



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KANSERİ HÜCRE
DİZİLERİNDE FİBULİN-3'ÜN EPİTELYAL MEZENKİMAL
GEÇİŞ VE KANSER KÖK HÜCRE FENOTİPİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ege Rıza KARAGÜR

Kasım 2020
DENİZLİ

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

**KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE
FİBULİN-3'ÜN EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ VE KANSER
KÖK HÜCRE FENOTİPİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

Ege Rıza KARAGÜR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan AKÇA

Denizli, 2020

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar" gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Tam metin/metinleri ekte sunulmuştur):

Çil N, Yaka M, Ünal MS, Dodurga Y, Tan S, Seçme M, **Karagür ER**, Abban Mete G, "Adipose derived mesenchymal stem cell treatment in experimental asherman syndrome induced rats" *Molecular Biology Reports*. 47:4541–4552. doi.org/10.1007/s11033-020-05505 (2020).

Tokgun O, Elma Karakas D, Tan S, **Karagür ER**, İnal B, Akca H, Durap F, Baysal A, Aydemir M, "Novel ruthenium and palladium complexes as potential anticancer molecules on SCLC and NSCLC cell lines" *Chemical Papers* 74:2883–2892 doi.org/10.1007/s11696-020-01129-x (2020).

Demiray A, Yaren A, Karagenç N, Bir F, Demiray AG, **Karagür ER**, Tokgün O, Elmas L, Akça H, "The Frequency Of Egfr And Kras Mutations In The Turkish Population With Non-Small Cell Lung Cancer And Their Response To Erlotinib Therapy" *BJMG*. 21 (2), 2018 | 21-26. DOI: 10.2478/bjmg-2018-0022 (2018)

Karagür ER, Ozay C, Mammadov R, Akca H, "Anti-invasive effect of Cyclamen pseudibericum extract on A549 non-small cell lung carcinoma cells via inhibition of ZEB1 mediated by miR-200c" *Journal of Natural Medicines* 72:686–693 doi.org/10.1007/s11418-018-1204-z (2018)

Cennet O, Mammadov R, Tasdelen G, **Karagür ER**, Akça H "Potential Antioxidant Antiproliferative and Hepatoprotective Effects of Crataegus Meyeri." *Journal of Food Biochemistry*, 39(5), 548-553., Doi: 10.1111/jfbc.12161 (2015).

Tokgün O, Demiray A., Kaya B, **Karagür ER**, Demir E, Akarsu E, Akça H "Silica nanoparticles can induce apoptosis via dead receptor and caspase 8 pathway on A549 cells." *Advances in Food Science*, 37, 65-70 (2015).

Yildiz M, Bozcu H, Tokgun O, **Karagür ER**, Akyurt O, Akca H. "Cyclamen exerts cytotoxicity in solid tumor cell lines: a step toward new anticancer agents?" *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 14, 10, 5911-5914 (2013).

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Ege Rıza KARAGÜR

İmza :



ÖZET**KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE FİBULİN-3'ÜN
EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ VE KANSER KÖK HÜCRE FENOTİPİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ege Rıza KARAGÜR

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Hakan AKÇA

Kasım 2020, Sayfa 159

Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) yüksek ölüm oranı, erken metastaz ve proliferasyon hızıyla agresif fenotiple karakterizedir. İnvazyonda ve metastazda başlatıcı bir rolü olan epitelden mezenkimal geçiş (EMT) halihazırda aydınlatılmamış belirsizliklere sahiptir. Fibulin-3 ekstraselüler matriksin yapısında ve stabilizasyonuna dahil olmaları nedeniyle, fibulinler doku organogenezi, vaskülojenez, fibrojenez ve tümör oluşumunda rol oynar. Biz bu çalışmada KHAK'lerinde Fibulin-3'in, EMT ve EMT ile yakından ilişkili kök hücre fenotipi için düzenleyici bir rolünün olup olmadığını moleküler mekanizmalarıyla tespit etmeyi amaçladık. Fibulin-3 ekspresyon vektörü kullanılarak Fibulin-3 ifadesi düşük N417 hücre dizilerinde ve Fibulin-3 ekspresyon seviyesi yüksek H82 hücre dizilerinde shRNA C infeksiyonuyla Fibulin-3 baskılanarak Fibulin-3'ün hücre proliferasyonu, EMT, kök hücre fenotipi üzerine etkisi qPCR, Western Blot, mikroarray analizleri ve biyoenformatik çalışmalarla araştırıldı.

Çalışmada Fibulin-3'ün hücre proliferasyonunu baskıladığını ve KHAK hücrelerinde EMT sürecinde mezenkimal belirteçleri ve EMT transkripsiyon faktörlerini baskılayarak KHAK hücre dizilerinde kök hücre fenotipinde rol oynayan belirteçleri baskıladığını gösterdik. Ayrıca kök hücre fenotipinde rol oynayan belirteçlerin downregülasyonu KHAK'inin agresifliğini düşürdüğünü gösterdik.

Anahtar Kelimeler: KHAK, Fibulin-3, EMT, kök hücre fenotipi

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon (Proje No: 2017SABE015) kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT**THE EFFECTS OF FIBULIN-3 ON EPITHELIAL MESENCHIMAL TRANSITION AND
CANCER STEM CELL PHENOTYPE IN SMALL CELL LUNG CANCER CELLS**

KARAGÜR Ege Rıza

PhD.Thesis in Medical Biology

Supervisor: Prof.Dr. Hakan AKCA (PhD.)

November 2020, 159 Pages

Small cell lung cancer (SCLC) is characterized by an aggressive phenotype with a high mortality rate, early metastasis, and proliferation rate. The mesenchymal transition through the epithelium (EMT), which is an initiating factor in invasion and metastasis, has currently unclear. Fibulins are involved in tissue organogenesis, vasculogenesis, fibrogenesis and formation, including the structure and stabilization of the fibulin-3 extracellular matrix. We aimed to determine with its molecular mechanisms that Fibulin-3 does not have a regulatory role for the cell stem phenotype closely related to EMT and EMT in these SCLCs. The effect of Fibulin-3 expression vector on Fibulin-3 proliferation, EMT, cell phenotype by suppressing Fibulin-3 by shRNA C infection in N417 cell lines with low expression of Fibulin-3 and H82 cell lines with high Fibulin-3 expression level qPCR, Western Blot, microarray analysis and bioinformatics studies.

In the study, we showed that Fibulin-3 does not suppress cell proliferation and does not suppress post-EMT mesenchymal markers and EMT transcription in SCLC cells, and not markers that play a role in stem cell phenotype in SCLC sequences. We have also shown that downregulation of markers that play a role in the stem cell phenotype reduces the aggressivity of SCLC.

Keywords: SCLC, Fibulin-3, EMT, stemness

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects
Coordination Unit through project numbers 2017SABE015**

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince tecrübelerinden yararlandığım başta tez danışman hocam Prof. Dr. HAKAN AKÇA' ya,

Tez çalışmam sırasında değerli zamanlarını ayırarak bilimsel katkı ve desteklerinden dolayı Prof Dr. Arzu YAREN ve Prof. Dr. A. Gaye TOMATIR'a

Beni maddi ve manevi olarak her koşulda destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİ VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1 Akciğer Kanseri.....	3
2.1.1 Epidemiyolojisi	3
2.1.2 Etiyoloji.....	5
2.1.2.1. Sigara tüketimi, diyet ve obezite.....	5
2.1.2.2 Kalıtsal faktörler.....	6
2.1.2.3 Enfeksiyonlar	7
2.1.2.3 Mesleki kanserojenler.....	7
2.2 Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması.....	8
2.2.1 Akciğer kanserinin evrelendirilmesi.....	10
2.3 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	12
2.3.1 Küçük hücreli akciğer kanserinin genomik yapısı	13
2.4 Epitelyal-Mezenkimal Transisyon	18
2.4.1 EMT-MET transisyonunda kök hücrelilik ve plastisite	19
2.5 Ekstraselüler Matriks ve Fibulinler	21
2.5.1 Fibulin protein yapısı	22
2.6 Hipotez.....	23
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1 Gereçler	24
3.2 Yöntemler	28
3.2.1 Hücre kültürü.....	28
3.2.2 Hücrelerin çözülmesi ve dondurulması	29

3.2.3 RNA izolasyonu.....	29
3.2.4 MiRNA izolasyonu.....	30
3.2.5 Nükleik asit miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi	31
3.2.6 cDNA sentez reaksiyonları.....	31
3.2.6.1 Total RNA'dan cDNA eldesi	31
3.2.6.2 Total miRNA'nın cDNA'ya çevrimi	32
3.2.7 Real Time PCR (qPCR)	33
3.2.7.1 Örneklerin mRNA ekspresyon seviyelerinin analizi	33
3.2.7.2 Örneklerin miRNA ekspresyon seviyelerinin analizi	33
3.2.8 Western Blot.....	34
3.2.8.1 Örneklerden protein izolasyonu.....	34
3.2.8.2 Protein miktar tayini.....	35
3.2.8.3 SDS-PAGE jelin hazırlanması ve Western Blot analizi	35
3.2.8.4 İmmunoblotlama ve görüntüleme	37
3.2.9 siRNA ve plazmit DNA transfeksiyonları	38
3.2.10 Antisense ekspresyon vektörlerinin oluşturulması	39
3.2.10.1 Fibulin-3 insert'ünün eldesi.....	39
3.2.10.2 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro lentiviral vektörü ve insert Fibulin-3'ün EcoRI RE kesimleri.....	42
3.2.10.3 Agaroz jel elektroforezi	43
3.2.10.4 insert DNA Fibulin-3'ün agaroz jelden eldesi	44
3.2.10.5 pCDH-CMV-MCS-EF1 lentiviral vektörünün alkalin fosfataz işlemi ve purifikasyonu	44
3.2.10.6 DNA ligasyonu.....	45
3.2.10.7 Luria-Bertani (LB) Broth besiyeri hazırlanması	47
3.2.10.8 LB Broth agar besiyeri hazırlanması	48
3.2.10.9 Kompetent bakteri hazırlanması.....	48
3.2.10.10 DH5α hücrelerine transformasyon.....	49
3.2.10.11 Tek koloni seçimi	49
3.2.11 Plazmid izolasyonu	50
3.2.12 Plazmid DNA'nın doğrulanması	51
3.2.12.1 Restriksiyon enzimleriyle	51
3.2.12.2 Sanger sekans yöntemiyle	51
3.2.13 Lentiviral shRNA vektörleri için lentivirüs üretimi.....	52
3.2.13.1 Lentiviral infeksiyon ve seçim	54
3.2.14 Hücre popülasyon çoğalma analizi	55
3.2.15 Mikroarray analizi.....	56

3.2.16 Mikroarray sonuçlarının analizinde biyoenformatik araçların kullanımı	56
3.2.17 İstatistiksel analiz	56
4. BULGULAR	58
4.1 Çalışmada Kullanılan KHAK Hücre Dizilerinin Normal Koşullardaki Fibulin-3 Ekspresyon Düzeyleri	58
4.2 Fibulin-3'ün İfadesinin Düzenlenmesi	60
4.2.1 Fibulin-3 ekspresyon vektörünün transfeksiyonu	60
4.2.2 Fibulin-3 ifadesinin baskılanması	61
4.2.2.1 Antisense Fibulin-3 kalıcı vektörün tasarlanması	61
4.2.2.1.1 Fibulin-3 insert'ünün eldesi	62
4.2.2.1.2 pCDH-CMV-MCS-EF1 lentiviral vektörü ve Fibulin-3 insert'ün EcoRI dizilerine göre hazırlanması	64
4.2.2.1.3 Antisense Fibulin-3 kalıcı vektörün etkinliğinin belirlenmesi	66
4.2.2.2 Fibulin-3 ekspresyonunun baskılanması için Lenti-shRNA vektörlerinin ve siRNA'nın etkinliğinin belirlenmesi	67
4.3 Fibulin-3 Ekspresyonundaki Değişimin KHAK Hücre Dizilerinde Hücre Proliferasyonuna Etkisi	69
4.3.1 Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak hücre proliferasyonunda görev alan proteinlerin ekspresyon değişimleri	71
4.4 Fibulin-3 Ekspresyonunun Kansere Kök Hücre Fenotipine ve EMT Regülasyonuna Etkisi	73
4.4 KHAK Hücre Dizilerinde Fibulin-3 İfadesine Bağlı Olarak Düzenlenen RNA Ekspresyonlarının Mikroarray Yöntemi ile Belirlenmesi	76
4.4.1 Mikroarray analizlerinin Real-Time PCR ile teyit edilmesi	86
5. TARTIŞMA	94
6. SONUÇ	106
7. KAYNAKLAR	107
8. ÖZGEÇMİŞ	134
9. EKLER	135

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 2018 yılı dünya genelinde, akciğer kanseri vakalarının insidans dağılımı (WEB_1).....	4
Şekil 2.2 2018 yılı dünya genelinde, akciğer kanseri vakalarının mortalite dağılımı (WEB_2).....	4
Şekil 2.3 2018 yılı dünya genelinde, akciğer kanseri vakalarının prevelans dağılımı (WEB_3).....	4
Şekil 2.4 Küçük hücreli akciğer kanserinde genomik değişiklikler (George, Lim, Jang, Cun, Ozretia, vd. 2015).	15
Şekil 2.5 Adenokarsinomdan küçük hücreli akciğer kanserine dönüşümüne yol açan moleküler olayları gösteren hipotetik model.	17
Şekil 2.6 EMT-Tip 1 embriyo oluşumu EMT-Tip 2 doku rejenerasyonu ve EMT-Tip 3 kanser ilerlemesi.	19
Şekil 2.7 EMT, geçiş durumları ve sahip oldukları fonksiyonel özellikler (Pastushenko ve Blanpain 2019).	21
Şekil 2.8 Ekstraselüler matriks kompozisyonunda fibulinlerin yeri.	22
Şekil 2.9 Fibulin ailesi proteinlerinin domain yapıları (Giltay vd. 1999).	23
Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan hücre dizilerinin mikroskopik görüntüsü.	28
Şekil 3.2 İnsert DNA'nın vektör haritası üzerinde gösterimi.	40
Şekil 3.3 Klonlama primerlerinin tasarımı.	41
Şekil 3.4 pCDH-CMV-MCS-EF1-puro lentiviral vektör haritası ve restriksiyon enzimleri.	42
Şekil 3.5 Antisense Fibulin-3 vektörünün tasarım şeması.	47
Şekil 3.6 Lentivirüs üretiminin şematik gösterimi.	53
Şekil 3.7 Lentivirüs infeksiyonunun şematik gösterimi	54
Şekil 3.8 Lentiviral shRNA vektörünün haritası	55
Şekil 4.1 H82, H209, N417 ve N417-adh KHAK hücre dizilerinin Fibulin-3 ekspresyonlarının Western Blot analizi ile tespit edilmesi.0,70.....	59
Şekil 4.1 H82, H209, N417 ve N417-adh KHAK hücre dizilerinin Fibulin-3 ekspresyonlarının Western Blot analizi ile tespit edilmesi.	59
Şekil 4.4 Fibulin-3'ün aşırı ifade edildiği N417 ve H209 hücre hatlarında zamana bağlı ekspresyon değişiminin qPCR ile tespit edilmesi.Şekil 4.1 H82, H209, N417 ve N417-adh KHAK hücre dizilerinin Fibulin-3 ekspresyonlarının Western Blot analizi ile tespit edilmesi.	59

Şekil 4.2 H82, H209, N417 ve N417-adh KHAK hücre dizilerinin Fibulin-3 ekspresyonlarının qPCR analizi ile tespit edilmesi.....	59
Şekil 4.3 FL-fibulin-3 V5-lentiviral-GFP vektörünün transfeksiyon sonrası 24., 48., 72., ve 96. saatlerdeki H209 ve N417 hücrelerindeki GFP görüntüleri.	60
Şekil 4.4 Fibulin-3'ün aşırı ifade edildiği N417 ve H209 hücre hatlarında zamana bağlı ekspresyon değişiminin qPCR ile tespit edilmesi.	61
Şekil 4.5 FL-fibulin-3 V5-lentiviral-GFP lentiviral vektör haritası, restriksiyon enzimlerinin gösterimi ve vektörün doğrulaması.	62
Şekil 4.6 PCR yöntemi ile amplifiye edilen Fibulin-3 cDNAsı için optimum sıcaklığın belirlenmesi.	63
Şekil 4.7 Fibulin-3 insert'ünün saflaştırma işleminden sonraki jel görüntüsü ve pCDH-CMV-MCS-EF1 vektörünün agaroz jelde gösterilmesi.....	63
Şekil 4.8 İntert Fibulin-3 agaroz jelden geri kazanılması/izolasyonu.....	64
Şekil 4.9 Ligasyon sonrası tek koloni seçimi.	65
Şekil 4.10 Ligasyon sonrası insert DNA'yı taşıyan vektörün belirlenmesi.....	66
Şekil 4.11 Antisense Fibulin-3 kalıcı vektörünün etkinliğinin hem Western Blot hem de qPCR ile gösterilmesi.	67
Şekil 4.12 Fibulin-3 siRNA'sinin etkinliğini hem Western Blot hem de qPCR ile gösterilmesi.	68
Şekil 4. 22 Çok boyutlu ölçkleme ile örnekler arasındaki benzerlik düzeyleri	
Şekil 4.12 Fibulin-3 siRNA'sinin etkinliğini hem Western Blot hem de qPCR ile gösterilmesi.	68
Şekil 4.13 Fibulin-3 shRNA'sinin etkinliğini hem Western Blot hem de qPCR ile gösterilmesi.	69
Şekil 4.14 KHAK N417 hücre dizilerinde Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak değişen populasyon çoğalma hızı.....	70
Şekil 4.15 KHAK H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak değişen populasyon çoğalma hızı.....	71
Şekil 4.16 KHAK N417 hücre dizisinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak ekspresyonu değişen mRNA'lar. * $p < 0.05$	72
Şekil 4.17 KHAK H82 hücre dizisinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak ekspresyonu değişen mRNA'lar. * $p < 0.05$	72
Şekil 4. 18 N417 ve H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak farklılık gösteren markerler. Fibulin-3 ekspresyon vektörü transfekte edilmiş N417 hücre dizisinde ve shRNA C infekte H82 hücre dizisinde EMT, kök hücre ve hücre proliferasyonu ile ilişkili markerlerin protein ifadesindeki değişimlerinin Western Blot yöntemi ile belirlenmesi.	74

Şekil 4. 19 N417 hücre dizisinde, Fibulin-3 ekspresyonundaki bağlı olarak ifadesi değişen EMT, kök hücre ve hücre proliferasyonu ile ilişkili markerlerin dansitometrik olarak değerlendirilmesi.	75
Şekil 4. 20 H82 hücre dizisinde, Fibulin-3 ekspresyonundaki bağlı olarak ifadesi değişen EMT, kök hücre ve hücre proliferasyonu ile ilişkili markerlerin dansitometrik olarak değerlendirilmesi.	75
Şekil 4. 21 Mikroarray analizi sonucunda belirlenen örnekler arasındaki korelasyon ...	76
Şekil 4. 22 Çok boyutlu ölçkleme ile örnekler arasındaki benzerlik düzeyleri	77
Şekil 4. 23 Fibulin-3'ün ifadesinin modüle edildiği KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinin Z skorlama sistemine göre örneklerin hem hiyerarşik sınıflandırılması hem de 1.5 kat değişimi ile -1.5 kat değişimi arasındaki transkript dağılımının heatmap grafiği.	78
Şekil 4.24 Fibulin-3'ün aşırı ifade edildiği KHAK N417 hücre dizisinde 0.5 kat değişimi ile -0.5 kat değişimi arasındaki transkript dağılımının heatmap grafiği.	79
Şekil 4.25 Fibulin-3'ün baskılandığı KHAK H82 hücre dizisinde 0.5 kat değişimi ile -0.5 kat değişimi arasındaki gen dağılımının heatmap grafiği.	79
Şekil 4. 26 Fibulin-3'ün aşırı ifade edildiği KHAK N417 hücre dizisinde 1ie 15 kat ifade değişimine sahip transkript sayılarının farklı ifade değişimlerdeki dağılım sayıları. ...	80
Şekil 4.29 KHAK N417 hücre dizisinde Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak artan ve azalan mRNA prob sayıları.H82	81
Şekil 4.27 Fibulin-3 baskılandığı ve aşırı ifade edildiği N417 ve H82 hücre gruplarında $ FC \geq 2$ değerlerine göre ekspresyonun arttığı/azaldığı tespit edilen genlerin dağılımı.	81
Şekil 4.28 Fibulin-3'ün baskılandığı KHAK H82 hücre dizisinde 1ile 15 kat ifade değişimine sahip transkript sayılarının farklı ifade değişimlerdeki dağılım sayıları. ...	81
Şekil 4.29 KHAK N417 hücre dizisinde Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak artan ve azalan mRNA prob sayıları.	82
Şekil 4.30 KHAK H82 hücre dizisinde Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak artan ve azalan mRNA prob sayıları.	82
Şekil 4.31 KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı ortak değişim gösteren mRNA sayı ve değişim gösteren ilgili genlerin ekspresyonları.	84
Şekil 4. 35 Mikroarray analizlerine göre Fibulin-3 tarafından regüle edilen lncRNA'lar. * $p < 0.05$ Şekil 4.31 KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı ortak değişim gösteren mRNA sayı ve değişim gösteren ilgili genlerin ekspresyonları.	84
Şekil 4.32 Mikroarray analizlerine göre Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı ifadesi değişen miRNA'lar. * $p < 0.05$	85
Şekil 4.33 N417 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'lar. * $p < 0.05$	86

Şekil 4.34 H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspersyonuna bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'lar. * $p < 0.05$	87
Şekil 4.35 Mikroarray analizlerine göre Fibulin-3 tarafından regüle edilen lncRNA'lar. * $p < 0.05$	88
Şekil 4.36 Biyoenformatik analiz verilerinin kümülatif olarak değerlendirilmesi.	89
Şekil 4.37 Mikroarray verilerinin gen ontoloji analiz sonuçları.....	90
Şekil 4.38 Pathway analizinde kullanılan KEGG ve REAC analiz sonuçları.	91
Şekil 4.39 Gen ontoloji zenginleştirilmiş analizi ve şematize edilmiş görseli.....	93

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine göre akciğer kanserinde epitelyal tümörlerin sınıflandırılması.	9
Tablo 2.2 Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine göre akciğer kanserinde diğer tümörlerin sınıflandırılması.	10
Tablo 2.3 Akciğer kanserinin evrenmesinde T, N, M kriterleri (IASLC 8th Edition). ...	11
Tablo 2.4 Akciğer kanser evrelerinin gruplandırılması (IASLC 8th Edition).	11
Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri.	24
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan antikör primer ve özellikleri.	24
Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan kitler ve özellikleri.....	26
Tablo 3.4 Çalışmada kullanılan vektörler ve özellikleri.....	26
Tablo 3.5 Çalışmada kullanılan tamponlar.	27
Tablo 3.6 mRNA'dan cDNA'ya çevirme reaksiyonları (1. basamak).	31
Tablo 3.7 mRNA'dan cDNA'ya çevirme reaksiyonları (2. basamak).	32
Tablo 3.8 miRNA'dan cDNA'ya çevirme reaksiyonları.	32
Tablo 3.9 mRNA için qPCR reaksiyon miktarları.....	33
Tablo 3.10 miRNA için qPCR reaksiyon miktarları.....	34
Tablo 3.11 Western blot jel hazırlama tablosu	36
Tablo 3.12 Fibulin-3 ekspresyon vektörü için transfeksiyon oranları.	39
Tablo 3.13 Fibulin-3 siRNA için transfeksiyon oranları.....	39
Tablo 3.14 PCR reaksiyon miksleri ve şartları.	42
Tablo 3.15 Restriksiyon enzim kesim protokolleri.	43
Tablo 3.16 Alkalen fosfataz reaksiyon tablosu.....	45
Tablo 3.17 Ligasyon için reaksiyon protokolü	46
Tablo 3.18 Sanger sekans PCR reaksiyonu için bileşenler	51
Tablo 3. 19 Sanger sekans, sekans PCR'ı reaksiyonu için bileşenler	52
Tablo 4.1 Gen ontoloji zenginleştirilmiş analizinin P ve FDR q değerleri	92

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AT.....	Anafilatoksin
APS.....	Amonyum Persülfat
ATP.....	Adenozin trifosfat
BSA.....	Dana Serum Albumin
CCP.....	Kompleman Kontrol Proteini
cDNA.....	Komplementer DNA
CSC.....	Kanser Kök Hücresi
DMSO.....	Dimetilsülfoksit
ECM.....	Ekstraselüler Matriks
EFEMP1.....	Fibulin Benzeri Hücre Dışı Matriks Proteini 1
EGF.....	Epidermal Büyüme Faktör
EGFR.....	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EMT.....	Epitelyal Mezenkimal Transisyon
EpCAM.....	Epitelyel Hücre Adezyon Molekülü
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBS.....	Fetal Dana Serumu
FGFR1.....	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1
GFP.....	Yeşil fluoresans proteini
GO.....	Gen Ontoloji
GSEA.....	Gene Set Enrichment Analysis
GWAS.....	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
GO:BP.....	Gen Ontoloji Biyolojik Prosesler
GO:CC.....	Gen Ontoloji Hücresel Komponentler
HIV.....	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HPV.....	Human Papilomavirus
IARC.....	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IASCL.....	Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Örgütü
KEGG.....	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KHAK.....	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK.....	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
MET.....	Mezenkimal Epitelyal Geçiş
miRNA.....	Mikro RNA
MM.....	Malign Mezotelyoma
MMP.....	Matriks Metalloproteinazlar
mRNA.....	Mesajcı RNA

ORA.....	Over Representation Analysis
LOH.....	Heterozigotluk Kaybı
PAH.....	Polisiklik aromatik Hidrokarbonlar
PBS.....	Fosfat tamponlu salin
PI3KCA.....	Fosfatidilinositol-3-kinaz katalitik α
PTEN.....	Kromozom 10'dan Fosfat ve Tensin Delesyonu
PVDF.....	Poliviniliden diflorid
qPCR.....	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTK.....	Reseptör Tirozin Kinaz
SCR.....	Kısa Konsensus Tekrarı
SDS.....	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SE-KHAK.....	Sınırlı Evre Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
shRNA.....	Kısa saç tokası RNA
siRNA.....	Small interfering RNA
SNAIL1.....	Snail Family Transcriptional Repressor 1
TERT.....	Telomeraz revers transkriptaz
TWIST1.....	Twist Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1
T β RI.....	TGF-Reseptör 1
VEGFA.....	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-A
WHO.....	Dünya Sağlık Örgütü
YE-KHAK.....	Yaygın Evre Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
μ g.....	Mikrogram
μ l.....	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, yüksek insidansı ve malign tümör potansiyeliyle, kanser çeşitleri arasında dünyada en yüksek ölüm oranına sahiptir. Dünya genelinde son 5 yıl göz önünde bulundurulduğunda yıllık ortalama 1.8 milyonun üzerinde ölümlerle sonlanmış akciğer kanseri vakası bulunmaktadır. Tütün kullanımı, akciğer kanseri nedenleri arasında ilk sırada gelirken, değişen beslenme alışkanlıkları, artan sanayileşmenin yan etkisi olarak günlük hayatımızın teknolojik cihazlar üzerine kurulması ve değişen çevresel etkenler dolayısıyla artan genetik defektler yüzünden sigara ilişkili olmayan akciğer kanser vakalarının sayısında da artış görülmektedir. Ne yazık ki akciğer kanseri vakalarının sağ kalım yüzdeleri %10-15'dir. Bu denli düşük sağ kalım oranına sahip olmasındaki temel nedenleri akciğer kanserinin yüksek proliferasyon, erken metastaz ve yüksek invazyon yeteneğine sahip olması ve olguların erken evrede teşhis edilememeleridir.

Histolojik olarak akciğer tümörleri küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK), ve küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) olarak sınıflandırılır. KHAK nöroendokrin kökenli bir karsinomadır ve KHDAK'e göre daha agresif bir tavır sergilemektedir. Ayrıca KHAK çoklu ilaç dirençliliği mekanizmaları açısından oldukça aktiftir. Bu karakteristik özelliklerinden dolayı geliştirilen tedavi stratejilerinden istenildiği gibi bir sonuç alınamamıştır.

Ekstraselüler glikoprotein ailesinden Fibulin-3 hücre invazyonu, motilitesi, farklılaşması ve anjiyogenezinde rol almaktadır. Fibulin-3'ün hücre invazyonuna olan etkisi üzerine farklı kanser tiplerinde çalışmalar mevcuttur. Ayrıca bu çalışmalarda Fibulin-3'ün anormal promotör metilasyonuna bağlı olarak düşük seviyedeki ekspresyonunun hastaların düşük sağkalım süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Primer tümörün, sekonder bir odak oluşturması sürecinde Epitelyal Mezenkimal Transisyon'un (EMT) farklı basamaklar izlediğini bilmekteyiz. EMT bu sürecini tamamlarken hücre

fenotipi ve kompozisyonunda (plastisitesinde) meydana gelen değişimlerde kanser kök hücre fenotip markerleride rol oynamaktadır.

Bu bilgilerden yola çıkılarak EMT sürecinin aktif halde çalıştığı KHAK hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyonunun epiteyal mezenkimal ya da mezenkimal epiteyal geçişte, hücre plastisitesinin regülasyonunda rol alacağını öngörmekteyiz.

1.1 Amaç

Bu tez projesinde küçük hücreli akciğer kanser hücre dizilerinde epiteyal mezenkimal geçiş sürecinin ve kanser kök hücre fenotipinin regülasyonunda Fibulin-3'ün üstlendiği görevleri ortaya çıkarmayı amaçlamaktayız.

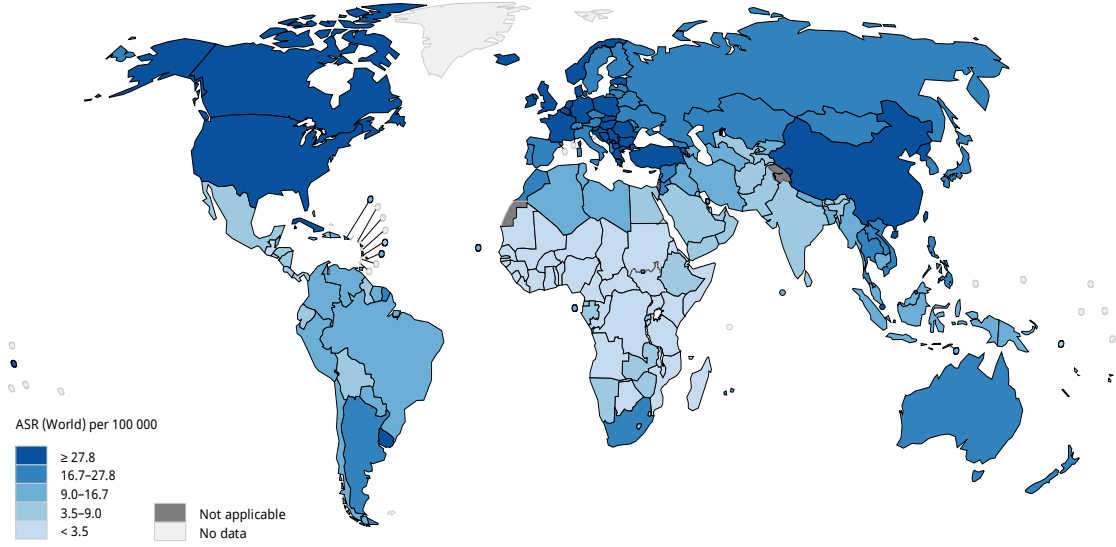
2. KURAMSAL BİLGİ VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Akciğer Kanseri

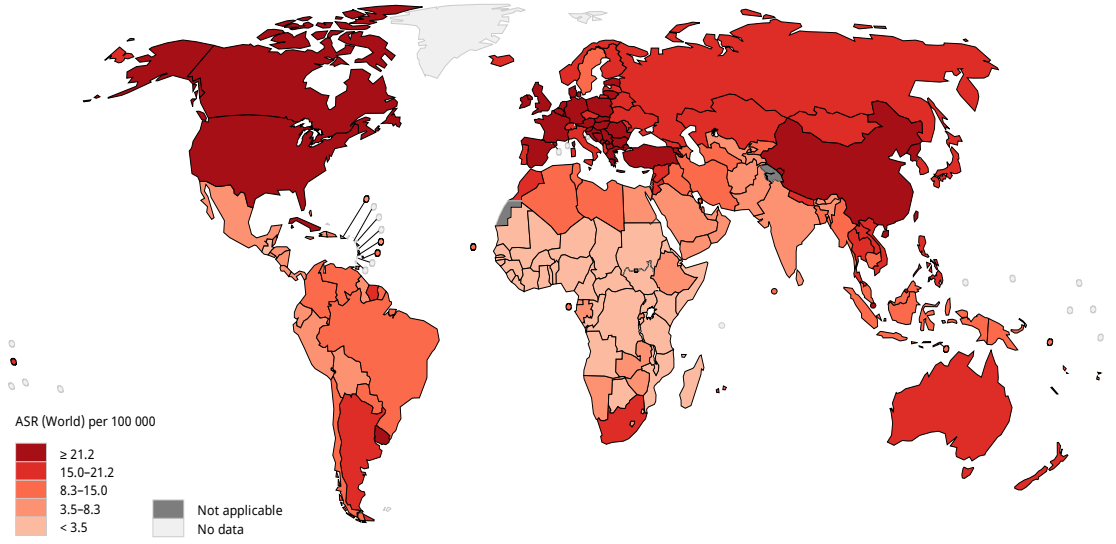
Akciğer kanseri dünya genelinde hem erkekler hem de kadınlar arasında, yıllık en fazla yeni vaka sayısı ve yüksek ölüm oranı ile en malign kanser türlerinden biridir. Akciğer kanseri meme, kolon ve prostat kanserlerinin toplam ölüm oranından daha yüksek ölüm oranına sahiptir (Kim vd. 2014). Akciğer kanseri vakalarının %80.4'ünü KHDAK ve %16.8'ini KHAK tanısı almış hastalar oluşturmaktadır. Esas olarak adenokarsinom, skuamoz hücreli ve büyük hücreli karsinomdan oluşan KHDAK, akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %80'ini oluştururken, KHAK daha az sıklıktadır ve bilinen tüm vakalar sigara tüketiminden kaynaklanmaktadır (Esposito vd. 2010).

2.1.1 Epidemiyolojisi

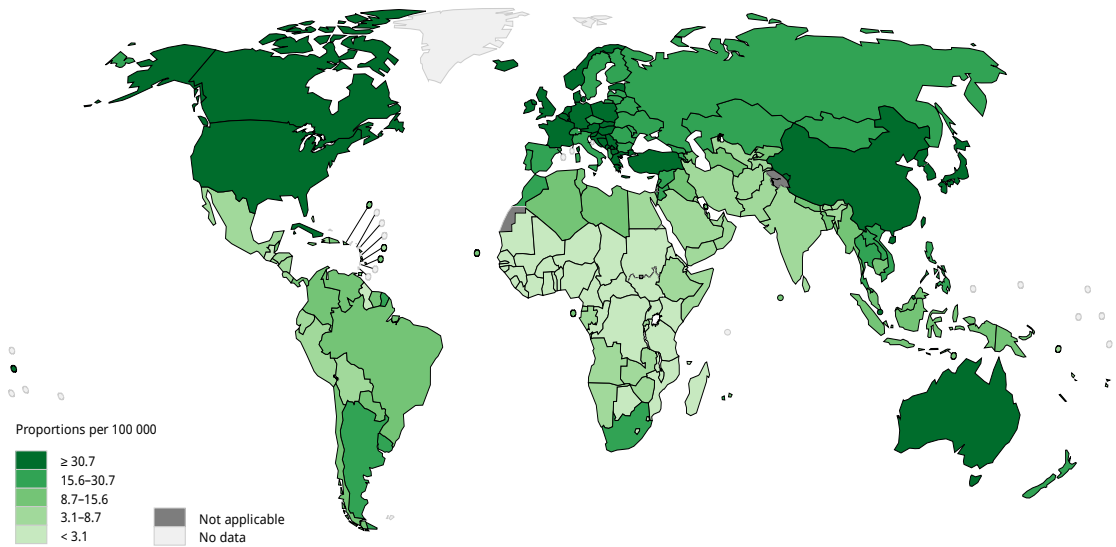
Geçen yüzyılda akciğer kanseri sahip olduğu insidans ve mortalite oranıyla nadir görülen hastalıklar sınıfında yer almaktaydı. Zamanla artan kanserojen ajanlarla beraber yükselen insidans ve mortalite oranıyla küresel bir sağlık problemi haline gelmiştir (Adler 1913). Akciğer kanseri vakalarının erkeklerdeki insidansı (1 368 524 %14.5), kadınlardan (725 253 %8.4) daha yüksektir aynı şekilde mortalite oranları da insidansla paralellik göstermektedir (Şekil 2.1, Şekil 2.2). Akciğer kanseri toplam kanser vakalarının %11.6'sını (2 093 826) oluşturmaktadır (WEB_1). Dünya çapında farklı kanser türleri arasında akciğer kanserinin prevalansı %15.7 meme, %10.9 kolorektal, %8.5 prostat kanserinden sonra %4.9 ile 4. sırada yer almaktadır. Akciğer kanserinin dünya genelinde 5 yıllık prevalansına (2 129 964) bakıldığında Asya %56.6 Avrupa %23.3 Kuzey Amerika %13.3 Latin Amerika ve Karayipler %4 Afrika %1.8 ve Okyanusya %0.87'lik bir dağılıma sahiptir (Şekil 2.3) (WEB_2).



Şekil 2.1 2018 yılı dünya genelinde, akciğer kanseri vakalarının insidans dağılımı (WEB_1).



Şekil 2.2 2018 yılı dünya genelinde, akciğer kanseri vakalarının mortalite dağılımı (WEB_2).



Şekil 2.3 2018 yılı dünya genelinde, akciğer kanseri vakalarının prevalans dağılımı (WEB_3).

2.1.2 Etiyoloji

2.1.2.1. Sigara tüketimi, diyet ve obezite

Akciğer kanserinin meydana gelmesindeki en büyük etken sigara dumanındaki aerosoller ve partiküllerdir. Sigara dumanı, ana duman dalgası ve yan duman dalgasının komponentlerinden meydana gelir. Ana duman dalgası, sigara kullanıcısının primer kaynaktan inhalasyon yoluyla maruz kaldığı sigara dumanıdır. Yan duman dalgası çevresel tütün duman kaynaklarından ve sigara kullanıcılarından kaynaklı tütün dumanlarıdır. Tütün bağımlılığının birincil belirleyicileri nikotin ve katrandır. Katran maruziyeti akciğer kanseri riskinin önemli bir etkeni olarak görülmektedir (Charles S Dela Cruz, Tanoue, ve Matthay 2011). Sigara dumanında 4000'den fazla kimyasal vardır: ana duman dalgasının %95'i 400-500 gaz bileşeninden meydana gelir, geri kalanı ise 3500'den fazla partikülden oluşur (Charles S Dela Cruz vd. 2011). Sigara kullanıcılarının inhalasyon yoluyla maruz kaldığı duman polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aromatik aminler, N-nitrozaminler ve vinil klorid, arsenik ve krom gibi organik ve inorganik bir çok potansiyel karsinojenden oluşur (Faccini 1989). Sigaranın ihtiva ettiği karsinojenler, hücreye genotoksik bir etkiye ya da karsinogenezi tetikleyen mekanizmaları aktive edecek bir etkiye sahiptir (Xue, Yang, ve Seng 2014). Örneğin; sigara dumanındaki bazı kanserojenler DNA'ya kovalent bağlanarak DNA hasarlarına neden olmaktadır. Hasarlı DNA'lar kontrol ve tamir mekanizmalarınca tespit edildikten sonra, tamir edilir ya da hücre apoptoza yönlendirilir. Kanserojene maruz kalma süresi ve dozu arttıkça hücre DNA tamir mekanizmalarının hata yapma ya da hasarlı DNA'yı gözden kaçırma olasılığı artmaktadır. Eğer hatalı DNA tespit edilip gerekli süreç başlatılmazsa meydana gelen mutasyonlar, kontrol edilemeyen hücresel çoğalma ve tümör oluşumu ile sonuçlanabilecek kritik onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin modülasyonunu içeren sinyal yollarının aktivasyonunu sağlayabilir (Akopyan ve Bonavida 2006).

Bütün kanserlerin yaklaşık olarak %30'unda diyetin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Willett ve Trichopoulos 1996). Beslenme biçiminin akciğer kanseri için risk temsil ettiği bir çok çalışmada gösterilmiştir (Ruano-Ravina, Figueiras, ve Barros-Dios 2000). Örneğin; A, C ve E vitaminleri gibi antioksidanların serumdaki düşük konsantrasyon seviyesi akciğer kanserinin gelişimi ve progresyonuyla ilişkilidir (Ruano-Ravina vd. 2006). A vitamini hem hayvansal (retinol) hem de sebze (karotenoid) kaynaklı temin edilebilir; sadece sebze kaynaklı A vitaminin akciğer kanserine karşı koruyucu bir

etkiye sahip olduğu ve özellikle, en çok bilinen karotenoid olan, β -karotenin akciğer kanserine karşı en büyük koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Yu vd. 2015). Ayrıca C ve E vitaminlerinin de (a-tokoferol) koruyucu etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Narita vd. 2018).

Aşırı vücut ağırlığı akciğer kanseri için risk teşkil etmese bile endometriyal, meme ve kolorektal kanser için bir risk teşkil etmektedir (Charles S. Dela Cruz, Tanoue, ve Matthay 2011). Renehan ve arkadaşları tarafından yapılan bir meta analizde, vücut kütle indeksi ile akciğer kanseri riski arasında ters bir ilişki olduğunu ve obezitenin koruyucu bir rol oynayabileceğini bildirilmiştir (Bhaskaran vd. 2014).

2.1.2.2 Kalıtsal faktörler

Pek çok çalışmada akciğer kanseri oluşumunun %80'inden fazlasının sigara içme alışkanlığı ile ilişkili olduğu, ancak sigara içenlerin %20'sinden daha azının akciğer kanserine sahip olduğu gösterilmektedir, bu da akciğer kanseri oluşumunun muhtemelen genetik duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir (Jemal vd. 2011). 1960'lı yılların başlarında Tokuhata ve arkadaşları akciğer kanserinin ailesel agregasyonunun ilk epidemiyolojik kanıtını sundular (Tokuhata ve Lilienfeld 1963). Bu konu üzerine yapılan çalışmalarda, birinci derece akrabaların akciğer kanseri riskinin, kontrollerin ailelerinden 1.88 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Gu vd. 2010). Gaughan ve arkadaşları ortaya koydukları bir çalışmada ise KHDAK tanılı hastalarda sigara kullanmamış hasta grubunda kalıtsal risk ve epidermal büyüme faktör reseptör (Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*)) mutasyonu nedeniyle tanı aldıklarını göstermişlerdir (Gaughan vd. 2013).

Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında (Genome Wide Association Studies (GWAS)), yeni akciğer kanserine duyarlılık genleri 5p15.33, 6p21, 15q24-25.1, 6q23-25 ve 13q31.3.44 kromozomları üzerinde tanımlanmıştır (Yokota, Shiraishi, ve Kohno 2010). Örneğin; Telomeraz revers transkriptaz (*TERT*) geni 5p1 5 lokusunda yer almaktadır ve *TERT* geni akciğer kanserinde, hücre proliferasyonunda rol oynamaktadır (Xie vd. 2011). 6q21 lokusundan (*PRRC1A (BAT2)*, *BAT3*, *FKBPL*, *GTF2H4* ve *CLPTM1L*) kodlanan bazı genlerde meydana gelen varyasyonların sigara kullanımı ile ilişkili olmayan akciğer karsinomu riskini artırdığı gösterilmiştir (Wang vd. 2008, 2016).

Akciğer kanseri ile ilişkili genetik faktörlerin tanımlanması sayesinde, kısa vadede, yüksek riskli bireyleri taramak için ailenin genetik risk skoru oluşturularak hastalığın erken evrelerinde tespiti sağlanabilir. Orta ve uzun vadede, genlerin keşfedilmesi, bakım kalitesi, kişiselleştirilmiş tedaviler, yeni terapötik hedefler ve

biyomarkerleri ortaya çıkararak sonuçları klinik uygulamalara bir adım daha yaklaştıracaktır.

2.1.2.3 Enfeksiyonlar

Akciğer kanseri nedenleri arasında, enfeksiyonlar önemli bir yer teşkil etmektedir ve üzerine çalışmış bir konudur. Engles ve arkadaşları eflamasyonların akciğer kanseri oluşum ve gelişim sürecinde rol oynadığını göstermişlerdir (Engels 2008).

İnsan papiloma virüsünün (Human Papillomavirus (HPV)) diğer dokularda karsinomaya neden olduğu bilinmektedir. 1980 yılında Syrjänen tarafından HPV'nin bronşiyal yassı epitel hücre lezyonlarına neden olma potansiyeli öne sürülmüştür (Syrjänen 1980). İrksal ve coğrafik varyasyonları olan farklı ülkelerde akciğer kanserli hastalar ile HPV enfeksiyonu arasında bir prevalans uyumu olmamasına rağmen yapılan moleküler analizlerde skuamöz hücreli karsinom akciğer kanseri dokularında HPV'nin DNA'sı tespit edilmiştir (Chen vd. 2004; Rezazadeh vd. 2009).

Burkitt lenfoma ve nazofarengeal karsinom ile ilişkili Epstein Barr virüsü, Asya kökenli hastalarda nadir görülen bir akciğer kanseri türü olan lenfoepitelyoma benzeri karsinom ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Fakat bu ilişki batı popülasyonlarında görülmemiştir (Castro vd. 2001).

İnsan bağışıklık yetmezliği (Human Immunodeficiency Virus (HIV)) pozitif hastalarda, HIV tat proteini hücrel genleri veya protoonkogenleri transaktive edebilirken diğer HIV genleri, tümör baskılayıcı genleri inhibe edebilir (El-Solh vd. 1997). Böyle bir aktivasyondan dolayı HIV ile enfekte kanser hastaları, benzer şekilde evrelenen HIV ile enfekte olmayan aynı kansere sahip hastalardan daha kötü bir prognoza sahiptir (Powles vd. 2003). Ayrıca HIV pozitif hastaların tanı sırasında daha ileri evre olma olasılığı daha yüksektir (Brock vd. 2006). Yapılan çalışmalar, HIV pozitif hastalarda diğer kanserlere oranla akciğer kanserinin daha sık görüldüğünü belirtmiştir (Engels 2008).

2.1.2.3 Mesleki kanserojenler

Birçok işyerinde kullanılan kimyasal maddelerin akciğer karsinogenezinde rol aldığı gösterilmiştir. Bu kanserojen maddeler Uluslararası Kanserojen Araştırmaları Ajansı (International Agency for Research on Cancer (IARC)) tarafından tanımlanmıştır. Endüstriyel olarak sıkça kullanılan nikel, krom, silika, klorometil eterler, asbest, vinil klorür, arsenik, kadmiyum, berilyum ve radon kanserojenlerden birkaçıdır. Bunlara ek olarak sanayileşme yüzünden artan fosil yakıt kullanımı ile polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve kükürt dioksit gibi kanserojen maddelere maruziyette artmıştır (de

Groot vd. 2018). Yapılan çalışmalarda bu ajanlara maruziyet sonucu akciğer kanserine yakalanma riskinin %50 oranında arttığı gösterilmiştir (Charles S. Dela Cruz vd. 2011).

2.2 Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması

Dünya sağlık örgütünün (World Health Organization (WHO)) yayınlamış olduğu en son güncellemede, sınıflandırma boyunca immünohistokimyasal takip (Allen 1991), genetik çalışmalar özellikle moleküler entegrasyonlara ve akciğer kanseri için tedavi stratejilerinin kişiselleştirilmesine yardımcı testler (The International Agency for Research on Cancer 2004), küçük biyopsiler ve sitolojileri için yeni bir sınıflandırma (Anonim 1982), akciğer adenokarsinomuna farklı bir yaklaşım (Organization 1981), sadece büyük hücreli karsinom tanısını kısıtlayan morfolojik veya immünohistokimyasal eksikliği olan rezeke edilmiş tümörlerin sınıflandırılması ve büyük hücreli karsinom alt tiplerinin tanımlanması (Travis vd. 1999), keratinize ve non-keratinize skuamöz hücreli karsinomların sınıflandırılması ve bazaloid alt tiplerinin sınıflandırılmasında immünohistokimyasal ispat aranması (Travis vd. 2011), nöroendokrin tümörlerin tek bir kategoride gruplandırılması (Lindeman 2015), NUT karsinomun eklenmesi (Lindeman vd. 2013), “sklerozan hemanjiyom” yerine “sklerozan pnömositoma” “hamartom” yerine “pulmoner hamartom” teriminin getirilmesi (Leighl vd. 2014; Travis vd. 2013), lenfanjiioleiomiyomatozis, PEComa benign ve PEComa malign, alt gruplarını PEComatous tümörleri grubu altına toplanması (Ignatius Ou ve Zell 2009), akciğer pulmoner miksoid sarkomunda *EWSR1-CREB1* translokasyonun tanımlanması ve *EWSR1* genini yeniden düzenlenmesine sahip myoepitelyoma, myoepitelyel karsinomanın eklenmesi (Loo vd. 2010; Nicholson vd. 2010), Epitelioid hemanjiioendotelyoma tanısında, *WWTR1-CAMTA1* füzyon geninin tanı kriterlerine eklenmesi (Edwards vd. 2000), Erdheim–Chester hastalığının lenfoproliferatif tümöre eklenmesi (Travis vd. 2010), İntrapulmoner timoma, melanoma, meningioma ve germ hücreli tümörleri içerecek ektopik kökenli bir tümör grubunun oluşturulması (Travis vd. 2015) üzerine akciğer kanseri sınıflandırması revize edilmiştir. Günümüzde hâlen kullanılan 2015 yılında son halini almış sınıflandırma kriterleri Tablo 2.1 ve Tablo 2.2’ de sunulmuştur.

Tablo 2.1 Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine göre akciğer kanserinde epitelyal tümörlerin sınıflandırılması.

Epitelyal tümörler	
<p>I. Adenokarsinoma</p> <p>Lepidik adenokarsinoma</p> <p>Asiner adenokarsinoma</p> <p>Papiller adenokarsinom</p> <p>Mikropapiller adenokarsinom</p> <p>Solid adenokarsinom</p> <p>İnvaziv müsinöz adenokarsinom</p> <p style="padding-left: 20px;">Mikst invaziv müsinöz ve müsin içermeyen adenokarsinom</p> <p>Kolloid adenokarsinom</p> <p>Fetal adenokarsinom</p> <p>Minimal invaziv adenokarsinom</p> <p style="padding-left: 20px;">Müsinöz minimal invaziv adenokarsinom</p> <p style="padding-left: 20px;">Non-müsinöz minimal invaziv adenokarsinom</p> <p>Preinvaziv lezyonlar</p> <p style="padding-left: 20px;">Atipik adenomatöz hiperplazi</p> <p>Adenokarsinoma insitu</p> <p style="padding-left: 20px;">Non-müsinöz</p> <p style="padding-left: 20px;">Müsinöz</p>	<p>IV. Büyük hücreli karsinom</p> <p>V. Adenoskuamöz karsinom</p> <p>VI. Sarkomatoid karsinom</p> <p>Pleomorfik karsinom</p> <p>İğsi hücreli karsinom</p> <p>Dev hücreli</p> <p>Karsinosarkom</p> <p>Pulmoner blastom</p> <p>VII. Diğer ve sınıflandırılmamış karsinomalar</p> <p>Lenfoepitelyoma benzeri karsinom</p> <p>NUT karsinom</p> <p>VIII. Tükrük bezi tipi tümörler</p> <p>Mukoepidermoid karsinom</p> <p>Adenoid kistik karsinom</p> <p>Epitelyal-Myoepitelyal karsinom</p> <p>Pleomorfik adenom</p> <p>IX. Papillomlar</p> <p>Skuamöz hücreli papillom</p> <p style="padding-left: 20px;">Egzofitik</p> <p style="padding-left: 20px;">Endofitik</p> <p>Glandüler papillom</p> <p>Mikst skuamöz hücreli ve glandüler papillom</p>
<p>II. Skuamöz hücreli karsinom</p> <p>Keratinize skuamöz hücreli karsinom</p> <p>Non-keratinize skuamöz hücreli karsinom</p> <p>Bazaloid skuamöz hücreli karsinom</p> <p>Preinvaziv lezyon</p> <p style="padding-left: 20px;">Skuamöz hücreli karsinoma insitu</p>	<p>X. Adenomlar</p> <p>Sklerozan pnomositom</p> <p>Alveolar adenom</p> <p>Papiller adenom</p> <p>Müsinöz kistadenom</p> <p>Muköz bez adenomu</p>
<p>III. Nöroendokrin tümörler</p> <p>Küçük hücreli karsinom</p> <p style="padding-left: 20px;">Kombine küçük hücreli karsinom</p> <p>Büyük hücreli nöroendokrin karsinom</p> <p style="padding-left: 20px;">Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom</p> <p>Karsinoid tümör</p> <p style="padding-left: 20px;">Tipik karsinoid tümör</p> <p style="padding-left: 20px;">Atipik karsinoid tümör</p> <p>Preinvaziv lezyon</p> <p style="padding-left: 20px;">Diffüz idiyomatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi</p>	

Tablo 2.2 Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine göre akciğer kanserinde diğer tümörlerin sınıflandırılması.

Mezenkimal tümörler	Lenfositik tümörler
I. Pulmoner hamartom	I. MALT Tipi Ekstranodal Marjinal Zon B Hücreli Lenfoma
II. Kondrom	
III. PEComatöz tümörler	II. Diffüz büyük hücreli lenfoma
Lenfanjiomiyoamatosis	III. Lenfomatoid granülatosis
Benign PEComa	IV. İntravasküler büyük B hücreli lenfoma
Şeffaf hücreli tümör	V. Pulmoner Langerhans hücreli histiositoz
Malign PEComa	VI. Erdheim-Chester hastalığı
IV. Konjenital peribronşiyal myofibroblastik tümör	Ektopik kökenli tümörler
V. Diffüz pulmoner lenfanjiomatosis	I. Germ hücreli tümör
VI. İnflamatuar myofibroblastik tümör	Matür teratom
VII. Epiteloid hemanjioendoteliyoma	İmmatür teratom
VIII. Plöropulmoner blastoma	II. İntrapulmoner timoma
IX. Sinavyal sarkoma	III. Melanoma
X. Pulmoner arteriyal intimal sarkom	IV. Meningioma, NOS
XI. EWSR1-CREB1 translokasyonlu pulmoner miksoid sarkom	Metastatik tümörler
XII. Myoepitelyal tümörler	
Myoepitelyoma	
Myoepitelyal karsinom	

2.2.1 Akciğer kanserinin evrelendirilmesi

Akciğer karsinomu histolojik olarak sınıflandırdıktan sonraki diğer bir önemli basamağı tümörün evrelendirilmesidir. Evrelendirme hastaların tedavisinde önemli bir rol oynar, çünkü ilk tanı anında akciğer kanserinin evrelendirilmesi sağkalımı en çok etkileyen parametrelerden biridir. Ayrıca, tedavi seçenekleri hastalık evresine göre değişim göstermektedir (Rami-Porta vd. 2014).

En doğru prognostik belirteçleri sağlamak için daha fazla veri elde edildiğinden kılavuzlar sürekli olarak gözden geçirilerek, akciğer kanserinin klinik tespiti ve evrelemede daha hızlı ve daha doğru sonuçlara ulaşmamıza olanak sağlanmaktadır (Lim vd. 2018). Akciğer kanserinin evrelendirilmesi için kabul görmüş TNM evrelendirme sistemi kullanılır. Bu sistem, primer tümörün büyüklüğü ve yayılımına (T), bölgesel lenf bezi tutulumuna (N), uzak metastaz varlığına (M) göre sınıflama yapmamızı sağlar. TNM

evrelendirme sistemi kabul gördüğü günden itibaren çeşitli zamanlarda revize edilmiştir, en son 2018 yılında (International Association Study of the Lung Cancer (IASLC)) uluslararası olarak geçerli olan 8. baskı ile önemli revizyonlar yapılmıştır (Tablo 2.3-2.4).

Tablo 2.3 Akciğer kanserinin evrelenmesinde T, N, M kriterleri (IASLC 8th Edition).

T – Primary Tumour

TX		Primary tumour cannot be assessed, or tumour proven by the presence of malignant cells in sputum or bronchial washings but not visualized by imaging or bronchoscopy
T0		No evidence of primary tumour
Tis		Carcinoma in situ
T1		Tumour 3 cm or less in greatest dimension, surrounded by lung or visceral pleura, without bronchoscopic evidence of invasion more proximal than the lobar bronchus (i.e., not in the main bronchus) ¹
	T1mi	Minimally invasive adenocarcinoma ²
	T1a	Tumour 1 cm or less in greatest dimension ¹
	T1b	Tumour more than 1 cm but not more than 2 cm in greatest dimension ¹
	T1c	Tumour more than 2 cm but not more than 3 cm in greatest dimension ¹
T2		Tumour more than 3 cm but not more than 5 cm; or tumour with any of the following features ³ <ul style="list-style-type: none"> • Involves main bronchus regardless of distance to the carina, but without involving the carina • Invades visceral pleura • Associated with atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to the hilar region, either involving part of the lung or the entire lung
	T2a	Tumour more than 3 cm but not more than 4 cm in greatest dimension
	T2b	Tumour more than 4 cm but not more than 5 cm in greatest dimension
T3		Tumour more than 5 cm but not more than 7 cm in greatest dimension or one that directly invades any of the following: chest wall (including superior sulcus tumours), phrenic nerve, parietal pericardium; or associated separate tumour nodule(s) in the same lobe as the primary
T4		Tumours more than 7 cm or one that invades any of the following: diaphragm, mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, oesophagus, vertebral body, carina; separate tumour nodule(s) in a different ipsilateral lobe to that of the primary

N – Regional Lymph Nodes

M- Distant Metastasis

NX		Regional lymph nodes cannot be assessed	M0		No distant metastasis
N0		No regional lymph node metastasis	M1		Distant metastasis
N1		Metastasis in ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes and intrapulmonary nodes, including involvement by direct extension		M1a	Separate tumour nodule(s) in a contralateral lobe; tumour with pleural or pericardial nodules or malignant pleural or pericardial effusion ⁴
N2		Metastasis in ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph node(s)		M1b	Single extrathoracic metastasis in a single organ ⁵
N3		Metastasis in contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene or supraclavicular lymph node(s)		M1c	Multiple extrathoracic metastases in one or several organs

¹ Herhangi bir boyuttaki nadir yüzeysel yayılan tümör, bronşiyal duvar ile ana bronşın proksimaline sınırlı invaziv, T1a olarak da sınıflandırılır.

