



**Transkripsiyonel Faktör NF-kB İçin Hedef miRNA  
Genlerinin Saptanması ve NF-kB Tarafından İndüklenen  
miRNA'ların KHDAK İnvazyonu Üzerindeki Olası Etki  
Mekanizmalarının Araştırılması**

**Program Kodu: 1001**

**Proje No: 112S636**

Proje Yürütücüsü:  
**Prof. Dr. Hakan AKÇA**

NİSAN 2016  
DENİZLİ



## ÖNSÖZ

MikroRNA'lar gen ifadesinin düzenlenmesinde oldukça önemli bir görev üstlenmektedirler. Her genin transkripsiyonu RNA Polimeraz II tarafından yapıldığından ve ökaryotik transkripsiyonda transkripsiyonel faktörlerin önemli düzenleyici görevleri bulunduğundan biz bu çalışmamızda bir transkripsiyonel olan ve KHDAK hücrelerinde invazyondan sorumlu olduğunu daha önceki çalışmalarımızda gösterdiğimiz NF-kB'nin ökaryotik miRNA genlerinin transkripsiyonunu indükleyerek KHDAK hücre invazyonunu indüklediğini göstermiş bulunuyoruz. Sağkalım oranı oldukça düşük olan KHDAK'nin tedavisinde hedef moleküller olarak kullanılacak yeni miRNA'lar bu çalışmamızda tanımlamış bulunmaktayız.



## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	iii
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	7
3.1 Hücre Kültürü .....	7
3.2 Lusiferaz deneyi.....	7
3.3 Western Blot Analizi .....	7
3.4 RNA İzolasyonu .....	8
3.5 Mikroarray Analizi .....	8
3.6 Kromozom İmmunopresipitasyon (ChIP) Sekans .....	9
3.7 Biyoenformatik Analiz .....	10
3.8 miRNA Mimik ve İnhibitör Transfeksiyonları .....	11
3.9 Hücre invazyon deneyi.....	11
3.10 Standart PCR ve qRT-PCR Analizleri .....	11
4. BULGULAR.....	13
4.1 TNF- $\alpha$ indüklü NF-kB lusiferaz aktivitesinin belirlenmesi .....	13
4.2 Hücre invazyonunun belirlenmesi .....	14
4.3 TNF- $\alpha$ , NF-kB inhibitörü BAY11-7082' nin p53, PTEN, p-AKT ve Akt ekspresyonları üzerine etkisi.....	15
4.4 TNF- $\alpha$ , NF-kB inhibitörü BAY11-7082'nin miRNA transkripsiyon seviyeleri üzerine etkileri .....	16
4.5 ChIP sekans yöntemi ile NF-kB tarafından spesifik olarak transkripsiyonu indüklenen miRNA genlerinin tespiti.....	19
4.6 Belirlenen miRNA'ların hücre invazyonuna olan etkileri.....	22
5. TARTIŞMA.....	28
Kaynaklar .....	31

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> miRNA biyogenezi .....	4
<b>Şekil 2.</b> miRNA array protokol şeması.....	9
<b>Şekil 3.</b> ChIP sekans sonuçlarının bilinen miRNA'lar ile aynı anda genom üzerindeki bağlanma bölgelerinin Integrative Genomics Viewer (IGV Tools) programında gösterimi. ....	10
<b>Şekil 4.</b> Transfeksiyon verimliliğinin GFP vektör aracılığıyla gösterilmesi. ....	14
<b>Şekil 5.</b> NF- $\kappa$ B lusiferaz aktivitesi. ....	14
<b>Şekil 6.</b> H1299, PC3 VE PC14 hücre hatlarında kontrole oranla % invazyon. ....	15
<b>Şekil 7.</b> PC3, PC14, H1299 hücrelerinde TNF- $\alpha$ , BAY11-7082 ve BAY11-7082 uygulamalarının PTEN, p-AKT ve p53 ekspresyon seviyelerine etkisi. ....	15
<b>Şekil 8.</b> miRNA array analiz sonucunda tüm dataların Hierarchical clustering analizi. ....	17
<b>Şekil 9.</b> Sonikasyon öncesi örnek (H1299,PC3,PC14) DNA'larının jel görüntüsü, sonikasyon sonrası örnek (H1299,PC3,PC14) DNA'larının jel görüntüsü.....	20
<b>Şekil 10.</b> ChIP yöntemi ile elde ettiğimiz örneklerin PCR doğrulaması sonucu agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü, aynı örneklerin Real-time PCR ile doğrulanması. ....	20
<b>Şekil 11.</b> miRNA transfeksiyon verimliliğinin saptanması. ....	22
<b>Şekil 12.</b> H1299 hücre hattında belirlenen miRNA'ların invazyona olan etkileri. ....	23
<b>Şekil 13.</b> PC3 hücre hattında belirlenen miRNA'ların invazyona olan etkileri.....	23
<b>Şekil 14.</b> PC14 hücre hattında belirlenen miRNA'ların invazyona olan etkileri.....	24
<b>Şekil 15.</b> TNF- $\alpha$ muamele edilen PC14 hücrelerinde 1., 2., 4., 8., ve 24. saatlerde miR-8078'in transkripsiyon seviyeleri. ....	24
<b>Şekil 16.</b> H1299 hücre hattında invazyonda etkili olan miRNA'ların qRT-PCR ile TNF- $\alpha$ , BAY11-7082, TNF- $\alpha$ ve BAY11-7082'nin beraber uygulandığındaki transkripsiyon seviyeleri değişimleri.....	25
<b>Şekil 17.</b> PC3 hücre hattında invazyonda etkili olan miRNA'ların qRT-PCR ile TNF- $\alpha$ , BAY11-7082, TNF- $\alpha$ ve BAY11-7082'nin beraber uygulandığındaki transkripsiyon seviyesi değişimleri .....	26
<b>Şekil 18.</b> PC14 hücre hattında invazyonda etkili olan miRNA'ların qRT-PCR ile TNF- $\alpha$ , BAY11-7082, TNF- $\alpha$ ve BAY11-7082'nin beraber uygulandığındaki transkripsiyon seviyesi değişimleri .....	27



## TABLULAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Mikroarray hibridizasyon karışımı hazırlanması.....	8
<b>Tablo 2.</b> İzole edilen miRNAların kalitesi.....	16
<b>Tablo 3.</b> H1299, PC 3 ve PC14 hücre hatlarında TNF- $\alpha$ uygulaması sonrasında ifadesi artmış iken BAY11-7082+ TNF- $\alpha$ uygulaması sonrası ifadesi düşen miRNA'ların transkripsiyon seviyeleri.....	18
<b>Tablo 4.</b> Biyoenformatik analizler sonucunda CHIP Sekans sonuçlarında belirlenen bölgelerde NF-kB bağlanma bölgesi ile alakalı olabilecek olan miRNA'lar.....	21



## ÖZET

Akciğer kanseri, tüm dünyada kanser ilişkili ölümlerde birinci sırada gelmektedir. Akciğer kanseri hastalarının ölüm sebebinin yaklaşık %90'ı metastazdan dolayıdır. İnvazyon, kanser hücrelerinin metastaz yapması için kritik ve önemli adımıdır. Önceki çalışmamızda KHDAK'de, Akt/NF-kB yolağının sürekli aktif olduğunu ve hücreyel invazyonu uyardığını ve PTEN'in bu yolağı inhibe ederek invazyonu baskıladığını göstermiştik. Bu çalışmada TNF- $\alpha$  uyarımlı NF-kB aktivasyonu ile KHDAK invazyonunu indükleyen miRNA'ları belirlemeyi amaçladık. TNF- $\alpha$  tarafından aktive edilen NF-kB aracılı miRNAların tespiti için ChIP kit (Kromozom immunipresitasyon kiti) kullanıldı. H1299, PC14, PC3 hücreleri ChIP yöntemi için TNF- $\alpha$  (30ng/ml) muamale edildiler. Kromotin örnekleri 250-500 bp fragment aralığında 3 hücre için hazırlandı. ChIP sekans ile okunan kromotin bölgeleri biyoenformatik araçlar kullanılarak analiz edildi. NF-kB ile ilişkili ve KHDAK invazyonunda potensiyel rolleri olan miRNAların bulunması için ayrıca bir bioinformatic analiz de yapılmıştır. NF-kB tarafından aktive edilip KHDAK invazyonu ile ilişkili olabilecek 16 miRNA saptandı. İlk olarak H1299, PC14 ve PC3 hücreleri bu 16 mimik miRNA ile transfekte edildi ve onların KHDAK invazyonuna etkileri invazyon chamber yöntemi ile araştırıldı. Sonuçlarımız açıkça göstermektedir ki; miR-548a-3p, miR-548as-3p, miR-8078, miR-1915, miR-6814-3p, miR-548q mimikleri H1299 hücre invazyonunu, miR-548v, miR-548h-5p, miR-138-5p, miR-548a-3p, miR-548as-3p ve miR-8078 mimikleri PC14 hücre invazyonunu, miR-138-5p, miR-1203, miR-4651 mimikleri PC3 hücre invazyonunu indüklemektedirler. Biz bu yukarıda saptadığımız invazyonu indükleyen miRNAların NF-kB tarafından düzenlendiğinden emin olmak için sonuçlarımızı RT-PCR ile doğrulamak istedik.

Sonuç olarak, miR-548q, miR-548a-3p, miR-548as-3p, miR-1915 ve miR-8078 H1299 hücrelerinde, miR-138-5p, miR-548a-3p, miR-548as-3p ve miR-8078 PC14'de, miR-1203 ise PC3 de hücre invazyonunu indüklediği ve bu miRNA genlerinin transkripsiyonlarının NF-kB tarafından pozitif yönde regüle edildiğini bulmuş olduk.

**Anahtar Kelimeler:** KHDAK, TNF- $\alpha$ , NF-kB, miRNA, ChIP.



## ABSTRACT

Lung Cancer is the leading cause of cancer related deaths in the world and approximately 90% patients with lung cancer ultimately die from metastatic disease. Metastasis is the most dangerous step of cancer. In our recently published work showed that Akt/NF- $\kappa$ B pathway is continuously active and induces cellular invasion and PTEN suppresses cellular invasion via inhibition of Akt/NF- $\kappa$ B pathway. In this study we aimed to show NF- $\kappa$ B mediated induction of miRNA expression can responsible for inducing NSCLC invasion. We used Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit for detection of TNF- $\alpha$  induced NF- $\kappa$ B mediated miRNAs. Therefore, H1299, Pc14 ve PC3 cells treated by TNF- $\alpha$ (30ng/ml) for ChIP assay. Chromatin samples prepared range from 250-500 bp fragment for three cell lines performed Chip Sequencing. Chromatin regions, reading with ChIP-Seq, were analyzed using bioinformatics tools. We performed a bioinformatics search for transcription factor binding sites in human genomic sequence. We also performed additional bioinformatics search for to find NF- $\kappa$ B related miRNAs which potentially take a role in NSCLC invasion. We find 16 miRNAs which potentially induced by NF- $\kappa$ B and NSCLC invasion related. We first transfected H1299, PC14 and PC3 cells with these 16 miRNA mimics and examined their effects on NSCLC invasion by invasion chamber method. Our results indicate that miR-548a-3p, miR-548as-3p, miR-8078, miR-1915, miR-6814-3p, miR-548q mimics can indice cellular invasion on H1299, miR-548v, miR-548h-5p, miR-138-5p, miR-548a-3p, miR-548as-3p ve miR-8078 mimics can induce cellular invasion on PC14, miR-138-5p, miR-1203, miR-4651 mimics can induce cellular invasion on PC3 cells. We also verified our results by RT-PCR because, we want to sure that there above miRNAs, which can induce invasion, can also transcriptionally regulated by NF- $\kappa$ B or not.

As a conclusion, we find that miR-548q, miR-548a-3p, miR-584as-3p, miR-1915 and miR-8078 in H1299, miR-138-5p, miR-548a-3p, miR-548as-3p and miR-8078 in PC14 and miR-1203 in PC3 can induce cellular invasion and their transcription positively regulated by NF- $\kappa$ B activity.

**Keywords:** NSCLC, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, miRNA, ChIP assay.



## 1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, kanser ilişkili ölümler arasında önde gelmektedir. Dünya genelinde akciğer kanserinde gözüken sağ kalım oranı %10-15'tir. Bunun sebebi akciğer kanseri tümörüne sahip hastalarda metastazın ve lezyonların teşhisinin geç olmasıdır. Güncel Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasına göre; akciğer kanserinin bir alt türü olarak küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK), akciğer kanseri vakalarının yaklaşık olarak %70-80'ini oluşturduğu belirtilmektedir. Kanser ilişkili ölümlerde akciğer kanserinin başta gelmesinin sebebi; akciğer kanseri vakalarının büyük çoğunluğunu oluşturan KHDAK'nin yüksek invazyon ve metastaz yapma potansiyelinden dolayı agresif bir yapıya sahip olmasındandır (Mehlen vd., 2006).

Kanser bilindiği gibi genetik altyapı ve çevresel faktörlerinde etkisiyle meydana gelmektedir. Sağlıklı bir hücrenin proto-onkogenlerinde ve/veya tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen genetik ve/veya epigenetik anormalliklerin hepsi kanserin oluşumunu tetiklemektedir. Bu değişimler neticesinde hücrede çoğalma, invaziv özellik kazanma, programlı hücre ölümünden (apoptozis) kaçış ve sağkalım özellikleri kazanmaktadır. Kanser ilişkili ölümlere bakıldığında, bunun en önemli sebebinin kanser hücrelerinin metastaz yaparak farklı doku ve organlarda yeniden bir tümör oluşturmasıdır. Metastaz oldukça karmaşık bir süreçtir. Tümörün hücrelerinin köken aldığı bölgeden EMT denilen epitel-mezenkimal geçiş gerçekleştirilerek invaziv özellik kazanıp bazal laminayı aşip damar içerisine girerek farklı doku ve organlara yayılması metastazın temel basamaklarıdır. Bu basamaklar içerisinde anahtar rolü invazyon oluşturmaktadır. İnvazyon birçok molekül tarafından düzenlenen oldukça kompleks bir mekanizmadır.

miRNA'ların birçok hücrel süreçte mRNA'ların 3'UTR lerini hedefleyerek genlerin negatif düzenleyicisi olarak rol alan önemli elemanlardır. Bugüne kadar kodlanmaya bu küçük RNA parçalarının birçok hastalık ve hücrel aktivitenin düzenlenmesinde önemli görevleri olduğu tespit edilmiş ve edilmeye devam etmektedir. miRNA'larda mRNA'lar gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri ile düzenlenirler ve transkripsiyonları RNA Polimeraz II tarafından gerçekleştirilir. Birçok kanserde ve özellikle akciğer kanserinde invazyon, sağkalım, farklılaşma, ilaca direnç, apoptozdan kaçış gibi birçok hücrel prosesin uyarılmasında anahtar role sahip NF-kB transkripsiyon faktörünün hücrel invazyonun indüklemeye mekanizmasında miRNA'larında olduğunu düşünmekteyiz. Biz de çalışmamızda, KHDAK'inde TNF- $\alpha$  ile NF-kB'nin aktivasyonu ile invazyonu indükleyen miRNA'ları tespit etmeyi amaçladık. Böylece karmaşık olan invazyon mekanizmasında öncül düzenleyici olan miRNA'larla ilişkisi aydınlatılmış olacaktır.





## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

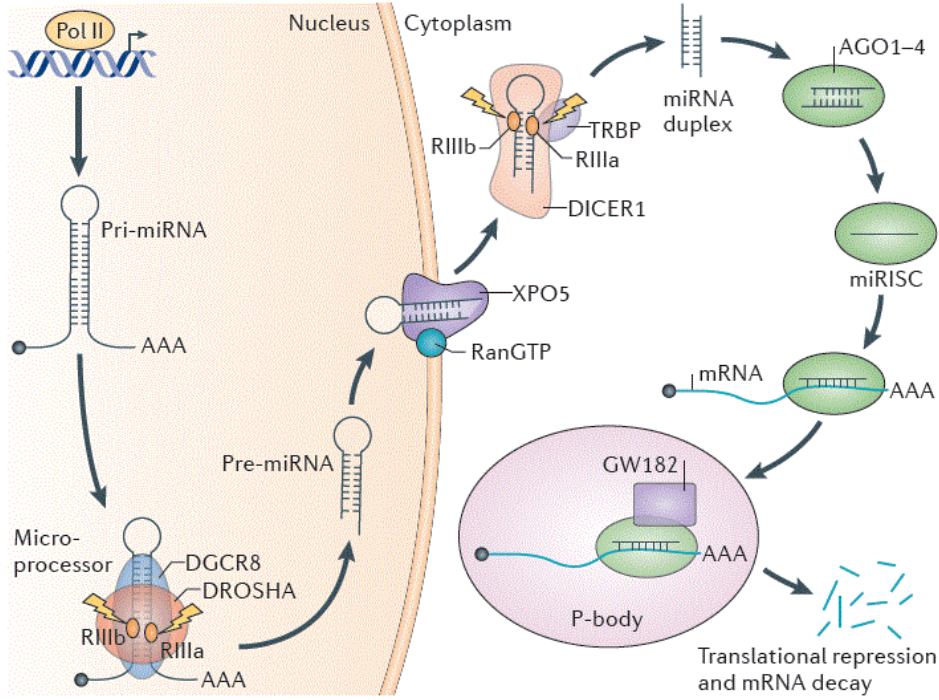
PI3K(Fosfatidilinositol-3-OH kinaz)/Akt yolağı çoğu kanserde sıklıkla aktif olan bir yoldur (Akca, et al. 2011). Bu yolağın aktivasyonu ile STAT3, Ap-1 ve Nükleer Faktör kapp B (NF-kB) gibi bazı transkripsiyon faktörleri aktive olmaktadır. Bu transkripsiyon faktörleri arasında en önemlilerinde biri kanser gelişimi, invazyon, anjiyogenezis, metastazis, hücre çoğalması ve apoptozisten kaçışı aktive edebilen NF-kB'dir (Aggarwal, 2004). NF-kB meme, akciğer, pankreas, prostat gibi birçok kanser türünde sürekli aktiftir. NF-kB, sitoplazmada DNA bağlanma altüniteleri (p50 ve p52) ve transkripsiyonel aktivite gösteren altüniteleri (p65 (RelA), RelB ve c-Rel) ile heterodimer olarak İnhibitör kapp B (IkB) proteinleri (IkB $\alpha$ , IkB $\beta$ , IkB $\gamma$ , IkB $\epsilon$ ) tarafından tutulur (Gustin vd., 2004). IkB proteinleri, çeşitli sitokinlerle uyarılarak fosforillenir, poliubikütinlenir ve 26S proteazomal degradasyona uğrayarak NF-kB heterodimerleri serbest kalır. IkB proteinleri, bir serin threonin kinaz olan IKK $\alpha$  ve IKK $\beta$  ve ikisi için iskelet görevi gören IKK $\gamma$  (NEMO) tarafından fosforillenir ve NF-kB'nin IkBlerce maskelenmiş olan nükleer lokalizasyon dizisi açığa çıkar ve nükleusa lokalize olur (Anrather vd., 1997). IKK $\alpha$  ve IKK $\beta$  çeşitli kinazlar fosforile edilebilirler. Bunlardan biri PI3K'in alt hedefi olan Akt serin-threonin kinazdır. Akt çeşitli sitokinler ve mitojenlerce aktive edilebilir. TNF- $\alpha$  Akt'yi aktive eden sitokinlerdendir (Ozes vd., 1999). Böylece Akt aktivasyonu ile IKK $\alpha$  ve IKK $\beta$  fosforillenir ve IkB fosforillenerek NF-kB heterodimer proteinleri nükleusa lokalize olur ve hedef DNA bağlanma bölgelerine bağlanarak çeşitli genlerin transkripsiyonel düzeyde düzenlenmelerini sağlarlar.

Küçük kodlanmayan RNA'lar sınıfına giren MikroRNA'lar (miRNA), mRNA'ların 3' kodlanmayan bölgelerine (3'-UTR) komplementer olarak bağlanıp mRNA'nın translasyonu engelleyerek gen ifadesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptirler. Bir miRNA yüzlerce mRNA'yı hedef alarak translasyonunu engellediği gibi bir mRNA'da yüzlerce miRNA tarafından hedef alınarak translasyonu baskılanabilmektedir (Lin vd., 2015). miRNA'lar 21-25 nükleotid uzunluğunda, iç kaynaklı küçük RNA moleküllerinin geniş bir sınıfını oluştururlar.

miRNA'lar ilk olarak C.elegans'ın gelişimi üzerine yapılan çalışmalarda keşfedilmişlerdir. C. elegans üzerinde yapılan çalışmada iç kaynaklı (endojenik) küçük bir RNA parçasının (lin-4); post-embriyonik gelişme için gerekli bir proteini kodlayan lin-14' genin translasyonunu genin 3' bölgesinde bulunan ve translasyona uğramayan bölgesiyle (3'-UTR) RNA-RNA etkileşimine girerek translasyonunu düzenlediğini gösterilmiştir (Lee vd., 2004). Daha sonra bu çalışmayı destekler nitelikte olan ve yine C. elegans üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise let-7 genini baskılayan küçük kodlanmayan RNA parçalarının varlığı gösterilmiştir. Endojen küçük RNA'ların, haberci RNA'ların (mRNA) translasyonunu baskıladığı hipotezi yapılan araştırmalarla desteklenmiş ve "miRNA" terimi Science dergisinde yayınlanan bir dizi makalede önerilmiş ve kabul görmüştür (Lagos-Quintana vd., 2001). Böylece miRNAların

hücrenin yaşam döngüsü boyunca birçok düzeyde homeostasis'in posttranskripsiyonel olarak düzenleyen oldukça önemli rolleri olduğu kabul görmüştür. miRNA genleri Y kromozomu hariç bütün kromozomlarda dağılmıştır (Kozomara vd., 2011).

miRNA'larda diğer mRNA'larda olduğu gibi RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilirler. DNA'dan ilk sentezlenen birincil miRNA transkribine primary miRNA (pri-miRNA) denir. miRNA'larda, RNA polimeraz II tarafından transkribe olduklarından, mRNA gibi 5'cap, splays ve poliadenilasyon modifikasyonlarına uğrarlar (Lee, et al. 2004). miRNA'ların yaklaşık %30'u protein kodlayan genlerin intronlarından sentezlenirken diğer büyük kısmı ise kendine ait gen bölgelerine sahiptirler (Lin vd., 2015). İlk sentezlenen bu uzun pri-miRNA öncelikle nükleusta iki adet RNaz III enzim içeren DROSHA ve çift zincir RNA bağlayan DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) denilen bir proteinle kompleks tarafından kesilir (Gregory vd., 2004). Sap-ilmik yapısındaki pri-miRNA kırılınca yaklaşık 60-70 nükleotidlik saç tokası yapısında pre-miRNA oluşur (Gregory, et al. 2004). Oluşan pre-miRNA exportin 5 ile sitoplazmaya aktarılır (Yi vd., 2003). Sitoplazmada yine iki katalitik RNaz III aktivitesine sahip DICER1 denilen enzim ile çift zincir pre-miRNA asimetrik olarak kırılır. Pre-miRNA kırıldıktan sonra 3' ucunda 2 nükleotidlik fazlalıklı yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda çift zincir olgun miRNA ortaya çıkar (Bernstein vd., 2001). Asimetrik olarak kesilmiş olan çift zincir olgun miRNA Argonat denilen (AGO1, AGO2, AGO3 veya AGO4) proteinler tarafından tek zincir olarak bağlanır ve RNA ile uyarılmış susturma kompleksi (RNA Induced Silencing Complex-RISC) oluşur (Chendrimada vd., 2005). Tek zincir olgun miRNA RISC kompleksine rehberlik yaparak hedef dizisine kompleksin bağlanmasını sağlar. Hedef mRNA 3' UTR dizisine bağlanan miRISC kompleksi translasyonun durmasını veya mRNA'nın parçalanmasını sağlar (Gregory vd., 2005). Bu işlem sitoplazmada P cismi denilen yerde gerçekleşir (Şekil 1).



**Şekil 1.** miRNA biyogenezi (Lin vd., 2015).

RISC içindeki miRNA'lar hedef mRNA'ları 3' UTR bölgelerindeki baz eşleşmesine göre belirlerler. Hedef seçiminde bağlanmayı sağlayan kısım ise "çekirdek-seed" adı verilen sınırlı bir bölgedir (Saunders vd., 2007). Bunun yanı sıra, miRNA ya da mRNA'lara bağlanan proteinler de hedef seçimini etkiler. miRNA'lar genel olarak posttranskripsiyonel düzenlenmeyi; translasyonu baskılayarak veya mRNA hedeflerinin yıkımını sağlayarak yapar. Olgun mRNA'larda translasyonun başlatılmasında eIF4E (ökaryotik başlatım faktörü 4E) ile 7-metilguanozin dizilimi arasında doğrudan bir etkileşim gereklidir. miRNA'lar mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlandığında, RISC'teki Ago proteinleri mRNA'nın 7-metilguanozin bölgesiyle etkileşime girerek eIF4E'nin mRNA'ya bağlanmasını bloke eder ve böylece translasyonun başlamasını engeller. İlgili miRNA'nın bağlanmasını takiben mRNA yıkımı gerçekleştirilerek mRNA yok olmasıyla sonuçlanır (Filipowicz vd., 2008). miR-124'ün mRNA hedefleri üzerine yapılan araştırmalar; miRNA'ların hedefi olan mRNA'ların hem translasyonunu hem de varlığını azalttığını, translasyonun başlangıç aşamasında sonlandırıldığını veya translasyonun olduğu bölgede ribozom sayısının azaltıldığını göstermiştir (Hendrickson vd., 2009). Bu yüzden hedef mRNA'ların çoğu aynı anda hem translasyonel olarak baskılanma hem de yıkıma maruz kalırlar.

miRNA işlevi mRNA'nın tek bir belirli bölgesine bağlanmaya endeksli değildir. Çalışmalarda miRNA-ribonükleoprotein birleşmesinin hedef mRNA'nın herhangi bir bölgesine bağlanarak başlamış olan translasyonu mekanik olarak engelleyebildiği gösterilmiştir (Lytle

vd., 2007). Yapılan araştırmalarda miRNA'nın reseptör etkileşimli protein 140'ın 5'-UTR bölgesine bağlanmasıyla ve 3'-UTR bölgelerinde gösterdiği etkinliğiyle kıyaslandığında daha az etkin olsa da 37 miRNA'ların mRNA'da kodlanan bölgeleri de hedefleyebildiğini ortaya koyan sonuçlar alınmıştır. miRNA'lar ve ilgili RISC bir mRNA hedefine bağlandığında, RISC kompleksinde bulunan ve mitojen aktive edici bir kinaz olan P38 ile fosforile olan argonat proteini-2 (Ago2)'nin hedef mRNA'yı işlevsel parçalara ayırdığını gösteren çalışmalar yapılmıştır (Pillai, et al. 2005). Bazı mRNA'ların yıkım sonrası RISC oluşumundan ayrıldıktan sonra ribozomlara bağlanıp translasyona uğradığı da gösterilmiştir.

mikroRNA'lar aracılığıyla gerçekleşen gen regülasyonu çeşitli hücrel süreçlerde homeostasiyi sağlama açısından önemli bir role sahiptir. MikroRNA'ların en önemli rolü çeşitli hücrel mRNA'ları hedef alarak gelişim sürecinin değişik dönemlerinde hücrel sinyal iletim yollarının aktivasyonunu ya da represyonunu sağlamaktır (Tsuchiya vd., 2011). MikroRNA fonksiyon bozukluklarının sonucu olarak sinyal iletim yollarında defektler gözlenmekte ve bunun sonucu olarak hücrel homeostasi bozulmaktadır (Tsuchiya vd., 2011). Kanser hücrelerinde mikroRNA fonksiyon bozukluklarının sonucu olarak tümör baskılayıcı sistemlerin represyonu, onkogenik yolların ise aktivasyonu gerçekleşmektedir (Tsuchiya vd., 2011). miRNA'lar kanserde birçok moleküler yolağı onkogen ve tümör supresör genleri hedef alarak epitel-mezenkimal geçiş, invazyon, metastaz ve ilaç dirençliliği vb. hücrel aktiviteleri düzenleyebilmektedirler (Ahmad vd., 2013). Böylelikle kanser ilişkili miRNA'lar, metastamir, onkomir veya tümör supresör olarak isimlendirilerek sınıflandırılmaktadır (Hurst vd., 2009; Yanokura vd., 2015).

