T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

KOLON KARSİNOMA DOKU VE HÜCRELERİNDE URG-4/URGCP GENİNİN PROLİFERATİF VE METASTATİK GENLERLE İLİŞKİSİ

TUNZALA ABDUSALAMOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri: **Prof.Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)**
Öğr. Gör. Dr.Esra TOKAY (Eş Danışmanı)
Prof.Dr. Rahşan ILIKÇI SAĞKAN
Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU

BALIKESİR, OCAK 2022

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımca hazırlanan "**KOLON KARSİNOMA DOKU VE HÜCRELERİNDE URG-4/URGCP GENİNİN PROLİFERATİF VE METASTATİK GENLERLE İLİŞKİSİ**" başlıklı tezde;

- Bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde tüm bilgi ve sonuçları sunduğumu,
- Akademik kurallar çerçevesinde tüm bilgi ve belgeleri elde ettiğimi,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Tunzala ABDUSALAMOVA

(imza)

ÖZET

KOLON KARSİNOMA DOKU VE HÜCRELERİNDE URG-4/URGCP GENİNİN PROLİFERATİF VE METASTATİK GENLERLE İLİŞKİSİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TUNZALA ABDUSALAMOVA
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI:PROF.DR.FERAY KÖÇKAR)
(EŞ DANIŞMAN: DR. ESRA TOKAY)
BALIKESİR, OCAK - 2022

URG-4/URGCP'nin, kolon kanseri hücreleri ve dokularında yapılmış herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Bu amaçla çalışmalarımızda 15 adet taze kolon kanserli ve normal kolon dokularından RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hem URG-4/URGCP geninin hem de metastatik marker genlerin ifadesi mRNA düzeyinde qRT-PCR metodu ile araştırılmıştır. Hücre çalışmalarında ise kolon kanseri hücreleri (HT-29) kullanılmıştır. İlk olarak, URG-4/URGCP geninin ifadesi, shRNA vektör uygulama çalışmalarıyla kolon kanseri hücrelerinde susturulmuştur. mRNA ve protein düzeyinde genin susturulduğu doğrulanmıştır. Susturulmuş ve normal kolon kanseri hücrelerinde koloni formasyon ve yaralanma deneyleri gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda proliferatif kabiliyetinin belirlenmesi amacıyla MTT deneyleri yapılmıştır. URG-4/URGCP geni susturulmuş olan ve normal kolon kanseri hücreleri kullanılarak, URG-4/URGCP geninin metastatik ve proliferatif marker genlerle (osteopontin, vimentin, E-kaderin, twist, p27 ve siklinD1) ilişkisi analiz edilmiştir. Bu analiz mRNA (qPCR) ve protein seviyesindewestern blotlama yöntemi ile yapılmıştır.

Çalışmalarımız sonucunda URG-4/URGCP geninin tümörlü dokularda normal dokulara kıyasla ifadesinin arttığı, diğer genler için ise kişisel gen farklılıkların olmakla beraber genel olarak vimentin, E-kaderin, twist gen ifadelerinde artış, osteopondin ifadesinde ise azalış gözlemlenmiştir. URG-4/URGCP geninin susturulması hücrenin koloni formasyon oluşturma kabiliyetini azalttığı, proliferasyon ve metastatik kabiliyetini etkilemediği bulunmuştur. Metastatik marker primerler olan vimentin, E-kaderin, twist ifadelerinde azalış gözlemlenmiştir. p27 ve siklinD1 gen ifadeleri de azalış göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: URG-4/URGCP, kolon karsinoma, metastaz

Bilim Kod / Kodları : 20606-20610 Sayfa Sayısı: 55

ABSTRACT

THE RELATIONSHIP OF URG-4/URGCP GENE WITH PROLIFERATIV AND METASTATIC GENES IN COLON CARCINOMA TISSUES AND CELLS
MSC THESIS
TUNZALA ABDUSALAMOVA
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS
(SUPERVISOR:PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
(CO-SUPERVISOR: DR. ESRA TOKAY)
BALIKESİR, JANUARY - 2022

There are no studies of URG-4/URGCP in colon cancer cells and tissues.

For this purpose, RNA was isolated from 15 fresh colon cancer and normal colon tissues in our studies. Expression of both URG-4/URGCP gene and metastatic marker genes were investigated at the mRNA level by qRT-PCR method. Colon cancer cells (HT-29) were used in cell studies.First, expression of the URG-4/URGCP gene was silenced in colon cancer cells by shRNA vector application studies.Gene silencing was confirmed at the mRNA and protein level. Colony formation and injury assays were performed on silenced and normal colon cancer cells. At the same time, MTT experiments were carried out to determine its proliferative ability.The association of the URG-4/URGCP gene with metastatic and proliferative marker genes (osteopontin, vimentin, E-caderin, twist, p27, and cyclin D1) was analyzed using URG-4/URGCP gene silenced and normal colon cancer cells. This analysis was performed by mRNA (qPCR) and protein level dewestern blotting.

As a result of our studies, an increase in the expression of the URG-4/URGCP gene in tumor tissues compared to normal tissues, and an increase in vimentin, E-cadherin, twist gene expressions and a decrease in osteopondin expression were observed in general, although there are individual gene differences for other genes. It was found that silencing the URG-4/URGCP gene reduces the cell's ability to form colonies, but does not affect its proliferation and metastatic ability. A decrease was observed in the expression of metastatic marker primers vimentin, E-cadherin, twist. p27 and cyclin D1 gene expressions also decreased.

KEYWORDS:URG-4/URGCP, Colon carcinoma, metastatic, HT-29

Science Code / Codes : 20606-20610 Page Number : 55

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
TABLO LİSTESİ ..... **vi**
SEMBOL LİSTESİ ..... **vii**
ÖNSÖZ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Kolorektal Kanser **1**
1.2 Kolorektal Kanser Metastazı ve Moleküler Genetik Temeli Epitelyal-Mezenşimal Geçiş Kavramları **2**
1.3 Kolorektal Kanserde EMT Sürecinin Transkripsiyonel Düzenlenmesi **3**
1.4 Kolorektal Kanserin EMT Süreci ile İlişkili Sinyal Yolakları **3**
1.5 URG-4/URGCP Geni **4**
1.6 URG-4/URGCP geninin diğer kanser türleri ile ilişkisi **5**
2. AMAÇ **11**
3. MATERYAL-METOD **13**
3.1 Materyal **13**
3.1.1 Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasallar **13**
3.1.2 Yapılan Çalışmalarında Kullanılan Laboratuvar Cihazları **14**
3.2. Metot **15**
3.2.1.Çalışma ortamınve gerekli malzemelerinsterilizasyon işlemi **15**
3.2.2. Hasta dokularının -80°C derin dondurucuda saklanılması **16**
3.2.3 RNA Eldesi Aşamasındaki Çalışmalar **16**
3.2.3.1 Tümörlü olan ve olmayan kolon dokularından RNA İzolasyonu **16**
3.2.3.2 İzole edilen RNA miktarının tayin edilmesi **16**
3.2.4 Formaldehit RNA Jel Elektroforezi **17**
3.2.4.1 RNA'ların jele yüklenmesi **17**
3.2.4.2 Reverse Transkriptaz Enzimi ile Komplementer DNA (cDNA) Eldesi **18**
3.2.4.3 PZR **19**
3.2.4.4 qRT-PZR **19**
3.2.4.5 Kantitatif RT-PZR'ın Değerlendirilmesi **21**
3.2.5 DNA ile ilgili Teknikler **21**
3.2.5.1 Jel Elektroforezi-DNA **21**
3.2.6 Hücre Kültürü Metotları **22**
3.2.6.1 Çalışmalada Kullanılan Malzemelerin Hazırlık Aşamaları **22**
3.2.6.2 PBS'nin Hazırlanması **22**
3.2.6.3 FBS'nin Hazılanması **22**
3.2.6.4 Tripsin EDTA Solüsyonunun oluşturulması **22**
3.2.6.5 Hücre Besiyerinin Hazırlanması **22**
3.2.7 Deneylerde Kullanılan Hücre Hattı **22**
3.2.7.1 -80°C'de Bekletilen Hücre Soyunun Başlatılması **22**
3.2.7.2 Hücrelerin Pasajlanması **23**

3.2.7.3 Tripan Mavisi ile Canlı Hücrelerin Boyanması 23
3.2.7.4 -80°C'de Hücrelerin korunması 23
3.2.8 Transfeksiyon işlemleri 23
3.2.8.1 Koloni formasyon 24
3.2.8.2 MTT 24
3.2.8.3 Yaralanma Deneyleri 24
3.2.9 Western Blot Deney Basamakları 24
3.2.9.1 RIPA Lizis ve Ekstraksiyon 24
3.2.9.2 Protein Miktarının Bradford ile Çözümlenmesi 25
3.2.9.3 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi 26
3.2.9.4 Western Blot Membranına Protein Transferi 28
3.2.9.5 Antikorlama ve Membran Bloklama 28
3.2.9.6 Membranların PVDF Görüntülemesi 29
4. BULGULAR 30
4.1 Tümörlü olan ve olmayan dokularda URG-4/URGCP geninin mRNA seviyesinde ifadesinin incelenmesi 30
4.2 Metastatik ve proliferatif marker primerlerinin çalışabilirliğinin qPZR aracılı kontrol edilmesi 35
4.3 pLKO1 shRNA vektörü kullanılarak URG-4/URGCP geni ifadesinin HT-29 hücre hattında susturulmasının doğrulanması 37
4.4 Proliferatif ve Metastatik özellikleri üzerine etkisinin belirlenmesi 39
4.5 URG-4/URGCCP ifadesinin susturulmasının metastatik marker gen ifadeleri üzerine mRNA ve protein seviyesinde etkisi 41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 44
6. KAYNAKLAR 47
EK B: Protein belirteci 53
ÖZGEÇMİŞ 54

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: HB×AG proteinin diger protein transkripsiyon faktorleri ile ilişkisi 4
Şekil 1.2: URG-4/URGCP geninin kromozom 7 üzerindeki ifade oluş yönü ve konumu 5
Şekil 2.1: Akış diyagramı 12
Şekil 4.1: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü 30
Şekil 4.2: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü 30
Şekil 4.3: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü 31
Şekil 4.4: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü 31
Şekil 4.5: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü 31
Şekil 4.6: Taze hayvan dokularından izole edilen RNA örneklerinin formaldehit jel elektroforezi görüntüsü 32
Şekil 4.7: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü 32
Şekil 4.8: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü 32
Şekil 4.9: Hβ-2 kullanılarak yapılan PZR jel görüntüsü 35
Şekil 4.10: Hβ-2 kullanılarak yapılan PZR jel görüntüsü 35
Şekil 4.11: Hβ-2 kullanılarak yapılan PZR jel görüntüsü 35
Şekil 4.12: PZR jel görüntüsü 36
Şekil 4.13: Real-Time PCR analizleri 37
Şekil 4.14: HT-29 hücrelerinde Sadece Hücre, Scr-pLKO.1 ve URG-4-shpLKO.1 transfeksiyon aşamasından sonra yapılmış olan Real-Time analizi ve protein seviyesi 38
Şekil 4.15:HT-29 hücrelerinde Sadece Hücre, Scr-pLKO.1 ve URG-4-shpLKO.1 transfeksiyon aşamasından sonra elde edilen protein lizatları kullanılarak yapılan URG-4/URGCP ve beta aktin antikorları uygulamasına ait western blotting analizi 38
Şekil 4.16: OD 550nm'de alınan MTT ölçüm sonuçlarına ait grafik 39
Şekil 4.17: Koloni formasyon sonucu 40
Şekil 4.18: Koloni formasyon deneyine ait grafik 40
Şekil 4.19: Yaralanma deneyi sonucu 41
Şekil 4.20: Metastatik ve proliferatif marker gen primerleri kullanılarak Yapılan Real-Time PCR grafiği ve vimentin, E-kaderin proteinlerinin western blotting yöntemi ile ifadesinin gösterilmesi 42
Şekil 4.21: Protein ifadesi çalışmaları 43
Şekil A 1: DNA belirteci. 52
Şekil A 2: Protein belirteci. 53

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Kullanılan laboratuvar malzemeleri ve kimyasallar 13
Tablo 3.2: Deneyler için gerekli gereçler ve markaları 15
Tablo 3.3: 10 X FA çözeltisi miktarları ve bileşenleri 17
Tablo 3.4: 1 X FA tamponu miktarları ve bileşenleri.....18
Tablo 3.5: cDNA için gerekli kimyasallar ve basamaklar 18
Tablo 3.6: PZR için gerekli bileşenler 19
Tablo 3.7: PZR döngü koşulları 19
Tablo 3.8: PZR için gerekli bileşenler 20
Tablo 3.9: Real-Time döngü koşulları 20
Tablo 3.10: Gerekli olan ekspresyon primerleri.....20
Tablo 3.11: Jel Agaroz kimyasalları. 21
Tablo 3.12: Ekstraksiyon (RİPA) ve lizis için kimyasallar 25
Tablo 3.13: Bradford için kullanılan kimyasallar 26
Tablo 3 14: SDS'in hazırlanması için gerekli olan malzemeleri 27
Tablo 3 15: Gerekli olan SDS kimyasalları 27
Tablo 4.1 : Elde edilen RNA örneklerinin 260 nm'de OD değerleri ve RNA miktarları 33

SEMBOL LİSTESİ

bç : Baz çifti
cDNA : Komplamenter DNA
DNA : Deoksi ribonükleik asit
DEPC : Dietilpirokarbonat
DMSO : Dimetil Sülfoksit
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FCS : Fetal calf serum
Hep3B : İnsan hepatoselüler karsinom hücre hattı
ng : Nanogram
ml : Mililitre
mg : Miligram
nm : Nanometre
NONO : Non-POU Domain Containing Octamer Binding
O.D : Optik Dansite
PBS : Phosphate-buffered saline
RPM : Revolution Per Minutes
RNA : Ribonükleik asit
SEAP : Secreted Alkaline Phosphatase
UV : Ultra-viyole
µl : Mikrolitre
µg : Mikrogram

ÖNSÖZ

Moleküler Bioloji ve Genetik bölümünde Yüksek Lisans eğitim fırsatı sunan ve bu hayalimi gerçekleştire bilmem için benden destediğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez izleme sürecinde eksikliklerimi anlayışla karşılayıp, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan saygı değer hocam Öğr. Gör. Dr. Esra TOKAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU, Doç. Dr. Hatice YILDIRIM, Arş. Gör. Dr. Nelin HACIOĞLU'a

Laboratuvar çalışmalarında eksik bilgilerimde benden desteğini esirgemeyen Fatma POYRAZLI, Kübra PASPAL, hüznümü, sevincimi paylaştığım canım arkadaşım Hatice ERDOĞAN'a, Burcu EFE'ye ve Nuriye KÖTÜZ'e

Kızımın doğumu ile beraber eğitimimi devam ettirebilmem için manevi desteğini benden esirgemeyen ve eğitim hayatımda her zaman beni okumam için teşvik eden canım annem Vefa ABDUSALAMOVA'a, kardeşim ve benim iyi bir eğitim almamız için ne gerekiyorsa yapan babam Abdurahman ABDUSALAMOV'a, onun eğitim süreci bizim ayrı büyümemize sebep olsa da kardeşliğini ve gerektiğinde abiliğini hissettiren canım kardeşim Asiman ABDUSALAMOV'a, yüksek lisans eğitimimde beni destekleyen babam Mehmet YILMAZ'a

Benim için oldukça çok zor geçen bu süreçte destek olan sevgili eşim Arif YILMAZ'a Teşekkürlerimi Sunuyorum

Bu tez çalışması, benim için en büyük fedakarlığı yapan ve beni hep kapıda karşılayıp minicik kolları ile bana kocaman sarılan canımın içi kızım Emine Vefa YILMAZ'a ithaf edilmiştir.

Balıkesir, 2022 **TUNZALA ABDUSALAMOVA**

1. GİRİŞ

1.1 Kolorektal Kanser

Kanser, sadece genetik mutasyonların oluşumuna bağlı olmayan kompleks bir süreçtir. Bazı genlerin (proto-onkogen ve ya tümör süpresör gen) mutasyona uğraması sonucunda hücre kanserleşebilir ve genomik instabilite gelişir. Kolon kanseri buna en iyi örnektir. Onkogenezin, genetik açıdan multistep (çok aşamalı) bir süreç olduğunu söyleyebiliriz [1].

APC (Adenomatöz Polipozis Koli) geni mutasyon hücre bölünmesinin kontrolünü sağlar. Bu gen çeşitli ailesel kanserlerde inaktivdir. MLH1 (Mut L homologu-1), MSH2 (Mut S homologu-2), MSH6 (Mut S homologu-6), PMS2 (mayotik sonrası segregasyon-2) genleri ise sporadik tümörlerde inaktive olan tümör süpresör genleridir [1].

Normal bir dokunun kanserleşebilmesi için hücrenin 6 temel özelliğe sahip olması gerekir. Bu özelliklere; otokrin uyarım, büyümeyi engelleyen sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçış, sürekli bölünme potansiyeli, anjiyogenez kabiliyeti, invazyon ve metastaz olarak sıralanır [2]. Tümör mikroçevresi proliferasyon, EMT (epitelyal-mezenşimal geçiş), anjiyogenez, apoptoz ve metastaz gibi özellikler gösterebilir [3].

KRK (Kolorektal Karsinom)'ların yaklaşık %47'sinde ise CIN (Chromosomal instaiblity) etkili olmaktadır. CIN kromozomlarda büyük ya da küçük parçaların kazanımı veya kaybına neden olur. CIN yolağında, APC, P53 (protein 53), SMAD2 (small mothers against decapentaplegic-2), SMAD4 (small mothers against decapentaplegic-4), DCC (Deleted In Colorectal Carcinoma) gibi TSG (tümör süpressor genler) ve onkogenler (KRAS ve β-katenin) rol oynamaktadır [4].

KRK'ların yaklaşık %40'ında epigenetik dengesizlikler rol oynamaktadır. Bu zaman DNA dizisinin 5'ucunda yer alan CpG ile zengin bölgelerin hipermetilasyonu tümör süpressor genlerin (hMLH1, P16INK4A, MGMT, ER, APC, COX2) sesizleşmesine sebep olur [4].

KRK normal epitel hücresinin APC geninin her iki allelinin kaybı ve ya inaktivasyonu erken adenom oluşumuna sebep olur. Hücrelerin 12p (KRAS), 18q (DCC-Smad), 17p (p53) kromozom bölgelerinde oluşan mutasyonlar kolon kanserine sebep olacak malignant transformasyona yol açar [5].

