 ile sınırlı olamamakla beraber birçok çalışmada farklı genler dahil edilerek araştırmalar devam etmektedir (130, 140).



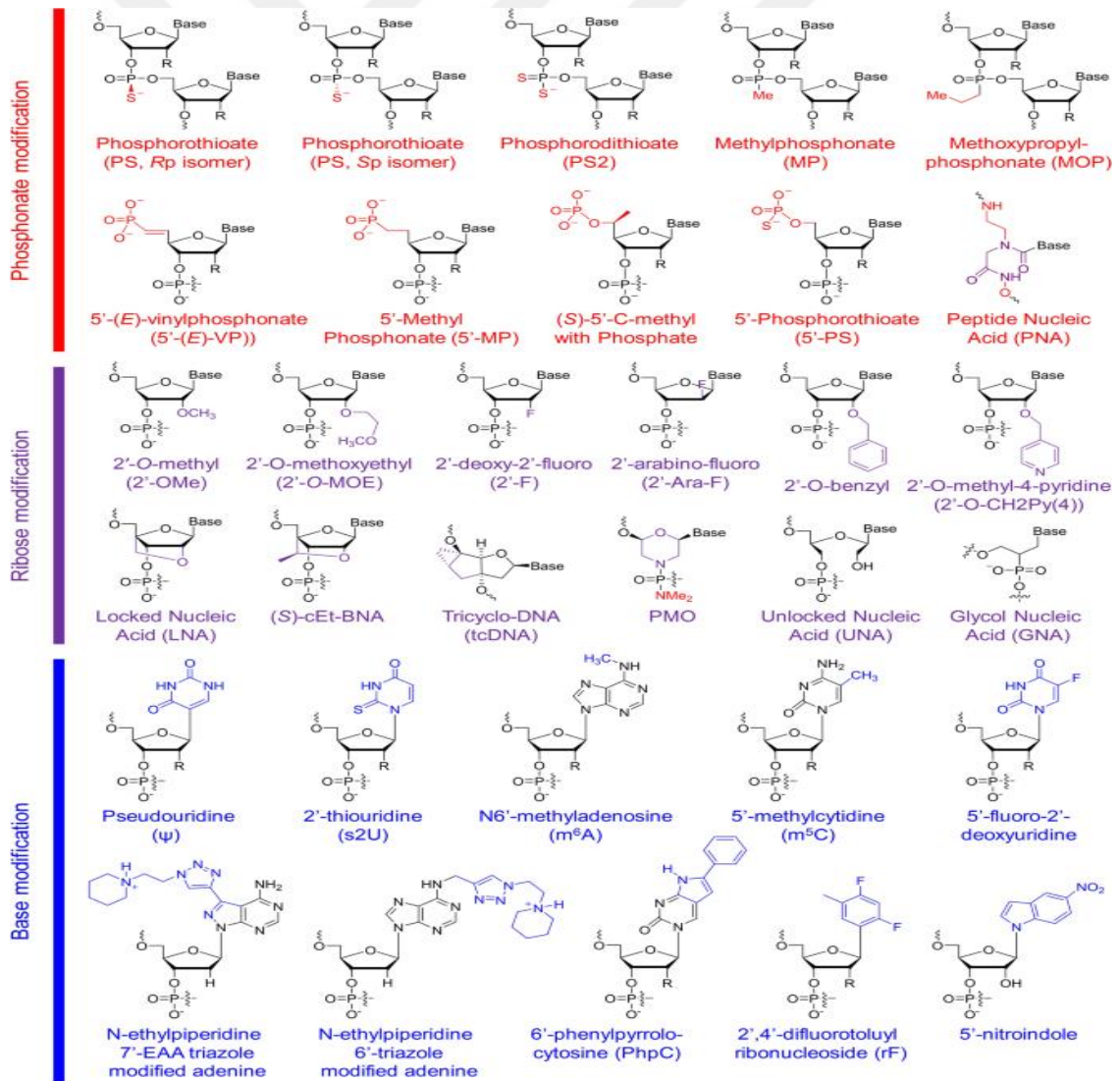
Şekil 2.11. saRNA bazlı terapötiklerin antikanser mekanizması (130).

2.6. Küçük RNA Modifikasyonu ve Etkili Taşınımı

Birçok çaba gösterilmesine rağmen, nükleik asidin sistemik iletimi, ilgili dokuya taşınması konusunda karmaşık zorluklarla karşı karşıyadır (141). Tedavinin etkili olabilmesi için ilk ve en önemli adım küçük RNA'nın enjeksiyon bölgesinden tümör hücrelerine iletilmesini sağlamaktır. Küçük RNA'lar sistemik olarak uygulandığında aktif bölgeye ulaşmalarını engelleyen fizyolojik ve biyolojik engelleri aşması gerekir (142-144). Bu bariyerler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, intravasküler bozulma, bağışıklık sistemi tarafından tanınma, renal klirens, tümör dokusuna nüfuz etme ve tümör hücrelerine alımdaki engeller ve tümör hücrelerine girdiğinde endozomal kaçış yer alır (119). Bu zorlukların üstesinden gelmek ve küçük RNA'ların hedef hücrelerine ulaşmasını kolaylaştırmak için kimyasal modifikasyonlar ve taşıma formülasyonları gereklidir (145).

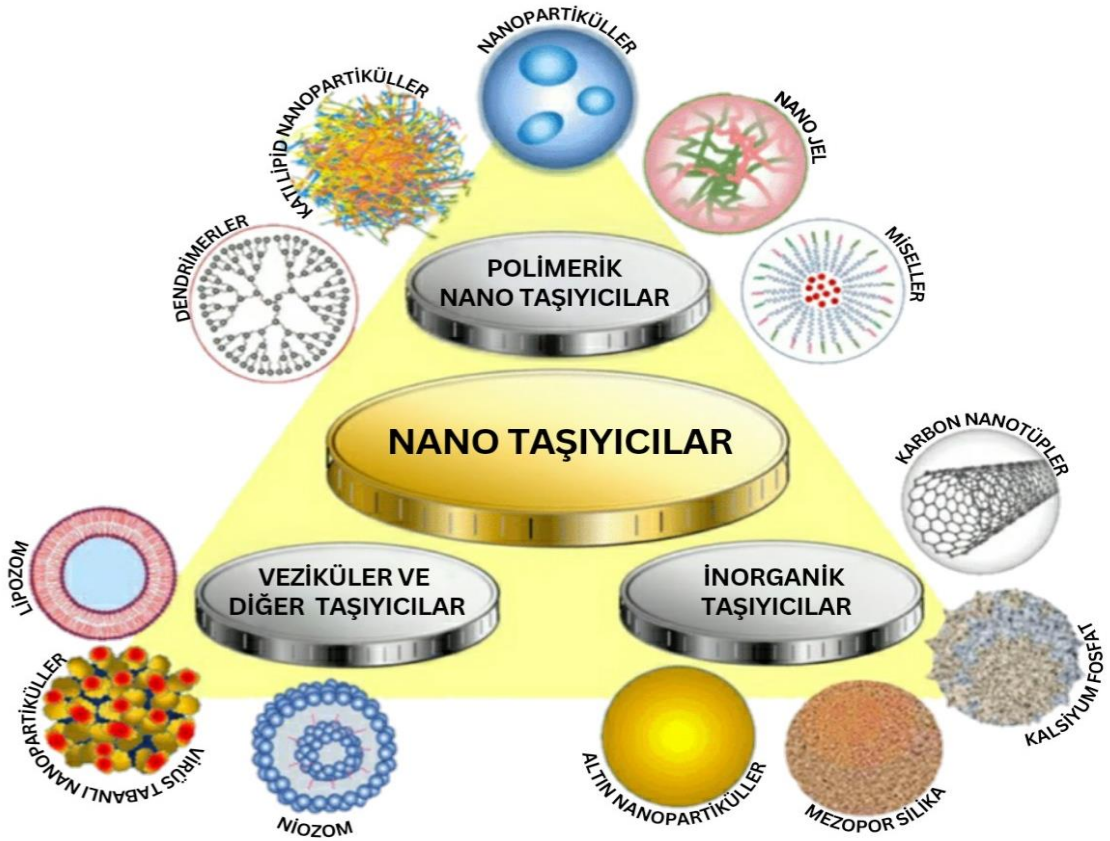
Mevcut biyoorganik tekniklerle, oligonükleotitler tek iplikçikler halinde sentezlenebilir ve modifiye edilebilir, daha sonra istenen çift iplikli hale getirilebilir. Yapay modifikasyonları içeren özelleştirilebilir oligonükleotit sentezi, çıplak küçük RNA'nın uygulanmasıyla ilişkili sorunların üstesinden gelerek RNA terapötiklerinin

potansiyelini artırabilir (119). Küçük RNA'nın işlevsel etkinliğinin potansiyelini arttırmaya yönelik yöntemlerden biri, küçük RNA'nın RNA omurgası üzerinde kimyasal modifikasyonlar uygulamaktır. RNA'nın en yaygın değişikliklerinden biri, riboz omurgasındaki 2' pozisyonunun modifikasyonudur. Bu modifikasyonlar arasında 2'-O-metil (2'-Ome) (146), 2'-O-metoksietil (2'-MOE) (147) ve 2'-deoksi-2'-floro (2'-F) (148) ve çok daha fazlası yer alır. Küçük RNA'larda uygulanan bazı modifikasyonlar Şekil 2.12'de (149) gösterilmiştir. Bu kimyasal modifikasyonlar nükleazlara karşı stabiliteyi artırır ve termal stabiliteyi geliştirir (119). Dahası, 2'-F ile modifiye edilmiş küçük RNA'nın modifiye edilmemiş RNA'ya göre *in vitro* modelde immün uyarımı önemli ölçüde azalttığı ve bazı durumlarda *in vitro* ve *in vivo* aktivitede iyileşme gösterdiği belirtilmiştir (150). Ayrıca, 2'-F ile modifiye edilmiş RNA ile yapılan çalışmalar hücre lizati (151) ve plazmada (152) stabilitenin arttığını göstermiştir.



Şekil 2.12. Küçük RNA'larda gerçekleştirilen bazı modifikasyonlar (149).

Küçük RNA'nın sistemik iletimi ve hedefine ulaşmak adına fizyolojik engellerin aşılması için modifikasyonun yanı sıra taşıma sistemlerine de ihtiyaç vardır (153, 154). Taşıma sistemleri, küçük RNA'nın serum stabilitesini sağlamak, bağışıklık sistemi uyarımını engellemek, serum proteinleri ve kanser dışı hücrelerle etkileşimi azaltmak, böbrek temizliğiyle mücadele etmek, kanser dokularına erişim sağlamak için damar geçirgenliğini arttırmak, hücre girişini ve endozomal kaçışı sağlamak ve düşük toksisiteye neden olmak gibi özelliklere sahip olmalıdır (155). Geliştirilmiş nanoteknoloji platformlarının ortaya çıkışı, küçük RNA hedefli salınımına yönelik çok işlevli taşıma formülasyonlarının ilerlemesini arttırmaktadır. Lipozomlar, miseller, eksozomlar, sentetik organik polimerler (polietilenimin, dendrimer, siklodekstrin) ve inorganik malzemeler (karbon nanotüpler, kuantum noktaları, altın nanopartiküller (AuNP'ler)) gibi çeşitli doğal ve sentetik nanotaşıyıcılar, başarılı küçük RNA iletimi için tasarlanmıştır ve bunlardan birkaçı klinik değerlendirme altındadır (155). Bazı nanotaşıyıcılar Şekil 2.13'de (156) gösterilmiştir. Bunların arasından, AuNP'ler, yüksek düzeyde biyouyumlulukları, kolay sentezleri, yüksek yüzey-hacim oranı ve basit yüzey işlevselleştirmeleri nedeniyle küçük RNA taşıma sistemi olarak büyük potansiyel göstermektedir (157, 158).



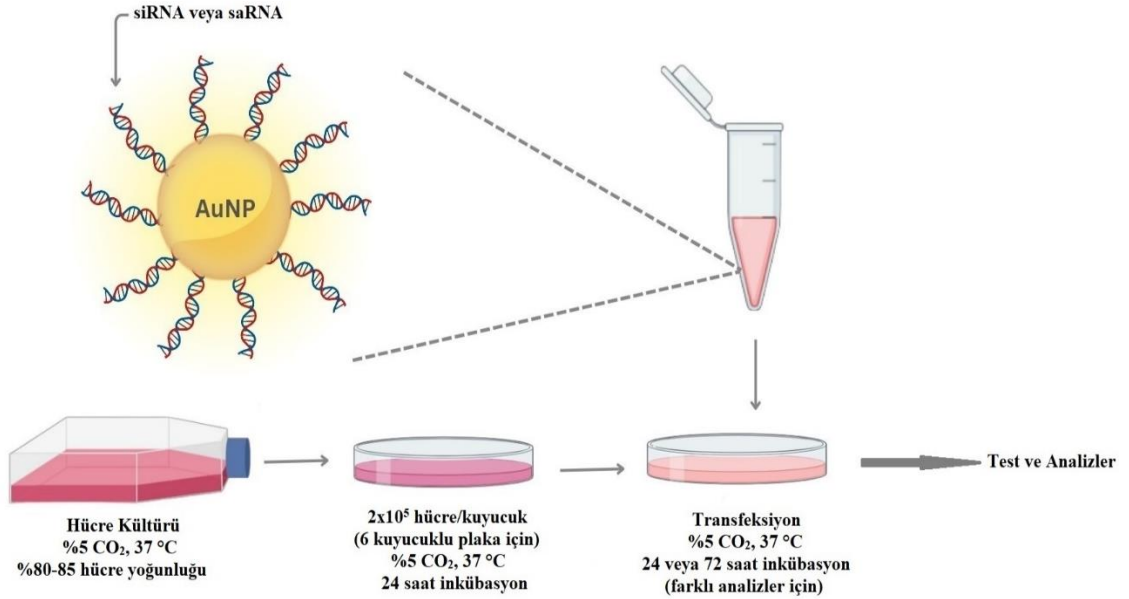
Şekil 2.13. İlaç salınımı için nanotaşıyıcıların sınıflandırılması (156).

AuNP'lerin sentezi ve özelliklerine odaklanan araştırmalar, nanotıp ve nanoteknolojilerin ileri alanlarına doğru genişlemiştir (159, 160). Kükürt, amino veya hidroksil grupları kimyasal veya fiziksel etkileşimler yoluyla AuNP'lerin yüzeyine bağlanır (161) ve çeşitli AuNP konjugasyonlarına konu olur. AuNP'ler genellikle küçük organik molekül katmanları tarafından farklı çözeltilerde stabilize edilir. Bu süreçte sitrat, sudaki AuNP'ler için hem indirgeyici bir maddeyi hem de bir stabilizasyon maddesini temsil eder (162). Albümin, sitrat korumalı AuNP'lere kendiliğinden bağlanabilir ve ortaya çıkan nanosistemler, çok bileşenli ilaç sistemi uygulamaları için ilgi çekicidir (163, 164).

Protein stabilize, suda çözüdür AuNP'ler biyomedikal ve biyoteknolojide önemli bir yere sahiptir (165). Tamamlayıcı bir şekilde, AuNP işlevselleştirmesi ve endojen proteinlerle kaplanması, AuNP bazlı nanosistemlerin dolaşım süresini, biyoyumluluğunu, seçici alımını ve biyolojik dağılımını artırabilir (166, 167). Serum albumini (SA), plazmada en çok bulunan proteindir ve karboksil, amino ve sülfidril gibi yüklü fonksiyonel gruplara sahip çok sayıda amino asit içerir. Bu durum, nanopartiküller de dahil olmak üzere terapötik sistemlere bağlanmak için çeşitli bağlanma bölgelerine sahip olmasını sağlar ve ayrıca SA, bir besin ve amino asit kaynağı olarak tümör hücrelerindeki spesifik reseptörler yoluyla hücre alımına maruz kalabilir ve yüklü ajanların biyoyararlanımı artırılabilir (168). Böylece, AuNP'ler SA molekülleri ile kaplandığında küçük RNA'ları taşıyabilen ve bunları hedef bölgelere ulaştırabilen çok işlevli nanoplatformların ortaya çıkmasını sağlayabilir (169). Son zamanlarda, biyomedikal uygulamalar için umut verici bir nanoplatformun başlangıcını temsil eden AuNP-SA tabanlı sistemlerle ilgili çok sayıda çalışma rapor edilmiştir ve AuNP-SA konusunda daha fazla gelişmenin mümkün olduğu ve gelecekte bu sistemlerin klinik olarak deneneceği ifade edilmektedir (168).

3. MATERYAL VE METOT

Çalışmada, AuNP sentezi gerçekleştirildikten sonra sentezlenen AuNP'lerin küçük RNA'lar ile konjugasyonları yapıldı ve hücreler konjugatlar ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası test ve analizler gerçekleştirildi. Çalışmanın iş akış planı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmanın iş akış planı.

3.1. Hücre Hatları

Çalışmada, temel olarak mutant KRAS (p.G12S c.34G>A) ve yabancı tip p53 taşıyan A549 (ATCC CCL-185) insan akciğer ADK hücre hattı kullanıldı. Çalışmamıza konu olan kombine terapötik stratejinin kontrol edilmesi amacıyla mutant KRAS (p.G13D c.38G>A) ve yabancı tip p53 taşıyan HCT116 (ATCC CCL-247) insan kolorektal karsinom hücre hattı çalışmaya dahil edildi. Çalışma sırasında tüm deneysel aşamalar her iki hücre hattı için eşit şartlarda uygulandı.

3.2. Hedef Gen ve Proteinler

Çalışmada temel olarak TP53 ve KRAS genleri ve bu genlerin ifade ettiği proteinler hedef olarak seçildi. Bununla beraber p53 ve KRAS proteinlerinin alt yollarında görevli olan bazı proteinler ve onları kodlayan genler de hedef olarak belirlendi. Hedef genler Tablo 3.2'de verilmiştir.

3.3. Küçük RNA Moleküllerinin Tasarlanması ve Sentezi

siKras (KRAS siRNA.923) (16), sap53 (dsP53-285) (18-20), kontrol siRNA (siScramble.923) (16) ve kontrol saRNA (dsControl) (18-20) molekülleri daha önceden yayımlanmış olan çalışmalardaki sekans bilgileri kullanılarak sentezlendi. Sentez ve temin işlemleri biyoteknoloji firması (SUGENOMICS) aracılı gerçekleştirildi. Küçük RNA (siKras, sap53, kontrol siRNA ve kontrol saRNA) moleküllerinin hedef ve sekans bilgileri Tablo 3.1’de verilmiştir. Sentez sırasında her bir küçük RNA molekülü riboz şekerinin 2’inci karbonunda flor modifikasyonu (2'-F) bulunduracak şekilde modifiye edildi. Buna ek olarak, küçük RNA’ların AuNP üzerine konjugasyonlarının sağlanabilmesi için anlamlı zincir (sense strand)’in 5’ ucuna disülfit (SS) bağı eklendi. Hücre kültürü ortamında ve transfekte edilmiş hücrelerde siRNA'ların nükleaz direncini artırması adına RNA moleküllerinin her iki zincirinin 3’ ucuna 2 adet dT (deoksitimidin) çıkıntısı eklendi (115). Her bir RNA molekülü tek zincir halinde sentezlendiğinden, hibridizasyon reaksiyonu ile anlamlı zincir (sense strand) ve karşı anlamlı zincir (antisense strand) tek bir çift zincirli RNA (dsRNA) molekülü haline getirildi. Hibridizasyon reaksiyonu her iki tamamlayıcı tek zincir RNA molekülünün eşit hacim ve konsantrasyonda bağlanma tamponu (annealing buffer, 10 mM Tris (pH 7.5-8.0), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, PanReac AppliChem) içerisinde 5 dakika boyunca 95 °C’de ısı bloğu (Digital Dry Baths/Block Heaters, Thermo Scientific) ile inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında yavaşça soğumaya bırakılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. Küçük RNA’ların hedef ve sekans bilgileri.

Küçük RNA	Hedef Gen	Hedef Bölge	Karşı anlamlı sekans (5’- 3’)	Anlamlı sekans (5’ – 3’)
siKras	KRAS	mRNA	CUUAGAAAAAGAAGGUUCC[dTdT]	GGAAACCUUCUUUUUCUAAG[dTdT]
Kontrol siRNA	-	-	GCCUAAUAAUAGGAAUACGU[dTdT]	ACGUAUCCUUAUUUUAGGC[dTdT]
sap53	p53	Promotör	UUAGGAAGGCUUCCGUAA[dTdT]	UUACGGAAAGCCUCCUAA[dTdT]
Kontrol saRNA	-	-	UCUACUGUCACUCAGUAGU[dT][dT]	ACUACUGAGUGACAGUAGA[dT][dT]

3.4. AuNP Sentezi ve Karakterizasyonu

1 mM 20 nm AuNP sentezi daha önce literatürde rapor edildiği şekliyle gerçekleştirildi (170). Altın sentezinde kullanılan tüm cam malzemeler %20'lik kromik asit ile yıkanıp ve steril dH₂O ile durulandıktan sonra 3 saat boyunca 180 °C'lik pastör fırınında (Nüve) kurutuldu. 0.08 gram Tetrakloroaurik(III) asit trihidrat (%99, Alfa Easar) tartıldı ve 200 ml steril ultra saf su (Millipore, Milli-Q Direct-Q® 5 UV Water Purification System) içerisinde manyetik ısıtıcı-karıştırıcı ile karıştırılıp kaynatıldı ve çözümlenerek sarı renkli bir çözelti haline getirildi. Kaynama başladıktan sonra 20 ml 38.8 mM trisodyum sitrat dihidrat (Thermo Fisher) sulu çözeltisi hızlı bir şekilde sarı renkli altın çözeltisi üzerine eklendi. Trisodyum sitrat dihidrat sulu çözeltisi eklendikten çok kısa bir süre sonra çözeltinin rengi önce berraklaştı, daha sonra siyaha döndü ve en sonunda şarap kırmızısı rengini aldı. Kaynama birkaç dakika daha devam ettirilip ardından manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında karıştırılarak soğumaya bırakıldı ve böylece AuNP sentezi tamamlandı. Sonrasında, 0.45 µm'lik filtre (Isolab) ile filtrelendi ve sentezlenen AuNP'lerin boyutları spektrofotometre ölçümü (400-600 nm arası 1 nm'lik dalga boyu ile absorbans ölçümü) (Agilent Technologies, BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer) ve Zeta boyut ve potansiyel (Anton Paar, Litesizer 500) analizleri ile teyit edildi. Sentezlenen AuNP konsantrasyonu 3 kat arttırıldı. Bu işlem için, Amicon® Ultra-50k Santrifüj Filtresi (Merck KGaA) kullanılarak 3750 rpm'de 10 °C'de 30 dakika santrifüj edildi ve filtre içerisinde elde edilen AuNP'ler ilk çözelti hacminin 1/3 oranında steril ultra saf su içerisinde çözümlenip Beer-Lambert Yasası ($A = \epsilon lc$, A: absorbance, ϵ : molar tükenme katsayısı ($M^{-1} cm^{-1}$), l: küvetin ışık yolu uzunluğu (cm), c: konsantrasyon (M)) kullanılarak 20 nm AuNP için $\epsilon = 8.78 \times 10^8 M^{-1} cm^{-1}$ (171) eşitliği ile son konsantrasyon hesaplandı ve konjugasyon işlemine kadar 4 °C'de saklandı.

3.5. Konjugasyon

Küçük RNA'lar sentez sırasında anlamlı zincirin 5' ucuna ilave edilmiş SS bağları Tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP, Sigma Aldrich) ile sülfidril (tiyol, SH) gruplarına indirgenerek, AuNP üzerine konjuge edildi. İlk olarak, 10 µM küçük RNA üzerindeki SS bağları, 100 µM TCEP bulunduran 400 µL'lik sulu çözelti içerisinde, 25°C'de 300 rpm'de (ESCO, ProvoCell™ Incubator Block 1) 1 saat boyunca inkübe edilerek SH gruplarına indirgendi. Daha sonra, 3 kat konsantre hale getirilmiş 600 µL AuNP çözeltisi içerisine eklendi ve 25°C'de 300 rpm'de gece boyu (12-16 saat) inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, inkübasyon koşulları değiştirilmeden (25°C'de 300 rpm'de) 0.1 M PBS (phosphate

buffered saline: fosfat tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4, Biowest) ile final konsantrasyonu 0.01 M olana kadar her 10 dakika da bir 10 µL PBS toplamda 12 defa eklenerek tuzla yaşlandırma (salt aging) işlemi gerçekleştirildi. 12 defa 0.1 M PBS eklendikten sonra, +4 °C'de 300 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, konjugasyona tabi tutulan AuNP-küçük RNA çözeltisi 14,000 rpm'de 20 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellet 1 ml 20 mM sodyum fosfat tamponu (5.6 mM NaH₂PO₄, 14.4 mM Na₂HPO₄, %5 BSA, %0.25 Tween 20 ve %10 sükröz) içerisinde çözüldü ve 14.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 1 kez daha tekrar edildi ve sonunda AuNP-küçük RNA konjugat pelleti 1 ml 20 mM sodyum fosfat tamponu içerisinde çözülerek transfeksiyon işlemine kadar +4 °C'de saklandı. Konjugasyon işleminin tamamlanmasının ardından, AuNP-küçük RNA konjugatlarının tekrardan spektrofotometre ölçümü ve zeta boyut ve potansiyel analizleri yapıldı ve ilk sentez sırasında elde edilen AuNP ile karşılaştırılarak konjugasyonlar doğrulandı. AuNP konsantrasyonu başına konjuge olmuş küçük RNA konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı.

Konjuge olmuş küçük RNA (µM) / AuNP (mM) = [((((konjugasyon öncesi küçük RNA absorbans değeri (A₂₆₀)-(konjugasyon sonrası konjuge olmamış küçük RNA absorbans değeri (A₂₆₀))) / (konjugasyon öncesi küçük RNA absorbans değeri (A₂₆₀))) x (ilk küçük RNA konsantrasyonu (µM))) / (teorik olarak hesaplanmış AuNP konsantrasyonu (mM))].

3.6. Hücre Kültürü

-80 °C'de kriyojenik tüplerde saklanan 1 ml hücre çözeltileri (A549 ve HCT116) üzerine hızlı bir şekilde 37 °C'de ılıtılmış bir miktar besi yeri (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) eklenerek çözdürüldü ve toplamda 5 ml olacak şekilde steril falkon tüplere (Isolab) alındı. 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj (Nüve, NF800R) işlemi uygulandı ve üstte kalan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Tüp içerisinde kalan hücre pelleti üzerine 5 ml %10 fetal sıgır serumu (FBS, Capricorn), L-glutamin (Gibco) ve %1 penisilin/streptomisin (Gibco) ile desteklenmiş DMEM besi yeri eklenerek 25 cm²'lik (Greiner CELLSTAR®) kültür flasklarına transfer edildi. İverted mikroskop (BAB, BAB-TERS) yardımıyla flask içerisindeki hücreler kontrol edildikten sonra %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde (ESCO, CCL-170B-8) 37 °C'de kültüre edildi. Kültür boyunca, 24 saatlik periyodlar halinde, inverted mikroskop yardımıyla hücrelerin tutunması, gelişimi ve kontaminasyon açısından kontrolleri yapıldı. Hücreler, flaskın

tabanının yaklaşık %80-85'ini kapladıktan sonra pasaj için hazırlandı. Bu işlem için, eski besi yeri steril serolojik pipet (Greiner CELLSTAR®) ile flasktan uzaklaştırıldıktan sonra hücreler Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen 2 ml PBS ile 3 defa yıkandı. Yıkama işleminin ardından, hücrelerin üzerine 1.25 ml %0.25'lik 1X Tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco) eklenerek 37 °C'lik inkübatörde yaklaşık 5 dk boyunca bekletildi ve hücrelerin flask tabanından kalkmaları sağlandı. Flask tabanından kalkmış hücrelerin üzerine 3.75 ml taze besi yeri eklendikten sonra steril falkon tüpe alınarak 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı ulaştırıldıktan sonra hücre pelleti üzerine yeterli miktarda taze besi yeri eklenerek süspanse edildi ve diğer deneysel uygulamalarda kullanıldı.

3.7. Transfeksiyon

Pasajlama işlemi ile hazırlanmış hücre solüsyonları hücre sayım işlemleri JuLI™ Br (NanoEntek) cihazı ile yapıldıktan sonra 6'lı hücre plakalarına (Thermo Fisher) 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapıldı ve toplam sıvı hacmi her bir kuyucuk için 3 ml olacak şekilde serum ilave edilmiş (%10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin) taze besi yeri eklendi. Hücreler, 24 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin yapışması kontrol edildi ve hücrelerin flaska tutunmalarının gerçekleşmesinin ardından hücre hatlarına 1.5 ml transfeksiyon besi yeri ortamında (serum içermeyen DMEM ortamı) küçük RNA'ların son konsantrasyonu 25, 50 ve 100 nM olacak şekilde AuNP-küçük RNA konjugatları uygulandı ve 6-8 saat boyunca %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde 37 °C de inkübe edildi. Daha sonra transfeksiyon besi yeri ortamına içerisinde iki kat FBS içeren (%20) eşit miktarda (1.5 ml) DMEM ortamı eklendi ve 24 saat oluncaya kadar inkübe edildi. Ardından, son durumdaki besi yeri ortamı taze hazırlanmış normal büyüme ortamı (%10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş DMEM) ile değiştirilerek transfeksiyon işlemi tamamlandı. Transfeksiyon işlemleri her iki hücre hattına (A549 ve HCT116) aynı şekilde uygulandı. Transfeksiyon işlemleri ile, hücreler aynı hücre hattı için farklı uygulama gruplarına ayrıldı. Kısaca hücre grupları; kontrol grubu (transfekte edilmemiş hücreler), AuNP (mock grubu, yalnızca AuNP ile transfekte edilmiş hücreler), siKras (AuNP-siKras konjugatı ile transfekte edilmiş hücreler), sap53 (AuNP-sap53 konjugatı ile transfekte edilmiş hücreler), kontrol saRNA (AuNP-kontrol saRNA konjugatı ile transfekte edilmiş hücreler), kontrol siRNA (AuNP-kontrol siRNA konjugatı ile transfekte edilmiş hücreler), siKras + sap53 (AuNP-siKras-sap53 birlikte konjugatı ile transfekte edilmiş hücreler) ve kontrol siRNA + kontrol saRNA (AuNP-kontrol siRNA-kontrol-saRNA birlikte konjugatı ile transfekte edilmiş hücreler) olarak

adlandırıldı. Transfeksiyon işleminin ardından hücreler diğer deneysel aşamalarda kullanıldı.