² Ağırıklı olarak adenokarsinom ≤ 3 cm ve Lepidik patern ≤ 5 mm invazyon (herhangi bir odadaki en büyük boyut).

³ T2 tümörler sınıfı özelliklerine sahip tümörler 4 cm ve daha küçükse T2a, 4 cm büyük 5 cm'den küçük ise T2b olarak sınıflandırılır.

⁴ Çoğun plevral efüzyonlar tümör nedenlidir. Çok az hastada plevral sıvının mikroskopik incelemeleri tümör için negatiftir ve sıvı kanlı değildir. Klinik değerlendirmede, efüzyonun ilişkili olup olmadığı dikkate alınmalı ve evreleme dışlanmalıdır.

⁵ Bölgesel olmayan (uzak bölgedeki) nodülde dahildir.

Tablo 2.4 Akciğer kanser evrelerinin gruplandırılması (IASLC 8th Edition).

STAGE	T	N	M
Occult carcinoma	TX	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA1	T1mi	N0	M0
	T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T1c	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a	N2	M0
	T1b	N2	M0
	T1c	N2	M0
	T2a	N2	M0
	T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
IIIB	T1a	N3	M0
	T1b	N3	M0
	T1c	N3	M0
	T2a	N3	M0
	T2b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
IIIC	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
IVA	Any T	Any N	M1a
	Any T	Any N	M1b
IVB	Any T	Any N	M1c

2.3 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Küçük hücreli karsinomlar, farklı epitel dokularda meydana gelen, farklılaşmış ve oldukça agresif nöroendokrin tümörlerdir. En sık akciğer kanseri vakalarında görülür ve en yaygın olarak bronşiyal/solunum ağacında meydana gelir (Travis 2012). Gastrointestinal sistem, genitoüriner sistem, deri, kemik ve perikardiyumdan kaynaklı primer küçük hücreli karsinomlar daha az yaygındır (Rainal vd. 1992). KHAK'nin agresif doğası altında yatan nedenlerden biri ise, neredeyse tüm tümörlerde p53 tümör süpresör geninin ve retinoblastom 1'in biallellik inaktivasyonunu içeren yüksek mutasyon profiline sahip olmasıdır (George, Lim, Jang, Cun, Ozretia, vd. 2015). KHAK, tanısı almış hastaların neredeyse hepsinin sigara öyküsü vardır. Akciğer kanseri vakalarının %10-15'ini oluşturan KHAK, hızlı büyüme ve erken yaygın metastaz ile karakterize bir hastalıktır (Früh vd. 2013; Herbst, Heymach, ve Lippman 2008; Rudin vd. 2015). KHAK'li

hastalar yaygın evre (YE-KHAK) veya sınırlı evre (SE-KHAK) olarak sınıflandırılır. Genellikle tanı sırasında, hastaların %70'i YE KHAK tanısını alır (Horn, Reck, ve Spigel 2016). KHAK hastaları için sistemik tedavi seçeneklerinde son çeyrek asırda kayda değer ölçüde bir değişiklik olmamıştır. YE-KHAK için standart ilk basamak tedavi olarak ABD ve Avrupa'da etoposid ile cisplatin veya karboplatin kombinasyonları verilmektedir (Früh vd. 2013; George, Lim, Jang, Cun, Ozretia, vd. 2015; Hanna vd. 2006; Rudin vd. 2015; Sundström vd. 2002), Asya'da etoposid veya irinotekan ile cisplatin veya karboplatin kombinasyonları kullanılmaktadır (Yuankai Shi vd. 2015; Zhi, Yu, ve Shi 2015). Hastaların yaklaşık %80'i birinci basamak kemoterapiye yanıt verse de, çoğunda (yaklaşık% 80 SE-KHAK ve hemen hemen tüm YE-KHAK hastaları) tedavilerini takip eden ilk yıllarda hastalıkları nüksetmektedir (Hurwitz vd. 2009). KHAK tedavisi için immunoterapi ve kemoterapi ilaç kombinasyonları üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda alınan olumlu sonuçlar neticesinde; immunoterapi ajanlarından PD-1 inhibitörleri olan pembrolizumab, nivolumab ve PD-L1 inhibitörleri atezolizumab ile durvalumab metastatik KHAK tedavisi için kemoterapi ajanlarıyla kombine kullanımına FDA'den ilk basamak tedavi rejimi olarak onay verilmiştir (Konala vd. 2020). KHAK için birinci ve ikinci basamak tedaviler oldukça sınırlıdır ve yakın zamanda KHDAK adenokarsinomunda tümör genomik çalışmaları ve moleküler hedefe yönelik tedaviler KHAK için olumlu bir yanıt oluşturmamıştır.

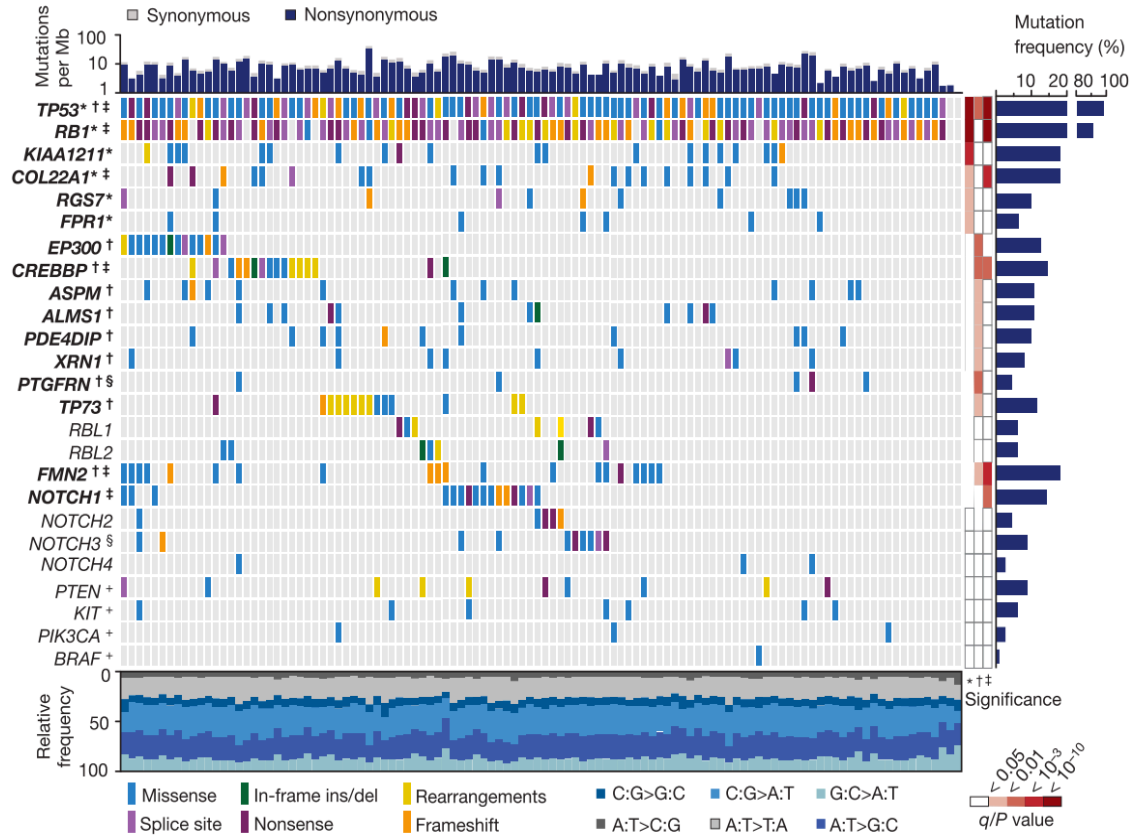
Sonuç olarak, KHAK'li hastalar için kötü prognoz devam etmektedir, SE-KHAK için ortalama genel sağkalım (OS) 15-20 ay iken YE-KHAK için 8-13 aydır (Chan ve Coward 2013). 5 yıllık sağkalım oranları SE-KHAK % 10-13, YE-KHAK için % 1-2 arasındadır (Zhao vd. 2018). Mevcuttaki sınırlı tedavi seçenekleri, KHAK'ine yönelik yeni terapötik yaklaşımların araştırılması için itici güç olmaktadır.

2.3.1 Küçük hücreli akciğer kanserinin genomik yapısı

Küçük hücreli akciğer kanserine moleküler açıdan ilk kez Todd ve arkadaşları sitogenetik ve heterozigotluk kaybı (loss of heterozygosity (LOH)) çalışmaları ile öncülük etmişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışmalarda karsinogenez sonucu meydana gelen kromozomal abnormaliteyi belirlemişlerdir. Belirlemiş oldukları defekt, akciğer kanserinin bütün alt türlerinde sıklıkla görülen 3. kromozomun kısa kolunda (3p) meydana gelen delesyonlardan kaynaklanmaktadır. Tümörigenezde 3p delesyonlarının rolünü açıklığa kavuşturmak için KHAK hücre hatlarında mikrosatellit ve floresan *in situ* hibridizasyon deneyleriyle, KHAK'nin 3p21 bölgesinde 1-2 megabazlık homozigot mutasyonların olduğunu göstermişlerdir (Todd vd. 1997). 3. kromozomun kısa kolunda meydana gelen

bu delesyonlar 3p14.3-3p14.2 lokusunda yer alan *FHIT* ve 3p12.3-3p12.2 lokusundaki *ROBO1* tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybına neden olabilmektedir (Angeloni vd. 2006). KHAK genomik profili üzerine yapılan başka bir çalışmada ise malign mezotelyoma (MM) ile KHAK ve KHDAK genomik hibridizasyon analizleri ile karşılaştırılmıştır. Tümörlerin patogenezinde yer alan kromozom 4 üzerindeki varsayılan tümör baskılayıcı genlerin yerlerini daha kesin olarak belirlemek ve haritalamak amacıyla, 16 polimorfik mikrosatellit marker kullanılarak LOH çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 20 MM, 21 KHAK ve 20 KHDAK hasta genomu ve 14 KHAK ile 17 KHDAK hücre hattı karşılaştırıldığında, MM ve KHAK, 4q33-34 (bölge R1;>%80), 4q25-26 (bölge R2;>%60) ve 4p15.1-15.3 (bölge R3;>%50) bölgelerinde yüksek sıklıkta kayıplar olurken, KHDAK'de daha düşük (>%20-30) sıklıkta meydana geldiği gösterilmiştir (Shivapurkar vd. 1999).

KHAK genomları son derece yüksek mutasyon oranlarına sahiptir, bir milyon baz çifti başına 8.62 non-sinonim mutasyon (Mb) ve, %28 oranında C:G>A:T transversiyonu barındırır (Peifer vd. 2012). Önemli ölçüde mutasyona uğramış genler arasında *TP53* ve *RB1* (Horowitz vd. 1990; Takahashi vd. 1989), *KIAA1211* ve *COL22A1* ile G-protein bağlı reseptör sinyal yolağında yer alan *RGS7* ve *FPR1* genleri yer alır (George, Lim, Jang, Cun, Ozretia, vd. 2015)(Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Küçük hücreli akciğer kanserinde genomik değişiklikler (George, Lim, Jang, Cun, Ozretia, vd. 2015).

Ayrıca, sentrozomda fonksiyonel rolleri olan *ASPM*, *ALMS1* ve *PDE4DIP* genleri ve RNA regülasyon geni *XRN1* ile tetraspanin geni *PTGFRN*'de önemli mutasyon kümelenmesi meydana geldiği gösterilmiştir (George, Lim, Jang, Cun, Ozretia, vd. 2015). Bunlara ek olarak *RB1* ile yakından ilişkili olan *RBL1* ve *RBL2* benzer şekilde inaktif translokasyonlar sergilemiştir (Schaffer vd. 2010).

KHAK tanısı almış hastaların tedaviye vermiş oldukları olumsuz yanıtların nedenini aramak için onkolojik terapötiklerin hedef genlerine bakıldığında, *BRAF*, *KIT*, ve *PIK3CA* genlerinin çeşitli mutasyonlara sahip olduğu gösterilmiştir (Hirota vd. 1998; Holderfield vd. 2014; Shibata vd. 2009). KHAK hastalarının genotiplendirilmesi, hedefe yönelik terapötik ajanların olası bir yararını daha verimli hale getirmek için çok önemlidir. Başka bir çalışmada programlanmış hücre ölümünü veya apoptozu inhibe eden bir protein olan Bcl-2'nin yüksek ekspresyon seviyesi radyasyon ve ilaç direnciliği ile ilişkilendirilmiştir. Bcl-2'nin yüksek ekspresyon seviyesi küçük hücreli akciğer kanseri olguları (%90) ve hücre dizilerinin çoğunda gözlenmiştir ve tedavi stratejisinde hedef gen olarak *BCL2* tartışılmıştır (Ziegler vd. 2009).

Hedgehog sinyal yolağı akciğer mikroçevresinden bağımsız olarak KHAK hücrelerinde aktif haldedir (Teglund ve Toftgård 2010; Vestergaard vd. 2006).

Hedgehog sinyal molekülü Smo'nun aktivasyonu KHAK'de klonojek aktiviteyi sağlarken fare deneylerinde karsinogenezin başlamasını ve ilerlemesini desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca hedgehog sinyal yolağının farmakolojik blokajının, özellikle kemoterapiyi takiben fare deneylerinde ve insan çalışmalarında KHAK'nin ilerlemesini/büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak ve kanserin nüksetmesini geciktirmek için terapötik bir strateji olarak tanımlanabileceğini savunmuşlardır (Park vd. 2011). WNT yolağının aktivasyonu KHAK'de onkogenik bir etki gösterirken NOTCH yolağının aktivasyonu tümör gelişimini inhibe etmektedir (Kunnimalaiyaan ve Chen 2007, Espinoza ve Miele 2013). KHAK'inde %25 oranında NOTCH sinyal yolağının inaktivasyonu gözlenmektedir (Development ve Pharmacology 2015; Espinoza ve Miele 2013).

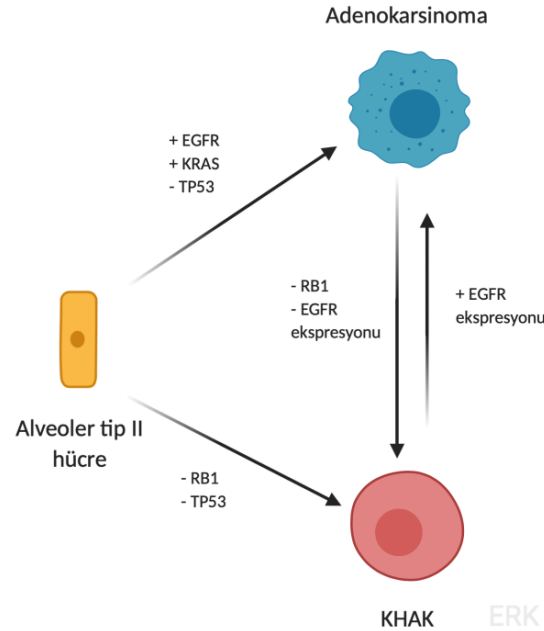
Fosfataz ve tensin homologu (Phosphatase and tensin homolog (*PTEN*)), PI3K/AKT/mTOR yolağını inhibe ederek çeşitli fizyolojik süreçleri düzenler. Shibata ve arkadaşları, KHAK hücrelerinde fosfatidilinositol-3-kinaz katalitik α (*PIK3CA*) mutasyonunun, triciribine hassasiyeti arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca, *PIK3CA* mutasyonuna sahip KHAK hücrelerinin cisplatine dirençli olan alt klonunu içeren hücreler, triciribine karşı daha yüksek bir hassasiyet göstermektedir (Shibata vd. 2009; Vestergaard vd. 2006).

Akciğer kanserinde Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü hedefli en çok kullanılan kemoterapi ajanları arasında tirozin kinaz inhibitörleri (erlotinib, gefitinib, afatinib) yer almaktadır. Fakat birinci basamak tedaviden sonra ortalama 12 aylık bir süre içinde (Mok vd. 2009), direnç gelişir ve tekrar alınan biyopsi numunelerinde EGFR inhibitörlerine karşı edinilmiş çeşitli direnç mekanizmaları gözlemlenmiştir. En yaygın direnç mekanizması, *EGFR*'de, Adenozin trifosfat (ATP) için reseptörün afinitesini arttıran ve inhibitörün varlığında sürekli olarak EGFR sinyalizasyonuna izin veren Thr790Met (T790M) mutasyonudur (Yun vd. 2008). Thr790Met mutasyonları, dirençli tümörlerden alınan numunelerin %50-60'ında rapor edilmiştir (Sequist vd. 2011; Yu vd. 2013). EGFR reseptörünün açık kalmasını sağlayan baypas mekanizması *MET* ve *HER2* amplifikasyonlarıdır. Bu mekanizma EGFR inhibitörlerine karşı oluşan dirençli tümörlerin %15-20'lik kısmında görülmektedir (Engelman vd. 2007; Sequist vd. 2011; Yu vd. 2013). EGFR inhibitörlerine karşı bir başka direnç mekanizması, *EGFR*-mutant adenokarsinomunun KHAK'ine histolojik transformasyonudur (Zakowski, Ladanyi, ve Kris 2006). Bu histolojik transformasyon üzerine yapılan RNA sekans çalışmalarında KHAK'inde *EGFR* ifadesinin oldukça düşük olduğu gösterilmiştir (George, Lim, Jang, Cun, Ozretia, vd. 2015). Yapılan başka bir çalışmada ise *EGFR* mutasyonu bulunan akciğer adenokarsinomlarında yapılan çalışmalar sonucunda KHAK'den KHAK'ne

dönüşüm sırasında *EGFR* ifadesinin önemli seviyede azaldığı gösterilmiştir (Şekil 2.5) (Niederst vd. 2015; Oser vd. 2015).

KHAK karakterizasyonunda, *MYC*, *MET*, *SOX2*, *SOX4*, *KIT* ve *FGFR1* genlerinin amplifikasyonları saptanmıştır (Gelsomino, Rossi, ve Tiseo 2014; Peifer vd. 2012; Rudin vd. 2012; Sos vd. 2012). *FGFR1* amplifikasyonu birinci basamak kemoterapiye cevap olarak daha kısa progresyonsuz sağkalım ile ilişkilidir (Park vd. 2015). *FGFR1* amplifikasyonunun hem *in vitro* hem de ksenograft modellerinde, küçük hücreli akciğer kanseri için potansiyel bir terapötik hedef olabileceği öngörülmüştür (Park vd. 2015; Thomas vd. 2014; Zhang vd. 2015). KHAK örneklerinin %27'sinde *SOX2* amplifikasyonu, %9'unda *RLF-MYCL1* gen füzyonları gözlenmiştir (Gelsomino vd. 2014). *SOX2* ve *RLF-MYCL1* füzyonunun tekrarlayan doğası ve fonksiyonelliği sayesinde, KHAK'de terapötik müdahale için ek fırsatlar sağlar (Rudin vd. 2012). Son dönemlerde yapılan genom düzeyindeki çalışmalarda KHAK vakalarının %16'sında *MYC* onkogeni ve *MYC* aile üyelerinin amplifikasyonları saptanmıştır (Peifer vd. 2012).

Yeni nesil sekans kullanılarak insan epigenomunun görselleştirilmesi, epigenetik süreçlerin karsinogenezdeki ve özellikle KHAK'deki rolünün belirlenmesini kolaylaştırmıştır (Baylin ve Jones 2011; Coe vd. 2013; Poirier vd. 2015). KHAK'nın alt



Şekil 2.5 Adenokarsinomdan küçük hücreli akciğer kanserine dönüşümüne yol açan moleküler olayları gösteren hipotetik model.

tiplerinin belirlenmesi kemoterapik ajanlara verdiği cevapların sınıflandırılması açısından metilasyon ve gen ekspresyonlarının önemli olduğu gösterilmiştir (Charles M. Rudin vd. 2019). KHAK alt tiplerinin belirlenmesinde *ASCL1* *NEUROD1* genleri öne çıkmaktadır (Charles M. Rudin vd. 2019). Yapılan başka bir çalışmada ise *ASCL1*, *NEUROD1*,

ASCL2, *INSM1*, *YAP1* ve *POU2F3* genlerinin güçlü bir korelasyon sağladığı ve ayrıca belirli biyolojik ilginin spesifik genlerin bütününde olduğu gösterilmiştir (Krushkal vd. 2020).

2.4 Epitelyal-Mezenkimal Transisyon

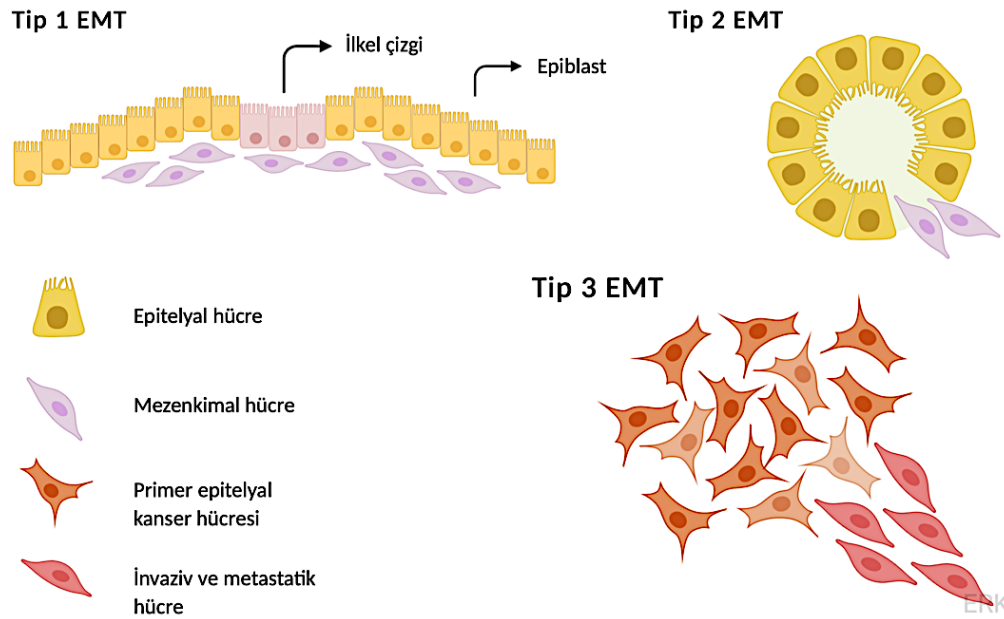
Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), hücrelerin epitel özelliklerini kaybettikleri ve mezenkimal hücre fenotip özellikleri kazandıkları hücresel bir süreçtir. EMT, sıklıkla embriyogenez tümör başlangıcı, malign ilerleme, tümör sapması, tümör hücre göçü, kana intravazasyon, metastaz ve tedaviye direnç gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlar ile ilişkilendirilmiştir (Brabletz 2012; Brabletz vd. 2018; Craene ve Berx 2013a). EMT ya da, mezenkimal epitelyal geçiş (MET), kök hücre farklılaşması veya yeniden programlamada önemli roller oynamaktadır (T. Chen vd. 2017). EMT'nin, epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin farklı seviyelerini ifade eden, epitelyal ve mezenkimal hücreler arasında ara morfolojik, transkripsiyonel ve epigenetik özellikler sergileyen, birkaç hücresel durum ile karakterize edilen kademeli bir şekilde ortaya çıktığı bilinmektedir (Hong vd. 2015; Jolly vd. 2016; Jordan, Johnson, ve Abell 2011; Pastushenko vd. 2018a). Epitelyal ve tamamen mezenkimal geçişteki ara durumlara kısmi, eksik veya hibrit EMT durumları denir.

Farklı kanser türlerinde yapılan ksenograft (Pastushenko vd. 2018a) ve hücre kültürü çalışmalarında epitelyal, mezenkimal belirteçlerin ekspresyonları araştırılmıştır. Meme, pankreatik, böbrek, akciğer, kolorektal ve yumurtalık kanseri hücre dizilerinde, bu iki belirtecin eş ifade edildiği hücrelerde, EMT hibrit durumunun varlığı düşünülmektedir (Bronsert vd. 2014; Hendrix vd. 1997; Hiew vd. 2018; Sampson vd. 2014; Schliekelman vd. 2015; Strauss vd. 2009). *In vitro* çalışmalarda hibrit fenotipin artan invazyon ve migrasyon yeteneği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Schliekelman vd. 2015; Strauss vd. 2011).

Karsinosarkomlar, klonal kökenli epitelyal ve mezenkimal kısımlar içeren, nadir bulunan tümörlerdir. Bu tümörler farklı organlardan gelen primer kanserlerde gözlenen spontan EMT paradigmasını temsil eder (Koba vd. 2018; Paniz-Mondolfi vd. 2015; Somarelli vd. 2015; Yabuuchi, Tanaka, ve Ono 2018).

Tip 1 EMT implantasyon, embriyogenez ve organ gelişimi sırasında görülür; bu EMT tipi organ fibrozu veya malign metastaz ile ilişkili değildir. Tip 2 EMT, yara iyileşmesi, organ fibrozu ve doku rejenerasyonunda rol alır. Yaralanmaya yanıt olarak ortaya çıkar ve onarım işlemlerine katkıda bulunur, dokuyu onarmaya yardımcı olmak

için fibroblastlar ve diğer hücrelerin üretiminde rol alır. EMT'nin bu tipi genellikle enflamasyon ile ilişkilidir ve enflamasyon bitince sonlanır. Eğer iltihaplanma tekrarlırsa ve tip 2 EMT uzun sürerse, bu durum organ hasarına neden olabilir ve çok ciddi sonuçlara yol açabilir. Son EMT tipi olan tip 3 EMT, kanser progresyonu ve metastazı ile ilişkilidir. Bu tip EMT tarafından üretilen hücreler dolaşıma dahil olarak metastaz oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Şekil 2.6) (Sohal vd. 2013).



Şekil 2.6 EMT-Tip 1 embriyo oluşumu EMT-Tip 2 doku rejenerasyonu ve EMT-Tip 3 kanser ilerlemesi.

2.4.1 EMT-MET transisyonunda kök hücrelilik ve plastisite

EMT'nin birden çok biyolojik süreçte rol oynadığı bilinmektedir. Bu biyolojik süreçlerde hücreler farklı epitel ve mezenkimal hücre fenotipleri sergilemektedir. Dolayısıyla hücre farklı transkripsiyonel etkinlik ve epigenetik karakterizasyona bürünmektedir. Kanser kök hücreleri, kendi kendine yenilenen ve primer tümörlerde bulunan farklı tümör hücresi tiplerine farklılaşabilen, artan tümörjenik potansiyele sahip bir tümör hücresi popülasyonunu tanımlar.

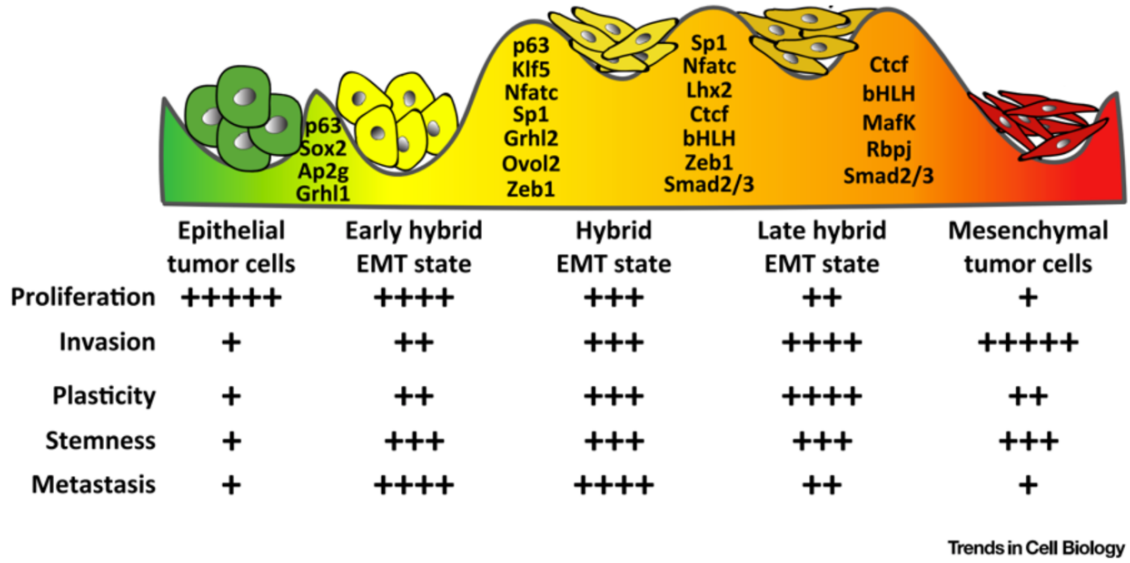
Tümör kök hücreliliğini değerlendirmek için tümör transplantasyonu, tümör kökeninin izlenmesi ve köken ablasyon yöntemi dahil olmak üzere hücresel deneyler geliştirilmiştir (Nassar ve Blanpain 2016). EMT ve tümör stemness ilişkisi *in vivo* olarak tümör transplantasyonundan sonra artan tümör yayılma potansiyelinin skorlanmasıyla gösterilmiştir. Epitel hücrelerinde Twist Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1

(TWIST1) veya Snail Family Transcriptional Repressor 1 (SNAI1) gibi EMT'yi destekleyen transkripsiyon faktörlerinin artan ekspresyonu, sekonder tümörlerin oluşma yeteneklerini arttırır (Mani vd. 2008; Morel vd. 2008).

Farklı tümör hücresi popülasyonlarının izolasyonunda EpCAM veya E-kaderin ifadesi yüksek primer tümörler, EMT tümör hücresi popülasyonlarının, artan tümör yayılma potansiyeli ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Latil vd. 2017; Rhim vd. 2012). Ovaryum kanseri gibi bazı modellerde hibrit EMT fenotipi, artan tümör kök hücrelilik fenotipi ile ilişkilirken, tamamen epitelyal veya tamamen mezenkimal fenotipler, kök hücre belirteçlerinin kaybı ve tümörjenisitesi ile ilişkilendirilmiştir (Strauss vd. 2009). Hibrit EMT popülasyonları, tümör epitel hücrelerine kıyasla tümör yayılımında beş kat daha agresif bir profil sergilemiştir (Pastushenko vd. 2018b).

EMT'nin sıklıkla epitelyal tümör hücrelerine kıyasla artan tümör yayılımı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Hibrit EMT popülasyonlarının geç EMT hücrelerine kıyasla daha klonojenik olduğunu ortaya koyulmaktadır. Bunlara ek olarak, mikro çevreye bağlı olarak farklı EMT alt popülasyonları diğer tüm popülasyonları doğurabilme özelliğine sahiptir, ancak bazı popülasyonlar belirli alt popülasyonlara evrilecek şekilde meyillidir. Bu veriler EMT'nin sıralı bir şekilde oluştuğunu ve tümör hücrelerinin farklı ara durumlardan geçerek epitel durumundan mezenkimal duruma ilerlediğini göstermektedir. Bununla birlikte, bazı tümör epitel hücrelerinin doğrudan yüksek mezenkimal durumlara sebep olması veya tümör mezenkimal hücrelerinin ara durumlardan geçmeden tümör epitel hücrelerine yol açması da mümkündür

Yukarıda bahsi geçen EMT aşamaları hem tümör kök hücreliliği hem de hücre plastisitesine göre 5 sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; stabil epitelyal, erken-faz melez EMT, melez EMT, geç-faz melez EMT ve stabil mezenkimaldır (Şekil 2.7) (Pastushenko ve Blanpain 2019).

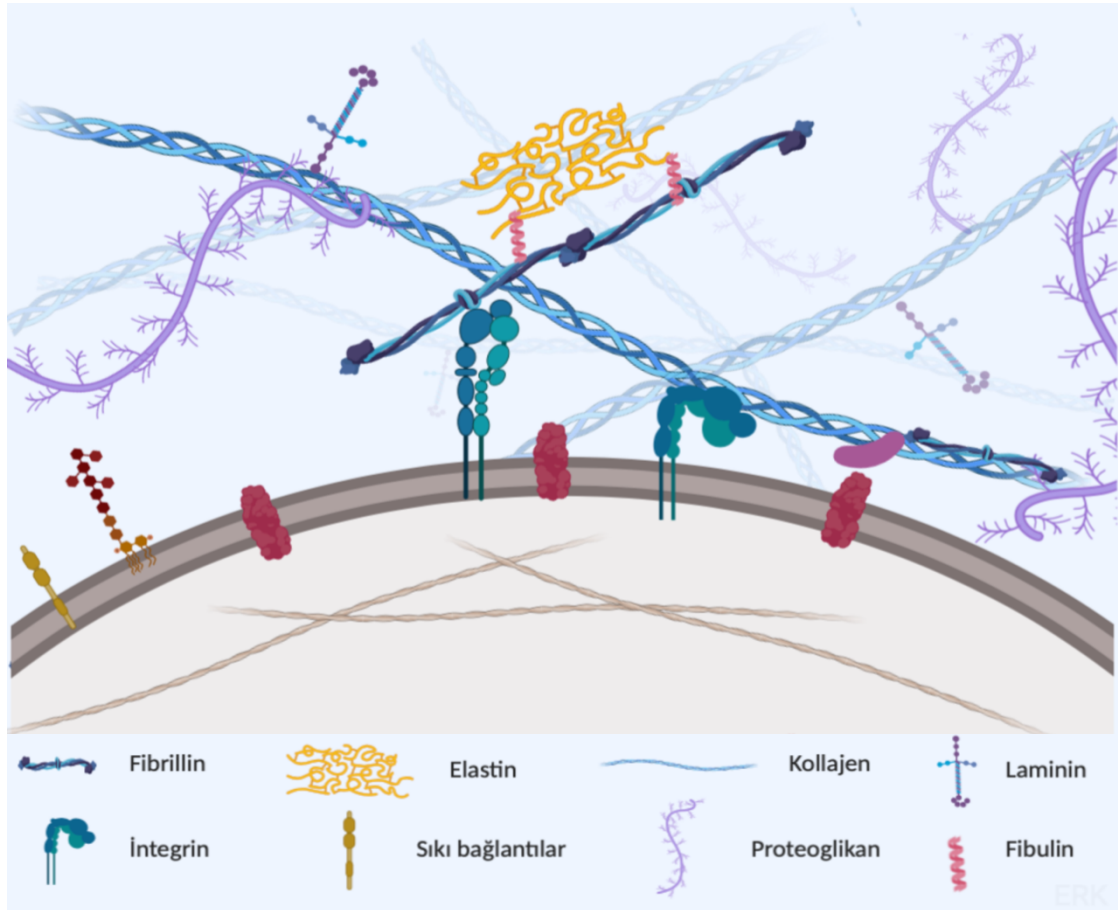


Şekil 2.7 EMT, geçiş durumları ve sahip oldukları fonksiyonel özellikler (Pastushenko ve Blanpain 2019).

2.5 Ekstraselüler Matriks ve Fibulinler

Ekstraselüler matriks (Extracellular Matrix (ECM)), doğası ve kompozisyonu bakımından çok çeşitlidir. Bu karakteristik özellik, hücreleri destekleme ve hücreler arası iletişimi düzenleme gibi birçok işleve hizmet etmesine yardımcı olur. Hücre motilitesini kontrol etmenin yanı sıra büyüme, gelişme, yara iyileşmesi ve fibroz için de gereklidir. ECM bileşenleri mevcut matrikste salgılanır. ECM'deki birçok protein, lamininler, fibronectin ve elastinler gibi nispeten büyük moleküller içeren glikoproteinlerdir. Diğer küçük ECM proteinleri hücreSEL davranışı ve fonksiyonları modüle eder (de Vega, Iwamoto, ve Yamada 2009).

Fibulinler, epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor (EGF) benzeri bir modülün ve benzersiz bir C-terminal fibulin tipi modülün ardışık tekrarları ile ortak bir multimodüler organizasyonu paylaşır (Barth vd. 1998). Fibulinler, supramoleküler ECM komplekslerinin montajında ve stabilizasyonunda rol almaktadır. ECM'nin yapısına ve stabilizasyonuna dahil olmaları nedeniyle, fibulinler doku organogenezi, vaskülojenez, fibrojenez ve tümörigenezde rol oynar. Fibulinler, bağ dokusu lifleri, bazal membranlar ve kan pıhtıları gibi ECM yapıları ile ilişkilidir (Şekil 2.8) (Argraves vd. 2003; Chu ve Tsuda 2004; Timpl vd. 2003).

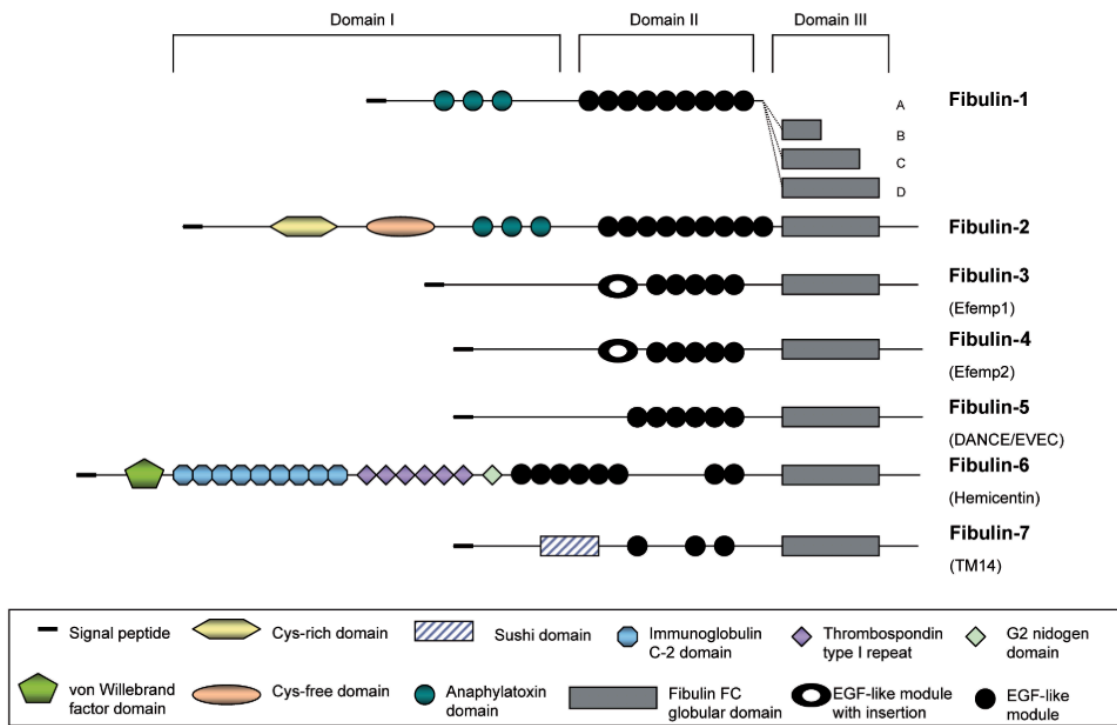


Şekil 2.8 Ekstraselüler matriks kompozisyonunda fibulinlerin yeri.

2.5.1 Fibulin protein yapısı

Fibulinler, domain I, II ve III gruplandırılmış modüllerden oluşur. Domain I, N terminalini temsil eder ve aile üyeleri arasında değişkenlik gösterir. Domain II, merkezi kısmı temsil eder ve bir tandem dizide değişken sayıda EGF benzeri modül içerir. EGF benzeri modüllerin çoğu, kalsiyum bağlanması için bir konsensüs sekansı içerir ve kalsiyum bağlayıcı EGF (cbEGF) benzeri modüller olarak bilinir. C-terminal kısmı, fibülinlere ve fibrillinlere özgü, fibulin tipi modül olarak adlandırılan domain III'tür (Şekil 2.9) (Giltay, Timpl, ve Kostka 1999). Fibulin ailesi iki alt gruba ayrılmaktadır. İlk grup fibulin-1 (100 kDa) ve fibulin-2 (195 kDa)'den oluşmaktadır. Fibulin 1 ve 2 diğer üyelerden daha büyüktür, çünkü domain I'de parazitlere karşı iltihaplanma ve savunmaya dahil olan tamamlayıcı sistemin bileşenleri olan ve ana kısımda daha fazla EGF benzeri modül olan üç anafilatoksin (AT) modülü vardır. Ek olarak, fibulin-2 N-terminal alanında sistein açısından zengin segmente sahip ve sistein amino asit rezidüleri olan iki ekstra kısım içerir (Şekil 2.9). İkinci alt grup üyeleri, fibulin-3, -4, -5, -6 ve -7 formlarından

oluşmaktadır. Bunların ilk üçü 50-60 kDa arasında bir moleküler ağırlığa sahiptirler ve “kısa fibulinler” olarak tanımlanmaktadır. Fibulin-6, 615 kDa moleküler ağırlığa sahip, dokuz immünoglobulin C-2 modülü ve altı trombospondin tip I tekrarı ile daha büyük bir N-terminal alanı içerir. Fibulin-7 50 kDa ağırlığında, suşi domaini içeren N terminal domain I ayrıca protein-protein etkileşimlerini içeren kompleman kontrol proteini (CCP) domaini ile kısa konsensüs tekrarı (SCR) olarak da bilinen domainlerden oluşmaktadır. Fibulin-3 ile fibulin-7 başlangıçta yeni proteinlerin araştırılması sırasında tanımlanmış ve farklı kısaltmalar verilmiştir. Fibulin motifi ve EGF alanlarının tandem dizisini içerdikleri için fibülin ailesinin üyeleri olarak sonradan tanınmışlardır (C. vd. 1999; Giltay vd. 1999; De Vega vd. 2007).



Şekil 2.9 Fibulin ailesi proteinlerinin domain yapıları (Giltay vd. 1999).

2.6 Hipotez

Küçük hücreli akciğer kanseri hücre dizilerinde Fibulin-3'ün epitelyal mezenkimal geçiş ve kanser kök hücre fenotipi üzerine etkisi olabilir.

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Gereçler

Çalışmada kullanılan hücreler Tablo 3.1’de, antikor ve primerler Tablo 3.2’de, kitler Tablo 3.3’de ve vektörler Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri.

Hücre Hattı	Çoğalma Özelliği	Kökeni
N417	Süspanse	Homo sapiens/ Karsinoma; Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
N417-adh	Monolayer	Homo sapiens/ Karsinoma; Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
H209	Süspanse	Homo sapiens/ Karsinoma; Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
H82	Süspanse	Homo sapiens/ Karsinoma; Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
HEK293T	Monolayer	Homo sapiens/ İmmortal böbrek epitel hücresi

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan antikor primer ve özellikleri.

Antikor ve Primerler	Firma/Marka
Fibulin-3 Antikor (C-3) sc-365224	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz
TCF8/ZEB-1 Antikor (D80D3)	Cell Signalig Technology
N-Kaderin Antikor (13A9)	Cell Signalig Technology

E-Kaderin Antikor (24E10)	Cell Signalig Technology
c-MYC (C33) sc-42	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz
Sox-2 (Y-17) sc-17320 Goat	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz
Snail	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz
Slug	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz
Twist	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz
Nanog	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz
Aldh1a1	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz
HIF1-alfa (28b) sc-13515	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz
GAPDH	Cell Signalig Technology
Mouse IgG Sekonder Antikor	Thermo Fisher Scientific
Rabbit IgG Sekonder Antikor	Thermo Fisher Scientific
Goat IgG Sekonder Antikor	Thermo Fisher Scientific
Bax Forward (oligonükleotit)	Sentegen
Bax Reverse (oligonükleotit)	Sentegen
Bcl-2 Forward (oligonükleotit)	Sentegen
Bcl-2 Reverse (oligonükleotit)	Sentegen
P21 Forward (oligonükleotit)	Sentegen
P21 Reverse (oligonükleotit)	Sentegen
PTEN Forward (oligonükleotit)	Sentegen
PTEN Reverse (oligonükleotit)	Sentegen
Siklin D1 Forward (oligonükleotit)	Sentegen
Siklin D1 Reverse (oligonükleotit)	Sentegen
hsa-miR-27a	Qiagen
hsa-miR-1200	Qiagen
hsa-miR-1243	Qiagen
hsa-miR-548a	Qiagen
hsa-miR-30e	Qiagen
hsa-miR-3179	Qiagen
hsa-let-7a	Qiagen
U6/Snord 48	Qiagen
Fibulin-3 Forward (oligonükleotit)	Sentegen
Fibulin-3 Reverse (oligonükleotit)	Sentegen
Beta-aktin Forward (oligonükleotit)	Sentegen

Beta-aktin Reverse (oligonükleotit)	Sentegen
Fibulin-3 EcoRI Forward (oligonükleotit)	Sentegen
Fibulin-3 EcoRI Reverse (oligonükleotit)	Sentegen

Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan kitler ve özellikleri.

Kitler	Firma/Marka
NEB 5-alfa Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	New England Biolabs (NEB)
HiSpeed Plasma Maksi Kit (Cat no: 1263)	Qiagen
Nucleo Spin Plasmid Quick Pure (Product.Code 16311616)	Macherey-Nagel
GenepHlow Gel/PCR kit (DFH300)	Geneaid
E.Z.N.A DNA probe Purification Kit (D6538)	OMEGA
ON-TARGETplus Human EFEMP1 (2202) siRNA- SMART pool 10nmol	Dharmacon
EcoRI (NEB# R3195)	New England Biolabs (NEB)
T4 ligaz (EL0011)	Thermo Fisher Scientific
FastAp Thermosensitive Alkaline Phosphatase (EF0651)	Thermo Fisher Scientific
miRNeasy Mini Kit (Cat No: 217004)	Qiagen
RT ² First Strand Kit (50)	Qiagen
Platinum Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
QuantiTect SYBR Green PCR Kit (204143)	Qiagen

Tablo 3.4 Çalışmada kullanılan vektörler ve özellikleri.

Vektörler	Temin Edilen Kişi/Firma
FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP (Plasmid 29703)	Addgene
EFEMP1-Human, 4unique 29 mer shRNA retroviral vektör (Cat: TR213284)	Origene
pCDH-CMV-MCS-EF1-puro lentiviral (Cat: CD510B)	Dr. Öğr. Üyesi Onur Tokgün
pMD.G2 (Zarf vektör)	Dr. Öğr. Üyesi Onur Tokgün
psPAX2 (Paketleme vektörü)	Dr. Öğr. Üyesi Onur Tokgün

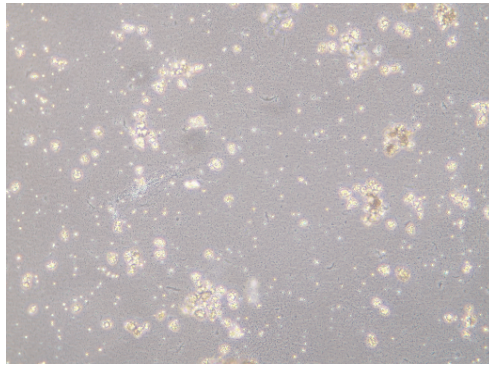
Tablo 3.5 Çalışmada kullanılan tamponlar.

Tamponlar/Solüsyonlar	Firma/Marka
4X Yükleme Tamponu	Laemli Buffer (Kat.No: 1610747, BioRad), β-merkaptotanol (Kat. No:805740, MerckMillipore). (1/9)
1,5 M Tris Base (pH: 8.8)	Tris (Kat. No: TRS001, BioShop)
%10 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS):	SDS (Kat. No: SDS001, BioShop)
%10 Amonyum persülfat (APS)	APS (Kat. No:1610700, BioRad)
Running (Yürütme) Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0,1 SDS):	Tris Base (Kat. No: TRS001, BioShop) Glisin (Kat. No: GLN002, BioShop) SDS (Kat. No: SDS001, BioShop)
TBS-T	Tris (Kat. No: TRS001, BioShop) NaCl (Kat. No: SOD001, BioShop)
Phosphate-buffered saline, (PBS)	1X PBS (Kat. No: 10010023ThermoFisher)
RIPA tamponu	10X RIPA (Kat. No:9806, Cell Signaling Technology)
Kloroform	Kloroform (Kat. No:288306, Sigma-Aldrich)
Trizol	Qiazol (Kat. No:79306, Qiagen)
İzopropanol	Kat. No:109634, Merck
Etanol	Kat. No:100983, Merck
Dimetilsülfoksit (DMSO)	DMSO (Kat. No: DMS666 BioShop)
Fetal dana serumu	FBS (Kat. No:10500064, Gibco)
RPMI1640 besiyeri	RPMI 1640 (Kat. No:52400-025, Gibco)
DMEM besiyeri	DMEM (Kat. No:41965-039, Gibco)

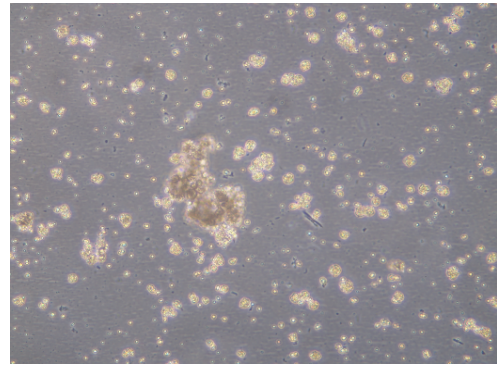
3.2 Yöntemler

3.2.1 Hücre kültürü

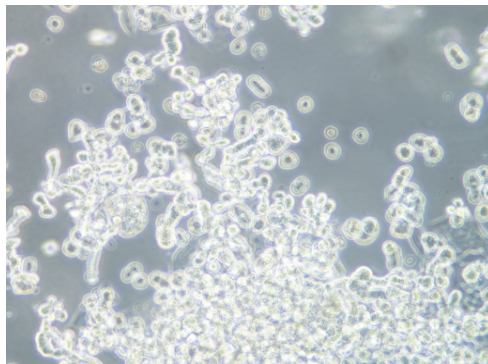
Çalışmada kullanılan, KHAK hücre dizisi H82, H209 Şap Enstitüsünden (TÜRKİYE) HEK293T ve N417 hücreleri Prof. Dr. Hakan AKÇA'dan (T.C. Pamukkale Üniversitesi, TÜRKİYE) temin edildi. H82 ve H209 ve N417 hücre dizisi %10 fetal dana serumu (FBS, Kat. No:10500064, Gibco) ve %0,5'lik penisilin/steptomisin içeren RPMI1640 (Kat. No:52400-025, Gibco) besi ortamında, HEK293T hücre dizileri %10 fetal dana serumu ve %0,5'lik penisilin/steptomisin içeren DMEM (Kat. No:41965-039, Gibco) besi ortamında 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava ortamında kültüre edildi.



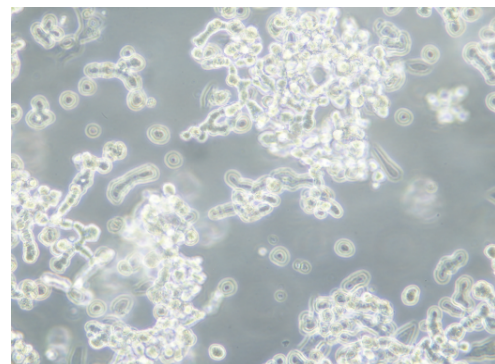
H82



H209



N417



N417-adh

Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan hücre dizilerinin mikroskobik görüntüsü.

3.2.2 Hücrelerin çözülmesi ve dondurulması

Daha önceden dondurularak -80°C 'de saklanan hücreler önceden ayarlanmış olan su banyosunda (37°C) 1-2 dakika inkübe edilerek çözümleri sağlandı. Steril 15 ml'lik falkon tüp içerisinde 5 ml besiyeriyle karıştırıldıktan sonra $100\times$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı ve falkon tüpün dibinde kalan pelet 5 ml besiyeriyle yumuşak bir pipetajlamayla homojen hale getirilerek flaslara aktarıldı.

Hücreleri dondurmak amacıyla 9 ml besiyeri ile 1 ml dimetilsülfoksit karıştırılarak %10 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren besiyeri hazırlandı. Hücreler dondurma işlemi için 15 ml'lik steril falkonlara aktarıldı ve $100\times$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısım aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Daha önceden hazırladığımız %10 DMSO'lu besiyeriyle yumuşak pipetajlama işlemiyle homojen hale getirildi. Dondurma işlemi sonrasında hücreler -80°C 'ye kadar dayanıklı özel cryo tüplere aktarılarak -80°C 'de saklandı.

3.2.3 RNA izolasyonu

Çalışmada kullanılacak hücrelerde Fibulin-3'ün ekspresyonunu ve hipotezimiz gereği mikroarray analizi ve mikroarray analizinin teyiti için qPCR çalışmalarında kullanılacak RNA'ların izolasyonu yapıldı;

- i. Hücrelerin adherent ve süspanse özelliklerine göre farklı işlemler yapılarak, besiyerleri uzaklaştırılıp PBS ile yıkandı.
- ii. Hücre pelletleri 500 μl trizol ile yeteri şekilde pipetaj yapılarak steril 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılıp 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- iii. 5 dakikalık inkübasyon sonrası 200 μl kloroform eklenip vorteks işleminden sonra 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- iv. 2-3 dakika inkübe edildikten sonra $12000\times$ 'de 4°C 'de 15 dakika santrifüj edildi.
- v. Santrifüj sonunda 3 farklı faz gözlemlendi; akuaz faz, beyaz faz ve pembe faz, orta kısımda DNA içeriği bulunan beyaz faza temas edilmeden üst faz çekildi.
- vi. Steril ependorf tüpe aktarılan akuaz faza 500 μl izopropil alkol eklenerek 6-8 defa alt üst yapıp oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- vii. İnkübasyon sonunda örnekler $12000\times$ 'de 4°C 'de 10 dakika santrifüj edildi.
- viii. Santrifüj sonrası pellet hareket ettirilmeden süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve pellete 500 μl %70 etanol eklenerek hafif bir vorteks yapıldı.
- ix. Örnekler $7000\times$ 'de 4°C 'de 10 dakika santrifüj edildi.

- x. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak pelletin kuruması için ependorf tüplerin kapakları açık bırakıldı.
- xi. Kurumuş olan pelletler 20-25 µl nükleaz içermeyen dH₂O'de çözülerek 10 dakika 60°C'de inkübe edildi.
- xii. İnkübasyon sonunda RNA kalitesi ve miktarı Nanodrop cihazı ile belirlendikten sonra örnekler kullanılacağı zamana kadar saklanmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.4 MiRNA izolasyonu

Fibulin-3 over ekspresyon vektörü, Fibulin-3 siRNA ve Fibulin-3 shRNA'lar aracılığıyla Fibulin-3 ifadesi yeniden düzenlenen KHAK hücre dizilerinde Fibulin-3 ifadesindeki artış ya da azalmaya bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'ları belirlemek ve mikroarray sonuçlarını teyit etmek amacıyla hücrelerden miRNA izolasyonu yaptık. İzolasyon miRNeasy Mini kit (Kat No: Qiagen) aracılığıyla yapıldı. MiRNA izolasyonları aşağıda belirtilen protokole göre yapılmıştır:

- i. Hücreler 250xg'de santrifüj edilip besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pellet PBS ile yıkandı.
- ii. Hücre pelletleri 700 µl trizol ile yeteri şekilde pipetaj yapılarak steril 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı ve örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- iii. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra 140 µl kloroform eklenip vorteks işlemi gerçekleştirildi ve oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübasyona bırakıldı.
- iv. İnkübasyon sonrası örnekler 12000xg'de 4°C' de 15 dakika santrifüj edildi.
- v. Santrifüj sonunda 3 farklı faz gözlemlendi; akuaz faz, beyaz faz ve pembe faz. *Orta kısımda DNA içeriği bulunan beyaz faza temas edilmeden üst faz çekildi.
- vi. Çekilen üst faz yeni bir tüpe aktararak 1,5 katı kadar %100'lük EtOH eklendi ve pipetaj yapıldı.
- vii. RNeasy mini spin kolonlara 700 µl örnek aktarıldı. Oda sıcaklığında 8000x g'de 15 saniye santrifüj edildi ve alt faz atıldı (Örneğin kalan kısmı aynı kolonlara aktararak vii. basamakta yapılan işlemler tekrarlandı).
- viii. RNeasy mini spin kolona 700 µl Buffer RWT eklenerek oda sıcaklığında 8000xg'de 15 saniye santrifüj edildi ve alt faz atıldı.
- ix. RNeasy mini spin kolona 500 µl Buffer RPE eklenerek oda sıcaklığında 8000xg'de 15 saniye santrifüj edildi ve alt faz atıldı.

- x. RNeasy mini spin kolona 500 µl Buffer RPE eklenerek oda sıcaklığında 8000xg'de 2 dakika santrifüj edildi ve alt faz atıldı.
- xi. RNeasy mini spin kolon 1,5 ml temiz ependorf tüpe aktarıldı ve kurutma işlemi için oda sıcaklığında 16000xg'de 3 dakika santrifüj edildi.
- xii. RNeasy mini spin kolon 1,5 ml temiz ependorf tüpe aktarıldı ve kolona 20 µl RNaz içermeyen steril su eklenerek oda sıcaklığında 12000xg'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA ependorf tüpe aktarıldı.
- xiii. RNA'ların kalite ve konsantrasyonları nanodrop ile ölçüldükten sonra kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.2.5 Nükleik asit miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi

Örnekten izole ettiğimiz DNA, RNA ve ayrıca izole edilen RNA'lardan çevirilen cDNA nükleik asitlerinin 230 nm, 260 nm ve 280 nm değerleri NanoDrop 2000 cihazında ölçülerek her bir örneğin ayrı ayrı konsantrasyonları ve saflık kalitesi hesaplandı.