KRK'ların %80'de APC inaktivasyonu gerçekleşir. Mutasyon ve delesyonlar ile kısalmış APC proteini üretilir. APC geni Wnt/β-katenin sinyal yolağında etkin bir molekül olan β-katenin düzeyini kontrol ediyor. 5q21-22'de yerleşimli bir tümör süpresör gendir. APC hücre-hücre adezyonunda β-katenin'in degradasyonuna yol açar. β-katenin ve nukleus proteinlerinin birikimi ile hücre çoğalmasında artış gözlemlenir. Bu da azalmış apoptozla sonuçlanır. β-katenin, hücre dışından gelen sinyallerin hücre içine iletilmesini sağlar [6].

APC'de mutasyon oluşursa adezyonda değişikliklere sebep olur. Hücreler arası adezyonda etkin transmembran proteini E-kaderindir. E-kaderinin sitoplazmik bölümü ile β-kateninin oluşturduğu kompleks alfa-katenine ve aktine bağlanarak adezyon oluşumunda rol oynar [6].

KRK'lerin %75'inde kromozomun 17p'inde yerleşen p53 geninin delesyonuna rastlanmaktadır. p53 geninin kaybı hasarlı hücrenin apoptozdan kaçış sebebidir. p53 geni hücre siklusunda G1-S fazlarında hücrenin DNA hasarlanmalarına karşı korunmasını sağlayan bir kontrol noktası proteinidir. Bu gen hücrenin çoğalmasında ve farklılaşmasında görev alır. p53'ün inaktivasyonu kolorektal karsinogenezin geç dönemlerinde oluşanadenomun karsinoma dönüşümünü yönetir [6].

1.2 Kolorektal Kanser Metastazı ve Moleküler Genetik Temeli Epitelyal-Mezenşimal Geçiş Kavramları

Metastatik kaskad bir çok basamağı içerir: primer tümör odağından kaçış, bölgesel stromaya penetrasyon, intravazasyon, reseptör ekspresyonu, immun hücrelerden kaçış, endotelle etkileşime geçme ve adezyon, ekstravazasyon, koloniler oluşturma ve büyüme. Kanser hücresinin bu basamaklarda epitelyal ve mezenkimal fenotipleri arasındaki dönüşümler mevcuttur. EMT invazyon ve metastazın gelişiminde anahtar rolü oynar. Epitelyal hücrelerçeşitli moleküler bağlantılar ile birarada tutulur. Epitelyal hücreler mezenkimal karakter kazanarak invaziv özellik kazanır ve apoptoza direnç geliştirir. MET (mezenkimal-epitelyal transizyon) EMT sürecinin biyokimyasal ve morfolojik olarak tersi olarak tanımlanır. MET tümör hücrelerinin primer odaktan ayrılıp, uzak yere metastaz yapmasından sonrası (teorik olarak ekstravazasyondan sonra) süreç olarak belirlenmiştir [8].

1.3 Kolorektal Kanserde EMT Sürecinin Transkripsiyonel Düzenlenmesi

EMT, KRK metastazında oldukça önemlidir. E-kaderinin azalan ekspresyonu ve vimentinin artan ekspresyonu zayıf tümör diferansiyasyonu ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Üç grup transkripsiyon düzenleyici EMT mekanizmasını düzenler. İlk grup Snail çinko parmak ailesidir. Bu grubun iki üyesi (SNAI1 ve SNAI2) bulunmaktadır. İkinci grupa ZEB ailesi dahildir. Bu grubun da iki üyesi (ZEB1 ve ZEB2) mevcuttur. Üçüncü grupa ise bHLH ailesi dahildir. Bu grupun ise TWIST1, TWIST2 ve E12/E47 isimli üç üyesi var. KRK hastalarından elde edilen rezeksiyon dokularında TWIST1'in kuvvetli ekspresyonu gözlenmiştir. E-kaderin ekspresyonunun azalması SLUG1, ZEB1, ZEB2 artışı ile koreledir. TWIST1'in ekspresyonu lenf nodu invazyonu ve kötü sonuçla ilişkilendirilmiştir [9].

1.4 Kolorektal Kanserin EMT Süreci ile İlişkili Sinyal Yolakları

Tümör mikroçevresinden gelen bir dizi ekstraselüler sinyale yanıt olarak kanser hücreleri EMT sürecine girer. KRK'nın da dahil olduğu birçok kanserde TGF-beta, Wnt ve büyüme faktör reseptörlerinin dahil olduğu sinyal yolakları invazyon ve metastazda oldukça aktiftir. KRK'da TGF beta/Smad sinyal yolağı EMT'nin gelişiminde oldukça önemlidir. TGF-beta ligandları, reseptörlerin dimerizasyonu ile Smad'ın fosforillenmesini yönetir. Bu zaman aktiv hale geçen Smad-2 ve Smad-3, nükleusta Smad4 ile birlikte lokalize olur. KRK metastazlarının %30'unda Smad-4'ün kaybı saptanmıştır. E-kaderinin ekspresyon kaybı ile artan β-katenin ekspresyonu korele bulunmuştur [10].

Ayrıca Smad-4'ün kaybı STAT3 aktivasyonu ile sonuçlanır. Smad4 EMT'de doğrudan etkilidir ve ZEB1 ekspresyonunu arttırararak KRK progresyonunda rol alır. Smad-4'ün kaybı KRK hastalarında, metastazın öngörülmesi açısından umut vadeden bir belirteç olarak görülmüştür. Smad-4'ün kaybı EMT'yi indükler, Rho ve ROCK'ın aktiflenmesini sağlar. KRK progresyonu ve EMT için Wnt sinyal mekanizması önemlidir. Bu yolağın aktiflenmesini APC ve β-catenin mutasyonları sağlar. Wnt'nin DKK1 (dickkopf-1) inhibitörü aracılığı ile EMT'yi inhibe ederek KRK'nın ilerlemesini durdurduğu gözlemlenmiştir [9].

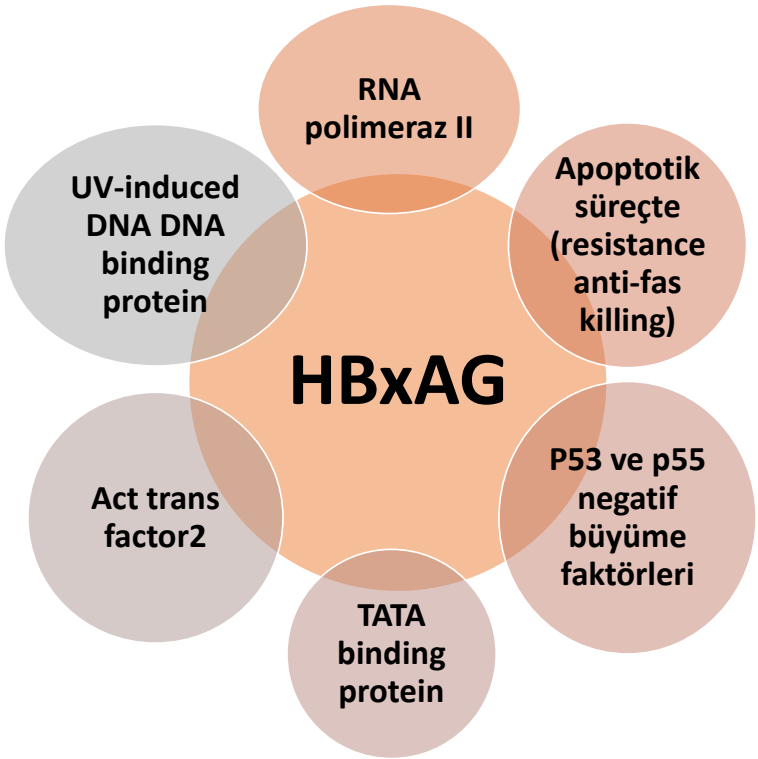
KRK'de RAS/ERK1/2 yolağının EMT'yi desteklediğine dair sonuçlar bulunmuştur. Artan RAS ekspresyonu, histon modifikasyonları ile SiklinD1 ve E-kaderinin düzenlenmesini sağlamıştır. RAS yolağı Slug'ı düzenler ve mutant RASile EMT'ye giden KRK'lerde yeni bir hedef haline gelebilir. BRAF ve RAS onkogenleri, hücre migrasyonu ve invazyonunu yöneten Rho GTPaz'ları düzenlemişlerdir. MEK1 aktivasyonu bağırsak kökenli epitelyal hücrelerde

EMT'yi indüklemektedir. AKT sinyal yolağı SNAI1 ve SLUG gibi EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin ifade olmasından sorumludur. Bu yolak EMT ve anjiyogenezi düzenler. Metastaz ilişkili fosfataz olan PRL-3 EMT'yi indükler. AKT aktif hale gelir ve PTEN baskılanır. PI3K/AKT alt yolağında bulunan mTOR1 ve mTOR2'de Rho A ve Rac-1 aracılığıyla KRK'da EMT, motilite ve metastaz indüklenir [9].

1.5 URG-4/URGCP Geni

URG-4/URGCP, bir trans-aktivatör olarak transkripsiyonu teşvik eden ve hücre proliferasyonunu arttırıcı olarak adlandırılan hepatit B virüsü X proteininin (HBx) varlığında çok aşamalı hepatokarsinogeneze önemli ölçüde katkıda bulunduğu varsayılan bir onkogendir [7].

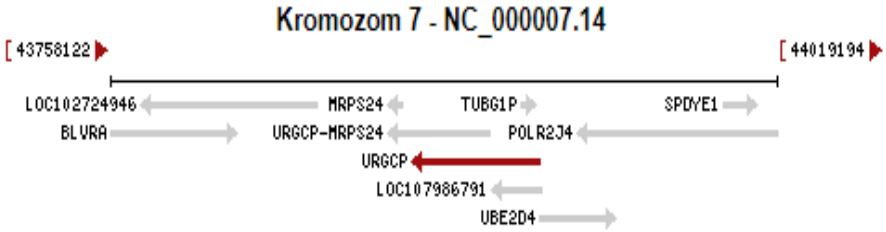
HBV (Hepatit B virüs) ile enfekte karaciğer ve hepatoselüler karsinom vakalarında URG4/URGCP'nin protein ekspresyonu yüksek, HBV ile enfekte olmayan karaciğer dokularında çok az URG4/URGCP'nin protein ekspresyonu saptanmıştır. Hepatosellüler karsinom olgularında URG4/URGCP ve HBXAg'nin protein ekspresyonu arasındaki ilişki de gösterilmiştir [10].



Şekil 1.1: HB×AG proteinin diger protein transkripsiyon faktorleri ile ilişkisi

URG-4/URGCP geninin insanlarda 3 tane varyantı bulunmaktadır. Varyant 1 mRNAsı 3609 bç, varyant 2 mRNA'sı 3851 bç, varyant 3 mRNA'sı 3636 bç uzunluğunda olup her üçü de yaklaşık 104 kDa ağırlığında mitokondriyal protein sentezlemektedir. URG-4/URGCP geninin farelerde *(Mus muculus*) iki varyantı bulunmuştur. Varyantlar sırasıyla 5115 bp ve 5531 bp mRNA uzunluğuna sahiptirler. Bunun yanısıra varyant 3'ün (931 aminoasit) diğer varyantlarla karşılaştırıldığında en büyük proteini kodladığı tespit edilmiştir [8].

URG4/URGCP geni 7p13 üzerinde 3.607 kb mRNA'a sahip onkogendir. Sitoplazmada 922 amino asit içeren protein sentezler [8] (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: URG-4/URGCP geninin kromozom 7 üzerindeki ifade oluş yönü ve konumu
URG-4/URGCP promoter dizisi, ilk 300 bp'de % 80 yüzdeyle son derece yüksek GC içeriğine sahiptir [10] (Şekil 1.1).

URG-4/URGCPaşırı ekspresyonu sadece in vitro HCC'nin büyümesini ve hayatta kalmasını, aynı zamanda in vivo HCC gelişimini de hızlandırır [11].

URG-4/URGCP tümör hücrelerinin büyümesini, proliferasyonu, invazyonu ve metastazı teşvik, apoptozu ise inhibe eder [7].

q-PCR analizi sonucunda URG-4/URGCP geninin en az DU145 (İnsan Prostat kanseri Hücre Hattı) hücre hattı ve en fazla ise MCF-7 (İnsan Mide Kanseri Hücre hattı) hücre hatlarında ekspre olduğu tespit edilmiştir [10].

1.6 URG-4/URGCP geninin diğer kanser türleri ile ilişkisi

URG-4/URGCP geni, hepatosellüler kanser, yumurtalık kanseri, mide kanseri, mesane kanseri, glioblastoma, meme karsinomu, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, medüller tiroid kanseri, nazofarengeal kanser, nöroblastoma, prostat kanseri ve lösemi dahil birçok tümörün ilerlemesine katkıda bulunur [9].

Dodurga ve grubu, tiroid hücrelerindeki ferulik asidin ve nöroblastoma hücrelerindeki temozolomidin URG-4/URGCP ekspresyonunda önemli bir azalmaya ve dolayısıyla apoptoza neden olduğu gösterilmiştir [10]
Aynı çalışmadan elden edilen bir başka sonuca göre, HCC'de HBxAg, IGF-1 (insulinbenzeri büyüme faktörü-1) ve IGF-2 (insulin benzeri büyüme faktörü-2) reseptörünün ekspresyonunu artırır. Bu da HBxAg'nin hücre büyümesini artıran etkiye sahip olduğunu gösterir [12].

URG-4/URGCP, MAPK, PI3K, Akt ve NF-kappa B yolları aracılığıyla hücre proliferasyonunu destekleyrek kötü huylu tümörlerin biyolojik işlevini düzenlemede önemli bir rol oynar [7].

Xie ve arkadaşları URG4/URGCP'nin test edilen tüm HCC hücre dizilerinde fazla sentezlendiğini bulmuşlardır. URG4/URGCP'nin susturulması sonucunda, QGY-7703 ve Hep3B hücrelerinde VEGFC'nin anjiyojenik kapasitesini ve ekspresyonunu da azalttığı gösterilmiştir [13].

URG4/URGCP'nin insan mide kanseri hücre hatlarında aşırı ifade olduğu ve tedavide ümit verici bir terapötik hedef olduğu tespit edilmiştir. Bu hücrelerde URG4/URGCP'nin aşırı ekspresyonu hücre proliferasyonunu desteklediği belirlenmiştir. Bu etkiyi Akt/FOXO3a sinyal yolunu kullanarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir. URG4/URGCP aşırı ifade olduğunda, siklinD1'in ifadesi artmıştır. Aynı zamanda, URG4/URGCP'nin susturulduğu hepatosellüler karsinom hücrelerinde siklinD1'in mRNA ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir [13].

Epitelyal yumurtalık kanserinde URG4/URGCP'nin onkojenik potansiyelinin tümör büyümesi ve zayıf sağkalım ile korele olduğu bulunmuştur [15].

Yapılan başka bir çalışmada, URG-4/-URGCP'nin susturulmasının, NF-κB ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. NF-κB anti-apoptotik transkripsiyon faktörüdür [11].

NF-κB yolu, HCC'deki URG4/URGCP'nin pro-anjiyojenik etkisinin temelini oluşturabilir. NF-κB hedef genleri olan TNF-a, IL-6, IL-8 ve MYC, URG4/URGCP genini aşırı ifade eden hücrelerde ekpsresyonları artmıştır. URG4/URGCP'nin susturulmuş HCC hücrelerinde ise ifadelerinin azaldığı tespit edilmiştir. URG4/URGCP'nin aşırı ekspresyonunun fosforile IKK

ve fosforile IκBa seviyelerini arttırdığını, ancak IKK veya IκBa'nın toplam protein seviyesini önemli ölçüde değiştirmediğini göstermiştir [13].

Yapılan bir başka çalışmada mesane kanseri hücrelerinin qRT-PCR analizi, URG4/URGCP geninin ekspresyonunun artması ile CCND1, Bcl-2, MMP-9 ve VEGF dahil olmak üzere NF-κB hedefli genlerin ifadesinin arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca URG-4/URGCP'nin susturulmasının mesane kanserinde bu genlerin ifadesini azalttığı görülmüştür [11].

Ek olarak, URG-4/URGCP'nin Bcl-2, Bcl-xL (anti-apoptotik faktör) ekspresyonunu teşvik, p53 ve kaspazların (Caspase-3 ve Cleaved-Caspase-3) (pro-apoptotik faktör) ekspresyonunu inhibe ettiğini görmüşler. Yapılmış olan bu çalışmadan çıkan sonuç: URG-4/ URGCP'nin hedef genlerinin apoptoz için kritik olan NF-κB yolunu aktiv ederek cisplatin kaynaklı apoptozu teşvik ettiğidir [11].

Yapılan bir çalışmadakı lusiferaz raportör tahlilleri sonucunda URG4/URGCP'yi aşırı eksprese eden HCC hücrelerinde VEGFC'nin önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini görmüşler. VEGFC, TNF, IL-6, IL-8 ve MYC NF-κB yolağının aşağı akış genleridir. URG4'ün aşırı ekspresyonu, bu genleri de yukarı regüle eder [13].

SP1, SP/KLF ailesine ait bir çinko parmak transkripsiyon faktörüdür. Genlerin GC açısından zengin promoter bölgesine özel olarak bağlanır. Yapılmış olan bu çalışmada da URG-4/URGCP'nin promotrunde birçok GC kutusunun varlığından dolayı SP1 transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerine odaklanmışlar.

Ayrıca SP1, p16, p53 ve p21'i kodlayan tümör baskılayıcı genlerin temel bir düzenleyicisidir. Transkripsiyon faktörlerinin gen promoterlerindeki spesifik DNA bölgesine bağlanması, transkripsiyonel aktivasyon veya baskılamaya doğru anahtar bir adımdır [10].

Yapılmış olan çalışmada elde edilen transkripsiyon analizi, SP1 transkripsiyon faktörünün (TF), URG-4/URGCP geninin promoter aktivitesini arttırdığını göstermişler [10].

Yapılan bir başka çalışmada URG-4/URGCP'nin invazif meme karsinomunda Akt sinyal yollarını aktive ettiği, hücre döngüsü inhibitörleri p27 ve p21'i inhibe ettiğini ve NF-κB aktivasyonu ile anjiyogenezi kolaylaştırdığını göstermişler.

İnvazif meme karsinomunda URG-4/URGCP'nin mRNA ekspresyonu moleküler olarak ve URG-4/URGCP'nin protein ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmadan elde ettikleri sonuca göre tümör dokularında URG-4/URGCPgeninin mRNA ekspresyon seviyeleri, kontrol göğüs dokularına kıyasla daha yüksekti [14].