3.8. RNA İzolasyonu ve Real Time qPCR Analizi

Hücreler AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edildikten 72 saat sonra 6 kuyucuklu kültür plakasından besi yeri uzaklaştırıldı ve plakanın her kuyucuğu 3'er defa PBS ile yıkandı. Ardından, yıkanmış olan her kuyucuğa 500'er µL %0.25'lik tripsin çözeltisi eklenerek 37 °C'lik inkübatörde 5 dakika bekletildi ve hücrelerin kültür plakası tabanından kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1'er ml taze besi yeri eklenerek steril eppendorf tüplere (Microcult) alındı. 1000 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj (Sigma 1-14 mikrosantrifüj) işleminden sonra her bir hücre pelletinden toplam RNA, RNA izolasyon kiti (Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit) kullanılarak üretici firma protokolüne uygun olarak izole edildi. Toplam RNA miktarı spektrofotometre (Denovix DS-11 FX+ Spectrophotometer/Fluorometer) kullanılarak tayin edildi. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentez kiti (ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit) kullanılarak 1 µg toplam RNA ile cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA'lar StepOne™ Plus v2.3 yazılımı ile StepOnePlus™ Real-Time PCR Sisteminde (Applied Biosystems [AB]) çalışıldı. RT-qPCR sırasında her bir reaksiyon için 100 ng cDNA, 10 µL 2X Master Mix (Promega, GoTaq® qPCR Master Mix), 200 nM ileri ve geri primer (Sentebiolab) ve toplam hacmi 20 µL tamamlayacak şekilde nükleaz içermeyen ddH₂O kullanıldı. PCR başlangıcında çift sarmal olan cDNA'lar 95 °C'de 10 dakika boyunca ısıtılıp tek zincir haline getirildikten sonra, reaksiyon 40 döngü boyunca 95 °C'de 10 saniye, 60°C'de 30 saniye (ileri ve geri primerler için üretici firmanın sunmuş olduğu sıcaklık değerlerinin ± 5 °C sıcaklık değerleri denererek primer bağlanma sıcaklığı optimize edildi ve tüm primerler için ortak olarak 60 °C belirlendi) olarak uygulandı. RT-qPCR'da kullanılan primerlerin sekans bilgileri Tablo 3.2'de verilmiştir. qPCR işleminden sonra, StepOne™ Plus v2.3 yazılımı her reaksiyon için bir C_T değeri üretti ve bu C_T değerleri kullanılarak hedef genler ifadelenmeleri açısından analiz edildi. İlgili genlerin relatif ekspresyonlarının farklı hücre grupları arasında karşılaştırılması livak metodu (2^{-ΔΔCT}) ile yapıldı (172). İnternal kontrol olarak GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz) geni referans alındı. Hesaplama sırasında öncelikle $[2^{CT(kontrol\ grubu\ hedef\ gen)}/2^{CT(kontrol\ grubu\ GAPDH)}]^{-1} = 2^{-\Delta CT}$ formülü ile kontrol grubu için hedef gen (p53, KRAS vb.)/GAPDH oranı hesaplandı. Daha sonra kontrol grubunun her bir hedef geni için ayrı ayrı olmak üzere 2^{-ΔCT} değerleri toplamının kontrol deney tekrar sayısına bölünmesiyle kontrol grubunda her bir hedef gen

için ortalama $2^{-\Delta CT}$ değeri hesaplandı. Bunun beraberinde aynı hücre hattına ait her hücre grubu için de kontrolde olduğu gibi her bir hedef gen için $2^{-\Delta CT}$ değeri hesaplandı. Son olarak, aynı hedef genlerin farklı hücre grupları arasında kontrol grubuna kıyasla rölatif ifadelenmeleri, aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi.

$$2^{-[\Delta CT(\text{her bir hücre grubu}) - \Delta CT(\text{kontrol grubu ortalaması})]} = 2^{-\Delta \Delta CT}$$

Tablo 3.2. RT-qPCR primer sekansları.

Gen	İleri primer (5'- 3')	Geri primer (5' – 3')
p53	CAGCACATGACGGAGGTTGT	TCATCCAAATACTCCACACGC
p21	GCCCAGTGGACAGCGAGCAG	GCCGGCGTTTGGAGTGGTAGA
Siklin D1	GCTGCGAAGTGGAAACCATC	CCTCCTTCTGCACACATTTGAA
CDK4	ATGGCTACCTCTCGATATGAGC	CATTGGGGACTCTCACACTCT
CDK6	TCTTCATTACACCGAGTAGTGC	TGAGGTTAGAGCCATCTGGAAA
GAPDH	TCCCATCACCATCTTCCA	CATCACGCCACAGTTTCC
KRAS	AAGAGACCAAGGTTGCAAGG	TGAGCTATCCAAACTGCCCT
AKT	GGGTGCATTTGAGAGAAGCC	CACACCCGGAGAACAACACTG
ERK1	AAGATCAGCCCCTTCGAACA	CCATCAGGTCTCTGCACAATG
ERK2	ACACCAACCTCTCGTACATCGG	TGGCAGTAGGTCTGGTGCTCAA
BAX	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
PUMA	ACGACCTCAACGCACAGTACGA	CCTAATTGGGCTCCATCTCGGG
BCL2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
Kaspaz-3	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG	GCATCGACATCTGTACCAGACC
Kaspaz-9	GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT	CAACGTACCAGGAGCCACTCTT

3.9. Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizi

AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edilmiş hücrelerden 72 saat sonra, %1 proteaz ve fosfataz (Thermo Fisher) eklenmiş RIPA tamponu (1X RIPA: 50 mM Tris HCl (PanReac AppliChem), 150 mM NaCl (PanReac AppliChem), %1 (v/v) NP-40 (PanReac AppliChem), %0.5 (w/v) sodyum deoksikolat (PanReac AppliChem), 1.0 mM EDTA (PanReac AppliChem) ve %0.1 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS, PanReac AppliChem), pH 7.4) kullanılarak protein izolasyonu yapıldı. 6 kuyucuklu hücre plakasında her bir kuyucuk için ($\sim 1 \times 10^6$ hücre), 500 μ L 1X RIPA tamponu kullanıldı. Hücreler, protein izolasyonundan önce üç defa soğuk 1 ml PBS (pH 7.4) ile yıkandıktan sonra, soğuk RIPA tamponu ile 6 kuyucuklu kültür plakasından uzaklaştırıldı ve steril eppendorf tüplere alındı. Eppendorf tüpler 20 dakika boyunca +4 °C'de hafifçe çalkalandı. Daha sonra, eppendorf tüpler +4°C'de 13,000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemiyle elde edilen süpernatant kısmında çözülmüş proteinler daha sonraki deneysel aşamalarda kullanılmak üzere -80°C 'de saklandı. Western Blot analizi için, hücrelerden izole edilen proteinlerin BCA testi (ABP Biosciences) kullanılarak üretici firmanın sağlamış olduğu protokol ile miktar tayini yapıldı. Eşit miktarlarda protein (25-40 μ g) içeren solüsyon eşit hacimde 2X Laemmlı tamponu (0.125M Trizma baz, %4 SDS, %20 gliserol (PanReac AppliChem), %10 2-merkaptolanol (PanReac AppliChem) ve %0.02 bromophenol blue (PanReac AppliChem)) ile karıştırılıp jele yüklendikten sonra, SDS-PAGE yürütme sistemi (Mini-PROTEAN Tetra Cell) kullanılarak SDS yürütme tamponu (%3.03 Trizma baz, %14.44 Glisin (PanReac AppliChem) ve %1 SDS) içerisinde 120 V'de 90 dakika boyunca yürütme işlemi uygulandı. SDS-PAGE jel içerikleri Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'de belirtilmiştir. SDS-PAGE sonrası proteinler jelden Western Blot protokolüne uygun transfer tamponu kullanılarak (1X yarı-kuru transfer tamponu: (%0.58 Trizma baz, %0.29 glisin, %0.037 SDS ve %20 metanol (Sigma)), Western Blot transfer sistemi (Thermo Scientific™ Pierce™ Power Blotter) ile 7 dakika boyunca 25 V ve 1.3 A uygulanarak PVDF (GVS) membrana transfer edildi. Protein transfer edilmiş membran 1.5 saat boyunca oda sıcaklığında 1X TBS-T (Tris buffered saline: Tris tamponlu tuz çözeltisi; 20 mM Trizma baz, 150 mM NaCl, %0.1 Tween 20 (PanReac AppliChem), pH 7.4) ile hazırlanmış %5 yağsız süt tozu (Serva) solüsyonuyla hafifçe çalkalanarak blokladı. Bloklama işleminden sonra, membranlar, membran yüzeyindeki hedef proteinlere spesifik antikolar (birincil antikor, 1X TBS-T içerisinde hazırlanmış %5 süt tozu solüsyonunda 1/1000 oranında seyreltilmiş) ile gece boyunca +4 °C'de (ya da 2 saat oda

sıcaklığında) hafifçe çalkalanarak (37 rpm, Daihan) inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, membranlar 1X TBS-T ile 20'şer dakika boyunca 3'er defa yıkandı. Ardından, membranlar birincil antikora bağlanacak olan HRP (At Kestanesi Peroksidazı) enzimi ile konjuge edilmiş ikincil antikor (1X TBS-T içerisinde hazırlanmış %5 süt tozu solüsyonunda 1/10000 oranında seyreltilmiş) ile 1.5 saat boyunca hafifçe çalkalanarak oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranlar yeniden 1X TBS-T ile 20'er dakika boyunca 3'er defa yıkandı ve hedef proteinler, HRP enziminin sübstratı olan ECL (Enhanced Chemiluminescence, Geliştirilmiş Kemilüminesans) (Santa Cruz) görüntüleme kiti kullanılarak immünokimyasal olarak görüntülenip (G:BOX Chemi XRQ, Syngene) GeneTools yazılımı (Syngene) ile analiz edildi. İnternal kontrol olarak GAPDH proteinini kullanıldı. Analiz sırasında GeneTolls yazılımının sunmuş olduğu protein bant yoğunlukları kıyaslanarak farklı hücre grupları arasında her bir protein ekspresyon ilişkisi rölatif olarak değerlendirildi. Değerlendirme sırasında öncelikle kontrol grubu için hedef protein (p53, KRAS vb.)/GAPDH protein bant yoğunluğu oranı hesaplandı. Daha sonra kontrol grubunun her bir hedef proteinini için ayrı ayrı olmak üzere bu oranların toplamının kontrol deney tekrar sayısına bölünmesiyle kontrol grubunda her bir hedef protein için ortalama protein bant yoğunluk oranı hesaplandı. Bunun beraberinde aynı hücre hattına ait her hücre grubu için de kontrolde olduğu gibi her bir hedef protein için protein bant yoğunluk oranı hesaplandı. Son olarak, aynı hedef proteinlerin farklı hücre grupları arasında kontrol grubuna kıyasla rölatif ifadelenmeleri, aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi; rölatif protein ifadelenmesi = [(Hedef gen protein yoğunluğu oranı)_(her bir hücre grubu)/(Hedef gen protein yoğunluğu oranı)_(kontrol grubu ortalaması)]. Western Blot analizlerinde kullanılan birincil ve ikincil antikor bilgileri Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.3. SDS-PAGE ayırıcı jel içeriği.

Ayrıcı jel (%10)	
Kimyasal (içerik)	µL (mikrolitre)
1.5 Tris HCl pH 8.8	1250
ddH ₂ O	2000
%30 akrilamid/bis akrilamid (37.5:1)	1670
%20 SDS	25
%10 APS	25
TEMED	2.5

Tablo 3.4. SDS-PAGE istifleme jeli içeriği.

İstifleme jeli (%5)	
Kimyasal (içerik)	µL (mikrolitre)
1M Tris HCl pH 6.8	375
ddH ₂ O	2088
%30 akrilamid/bis akrilamid (37.5:1)	506
%20 SDS	15
%10 APS	15
TEMED	1.5

Tablo 3.5. Western Blot analizlerinde kullanılan antikor bilgileri.

Antikor	Şirket	Katalog Numarası
Anti-p53	Abcam	ab131442
Anti-p21	Elabscience	E-AB-66357
Anti-Cyclin D1	Elabscience	E-AB-63508
Anti-CDK4	Elabscience	E-AB-13989
Anti-CDK6	BT-LAB	BT-AP14883
Anti-GAPDH	BT-LAB	BT-AP15693
Anti-KRAS	Elabscience	E-AB-32152
Anti-AKT	Elabscience	E-AB-30465
Anti-p-AKT	Elabscience	E-AB-20802
Anti-ERK1	Elabscience	E-AB-31372
Anti-ERK2	Elabscience	E-AB-31372
Anti-p-ERK1	Elabscience	E-AB-70310
Anti-p-ERK2	Elabscience	E-AB-70310
Anti-BAX	Elabscience	E-AB-40495
Anti-PUMA	Elabscience	E-AB-67059
Anti-BCL2	Elabscience	E-AB-15522
Anti-Kaspaz-3	Elabscience	E-AB-60646
Anti-K-Kaspaz-3	Elabscience	E-AB-60646
Anti-K-Kaspaz-3	Elabscience	E-AB-60646
Anti-K-Kaspaz-9	Elabscience	E-AB-60760

3.10. Hücre Canlılığı Testi

Aynı hücre hattına ait farklı hücre gruplarında hücre canlılığı CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) kiti kullanılarak üretici firmanın protokolü uygulanıp tespit edildi ve gruplar arasında karşılaştırıldı. 6'lı hücre plakasında küçük RNA'lar ile transfekte edilen hücreler 24 saat sonunda eski besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra 3'er defa 2 ml PBS ile yıkandı. Ardından, yıkanmış her bir kuyucuğa 500'er µL %0.25'lik tripsin çözeltisi eklenerek 37 °C'lik inkübatörde 5 dakika bekletildi ve hücrelerin plakanın tabanından kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1'er ml taze besi yeri eklenerek steril eppendorf tüplere alındı. 1000 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj işleminden sonra hücreler 96 kuyucuklu plakada 1000 hücre/kuyu yoğunluğunda ekildi. Hücre büyümesi 5 gün boyunca günlük olarak değerlendirildi. Ölçüm sırasında, her kuyunun bir önceki besi yeri ortamı, 10 uL CellTiter-Blue® solüsyonu ile önceden karıştırılmış 100 uL taze besi yeri ortamı ile değiştirildi. Ardından, 37°C'de 2 saat inkübasyondan sonra, her bir kuyunun 570 ve 600 nm'de absorbanı Biotek Epoch Mikroplaka Spektrofotometre ile tespit edildi ve her ölçüm sonrasında besi yeri ortamı taze büyüme ortamı (%10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş DMEM) ile yeniden değiştirildi. Hücre canlılığının 5 günlük değerlendirilmesi adına her bir deneysel gruba ait günlük ölçümlerden elde edilen 570 nm'deki absorban değerinden 600 nm'deki absorban değeri çıkarılarak gruplar arasındaki hücre canlılığı farklılıkları günlük olarak tespit edildi. Ayrıca, hücre canlılık oranları
$$\frac{((O2 \times A1) - (O1 \times A2))}{((O2 \times P1) - (O1 \times P2))} \times 100$$
 formülü kullanılarak belirlendi. Bu formülde; O1 = 570 nm'de oksitlenmiş resazurin'in molar tükenme katsayısı, O2 = 600 nm'de oksitlenmiş resazurin'in molar tükenme katsayısı, A1 = 570 nm'de test gruplarının (yalnızca AuNP (mock grubu) veya AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edilmiş hücre grubu) absorbanı, A2 = 600 nm'de test gruplarının (yalnızca AuNP (mock grubu) veya AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edilmiş hücre grubu) absorbanı, P1 = 570 nm'de pozitif büyüme kontrol grubu (transfekte edilmemiş hücre grubu) absorbanı, P2 = 600 nm'de pozitif büyüme kontrol grubu (transfekte edilmemiş hücre grubu) absorbanı.

3.11. Hücre Döngüsü Analizi

Hücreler AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edildikten 72 saat sonra 6 kuyucuklu kültür plakasından besi yeri uzaklaştırıldı ve plakanın her kuyucuğu 3'er defa PBS ile yıkandı. Ardından, yıkanmış olan her kuyucuğa 500'er µL %0.25'lik tripsin

çözeltisi eklenerek 37 °C'lik inkübatörde 5 dakika bekletildi ve hücrelerin kültür plakası tabanından kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1'er ml taze besi yeri eklenerek steril eppendorf tüplere alındı. 1000 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj işleminden sonra her bir hücre pelleti eppendorf tüplerde hafifçe çalkalanarak %70 etanol (Sigma) ile çözüldü ve 4°C'de 2 saat boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonrasında hücreler, 7 dakika boyunca santrifüj edildi ve PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, 500 µL PBS içerisinde seyreltilmiş 0.1 mg/mL RNase A ile 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Santrifüj edilerek elde edilen hücre pelleti, daha sonra PBS içerisinde hazırlanmış 0.05 mg/ml propidyum iyot (PI) ile yeniden süspansiyon edildi ve ışıktan korunarak 4°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Son olarak, PI ile inkübe edilmiş hücreler BD Accuri™ C6 Plus akış sitometresi (BD Life Sciences) kullanılarak analiz edildi. Aynı hücre hattına ait her hücre grubu başına maksimum 10.000 olay (hücre) analiz edildi ve hücre kalıntıları, ileri saçılım (FSC) ve yan saçılım (SSC) ışık geçişine dayalı olarak analizden çıkartıldı. PI, mavi bir lazer (488 nm) tarafından uyarıldı ve FL2 kanalında 585/40nm bandpass filtre kullanılarak floresan ışımaya tespit edildi. Elde edilen sonuçlar, BD Accuri™ C6 Plus yazılımı (BD Life Sciences) kullanılarak analiz edildi. Analizler neticesinde, AuNP-küçük RNA konjugatlarının hücre döngüsü üzerindeki etkisi değerlendirilerek aynı hücre hattına ait farklı hücre grupları arasında hücre döngüsü evreleri karşılaştırıldı.

3.12. Apoptoz ve Nekroz Testleri

İlgili testler, apoptoz kiti kullanılıp üretici firma protokollerine bağlı kalınarak yapıldı (BioLegend, APC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI). Hücreler AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edildikten 72 saat sonra 6 kuyucuklu kültür plakasından besi yeri uzaklaştırıldı ve plakanın her kuyucuğu 3'er defa PBS ile yıkandı. Ardından, yıkanmış olan her kuyucuğa 500'er µL 0.25'lik tripsin çözeltisi eklenerek 37 °C'lik inkübatörde 5 dakika bekletildi ve hücrelerin kültür plakası tabanından kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1'er ml taze besi yeri eklenerek steril eppendorf tüplere alındı. 1000 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj işleminden sonra her bir hücre pelleti eppendorf tüpler içerisinde kit tarafından sağlanan 100 µL Annexin V bağlama tamponu ile yeniden süspansiyon edildi ve üzerine 5 µL Anneksin V-FITC konjugatı (90 µg/ml) ve 10 µL PI (0.5 mg/ml) boyası eklenip hafifçe çalkalandıktan sonra 15 dakika boyunca ışık görmeyen ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından son durumdaki hücre solusyonunun üzerine 400 µL daha Annexin V bağlama tamponu

eklendi ve apoptoz ve nekrozu saptamak için hücre örnekleri BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer cihazı kullanılarak analiz edildi. Aynı hücre hattına ait her hücre grubu başına maksimum 10.000 olay (hücre) analiz edildi ve hücre kalıntıları, ileri (FSC) ve yan saçılım (SSC) ışık geçişine dayalı olarak analizden çıkartıldı. FITC ve PI, mavi bir lazer (488 nm) tarafından uyarıldı ve FITC FL1 kanalında 533/30 nm, PI ise FL2 kanalında 585/40nm bandpass filtre kullanılarak floresan tespit edildi. Akış sitometrisi tarafından üretilen veriler, BD Accuri™ C6 Plus yazılımı kullanılarak farklı hücre uygulama gruplarında AuNP-küçük RNA konjugatlarının apoptozu tetikleyip tetiklemediği analiz edilerek aynı hücre hattına ait farklı hücre grupları arasında apoptoz oranları karşılaştırıldı.

3.13. Koloni Oluşturma Deneyi

Koloni oluşturma deneyi daha önce literatürde rapor edildiği şekliyle uygulandı (18). Hücreler AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edildikten 24 saat sonra 6 kuyucuklu kültür plakasından besi yeri uzaklaştırıldı ve plakanın her kuyucuğu 3'er defa PBS ile yıkandı. Ardından, yıkanmış olan her kuyucuğa 500'er µL %0.25'lik tripsin çözeltisi eklenerek 37 °C'lik inkübatörde 5 dakika bekletildi ve hücrelerin kültür plakası tabanından kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1'er ml taze besi yeri eklenerek steril eppendorf tüplere alındı. 1000 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj işleminden sonra her bir hücre pelleti taze besi yeri ortamı ile yeniden süspanse edildi ve JuLI™ Br cihazı ile hücre sayımı yapıldıktan sonra yaklaşık 1000 hücre/kuyucuk olacak şekilde yeni bir steril 6 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna ekildi. Hücre büyümesini sürdürmek için kültür ortamı her 3 günde bir değiştirildi. 10. günde, koloniler 3'er defa steril PBS ile yıkandıktan sonra 15 dakika boyunca soğuk %100 metanol ile fikse edildi. Ardından, metanol uzaklaştırıldı ve koloniler oda sıcaklığında 30 dakika boyunca %25 metanol ve %75 ddH₂O içeren solüsyon ile hazırlanmış %0.5 kristal viyole (Merck) ile boyandı. Koloniler, fazla boya uzaklaştırılınca kadar steril distile su ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Koloni oluşum hızı, aynı hücre hattına ait her farklı hücre grubu için ayrı ayrı olmak üzere aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Koloni oluşum hızı (%) = (koloni sayısı/ekilen hücre sayısı) × 100. Hesaplama ile elde edilen veriler aynı hücre hattına ait farklı hücre grupları ile karşılaştırılarak AuNP-küçük RNA transfeksiyon uygulamasının hücre hatlarında koloni oluşturma hızı üzerindeki etkisi analiz edildi.

3.14. Yara İyileşmesi Deneyi

Yara iyileşmesi deneyi daha önce literatürde uygulandığı şekliyle gerçekleştirildi (19). Hücreler AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edildikten 72 saat sonra 6 kuyucuklu kültür plakasından besi yeri uzaklaştırıldı ve plakanın her kuyucuğu 3'er defa PBS ile yıkandı. Ardından, yıkanmış olan her kuyucuğa 500'er µL %0.25'lik tripsin çözeltisi eklenerek 37 °C'lik inkübatörde 5 dakika bekletildi ve hücrelerin kültür plakası tabanından kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1'er ml taze besi yeri eklenerek steril eppendorf tüplere alındı. 1000 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj işleminden sonra her bir hücre pelleti taze besi yeri ortamı ile yeniden süspanse edildi ve JuLI™ Br cihazı ile hücre sayımı yapıldıktan sonra yaklaşık 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde yeni bir steril 6 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna ekildi. Gece boyunca inkübasyondan sonra, birleşik hücre tabakaları, 10 µL (Thermo Fisher) steril pipet ucu ile çizildi. Daha sonra yapışmayan hücreler sterilize edilmiş PBS ile 3 defa yıkandı ve kuyucuklara taze besi yeri ortamı ilave edildi. Çizimin neden olduğu boşluk alanı, hücre görüntüleme sistemi (JuLI™ Br) ile izlendi. Her kuyucukta üç rastgele örtüşmeyen alan, çizimden 0, 12 ve 24 saat sonra fotoğraflandı. İki doğrusal bölge arasındaki çizik genişliği, yara kapanmasının kapasitesini değerlendirmek için ölçüldü. Ölçümler sonunda, aynı hücre hattına ait farklı hücre grupları arasında çizik genişliğinin kapanması açısından karşılaştırması yapıldı. Değerlendirme sırasında aynı hücre hattına ait her hücre grubu için 12. ve 24. saat sonrasındaki çizik genişliği ölçümleri, 0. saat çizik genişliğine oranlanarak gruplar içinde yara kapanma oranı hesaplandı. Her hücre grubu arasında yara kapanma oranlarının hesaplanması sırasında aşağıdaki formül kullanıldı.

Yara kapanma oranı (%) = $(100 - ((12. \text{ veya } 24. \text{ saat çizik genişliği}) / (0. \text{ saat çizik genişliği})) \times 100)$. Daha sonra aynı hücre hattına ait farklı hücre grupları arasında yara kapanma oranları karşılaştırıldı.

3.15. Migrasyon ve İnvazyon Deneyleri

Migrasyonu (hücresel göçü) incelemek için polikarbonat membran (Transwell® Permeable Supports, Polycarbonate (PC) Membrane, 3428) kullanılarak Boyden çemberi testi uygulandı. İnvazyonu (hücresel istilayı) incelemek için ise Boyden çemberi testi, polikarbonat membran üzerine 1 ml hücre dışı matris (200-300 µg/mL) (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix, 354234) eklendikten sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edilerek hazırlanıp uygulandı. Her iki deneysel uygulama sırasında hücre plakasının deneysel amaçlı kullanılacak her bir kuyucuğuna 8 µm por çapına sahip steril

polikarbonat membran (invazyon için üzerine hücre dışı matris eklenmiş membran) yerleştirildi ve kuyucuklar 2 farklı bölmeye ayrıldı. Membran altında kalan bölmeye serum ilave edilmiş besi yeri (2600 µL), membran üzerine ise transfekte edilmiş hücre içeren serum ilavesiz taze besi yeri (1500 µL) eklenerek uygulamalar gerçekleştirildi. İlk olarak, hücrelerin polikarbonat membran üzerine eklenmesinden önce hücreler AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edildikten 72 saat sonra 6 kuyucuklu kültür plakasından besi yeri uzaklaştırıldı ve plakanın her kuyucuğu 3'er defa PBS ile yıkandı. Ardından, yıkanmış olan her kuyucuğa 500'er µL %0.25'lik tripsin çözeltisi eklenerek 37 °C'lik inkübatörde 5 dakika bekletildi ve hücrelerin kültür plakası tabanından kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1'er ml taze besi yeri eklenerek steril eppendorf tüplere alındı ve 1000 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen her bir hücre pelleti serum ilavesiz taze besi yeri ortamı ile yeniden süspanse edildi ve hücre sayımı yapıldı. Sayımı yapılan hücreler invazyon ve migrasyon deneyleri için 10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde serumsuz besi yeri içerisinde membranlar (invazyon için üzerine hücre dışı matris eklenmiş membranlar) üzerine eklendi ve 24 saat boyunca %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde 37 °C'de kültüre edildi. Süre sonunda, membran üstündeki (serumsuz besi yeri kısmında kalan) membran boyunca hareket etmeyen hücreler steril pamuk yardımıyla uzaklaştırıldı. Ardından, membran boyunca hareket eden hücreler, soğuk %100 metanol ile 15 dakika boyunca fikse edildikten sonra, %0.5'lik kristal viyolet ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında boyandı. Son olarak, membranlar steril distile su ile yıkayıp fazla boya uzaklaştırıldı ve membranın serumlu besi yerine bakan kısmındaki hücreler mikroskop altında sayıldı. Sayma işlemi ile elde edilen hücre sayıları kullanılarak aynı hücre hattına ait farklı uygulama grupları arasında migrasyon ve invazyon kapasiteleri karşılaştırıldı. Karşılaştırma işlemleri sırasında aşağıdaki formül kullanıldı.

Migrasyon veya invazyon (%) = [(herbir uygulama grubunda membranı geçen hücre sayısı)/(kontrol grubunda membranı geçen hücre sayısı)] x 100.