NF-kB kanser gelişimi ve progresyonunda sıkı kontrol edilen bir transkripsiyon faktörüdür (Ozes vd., 1999). Çoğu kanserde sürekli aktif olan NF-kB birçok hücrel aktivitenin (inflamasyon, invazyon, metastaz, anjiyogenez, apoptozisten kaçış) indüklenmesinde rol oynamaktadır (Aggarwal, 2004; Baldwin, 1996). Bu aktivitelerin gerçekleşmesi için birçok gen NF-kB tarafından düzenlenmektedir (Karin vd., 2002). Son yıllarda yapılan miRNA çalışmalarında kanser hücrelerinde normal hücrelere göre düzenlenmelerinin değiştiği transkripsiyon seviyelerinin artarak veya azalarak kanserleşmede rol oynadıkları gösterilmiştir (Sun vd., 2016). Bu miRNA'lar kanser hücrelerinde ifadesi değişen çeşitli yolak veya bu yollarda görev alan transkripsiyon faktörleri ile düzenlenmektedirler. Transkripsiyon faktörleri miRNA'ların promoter bölgelerine bağlanarak ifadelerini düzenledikleri birçok çalışmada gösterilmiştir (Jeon vd., 2015; Tsuchiya vd., 2011). NF-kB'nin de çoğu kanserde sürekli aktif olması ve hücrel birçok aktivitede oynadığı rolden dolayı birçok çalışma bu aktivitelerde NF-kB'nin miRNAlar aracılığıyla da rol oynadığını düşündürmüş ve birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir



Tüm bilinenler doğrultusunda, insanda bugüne kadar tanımlanmış yaklaşık 2800 adet miRNA'nın birçok hücresel faaliyette rol aldıkları aşikârdır. Tanımlanan miRNA'ların büyük çoğunluğunun hedefleri ve biyolojik aktiviteleri bilinmemektedir. Bunun üzerine literatürde bu boşluğu dolduracak birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Genetik düzeyde kontrol denildiğinde mekanizmada rol alan her elemanın bilinesi önem arz etmektedir. Dolayısı ile NF-kB gibi hücresel düzeyde migrasyon, invazyon, sağkalım, hücre çoğalması, inflamasyon gibi birçok aktivitede görev alan transkripsiyon faktörünün hücrede bu aktivitelerin indüklenmesindeki mekanizmalarda rol oynayan genetik faktörlerin tamamının açığa çıkarılması önemlidir. Biz bu çalışmamızda TNF- $\alpha$ /PI3K/AKT yolağı ile aktifleşen NF-kB'nin nükleusa geçerek invazyonu aktive eden miRNA genlerinin promotorlarına bağlanarak onların transkripsiyonunu indüklemek sureti ile KHDAK invazyonunu arttırdığını göstermeye çalıştık.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Hücre Kültürü

Proje araştırması boyunca H1299, PC3, PC14 KHDAK hücre hatları kullanıldı. Kültür şartları %10 Fetal Bovine Serum ve % 0,5'lik penisilin/streptomisin içeren RPMI besi ortamında, 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında gerçekleştirildi.

#### 3.2 Lusiferaz deneyi

Lusiferaz deneyleri Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PC3, PC14 ve H1299 KHDAK hücreleri tripsin edilerek 6 well plate' lere aktarıldı ve %80 yoğunluğa ulaştıklarında hücelere NF-kB lüsiferaz vektör ve renila lüsiferaz kontrol vektör, Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transfeksiyon ajanı kullanılarak transfekte edildi. Transfeksiyon verimliliği GFP vektör yardımı ile ölçülmüş ve yeterli verimlilikte olduğu görülmüştür. 24 saat sonra hücrelerin besi yerleri değiştirilerek hücelere serum free medium eklenmiş ve 24 saat bu medyumda hüceler inkübe edilerek NF-kB aktivasyonunun bazal seviyeye düşmesi hedeflenmiştir. Ardından hücreler, NF-kB inhibitörleri ile (Triptolit (20ng/ml), LY294002 (8 µM), BAY11-7082 (10 µM) ve MG132 (10 µM)) 1 saat muamele edildikten sonra TNFα (30ng/ml) uygulanarak 8 saat 37°C de %5 CO<sub>2</sub>' li ortamda inkübe edilerek kit içeriğinde bulunan pasif liziz tampon ile muamele edilerek lüsiferaz aktivitesi luminometrik olarak belirlenmiştir (Şekil 4-5).

#### 3.3 Western Blot Analizi

H1299, PC3, PC14 hücreleri 6-well plate'lerde kültüre edildi. Hücreler serum içermeyen besiyeri ile 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonunda BAY11-7082 (10 µM) spesifik NF-kB inhibitörü ile 1 saat muamele edilerek ardından TNF-α (30ng/ml) uygulanmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda hücreler RIPA Lizis Tamponu ile toplanarak protein elde edilmiştir. Proteinlerin konsantrasyon tayinleri Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Her örnek için 50 µg protein %10'luk SDS-Page Jel'de 120 V'ta yürütülmüştür. SDS-Page ile ayrılan proteinler ıslak transfer yöntemi ile 90 mA'de bir gece PVDF membrana aktarılmıştır. Membrana aktarılan proteinler 2 saat %5'lik yağsız sütte bloklama yapılarak 1'er saat primer (p-AKT, AKT, p53, PTEN) ve horseradish peroxidase-labeled sekonder antikor ile muamele edildikten sonra ECL kemiluminesans reagent kullanılarak protein seviyelerine göre gerçekleşen ışımaya filme aktarılmıştır.

### 3.4 RNA İzolasyonu

H1299, PC3, PC14 hücreleri 6-well'lere ekildi. Ekildikten 24 saat sonra hücreler serum içermeyen besiyeri ile inkübe edildi. 24 saat sonunda hücreler öncelikle 1 saat BAY11-7082 (10  $\mu$ M) ile muamele edilip ardından 24 saat için TNF- $\alpha$  (30ng/ml) uygulandı. 24 saat sonunda hücreler Trizol (QIAGEN, Almanya) ile toplanarak RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Almanya) kullanılarak miRNA izolasyonu gerçekleştirildi.

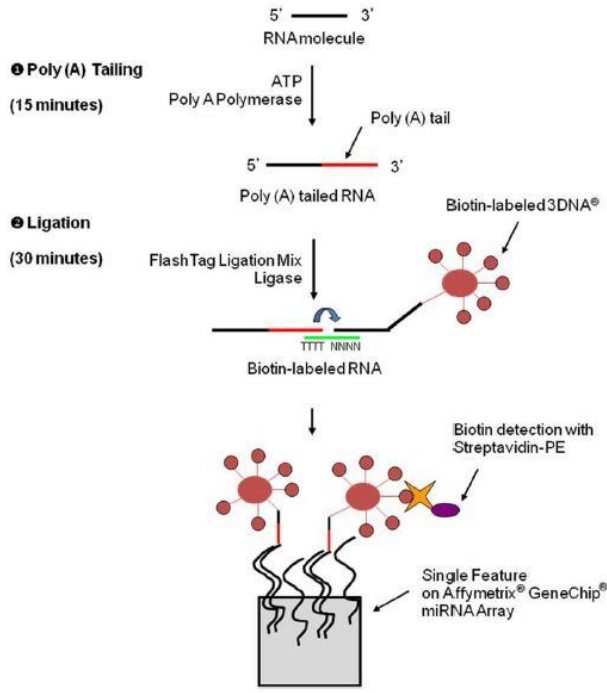
### 3.5 Mikroarray Analizi

Prosedüre göre affymetrix hibridizasyon fırını deneyden 1 saat önce acılarak 48°C ve 60 rpm' e ayarlanarak ön ısınması yapılmış ardından arraylar oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiş ve tablo 1' de verilen hibridizasyon karışımı hazırlandıktan sonra üzerine 21.5  $\mu$ L biotin-işaretlenmiş örnek ektenmiştir.

Component	Volume for a 400/169 Format Array (miRNA 1.0 and 2.0 Arrays)	Volume for a 100 Format Array (miRNA 3.0 Arrays)	Final Concentration
2X Hybridization Mix	50 $\mu$ L	66 $\mu$ L	1X
27.5% Formamide (Vial 12)	15 $\mu$ L	19.2 $\mu$ L	4%
DMSO	10 $\mu$ L	12.8 $\mu$ L	9.7%
20X Hybridization Controls	5 $\mu$ L	6.6 $\mu$ L	1X
Control Oligo B2, 3nM	1.7 $\mu$ L	2.2 $\mu$ L	50 pM
Nuclease-free Water	N/A	3.7 $\mu$ L	
<b>Total Volume</b>	<b>81.7 <math>\mu</math>L</b>	<b>110.5 <math>\mu</math>L</b>	

**Tablo 1.** Mikroarray hibridizasyon karışımı hazırlanması.

Karışım 99°C' de 5 dakika, ardından 45°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra karışımdan 100  $\mu$ L alınarak array' e enjekte edilmiştir. Arrayler hibridizasyon fırınına kaldırılarak 48°C ve 60 rpm de 18 saat hibridizasyon için inkübe edilmişlerdir. Hibridizasyonun ardından yıkama ve boyama solüsyonları kullanılarak kit prosedürü takip edilmiş ve örnekler üzerinde hava kabarcığı kalmadığı kontrol edildikten sonra örnekler okutulmuş ve data analizi affimetrix'in önerdiği RMA+DABG kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar ek dosya olarak verilmiştir. İzole edilen miRNA'lar ilk olarak FlashTag Biotin HSR RNA işaretleme kiti kullanılarak biyotinle işaretlenmişlerdir. Ardından miRNA array, MiRNA array Affymetrix GeneChip miRNA Array prosedürü takip edilerek yapılmıştır (Şekil 2).



**Şekil 2.** miRNA array protokol şeması.

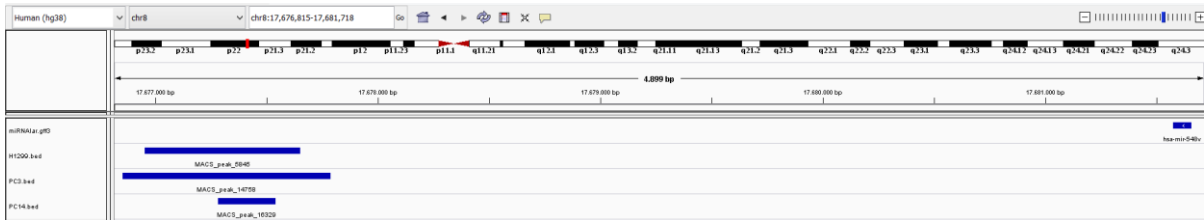
### 3.6 Kromozom İmmunopresipitasyon (ChIP) Sekans

ChIP için 17-10085 Katalog no'lu NF- $\kappa$ B için spesifik ChIP kit ve 17-10060 Katalog No'lu ChIPAb+ NF $\kappa$ B p65 (RelA) - ChIP Validated Antibody and Primer Set (Millipore) kullanıldı. Deney kitin protokolünde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Yaklaşık %80-90 yoğunluğa ulaşan H1299, PC3 ve PC14 hücreleri serumsuz besiyerinde normal kültür şartlarında 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonunda TNF- $\alpha$  (30ng/ml) ile 8 saat muamele edildi. Hücreler %18,5'lik formaldehit kullanılarak fikse edildi. Petrilerden hücreler toplanarak çöktürüldü. Hücresel pellet lizis tampon ile parçalanarak sonike edildi. Sonikasyon buzun içerisinde Bandelin marka sonikatör kullanılarak 30 sn açık 15 sn kapalı 1 sn döngüde %95 güçte yaklaşık 7 dk olacak şekilde gerçekleştirildi. Örneklerin DNA fragmentasyon uzunluklarının 200 - 1000 bp olduğunu tespit etmek amacıyla %0,8'lik Agaroz jel elektroforezi kullanıldı. DNA uzunlukları belirlendikten sonra yaklaşık 25 ug örnekler kit ile temin edilen manyetik boncuklar ve p65 antikoru ile 4°C'de gece boyunca çalkalanarak inkübe edildi, ardından manyetik ayırıcı kullanarak ayrıldı ve saflaştırıldı. Saflaştırılan kromozom materyali standart PCR ve real-time PCR kullanarak kontrol edildi.



### 3.7 Biyoenformatik Analiz

TNF- $\alpha$  indüklenmesiyle aktif olan NF-kB'nin genom üzerinde bağlandığı bölgeleri saptamak amacıyla H1299, PC3, PC14 hücre hatlarına Kromozom İmmünopresipitasyon (ChIP) yöntemini gerçekleştirip ChIP Sekanslama için örnekler TÜBİTAK BİLGEM İleri Genom ve Biyoenformatik Araştırma Merkezi'ne gönderildi. Sekans sonucunda TÜBİTAK'tan gelen sonuçlarda sekanslanan bölgeler hg38 (Genome Reference Consortium tarafından en son yayınlanan insan genomunun birleştirilmiş yeni versiyonu)'e göre alignment edildi. H1299, PC3 ve PC14 kromozom bölgelerinde tespit edilen pik'lerin fold enrichment değerleri (FE)  $\geq 10$  olacak şekilde değerlendirildi (Xing vd., 2013). Yüksek Fold Enrichment değerleri dizilenen bölgenin güvenilirliğini arttırdığı için eşik değerini 10 ve üstü kabul edildi. pre-miRNAların transkripsiyon başlama bölgelerinin 100 kb upstream ve transkripsiyonunun sonlandığı bölgelerden 100 kb downstream bölgeler gen düzenlenme bölgesi kabul edildi (Lim, Yao et al. 2007). Gen bölgelerinde bulunan miRNA'lar değerlendirmeye alındı. Bu analiz IGV (Integrative Genomics Viewers) programı kullanılarak miRBase de şimdiye kadar tespit edilen genom üzerinde bağlanma bölgesi bilinen miRNAlar ile birlikte ChIP sekans sonuçlarında genom üzerinde bağlandığı tespit edilen bölgelerle birlikte görüntülenerek gerçekleştirildi (Şekil 3).



**Şekil 3.** ChIP sekans sonuçlarının bilinen miRNA'lar ile aynı anda genom üzerindeki bağlanma bölgelerinin Integrative Genomics Viewer (IGV Tools) programında gösterimi.