Hesaplamalarda 260nm/280nm oranı DNA için ~1.8 RNA için ~2 olarak kabul edildi.

260nm Nükleik asit

280nm Protein

230 nm Ortam (şeker, tuz, fenol)

3.2.6 cDNA sentez reaksiyonları

3.2.6.1 Total RNA'dan cDNA eldesi

Hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden, *EFEMP1* ve ilgili genlerin ekspresyon seviyelerini qPCR'da belirlemek için RT²First Strand Kit (Kat. No:330404, Qiagen) kullanılarak cDNA reaksiyonları gerçekleştirildi. cDNA reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve reaksiyon şartları aşağıda verilmiştir (Tablo 3. 6, 3. 7).

Tablo 3. 6 mRNA'dan cDNA'ya çevirme reaksiyonları (1. basamak).

RNA (200ng- 2µg)	1,5 µg	} 1.Basamak 42°C'de 5 dakika Buzda 1 dakika
Buffer GE	2 µl	
ddH ₂ O	Değişken	
Toplam	10 µl	

Tablo 3.7 mRNA'dan cDNA'ya çevirme reaksiyonları (2. basamak).

Control P2	1 µl	} <u>2. Basamak</u> 42°C'de 15 dakika 95°C'de 5 dakika
5x Buffer BC3	4 µl	
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl	
ddH ₂ O	3 µl	
Toplam	20 µl	

Reaksiyon sonunda cihazdan çıkarılan cDNA örnekleri buz üzerine bir süre bekletildikten sonra -20°C'de saklandı.

Not: Birinci basamağın reaksiyon süresi tamamlandığında, önceden hazırlanan ikinci basamak karışımı tüplere eklenerek ikinci basamak şartları gerçekleştirilir.

3.2.6.2 Total miRNA'nın cDNA'ya çevrimi

Hücrelerden izole edilen total miRNA örneklerinden, miRNA ekspresyon seviyelerini Real-Time PCR'da belirlemek için miScript II RT Kit (Kat. No:218161, Qiagen) kullanılarak cDNA reaksiyonları gerçekleştirildi. cDNA reaksiyonu için kullanılan kimyasallar ve reaksiyon şartları aşağıda verilmiştir (Tablo 3. 8).

Tablo 3.8 miRNA'dan cDNA'ya çevirme reaksiyonları.

RNA	1,5 µg	} 37°C'de 60 dakika 95°C'de 5 dakika
10X Nucleics Mix	2 µl	
5x Hispect Mix	4 µl	
miScript Revers Transcriptase Mix	2 µl	
ddH ₂ O	Değişken	
Toplam	10 µl	

Reaksiyon sonunda cihazdan çıkarılan cDNA örnekleri buz üzerine bir süre bekletildikten sonra -20°C'de saklandı.

3.2.7 Real Time PCR (qPCR)

3.2.7.1 Örneklerin mRNA ekspresyon seviyelerinin analizi

KHAK N417, H209 ve H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak artan ya da azalan mRNA'ların ifadelerini saptamak amacıyla örneklerden izole edilen RNA'lar, cDNA'ya çevrildikten sonra örnekler BrightGreen 2X qPCR MasterMix'i (Kat No: MasterMix-S) kullanılarak Corbett Rotor-Gene 6000 cihazında reaksiyonlar gerçekleştirildikten sonra analiz edildi. qPCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve reaksiyon şartları aşağıda verilmiştir (Tablo 3. 9).

Tablo 3.9 mRNA için qPCR reaksiyon miktarları

cDNA (1/5 sulandırılmış)	2,5 µl
BrightGreen 2X qPCR	5 µl
Forward (ileri) primer (10 µM)	0,3 µl
Reverse (geri) primer (10 µM)	0,3 µl
ddH ₂ O	1,9 µl
Toplam	10 µl

95°C'de 10 dakika } 1 Döngü
 95°C'de 5 saniye }
 60°C'de 60 saniye } 40 Döngü
 55°C-90°C arası 0,1°C Melting curve

qPCR için reaksiyonlar 3'lü tekrarlı kurulmuştur ve endojen kontrol olarak β-Aktin kullanıldı. Sonuçların analizi için kopya sayısı ve $2^{-\Delta\Delta C_q}$ metodu kullanıldı.

3.2.7.2 Örneklerin miRNA ekspresyon seviyelerinin analizi

KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 indüksiyonuyla upregüle ya da downregüle olan miRNA'ların ekspresyon seviyelerini saptamak amacıyla örneklerden miRNA izolasyonu yaptık. İzole edilen miRNA'lar cDNA'ya çevrildikten sonra örnekler QuantiTect SYBR Green (Kat. No:204143, Qiagen) PCR kiti kullanılarak CFX Bio-Rad cihazında analiz edildi. qPCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve reaksiyon şartları aşağıda verilmiştir (Tablo 3. 10).

Tablo 3.10 miRNA için qPCR reaksiyon miktarları

cDNA (1/5 sulandırılmış)	2 µl
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
10x miScript Primer Assays	2 µl
10x Universal Primer	2 µl
ddH ₂ O	4 µl
Toplam	20 µl

95°C'de 15 dakika } 1 Döngü
 95°C'de 15 saniye }
 55°C'de 30 saniye } 40Döngü
 72°C'de 30 saniye }
 55°C-90°C arası 0.1°C Melting curve

qPCR için reaksiyonlar 2 tekrarlı kurulmuştur ve normalizatör olarak U6 ve Snord61 kullanıldı. Sonuçların analizi için $2^{-\Delta\Delta C_q}$ metodu kullanıldı.

3.2.8 Western Blot

KHAK H82, H209 ve N417 ve N417-adh hücre dizilerinde Fibulin-3 protein düzeyine ve ilerleyen deneyler sürecinde Fibulin-3'ün upregülasyonu ve downregülasyonu sonucu ifadesi değişen proteinlerin ifadeleri SDS-PAGE temelli Western Blot yöntemiyle belirlenmiştir.

3.2.8.1 Örneklerden protein izolasyonu

Western Blot deneyinde değerlendirmek üzere kullanılacak proteinlerin izolasyonu için aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

- Hücreler 250xg'de santrifuj edilip besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra soğuk PBS ile 2 kez yıkandı.
- 15000xg'de santrifüj edilip PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1X RIPA + proteaz inhibitör kokteyli (Kat. No: 5871, Cell Signaling Technology) buffer (Kat. No: 9806, Cell Signaling Technology) ile iyice pipetaj yapıldı.
- RIPA buffer ile homojen hala getirilen örnekler 15 dakika buz üstünde inkübe edildi.
- Bir seri pipetaj ve vorteks işleminden sonra buzda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sürecinin sonunda 15000xg'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant steril ependorf tüplere aktarıldı.

3.2.8.2 Protein miktar tayini

Protein izolasyon işlemi tamamlandıktan sonra Bradford metoduyla miktar tayini yapıldı.

- i. 1/1000 oranında sulandırılmış protein örneklerinin ¼'ü oranında Bradford dye reaktifi (Kat No: BioRad 500-0006) eklendi.
- ii. Ölçüm eğrisi için 25, 12.5, 5, 2.5 ve 1 µg BSA standartları kullanıldı.
- iii. Hazırlanan örnekler ve standartlar 96 kuyucuklu plaklara dağıtıldı.
- iv. Absorbans ölçümler 595 nm dalga boyunda Glomax Multi Detection System (Promega) cihazında gerçekleştirildi.

3.2.8.3 SDS-PAGE jelin hazırlanması ve Western Blot analizi

Western blot analizi aşamalarında kullanılan kimyasallar ve hazırlanışı aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır.

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) için proteinlerin yüklemeye hazırlanması:

- i. Bradford sonucuna göre bütün örnekler 50 µg protein yüklenecek şekilde steril ependorflara aktarıldı.
- ii. 3:1 oranında olacak şekilde steril ependorflara aktarılan proteinler 4x yükleme tamponu ile pipetaj yapılarak homojen hale getirildi.
- iii. Ependorfların kapakları kısıkaç ile tutturulduktan sonra 95°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- iv. İnkübasyon sonrası kısa bir santrifüj yapılan örnekler daha önceden hazırlanan yürütme tamponunda bekleyen jele yüklendi.

4X Yükleme Tamponu:

900 µl Laemli Buffer (Kat.No: 1610747, BioRad), 100 µl β-merkaptöetanol (Kat. No:805740, MerckMillipore).

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) için jelin hazırlanması ve örneklerin yüklenmesi:

- i. Mini-PROTEAN (BioRad) Western Blot sisteminin stantları hazırlandı.
- ii. Tablo 3.10'da verilen protokole göre ayrıştırma ve yükleme jelleri istenilen konsantrasyonlara göre hazırlandı.

- iii. Jel stantlarında tamamen polimerize olmuş olan jeller yürütme tankına yerleştirildi.
- iv. Yürüme tankına, istenilen seviyeye kadar yürütme tamponu koyuldu.
- v. Yüklemeye hazır haldeki örnekler yürütme tamponundaki jellere seri bir şekilde yüklendi.
- vi. Örneklerin yükleme işlemi bittikten sonra jeller 100 V'ta 90 dakikada yürütüldü.

Tablo 3.11 Western blot jel hazırlama tablosu

	Ayrıştırma Jeli (Separating) %8	Ayrıştırma Jeli (Separating) %10	Yükleme Jeli (Stacking) %5
dH ₂ O	4.6 ml	6,15 ml	3,05 ml
%30 Akrilamid/bis-akrilamid (29:1, Kat. No: 1610156, BioRad)	2.7 ml	5 ml	850 ml
1.5 M Tris pH: 8.8	2.5 ml	3,75 ml	-
0.5 M Tris pH: 6.8	-	-	1,25 ml
%10 SDS	100 µl	150 µl	50 µl
%10 Amonyum persülfat (APS)	100 µl	75 µl	25 µl
TEMED (Kat. No:1610800, BioRad)	6 µl	7,5 µl	5 µl

1,5 M Tris Base (pH: 8.8):

100 ml'lik 1,5 M Tris Base için; 18.17 gr Tris (Kat. No: TRS001, BioShop) tartıldı ve 70-80 ml dH₂O ile çözüldü pH: 8.8'e ayarlanarak son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 0.8 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılıncaya kadar +4°C'te saklandı.

0,5 M Tris Base (pH: 6.8):

100 ml'lik 0,5 M Tris Base için; 6.04 gr Tris (Kat. No: TRS001, BioShop) tartıldı ve 70-80 ml dH₂O ile çözüldü pH: 6.8'e ayarlanarak son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 0.8 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılıncaya kadar +4°C'te saklandı.

%10 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS):

100 ml'lik %10 SDS için; 10 gr SDS tartıldı, 100 ml dH₂O ile çözüldü. 0.8 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

%10 Amonyum persülfat (APS):

250 µl %10'luk APS için; 0.025 gr APS (Kat. No:1610700, BioRad) tartıldı ve 250 µl dH₂O ile çözüldü ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Running (Yürütme) Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.1 SDS):

İki jel yürütmek için (1 L); 3.03 gr Tris Base, 14.26 gr Glisin (Kat. No: GLN002, BioShop) ve 1 gr SDS (Kat. No: SDS001, BioShop) tartıldı ve dH₂O ile çözüldü.

PVDF membrana ıslak transfer:

- i. Elektroforez sonrası ayrıştırma jeli transfer tamponunun için 15 dakika inkübe edilerek dengeleme işlemi yapılmıştır.
- ii. PVDF (Polyvinylidene flüoride, Kat. No: IPVH00010, Merck Millipore) membran oda sıcaklığında metanolde 5 dakika inkübe edildi.
- iii. Transfer tamponunda dengelenmiş jel, PVDF membran ve önceden kesilip hazırlanmış kurutma kağıtlarıyla sandviç modelinde hazırlanmıştır.
- iv. Islak transfer için +4°C'de 70-100 mA'de 16-24 saat transfer işlemi yapılmıştır.
- v. Transfer işleminin başarılı bir şekilde olup olmadığını kontrol etmek için 5 dakika Ponceau S boyası ile inkübe edilerek membrandaki bantlar gözlemlendi.

Transfer Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.05 SDS):

1 L'lik transfer tamponu hazırlamak için; 2.42 gr Tris (Kat. No: TRS001, BioShop), 11.41 gr Glisin (Kat. No: GLN002, BioShop) ve 0.4 gr SDS (Kat. No: SDS001, BioShop) 800 ml dH₂O ile çözüldü ve daha sonra eklemek üzere 200 ml metanol ile +4°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.8.4 İmmunoblotlama ve görüntüleme

Transfer işlemi tamamlanmış membranın immunoblotlama ve görüntüleme işlemi aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

- i. Transfer işlemi bittikten sonra membranlar jelin boyuna uygun bir şekilde kesilerek SDS'i uzaklaştırmak için 5 dakika TBS-T ile 150-200 rpm'de çalkalanarak yıkandı.
- ii. %5'lik yağsız süt (Kat. No: 170-6404, BioRad) ile 90-120 rpm'de 1-2 saat bloklama yapıldı.
- iii. Primer antikör için 1:200-1:1000 oranında hazırlanan %5'lik yağsız süt veyahut %5'lik BSA ile oda sıcaklığında 1 saat ya da 4°C'te 16 saat çalkalanarak inkübe edildi.

- iv. Primer antikor inkübasyonundan sonra membran, TBS-T ile oda sıcaklığında 5-15-5 dakika 150-200 rpm'de çalkalanarak yıkandı.
- v. Yıkama işleminden sonra membran HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor (Kat. No: 5450-0010, Seracare) ile 1:10000 oranında hazırlanan %5'lik yağsız süt ile oda ısısında 1 saat boyunca 90-120 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi.
- vi. Sekonder antikor inkübasyonundan sonra TBS-T ile oda sıcaklığında 5-15-5 dakika 150-200 rpm'de çalkalanarak yıkandı.
- vii. Yıkama işlemleri sonunda kemilüminesans reaksiyon için Enhanced Chemiluminescence (ECL Kat. No: WBLUF0500, Millipore) kullanılarak spesifik protein bantları Odyssey ® Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) görüntüleme cihazında görüntülenerek analiz edildi.

TBS-T (25 mM Tris pH:7.6, 34 mM NaCl (Kat. No: SOD001, BioShop), %1 Tween 20 (Kat. No:1706531, BioRad):

20X 1 L TBS hazırlamak için; 48.46 gr Tris (Kat. No: TRS001, BioShop), ve 175.32 gr NaCl (Kat. No: SOD001, BioShop) 1 L dH₂O'da çözüldü.

1X 1 L TBS-T hazırlamak için; 50 ml 20X TBS, 950 ml dH₂O ve 1 ml Tween 20 çözeltisi hazırlandı.

%5'lik yağsız süt/BSA:

50 ml %5'lik yağsız süt/BSA hazırlamak için; 2.5 gr yağsız süt tozu/ BSA (Kat. No: 170-6404, BioRad) 50 ml TBS-T de çözüldü.

3.2.9 siRNA ve plazmit DNA transfeksiyonları

Tez çalışması boyunca Fibulin-3'ün aşırı ifadesini sağlamak için ekspresyon vektörü FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP (Plasmid 29703) vektörü kullanıldı. Fibulin-3 ifadesini baskılamak için mRNA'sını hedef alan ON-TARGETplus Human EFEMP1 (2202) siRNA-SMART pool 10nmol kullanıldı. Çalışmada kullanılan hücre hatları transfeksiyon için 6 kuyucuklu plakaya ekim yapılarak tablo 3.11 ve 3.12'de verilen değerler doğrultusunda gerçekleştirildi.

Tablo 3.12 Fibulin-3 ekspresyon vektörü için transfeksiyon oranları.

FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP		
Ekilen hücre miktarı		1x10 ⁵
A	Plazmit DNA	2,5 µg
	Opti-MEM	~125 µl
B	Lipofectamin 2000	5 µl
	Opti-MEM	120 µl

Tablo 3.13 Fibulin-3 siRNA için transfeksiyon oranları.

ON-TARGETplus Human EFEMP1 siRNA		
Ekilen hücre miktarı		2x10 ⁵
A	siRNA (10 µM)	4-8 µl
	Opti-MEM	121-117µl
B	Lipofectamin 2000	5 µl
	Opti-MEM	120 µl

Transfeksiyon için hazırlamış olduğumuz A ve B tüpleri oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra A tüpü B tüpüne aktarılarak pipetaj yöntemiyle homojen hale getirildi. Karışım oda sıcaklığına 15 dakika inkübe edildikten sonra yaklaşık 10-15 cm yukarıdan hücrelere damla damla verildi.

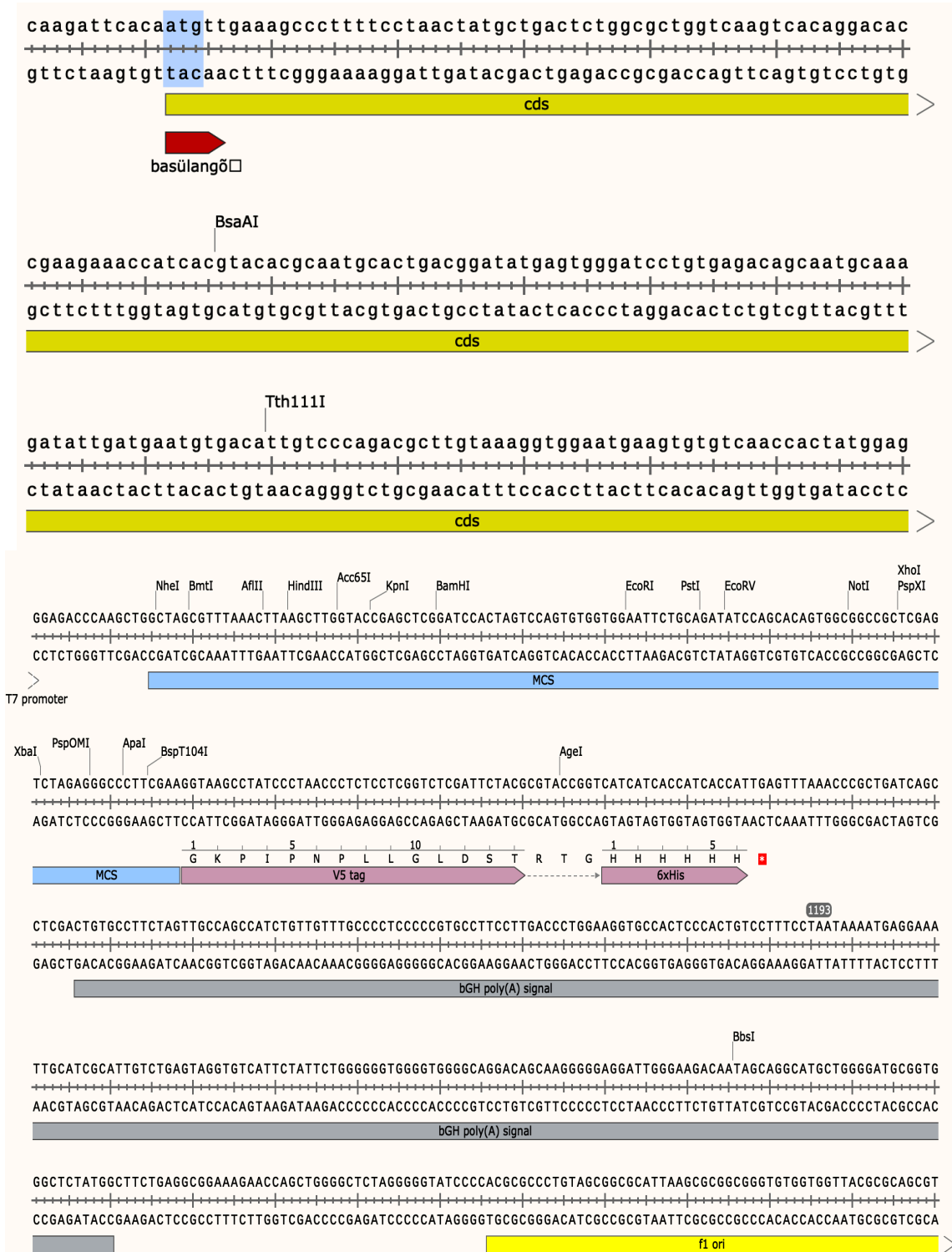
3.2.10 Antisense ekspresyon vektörlerinin oluşturulması

Fibulin-3 ifadesinin tespit edildiği hücrelerde Fibulin-3 ifadesini baskılamak için lentiviral kalıcı antisense ekspresyon vektörünü oluşturmayı planladık. Ekspresyon vektörü için pCDH-CMV-MCS-EF1-NEO (System Biosciences) (Şekil 3.2) ve yabancı tip Fibulin-3 cDNA'sı içeren FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP (Plasmid 29703) addgene (Şekil 3.4) vektörlerini kullandık. Klonlamada kullanılacak insert Fibulin-3 cDNA'sına uygun tasarladığımız restriksiyon dizisine sahip primerler kullanarak istenilen bölge PCR yöntemiyle çoğaltıldı.

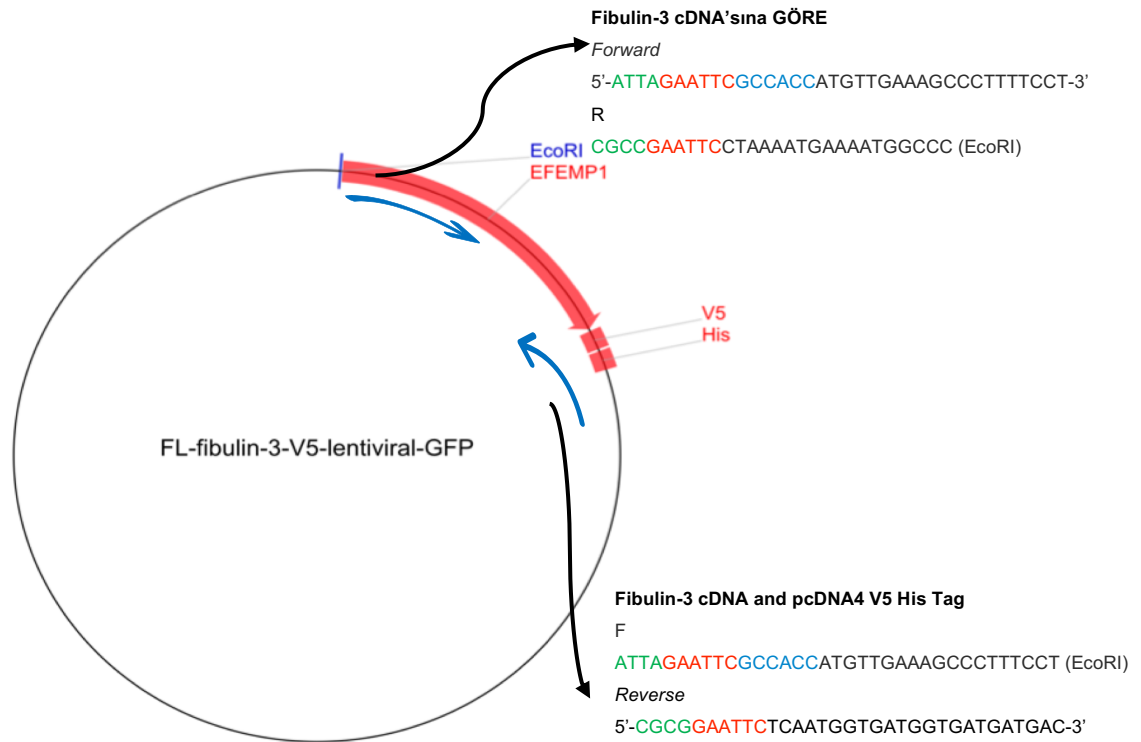
3.2.10.1 Fibulin-3 insert'ünün eldesi

Klonlamada kullanılan insert DNA'nın elde edilmesinde primerlerin başlangıç bölgelerine FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP vektörünü herhangi bir noktadan kesmeyen

EcoRI restriksiyon dizileri eklenerek tasarlandı. Bu primerler kullanılarak başlangıç ve bitiş kodonlarını içeren Fibulin-3 cDNA+V5 His Tag bölgesinin çoğaltılması gerçekleştirildi (Şekil 3.2, Şekil 3.3). Fibulin-3 antisense vektörün tasarlanmasında kullanılan primerler ve validasyon çalışmalarındaki PCR şartları aşağıda verilmiştir (Tablo 3.13).



Şekil 3.2 Insert DNA'nın vektör haritası üzerinde gösterimi.



Şekil 3.3 Klonlama primerlerinin tasarımı.

Fibulin-3 cDNA'sına GÖRE

Forward

5'-ATTAGAATTCGCCACCATGTTGAAAGCCCTTTTCCT-3'

R

CGCGAATTCCTAAAATGAAAATGGCCC (EcoRI)

Fibulin-3 cDNA and pcDNA4 V5 His Tag

F

ATTAGAATTCGCCACCATGTTGAAAGCCCTTTTCCT (EcoRI)

Reverse

5'-CGCGAATTCCTCAATGGTGATGGTGATGATGAC-3'

Klonlama primerlerinin tasarımı:

Lider dizi: Restriksiyon enzimi ile tasarlanan primerin 5' ucunda enzim kesimine yardımcı ekstra baz çiftleri (3-6 bp)

Restriksiyon enzim (RE) kesim bölgesi: Klonlama primerine takılmış kesim bölgesi (6-8 bp)

Kozak konsensus dizisi: mRNA'nın ribozomun küçük alt birimine bağlanmasını kolaylaştırarak translasyonu başlatan konsensus nükleotit dizisidir (6 bp).

Hibridizasyon dizisi: Çoğaltılacak diziye bağlanan primer dizisi (18-29 bp).

Tablo 3.14 PCR reaksiyon miksleri ve şartları.

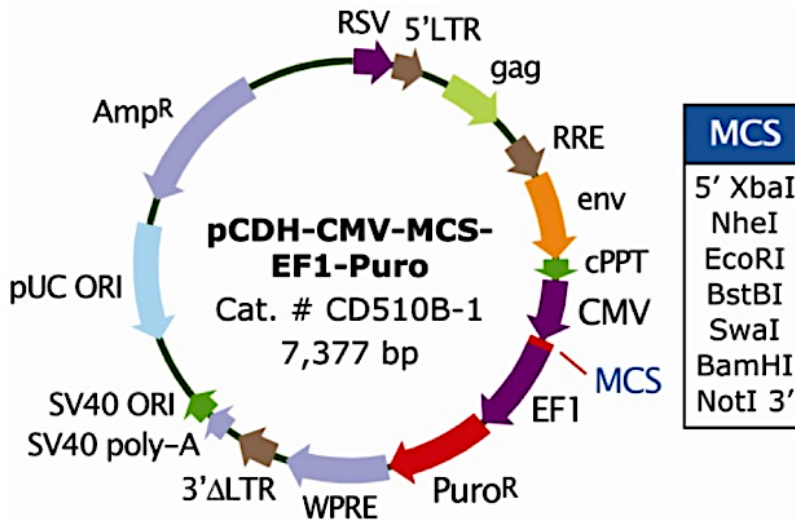
DNA	2 µl
5X Buffer	10 µl
MgCl ₂	1,5µl
dNTP	1,2 µl
Forward (ileri) primer (10 µM)	1 µl
Reverse (geri) primer (10 µM)	1 µl
ddH ₂ O	32,8 µl
Toplam	50 µl

95°C'de 1 dakika } 1 Döngü
 95°C'de 20 saniye }
 62°C'de 25 saniye } 40 Döngü
 72°C'de 30 saniye }
 72°C'de 10 dakika }

Not: Klonlama primerlerinin optimum çalışma protokolünü belirlemek için farklı PCR karışım konsantrasyonlarında gradiyent PCR yapılmıştır.

3.2.10.2 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro lentiviral vektörü ve insert Fibulin-3'ün EcoRI RE kesimleri

FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP vektöründen çaktığımız insert Fibulin-3'ün ve pCDH-CMV-MCS-EF1 vektörünün enzim kesimleri için EcoRI HF (Kat No: R0310, NEB) restriksiyon enzimi kullanılmıştır (Tablo 3.14).



Şekil 3.4 pCDH-CMV-MCS-EF1-puro lentiviral vektör haritası ve restriksiyon enzimleri.

Tablo 3.15 Restriksiyon enzim kesim protokolleri.

	EcoRI HF RE	EcoRV RE
Plazmid vektörü	1 ug	1 ug
Kesim enzimi	1 µl	2 µl
Cut Smart Buffer/Buffer R	5 µl	2 µl
dH ₂ O	değişken	değişken
Toplam	50 µl	20 µl

37°C'de 1 saat
65°C'de 20/5 dakika

Plazmid ve insert DNA'nın enzim kesim işleminden sonra ürünlerin Omega EZNA Cycle Pure kit kullanılarak saflaştırmaları yapıldı. Saflaştırma işleminden sonra ürünler %0,8-1'lik hazırlanmış agaroz jelde kontrol edildi. Purifikasyon işlemi için kullandığımız kitin protokolü;

- i. 50 µl ürüne 50 µl dH₂O eklenerek pipetaj yapıldı.
- ii. 100 µl'lik karışım 500 µl CP buffer ile homojen hale gelene kadar pipetaj yapıldı.
- iii. 600 µl'lik karışım kolonlara aktararak 12000xg'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- iv. Kolonlara 750 µl yıkama bufferi aktararak 12000xg'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- v. Kolonlara kurutmak amaçlı yeni toplama tüplerine aktarıldı ve 12000xg'de boş santrifüj yapıldı.
- vi. Kurutma işleminden sonra kolonlar steril 1,5 ml'lik ependorflara aktarılıp 12000xg'de santrifüj yapılarak ürün 50 µl toplama buffer ile toplandı.

3.2.10.3 Agaroz jel elektroforezi

Plazmid, insert DNA, PCR ürünleri ve enzim kesim ürünlerinin kontrolü için %0.8-1'lik agaroz jelde görüntüleme yapıldı. Elektroforez işlemleri;

- i. %1'lik agaroz jel için 1 gr agaroz tartılıp 100 ml TBE'de çözüldü.
- ii. Agarozun çözünmesi için çözelti mikrodalga fırında kaynatıldı.
- iii. Çözelti hafif soğutulduktan sonra 1µl akridil orange eklendi.
- iv. Önceden hazırlanmış tanka dökülerek donmaya bırakıldı.
- v. Örnekler jele yüklendikten sonra 1X TBE buffer içinde 90-120 voltta yürütüldü.

3.2.10.4 insert DNA Fibulin-3'ün agaroz jelden eldesi

İnsert Fibulin-3'ün enzim kesim ve saflaştırma işleminden sonra agaroz jelde kontrol edilmiştir. Daha sonra ürünlerimiz GenepHlow (Kat. No: DFH300) kitinin aşağıda verilmiş olan protokolüne göre agaroz jelden tekrar elde edilmiştir.

- i. UV altında bantlar teyit edilip belirlendi.
- ii. Fibulin-3 için 1.5 kb'lik bantlar kesilip ependorflara aktarıldı (~300 µg jel). Aktarılan bantlar UV altında tekrar kontrol edildi.
- iii. Jellerin aktarıldığı ependorflara 500 ml PCR/gel Buffer eklenerek vorteks yapıldı.
- iv. Örnekler 56 °C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında her 3 dakikada bir tüpler alt üst yapıldı.
* Eğer miksin rengi sarıdan mora dönerse 10 µl 3M NaCl eklenir.
- v. Örnekler DFH kolona aktarıldı ~800 µl ve 14-16000xg'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
- vi. Kolona 400 µl W1 buffer koyularak 14-16000xg'de 30 saniye santrifüj edildi.
- vii. Kolona 600 µl Wash Buffer koyulduktan sonra oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilip 14-16000xg'de 30 saniye santrifüj edildi.
- viii. Kolon steril bir toplama tüpüne aktarılıp kapağı açık bir şekilde 16000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
- ix. Son aşama olarak kolon steril ependorfa aktarılıp 20-50 µl Elution Buffer ile 14-16000xg'de santrifüj edilerek ürünler toplandı.
- x. Örneklerin konsantrasyonları Nanodropta ölçüldükten sonra -20°C'de saklandı.

3.2.10.5 pCDH-CMV-MCS-EF1 lentiviral vektörünün alkale fosfataz işlemi ve purifikasyonu

pCDH-promoter-MCS-EF1 lentiviral vektörünün enzim kesimi yapıldıktan sonra self ligasyonun önlemek için 5' fosfat gruplarının defosforile olması gerekmektedir. Vektörün alkale fosfataz işleminde FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Kat no: 18009-27) enzimi kullanılmıştır (Tablo 3.15).

Tablo 3.16 Alkalen fosfataz reaksiyon tablosu.

Plazmid vektörü	1 ug	} 37°C'de 30 dakika 75°C'de 5 dakika
FastAP enzimi	1 µl	
10X Buffer	2 µl	
dH ₂ O	değişken	
Toplam	20 µl	

Alkalen fosfataz işleminin sonunda pCDH-CMV-MCS-EF1 lentiviral vektörü, fenol-kloroform-izoamilalkol ile aşağıdaki basamaklar uygulanarak saflaştırıldı.

- i. 100 µl ürüne 100 µl fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) eklenerek vorteks yapıldı.
- ii. Karışım 10 dakika buzda inkübe edildikten sonra +4 °C'de 12000xg'de 10 dakika santrifüj edildi.
- iii. Supernatant steril bir ependorfa aktarıldı ve aktarılan supernatant kadar fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) eklenip vorteks yapıldıktan sonra ii. basamak tekrarlandı.
- iv. Aqua faz steril bir ependorfa aktarılarak 1:10 oranında 3M NaAc eklenerek pipetaj yapıldı.
- v. Son hacmin 2.5 katı kadar soğuk %100 EtOH eklendi ve -20 °C'de 2 saat inkübe edildi.
- vi. Örnekler +4 °C'te 12.000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatantı atıldı.
- vii. Pelletin olduğu ependorf 5-10 dakika kurumaya bırakıldı.
- viii. Pellet kurutulduktan sonra 25 µl nükleaz içermeyen dH₂O'da çözüldü.
- ix. Elde edilen DNA konsantrasyonu Nanodrop cihazında ölçüldükten sonra -20 °C'de saklandı.

Not: Ligasyon işlemi için insert Fibulin-3 ve alkalen fosfataz işlemi yapılmış vektör %0.8'lik agaroz jelde miktarlarının teyiti için yürütüldü. Jel görüntüsü dansitometrik olarak analiz edilerek miktarların doğruluğu kontrol edilmiştir.

3.2.10.6 DNA ligasyonu

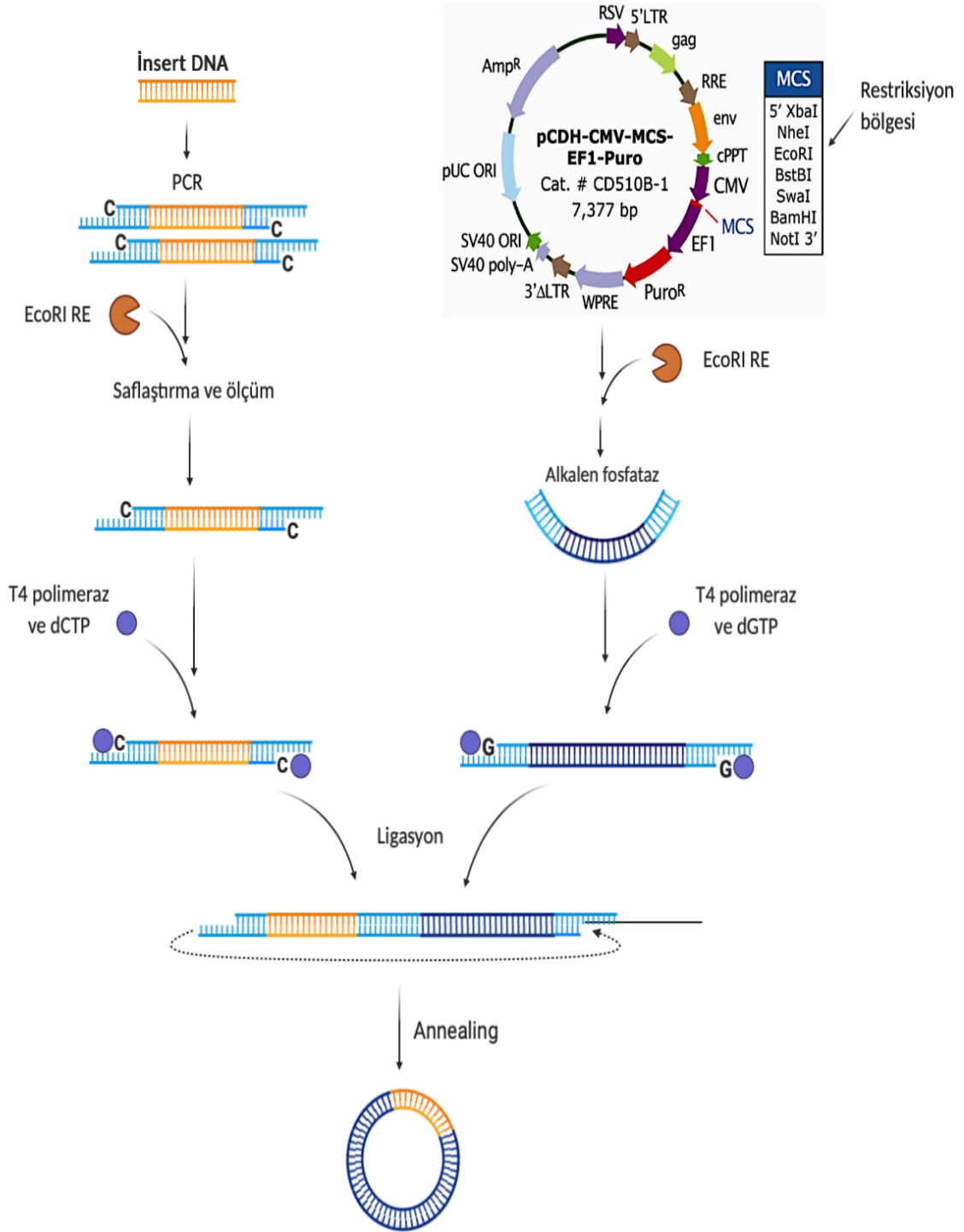
DNA ligasyon işleminde, restriksiyon enzimiyle kesilmiş vektör ve insert Fibulin-3'ün serbest 5' fosfat ve serbest 3'OH uçları arasında fosfodiester bağı oluşturulur. DNA fragmentleri arasındaki fosfodiester bağlarının gerçekleşmesi için T4 DNA Ligase (Kat. No: EL0014, Thermo Fisher Scientific) kiti kullanılmıştır (Şekil 3.5). Bu çalışmada ligasyon

reaksiyonunu gerçekleştirmek için 1X T4 DNA ligase buffer 4X restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş vektör ve 1X insert DNA PCR ürünleri aşağıdaki tabloda verilen protokole göre hazırlandı (Tablo 17).

Tablo 3.17 Ligasyon için reaksiyon protokolü

10X T4 DNA Ligase Buffer	2 µl
Vektör DNA (7,5kb)	4X ng
İnsert DNA (1,5 kb)	1X ng
T4 DNA Ligaz	1 µl
dH ₂ O	değişken
Toplam	20 µl

16-24 °C'de 24 saat



Şekil 3.5 Antisense Fibulin-3 vektörünün tasarım şeması.

3.2.10.7 Luria-Bertani (LB) Broth besiyeri hazırlanması

Transformasyon işlemi için DH5-alfa kompetent *E. coli* (Kat. No:C2987H, NEB) medyası olarak kullanılmak üzere LB-Broth besiyerleri hazırlandı.

- i. 250 ml'lik LB-Broth besiyerleri için 6.25 gr LB Broth (Kat. No:110285, Merck) tartılıp 250 ml dH₂O ile çözüldü.
- ii. 500 ml'lik erlenlerin içerisine hazırlanan besiyerleri otoklav ile sterilize edilerek kullanılmak üzere seçilim markeri eklenerek kadar +4°C'de saklandı.

3.2.10.8 LB Broth agar besiyeri hazırlanması

Transformasyon işleminden sonra tek koloni seçimi için katı LB-Broth agar besiyeri kullanıldı. Bu besiyerinin hazırlanması için aşağıdaki protokol takip edildi.

- i. 100 ml'lik katı LB-Broth agar besiyerleri için 2.5 gr LB Broth (Kat. No:110285, Merck) ve 1.5 gr agar (Kat. No:05039, Sigma-Aldrich) tartılıp 100 ml dH₂O ile çözüldü.
- ii. 250 ml'lik erlenlerin içerisine hazırlanan besiyeri sterilizasyon için otoklavlandı.
- iii. Otoklav sonrası LB-Broth agar besiyeri yaklaşık 40-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 100 µg/ml seçilim markeri (amfisilin (Kat. No: BP1760, Fisher Scientific)) eklendi.
- iv. LB-Broth agar besiyeri donmaya başlamadan steril petrilere aseptik koşullarda yaklaşık 10 ml olacak şekilde döküldü.
- v. Petrillerdeki LB-Broth agar besiyerlerinin donması beklenirken petrilere çevresi parafinlendi.
- vi. Kullanılacağı zamana kadar +4°C'de ışık görmeyecek şekilde (1 ay'a kadar) muhafaza edildi.

3.2.10.9 Kompetent bakteri hazırlanması

Transformasyonda kullanacağımız kompetent bakterilerin hazırlanmasında CaCl₂ protokolü uygulandı.

- i. -80 °C' de %50'lik gliserol içinde saklanan bakteriler 5 ml LB-broth besiyerinde 16-24 saat 37°C'de 200 rpm'de sallanarak çoğaltıldı.
- ii. Çoğalma olan tüplerden 1 ml alınarak 25-30 ml LB-Broth besiyerinde 45-60 dakika 37°C'de 200 rpm'de sallanarak inkübe edildi.
- iii. İnkübasyon sonrasında buz içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra örnekler 1000xg' de 10 dakika santrifüj edildi.
- iv. Pellet 10 ml soğuk 100 mM CaCl₂ ile pipetaj edilerek süspanse hale getirildikten sonra 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- v. İnkübasyon sonunda örnek 1000xg' de 10 dakika santrifüj edildi.

- vi. Pellet 2.5 ml %50'lik gliserolde süspanse edilerek, 100 µl olacak şekilde alikatlandı.
- vii. Kompetent bakteriler (DH5α) kullanılacağı zamana kadar -80°C'de saklandı.

3.2.10.10 DH5α hücrelerine transformasyon

Transformasyon aşamasında *E. coli'nin* bir suşu olan DH5α (Kat. No:C2987H, NEB) kullanıldı. Çalışma aseptik koşullara uyularak bek alevi altında aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

- i. Kompetent DH5α hücreleri -80°C'den çıkarıldıktan sonra 10 dakika buzda bekletilerek çözüldü.
- ii. Çözünmüş hücreler ve ligasyon ürünü buzda bekletilmiş steril ependorfa aktarıldıktan sonra 30 dakika buzda inkübe edildi.
- iii. Hücreler su banyosunda 42°C'de 30 saniye inkübe edildikten sonra 5 dakika buzda bekletildi.
- iv. İnkübasyonun sonunda 900 µl oda sıcaklığına getirilmiş SOC besiyeri eklenerek 37°C'de 1 saat boyunca 200 rpm'de sallanarak inkübe edildi.
*Katı LB-Broth agar ısınması için 20-25 dakika önceden oda sıcaklığına gelmesi için +4°C'den çıkarıldı.
- v. İnkübasyon sonrası SOC besiyerli örnekler antibiyotik (Amp) içeren katı LB-Broth agarlı petrilere yayma yöntemiyle ekildi.

3.2.10.11 Tek koloni seçimi

Saf bakteri elde etmek için tek koloni seçilimi yapıldı. Antibiyotikli (Amp) katı LB-Broth agarlı besiyerine yayma yöntemiyle ekilen bakterilerden, çoğalan kolonilerden rastgele 12 tanesi seçilerek aşağıda belirtilen protokole göre ekim yapıldı.

- i. 50 ml'lik falkonda hazırlanan 36 ml LB-Broth + 18 µl Amp'li sıvı besiyeri 15 ml'lik falkonlara 4'er ml alikatlandı.
- ii. Bek alevi altında, petride seçilen koloniler 10 µl'lik pipet ucuyla koloninin ortasına dokunularak falkonlara alikatlanmış LB-Broth besiyerlerine aktarıldı.
- iii. 4 ml'lik LB-Broth besiyerindeki bakteriler 16-24 saat 37°C'de 200 rpm'de sallanarak inkübe edildi.
*İnkübasyon sonunda 250 µl %50 gliserol + 250 µl bakteri cryo tüpe aktarılıp -80 °C'de saklandı.

- iv. İnkübasyonun sonunda çoğaltılan bakteriler 3.2.11 Plazmid İzolasyonu başlığı altında verilen protokole göre izole edildi.

3.2.11 Plazmid izolasyonu

Plazmid izolasyonu HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Kat. No:12663, Qiagen) kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon protokolü aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

- i. Kompetent bakteriler 250 ml sıvı LB besiyerine ekilerek 37°C'de sallamalı inkübatörde çoğaltıldı.
- ii. Bakteri içeren 250 ml'lik besiyeri 50 ml'lik falkon tüplere dağıtılarak 6000xg 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. (İstenirse protokole daha sonra devam etmek için hücre pelletinin -20°C'de saklanması gerekir).
*Buffer P3 Kullanılmadan 30 dakika önce buza koyulur.
- iii. Santrifüj sonrası elde edilen pellet 10 ml Buffer P1'de çözülerek, 10 ml Buffer P2 eklenerek 4-6 kez ters yüz edildi.
- iv. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra (Bekleme süresinde QIAfilter Maxi Cartridge'in çıkış yeri vidalanarak uygun bir spora yerleştirilerek hazırlanır).
- v. 10 ml Buffer P3 eklenerek 4-6 kez ters yüz edilip, falkondaki lizat daha önceden hazırlanmış olan QIAfilter Cartridge'nin içerisine dökülüp 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- vi. HiSpeed Maxi Tip'in dengelenmesi için 10 ml Buffer QBT yerçekiminin etkisiyle kolondan geçirilerek hazırlandı.
- vii. QIAfilter Cartridge'nin çıkış yerindeki vida çıkarılarak, pistonu yerleştirilip nazıkçe sabit bir kuvvet uygulanarak daha önce dengelenmiş olan HiSpeed Tip'in içerisine döküldü.
- viii. HiSpeed Tip'in içerisine dökülen lizat, yerçekiminin etkisiyle kolondan geçirildi.
- ix. HiSpeed Tip'in içerisine 60 ml QC eklenerek yavaşça kolondan geçirilerek yıkandı (yerçekiminin etkisiyle).
- x. 15 ml QF buffer eklenerek steril bir falkonun içerisine yavaşça akıtıldı.
- xi. Falkonun içerisine akıtılmış olan örneğin içerisine 10,5 ml (QF'nin 0,7 kat hacminde) izopropanol eklenerek (oda sıcaklığında) karıştırılıp plazmid DNA çöktürüldü. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- xii. 30 ml'lik enjektörün ucuna QIAprecipitator Maxi Module (filtre) eklendi.
*Bu ve bundan sonraki aşamalarda filtre enjektörün ucuna takılıken piston geri çekilmemelidir. Filtre çıkarıldıktan sonra piston enjektörden çıkarılır.

- xiii. 2 ml %70'lik Etanol filtreden yavaşça geçirildi (enjektör boşken birkaç kez filtreden hava geçirilir) Filtrenin kurutma kağıdında tamamen kuruması beklendi.
- xiv. Enjektöre çekilen 1 ml TE kurutulmuş filtreden geçirilerek örnek steril ependorfta toplandı.
- xv. Toplanan örnekler -20°C saklandı.

3.2.12 Plazmid DNA'nın doğrulanması

3.2.12.1 Restriksiyon enzimleriyle

Seçilen kolonilerden izole edilmiş plazmidlerin *EFEMP1* genini alıp almadığını belirlemek amacıyla restriksiyon enzim kesimleri yapıldı. Plazmid DNA'ları EcoRI restriksiyon enzimi ile kesim yapılarak agaroz jel görüntüleri sonucunda beklediğimiz *EFEMP1* bandını taşıyan plazmid örnekleri seçilerek ikinci aşama olarak sekansla okuma gerçekleştirildi.

3.2.12.2 Sanger sekans yöntemiyle

Kolonilerin agaroz jelde *EFEMP1* genini alıp almadığı kontrol edildikten sonra, *EFEMP1* geninin plazmide sense mi yoksa antisense yönde girip girmediğini kontrol etmek için sekans primerleri tasarlanıp ABI 3130 sekans cihazında sekanslandı. Sekans reaksiyonları aşağıdaki tabloda verilen protokole göre hazırlandı.

Tablo 3.18 Sanger sekans PCR reaksiyonu için bileşenler

DNA	5 µl	
Exprime Taq	25 µl	
Betain	8 µl	
Forward primer (10 µM)	3 µl	
Reverse primer (10 µM)	3 µl	
ddH ₂ O	6 µl	
Toplam	50 µl	

Not: sekans primerlerinin optimum çalışma protokolünü belirlemek için farklı PCR karışım konsantrasyonlarında gradiyent PCR yapılmıştır.

Betaimli: 58 °C 59 °C 62 °C

Betainsiz: 58 °C 59 °C 62 °C

PCR sonrası örneklerin Omega EZNA cycle pure kit ile purifikasyonu yapıldıktan sonra %2'lik agaroz jelde kontrol edildi. Sekans PCR'ı için aşağıdaki tabloya bağlı kalarak 4 farklı sıcaklık için reaksiyon kuruldu.

Tablo 3.19 Sanger sekans, sekans PCR'ı reaksiyonu için bileşenler

PCR ürünü	1 µl	
Thermo Big Dye	1 µl	
5X sekans buffer	2 µl	
Forward (ileri) primer (10 µM)	1 µl	
Reverse (geri) primer (10 µM)	1 µl	
ddH ₂ O	4 µl	
Toplam	10 µl	

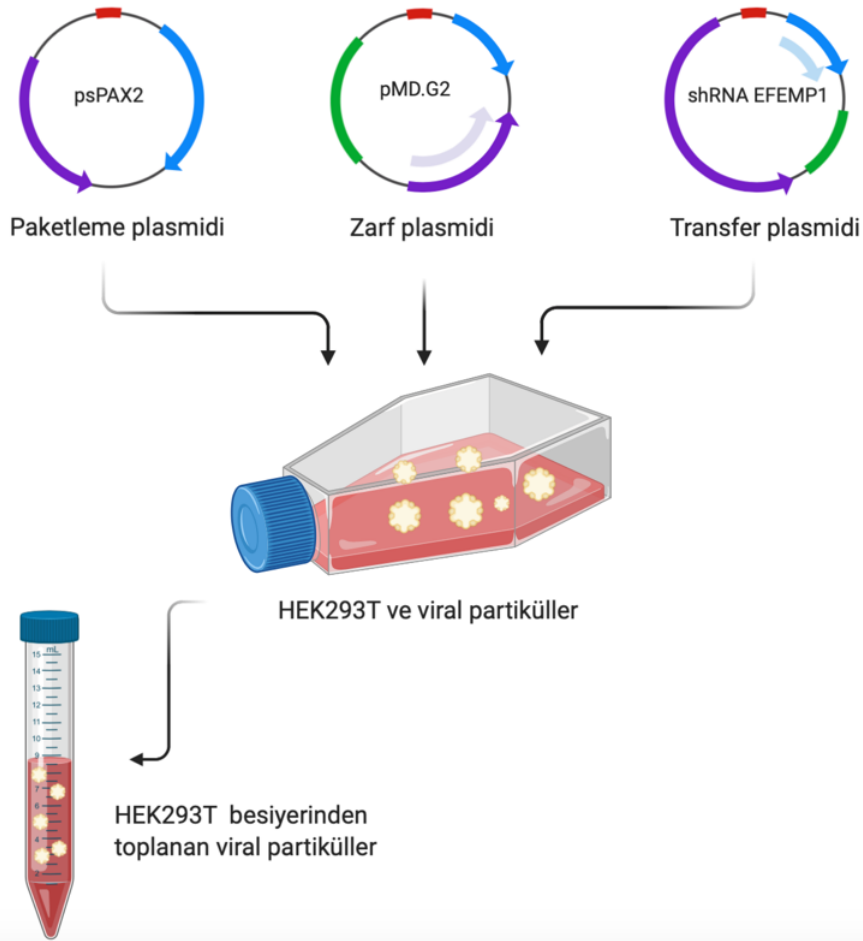
3.2.13 Lentiviral shRNA vektörleri için lentivirüs üretimi

EFEMP1 genini susturmak amaçlı OriGene'den temin edilen lentiviral GFP özelliğine sahip EFEMP1-Human kullanıldı (Şekil 3.8). ShRNA lentiviral vektör sistemlerinin lipozom aracılı transfeksiyon yönteminden daha uzun süreli etkinlik sağlamaları nedeniyle lentiviral infeksiyon yöntemini tercih ettik. Lentiviral infeksiyon uygulamasını ikinci nesil paketleme ve zarf vektörlerini kullanarak gerçekleştirdik. Lentiviral partikül üretimi ve infeksiyon işlemleri aşağıda verilen protokole göre gerçekleştirildi.

- Lentiviral partiküllerin üretimi için konak hücre olarak HEK293T kullanıldı.
- T75 flaklara ekilen HEK293T (15 ml besiyeri) hücreleri %75-80 yoğunluğa ulaştığında besiyerleri aspire edildi.
- Hücrelere 7.5 ml %10 FBS içeren DMEM besiyeri verildi. Taze besiyerine 25 µM chloroquine eklenerek 2 saatlik inkübasyona bırakıldı.
- Besiyeri değişiminden 2 saat sonra transfeksiyon paketi besiyerine verildi. Transfeksiyon paketi verilen hücreler 16-18 saat inkübe edildi.

*Transfeksiyon paketi: 15 ml falkon tüpte 15 µg transfer plazmid, 3.5 µg pMD.G2 ve 6.5 µg pPAX2 513 µl dH₂O ile çözüldü. 57 µl CaCl₂ (2.5 M) eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı. 15 ml tüp düşük hızda karıştırılırken 570 µl HBSS damla damla eklendi ve 5 dakika beklendi.

- v. Transfeksiyon besiyeri, 7.5 ml % 10 FBS içeren DMEM besiyeri ile değiştirildi. 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu işlem 2 defa tekrarlandı.
- vi. Virüs partikülleri içeren HEK293T hücre besiyeri toplandı ve 0.45 µM PVDF filtreden geçirilerek +4°C'de saklandı.
- vii. Toplanmış olduğumuz viral partiküllerin 1/3 hacimi kadar Lenti-X concentrator (PEG-8000) eklendi.
- viii. Viral partikül ve Lenti-X concentrator karışımı dikkatli bir şekilde 8-10 kez alt üst yapıldıktan sonra +4°C'de 16-24 saat inkübe edildi.
- ix. inkübasyon sonunda karışım +4°C'de 1500xg'de 45 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra, falkon tekrar +4°C'de 1500xg'de 3 dakika santrifüj edildi.
- x. Pellet iv. aşamada HEK293T hücrelerinde topladığımız DMEM hacminin 1/100 oranında PBS ile iki kez yıkanarak viral partiküller steril ependorflara 20'şer µl olacak şekilde alıkatlandı.
- xi. Kullanılacağı zamana kadar -80°C'de saklandı.

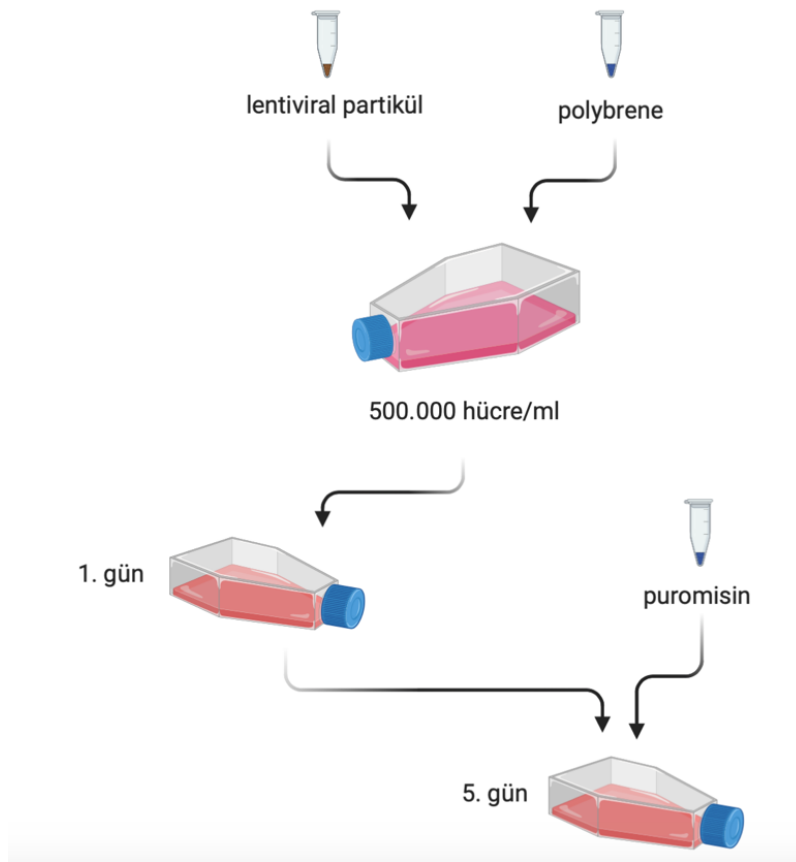


Şekil 3.6 Lentivirüs üretiminin şematik gösterimi

3.2.13.1 Lentiviral infeksiyon ve seçilim

Lentiviral partiküller üretildikten sonra hedef hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında infeksiyon ve seçilim için aşağıdaki protokol takip edildi.