3.16. İstatistiksel Analiz

Her deneysel uygulama için aynı hücre hattına ait kontrol hücre grubu (transfekte edilmemiş hücre grubu) ile test gruplarının (yalnızca AuNP (mock grubu) veya AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edilmiş hücre grubu) arasında, ve siKras ve sap53 tekli transfeksiyon grupları ile AuNP-siKras-sap53 birlikte transfeksiyon grubu arasında deneysel süreçlerden elde edilmiş olan sonuçlar karşılaştırılarak kıyaslama verileri elde

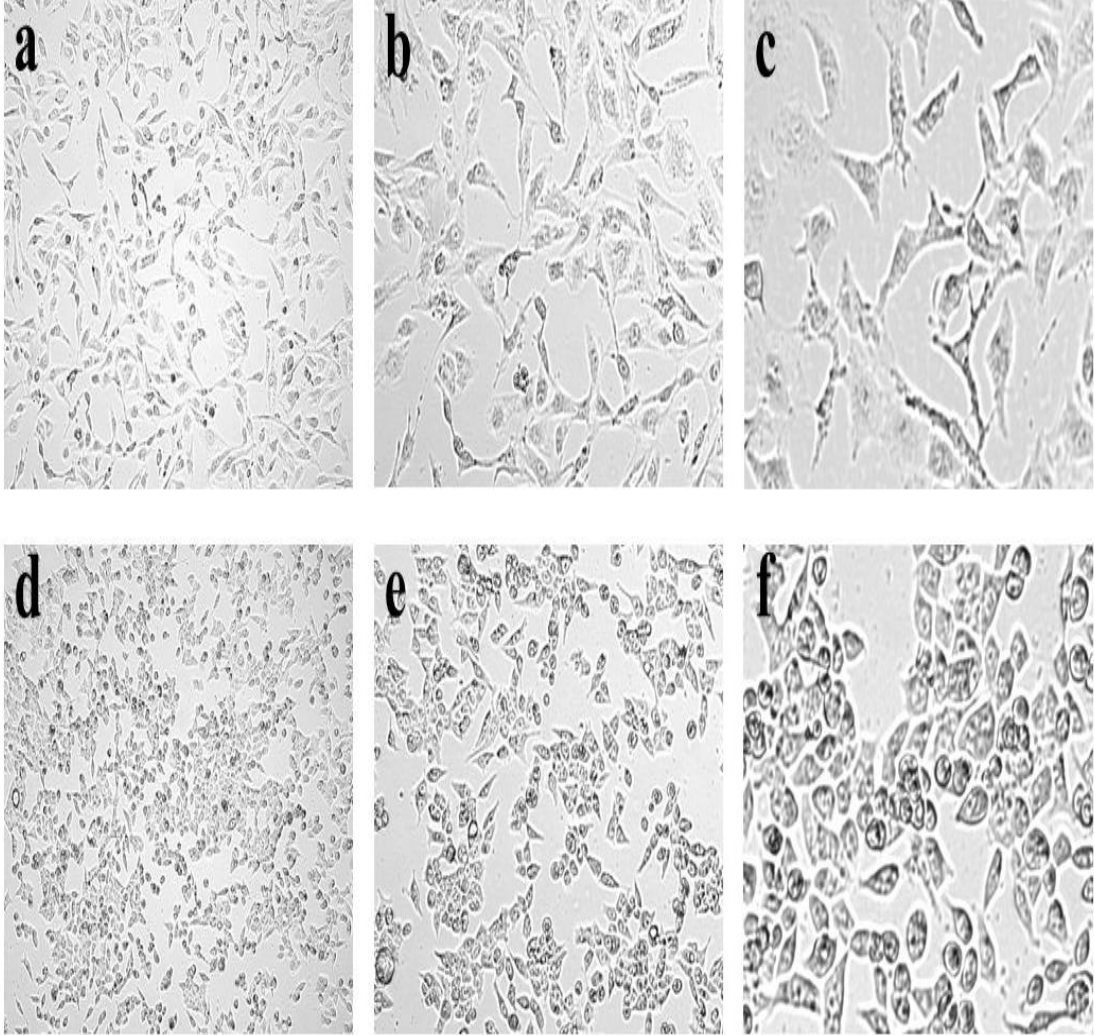
edildi. Aynı hücre hattına ait herhangi iki uygulama grubu arasındaki deneysel farklılık düzeyi student's t-test uygulanarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma neticesinde elde edilmiş olan $p < 0.05$ değeri deney sonuçları açısından iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir. $p < 0.05$ 'den daha küçük değerler ($p < 0.01$ veya $p < 0.00.1$) iki grup sonuçları arasında istatistiksel açıdan daha fazla farklılığı ifade etmektedir. $p \geq 0.05$ değerleri ise iki grup sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ifade etmektedir. Kontrol grubu ile kıyaslamalarda anlamlı farkı ifade etmek için '*' simgesi, AuNP-siKras-sap53 birlikte (kombine) transfeksiyonu ile kıyaslamalarda ise bu farkı ifade etmek için '#' simgesi kullanıldı. İstatistiksel analiz için her bir deneysel grubun 3'lü biyolojik tekrar sonuçları değerlendirildi.



4. BULGULAR

4.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Morfolojisi

Çalışmada kullanılan A549 ve HCT116 hücrelerinin morfolojik görüntüleri JuLI™ Br hücre görüntüleme cihazı ile 1X, 4X ve 16X büyütülerek Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

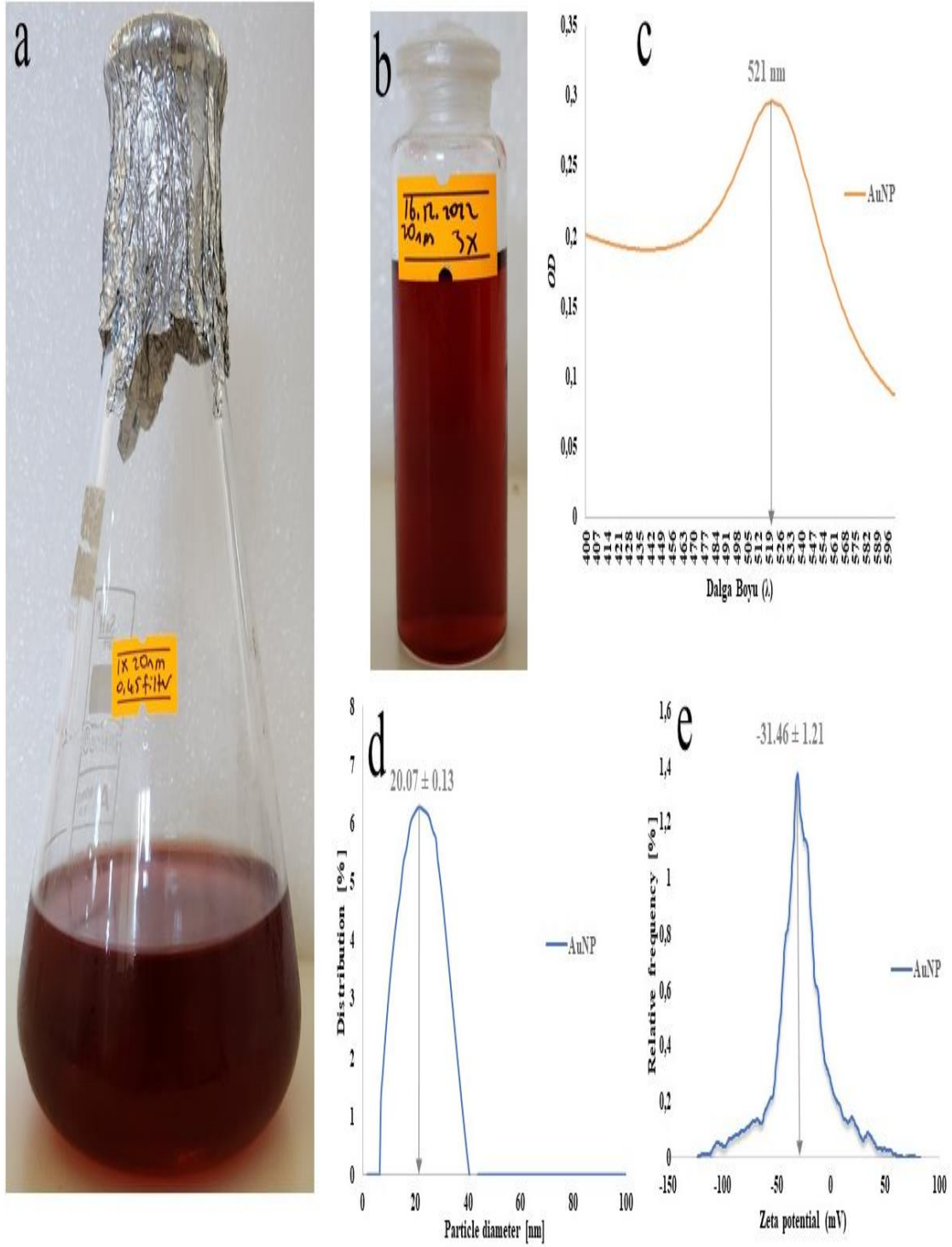


Şekil 4.1. A549 hücresinin 1X (a), 4X (b), 16X (c) ve HCT116 hücresinin 1X (d), 4X (e), 16X (f) görüntüleri.

4.2. AuNP Sentezi ve Karakterizasyonu

AuNP sentezinin karakterizasyonu, spektrofotometre ve zeta boyut ve potansiyel analizleri ile sağlandı. Spektrofotometre analizleri doğrultusunda sentezlenmiş 20 nm AuNP için 521 nm dalga boyunda maksimum absorbans gözlemlendi ve böylece 20 nm AuNP sentezi spektrofotometrik olarak doğrulandı. Zeta boyut analizleri ile sentezlenen

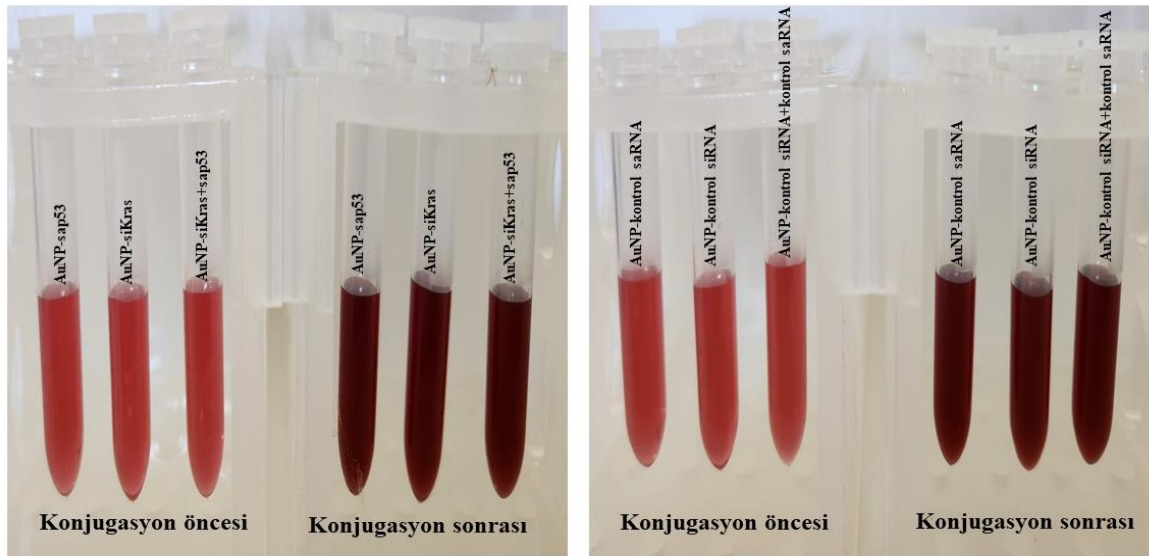
AuNP çözeltisinde partikül ortalama boyutu 20.07 nm olarak tespit edildi. Zeta potansiyel analizi doğrultusunda AuNP çözeltisinin ortalama -31.46 mV potansiyele sahip olduğu gözlemlendi. Böylece zeta boyut ve potansiyel analizleri ile 20 nm AuNP sentezi doğrulandı. AuNP sentez sonuçları ile ilgili görüntü ve grafikler Şekil 4.2’de verilmiştir.



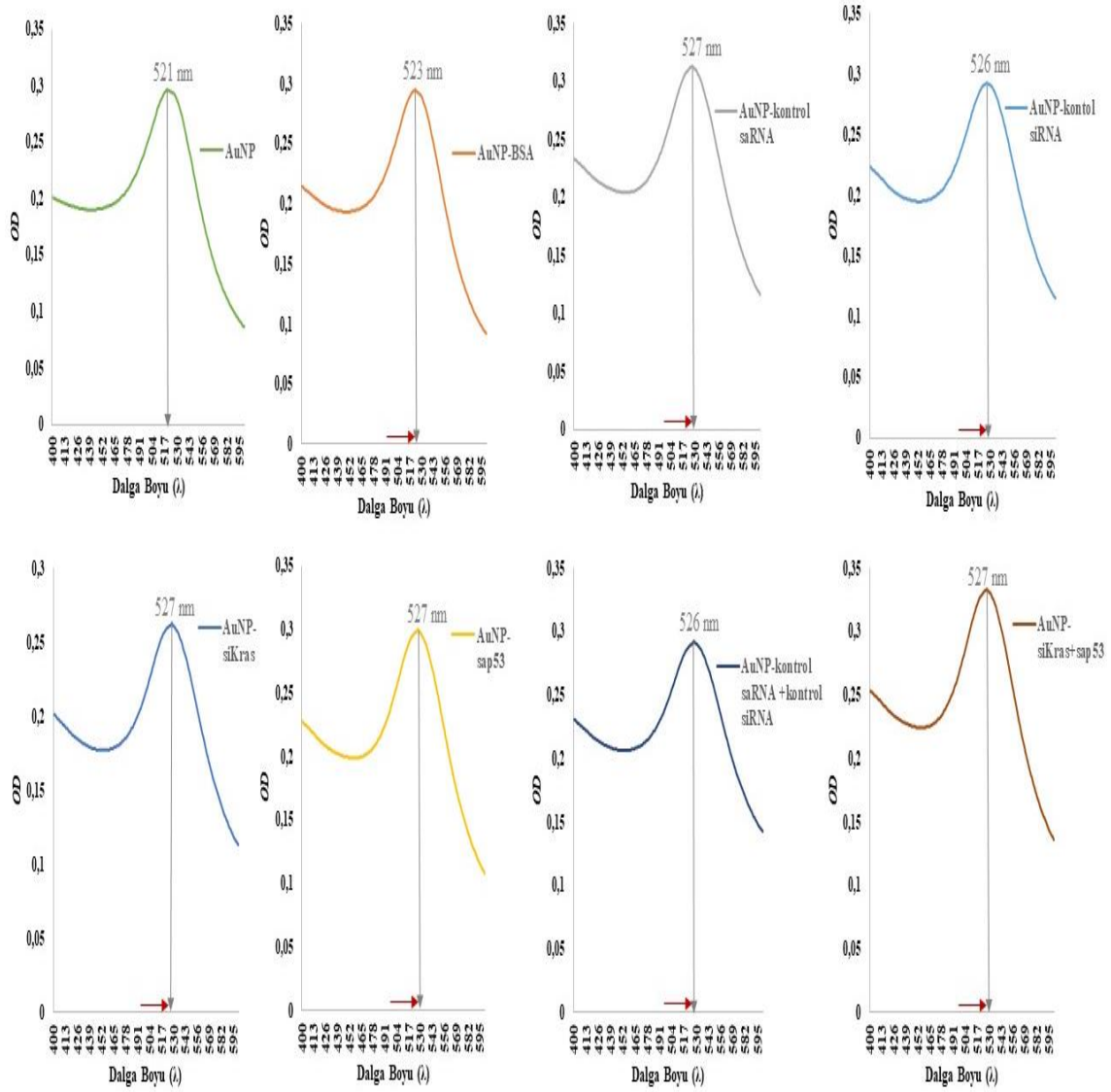
Şekil 4.2. AuNP sentez ve analiz görüntüleri. 20 nm AuNP çözeltisi (a), 3 kat konsantre edilmiş AuNP çözeltisi (b), spektrofotometrik analiz grafiği (c), zeta boyut analizi grafiği (d) ve zeta potansiyel analizi grafiği (e).

4.3. AuNP-küçük RNA Konjugasyonu ve Konjugasyonun Doğrulması

AuNP sentezi ve karakterizasyonundan sonra AuNP-küçük RNA konjugasyonları gerçekleştirildi ve her bir küçük RNA (siKras, sap53, kontrol saRNA ve kontrol siRNA) AuNP konjugasyonu spektrofotometre ve zeta boyut ve potansiyel analizleri ile doğrulandı. AuNP konjugatları %5 BSA içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu içerisinde saklandığı için AuNP-BSA konjugatı karşılaştırma amacı ile karakterizasyona dahil edildi. Yalnızca BSA ortamında saklanan AuNP'ler için spektrotometrik olarak maksimum absorbands verdiği dalga boyunda 2 nm artış ile 523 nm'de maksimum absorbands gözlemlendi. AuNP-küçük RNA konjugatlarının ise maksimum absorbands verdiği dalga boylarında sırasıyla AuNP-kontrol saRNA için 6 nm (527 nm), AuNP-sap53 için 6 nm (527 nm), AuNP-kontrol siRNA için 5 nm (526 nm), AuNP-siKras için 6 nm (527 nm), AuNP-kontrol siRNA+kontrol saRNA için 5 nm (526 nm) ve AuNP-siKras+sap53 için 6 nm (527 nm) artış ile maksimum absorbands gözlemlendi. Bu gözlemler doğrultusunda AuNP-küçük RNA konjugasyonları spektrofotometrik olarak doğrulandı. Farklı AuNP konjugatları için konjugasyondan önce ve sonraki görüntüler Şekil 4.3'de verilmiştir. Konjugatların spektrofotometrik analiz grafikleri Şekil 4.4'de verilmiştir.

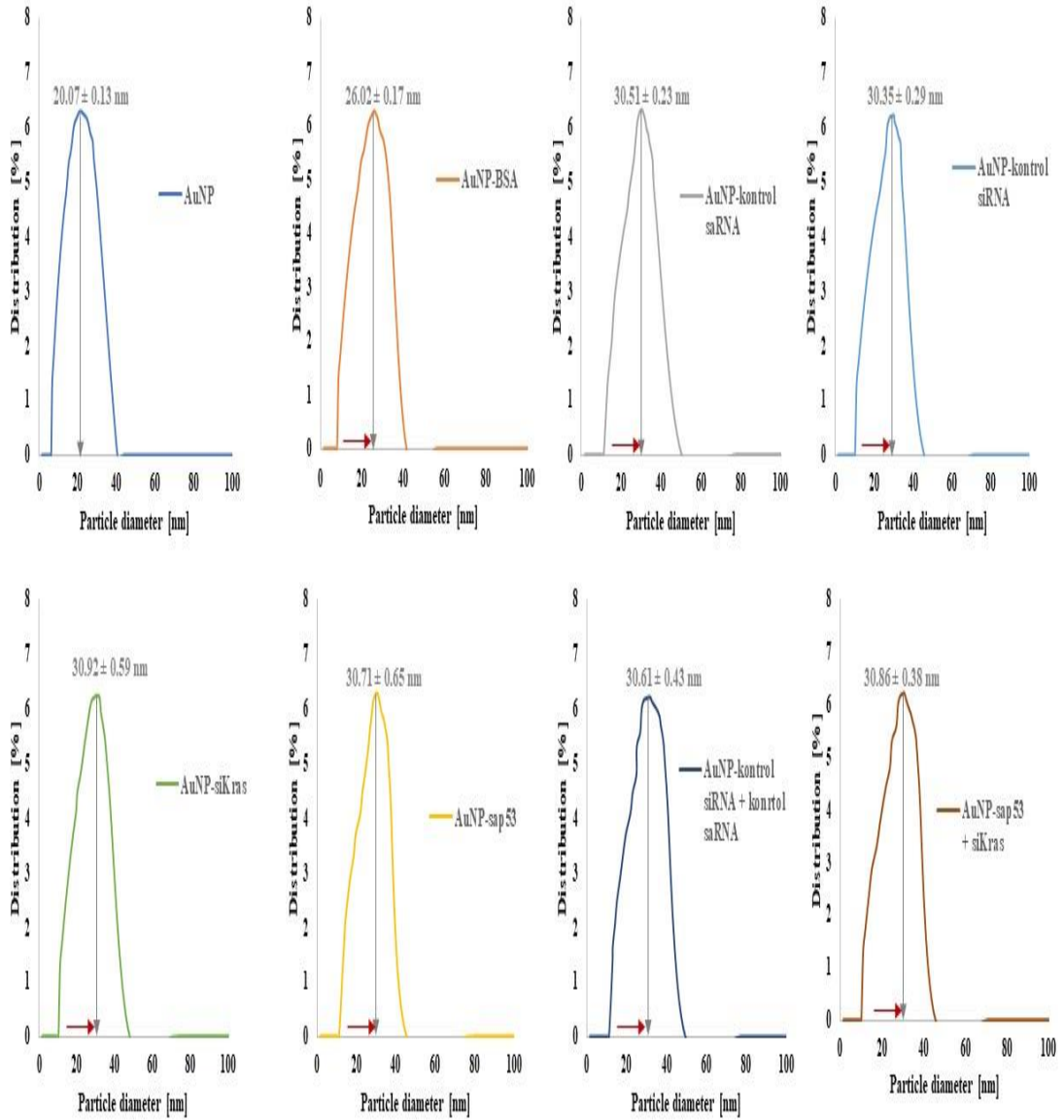


Şekil 4.3. AuNP-küçük RNA konjugatlarının konjugasyon öncesi ve sonrası görüntüleri.



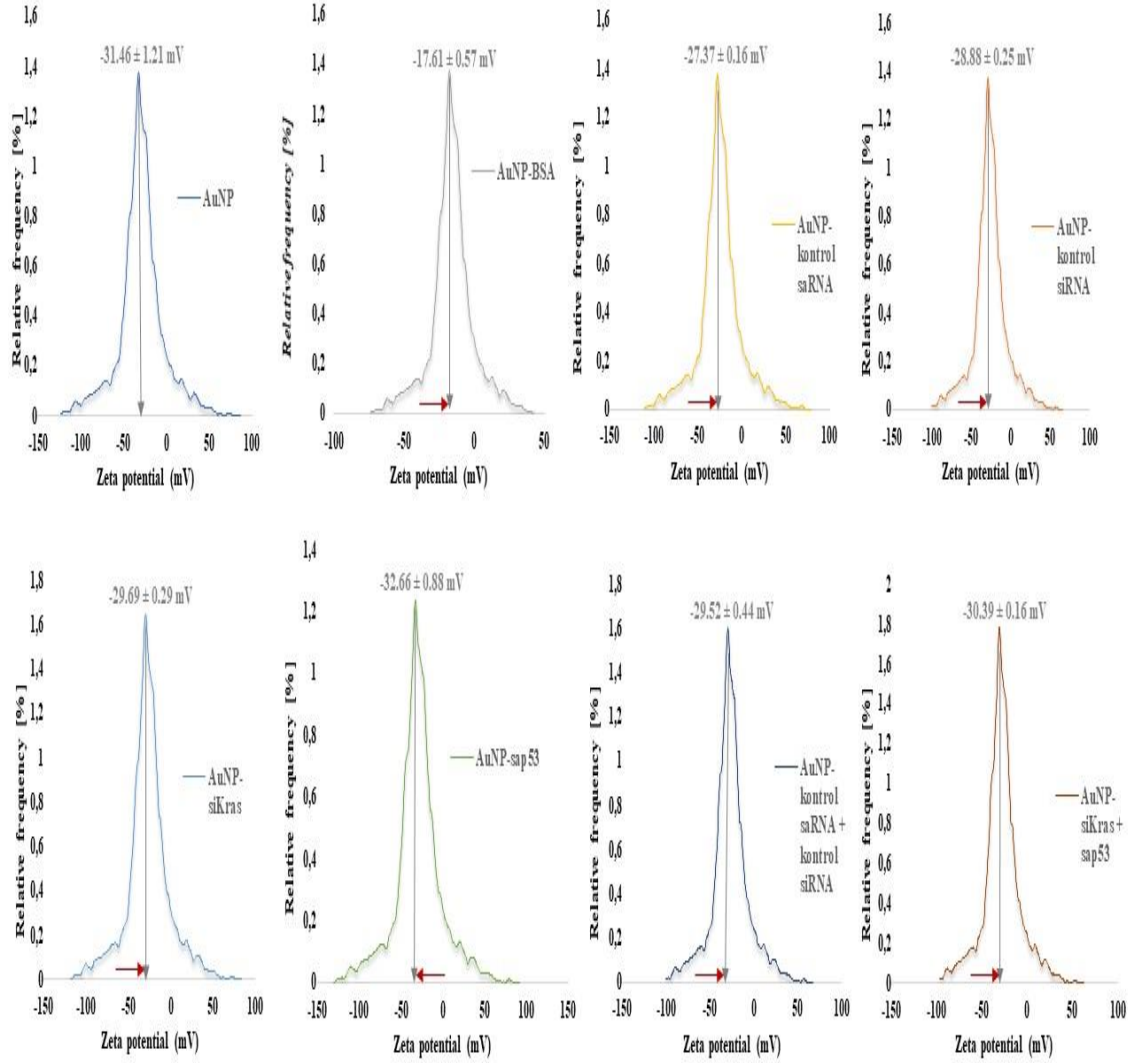
Şekil 4.4. AuNP-küçük RNA konjugatlarının konjugasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik veri grafikleri.

Zeta boyut analizinde ise spektrofotometrik analizler ile paralel sonuçlar elde edildi ve konjugatlar için ortalama partikül boyutlarında sırasıyla AuNP-BSA için 5.95 nm (26.02 ± 0.17 nm), AuNP-kontrol saRNA için 10.44 nm (30.51 ± 0.23 nm), AuNP-sap53 için 10.64 nm (30.71 ± 0.65 nm), AuNP-kontrol siRNA 10.28 nm (30.35 ± 0.29 nm), AuNP-siKras için 10.85 nm (30.92 ± 0.59 nm), AuNP-kontrol siRNA+kontrol saRNA için 10.54 nm (30.61 ± 0.43 nm) ve AuNP-siKras+sap53 10.79 nm (30.86 ± 0.38 nm) artış gözlemlendi. AuNP-küçük RNA konjugatlarının AuNP-BSA konjugatına oranla ortalama partikül boyutlarında daha fazla artış göstermesiyle konjugasyon zeta boyut analizi ile doğrulandı. Konjugatların zeta boyut analiz grafikleri Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5. AuNP-küçük RNA konjugatlarının konjugasyon öncesi ve sonrası zeta boyut analizi veri grafikleri.

Zeta potansiyel analizinde ise konjugatlar için ortalama zeta potansiyellerinde sırasıyla AuNP-BSA için 13.85 mV (-17.61 ± 0.57 mV), AuNP-kontrol saRNA için 4.09 mV (-27.37 ± 0.16 mV), AuNP-sap53 için -1.2 mV (-32.66 ± 0.88 mV), AuNP-kontrol siRNA 2.58 mV (-28.88 ± 0.25 mV), AuNP-siKras için 1.77 mV (-29.69 ± 0.29 mV), AuNP-kontrol siRNA+kontrol saRNA için 1.94 mV (-29.52 ± 0.44 mV), ve AuNP-siKras+sap53 1.07 mV (-30.39 ± 0.16 mV) artış gözlemlendi. AuNP-küçük RNA konjugatlarının AuNP-BSA konjugatına oranla ortalama potansiyellerinde çok daha az artış göstermesiyle konjugasyon zeta potansiyel analizi ile doğrulandı. Konjugatların zeta potansiyel analiz grafikleri Şekil 4.6’da verilmiştir.



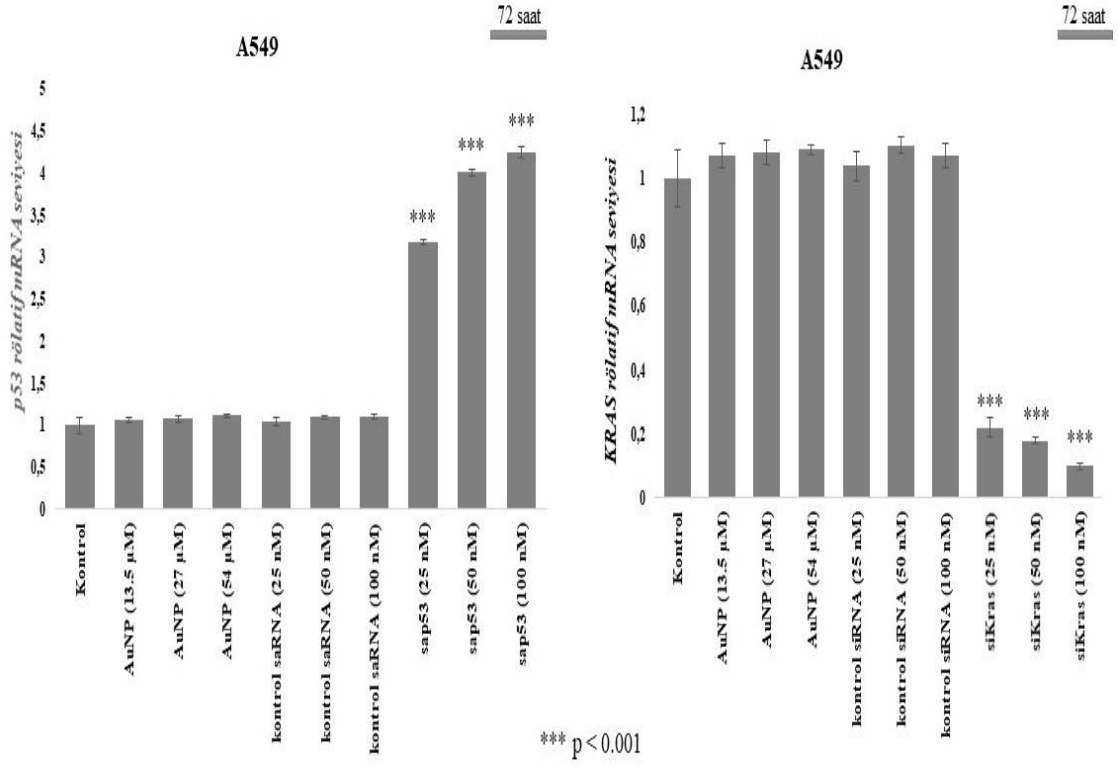
Şekil 4.6. AuNP-küçük RNA konjugatlarının konjugasyon öncesi ve sonrası zeta potansiyel analizi veri grafikleri.