ChIP sekans sonuçları NF-kB'nin TRANSFAC® (<http://www.biobase-international.com/product/transcription-factor-binding-sites>) database'i kullanılarak gerçekten bu bölgelerde NF-kB bağlanma motifi olup olmadığı tespit edilerek olanlar ayıklandı. TNF- $\alpha$  uyarısının ardından NF-kB'nin aktifleşerek nükleusa göç etmesi ve hedef miRNA promotor bölgelerine bağlanmasını beklediğimizden biyoenformatik analizlerimizde ChIP sekans analizi sonucunda, kromozomlarda bağlandığı tespit edilen bölgelerin 100 kb 5' ve 100 kb 3' yönüne kadar olan alanın miRNA'ların düzenleyici bölgeleri olduğu varsayılarak bu bölgede kalan miRNA'ları seçildi (Tablo 1-2). miRNA'ların düzenlenme bölgelerinin upstream ve downstream'de 100 kb a kadar olabileceği bir çalışma da gösterilmiştir (Lim vd., 2007). Ayrıca miRStart database'i (<http://mirstart.mbc.nctu.edu.tw/>) kullanılarak miRNA'ların Tahmini transkripsiyon başlama bölgeleri de miRNA'ların seçiminde analizlerin gerçekleştirilmesinde



kullanıldı. Seçilen miRNA'ların tahmini hedeflerini belirlemek için DIANA-microT-CDS ([http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=MicroT\\_CDS/index](http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=MicroT_CDS/index)), TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) ve miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) veritabanları kullanılmıştır.

### 3.8 miRNA Mimik ve İnhibitör Transfeksiyonları

Tespit edilen miRNA'ların invazyon ile ilişkilerini tespit etmek için H1299, PC3 ve PC14 hücre hatları belirtilen miRNA'ların mimikleri ile transfekte edildi. miRNA mimik (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) 50 nM kullanıldı. Transfeksiyon deneyleri 6-well plate'lerde gerçekleştirildi. miRNA mimiklerin transfeksiyon etkinliğini tespit etmek için florokrom boya konjuge edilmiş kontrol miRNA mimik (miRIDIAN microRNA Mimic Transfection Control with Dy547, Dharmacon, Lafayette, CO, USA) kullanıldı. Transfeksiyon deneyleri Lipofectamin 2000 (Invitrogen) ile gerçekleştirildi.

### 3.9 Hücre invazyon deneyi

Tespit edilen miRNA'ların H1299, PC3 ve PC14 KHDAK hücre hatlarında invazyon üzerine olan etkilerini belirlemek için BioCoat Matrigel Invazyon Chamber-invazyon odaları (BD Biosciences, Clontech) kullanıldı. Bunun için hücreler 6-well plakalara ekilerek miRNA kontrol ve mimikler ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler tripsin edilip sayıldı ve 2 saat önce 37°C'de serum içermeyen besiyerinde rehidre edilen invazyon odasına  $2,5 \times 10^4$  olacak şekilde ekildi. İnvazyon odalarında hücreler serum içermeyen besiyerinde inkübe edildi. Odacığın altında kalan kuyuya ise kemoatraktan olarak %10 FBS içeren RPMI1640 kullanıldı. Hücreler 24 saat kültür şartlarında inkübe edildi. 24 saat sonunda invazyon odacığının içindeki besi yeri uzaklaştırıldı ve pamuklu çubukla odacığın içerisinde kalmış olan hücreler temizlendi. İnvazyon odacıkları öncelikle soğuk metanol içerisinde ile fikse edilip ardından Toluidine blue (%1) ile boyanarak mikroskop altında sayılarak invaziv hücreler belirlendi.

### 3.10 Standart PCR ve qRT-PCR Analizleri

ChIP deneyi sonucunda örneklerin sekansa gönderilmeden önce NF- $\kappa$ B'nin bağlandığı DNA bölgelerinin elde edilip edilmediğini tespit etmek için standart PCR ve real-time PCR gerçekleştirildi. Standart PCR, DNA 10  $\mu$ L, Taq polimeraz Buffer 5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L, dNTP 1  $\mu$ L, Primer 1,5  $\mu$ L, Taq DNA Polimeraz 1  $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O 28,5  $\mu$ L şeklinde reaksiyon karışımı kullanılarak, 94°C 3 dakika (94°C 20 saniye, 59°C 30 saniye, 72°C 30 saniye) 32 döngü, 72°C 2 dakika olacak şekilde şartlarda gerçekleştirildi. Real-time PCR şartları; DNA 2  $\mu$ L, Syber Green Master



Mix 10 $\mu$ L, Primer Mix 1 $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O 7 $\mu$ L. 94°C 10 dakika, (94°C 20 saniye, 60°C 1 dakika) 50 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi.

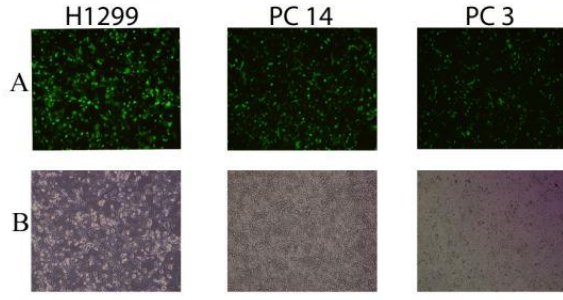
İnvazyon deneyinde belirlenen miRNA'lar için primerler dizayn edilerek bu miRNA'ların transkripsiyonlarının NF-kB aktivitesi ile düzenlenip düzenlenmediği qRT-PCR ile saptanmıştır. Bunun için mRNA array sonuçlarında bulunan genler için primerler tasarlanacaktır. Bu primerler; 60°C bağlanma sıcaklığında, 18-24 nükleotid, genlerin kodlama bölgelerinde 50-150 nükleotidlik bir bölge çoğaltacak şekilde tasarlanacaktır. Primerler Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) web tabanlı program kullanılarak tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler hizmet alımı yolu ile sentez ettirilmişlerdir. 6-well plate'lere ekilen H1299, PC3 ve PC14 hücreleri miRNA kontrol, mimik ve inhibitörü ile transfektüre edildikten 24 saat sonra Total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA Easyscript cDNA sentez kiti (abm, Kanada) kullanılarak cDNA'ya çevrildi. qRT-PCR Kilogreen Syber Green Master Mix (abm, Kanada) kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar  $\Delta\Delta C_t$  metoduna göre analiz edildi.

## 4. BULGULAR

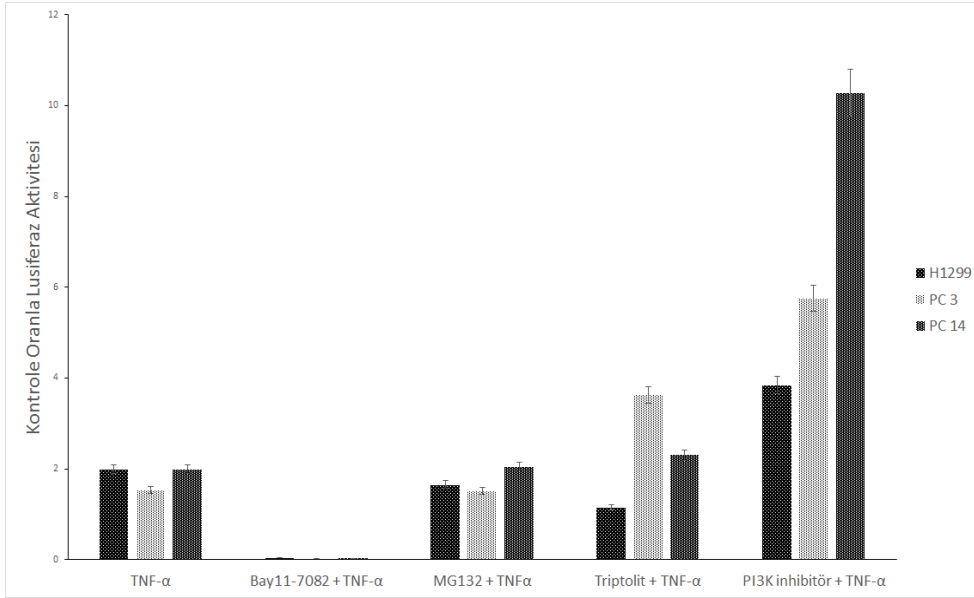
### 4.1 TNF- $\alpha$ indüklü NF-kB lüsiferaz aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmamızda “TNF- $\alpha$  tarafında indüklenen NF-kB aktivitesinin KHDAK invazyonunu miRNA transkripsiyonunu düzenleyerek mi indüklemektedir?” sorusuna yanıt aradığımızdan, ilk olarak PC14, PC3 ve H1299 hücrelerinde TNF- $\alpha$ 'nın NF-kB yi aktive edip etmediği ve bu aktivasyonun spesifik NF-kB inhibitörü ile susturulup susturulamayacağını araştırdık. Bunun için PC3, PC14 ve H1299 KHDAK hücreleri tripsin edilerek 6 well plate' lere aktarıldı ve %80 yoğunluğa ulaştıklarında hücrelere NF-kB lüsiferaz vektör ve renila lüsiferaz kontrol vektör, lipofectamin 2000 transfeksiyon ajanı kullanılarak transfekte edilmiştir. Transfeksiyon verimliliği GFP vektör yardımı ile ölçülmüş ve yeterli verimlilikte olduğu görülmüştür (Şekil 4). 24 saat sonra hücrelerin besi yerleri değiştirilerek hücrelere “serum free medium” eklenmiş (sekronize olmaları için) ve 24 saat bu medyumda hücreler inkübe edilerek NF-kB aktivasyonunun bazal seviyeye düşmesi hedeflenmiştir. Ardından hücreler hiçbirsey muamele edilmemiş kontrol grubu; 30 ng/ml TNF- $\alpha$  muamele edilmiş, NF-kB inhibitörleri ile ( ki çalışmamızda Triptolit (20ng/ml), PI3K inhibitörü (8  $\mu$ M), BAY11-7082 (10  $\mu$ M),ve MG132 (10  $\mu$ M) test edilmiştir) ile 1 saat önce muamele edilen hücreler ardından TNF- $\alpha$  (30ng/ml) uygulanarak 8 saat 37C de %5 CO<sub>2</sub>' li ortamda inkübe edilmişler ve promega lüsiferaz dual assay kiti kullanılarak hücreler liziz edilmiş ardından lüsiferaz aktivitesi luminometrik olarak belirlenmiştir (Şekil 5).

Daha önce yayınladığımız makalelerde ve diğer araştırmacıların makalelerinde açıkça belirtildiği üzere NF-kB aktivitesi uyarı yapıldıktan 8 saat sonra maksimum seviyeye geldiği için çalışmamızda diğer zamanları test etmeyip sadece 8. Saat aktiviteleri ölçülmüştür. Bunun iki sebebi vardır birincisi 8. Saat NF-kB aktivitesi ölçümü için uygun saattir, ikincisi biz proje önerimizde belirttiğimiz gibi sadece 2 inhibitör değil toplam 5 inhibitörü denediğimiz için ve NF-kB aktivite kitimizin optimum kullanılması için sadece bu saat kullanılmıştır. Ayrıca proje önerimizde kullanacağımızı belirttiğimiz Triptolit ve PI3K inhibitörü NF-kB aktivitesini inhibe edememiş, sadece BAY11-7082 NF-kB aktivitesini inhibe edebilmiştir (Şekil 5).



**Şekil 4.** Transfeksiyon verimliliğinin GFP vektör aracılığıyla gösterilmesi.



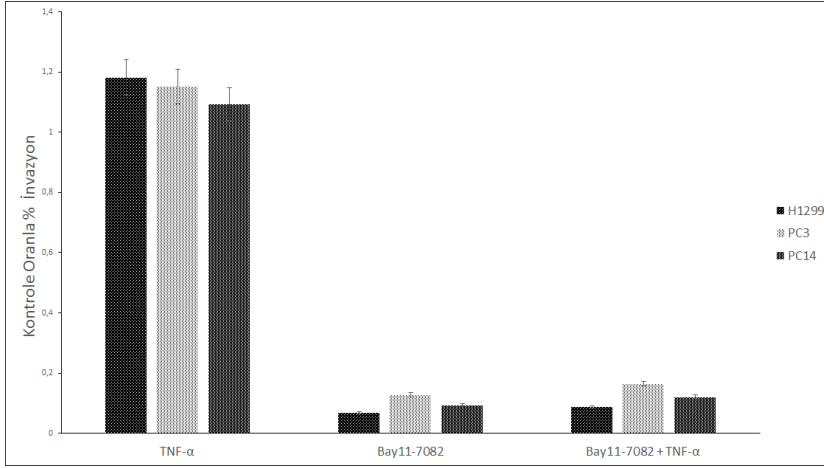
**Şekil 5.** NF-kB lusiferaz aktivitesi.

Şekil 5' te açıkça görüldüğü gibi TNF- $\alpha$  uygulaması tüm hücrelerde NF-kB aktivitesini kontrol oranla arttırmıştır. İnhibitörlerden ise sadece BAY11-7082'nin TNF- $\alpha$ 'nın indüklediği NF-kB aktivitesini baskıladığı görülmekte iken, diğer spesifik NF-kB inhibitörlerinin PC3, PC14 ve H1299 hücrelerinde NF-kB aktivitesini baskılayamadığı saptanmıştır.

Bu verinin ardından sonraki çalışmalarımızda NF-kB aktivitesini inhibe etmek için BAY11-7082 kullanılmasına karar verilmiş ve PC3, PC14 ve H1299 hücrelerinde TNF- $\alpha$  tarafından aktive edilen NF-kB ile NF-kB inhibitörü BAY11-7082' nin hücre invazyonuna etkisi "invazyon chamber assay" ile araştırılmıştır.

#### 4.2 Hücre invazyonunun belirlenmesi

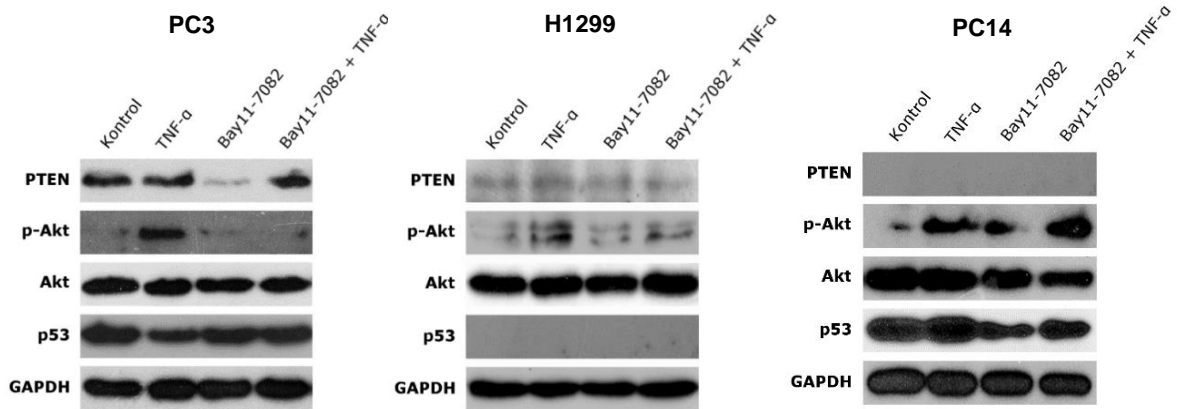
Şekil 6' da görüldüğü gibi tüm hücrelerde TNF- $\alpha$  uygulaması hücre invazyonunu arttırırken NF-kB spesifik inhibitörü olan BAY11-7082 hücre invazyonunu inhibe etmiştir. Bu sonuç bize açıkça TNF- $\alpha$  aracılı NF-kB aktivitesinin KHDAK hücrelerinde invazyonu indüklediğini göstermektedir.