Çalışmada yapılan immünohistokimyasal bir değerlendirme sonucuna göre, URG-4/ URGCP'nin normal göğüs dokularında ve memenin düşük dereceli (derece I ve II) duktal karsinomlarında güçlü bir şekilde, ancak yüksek dereceli (derece III) duktal meme karsinomlarında zayıf bir şekilde ifade edildiğine kanaat gösterilmiştir.

Ayrıca URG-4/URGCP'nin ekspresyonunun Ki 67 proliferatif indeksine Nottingham prognostik indeksi ile negatif korelasyonlu olduğunu bulmuşlar [14].

NF-κB ve AP-1, MMP-9 ekspresyonu için iki ana transkripsiyon faktörüdür. Bu nedenle, URG-4/URGCP'nin bu iki sinyalleme yolu aracılığıyla MMP-9 ekspresyonunu indükleyip indüklemediğini araştırmışlardır. URG-4/URGCP'nin aşırı ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını ve URG-4/URGCP susturmanın hem A549, hem de SK-MES-1 hücrelerinde AP-1 dışındaki NF-κB'nin transkripsiyonel aktivitesini inhibe ettiğini bulmuşlardır. NF-κB aktivitesinin inhibisyonu, MMP-9 ekspresyonunu ve URG-4/URGCP'ni aşırı ifade eden NSCLC hücrelerinin (Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücreleri) invazif kabiliyetini azalttığı görülmüştür [15].

Son zamanlarda yapılan literatürde URG-4/URGCP ve miRNA'lar ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır. Yapılan çalışmalar sonucunda URG-4/URGCP varlığında miR-1274b, miR-4271, miR-4286, miR-3926, miR-4267 gibi 77tane miRNA'nın ifadesinin arttığı, miR-3664, miR-3663-5p, miR-3134 gibi 9 tane miRNA ifadelerinin azaldığı gösterilmiştir [13].

URG-4/URGCP ekspresyonuna osteosarkom olgularının %87'sinde rastlanmıştır. URG-4/URGCP geni GSK3/β-katenin/siklin D1 yolu aracılığıyla çeşitli sinyal proteinlerini ve transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek osteosarkomda hücre döngüsünü ve proliferasyonu düzenlediği bulunmuştur [13].

Yapılmış olan bu çalışmadan çıkan bir diğer sonuca göre URG-4/URGCP'nin β-katenin üzerinde hareket ederek EMT'yi aktive ettiği ve böylece osteosarkom hücrelerinin göçünü ve istilasını desteklediğini tespit etmişlerdir [7].

FA (ferulik asit) ile muamele edilmiş TT hücreleri (medüller tiroid kanser) kontrol hücreleri ile karşılaştırılmıştır. FA'nın URG-4/URGCP geninin ekspresyonunu azaltarak hücre istilası, hücre göçü ve koloni oluşumunda azalmaya neden olabileceği kanaatine varmışlar. FA ile muamele edilmiş TT hücrelerinde URG-4/URGCP'nin CCND1, CDK4 ve CDK6'nın mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde aşağı regüle ederek hücre döngüsü susturulmasına sebep olmuştur [17].

Bu ön çalışmada, RA (retinoik asit) tedavisinin farklılaşmamış ve farklılaşmış SHSY5Y nöroblastoma hücrelerinde URG-4/URGCP, CCND1, Bcl-2 ve Baxgen ekspresyon değişiklikleri üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Elde ettikleri sonuca göre RA ile tedavi edilen gruplarda Bcl-2 ve CCND1 gen ekspresyonu artttığı, RA tedavisi sonrası SHSY5Y hücrelerinde kontrol hücrelerine göre URG-4/URGCP ve Bax gen ekspresyonu azaldığı tespit edilmiştir [19].

Yapılan başka bir çalışmada temozolomid (TMZ)'in koloni oluşumu ve istilası üzerindeki etkileri SH-SY5Y hücrelerinde araştırılmıştır. SH-SY5Y hücre hattındaki TMZ'nin URG4/ URGCP, CCND1, CCND2, CDK4 ve BCL2 gen ekspresyonlarında önemli bir azalmaya neden olduğunu gözlemlemişler [21].

URG-4/URGCP geninin çeşitli sitokinlerce düzenlenme çalışmaları yapılmıştır. İnsan Hepatoma hücre hattında (Hep3B) TGF-β1 varlığında veya yokluğunda URG-4/URGCP geninin mRNA protein seviyesi değişikliklerini analiz etmişler. Çalışma sonucunda TGF-β sitokinin URG-4/URGCP geninin ekspresyonunu mRNA ve protein düzeyinde arttırdığını bulmuşlardır. Özellikle bu etkinin MAPK yolağı üzerinden olduğunu tespit etmişlerdir [20].

TNF-α sitokini ile serum açlığı ve varlığında URG-4/URGCP geni üzerine etkileri Hep3B hücre hattında araştırılmıştır. Her iki farklı koşulda URG-4/URGCP geninin ayrı yollarda düzenlendiğini bulmuştur. Serum açlığı olmadığında Hep3B hücrelerinde URG-4/URGCP genini düzenlemek için JNK ve PI3K yollarını kullandığı, serum varlığında ise wortmannin

(PI3K inhibitörü), MEK-1 (MAPK inhibitörü) ve SP600125 (JNK inhibitörü) yolları üzerinden etkilendiği bulunmuştur [22].

Yapılan bir başka çalışmada elde edilen bulgular LINC00514'ü OS için etkili bir tanısal biyobelirteç, prognostik gösterge ve terapötik hedef olarak önermişler ve LINC00514, URG-4/URGCP'nin ekspresyonunu arttırdığını bulmuşlardır [24].

Yapılan başka bir çalışmada, NF-κB/c-myc/miR-16 yolunun, gliomablastoma hücrelerinde URG-4/URGCP aracılı Cyclin D1 ve Cyclin E1'in aşırı ekspresyonunu artırarak glioma büyümesini teşvik ettiğini görmüşlerdir [25].

Yapılan in vitro çalışmada URG-4/URGCP'nin normal mide epitel hücrelerile karşılaştırıldığında mide kanseri hücrelerinde ifadesinin arttığını araştırmışlardır. Ek olarak URG-4/URGCP'nin siRNA ile indirgenmesi, SGC7901 ve MKN28 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hücre döngüsü ilerlemesini bastırdığını göstermişlerdir. Aynı zamanda URG-4/URGCPgeninin azaltılmasının nude farelerde tümör oluşumunu ve büyümesini baskıladığı bulgusuyla desteklemişlerdir. URG-4/URGCP'nin mide karsinojenezinde çalışan bir onkojen olabileceğini önermişlerdir [26].

Rapamisin (RPM), G1'den S'e geçişi inhibe edebilen, Streptomyces hygroscopicus'tan izole edilmiş bir antifungal makrolid antibiyotiktir.

Yapılan bir çalışmada RPM'li/ RPM'siz PC3, DU145 ve LNCAP hücre dizilerinde URG-4/URGCP'nin ekspresyonunu araştırmışlar. PC3, DU145, ve LNCaP hücrelerinde dozlar sırasıyla 10, 25, ve 50 nM olarak tespit edilmiştir. URG-4/URGCP'nin gen ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde azaldığını gözlemlemişler [27].

URG-4/URGCP, hücre döngüsünü uyaran FOXO3a'nın Akt aracılı fosforilasyonu tarafından düzenlenir. Lenf nodu metastazı, rahim ağzı kanseri hastalarının prognozundaçok önemli bir rol oynar [28]. Çalışmadan çıkan sonuca göre lenf düğümü metastazı durumunda, URG-4/URGCP'nin servikal kanser hücrelerinde lenfanjiyogeneze aracılık ederek Akt sinyal yolu aracılığıyla VEGF-C ekspresyonunu düzenleyebileceğini varsaymışlar [28].

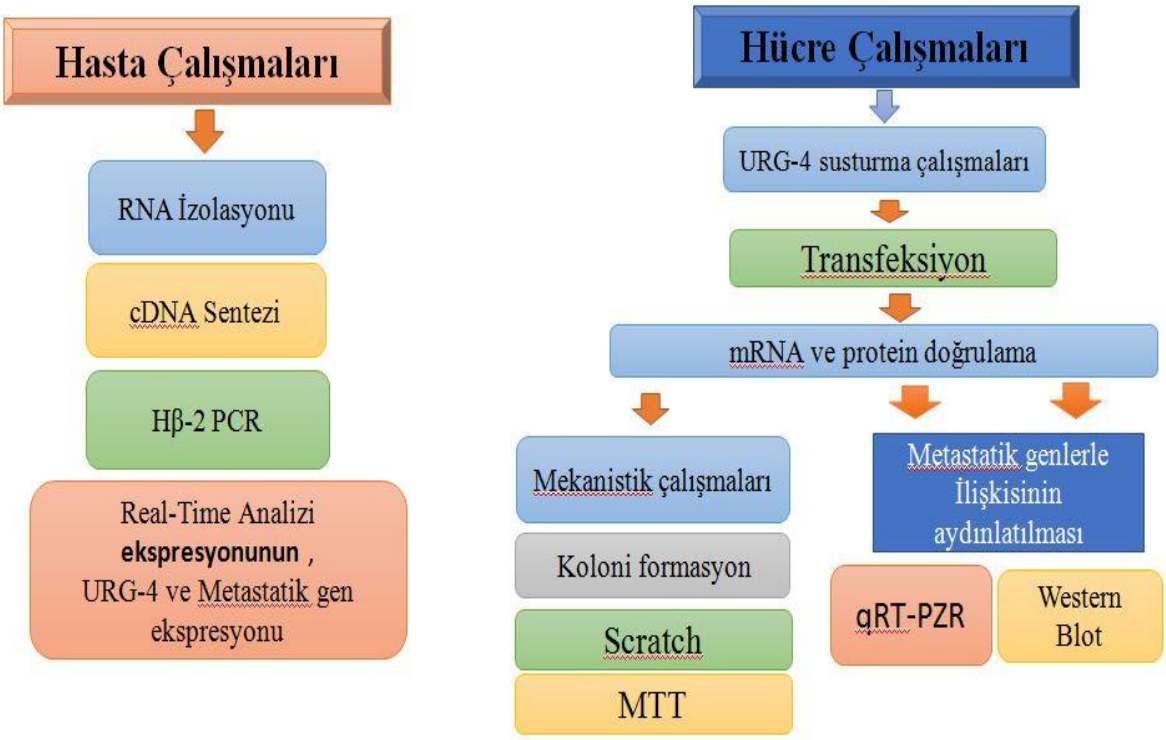
2. AMAÇ

Kanserle doğrudan ilişkili olan URG-4/URGCP birçok kanser hücresindeki rolü çalışılmasına rağmen kolon kanseri hücreleri ve dokularında yapılmış herhangi bir çalışma mevcut değildir. Genel amacımız, URG-4/URGCP geninin kolon doku ve kanser hücreleri üzerine proliferatif ve invaziv kabiliyeti üzerine etkisini araştırmaktır. Bu kapsamda çalışmalarımız hasta ve hücre çalışmaları olarak bölünmüştür.

Hasta çalışmaları kapsamında, 15 adet taze kolon kanserli ve normal kolon dokularından RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve qRT-PCR stratejisiyle hem URG-4/URGCP geninin hem de hücre çalışmalarında yapılan proliferatif ve metastatik marker genlerin ifadesi mRNA düzeyinde araştırılmıştır. Amacımız, dokulardaki URG-4/URGCP ifadesini proliferativ ve metastatik marker gen ifadeleri ile ilişkisini mRNA seviyesinde göstermektir.

Hücre çalışmaları kapsamında ise, kolon kanseri hücreleri (HT-29) kullanılmıştır. İlk olarak, ön çalışmalarla mRNA (qPCR) ve protein (Western blotting) düzeyinde gösterdiğimiz URG-4/URGCP geninin ifadesi, shRNA vektörü sistemi uygulama çalışmalarıyla kolon kanseri hücrelerinde susturma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Susturmanın doğruluğu mRNA ve protein seviyesinde analiz edilmiştir.Amacımız, HT-29 hücrelerinde ifadesi olan URG-4/URGCP geni ifadesini shRNA vektör aracılı olarak ifade düzeyini azaltmaktır.

Susturmanın doğrulandığı HT-29 hücreleri kullanılarak mekanistik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Mekanistik çalışmalar kapsamında MTT, koloni formasyon ve yaralanma deneyleri gerçekleştirilmiştir. Amacımız, URG-4/URGCP geninin hücre proliferasyonu, koloni oluşum kabiliyeti ve invaziv kabiliyeti üzerine etkisini normal ifadesi olan HT-29 hücreleri ile kıyaslayarak vurgulamaktır. Aynı zamanda URG-4/URGCP geni susturulmuş olan ve normal kolon kanseri hücreleri kullanılarak, URG-4/URGCP geninin metastatik ve proliferatif marker genlerle (osteopontin, vimentin, E-kaderin, twist, p27 ve siklin D1) ilişkisi mRNA (qPCR) seviyesinde ve E-caderin, vimentin ve URG-4 ifadesi protein düzeyinde gösterilmiştir. Amacımız URG-4/URGCP ifadesinin baskılandığı hücrelerde metastatik marker gen ifade değişimlerinin normal URG-4/URGCP ifade eden kolon kanseri hücreleri ile kıyaslayarak göstermektir. Şekil 2.1'de tez akış diyagramı gösterildiği gibidir.



Şekil 2.1: Akış diyagramı

3. MATERYAL-METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasallar

Kimyasallarların oluşturacağı tehlikeli durumlar dikkate alınarak çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarda kullanılan laboratuvar malzemeleri ve kimyasallar ve Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan laboratuvar malzemeleri ve kimyasallar

Dokudan RNA izolasyonunda gerekli olan kitler ve kimyasallar	
Trizol Reagent	Thermo scientific
Etanol	Merck
İzopropanol	Merck
DNA Sentezi ve Sonrasında Kontrolü İçin Kullanılan Malzemeler	
10X Taq Tamponu $(NH4)_2SO_4$	Thermo scientific
MgCl2	Thermo scientific
GeneRuler 1 kb DNA belirteç	Fermantas
6X DNA Yükleme Boyası	Thermo scientific
5X Reaksiyon Tamponu	Thermo scientific
Taq DNA Polimeraz (rekombinant)	Thermo scientific
Oligo dT	Thermo scientific
RiboLock RNaz İnhibitör	Thermo scientific
Jel Yükleme Boyası, Mor (6X)	NEB
$dNTP_{mix}$(deoksinükleotidmix solüsyon)	NEB
RevertAid Reverse Transkriptaz Enzimi	Thermo scientific
Beyaz, 96 kuyulu plaka	LightCycler480
RealQ Plus 2X Master Mix	Ampliqon
Agaroz	Sigma, Prona
1 kb DNA belirteç	NEB
96 kuyulu plaka jelatini	Thermo scientific

Tablo 3.1(devamı)

Hücre Kültürü Deney Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Ependorf	İsoLab
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck (Sigma-Aldrich)
Etilendiaminetetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
DMEM	Gibco
Antibiyotik-Antimiyotik Solüsyon	Gibco, Euroclone
FBS-FCS	Gibco
PBS Tableti	Amresco
25-75 cm^2hücre kültürü şişesi	Sarstedt, Germany
Steril Filtre (Filtropur) 0.20 µM	Sarstedt, Germany
6 kuyulu hücre kültürü plakası	SPL Life Sciences
10-25 mL Tek Kullanımlık Cam Pipet	Sarstedt, Germany
Western Blot için Kullanılan Kimyasallar	
4x Laemmli Tamponu	Bio-Rad
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma
Yağsız Süt Tozu (non-fat dry Milk)	Santa Cruz
%90'lık İzopropanol	Merck
2-Beta Merkaptoetanol	Sigma
TWEEN® 20	Sigma
TEMED	Bio-Rad
2-Beta Merkaptoetanol	Merck
Akrilamid (19:1)	Sigma
Membran (PVDF)	Millipore
Akrilamid (37.5:1)	Sigma
Amonyum Persülfat (APS)	Fisher Scientific
Protein Belirteci	Thermo scientific

3.1.2 Yapılan Çalışmalarında Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Yapılan deney çalışması sırasında kullanılan cihazların gerekli bakımı yapılmıştır. Çalışma için gerekli olan cihazlar Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: Deneyler için gerekli gereçler ve markaları

Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları	
UVP Jel Görüntüleme Sistemi	Vılber Lourmat
Otoklav	Human Corporation
Elektro	Roche Life Science
Light- Cycler 480 Real-Time PCR	Thermo
Luminometre	Hettich Zentrifügen
Santrifüj	Profilo/Türkiye
Buzdolabı (-20) ve (+4)	Hoshızakı, Japonya
Buz Makinası	Velp Scientfica
Vorteks	Elektromag/Türkiye
Sıcak su banyosu	Thermo
Ultra Saf Su Cihazı	Apelex, İngiltere
Tank Blot Sistemi	Bio-Rad
Elektroforez Güç Kaynağı (DNA-RNA)	Thermo Scientific
Hassas terazi	Sartorius
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Masa Tipi pH metre	Hanna
Spektrofotometre	Thermo Fisher
PZR Thermocycler	Scientific

3.2. Metot

3.2.1.Çalışma ortamınve gerekli malzemelerinsterilizasyon işlemi

Tez çalışmasında kullanılan çeşitli solüsyonlar ve cam malzemelerin sterilizasyonu 20 dk 121°C'de otoklav cihazında sağlandı. Daha sonra 80°C'lik etüvde kurutuldu. HEPA Filtre cihazını kullanarak havadan kaynaklanan kirleticileriler hücre kültürü laboratuvarında önlenildi. Gerekli araç gereçler %70'lik etil alkol kurulanarak steril edildi. Çalışma alanı virkonla ve etil alkol (%70'lik) ile steril edildi. Kullanılan solüsyonlara ek olarak RNA tabanlı çalışmalarda DEPC'li su ile mikropipetler temizlendi.

3.2.2. Hasta dokularının -80°C derin dondurucuda saklanılması

Bu araştırma için gerekli hasta doku örnekleri, Balıkesir Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniğinde kolon kanseri tanısı ile ameliyatına kararverilen hastalardan alınmıştır. Alınan normal ve tümör dokuları bekletilmeden ependoflardakı RNA koruyucu solüsyon içerisine koyulmuştur. Daha sonra solüsyondan çıkarılan dokular -80ºC dondurucuya kaldırıldı. Çalışmada 15 kolon kanseri tümörlü ve tümörsüz kolon dokusu RNA örnekleri kullanıldı. Çalışma protokolüne uygun olarak alınan ve –80ºC de saklanan doku örnekleri RNA izolasyonu için sıvı azot içerisinde parçalanarak homojenize edildi.