- Flasklarda %40-50'lık yoğunluğa ulaşan hücrelerin besiyerleri değiştirildi.
- Taze besiyeri koyulmuş (5 ml %10 FBS RPMI (-penisilin/streptomisin)) hücrelere 20 µl lentiviral partikül + 8 µg/ml polybrene uygulandı (Şekil 3.5).
- 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırılıp hücreler 2 kez PBS ile yıkanarak üzerlerine %10 FBS içeren RPMI besiyeri eklendi.
- İnfeksiyonun gerçekleştiği hücrelerde aktarılan vektörün hedef gene etkisini gösterebilmesi için hücreler iki pasaj uygun koşullar altında kültüre edildi.
- İnfecte olmamış kolonileri ortamdan uzaklaştırmak için lentiviral vektör sistemimizde bulunan puromisin (2µg/ml) direnç genine göre seçilim yapıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.7 Lentivirüs infeksiyonunun şematik gösterimi

3.2.15 Mikroarray analizi

N417-kontrol ve N417, Fibulin-3 ekspresyon vektörü transfekte edilmiş hücre dizileri ile H82-scramble shRNA ve shRNA C (Fibulin-3) infekte hücre dizilerinden total RNA izolasyon yöntemine göre RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen örneklerin RNA'ları Nanodrop ile ölçüldükten sonra MacroGen' in talimatları doğrultusunda 70 ng/μl'den az olmayacak şekilde ayarlandı. Kargolama protokolü için 10X örnek hacimimizi 1X, 3 M NaAsetat ve 22X %100 EtOH ile muamele edildi. Örnekler Affymetrix's Human GeneST array platformu protokollerine göre hazırlık aşamasından sonra mikroarray analizi MacroGen Inc. (Güney Kore) firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

3.2.16 Mikroarray sonuçlarının analizinde biyoformatik araçların kullanımı

Mikroarray verileri Gen ontoloji (GO) ve Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Yolak analizleri ile değerlendirildi.

Gen Ontoloji (GO) Analizi:

Hedef genin ekspresyonunun değişimine bağlı olarak ekspresyon seviyesinde farklılık gösteren mRNA'ların rol oynadığı biyolojik ve hücresel prosesleri moleküler açıdan tanımlamak için bu proseslerdeki fonksiyonel genleri ve gen gruplarını ortaya koymak amacıyla yapıldı. Gen ontoloji analizinde hedef hücre verileri kontrol hücre verilerine kıyaslandı. Kıyaslama ve filtrelemede istatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlılık seviyesi olarak kabul edilerek yapıldı.

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Yolak Analizi:

Hedef genin ekspresyon değişimine bağlı olarak ekspresyon seviyesinde farklılık gösteren mRNA'ların interaksiyon içinde bulunduğu mRNA'ların ağını ve ilişkili olduğu yolları tespit etmek için KEGG yolak analizi yapıldı. Herbir analiz için hedef hücre verileri kontrol hücre verilerine kıyaslandı. Yapılan analizde en yüksek skor alan yollar belirlendi. Kıyaslama ve filtrelemede istatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlılık seviyesi olarak kabul edilerek yapıldı.

3.2.17 İstatistiksel analiz

Mikroarray çalışması sonucunda gruplar arasında ekspresyonel değişim gözlenen miRNA ve mRNA'ların istatistiksel analizi için R istatistik dili v.3.1.2 kullanıldı. Hücre gruplarındaki miRNA ve mRNA'lar qPCR yöntemiyle doğrulandı. QPCR analizi sonucundaki datarlar karşılaştırmalı olarak " $2^{-\Delta\Delta Ct}$ " formülüyle analiz edildi. Verilerin

istatistiksel olarak anlamlılık seviyelerini belirlemek için basic student T testleri uygulandı (Livak ve Schmittgen 2001). Data analizleri için yapılan istatistik analizlerde SPSS software programı kullanıldı. Tüm analizlere $P < 0.05$ anlamlılık seviyesi olarak kabul edildi.

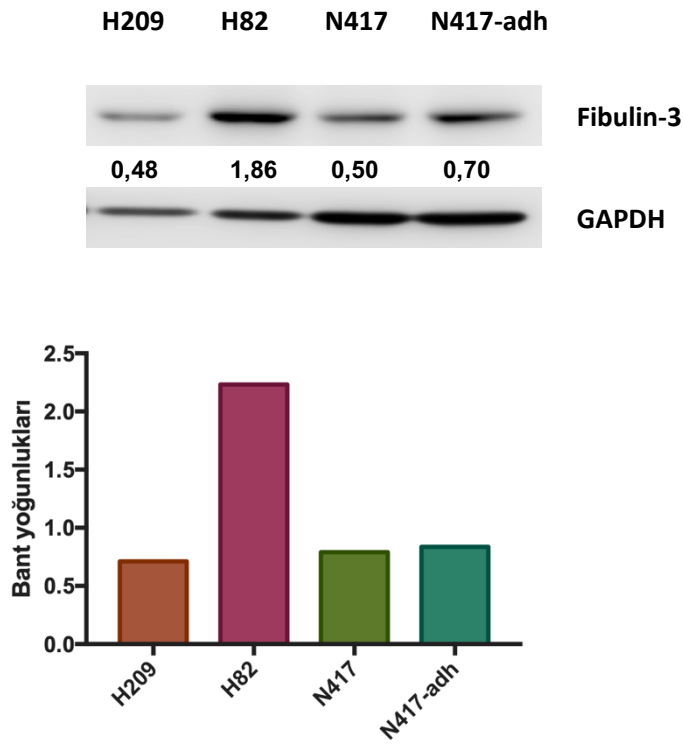
4. BULGULAR

4.1 Çalışmada Kullanılan KHAK Hücre Dizilerinin Normal Koşullardaki Fibulin-3 Ekspresyon Düzeyleri

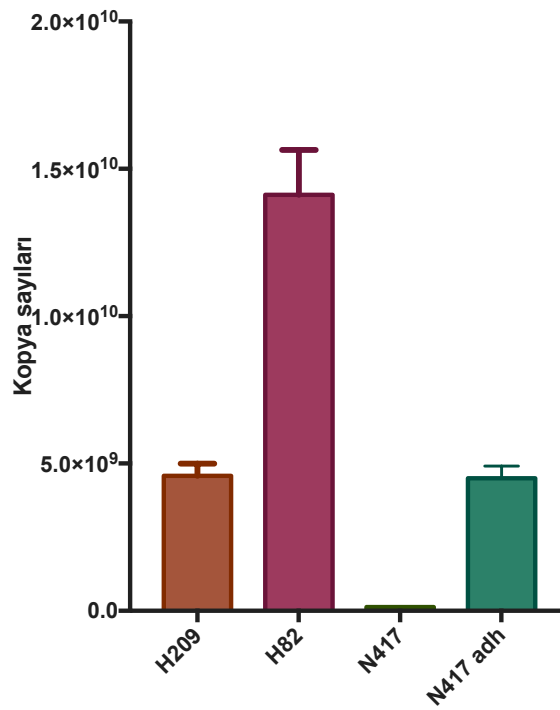
Fibulin-3 ifadesinin EMT ve kök hücrelilikteki rolünü belirlemek için KHAK hücre dizilerinin hipotezimiz doğrultusunda hücresel çoğalma hızı, EMT markerlerinin değişimi ve kök hücre markerlerinin ifadesel değişiminin değerlendirilmesini amaçladık. Çalışmada kullanacağımız hücre dizilerinin normal şartlardaki Fibulin-3 ifade düzeylerini belirlemek için, uygun hücre kültürü koşulları altında kültüre edilen, hiçbir şey ile muamele edilmemiş hücrelerin lizatları RIPA tamponu ile toplandıktan sonra materyal ve metot bölümünde belirtildiği gibi protein izolasyonu ve miktar tayini yapıldı.

KHAK H82, H209, N417 ve N417-adh hücre dizilerinde Fibulin-3 ifadesi Western Blot yöntemi ile belirlendi. Western Blot görüntüsündeki bant yoğunlukları dansitometrik olarak Image Studio Lite Ver. 5.2.5 programı ile analiz edilirken normalizatör olarak GAPDH ifadesi kullanıldı. H209, N417 ve N417-adh hücre dizilerinde Fibulin-3 ifadesinin düşük olduğu tespit edildi. Analizlere göre H82 hücre hattının ise H209, N417 ve N417-adh hücre hatlarına kıyasla yaklaşık 2.5-3 kat daha yüksek Fibulin-3 ifadesine sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.1).

KHAK hücre dizileri H209, H82, N417 ve N417-adh'de Fibulin-3 mRNA seviyesini aynı zamanda qPCR ile de belirlendi. QPCR verilerini değerlendirmek için kopya sayılarını hesapladıktan sonra veriler log10 formatında grafiğe döküldü (Şekil 4.2). Hücrelerde yapılan protein ve mRNA analizlerinde hem protein hem de mRNA ifadelerinin korelasyon içinde olduğu tespit edildi.



Şekil 4.2 H82, H209, N417 ve N417-adh KHAK hücre dizilerinin Fibulin-3 ekspresyonlarının Western Blot analizi ile tespit edilmesi.

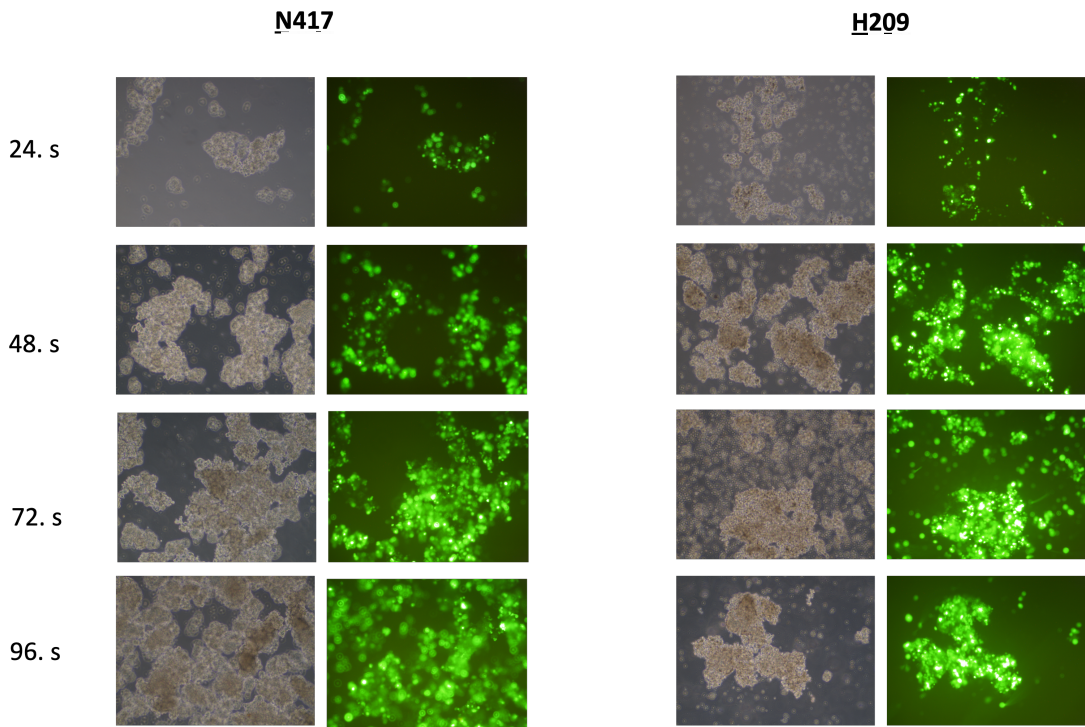


Şekil 4.5 H82, H209, N417 ve N417-adh KHAK hücre dizilerinin Fibulin-3 ekspresyonlarının qPCR analizi ile tespit edilmesi.

4.2 Fibulin-3'ün İfadesinin Düzenlenmesi

4.2.1 Fibulin-3 ekspresyon vektörünün transfeksiyonu

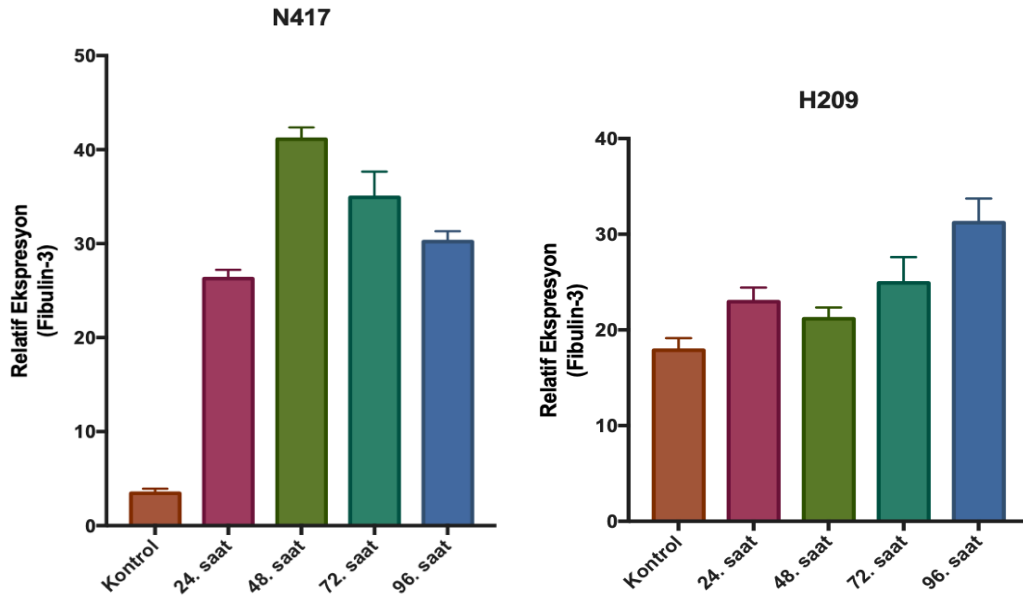
KHAK hücre dizilerinde Fibulin-3 ifadesini belirlemek için yaptığımız çalışmalarda, Fibulin-3 ifadesi düşük KHAK N417 ve H209 hücre dizilerine addgene'den ticari olarak temin edilen FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP (Plasmid 29703 addgene) (Şekil 3.4) vektörü kullanılarak geçici transfeksiyon yapıldı. Geçici transfeksiyonda Fibulin-3 ekspresyonunun en yüksek olduğu zamanını belirlemek için transfeksiyon işleminden sonra 24. saat, 48. saat, 72. saat ve 96. saatlerde H209 ve N417 hücre hatlarının floresan lambalı kontrast mikroskop altında vektörün reporter geni olan GFP'nın ışımaya görüntüleri fotoğraflandı (Şekil 4.3). Fotoğraflar analiz edilirken aynı alanın hem normal görüntüsü hem de GFP görüntüsü fotoğraflandı. Böylece transfeksiyon verimliliği de belirlendi.



Şekil 4.6 FL-fibulin-3 V5-lentiviral-GFP vektörünün transfeksiyon sonrası 24., 48., 72., ve 96. saatlerdeki H209 ve N417 hücrelerindeki GFP görüntüleri.

KHAK H209 ve N417 hücre dizilerinde gerçekleştirilen geçici transfeksiyonun verimliliğini yeterli görüldükten sonra 24, 48, 72, 96. saatlerde trizol ile toplanan örnekler 3.2.3 RNA izolasyonu başlığı altındaki protokole göre RNA izolasyonu yapıldı. FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP plasmid transfeksiyonu sonrası 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki Fibulin-3

ekspresyonu qPCR yöntemiyle belirlendi. QPCR çalışmasında örnekler β -aktine oranla $\Delta\Delta Ct$ kat değişim analizi ile değerlendirildi. N417 hücre dizisinde 48. saatin Fibulin-3 ifadesi bakımından en yüksek değere sahip olduğu görüldü. H209 hücre dizisindeki zamana bağlı ifade değişimine baktığımızda, N417 hücre dizisine kıyasla net sonuçlar sergileyemediği belirlendi (Şekil 4.4).

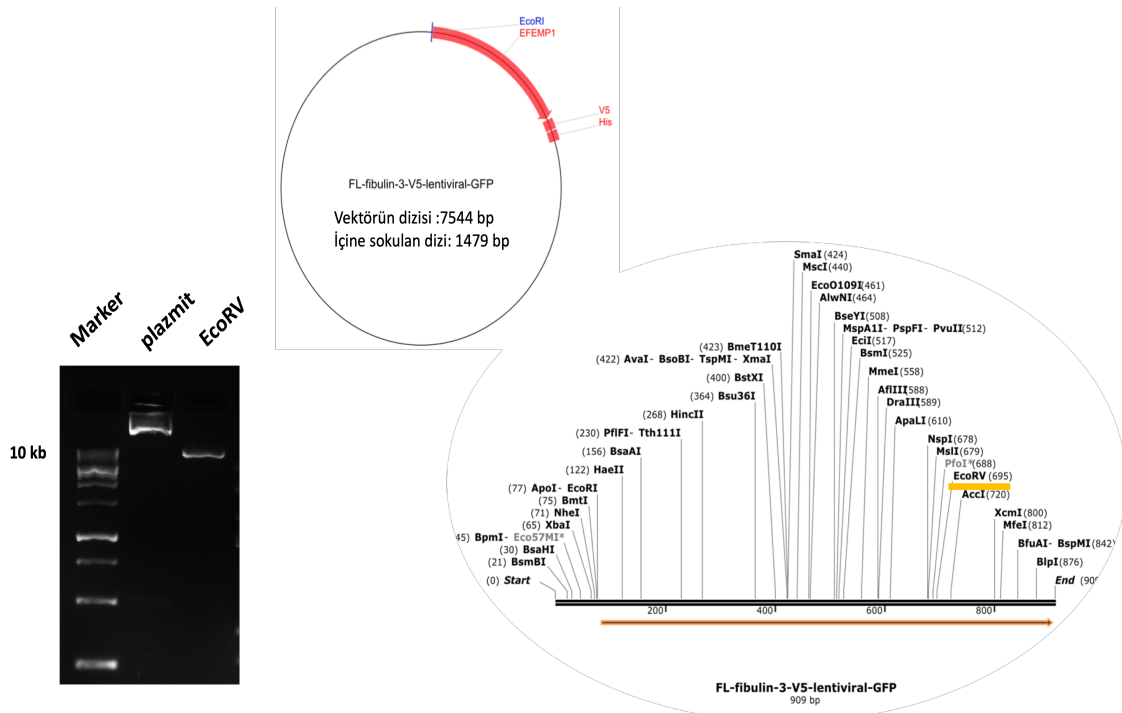


Şekil 4.7 Fibulin-3'ün aşırı ifade edildiği N417 ve H209 hücre hatlarında zamana bağlı ekspresyon değişiminin qPCR ile tespiti.

4.2.2 Fibulin-3 ifadesinin baskılanması

4.2.2.1 Antisense Fibulin-3 kalıcı vektörün tasarlanması

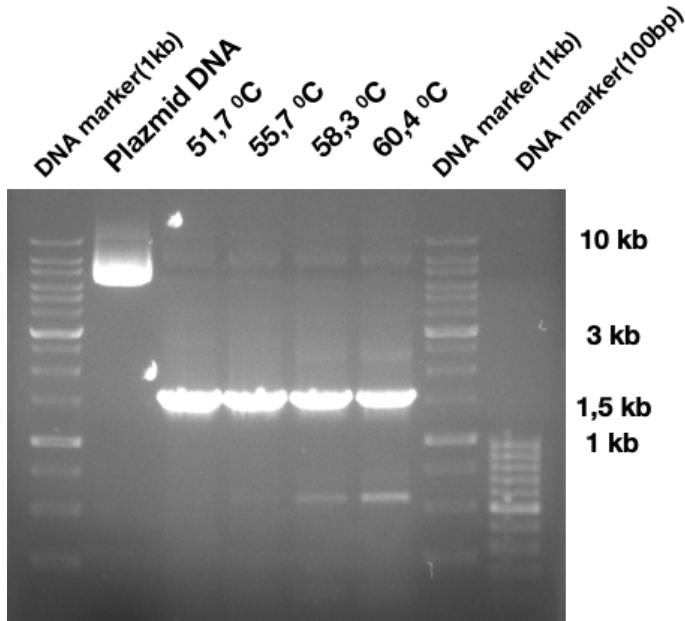
Fibulin-3 ekspresyonunun yüksek olduğu H82 hücre hattında, Fibulin-3 ekspresyonunu baskılamak amacıyla antisense ekspresyon vektörünün tasarlanması planlandı. Antisense ekspresyon vektörümüzün iskeleti pCDH-CMV-MCS-EF1-NEO (System Biosciences) (Şekil 3.2) ve yaban tip Fibulin-3 cDNA'sı içeren FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP (Plasmid 29703) addgene (Şekil 3.4) vektörlerinden oluşturuldu. pCDH-CMV-MCS-EF1-NEO vektörünün MCS'ında EcoRI kesim dizisi barındırması ve insert DNA olarak planlanan dizinin (Fibulin-3 cDNA) herhangi bir bölgesinde EcoRI dizisi bulunmamasından dolayı (Şekil 4.5), klonlama stratejimize uygun olarak Fibulin-3 cDNA'sının elde edilmesinde kullanılacak primerler 3.2.10.1 *Fibulin-3 insert'ünün eldesi* (PCR) başlığı altında verilen EcoRI restriksiyon dizilerine sahip forward ve reverse primerler olarak tasarlandı.



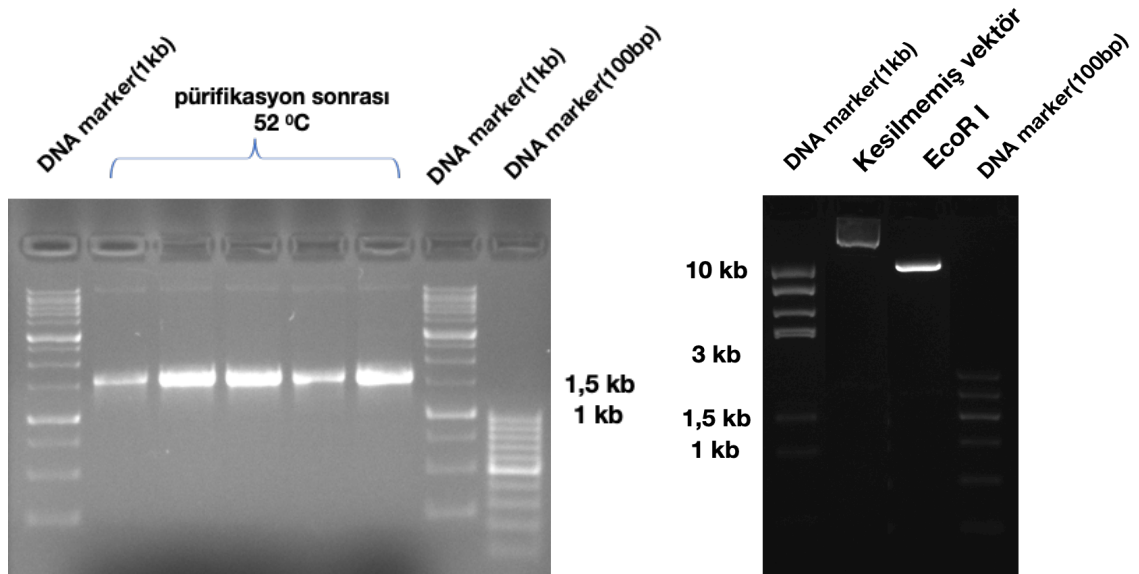
Şekil 4.8 FL-fibulin-3 V5-lentiviral-GFP lentiviral vektör haritası, restriksiyon enzimlerinin gösterimi ve vektörün doğrulaması.

4.2.2.1.1 Fibulin-3 insert'ünün eldesi

Fibulin-3 geni için antisense vektörün tasarlanmasında Addgene firmasından ticari olarak temin ettiğimiz FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP plasmidi donör olarak kullanıldı. Fibulin-3'ün başlangıç bölgesi ile devamındaki V5 his tag bölgesini kapsayacak şekilde FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP vektörünü herhangi bir noktasından kesmeyen EcoRI restriksiyon enzimi dizileri içeren forward ve reverse primerler tasarlandı. EcoRI restriksiyon dizilerini kullanarak tasarlanan primerlerin validasyon çalışmalarındaki PCR şartları Tablo 3.'de verilmiştir. Fibulin-3 cDNA'sını PCR ile çoğaltmak için primerlerin optimum çalışma sıcaklığı gradient PCR yapılarak belirlendi. 51.7 °C, 55.7 °C, 58.3 °C ve 60.4 °C annealing sıcaklıklarında gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun ürünlerini değerlendirmek için %0.7-1'lik agaroz jelde elektroforezi yapıldı. 58.3 °C ve 60.4 °C'de dimer bantları bariz bir şekilde görülürken 55.7 °C'de silik bir bant gözlemledik. 51.7 °C'yi optimum çalışma sıcaklığı olarak kabul ederek bundan sonraki PCR şartlarında bu sıcaklık kullanıldı. Şartların oluşturduğu PCR örneklerinin agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.9 PCR yöntemi ile amplifiye edilen Fibulin-3 cDNAsı için optimum sıcaklığın belirlenmesi.

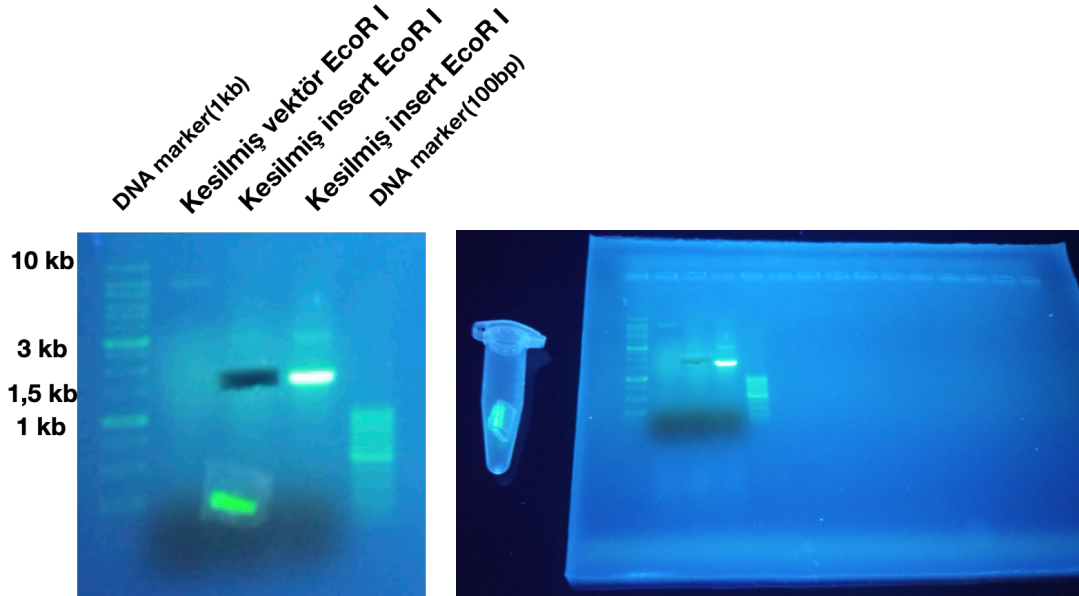


Şekil 4.10 Fibulin-3 insert'ünün saflaştırma işleminden sonraki jel görüntüsü ve pCDH-CMV-MCS-EF1 vektörünün agaroz jelde gösterilmesi.

İnsert Fibulin-3 PCR yöntemiyle çoğaltılıp saflaştırma işlemi yapıldıktan sonra agaroz jelde kontrol amaçla görüntülendi (Şekil 4.7).

Ligasyon aşamasında şansımızı arttırmak ve daha saf insert DNA elde etmek için 1.5 kb bandında çıkan insert DNA bandı agaroz jelden, UV ışık altında kesilerek 1.5 ml'lik ependorfa aktarıldı (Şekil 4.8). Akabinde 3.2.10.4 insert DNA Fibulin-3'ün agaroz jelden

eldesi, başlığı altında verilen protokole göre insert DNA saflaştırılarak elde edildi. Çoklu klonlama bölgesinde bulunan EcoRI kesim bölgesinden kesimi yapılmış ve alkalen fosfataz işlemine tabi tutulmuş pCDH-CMV-MCS-EF1 vektörü ve iki ucuda EcoRI RE dizilerine sahip insert DNA 16-24 saatlik ligasyon aşamasına bırakıldı.



Şekil 4.11 Insert Fibulin-3 agaroz jelden geri kazanılımı/izolasyonu.

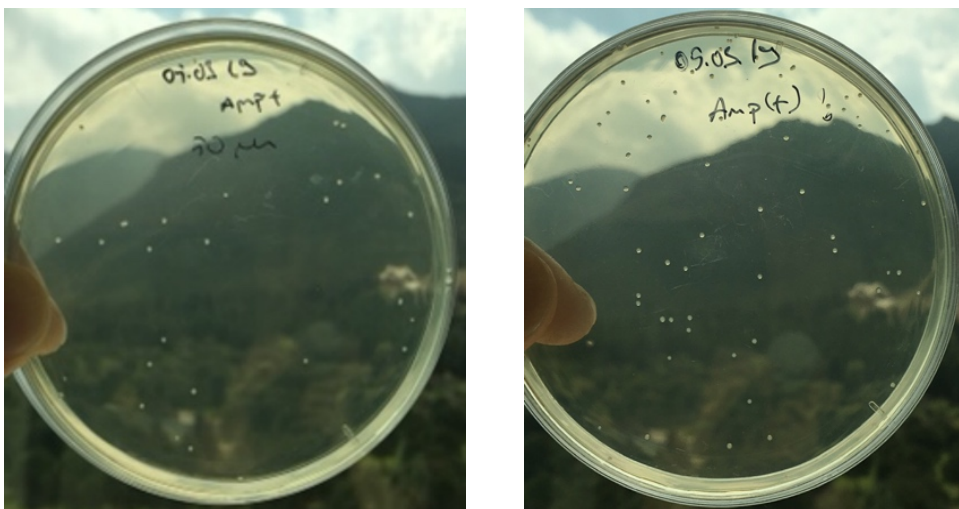
4.2.2.1.2 pCDH-CMV-MCS-EF1 lentiviral vektörü ve Fibulin-3 insert'ün EcoRI dizilerine göre hazırlanması

FL-fibulin-3 V5 lentiviral GFP vektöründen elde edilen insert Fibulin-3'ün optimum PCR şartları (52 °C) belirlendikten sonra amplifikasyon işlemleri yapıp saflaştırıldı. Saflaştırılmış Fibulin-3 insert'ü ve pCDH-CMV-MCS-EF1 vektörünün enzim kesimleri için Tablo 3.15'de verilen şartlar doğrultusunda EcoRI HF (Kat No: R0310, NEB) restriksiyon enzimiyle muamele edildi (Şekil 4.8). pCDH-CMV-MCS-EF1 vektörünün kesim işlemi bittikten sonra vektörün 5' ucu fosfat grupları ile 3' OH grupları self ligasyon yapmaması için alkalen fosfataz işlemine tabi tutuldu. Böylece defosforile edilerek ligasyon için hazır hale getirildi.

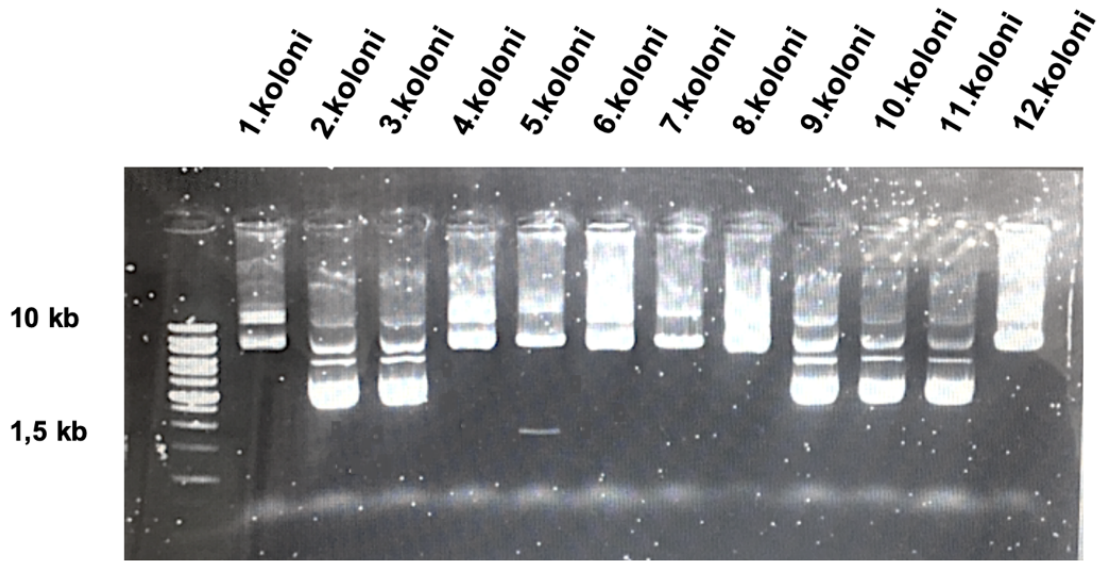
Tasarlamış olduğumuz vektörün ve insert DNA'nın her iki ucunda da EcoRI dizilerinin olmasının avantajı, insert DNA sense ve antisense yönde girebilme olasılığına sahip olmasıdır. Insert DNA sense yönde girerse pCDH-CMV-MCS-EF1 vektörünün sahip olduğu puromisin direnç geni sayesinde puromisin seçim markerli ekspresyon vektörüne eğer antisense yönde lokalize olursa Fibulin-3 mRNA'sını baskılayacak antisense Fibulin-3 vektörü elde edilecektir.

Ligasyon aşamasından sonra ürünleri kompetent yapılmış *E. coli*'nin bir suşu olan DH5 α transformasyon yapıldı. Transformasyon işleminde DH5 α bakterileri çalkalamalı inkübatörde LB besiyeri ortamında (+Amp) 37 °C'de 200 rpm'de 16-24 saat inkübe ettikten sonra daha önceden hazırlanan 10'luk petrilerdeki, seçim markerli (+Amp) LB-agar katı besiyerine aseptik koşullar altında 50 ve 100 μ l'lik yayma ekim yapıldı. Petriler etüvde 37 °C'de koloniler net bir hale gelene kadar inkübe edildi (Şekil 4.9). Koloni seçiminde, kolonilerin büyük ve pürüzsüz olmasına dikkat edildi. 12 adet koloni seçimi yapıldıktan sonra bek alevi altında 10 ml'lik pipet ucu yardımıyla koloninin orta noktasına dokunduktan sonra 15 ml'lik falkonlar içindeki LB (+Amp) besiyeri ortamında pipetaj yapılarak koloninin besiyerine aktarılması sağlandı. Falkonlar 37 °C'de 200 rpm'de 16-24 saat inkübe edildikten sonra 3.2.11 Plazmid izolasyonu başlığı altında verilen izolasyon protokolüne göre plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidler Tablo 3.15'de verilen şartlar doğrultusunda EcoRI enzimi ile kesim işlemi gerçekleştirildi. Kesim işleminden sonra %0,7-1' lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.10). Şekil 4.10'da görüldüğü gibi 5. koloninin Fibulin-3 klonunu taşıyan vektör olduğunu tespit edildi.

Antisense Fibulin-3 kalıcı vektörü tasarlanırken 1536 baz çifti uzunluğunda olan insert DNA'sını bulundurduğunu düşündüğümüz 5. koloninin sekanslanmasında kullanılacak klonlama yaptığımız bölgenin biraz daha ilerisinden (vektörde içeren bölgelerden) sekans primerleri tasarlandı. Sekans işlemini ABI 3130 Genetic Analyzer Sanger sekans cihazında yapıldı. Sekans cihazının kendi yazılımında yaptığımız sekans analizleri sonucunda hem forward primer sekansında hem de Reverse primer sekansında insert DNA'nın antisense istikametinde lokalize olduğu belirlendi.



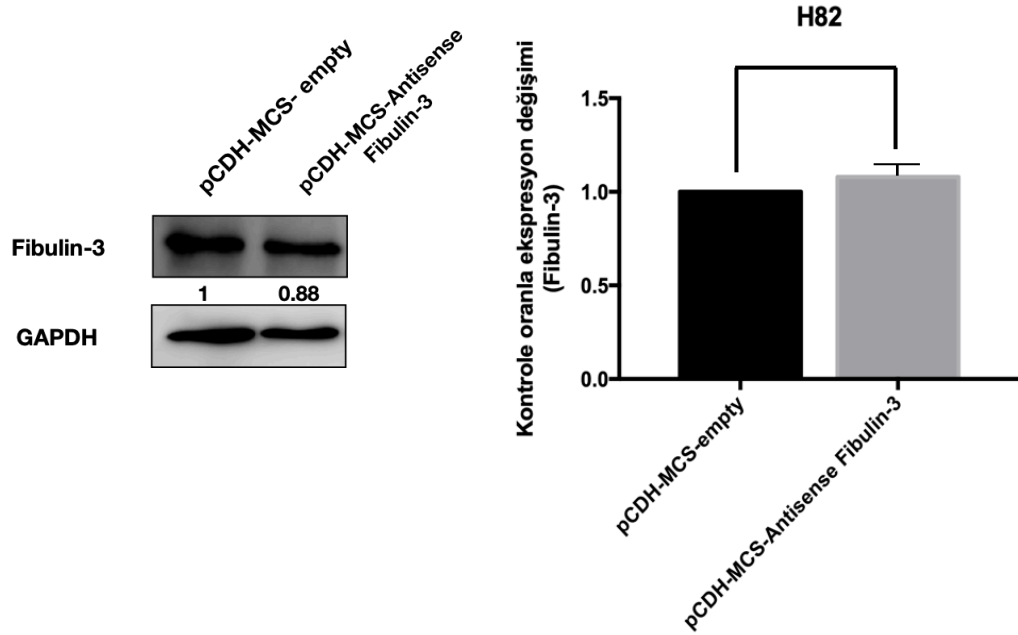
Şekil 4.12 Ligasyon sonrası tek koloni seçimi.



Şekil 4.13 Ligasyon sonrası insert DNA'yı taşıyan vektörün belirlenmesi

4.2.2.1.3 Antisense Fibulin-3 kalıcı vektörün etkinliğinin belirlenmesi

Seçilmiş olan 5. koloni sekans analizi ile kontrol edildikten sonra Antisense Fibulin-3 kalıcı vektörünün etkinliğinin tespiti amacıyla Fibulin-3 ifadesi yüksek H82 KHAK hücre dizisinde hem Western Blot yöntemiyle hem de qPCR analiziyle kontrol edildi. KHAK H82 hücre dizisine pCDH-CMV-MCS-empty ve pCDH-CMV-MCS-Antisense Fibulin-3 vektörleri ayrı ayrı transfekte edildi. Transfeksiyon işleminden sonra ilk 24. saat 0 kabul edilerek 48 saat sonra transfektan hücre lizatlar toplandı. Protein ve RNA izolasyonu materyal ve metot bölümünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. pCDH-CMV-MCS-Antisense Fibulin-3 vektörünün verimliliğinin belirlenmesi için yapılmış qPCR ve Western Blot, sonuçlarına göre Fibulin-3 ifadesi yüksek olan H82 hücre dizisinde pCDH-CMV-MCS-empty vektöre oranla pCDH-CMV-MCS-Antisense Fibulin-3 vektörünün protein seviyesini baskılayarak mRNA ekspresyonunu baskılayamadığı gözlemlendi. KHAK H82 hücre dizisinde Fibulin-3 ifadesini istediğimiz seviyeye düşürmek için ticari olarak temin edilmiş siFibulin-3 ve shRNA-Fibulin-3 kullanılarak Fibulin-3'ün ekspresyonunun baskılanması planlandı.



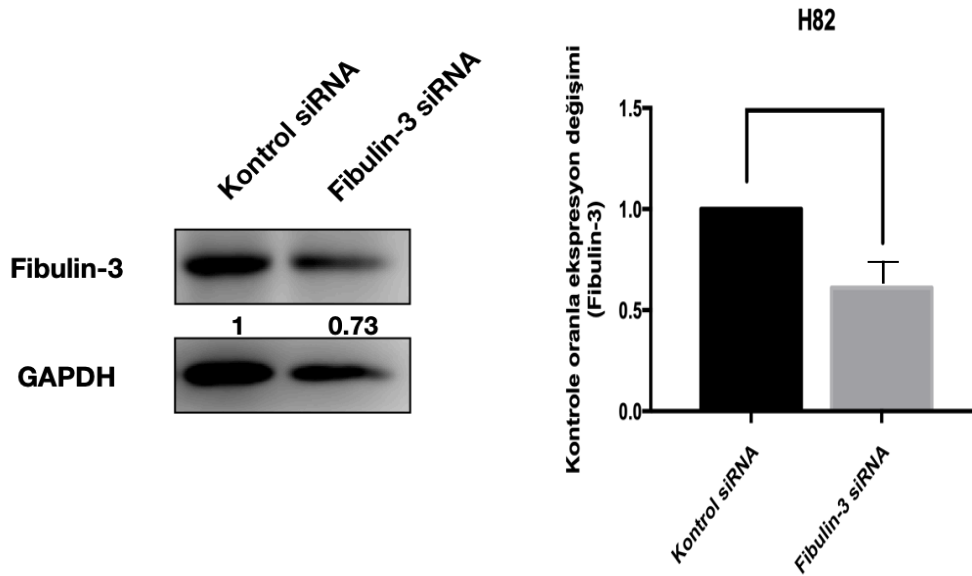
Şekil 4.14 Antisense Fibulin-3 kalıcı vektörünün etkinliğinin hem Western Blot hem de qPCR ile gösterilmesi.

4.2.2.2 Fibulin-3 ekspresyonunun baskılanması için Lenti-shRNA vektörlerinin ve siRNA'nın etkinliğinin belirlenmesi

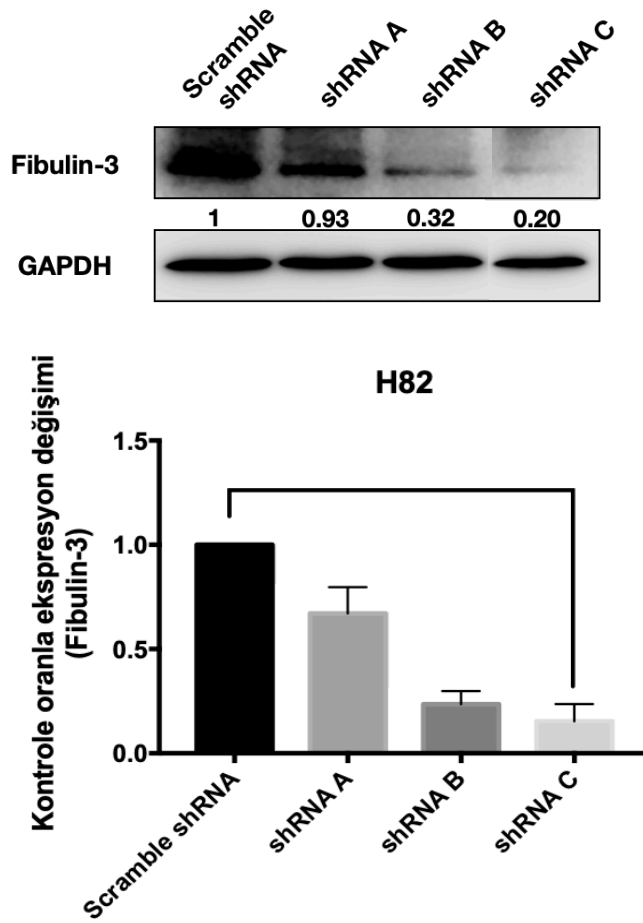
Fibulin-3 ekspresyonunu baskılayabilmek için ticari olarak OriGene'den temin edilen EFEMP1- Human, 4 unique 29 mer shRNA lenti viral GFP özelliğine sahip lenti viral vektör kullanıldı. KHAK H82 hücre dizisine lentiviral vektör infeksiyon yapılarak Fibulin-3 ekspresyonunun baskılanması planladı. Aynı zamanda Dharmacon'dan ticari olarak temin ettiğimiz Human EFEMP1 siRNA'sı Lipofectamin transfeksiyon ajanı yardımı ile KHAK H82 hücre dizisine transfekte edildi. İki farklı metodu birbiriyle karşılaştırarak en verimli metodu belirlemeyi amaçladık.

Fibulin-3 ifadesinin baskılanması bağlamında farklı bir dizi teknik kullandık. pCDH-CMV-MCS-Antisense Fibulin-3 vektörü oluşturulduktan sonra vektörün verimliliğini gösterebilmek için hem protein hem de mRNA Fibulin-3 ekspresyonuna bakıldı. Sonuçların birbiriyle tutarsız olduğu görüldükten sonra Fibulin-3 siRNA'sı kullanılarak Fibulin-3 ifadesinin baskılanması hedeflendi. Fibulin-3 siRNA'sı kullanılarak yapılan transfeksiyon sonrasında protein ifadesinin kontrole oranla yaklaşık $\frac{1}{4}$, mRNA ifadesinin ise yine kontrole oranla yaklaşık $\frac{1}{3}$ oranında baskılandığı tespit edildi. Planlamış olduğumuz çalışmada Fibulin-3'ün biyolojik süreçlerden EMT ve kök hücre fenotipi üzerine olan etkisini daha net görmek için Fibulin-3 ifadesinin daha fazla baskılanmasını hedefledik. Bu hedef doğrultusunda seçim markerine sahip lentiviral-

shRNA-Fibulin-3 vektörü kullanılarak hem infeksiyonunun verimliliğinden hem de puromisin aracılı seçim avantajlarından yararlanılarak daha yüksek baskılama oranlarına ulaşmayı öngördük. İnfeksiyon sonrası seçilimin tamamlanmasıyla beraber hücre lizatları qPCR ve Western Blot analizi için toplandı. QPCR analizlerine göre, kontrole oranla sırasıyla shRNA A, shRNA B ve shRNA C yaklaşık %30, %70 ve %80 oranında baskılamıştır. Western Blot analizi sonuçlarına göre de Fibulin-3 ifadesi en yüksek verimlilikle shRNA C tarafından %80 oranında baskılanmıştır (Şekil 4.11-13). Yapılmış olan analizler doğrultusunda Fibulin-3'ün baskılanması sürecinde en etkin yöntemin ve ajanın lentiviral-shRNA C olduğu tespit edildi ve bundan sonraki aşamalarda Fibulin-3 ifadesinin baskılanması için lentiviral-shRNA C kullanıldı.



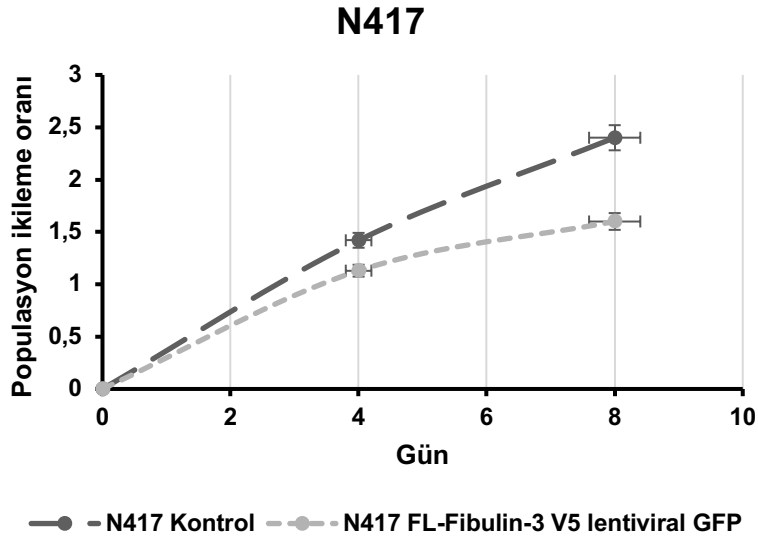
Şekil 4.15 Fibulin-3 siRNA'sinin etkinliğini hem Western Blot hem de qPCR ile gösterilmesi.



şekil 4.18 Fibulin-3 shRNA'sinin etkinliğini hem Western Blot hem de qPCR ile gösterilmesi.

4.3 Fibulin-3 Ekspresyonundaki Değişimin KHAK Hücre Dizilerinde Hücre Proliferasyonuna Etkisi

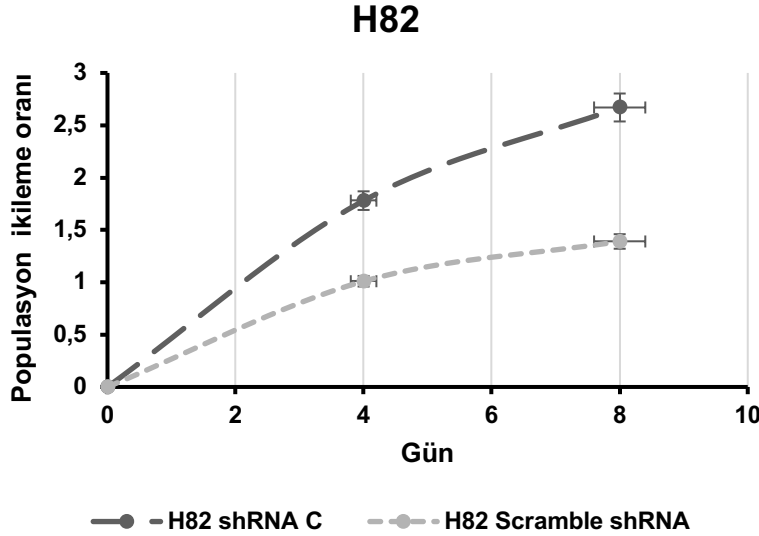
KHAK hücre dizileri H82 ve N417'de, Fibulin-3 ekspresyonundaki değişimin hücre proliferasyonuna olan olası etkisinin belirlenmesi için kümülatif hücre çoğalma analizi yapıldı. Materyal ve metot bölümünde belirtilmiş olan kümülatif hücre çoğalma analizinde 6 kuyu platelere 25×10^4 hücre/ 3 ml olacak şekilde ekildi ve 3'er gün ara ile hücreler tripan mavi ile boyanarak thoma lamında sayıldı. Düzenli olarak sayımlarını yaptığımız hücrelerin ikileme zamanları popülasyon ikileme formülüne göre hesaplandı. N417 kontrol hücresi ile Fibulin-3 ekspresyonu vektörü transfekte edilmiş N417 FL-fibulin-3 V5 lentiviral-GFP hücresi kıyaslandı. N417 hücre hattında Fibulin-3 ekspresyonu arttıkça proliferasyon hızının düştüğü saptandı (şekil 4.14).



Şekil 4.19 KHAK N417 hücre dizilerinde Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak değişen populasyon çoğalma hızı

Fibulin-3 ekspresyon seviyesi yüksek KHAK H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyonunun baskılanması için shRNA C vektörünün infeksiyonu yapıldı. Kontrol hücre dizisinin oluşturulması amacıyla shRNA scramble lenti viral vektörü kullanıldı. H82 shRNA scramble hücre dizisiyle H82 shRNA C hücre dizisi, populasyon ikileme kapasiteleri bakımından kıyaslandığında Fibulin-3 ekspresyonunun baskılandığı H82 shRNA C hücre dizisinde populasyon ikileme süresinin daha geç olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15).

KHAK H82 ve N417 hücre dizilerinde gerçekleştirilen populasyon ikileme deneyinde Fibulin-3 ekspresyonunun artmasına bağlı olarak hücre çoğalma hızında bir azalma meydana geldiği görüldü. Bu sonuçlar KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinin çoğalma kinetiklerinin Fibulin-3 ya da Fibulin-3 aracılı moleküllere bağlı olabileceğini göstermektedir.

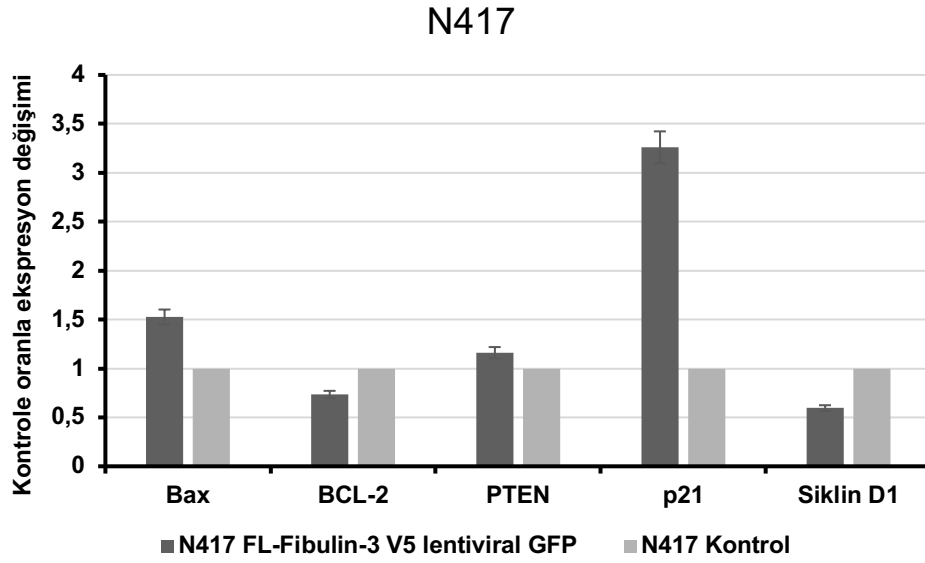


Şekil 4.20 KHAK H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak değişen populasyon çoğalma hızı.

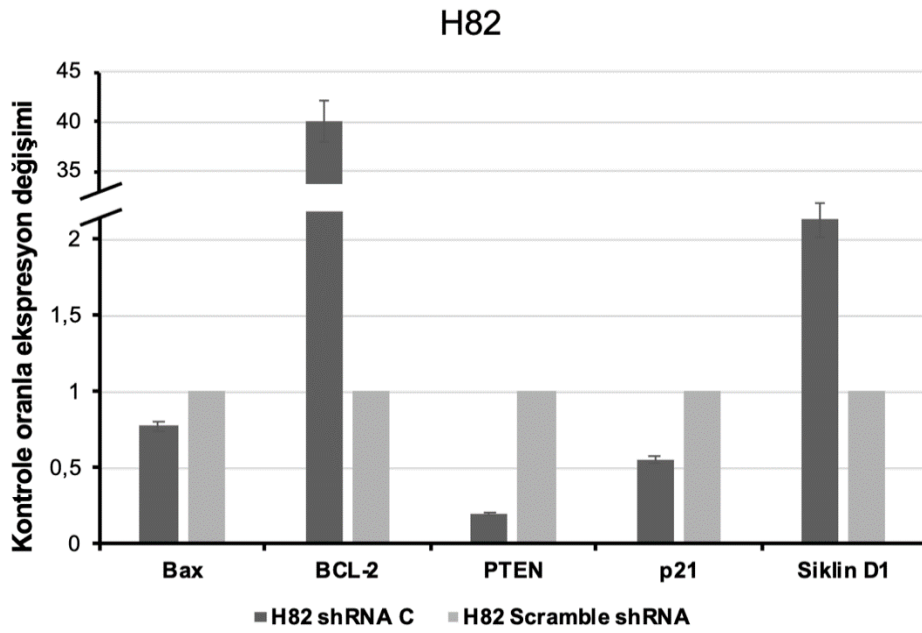
4.3.1 Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak hücre proliferasyonunda görev alan proteinlerin ekspresyon değişimleri

PTEN hücre proliferasyonu ve sağ kalımı için önemli bir yolak olan PI3K/AKT yolağının negatif düzenleyicisidir. KHAK hücre dizilerinde, Fibulin-3'ün hücre proliferasyonu üzerine olası etkisi önceki sonuçlarda gösterilmişti (Şekil 4.14 ve Şekil 4.17). Fibulin-3'ün hücre proliferasyonu ve sağ kalımı üzerinde aktif rol alan moleküllerle nasıl bir interaksiyon içinde olduğunu belirlemek için, H82 shRNA C, H82 shRNA scramble ve N417 kontrol, N417 Fibulin-3 ekspresyon vektörü transfekte hücrelerinde Bax, Bcl-2, p21, PTEN ve siklin D1 ifadelerine bakıldı.

KHAK N417 hücre dizisinde ve H82 hücre dizisinde Fibulin-3 ifadesine bağlı yapılan kıyaslamada, Fibulin-3 ekspresyon vektörü transfekte N417 hücre dizisi ile yine Fibulin-3 ekspresyon seviyesi yüksek H82 shRNA scramble infekte hücre dizisinde PTEN ekspresyonunun yüksek olduğu saptanmıştır. Fibulin-3 ekspresyon vektörü transfekte edilmiş N417 hücre dizilerinde artan Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak Siklin D1 ve Bcl-2 genlerinin ifadesi istatistiksel olarak önemli seviyede düşmüş iken hücre siklus inhibitörü olarak bilinen p21 ifadesi artmıştır (Şekil 4.16). Fibulin-3 ifadesi baskılanan H82 hücre dizilerinde Siklin D1, Bcl-2, p21 ve Bax ifade değişimleri analiz edildiğinde. QPCR sonuçları doğrultusunda H82 hücre dizilerinde Siklin D1 ve Bcl-2 gibi genlerin ifadesi istatistiksel olarak önemli seviyede artmış iken hücre siklus inhibitörü olarak bilinen p21 ve Bax'in ifadesi azalmıştır (Şekil 4.17).