**Şekil 6.** H1299, PC3 VE PC14 hücre hatlarında kontrole oranla % invazyon.

#### 4.3 TNF- $\alpha$ , NF-kB inhibitörü BAY11-7082' nin p53, PTEN, p-AKT ve Akt ekspresyonları üzerine etkisi

Western Blot analizi sonucu elde ettiğimiz sonuçlar; TNF- $\alpha$  uygulamasının PC3 hücrelerinde p-AKT seviyesini artırırken, BAY11-7082 ve BAY11-7082 +TNF- $\alpha$  uygulamalarının p-AKT seviyesi üzerine herhangi bir etki yapmadığı saptanmıştır. TNF- $\alpha$ , BAY11-7082 ve BAY11-7082 +TNF- $\alpha$  uygulamalarının ise AKT ve p53 seviyesi üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken, p53 ekspresyonu üzerinde sadece BAY11-7082 uygulamasının p53 seviyesini düşürdüğü saptanmıştır (Şekil 7).



**Şekil 7.** PC3, PC14, H1299 hücrelerinde TNF- $\alpha$ , BAY11-7082 ve BAY11-7082 uygulamalarının PTEN, p-AKT ve p53 ekspresyon seviyelerine etkisi.

TNF- $\alpha$  uygulaması H1299 hücrelerinde p-AKT seviyesini artırırken, BAY11-7082 ve BAY11-7082 +TNF- $\alpha$  uygulamalarının p-AKT seviyesi üzerine herhangi bir etki yapmadığı

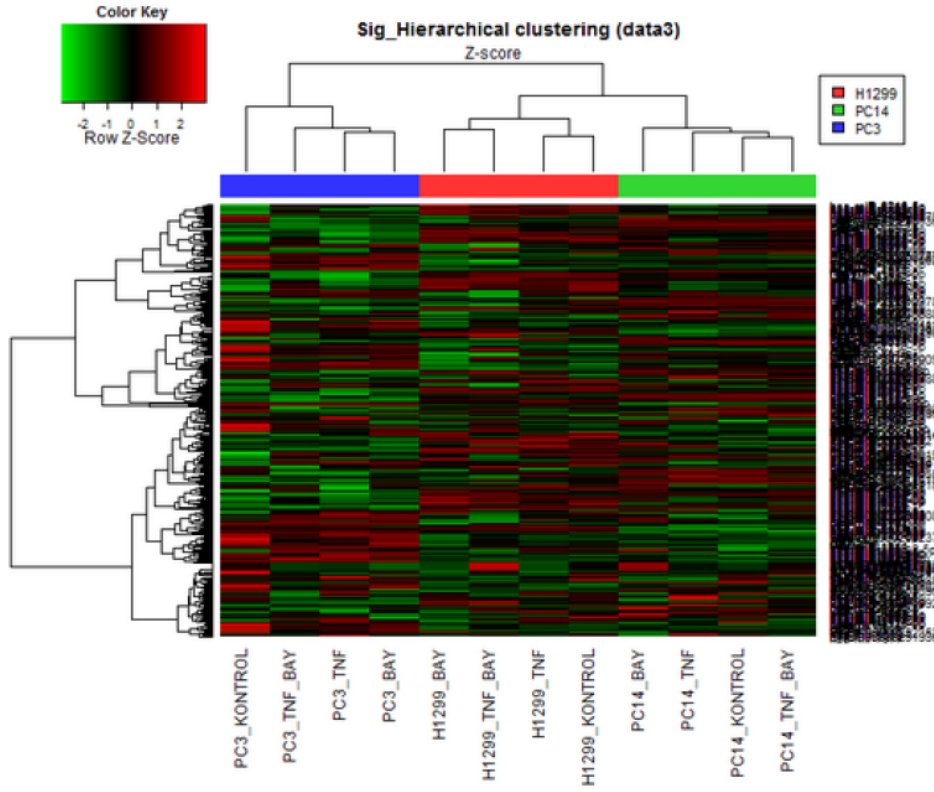
saptanmıştır, bu hücrelerde p53 ekspresyonu saptanamamıştır (Şekil 7), çünkü bu hücrelerde p53 delesyonu vardır (Ferraz da Costa vd., 2012). TNF- $\alpha$ , BAY11-7082 ve BAY11-7082 + TNF- $\alpha$  uygulamalarının p-AKT seviyesini artırırken, p53, AKT ve PTEN ekspresyonunu azaltığı saptanmıştır. GAPDH de herhangi bir düzensizlik görülmemesi bu ekspresyonların gerçekten düştüğüne işaret etmektedir (Şekil 7).

#### 4.4 TNF- $\alpha$ , NF-kB inhibitörü BAY11-7082'nin miRNA transkripsiyon seviyeleri üzerine etkileri

PC3, PC14 ve H1299 hücreleri 6 well platalere ekildiler ve hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında besi yerleri serum free besi yeri ile değiştirilerek hücreler bu medium da 24 saat inkübe edildiler, böylece hücrelerin senkronize olması sağlandı. Artından hücreler hiç birşey muamele edilmemiş kontrol grubu, TNF- $\alpha$  (30ng/ml), BAY11-7082 (10  $\mu$ M), BAY11-7082 + TNF- $\alpha$  ile 8 saat muamele edildikten sonra. Medium uzaklaştırıldı ve hücrelerin miRNAları Qiagen miRNA izolasyon kiti kullanılarak izole edildi (miRNeasy microKit katalog num:217084). İzole edilen miRNA ların kalitesi tablo 2'de görülmektedir.

**Tablo 2.** İzole edilen miRNAların kalitesi.

No:	Örnek Adı:	Kons. (ng/ $\mu$ l)	A260/A280	A260/A230	Toplam Miktar ( $\mu$ g)
1	PC3_KONTROL	852,42	1,97	2,28	17,05
2	PC3_TNF	1160,37	2	2,27	23,21
3	PC3_BAY	2084,27	2	2,27	41,69
4	PC3_TNF_BAY	1426,14	2	2,3	28,52
5	H1299_KONTROL	1062,09	2,02	2,28	21,24
6	H1299_TNF	1353,34	2,04	2,19	27,07
7	H1299_BAY	3233,68	2,02	2,27	64,67
8	H1299_TNF_BAY	1868,04	2,03	2,32	37,36
9	PC14_KONTROL	2663,2	2,02	2,25	53,26
10	PC14_TNF	3003,76	2,02	2,21	60,08
11	PC14_BAY	1409,73	1,99	2,3	28,19
12	PC14_TNF_BAY	1889,86	2,01	2,25	37,8



**Şekil 8.** miRNA array analiz sonucunda tüm dataların Hierarchical clustering analizi.

Hipotezimize göre TNF- $\alpha$  uygulamasının ardından NF-kB aktive olduğu için NF-kB miRNA genlerinin promotor bölgelerine bağlanarak miRNAların transkripsiyon seviyesinin artmasını sağlarken, BAY11-7082 +TNF- $\alpha$  uygulamasının ardından NF-kB inhibe olduğu için transkripsiyon seviyesi düşen miRNA'ların tespiti önemlidir. Bu sebeple miRNA array sonucunda çıkan datalardan bizim için önemli olan TNF- $\alpha$  uygulamasında transkripsiyon seviyesi artarken BAY11-7082 + TNF- $\alpha$  uygulamasında transkripsiyon seviyesi düşen miRNA'lardır. Bunun için TNF- $\alpha$  transkripsiyon düzey verilerini BAY11-7082+TNF- $\alpha$  transkripsiyon düzey verileri ile kıyasladığımızda aşağıdaki grafik transkripsiyonu artan ve azalan miRNA'ları vermiştir (Tablo 3). Tablo 3'te görüldüğü gibi BAY11-7082 ve TNF- $\alpha$ 'nın birlikte uygulandığı grubun TNF- $\alpha$  uygulanan gruba oranlandığında transkripsiyon seviyelerinin azaldığı miRNA'lardır. Bu durumda transkripsiyon seviyeleri azalmış olan miRNA'ların TNF- $\alpha$  ile indüklendiği, BAY11-7082 ile transkripsiyon seviyelerinin azaldığını göstermektedir.



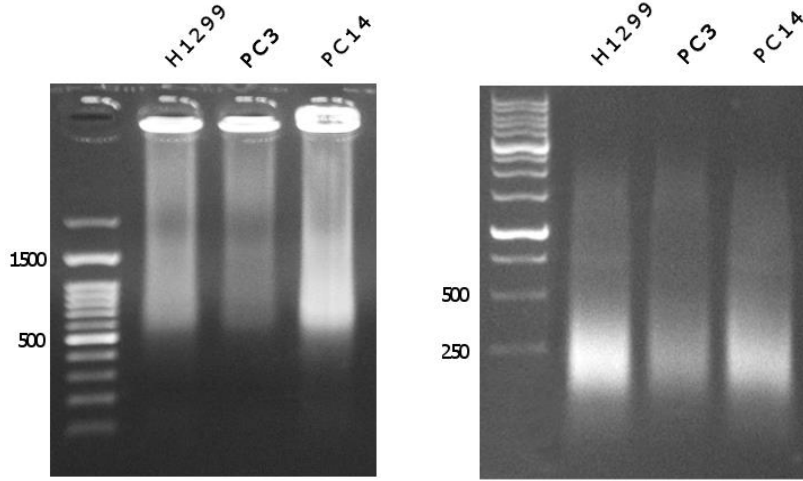
**Tablo 3.** H1299, PC 3 ve PC14 hücre hatlarında TNF- $\alpha$  uygulaması sonrasında ifadesi artmış iken BAY11-7082+ TNF- $\alpha$  uygulaması sonrası ifadesi düşen miRNA'ların transkripsiyon seviyeleri.

H1299		PC3		PC14	
miRNA	BAY11-7082+ TNF- $\alpha$ / TNF- $\alpha$	miRNA	BAY11-7082+ TNF- $\alpha$ / TNF- $\alpha$	miRNA	BAY11-7082+ TNF- $\alpha$ / TNF- $\alpha$
miR-8060	-4,835094	miR-548a-3p	-2,045891	miR-4521	-3,233214
miR-29c-3p	-2,095573	miR-3180	-3,673387	miR-4778-5p	-2,209476
miR-7847-3p	-2,933223	miR-365a-5p	-2,251179	miR-1224-5p	-2,519408
miR-4298	-3,576506	miR-451a	-3,070895	miR-222-5p	-9,123807
miR-4521	-2,446895	miR-4720-5p	-2,100605	miR-1244	-2,213633
miR-6775-5p	-2,090983	miR-1294	-2,208191	miR-3152-3p	-2,209476
miR-6812-5p	-2,773216	mir-7977	-2,599889	miR-4461	-4,957188
miR-4459	-2,411278	miR-5100	-5,477699	miR-7852-3p	-4,640689
miR-25-5p	-2,311753	miR-7975	-3,357997	miR-4310	-4,088966
miR-3141	-2,617182	miR-125b-1-3p	-2,051572	miR-548ae	-2,762478
miR-7162-3p	-3,444873	miR-378i	-2,330215	miR-4797-5p	-2,169816
miR-7107-5p	-2,202636	miR-3180-3p	-4,503426	miR-1246	-2,03406
miR-92a-1-5p	-3,852604	miR-4286	-9,864227	miR-3201	-2,07403
miR-1246	-6,890024	miR-29b-2-5p	-4,373823	miR-491-5p	-2,07862
miR-6831-5p	-3,168711	miR-191-3p	-2,065398	miR-8060	-3,36475
miR-4669	-3,58614	miR-34c-5p	-2,8002	miR-8084	-2,23391
miR-197-5p	-2,238745	miR-378d	-2,406788	miR-2276-3p	-2,49744
miR-6778-5p	-3,271504	mir-548q	-2,199005	miR-1285-3p	-2,92365
miR-6819-5p	-2,640112	miR-1185-1-3p	-2,513011	miR-8085	-2,33386
miR-3911	-3,360102	miR-4797-5p	-2,130645	miR-510-5p	-2,36056
miR-6165	-2,110053	miR-378g	-2,444528		
miR-6127	-2,398316	miR-1298-3p	-3,393053		
miR-6086	-4,088135				

miR-6777-5p	-2,607436				
miR-200c-3p	-3,828627				
miR-222-5p	-3,173769				
miR-4732-5p	-2,373479				
miR-4534	-3,221956				
miR-629-3p	-2,104181				
miR-2392	-2,873215				
miR-4701-3p	-7,747232				
miR-138-1-3p	-2,783708				
miR-4788	-5,143263				
miR-6776-5p	-2,374049				
miR-4710	-4,597246				
miR-4800-5p	-2,393651				
miR-6769a-5p	-5,171737				
miR-6865-5p	-5,068578				
miR-374b-5p	-2,88899				
miR-4778-5p	-2,426228				
miR-4797-5p	-2,131911				
miR-3910	-2,772468				

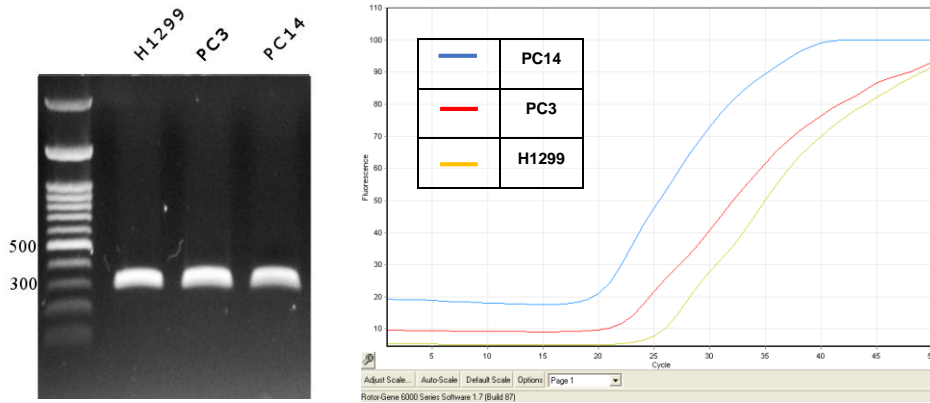
#### 4.5 ChIP sekans yöntemi ile NF- $\kappa$ B tarafından spesifik olarak transkripsiyonu indüklenen miRNA genlerinin tespiti

Materyal ve metod bölümünde de ayrıntılı olarak belirtildiği üzere PC14, PC3 ve H1299 hücreleri bir gece serumsuz besiyeri ile inkübe edildikten sonra 30 ng/ml TNF- $\alpha$  ile 8 saat muamele edildiler. İnkübasyon süresinin ardından ChIP için hücreler fixe edildi ve Millipore CHIP assay kit kullanılarak deney gerçekleştirildi. Buna göre ilk önce hücrelerden elde edilen genomik DNA ChIP sekans için istenilen ölçülerde sonikasyon ile fragmente edildi (Şekil 9).