3.2.3 RNA Eldesi Aşamasındaki Çalışmalar

Bu aşamadaki çalışmalara başlamadan önce DEPC'li su çözeltisi hazırlandı. Hazırlayacağımız miktar 1 L ise 1000 mL steril dH_2O'dan pipetle 1 mL çekilip atıldı ve1 mL DEPC eklendi. Ardından 12 saatten az olmayacak bir sürede 37°C'lik inkübatörde bekletildi. Daha sonra sterilizasyon için 121°C'de 20 dk otoklav yapıldı. Doku parçalanması için gerekli olan havanlar alüminyum folyaya sarılarak otoklavlandı. Otoklav sonrasında kurutmaya yerleştirildi. Çalışma ortamı önceden hazırlanmış % 0.1 DEPC içeren su ile temizlendi.

3.2.3.1 Tümörlü olan ve olmayan kolon dokularından RNA İzolasyonu

RNA izolasyonunda Trizol Reagent kullanıldı. Dokular sıvı azot kullanılarak parçalandı. Dokuları ependorfa aktardıktan sonra üzerine 1 mL trizol eklendi. 5 dk inkübasyon ardından vortekslendi. Üzerine 200 µL kloroform eklendi ve vortex ile karışması sağlandı. 12000 rpm'de 4ºC'de 15 dk santrifüj yapıldı. Bu aşamada 3 katlı bir görüntü elde edildi. RNA içeren üst beyaz kat yeni ependorfa aktarıldı. Üzerine 0.5 mL isopropanol eklenerek 10 dk inkübe edildi. Ardından 12.000 rpm'de 4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Bu aşamada RNA pellet olarak elde edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra RNA çökeltisinin üzerine %75'lik etanol 1 mL olacak şekilde eklendi. Vorteksin ardından 7500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Mikropipet ile süpernatant atıldıktan sonra 15 dk peçete üzerine kurumaya koyuldu. 15 dk sonunda RNA çökeltisi 50 µL steril enjeksiyonluk dH_2O içerisinde çözüldü.

3.2.3.2 İzole edilen RNA miktarının tayin edilmesi

RNA'nın konsantrasyon ölçümü µDrop™ Plate Cihazı kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boylarında yapıldı. µDrop™ plakaya elüsyon alınan steril dH_2O'dan 2 µL ve elde edilen

RNA'dan 2 µL konuldu. RNA örneklerin konsantrasyon miktarı aşağıdaki formüller ile yapıldı;

RNA miktarı= Absorbans × 40 × 20.408

3.2.4 Formaldehit RNA Jel Elektroforezi

Kullanılan elektroforez tankı, cam malzemeler RNaz enziminden arındırılarak kullanıldı. Cam malzemeler kullanılabilmek için % 0,1 DEPC'li suda bekletildi. Daha sonra otoklavlandı. Elektroforez tankı % 0.5'lik SDS ile temizlendi. Durulanması DEPC'li su ile yapıldı. Saf etanolle yıkandıktan sonra kurutuldu.

0,5 g agaroz tartılıp jelin yapımı için 10 X'lik FA jel tamponunda çözüldü (Tablo 3.3). %0,1 DEPC'li su ile 50 mL'ye tamamlandı. Kaynatılan jel 50 ºC'ye kadar soğutuldu. Homojen bir şekilde karışması sağlanarak 0,9 mL % 37'lik formaldehitten eklenerek, 1 µL Et-Br solüsyonundanilave edildi. Hazırlanan jel elektroforezine taraklar yerleştirildi. Kasete dökülen jelin polimerleşmesi beklendi.

3.2.4.1 RNA'ların jele yüklenmesi

Örnek sayına göre PCR tüplerine 5 µL RNA örneği ve 3 µL 2X yükleme boyası eklendi. Önceden 70 ºC'ye ayarlanmış su banyosunda RNA örnekleri 10 dk ısı ile denatüre edildi. Daha sonra 10 dk buzda bekletildi. Hazırlanan örnekler 1XFA jel tamponu içerisinde jele yüklendi (Tablo 3.4). 90 Voltta 30 dk yürütülerek UV cihazı ile görüntülendi.

Tablo 3.3: 10 X FA çözeltisi miktarları ve bileşenleri

FA Çözeltileri	Stok	Konsantrasyon (son)
EDTA	0.5 M	0,05 M
NaAc	1 M	0,01 M
MOPS (pH:7,0)	1 M	0,2 M

DEPC'li su ile 1L'ye tamamlandı. Tampon çözelti % 0.1'lik DEPC'li sudan hazırlandı. Kullanılmadan önce 121 °C'de 20 dk otoklavdı.

Tablo 3.4: 1 X FA tamponu miktarları ve bileşenleri

FA Çözelti	Konsantrasyon (SON)
% 37 'lik Formaldehit	0.25 M
10 X FA Tamponu	1 X
10 X FA tamponu 900 µL DEPC'li su ve 100mL % 37'lik formaldehit ile 1 L'ye tamamlandı.	

3.2.4.2 Reverse Transkriptaz Enzimi ile Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

Ribolock inhibitörü, fermentas reaksiyon tamponu, dNTP, oliqo dT ve reverse transkriptaz bileşenleri önerildiği miktarlarda kullanılarak cDNA sentezi iki basamakta gerçekleştirildi. Her iki basamakta Tablo 3.5'de verilmiştir. RT reaksiyonunun birinci basamağı son hacim 12,5 µL olacak şekilde; 1 µL Oliqo dT primer (200 pmol), 1 µg/mL olacak şekilde RNA kalıbı ve dH_2O ile tamamlanarak gerçekleştirildi. 70 ºC 'de 5dk inkübe edildi. Reaksiyon tüpüne 4 µL 5X Reaksiyon tamponundan, 20 U/µL ribolock inhibitör stoktan 0.5 µL (20 U/mL), 10 mM dNTP karışımı stoğundan 2 µL (1mM), 1 µL reverse transkriptaz eklenerek RT'nin ikinci basamağı gerçekleştirildi. Bu bileşenler ilave edildikten sonra 25 ºC'de 5 dk, 42 ºC'de 60 dk ve 70 ºC'de 5 dk inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan cDNA'lar -20 ºC'de bekletildi.

Tablo 3.5: cDNA için gerekli kimyasallar ve basamaklar

Kullanılan Malzemeler ve Miktarı	Hacim
dH2O (Enjeksiyonluk dH2O)	X µL
RNA kalıbı	1µg/mL
Oligo (dT)	1 µL
Son hacim	12.5 µL
Basamak2 :PZR'da 5 dk 65 °C'de inkübe olunması beklenildi.	
dNTP (Deoksinükleotid) mix(10mM)	2µL
RiboLock RNaz İnhibitörü (40ng/µL)	0.5 µL
5 X Reaksiyon Tamponu	4µL
RevertAid Reverse Transkriptaz (20U/µL)	1µL
Toplam hacim	20 µL
Basamak2 : Kullanılan cihazında 60 dk ve 10 dk, 42'de ve 70°Cuygulandı.	

3.2.4.3 PZR

Hβ-2 gen primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gerçekleştirildi. Tablo 3.6'de PZR için gerekli bileşenler ve Tablo 3.7'da PZR döngü koşulları verilmiştir.

Tablo 3.6: PZR için gerekli bileşenler

Hβ-2 PZR bileşenleri	**Hacim**
dNTP mix (10 mM each)	1 µL
10 X Taq polimeraz Tamponu	5 µL
cDNA kalıbı	1 µL
Taq Polimeraz	0.5 µL
İleri Hβ-2 Primeri	1 µL
Geri Hβ-2 Primeri	1 µL
$MgCl_2$	2 µL
dH_2O	36.5 µL
Son Hacim	50 µL

Tablo 3.7: PZR döngü koşulları

PZR	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü Sayısı**
Başlangıç			
Denatürasyonu	94 °C	3 dk	1
Denatürasyon	94 °C	1 dk	
Bağlanma	58 °C-60 °C	45 san	35
Uzama	72 °C	1 dk	
Final Uzama	72 °C	10 dk	1

3.2.4.4 qRT-PZR

LightCycler® 480 Sistemi kullanılarak kantitatif olarak gen ekspresyon analizinin değerlendirilmesi sağlandı. Tablo 3.8'de, PZR için gerekli kimyasallar, döngü şartları, Tablo 3.9'da gerekli primerler Tablo 3.10'da yazılmıştır.

Tablo 3.8: PZR için gerekli bileşenler

PZR malzemeleri	Hacim	
dH2O	4,25 µL	
2X Master Mix	6.25 µL	
Geri primer	0,5 µL	
İleri Primer	0.5 µL	
Kalıp DNA	1 µL	20 ng (1-100 ng)

Tablo 3.9: qRT-PZR döngü koşulları

Hβ-2 PZR Döngü miktarı	Sıcaklık °C	Süre
Başlangıç Inkübasyonu 1	95°C	15saniye
Erime eğris i35	95-65-97°C	5 san-1 dk
Amplifikasyon 40	95-55-72°C	30-30-30 saniye
Soğutma1	40°C	30 saniye

Tablo 3.10: Gerekli olan kspresyon primerleri

Gerekli olan ekspresyon primerleri	
İleri Primer (10 pmol) (Hβ-2)	5'-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'
Geri Primer (10 pmol) (Hβ-2)	3'-CATGTCTCCATCCCACTTAACT-5'
İleri Primer (10 pmol) (E-caderin)	5'-TTG GTT GTG TCG ATC ACT-3'
Geri Primer (10 pmol) (E-caderin)	3'-RCAG TGG TAC CCT TAG TTC-5'
İleri Primer (10 pmol) (Vimentin)	5'-TGGCCGACGCCATCAACACC-3'
Geri Primer (10 pmol) (Vimentin)	3'-CACCTCGACGCGGGCTTTG-5'
İleri Primer (10 pmol) (Twist)	5'-GCCAGGTACATCGACTTCCTCT-3'
Geri Primer (10 pmol) (Twist)	3'-TCCATCCTCCAGACCGAGAAG-5'
İleri Primer (10 pmol) (URG-4)	5'-CTTCATCCTGAGTCCCTACCG-3'
Geri Primer (10 pmol) (URG-4)	3'-GCCGTTCTGCTGCATTCG-5'

3.2.4.5 Kantitatif RT-PZR'ın Değerlendirilmesi

Real Time sonuçları 2 delta CT yöntemine göre değerlendirildi. URG4/URGCP genlerinin elde edilmiş değerler ile İnsan Beta-2'nin değer ortalamasından farkı bulundu. Deney gurbu kontrol kuvveti değerine bölünerek birin katı hali ile hesaplanıldı. Sonuçların istatistiki analizi MiniTab programıyla gerçekleştirildi.

3.2.5 DNA ile ilgili Teknikler

3.2.5.1 Jel Elektroforezi-DNA

Bu yöntemle PCR ürünlerinin görüntülenmesi sağlanılır. İlk olarak jel elektroforezi için 5 X TBE çözeltisi (Tablo 3.11) hazılandı. Bu çözelti 0.5 X TBE'ye seyreltildi. Tablo 3.11'de verilmiş üzere 0.5 X TBE (75 mL) tampon çözeltisinde 0.75 g agaroz mikrodalga fırın kullanılarak çözündürülüp homojenize edildi. Jel karışımının sıcaklık derecesi 50 °C'ye düştükten sonra içerisine son konsantrasyon 0.5 µg/mL olacak biçimde Etidyum Bromür ilave edildi. Taraklar jel elektroforez kasetine yerleştirildikten sonra jel döküldü. Tampon çözeltisi (0.5 X TBE) bulunan tanka polimerleşen jel konuldu. 6X DNA yükleme boyası ile Hβ-2 PZR boyandı. Kuyucuklara yüklenen örnekler 45 dk'da 90 voltda yürütüldü. UV cihazı ile görüntüleme yapıldı.

Tablo 3.11: Jel Agaroz kimyasalları.

Jel Agaroz kimyasalları	
1 kb DNA Belirteç Thermo SM0311	4 µL enjeksiyonluk dH2O,1 µL markır, 1 µL 6X yükleme boyası ependorfta karıştırıldı. -20°C'de bekletildi.
0.5X TBE	1 L 0.5X TBE için 900 mL steril dH2O 100 mL 5X TBE kullanıldı. Karışım 20 dk 121°C'de otoklav yapıldı.
5X TBE	Sırası ile 20 mL 0.5M'lık EDTA, 27.5g Borik asit, 54g Tris Base tartıldı. 8.0'e pH'ı ayarlandı. 20 dk 121°C'de otoklavlandı.

3.2.6 Hücre Kültürü Metotları

3.2.6.1 Çalışmalada Kullanılan Malzemelerin Hazırlık Aşamaları

Kullanılacak malzemelerin ısıya dayanıklığı dikkate alınarak sterilizasyon gerçekleştirildi.

3.2.6.2 PBS'nin Hazırlanması

1 tablet PBS 100 mL saf suda çözülerek 1XPBS elde edilir. 20 dk 121°C'de otoklav yapılır. Buzdolabında +4°C'de bekletildi.

3.2.6.3 FBS'nin Hazılanması

FCS +4°C'de kullanılmadan önce eritildi. 30 dk 55°C'de su banyosunda bekletilerek inaktive edildi ve 50 mL'lik steril falkonlara paylaştırıldı. Deneylerde kullanılmak amaçlı -20 °C'de buzdolabında saklandı.

3.2.6.4 Tripsin EDTA Solüsyonunun oluşturulması

Tripsin solüsyonu için distile su kullanılarak 1X PBS solüsyonu hazırlandı. Tripsin (0.25 g) ve EDTA (0.2 g) 100 ml 1X PBS solüsyonun içerisine eklendi.Deney çalışmasında % 0.25 EDTA'lı Tripsin solüsyonu kullanıldı. 15 mL ölçülü falkonlara bölüştürüldü. Alikot yapıldı. -20 °C'de bekletildi.

3.2.6.5 Hücre Besiyerinin Hazırlanması

Çalışma için high glucoseL-glutamin içeren DMEM kullanıldı. DMEM'in içerisine steril FCS %10 oranında eklendi. Son olarak %1 Anti-myco (antibiyotik eklendi). +4°C'de bekletildi.

3.2.7 Deneylerde Kullanılan Hücre Hattı

Bu çalışmada HT29 (İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı) kullanıldı.

3.2.7.1 -80°C'de Bekletilen Hücre Soyunun Başlatılması

Hücreler -80°Cdondurucudan çıkarıldı, önceden su banyosunda (37°C'lik) eriyene kadar bekletildi. Bölüm 3.2.6.5 'de açıklandığı üzere HT-29 hücreleri %1 antibiyotik+ %10 FCS içeren DMEM ile karışıma eklendi. Sonrasında ölü hücre ve DMSO olan ortamdan uzaklaştırmak için 5 dk 1000 rpm'de hücreler santrifüje bırakıldı. 2mL %10 FCS + %1 antibiyotik + DMEM'de pellet çözülür. Sonra 13 mL FCS+DMEM eklenmiş 75 cm^2 'lik flaska alınır. Uygun şekilde flask üzerine hücre pasaj sayısı tarihi yazıldı. 37°C'lik %5 CO_2 ve % 95 nem içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.2.7.2 Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin flaskın yüzeyini %80-90 civarında kapladığı zaman pasaj yapıldı. FCS+DMEM karışımı olan medyum uzaklaştırıldı. Daha sonra PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Tripsin-EDTA eklenerek hücrenin flask yüzeyinden kalkması için ($25cm^2$ için 1 mL ve $75cm^2$ için 3 mL) 3-4 dk inkübatöre kaldırıldı. Tripsinizasyonu gözlemlenen hücrelere FCS + DMEM karışımı medyum eklendi ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. %10 FCS + %1 antibiyotik + DMEM ile pellet çözüldü. Flasklara ekim yapıldı. 37°C ve % 5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.2.7.3 Tripan Mavisi ile Canlı Hücrelerin Boyanması

25 küçük kareye ayrılmış, Thoma lamı canlı hücrelerin toplam hacmini hesaplamak için kullanıldı. Pellet 10 mL medyumda çözündürüldü. Pelletden 1mL ependorfa aktarıldı. 10 µL alınarak tripan mavi boyası ile1 mL hücre boyandı. Hücreler mikroskop altında sayıldı. Thoma lamı sayım sonucu x 2 x 10^4= Toplam canlı hücre sayısı/mL

3.2.7.4 -80°C'de Hücrelerin korunması

%80-90 oranında hücreler flaskı doldurduğu zaman, medyumdan ayrıştırıldı. Yüzeye yapışık olan hücreler PBS ile yıkandıktan sonra EDTA kullanılarak yüzeyden ayrıştırıldı. Medyum süspanse hale getirilerek flasklara taşındı. Çöktürülmesi 5dk 1000 rpm'de yapıldı. Süpernatant pellet pipetle uzaklaştırıldı. 100 µL DMSO, 900 µL FCS ile pellet karışımı çözülerek, hücreler -80°C'de muhafaza edidi.

3.2.8 Transfeksiyon işlemleri

5 dk 1000 rpm'de santrifüjlendi. Hücre pelleti 6 mL medyumda çözümlendi. Homojenize edilen hücrelerhücre süspansiyonundan 30 µL alınarak bir ependorfa aktarıldı. Üzerine 30 µL Tripan Mavisi boya ilave edilerek sonra 5 dk oda normal sıcaklıkta bekletilir. Pipetaj yapılan karışımdan 10 µL alınarak thoma lamına aktarıldı. Canlı hücrelerin sayımı yapıldı. 1 mL'deki hücre miktarı aşağıdaki formüle esasen hesaplandı.

Hücre miktarı x Seyreltme faktörü (10^4 x) = Hücre sayısı (1 mL'deki)

Bu çalışma için öncelikle HT-29 hücreleri yukarıda anlatıldığı şekilde sayılarak eşit olacak şekilde (500.000 hücre) 6 kuyucuklu plakalara bölündü. Negatif kontrol olarak (scramle Scr)

için $5x10^4$ HT-29 hücreleri, 6 µL × 2 TurboFect transfeksiyon reaktifi, 3 µL × 2 plazmit DNA ile transfekte edildi. 391 µL × 2 DMEM kullanıldı. URG-4 için 5x104 HT-29 hücreleri, 6 µL × 2 TurboFect transfeksiyon reaktifi, 2.6 µL × 2 plazmit DNA ile transfekte edildi. 391.4 µL × 2 DMEM kullanıldı.