AuNP-küçük RNA konjugasyonları teyit edildikten sonra, AuNP konsantrasyonu başına küçük RNA konsantrasyonu; konjuge olmuş küçük RNA (μM) / AuNP (mM) = [(((konjugasyon öncesi küçük RNA absorbans değeri (A_{260})-(konjugasyon sonrası konjuge olmamış küçük RNA absorbans değeri (A_{260}))) / (konjugasyon öncesi küçük RNA absorbans değeri (A_{260}))) x (ilk küçük RNA konsantrasyonu (μM))) / (teorik olarak hesaplanmış AuNP konsantrasyonu (mM))] = [(((0.4127)-(0.071)) / (0.4127)) x (4 μM)] / (1.8 mM) işlemi ile yaklaşık olarak 1 mM AuNP başına 1.84 μM küçük RNA konsantrasyonu hesaplandı. Transfeksiyon işlemleri için hesaplanmış bu veriler üzerinden AuNP-küçük RNA konjugatları uygulandı. Uygulama sırasında 25, 50 ve 100 nM küçük RNA transfeksiyonu için sırayla 13.5, 27 ve 54 μM AuNP birlikte transfeksiyon işlemlerine dahil oldu.

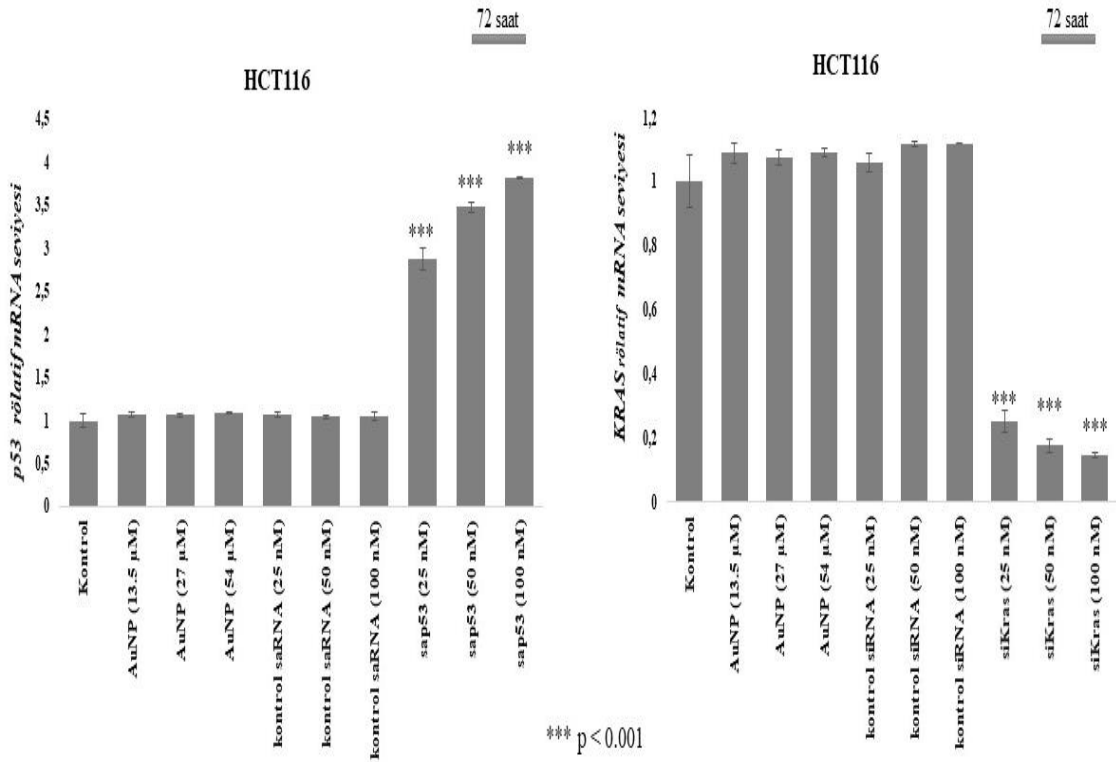
4.4. RT-qPCR ile mRNA İfadelenme Analizi

Hücrelerin, AuNP-küçük RNA transfeksiyonundan 72 saat sonra toplam RNA izolasyonları gerçekleştirildi ve 1 µg toplam RNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlendi. Elde edilen cDNA'lar StepOne™ Plus v2.3 yazılımı ile StepOnePlus™ Real-Time PCR Sisteminde analiz edildi. qPCR işleminden sonra, StepOne™ Plus v2.3 yazılımı her reaksiyon için bir C_T değeri üretti ve bu C_T değerleri kullanılarak hedef genler mRNA ifadenmeleri açısından analiz edildi.

Her iki hücre hattına ait farklı uygulama grupları (kontrol grubu (transfekte edilmemiş hücre grubu), yalnızca AuNP ile transfekte edilmiş hücre grubu (mock grubu) ve AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edilmiş hücre grubu) için StepOne™ Plus v2.3 yazılımının sağlamış olduğu her bir gene ait C_T değeri kullanılıp livak metodu uygulanarak mRNA ifadenme seviyeleri analiz edildi. İlk olarak A549 ve HCT116 hücre hatları için p53 ve KRAS mRNA seviyelerinin farklı hücre uygulama gruplarında kontrol grubuna kıyasla oranları analiz edildi. Elde edilen sonuçlar grafiksel veri halinde A549 ve HCT116 hücreleri için sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Bu verilerden yola çıkılarak 25, 50 ve 100 nM sap53 ve siKras uygulamalarının neden olduğu p53 ve KRAS mRNA seviyelerindeki değişim değerlendirilmiş olup son konsantrasyon olarak 50 nM sap53 ve siKras sağlayan AuNP-küçük RNA konjugatlarının uygulanmış olduğu grupların p53 ve KRAS mRNA seviyelerinin kontrol grubuna oranla, A549 hücre hattında p53 mRNA'sı için ortalama 4.01 kat fazla ifade olmasına, KRAS mRNA'sı için ortalama 5.76 kat az ifade olmasına, HCT116 hücre hattında ise p53 mRNA'sı için ortalama 3.48 kat fazla ifade olmasına, KRAS mRNA'sı için ortalama 5.68 kat az ifade olmasına neden olduğu tespit edildi. Her iki hücre hattının farklı konsantrasyonlarda AuNP, AuNP-kontrol siRNA ve AuNP-kontrol saRNA konjugatları ile transfekte olmasının p53 ve KRAS mRNA seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla farka neden olmadığı tespit edildi.

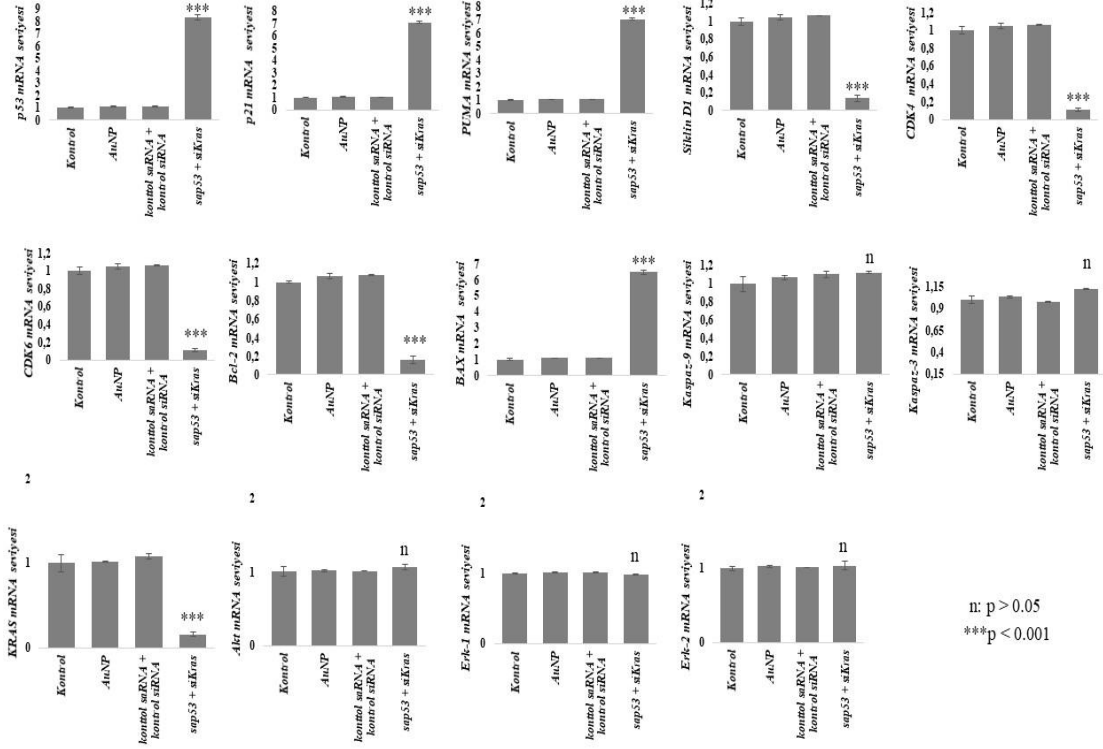


Şekil 4.7. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve KRAS rölatif mRNA ifadenme seviyeleri.

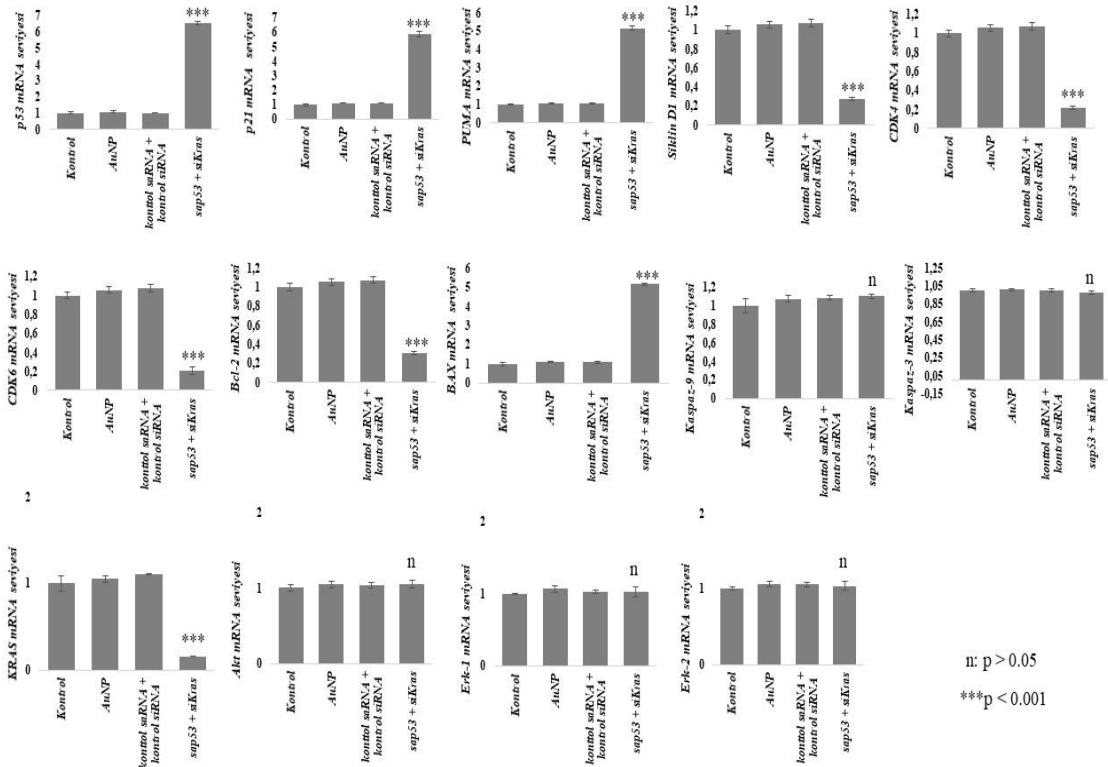


Şekil 4.8. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve KRAS rölatif mRNA ifadenme seviyeleri.

Bu değerlendirmelerden yola çıkılarak daha sonra yapılan qPCR analizlerinde son konsantrasyonda 50 nM küçük RNA'ların her ikisi ile birlikte transfekte edilmiş (AuNP-kontrol siRNA+kontrol saRNA konjugatı veya AuNP-siKras+sap53 konjugatı ile transfekte edilmiş) olan hücre grupları ile kontrol grubu arasında mRNA seviye farkları analiz edilmiştir. Her iki hücre hattı son konsantrasyonda 50 nM siKras ve sap53 sağlayan AuNP-siKras+sap53 konjugatı ile transfekte edildi ve p53 ve KRAS mRNA seviyelerinin kontrol grubuna oranla, A549 hücre hattında p53 mRNA'sı için ortalama 8.32 kat fazla ifade olmasına, KRAS mRNA'sı için ortalama 6.29 kat az ifade olmasına, HCT116 hücre hattında ise p53 mRNA'sı için ortalama 6.54 kat fazla ifade olmasına, KRAS mRNA'sı için ortalama 6.17 az ifade olmasına neden olduğu tespit edildi. Böylelikle, sap53 ve siKras'ın birlikte 50 nM konsantrasyonla transfekte edilmesi, ayrı ayrı transfeksiyonlarına kıyasla sırasıyla A549 ve HCT116 hücre hatlarında p53 mRNA seviyesini 2.08 ve 1.88 kat arttırdığı ($p < 0.001$, $p < 0.01$) ve KRAS mRNA seviyesini değiştirmediği ($p > 0.05$) tespit edildi. Her iki hücre hattı için 54 μ M AuNP ve her iki küçük RNA için son konsantrasyonda 50 nM sağlayan AuNP-kontrol siRNA+kontrol saRNA konjugatı ile transfekte olmasının p53 ve KRAS mRNA seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla farka neden olmadığı tespit edildi. Analizler yalnızca p53 ve KRAS mRNA seviyeleri ile sınırlı kalmayıp, p53 ve KRAS'ın alt sinyal yolaklarında görev yapan diğer genlerin de A549 ve HCT116 hücre hatları için 50 nM küçük RNA'ların her ikisi ile birlikte transfekte edilmiş gruplarında mRNA seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla oranları analiz edilmiş olup, sonuçlar grafiksel veri halinde A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. A549 hücre hattında AuNP-siKras-sap53 birlikte konjugatı ile transfekte olmuş hücrelerde kontrol grubuna kıyasla ortalama p21 seviyesi 7.1, PUMA seviyesi 7.03 ve BAX seviyesi 6.47 kat mRNA düzeyinde arttığı, siklin D1 seviyesi 6.32, CDK4 seviyesi 6.85, CDK6 seviyesi 6.92, BCL-2 seviyesi 5.99 kat mRNA düzeyinde ifadelenmelerinin azaldığı gözlemlendi. Kaspaz-9, Kaspaz-3, Erk 1/2 ve Akt mRNA ifadelenmeleri düzeyinde AuNP-siKras-sap53 ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p > 0.05$). HCT116 hücre hattında ise AuNP-siKras-sap53 birlikte konjugatı ile transfekte olmuş hücrelerde kontrol grubuna kıyasla ortalama p21 seviyesi 5.87, PUMA seviyesi 5.76 ve BAX seviyesi 5.67 kat mRNA düzeyinde arttığı, siklin D1 seviyesi 4.70, CDK4 seviyesi 4.62, CDK6 seviyesi 4.69, BCL-2 seviyesi 4.27 kat mRNA düzeyinde ifadelenmelerinin azaldığı gözlemlendi. Kaspaz-9, Kaspaz-3, Erk 1/2 ve Akt mRNA ifadelenmeleri düzeyinde AuNP-siKras-sap53 ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p > 0.05$).



Şekil 4.9. A549 hücre hattında p53 ve KRAS alt yollarında görevli genlerin rölâtif mRNA ifadenleme seviyeleri.

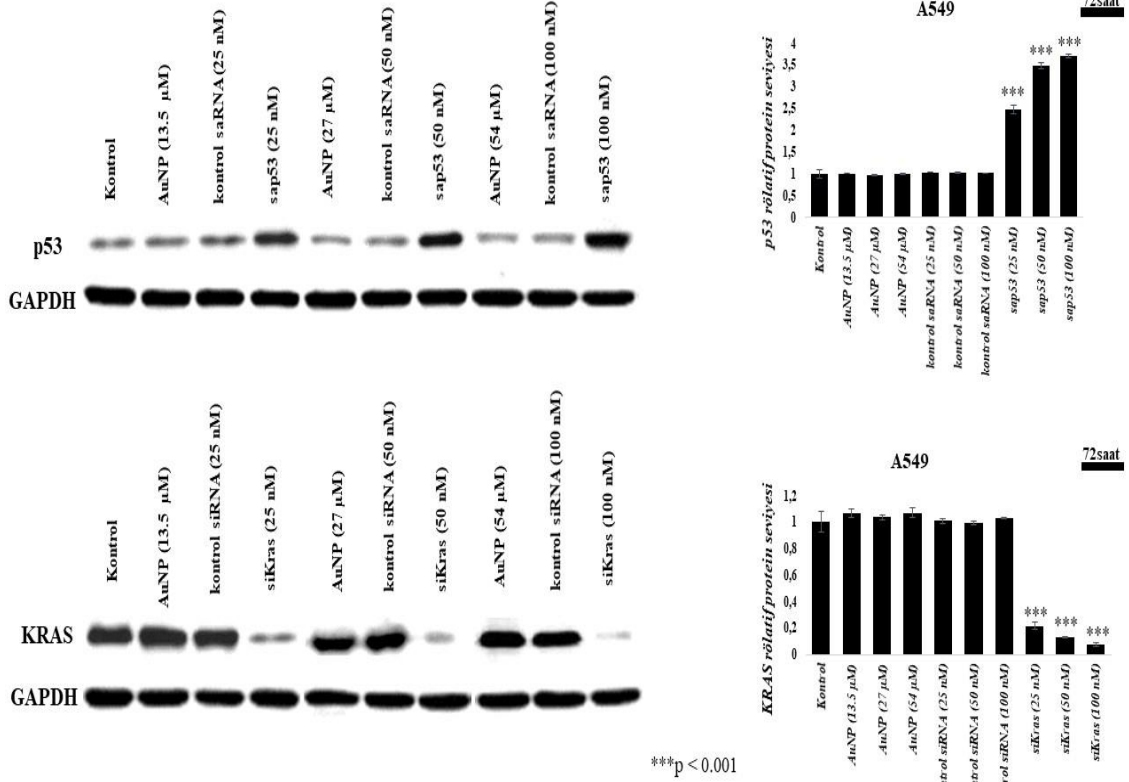


Şekil 4.10. HCT116 hücre hattında p53 ve KRAS alt yollarında görevli genlerin rölâtif mRNA ifadenleme seviyeleri.

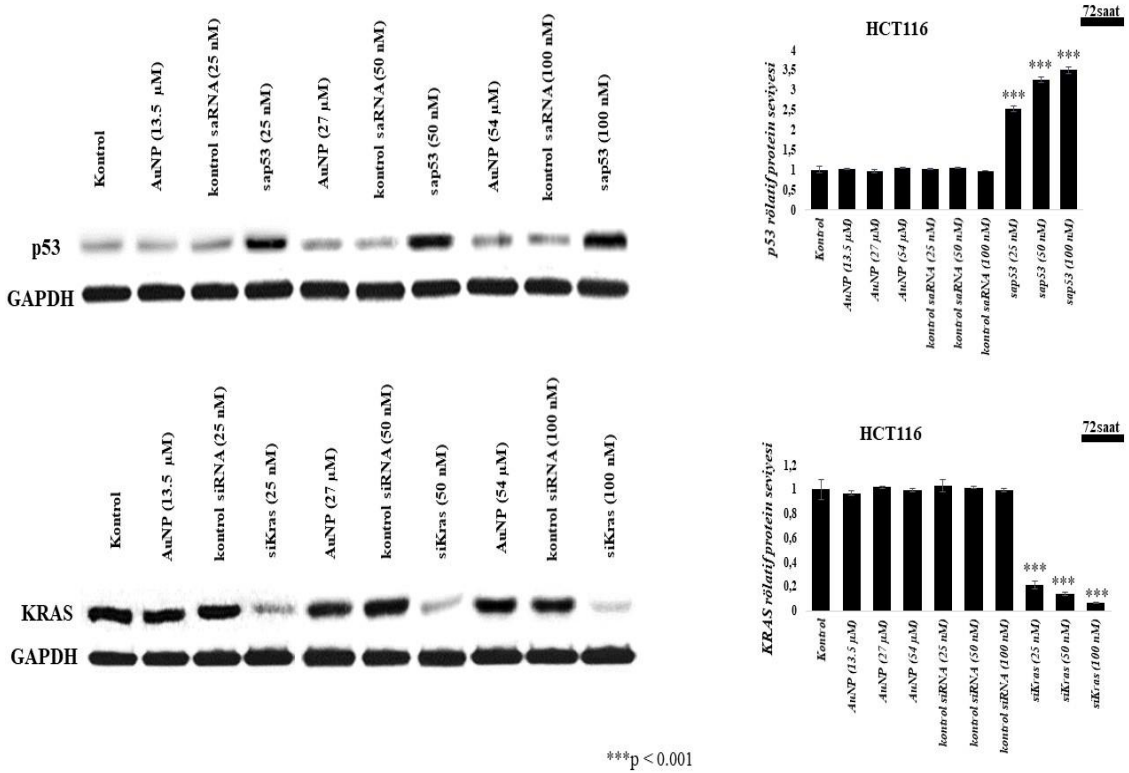
4.5. Western Blot ile Protein İfadeleme Analizi

Hücrelerden, AuNP-küçük RNA transfeksiyonundan 72 saat sonra protein izolasyonu gerçekleştirildi ve BCA testi kullanılarak protein miktar tayini yapıldı. Her iki hücre hattı için farklı uygulama gruplarından (kontrol grubu (transfekte edilmemiş hücre grubu), yalnızca AuNP ile transfekte edilmiş hücre grubu (mock grubu) ve AuNP-küçük RNA konjugatları ile transfekte edilmiş hücre grubu) eşit miktar protein kullanılarak SDS-PAGE ve Western Blot analizleri gerçekleştirildi. Western Blot tekniği ile elde edilmiş olan protein bant yoğunlukları kullanılarak hedef genler protein ifadenmeleri açısından analiz edildi.

İlk olarak A549 ve HCT116 hücre hatları için p53 ve KRAS protein seviyelerinin farklı hücre uygulama gruplarında kontrol grubuna kıyasla oranları analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, protein bant görüntüleri ve grafiksel veri halinde A549 ve HCT116 hücreleri için sırasıyla Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmiştir. Bu verilerden yola çıkılarak 25, 50 ve 100 nM sap53 ve siKras uygulamalarının neden olduğu p53 ve KRAS protein seviyelerindeki değişim değerlendirilmiş olup son konsantrasyon olarak 50 nM sap53 ve siKras sağlayan AuNP-küçük RNA konjugatlarının uygulanmış olduğu grupların p53 ve KRAS protein seviyelerinin kontrol grubuna oranla, A549 hücre hattında p53 proteini için ortalama 3.47 kat fazla ifade olmasına, KRAS proteini için ortalama 7.69 kat az ifade olmasına, HCT116 hücre hattında ise p53 proteini için ortalama 3.26 kat fazla ifade olmasına, KRAS proteini için ortalama 7.33 kat az ifade olmasına neden olduğu tespit edildi. Her iki hücre hattının farklı konsantrasyonlarda AuNP, AuNP-kontrol siRNA ve AuNP kontrol saRNA konjugatları ile transfekte olmasının p53 ve KRAS protein seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla farka neden olmadığı tespit edildi.



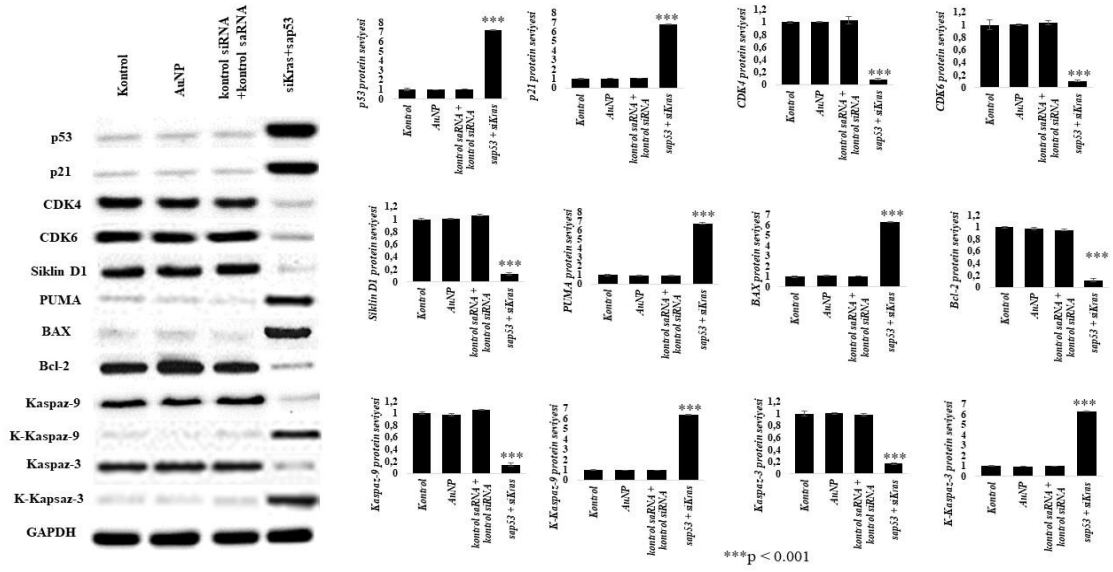
Şekil 4.11. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve KRAS rölatif protein ifadenme seviyeleri.



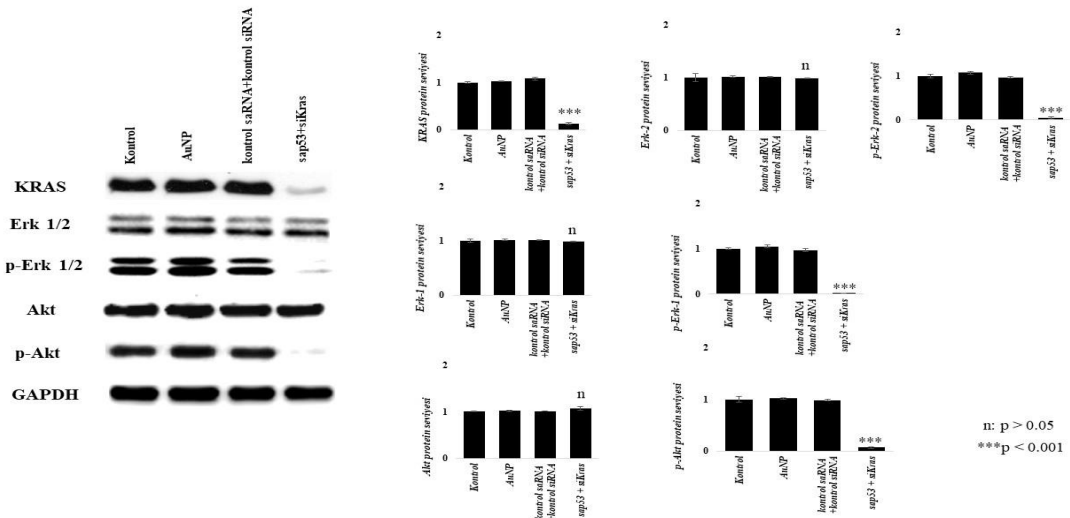
Şekil 4.12. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve KRAS rölatif protein ifadenme seviyeleri.