şekil 4.21 KHAK N417 hücre dizisinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak ekspresyonu değişen mRNA'lar. * $p < 0.05$



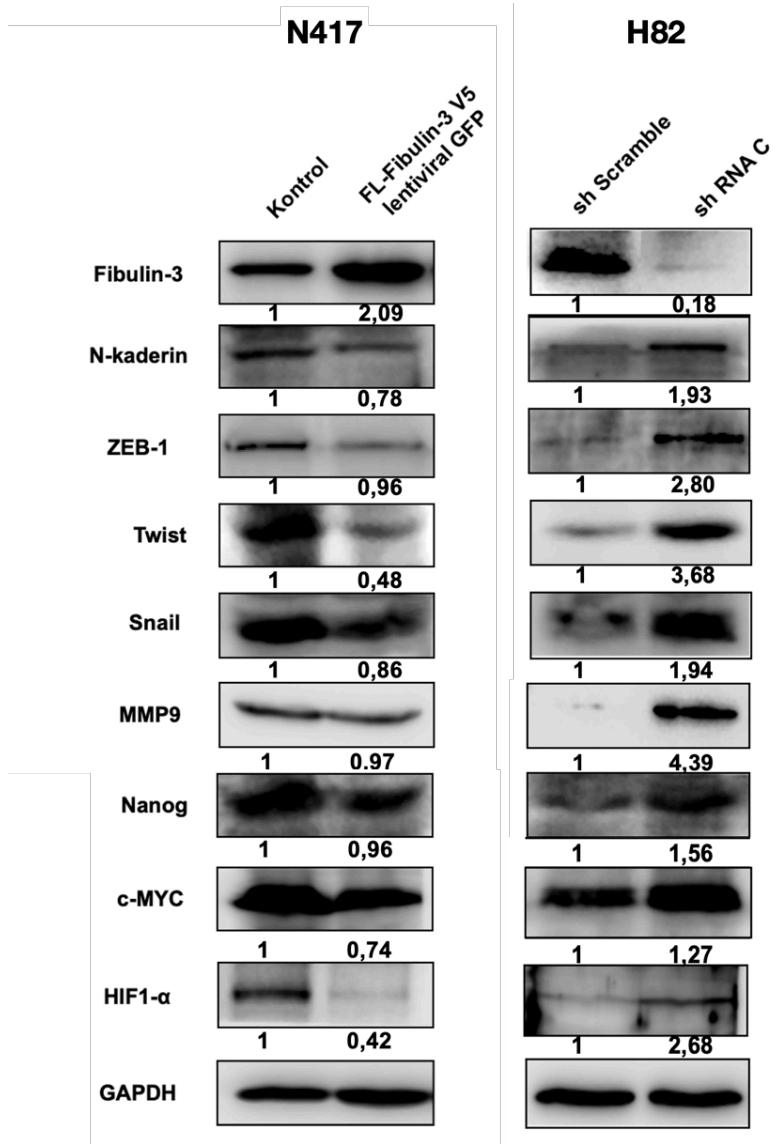
şekil 4.22 KHAK H82 hücre dizisinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak ekspresyonu değişen mRNA'lar. * $p < 0.05$

4.4 Fibulin-3 Ekspresyonunun Kanser Kök Hücre Fenotipine ve EMT Regülasyonuna Etkisi

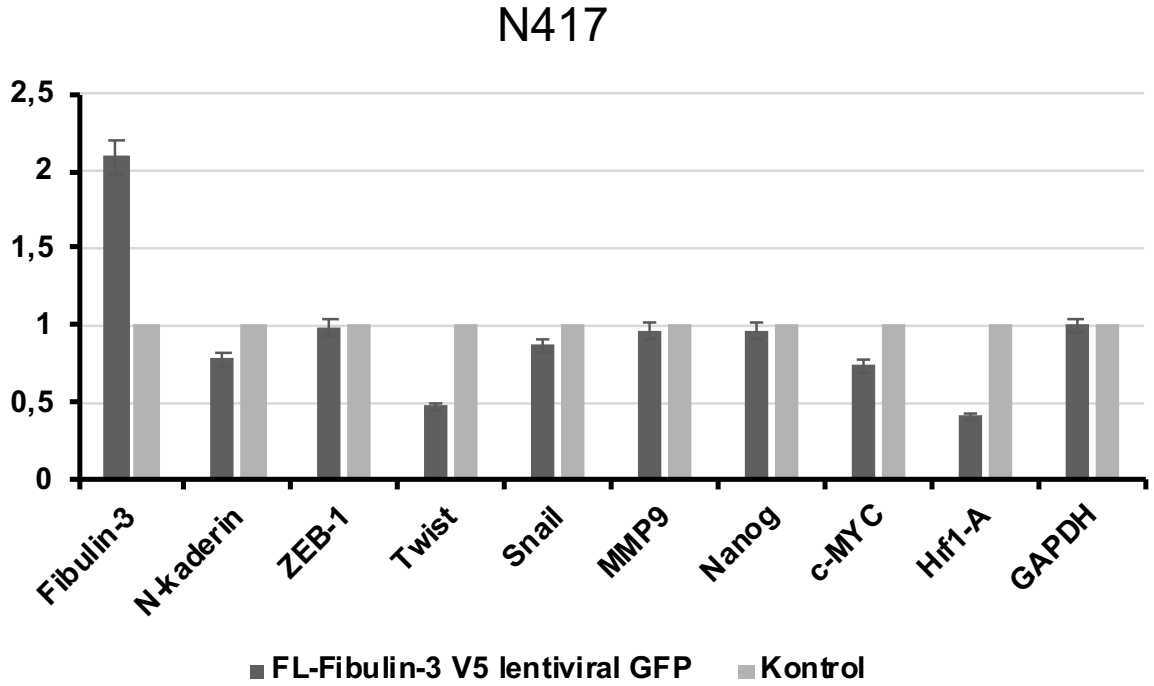
Çalışmamızda Fibulin-3 ekspresyonunu düzenlenmesi için lentiviral temelli Fibulin-3 ekspresyon ve shRNA-C (Fibulin-3) vektörleri kullanıldı. KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinin sahip olduğu doğal Fibulin-3 ekspresyonlarının antogonist bir şekilde ifade etmeleri sağladı. N417 ve H82 hücre dizilerinin eksprese ettiği Fibulin-3 seviyelerinin antogonist değişimine bağlı olarak EMT-MET sürecinde yer alan epitelyal ve mezenkimal markerlerdeki değişimleri ve hücre plastisitesinde ifade farklılığı gösteren, kanser kök hücre fenotipinde hücre özelliklerini belirleyen markerlerin ifade değişimleri Western Blot yöntemiyle analiz edildi.

Western Blot analizi kapsamında KHAK N417 hücre dizisinde Fibulin-3, N-kaderin, ZEB-1, Twist, Snail, MMP9, Nanog, c-MYC, HIF1-A, GAPDH proteinleri analiz edildi (Şekil 4.18). Western Blot sonuçlarımızı dansitometrik olarak kontrole oranla değerlendirdiğimizde (Şekil 4.19); N417 hücre hattında Fibulin-3 ekspresyonunun artışına bağlı olarak EMT markerlerinden mezenkimal farklılaşma ile ilgili N-kaderin, ZEB-1 ve EMT transkripsiyon faktörlerinden Twist ve Snail'in ifadelerinde azalış olduğunu saptandı. Aynı şekilde Fibulin-3 ekspresyonunun matriks metalloproteinaz MMP9 ifadesini baskıladığı da saptandı. Nanog, c-MYC ve HIF1-alfa, kök hücre markerlerinin Fibulin-3 ifadesinin artışına bağlı olarak, ekspresyon seviyelerinin düştüğü gözlemlendi.

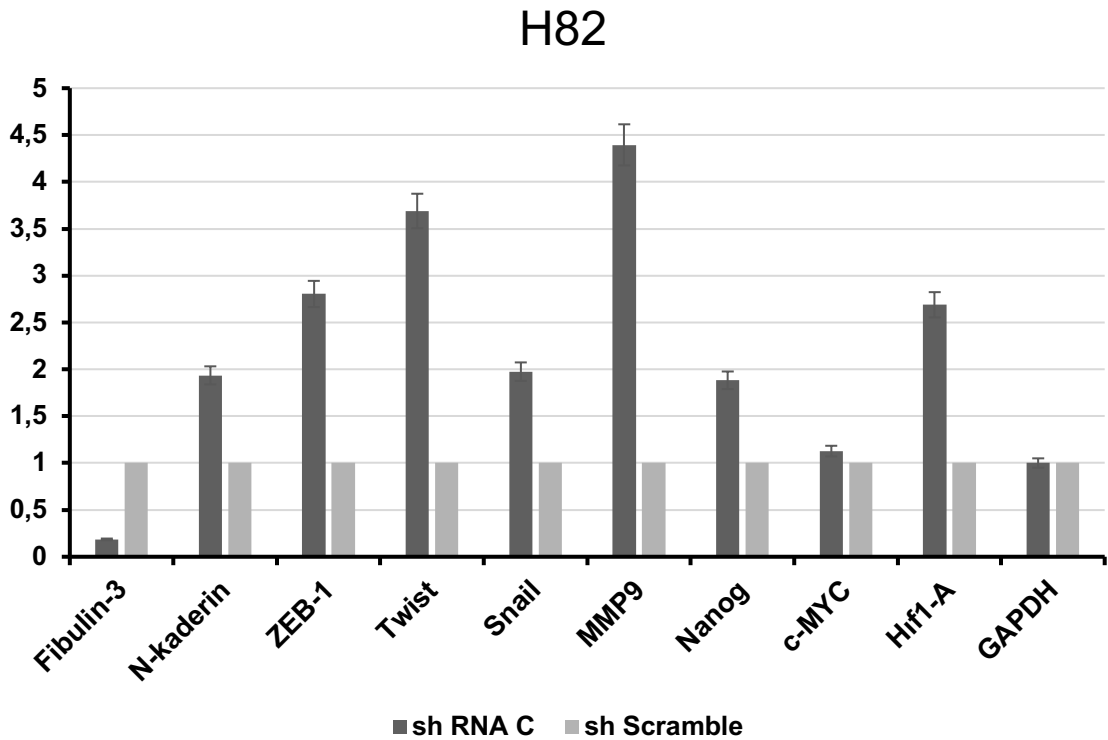
KHAK H82 hücre dizisinde Fibulin-3, N-kaderin, ZEB-1, Twist, Snail, MMP9, Nanog, c-MYC, HIF1-A, GAPDH proteinleri analiz edildi (Şekil 4.18). Western Blot sonuçları dansitometrik olarak kontrole oranla değerlendirildiğinde (Şekil 4.20); H82 hücre dizisinde Fibulin-3 ekspresyon seviyesi baskılandığı zaman EMT markerlerinden mezenkimal farklılaşma ile ilgili olan N-kaderin, ZEB-1 ve transkripsiyon faktörlerinden Twist ve Snail'in ekspresyon seviyelerinde artış olduğu saptandı. Aynı şekilde Fibulin-3 ekspresyonunun MMP9 ifadesi ile negatif korelasyona sahip olduğunu teyit edildi. Nanog, c-MYC ve HIF1-alfa kök hücre markerlerinin Fibulin-3 ekspresyon seviyesinin düşmesine bağlı olarak, ekspresyon seviyelerinin artmış olduğu gözlemlendi.



Şekil 4. 23 N417 ve H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak farklılık gösteren markerler. Fibulin-3 ekspresyon vektörü transfekte edilmiş N417 hücre dizisinde ve shRNA C infekte H82 hücre dizisinde EMT, kök hücre ve hücre proliferasyonu ile ilişkili markerlerin protein ifadesindeki değişimlerinin Western Blot yöntemi ile belirlenmesi.



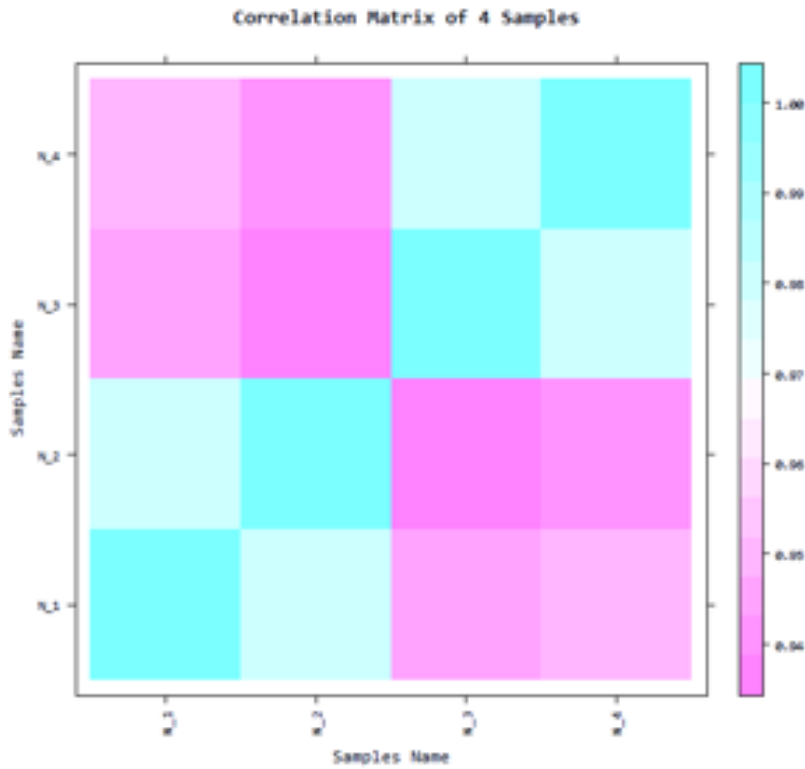
Şekil 4. 24 N417 hücre dizisinde, Fibulin-3 ekspresyonundaki bağılı olarak ifadesi değişen EMT, kök hücre ve hücre proliferasyonu ile ilişkili markerlerin dansitometrik olarak değerlendirilmesi.



Şekil 4. 25 H82 hücre dizisinde, Fibulin-3 ekspresyonundaki bağılı olarak ifadesi değişen EMT, kök hücre ve hücre proliferasyonu ile ilişkili markerlerin dansitometrik olarak değerlendirilmesi.

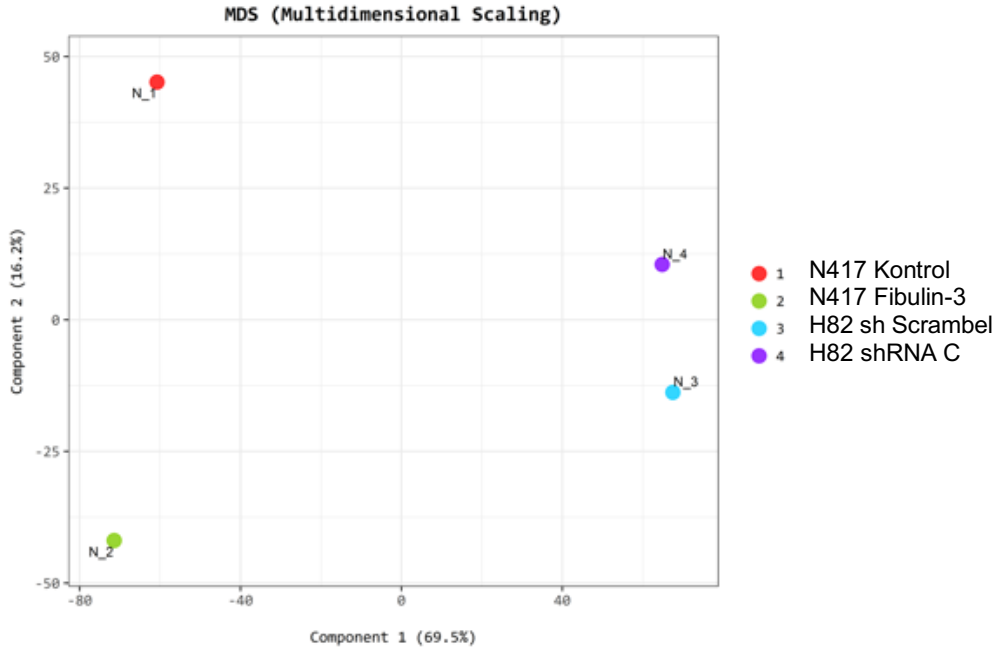
4.4 KHAK Hücre Dizilerinde Fibulin-3 İfadesine Bağlı Olarak Düzenlenen RNA Ekspresyonlarının Mikroarray Yöntemi ile Belirlenmesi

Ekstraselüler matriks elamanı olarak, hücre invazyonu, proliferasyonu gibi biyolojik proseslerde görev alan Fibulin-3'ün KHAK N417 ve H82 hücrelerindeki fonksiyonu hakkında daha ayrıntılı bilgiye sahip olabilmek için Fibulin-3 ekspresyon vektörü transfekte edilmiş N417 hücre dizisi ile shRNA C infekte edilmiş H82 hücre dizisi ve bu hücre dizilerinin kontrol grupları oluşturuldu. Oluşturulan bu hücre dizileri mikroarray çalışmasına gönderilmeden önce hem protein hem de mRNA düzeyinde Fibulin-3 ifade değişimleri tespit edilip doğruladıktan sonra örnekler, Macrogen'den hizmet alımı şeklinde planladığımız "Affymetrix's Human GeneST array platformunda" analiz edilmek üzere hazırlandı. Örneklerin hazırlık aşamasında Mikroarray çalışmasına gönderilecek örneklerden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve transfer için Macrogen firmasının önerdiği NaAsetat çöktürme metoduna göre örnekler hazırlandı. Mikroarray aşamasından sonra her örnek için Macrogen'in gerçekleştirmiş olduğu örnek korelasyon bilgileri şekil 4.21'de verilmiştir.

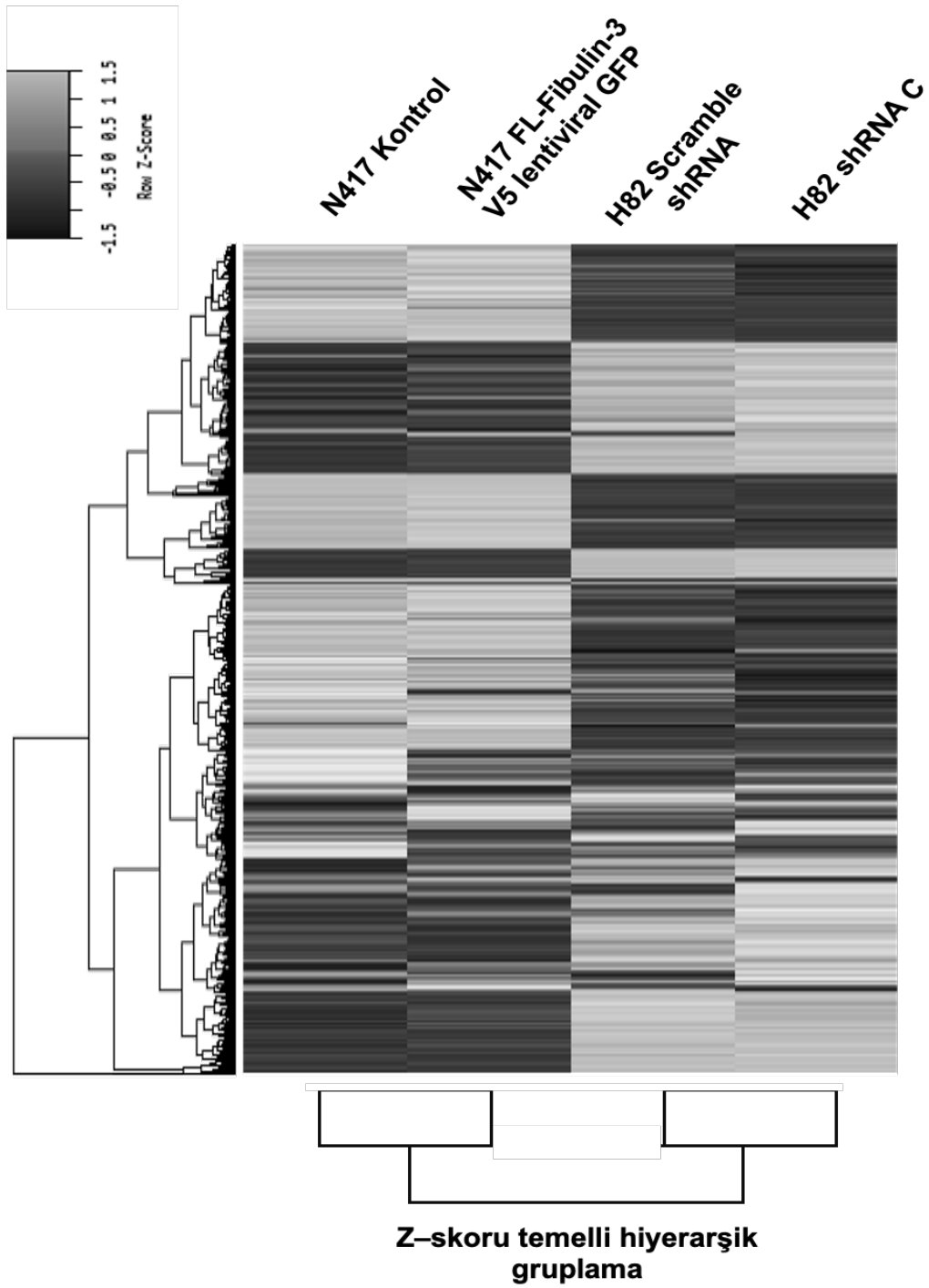


Şekil 4. 26 Mikroarray analizi sonucunda belirlenen örnekler arasındaki korelasyon

Mikroarray analiz sonucunda, örnekler R studio programında çok boyutlu ölçekleme analizi ve Z-skoruna göre yapılan hiyerarşik heatmap analizleri ile değerlendirildiğinde. N_1 ve N_2'nin aynı profile sahip farklı ekspresyon dağılımında olduğunu görülmüyor aynı şekilde N_3 ve N_4'ün de aynı profile sahip farklı ekspresyon dağılımında olduğu görülmüyor. Fibulin-3 ekspresyon seviyesi düşük ve baskılanmış N_1 ve N_4 örneklerindeki korelasyonu Fibulin-3 ekspresyon seviyesi yüksek N_2 ve N_3 örneklerinde de görülmektedir (Şekil4.22). KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinde yapmış olduğumuz Fibulin-3 ekspresyon değişimleri sonucunda ekspresyonu 1.5 kat azalan ve artan tüm transkriptlerin profilleri ve hiyerarşik sınıflandırmaları, z skorlamasına göre şekil 4.23'de verilmiştir.



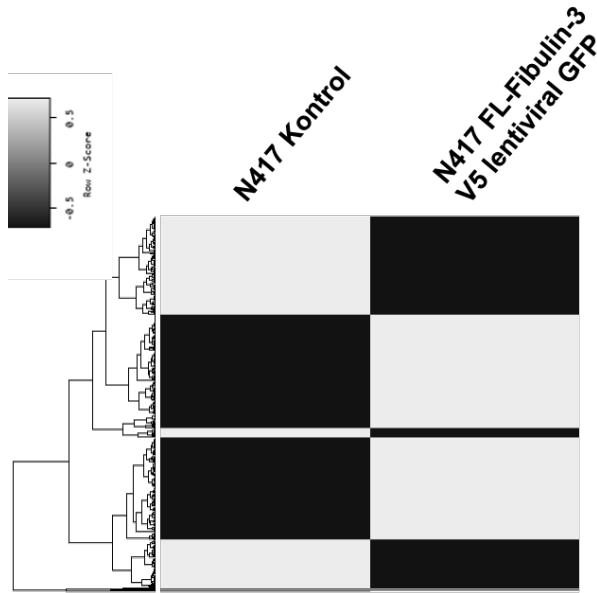
Şekil 4. 27 Çok boyutlu ölçekleme ile örnekler arasındaki benzerlik düzeyleri



Şekil 4. 28 Fibulin-3'ün ifadesinin modüle edildiği KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinin Z skorlama sistemine göre örneklerin hem hiyerarşik sınıflandırılması hem de 1.5 kat değişimi ile -1.5 kat değişimi arasındaki transkript dağılımının heatmap grafiği.

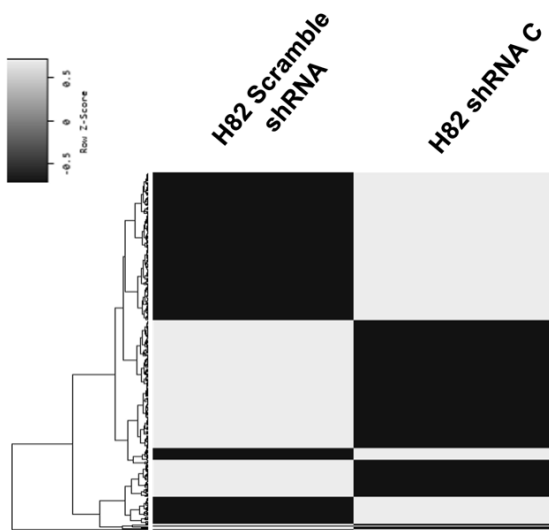
N417 kontrol ve N417 FL-Fibulin-3 V5 lentiviral GFP örnekleri mikroarray çalışması sonucunda 0.5 kat değişimi dikkate alınarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda KHAK N417 hücre dizisinin Fibulin-3 ekspresyon değişimi (0.5 kat

değişiminde) neticesinde upregüle ve downregüle olan transkriptlerin anlamlı bir şekilde negatif korelasyon gösterdiği saptandı (Şekil 4.24).



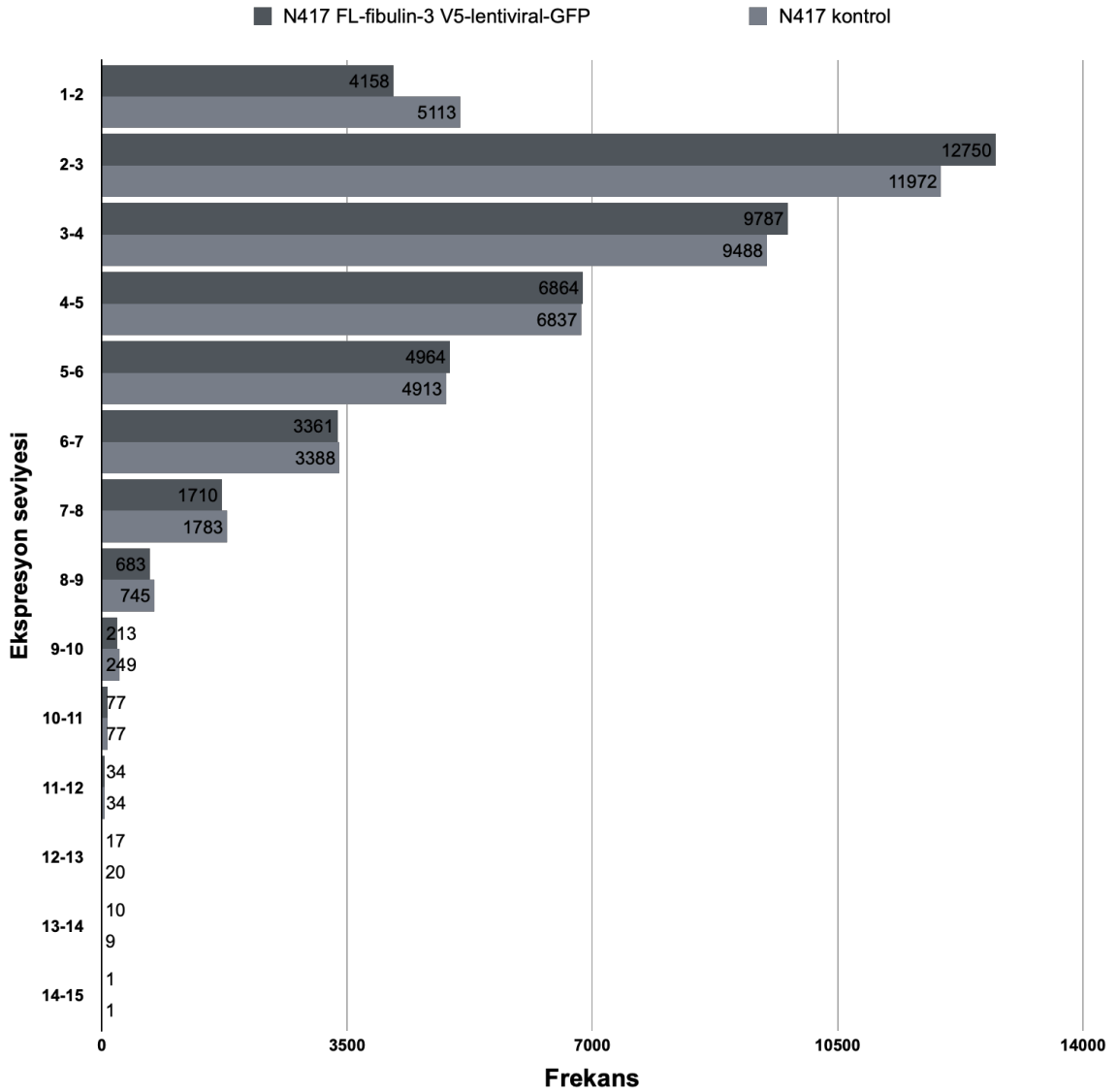
Şekil 4.29 Fibulin-3'ün aşırı ifade edildiği KHAK N417 hücre dizisinde 0.5 kat değişimi ile -0.5 kat değişimi arasındaki transkript dağılımının heatmap grafiği.

H82 Scramble shRNA ve H82 shRNA C örneklerinin mikroarray sonuçları 0.5 kat değişimi dikkate alınarak analiz edildi. Analiz sonucunda KHAK H82 hücre dizisindeki Fibulin-3 ekspresyon değişiminin etkilediği transkriptlerin (0.5 kat değişiminde) upregülasyonu ve downregülasyonu Şekil 4.25 de gösterilmiştir.

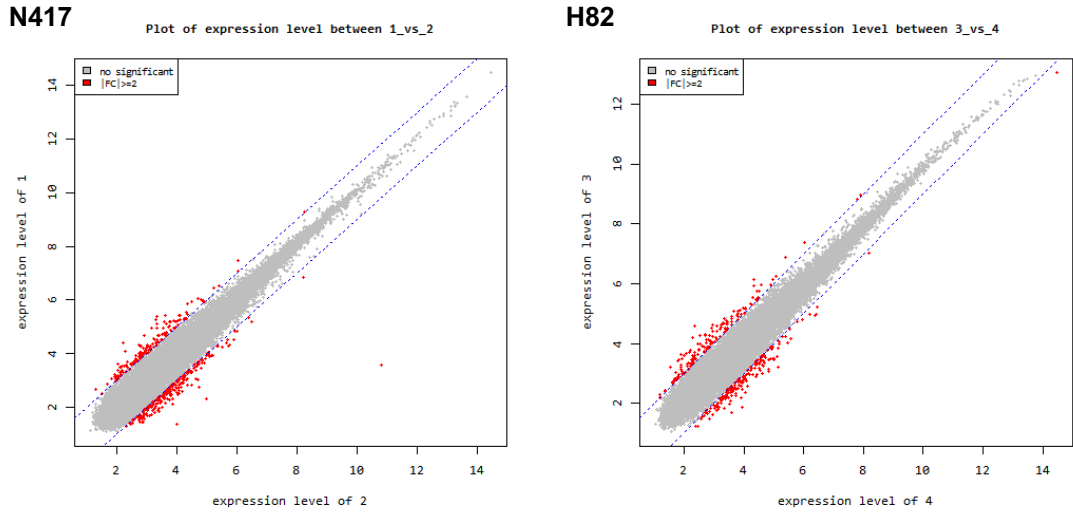


Şekil 4.30 Fibulin-3'ün baskılandığı KHAK H82 hücre dizisinde 0.5 kat değişimi ile -0.5 kat değişimi arasındaki gen dağılımının heatmap grafiği.

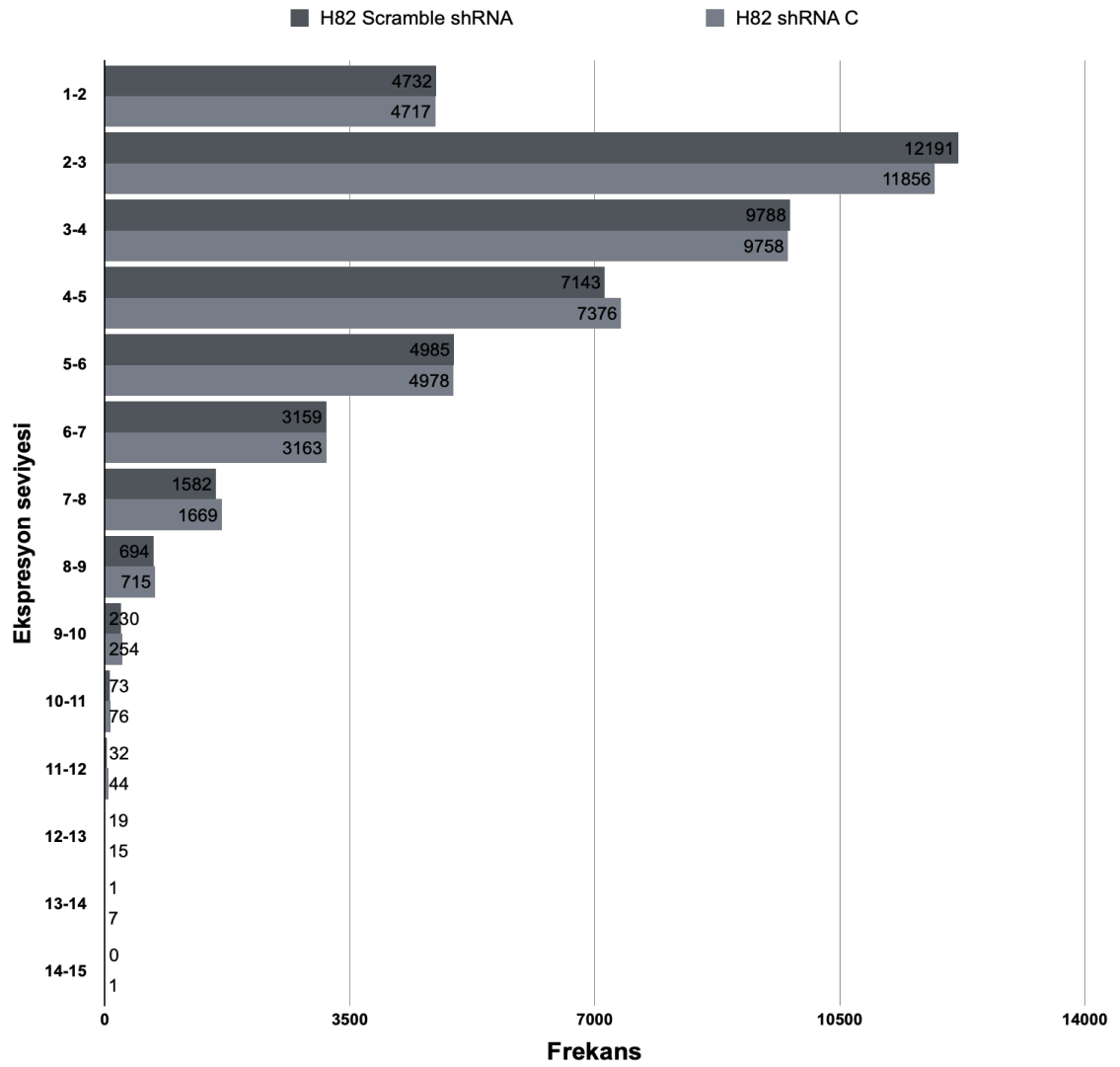
KHAK N417 hücre dizisinde Fibulin-3 ifadesinin upregülasyonu neticesinde 89258 farklı transkriptin ifadesini değiştirdiği saptandı. Ekspresyon seviyelerindeki farklılıklara göre transkriptlerin dağılım sayıları Şekil 4.26'daki grafikte verilmiştir. KHAK H82 hücre dizisinde Fibulin-3 ifadesi baskılandığında ekspresyon değişikliği neticesinde 93003 farklı transkriptin ifadesini değiştirdiği saptandı. Ekspresyon seviyelerindeki farklılıklara göre transkriptlerin sayıları Şekil 4.27'deki grafikte verilmiştir.



Şekil 4. 31 Fibulin-3'ün aşırı ifade edildiği KHAK N417 hücre dizisinde 1ie 15 kat ifade değişimine sahip transkript sayılarının farklı ifade değişimlerdeki dağılım sayıları.

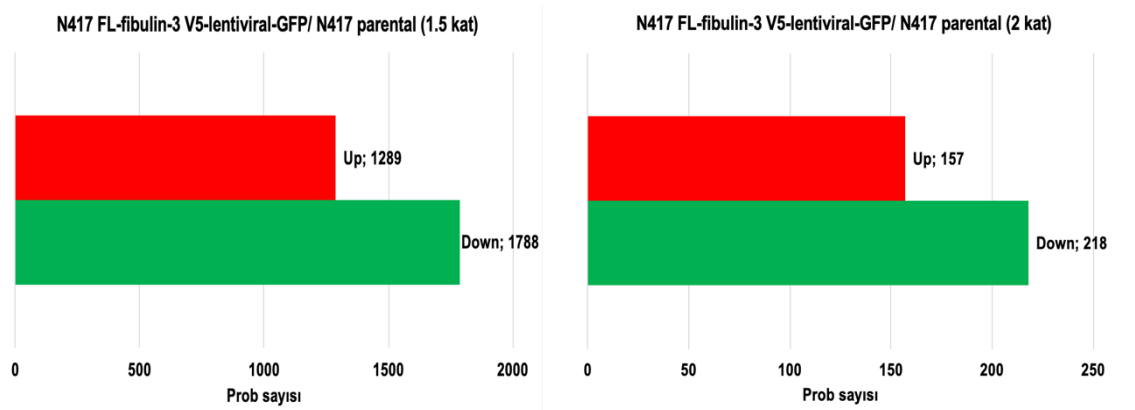


Şekil 4.33 Fibulin-3 baskıldığı ve aşırı ifade edildiği N417 ve H82 hücre gruplarında $|FC| \geq 2$ değerlerine göre ekspresyonun arttığı/azaldığı tespit edilen genlerin dağılımı.

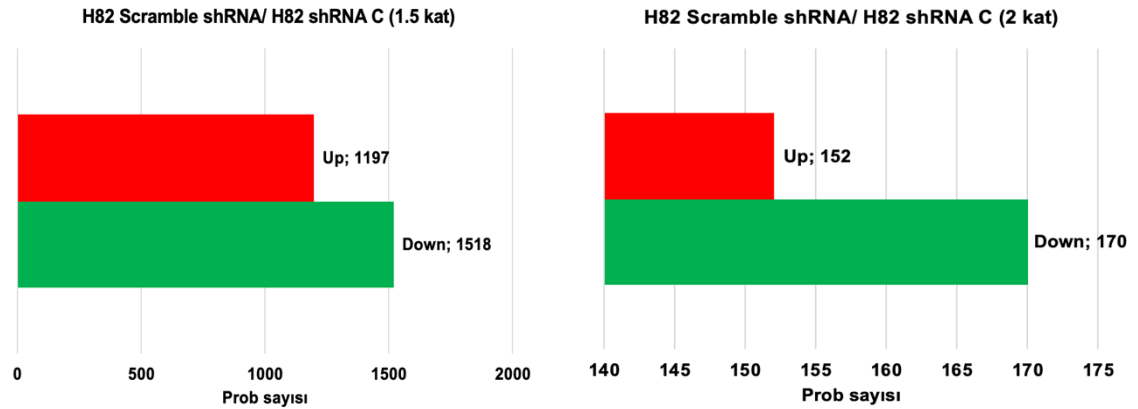


Şekil 4.34 Fibulin-3'ün baskıldığı KHAK H82 hücre dizisinde 1 ile 15 kat ifade değişimine sahip transkript sayılarının farklı ifade değişimlerdeki dağılım sayıları.

Mikroarray verileri N417-fibulin-3 V5-lentiviral-GFP örneği ile N417 kontrol örneği için 1.5 kat değişimi ve 2 kat değişimi “cut off” değeri olarak belirledikten sonra analiz edildiğinde 1.5 kat değişimi için 1289 mRNA probunun upregüle olduğunu ve 1788 mRNA probunun downregüle olduğu saptandı. Cut off değeri 2 eşliğine çıkarıldığında 157 upregüle 218 downregüle mRNA prob değerleri saptandı (Şekil 4.29). Aynı analiz H82 shRNA C örneği ile H82 Scramble shRNA örneği için yapıldığı zaman 1.5 kat değişimi için 1197 mRNA probunun upregüle olduğunu ve 1518 mRNA probunun downregüle olduğu saptandı. Cut off değeri 2 eşliğine çıkarıldığında 152 upregüle 170 downregüle mRNA prob değerleri saptandı (Şekil 4.30).



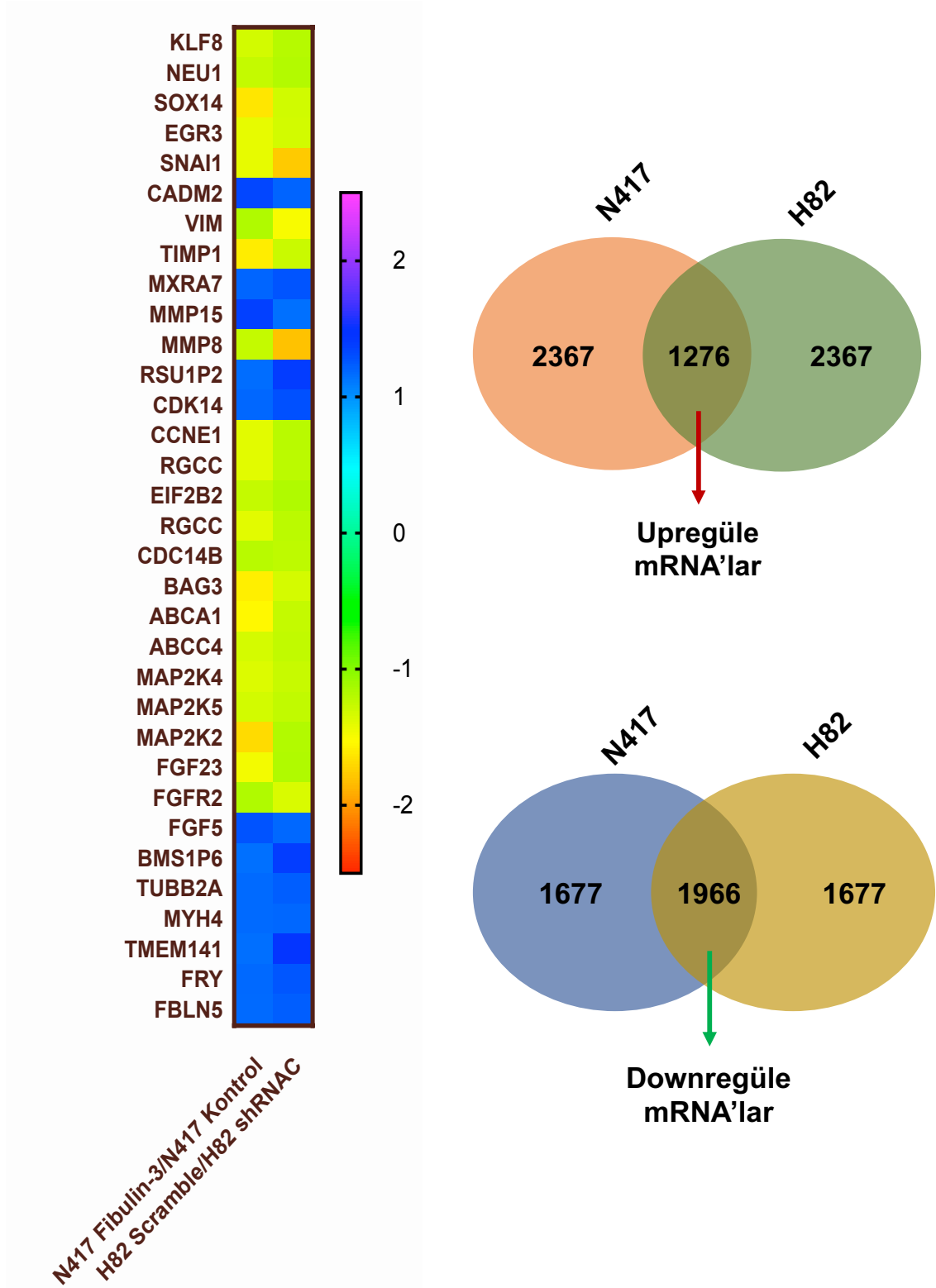
Şekil 4.35 KHAK N417 hücre dizisinde Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak artan ve azalan mRNA prob sayıları.



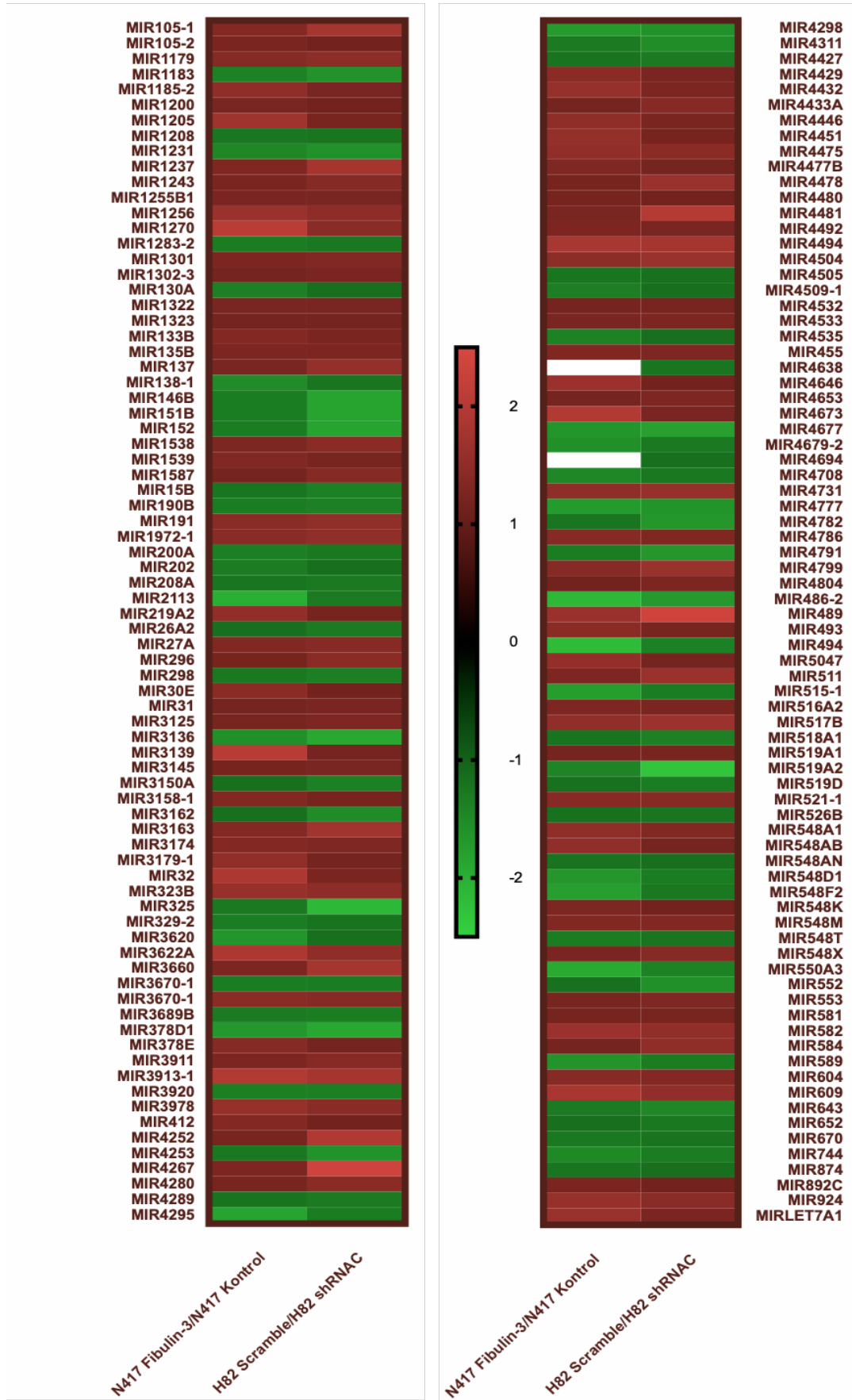
Şekil 4.36 KHAK H82 hücre dizisinde Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak artan ve azalan mRNA prob sayıları.

Mikroarray verilerinden mRNA'ların analizi için farklı cut off değerlerinde filtrelemeler yapıldı. Bu filtrelemelerle sonucunda her iki hücre hattı içinde downregüle mRNA ile upregüle mRNA'ların korelasyon içinde olduğu saptandı. Mikroarray analizinden sonra saptanan mRNA'lar biyoenformatik olarak analize tabi tutuldu. Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak değişen gen ve gen grupları biyoenformatik değerlendirilmesi ve genlerin fonksiyon analizlerinden sonra sonuçlar filtrelendiğinde Şekil 4.31' de verilen ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Yapılmış olan biyoenformatik analizlerde Fibulin-3 ve Fibulin ailesinin literatür geçmişini de göz önüne alarak ECM ile ilişkili genlere, hücre kompozisyonunda görev alan genlere ve EMT sürecinde rol alan genlere ve ayrıca transkripsiyon faktörlerine odaklanıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda kanser kök hücresi, hücre plastisitesinde ve epitelyal mezenkimal geçişte aktif rol oynayan gen gruplarının Fibulin-3 ifadesiyle negatif bir düzenlenmeye girdiği tespit edildi. KHAK'nın öne çıkan özelliklerinden biri de ilaç dirençliliği mekanizmalarının aktifleşme hızı ve kullanımıdır. Bu bağlamda yapılmış olan biyoenformatik analizde KHAK vakalarının sahip olduğu gen amplifikasyonlarını da araştırmamıza dahil ederek N417 ve H82 hücre hatlarında Fibulin-3 ekspresyonunun aşırı ifadesi açısından iki hücre dizisi içinde ortak, ilaç dirençliliğinde ve kötü prognozda modülatör olan genlerin ifadelerinin direkt veyahut indirekt baskıladığı saptandı. Kümülatif bir değerlendirme ile yapılmış olan popülasyon ikileme deneyinde hücre proliferasyonunun ya da popülasyon ikileme süresinin Fibulin-3 ekspresyonu ile ters orantılı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Fibulin-3 ekspresyonunun hücre proliferasyonundaki rolü sadece popülasyon ikileme süresindeki etkisi açısından değerlendirilmedi aynı zamanda qPCR ile hücre proliferasyonu ve apoptotik markerlerin ifadelerine bakılarakta sonuçlar desteklendi. Elde edilen bu verileri hem desteklemek hem de doğrulamak amacıyla mikroarray analizinde de hücre proliferasyonu ile ilişkili genlerin ifadeleri değerlendirildi. Yapılmış olan değerlendirmede Fibulin-3 ekspresyonunun upregülasyonuna göre kıyaslama yapıldığında her iki hücre hattında da Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak ilgili genlerin upregülasyonu ve downregülasyonunda bir korelasyon olduğu saptandı (Şekil 4.31).

Mikroarray analiz sonucunda elde edilen transkriptlerden miRNA'lar filtrelenerek Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı değişim gösteren miRNA'lar değerlendirilmeye alındı. Değerlendirmede N417 Fibulin-3/N417 kontrol ile H82 scramble shRNA/H82 shRNAC kıyaslamasının kesişim kümesi kullanıldı (Şekil 4.32).



Şekil 4.37 KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı ortak değişim gösteren mRNA sayı ve değişim gösteren ilgili genlerin ekspresyonları.



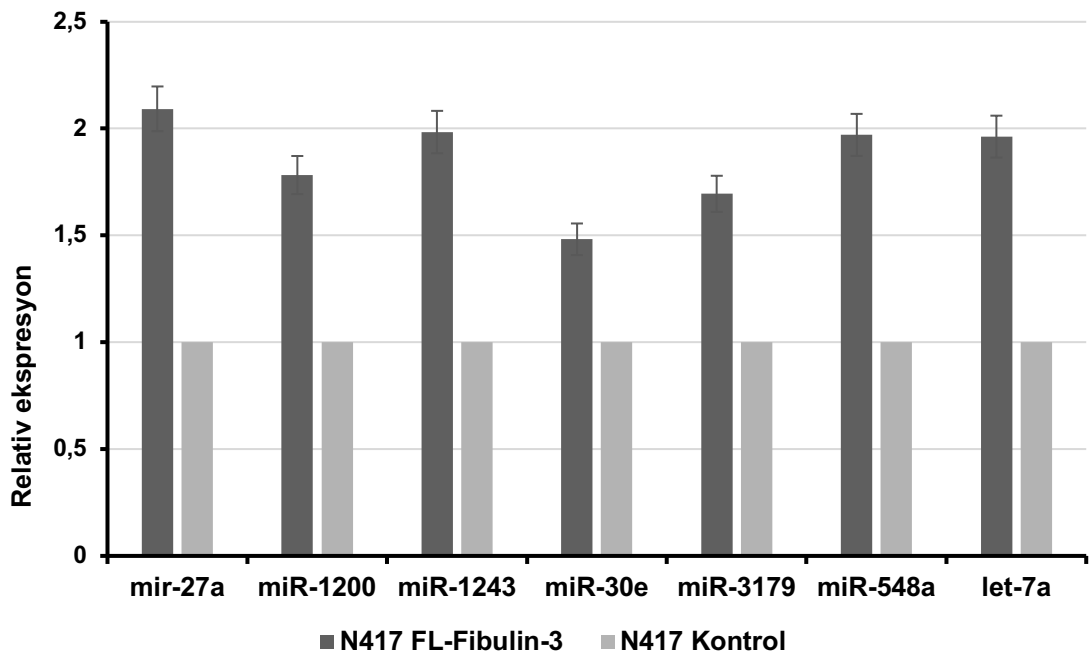
Şekil 4.40 Mikroarray analizlerine göre Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı ifadesi değişen miRNA'lar.

* $p < 0.05$

4.4.1 Mikroarray analizlerinin Real-Time PCR ile teyit edilmesi

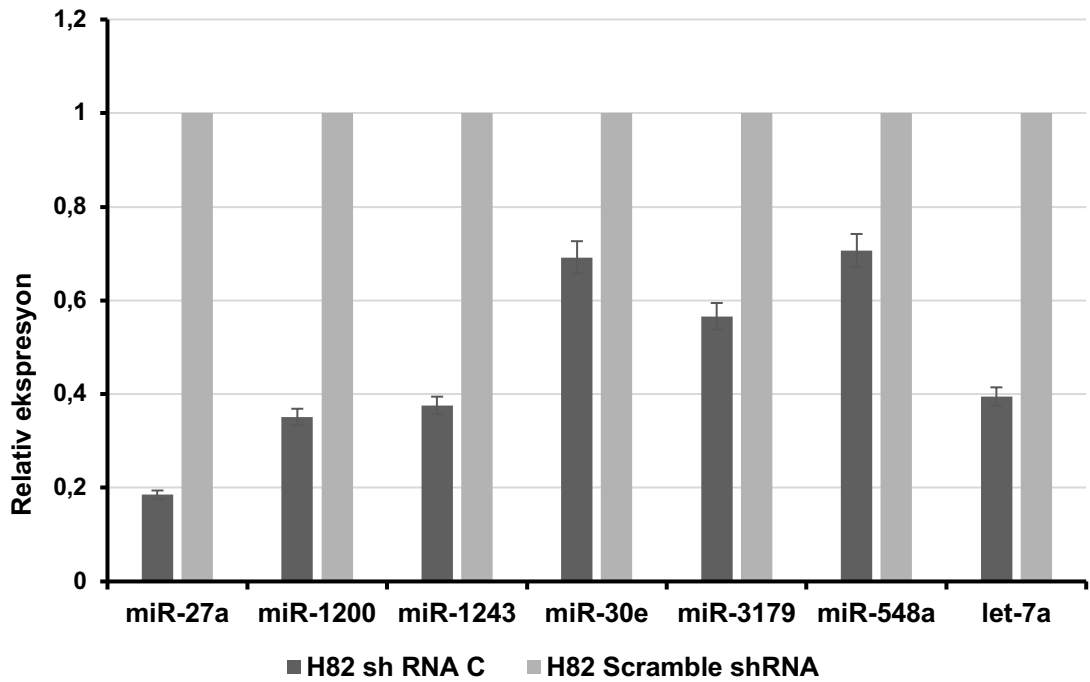
Mikroarray verileri miRNA transkriptleri açısından analiz edildiğinde her iki hücre hattı içinde ortak anlamlılığa sahip miRNA'lar tespit edilmiştir (Şekil 4.32). Filtrelenen bu miRNA'lar biyoenformatik olarak değerlendirilerek karsinogenez için anlamlılık ihtiva eden miRNA'lar hedeflenmiştir. Qiagen firmasından temin edilen primerler ile qPCR analizi ile belirlenen miRNA'lar çalışmaya alınmıştır. Yapılan bu çalışmanın amacı hem mikroarray sonuçlarının teyit edilmesi hem de KHAK N471 ve H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı değişim gösteren miRNA'ların literatüre kazandırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda N417 ve H82 hücre dizilerinden miRNA izolasyonu ve cDNA ede edildikten sonra, miRNA örneklerinde miR-27a, miR-1200, miR-1243, miR-130e, miR-3179, miR-548a, let-7a ifade değişimleri analiz edildi (Şekil 4.33 ve Şekil 4.34).

KHAK N417 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyon artışına bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'lar, qPCR yöntemi ile teyit edildi. Bu çalışmada N417 hücrelerinde Fibulin-3 ekspresyonunun artışına bağlı olarak miR-27a, miR-1200, miR-1243, miR-130e, miR-3179, miR-548a, let-7a miRNA'ları analiz edildiğinde mikroRNA'ların Fibulin-3 ekspresyon artışına bağlı olarak ekspresyon seviyelerinde önemli bir artış olduğu tespit edildi (Şekil 4.33). Elde edilen bu veri daha önceden gerçekleştirmiş olduğumuz mikroarray verileriyle de örtüşmektedir.