3.2.8.1 Koloni formasyon

2000 sayısında HT-29 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara kuyu paylaştırıldı. İki tekrarlı olacak şekilde hücrelere URG-4 shpLKO.1 vektörü uygulandı. İki hafta sonra hücrelerin bulunduğu medyum uzaklaştırıldı ve kuyular PBS ile yıkandı. Hücreler buzda 5 dk bekletilerek birkaç damla metanolle sabitlendi. Metanol tekrar PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra kristal viyole boyası yüzeyi kapatacak kadar eklendi. Boya birkaç defa PBS ile yıkandı. Colony counter programı kullanılarak koloni sayıları belirlendi ve Microsoft Excel programı ile grafiklendirildi.

3.2.8.2 MTT

MTT metodu canlı hücrelerin tetrazolium tuzu olan MTT'yi formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanır. Hücreler her kuyuda 10.000 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Kuyular, SH-1 ve SH-2 kontrol, scr-1, scr-2, URG-4 (1), URG-4 (2) gibi ayrıldı. Kuyular 100 µl besiyeri eklendi. 24 ve 48 saat sonrasında hücrelerin bulunduğu ortama, 10 µl stok MTT solüsyonu eklendi ve ve 4 saat süresince 37°C, %5 CO2 içeren etüvde bekletildi. İnkübasyondan sonra medyum uzaklaştırıldı. Kristaller 0,004 M HCl içeren izopropanol ile çözüldü. 550 nm'de absorbans belirlendi.

3.2.8.3 Yaralanma Deneyleri

HT-29 hücreleri 250.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara paylaştırıldı. 24 saat hücrelerin tutunması ve tüm yüzeyi kaplaması beklenildi. Kuyucuklara 10 µL pipet yardımıyla artı şeklinde çizikler yapıldı. İlk uygulama anı (0.saat) görüntülendi. Sonrasında ise hücrelerin arkadaki çizik alana doğru hücre göç hızının hesaplanabilmesi için 3, 6, 24, 48 ve 72. saatlerde kuyucuklar Nikon marka mikroskop ile görüntülendi. Sonuçlar imaje J programında analiz edildi.

3.2.9 Western Blot Deney Basamakları

3.2.9.1 RIPA Lizis ve Ekstraksiyon

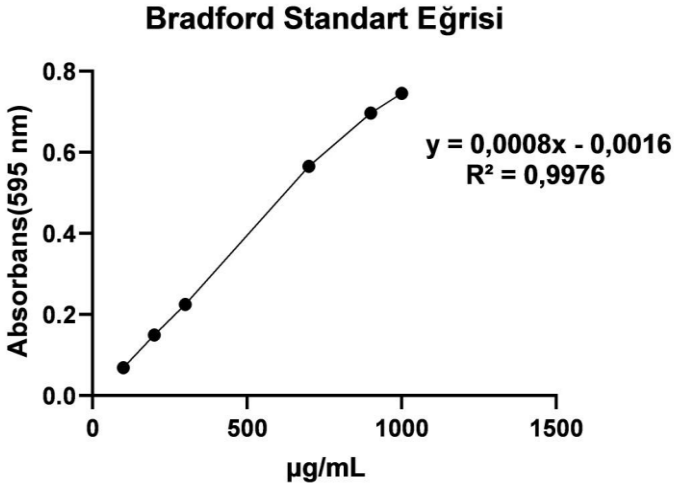
Pelletler -80°C'den çıkarılarak buz üzerinde erimesi beklendi. Pellletlerin üzerine 100 µL RIPA tamponu eklendi. Tablo 3.13'de ekstraksiyon tamponu ve RIPA lizisin hazırlanışı verilmiştir. Daha sonra buz üzerinde 45 dk bekletildi. Örnekler pipetaj yapılarak ependorflara aktarıldı. 1200 g'de 10 dk santrifüj edildi. Steril ependorflara alınan süpernatantların konsantrasyonları belirlendi.

Tablo 3.12: Ekstraksiyon (RİPA) ve lizis için kimyasallar .

	Son Konsantrasyon
Triton x 100 %1	500 µL
NaCl 140 mM	7 mL
Tris Cl pH:8 10 mM	500 µL
EGTA 1 mM	500 µL
SDS %0.1	10 mL
Sodyum deoksikolat %0.1	0.05 g
EDTA 1mM	100 µL
Hazırlanan tampon çözeltiler 15 mL'lik temiz falkona paylaştırıldı. Buzdolabında -20°C'de bekletildi.	

3.2.9.2 Protein Miktarının Bradford ile Çözümlenmesi

Bradford yöntemi kullanılarak proteinlerölçüldü. Tablo 3.13'de kullanılan kimyasal malzemeler verilmiştir. Bradford denklemi yapıldı. İşlem için distille su, stok çözelti (BSA), reaktif ile örnekler hazırlandı. 10 dk karanlık ortamda tutuldu. Plakanın herbir kuyucuğuna 250 µL eklendi. Spektrofotometre cihazında 595 nm'de ölçüm yapıldı. Denklem oluşturularak hesaplanıldı. Protein yüklemesi ölçüm sonucu kadar yapıldı. -80°C muhafaza edildi. Şekil 3.1'de Bradford Standart Eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Bradford Eğrisi

Tablo 3.13: Bradford için kullanılan kimyasallar

Gerekli malzemeler	Standart eğri için Stok BSA çözeltisi hazırlanması
0.05 L Etanol (% 95'lik) 100 mL % 95'lik Fosforik asit 0.1g BSA 0.1g Coomassie Brilliant Blue	0.1L distille suda çözündürülür. +4 buzdolabında bekletildi.
Kimyasallar distille su ile 1000 mL'ye sabitlenilir. Oda sıcaklığında, ışık almayan bir yerde tutulur.	

3.2.9.3 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Bu çalışma için gerekli lab malzemeleri: jel tarakları, cam plaka, elektroforez tankı %70'lik etil alkol solüsyonu, sonra steril su ile yıkandı, kurumaya bırakıldı. Camlar bir-birine monte edildi. Yığma jeli hazırlandı. Hazırlanan jelden yeteri kadar alınarak camların arasına eklenildi. Ardından jelin düz bir görüntüde olması için izopropanol (%90'lık) ilave edildi. Kuruyan jelden kurutma kağıdı ile bu maddeler uzaklaştırıldı. Ardından hazırlanan ayırma jeli polimerleşen yığma jelinin üzerine eklendi. Jel tarağı kuyucuk oluşması için cam plakaların arasına yerleştirildi. SDS-PAGE jel malzemeleri Tablo 3.14'de verilmiştir.

-80°C'de muhafaza edilen protein örnekleri 4X Laemli bufferın beta-merkapto etanol ile karışımının konsantrasyonu 30-50 µg olacak şekilde birleştirildi. Örnekler 5 dk 95°C-lik su

banyosunda inkübe edildi. Daha sonra ilk kuyuya markır diğer kuyucuklara ise inkübasyonu tamamlanmış protein örnekleri yüklendi. Yürütme işlemi yapmak için kullanılan tankın içerisi 1X yürütme tamponu ile doldurulduu. Hazır olan örnekler 120 dk 90 V'de yürütüldü.

Tablo 3.14: SDS'in hazırlanması için gerekli olan malzemeleri

(miktar 2 jel)	**Yığma Jeli**	**Ayırma Jeli (%10'luk)**
	1.25 mL (Üst Tamponu)	2.5 mL (Alt Tamponu)
Akrilamid-Bisakrilamid (37.5:1)/ (19:1)	0.625 mL	2.5 mL
TEMED	5µL	10µL
dH_2O	3.07 mL	5 mL
%10 APS	50µL	100µL

Tablo 3.15: Gerekli olan SDS kimyasalları

Kullanılan Solüsyon	**İçeriğin Hazırlanması**
Üst tamponu	Terazide 6.6 g Tris ve 0.4 g SDS çözelti tartılarak üzeri distille su 0.1 L'ye tamamlanılır. +4°C'de bekletilir.
Alt tamponu	Terazide 0.4 g SDS,19.8 g Tris, tartılarak üzeri 100 mL'ye tamamlanılır. +4°C bekletilir.
Yükleme boyası	100 µL 2-Beta Merkaptoetanol 900 µL 4X LSB için gerekli olan miktardır.
10X Yürütme tamponu	Terazide 144.4 g Glisin, 30.3 g Tris tartılarak üzeri distille su ile tamamlanılır. +4°C bekletilir.
1X Yürütme tamponu	900 mL distille su ile 100 mL 10X yürütme tamponu1 L'ye ayarlandı. 10 mL SDS çözeltisi ilave edilir. Normal sıcaklıkta bekletilir.
10X TBS tampon solüsyonu	Terazide 87.6 g NaCl ve 24.22 g Tris distille su ile 1000 mL'ye tamamlanılır. +4°C'de bekletilir.

Tablo 3.15 (devamı)

Transfer tamponu	200 mL metanol ve 100 mL 10X tamponunun üzeri distille su ile 1L'ye tamamlanılır. %10 SDS'den 500 µL solüsyon ilave edilir.
Brillant Mavi R-250 Boya (Poliakrilamid Jel boyama çözeltisi)	0.25 g Brillant mavisi 250, 100 mL Etanol (% 95'lik) ile Asetik Asit (% 10) karıştılarak oda sıcaklığında bekletildi.
%10 SDS çözeltisi	Terazide 10 g SDS çözeltisi tartılarak üzerine 100 mL distille su eklenildi. Normal sıcaklıkta bekletilir.
Bloklama tampon solüsyonu	1g yağsız süt tozuna 20 mL 1XTBS tween 20 solüsyonu eklendi. +4°C bir hafta muhafaza edildi.
1X TBS-(%0,1) Tween20 tampon solüsyonu	900 mL steril dH_2O ile 100 mL 10 XTBS tamponu 1 L'ye tamamlandı. 1 mL tween20 maddesi içerisine eklendi. +4°C muhafaza edildi.

3.2.9.4 Western Blot Membranına Protein Transferi

Yürütme işlemi devam ettiği sürede taze transfer tamponu (Tablo 3.15) hazırlandı ve buzdolabında bekletildi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra membrana transfer işlemine devam edildi. Transferde PVDF membranlar kullanıldı. Soğuk transfer tamponuna alınan SDS-poliakrilamid jel burada 5 dk bekletildi. Jeller dikkatli bir şekilde cam plakalardan ayrıldı. Soğuk transfer tamponuna alınan SDS-poliakrilamid jel burada 5 dk bekletildi. Jeller dikkatli bir şekilde cam plakalardan ayrıldı. Sandiviçleme olarak adlanan bu işlemde sırası ile 1'er sünger, 1'er kurutma kağıdı, 1'er membran, SDS jel, 1'er kurutma kağıdı ve 1'er sünger konuldu. Daha sonra tanka yerleştirildi. Transfer tankının içerisine 1000mL soğuk transfer tamponu eklendi. Bir gece boyunca +4ºC'de 15 V'da transfer edildi.

3.2.9.5 Antikorlama ve Membran Bloklama

Tranferden çıkarılan membran bloklama solüsyonuna bırakıldı. Membran 1 saat boyunca horizantal çalkalayıcıya alındı. 5 dk Briliant mavi R-250 boyası ile SDS- poliakrilamid jel

boyandı. Bu sürecin sonunda kullanılan boya su ile arındırıldı. 1-1,5 saatde yıkanması biten PVDF membran Tablo 3.15'de anlatılan bloklama solüsyonu ile çalkalayıcıya bırakıldı. PVDF membran daha sonra 5'er dk 3 kere 1XTBS-Tween20 ile yıkandı. URG-4/URGCP 1/1000 oranında birincil antikorda, 1/5000 oranında sekonder (anti-rabbit) antikorda 1gece +4°C bekletildi. Her antikorlama sonrası 3 defa 5 dk 1XTBS-Tween20'de yıkanması sağlandı.

E-kaderin ve Vimentin için kullanılan antikorlama ölçüsü birincil 1/1000, sekonder (anti-rabbit) 1/5000 oranındadır. Her antikorlama sonrası 3 defa 5 dk 1XTBS-Tween 20'de yıkanması sağlandı. 1 gece +4°C bekletildi.

β-aktin bu ölçü birincil antikor için 1:5000, sekonder antikor (anti-rabbit) için 0.3:5000 oranındadır. Her antikorlama sonrası 3 defa 5 dk 1XTBS-Tween 20'de yıkanması sağlandı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

3.2.9.6 Membranların PVDF Görüntülemesi

PVDFmembranlar, 1 dk karanlık ortamda ECL solüsyonu ile bekletildi. Fusion Fx (Vilber) ile görüntüleme yapıldı.

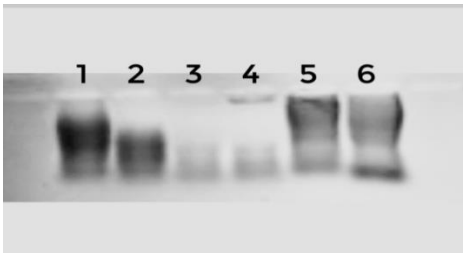
4. BULGULAR

4.1 Tümörlü olan ve olmayan dokularda URG-4/URGCP geninin mRNA seviyesinde ifadesinin incelenmesi

Bölüm 3.2.3.1.'de ifade edildiği şekilde dokulardan RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 3.2.4.1'de gösterildiği gibi RNA'ların kalitesinin kontrolü RNA jel elektroforezi ile belirlendi. Bölüm 3.2.3.2'de RNA'ların miktar tayini yapıldı. Sonuçlar Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5'de verildiği gibidir. Yaptığımız doku izolasyonları sonucunda bazı dokuların stoklama süresinin uzun olmasından dolayı veriminin düşük ve RNA'nın intak olmadığı tespit edilmiştir. Hastanın tümörlü dokusu T ve aynı hastanın tümör dokusundan uzak normal dokusu da N olarak sembolize edilmiştir.

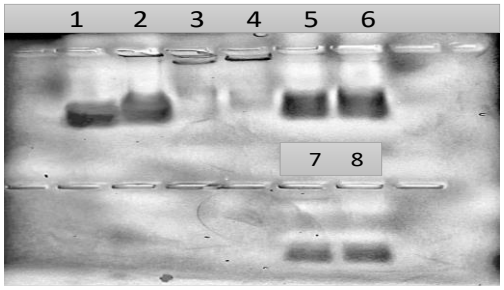
Şekil 4.1: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü

1: T1 (50 mg/mL); **2:** T1 (100 mg/mL); **3:** T2 (50 mg/mL); **4:** T2 (100 mg/mL); **5:** N1 (50 mg/mL); **6:** N1 (100 mg/mL); **7:** N2 (50 mg/mL); **8:** N2 (100 mg/mL)



Şekil 4.2: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü

1: T3 (50 mg/mL); **2:** T3 (100 mg/mL); **3:** N3 (50 mg/mL); **4:** N3 (100 mg/mL); **5:** T4 (50 mg/mL); **6:** T4 (100 mg/mL)

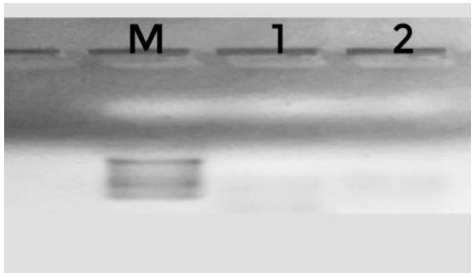


Şekil 4.3: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü

1: T5 (50 mg/mL); **2:** T5 (100 mg/mL); **3:** N5 (50 mg/mL); **4:** N5 (100 mg/mL); **5:** T6 (50 mg/mL); **6:** T6 (100 mg/mL); **7:** N6 (50 mg/mL); **8:** N6 (100 mg/mL)

Şekil 4.4: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü

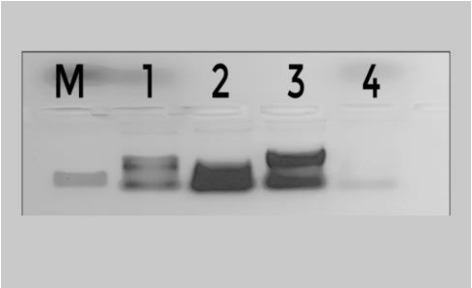
1: T7(50 mg/mL); **2:** T7 (100 mg/mL); **3:** N7 (50 mg/mL); **4:** N7 (100 mg/mL)



Şekil 4.5: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü

1: T8 (50 mg/mL); **2:** T9 (50 mg/mL)

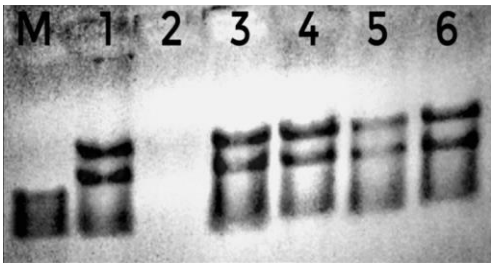
Yöntem optimizasyonu yapılarak kalitesi daha iyi RNA'ların elde edilmesi amacıyla hiç beklemeden kesim sonrası temin edilmiş olan kuzu karaciğer dokusu ile çalışılmıştır. Yapmış olduğumuz çalışma sonuçları Şekil 4.6'da gösterildiği gibidir. Stoklanma süresinin hiç olmadığı ve taze alınmış olan dokulardan elde edilen RNA kalitesinin çok yüksek miktarda olduğu ve RNA degredasyonunun gözlemlenmediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.6: Taze hayvan dokularından izole edilen RNA örneklerinin formaldehit jel elektroforezi görüntüsü

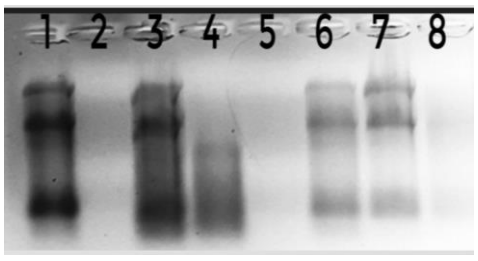
1: 0.5 g doku örneği; **2:** 1 g doku öğrneği; **3:** 1.5 g doku örneği; **4:** 2 g doku örneği

Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de elde edilen RNA görüntüleri Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi bilimlerden kolon tanısı konulmuş ve hiç bekletilmeden dokulardan elde edilmiştir. Yapılan çalışmada sonucunda bekletilmeden elde edilen RNA kalitesinin yüksek olduğu ve RNA'nın degrede olmadığı gözlemlenmiştir. Tablo 4.1'de dokulardan elde ettiğimiz RNA miktarları verilmiştir. RNA miktarı yüksek olan RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.7: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü

1: T10 (50 mg); **2:** N10 (50 mg); **3:** T11 (50 mg); **4:** N11 (50 mg); **5:** T12 (50 mg); **6:** N12 (50 mg)