Bu değerlendirmelerden yola çıkılarak daha sonra yapılan Western Blot analizlerinde son konsantrasyonda 50 nM küçük RNA'ların her ikisi ile birlikte transfekte edilmiş (AuNP-kontrol siRNA+kontrol saRNA konjugatı veya AuNP-siKras+sap53 konjugatı ile transfekte edilmiş) olan hücre grupları ile kontrol grubu arasında protein seviye farkları analiz edilmiştir. Her iki hücre hattı son konsantrasyonda 50 nM siKras ve sap53 sağlayan AuNP-siKras+sap53 konjugatı ile transfekte edilmiş ve p53 ve KRAS mRNA seviyelerinin kontrol grubuna oranla, A549 hücre hattında p53 proteinini için ortalama 7.16 kat fazla ifade olmasına, KRAS proteinini için ortalama 8.13 kat az ifade olmasına, HCT116 hücre hattında ise p53 proteinini için ortalama 6.04 kat fazla ifade olmasına, KRAS proteinini için ortalama 7.70 kat az ifade olmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle, sap53 ve siKras'ın birlikte 50 nM konsantrasyonla transfekte edilmesi, ayrı ayrı transfeksiyonlarına kıyasla sırasıyla A549 ve HCT116 hücre hatlarında p53 protein seviyesini 2.06 ve 1.85 kat arttırdığı ($p < 0.001$, $p < 0.01$) ve KRAS protein seviyesini değiştirmediği saptandı ($p > 0.05$). Her iki hücre hattı için 54 μ M AuNP ve her iki küçük RNA için son konsantrasyonda 50 nM sağlayan AuNP-kontrol siRNA+kontrol saRNA konjugatı ile transfekte olmasının p53 ve KRAS protein seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla farka neden olmadığı tespit edildi. Analizler yalnızca p53 ve KRAS proteinler seviyeleri ile sınırlı kalmayıp, p53 ve KRAS'ın alt sinyal yolaklarında görev yapan diğer genlerin de A549 ve HCT116 hücre hatları için 50 nM küçük RNA'ların her ikisi ile birlikte transfekte edilmiş gruplarında protein seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla oranları analiz edilmiş olup, sonuçlar protein bant görüntüleri ve grafiksel veri halinde A549 hücre hattı için Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'da, HCT116 hücre hattı için Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da verilmiştir. A549 hücre hattında AuNP-siKras-sap53 birlikte konjugatı ile transfekte olmuş hücrelerde kontrol grubuna kıyasla ortalama p21 seviyesi 6.73, PUMA seviyesi 6.63 ve BAX seviyesi 6.31, Kesilmiş Kaspaz-9 (K-Kaspaz-9) seviyesi 6.40, Kesilmiş Kaspaz-3 (K-Kaspaz-3) seviyesi 6.30 kat protein düzeyinde arttığı, siklin D1 seviyesi 7.87, CDK4 seviyesi 8.11, CDK6 seviyesi 8.36, BCL-2 seviyesi 8.54, Kaspaz-9 seviyesi 6.79, Kaspaz-3 seviyesi 6.18, fosfatlanmış Erk1 (p-Erk-1) seviyesi 9.16, fosfatlanmış Erk-2 (p-Erk-2) seviyesi 9.63 ve fosfatlanmış Akt (p-Akt) seviyesi 9.33 kat protein düzeyinde ifadelenmelerinin azaldığı gözlemlendi. Erk 1/2 ve Akt protein ifadelenmeleri düzeyinde AuNP-siKras-sap53 ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p > 0.05$). HCT116 hücre hattında ise AuNP-siKras-sap53 birlikte konjugatı ile transfekte olmuş hücrelerde kontrol grubuna kıyasla ortalama p21 seviyesi 5.65, PUMA seviyesi 5.53 ve BAX seviyesi 5.50, Kesilmiş Kaspaz-9 (K-Kaspaz-

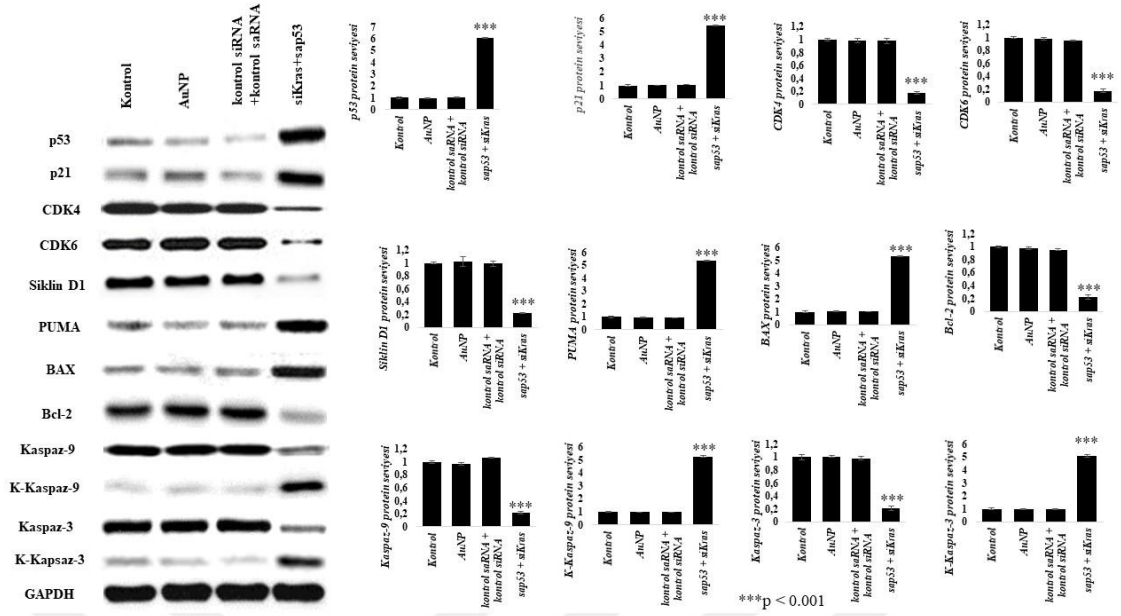
9) seviyesi 5.47, Kesilmiş Kaspaz-3 (K-Kaspaz-3) seviyesi 5.24 kat protein düzeyinde arttığı, siklin D1 seviyesi 5.22, CDK4 seviyesi 5.35, CDK6 seviyesi 5.54, BCL-2 seviyesi 5.23, Kaspaz-9 seviyesi 5.27, Kaspaz-3 seviyesi 5.16, fosfatlanmış Erk1 (p-Erk-1) seviyesi 5.32, fosfatlanmış Erk-2 (p-Erk-2) seviyesi 5.09 ve fosfatlanmış Akt (p-Akt) seviyesi 2.93 kat protein düzeyinde ifadenmelerinin azaldığı gözlemlendi. Erk 1/2 ve Akt protein ifadenmeleri düzeyinde AuNP-siKras-sap53 ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p > 0.05$).



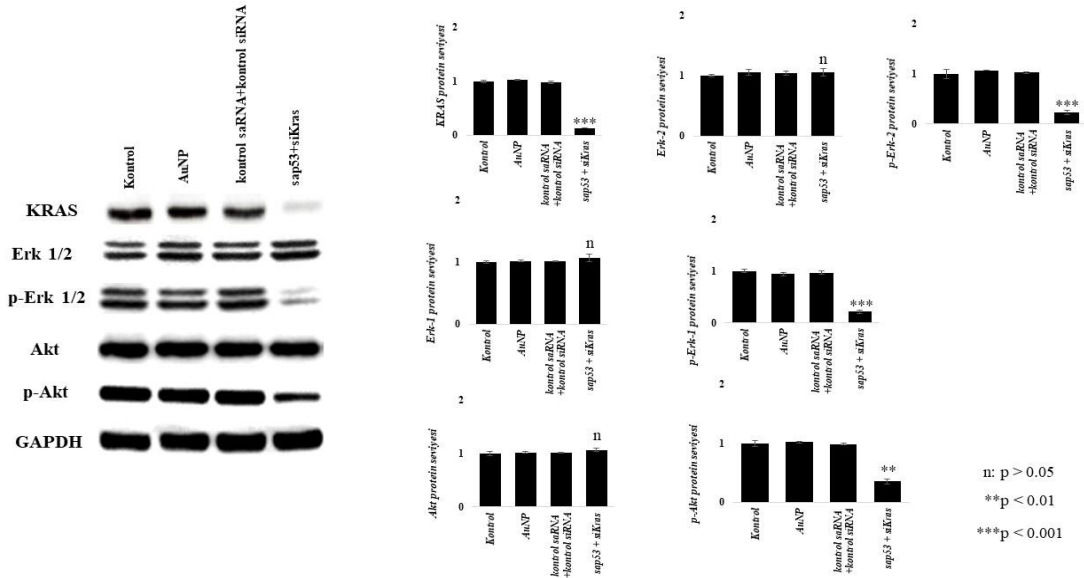
Şekil 4.13. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve alt yollarında görevli proteinlerin rölatif ifadenme seviyeleri.



Şekil 4.14. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında KRAS ve alt yollarında görevli proteinlerin rölatif ifadenme seviyeleri.



Şekil 4.15. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında p53 ve alt yollarında görevli proteinlerin rölatif ifadenme seviyeleri.

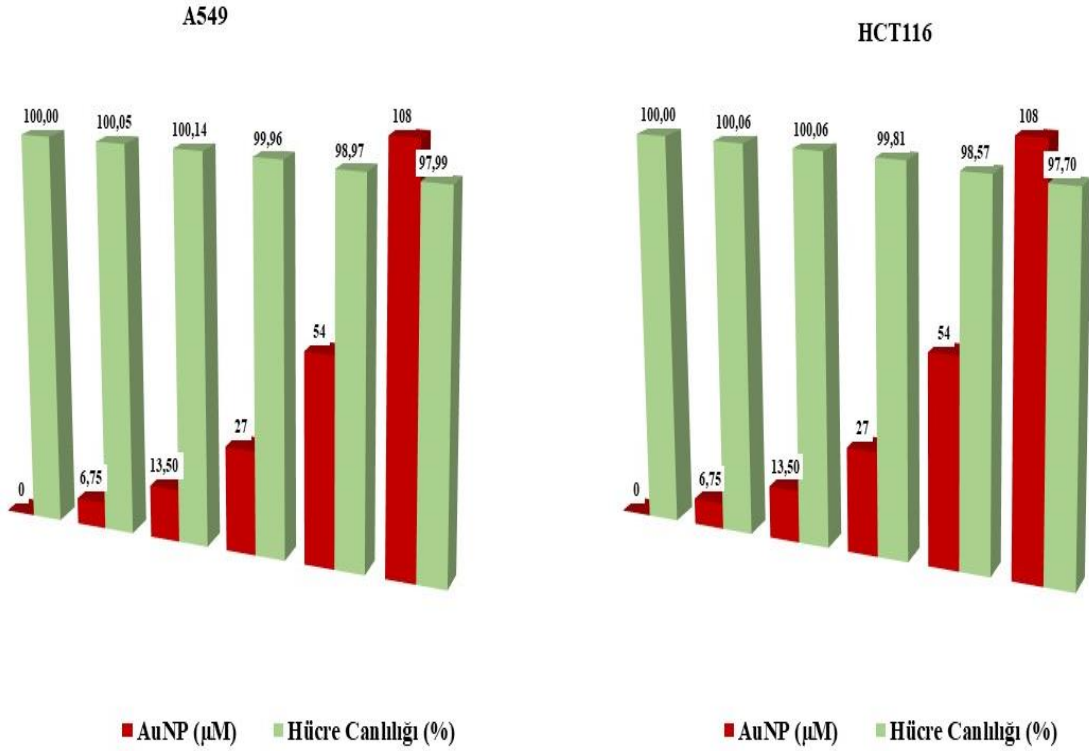


Şekil 4.16. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında KRAS ve alt yollarında görevli proteinlerin rölatif ifadenme seviyeleri.

4.6. Hücre Canlılığı Testi

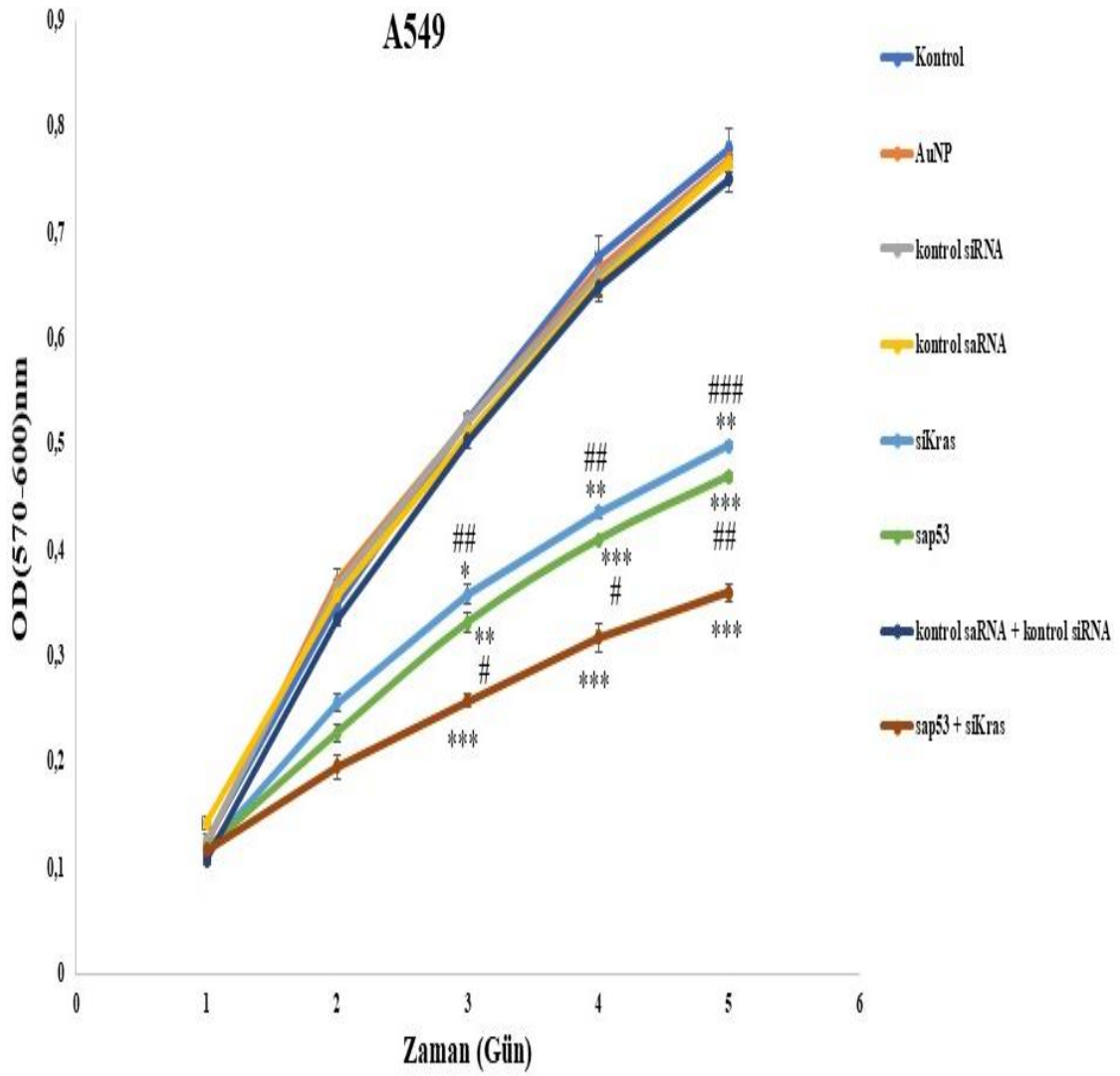
Farklı uygulama grupları arasında rezazurin test ile hücre canlılığı analiz edildi. İlk olarak her iki hücre hattı için taşıyıcı ajan olan AuNP'nin farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkileri araştırıldı. Küçük RNA transfeksiyonu için uygulanan AuNP'nin minimum ve maksimum konsantrasyonu değerlerinden her seferinde 2 kat

azalan ve artan olmak üzere daha düşük ve daha yüksek konsantrasyonlar uygulandı ve kontrol grubu ile kıyaslandı. Uygulamanın 5. gününde elde edilen verilere göre 2 kat artan ve 2 kat azalan AuNP konsantrasyonu uygulanan hücre gruplarında kontrol grubuna göre hücre canlılığı açısından fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Sonuçlar Şekil 4.17’de verilmiştir.



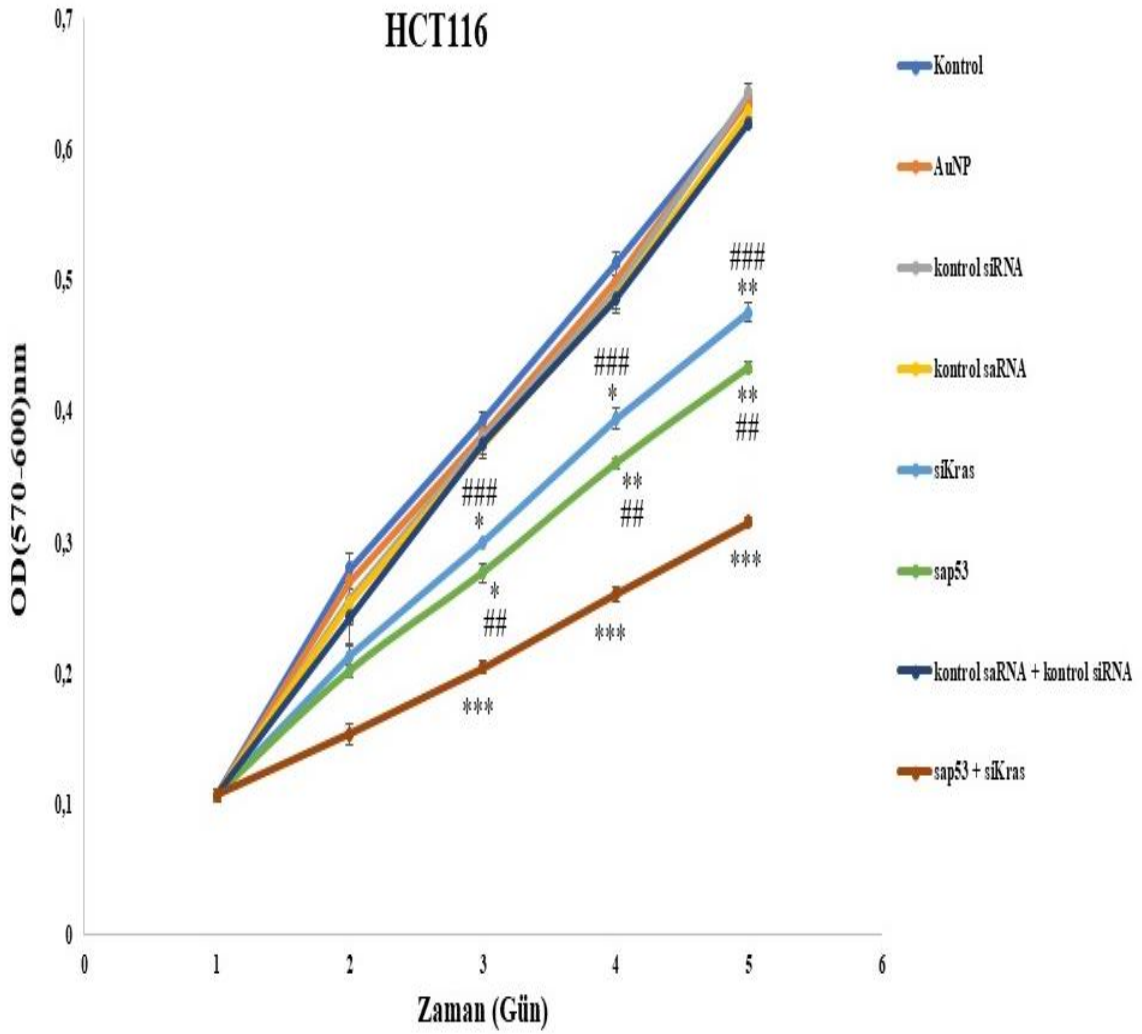
Şekil 4.17. A549 ve HCT116 hücre hatlarında farklı konsantrasyon AuNP (μM) uygulamasının hücre canlılığı (%)’na etkisi.

Daha sonra, hücreler AuNP-küçük RNA transfeksiyonunu takip eden 5 gün boyunca günlük olarak hücre canlılığı açısından analiz edildi. A549 hücre hattı için farklı hücre uygulama gruplarında 5 günlük analizler neticesinde kontrol grubuna kıyasla, yalnızca sap53 ile transfekte edilen hücre grubunda 3. gün %32.83, 4. gün %36.50 ve 5. gün %39.79 ortalama hücre ölümü gözlemlenmiştir. Aynı hücre hattında yalnızca siKras ile transfekte olmuş hücre grubunda kontrol grubuna kıyasla, 3. gün %28.96, 4.gün %32.65 ve 5.gün %35.78 ortalama hücre ölümü gözlemlenmiştir. A549 hücre hattında sap53 ve siKras ile birlikte transfekte olmuş hücre grubunda ise 3. gün %52.95, 4.gün %57.74 ve 5. gün %61.91 ortalama hücre ölümü gözlemlenmiştir. A549 hücre hattı için farklı hücre gruplarında hücre canlılığını gösteren veri grafiği Şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.18. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarının 5 günlük hücre canlılığı analizi.

HCT116 hücre hattında analizler neticesinde kontrol grubuna kıyasla, yalnızca sap53 ile transfekte edilen hücre grubunda 3. gün %28.07, 4. gün % 29.82 ve 5. gün % 31.45 ortalama hücre ölümü gözlemlenmiştir. Aynı hücre hattında yalnızca siKras ile transfekte olmuş hücre grubunda kontrol grubuna kıyasla, 3. gün %19.58, 4.gün %20.98 ve 5.gün %22.97 ortalama hücre ölümü gözlemlenmiştir. HCT116 hücre hattında sap53 ve siKras ile birlikte transfekte olmuş hücre grubunda ise 3. gün %50.09, 4.gün %52.85 ve 5. gün % 56.86 ortalama hücre ölümü gözlemlenmiştir. HCT116 hücre hattı için farklı hücre gruplarında hücre canlılığını gösteren veri grafiği Şekil 4.19'da verilmiştir.



###p<0.001< ##p<0.01 *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

Şekil 4.19. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarının 5 günlük hücre canlılığı analizi.

Analizler neticesinde A549 ve HCT116 hücre hatlarında siKras ve sap53 birlikte transfeksiyonunun sırasıyla yalnızca sap53 transfeksiyonuna kıyasla ortalama 3. gün %20.12 ve %22.02, 4. gün %21.24 ve %23.03 ve 5.gün %22.12 ve %25.41, yalnızca siKras ile transfeksiyonuna kıyasla ise ortalama 3. gün %23.99 ve %30.51, 4. gün %25.09 ve %31.87 ve 5.gün %26.13 ve %33.89 daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar neticesinde her iki hücre hattı için de birlikte transfeksiyonun ayrı ayrı transfeksiyonlara kıyasla çok daha fazla oranda hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Her iki hücre hattı için diğer hücre grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir hücre ölümü farkı tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

4.7. Hücre Döngüsü Analizi

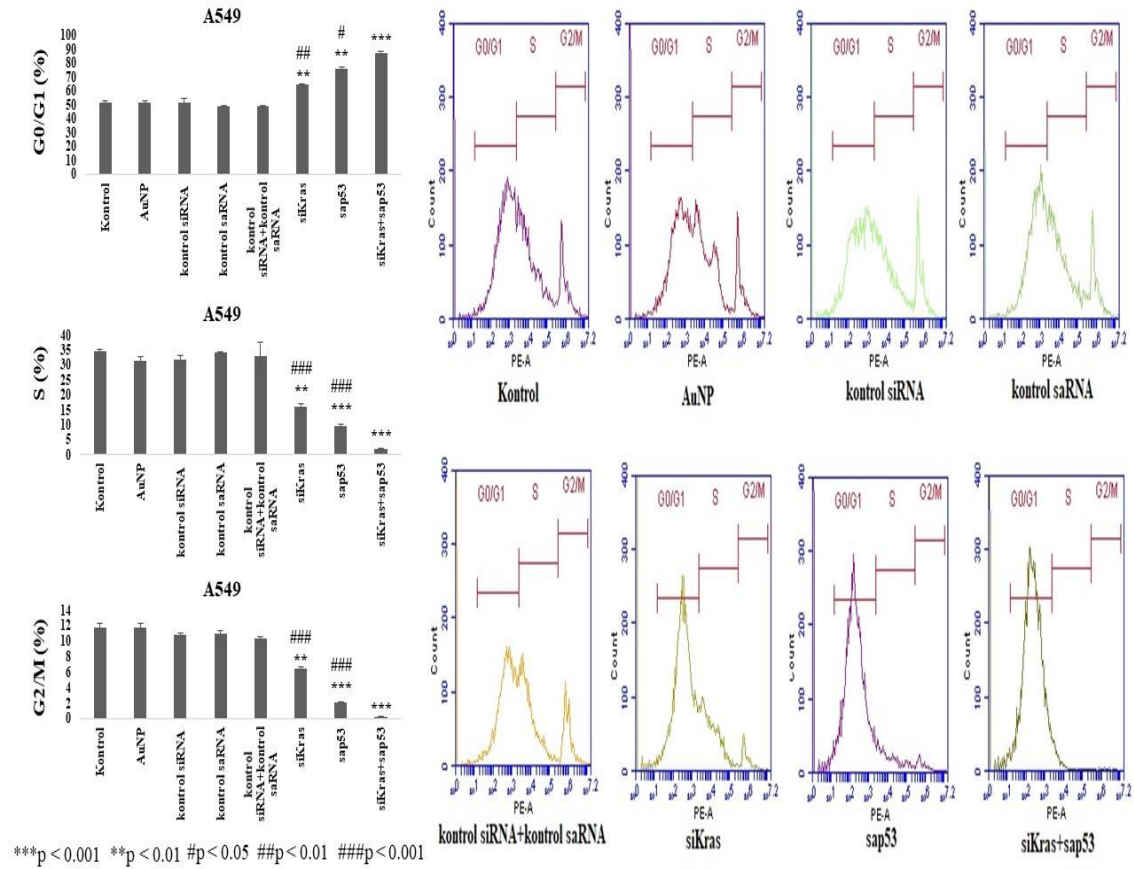
Hücrelerin farklı uygulama gruplarında AuNP-küçük RNA konjugatlarının hücre döngüsü evrelerindeki sebep olduğu değişikliklerin ortaya konması amacıyla hücre döngüsü analizi uygulanmıştır. PI ile inkübe edilmiş farklı gruptaki hücreler BD Accuri™ C6 Plus akış sitometresi kullanılarak analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, BD Accuri™ C6 Plus yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Analiz sırasında, S fazındaki hücreler, G1'deki hücrelerden daha fazla DNA'ya sahip olacağından orantılı olarak daha fazla boya aldı ve DNA içeriklerini ikiye katlayana kadar daha parlak bir şekilde floresan ışığa verdi. G2'deki hücreler, G1'deki hücrelerden yaklaşık iki kat daha parlak ışığa verdi. Bu şekilde hücrelerin, hücre döngüsü evrelerinden G0/G1, S veya G2/M'de oldukları tespit edildi ve farklı hücre grupları arasında hücre döngüsü fazları karşılaştırılarak AuNP-küçük RNA konjugatlarının hücre döngüsü üzerindeki etkisi değerlendirildi.

Değerlendirmeler neticesinde, 72 saat sonunda sap53 ile transfekte edilmiş A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla ortalama %75.86 ve %70.05, siKras ile transfekte edilmiş olan hücre grubunda ise ortalama %64.12 ve %59.40 hücrenin G0/G1 fazında oldukları tespit edildi. siKras ve sap53 ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda sırasıyla A549 ve HCT116 için ortalama %86.85 ve %81.40 G0/G1 fazı gözlemlendi. Bununla beraber, sap53 ile transfekte edilmiş hücre gruplarında kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla ortalama %24.33 ve %15.84, siKras ile transfekte edilmiş hücre grubunda ise kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla %12.62 ve %5.19 daha fazla hücrenin G0/G1 fazında olduğu tespit edildi. sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla sırasıyla A549 ve HCT116 hücre hatlarında %35.35 ve %27.19 daha fazla G0/G1 fazı gözlemlendi.

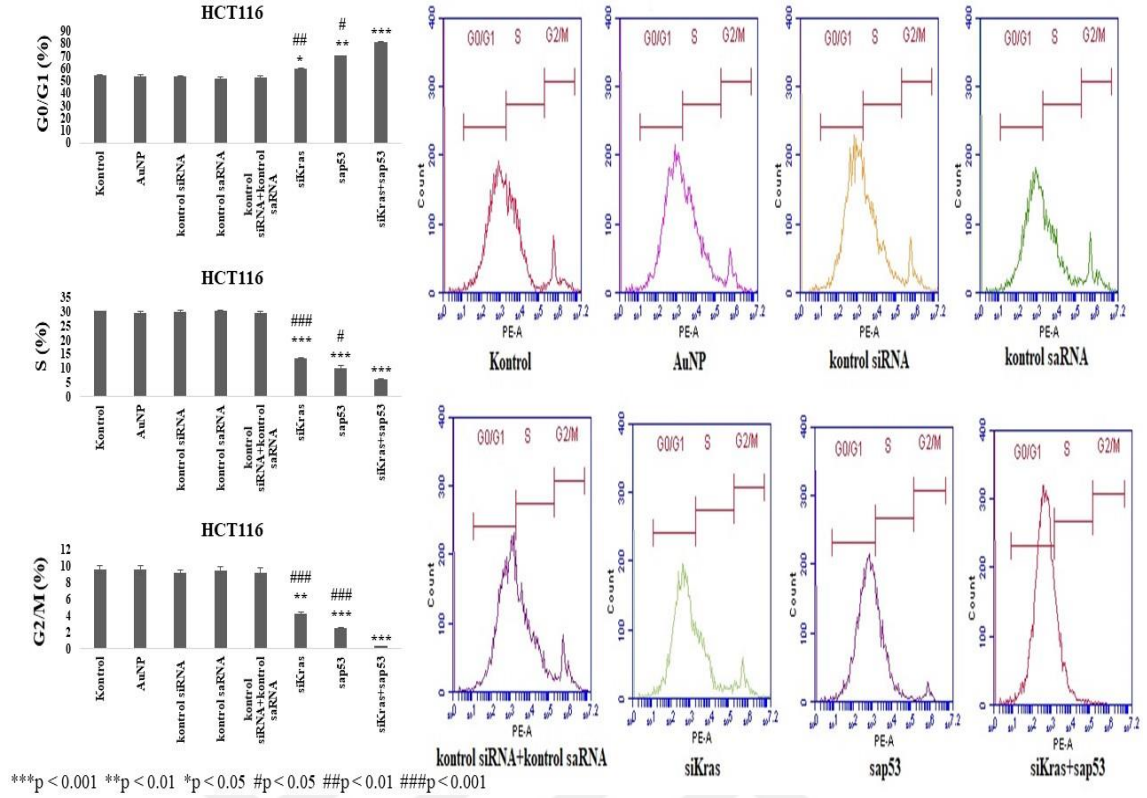
S fazı analizleri sırasında, 72 saat sonunda sap53 ile transfekte edilmiş A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla ortalama %9.51 ve %10.19, siKras ile transfekte edilmiş olan hücre grubunda ise ortalama %16.16 ve %13.56 hücrenin S fazında oldukları tespit edildi. siKras ve sap53 ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda sırasıyla A549 ve HCT116 için ortalama %1.64 ve %6.27 S fazı gözlemlendi. Bununla beraber, sap53 ile transfekte edilmiş hücre gruplarında kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla ortalama %25.09 ve %20.03, siKras ile transfekte edilmiş hücre grubunda ise kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla %18.24 ve %16.66 daha az hücrenin S fazında olduğu tespit edildi. sap53 ve siKras ile

birlikte transfekte edilmiş hücre gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla sırasıyla A549 ve HCT116 hücre hatlarında %32.96 ve %23.95 daha az S fazı gözlemlendi.