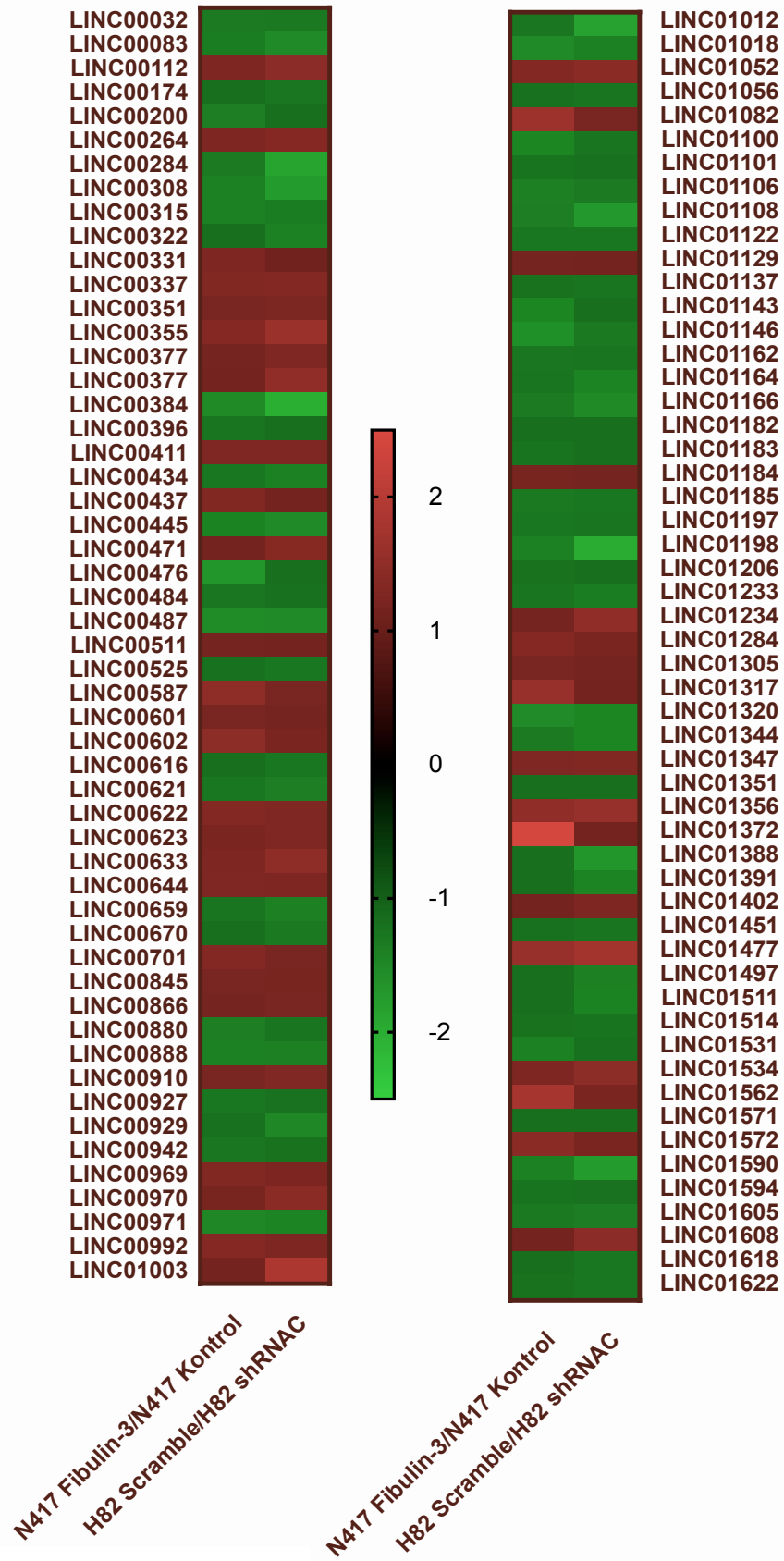
Şekil 4.41 N417 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'lar. * $p < 0.05$

KHAK H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyon seviyesinin artışına bağlı olarak mikroarray analizi verilerinde ifadesi değişen miRNA'lar, H82 hücrelerinde qPCR yöntemiyle teyit edildi. Bu çalışma doğrultusunda, H82 shRNA C ve H82 shRNA scramble infekte hücrelerinden miRNA izolasyonu gerçekleştirildi. Fibulin-3 ekspresyonunun baskılanmasına bağlı olarak miR-27a, miR-1200, miR-1243, miR-30e, miR-3179, miR-548a, let-7a miRNA'larının ekspresyon seviyelerinde önemli bir düşüş tespit edildi (Şekil 4.34). Elde ettiğimiz bu veriler mikroarray çalışmamız ile bire bir korelasyon içindedir. Aynı zamanda Fibulin-3 ifadesine bağlı değişen bu miRNA'lar N417 hücre dizisinden elde edilen verilerde doğrular şeklindedir.



Şekil 4.42 H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'lar.
* $p < 0.05$

Mikroarray analiz sonucunda elde ettiğimiz transkriptlerden lncRNA'ların ifadelerini karşılaştırabilmek için kullandığımız filtreleme sonucunda Fibulin-3 ekspresyonuna bağlı olarak değişim gösteren lncRNA'lar tespit edildi. Değerlendirmede N417 Fibulin-3/N417 kontrol ile H82 shRNA scramble/H82 shRNA C kıyaslamasının kesişim kümesi tanımlandı (Şekil 4.35).



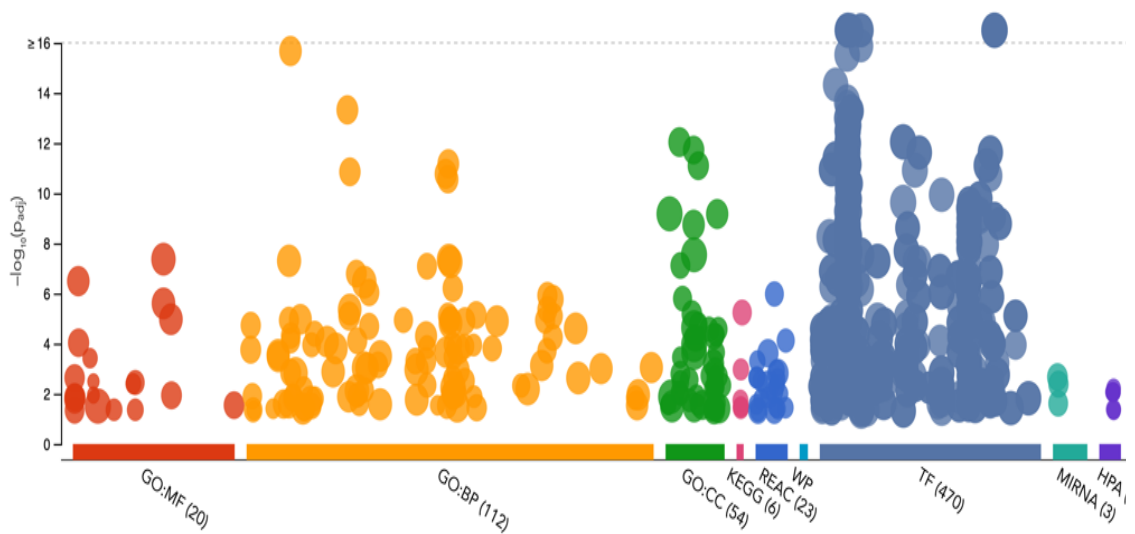
Şekil 4.43 Mikroarray analizlerine göre Fibulin-3 tarafından regüle edilen lincRNA'lar.

* $p < 0.05$

4.5 Mikroarray Sonuçlarının Gen Ontoloji (GO), Gen Set Zenginleştirme Analizi (GSEA) ve Reactome (REAC) analizleri

Fibulin-3 ekspresyon seviyesi düşük N417 hücre dizisi ve Fibulin-3 ekspresyon seviyesi yüksek H82 hücre dizilerinde, Fibulin-3 ekspresyon vektörü ve lenti viral shRNA kullanılarak hücrelerin sahip olduğu doğal Fibulin-3 ifadelerinin tam zıttı (N417-Fibulin-3 ve H82-shRNA C) yeni hücre modelleri oluşturuldu. Bu yeni oluşturulan hücre modellerinde western blot ve qPCR yöntemleri kullanılarak, Fibulin-3 ekspresyonundaki değişim teyit edilmiştir.

Fibulin-3 molekülünün, KHAK hücre dizileri olan N417 ve H82 üzerindeki etkisini daha ayrıntılı ve kümülatif gözlemleyebilmek için, N417 Fibulin-3 ve H82 shRNA C hücre dizileri ve kontrol grupları mikroarray analizine tabi tutuldu. Mikroarray analizinden sonra elde edilen veriler, g:GOST, (functional enrichment analysis diğer bir adıyla over-representation analysis (ORA)) ve Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) analizlerine tabi tutuldu. Bu biyoenformatik ve istatistiksel analizlerde mikroarray verileri işlevsel özellikleri benzer genleri, gen setleri halinde gruplandırmak amacıyla belirlenmiş algoritmalarla değerlendirildi. Gen ontoloji analizi, KEGG analiz, REAC analizi ve Transkripsiyon Faktörlerinin analizleri detaylı olarak değerlendirilirken, Fibulin-3'ün aktif rol oynadığı yollar, biyolojik süreçler ve ilgili transkripsiyon faktörleri ile miRNA'lara da ayrı bir önem verildi. Yapılan bütün analizlerin sonuçlarını kümülatif olarak Şekil 4.36'da sunulmaktadır.



Şekil 4.44 Biyoenformatik analiz verilerinin kümülatif olarak değerlendirilmesi.

Mikroarray sonuçları gen ontoloji analizi Biyoloji Prosesler (GO:BP) üzerine detaylı olarak incelediğinde, nöroendokrin kökenli olan N417 ve H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ifadesinin upregülasyonuna bağlı olarak nörolojik farklılaşma, nörogenesis, nöron farklılaşmasının regülasyonunda yer alan genlerle bir interaksiyon içinde olduğu gözlemlendi. Kurmuş olduğumuz çalışma dizaynı doğrultusunda değerlendirildiğinde, hücre gelişimi, hücre morfogenezisi, hücre farklılaşmasının regülasyonu, hücre membran potansiyeli ve hücre birleşme/kaynaşma organizasyonu gibi hem kök hücre fizyolojisi hem de EMT sürecinde boy gösteren gen setleriyle etkileşim içinde olduğunu gözlemledik (Şekil 4.37). Yine aynı şekilde gen ontoloji analizinde Hücre Komponentleri (GO:CC) üzerine irdelendiğinde ise; hücre junction, hücre içi ve plazma membran bağlantıları üzerine yoğunlaşmış gen setlerinin ilk sıralarda yer aldığı görülmektedir (Şekil 4.37).



Şekil 4.45 Mikroarray verilerinin gen ontoloji analiz sonuçları.

Gen Set Zenginleştirme Analizi ile yapılmış olan biyoenformatik değerlendirmede, ekspresyon farklılığı gözlemlenen genlerin anlamlılık seviyelerine göre hangi moleküler mekanizmada rol aldığı araştırıldı. Her iki hücre grubunda da Fibulin-3 ekspresyonunun upregülasyonuna göre bir kıyaslama gerçekleştirildi. İki hücre grubunda ortak olarak yer alan değişimler hem KEGG analizi hem de REAC analizinde değerlendirildi. KEGG analizi ile yapılan değerlendirmede bizim için önem arz eden Gap junction ve adherens junction gen setleri gözlemlendi (Şekil 4.38). REAC analizi sonuçlarından elde edilen verilerin hem gen ontoloji hemde KEGG analizi ile aynı doğrultuda olduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 4.38).

KEGG		stats	
Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
Glutamatergic synapse	KEGG:04724	1.068×10^{-3}	3.04
Gap junction	KEGG:04540	1.817×10^{-2}	1.74
Insulin secretion	KEGG:04911	3.307×10^{-2}	1.48
Adherens junction	KEGG:04520	3.307×10^{-2}	1.48
Circadian entrainment	KEGG:04713	3.772×10^{-2}	1.42

1 to 5

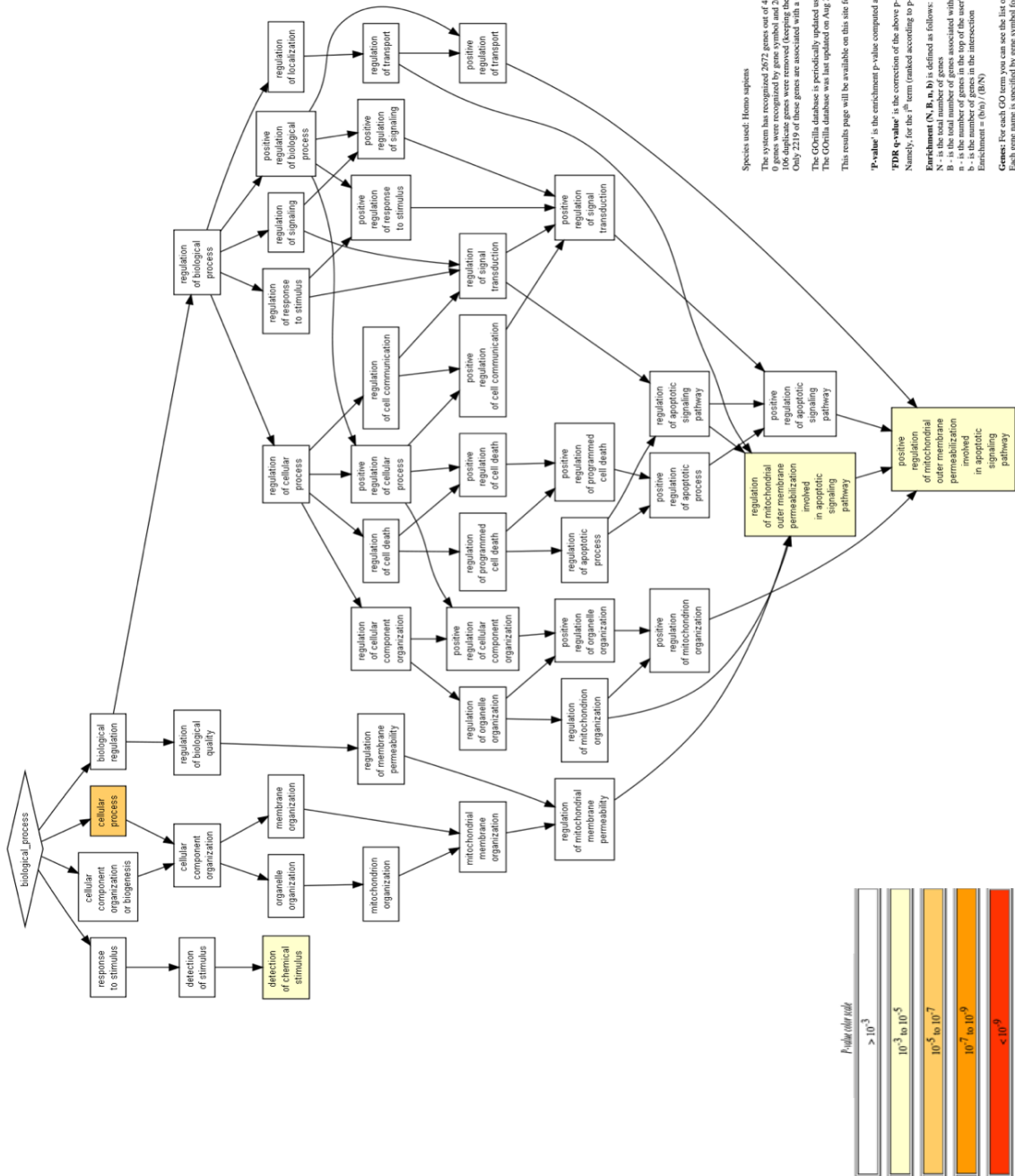
REAC		stats	
Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
Neuronal System	REAC:R-HSA-1...	1.045×10^{-6}	5.98
Pre-NOTCH Transcription and Translation	REAC:R-HSA-1...	1.160×10^{-3}	3.03
RNA Polymerase II Transcription	REAC:R-HSA-7...	1.503×10^{-3}	2.82
Activation of anterior HOX genes in hindbrain developm...	REAC:R-HSA-5...	2.242×10^{-3}	2.65
Activation of HOX genes during differentiation	REAC:R-HSA-5...	2.242×10^{-3}	2.65
RNA Polymerase I Promoter Opening	REAC:R-HSA-7...	2.454×10^{-3}	2.51
Gene expression (Transcription)	REAC:R-HSA-7...	4.460×10^{-3}	2.35
Pre-NOTCH Expression and Processing	REAC:R-HSA-1...	4.475×10^{-3}	2.35
Neurotransmitter receptors and postsynaptic signal tra...	REAC:R-HSA-1...	8.082×10^{-3}	2.10
SIRT1 negatively regulates rRNA expression	REAC:R-HSA-4...	9.924×10^{-3}	2.00
HDACs deacetylate histones	REAC:R-HSA-3...	1.375×10^{-2}	1.86
DNA methylation	REAC:R-HSA-5...	1.562×10^{-2}	1.81
Activated PKN1 stimulates transcription of AR (androge...	REAC:R-HSA-5...	2.594×10^{-2}	1.59
PRC2 methylates histones and DNA	REAC:R-HSA-2...	3.379×10^{-2}	1.48
Transcriptional regulation by small RNAs	REAC:R-HSA-5...	3.544×10^{-2}	1.45
RHO GTPases activate PKNs	REAC:R-HSA-5...	3.894×10^{-2}	1.41
Nervous system development	REAC:R-HSA-9...	4.777×10^{-2}	1.32

Şekil 4.46 Pathway analizinde kullanılan KEGG ve REAC analiz sonuçları.

Farklı veri tabanları ve algoritmalar kullanarak yapmış olduğumuz gen ontoloji analizlerinin hücresel proseslerle arasındaki ilişkiyi/kaskatı görsel bir şekilde gösterebilmek için *Gene Ontology enRichment anaLysis and visuaLizAtion tool (GORILLA)* veri tabanı yardımıyla Şekil 4.39'da Gen ontoloji zenginleştirilmiş analizi diyagram üzerinde verilmiştir. Bu diyagram verilerinin istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri ve ilgili genlerinin skorları Tablo 4.1'de sunulmuştur.

Tablo 4.1 Gen ontoloji zenginleştirilmiş analizinin P ve FDR q değerleri

GO term	Description	P-value	FDR q-value	Enrichment (N, B, n, b)	Genes
GO:0009987	cellular process	7.39E-6	6.64E-2	1.07 (2219,1691,953,776)	[+] Show genes
GO:0009593	detection of chemical stimulus	7.52E-4	1E0	2.84 (2219,21,484,13)	[+] Show genes
GO:1901028	regulation of mitochondrial outer membrane permeabilization involved in apoptotic signaling pathway	9.19E-4	1E0	65.26 (2219,4,17,2)	[+] Show genes
GO:1901030	positive regulation of mitochondrial outer membrane permeabilization involved in apoptotic signaling pathway	9.19E-4	1E0	65.26 (2219,4,17,2)	[+] Show genes



Şekil 4.47 Gen ontoloji zenginleştirilmiş analizi ve şematize edilmiş görseli.

Species used: Homo sapiens

The system has recognized 2672 genes out of 4118 gene terms entered by the user. 106 terms were recognized by gene symbols and 12 genes by other gene IDs. 106 terms were not recognized because they do not have a corresponding GO term. Only 2219 of these genes are associated with a GO term.

The COChis database is periodically updated using the CO database and other sources. The COChis database was last updated on Aug 29, 2020.

This results page will be available on this site for one month from now (until Sep 30, 2020). You can bookmark this page and come back to it later.

'P-value' is the enrichment p-value computed according to the mHG or HG model. This p-value is not corrected for multiple testing of 6996 GO terms.

'FDR q-value' is the correction of the above p-value for multiple testing using the Benjamini and Hochberg (1995) method. Namely, for the i^{th} term (ranked according to p-value) the FDR q-value is (p-value * number of GO terms) / i .

Enrichment (N, B, n, b) is defined as follows:
 N: is the total number of genes
 B: is the total number of genes associated with a specific GO term
 n: is the number of genes in the top of the user's input list or in the target set when appropriate
 b: is the number of genes in the intersection
 Enrichment = (b/b') / (N/N')

Genes: For each GO term you see the list of associated genes that appear in the original top of the list. Each gene name is specified by gene symbol followed by a short description of the gene.

5. TARTIŞMA

Akciğer kanserinin 5 yıllık sağkalım oranı sadece %18'dir. Bu yüksek orana paralel bir şekilde kanser morbidite ve mortalite oranları da eşlik etmektedir (Siegel, Miller, ve Jemal 2016). Akciğer kanseri hastalarının %80'inde geç tanı nedeniyle, hastaya uygulanan tedaviye olumlu yanıt alınmaz. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 220.000 kişiye akciğer ve bronş kanseri teşhisi konulmaktadır ve ana neden tütün kullanımınıdır (Quintanal-Villalonga ve Molina-Pinelo 2019). Akciğer kanserinin iki ana tipi mevcut olup bunlar, küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseridir. Akciğer kanserinin %85'inden fazlası küçük hücreli dışı akciğer kanseridir (KHDAK) ve adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak alt bölümlere ayrılmıştır (Lewis vd. 2014). KHDAK, adenokarsinom (%40), skuamöz hücreli karsinom (%40) ve büyük hücreli karsinom (%10) dahil olmak üzere tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'ini oluşturur. KHAK, tüm akciğer kanserlerinin ~% 15'ini temsil etmektedir (MacKinnon, Kopatz, ve Sethi 2010). EGFR mutasyonu, ALK ve ROS1'in yeniden düzenlemeleri gibi kinaz genlerindeki genomik farklılıkların keşfi, adenokarsinoma klinik yaklaşımı değiştirmiştir (Hanna vd. 2017). Bu keşifler sayesinde akciğer tümörlerinin moleküler ve genomik profillendirilmesi gerçekleştirilebilmiştir, ayrıca alt tiplerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır ((CLCGP) ve (NGM) 2013; F. Chen vd. 2017; Hammerman vd. 2012; Hanna vd. 2017; Siegel vd. 2016). Genomik araştırmalarda akciğer adenokarsinomu ile akciğer skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli akciğer kanserin karşılaştırıldığında, sadece birkaç terapötik ajana uyum gösteren genom değişikliği bulunmuştur. Örnek verecek olursak, 8p12 amplikonunun neden olduğu fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 (FGFR1) amplifikasyonu; akciğer skuamöz hücreli karsinom'un %20'sinde, KHAK'in % 5-7'sinde ve adenokarsinom'un % 1-3'ünde görülmektedir (H. R. Kim vd. 2012; Kwak vd. 2015; Sousa vd. 2016).

Akciğer kanserinin patobiyolojisinin araştırılması ve terapisindeki son gelişmeler, yeni hedef bazlı tedavilerin ve kemoterapi rejimlerinin ortaya çıkışını hesaba katarak histolojik sınıflandırmanın iyileştirilmesini tetiklemiştir (Zugazagoitia vd. 2017). Örneğin, *EGFR*, *BRAF*, *HER2*, *ALK*, *ROS1*, *RET* ve *NTRK* gibi kinazlardaki farklı yeniden düzenlenmelerin, adenokarsinomlarda onkojenik aktivatörler olarak görev yaptığı bulunmuştur. Bu aktivatörün terapötik potansiyele sahip olmaları tedavi sürecinde büyük avantajlar sağlamıştır. Bununla birlikte, şu anda, skuamöz hücreli akciğer kanserinde (yani, *FGFR1*, *PI3K* ve *DDR2*) çok az eyleme geçirilebilir itici güç vardır ve bunların inhibitörleri, düşük klinik etkiler göstermektedir (Quintanal-Villalonga ve Molina-Pinelo 2019). Bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri son zamanlarda akciğer kanseri tedavisinde devrim niteliğinde bir öneme sahip olmuştur. Bu inhibitörlerin kullanıldığı tedavi stratejilerinde bazı kalıcı yanıtlar bile alınmıştır. Bu ilerlemelere rağmen, hastalığın sahip olduğu heterojenite yüzünden, genelleştirilmiş bir klinik yaklaşım mevcut değildir. Bu nedenle, akciğer kanseri gelişimini belirleyen, klinik olarak ilgili fenotiplerin karmaşıklığını aydınlatmak, erken evrede akciğer kanseri teşhisi için daha etkili tanı yöntemlerini tanımlamak ve klinik terapötiklerin etkinliklerini artırmak için yeni stratejiler geliştirmek amacıyla özel moleküler analizler gerekmektedir. Yüksek çözünürlüklü görüntüleme teknikleri ve yüksek verimliliğe sahip moleküler yaklaşımlardaki ilerlemeler, akciğer kanseri gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaları anlamamıza fırsat vermiştir. Epigenetik modifikasyonların, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve genomik stabilitenin korunmasında rol oynadığı gibi akciğer kanseri gelişiminde de aktif roller aldığı gösterilmiştir (Krushkal vd. 2020).

Küçük hücreli akciğer kanseri, erken metastaza eğilimi, düşük sağ kalım oranına sahip olması ve etkili tedavi için sınırlı seçeneklere sahip, oldukça agresif bir nöroendokrin tümördür (Gazdar, Bunn, ve Minna 2017; Govindan vd. 2006; Charles M Rudin vd. 2019). Yeni tedavi rejimlerine duyulan büyük bir ihtiyaca rağmen, KHAK tedavisindeki ilerlemeler ne yazık ki ikinci ve üçüncü sıra kemoterapötik ve immünoterapötik ajanlarla sınırlıdır ki bu tedavilerde, hızla kazanılan direnç nedeniyle geçici yanıtla sonuçlanmaktadır (Charles M Rudin vd. 2019). KHAK'nın bu agresif tutumundan dolayı yeni tedavi stratejileri tanımlanması önem kazanmaktadır. Bu arayışlardan biride, ABD'de tekrarlayan KHAK'nin tedavisi için immünoterapi ilaçları olan atezolizumab, pembrolizumab ve nivolumab'ın onaylanmasıdır (Anonim y.y.).

KHAK genom çalışmalarında, en yaygın çalışılan genler *TP53*, *RB1* ve daha az yaygın olarak *PTEN* tümör baskılayıcı genlerdir. Bu genler üzerine yapılan çalışmalarda genlerin fonksiyonel olarak aktif hale gelmesi ve KHAK hücrelerinde sık görülen somatik moleküler değişimlere odaklanılmıştır. Ayrıca bu çalışmalarda; MYC ailesi genleri *MYC*, *MYCL1* ve *MYCN*'nin ampifikasyonu, histon değiştirici proteinleri kodlayan *EP300*,

CREBBP, *KMT2A (MLL)* ve *KMT2D (MLL2)* genlerindeki mutasyonlar, NOTCH ailesi genlerinde başlatıcı mutasyonları *FHIT* ve *CDKN2A* genlerini içeren genomik bölgelerin yaygın kaybı üzerinden yoğunlaşmıştır (Brägelmann vd. 2017; George, Lim, Jang, Cun, Ozretić, vd. 2015; Charles M Rudin vd. 2019). KHAK örneklerinde bulunan diğer genomik değişiklikler arasında *TP73* geninin yeniden düzenlenmesi, *CCND1*'in aşırı ekspresyonu, *SLIT2*, *EPHA7*'deki mutasyonlar ve *FGFR1*'in fokal amplifikasyonları bulunmaktadır (George, Lim, Jang, Cun, Ozretić, vd. 2015; Peifer vd. 2012). Genomik çalışmalar dışında KHAK tümörleri için önemli olan bir konu ise, tütünün özellikle KHAK üzerinde önemli ölçüde negatif bir etkisinin olduğudur (Mollaoglu vd. 2017; Pleasance vd. 2010).

Fibulin-3, epidermal büyüme faktörü domaini içeren olarak da adlandırılmaktadır. Fibulin benzeri hücre dışı matriks proteini 1 (EFEMP1) çeşitli insan dokularında bulunan hücre dışı glikoproteinlerinden fibulin ailesinin bir üyesidir. Hücre büyümesini, morfolojisini, yapışmasını ve hareketliliğini modüle eder (Timpl vd. 2003). Fibulin-3, moleküler kütlesi 54 kD olan 493 amino asitli bir proteini kodlar ve kromozomda 2p16'da lokusunda bulunan geni 11 ekzon içerir. Birçok kanserde *Fibulin-3*'ün potansiyel aktivitesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Fakat Fibulin-3'ün hala bazı tümörlerdeki işlevi belirsizliğini korumaktadır (Hu vd. 2011, 2012; Obaya vd. 2012).

Akciğer kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünün, kötü prognoza yönelmesinde kanser kök hücrelerinin (CSC) rolünün olabileceği ileri sürülmüştür (Alison vd. 2012; Mani vd. 2008). CSC, tümör oluşumunu başlatabilen ve heterojen bir kanser hücresi popülasyonu üretebilen çok potansiyelli progenitörler oluşturabilen nadir farklılaşmamış hücre kümesidir. CSC hücre küreleri oluşturan ve *in vivo* ksenograf deneylerinde tümörjenik kabiliyete sahip hücreler olarak tanımlanırlar (Bonnet ve Dick 1997). Yapılan başka bir çalışmada, metastazın itici gücü olan epitelden mezenkime geçişe uğrayan bir CSC popülasyonunun keşfi, kanser tedavisi gelişimi için CSC araştırmasının önemini desteklemektedir (Mani vd. 2008). CSC'lerin özelliklerini ve bunların birbirleriyle etkileşimlerini düzenleyen moleküler yolların aydınlatılması potansiyel terapötik hedeflerin belirlenmesi için önemlidir.

Tez çalışmamızda küçük hücreli akciğer kanseri hücre dizilerinde, Fibulin-3 ekspresyonunun kanser kök hücre fenotipi üzerine etkisini ve EMT'nin regülasyonundaki rolünü aydınlatmaya çalıştık. Fibulin-3, neredeyse bütün hücrelerden eksprese edilen hücre dışı matris (ECM) proteini ve hücre matris iletişimde ve ECM yapısının stabilizasyonunda, organogenezde ve embriyonik gelişimde farklı fonksiyonlara sahip olduğu için kanser kök hücre dönüşümü ve EMT regülasyonunda da görev alabileceğini hipotezini kurduk.

Fibulin ailesinin üyeleriyle, kanser türleri üzerine yapılan çalışmalarda, hücre invazyonu, proliferasyon ve tümörjenite üzerine olan etkileri gösterilmiştir. Örneğin;

Schiemann ve arkadaşları Fibulin-3'ün homoloğu olan FBLN5 (Fibulin-5)'in TGF- β 'yi inhibe ederek TGF- β indüksiyonlu EMT'yi baskılaması sonucu, hücre proliferasyonu, motilitesi ve hücre invazyonunun baskılandığını göstermişlerdir (Schiemann vd. 2002). Fibulin-3 ekspresyon seviyesi yüksek olan H82 hücrelerinde Fibulin-3 ifadesi baskılandığında H82 hücre dizisinin popülasyon ikileme hızının arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Aynı şekilde düşük Fibulin-3 ekspresyon seviyesine sahip N417 hücre dizilerinde Fibulin-3 aşırı ifadesi ile N417 hücre dizisinin popülasyon ikileme süresinin uzadığını tespit ettik (Şekil 4.14). KHAK hücre dizileri üzerinden elde ettiğimiz bu sonuç literatürde ilk kez yer almasına rağmen KHDAK hücre dizileri A549 ve H460 hücre dizileriyle bir korelasyona sahiptir (Kim vd. 2014). Buna ek olarak hücre proliferasyonunda osteosarkoma dışındaki glioblastoma, kolon, meme ve servikal kanserleriyle yapılan çalışmaların sonuçlarıyla da bir korelasyon içindedir (Hu vd. 2011; Li vd. 2018; Wang vd. 2017; Z. Wang vd. 2015). Literatürde bilindiği üzere hücre proliferasyonunun kaderine etki eden ve sağ kalım ya da apoptozis açısından önemli Bax, BCL-2, PTEN, p21 ve siklin D1, ifadeleri Fibulin-3 ekspresyonu açısından değerlendirildi. Fibulin-3 ekspresyon seviyesi düşük olan N417 hücre dizisinde Fibulin-3'ün ekspresyonunun artmasıyla beraber tümör baskılayıcı bir gen olan PTEN ve hücre siklusu inhibitörü olarak görev alan p21'in ifadesi ile pro-apoptotik protein olan Bax'ın ifadesinde bir artış gözlemlendi. Bunlara ek olarak hücre siklisunda görev alan siklin D1 ifadesinde ve anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nin ifadesinde bir düşüş gözlemlendi (Şekil 4.16). N417 hücre dizisi üzerinde tasarlayıp gerçekleştirdiğimiz deneyi, Fibulin-3 ekspresyon seviyesi yüksek H82 hücre dizisinde shRNA kullanarak Fibulin-3 ifadesini baskılayıp gerçekleştirdik. ShRNA vererek Fibulin-3 ifadesini baskıladığımız H82 hücre dizisinde PTEN, p21 ve Bax'ın ifadeleri düşerken Bcl-2 ve siklin D1'in ifadelerinin arttığını saptadık (Şekil 4.17). KHAK N417 ve H82 hücre hatlarında qPCR ile yapmış olduğumuz değerlendirmede Fibulin-3 ifadesinin hücre proliferasyonunu baskılayabileme yeteneğine sahip olduğunu göstermiş olduk. Yuanjie ve arkadaşları, Fibulin-3 ekspresyonunun U251HF hücre dizilerinde vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGFA) geni hedefli, hücre proliferasyonu ve tümörjeniteyi baskıladığını göstermişlerdir (Hu vd. 2011). Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz bu sonuç literatürdeki meme kanseri, KHDAK ve kolon kanseri üzerine yapılan çalışmalarla büyük bir uyum göstermektedir (Arechederra vd. 2015; Chen vd. 2014a; E. J. Kim vd. 2012; Kim vd. 2014; Tian vd. 2015; Xu vd. 2014).

Fibulin-3'ün kanser üzerindeki potansiyelini anlamak için yapmış olduğumuz literatür çalışmasında, Fibulin-3'ün EMT'yi, EMT'nin rol aldığı invazyon ve metastazı baskıladığını gösteren ya da Fibulin-3 ifadesinin tümör mikroçevresinin ve kanser kök

hücre sürecinin regülasyonundaki rolünü gösteren çeşitli çalışmalara ulaştık (Heo vd. 2016; Hu vd. 2011; Kim vd. 2014). Tez çalışmamızda kullandığımız küçük hücreli akciğer kanseri hücre dizileri diğer akciğer kanseri hücre dizileriyle karşılaştırıldığında, KHAK hücre dizilerinin öne çıkan morfolojik farklılıkları ve çoğalma özelliklerinin süspanse ve küçük kümeler oluşturarak çoğalma formunda olduğunu görmekteyiz (Salcido vd. 2010). Giriş bölümünde de bahsettiğimiz üzeri KHAK hücre dizilerinin sahip oldukları hızlı çoğalma kabiliyetleri ve geliştirdikleri çoklu ilaç direnç mekanizmaları sayesinde kanser kök hücrelerine benzer özellikler taşıdıkları literatürde belirtilmiştir (Codony-Servat, Verlicchi, ve Rosell 2016). Kanser kök hücresinde ki bazı genlerin sahip olduğu ifade farklılıkları ve yüzey markerlerindeki abnormal değişimleri kanser kök hücrelerinin belirteçleri olarak kullanılmaktadır. Literatürde KHAK hücreleri için öne çıkan belirteçler *CD44, CD90, CD133, CD87, OCT4, MYC, SOX1 SOX2, ALDH1, ABCG2, FGF1* ve *uPAR* olarak göze çarpmaktadır (Abe ve Tanaka 2016; Hadnagy vd. 2006; Roudi vd. 2015; Saigusa vd. 2009; Salcido vd. 2010; Sholl vd. 2010; Tong, Izquierdo, ve Raashid 2017; Watkins vd. 2003; Wilbertz vd. 2011; Xiang vd. 2011; Zhang vd. 2013). Kanser kök hücresinin evrilmesindeki biyolojik süreçte EMT aktif bir şekilde görev alır. EMT sırasında kanser hücreleri, adezyon moleküllerini ve hücre iskelet proteinlerinin ifadelerini değiştirerek hücre göçü, invazyon ve tümör metastazına yönelerek kanser kök hücresinin davranışlarında sergiler (Gloushankova, Zhitnyak, ve Rubtsova 2018). EMT, pleiotropik sinyal faktörleri tarafından indüklenir ve esas olarak SNAIL1, ZEB1 ve TWIST gibi EMT-TF'ler olarak adlandırılan çekirdek transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir (Lamouille, Xu, ve Derynck 2014). EMT'nin modülasyonunda, reseptör tirozin kinazları (RTK), kodlamayan RNA'ları ve epigenetik ve post-translasyonel faktörleri içeren karmaşık düzenleyici ağlar bulunmuştur (Craene ve Berx 2013b; Gloushankova vd. 2018; Lamouille vd. 2014). Sonuç olarak, EMT süreci tümör metastazı, ilaç direnci, kanser kök hücreleri ve immün kaçış ile ilişkilendirilmiştir (Craene ve Berx 2013b; Scheel ve Weinberg 2012; Terry vd. 2017).

Yapmış olduğumuz literatür taramasından sonra Fibulin-3'ün kök hücrelilik (stemness) ve EMT sürecindeki fonksiyonunu belirlemek için Nanog, Hıf1-alfa, N-kaderin, ZEB-1, TWIST, SNAIL gibi EMT ve kanser kök hücresi belirteçleri üzerine olası etkilerini araştırmayı amaçladık.

Fibulin-3 ekspresyon seviyesi yüksek olan H82 hücre dizisinde, Fibulin-3 ifadesini lentiviral shRNA C vektörü infeksiyonu baskıladıktan sonra (Şekil 4.13) western blot yöntemiyle, literatür ışığında planlamış olduğumuz markerlerin protein seviyelerini analiz ettik. Fibulin-3 baskılandığında önemli mezenkimal markerlerinden N-kaderin ve ZEB-1'in ekspresyon seviyelerinin arttığını gözlemleyerek EMT sürecinde negatif bir regülatör olarak çalıştığını saptadık. Bunlara ek olarak EMT-TF'lerinden SNAIL ve TWIST'in

ekspresyon seviyelerinde önemli bir artış olduğunu saptadık (Şekil 4.18, Şekil 4.20). Fibulin-3 ekspresyon seviyesi düşük olan N417 hücre dizisinde, Fibulin-3 ekspresyon vektörünün transfeksiyonu ile Fibulin-3'ün aşırı ifade edilmesini sağladık, daha sonra H82 hücre dizisinde değerlendirdiğimiz gibi western blot yöntemiyle, literatür ışığında planlamış olduğumuz markerlerin protein seviyelerini analiz ettik. Fibulin-3'ün önemli mezenkimal markerlerinden N-kaderin ve ZEB-1'in ekspresyon seviyelerini baskılayarak EMT için negatif bir regülatör olarak çalıştığını teyit ettik. Aynı şekilde EMT-TF'lerinden SNAIL ve TWIST protein seviyelerini değerlendirdiğimizde Fibulin-3 ekspresyonuna antagonist bir şekilde, önemli bir düşüş eğiliminde olduğunu saptadık (Şekil 4.18, Şekil 4.19). Bu bulgulara dayanarak Fibulin-3'ün KHAK hücrelerinde N-kaderin, sırasıyla TWIST ve SNAIL transkripsiyon faktörlerinde downregüle ederek (Araki vd. 2011), ZEB1'in de baskılanmasını sağlamıştır (Araki vd. 2011). Mezenkimal hücre göçünün zorunlu bir düzenleyicisi olan ara filaman proteinler, onkogenik *H-RAS* ve *c-MYC* aracılı EMT indüksiyonunu düzenleyen EMT'nin bir başka önemli belirteçidir (Araki vd. 2011). N417 hücre dizilerinde SNAIL'ın akciğer kanserinde tipik bir EMT düzenleyicisi olduğu bilinmektedir (Araki vd. 2011). N417 hücrelerinin bu mezenkimal fenotipleri, *FBLN3*'ün aşırı eksprese edilmesiyle epitelyal hücrelerin fenotiplerine dönüşmüştür. Yukarıda da bahsettiğimiz üzere N417 hücrelerinde *Fibulin-3*'ün aşırı ekspresyonu, N-kaderin, TWIST, ZEB1 ve SNAIL ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Buna ek olarak, H82 hücrelerindeki *Fibulin-3* ifadesinin baskılanması N-kaderin, TWIST, ZEB1 ve SNAIL protein seviyelerinin artışı sağlanmıştır.

Fibulin-3, EMT'nin negatif regülasyonundan sorumlu olmasının yanında, akciğer kanserinde kök hücrelilik fenotipini de negatif olarak regüle eder (Kim vd. 2014). İnvazyon ve metastazın itici bir gücü olarak EMT'nin önemi giderek daha fazla kabul edilmektedir. Son zamanlarda sunulan veriler, EMT ile tümörleri başlatan ve sürdüren CSC'si arasında bir bağlantı olduğunu vurgulamıştır (Biddle ve Mackenzie 2012). Bu nedenle, mezenkimal N417 ve H82 hücrelerinin kök hücrelilik fenotipi ile ilişkili özelliklerini karakterize etmeye çalıştık ve Fibulin-3'ün bu özellikler üzerindeki etkisini inceledik. N417 hücre dizisinde Fibulin-3 aşırı ekspresyonunu sağlanarak ilgili markerleri western blot yöntemi ile incelendiğimizde, kök hücre markerlerinden Nanog ve Hif1-a'nın Fibulin-3 ekspresyonuyla ters bir dinamik içinde olduğunu saptadık (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19). Kök hücre markerlerinin Fibulin-3 ekspresyonuyla ifade değişimi gösterip göstermediğini teyit etmek için önceki deneylerimizde kurguladığımız gibi Fibulin-3 ekspresyonu yüksek H82 hücre dizisinde, Fibulin-3 ekspresyonunu baskılayarak Nanog ve Hif1-a'nın ve transkripsiyon faktörü c-MYC'in ifadelerini analiz ettik.

Fibulin-3 ekspresyonu baskılanmış olan H82 hücre dizilerinde Nanog Hif1-a ve transkripsiyon faktörü c-MYC2in ekspresyon seviyelerinde bir artış saptadık (Şekil 4.18

ve Şekil 4.20). Elde edilen bu veriler doğrultusunda KHAK hücre dizilerinde Fibulin-3'ün negatif bir kök hücrelilik fenotipi düzenleyicisi olduğunu tespit ettik. KHAK hücrelerinde kanser kök hücre belirteçleri ifade düzeylerinin Fibulin-3 ifadesine bağlı olarak değiştiğini gösterdik.

EMT'nin, invazyon ve metastaz süreçlerinin başlatıcı basamağı olduğu bilinmektedir (Pastushenko vd. 2018b). Tümör invazyonunun mekanizmaları ve metastaz üzerine yapılan kapsamlı çalışmalarda, matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) tümör yayılmasının altında yatan olaylarda kilit oyuncular olarak tanımlanmıştır (Stamenkovic 2000). KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinde Fibulin-3'ün matriks metalloproteinazlardan MMP-9 ifadesindeki etkisini araştırmak üzere tasarladığımız çalışmada Fibulin-3 ifadesinin artışına bağlı olarak MMP-9 ifadesinin baskılandığını ve aynı şekilde Fibulin-3 ifadesinin baskılanmasıyla MMP-9 ifadesinin arttığını, Western Blot yöntemiyle gösterdik (Şekil 4.18-20). Kim ve arkadaşlarının KHDAK'inde Fibulin-3'ün invazyondaki negatif regülatör rolü ile ilgili yaptıkları çalışmada MMP-7 ve MMP-2 üzerinden yaptıkları değerlendirmede Fibulin-3 ekspresyon seviyesi düşük A549 hücre dizisinde Fibulin-3 ekspresyon vektörü transfekte ettiklerinde MMP-7 ve MMP-2'nin kontrole oranla ifadelerinin baskılandığını göstermişlerdir (E. J. Kim vd. 2012). Fibulin-3 ekspresyon seviyesi yüksek H460 hücre dizilerinde ise siRNA aracılı Fibulin-3 ifadesini baskıladıklarında MMP-7 ve MMP-2'nin kontrole oranla ifadelerinin arttığını göstermişlerdir. ERK1/2 ve fosfo-JNK'nin Fibulin-3 tarafından pozitif regülasyonu gösterilmiştir. p38-MAPK'nın daha önce mesane kanseri modelinde MMP-2 ve MMP-9 mRNA seviyelerinin ve zimografik aktivitenin modülasyonu ile invazyonu düzenlediği gösterilmişti (Hsu vd. 2012). p38-MAPK, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun inhibisyonu ile 17p-estradiol ile tedavi edilen insan kolon kanseri hücrelerinde invazyon inhibisyonunu da modüle ettiği gösterilmiştir (Kumar vd. 2010). Bu çalışmalara benzer şekilde akciğer kanseri ile yapılan başka bir çalışmada, Fibulin-3'ün, A549 hücrelerinde p38-MAPK fosforilasyonunu artırarak MMP-2 ve MMP-9 protein seviyelerini downregüle ederek invazyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Xu vd. 2014).

Akciğer kanserinde Fibulin-3 downregülasyonu yaygın bir anormalliktir ve *Fibulin-3* ün ekspresyonu promotör bölgenin hipermetilasyonları ile düzenlenir. Dolaşımdaki Fibulin-3, tümör progresyonunda ve KHDAK'li hastaların sağ kalım sürelerinde rol oynayabilir. Bu bağlamda sonuçlarımız, Fibulin-3'ün, p38-MAPK ve MMP-2, MMP-9'un düzenlenmesi yoluyla akciğer kanseri hücrelerinin invazivliğini negatif olarak modüle ettiğini gösteren çalışmalar ile korelasyon göstermektedir. Fibulin-3'ün MMP-2, MMP-9 ve hücre invazyonu arasındaki moleküler mekanizmalarında hâlen aydınlatılmayan noktalar olmasına rağmen hem literatür bilgisi hem de bizim elde ettiğimiz sonuçlar, akciğer kanseri için Fibulin-3'ün tanısallık ve terapötik potansiyelini ifade etmektedir.

Fibulin-3'ün interaksiyon içinde bulunduğu moleküller ve bu moleküllerin görev aldığı biyolojik proseslerden sorumlu genlerin ifadelerindeki değişimi aynı zamanda hem genlerin hem de yolakların regülasyonunda önemli rollerde yer alan miRNA ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA) transkriptlerin değişimlerini mikroarray çalışmamızda gözlemledik. Mikroarray çalışmamızda Fibulin-3 ekspresyon seviyesi yüksek KHAK H82 hücre dizisi ile lentiviral shRNA-Fibulin-3 ile Fibulin-3 ifadesi baskılanmış H82 hücre dizisini ve Fibulin-3 ekspresyon seviyesi düşük KHAK N417 hücre dizisi ile Fibulin-3 ekspresyon vektörü transfekte edilmiş N417 hücre dizisini kıyaslamaya aldık. Yapmış olduğumuz bu çapraz kıyaslama stratejisiyle Fibulin-3'ün doğrudan regülasyonunda rol aldığı genleri daha güvenilir bir şekilde tespit etmiş olduk. Mikroarray sonuçlarımızın analizinde Fibulin-3'ün regüle ettiği transkriptler (kodlanan ve kodlanmayan genler) tespit edildi. Mikroarray analizi için filtreleme yaparken Fibulin-3 ekspresyon vektörüyle transfekte edilmiş N417 hücre dizisi ile H82 hücre dizileri sırasıyla Fibulin-3 ekspresyon seviyesi düşük N417 hücre dizisi ile shRNA C infekte edilmiş H82 hücre dizilerine karşı kıyaslandı. Filtrelemenin ikinci aşamasında her iki grup içinde hem upregüle hem de downregüle transkriptler incelenmeye alındı (Şekil 4.23). Yapmış olduğumuz filtreleme sonucunda elde ettiğimiz transkriptleri ekspresyon seviyelerine göre sınıflandırdık (Şekil 4.26,38), İstatistiksel olarak anlamlılık gösteren transkriptleri GSEA analizine tabi tuttuk (Şekil 4. 36). Biyolojik prosesler üzerine yaptığımız gen ontoloji analizlerimizden elde ettiğimiz sonuçlar, hipotezimizi destekler doğrultuda gen setlerini göstermektedir (Şekil 4. 37). KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinde Fibulin-3 ifadesinin değişimiyle hücre gelişmesi, hücre farklılaşması, hücre gelişiminin negatif regülasyonu ve hücre bağlantı organizasyon gen setleri öne çıkmaktadır. Aynı şekilde hücresel komponentleri üzerine yaptığımız gen ontoloji analizlerimizden öne çıkan gen setleri hücre bağlantıları, hücreler arası komponentler ve organellerdir. İki farklı açıdan gerçekleştirdiğimiz gen ontoloji analizlerimizin birbiriyle uyumlu olması sonuçlarımızın güvenilirliğini arttırmaktadır (Şekil 4.37, Şekil 4.39). Elde ettiğimiz sonuçlar kümülatif olarak literatürle uyum içindedir. Bizim burada kullandığımız teknoloji ve analiz Fibulin-3 ilişkili literatürün aydınlatılmamış kısmına ışık tutacak niteliktedir.

Mikroarray sonuçlarımızdan, hipotezimizle ilgili mRNA'ları biyoenformatik olarak analiz ettiğimizde Fibulin-3'ün upregülasyonu kök hücre markerlerinin, mezankimal markerlerin ve hücre proliferasyon markerlerinin downregüle olduğunu saptadık (Şekil 4. 31). Yapmış olduğumuz analizlerde Western Blot, qPCR ve popülasyon ikileme sonuçlarımıza ek olarak literatürle korele bir şekilde kök hücre ve mezenkimal markerlerinden NEU1, SOX14, EGR3, KLF8, SNAIL, VIM, transkriptlerinin downregüle olduğunu saptadık (Puisieux, Brabletz, ve Caramel 2014). Küçük hücreli akciğer kanserinin sahip olduğu agresif karakterin altında *MYC*, *MET*, *SOX2*, *SOX4* ve *FGFR*

gen ailerinin aşırı amplifikasyonları ve hızlı bir şekilde geliştirdiği ilaç dirençliliği mekanizmaları yatmaktadır (Salcido vd. 2010; Wang vd. 2018). Fibulin-3'ün aşırı ifadesiyle FGFR ailesinden FGFR2'nin ve ilaç dirençliliği mekanizmalarında rol alan ABCA1, ABCC4'ün downregülasyonunu saptadık. Elde ettiğimiz bu sonuçlar doğrultusunda akciğer kanseri için Fibulin-3'ün terapötik potansiyelinin ileride yapılacak tedavi stratejilerine ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.

Mikroarray sonuçlarımızı yolak analizleri için KEGG ve REAC analizlerine tabi tuttuğumuzda, KEGG analizinde gap junction ve adherens bağlantılarının öne çıktığını gördük. Reactome analizinde ise NOTCH yolağıyla ilgili pre-NOTCH transkripsiyon ve translasyon ile pre-NOTCH ekspresyon ve proseslerini tespit ettik (Şekil 4. 37).

Fibulin-3 hem meme kanseri hücrelerinde hem de endotel hücrelerinde TGF- β sinyalini etkili bir şekilde inhibe eden meme kanseri mikro çevresinde salgılanan bir protein olarak tanımlanmaktadır. Mekanik olarak, Fibulin-3, tip I TGF-reseptörü (T β RI) ile etkileşime girerek TGF- β ile indüklenen T β RI, T β RII kompleksinin oluşumunu ve böylece TGF- β downstreamını bloke eder. Literatürde Fibulin-3 ekspresyon seviyesinin, meme kanserinin progresyonu sırasında düştüğü ve düşük Fibulin-3 seviyesinin, daha kötü bir prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Tian vd. 2015). Fonksiyonel olarak, yüksek Fibulin-3 seviyesi, TGF- β ile indüklenen epitelyal mezenkimal geçişi (EMT), göçü, invazyonu ve endotel geçirgenliğini inhibe ederken, Fibulin-3 ekspresyon ya da fonksiyon kaybı, TGF- β aracılı biyolojik süreçleri teşvik eder. Tin ve arkadaşları TGF- β sinyalini inhibe eden Fibulin-3 ekspresyonunu meme kanseri hücrelerinde eski haline getirdiğinde, meme kanseri hücre dizilerinde EMT'yi, invazyonu ve *in vivo* deneylerle de metastazı inhibe ettiğini göstermişlerdir (Tian vd. 2015).

KHAK N417 ve H82 hücre dizilerinde T β RI'nın null olmasından dolayı TGF- β 'ya kısmi cevap verebildiği bilinmektedir. KHAK hücre dizilerinde Fibulin-3 indüksiyonuna bağlı olarak EMT, hücre proliferasyonu ve kök hücrelilik fenotipini baskıladığımızda, bu biyolojik proseslerde TGF- β sinyal yolağından başka yolların ve ara moleküllerin rol oynadığını düşünmekteyiz. Bu düşüncemiz yolak analizinin NOTCH sinyal yolağını işaret etmesiyle desteklenmektedir. Bu konu ile yaptığımız literatür çalışmasında, Fibulin-3'ün MAPK (Camaj vd. 2009), Akt (Camaj vd. 2009; Hwang vd. 2010), Notch (Hu vd. 2012) ve Wnt (Chen vd. 2014b) sinyal yolları tarafından düzenlediği bildirilmiştir. Fibulin-3'ün farklı sinyal yolları üzerinden aktivite gösterdiği bilinmesine rağmen KHAK için sunmuş olduğumuz veriler literatür için bir ilktir (Şekil 4.37).

Reactome analizinde "NOTCH sinyal yolağının" yanında "küçük RNA'lar tarafından transkripsiyonun düzenlenmesi" sınıfına ait gen setinde de istatistiksel olarak anlamlılık tespit ettik (Şekil 4.38). Mikroarray sonuçlarını filtrelerken sadece Fibulin-3'ün değişiminden etkilenen miRNA'ları belirlemek için her iki hücre dizisi içinde Fibulin-3'ün

upregülasyonundan ve downregülasyonundan etkilenen ortak miRNA'lar değerlendirilmeye alındı (Şekil 4.32).

Mikroarray analiz sonuçlarımızı literatür ile doğrulamak için araştırma yaptığımızda, Fibulin-3 aracılı veyahut hedefli, miRNA çalışmalarına rastlamadık. Bunun üzerinde literatürde fonksiyonu bilinen miRNA ve literatürde hakkında araştırma yapılmamış miRNA'ları belirleyerek qPCR çalışmasıyla analizlerimizi teyit ettik.

Mikroarray analizlerinde Fibulin-3'ün regule ettiği let-7a, miR-27a, miR-30e, miR-548a, miR-1200, miR-1243 ve miR-3179 miRNAlarını, qPCR ile analiz ettiğimizde Fibulin-3 ifadesinin upregülasyonuna göre seçmiş olduğumuz miRNA'ların ifadelerinin arttığını gözlemledik. Yapmış olduğumuz iki farklı analizdeki korelasyon ile çalışmamızı teyit etmiş olduk (Şekil 4. 33, Şekil 4. 34).

MiRNA'lar hedef mRNA'ları ile etkileşime girme ve transkripsiyon sonrası susturma yeteneğine sahiptir (Ozcan vd. 2016; T. Wang vd. 2015). Bu yeteneği sayesinde, hücre proliferasyonu, farklılaşma, anjiyogenez ve apoptoz olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri düzenlediği bilinmektedir (He ve Xue 2017; Ru vd. 2017). MiRNA'lar ayrıca onkogenler veya tümör baskılayıcı genler gibi görev yapabilme yeteneğine sahiptir.

Let-7a, bir tümör baskılayıcı miRNA olarak, çok sayıda kötü huylu hücre tipinde düzensiz olarak tanımlanmıştır. Örneğin, let-7a'nın aşırı ekspresyonunun, piruvat kinaz kas izozimi M2' nin ekspresyonunu baskılayarak mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonu baskıladığı gösterilmiştir (Ru vd. 2017). Siklin ailesinin bir üyesi olarak siklin D1, hücre proliferasyonunun önemli bir düzenleyicisidir. Siklin D1, hücre döngüsünde G1/S kontrol noktasında yer aldığını gösteren G1 aşamasında zirve seviyesine ulaşır. Siklin D1'in aşırı ekspresyonu G1/S kontrol noktasından geçişe ve sonucunda tümör oluşumuna yol açabilen hücre proliferasyonunun artmasına yol açabilir (Li vd. 2016). Wei ve arkadaşları KHDAK hücre dizilerinde let-7a ekspresyonunun, siklin D1'i regüle ederek hücre gelişimini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda Fibulin-3 ekspresyon seviyesi yüksek örneklerimizde let-7a ifadesinin upregülasyonu hem mikroarray hem de qPCR yöntemiyle tespit edildi. (Şekil 4.32-34). Aynı zamanda literatürle paralel olarak Fibulin-3 ekspresyonu ile baskılanan siklin D1 ifadesini gösterdik (Şekil 4.16, 17). Bu bağlamda KHAK hücre dizilerinde Fibulin-3 indüksiyonlu let-7a ekspresyonunun, siklin D1'i regüle ederek hücre gelişimini inhibe edebileceğini düşünmekteyiz.

MiRNA'ların biyomarker özelliği üzerine yapılan bir çalışmada, otopsi örneklerinin analizi ile KHAK'inde miRNA ekspresyon profillemesi yapılmıştır. Ortaya çıkan profile göre, dört miRNA'nın (miR-27a-5p, miR-485-3p, miR-34-5p ve miR-574-3p) aday anti-tümör miRNA'lar olduğu gösterilmiştir. İşlevsel önemini araştırmak için, önce KHAK klinik

örneklerinde miR-27a ve miR-34b'nin downregülasyonunu teyit etmişlerdir. Daha sonra, hem miR-27a hem de miR-34b'nin ektojik ekspresyonunun kanser hücrelerinin agresifliğini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermişlerdir (Mizuno vd. 2017). Bir başka çalışmada ise yine miR-27a'nin akciğer kanserinde SMAD2 ve SMAD4'ü hedefleyerek TGF- β sinyal yolağı üzerinden hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Chae vd. 2017). Yan ve arkadaşları miRNA-27a'nin aşırı ekspresyonunun, KHDAK hücre apoptozunu indükleyerek hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, Homeobox B8 (HOXB8)'i miRNA-27a'nin fonksiyonel bir hedefi olarak doğrulayarak hücre proliferasyonundaki inhibisyonu HOXB8 aracılığıyla yaptığını göstermişlerdir (Yan vd. 2019). Çalışmamızda her iki hücre dizisinde Fibulin-3 upregülasyonuna bağlı olarak miR-27a ekspresyonunun artışı tespit edildi. N417 ve H82 hücre dizilerinde TGF- β sinyal yolağının kısmi ifadesinden dolayı, Fibulin-3 aracılı upregüle olan miR-27a'nın TGF- β ek olarak direkt ya da indirekt HOX ailesi gibi ara molekülleri hedefleyerek hücre gelişimini inhibe ettiğini düşünmekteyiz.