**Şekil 9.** Sonikasyon öncesi örnek (H1299,PC3,PC14) DNA'larının jel görüntüsü (solda), sonikasyon sonrası örnek (H1299,PC3,PC14) DNA'larının jel görüntüsü (sağda).

ChIP yöntemi ile TNF- $\alpha$  uyarısından sonra NF- $\kappa$ B antikoru ile çöktürdüğümüz DNA parçacıklarının, gerçekten NF- $\kappa$ B nin spesifik olarak promotor bağlanma bölgesine bağlandığını doğrulamak için elde edilen örneklerin DNA'ları NF- $\kappa$ B'nin bağlandığı IKK'nın promotor bölgesine spesifik primerler (NF- $\kappa$ B için spesifik CHIP kit ve 17-10060 Katalog No'lu ChIPAb+ NF- $\kappa$ B p65 (RelA) - CHIP Validated Antibody and Primer Set Millipordan temin edildi) kullanılarak standart PCR ve qPCR yöntemleriyle gerçekleştirildi.



**Şekil 10.** ChIP yöntemi ile elde ettiğimiz örneklerin PCR doğrulaması sonucu agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü (solda), aynı örneklerin Real-time PCR ile doğrulanması (sağda).

ChIP-Sekans sonuçlarını değerlendirmek için kullanılan programlarla belirlediğimiz miRNA profiline bakıldığında, Toplamda 78 adet miRNA tespit edildi bunların bir kısmı sadece bir ve /veya iki hücre hattında tespit edilenleri de kapsamaktadır. Bu 78 miRNA'nın arasından DIANA TOOLS ve miranda databaseleri ile tahmini hedef genleri ve miRStart database'i ile

transkripsiyon başlama bölgelerinin tahmini gibi ayrıntılı biyoenformatik analizleri yapıp invazyonla ilişkili olabilecek miRNA'lar arandı. H1299, PC3, PC14 hücre hatlarında TNF- $\alpha$  indüklenmesi ile gerçekleşen NF-kB aktivasyonu ile düzenlendiği düşünülen ve invazyon ile ilişkisi olma ihtimali olan 16 adet miRNA tespit edildi (Tablo 4). ChIP-Sekans sonuçlarında ortaya çıkan bölgelerin miRNA düzenleme bölgeleri içerisinde yer aldığı ve NF-kB bağlanma bölgesi taşıdıklarından dolayı NF-kB tarafından düzenleniyor olarak kabul edildi.

**Tablo 4.** Biyoenformatik analizler sonucunda ChIP Sekans sonuçlarında belirlenen bölgelerde NF-kB bağlanma bölgesi ile alakalı olabilecek olan miRNA'lar.

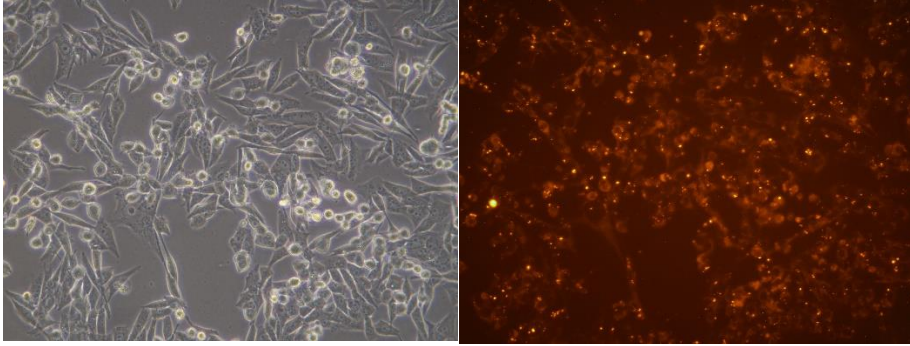
	miRNA	Pre-miRNA'ya olan Uzaklık	ChIP Sekans sonucu belirlenen Kromozom Bölgelerine ait diziler	DNA Bağlanma Motifi
H1299, PC3, PC14	miR-548h-5p	3kb	GGGATATAAAACATAATCAAGGAAATGACGGCAGAACAACCTTCC	nrGAAAnmC
	miR-548q	10kb	TTGAAATGTGGCCTTCTTCATCCAGAAATTTCCATGATGGCG	nGrrATTyCm
	miR-4651	21kb	TATGACCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGGGCTCAAGCAATCC	wnyCCTGGss
	miR-6814-3p	1,6kb	ATATCATGAGTAGCCAGAAATGTCTTTAGAGGAAAAGGGAAT	rGAGGrAwwk
	miR-138-5p	16kb	TTTGACCCAGTTAAACCATAAGGGACAGTCCAAATGGTGTGTTG	nGGAnwkTCC
	miR-548a-3p	10kb	TGTGTTCAAGTTCAATCCCGCTCCCTTTGTAGTCTTCCAGC	nCCyyTGTwk
	miR-8078	0,7kb	GCCAACATGTGAAACCCGTCTCTACTAAAAATCCAAAAATT	GkrAAAnyCCC
	miR-3179	2,5kb	GATTATAGGCATGAGTCACCACACCTGGCCAGGGCAAGTCCA	ssCCAGGGmw
	miR-548v	4,5kb	TTATTAAGGGAGGTTTTGGGAAAAGGAGTTTCACCAGCATGT	GGrnwTTCmC
	miR-548as-3p	7kb	AGCTTGTGCAGGGGAACCTCCATCTATAAAACCATCAGATTG	GGkwnyCCs
	miR-1203	9kb	GAACTTTGTCCAGGGAACCTCCACCTAGGTACTATATGAGGT	GGrnTTyCs
	miR-564	9kb	CTTGAATCCCCAAAACCAATGTGATTTGGGCTTTCCTTCCAAA	kGGrnTTyCC
	miR-769-5p	55kb	TAAAAAGTGAGGAGTTGGGCTTTCCTTCTTGATGGTGCTGTA	kGGrnTTyCC
	miR-1915	70kb	ATGGCGCTCCCCGTCTGGAGGGAAGTCCCACAGACTGGG	GGrAAAnnCCC
	miR-3607-5p	70kb	GCCATTATTGAAAACAGTATGGAGTTCCCCCAAAAACTAAA	GGrAAAnnCCC
	miR-7107-3p	80kb	GTAGATGGACCTATTCTGGAAATTCATTCTGATGGATTATAC	nGGrrAkyCC

Bulunan miRNA'ların projenin nihai hedefi olan invazyon ile alakalı olanlarını tespit edebilmek için DIANA-microT-CDS ([http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=MicroT\\_CDS/index](http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=MicroT_CDS/index)), miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) veritabanları kullanılarak miRNA'ların tahmini hedef genleri tespit edildi. DIANA-microT-CDS veritabanı'nda yapılan aramalarda miRNAların hedefleri için skor eşik değerleri 0,9 üstü olan hedef genler dikkate alındı. Elde edilen sonuçlar miRanda veritabanı'nda değerlendirilerek belirlenen hedeflerin tutarlılığı teyit edildi. Her iki veritabanı karşılaştırılarak örtüşen genler, miRNAların hedef genleri olması açısından güvenilir kabul edildi.

Analizler sonucunda belirlediğimiz miRNAların KHDAK'de invazyon ile alakalı olabilecek olanları tespit edebilmek için kullandığımız DIANA-microT-CDS ve miRanda skorları değerlendirilerek invazyon ile ilişkili olabilecek 16 miRNA belirlendi (Tablo 4).

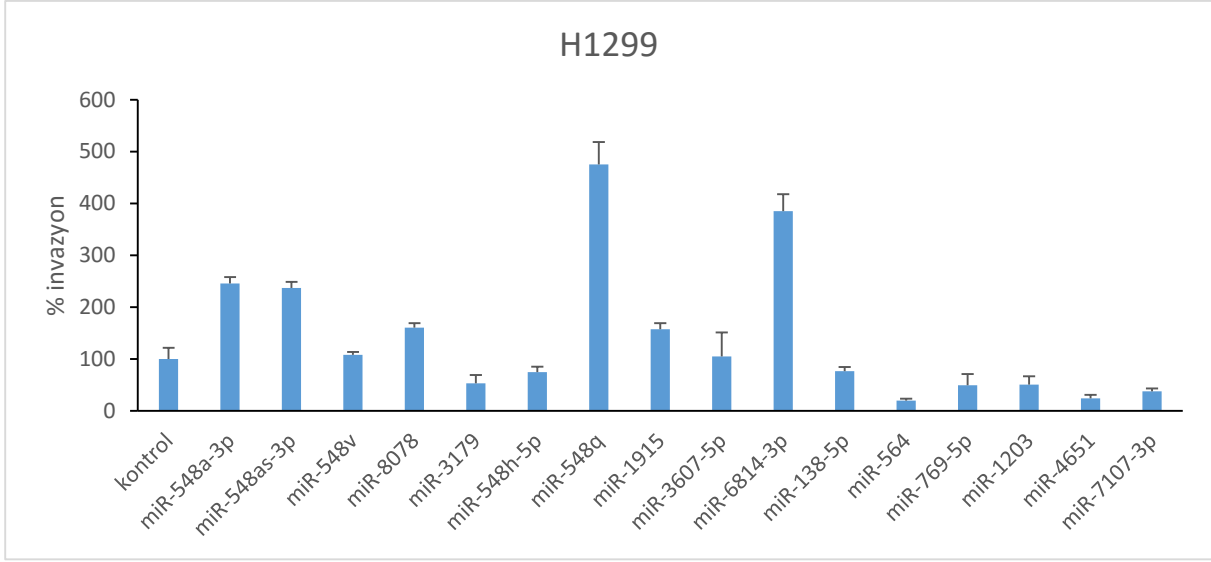
#### 4.6 Belirlenen miRNA'ların hücre invazyonuna olan etkileri

Yaptığımız biyoenformatik analizler doğrultusunda NF-kB ile uyarılıp invazyonla ilişkili olabilecek 16 miRNA geni saptanmıştır. Bu miRNAlar abm ve dharmacon firmalarında mimik olarak sentez ettirilip. Lipofectamin 2000 aracılığı ile PC3, PC14 ve H1299 hücrelerine transfekte edilmiş. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler sayılarak  $2,5 \times 10^4$ /well olacak şekilde invazyon odacıklarına ekilmiş ve 24 saat sonra invazyon odacığı içerisindeki invaziv olmayan hücreler uzaklaştırılıp invazyon metod bölümünde ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Dye547 florokrom konjige miRNA ile ilk önce transfeksiyon verimliliği belirlenmiştir (Şekil 11), verimlilik yeterli olduğu görülünce aynı şartlarda mimik miRNA transfeksiyonları gerçekleştirildi.



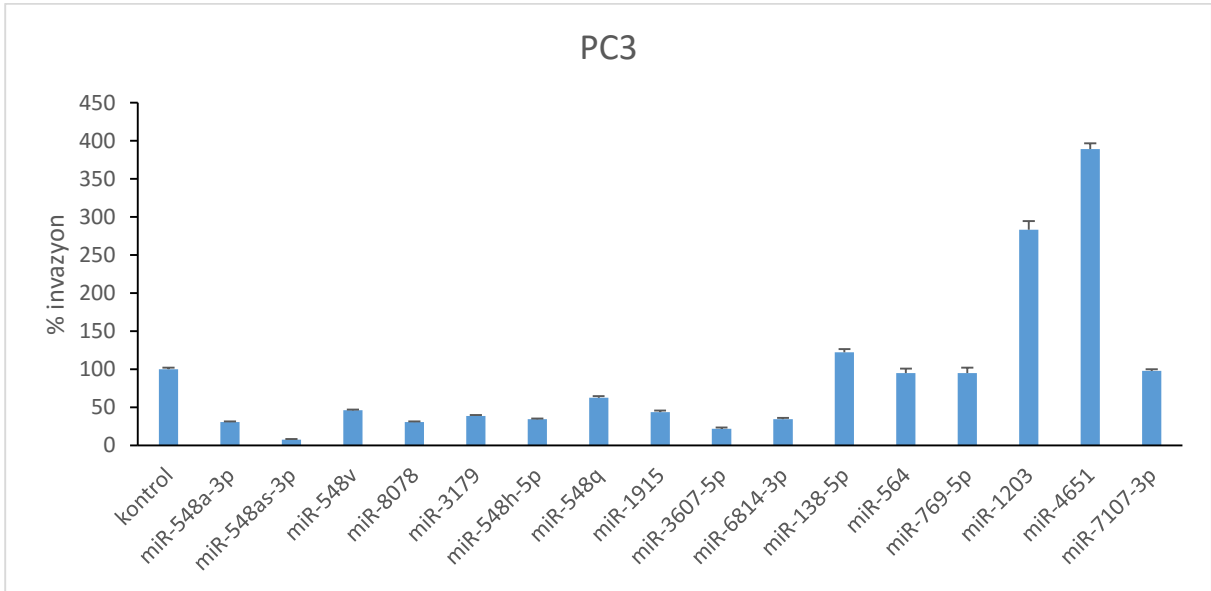
**Şekil 11.** miRNA transfeksiyon verimliliğinin saptanması.