G2/M fazı analizleri neticesinde, 72 saat sonunda sap53 ile transfekte edilmiş A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla ortalama %2.07 ve %2.48, siKras ile transfekte edilmiş olan hücre grubunda ise ortalama %6.48 ve %4.26 hücrenin G2/M fazında oldukları tespit edildi. siKras ve sap53 ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda sırasıyla A549 ve HCT116 için ortalama %0.26 ve %0.3 G2/M fazı gözlemlendi. Bununla beraber, sap53 ile transfekte edilmiş hücre gruplarında kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla ortalama %9.72 ve %7.08, siKras ile transfekte edilmiş hücre grubunda ise kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla %9.72 ve %5.29 daha az hücrenin G2/M fazında olduğu tespit edildi. sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda ise kontrol grubuna kıyasla sırasıyla A549 ve HCT116 hücre hatlarında %11.53 ve %9.25 daha az G2/M fazı gözlemlendi. Hücre döngüsü analiz sonuçları A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında hücre döngüsü analizi sonuçları.



Şekil 4.21. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında hücre döngüsü analizi sonuçları.

Gözlemler doğrultusunda, hücre döngüsü analizlerinde sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre gruplarında A549 hücre hattı için sırasıyla yalnızca sap53 ve yalnızca siKras ile transfekte edilmiş hücre gruplarına kıyasla G0/G1 fazında %10.99 ve %22.73 daha fazla hücrenin olduğu tespit edilmiştir. HCT116 hücre hattı için G0/G1 fazı sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda sap53 ve siKras ile ayrı ayrı transfekte edilmiş gruba kıyasla sırasıyla %11.35 ve %22.00 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. S fazı analizlerinde, sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre gruplarında A549 hücre hattı için sırasıyla yalnızca sap53 ve yalnızca siKras ile transfekte edilmiş hücre gruplarına kıyasla S fazında %7.87 ve %14.52 daha az hücrenin olduğu tespit edilmiştir. HCT116 hücre hattı için S fazı sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda sap53 ve siKras ile ayrı ayrı transfekte edilmiş gruba kıyasla sırasıyla %3.92 ve %7.29 daha az olduğu tespit edilmiştir. G2/M fazı analizlerinde, sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre gruplarında A549 hücre hattı için sırasıyla yalnızca sap53 ve yalnızca siKras ile transfekte edilmiş hücre gruplarına kıyasla G2/M fazında %1.8 ve %6.21 daha az hücrenin olduğu tespit edilmiştir. HCT116 hücre hattı için G2/M fazı sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda sap53 ve

siKras ile ayrı ayrı transfekte edilmiş gruba kıyasla sırasıyla %2.17 ve %3.96 daha az olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar neticesinde her iki hücre hattı için de birlikte transfeksiyonun ayrı ayrı transfeksiyonlara kıyasla çok daha fazla oranda hücrenin G0/G1 fazında hücre bölünmesini durdurduğu tespit edilmiştir. Her iki hücre hattı için diğer hücre grupları ile kontrol grubu arasında hücre döngüsü fazları açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

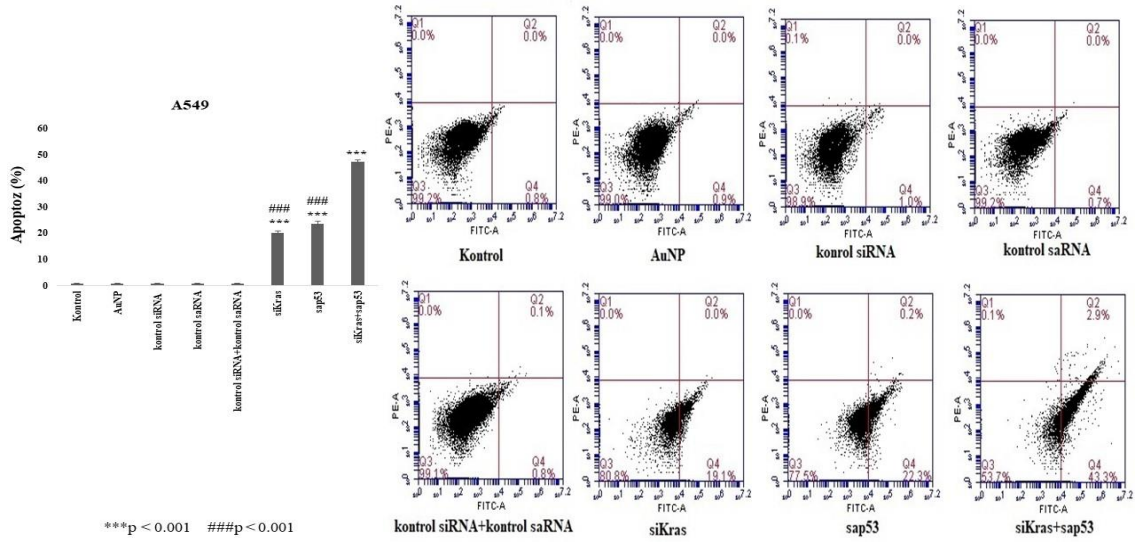
4.8. Apoptoz ve Nekroz Testleri

Hücrelerin farklı uygulama gruplarında AuNP-küçük RNA konjugatlarının apoptozu tetikleyip tetiklemediğini ortaya koymak amacıyla apoptoz ve nekroz testleri uygulanmıştır. PI ve Annexin V-FITC konjugatı ile birlikte inkübe edilmiş farklı gruptaki hücreler BD Accuri™ C6 Plus akış sitometresi ile analiz edildi. Akış sitometrisi tarafından üretilen veriler, BD Accuri™ C6 Plus yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Değerlendirme sırasında, PI'nin Annexin V-FITC'ye karşı temsil edildiği iki boyutlu nokta grafikleri çizildi. Bu grafikler, aşağıdakilere karşılık gelen dört bölgeye ayrılarak: 1) PI ve FITC negatif (PI/FITC -/-, Q3) olan canlı hücreler; 2) PI negatif ve FITC pozitif (PI/FITC -/+, Q1) olan apoptotik hücreler; 3) PI ve FITC pozitif (PI/FITC +/+, Q2) olan geç apoptotik hücreler; 4) PI pozitif ve FITC negatif (PI/FITC +/-, Q4) olan nekrotik hücreler olarak belirlendi.

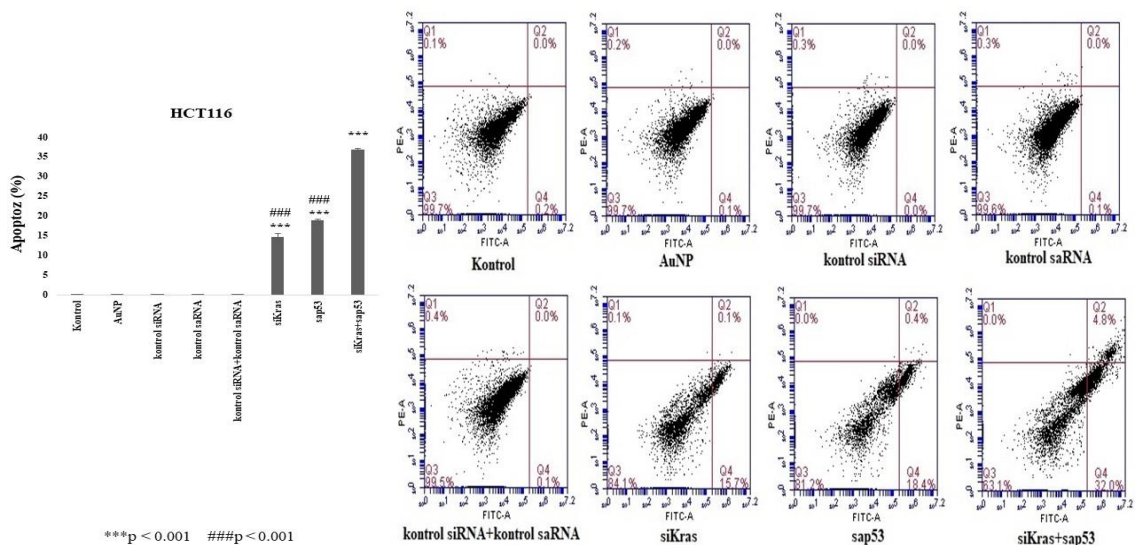
Değerlendirmeler neticesinde, 72 saat sonunda sap53 ile transfekte edilmiş A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla ortalama %23.50 ve %18.89, siKras ile transfekte edilmiş olan hücre grubunda ise ortalama %20.04 ve %14.67 apoptoz gözlemlendi. siKras ve sap53 ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda sırasıyla A549 ve HCT116 için ortalama %47.17 ve %36.90 apoptoz gözlemlendi. Bununla beraber, sap53 ile transfekte edilmiş hücre gruplarında kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla ortalama %22.75 ve %18.71, siKras ile transfekte edilmiş hücre grubunda ise kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla %19.29 ve %14.49 daha fazla apoptoz tetiklendiği gözlemlendi. sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla sırasıyla A549 ve HCT116 hücre hatlarında %46.42 ve %36.72 daha fazla apoptoz gözlemlendi. Her iki hücre hattı için diğer hücre grupları ile kontrol grubu arasında apoptozun tetiklenmesi açısından anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0.05$). Ayrıca, her iki hücre hattı için farklı gruplar arasında ve kontrol grubuna kıyasla nekrozun tetiklenmesi adına anlamlı bir fark tespit edilmemiştir

($p > 0.05$). Apoptoz ve nekroz testi sonuçları A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla Şekil 4.22 ve Şekil 4.23’de verilmiştir.

Gözlemler doğrultusunda, hücre döngüsü analizlerinde sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre gruplarında A549 hücre hattı için sırasıyla yalnızca sap53 ve yalnızca siKras ile transfekte edilmiş hücre gruplarına kıyasla %23.67 ve %27.13 daha fazla apoptoz tespit edilmiştir. HCT116 hücre hattı için apoptozun sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda sap53 ve siKras ile ayrı ayrı transfekte edilmiş gruba kıyasla sırasıyla % 18.01 ve %22.23 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar neticesinde her iki hücre hattı için de birlikte transfeksiyonun ayrı ayrı transfeksiyonlara kıyasla çok daha fazla oranda apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.22. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında apoptoz testi sonuçları.



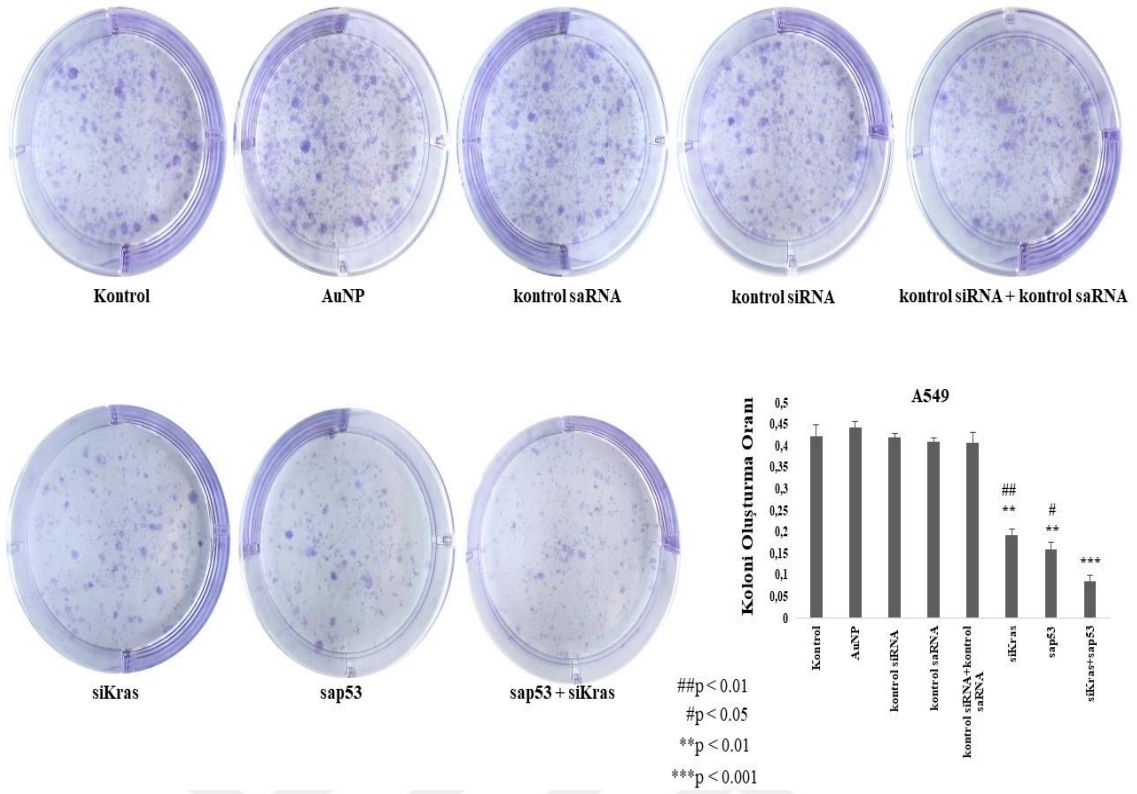
Şekil 4.23. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında apoptoz testi sonuçları.

4.9. Koloni Oluşturma Deneyi

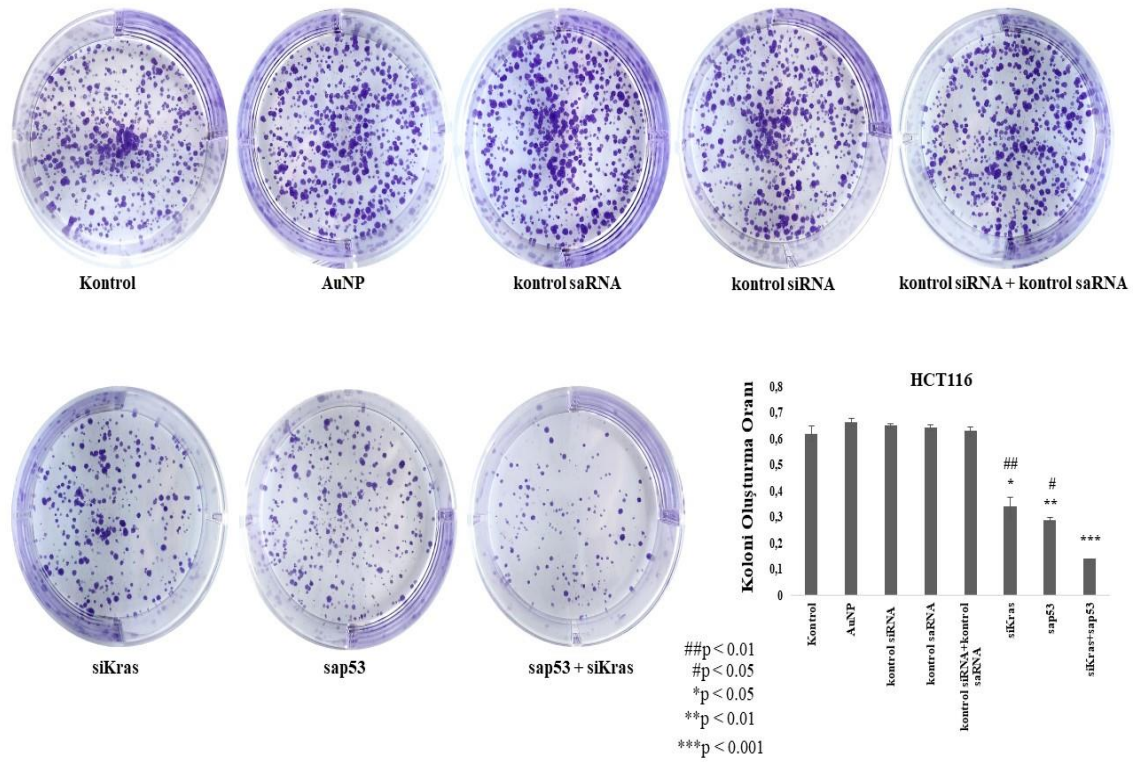
Koloni oluşturma deneyleri, hücrelerin AuNP-küçük RNA transfeksiyonu sonrasında koloni oluşturabilme kapasitelerinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Her iki hücre hattı için transfeksiyonu takip eden 24 saat sonra deneyler başlatılmış ve deneyin 10.günün'de koloniler %0.5 kristal viyoleto boyası ile boyanarak sayı ve büyüklükleri açısından analiz edilmiştir. Bir hücre topluluğunun koloni sayılabilmesi için en az 50 hücre içeriyor olması dikkate alınarak değerlendirmeler yapılmıştır.

A549 ve HCT116 hücre hatlarında sap53 ile transfekte edilmiş hücre gruplarında kontrol gruplarına kıyasla koloni oluşturma yetenekleri sırasıyla %62.18 ve %53.23, siKras ile transfekte edilmiş hücre gruplarında ise kontrol gruplarına kıyasla sırasıyla %54.37 ve %45.16 azaldığı gözlemlenmiştir. Her iki hücre hattı için de sap53 ve siKras ile transfekte edilmiş hücre gruplarında kontrole kıyasla daha küçük boyutta kolonileşmeler gözlemlenmiştir. sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre gruplarında ise koloni oluşturma yeteneklerinde A549 ve HCT116 hücreleri için kontrol hücre gruplarına kıyasla sırasıyla %79.43 ve %77.42 azaldığı görülmüştür ve koloni büyüklüklerinin kontrol hücre gruplarına göre çok daha küçük oldukları gözlemlenmiştir. Her iki hücre hattı için koloni oluşturma yetenekleri açısından diğer hücre uygulama gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Gözlemler doğrultusunda, koloni oluşturma deneyinde sap53 ve siKras ile birlikte transfeksiyonunun A549 hücre hattı için sırasıyla yalnızca sap53 ve yalnızca siKras ile transfekte edilmiş hücre gruplarına kıyasla ortalama %17.25 ve %25.06 daha az koloni oluşumuna sebep olduğu tespit edilmiştir. HCT116 hücre hattı için ise birlikte transfeksiyonun sap53 ve siKras ile ayrı ayrı transfekte edilmiş gruplarına kıyasla sırasıyla %24.19 ve %32.26 daha az koloni oluşumuna sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar neticesinde her iki hücre hattı için de birlikte transfeksiyonun ayrı ayrı transfeksiyonlara kıyasla koloni oluşumunu çok daha fazla engellediği tespit edilmiştir. A549 ve HCT116 hücre hatları için koloni oluşturma deney sonuçları sırasıyla Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'de verilmiştir.



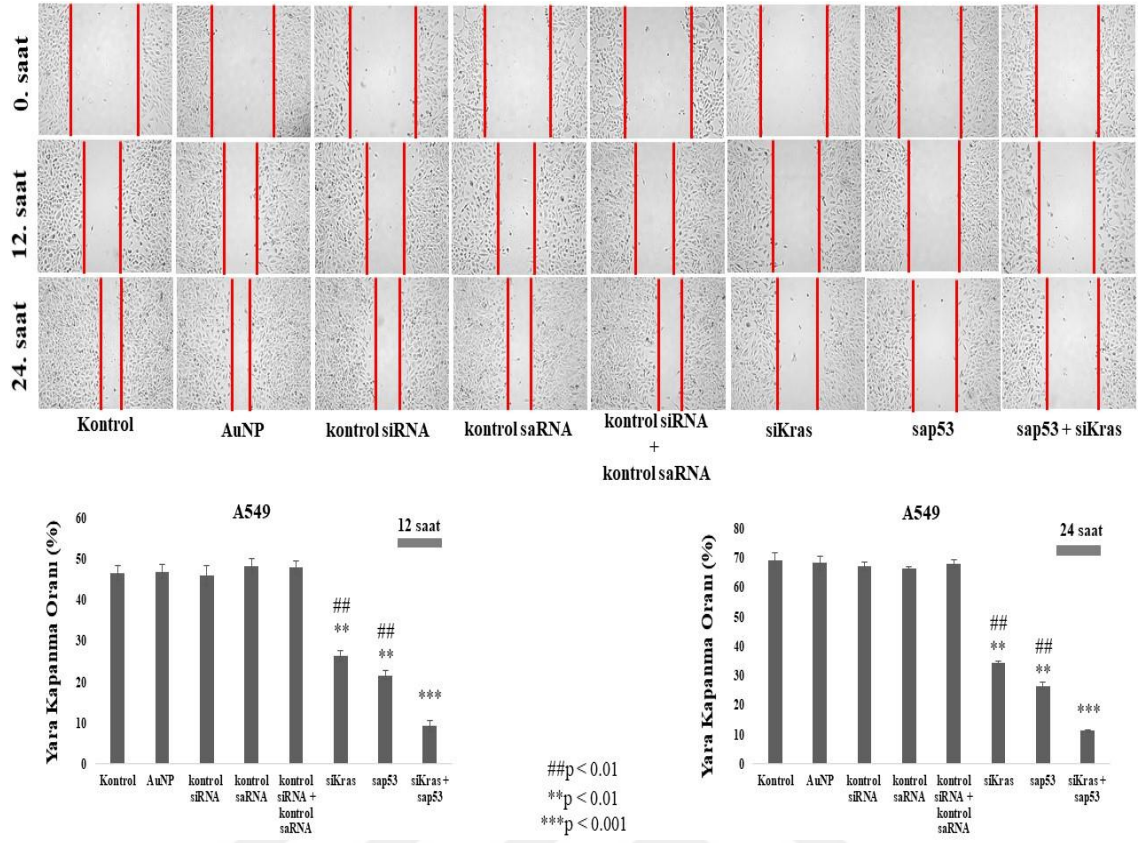
Şekil 4.24. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarında koloni oluşturma deneyi görüntü ve analizleri.



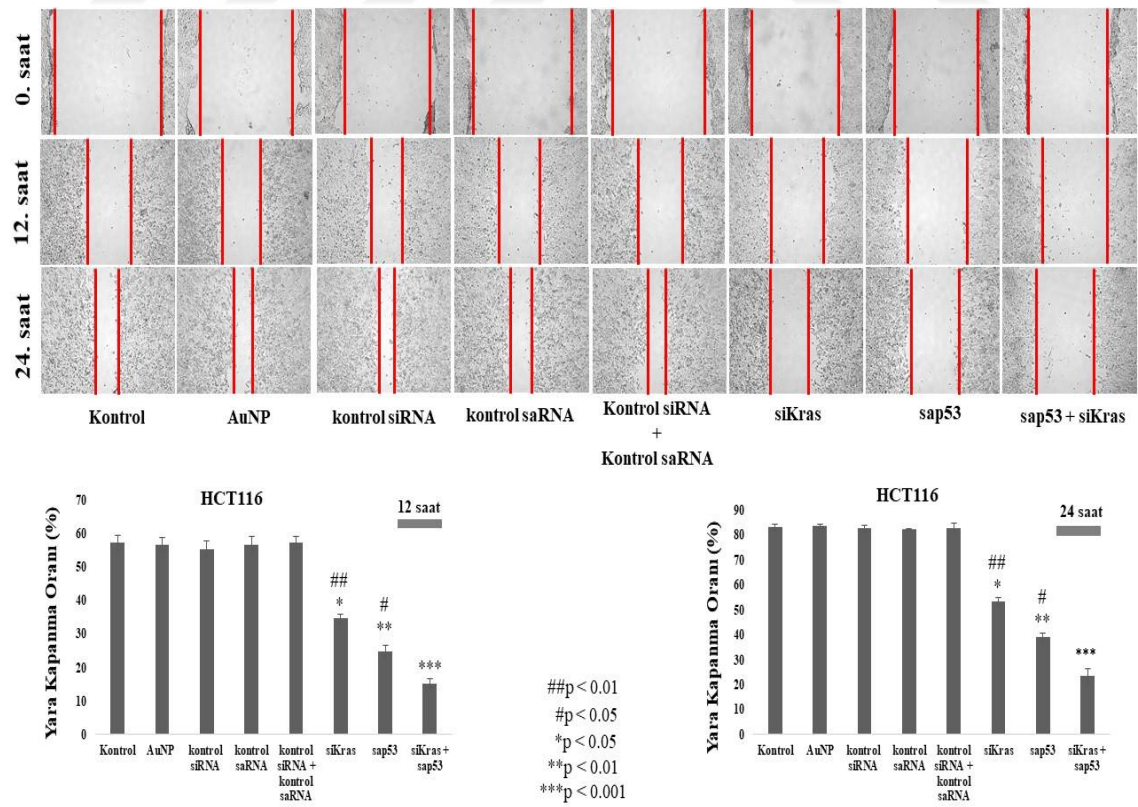
Şekil 4.25. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarında koloni oluşturma deneyi görüntü ve analizleri.

4.10. Yara İyileşmesi Deneyi

Hücrelerin farklı uygulama gruplarında hareket ve çoğalabilme özelliklerinin analiz edilmesi amacıyla yara iyileşmesi deneyi uygulanmıştır. Her iki hücre hattı için farklı hücre gruplarında yara oluşumu gerçekleştirildikten 12 ve 24 saat sonra ilk duruma göre (0.saat) yara kapatma yetenekleri çizik alanlarının ölçülmesiyle oransal olarak hesaplanmış ve oranlar kontrol grubu oranları ile karşılaştırılarak değerlendirmeler yapılmıştır. Bu değerlendirmeler neticesinde, 12 saat sonra sap53 ile transfekte edilmiş A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla ortalama %21.67 ve %24.65, siKras ile transfekte edilmiş olan hücre grubunda ise ortalama %26.32 ve %34.54 yara kapanması gözlemlenmiştir. siKras ve sap53 ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda sırasıyla A549 ve HCT116 için ortalama %9.32 ve %15.23 yara kapanması gözlemlenmiştir. 12 saat sonunda, sap53 ile transfekte edilmiş hücre gruplarında kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla ortalama %25.00 ve %32.66, siKras ile transfekte edilmiş hücre grubunda kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla %20.34 ve %22.66 fazla yara açıklığı gözlemlenmiştir. sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla sırasıyla A549 ve HCT116 hücre hatlarında %37.34 ve %42.00 daha fazla yara açıklığı gözlemlenmiştir. 12 saat sonrası analizlerde diğer hücre grupları ile kontrol grubu arasında yara açıklığı açısından anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi ($p>0.05$). 24 saat sonrası analizlerinde ise, sap53 ile transfekte edilmiş A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla %26.67 ve %39.66, siKras ile transfekte edilmiş olan hücre grubunda ise %34.33 ve %53.26 yara kapanması gözlemlenmiştir. siKras ve sap53 ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda sırasıyla A549 ve HCT116 için %11.27 ve %22.86 yara kapanması gözlemlenmiştir. 24 saat sonunda, sap53 ile transfekte edilmiş hücre gruplarında kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla ortalama %42.66 ve %43.67, siKras ile transfekte edilmiş hücre grubunda kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla %35.00 ve %30.01 daha fazla yara açıklığı gözlemlenmiştir. sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla sırasıyla A549 ve HCT116 hücre hatlarında %58.06 ve %60.11 fazla yara açıklığı gözlemlenmiştir. 24 saat sonrası analizlerde diğer hücre grupları ile kontrol grubu arasında yara açıklığı açısından anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi ($p>0.05$). Yara iyileşmesi görüntü ve analiz sonuçları A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla Şekil 4.26 ve Şekil 4.27’de verilmiştir.



Şekil 4.26. A549 hücre hattında yara iyileşmesi deneyi görüntü ve analizleri.



Şekil 4.27. HCT116 hücre hattında yara iyileşmesi deneyi görüntü ve analizleri.