MiR-30e, çeşitli kanserlerde hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda, tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır (Feng vd. 2016; Hershkovitz-Rokah vd. 2015; Luan, Wang, ve Liu 2018). Akciğer kanseri hücrelerinde miR-30e'nin aşırı ekspresyonunun, gefitinibe karşı ilaç direncini tersine çevirerek, hücre proliferasyonunun ve göçünün azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Ning vd. 2017). MiR-30e üzerine yaptığımız literatür çalışmaları sonucunda bilinen hedefleri arasında *BCR-ABL*, *UBC9*, *Bmi1* ve *P4HA1* genleri tespit edildi (Feng vd. 2016; Hershkovitz-Rokah vd. 2015; Li vd. 2013; Sugihara vd. 2013). Bunlara ilaveten, yeni bir miR-30e hedefi olarak HOXA1 tanımlanmıştır. HOXA1, erken gelişim modellerinin ve organogenezin düzenlenmesinde önemli roller oynar (Ning vd. 2017). Bu bağlamda her iki hücre dizisinde Fibulin-3 upregülasyonuna bağlı olarak miR-30e ekspresyonunun artışı tespit edildi. N417 ve H82 hücre dizilerinde, Fibulin-3'ün upregülasyonuna bağlı olarak ekspresyon seviyesi artan miR-30e'nin hücre gelişimi ve proliferasyonun inhibisyonunda rol aldığını düşünmekteyiz.

miR-548-3p, büyük bir primat spesifik miRNA gen ailesi olan miR-548 ailesinin üyelerinden biridir. MiR-548-3p ailesinin akciğer, meme ve kolon kanserindeki rolü kısıtlı sayıdaki çalışmalarla aydınlatılmaya çalışılmıştır (Yafei Shi vd. 2015; Through vd. 2020; Wang vd. 2020). Yapılan bir çalışmada, kontrollere kıyasla hem klinik tümör örneklerinde hem de akciğer kanseri hücrelerinde miR-548-3p ekspresyonunun daha düşük olduğu gösterilmiştir (Wang vd. 2020). *In vitro* olarak miR-548-3p, akciğer kanseri hücre büyümesini inhibe ettiği ve hücre döngüsünün S aşamasında hücre apoptozunu teşvik ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada miR-548-3p ailesinden miR-548b-3p ile indüklenen hücre proliferasyonu inhibisyonunun ve apoptozun altında yatan mekanizmanın,

PI3K/AKT sinyal yolağının inhibisyonu ile bağlantılı olduğu ve *in vivo*, miR-548b-3p'nin akciğer kanseri hücrelerinin ksenograft modelinde tümör büyümesini de inhibe ettiği gösterilmiştir (Wang vd. 2020). Akciğer kanserindeki sonuçlara paralel bir şekilde, kolon ve meme kanserinde de sırasıyla miR-548-3p ve miR-548a'nin aşırı ekspresyonunun, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, kolon ve meme kanseri hücrelerinde apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (Yafei Shi vd. 2015; Through vd. 2020)

Fibulin-3 indüksiyonuna bağlı doğrudan ya da dolaylı olarak let-7a, miR-27a, miR30e ve miR-548a miRNA'larının upregülasyonu yukarıdaki vermiş olduğumuz literatür ve elde etmiş olduğumuz sonuçlar doğrultusunda, HOX gen ailesi, PI3K/AKT sinyal yolağı ve benzer biyolojik prosesler gibi ortak hedeflerle etkileşime girmektedirler. Bu yüzden bu miRNA'ların akciğer kanseri için terapötik bir ajan veyahut hedef olma potansiyelini barındırdıklarını düşünmekteyiz.

Epitel mezenkimal geçiş, metastaz ve ilaç direnci gibi kanser progresyonundaki çeşitli süreçlere katkıda bulunduğu bilinmektedir. Fibulin-3 upregülasyonu EMT'yi, hücre proliferasyonunu ve hücre invazyon yeteneğini negatif regüle ettiğini KHAK hücrelerinde Fibulin-3 indüksiyonuyla upregüle olan miR-1243 ve miR-3179 miRNA'larının hedeflerini biyoenformatik açıdan araştırdığımızda gen setlerinin EMT ve metastatik süreçlerle ilgili olduğunu tespit ettik. Fibulin-3 indüksiyonuyla upregüle olan miR-1243 üzere Hiramoto ve arkadaşları pankreas hücre hattın olan Panc1'de SMAD2 ve SMAD4 genlerini doğrudan hedef alarak EMT'yi negatif regüle ettiğini tespit etmişlerdir (Hiramoto vd. 2017). miR-3179 üzerine yaptığımız literatür çalışmasında KHAK hücre dizilerinde yapılan tümörigenez ve tümör gelişiminde kritik rollere sahip miRNA profillemesinde yer aldığını görmekteyiz (Liu, Zhou, ve Cao 2016).

KHAK hücrelerinde Fibulin-3 tarafından düzenlenen miRNA'ları kümülatif olarak değerlendirecek olursak EMT, hücre proliferasyonu, nöroendokrin farklılaşma, apoptoz ve ilaç dirençliliği mekanizmaları üzerinde işlevlere sahip olduğunu görmekteyiz. Fibulin-3'ün doğrudan ya da dolaylı olarak etki ettiği bu mekanizmalar aracılığıyla akciğer karsinogenezinde önemli bir role sahip olduğunu ve akciğer kanseri tedavi stratejilerinde hedef olma potansiyeline sahip olduğunu düşünüyoruz.

6. SONUÇ

Akciğer kanseri alt türleri arasında yer alan KHAK, yüksek proliferasyon hızı ve erken metastaz yeteneğine sahip en agresif türüdür. Ayrıca KHAK hastaları için sistemik tedavi seçeneklerinde son çeyrek asırda kayda değer ölçüde bir değişiklik olmamıştır. Kanser tedavisi için son yıllarda önemli bir hedef strateji olarak kanserlerin moleküler mekanizmalarının hedeflenmesi ön plana çıkmaktadır. Bizde KHAK üzerine Fibulin-3'ün olası etkisini moleküler düzeyde açıklamayı amaçladık. Bu amaç doğrultusunda elde ettiğimiz sonuçlar:

- i. Fibulin-3 ekspresyonu KHAK hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskılamaktadır.
- ii. KHAK hücrelerinde Fibulin-3 ifadesi EMT sürecinde Mezenkimal markerleri ve EMT transkripsiyon faktörlerini baskılar.
- iii. Fibulin-3 KHAK hücre dizilerinde kök hücre fenotipinde rol oynayan markerleri baskılayarak KHAK'inin agresif fenotipini baskılar.
- iv. Fibulin-3 kök hücre, hücre proliferasyonu ve EMT gibi hücresel süreçlerde rol oynayan genlerin ifadesini düzenler.
- v. KHAK hücrelerinin KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşması sürecinde Fibulin-3, regülasyonu sağlar.
- vi. Fibulin-3, tümör baskılayıcı miRNA olarak tanımlanan let-7a, miR-27a, ve miR-30e'nin ekspresyonunu arttırmaktadır.
- vii. KHAK hücre hatlarının sahip olduğu TGF- β ifade eksikliği olmasına rağmen Fibulin-3'ün aktivitesini HOX gen ailesi ve PI3K/AKT gibi sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirebilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- (CLCGP), Clinical Lung Cancer Genome Project ve Network Genomic Medicine (NGM).
2013. "A Genomics-Based Classification of Human Lung Tumors". *Science Translational Medicine* 5(209):209ra153-209ra153.
- Abe, Yoshinori ve Nobuyuki Tanaka. 2016. "The Hedgehog Signaling Networks in Lung Cancer: The Mechanisms and Roles in Tumor Progression and Implications for Cancer Therapy". *BioMed Research International* 2016:7969286.
- Adler, I. 1913. "Primary Malignant Growths of the Lungs and Bronchi???A Pathological and Clinical Study". *The Laryngoscope* 23(1):80.
- Akopyan, Gohar ve Benjamin Bonavida. 2006. "Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis (review)". *International Journal of Oncology* 29(4):745–52.
- Alison, Malcolm R., Wey-Ran Lin, Susan M. L. Lim, ve Linda J. Nicholson. 2012. "Cancer Stem Cells: In the Line of Fire". *Cancer Treatment Reviews* 38(6):589–98.
- Allen, P. W. 1991. "ICDO — International Classification of Diseases for Oncology". *Pathology* 23(3):280.
- Angeloni, Debora, Arja ter Elst, Ming Hui Wei, Anneke Y. van der Veen, Eleonora A. Braga, Eugene A. Klimov, Tineke Timmer, Luba Korobeinikova, Michael I. Lerman, ve Charles H. C. M. Buys. 2006. "Analysis of a new homozygous deletion in the tumor suppressor region at 3p12.3 reveals two novel intronic noncoding RNA genes". *Genes, Chromosomes and Cancer* 45(7):676–91.
- Anonim. 1982. "The World Health Organization Histological Typing of Lung Tumours. Second Edition". *American journal of clinical pathology* 77(2).
- Anonim. y.y. "Drugs Approved for Lung Cancer - National Cancer Institute". Tarihinde 10 Ağustos 2020 (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/lung>).
- Araki, K., T. Shimura, H. Suzuki, S. Tsutsumi, W. Wada, T. Yajima, T. Kobayahi, N.

- Kubo, ve H. Kuwano. 2011. "E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma". *British Journal of Cancer* 105(12):1885–93.
- Arechederra, María, Neibla Priego, Ana Vázquez-Carballo, Celia Sequera, Álvaro Gutiérrez-Uzquiza, María Isabel Cerezo-Guisado, Sara Ortiz-Rivero, Cesáreo Roncero, Ana Cuenda, Carmen Guerrero, ve Almudena Porras. 2015. "p38 MAPK down-regulates fibulin 3 expression through methylation of gene regulatory sequences: Role in migration and invasion". *Journal of Biological Chemistry* 290(7):4383–97.
- Argraves, W. Scott, Lisa M. Greene, Marion A. Cooley, ve William M. Gallagher. 2003. "Fibulins: Physiological and Disease Perspectives". *EMBO Reports* 4(12):1127–31.
- Barth, Jeremy L., Kelley M. Argraves, Eileen F. Roark, Charles D. Little, ve W. Scot. Argraves. 1998. "Identification of chicken and *C. elegans* fibulin-1 homologs and characterization of the *C. elegans* fibulin-1 gene". *Matrix Biology* 17(8):635–46.
- Baylin, Stephen B. ve Peter A. Jones. 2011. "A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications". *Nature Reviews Cancer* 11(10):726–34.
- Bhaskaran, Krishnan, Ian Douglas, Harriet Forbes, Isabel Dos-Santos-Silva, David A. Leon, ve Liam Smeeth. 2014. "Body-mass index and risk of 22 specific cancers: A population-based cohort study of 5.24 million UK adults". *The Lancet* 384(9945):755–65.
- Biddle, Adrian ve Ian C. Mackenzie. 2012. "Cancer Stem Cells and EMT in Carcinoma". *Cancer Metastasis Reviews*.
- Bonnet, Dominique ve John E. Dick. 1997. "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell". *Nature Medicine* 3(7):730–37.
- Brabletz, Thomas. 2012. "To differentiate or not-routes towards metastasis". *Nature Reviews Cancer* 12(6):425–36.
- Brabletz, Thomas, Raghu Kalluri, M. Angela Nieto, ve Robert A. Weinberg. 2018. "EMT in cancer". *Nature Reviews Cancer* 18(2):128–34.
- Brägelmann, Johannes, Stefanie Böhm, Matthew R. Guthrie, Gurkan Mollaoglu, Trudy G. Oliver, ve Martin L. Sos. 2017. "Family Matters: How MYC Family Oncogenes Impact Small Cell Lung Cancer". *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 16(16):1489–98.
- Brock, Malcolm V., Craig M. Hooker, Eric A. Engels, Richard D. Moore, Maura L. Gillison, Anthony J. Alberg, Jeanne C. Keruly, Stephen C. Yang, Richard F. Heitmiller, Stephen B. Baylin, James G. Herman, ve Julie R. Brahmer. 2006. "Delayed diagnosis and elevated mortality in an urban population with HIV and lung cancer:

- Implications for patient care". *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 43(1):47–55.
- Bronsert, P., K. Enderle-Ammour, M. Bader, S. Timme, M. Kuehs, A. Csanadi, G. Kayser, I. Kohler, D. Bausch, J. Hoepfner, U. T. Hopt, T. Keck, E. Stickeler, B. Passlick, O. Schilling, C. P. Reiss, Y. Vashist, T. Brabletz, J. Berger, J. Lotz, J. Olesch, M. Werner, ve U. F. Wellner. 2014. "Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer–host interface". *The Journal of Pathology* 234(3):410–22.
- C., Kowal Robert, Richardson James A., Miano Joseph M., ve Olson Eric N. 1999. "EVEC, a Novel Epidermal Growth Factor–Like Repeat-Containing Protein Upregulated in Embryonic and Diseased Adult Vasculature". *Circulation Research* 84(10):1166–76.
- Camaj, Peter, Hendrik Seeliger, Ivan Ischenko, Stefan Krebs, Helmut Blum, Enrico N. De Toni, Dagmar Faktorova, Karl Walter Jauch, ve Christiane J. Bruns. 2009. "EFEMP1 Binds the EGF Receptor and Activates MAPK and Akt Pathways in Pancreatic Carcinoma Cells". *Biological Chemistry* 390(12):1293–1302.
- Castro, Claudia Y., Mary L. Ostrowski, Roberto Barrios, Linda K. Green, Helmuth H. Popper, Susan Powell, Phillip T. Cagle, ve Jae Y. Ro. 2001. "Relationship between Epstein-Barr virus and lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: A clinicopathologic study of 6 cases and review of the literature". *Human Pathology* 32(8):863–72.
- Chae, Dong Kyu, Eunmi Ban, Young Sook Yoo, Eunice Eun Kyeong Kim, Ja Hyun Baik, ve Eun Joo Song. 2017. "MIR-27a regulates the TGF- β signaling pathway by targeting SMAD2 and SMAD4 in lung cancer". *Molecular Carcinogenesis* 56(8):1992–98.
- Chan, Bryan A. ve Jermaine I. G. Coward. 2013. "Chemotherapy Advances in Small-Cell Lung Cancer". *Journal of Thoracic Disease* 5 Suppl 5(Suppl 5):S565–78.
- Chen, F., Y. Zhang, E. Parra, J. Rodriguez, C. Behrens, R. Akbani, Y. Lu, J. M. Kurie, D. L. Gibbons, G. B. Mills, I. I. Wistuba, ve C. J. Creighton. 2017. "Multiplatform-Based Molecular Subtypes of Non-Small-Cell Lung Cancer". *Oncogene* 36(10):1384–93.
- Chen, Tong, Yanan You, Hua Jiang, ve Zack Z. Wang. 2017. "Epithelial–mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis". *Journal of Cellular Physiology* 232(12):3261–72.
- Chen, Xiaojun, Jie Meng, Wen Yue, Jian Yu, Jie Yang, Zhi Yao, ve Lin Zhang. 2014a. "Fibulin-3 suppresses Wnt/ β -catenin signaling and lung cancer invasion." *Carcinogenesis* 35(8):1707–16.
- Chen, Xiaojun, Jie Meng, Wen Yue, Jian Yu, Jie Yang, Zhi Yao, ve Lin Zhang. 2014b.

- “Fibulin-3 suppresses Wnt/ β -catenin signaling and lung cancer invasion”. *Carcinogenesis* 35(8):1707–16.
- Chen, Yen Ching, Jen Hau Chen, Kradin Richard, Pao Yang Chen, ve David C. Christiani. 2004. “Lung adenocarcinoma and human papillomavirus infection”. *Cancer* 101(6):1428–36.
- Chu, Mon-Li ve Takeshi Tsuda. 2004. “Fibulins in development and heritable disease”. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 72(1):25–36.
- Codony-Servat, Jordi, Alberto Verlicchi, ve Rafael Rosell. 2016. “Cancer stem cells in small cell lung cancer”. *Translational Lung Cancer Research* 5(1):16–25.
- Coe, Bradley P., Kelsie L. Thu, Sarit Aviel-Ronen, Emily A. Vucic, Adi F. Gazdar, Stephen Lam, Ming Sound Tsao, ve Wan L. Lam. 2013. “Genomic Deregulation of the E2F/Rb Pathway Leads to Activation of the Oncogene EZH2 in Small Cell Lung Cancer”. *PLoS ONE* 8(8).
- Craene, Bram De ve Geert Berx. 2013a. “Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression”. *Nature Reviews Cancer* 13(2):97–110.
- Craene, Bram De ve Geert Berx. 2013b. “Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression”. *Nature Reviews Cancer* 13(2):97–110.
- Dela Cruz, Charles S, Lynn T. Tanoue, ve Richard A. Matthay. 2011. “Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention”. *Clin Chest Med* 32(4).
- Dela Cruz, Charles S., Lynn T. Tanoue, ve Richard A. Matthay. 2011. “Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention”. *Clinics in Chest Medicine* 32(4):605–44.
- Development, New Drug ve Clinical Pharmacology. 2015. “Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics”. 1189–98.
- Edwards, S. L., C. Roberts, M. E. McKean, J. S. Cockburn, R. R. Jeffrey, ve K. M. Kerr. 2000. “Preoperative histological classification of primary lung cancer: Accuracy of diagnosis and use of the non-small cell category”. *Journal of Clinical Pathology* 53(7):537–40.
- El-Solh, A., N. M. Kumar, M. P. N. Nair, S. A. Schwarte, ve J. S. Lwebuga-Mukasa. 1997. “An RGD containing peptide from HIV-1 Tat-(65-80) modulates protooncogene expression in human bronchoalveolar carcinoma cell line, A549”. *Immunological Investigations* 26(3):351–70.
- Engelman, Jeffrey A., Kreshnik Zejnullahu, Tetsuya Mitsudomi, Youngchul Song, Courtney Hyland, Joon Oh Park, Neal Lindeman, Christopher-Michael Gale, Xiaojun Zhao, James Christensen, Takayuki Kosaka, Alison J. Holmes, Andrew M. Rogers, Federico Cappuzzo, Tony Mok, Charles Lee, Bruce E. Johnson, Lewis C. Cantley, ve Pasi A. Jänne. 2007. “MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling”. *Science*

316(5827):1039 LP – 1043.

- Engels, Eric A. 2008. "Inflammation in the development of lung cancer: Epidemiological evidence". *Expert Review of Anticancer Therapy* 8(4):605–15.
- Espinoza, Ingrid ve Lucio Miele. 2013. "Notch Inhibitors for Cancer Treatment". *Pharmacology & Therapeutics* 139(2):95–110.
- Esposito, Luca, Daniele Conti, Ramyasri Ailavajhala, Nansie Khalil, ve Antonio Giordano. 2010. *Lung Cancer: Are we up to the Challenge?* C. 11.
- Faccini, J. M. 1989. "The role of histopathology in the evaluation of risk of lung cancer from environmental tobacco smoke". *Experimental Pathology* 37(1–4):177–80.
- Feng, Guoxing, Hui Shi, Jiong Li, Zhe Yang, Runping Fang, Lihong Ye, Weiyang Zhang, ve Xiaodong Zhang. 2016. "MiR-30e suppresses proliferation of hepatoma cells via targeting prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 (P4HA1) mRNA". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 472(3):516–22.
- Früh, M., D. De Ruyscher, S. Popat, L. Crinò, S. Peters, E. Felip, ve Working Group. 2013. "Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up †". *ESMO Updated Clinical Practice Guidelines* 24:vi99–105.
- Gaughan, Elizabeth M., Sarah K. Cryer, Beow Y. Yeap, David M. Jackman, ve Daniel B. Costa. 2013. "Family history of lung cancer in never smokers with non-small-cell lung cancer and its association with tumors harboring EGFR mutations". *Lung Cancer* 79(3):193–97.
- Gazdar, Adi F., Paul A. Bunn, ve John D. Minna. 2017. "Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward". *Nature Reviews Cancer* 17(12):725–37.
- Gelsomino, Francesco, Giulio Rossi, ve Marcello Tiseo. 2014. "MET and small-cell lung cancer". *Cancers* 6(4):2100–2115.
- George, Julie, Jing Shan Lim, Se Jin Jang, Yupeng Cun, Luka Ozretia, Gu Kong, Frauke Leenders, Xin Lu, Lynnette Fernández-Cuesta, Graziella Bosco, Christian Müller, Ilona Dahmen, Nadine S. Jahchan, Kwon Sik Park, Dian Yang, Anthony N. Karnezis, Dedeepya Vaka, Angela Torres, Maia Segura Wang, Jan O. Korb, Roopika Menon, Sung Min Chun, Deokhoon Kim, Matt Wilkerson, Neil Hayes, David Engelmann, Brigitte Pützer, Marc Bos, Sebastian Michels, Ignacija Vlastic, Danila Seidel, Berit Pinther, Philipp Schaub, Christian Becker, Janine Altmüller, Jun Yokota, Takashi Kohno, Reika Iwakawa, Koji Tsuta, Masayuki Noguchi, Thomas Muley, Hans Hoffmann, Philipp A. Schnabel, Iver Petersen, Yuan Chen, Alex Soltermann, Verena Tischler, Chang Min Choi, Yong Hee Kim, Pierre P. Massion, Yong Zou, Dragana Jovanovic, Milica Kontic, Gavin M. Wright, Prudence A.

Russell, Benjamin Solomon, Ina Koch, Michael Lindner, Lucia A. Muscarella, Annamaria La Torre, John K. Field, Marko Jakopovic, Jelena Knezevic, Esmeralda Castaños-Vélez, Luca Roz, Ugo Pastorino, Odd Terje Brustugun, Marius Lund-Iversen, Erik Thunnissen, Jens Köhler, Martin Schuler, Johan Botling, Martin Sandelin, Montserrat Sanchez-Céspedes, Helga B. Salvesen, Viktor Achter, Ulrich Lang, Magdalena Bogus, Peter M. Schneider, Thomas Zander, Sascha Ansén, Michael Hallek, Jürgen Wolf, Martin Vingron, Yasushi Yatabe, William D. Travis, Peter Nürnberg, Christian Reinhardt, Sven Perner, Lukas Heukamp, Reinhard Büttner, Stefan A. Haas, Elisabeth Brambilla, Martin Peifer, Julien Sage, ve Roman K. Thomas. 2015. “Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer”. *Nature* 524(7563):47–53.

George, Julie, Jing Shan Lim, Se Jin Jang, Yupeng Cun, Luka Ozretić, Gu Kong, Frauke Leenders, Xin Lu, Lynnette Fernández-Cuesta, Graziella Bosco, Christian Müller, Ilona Dahmen, Nadine S. Jahchan, Kwon-Sik Park, Dian Yang, Anthony N. Karnezis, Dedeepya Vaka, Angela Torres, Maia Segura Wang, Jan O. Korbel, Roopika Menon, Sung-Min Chun, Deokhoon Kim, Matt Wilkerson, Neil Hayes, David Engelmann, Brigitte Pützer, Marc Bos, Sebastian Michels, Ignacija Vlastic, Danila Seidel, Berit Pinther, Philipp Schaub, Christian Becker, Janine Altmüller, Jun Yokota, Takashi Kohno, Reika Iwakawa, Koji Tsuta, Masayuki Noguchi, Thomas Muley, Hans Hoffmann, Philipp A. Schnabel, Iver Petersen, Yuan Chen, Alex Soltermann, Verena Tischler, Chang-min Choi, Yong-Hee Kim, Pierre P. Massion, Yong Zou, Dragana Jovanovic, Milica Kontic, Gavin M. Wright, Prudence A. Russell, Benjamin Solomon, Ina Koch, Michael Lindner, Lucia A. Muscarella, Annamaria la Torre, John K. Field, Marko Jakopovic, Jelena Knezevic, Esmeralda Castaños-Vélez, Luca Roz, Ugo Pastorino, Odd-Terje Brustugun, Marius Lund-Iversen, Erik Thunnissen, Jens Köhler, Martin Schuler, Johan Botling, Martin Sandelin, Montserrat Sanchez-Céspedes, Helga B. Salvesen, Viktor Achter, Ulrich Lang, Magdalena Bogus, Peter M. Schneider, Thomas Zander, Sascha Ansén, Michael Hallek, Jürgen Wolf, Martin Vingron, Yasushi Yatabe, William D. Travis, Peter Nürnberg, Christian Reinhardt, Sven Perner, Lukas Heukamp, Reinhard Büttner, Stefan A. Haas, Elisabeth Brambilla, Martin Peifer, Julien Sage, ve Roman K. Thomas. 2015. “Comprehensive Genomic Profiles of Small Cell Lung Cancer”. *Nature* 524(7563):47–53.

Giltay, Richard, Rupert Timpl, ve Günter Kostka. 1999. “Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4”. *Matrix Biology* 18(5):469–80.

Gloushankova, N. A., I. Y. Zhitnyak, ve S. N. Rubtsova. 2018. “Role of Epithelial-

Mesenchymal Transition in Tumor Progression". *Biochemistry (Moscow)* 83(12):1469–76.

- Govindan, Ramaswamy, Nathan Page, Daniel Morgensztern, William Read, Ryan Tierney, Anna Vlahiotis, Edward L. Spitznagel, ve Jay Piccirillo. 2006. "Changing Epidemiology of Small-Cell Lung Cancer in the United States Over the Last 30 Years: Analysis of the Surveillance, Epidemiologic, and End Results Database". *Journal of Clinical Oncology* 24(28):4539–44.
- de Groot, Patricia M., Carol C. Wu, Brett W. Carter, ve Reginald F. Munden. 2018. "The epidemiology of lung cancer". *Translational Lung Cancer Research* 7(3):220–33.
- Gu, Jundong, Feng Hua, Diansheng Zhong, Jun Chen, Hongyu Liu, ve Qinghua Zhou. 2010. "Systematic review of the relationship between family history of lung cancer and lung cancer risk". *Chinese Journal of Lung Cancer* 13(3):224–29.
- Hadnagy, Annamaria, Louis Gaboury, Raymond Beaulieu, ve Danuta Balicki. 2006. "SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations". *Experimental Cell Research* 312(19):3701–10.
- Hammerman, Peter S., Michael S. Lawrence, Douglas Voet, Rui Jing, Kristian Cibulskis, Andrey Sivachenko, Petar Stojanov, Aaron McKenna, Eric S. Lander, Stacey Gabriel, Gad Getz, Carrie Sougnez, Marcin Imielinski, Elena Helman, Bryan Hernandez, Nam H. Pho, Matthew Meyerson, Andy Chu, Hye-Jung E. Chun, Andrew J. Mungall, Erin Pleasance, A. Gordon Robertson, Payal Sipahimalani, Dominik Stoll, Miruna Balasundaram, Inanc Birol, Yaron S. N. Butterfield, Eric Chuah, Robin J. N. Coope, Richard Corbett, Noreen Dhalla, Ranabir Guin, An He, Carrie Hirst, Martin Hirst, Robert A. Holt, Darlene Lee, Haiyan I. Li, Michael Mayo, Richard A. Moore, Karen Mungall, Ka Ming Nip, Adam Olshen, Jacqueline E. Schein, Jared R. Slobodan, Angela Tam, Nina Thiessen, Richard Varhol, Thomas Zeng, Yongjun Zhao, Steven J. M. Jones, Marco A. Marra, Gordon Saksena, Andrew D. Cherniack, Stephen E. Schumacher, Barbara Tabak, Scott L. Carter, Nam H. Pho, Huy Nguyen, Robert C. Onofrio, Andrew Crenshaw, Kristin Ardlie, Rameen Beroukhi, Wendy Winckler, Peter S. Hammerman, Gad Getz, Matthew Meyerson, Alexei Protopopov, Jianhua Zhang, Angela Hadjipanayis, Semin Lee, Ruibin Xi, Lixing Yang, Xiaojia Ren, Hailei Zhang, Sachet Shukla, Peng-Chieh Chen, Psalm Haseley, Eunjung Lee, Lynda Chin, Peter J. Park, Raju Kucherlapati, Nicholas D. Socci, Yupu Liang, Nikolaus Schultz, Laetitia Borsu, Alex E. Lash, Agnes Viale, Chris Sander, Marc Ladanyi, J. Todd Auman, Katherine A. Hoadley, Matthew D. Wilkerson, Yan Shi, Christina Liquori, Shaowu Meng, Ling Li, Yidi J. Turman, Michael D. Topal, Donghui Tan, Scot Waring, Elizabeth Buda, Jesse Walsh, Corbin D. Jones, Piotr A. Mieczkowski, Darshan Singh, Junyuan Wu, Anisha

Gulabani, Peter Dolina, Tom Bodenheimer, Alan P. Hoyle, Janae V Simons, Matthew G. Soloway, Lisle E. Mose, Stuart R. Jefferys, Saianand Balu, Brian D. O'Connor, Jan F. Prins, Jinze Liu, Derek Y. Chiang, D. Neil Hayes, Charles M. Perou, Leslie Cope, Ludmila Danilova, Daniel J. Weisenberger, Dennis T. Maglinte, Fei Pan, David J. Van Den Berg, Timothy Triche Jr, James G. Herman, Stephen B. Baylin, Peter W. Laird, Gad Getz, Michael Noble, Doug Voet, Gordon Saksena, Nils Gehlenborg, Daniel DiCara, Jinhua Zhang, Hailei Zhang, Chang-Jiun Wu, Spring Yingchun Liu, Michael S. Lawrence, Lihua Zou, Andrey Sivachenko, Pei Lin, Petar Stojanov, Rui Jing, Juok Cho, Marc-Danie Nazaire, Jim Robinson, Helga Thorvaldsdottir, Jill Mesirov, Peter J. Park, Lynda Chin, Nikolaus Schultz, Rileen Sinha, Giovanni Ciriello, Ethan Cerami, Benjamin Gross, Anders Jacobsen, Jianjiong Gao, B. Arman Aksoy, Nils Weinhold, Ricardo Ramirez, Barry S. Taylor, Yevgeniy Antipin, Boris Reva, Ronglai Shen, Qianxing Mo, Venkatraman Seshan, Paul K. Paik, Marc Ladanyi, Chris Sander, Rehan Akbani, Nianxiang Zhang, Bradley M. Broom, Tod Casasent, Anna Unruh, Chris Wakefield, R. Craig Cason, Keith A. Baggerly, John N. Weinstein, David Haussler, Christopher C. Benz, Joshua M. Stuart, Jingchun Zhu, Christopher Szeto, Gary K. Scott, Christina Yau, Sam Ng, Ted Goldstein, Peter Waltman, Artem Sokolov, Kyle Ellrott, Eric A. Collisson, Daniel Zerbino, Christopher Wilks, Singer Ma, Brian Craft, Matthew D. Wilkerson, J. Todd Auman, Katherine A. Hoadley, Ying Du, Christopher Cabanski, Vonn Walter, Darshan Singh, Junyuan Wu, Anisha Gulabani, Tom Bodenheimer, Alan P. Hoyle, Janae V Simons, Matthew G. Soloway, Lisle E. Mose, Stuart R. Jefferys, Saianand Balu, J. S. Marron, Yufeng Liu, Kai Wang, Jinze Liu, Jan F. Prins, D. Neil Hayes, Charles M. Perou, Chad J. Creighton, Yiqun Zhang, William D. Travis, Natasha Rekhtman, Joanne Yi, Marie C. Aubry, Richard Cheney, Sanja Dacic, Douglas Flieder, William Funkhouser, Peter Illei, Jerome Myers, Ming-Sound Tsao, Robert Penny, David Mallery, Troy Shelton, Martha Hatfield, Scott Morris, Peggy Yena, Candace Shelton, Mark Sherman, Joseph Paulauskis, Matthew Meyerson, Stephen B. Baylin, Ramaswamy Govindan, Rehan Akbani, Ijeoma Azodo, David Beer, Ron Bose, Lauren A. Byers, David Carbone, Li-Wei Chang, Derek Chiang, Andy Chu, Elizabeth Chun, Eric Collisson, Leslie Cope, Chad J. Creighton, Ludmila Danilova, Li Ding, Gad Getz, Peter S. Hammerman, D. Neil Hayes, Bryan Hernandez, James G. Herman, John Heymach, Cristiane Ida, Marcin Imielinski, Bruce Johnson, Igor Jurisica, Jacob Kaufman, Farhad Kosari, Raju Kucherlapati, David Kwiatkowski, Marc Ladanyi, Michael S. Lawrence, Christopher A. Maher, Andy Mungall, Sam Ng, William Pao, The Cancer Genome Atlas Research Network, Genome sequencing centres: Broad Institute, Genome characterization centres: B. C. Cancer Agency,

Broad Institute, Brigham & Women's Hospital/Harvard Medical School, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (TCGA pilot phase only), University of North Carolina at Chapel Hill, University of Southern California/Johns Hopkins, Genome data analysis centres: Broad Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, University of California Santa Cruz/Buck Institute, Baylor College of Medicine, Pathology committee, Biospecimen core resources: International Genomics Consortium, ve Disease working group. 2012. "Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers". *Nature* 489(7417):519–25.

Hanna, Nasser, Paul A. Bunn, Corey Langer, Lawrence Einhorn, Troy Guthrie, Thaddeus Beck, Rafat Ansari, Peter Ellis, Michael Byrne, Mark Morrison, Subramanian Hariharan, Benjamin Wang, ve Alan Sandler. 2006. "Randomized phase III trial comparing irinotecan/cisplatin with etoposide/cisplatin in patients with previously untreated extensive-stage disease small-cell lung cancer". *Journal of Clinical Oncology* 24(13):2038–43.

Hanna, Nasser, David Johnson, Sarah Temin, Sherman Baker, Julie Brahmer, Peter M. Ellis, Giuseppe Giaccone, Paul J. Hesketh, Ishmael Jaiyesimi, Natasha B. Leigh, Gregory J. Riely, Joan H. Schiller, Bryan J. Schneider, Thomas J. Smith, Joan Tashbar, William A. Biermann, ve Gregory Masters. 2017. "Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update". *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35(30):3484–3515.

He, Mei ve Yan Xue. 2017. "MicroRNA-148a Suppresses Proliferation and Invasion Potential of Non-Small Cell Lung Carcinomas via Regulation of STAT3". *OncoTargets and Therapy* 10:1353–61.

Hendrix, M. J., E. A. Seftor, R. E. Seftor, ve K. T. Trevor. 1997. "Experimental Co-Expression of Vimentin and Keratin Intermediate Filaments in Human Breast Cancer Cells Results in Phenotypic Interconversion and Increased Invasive Behavior". *The American Journal of Pathology* 150(2):483–95.

Heo, Jin Hyung, Ji-ye Song, Ju-yeong Jeong, Gwangil Kim, Tae Heon Kim, Haeyoun Kang, Ah-young Kwon, ve Hee Jung An. 2016. "Fibulin-5 is a tumour suppressor inhibiting cell migration and invasion in ovarian cancer". *Journal of Clinical Pathology* 69(2):109–16.

Herbst, Roy S., John V. Heymach, ve Scott M. Lippman. 2008. "Molecular origins of cancer: Lung cancer". *New England Journal of Medicine* 359(13):1367–80.

Hershkovitz-Rokah, Oshrat, Shira Modai, Metsada Pasmanik-Chor, Amos Toren, Noam Shomron, Pia Raanani, Ofer Shpilberg, ve Galit Granot. 2015. "MiR-30e induces

- apoptosis and sensitizes K562 cells to imatinib treatment via regulation of the BCR–ABL protein”. *Cancer Letters* 356(2, Part B):597–605.
- Hiew, Michele Sook Yui, Han Ping Cheng, Chiu-Jung Huang, Kowit Yu Chong, Soon Keng Cheong, Kong Bung Choo, ve Tunku Kamarul. 2018. “Incomplete cellular reprogramming of colorectal cancer cells elicits an epithelial/mesenchymal hybrid phenotype”. *Journal of Biomedical Science* 25(1):57.
- Hiramoto, Hidekazu, Tomoki Muramatsu, Daisuke Ichikawa, Kousuke Tanimoto, Satoru Yasukawa, Eigo Otsuji, ve Johji Inazawa. 2017. “MiR-509-5p and miR-1243 increase the sensitivity to gemcitabine by inhibiting epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer”. *Scientific Reports* 7(1):1–12.
- Hirota, Seiichi, Koji Isozaki, Yasuhiro Moriyama, Koji Hashimoto, Toshiro Nishida, Shingo Ishiguro, Kiyoshi Kawano, Masato Hanada, Akihiko Kurata, Masashi Takeda, Ghulam Muhammad Tunio, Yuji Matsuzawa, Yuzuru Kanakura, Yasuhisa Shinomura, ve Yukihiko Kitamura. 1998. “Gain-of-Function Mutations of *c-kit* in Human Gastrointestinal Stromal Tumors”. *Science* 279(5350):577 LP – 580.
- Holderfield, Matthew, Marian M. Deuker, Frank McCormick, ve Martin McMahon. 2014. “Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond”. *Nature Reviews Cancer* 14(7):455–67.
- Hong, Tian, Kazuhide Watanabe, Catherine Ha Ta, Alvaro Villarreal-Ponce, Qing Nie, ve Xing Dai. 2015. “An *Ovol2-Zeb1* Mutual Inhibitory Circuit Governs Bidirectional and Multi-step Transition between Epithelial and Mesenchymal States”. *PLoS Computational Biology* 11(11):1–20.
- Horn, Leora, Martin Reck, ve David R. Spigel. 2016. “The Future of Immunotherapy in the Treatment of Small Cell Lung Cancer”. *The Oncologist* 21(8):910–21.
- Horowitz, J. M., S. H. Park, E. Bogenmann, J. C. Cheng, D. W. Yandell, F. J. Kaye, J. D. Minna, T. P. Dryja, ve R. A. Weinberg. 1990. “Frequent Inactivation of the Retinoblastoma Anti-Oncogene Is Restricted to a Subset of Human Tumor Cells”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(7):2775–79.
- Hsu, Hsi Hsien, Chung Jung Liu, Chia Yao Shen, Yi Jyun Chen, Li Mien Chen, Wu Hsien Kuo, Yueh Min Lin, Ray Jade Chen, Chang Hai Tsai, Fuu Jen Tsai, ve Chih Yang Huang. 2012. “P38 α MAPK mediates 17 β -estradiol inhibition of MMP-2 and -9 expression and cell migration in human lovo colon cancer cells”. *Journal of Cellular Physiology* 227(11):3648–60.
- Hu, Bin, Mohan S. Nandhu, Hosung Sim, Paula A. Agudelo-Garcia, Joshua C. Saldivar, Claire E. Dolan, Maria E. Mora, Gerard J. Nuovo, Susan E. Cole, ve Mariano S.

- Viapiano. 2012. "Fibulin-3 Promotes Glioma Growth and Resistance through a Novel Paracrine Regulation of Notch Signaling". *Cancer Research* 72(15):3873 LP – 3885.
- Hu, Yuanjie, Peter Dion Pioli, Eric Siegel, Qinghua Zhang, Jodi Nelson, Abhishek Chaturbedi, Marlon S. Mathews, Daniel I. Ro, Selma Alkafeef, Nelson Hsu, Mark Hamamura, Liping Yu, Kenneth R. Hess, Bruce J. Tromberg, Mark E. Linskey, ve Yi Hong Zhou. 2011. "EFEMP1 suppresses malignant glioma growth and exerts its action within the tumor extracellular compartment." *Molecular cancer* 10:123.
- Hurwitz, Jane L., Francis McCoy, Paula Scullin, ve Dean A. Fennell. 2009. "New Advances in the Second-Line Treatment of Small Cell Lung Cancer". *The Oncologist* 14(10):986–94.
- Hwang, Chung-Feng, Chih-Yen Chien, Shun-Cheng Huang, Yu-Fang Yin, Chao-Cheng Huang, Fu-Min Fang, Hsin-Ting Tsai, Li-Jen Su, ve Chang-Han Chen. 2010. "Fibulin-3 is associated with tumour progression and a poor prognosis in nasopharyngeal carcinomas and inhibits cell migration and invasion via suppressed AKT activity". *The Journal of Pathology* 222(4):367–79.
- Ignatius Ou, Sai Hong ve Jason A. Zell. 2009. "Carcinoma NOS is a common histologic diagnosis and is increasing in proportion among non-small cell lung cancer histologies". *Journal of Thoracic Oncology* 4(10):1202–11.
- Jemal, Ahmedin, Freddie Bray, Melissa M. Center, Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, ve David Forman. 2011. "Global cancer statistics". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61(2):69–90.
- Jolly, Mohit Kumar, Satyendra C. Tripathi, Dongya Jia, Steven M. Mooney, Muge Celiktas, Samir M. Hanash, Sendurai A. Mani, Kenneth J. Pienta, Eshel Ben-Jacob, ve Herbert Levine. 2016. "Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype". *Oncotarget* 7(19):27067–84.
- Jordan, Nicole Vincent, Gary L. Johnson, ve Amy N. Abell. 2011. "Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer". *Cell Cycle* 10(17):2865–73.
- Kim, Eun Jin, So Yong Lee, Mi Kyung Woo, Soo Im Choi, Tae Rim Kim, Min Jung Kim, Kug Chan Kim, Eun Wie Cho, ve In Gyu Kim. 2012. "Fibulin-3 promoter methylation alters the invasive behavior of non-small cell lung cancer cell lines via MMP-7 and MMP-2 regulation". *International Journal of Oncology* 40(2):402–8.
- Kim, Hye Ryun, Dae Joon Kim, Dae Ryong Kang, Jin Gu Lee, Sun Min Lim, Chang Young Lee, Sun Young Rha, Mi Kyung Bae, Young Joo Lee, Se Hoon Kim, Sang-Jun Ha, Ross Andrew Soo, Kyung Young Chung, Joo Hang Kim, Ji Hyun Lee, Hyo Sup Shim, ve Byoung Chul Cho. 2012. "Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene

- Amplification Is Associated With Poor Survival and Cigarette Smoking Dosage in Patients With Resected Squamous Cell Lung Cancer". *Journal of Clinical Oncology* 31(6):731–37.
- Kim, I. G., S. Y. Kim, S. I. Choi, J. H. Lee, K. C. Kim, ve E. W. Cho. 2014. "Fibulin-3-mediated inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and self-renewal of ALDH⁺ lung cancer stem cells through IGF1R signaling". *Oncogene* 33:3908–17.
- Koba, Hayato, Hideharu Kimura, Shingo Nishikawa, Takashi Sone, Miki Abo, Johsuke Hara, Kazuyoshi Hosomichi, Atsushi Tajima, ve Kazuo Kasahara. 2018. "Next-generation sequencing analysis identifies genomic alterations in pathological morphologies: A case of pulmonary carcinosarcoma harboring EGFR mutations". *Lung Cancer* 122:146–50.
- Konala, Venu Madhav, Bhaskar Reddy Madhira, Sara Ashraf, ve Stephen Graziano. 2020. "Use of Immunotherapy in Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer". *ONCOLOGY (United States)*.
- Krushkal, Julia, Thomas Silvers, William C. Reinhold, Dmitriy Sonkin, Suleyman Vural, John Connelly, Sudhir Varma, Paul S. Meltzer, Mark Kunkel, Annamaria Rapisarda, David Evans, Yves Pommier, ve Beverly A. Teicher. 2020. "Epigenome-wide DNA methylation analysis of small cell lung cancer cell lines suggests potential chemotherapy targets". *Clinical Epigenetics* 12(1).
- Kumar, Binod, Sweaty Koul, Jane Petersen, Lakshmipathi Khandrika, Jeong S. Hwa, Randall B. Meacham, Shandra Wilson, ve Hari K. Koul. 2010. "p38 Mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity". *Cancer Research* 70(2):832–41.
- Kwak, Y., S. K. Nam, A. N. Seo, D. W. Kim, S. B. Kang, W. H. Kim, ve H. S. Lee. 2015. "Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene Copy Number and mRNA Expression in Primary Colorectal Cancer and Its Clinicopathologic Correlation". *Pathobiology* 82(2):76–83.
- Lamouille, Samy, Jian Xu, ve Rik Derynck. 2014. "Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15(3):178–96.
- Latil, Mathilde, Dany Nassar, Benjamin Beck, Soufiane Boumahdi, Li Wang, Audrey Brisebarre, Christine Dubois, Erwin Nkusi, Sandrine Lenglez, Agnieszka Checinska, Alizée Vercauteren Drubbel, Michael Devos, Wim Declercq, Rui Yi, ve Cédric Blanpain. 2017. "Cell-Type-Specific Chromatin States Differentially Prime Squamous Cell Carcinoma Tumor-Initiating Cells for Epithelial to Mesenchymal Transition". *Cell Stem Cell* 20(2):191-204.e5.
- Leighl, Natasha B., Natasha Rekhtman, William A. Biermann, James Huang, Mari Mino-

- Kenudson, Suresh S. Ramalingam, Howard West, Sara Whitlock, ve Mark R. Somerfield. 2014. "Molecular testing for selection of patients with lung cancer for epidermal growth factor receptor and anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the college of American pathologists/international association for the study of lung cancer/association for molecular pathology guideline". *Journal of Clinical Oncology* 32(32):3673–79.
- Lewis, Denise Riedel, David P. Check, Neil E. Caporaso, William D. Travis, ve Susan S. Devesa. 2014. "US Lung Cancer Trends by Histologic Type". *Cancer* 120(18):2883–92.
- Li, Hui, Huiyan Niu, Yang Peng, Jiahe Wang, ve Ping He. 2013. "Ubc9 promotes invasion and metastasis of lung cancer cells". *Oncol Rep* 29(4):1588–94.
- Li, Juan, Chen Qi, Xia Liu, Changzhong Li, Jie Chen, ve Min Shi. 2018. "Fibulin-3 knockdown inhibits cervical cancer cell growth and metastasis in vitro and in vivo". *Scientific Reports* 8(1):1–18.
- Li, Zhishuang, Jingjing Cui, Qiong Yu, Xiaojuan Wu, Aifeng Pan, ve Li Li. 2016. "Evaluation of CCND1 Amplification and CyclinD1 Expression: Diffuse and Strong Staining of CyclinD1 Could Have Same Predictive Roles as CCND1 Amplification in ER Positive Breast Cancers". *American Journal of Translational Research* 8(1):142–53.
- Lim, Wanyin, Carole A. Ridge, Andrew G. Nicholson, ve Saeed Mirsadraee. 2018. "The 8th lung cancer TNM classification and clinical staging system: Review of the changes and clinical implications". *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* 8(7):709–18.
- Lindeman, Neal. 2015. "Nivolumab approved for lung cancer". *Cancer discovery* 5(5):OF1.
- Lindeman, Neal I., Philip T. Cagle, Mary Beth Beasley, Dhananjay Arun Chitale, Sanja Dacic, Giuseppe Giaccone, Robert Brian Jenkins, David J. Kwiatkowski, Juan Sebastian Saldivar, Jeremy Squire, Erik Thunnissen, ve Marc Ladanyi. 2013. "Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the study of lung cancer, and Association for Molecular Pathology". *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 137(6):828–60.
- Liu, Minxia, Kecheng Zhou, ve Yi Cao. 2016. "MicroRNA-944 affects cell growth by targeting EPHA7 in non-small cell lung cancer". *International Journal of Molecular Sciences* 17(10).
- Loo, Peh Sun, Stuart C. Thomas, Marianne C. Nicolson, Margaret N. Fyfe, ve Keith M.

- Kerr. 2010. "Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens". *Journal of Thoracic Oncology* 5(4):442–47.
- Luan, Nianxu, Yi Wang, ve Xuedong Liu. 2018. "Absent expression of miR-30a promotes the growth of lung cancer cells by targeting MEF2D". *Oncology Letters* 16(1):1173–79.
- MacKinnon, Alison C., Jens Kopatz, ve Tariq Sethi. 2010. "The molecular and cellular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies". *British Medical Bulletin* 95(1):47–61.
- Mani, Sendurai A., Wenjun Guo, Mai-Jing Liao, Elinor Ng Eaton, Ayyakkannu Ayyanan, Alicia Y. Zhou, Mary Brooks, Ferenc Reinhard, Cheng Cheng Zhang, Michail Shipitsin, Lauren L. Campbell, Kornelia Polyak, Cathrin Brisken, Jing Yang, ve Robert A. Weinberg. 2008. "The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells". *Cell* 133(4):704–15.
- Mizuno, Keiko, Hiroko Mataka, Takayuki Arai, Atsushi Okato, Kazuto Kamikawaji, Tomohiro Kumamoto, Tsubasa Hiraki, Kazuhito Hatanaka, Hiromasa Inoue, ve Naohiko Seki. 2017. "The microRNA expression signature of small cell lung cancer: Tumor suppressors of miR-27a-5p and miR-34b-3p and their targeted oncogenes". *Journal of Human Genetics* 62(7):671–78.
- Mok, Tony S., Yi-Long Wu, Sumitra Thongprasert, Chih-Hsin Yang, Da-Tong Chu, Nagahiro Saijo, Patrapim Sunpaweravong, Baohui Han, Benjamin Margono, Yukito Ichinose, Yutaka Nishiwaki, Yuichiro Ohe, Jin-Ji Yang, Busyamas Chewaskulyong, Haiyi Jiang, Emma L. Duffield, Claire L. Watkins, Alison A. Armour, ve Masahiro Fukuoka. 2009. "Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma". *New England Journal of Medicine* 361(10):947–57.
- Mollaoglu, Gurkan, Matthew R. Guthrie, Stefanie Böhm, Johannes Brägelmann, Ismail Can, Paul M. Ballieu, Annika Marx, Julie George, Christine Heinen, Milind D. Chalisehar, Haixia Cheng, Abbie S. Ireland, Kendall E. Denning, Anandaroop Mukhopadhyay, Jeffery M. Vahrenkamp, Kristofer C. Berrett, Timothy L. Mosbrugger, Jun Wang, Jessica L. Kohan, Mohamed E. Salama, Benjamin L. Witt, Martin Peifer, Roman K. Thomas, Jason Gertz, Jane E. Johnson, Adi F. Gazdar, Robert J. Wechsler-Reya, Martin L. Sos, ve Trudy G. Oliver. 2017. "MYC Drives Progression of Small Cell Lung Cancer to a Variant Neuroendocrine Subtype with Vulnerability to Aurora Kinase Inhibition". *Cancer Cell* 31(2):270–85.
- Morel, Anne-Pierre, Marjory Lièvre, Clémence Thomas, George Hinkal, Stéphane Ansieau, ve Alain Puisieux. 2008. "Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition". *PLoS One* 3(8):e2888–e2888.
- Narita, Saki, Eiko Saito, Norie Sawada, Taichi Shimazu, Taiki Yamaji, Motoki Iwasaki,

- Junko Ishihara, Ribeka Takachi, Kenji Shibuya, Manami Inoue, ve Shoichiro Tsugane. 2018. "Dietary consumption of antioxidant vitamins and subsequent lung cancer risk: The Japan Public Health Center-based prospective study". *International Journal of Cancer* 142(12):2441–60.
- Nassar, Dany ve Cédric Blanpain. 2016. "Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications". *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 11(1):47–76.
- Nicholson, Andrew G., David Gonzalez, Pallav Shah, Matthew J. Pynegar, Manjiri Deshmukh, Alexandra Rice, ve Sanjay Popat. 2010. "Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of Mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR mutation analysis". *Journal of Thoracic Oncology* 5(4):436–41.
- Niederst, Matthew J., Lecia V. Sequist, John T. Poirier, Craig H. Mermel, Elizabeth L. Lockerman, Angel R. Garcia, Ryohei Katayama, Carlotta Costa, Kenneth N. Ross, Teresa Moran, Emily Howe, Linnea E. Fulton, Hillary E. Mulvey, Lindsay A. Bernardo, Farhiya Mohamoud, Norikatsu Miyoshi, Paul A. VanderLaan, Daniel B. Costa, Pasi A. Jänne, Darrell R. Borger, Sridhar Ramaswamy, Toshi Shioda, Anthony J. Iafrate, Gad Getz, Charles M. Rudin, Mari Mino-Kenudson, ve Jeffrey A. Engelman. 2015. "RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer". *Nature Communications* 6:199–203.
- Ning, Zhi Qiang, Hai lin Lu, Chao Chen, Lin Wang, Wei Cai, Yan Li, Ting hua Cao, Jing Zhu, Yong Qian Shu, ve Hua Shen. 2017. "MicroRNA-30e reduces cell growth and enhances drug sensitivity to gefitinib in lung carcinoma". *Oncotarget* 8(3):4572–81.
- Obaya, Alvaro J., Susana Rúa, Angela Moncada-Pazos, ve Santiago Cal. 2012. "The dual role of fibulins in tumorigenesis". *Cancer Letters* 325(2):132–38.
- Organization, World Health. 1981. *Histological typing of breast tumours*. 2nd ed. World Health Organization.
- Oser, Matthew G., Matthew J. Niederst, Lecia V. Sequist, ve Jeffrey A. Engelman. 2015. "Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: Molecular drivers and cells of origin". *The Lancet Oncology* 16(4):e165–72.
- Ozcan, Onder, Murat Kara, Onder Yumrutas, Esra Bozgeyik, Ibrahim Bozgeyik, ve Ozgur Ilhan Celik. 2016. "MTUS1 and its targeting miRNAs in colorectal carcinoma: significant associations". *Tumor Biology* 37(5):6637–45.
- Paniz-Mondolfi, Alberto, Rajesh Singh, George Jour, Mandana Mahmoodi, A. Hafeez Diwan, Bedia A. Barkoh, Ronald Cason, Yve Huttenbach, Gustavo Benaim, John Galbincea, ve Rajyalakshmi Luthra. 2015. "Cutaneous carcinosarcoma and the EMT: to transition, or not to transition? That is the question". *Virchows Archiv*

466(3):359–60.

- Park, Ji Soo, Jae Seok Lee, Eun Young Kim, Ji Ye Jung, Se Kyu Kim, Joon Chang, Dae Joon Kim, Chang Young Lee, Inkyung Jung, Joo Hang Kim, Hye Ryun Kim, Yong Wha Moon, Hyo Song Kim, Byoung Chul Cho, ve Hyo Sup Shim. 2015. “The frequency and impact of FGFR1 amplification on clinical outcomes in Korean patients with small cell lung cancer”. *Lung Cancer* 88(3):325–31.
- Park, Kwon-sik, Luciano G. Martelotto, Martin Peifer, Martin L. Sos, Anthony N. Karnezis, Moe R. Mahjoub, Katie Bernard, Jamie F. Conklin, Anette Szczepny, Jing Yuan, Ribo Guo, Beatrice Ospina, Jeanette Falzon, Samara Bennett, Tracey J. Brown, Ana Markovic, Wendy L. Devereux, Cory A. Ocasio, James K. Chen, Tim Stearns, Roman K. Thomas, Marion Dorsch, Silvia Buonamici, D. Neil Watkins, Craig D. Peacock, ve Julien Sage. 2011. “A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer”. *Nature Medicine* 17(11).
- Pastushenko, Ievgenia ve Cédric Blanpain. 2019. “EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis”. *Trends in Cell Biology* 29(3):212–26.
- Pastushenko, Ievgenia, Audrey Brisebarre, Alejandro Sifrim, Marco Fioramonti, Tatiana Revenco, Soufiane Boumahdi, Alexandra Van Keymeulen, Daniel Brown, Virginie Moers, Sophie Lemaire, Sarah De Clercq, Esmeralda Minguijón, Cédric Balsat, Yuri Sokolow, Christine Dubois, Florian De Cock, Samuel Scozzaro, Federico Sopena, Angel Lanas, Nicky D’haene, Isabelle Salmon, Jean Christophe Marine, Thierry Voet, Panagiota A. Sotiropoulou, ve Cédric Blanpain. 2018a. “Identification of the tumour transition states occurring during EMT”. *Nature* 556(7702).
- Pastushenko, Ievgenia, Audrey Brisebarre, Alejandro Sifrim, Marco Fioramonti, Tatiana Revenco, Soufiane Boumahdi, Alexandra Van Keymeulen, Daniel Brown, Virginie Moers, Sophie Lemaire, Sarah De Clercq, Esmeralda Minguijón, Cédric Balsat, Yuri Sokolow, Christine Dubois, Florian De Cock, Samuel Scozzaro, Federico Sopena, Angel Lanas, Nicky D’haene, Isabelle Salmon, Jean Christophe Marine, Thierry Voet, Panagiota A. Sotiropoulou, ve Cédric Blanpain. 2018b. “Identification of the tumour transition states occurring during EMT”. *Nature* 556(7702).
- Peifer, Martin, Lynnette Fernández-Cuesta, Martin L. Sos, Julie George, Danila Seidel, Lawryn H. Kasper, Dennis Plenker, Frauke Leenders, Ruping Sun, Thomas Zander, Roopika Menon, Mirjam Koker, Ilona Dahmen, Christian Müller, Vincenzo Di Cerbo, Hans-Ulrich Schildhaus, Janine Altmüller, Ingelore Baessmann, Christian Becker, Bram de Wilde, Jo Vandesompele, Diana Böhm, Sascha Ansén, Franziska Gabler, Ines Wilkening, Stefanie Heynck, Johannes M. Heuckmann, Xin Lu, Scott L. Carter, Kristian Cibulskis, Shantanu Banerji, Gad Getz, Kwon-Sik Park, Daniel Rauh, Christian Grütter, Matthias Fischer, Laura Pasqualucci, Gavin Wright, Zoe Wainer,

Prudence Russell, Iver Petersen, Yuan Chen, Erich Stoelben, Corinna Ludwig, Philipp Schnabel, Hans Hoffmann, Thomas Muley, Michael Brockmann, Walburga Engel-Riedel, Lucia A. Muscarella, Vito M. Fazio, Harry Groen, Wim Timens, Hannie Sietsma, Erik Thunnissen, Egbert Smit, Daniëlle A. M. Heideman, Peter J. F. Snijders, Federico Cappuzzo, Claudia Ligorio, Stefania Damiani, John Field, Steinar Solberg, Odd Terje Brustugun, Marius Lund-Iversen, Jörg Sanger, Joachim H. Clement, Alex Soltermann, Holger Moch, Walter Weder, Benjamin Solomon, Jean-Charles Soria, Pierre Validire, Benjamin Besse, Elisabeth Brambilla, Christian Brambilla, Sylvie Lantuejoul, Philippe Lorimier, Peter M. Schneider, Michael Hallek, William Pao, Matthew Meyerson, Julien Sage, Jay Shendure, Robert Schneider, Reinhard Buttner, Jurgen Wolf, Peter Nurnberg, Sven Perner, Lukas C. Heukamp, Paul K. Brindle, Stefan Haas, ve Roman K. Thomas. 2012. "Integrative Genome Analyses Identify Key Somatic Driver Mutations of Small-Cell Lung Cancer". *Nature Genetics* 44(10):1104–10.