Şekil 4.8: Dokudan elde edilen RNA'ların formaldehit jel görüntüsü

1: T13 (50 mg); **2:** N13 (50 mg); **3:** T14 (50 mg); **4:** N14 (50 mg); **5:** T15 (50 mg);

6: N15 (50 mg); **7:** T16 (50 mg); **8:** N16 (50 mg)

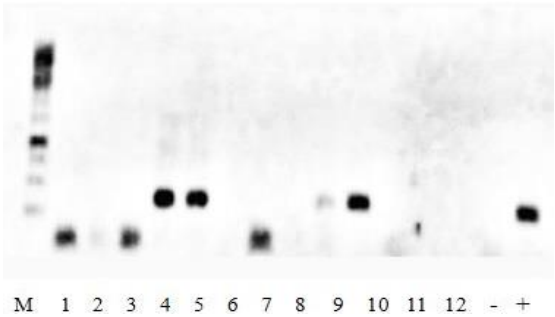
Tablo 4.1 Elde edilen RNA örneklerinin 260 nm'de OD değerleri ve RNA miktarları

Örnek Adı	**260 nm absorbans**	**RNA Miktarı (ng/mL)**
1. T1 (50 mg/mL)	3.42	684
2. T1 (100 mg/mL)	1.08	216
3. T2 (50 mg/mL)	Çok düşük	Çok düşük
4. T2 (100 mg/mL)	0.083	16.6
5. N1 (50 mg/mL)	2.21	442
6. N1 (100 mg/mL)	4.39	878
7. N2 (50 mg/mL)	4.30	860
8. N2 (100 mg/mL)	1.54	308
9. T3 (50mg doku)	3.571	2.915
10.T3 (100 mg doku)	3.557	2.903
11.N3 (50 mg doku)	2.016	1.645
12.N3 (100 mg doku)	0.833	679.9
13.T4 (50 mg doku)	2.758	2.251
14.T4 (100 mg doku)	3.374	2.754
15.T5 (50mg doku)	3.571	2.915
16.T5 (100 mg doku)	3.557	2.903
17.N5 (50 mg doku)	2.016	1.645
18.N5 (100 mg doku)	0.833	679.9
19.T6 (50 mg doku)	2.758	2.251
20.T6 (100 mg doku)	3.374	2.754
21.N6 (50 mg/doku)	0.378	308
22.N6 (100 mg doku)	0.3	244.8
23.T7 (50mg doku)	2.644	2.159
24.T7 (100 mg doku)	3.271	2.670
25.N7 (50 mg doku)	3.100	2.530
26.N7 (100 mg doku)	3.118	2.545
27.T8 (50 mg doku)	0.449	366.5
28.T9 (50 mg doku)	0.632	513.4
29.(0.5 g)	3.094	2.525

Tablo 4.1 (devamı)

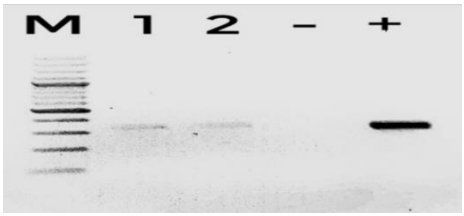
30.(0.75 g)	2.878	2.878
31.(1 gr)	2.538	2.538
32.(1.25 g)	2.297	2.297
33.(1.75 g)	2.875	2.875
34.(2 g)	3.494	2.852
35.T10 (50 mg doku)	1.533	1251
36.N10 (50 mg doku)	0.692	565
37.T11 (50 mg doku)	0.826	674
38.N11 (50 mg/doku)	0.09	Düşük
39.T12 (50 mg doku)	3.386	2764
40.N12 (50 mg doku)	1.584	1293
41.T13 (50 mg doku)	1.414	1154
42.N13 (50 mg doku)	0.225	183
43.T14 (50 mg doku)	1.049	856
44.N14 (50 mg/doku)	1.779	1452
45.T15 (50 mg doku)	0.229	186
46.N15 (50 mg doku)	2.113	1724
47.T16 (50 mg doku)	1.461	1192
48.N16 (50 mg doku)	1.593	1300

DNA (cDNA) Bölüm 3.2.4.2'de ifade edildiği gibi yapıldı. Bölüm 3.2.4.3'de ifade edilen yöntemle PZR kuruldu. Bölüm 3.2.5.1'de de bildirildiği gibi cDNA'lar referans gen olan Hβ-2 primerleri kullanılarak PZR örnekleri DNA jel elektroforezi, UV ile görüntülendi. Kontrol PZR yapılarak cDNA'nın kullanılabilirliği belirlendi. Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11'de çalıştığı gösterilen cDNA'lar Real-Time PCR aşamasına taşınmıştır.



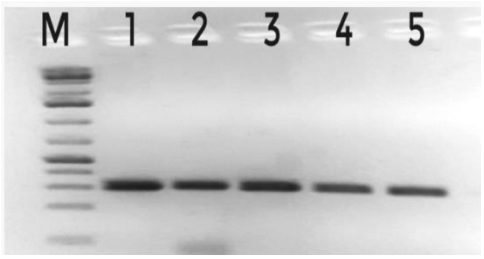
Şekil 4.9: Hβ-2 kullanılarak yapılan PZR jel görüntüsü

M:1kbSM0311 **1:** T1 (50 mg/mL); **2:** T1 (100 mg/mL); **3:** N1 (50 mg/mL); **4:** N1 (100 mg/mL); **5:** T3 (50 mg/mL); **6:** T3 (100 mg/mL); **7:** N3 (50 mg/mL); **8:** N3 (100 mg/mL); **9:** T4 (50 mg/mL); **10:** T4 (100 mg/mL); **11:** N4 (50 mg/mL); **12:** N4 (100 mg/mL)



Şekil 4.10: Hβ-2 kullanılarak yapılan PZR jel görüntüsü

M:1kbSM0311 **1:** T8 (50 mg/mL); **2:** T9 (50 mg/mL)



Şekil 4.11: Hβ-2 kullanılarak yapılan PZR jel görüntüsü

M:1kbSM0311 **1:** T10; **2:** N10; **3:** T11; **4:** T12; **5:** N12

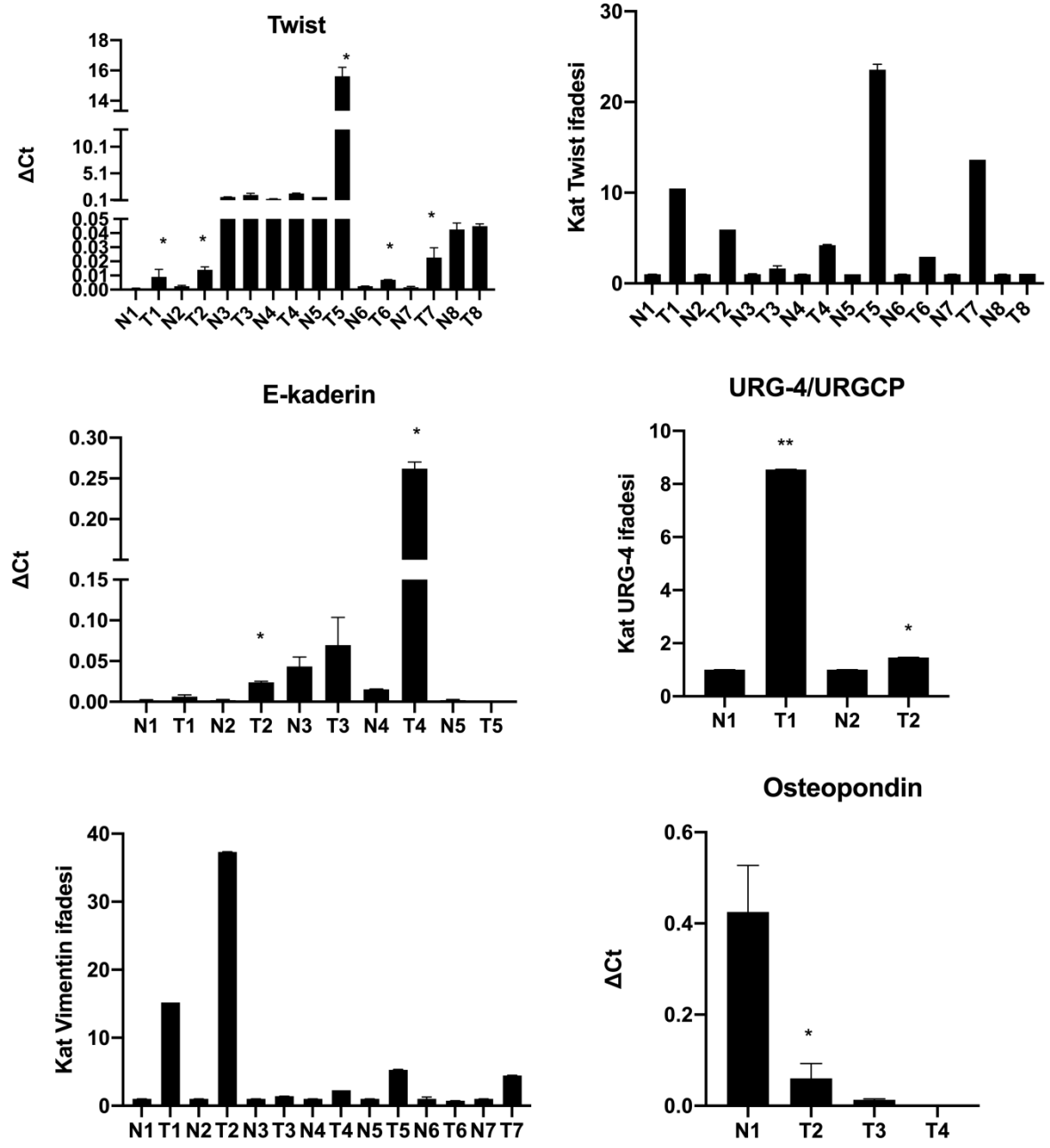
4.2 Metastatik ve proliferatif marker primerlerinin çalışabilirliğinin qPZR aracılı kontrol edilmesi

Real-Time PCR aşamasına geçmeden önce Real-Time aşamasında kullanılacak olan metastatik ve proliferatif marker gen ifadeleri Bölüm 3.2.4.4'de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.12'de gösterildiği şekilde Twist, Vimentin, E-kaderin, osteopondin, siklin D1 ve p 27 primerlerinin doğru bölgede spesifik amplifikasyon verdikleri gözlemlendi.

Şekil 4.12: PZRjel görüntüsü

M: 1kb DNA ladder **1:** Twist; **2:** Vimentin; **3:** E-kaderin; **4:** Osteopondin ;**5:** Siklin D1; **6:** P27; **(–)** negatif kontrol; **(+)** pozitif kontrol

Elde edilen ve çalıştığı kontrol edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak URG-4 ifadesi ve diğer metastatik primerler kullanılarak Real time gerçekleştirildi. Yapılmış olan sonuçlara göre Twist gen ekspresyonu normal dokulara kıyasla tümörlü dokularda artış göstermiştir. E-kaderin gen ifadesi ise bazı tümörlü dokularda normal dokulara kıyasla ifadesi azalırken bazılarında anlamlı olarak artış göstermiştir. Hastalardan alınan tümör ve normal dokuların gen profilleri değişeceğinden bu farklılıklar kaynaklanmaktadır. URG-4/URGCP, Twist ve vimentin gen ifadesi normal dokulara kıyaslandığında genel olarak artış göstermişlerdir. Osteopondin ifadesi ise normal dokulara göre ifadesi tümörlü dokuda azalan genler arasındadır (Şekil 4.13).

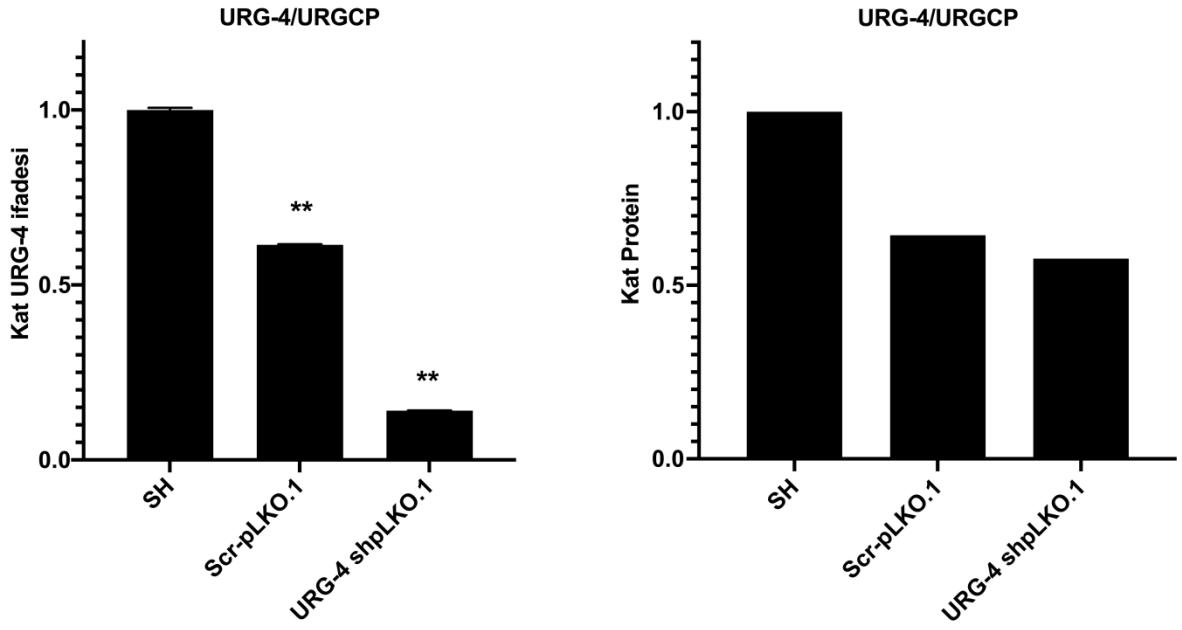


Şekil 4.13: Real-Time PCR analizleri

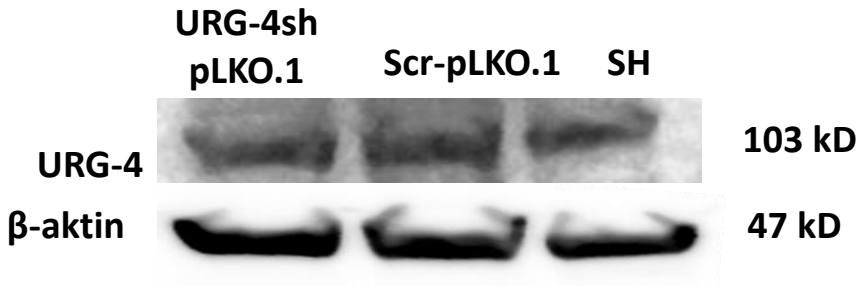
4.3 pLKO1 shRNA vektörü kullanılarak URG-4/URGCP geni ifadesinin HT-29 hücre hattında susturulmasının doğrulanması

HT-29 hücreleri içerisine Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı şekilde Dr. Esra TOKAY tarafından klonlanması yapılmış olan URG-4 shpLKO.1 vektörü transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra URG-4/URGCP'nin protein ve mRNA seviyesindeki ifadesini görmek için hücre peleti Bölüm 3.2.9.1'de anlatıldığı şekilde toplandı. Bölüm 3.2.9.3'de söylendiği gibi mRNA çalışması için peletten cDNA ve RNA'ların izolasyonu

gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak Real-Time PCR çalışması gerçekleştirildi. Protein ifadesi için hücre peletinden Bölüm 3.2.9'da belirtildiği şekilde protein lizatı oluşturuldu ve western blotting işlemi uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre URG-4/URGCP geni ifadesinin mRNA seviyesinde 0.14 kat azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Protein seviyesinde ise yapılan analizlere göre susturma Scr-pLKO.1 transfekte edilmiş olan hücre lizatındaki ifade kadar azalmış görülmektedir (Şekil 4.14). Sadece hücre ile kıyaslandığında azalmanın protein seviyesinde 0.5 kat olduğu analiz edilmiştir (Şekil 4.15)



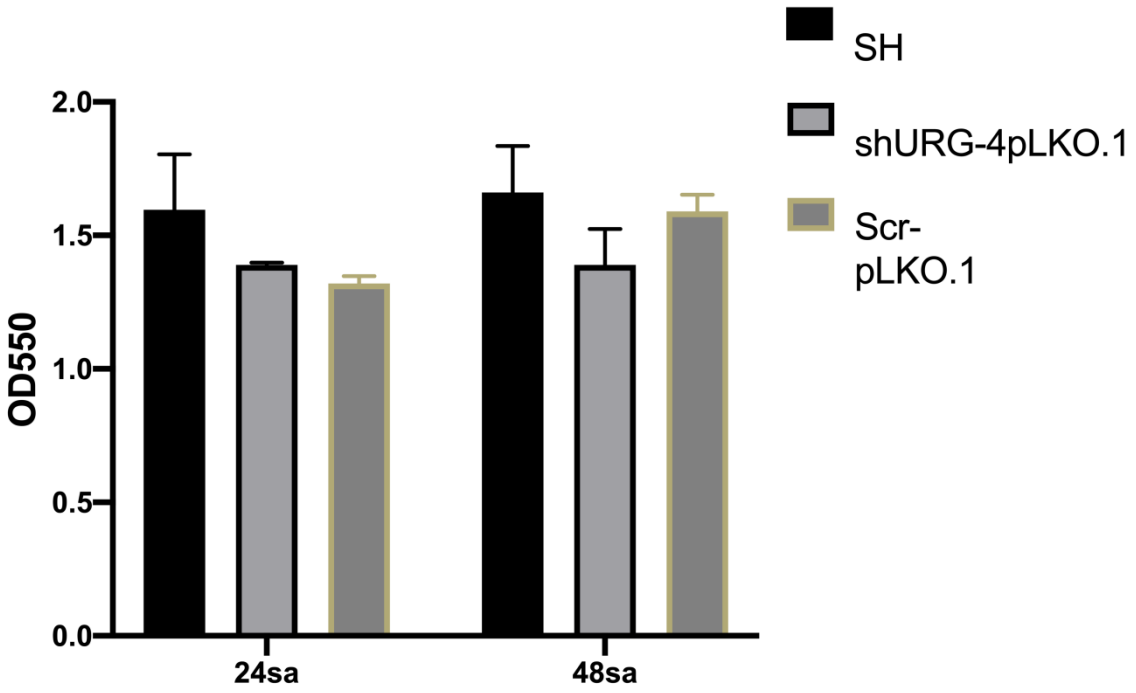
Şekil 4.14: HT-29 hücrelerinde Sadece Hücre, Scr-pLKO.1 ve URG-4-shpLKO.1 transfeksiyon aşamasından sonra yapılmış olan Real-Time analizi ve protein seviyesi