Gözlemler neticesinde, 12 saat sonra yapılan analizlerde sap53 ve siKras ile birlikte transfeksiyonunun A549 hücre hattı için sırasıyla yalnızca sap53 ve yalnızca siKras ile transfekte edilmiş hücre gruplarına kıyasla %12.35 ve %17.00 daha fazla yara açıklığına sebep olduğu tespit edilmiştir. HCT116 hücre hattı için bu oranlar sırasıyla %9.42 ve %19.31 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 24 saat sonra yapılan analizlerde ise sap53 ve siKras ile birlikte transfeksiyonunun A549 hücre hattı için sırasıyla yalnızca sap53 ve yalnızca siKras ile transfekte edilmiş hücre gruplarına kıyasla %15.40 ve %23.06 daha fazla yara açıklığına sebep olduğu tespit edilmiştir. HCT116 hücre hattı için bu oranlar sırasıyla %16.80 ve %30.40 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 12 ve 24 saat sonrası analizleri neticesinde her iki hücre hattı için de birlikte transfeksiyonun ayrı ayrı transfeksiyonlara kıyasla çok daha fazla oranda yara kapanmasına engel olduğu tespit edilmiştir.

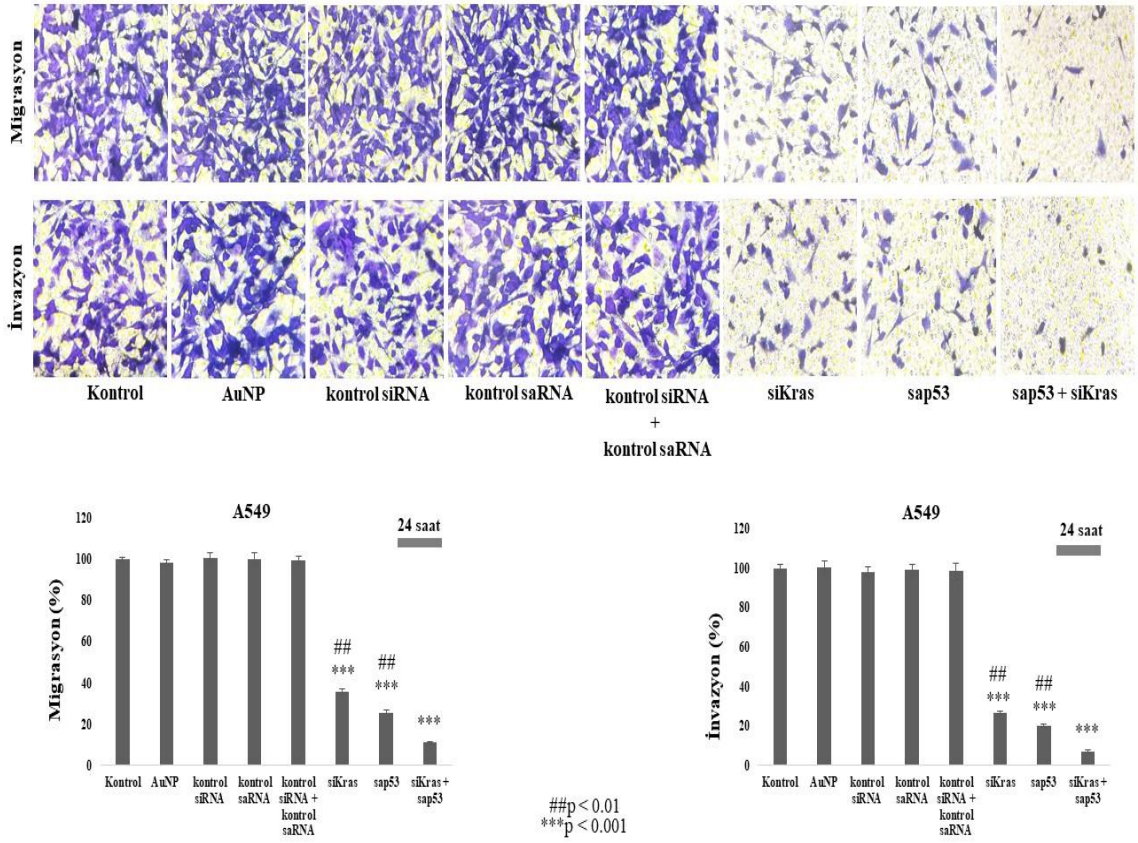
4.11. Migrasyon ve İnvazyon Deneyleri

Hücrelerin farklı uygulama gruplarında migrasyon (göç) ve invazyon (istila) yeteneklerinin analiz edilmesi amacıyla polikarbonat membran kullanılarak boyden çember testi uygulanmıştır. Her iki hücre hattı için farklı hücre gruplarında 24 saat inkübasyonun ardından migratif ve invazif hücreler sayılıp kontrol grubu sayıları ile karşılaştırılarak değerlendirmeler yapılmıştır. Bu değerlendirmeler neticesinde, sap53 ile transfekte edilmiş A549 ve HCT116 hücre hatlarında kontrol grubuna kıyasla sırasıyla ortalama %25.58 ve %33.54, siKras ile transfekte edilmiş olan hücre grubunda ise ortalama %35.50 ve %49.21 hücrenin membranı geçerek göç ettiği gözlemlenmiştir. siKras ve sap53 ile birlikte transfekte edilmiş hücre grubunda sırasıyla A549 ve HCT116 için kontrol grubuna kıyasla ortalama %14.10 ve %20.38 göç eden hücre gözlemlenmiştir.

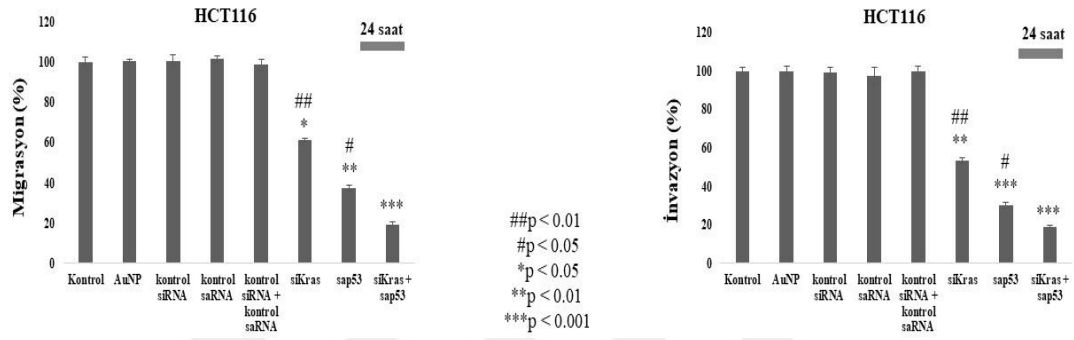
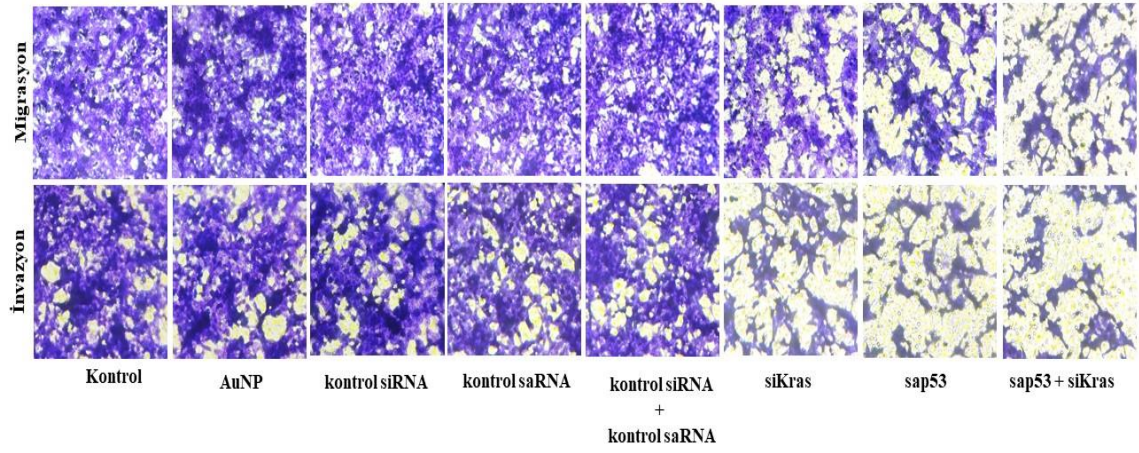
İnvazyon testi neticesinde, sap53 ile transfekte edilmiş hücre gruplarında A549 ve HCT116 hücre hatları için kontrol grubuna kıyasla sırasıyla ortalama %20.03 ve %30.07, siKras ile transfekte edilmiş hücre grubunda kontrol grubuna kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla %27.52 ve %53.54 invazif hücre gözlemlenmiştir. sap53 ve siKras ile birlikte transfekte edilmiş hücre gruplarında ise kontrol gruplarına kıyasla A549 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla %5.01 ve %14.09 invazif hücre gözlemlenmiştir.

Gözlemler neticesinde, migrasyon deneyinde yapılan analizlerle sap53 ve siKras ile birlikte transfeksiyonunun A549 hücre hattı için sırasıyla yalnızca sap53 ve yalnızca siKras ile transfekte edilmiş hücre gruplarına kıyasla migrasyonu %11.48 ve %21.40 daha

fazla engellediği tespit edilmiştir. HCT116 hücre hattı için bu oranlar sırasıyla %13.16 ve %28.83 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İnvazyon deneyinde yapılan analizlerde ise sap53 ve siKras ile birlikte transfeksiyonunun A549 hücre hattı için sırasıyla yalnızca sap53 ve yalnızca siKras ile transfekte edilmiş hücre gruplarına kıyasla invazyonu %15.02 ve %22.51 daha fazla engellediği tespit edilmiştir. HCT116 hücre hattı için bu oranlar sırasıyla %15.98 ve %39.45 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İnvazyon ve migrasyon deneyleri sonrası analizleri neticesinde her iki hücre hattı için de birlikte transfeksiyonun ayrı ayrı transfeksiyonlara kıyasla çok daha fazla oranda migrasyon ve invazyonu önlediği tespit edilmiştir. Diğer hücre grupları ile kontrol grubu arasında migrasyon ve invazyon açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Migrasyon ve invazyon görüntü ve analiz sonuçları A549 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla Şekil 4.28 ve Şekil 4.29’da gösterilmiştir.



Şekil 4.28. A549 hücre hattında farklı uygulama gruplarının migrasyon ve invazyon sonuçları.



Şekil 4.29. HCT116 hücre hattında farklı uygulama gruplarının migrasyon ve invazyon sonuçları.

5. TARTIŞMA

KRAS, tüm kanserler arasında yüksek mutasyon oranına sahip en iyi bilinen onkogendir ve pankreas duktal adenokarsinomu (PDADK), KHDAK ve KRK dahil olmak üzere bir dizi yüksek derecede ölümcül kanserle ilişkilidir (120). KRAS'taki onkogenik mutasyonlar çoğunlukla 12, 13 ve 61 numaralı kodonlara odaklanır. Bu bölgelerdeki mutasyon seviyeleri izoform ve malignite tipine bağlı olarak değişir (173). Özellikle kodon 12'deki glisin, en sık yanlış mutasyonlardan etkilenir (174). Dahası, KRAS yanlış mutasyonlarını köken dokularda; KRAS G12D, KRK ve PDADK'deki tüm KRAS mutasyonlarının ~%25-40'ını oluştururken KRAS G12C, akciğer ADK'de tüm KRAS mutasyonlarının >%40'ını oluşturur (173). Ne yazık ki, 40 yıllık tescilli ilaç araştırmalarına rağmen, mutasyona uğramış KRAS alt tipi KRAS'ı (G12C) hedeflemesi yeni onaylanan sotorasib dışında, KRAS mutasyonlarını hedef alan etkili bir strateji henüz mevcut değildir (120). Ayrıca KRAS mutasyonu olan hastaların mevcut standart tedaviye yanıtı genellikle zayıftır. Bu nedenle, RNAi dahil olmak üzere birçok çaba, KRAS'ı hedeflemeye odaklanmıştır. KRAS kaynaklı kanserde KRAS mutasyonlarını hedeflemeye yönelik acil ve karşılanmamış bir ihtiyaç vardır (120).

siRNA, gen ifadesinin son derece spesifik, geri döndürülebilir kontrolünü sunduğu için muazzam bir terapötik potansiyel barındırır (175). siRNA ile hedefe özgü terapötik yaklaşımların kullanıldığı kanserler arasında meme kanseri, AK , beyin tümörleri, yumurtalık kanseri, kolon kanseri ve prostat kanseri yer alır (118). Örneğin, Siklin B1 siRNA inhibisyon stratejisi, prostat ve AK'de *in vivo* olarak uygulanmıştır ve farelerde deri altı AK modelinde tümör hacminde %70'e varan azalmaya sebep olduğu ve tedavi edilen hayvanların yarısı daha uzun hayatta kalma sergilediği gösterilmiştir (119). Diğer bir çalışmada, MAD2 siRNA deri altı kolon karsinomu taşıyan farelere intravenöz olarak uygulanmış ve tümör büyümesini %35 oranında inhibe ettiğini gösterilmiştir (120). Yapılan bir başka çalışmada ise Plk1 siRNA deri altı meme tümörü taşıyan farelere intravenöz olarak enjekte edilmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tümör hacminin %70 oranında azalmasına yol açtığı rapor edilmiştir (121).

Son zamanlarda, RNAi ve siRNA, KRAS-mutant tümörlerdeki uygulamalarla umut verici antitümör etkinliği göstermiştir (82, 176). Böylece, siRNA tedavisi KRAS'ı hedeflemek için umut verici bir yaklaşım haline gelmiştir (115). Çeşitli çalışmalar siRNA tabanlı yaklaşımların KRAS'ı hedeflemedeki etkinliğini göstermiştir. Örneğin, bir çalışmada pankreas kanseri hücrelerinde mutant KRAS'ın başarılı bir şekilde inhibe

edildiği ve bunun sonucunda tümör büyümesinin azaldığı bildirilmiştir (177). Bu araştırma, KRAS kaynaklı kanserlere karşı terapötik bir strateji olarak siRNA'nın potansiyelini vurgulamıştır. Başka bir çalışmada ise, AK'de mutant KRAS'ı hedeflemek için siRNA kullanımı araştırılmış ve sonuçlar, mutant KRAS'ın siRNA aracılı inhibisyonunun, tümör hücresi proliferasyonunda azalmaya ve apoptozda artışa yol açtığını göstermiştir (178). Bu çalışma, KRAS mutasyonlu AK için siRNA bazlı tedavilerin uygulanabilirliğini vurgulamıştır. Bunlarla birlikte, siRNA kullanılıp KRAS hedeflenerek yapılan bir çalışmada, KRAS ekspresyonunun güçlü ve spesifik bir şekilde baskılandığı, kolon kanseri hücrelerinde proliferasyon ve canlılığın azaldığı, *in vitro* apoptozun indüklendiği ve kolon kanseri ksenograft fare modellerinde tümör büyümesini önemli ölçüde yavaşlattığı gösterilmiştir (102). Ek olarak, KRAS ile ilişkili kanserler için siRNA bazlı tedavilerin geliştirilmesi, bunların güvenilirliğini ve etkinliğini değerlendirmek için süregelen denemelerle birlikte aktif bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir (179).

Gen tedavisinde RNA temelli başka bir yaklaşım ise gen transkripsiyonunun artırılmasıdır. saRNA'lar, gen promotör bölgelerini spesifik olarak hedefleyerek transkripsiyonel gen aktivasyonuna yol açarlar. saRNA kullanan terapötik yaklaşımlar, son yıllarda farklı kanser türleri için birçok gen hedef alınarak uygulanmaya devam etmektedir (17). Örneğin, promotör hedefli saRNA yaklaşımı yoluyla Dihidropirimidinaz benzeri 3 (DPYSL3) gen ekspresyonunun artırılması, prostat kanser hücresi hareketliliğini ve metastazı baskıladığı (180), saRNA tarafından NK3 homeobox 1 (NKX3-1) geninin indüksiyonu, prostat tümörü büyümesini inhibe ettiği (181), E-cadherinin saRNA tarafından indüksiyonu, insan mesane kanseri hücresinde (182) ve böbrek karsinom hücrelerinde (183) invazyonu ve migrasyonu engellediği rapor edilmiştir. Diğer bazı çalışmalarda ise saRNA'nın tümör baskılayıcı kanserde hipermetillenmiş 1'in (HIC-1'in) meme kanseri üzerindeki aktivitesini restore ettiği ve saRNA tedavisi üzerine, immün aktivasyonu, hücre döngüsü durdurulması, apoptozun indüklenmesi, anti-metastaz ve hücre farklılaşmasında rol oynayan genlerin indüklendiği ve hücre istilasında, hücre büyümesinde ve hücre bölünmesinde rol oynayan genlerin ve onkogenlerin de aşağı yönde regüle edildiği (184) ve klonojenliği ve istilacılığı engellediği (185) gösterilmiştir. Ayrıca, vezatin, yapışan kavşak transmembran proteini'nin (VEZT'nin) saRNA tarafından indüksiyonu mide kanseri hücrelerinin çoğalmasını, istilasını ve göçünü engellediği (186), saRNA'nın, fosfatase ve tensin homologu (PTEN) ekspresyonunu artırarak epidermal büyüme faktörü reseptörü-mutant

AK'de tirozin kinaz inhibitör direncini tersine çevirdiği ve apoptozun artmasında sebep olduğu (187) ve Endojen D3 vitamini yukarı regüle edilmiş protein 1 (VDUP1) geninin saRNA tarafından hedeflenen indüksiyonu, AK hücrelerinin büyümesini engellediği (188) bildirilmiştir. Bunlara ek olarak saRNA ile terapötik yaklaşımlarda sıklıkla C/EBP α (132-136) ve p21 (22, 131, 137-139) genlerini hedef alınarak çalışmalar devam etmektedir. Bu yaklaşımlardan C/EBP α 'nın saRNA ile hedef alınması klinik denemesindedir ve saRNA terapötikine ilişkin insanlar üzerinde yapılan ilk çalışmayı temsil etmektedir (134-136).

Son yıllarda TP53 geni saRNA'nın hedefi haline gelmiştir. Bununla ilgili olarak, yabani tip p53'ün ekspresyonunu düzenleyerek prostat kanseri hücrelerini baskılamak için spesifik saRNA kullanılmış ve deneysel olarak saRNA'nın, insan prostat kanseri hücre hatları LNCaP ve DU145'teki p53 promotör bölgesini hedefleyerek yabani tip p53 ekspresyonunu önemli ölçüde aktive ettiği, p53'ün aşırı ekspresyonunun ise siklin D1 ve sikline bağımlı kinazın (CDK) 4/6 ekspresyonunu aşağı regüle ettiği, prostat kanseri hücrelerinde G0/G1 fazı hücre döngüsü durmasını indüklediği ve hücre çoğalmasını ve klon oluşumunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (18). Başka bir çalışma, saRNA'nın, p53 promoter bölgesine etki ederek insan mesane kanseri hücreleri T24 ve EJ'de p53 ekspresyonunu aktive ettiğini ve *in vitro* deneylerle, saRNA'nın hücre çoğalmasını ve klon oluşumunu inhibe ettiğini, G0/G1 fazı hücre döngüsü durmasını indüklediğini ve invazyonu ve metastazı inhibe ettiğini ve farelerde yapılan *in vivo* deneylerle ise, saRNA'nın mesane kanserinin ksenograft modelinde tümör büyümesini ve metastazını önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir (19). Daha sonra yapılan çalışmada ise, saRNA ile p53'ün hedef alınmasıyla, mide kanseri hücrelerinde *in vitro* proliferasyon ve migrasyon yeteneklerinin önemli ölçüde inhibe edildiği ve böylece biyolojik davranışlarını etkilediği ortaya konmuştur (20). Bu çalışmalar, yabani tip p53 taşıyan hücre kaynaklı diğer kanser hastalıklarında p53'ün saRNA ile hedef alınarak antikanser tedavi stratejisi geliştirilmesi adına umut vadetmektedir.

Bazı çalışmalar tek başına spesifik bir genin hedef alınmasının yanı sıra belirli kombinasyon tedavi yaklaşımlarının daha verimli sonuçlar ortaya koyduğunu destekler niteliktedir. Örneğin, bir çalışmada, p21'i hedef alan saRNA ve antikanser ajan olan sisplatin kombine olarak kullanılmış ve *in vitro* koşullarda A549 akciğer ADK hücre hattında sisplatinin duyarlılığın arttığı ve hücre büyümesinin engellendiği ve *in vivo* koşullarda ise A549 ksenograft farelerde tümör büyümesini önemli ölçüde engelleyebileceği gösterilmiştir (22). Diğer bir kombinasyon terapötik yaklaşımda ise

akciğer ADK'de miR-34a ve KRAS'ı hedef alan siRNA birlikte kullanılmış ve iki ajanın ayrı ayrı kullanılmasıyla karşılaştırıldığında anti-tümör etkilerini arttırdığı ve tümör gerilemesine yol açtığı rapor edilmiştir (16). Farklı bir kombine yaklaşımda, 5-FU ve miR-532-3p/si-KRAS ile birlikte kombine olarak uygulanmasının KKK hücrelerinin malign fenotiplerini inhibe etmek için umut verici bir potansiyel strateji sağlayabileceği gösterilmiş ve tek başına kullanılan serbest 5-FU ile karşılaştırıldığında, 5-FU ve miRNA/siRNA'nın birlikte verilmesi anti-tümör etkinliğini büyük ölçüde arttırdığı rapor edilmiştir (189).

Mutant KRAS taşıyan akciğer (12, 121, 178) ve kolon kanserlerinde (104, 121) siRNA ile KRAS hedef alınarak antikanser etkileri daha önceden yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bununla beraber, mutant KRAS ve yabani tip p53 taşıyan A549 insan akciğer kanser hücrelerinde KRAS'ın, düşük p53 seviyesinin korunmasına katkıda bulunduğu ve siRNA ile KRAS'ın inhibe edilmesinin p53'ü stabilize edip yeniden etkinleştirdiği ve böylece malign dönüşümü engellediği gösterilmiştir (190). Ek olarak, mutant KRAS'ın kolorektal tümör hücrelerinde ERK2-p53 kompleksinin oluşumunu spesifik olarak desteklediği ve MEK1/2 ve ERK2 inhibitörlerinin uygulanmasıyla bu kompleksin bozulması, p53'e bağımlı PUMA transkripsiyonunu aktive ederek güçlü apoptotik tepkiler ortaya çıkardığı ve böylece KRAS mutant tümörünü öldürdüğü ortaya konmuştur (191). Bu çalışmalar mutant KRAS'ın inhibisyonunun p53'ün biyolojik aktivitesinin artmasında etkili rolü olabileceğine ve KRAS'ın siRNA ile inhibisyonu ile p53'ün saRNA ile aktivasyonunun kombine olarak kullanımının p53'ün aktivasyonunu daha da arttırabileceğine ışık tutmuştur. Fakat bu kombine yaklaşım, mutant KRAS ve yabani yip p53 taşıyan akciğer ADK ve KKK için daha önceden uygulanmış bir çalışma olarak karşımıza çıkmamaktadır. Buradan hareketle, çalışmamızda mutant KRAS ve yabani tip p53 taşıyan A549 akciğer ADK hücre hattında RNA temelli yeni bir kombine terapötik strateji geliştirmeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda, KRAS'ın mRNA'sını 3' kodlama yapmayan bölgesinden hedef alıp ekspresyonunu inhibe eden siRNA (16) ve p53'ün promotör bölgesini hedef alıp ekspresyonunu arttıran saRNA (18-20), 20 nm altın AuNP'ler sentezlenip karakterize edildikten sonra, birlikte aynı AuNP üzerine konjuge edildi ve elde edilen AuNP-(siRNA ve saRNA) konjugatları kültür ortamında A549 hücresine transfekte edilerek analizler gerçekleştirildi.

Yapılan deneyler neticesinde bu kombine yaklaşımın siRNA ve saRNA'nın ayrı ayrı uygulanmalarına oranla kontrol hücre grubuna kıyasla hücre döngüsünün durması, koloni oluşturma oranının azalması, apoptozun tetiklenmesi, migrasyon ve invazyonun

engellenmesi gibi hücresel olayları çok daha fazla sağladığını ortaya koyduk. Çalışmamıza konu olan kombine terapötik stratejinin, mutant KRAS ve yabani tip p53 taşıyan farklı hücre hattında aynı/benzer etkiler gösterip göstermeyeceği açısından kontrol edilmesi amacıyla HCT116 insan KKK hücre hattı çalışmaya dahil edildi ve benzer şekilde kombine yaklaşımın, ayrı ayrı transfeksiyonların sağlamış olduğu antikanser etkiye kıyasla daha fazla etkili olduğu ortaya kondu. Çalışma sırasında tüm deneysel aşamalar her iki hücre hattı için eşit şartlarda uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde çalışmamızın RNA temelli yeni kombinasyon terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde öncülük etmesi beklenmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda temel olarak KRAS mutant ve yabani tip p53 taşıyan A549 hücre hattında daha önce araştırılmamış olan RNA temelli kombine bir yaklaşım denenmiş olup, siRNA (KRAS siRNA.923) ile KRAS inhibisyonunun ve saRNA (dsP53-285) ile p53 aktivasyonunun birlikte uygulanmasının neden olabileceği hücresel olaylar incelenmiştir. Aynı koşullarda HCT116 hücre hattı çalışmaya dahil edilerek, çalışmamıza konu olan kombine terapötik stratejinin, mutant KRAS ve yabani tip p53 taşıyan farklı hücre hattında aynı/benzer etkiler gösterip göstermeyeceği açısından kontrol edilmesi amaçlanmıştır.

A549 ve HCT116 hücre hatlarında kombine terapi yaklaşımının kontrole kıyasla, hücre proliferasyonunu azalttığı, G0/G1 fazında hücre döngüsünün durmasına neden olduğu, apoptozu tetiklediği, koloni oluşumunu azaltıcı etkide bulunduğu ve invazyon ve migrasyonu engellediği saptanmıştır. Aynı zamanda her iki hücre hattı için kombine yaklaşımın, siRNA ve saRNA'nın ayrı ayrı kullanıldığı terapi yaklaşımlarına kıyasla hücre döngüsünü G0/G1 fazında daha fazla durdurduğu, apoptozu daha çok tetiklediği ve hücre proliferasyonunu, koloni oluşturma yeteneğini, invazyonu ve migrasyonu daha fazla azalttığı belirlenmiştir. Böylelikle, çalışmamıza konu olan kombine olarak uygulanmış bu yaklaşımın her iki hücre hattı için kontrol grubuna kıyasla antikanser etki sağladığı tespit edilmiş olup, bu kombine yaklaşımın her iki küçük RNA'nın ayrı ayrı sağlamış olduğu antikanser etkiye oranla çok daha fazla antikanser etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur.

Çalışmamızdaki terapötik yaklaşım, *in vitro* olarak yalnızca iki hücre hattında denenmiştir. Kombine yaklaşımın antikanser etkilerini daha fazla belirleyebilmek ve ayrı ayrı uygulamalara oranla farkını ortaya koyabilmek adına bu yaklaşımın mutant KRAS ve yabani tip p53 taşıyan farklı hücre hatlarında ve dahası *in vivo* olarak denenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2021, 71(3):209-49.
2. Khan P, Siddiqui JA, Lakshmanan I, Ganti AK, Salgia R, Jain M, Batra SK, Nasser MW. RNA-based therapies: A cog in the wheel of lung cancer defense. *Molecular cancer* 2021, 20:1-24.
3. Inamura K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in oncology* 2017, 7:193.
4. Li W, Qu J, Xu Z. Clinical features and mutation status of EGFR, KRAS, BRAF, EML4-ALK and ROS1 between surgical resection samples and non surgical resection samples in lung cancer. *Journal of thoracic disease* 2015, 7(5):875.
5. Cruz CSD, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine* 2011, 32(4):605-44.
6. Denisenko TV, Budkevich IN, Zhivotovsky B. Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma. *Cell death & disease* 2018, 9(2):117.
7. Kumar V, Yadavilli S, Kannan R. A review on RNAi therapy for NSCLC: Opportunities and challenges. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2021, 13(2):e1677.
8. Holderfield M. Efforts to develop KRAS inhibitors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2018, 8(7).
9. Christensen JG, Olson P, Briere T, Wiel C, Bergo MO. Targeting Krasg12c-mutant cancer with a mutation-specific inhibitor. *Journal of internal medicine* 2020, 288(2):183-91.
10. Soofiyani SR, Baradaran B, Lotfipour F, Kazemi T, Mohammadnejad L. Gene therapy, early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *Advanced pharmaceutical bulletin* 2013, 3(2):249.
11. Zarredar H, Ansarin K, Baradaran B, Ahdi Khosroshahi S, Farajnia S. Potential molecular targets in the treatment of lung cancer using siRNA technology. *Cancer investigation* 2018, 36(1):37-58.