Pleasance, Erin D., Philip J. Stephens, Sarah O'Meara, David J. McBride, Alison Meynert, David Jones, Meng-Lay Lin, David Beare, King Wai Lau, Chris Greenman, Ignacio Varela, Serena Nik-Zainal, Helen R. Davies, Gonzalo R. Ordonez, Laura J. Mudie, Calli Latimer, Sarah Edkins, Lucy Stebbings, Lina Chen, Mingming Jia, Catherine Leroy, John Marshall, Andrew Menzies, Adam Butler, Jon W. Teague, Jonathon Mangion, Yongming A. Sun, Stephen F. McLaughlin, Heather E. Peckham, Eric F. Tsung, Gina L. Costa, Clarence C. Lee, John D. Minna, Adi Gazdar, Ewan Birney, Michael D. Rhodes, Kevin J. McKernan, Michael R. Stratton, P. Andrew Futreal, ve Peter J. Campbell. 2010. "A Small-Cell Lung Cancer Genome with Complex Signatures of Tobacco Exposure". *Nature* 463(7278):184–90.

Poirier, J. T., E. E. Gardner, N. Connis, A. L. Moreira, E. De Stanchina, C. L. Hann, ve C. M. Rudin. 2015. "DNA methylation in small cell lung cancer defines distinct disease subtypes and correlates with high expression of EZH2". *Oncogene* 34(48):5869–78.

Powles, T., C. Thirwell, T. Newsom-Davis, M. Nelson, P. Shah, S. Cox, B. Gazzard, ve M. Bower. 2003. "Does HIV adversely influence the outcome in advanced non-small-cell lung cancer in the era of HAART?" *British Journal of Cancer* 89(3):457–59.

Puisieux, Alain, Thomas Brabletz, ve Julie Caramel. 2014. "Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors". *Nature Cell Biology* 16(6):488–94.

Quintanal-Villalonga, lvvaro ve Sonia Molina-Pinelo. 2019. "Epigenetics of lung cancer: a translational perspective". *Cellular Oncology* 42(6):739–56.

Rainal, Vinod, Robert Milroy², Abdul Al-Dawoud³, David Dunlop', ve Michael Soukop'.

1992. *Extrapulmonary small cell carcinoma of bone*. C. 68.
- Rami-Porta, Ramón, Vanessa Bolejack, Dorothy J. Giroux, Kari Chansky, John Crowley, Hisao Asamura, ve Peter Goldstraw. 2014. "The IASLC lung cancer staging project: The new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer". *Journal of Thoracic Oncology* 9(11):1618–24.
- Rezazadeh, Arash, Damian A. Laber, Shin Je Ghim, Alfred Ben Jenson, ve Goetz Kloecker. 2009. "The role of human papilloma virus in lung cancer: A review of the evidence". *American Journal of the Medical Sciences* 338(1):64–67.
- Rhim, Andrew D., Emily T. Mirek, Nicole M. Aiello, Anirban Maitra, Jennifer M. Bailey, Florencia McAllister, Maximilian Reichert, Gregory L. Beatty, Anil K. Rustgi, Robert H. Vonderheide, Steven D. Leach, ve Ben Z. Stanger. 2012. "EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation". *Cell* 148(1–2):349–61.
- Roudi, Raheleh, Alireza Korourian, Ahmad Shariftabrizi, ve Zahra Madjd. 2015. "Differential Expression of Cancer Stem Cell Markers ALDH1 and CD133 in Various Lung Cancer Subtypes". *Cancer Investigation* 33(7):294–302.
- Ru, Yi, Xiao-Jie Chen, Zhi-Wei Zhao, Peng-Fei Zhang, Shuai-Hao Feng, Qiang Gao, She-Gan Gao, ve Xiao-Shan Feng. 2017. "CyclinD1 and p57 kip2 as biomarkers in differentiation, metastasis and prognosis of gastric cardia adenocarcinoma". *Oncotarget; Vol 8, No 43*.
- Ruano-Ravina, A., A. Figueiras, ve Jm Barros-Dios. 2000. "Diet and lung cancer: A new approach". *European Journal of Cancer Prevention* 9(6):395–400.
- Ruano-Ravina, A., A. Figueiras, M. Freire-Garabal, ve J. Barros-Dios. 2006. "Antioxidant Vitamins and Risk of Lung Cancer". *Current Pharmaceutical Design* 12(5):599–613.
- Rudin, Charles M., Steffen Durinck, Eric W. Stawiski, John T. Poirier, Zora Modrusan, David S. Shames, Emily A. Bergbower, Yinghui Guan, James Shin, Joseph Guillory, Celina Sanchez Rivers, Catherine K. Foo, Deepali Bhatt, Jeremy Stinson, Florian Gnad, Peter M. Haverty, Robert Gentleman, Subhra Chaudhuri, Vasantharajan Janakiraman, Bijay S. Jaiswal, Chaitali Parikh, Wenlin Yuan, Zemin Zhang, Hartmut Koeppen, Thomas D. Wu, Howard M. Stern, Robert L. Yauch, Kenneth E. Huffman, Diego D. Paskulin, Peter B. Illei, Marileila Varella-Garcia, Adi F. Gazdar, Frederic J. de Sauvage, Richard Bourgon, John D. Minna, Malcolm V Brock, ve Somasekar Seshagiri. 2012. "Comprehensive Genomic Analysis Identifies SOX2 as a Frequently Amplified Gene in Small-Cell Lung Cancer". *Nature Genetics* 44(10):1111–16.
- Rudin, Charles M., Nofisat Ismaila, Christine L. Hann, Narinder Malhotra, Benjamin Movsas, Kim Norris, M. Catherine Pietanza, Suresh S. Ramalingam, Andrew T. Turrisi, ve Giuseppe Giaccone. 2015. "Treatment of small-cell lung cancer:

- American society of clinical oncology endorsement of the American college of chest physicians guideline". *Journal of Clinical Oncology* 33(34):4106–11.
- Rudin, Charles M., John T. Poirier, Lauren Averett Byers, Caroline Dive, Afshin Dowlati, Julie George, John V. Heymach, Jane E. Johnson, Jonathan M. Lehman, David MacPherson, Pierre P. Massion, John D. Minna, Trudy G. Oliver, Vito Quaranta, Julien Sage, Roman K. Thomas, Christopher R. Vakoc, ve Adi F. Gazdar. 2019. "Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data". *Nature Reviews Cancer* 19(5):289–97.
- Rudin, Charles M., John T. Poirier, Lauren Averett Byers, Caroline Dive, Afshin Dowlati, Julie George, John V. Heymach, Jane E. Johnson, Jonathan M. Lehman, David MacPherson, Pierre P. Massion, John D. Minna, Trudy G. Oliver, Vito Quaranta, Julien Sage, Roman K. Thomas, Christopher R. Vakoc, ve Adi F. Gazdar. 2019. "Molecular Subtypes of Small Cell Lung Cancer: A Synthesis of Human and Mouse Model Data". *Nature Reviews. Cancer* 19(5):289–97.
- Saigusa, Susumu, Koji Tanaka, Yuji Toiyama, Takeshi Yokoe, Yoshinaga Okugawa, Yasuhiro Ioue, Chikao Miki, ve Masato Kusunoki. 2009. "Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in Rectal Cancer and Their Association with Distant Recurrence After Chemoradiotherapy". *Annals of Surgical Oncology* 16(12):3488–98.
- Salcido, C. D., A. Larochelle, B. J. Taylor, C. E. Dunbar, ve L. Varticovski. 2010. "Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer". *British Journal of Cancer* 102(11):1636–44.
- Sampson, Valerie B., Justin M. David, Isabel Puig, Pratima U. Patil, Antonio García de Herreros, George V. Thomas, ve Ayyappan K. Rajasekaran. 2014. "Wilms' Tumor Protein Induces an Epithelial-Mesenchymal Hybrid Differentiation State in Clear Cell Renal Cell Carcinoma". *PLOS ONE* 9(7):e102041.
- Schaffer, Bethany E., Kwon-Sik Park, Gloria Yiu, Jamie F. Conklin, Chenwei Lin, Deborah L. Burkhardt, Anthony N. Karnezis, E. Alejandro Sweet-Cordero, ve Julien Sage. 2010. "Loss of P130 Accelerates Tumor Development in a Mouse Model for Human Small-Cell Lung Carcinoma". *Cancer Research* 70(10):3877–83.
- Scheel, Christina ve Robert A. Weinberg. 2012. "Cancer Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition: Concepts and Molecular Links". *Seminars in Cancer Biology* 22(5–6):396–403.
- Schiemann, William P., Gerard C. Blobe, Dario E. Kalume, Akhilesh Pandey, ve Harvey F. Lodish. 2002. "Context-specific effects of Fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor- β and affects protein kinase cascades". *Journal of Biological Chemistry*

277(30):27367–77.

- Schliekelman, Mark J., Ayumu Taguchi, Jun Zhu, Xudong Dai, Jaime Rodriguez, Muge Celiktas, Qing Zhang, Alice Chin, Chee Hong Wong, Hong Wang, Lisa McFerrin, Suhaida A. Selamat, Chenchen Yang, Evan M. Kroh, Kavita S. Garg, Carmen Behrens, Adi F. Gazdar, Ite A. Laird-Offringa, Muneesh Tewari, Ignacio I. Wistuba, Jean P. Thiery, ve Samir M. Hanash. 2015. “Molecular portraits of epithelial, mesenchymal, and hybrid states in lung adenocarcinoma and their relevance to survival”. *Cancer Research* 75(9):1789–1800.
- Sequist, Lecia V, Belinda A. Waltman, Dora Dias-Santagata, Subba Digumarthy, Alexa B. Turke, Panos Fidias, Kristin Bergethon, Alice T. Shaw, Scott Gettinger, Arjola K. Cosper, Sara Akhavanfard, Rebecca S. Heist, Jennifer Temel, James G. Christensen, John C. Wain, Thomas J. Lynch, Kathy Vernovsky, Eugene J. Mark, Michael Lanuti, A. John Iafrate, Mari Mino-Kenudson, ve Jeffrey A. Engelman. 2011. “Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors”. *Science Translational Medicine* 3(75):75ra26-75ra26.
- Shi, Yafei, Min Qiu, Yanyan Wu, ve Lu Hai. 2015. “MiR-548-3p functions as an anti-oncogenic regulator in breast cancer”. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 75:111–16.
- Shi, Yuankai, Puyuan Xing, Yun Fan, Xin Zhang, Chengping Hu, Caixia Wang, Xiaoqing Liu, Xiaoxia Chen, Jianying Zhou, Mengzhao Wang, Meina Wu, Baohui Han, ve Min Fan. 2015. “Current Small Cell Lung Cancer Treatment in China”. *Thoracic Cancer* 6(3):233–38.
- Shibata, Tatsuhiro, Akiko Kokubu, Koji Tsuta, ve Setsuo Hirohashi. 2009. “Oncogenic mutation of PIK3CA in small cell lung carcinoma: A potential therapeutic target pathway for chemotherapy-resistant lung cancer”. *Cancer Letters* 283(2):203–11.
- Shivapurkar, Narayan, Arvind K. Virmani, Ignacio I. Wistuba, Sara Milchgrub, Bruce Mackay, John D. Minna, ve Adi F. Gazdar. 1999. “Advances in Brief Deletions of Chromosome 4 at Multiple Sites Are Frequent in Malignant Mesothelioma and Small Cell Lung Carcinoma 1”. 5(January):17–23.
- Sholl, Lynette M., Justine A. Barletta, Beow Y. Yeap, Lucian R. Chirieac, ve Jason L. Hornick. 2010. “Sox2 Protein Expression Is an Independent Poor Prognostic Indicator in Stage I Lung Adenocarcinoma”. *The American Journal of Surgical Pathology* 34(8):1193–98.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, ve Ahmedin Jemal. 2016. “Cancer statistics, 2016”. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66(1):7–30.
- Sohal, Sukhwinder, Amir Soltani, Steve Weston, Richard Wood-Baker, ve Haydn Walters. 2013. “Intermediate filament vimentin and potential role in epithelial

mesenchymal transition (EMT)". Ss. 37–62 içinde *Vimentin concepts and molecular mechanisms*.

- Somarelli, Jason A., Mary Keara Boss, Jonathan I. Epstein, Andrew J. Armstrong, ve Mariano A. Garcia-Blanco. 2015. "Carcinosarcomas: Tumors in transition?" *Histology and Histopathology* 30(6):673–87.
- Sos, Martin L., Felix Dietlein, Martin Peifer, Jakob Schöttle, Hyatt Balke-Want, Christian Müller, Mirjam Koker, André Richters, Stefanie Heynck, Florian Malchers, Johannes M. Heuckmann, Danila Seidel, Patrick A. Eyers, Roland T. Ullrich, Andrey P. Antonchick, Viktor V Vintonyak, Peter M. Schneider, Takashi Ninomiya, Herbert Waldmann, Reinhard Büttner, Daniel Rauh, Lukas C. Heukamp, ve Roman K. Thomas. 2012. "A Framework for Identification of Actionable Cancer Genome Dependencies in Small Cell Lung Cancer". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(42):17034–39.
- Sousa, Vitor, Diana Reis, Maria Silva, Ana Maria Alarcão, Ana Filipa Ladeirinha, Maria João d'Aguiar, Teresa Ferreira, Sandra Caramujo-Balseiro, ve Lina Carvalho. 2016. "Amplification of FGFR1 Gene and Expression of FGFR1 Protein Is Found in Different Histological Types of Lung Carcinoma". *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 469(2):173–82.
- Stamenkovic, Ivan. 2000. "Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis". *Seminars in Cancer Biology* 10(6):415–33.
- Strauss, Robert, Zong-Yi Li, Ying Liu, Ines Beyer, Jonas Persson, Pavel Sova, Thomas Möller, Sari Pesonen, Akseli Hemminki, Petra Hamerlik, Charles Drescher, Nicole Urban, Jiri Bartek, ve André Lieber. 2011. "Analysis of Epithelial and Mesenchymal Markers in Ovarian Cancer Reveals Phenotypic Heterogeneity and Plasticity". *PLoS One* 6(1):e16186–e16186.
- Strauss, Robert, Pavel Sova, Ying Liu, Zong Yi Li, Sebastian Tuve, David Pritchard, Paul Brinkkoetter, Thomas Möller, Oliver Wildner, Sari Pesonen, Akseli Hemminki, Nicole Urban, Charles Drescher, ve André Lieber. 2009. "Epithelial Phenotype Confers Resistance of Ovarian Cancer Cells to Oncolytic Adenoviruses". *Cancer Research* 69(12):5115 LP – 5125.
- Sugihara, Hidetaka, Takatsugu Ishimoto, Masayuki Watanabe, Hiroshi Sawayama, Masaaki Iwatsuki, Yoshifumi Baba, Yoshihiro Komohara, Motohiro Takeya, ve Hideo Baba. 2013. "Identification of miR-30e* Regulation of Bmi1 Expression Mediated by Tumor-Associated Macrophages in Gastrointestinal Cancer". *PLOS ONE* 8(11):e81839.
- Sundstrøm, Stein, Roy M. Bremnes, Stein Kaasa, Ulf Aasebø, Reidulv Hatlevoll, Ragnar Dahle, Nils Boye, Mari Wang, Tor Vigander, Jan Vilsvik, Eva Skovlund, Einar

- Hannisdal, ve Steinar Aamdal. 2002. "Cisplatin and etoposide regimen is superior to cyclophosphamide, epirubicin, and vincristine regimen in small-cell lung cancer: Results from a randomized phase III trial with 5 years' follow-up". *Journal of Clinical Oncology* 20(24):4665–72.
- Syrjänen, K. J. 1980. "Bronchial squamous cell carcinomas associated with epithelial changes identical to condylomatous lesions of the uterine cervix". *Lung* 158(1):131–42.
- Takahashi, T., M. M. Nau, I. Chiba, M. J. Birrer, R. K. Rosenberg, M. Vinocour, M. Levitt, H. Pass, A. F. Gazdar, ve J. D. Minna. 1989. "p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer". *Science* 246(4929):491 LP – 494.
- Teglund, Stephan ve Rune Toftgård. 2010. "Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1805(2):181–208.
- Terry, Stéphane, Pierre Savagner, Sandra Ortiz-Cuaran, Linda Mahjoubi, Pierre Saintigny, Jean-Paul Thiery, ve Salem Chouaib. 2017. "New Insights into the Role of EMT in Tumor Immune Escape". *Molecular Oncology* 11(7):824–46.
- The International Agency for Research on Cancer. 2004. "Pathology & Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart". *IARC/Press* 344.
- Thomas, Anish, Jih Hsiang Lee, Zied Abdullaev, Kang Seo Park, Marbin Pineda, Lola Saidkhodjaeva, Markku Miettinen, Yisong Wang, Svetlana D. Pack, ve Giuseppe Giaccone. 2014. "Characterization of fibroblast growth factor receptor 1 in small-cell lung cancer". *Journal of Thoracic Oncology* 9(4):567–71.
- Through, Cancer, Targeting Tpx, Ming Wang, Min Yang, Benyuan Deng, ve Wang E. T. Al. 2020. "miR-548a-3p Weakens the Tumorigenesis of Colon Cancer Through Targeting TPX2 1". 00(00):1–10.
- Tian, H., J. Liu, J. Chen, M. L. Gatzka, ve G. C. Blobe. 2015. "Fibulin-3 is a novel TGF- β pathway inhibitor in the breast cancer microenvironment". *Oncogene* 34(45):5635–47.
- Timpl, Rupert, Takako Sasaki, Günter Kostka, ve Mon-Li Chu. 2003. "Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(6):479–89.
- Todd, Sean, Wilbur A. Franklin, Marileila Vareila-Garcia, Timothy Kennedy, Carl E. Hilliker, Lisa Hahner, Marshall Anderson, Jonathan S. Wiest, Harry A. Drabkin, ve Robert M. Gemmill@. 1997. *Homozygous Deletions of Human Chromosome 3p in Lung Tumors*'.
- Tokuhata, G. K. ve A. M. Lilienfeld. 1963. "Familial aggregation of lung cancer among hospital patients." *Public health reports (Washington, D.C. : 1896)* 78(4):277–83.

- Tong, Godwin, Pablo Izquierdo, ve Rana Arham Raashid. 2017. "Human Induced Pluripotent Stem Cells and the Modelling of Alzheimer's Disease: The Human Brain Outside the Dish". *The Open Neurology Journal* 11:27–38.
- Travis, W. D., T. V. Colby, B. Corrin, Y. Shimosato, E. Brambilla, W. D. Travis, T. V. Colby, B. Corrin, Y. Shimosato, ve E. Brambilla. 1999. "Histological Classification of Lung and Pleural Tumours". Ss. 21–24 içinde *Histological Typing of Lung and Pleural Tumours*. Springer Berlin Heidelberg.
- Travis, William D. 2012. "Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas". *Modern Pathology* 25:18–30.
- Travis, William D., Elisabeth Brambilla, Andrew G. Nicholson, Yasushi Yatabe, John H. M. Austin, Mary Beth Beasley, Lucian R. Chirieac, Sanja Dacic, Edwina Duhig, Douglas B. Flieder, Kim Geisinger, Fred R. Hirsch, Yuichi Ishikawa, Keith M. Kerr, Masayuki Noguchi, Giuseppe Pelosi, Charles A. Powell, Ming Sound Tsao, ve Ignacio Wistuba. 2015. "The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification". *Journal of Thoracic Oncology* 10(9):1243–60.
- Travis, William D., Elisabeth Brambilla, Masayuki Noguchi, Andrew G. Nicholson, Kim R. Geisinger, Yasushi Yatabe, David G. Beer, Charles A. Powell, Gregory J. Riely, Paul E. Van Schil, Kavita Garg, John H. M. Austin, Hisao Asamura, Valerie W. Rusch, Fred R. Hirsch, Giorgio Scagliotti, Tetsuya Mitsudomi, Rudolf M. Huber, Yuichi Ishikawa, James Jett, Montserrat Sanchez-Cespedes, Jean Paul Sculier, Takashi Takahashi, Masahiro Tsuboi, Johan Vansteenkiste, Ignacio Wistuba, Pan Chyr Yang, Denise Aberle, Christian Brambilla, Douglas Flieder, Wilbur Franklin, Adi Gazdar, Michael Gould, Philip Hasleton, Douglas Henderson, Bruce Johnson, David Johnson, Keith Kerr, Keiko Kuriyama, Jin Soo Lee, Vincent A. Miller, Iver Petersen, Victor Roggli, Rafael Rosell, Nagahiro Saijo, Erik Thunnissen, Ming Tsao, ve David Yankelewitz. 2011. "International association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma". *Journal of Thoracic Oncology* 6(2):244–85.
- Travis, William D., Elisabeth Brambilla, Masayuki Noguchi, Andrew G. Nicholson, Kim Geisinger, Yasushi Yatabe, Yuichi Ishikawa, Ignacio Wistuba, Douglas B. Flieder, Wilbur Franklin, Adi Gazdar, Philip S. Hasleton, Douglas W. Henderson, Keith M. Kerr, Iver Petersen, Victor Roggli, Erik Thunnissen, ve Ming Tsao. 2013. "Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European

- respiratory society classification". *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 137(5):668–84.
- Travis, William D., Natasha Rekhtman, Gregory J. Riley, Kim R. Geisinger, Hisao Asamura, Elisabeth Brambilla, Kavita Garg, Fred R. Hirsch, Masayuki Noguchi, Charles A. Powell, Valerie W. Rusch, Giorgio Scagliotti, ve Yasushi Yatabe. 2010. "Pathologic Diagnosis of Advanced Lung Cancer Based on Small Biopsies and Cytology: A Paradigm Shift". *Journal of Thoracic Oncology* 5(4):411–14.
- de Vega, S., T. Iwamoto, ve Y. Yamada. 2009. "Fibulins: Multiple roles in matrix structures and tissue functions". *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(11–12):1890–1902.
- De Vega, Susana, Tsutomu Iwamoto, Takashi Nakamura, Kentaro Hozumi, Dianalee A. McKnight, Larry W. Fisher, Satoshi Fukumoto, ve Yoshihiko Yamada. 2007. "TM14 is a new member of the fibulin family (fibulin-7) that interacts with extracellular matrix molecules and is active for cell binding". *Journal of Biological Chemistry* 282(42):30878–88.
- Vestergaard, Janni, Mikkel W. Pedersen, Nina Pedersen, Christian Ensinger, Zeynep Tümer, Niels Tommerup, Hans Skovgaard Poulsen, ve Lars Allan Larsen. 2006. "Hedgehog signaling in small-cell lung cancer: Frequent in vivo but a rare event in vitro". *Lung Cancer* 52(3):281–90.
- Wang, Kaixuan, Wenxiang Ji, Yongfeng Yu, Ziming Li, Xiaomin Niu, Weiliang Xia, ve Shun Lu. 2018. "FGFR1-ERK1/2-SOX2 axis promotes cell proliferation, epithelial–mesenchymal transition, and metastasis in FGFR1-amplified lung cancer". *Oncogene* 37(39):5340–54.
- Wang, Meilin, Hongliang Liu, Zhensheng Liu, Xiaohua Yi, Heike Bickeboller, Rayjean J. Hung, Paul Brennan, Maria Teresa Landi, Neil Caporaso, David C. Christiani, Jennifer Anne Doherty, ve Qingyi Wei. 2016. "Genetic variant in DNA repair gene GTF2H4 is associated with lung cancer risk: a large-scale analysis of six published GWAS datasets in the TRICL consortium". *Carcinogenesis* 37(9):888–96.
- Wang, Songgang, Dong Zhang, Shasha Han, Peng Gao, Changying Liu, Jianmin Li, ve Xin Pan. 2017. "Fibulin-3 promotes osteosarcoma invasion and metastasis by inducing epithelial to mesenchymal transition and activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway". *Scientific Reports* 7(1):1–17.
- Wang, Tianzhen, Guangyu Wang, Dapeng Hao, Xi Liu, Dong Wang, Ning Ning, ve Xiaobo Li. 2015. "Aberrant Regulation of the LIN28A/LIN28B and Let-7 Loop in Human Malignant Tumors and Its Effects on the Hallmarks of Cancer". *Molecular Cancer* 14:125.
- Wang, Yufei, Peter Broderick, Emily Webb, Xifeng Wu, Jayaram Vijaykrishnan, Athena

- Matakidou, Mobshra Qureshi, Qiong Dong, Xiangjun Gu, Wei Vivien Chen, Margaret R. Spitz, Timothy Eisen, Christopher I. Amos, ve Richard S. Houlston. 2008. "Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk". *Nature Genetics* 40(12):1407–9.
- Wang, Zhenlin, Xingfu Wu, Xiangwei Hou, Wenqiu Zhao, Cheng Yang, Wei Wan, ve Lixia Chen. 2020. "miR-548b-3p functions as a tumor suppressor in lung cancer". *Lasers in Medical Science* 35(4):833–39.
- Wang, Zhuo, Chuang Jie Cao, Lei Lei Huang, Zun Fu Ke, Can Jiao Luo, Zhong Wei Lin, Fen Wang, Yuan Qi Zhang, ve Lian Tang Wang. 2015. "EFEMP1 promotes the migration and invasion of osteosarcoma via MMP-2 with induction by AEG-1 via NF- κ B signaling pathway". *Oncotarget* 6(16):14191–208.
- Watkins, D. Neil, David M. Berman, Scott G. Burkholder, Baolin Wang, Philip A. Beachy, ve Stephen B. Baylin. 2003. "Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer". *Nature* 422(6929):313–17.
- Wilbertz, Theresia, Patrick Wagner, Karen Petersen, Ann-Cathrin Stiedl, Veit J. Scheble, Sebastian Maier, Markus Reischl, Ralf Mikut, Nasser K. Altorki, Holger Moch, Falko Fend, Annette Staebler, Adam J. Bass, Matthew Meyerson, Mark A. Rubin, Alex Soltermann, Claudia Lengerke, ve Sven Perner. 2011. "SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer". *Modern Pathology* 24(7):944–53.
- Willett, W. C. ve D. Trichopoulos. 1996. "Nutrition and cancer: A summary of the evidence". *Cancer Causes and Control* 7(1):178–80.
- Xiang, R., D. Liao, T. Cheng, H. Zhou, Q. Shi, T. S. Chuang, D. Markowitz, R. A. Reisfeld, ve Y. Luo. 2011. "Downregulation of Transcription Factor SOX2 in Cancer Stem Cells Suppresses Growth and Metastasis of Lung Cancer". *British Journal of Cancer* 104(9):1410–17.
- Xie, Mingxuan, Qiong Chen, Shuya He, Baoshun Li, ve Chengping Hu. 2011. "Silencing of the human TERT gene by RNAi inhibits A549 lung adenocarcinoma cell growth in vitro and in vivo". *Oncology Reports* 26(4):1019–27.
- Xu, Shun, Yong Yang, Yan Bin Sun, Hao You Wang, Chang Bo Sun, ve Xin Zhang. 2014. "Role of fibulin-3 in lung cancer: In vivo and in vitro analyses". *Oncology Reports* 31(1):79–86.
- Xue, Jiaping, Suping Yang, ve Seyha Seng. 2014. "Mechanisms of cancer induction by tobacco-specific NNK and NNN". *Cancers* 6(2):1138–56.
- Yabuuchi, Yohei, Masaki Tanaka, ve Hiroyuki Ono. 2018. "Carcinosarcoma of the esophagus with rapid morphological change". *American Journal of Gastroenterology* 113(5):642.

- Yan, Xiaohong, Hui Yu, Yao Liu, Jie Hou, Qiao Yang, ve Yanning Zhao. 2019. "miR-27a-3p Functions as a Tumor Suppressor and Regulates Non-Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation via Targeting HOXB8". *Technology in cancer research & treatment* 18.
- Yokota, Jun, Kouya Shiraishi, ve Takashi Kohno. 2010. "Genetic Basis for Susceptibility to Lung Cancer. Recent Progress and Future Directions". Ss. 51–72 içinde *Advances in Cancer Research*. C. 109. Academic Press Inc.
- Yu, Helena A., Maria E. Arcila, Natasha Rekhtman, Camelia S. Sima, Maureen F. Zakowski, William Pao, Mark G. Kris, Vincent A. Miller, Marc Ladanyi, ve Gregory J. Riely. 2013. "Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers". *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19(8):2240–47.
- Yu, Na, Xinming Su, Zanfeng Wang, Bing Dai, ve Jian Kang. 2015. "Association of dietary vitamin A and β -carotene intake with the risk of lung cancer: A Meta-analysis of 19 publications". *Nutrients* 7(11):9309–24.
- Yun, Cai-Hong, Kristen E. Mengwasser, Angela V Toms, Michele S. Woo, Heidi Greulich, Kwok-Kin Wong, Matthew Meyerson, ve Michael J. Eck. 2008. "The T790M Mutation in EGFR Kinase Causes Drug Resistance by Increasing the Affinity for ATP". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(6):2070–75.
- Zakowski, Maureen F., Marc Ladanyi, ve Mark G. Kris. 2006. "EGFR Mutations in Small-Cell Lung Cancers in Patients Who Have Never Smoked". *New England Journal of Medicine* 355(2):213–15.
- Zhang, Liping, Hui Yu, Andrzej Badzio, Theresa A. Boyle, Hans Ulrich Schildhaus, Xian Lu, Rafal Dziadziuszko, Jacek Jassem, Marileila Varella-Garcia, Lynn E. Heasley, Ashley A. Kowalewski, Kim Ellison, Gang Chen, Caicun Zhou, ve Fred R. Hirsch. 2015. "Fibroblast growth factor receptor 1 and related ligands in small-cell lung cancer". *Journal of Thoracic Oncology* 10(7):1083–90.
- Zhang, Z., Y. Zhou, H. Qian, G. Shao, X. Lu, Q. Chen, X. Sun, D. Chen, R. Yin, H. Zhu, Q. Shao, ve W. Xu. 2013. "Stemness and inducing differentiation of small cell lung cancer NCI-H446 cells". *Cell Death & Disease* 4(5):e633–e633.
- Zhao, Honglin, Dian Ren, Hongyu Liu, ve Jun Chen. 2018. "Comparison and discussion of the treatment guidelines for small cell lung cancer". *Thoracic cancer* 9(7):769–774.
- Zhi, Xiu-Yi, Jin-Ming Yu, ve Yuan-Kai Shi. 2015. "Chinese guidelines on the diagnosis and treatment of primary lung cancer (2015 version)". *Cancer* 121(S17):3165–81.

- Ziegler, Annemarie, Gerd H. Luedke, Dorian Fabbro, Karl-heinz Altmann, Rolf A. Stahel, ve Uwe Zangemeister-wittke. 2009. "Induction of Apoptosis in Small-Cell Lung Cancer".
- Zugazagoitia, Jon, Sonia Molina-Pinel, Fernando Lopez-Rios, ve Luis Paz-Ares. 2017. "Biological therapies in nonsmall cell lung cancer". *European Respiratory Journal* 49(3).

8. ÖZGEÇMİŞ

Ege Rıza KARAGÜR 1987 yılında Uşak'ta doğdu. İlkokulu Akdoğan İlköğretim okulu (KIBRIS) ve Mehmet Akif Ersoy İlköğretim okulunda (Ankara), ortaokulu Ali Emiri İlköğretim okulunda (Diyarbakır), lise eğitimini ise Ziya Gökalp Lisesinde (Diyarbakır) başladı ve İbni Sina (Gaziantep) Lisesinde tamamladı. 2006 yılında eğitime başladığı Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2011 yılında tamamladı. Üniversite lisans eğitiminin ardından 2012-2014 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak, 2015 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı.

9. EKLER

Ek-1

Author's personal copy

Molecular Biology Reports
https://doi.org/10.1007/s11033-020-05505-4

ORIGINAL ARTICLE

**Adipose derived mesenchymal stem cell treatment in experimental asherman syndrome induced rats**Nazlı Çil¹ · Mutlu Yaka¹ · Murat Serkant Ünal¹ · Yavuz Dodurga² · Semih Tan¹ · Mücahit Seçme² · Ege Rıza Karagür³ · Gülçin Abban Mete¹Received: 27 February 2020 / Accepted: 6 May 2020
© Springer Nature B.V. 2020**Abstract**

Asherman syndrome (AS) occurs due to fibrosis or uterine adhesions as a result of damage to the basal layer of the endometrium. The aim of this study is investigating the effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (ADMSC) application on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF-1), miRNA-98, miRNA199a in endometrial tissue in rats with AS. Study groups were designed as, control (C), Asherman syndrome (AS), AS + oral estrogen (ASO), AS + ADMSC (ASSC), AS + oral estrogen + ADMSC (ASSCO) with 7 samples in each group. Characterization and differentiation experiments were performed in ADMSC obtained. Two weeks after the development of the AS, ADMSC therapy was applied. BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) labeling was performed to show the presence of ADMSC in the tissues. Rats were sacrificed after 8 weeks and bilateral uterine horn resection was performed. Tissues were fixed in formaldehyde. After routine tissue follow-up, sections were taken and evaluated with hematoxylin eosin staining. VEGF1 and IGF1 expressions were evaluated by immunohistochemical staining and western blot analysis. Expression changes of miR-98 and miR-199a were detected by RT-PCR. Our results showed that stem cells and estrogen giving together reduced inflammation and fibrosis in the endometrium. Immunohistochemistry and western blot results suggested that this effect was achieved especially through IGF-1. In our study, decreased miR-98 and miR-199a expressions were determined in Asherman syndrome. Furthermore, no changes of miRNA expressions were observed in treatment groups.

Keywords Asherman syndrome · Mesenchymal stem cells · VEGF · IGF-1 · miR-98 · miR-199a**Abbreviations**

AS	Asherman syndrome	PBS	Phosphate-buffered saline
ADMSC	Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell	HG-DMEM	High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium
VEGF	Vascular endothelial growth factor	FBS	Fetal bovine serum
IGF-1	Insulin-like growth factor	KÖGEM	Kocaeli University stem cell and gene therapy research and application centre
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine	HCl	Hydrochloric acid
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction	HRP-SA	Horse radish peroxidase conjugate streptavidin
BM-MSC	Bone marrow-mesenchymal stem cell	H SCORE	Histological Score
miRNA	MicroRNA	GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
		HRT	Hormone replacement therapy
		hAEC	Human amniotic epithelial cell

✉ Nazlı Çil
ncil@pau.edu.tr¹ Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Pamukkale University, Pamukkale, Denizli, Turkey² Department of Medical Biology, School of Medicine, Pamukkale University, Pamukkale, Denizli, Turkey³ Department of Medical Genetics, School of Medicine, Pamukkale University, Pamukkale, Denizli, Turkey**Introduction**

Asherman syndrome (AS) occurs due to fibrosis or uterine adhesions as a result of damage to the basal layer of the endometrium. This disease is often associated with

Chemical Papers (2020) 74:2883–2892
<https://doi.org/10.1007/s11696-020-01129-x>

ORIGINAL PAPER



Novel ruthenium and palladium complexes as potential anticancer molecules on SCLC and NSCLC cell lines

Onur Tokgun¹ · Duygu Elma Karakas² · Semih Tan³ · Ege Rıza Karagür¹ · Behcet İnal⁴ · Hakan Akca¹ · Feyyaz Durap⁵ · Akin Baysal⁵ · Murat Aydemir⁵

Received: 1 October 2019 / Accepted: 5 March 2020 / Published online: 10 March 2020
 © Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences 2020

Abstract

Lung cancer is one of the major causes of cancer-related deaths in the world. Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer, and small-cell lung cancer (SCLC) is the most aggressive subtype of lung cancer. Proper therapies for SCLC have not yet been developed. However, new molecules have been designed and big innovation in treating SCLC has been achieved. Platinum-based antitumor drugs like cisplatin and carboplatin have several disadvantages including side effects, cisplatin-resistant tumors and limited solubility in aqueous media. Thus, two novel chiral aminoalcohol-based bis(phosphinite) ligands containing (η^6 -p-cymene)-Ru(II)-phosphinite and bis(phosphinite)-Pd(II) complexes were synthesized and evaluated for anticancer activity. In this study, the results showed that complex **1** has the strongest cytotoxic effects on SCLC and NSCLC cell lines. On the other hand, cisplatin, ruthenium and palladium complexes are capable to induce apoptosis. Especially, complexes **1** and **2** can induce apoptosis for both SCLC and NSCLC. When compared to the qRT-PCR and TUNEL results, we obtained a significant correlation between apoptotic index and p21, Bax gene expressions. This work revealed the potential of the synthesized complexes as anticancer agents with cytotoxic and pro-apoptotic activity as leading compounds for further anticancer researches.

Keywords SCLC · NSCLC · Phosphinite · Palladium · Ruthenium · p21 · Bax

Introduction

Transition metal complexes may play a variety of important roles in many biological processes (Patel et al. 2013) such as cell division and gene expression, as well as carcinogenesis (Heydari et al. 2017). Among the synthesized compounds, organometallic- and inorganic-based compounds are very useful molecules. Organophosphorus compounds, especially phosphines (Gümgüm et al. 2007; Durap et al. 2008), aminophosphines (Gümgüm et al. 2006; Biricik et al. 2007a), phosphinites (Karakas et al. 2018; Al-Bayati et al. 2018), etc., are excellent versatile organometallic ligands that are easily prepared and form a variety of complexes with various transition metals including platinum (Durap et al. 2008), ruthenium (Karakas et al. 2018; Ok et al. 2014), palladium (Deepthi et al. 2012; Karakas et al. 2016), gold (Lazarevic et al. 2017) and copper (Biricik et al. 2007b) metal centers. In the literature, most studies showed that organometallic and inorganic compounds have potential anticancer effects (Mjos and Orvig 2014; Demkowicz et al. 2016; Wani et al.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11696-020-01129-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Onur Tokgun
 otokgun@pau.edu.tr

- ¹ Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Pamukkale University, 20160 Denizli, Turkey
- ² Science and Technology Application and Research Center, Siirt University, 56100 Siirt, Turkey
- ³ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Pamukkale University, 20160 Denizli, Turkey
- ⁴ Department of Agricultural Biotechnology, Agriculture Faculty, Siirt University, 56100 Siirt, Turkey
- ⁵ Department of Chemistry, Science Faculty, Dicle University, 21280 Diyarbakir, Turkey

THE FREQUENCY OF EGFR AND KRAS MUTATIONS IN THE TURKISH POPULATION WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER AND THEIR RESPONSE TO ERLOTINIB THERAPY

Demiray A^{1,4}, Yaren A², Karagöç N¹, Bir F³, Demiray AG², Karagür ER¹, Tokgün O¹, Elmas L¹, Akça H^{1,4}

#<https://orcid.org/0000-0002-3343-0184>.

*Corresponding Author: Professor Dr. Hakan Akça, Cancer Research Center, Pamukkale University, 11 University Street, Denizli Turkey. E-mail: hakca@pau.edu.tr (primary), hakanakca@yahoo.com

ABSTRACT

In this study, profiles of epidermal growth factor receptor (EGFR) and Kirsten ras sarcoma (KRAS) mutations and response to erlotinib therapy have been investigated in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). DNA from 300 patients with NSCLC was extracted from parafin-embedded tissues. After the extracted DNA was sequenced by pyrosequencing method, a total of 97 (32.0%) patients out of 300 were detected to carry an EGFR mutation and 75 (25.0%) patients out of 300 carried a KRAS mutation; 20 (6.6%) patients were detected to carry both of EGFR and KRAS mutations. The EGFR mutations were found to be statistically significant in female patients (48.0 women vs. 28.0% men, non smokers (49.0 vs. 26.0%) and adenocarcinoma (37.8 vs. squamous 26.8%). The overall rate of survival in patients receiving erlotinib therapy than in patients who did not. In patients without the KRAS mutation, the median overall survival rate was 161 ± 30 weeks with erlotinib therapy and 90 ± 13 weeks in patients without erlotinib therapy. In patients having KRAS mutation, the median overall survival was 98 ± 16 weeks with erlotinib therapy and 34 ± 16 weeks with no erlotinib therapy. In our study, we once again demonstrated that the presence of these mutations affected response to erlotinib therapy. The KRAS mutations negatively affected survival rate with and without erlotinib therapy.

Keywords: Erlotinib therapy; Epidermal growth factor receptor (EGFR); Kirsten ras sarcoma (KRAS); Non-small cell lung cancer (NSCLC).

¹ Medical Biology Department, Pamukkale University, Denizli, Turkey

² Medical Oncology Department, Pamukkale University, Denizli, Turkey

³ Medical Pathology Department, Pamukkale University School of Medicine, Denizli, Turkey

INTRODUCTION

Lung cancer is one of the main leading causes of cancer death, and the most common cancer after prostate and breast cancers, in respect to prevalence [1]. The 5-year overall survival is 15.0% in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) [1]. Overall survival rates increase with surgical, chemotherapy and radiotherapy treatments in early stages of the cancer [2]. Recently, immunotherapy and molecular targeted therapy have been used to treat cancer patients. Erlotinib and gefitinib, which are the inhibitors of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinases are molecular targeted agents. These agents have been used to inhibit certain EGFR tyrosine kinase mutations. Both of them can pass through the phospholipid membrane into the cell, and these agents compete with adenosine triphosphate (ATP) to bind the ATP binding pocket of EGFR. The EGFR, a transmembrane glycoprotein of 170 kDa consisting 1186 amino acids, is localized in the 7q12 chromosome region. It is known that the EGFR receptor has mutations in the tyrosine kinase region of 18-21 exons in NSCLC cells and correlate therapy response. These EGFR mutations are more common in Asian, Caucasian and non smoking women [4]. K-ras, a downstream protein, becomes constantly active as a result of EGFR auto-phosphorylation. The Kirsten ras sarcoma (KRAS) gene belongs to *Ras* gene family and homolog of Kirsten rat sarcoma viral oncogene [5-8]. It is localized at the chromosome 12 (12q12.1) region and consists of six exons transcribed as a small guanosine triphosphatase (GTPase) consists of 21k Da and 189 amino acids [5,7]. Codons 12 and 13 have GTPase-acting proteins (GTPs) binding site in the *KRAS* gene. Codon 61 is the switch II region that regulates Ras protein. Mutations at codons 12, 13 and 61 prevent GTP hydrolysis causing K-ras protein constantly active situation. Studies have shown that NSCLC patients



Anti-invasive effect of *Cyclamen pseudibericum* extract on A549 non-small cell lung carcinoma cells via inhibition of ZEB1 mediated by miR-200c

Ege Riza Karagur¹ · Cennet Ozay² · Ramazan Mammadov² · Hakan Akca^{1,3}

Received: 4 December 2017 / Accepted: 13 March 2018 / Published online: 19 March 2018
 © The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer Japan KK, part of Springer Nature 2018

Abstract

Scientists are increasingly focusing attention on natural products of plant origin for use as agents in cancer protection and treatment. *Cyclamen* L. tuber extracts contain saponin glycosides that have been shown to have anti-cancer and other biological activities. The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is thought to enhance malignant tumour progress. The transcriptional repressor zinc-finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) is an important inducer of EMT in different human tumours and has recently been shown to boost invasion by tumour cells. In this study, we investigated the effects of endemic *Cyclamen pseudibericum* (CP) saponin-rich tuber extract on the capacity of non-small cell lung cancer line A549 cells to proliferate, invade and migrate and also examined the expression levels of several invasion–migration-related microRNAs (miRNAs) to identify those which directly targeted ZEB1. The cytotoxicity effect of the CP extract on the A549 cancer cells was determined by the luminometric method. The half-minimal (50%) inhibitory concentration dose in the A549 cells was determined to be $41.64 \pm 2.35 \mu\text{g/mL}$. Using the Matrigel invasion chamber system and the wound healing assay we observed that the CP extract suppressed the invasion and migration capacity of A549 cells, respectively. The expression of miRNAs in A549 cells was evaluated by real-time PCR. Our data showed that overexpression of miRNA miR-200c hindered the EMT by increasing the expression of E-cadherin and decreasing the expression of both N-cadherin and vimentin through the direct targeting of ZEB1. These findings suggest that the saponin-rich tuber extract of CP may have considerable anti-cancer properties in lung cancer. Further studies are required to examine in detail the molecular-based mechanism involved in the EMT process of the extract along with isolation and identification of active saponin components.

Keywords *Cyclamen pseudibericum* · Lung cancer · A549 cells · miR-200c · Invasion · EMT · ZEB1

Introduction

Lung cancer is one of the main causes of cancer-related deaths globally. Non-small cell lung carcinoma (NSCLC), which is any type of lung cancer other than small cell lung carcinoma, accounts for 85–90% of all lung cancers. The overall 5-year survival rate of patients with NSCLC is <

10–15%. Although surgical treatment is effective on early diagnosed NSCLC, most patients are diagnosed at the metastatic and/or advanced stages when surgical resection is not a treatment option [1, 2].

Natural products, especially plant derivatives, have provided some of the most significant cancer chemotherapeutics because they provide structurally complicated molecules that are hard to obtain in large quantities by total synthesis [3, 4]. Consequently, plant-derived traditional medicine systems are regaining popularity, in part due to the adverse effects of synthetic drugs [5].

The genus *Cyclamen* L. (Primulaceae) is a tuberous perennial geophyte with 12 taxa native to Turkey [6, 7]. *Cyclamen* tuber extracts have been shown to possess antimicrobial, cytotoxic, analgesic, spermicidal, anti-inflammatory and antioxidant activities [8–13]. In particular, compounds referred to as saponins, a class of secondary metabolites,

✉ Hakan Akca
 hakca@pau.edu.tr; hakanakca@yahoo.com

¹ Department of Medical Biology, School of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey

² Department of Biology, Faculty of Science and Art, Pamukkale University, Denizli, Turkey

³ Cancer Research Center, Pamukkale University, Denizli, Turkey

POTENTIAL ANTIOXIDANT, ANTIPROLIFERATIVE AND HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF *CRATAEGUS MEYERI*CENNET OZAY^{1,3}, RAMAZAN MAMMADOV¹, GULTEN TASDELEN¹, EGE RIZA KARAGUR¹ and HAKAN AKCA²¹Department of Biology, Faculty of Science and Literature, Pamukkale University, Denizli, Turkey²Department of Medical Biology, School of Medicine, Pamukkale University, Denizli 20070, Turkey³Corresponding author:

TEL: +905362827667;

FAX: +902582963535;

EMAIL: cennetozay@hotmail.com

Received for Publication February 10, 2015

Accepted for Publication May 12, 2015

doi:10.1111/jfbc.12161

ABSTRACT

In this study, the potential antioxidant, antiproliferative and hepatoprotective effects of *Crataegus meyeri* Pojark. were investigated. The antioxidant activity of the ethanolic flower extracts was evaluated by using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and β -carotene–linoleic acid assays. Total phenolic contents were also measured. The results obtained showed that *C. meyeri* can act as a high radical scavenger reaching 88.67%. *In vitro* antiproliferative activity for the same extracts was determined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay against PC3 and PC14 cells. The extracts of the plant at concentrations of 0.5, 1 and 1.25% were administered orally to the three experimental groups, including partially hepatectomized rats for 42 days. At the end of the experimental period, animals were sacrificed, and blood was collected for the assessment of serum levels of ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase) and GGT (gamma-glutamyltransferase). In biochemical assay, a significant decrease in the levels of serum ALT and AST was found in the experimental groups.

PRACTICAL APPLICATIONS

The antioxidant activity studies on *Crataegus* species have exhibited that these species possess considerable antioxidant potential because of their polyphenolic compounds such as flavonoids and procyanidines. In this study, the findings are consistent with these observations. However, our results also demonstrated that *C. meyeri* exerts a protective effect against partial hepatectomy-induced liver injury in rats and could provide a new potential approach to inhibit the proliferation of human non-small cell lung cancer cells.

INTRODUCTION

Hawthorn (*Crataegus* spp.), belonging to the Rosaceae family, consists of small trees and shrubs, native to Northern temperate region of the world with approximately 280 species (Donmez 2004). *Crataegus* species are medicinal plants, which have flavonoids, triterpene acids, proanthocyanidins and organic acids as the main components. The medicinal use of extracts or tinctures prepared from the leaves, flowers and/or fruits of the plant species from the genus *Crataegus* dates back to the ancient times (Baharun *et al.* 2003). The drug from flowers has antispasmodic, hypotensive, cardiotoxic, diuretic and nervine-sedative properties. It dilates coronary vessels and improves

blood supply to the heart (Verma *et al.* 2007). In the past decade, there has been a great deal of interest in the use of medicinal plants for the treatment of diseases. Many studies have focused on the therapeutic properties of medicinal plants, such as hepatoprotective, antioxidative and antimicrobial activities (Janovská *et al.* 2003; Rusu *et al.* 2005).

Furthermore, many scientific studies have been extensively carried out by using medicinal plants in liver damages (Dahiru *et al.* 2005; Rusu *et al.* 2005; Aliyu *et al.* 2007). Liver can rapidly regenerate itself after acute liver injury, chronic hepatic diseases, liver transplantation and partial hepatectomy. Some studies have reported on different effectiveness of *Crataegus* spp., such as antioxidant, antiinflammatory and anticarcinogenic effects (Ahumada *et al.* 1997;

SILICA NANOPARTICLES CAN INDUCE APOPTOSIS VIA DEAD RECEPTOR AND CASPASE 8 PATHWAY ON A549 CELLS

Onur Tokgun¹, Aydın Demiray¹, Bülent Kaya²,
Ege Rıza Karagür¹, Eşref Demir², Esin Burunkaya³ and Hakan Akça^{1*}

¹Medical Biology Department, School of Medicine, Pamukkale University, Kinikli, Denizli, Turkey

²Akdeniz University, Faculty of Sciences, Department of Biology, 07058 Antalya, Turkey

³Akdeniz University, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, 07058 Antalya, Turkey

ABSTRACT

Synthetic amorphous silica (SAS) is an important material that is widely used in different applications, such as medicine and industry. Although SAS is generally regarded as potential toxic, the cytotoxicity, pathogenicity and carcinogenicity of SAS nanoparticles have been recently investigated. In this study, we aim to investigate the ability of induction of cytotoxicity and apoptosis by SAS NPs on human NSCLC cell line A549 with potential mechanisms. SAS NPs (6, 15, 30 nm size; concentration ranges 0.1, 10, 250, 500 and 1000g/ml) have ability to induce cytotoxicity on A549 cell line. Among 6, 15, 30 nm size of SAS NPs, only 6 nm SAS NP has the ability to induce strong cellular cytotoxicity and induction of apoptosis on A549 cells. qRT-PCR results showed that 6 nm-sized SAS NP treatment also induces the expression levels of FADD, TNFR, BID and Caspase 8, and mRNAs. In conclusion, this study demonstrates that among 6, 15 and 30 nm size of SAS NPs, only 6 nm-sized SAS NP has strong cytotoxic effects on A549 cells, and this cytotoxicity comes from dead receptor-mediated induction of apoptosis on A549 cells.

KEYWORDS:

NSCLC, Synthetic amorphous silica (SAS), Apoptosis, terminal transferase dUTP nick end-labeling (TUNEL), Caspase

1. INTRODUCTION

Nanotechnology originates from the Greek word meaning "dwarf". A nanometer is one billionth (10^{-9}) of a m, which is tiny, and only the length of 10 hydrogen atoms. Nanoscience and nanotechnology are the study and application of extremely small things, and can be used across all the other scientific fields, such as chemistry, biology, physics, materials science, and engineering.

Nanotechnology industry is rapidly growing because of the physical and chemical properties of nanomaterials. The size of nanoparticles (NPs) is between 1-100 nm. The ultra-small size and unique properties of nanomaterials have led to increasing concerns about their potential toxicity. The NPs can easily pass some biological barriers according to their dimensions. Little is known about the cytotoxicity mechanisms of NPs.

Nanoparticles (NPs) are used in different applications including targeted drug delivery systems [1, 2], rapid diagnostics [3, 4] and biomolecular sensing [5], antimicrobial agents [6], stain-resistant clothing [7], and fluorescent labels [8], such as nanoparticle-based cancer therapeutics [9].

Even though studies have demonstrated that cancer cells and epithelial cells are capable of taking up nanoparticles [10, 11], the mechanism for the biological responses to NPs are still not well understood. To understand the transmigration of NPs into cells could enable the control over cellular uptake, and to predict the possible toxic effects. Some reports have shown that NPs are taken up by cells via non-endocytic pathways [12], and model membranes have indicated possible mechanisms for non-endocytic uptake [13].

Nano-materials have important roles on apoptosis by inducing apoptotic pathways [14]. Apoptosis is termed as a form of cellular suicide, and it has two pathways (extrinsic and intrinsic ones). Extrinsic pathway-mediated induction of apoptosis is caspase-dependent and stimulated by extracellular stress signals, which are sensed and propagated by specific transmembrane receptors. Intrinsic pathway-mediated induction of apoptosis needs some intracellular stress conditions like DNA damage, oxidative stress, etc. [15]. The size of NPs is very important on cellular damages, and the small-sized NPs are more effective to enter the cells than the large-sized ones [16].

SAS NPs are suitable materials for biomedical applications. They have been used in cancer therapy, DNA/drug delivery and enzyme immobilization research studies [17-20]. SAS NPs can induce reactive oxygen species genera-

RESEARCH ARTICLE

Cyclamen Exerts Cytotoxicity in Solid Tumor Cell Lines: a Step Toward New Anticancer Agents?**Mustafa Yildiz^{1*}, Hakan Bozcuk², Onur Tokgun³, Ege Riza Karagur⁴, Oktay Akyurt⁵, Hakan Akca³****Abstract**

Cyclamen coum is a traditional medicinal plant in the Turkey. Its anticancer properties and whether cyclamen extract induces any cytotoxicity in solid cancer cell lines have not been thoroughly investigated previously. Therefore we examined cytotoxic effects on cervical cells; HeLa and non small cell lung cancer cell, H1299, lines; Cyclamen extract induced cellular death of both HeLa and H1299 cells in a dose dependent manner. We also analyzed the capacity of cyclamen extract to induce apoptosis by the TUNEL method. Here, for the first time we report that the extract of Cyclamen coum, an endemic plant for Turkey, Bulgaria, Georgia and the Middle East can induce cytotoxicity via apoptosis in HeLa and H1299 cells. These results imply that cyclamen extract can be further analyzed to potentially find novel anticancer compounds.

Keywords: Cyclamen coum - HeLa - H1299 - cytotoxicity - apoptosis

Asian Pac J Cancer Prev, 14 (10), 5911-5913

Introduction

Over the past few years, cancer has remained a major cause of death and the number of individuals affected with cancer is continuing to expand (Chaoki et al., 2010). Hence, a major portion of the current pharmacological research is devoted to anticancer drug design customized to fit new molecular targets (Xia et al., 2004). Due to enormous propensity of plants, which synthesize a variety of structurally diverse bioactive compounds, the plant kingdom is a potential source of chemical constituents with antitumor and cytotoxic activities (Kim et al., 2005; Chin et al., 2006). The rich and diverse plant sources of Turkey are likely to provide effective anticancer agents (Ozmen et al., 2009; 2010).

Cyclamen coum is found in the mountains and coastal areas that border the southern and eastern Black Sea coasts from Bulgaria in the west through Georgia and the Crimea in the east. It is also found in the Elburz Mountains of northern Iran. It extends from the Hatay in southern Turkey, down the eastern Mediterranean coast through Syria and the Lebanon into Israel. It grows in shady places in coniferous and broadleaved woodland and scrub, sometimes growing amongst tree roots and rocks (Yesson et al., 2006; Grey-Wilson et al., 2003).

Although this plant is used for recreational purposes, its medicinal properties remain unexplored. There is a little knowledge on the anti-tumor potential of Cyclamen plant (Indop et al., 2006; Altunkeyik et al., 2012). There

is no data in the literature of the anti-tumor potential of compounds of Cyclamen coum. Therefore, the aim of this study was to investigate the potential antitumor effects of Cyclamen coum on Non Small cell lung cancer lines; (NSCLC) H1299 and cervical cancer cell lines; HeLa cells.

Materials and Methods*Preparation of the extract*

Cyclamen specimens were collected in the vicinity of Antalya province. Agriculture department was consulted to confirm the validity of specimens. The methanol and water extracts were prepared as described in the literature, in 1 to 2 ratio (weight/weight; 15g plant/60g solvent), evaporated to dryness at 65°C with a rotator evaporator and stored at -20°C, with no exposure to light until use (Grey-Wilson et al., 2003). Extracts were diluted with PBS (phosphate buffer saline) to obtain different concentrations of extracts in order to be used in the experiments.

Cell lines and culture conditions

HeLa and H1299 cells were cultured in RPMI 1640 (Sigma aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA) at 37°C in humidified incubator with 5%CO₂.

Cell proliferation assay

The medium was aspirated when cells grown to about

¹Department of Medical Oncology, Antalya Education and Research Hospital, ²Department of Medical Oncology, Akdeniz University Hospital, Antalya, ³Department of Medical Biology, ⁴Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Pamukkale University, Denizli, ⁵Plant Collector, Turkey *For correspondence: drmyildiz@yahoo.com