Şekil 4.15: HT-29 hücrelerinde Sadece Hücre, Scr-pLKO.1 ve URG-4-shpLKO.1 transfeksiyon aşamasından sonra elde edilen protein lizatları kullanılarak yapılan URG-4/URGCP ve beta aktin antikorları uygulamasına ait western blotting analizi

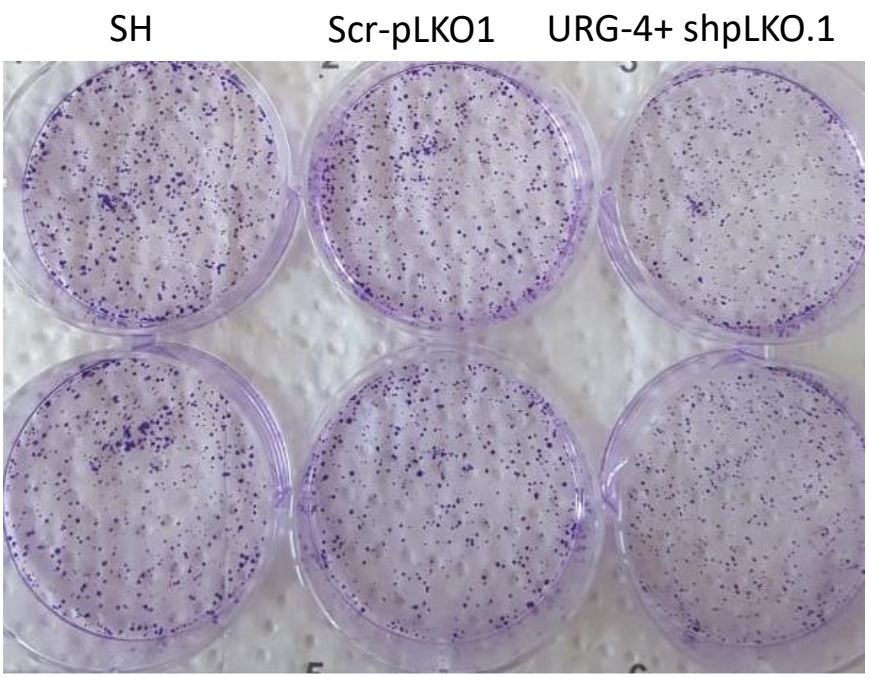
4.4 Proliferatif ve Metastatik özellikleri üzerine etkisinin belirlenmesi

Hücreler, Bölüm 3.2.7.2'de anlatıldığı gibi kültürde büyütültükten sonra, 96 well kuyularına paylaştırıldı. 0, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat sonra Bölüm 3.2.8.2'de anlatıldığı şekilde MTT testi uygulanmıştır. Spektrofotometrede 550 nm'deki ölçümler excelde değerlendirildi. Şekil 4.16'da sonuçlar gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, URG-4/URGCP geninin susturulmasının hücrenin proliferatif karakteri üzerine azaltıcı yada arttırıcı bir etkisi gözlemlenmemiştir.

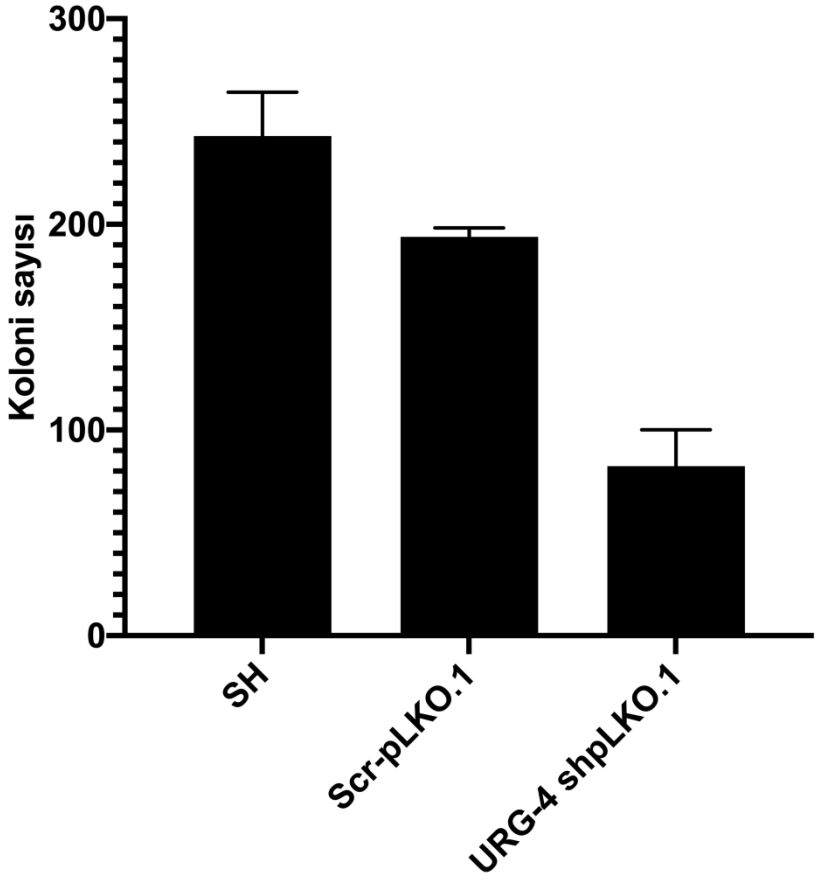


Şekil 4.16: OD 550nm'de alınan MTT ölçüm sonuçlarına ait grafik

URG-4/URGCP geni transfekte edilen HT-29 hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri Bölüm 3.2.8.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen koloni formasyon deneyi ile belirlendi. Buna göre HT-29 hücreleri yaklaşık 2 hafta sonra %10 metilen mavisi ile boyandı ve 20 X'lik büyütmede mikroskop kullanılarak fotoğraflandırıldı. Proliferasyona neden olan URG-4/URGCP geninin susturulmasının sağlandığı kuyucuklarda koloni oluşumu azalmışken, kontrol grubu olarak kullanılan hiçbir uygulamanın yapılmadığı HT-29 hücreleri ve kontrol Scr-pLKO.1 vektörünün transfekte edildiği hücre grubunda koloni sayısının daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4.17). Elde edilen koloni sayısı Cell counter programı ile sayılarak analiz edilmiş ve Graphpad Prism 8 programı kullanılarak grafiklendirilmiştir (Şekil 4.18).

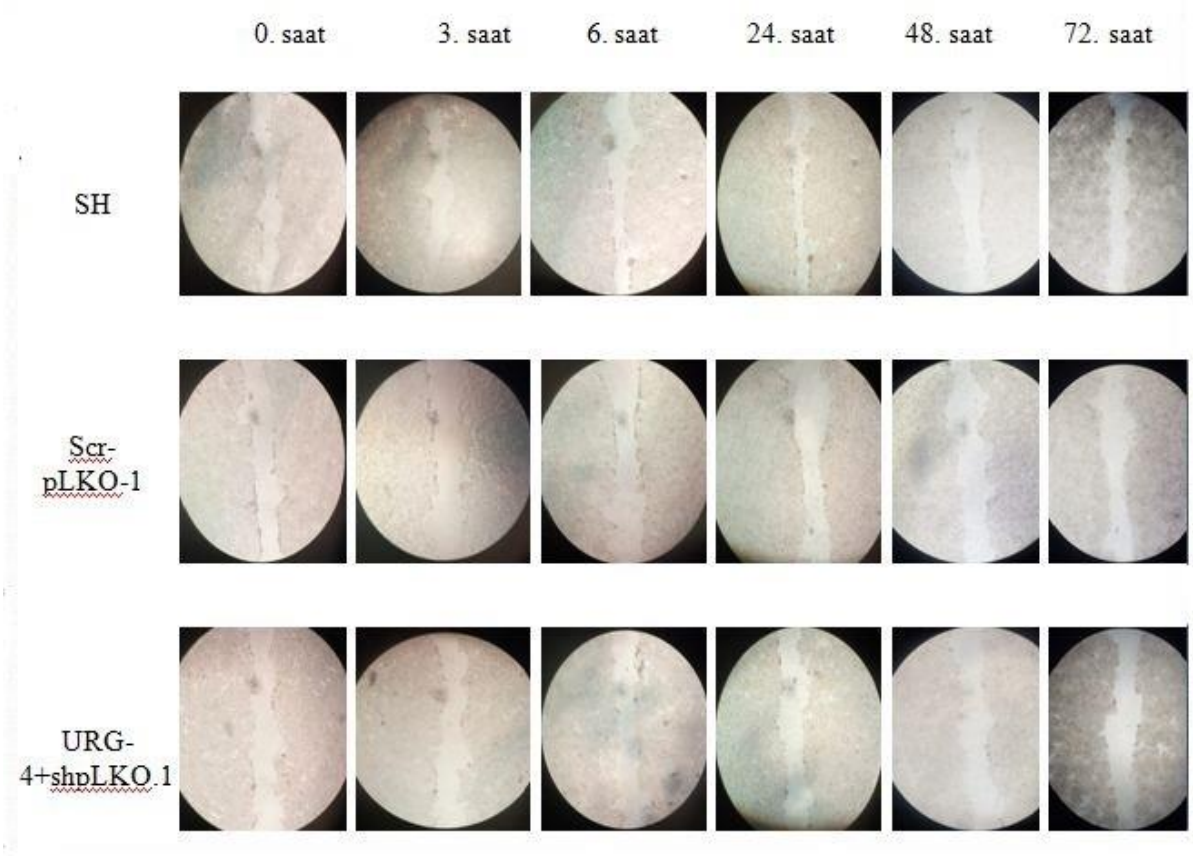


Şekil 4.17: Koloni formasyon sonucu



Şekil 4.18: Koloni formasyon deneyine ait grafik

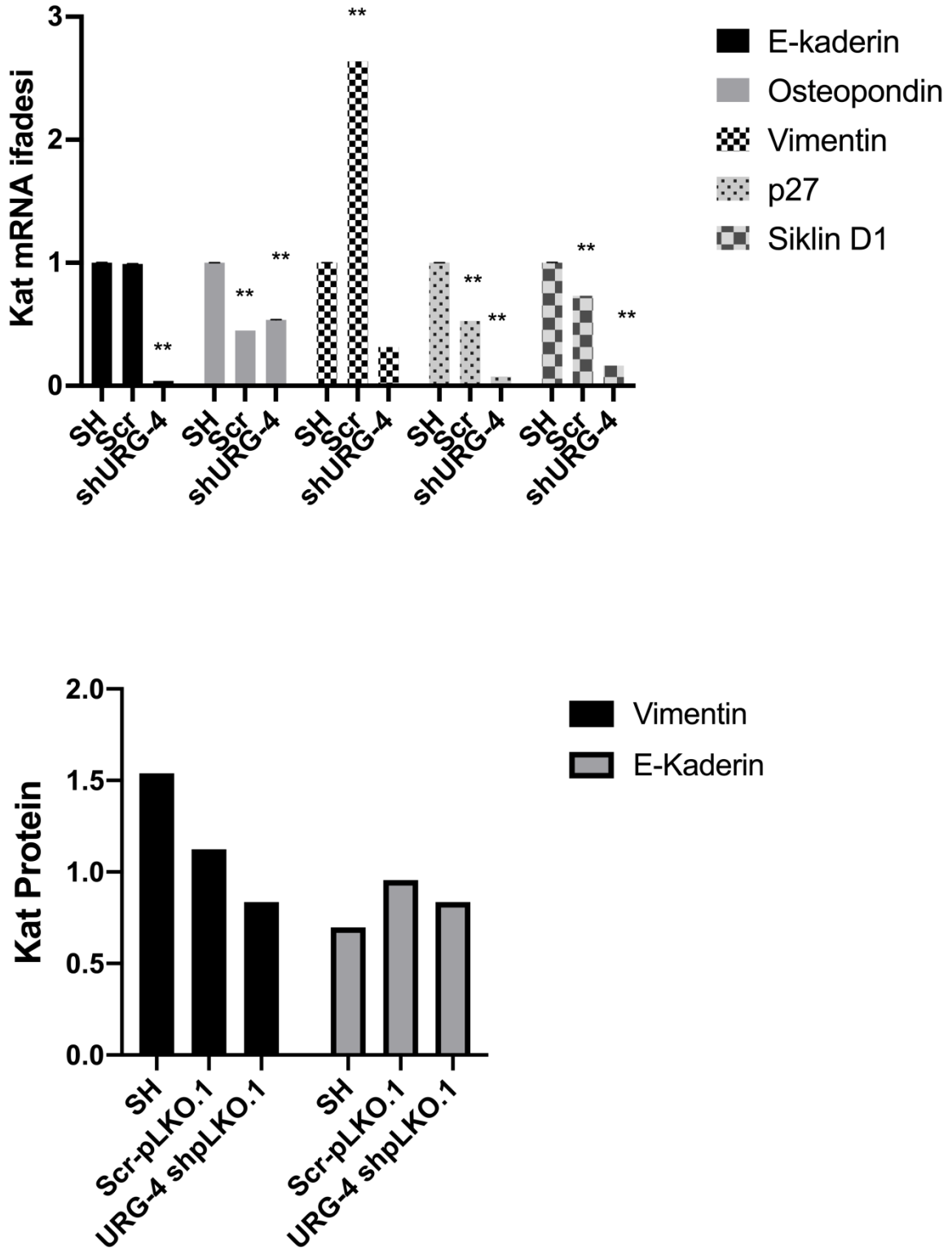
Yaralanma deneyleri Bölüm 3.2.8.3'de gösterildiği gibi yapıldı. URG-4 geni susturulmuş olan HT-29 hücrelerinin normal hücrelere kıyasla kapanma hızında anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.19'da gösterildiği gibidir.



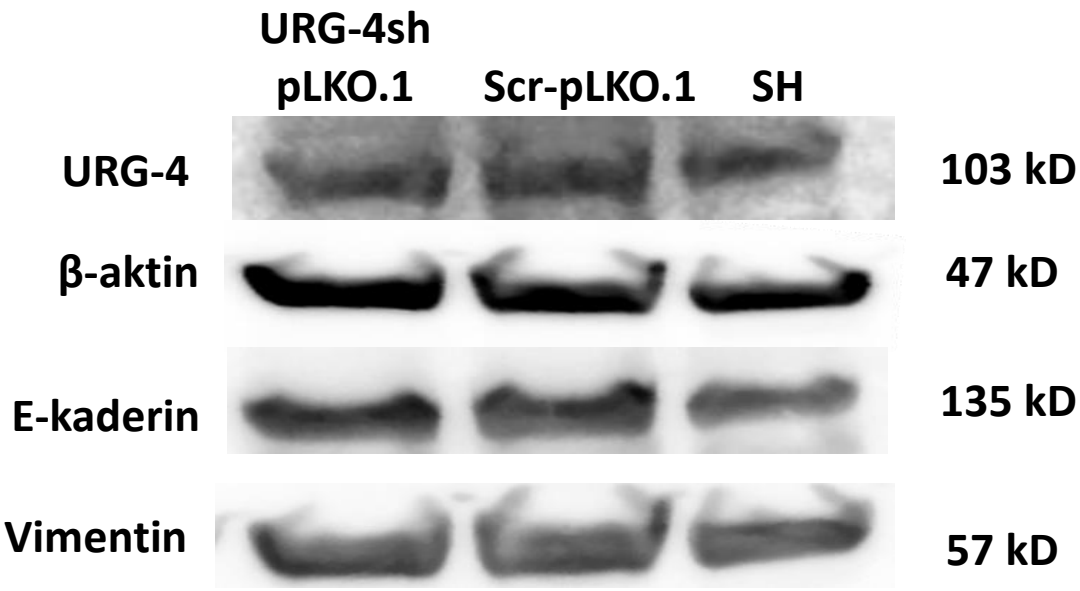
Şekil 4.19: Yaralanma deneyi sonucu

4.5 URG-4/URGCCP ifadesinin susturulmasının metastatik marker gen ifadeleri üzerine mRNA ve protein seviyesinde etkisi

URG-4/URGCP susturulmuş hücre cDNA'sı ve kontrol grubu (Sadece Hücre ve Scr-pLKO.1 vektörü transfekte edilmiş hücreler) cDNA'ları kalıp olarak kullanılarak matestatik ve proliferatif markır gen primerleri ile Real-Time PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda E-kaderin, vimentin, osteopondin ifadesinin sadece hücreye kıyasla azaldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda p27 ve Siklin D1 proliferatif marker gen ifadelerinde de azalış gözlemlenmiştir. Protein seviyesinde ise vimentin seviyesinde azalış mRNA ifadesi ile körele iken, E-kaderin ifadesinde sadece hücre grubuna kıyasla artış gösterilmiştir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21).



Şekil 4.20: Metastatik ve proliferatif marker gen primerleri kullanılarak Yapılan Real-Time PCR grafiği ve vimentin, E-kaderin proteinlerinin western blotting yöntemi ile ifadesinin gösterilmesi



Şekil 4.21: Protein ifadesi çalışmaları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son 40 yılda kansere bağlı ölüm oranları neredeyse % 40 artmıştır. 13 milyon kişinin 2030'da kanserden öleceği tahmin ediliyor. Yapılan araştırmalar sonucunda rektum kanserli hastaların %75'i, kolon kanserli hastaların % 80'i tanı anında ≥ 60 yaşındadır [29].

Kolorektal kanserin başlatılmasında Wnt sinyal yolu etkilidir. Sonra RAS–RAF–MAPK, TGF-β ve PI3K–AKT yollarınının regülasyonunu önler [30-31]. URG-4 geni kanser türlerinin tedavisinde bir onkogen olarak bilinmektedir. URG4/URGCP geninin hem kolon kanserli hastalarda hem de aynı hastalardan elde edilmiş normal dokularda metastatik özelliklikte etkisinin belirlenmesi açısından merak konusu olmuştur.

Bu amaçla tez kapsamının birinci aşamasında hasta çalışmaları yapılmış ve tümörlü normal kolon dokularından elde edilen RNA ve cDNA'lar Real-Time PCR aşamasında kullanılmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre dokularda Twist'in gen ekspresyonu normal dokulara kıyasla tümörlü dokularda artış göstermiştir. E-kaderin gen ifadesi ise bazı tümörlü dokularda normal dokulara kıyasla ifadesi azalırken bazılarında anlamlı olarak artış göstermiştir. Hastalardan alınan tümör ve normal dokuların gen profilleri değiştiğinden dolayı bu farklılıklar gözlemlenebilir. URG-4/URGCP, Twist ve vimentin gen ifadesi normal dokulara kıyaslandığında genel olarak artış göstermişlerdir. Osteopondin ifadesi ise normal dokulara göre ifadesi tümörlü dokuda azalan genler arasındadır.