12. Mehta A, Dalle Vedove E, Iserl L, Merkel OM. Targeting KRAS mutant lung cancer cells with siRNA-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *Pharmaceutical research* 2019, 36:1-13.
13. Tammemagi MC, McLaughlin JR, Bull SB. Meta-analyses of p53 tumor suppressor gene alterations and clinicopathological features in resected lung cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 1999, 8(7):625-34.
14. Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *BioMed Research International* 2011, 2011.
15. He L, He X, Lim LP, De Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007, 447(7148):1130-4.
16. Xue W, Dahlman JE, Tammela T, Khan OF, Sood S, Dave A, Cai W, Chirino LM, Yang GR, Bronson R. Small RNA combination therapy for lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014, 111(34):E3553-E61.
17. Wang X-Y, Yuan L, Li Y-L, Gan S-J, Ren L, Zhang F, Jiang J, Qi X-W. RNA activation technique and its applications in cancer research. *American Journal of Cancer Research* 2018, 8(4):584.
18. Ge Q, Wang C, Ruan Y, Chen Z, Liu J, Ye Z. Overexpression of p53 activated by small activating RNA suppresses the growth of human prostate cancer cells. *Oncotargets Ther* 2016, 9:231-41.
19. Wang C, Ge Q, Zhang Q, Chen Z, Hu J, Li F, Ye Z. Targeted p53 activation by saRNA suppresses human bladder cancer cells growth and metastasis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2016, 35(1):1-9.
20. Wang J, Li H, Xie D, Li L, Wang J, Peng L, Zhou Y. The reactivation of P53 by saRNA affects the biological behavior in vitro in gastric cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2018, 11(6):3157-64.
21. Uras IZ, Moll HP, Casanova E. Targeting KRAS mutant non-small-cell lung cancer: past, present and future. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21(12):4325.
22. Wei J, Zhao J, Long M, Han Y, Wang X, Lin F, Ren J, He T, Zhang H. p21WAF1/CIP1 gene transcriptional activation exerts cell growth inhibition and enhances chemosensitivity to cisplatin in lung carcinoma cell. *BMC cancer* 2010, 10(1):1-8.

23. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018, 68(6):394-424.
24. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz Jr LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *science* 2013, 339(6127):1546-58.
25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell* 2011, 144(5):646-74.
26. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17(9):2941-53.
27. McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015.
28. Vineis P, Chadeau-Hyam M, Gmuender H, Gulliver J, Herceg Z, Kleinjans J, Kogevinas M, Kyrtopoulos S, Nieuwenhuijsen M, Phillips DH. The exposome in practice: design of the EXPOsOMICS project. *International journal of hygiene and environmental health* 2017, 220(2):142-51.
29. Hoadley KA, Yau C, Wolf DM, Cherniack AD, Tamborero D, Ng S, Leiserson MD, Niu B, McLellan MD, Uzunangelov V. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell* 2014, 158(4):929-44.
30. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K-A, Mooij TM, Roos-Blom M-J, Jervis S, Van Leeuwen FE, Milne RL, Andrieu N. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Jama* 2017, 317(23):2402-16.
31. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Molecular origins of cancer: lung cancer. *New England Journal of Medicine* 2008, 359(13):1367-80.
32. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nature reviews Drug discovery* 2014, 13(11):828-51.
33. Liu P, Wang Y, Li X. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2019, 9(5):871-9.
34. Chen C-C, Er T-K, Liu Y-Y, Hwang J-K, Barrio MJ, Rodrigo M, Garcia-Toro E, Herreros-Villanueva M. Computational analysis of KRAS mutations: implications for different effects on the KRAS p. G12D and p. G13D mutations. *PloS One* 2013, 8(2):e55793.

35. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 2007, 129(5):865-77.
36. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer* 2011, 11(11):761-74.
37. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews cancer* 2003, 3(1):11-22.
38. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research* 1989, 49(17):4682-9.
39. Pylayeva-Gupta Y, Lee KE, Hajdu CH, Miller G, Bar-Sagi D. Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia. *Cancer cell* 2012, 21(6):836-47.
40. Waters AM, Der CJ. KRAS: the critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2017:a031435.
41. Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, Gaida K, Holt T, Knutson CG, Koppada N. The clinical KRAS (G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* 2019, 575(7781):217-23.
42. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, Price TJ, Falchook GS, Wolf J, Italiano A, Schuler M, Borghaei H, Barlesi F, Kato T, Curioni-Fontecedro A, Sacher A, Spira A, Ramalingam SS, Takahashi T, Besse B, Anderson A, Ang A, Tran Q, Mather O, Henary H, Ngarmchamnanrith G, Friberg G, Velcheti V, Govindan R. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N Engl J Med* 2021, 384(25):2371-81.
43. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, Desai J, Durm GA, Shapiro GI, Falchook GS, Price TJ, Sacher A, Denlinger CS. KRASG12C inhibition with sotorasib in advanced solid tumors. *New England Journal of Medicine* 2020, 383(13):1207-17.
44. Kato S, Han S-Y, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C. Understanding the function–structure and function–mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, 100(14):8424-9.
45. Joerger AC, Fersht AR. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, 2(6):a000919.
46. Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer cell* 2014, 25(3):304-17.

47. Li T, Kon N, Jiang L, Tan M, Ludwig T, Zhao Y, Baer R, Gu W. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* 2012, 149(6):1269-83.
48. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 2009, 137(3):413-31.
49. Reed SM, Quelle DE. p53 acetylation: regulation and consequences. *Cancers* 2014, 7(1):30-69.
50. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992, 358(6381):15-6.
51. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010, 2(1):a001008.
52. Marei HE, Althani A, Afifi N, Hasan A, Caceci T, Pozzoli G, Morrione A, Giordano A, Cenciarelli C. p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int* 2021, 21(1):703.
53. Muller PA, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *Journal of Cell Biology* 2011, 192(2):209-18.
54. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 2004, 4(10):793-805.
55. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in context. *Cell* 2017, 170(6):1062-78.
56. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2021. *Ca Cancer J Clin* 2021, 71(1):7-33.
57. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology* 2011, 6(2):244-85.
58. Van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruyscher DK. Small-cell lung cancer. *The Lancet* 2011, 378(9804):1741-55.
59. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *Journal of Thoracic Oncology* 2015, 10(9):1240-2.
60. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008, 83(5):584-94.

61. Wood DE, Kazerooni EA, Baum SL, Eapen GA, Ettinger DS, Hou L, Jackman DM, Klippenstein D, Kumar R, Lackner RP. Lung cancer screening, version 3.2018, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2018, 16(4):412-41.
62. Team NLSTR. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *New England Journal of Medicine* 2011, 365(5):395-409.
63. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bharat A, Bruno DS, Chang JY, Chirieac LR, D'Amico TA. NCCN guidelines insights: non-small cell lung cancer, version 2.2021: featured updates to the NCCN guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2021, 19(3):254-66.
64. Naylor EC, Desani JK, Chung PK. Targeted therapy and immunotherapy for lung cancer. *Surgical Oncology Clinics* 2016, 25(3):601-9.
65. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu Y-L, Paz-Ares L. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet* 2017, 389(10066):299-311.
66. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, O'Brien M, Rao S, Hotta K, Vandormael K, Riccio A, Yang J, Pietanza MC, Brahmer JR. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. *J Clin Oncol* 2019, 37(7):537-46.
67. Engelman JA, Jänne PA. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2008, 14(10):2895-9.
68. Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Cancer* 2010, 10(11):760-74.
69. Camidge DR, Kono SA, Lu X, Okuyama S, Barón AE, Oton AB, Davies AM, Varella-Garcia M, Franklin W, Doebele RC. Anaplastic lymphoma kinase gene rearrangements in non-small cell lung cancer are associated with prolonged progression-free survival on pemetrexed. *Journal of Thoracic Oncology* 2011, 6(4):774-80.
70. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020, 70(1):7-30.

71. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* 2005, 40(2):90-7.
72. Kadota K, Suzuki K, Kachala SS, Zabor EC, Sima CS, Moreira AL, Yoshizawa A, Riely GJ, Rusch VW, Adusumilli PS. A grading system combining architectural features and mitotic count predicts recurrence in stage I lung adenocarcinoma. *Modern pathology* 2012, 25(8):1117-27.
73. Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *J Clin Oncol* 2013, 31(8):1105-11.
74. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmi B, Zappasodi R, Maeda Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN, Chan TA. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015, 348(6230):124-8.
75. Network CGAR. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014, 511(7511):543.
76. Campbell JD, Alexandrov A, Kim J, Wala J, Berger AH, Pedamallu CS, Shukla SA, Guo G, Brooks AN, Murray BA, Imielinski M, Hu X, Ling S, Akbani R, Rosenberg M, Cibulskis C, Ramachandran A, Collisson EA, Kwiatkowski DJ, Lawrence MS, Weinstein JN, Verhaak RG, Wu CJ, Hammerman PS, Cherniack AD, Getz G, Artyomov MN, Schreiber R, Govindan R, Meyerson M. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 2016, 48(6):607-16.
77. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(6):459-65.
78. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2019, 19(9):495-509.
79. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS medicine* 2005, 2(1):e17.
80. Riely GJ, Pao W, Pham D, Li AR, Rizvi N, Venkatraman ES, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M, Miller VA. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clinical cancer research* 2006, 12(3):839-44.

81. O'Sullivan É, Keogh A, Henderson B, Finn SP, Gray SG, Gately K. Treatment Strategies for KRAS-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2023, 15(6).
82. Yuan TL, Fellmann C, Lee C-S, Ritchie CD, Thapar V, Lee LC, Hsu DJ, Grace D, Carver JO, Zuber J. Development of siRNA payloads to target KRAS-mutant cancer. *Cancer discovery* 2014, 4(10):1182-97.
83. Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, Settleman J. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 2009, 15(6):489-500.
84. Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* 2017, 17(1):20-37.
85. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012, 486(7404):532-6.
86. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8(4):275-83.
87. Wang D, Pham NA, Tong J, Sakashita S, Allo G, Kim L, Yanagawa N, Raghavan V, Wei Y, To C, Trinh QM, Starmans MH, Chan-Seng-Yue MA, Chadwick D, Li L, Zhu CQ, Liu N, Li M, Lee S, Ignatchenko V, Strumpf D, Taylor P, Moghal N, Liu G, Boutros PC, Kislinger T, Pintilie M, Jurisica I, Shepherd FA, McPherson JD, Muthuswamy L, Moran MF, Tsao MS. Molecular heterogeneity of non-small cell lung carcinoma patient-derived xenografts closely reflect their primary tumors. *Int J Cancer* 2017, 140(3):662-73.
88. Soussi T, Wiman KG. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ* 2015, 22(8):1239-49.
89. Takahashi T, Carbone D, Takahashi T, Nau MM, Hida T, Linnoila I, Ueda R, Minna JD. Wild-type but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions. *Cancer Res* 1992, 52(8):2340-3.
90. Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Zhang W-W, Owen-Schaub LB, Roth JA. Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by

- adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Cancer Research* 1994, 54(9):2287-91.
91. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 1996, 2(9):985-91.
 92. Bhatia R, Kumar B. p53 as a potential target for treatment of cancer: A perspective on recent advancements in small molecules with structural insights and SAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2023, 247:115020.
 93. Meng H, Nan M, Li Y, Ding Y, Yin Y, Zhang M. Application of CRISPR-Cas9 gene editing technology in basic research, diagnosis and treatment of colon cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023, 14:1148412.
 94. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, Lim YC, Kibria KK, Mohiuddin A, Ming LC. Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. *Cancers* 2022, 14(7):1732.
 95. Helsing LM, Kalager M. Colorectal cancer screening—approach, evidence, and future directions. *NEJM Evidence* 2022, 1(1):EVIDra2100035.
 96. Carethers JM, Jung BH. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 2015, 149(5):1177-90.
 97. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996, 87(2):159-70.
 98. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences* 2017, 18(1):197.
 99. Hassin O, Nataraj NB, Shreberk-Shaked M, Aylon Y, Yaeger R, Fontemaggi G, Mukherjee S, Maddalena M, Avioz A, Iancu O, Mallel G, Gershoni A, Grosheva I, Feldmesser E, Ben-Dor S, Golani O, Hendel A, Blandino G, Kelsen D, Yarden Y, Oren M. Different hotspot p53 mutants exert distinct phenotypes and predict outcome of colorectal cancer patients. *Nature Communications* 2022, 13(1):2800.
 100. Osterburg C, Dötsch V. Structural diversity of p63 and p73 isoforms. *Cell Death & Differentiation* 2022, 29(5):921-37.

101. Vaddavalli PL, Schumacher B. The p53 network: Cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging. *Trends in Genetics* 2022, 38(6):598-612.
102. Rosati G, Aprile G, Colombo A, Cordio S, Giampaglia M, Cappetta A, Porretto CM, De Stefano A, Bilancia D, Avallone A. Colorectal cancer heterogeneity and the impact on precision medicine and therapy efficacy. *Biomedicines* 2022, 10(5):1035.
103. Pathak S, Sushmitha S, Banerjee A, Marotta F, Gopinath M, Murugesan R, Zhang H, Bhavani B, Girigoswami A, Sollano J. Review on comparative efficacy of bevacizumab, panitumumab and cetuximab antibody therapy with combination of FOLFOX-4 in KRAS-mutated colorectal cancer patients. *Oncotarget* 2018, 9(7):7739.
104. Bäumer S, Bäumer N, Appel N, Terheyden L, Fremerey J, Schelhaas S, Wardelmann E, Buchholz F, Berdel WE, Müller-Tidow C. Antibody-mediated delivery of anti-KRAS-siRNA in vivo overcomes therapy resistance in colon cancer. *Clinical Cancer Research* 2015, 21(6):1383-94.
105. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990, 249(4971):912-5.
106. Harris MP, Sutjipto S, Wills KN, Hancock W, Cornell D, Johnson DE, Gregory RJ, Shepard HM, Maneval DC. Adenovirus-mediated p53 gene transfer inhibits growth of human tumor cells expressing mutant p53 protein. *Cancer gene therapy* 1996, 3(2):121-30.
107. Halbur C, Choudhury N, Chen M, Kim JH, Chung EJ. siRNA-conjugated nanoparticles to treat ovarian cancer. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation* 2019, 24(2):137-50.
108. Paskeh MDA, Saebfar H, Mahabady MK, Orouei S, Hushmandi K, Entezari M, Hashemi M, Aref AR, Hamblin MR, Ang HL. Overcoming doxorubicin resistance in cancer: siRNA-loaded nanoarchitectures for cancer gene therapy. *Life Sciences* 2022, 298:120463.
109. Zhang P, An K, Duan X, Xu H, Li F, Xu F. Recent advances in siRNA delivery for cancer therapy using smart nanocarriers. *Drug Discovery Today* 2018, 23(4):900-11.

110. Wang M, Wang J, Li B, Meng L, Tian Z. Recent advances in mechanism-based chemotherapy drug-siRNA pairs in co-delivery systems for cancer: a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2017, 157:297-308.
111. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000, 404(6775):293-6.
112. Cuccato G, Polynikis A, Siciliano V, Graziano M, di Bernardo M, di Bernardo D. Modeling RNA interference in mammalian cells. *BMC systems biology* 2011, 5:1-12.
113. Young SWS, Stenzel M, Jia-Lin Y. Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy? *Critical reviews in oncology/hematology* 2016, 98:159-69.
114. Bumcrot D, Manoharan M, Koteliansky V, Sah DW. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* 2006, 2(12):711-9.
115. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *nature* 2001, 411(6836):494-8.
116. McCaffrey AP, Meuse L, Pham T-TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002, 418(6893):38-9.
117. Qiu S, Adema CM, Lane T. A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic acids research* 2005, 33(6):1834-47.
118. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Hushmandi K, Hashemi F, Rahmani Moghadam E, Raei M, Kalantari M, Tavakol S, Mohammadinejad R, Najafi M. Progress in natural compounds/siRNA co-delivery employing nanovehicles for cancer therapy. *ACS combinatorial science* 2020, 22(12):669-700.
119. Lee SJ, Kim MJ, Kwon IC, Roberts TM. Delivery strategies and potential targets for siRNA in major cancer types. *Adv Drug Deliv Rev* 2016, 104:2-15.
120. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal transduction and targeted therapy* 2021, 6(1):386.
121. Pecot CV, Wu SY, Bellister S, Filant J, Rupaimoole R, Hisamatsu T, Bhattacharya R, Maharaj A, Azam S, Rodriguez-Aguayo C. Therapeutic silencing of KRAS using systemically delivered siRNAs. *Molecular cancer therapeutics* 2014, 13(12):2876-85.

122. Zhou L-Y, He Z-Y, Xu T, Wei Y-Q. Current advances in small activating RNAs for gene therapy: principles, applications and challenges. *Current gene therapy* 2018, 18(3):134-42.
123. Meng X, Jiang Q, Chang N, Wang X, Liu C, Xiong J, Cao H, Liang Z. Small activating RNA binds to the genomic target site in a seed-region-dependent manner. *Nucleic Acids Res* 2016, 44(5):2274-82.
124. Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(46):17337-42.
125. Portnoy V, Huang V, Place RF, Li LC. Small RNA and transcriptional upregulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2011, 2(5):748-60.
126. Portnoy V, Lin SH, Li KH, Burlingame A, Hu ZH, Li H, Li LC. saRNA-guided Ago2 targets the RITA complex to promoters to stimulate transcription. *Cell Res* 2016, 26(3):320-35.
127. Tan CP, Sinigaglia L, Gomez V, Nicholls J, Habib NA. RNA Activation-A Novel Approach to Therapeutically Upregulate Gene Transcription. *Molecules* 2021, 26(21).
128. Zheng B, Mai Q, Jiang J, Zhou Q. The therapeutic potential of small activating RNAs for colorectal carcinoma. *Current Gene Therapy* 2019, 19(3):140-6.
129. Zheng L, Wang L, Gan J, Zhang H. RNA activation: promise as a new weapon against cancer. *Cancer Letters* 2014, 355(1):18-24.
130. Ghanbarian H, Aghamiri S, Eftekhary M, Wagner N, Wagner KD. Small Activating RNAs: Towards the Development of New Therapeutic Agents and Clinical Treatments. *Cells* 2021, 10(3).
131. Wang LL, Feng CL, Zheng WS, Huang S, Zhang WX, Wu HN, Zhan Y, Han YX, Wu S, Jiang JD. Tumor-selective lipopolyplex encapsulated small active RNA hampers colorectal cancer growth in vitro and in orthotopic murine. *Biomaterials* 2017, 141:13-28.
132. Yoon S, Rossi JJ. Treatment of Pancreatic Cancer by Aptamer Conjugated C/EBP α -saRNA. *Adv Exp Med Biol* 2017, 983:173-88.
133. Zhao X, Voutilainen J, Ghobrial S, Habib NA, Reebye V. Treatment of Liver Cancer by C/EBP α saRNA. *Adv Exp Med Biol* 2017, 983:189-94.
134. Voutilainen J, Reebye V, Roberts TC, Protopapa P, Andrikakou P, Blakey DC, Habib R, Huber H, Saetrom P, Rossi JJ. Development and mechanism of small activating

- RNA targeting CEBPA, a novel therapeutic in clinical trials for liver cancer. *Molecular Therapy* 2017, 25(12):2705-14.
135. Setten RL, Lightfoot HL, Habib NA, Rossi JJ. Development of MTL-CEBPA: small activating RNA drug for hepatocellular carcinoma. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2018, 19(8):611-21.
136. Reebye V, Huang KW, Lin V, Jarvis S, Cutilas P, Dorman S, Ciriello S, Andrikakou P, Voutila J, Saetrom P, Mintz PJ, Reccia I, Rossi JJ, Huber H, Habib R, Kostomitsopoulos N, Blakey DC, Habib NA. Gene activation of CEBPA using saRNA: preclinical studies of the first in human saRNA drug candidate for liver cancer. *Oncogene* 2018, 37(24):3216-28.
137. Xie DT, Ma DD, Peng LP, Shang L, Li LP. Reactivation of p21WAF1/CIP1 by saRNA inhibits proliferation, invasion and migration in gastric cancer cells. *Int J Clin Exp Patho* 2017, 10(2):1585-93.
138. Yang K, Zheng XY, Qin J, Wang YB, Bai Y, Mao QQ, Wan Q, Wu ZM, Xie LP. Up-regulation of p21WAF1/Cip1 by saRNA induces G1-phase arrest and apoptosis in T24 human bladder cancer cells. *Cancer Lett* 2008, 265(2):206-14.
139. Wang LL, Guo HH, Zhan Y, Feng CL, Huang S, Han YX, Zheng WS, Jiang JD. Specific up-regulation of p21 by a small active RNA sequence suppresses human colorectal cancer growth. *Oncotarget* 2017, 8(15):25055-65.
140. Yoon S, Rossi JJ. Therapeutic Potential of Small Activating RNAs (saRNAs) in Human Cancers. *Curr Pharm Biotechnol* 2018, 19(8):604-10.
141. Wang L-L, Feng C-L, Zheng W-S, Huang S, Zhang W-X, Wu H-N, Zhan Y, Han Y-X, Wu S, Jiang J-D. Tumor-selective lipopolyplex encapsulated small active RNA hampers colorectal cancer growth in vitro and in orthotopic murine. *Biomaterials* 2017, 141:13-28.
142. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, Diaz-Torres LA, Grillo R, Swamy MK, Sharma S, Habtemariam S, Shin HS. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology* 2018, 16(1):71.
143. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 2007, 8(3):173-84.
144. Aigner A. Nonviral in vivo delivery of therapeutic small interfering RNAs. *Curr Opin Mol Ther* 2007, 9(4):345-52.

145. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004, 432(7014):173-8.
146. Quick J, Santos ND, Cheng MHY, Chander N, Brimacombe CA, Kulkarni J, van der Meel R, Tam YYC, Witzigmann D, Cullis PR. Lipid nanoparticles to silence androgen receptor variants for prostate cancer therapy. *J Control Release* 2022, 349:174-83.
147. Halloy F, Hill AC, Hall J. Efficient Synthesis of 2'-O-Methoxyethyl Oligonucleotide-Cationic Peptide Conjugates. *ChemMedChem* 2021, 16(22):3391-5.
148. Blidner RA, Hammer RP, Lopez MJ, Robinson SO, Monroe WT. Fully 2'-deoxy-2'-fluoro substituted nucleic acids induce RNA interference in mammalian cell culture. *Chem Biol Drug Des* 2007, 70(2):113-22.
149. Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, Liang XJ. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther* 2020, 5(1):101.
150. Manoharan M, Akinc A, Pandey RK, Qin J, Hadwiger P, John M, Mills K, Charisse K, Maier MA, Nechev L, Greene EM, Pallan PS, Rozners E, Rajeev KG, Egli M. Unique gene-silencing and structural properties of 2'-fluoro-modified siRNAs. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011, 50(10):2284-8.
151. Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *Rna* 2003, 9(9):1034-48.
152. Layzer JM, McCaffrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA, Sullenger BA. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *Rna* 2004, 10(5):766-71.
153. Miele E, Spinelli GP, Miele E, Di Fabrizio E, Ferretti E, Tomao S, Gulino A. Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. *Int J Nanomedicine* 2012, 7:3637-57.
154. Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev* 2009, 61(10):850-62.
155. Mishra DK, Balekar N, Mishra PK. Nanoengineered strategies for siRNA delivery: from target assessment to cancer therapeutic efficacy. *Drug Deliv Transl Res* 2017, 7(2):346-58.

156. Milewska S, Niemirowicz-Laskowska K, Siemiaszko G, Nowicki P, Wilczewska AZ, Car H. Current Trends and Challenges in Pharmaco-economic Aspects of Nanocarriers as Drug Delivery Systems for Cancer Treatment. *Int J Nanomedicine* 2021, 16:6593-644.
157. Rosi NL, Giljohann DA, Thaxton CS, Lytton-Jean AK, Han MS, Mirkin CA. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science* 2006, 312(5776):1027-30.
158. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60(11):1307-15.
159. Sotnikov DV, Berlina AN, Ivanov VS, Zherdev AV, Dzantiev BB. Adsorption of proteins on gold nanoparticles: One or more layers? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2019, 173:557-63.
160. Murawala P, Tirmale A, Shiras A, Prasad BL. In situ synthesized BSA capped gold nanoparticles: effective carrier of anticancer drug methotrexate to MCF-7 breast cancer cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014, 34:158-67.
161. Sardar R, Funston AM, Mulvaney P, Murray RW. Gold nanoparticles: past, present, and future. *Langmuir* 2009, 25(24):13840-51.
162. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* 1951, 11:55-75.
163. Brewer SH, Glomm WR, Johnson MC, Knag MK, Franzen S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir* 2005, 21(20):9303-7.
164. Lacerda SHDP, Park JJ, Meuse C, Pristiniski D, Becker ML, Karim A, Douglas JF. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. *ACS nano* 2010, 4(1):365-79.
165. Housni A, Ahmed M, Liu SY, Narain R. Monodisperse protein stabilized gold nanoparticles via a simple photochemical process. *J Phys Chem C* 2008, 112(32):12282-90.
166. Acura C, Guerrero S, Salas E, Medel L, Riveros A, Mena J, Arbiol J, Albericio F, Giralt E, Kogan MJ. Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013, 5(10):4076-85.

167. Olmedo I, Araya E, Sanz F, Medina E, Arbiol J, Toledo P, Alvarez-Lueje A, Giralt E, Kogan MJ. How changes in the sequence of the peptide CLPFFD-NH₂ can modify the conjugation and stability of gold nanoparticles and their affinity for beta-amyloid fibrils. *Bioconjug Chem* 2008, 19(6):1154-63.
168. Bolaños K, Kogan MJ, Araya E. Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties. *Int J Nanomedicine* 2019, 14:6387-406.
169. Yu Z, Yu M, Zhang Z, Hong G, Xiong Q. Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear. *Nanoscale Res Lett* 2014, 9(1):343.
170. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature physical science* 1973, 241(105):20-2.
171. Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2007, 58(1):3-7.
172. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods* 2001, 25(4):402-8.
173. Zhao M-H, Wu A-W. Targeting KRAS G12C mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology Report* 2023, 11:goac083.
174. Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of cell science* 2016, 129(7):1287-92.
175. Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 2004, 3(4):318-29.
176. Zorde Khvalevsky E, Gabai R, Rachmut IH, Horwitz E, Brunschwig Z, Orbach A, Shemi A, Golan T, Domb AJ, Yavin E. Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013, 110(51):20723-8.
177. Zimmermann G, Papke B, Ismail S, Vartak N, Chandra A, Hoffmann M, Hahn SA, Triola G, Wittinghofer A, Bastiaens PI. Small molecule inhibition of the KRAS–PDEδ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* 2013, 497(7451):638-42.
178. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, Schinzel AC, Sandy P, Meylan E, Scholl C. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 2009, 462(7269):108-12.

179. Pelosof R, Fairchild L, Huang C-H, Widmer C, Sreedharan VT, Sinha N, Lai D-Y, Guan Y, Premssirut PK, Tschaharganeh DF. Prediction of potent shRNAs with a sequential classification algorithm. *Nature biotechnology* 2017, 35(4):350-3.
180. Li C, Jiang W, Hu Q, Li LC, Dong L, Chen R, Zhang Y, Tang Y, Thrasher JB, Liu CB, Li B. Enhancing DPYSL3 gene expression via a promoter-targeted small activating RNA approach suppresses cancer cell motility and metastasis. *Oncotarget* 2016, 7(16):22893-910.
181. Ren S, Kang MR, Wang J, Huang V, Place RF, Sun Y, Li LC. Targeted induction of endogenous NKX3-1 by small activating RNA inhibits prostate tumor growth. *Prostate* 2013, 73(14):1591-601.
182. Mao Q, Li Y, Zheng X, Yang K, Shen H, Qin J, Bai Y, Kong D, Jia X, Xie L. Up-regulation of E-cadherin by small activating RNA inhibits cell invasion and migration in 5637 human bladder cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 375(4):566-70.
183. Dai J, He H, Lin D, Wang C, Zhu Y, Xu D. Up-regulation of E-cadherin by saRNA inhibits the migration and invasion of renal carcinoma cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2018, 11(12):5792-800.
184. Zhao F, Pan S, Gu Y, Guo S, Dai Q, Yu Y, Zhang W. Small activating RNA restores the activity of the tumor suppressor HIC-1 on breast cancer. *PLoS One* 2014, 9(1):e86486.
185. Zhao F, Pan S, Gu Y, Guo S, Dai Q, Yu Y, Zhang W. Reactivation of HIC-1 gene by saRNA inhibits clonogenicity and invasiveness in breast cancer cells. *Oncol Lett* 2015, 9(1):159-64.
186. Xie D, Shang L, Peng L, Li L. Up-regulation of VEZT by small activating RNA inhibits the proliferation, invasion and migration of gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2017, 482(4):542-8.
187. Li M, Peng Z, Ren W, Wang Z. Small activating ribonucleic acid reverses tyrosine kinase inhibitor resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer by increasing the expression of phosphatase and tensin homolog. *Thorac Cancer* 2016, 7(4):481-5.
188. Park KH, Yang JW, Kwon JH, Lee H, Yoon YD, Choi BJ, Lee MY, Lee CW, Han SB, Kang JS. Targeted Induction of Endogenous VDUP1 by Small Activating RNA Inhibits the Growth of Lung Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2022, 23(14):7743.

189. Shahidi M, Abazari O, Dayati P, Haghirsadat BF, Oroojalian F, Tofighi D. Targeted delivery of 5-fluorouracil, miR-532-3p, and si-KRAS to the colorectal tumor using layer-by-layer liposomes. *Front Bioeng Biotechnol* 2022, 10:1013541.
190. Yang H, Xiang S, Kazi A, Sebti SM. The GTPase KRAS suppresses the p53 tumor suppressor by activating the NRF2-regulated antioxidant defense system in cancer cells. *J Biol Chem* 2020, 295(10):3055-63.
191. Wang X, Xie Q, Ji Y, Yang J, Shen J, Peng F, Zhang Y, Jiang F, Kong X, Ma W. Targeting KRAS-mutant stomach/colorectal tumors by disrupting the ERK2-p53 complex. *Cell Reports* 2023, 42(1).



EKLER

Ek-1. Etik Kurul Kararına Gerek Olmadığına Dair Yazı