Buna göre kontrol mimik miRNA ile transfekte edilen kontrol grubuna oranladığımızda H1299 hücrelerinde mir-548a-3p ve miR-548as-3p transfekte edilen H1299 hücrelerinde invazyon kontrole oranla 2.5 kat artarken, miR-8078 ve miR-1915 transfekte edilen H1299 hücrelerinde yaklaşık 1.8 kat arttığı, miR-6814-3p grubunda 4 kat, miR-548q grubunda yaklaşık 5 kat invazyonun arttığı görülmüştür. miR-3179, miR-548h-5p, miR-138-5p, miR-564, miR-769-5p, miR-1203, miR-4651 ve miR-7107-3p transfekte edilenlerde ise ilginç olarak invazyonun kontrole oranla baskılandığı görülmektedir (Şekil 12).



**Şekil 12.** H1299 hücre hattında belirlenen miRNA'ların invazyona olan etkileri.

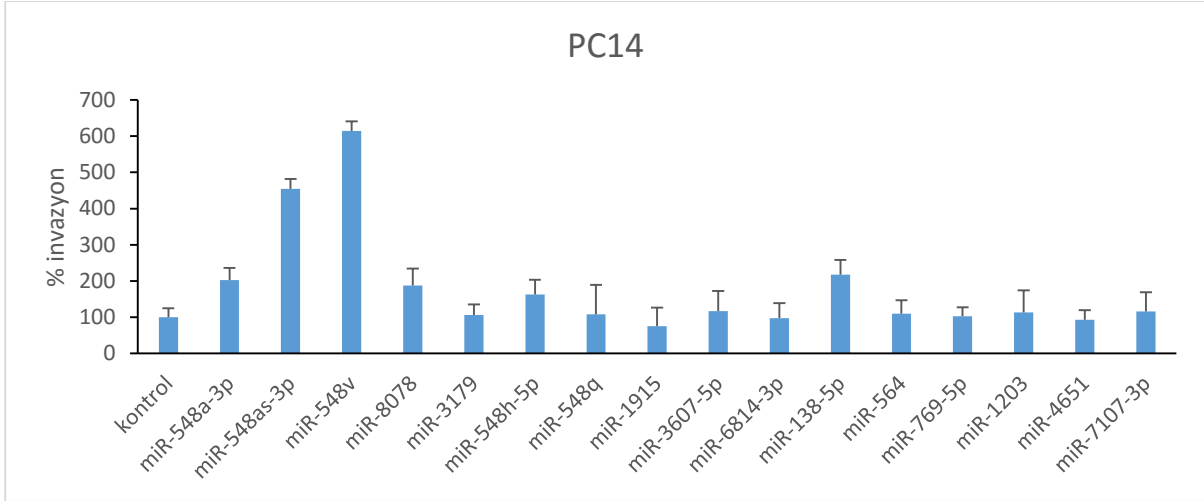
Aynı 16 miRNA mimik ile transfekte edilen PC3 hücrelerinde ise invazyon cevabı H1299 hücrelerinden oldukça farklı olmuştur. miR-138-5p transfekte edilenlerde invazyon kontrole oranla 1.3 kat artarken, miR-1203 2.8 kat ve miR-4651 transfeksiyonu ise yaklaşık olarak 4 kat arttırmıştır. miR-548a-3p, miR-548as-3p, miR-548v, miR-8078, miR-3179, miR-548h-5p, miR-548q, miR-1915, miR-3607-5p miR-6814-3p transfeksiyonu ise aynı hücrelerde invazyonu baskıladığı görülmüştür (Şekil 13).



**Şekil 13.** PC3 hücre hattında belirlenen miRNA'ların invazyona olan etkileri.

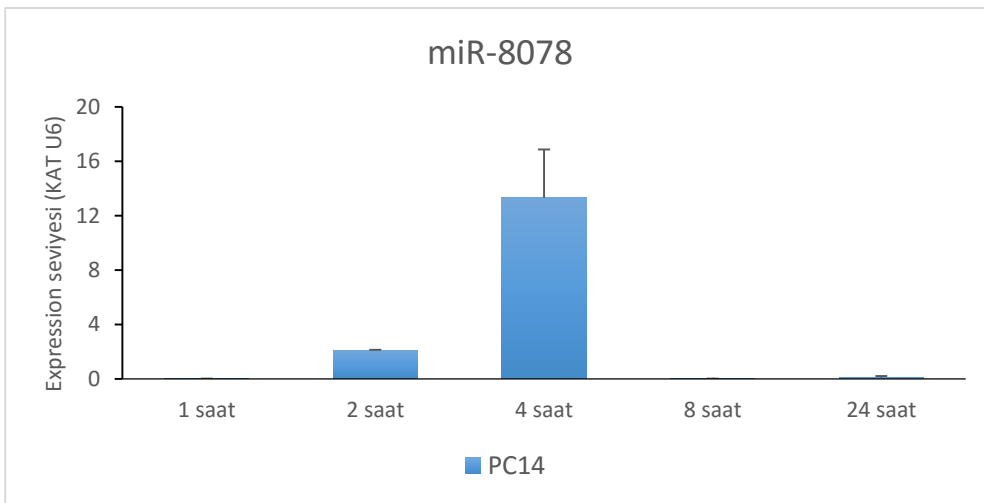
aynı 16 miRNA ile transfekte edilen PC14 hücrelerinde ise; miR-548a-3p, miR-8078, miR-548h-5p, miR-138-5p hücre invazyonunu yaklaşık 2 kat artırırken, miR-548as-3p 4.5 kat miR-548v 6.2 kat arttırmıştır. miR-3179, miR-548q, miR-3607-5p, miR-6814-3p, miR-564, miR-769-5p, miR-1203 ve miR-7107-3p tranfeksiyonu PC14 hücrelerinin invazyonuna etki

etmezken, miR-1915, miR-4651 transfeksiyonu PC14 hücrelerinin invazyonunu kontrole göre azalttığı görülmektedir (Şekil 14).



**Şekil 14.** PC14 hücre hattında belirlenen miRNA'ların invazyona olan etkileri.

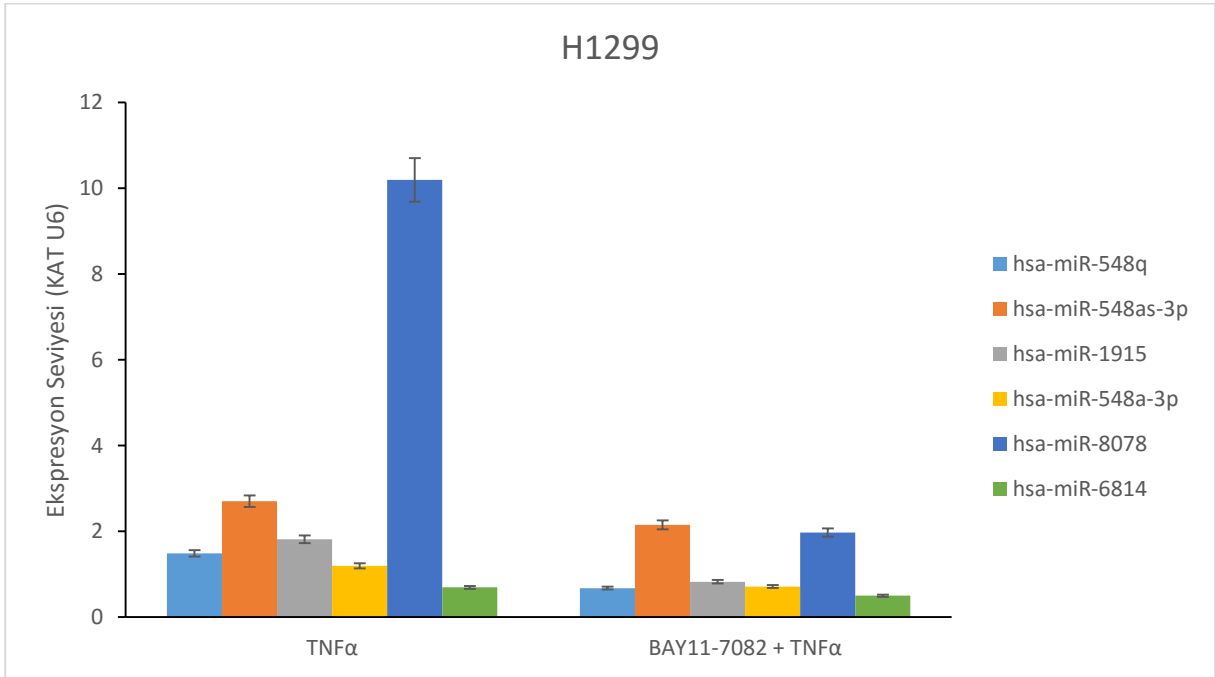
Sentezlediğimiz ve invazyona olan etkilerini araştırdığımız 16 miRNA mimiğün PC3, PC14 ve H1299 KHDAK hücrelerine invazyonlarına etkilerini saptadıktan sonra bu hücrelerde yüksek derecede invazyonu indükleyen miRNA'ların NF-kB tarafından düzenlenip düzenlenmediklerini qRT-PCR yöntemi ile analiz etmeyi uygun bulduk. miRNA mikroarray analizinin 24. saatte yapılmasından çıkan tutarsız sonuçlardan dolayı, her üç hücrede de CHIP ve biyoenformatik analizler sonucunda belirlediğimiz miRNA'lardan olan miR-8078 kullanılarak doğru zamanın bulunması için PC14 hücrelerini TNF- $\alpha$  (30ng/mL) ile 1., 2., 4., 8., ve 24. Saatlerde muamele ederek miRNA izole edilmiş ve qRT-PCR için uygun zaman aralığı 4.saat olarak belirlenmiştir (Şekil 15).



**Şekil 15.** TNF- $\alpha$  muamele edilen PC14 hücrelerinde 1., 2., 4., 8., ve 24. saatlerde miR-8078'in transkripsiyon seviyeleri.

TNF- $\alpha$  ile uyarılan hücrelerdeki miRNA transkripsiyon seviyesinin arttığı optimum saati belirledikten sonra PC3, PC14 ve H1299 hücrelerinde invazyonu arttırdığı tespit edilen miRNA'ların NF-kB ile ilişkisini saptamak için hücreler 6 well plate lere %70 yoğunlukta ekilerek 1 gün serum olmayan besiyerinde inkübe edildiler. Ardından TNF- $\alpha$  30 ng/ml, BAY11-7082 (10  $\mu$ M), önce 1 saat BAY11-7082 ve ardından TNF- $\alpha$  uygulanarak 4 saat inkübe edildiler. İnkübasyon süresinin ardından besi yeri uzaklaştırılıp, metod bölümünde bahsedildiği şekilde miRNA izolasyonları gerçekleştirildi.

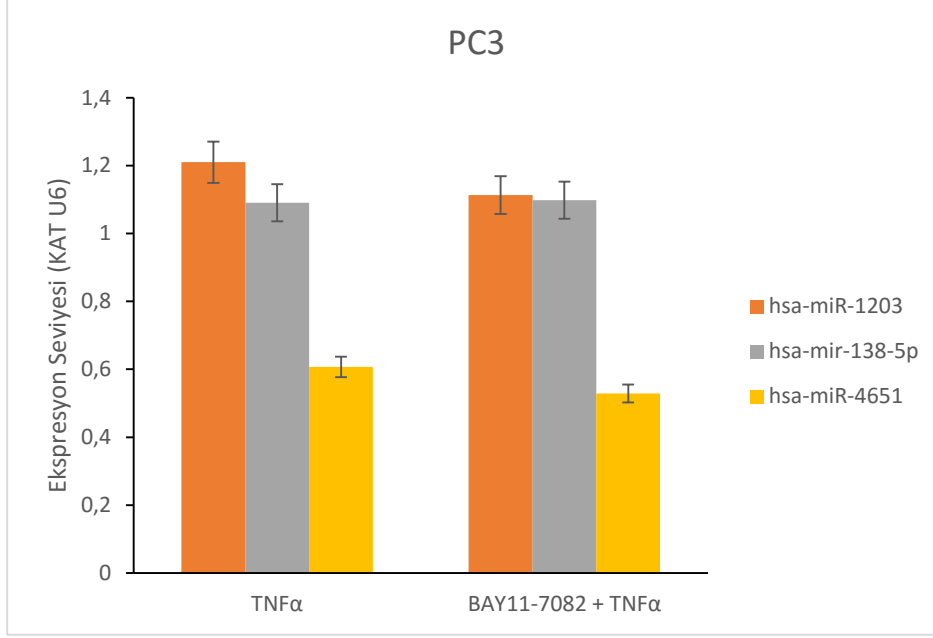
Buna göre şekil 16'te görüldüğü üzere H1299 hücrelerinde invazyonu arttıran mir-548q, mir-548a-3p, mir-584as-3p, mir-1915 ve mir-8078'in transkripsiyon seviyeleri TNF- $\alpha$  uyarımı ile artmakta spesifik NF-kB inhibitörü BAY11-7082 ise TNF- $\alpha$  in bu etkisini baskılamaktadır. İnvazyonu arttıran miR-6814-3p'de böyle bir artış görülmedi. Bu sonuçlar bize gerçekten mir-548q, mir-548a-3p, mir-584as-3p, mir-1915 ve mir-8078 miRNAların transkripsiyonunun NF-kB aktivitesi ile düzenlendiğini göstermektedir (Şekil 16).