Literatürde 226 mesane kanseri dokusunda yapılan çalışmada Twist'in ekspresyonunun artmasile beraber E-kaderinin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür [32].

Yapılan bir diğer çalışmada E-kadherinin ekspresyonunun azalması mesane kanseri hastaları için potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilmiştir [33].

Yapılan bir diğer çalışmada Vimentinin artan ekspresyonu birçok insan kanserinde tümör progresyonu ve metastaz ile ilişkilendirilmişti [34-35].

Literatürde yapılan bir diğer çalışmada 17 erkek, 22 kadın kolorektal kanserli hastalar evre I-II- III olarak derecelendirildi. Yapılan bu çalışma sonucunda Vimentinin ekspresyonunun arttığı, E-cadherinin ekspresyonunun azaldığını görmüşler [36].

Literatürde 1598 gastrit kanserli hastanın dahil edildiği on çalışmada Vimentin pozitif ekspresyonunun kanserin belirlenmesinde biobelirteç olabilinecği sonucunu bulmuşlar. Bu sebeple vimentinin ekspresyonunun tümörün daha ileri evrelerinde artabileceğinin söylemişler [37].

Literatürde 202 primer KRK doku, 41 adenom ve 37 normal kolonik mukozayı içeren bu çalışmada KRK numunelerinin 35'inde (% 17.3) Vimentin ekspresyonu tespit edildi. Tüm normal mukoza ve adenom örnekleri vimentin negatifti [38].

İkinci aşamada ise hücre çalışmalarına geçilmiştir. Hücre çalışmalarında HT-29 hücresi tercih edilmiştir. HT-29 hücresinde sh vektör stratejisi kullanarak URG-4 geni susturulmuştur. Susturma çalışmaları m-RNA ve protein düzeyinde doğrulanmıştır. Susturma çalışmalarından sonra metastatik fonksiyonel çalışmalar MTT, koloni formasyon, yaralanma deneyleri yapılarak devam edilmiştir. Yaptığımız MTT sonucunda HT-29 hücrelerinin proliferativ özelliği açısından susturulan hücrelerde bir farklılık gözlenmemiştir. Bu çalışmadan beklentimiz proliferativ kabiliyyetin azalmasıdır. Bu kabiliyet azalmamıştır.

Koloni formasyon deneyleri sonucunda URG-4'ün susturulmuş olduğu hücrelerin daha az koloni oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç şaşırtıcı değildir. Onkogenik özellikte olan bir genin kolon kanseri hücrelerinde susturulmuş olması bu kabiliyeti azaltmış olabilir diye düşünülebilir.

Yaralanma deneyleri sonucunda sadece hücre grubu ile karşılaştırıldığında URG-4'ü susturduğumuz hücrelerde metastatik kabiliyyeti yavaşlattığı görülmüştür. Metastatik primerlerle yapmış olduğumuz Real-Time sonucunda sonucunda E-kaderin, vimentin, osteopondin ifadesinin sadece hücreye kıyasla azaldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda p27 ve SiklinD1 proliferatif marker gen ifadelerinde de azalış gözlemlenmiştir. Bu ifade protein seviyesinde vimentin için doğrulanmıştır.

Mide kanseri, hepatoselüler kanser, akciğer kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom ve meme kanseri ile ilgili yapılan bu çalışmalarda kanserli hücrelerde E-kaderinin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür [39-43].

Yapmış olduğumuz bu çalışma literatüre yeni bilgi sağlaması açısından ve kolon kanseri tedavisinde temel moleküler mekanizma çalışması ihtiva etmesi açısından oldukça önemlidir.

6. KAYNAKLAR

[1] K. Çefle (2011) "Kanser Genetiği" [Online] Erişim adresi:http://www.klinikgelisim.org.tr

[2] A. Pazarbaşı ve M. Kasap, (2003) "Kanser Genetiği", vol.12, no.4, 2012. [Online] Erişim adresi: https://dergipark.org.tr/tr/pub/aktd/issue/2230/29472

[3] P. H. Pandya, M. E. Murray, K. E. Pollok and J. L. Renbarger "The Immune System in Cancer Pathogenesis", İmmunology Research, 2016, doi.org 10.1155/2016/4273943.

[4] L. Migliore, F. Migheli, R. Spinsi and F. Coppede. "Genetics, Cytogenetics, and Epigenetics of Colorectal Cancer", Department of Surgery, University of Pisa, 2011, doi.org/10.1155/2011/792362.

[5] T. Armaghany, J. D. Wilson, Q. Chu and G. M. Mills, "Genetic Alterations in Colorectal Cancer" Gastrointestinal cancer research: GCR, vol. 5, no. 1, pp.19–27, 2012. [Online] Erişim adresi:https://www.ncbi.nlm.nih.gov

[6] L. Zhang and J.W. Shay."Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer", JNCI: Journal of the National Cancer Institute, vol. 109, no.8, pp. 332, 2017, doi.org 10.1093 / jnci / djw332.

[7] Y. Liu,Y. Xi,G. Chen, X. Wu and M.He, "URG4 mediates cell proliferation and cell cycle in osteosarcoma via GSK3β/β-catenin/cyclin D1 signaling pathway", Journal of Orthopaedic Surgery and Research, pp.15:226, 2020, doi.org10.1186 / s13018-020-01681-y.

[8] E. Tokay "İnsan URG4 geninin transkripsiyonel regülasyonu", Doktoratezi, Balıkesir Üniv., Balıkesir, 2014

[9] Y.Dodurga, M. Seçme and N.L.Tufan-Şatıroğlu, "A novel oncogene URG4/URGCP and its role in cancer", Elsevıer Science Direct, pp. 668:12-17, 2018, doi:10.1016/j.gene.2018.05.047.

[10] E.Tokay and F.Köçkar "SP1 is a transcriptional regulator of URG-4/URGCP gene in hepatocytes", Mol Cell Biochem, vol. 423, no.1-2, pp. 75-83, 2016, doi: 10.1007/s11010-016-2826-7.

[11] M.Wu, etal.,"URGCP/URG4 promotes apoptotic resistance in bladder cancer cells by activating NF-κB signaling", Oncotarget, vol.6, no.31, pp.30887-901, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5134.

[12] N.L. Tufan-Şatıroğlu, etal., "Hepatitis Bx Antigen Stimulates Expression of a Novel Cellular Gene, URG4, that Promotes Hepatocellular Growth and Survival" Elsevıer-Science Direct, vol.4, no.4, pp. 355–368, 2002, doi:10.1038/ sj.neo.7900241.

[13] S. Xing, etal., "URG4/URGCP enhances the angiogenic capacity of human hepatocellular carcinoma cells in vitro via activation of the NF-κB signaling pathway", BMC cancer, pp. 15: 368, 2015, doi:10.1186 / s12885-015-1378-7.

[14] F. Aslan and A.Solmaz Avcıkurt "URG4 expression in invasive breast carcinoma and its relation to clinicopathological characteristics", Breast cancer, vol.4, pp.485-491, 2019, doi: 10.1007 / s12282-019-00947-6.

[15] J. Cai,etal., "URGCP promotes non-small cell lung cancer invasiveness by activating the NF-κB-MMP-9 pathway", Oncotarget, vol. 6, no. 34, pp. 36489–36504, 2015, doi:10.18632 / oncotarget.5351.

[16] Y. Dodurga, G. Gündoğdu, T. Koç, N. G. Yonguc, V. Kucukatayand N.L.Tufan-Şatıroğlu "Expression of URG4/URGCP, Cyclin D1, Bcl-2, and Bax genes in retinoic acid treated SH-SY5Y human neuroblastoma cells", Contemporary oncology, vol.17, no. 4, pp. 346-9, 2013, doi: 10.5114 / wo.2013.34634.

[17] C. Sui, D.Liu, Y. Hu and L. Zhang "MicroRNA-708-5p affects proliferation and invasion of osteosarcoma cells by targeting URGCP", Experimental and therapeutic medicine, vol.17 no.3, pp.2235–2241, 2019, doi:10.3892 / etm.2019.7171

[18] Y. Dodurga, C. Eroğlu, M. Seçme, L. Elmas, Ç.B. Avcı and N. L. Şatıroğlu-Tufan "Anti-proliferative and anti-invasive effects of ferulic acid in TT medullary thyroid cancer cells interacting with URG4/URGCP", Tumour biology, vol.37, no.2, pp.1933-40, 2016, doi:10.1007/ s13277-015-3984-z.

[19] Y. Dodurga, G. Gündoğdu, T. Koç, G.N. Yonguc,V.Kucukatay and N. L. Şatıroğlu-Tufan, "Expression of URG4/URGCP, Cyclin D1, Bcl-2, and Bax genes in retinoic acid treated SH-SY5Y human neuroblastoma cells", Contemporary oncology, vol.17, no.4, pp.346-9,2013, doi: 10.5114 / wo.2013.34634.

[20] E. Tokay and F. Köçkar" Identification of intracellular pathways through which TGF-β1 upregulates URG-4/URGCP gene expression in hepatoma cells", Life sciences, pp.144:1218,2016, doi:10.1016/j.lfs.2015.12.010.

[21] Y. Dodurga, V. Cıtışlı and C. Eroğlu"Temozolomide may induce cell cycle arrest by interacting with URG4/URGCP in SHSY5Y neuroblastoma cells",Tumor Biology, vol.36, no.9, 2015, doi:10.1007/s13277-015-3373-7.

[22] E. Tokay, R. I. Sağkan and F. Köçkar "TNF-α Induces URG-4/URGCP Gene Expression in Hepatoma Cells through Starvation Dependent Manner". Biochemical genetics, vol.59, no.1, pp.300-314,2020, doi: 10.1007 / s10528-020-09972-z.

[23] Y.Dodurga, G. N. Yonguc, C.B. Avcı, G. Bağcı, C. Gündüz and N.L. Satiroglu-Tufan,"Investigation of microRNA expression changes in HepG2 cell line in presence of URG4/URGCP and in absence of URG4/URGCP suppressed by RNA interference", Molecular biology reports, vol. 39, no. 12, pp. 11119-24, 2012, doi: 10.1007 / s11033-012-2019-8.

[24] D. Yu, X. Xu, S. Li and K. Zhang "LINC00514 drives osteosarcoma progression through sponging microRNA-708 and consequently increases URGCP expression". Aging, vol. 12, no.8, pp. 6793–6807, 2020, doi:10.18632 / aging.103043

[25] L. Hong, etal., "Downregulation of miR-16 via URGCP pathway contributes to glioma growth", Scientific Reports7, vol.7, no.1, pp.13470,2017, doi.org/10.1038/s41598-017-14035-2.

[26] J. Song, etal., "Enhanced Cell Survival of Gastric Cancer Cells By a Novel Gene URG4 "Elsevier Science Direct- Neoplasia, vol. 8, no 12, pp. 995–1002, 2006, doi: 10.1593 / neo.06592.

[27] Y. Dodurga, C, B. Avcı, S. Y. Süslüer, N.L,Satıroğlu Tufan and C. Gündüz,"The expression of URGCP gene in prostate cancer cell lines: correlation with rapamycin", Molecular biology reports, vol. 39, no. 12, pp. 10173-7, 2012, doi: 10.1007 / s11033-012-1891-6.

[28] L. Zhang,etal.,"URG4 overexpression is correlated with cervical cancer progression and poor prognosis in patients with early-stage cervical cancer", BMC kanseri., vol.14, no.70, pp.885, 2014, doi: 10.1186 / 1471-2407-14-885.

[29] E. J. Kuipers, etal, “Colorectal cancer”, Nature reviews. Disease primers,vol. 1 15065. 5, 2015, doi:10.1038/nrdp.2015.65

[30] D.W. Parsons etal. "Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway",Nature, pp. 436:792, 2005, doi: 10.1038/436792a.

[31] A. Bardelli, "Mutational Analysis of the Tyrosine Kinome in Colorectal Cancers", Science , pp. 300:949, 2003, doi: 10.1126/science.1082596

[32] Z. Zhang, etal, "Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer", Elsevier, vol.38, no.4, pp.598-606, 2007,
doi: 10.1016/j.humpath.2006.10.004.

[33] Y. Xie, etal, "Reduced E-cadherin expression is correlated with poor prognosis in patients with bladder cancer: a systematic review and meta-analysis", Oncotarget,vol. 8, no.37, pp. 62489–62499, 2017, doi.org/10.18632/oncotarget.19934

[34] A. Satelli, S. Li, " Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy",Cell Mol Life Sci.vol.68, no.18, pp.3033-46.doi: 10.1007/s00018-011-0735-1

[35] N. Makrilia, A. Kollias, L. Manolopoulos and K. Syrigos, "Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer", Cancer Invest, vol.27, pp.1023-1037, 2009, doi.org/10.3109/07357900902769749

[36] Z. Niknami, A. Muhammadnejad, A. Ebrahimi, Z. Harsani and R. Shirkoohi. " Significance of E-cadherin and Vimentin as epithelial-mesenchymal transition markers in colorectal carcinoma prognosis",EXCLI journal, vol.19, pp.917–926, 2020, doi.org/10.17179/excli2020-1946

[37] S. Yin, F. Chen, Gui-fangYang, "Vimentin immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer:A meta-analysis", vol.214, pp.1376-1380, 2018, doi.org/10.1016/j.prp.2018.07.014

[38] J. Al-Maghrabi, "Vimentin immunoexpression is associated with higher tumor grade, metastasis, and shorter survival in colorectal cancer",International journal of clinical and experimental pathology,vol.13, no.3,pp.493–500, 2020

[39] Z. Li, S.Yin, L. Zhang, W. Liu and B. Chen, "Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis", Oncotarget,vol. 8, no.10, 16445–16455, 2017, doi.org/10.18632/oncotarget.14860

[40] X. Ren, X. Lin and X.E Wang, E-cadherin expression and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma: evidence from 19 published investigations, Onco Targets Ther, vol. 9, pp. 2447-53, 2016, doi: 10.2147/OTT.S98577

[41] X. Xing, etal, "The prognostic value of E-cadherin in gastric cancer: a meta-analysis", Int J Cancer,vol.132, no.11, pp.2589-96, doi: 10.1002/ijc.27947

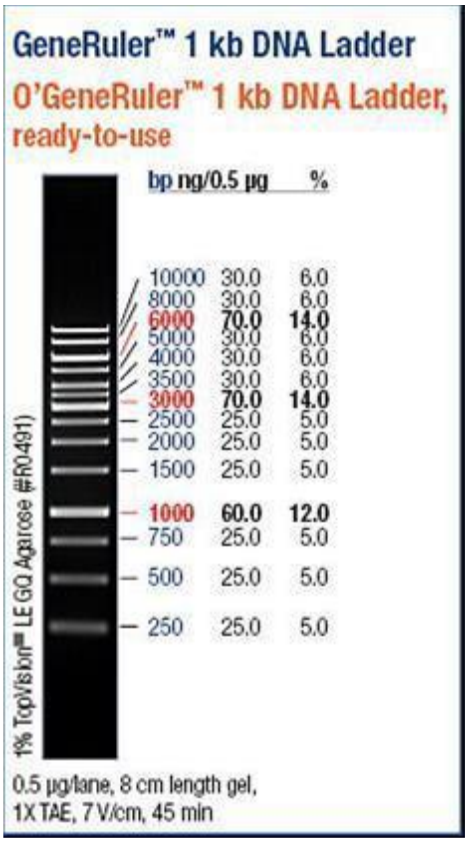
[42] J. Chen, J. Zhao, R. Ma , H. Lin , X. Liang and X. Cai, " Prognostic significance of E-cadherin expression in hepatocellular carcinom: a meta-analysis", vol.9, no.8, pp.e103952,2014, doi: 10.1371/journal.pone.0103952

[43] YL. Yang, MW. Chen and L. Xian, "Prognostic and clinicopathological significance of downregulated E-cadherin expression in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): a meta-analysis", 2014, doi.org/10.1371/journal.pone.0099763.

EKLER

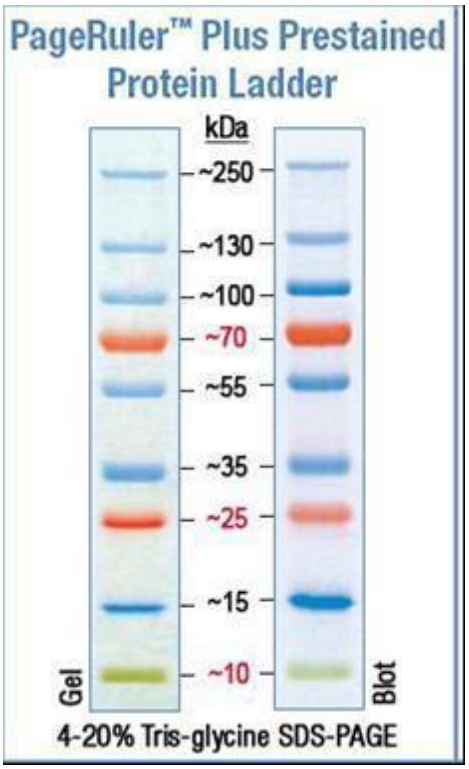
Ekler

EK A: DNA belirteci



Şekil A 1: DNA belirteci.

EK B: Protein belirteci



Şekil A 2: Protein belirteci.

ÖZGEÇMİŞ

Gerekli kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : TUNZALA ABDUSALAMOVA
Doğum tarihi ve yer : 05.08.1988 - BAKÜ
e-posta : tunzaleyilmaz@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	**Yıl**	**Okul/Program**
Lise	1995-2006	V. Ağakişiyev adına Lise
Lisans	2006-2010	Bakü Devlet Üniversitesi/Biyoloji
Y. Lisans	2018-2021	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik

Eğitim Bilgileri

Lisans: Biyoloji (2006-2010)

Yüksek Lisans: Moleküler Biyoloji ve Genetik (2018-2021)

Tez Konusu: Kolon karsinoma doku ve hücrelerinde URG-4/URGCP geninin proliferatif ve metastatik genlerle ilişkisi

Öğrenilmiş Bazı Metotlar: Hücre Kültürü, Real Time PZR, Geçici Transfeksiyon, Western Blot, Gen Klonlaması, MTT.

Bilgisayar Programları: Minitab14, Endnote, ImageJ, Microsoft Office