**Şekil 16.** H1299 hücre hattında invazyonda etkili olan miRNA'ların qRT-PCR ile TNF- $\alpha$ , BAY11-7082, TNF- $\alpha$  ve BAY11-7082'nin beraber uygulandığındaki transkripsiyon seviyeleri değişimleri

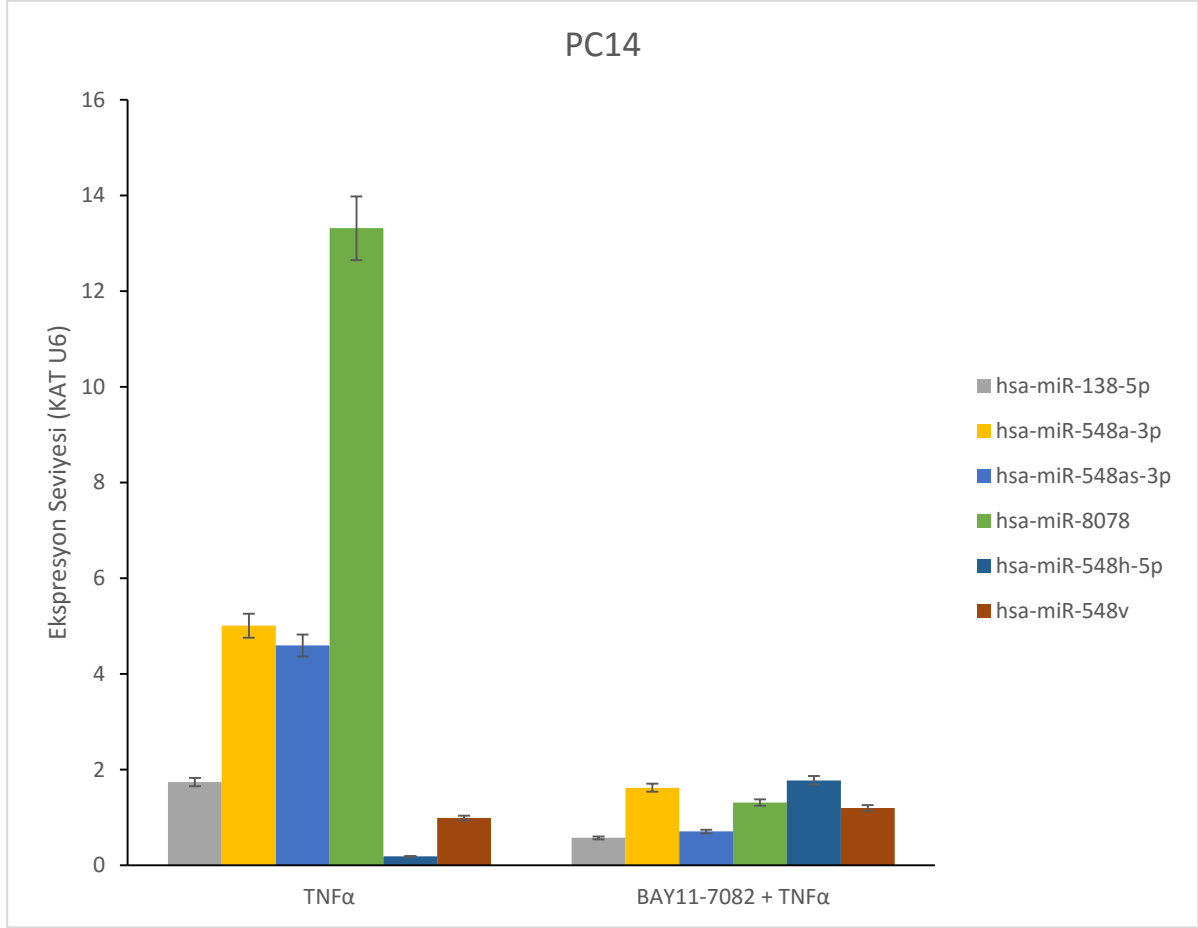
PC3 hücrelerinde ise hücrelerinde invazyonu arttıran mir-138-5p, mir-1203 ve mir-4651 miRNA'larından yalnızca miR-1203'ün transkripsiyon seviyesi TNF- $\alpha$  uyarımı ile artmakta spesifik NF-kB inhibitörü BAY11-7082 ise TNF- $\alpha$  in bu etkisini baskılamaktadır. miR-138-5p ve miR-4651'de böyle bir sonuç alınamadı. Bu sonuçlar bize gerçekten miR-1203'ün transkripsiyonunun NF-kB aktivitesi ile düzenlendiğini göstermektedir (Şekil 17).





**Şekil 17.** PC3 hücre hattında invazyonda etkili olan miRNA'ların qRT-PCR ile TNF- $\alpha$ , BAY11-7082, TNF- $\alpha$  ve BAY11-7082'nin beraber uygulandığındaki transkripsiyon seviyesi değişimleri

PC14 hücrelerinde invazyonu arttıran mir-548v, mir-548h-5p, mir-138-5p, mir-548a-3p, mir-548as-3p ve mir-8078 miRNA'larının içinden miR-548a-3p, miR-548as-3p, miR-8078 ve miR-138-5p'nin transkripsiyon düzeyleri TNF- $\alpha$  uyarımı ile artmakta spesifik NF-kB inhibitörü BAY11-7082 ise TNF- $\alpha$  nın bu etkisini baskılamaktadır. miR-548v ve miR-548h-5p'de böyle bir durum gözlenmedi. Bu sonuçlar bize gerçekten miR-548a-3p, miR-548as-3p, miR-8078 ve miR-138-5p'nin transkripsiyonunun NF-kB aktivitesi ile düzenlendiğini göstermektedir (Şekil 18).



**Şekil 18.** PC14 hücre hattında invazyonda etkili olan miRNA'ların qRT-PCR ile TNF- $\alpha$ , BAY11-7082, TNF- $\alpha$  ve BAY11-7082'nin beraber uygulandığındaki transkripsiyon seviyesi değişimleri

## 5. TARTIŞMA

KHDAK hücrelerinde TNF- $\alpha$  indüklenen NF-kB aktivasyonu ile upregüle olan ve invazyondan sorumlu miRNA'ların tespit edilmesi amaçlı yaptığımız çalışmamızda H1299, PC14 ve PC3 hücrelerinde 8 adet miRNA tespit edildi (miR-548a-3p, miR-548as-3p, miR-8078, miR-138-5p, miR-1915, miR-548q, miR-1203, miR-6814-3p). Bu miRNA'lerden miR-548a-3p, miR-548as-3p ve miR-8078, H1299 ve PC14 KHDAK hücrelerinde invazyonu arttıran ortak miRNA'lar olarak tespit edilmişlerdir. Bu miRNA'lar daha az invaziv özellikte olan PC3 hücrelerinde saptanamamıştır. Buda beklenen bir sonuçtur. Çünkü, PC3 hücreleri, H1299 ve PC14 hücrelerine göre daha az invaziv karakterdedir. Belirlediğimiz miRNA'ların NF-kB tarafından düzenlenip düzenlenmediğini tespit edebilmek için qRT-PCR deneyi gerçekleştirdik. TNF- $\alpha$  ile 4 saat muamele ettiğimiz hücrelerde artan, spesifik NF-kB inhibitörü BAY11-7082 + TNF- $\alpha$  ile muamele edildiğinde transkripsiyon seviyelerinin azaldığının görülmesi miRNA'ların NF-kB tarafından düzenleniyor olduğu göstermektedir. Yapılan literatür taramalarında da aşağıda bahsedileceği gibi, bu miRNA'ların NF-kB ile düzenlendiğinin gösterildiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla literatür için yeni bir bulgudur. 3 tane iki hücrede (H1299 ve PC14) ortak olarak tespit ettiğimiz miRNA'lar ile ilgili literatür taramaları sonucunda miR548a-3p'nin, yumurtalık kanserinde yapılmış bir çalışmada kontrol grubuna göre upregüle olduğu gösterilmiştir (Ayaz vd., 2014). Bir diğer Huh-7 karaciğer kanser hücrelerinde yapılmış olan bir çalışmada miR-548a'nın migrasyonu arttırdığı gösterilmiştir (Li vd., 2015). miR-548a-3p'nin akciğer kanserinde ve NF-kB ile ilişkisinin olduğunun gösterildiği çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sonuçlar bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Çalışmamızda da miR-548a-3p'nin invazyonu arttırıcı bir etki göstermesi ve DIANA TOOLS ve miRanda gibi databaselerde tahmini hedef genleri arasında PTEN gibi invazyonu baskılayıcı genlerin bulunması, miR-548a-3p'nin KHDAK'de invazyondan sorumlu yeni bir onkomir olduğunu göstermektedir. miR-548as-3p hakkında yapılan literatür taramalarında, meme kanseri hastalarında yapılmış çalışmada sağlıklı hastalara oranla yüksek seviyede eksprese olduğu gösterilmiştir (Matamala vd., 2015). miR-548as-3p hakkında akciğer kanseri ve NF-kB ile ilişkili herhangi bir çalışmaya yaptığımız literatür taramasında rastlanmamıştır. miR-548as-3p'nin tahmini hedef genlerine bakıldığında yine miR-548a-3p gibi tümör supresör gen PTEN'i hedef aldığı tespit edilmiştir. Bu durumda bulgularımızı destekler niteliktedir. TNF- $\alpha$  indüklü NF-kB tarafından düzenlenerek H1299 ve PC14 hücrelerinde invazyonu arttırdığı tespit edilen miR-8078 ile ilgili literatürde herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır. Tahimini hedef genleri tespiti çalışmalarımızda da kayda değer bir veriye rastlamadık. miR-8078'de miR-548a-3p ve miR-548as-3p gibi KHDAK'de invazyonu indükleyen yeni bir miRNA olarak gözükmemektedir.

Yalnızca H1299 hücresinde tespit edilen miR-548q, miR-1915 ve miR-6814-3p'nin hem invazyonu arttırdığı hem de transkripsiyonlarının NF-kB tarafından indüklendiği sonuçlarımızda açıkça görülmektedir (Şekil 12,16). Literatüre bakıldığında miR-548q ile ilgili KHDAK'ta herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yalnızca böbrek ve nazofarenks kanserinde potensiyel biyomarkır olabileceğine dair bilgi bulunmaktadır (Ferraz da Costa vd., 2012; Tan vd., 2014). miR-1915'in A549 KHDAK hücrelerinde yapılmış olan bir çalışmada p53 tarafından indüklenerek antiapoptotik gen olan Bcl-2'yi hedefleyerek apoptozisin indüklendiği gösterilmiştir (Nakazawa vd., 2014). Yine A549 KDAK hücresinin kullanıldığı başka bir çalışma da miR-1915'in tümör dokularında düşük seviye de eksprese olduğu tespit edilmiştir (Pan vd., 2015). Böbrek kanser hücrelerinde yapılmış bir araştırma da metastatik kanser türünde miR-1915'in upregüle olduğunu göstermişlerdir (White vd., 2011). miR-1915'in farklı kanser çeşitlerinde göstermiş olduğu zıt rolün hücre çeşidine göre farklılık gösterebildiği, yapılan birçok literatür çalışmalarında ortaya konmuştur. Biz bu çalışmamız ile ilk defa miR-1915'in KHDAK invazyonunu arttırdığı ve bunu NF-kB tarafından transkripsiyonunun uyarılarak gerçekleştirdiğini gösteriyoruz. Çalışmamızda kullanılan H1299 hücresi için invazyonu arttıran onkomir olarak gözükmemektedir. H1299'da invazyonu arttıran miR-6814-3p ile ilgili herhangi bir literatür bilgisine rastlanmadı.

Yalnızca PC3 hücrelerinde tespit edilen miR-1203'ün KHDAK ile ilişkili olduğu bir çalışma bulunmamakla birlikte, prostat kanserinde biyomarkır olarak kullanılabileceği Haldrup ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Haldrup vd., 2013). Hela hücreleriyle yapılan bir çalışmada miR-1203'ün EGFR mRNA'sını hedef aldığını belirtmişler (Yamaguchi vd., 2012). Küçük Hücreli Akciğer kanseri hastalarında yapılmış bir çalışmada miR-1203'ün tümörün tekrar nüksettiği hastalarda upregüle olduğu tespit edilmiştir (Okumura vd., 2015).

PC14 hücrelerinde NF-kB tarafından düzenlenerek invazyonu indükleyen miR-138-5p'nin, H1975 KHDAK hücrelerinde G-coupled reseptör 124'ü hedef alarak gefitinibe olan direnci azalttığı tespit edilmiştir (Gao vd., 2014). Yu ve arkadaşlarının pankreas kanserinde yapmış oldukları çalışmada miR-138-5p'nin FOXC1 genini hedefleyerek hücre döngüsünü düzenlediğini ve miR-138-5p'nin aşırı ifadesinin pankreas kanseri için yepyeni bir tedavi yaklaşımı olabileceğini ifade etmişlerdir (Yu vd., 2015). miR-548v ile ilgili yapılan literatür çalışmalarında endometeryum kanseri ile ilgili yapılan bir çalışma da upregüle olduğu tespit edilmiştir (Widodo vd., 2016). İnvazyon ve NF-kB ile ilgili herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. DIANA TOOLS ve miRanda database'lerinde hedef gen tespiti analizlerinde tümör supresör olan PTEN mRNA'sını hedef aldığı gözükmemektedir. Bu durum PC14 hücrelerinde miR-548v'nin invazyonu arttırmasını açıklayabilir niteliktedir. Elde ettiğimiz bulgularda bazı miRNA'ların invazyon üzerine farklı etkiler göstermiştir. Örneğin, miR-1915, miR-138-5p ve miR-548h-5p'nin invaziv karakteri sahip H1299 ve PC14 hücrelerinde

invazyonda farklı etkilere sahiptir. Bu durum literatürde, miRNA'ların kanser çeşidinde hatta aynı kanser çeşidinde farklı hücre hatlarında dahi zıt etki gösterebileceği şeklinde açıklanmaktadır.

Tespit edilen 8 adet miRNA (miR-548a-3p, miR-548as-3p, miR-8078, miR-138-5p, miR-1915, miR-548q, miR-1203, miR-6814-3p) hakkında literatürde KHDAK'inde NF-kB ve invazyon ile ilişkisinin gösterildiği bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile bu miRNA'lar literatüre kazandırılmış olacaktır. 8 miRNA'dan 3 tanesinin (miR-548a-3p, miR-548as-3p ve miR-8078) invaziv karakterli olan KHDAK hücrelerine (H1299, PC14) özgü olduğu görülmektedir.

Yaptığımız miRNA mikroarray analizlerindeki sonuçları qRT-PCR ile yapılan analiz sonuçları ile karşılaştırdığımızda herhangi bir tutarlılığa rastlamadık. Bunun nedeni, miRNA mikroarray çalışmaları için TNF- $\alpha$  ve BAY11-7082 uygulamaları için tek bir saati deneyecek bütçeye sahip olmamızdan dolayıdır. miRNA mikroarray için TNF- $\alpha$  uygulamasının süresi için literatür taramaları sonucunda belirlediğimiz 24 saatin çalışmamız için uygun olmadığını daha sonra yapmış olduğumuz qRT-PCR çalışmalarında tespit etmiş olduk. qRT-PCR çalışmalarında gerçekleştirdiğimiz zaman eğrisi çalışmalarında TNF- $\alpha$  ile indüklendiği bilinen bazı miRNA'lar ile yaptığımız analizlerde en uygun zamanın 4.saat olduğunu tespit ettik. Bu durum, NF-kB tarafından indüklendiğini düşündüğümüz miRNA'ları belirlemek için miRNA mikroarray analiz sonuçlarını değerlendirme dışı bırakmamıza neden oldu.

Sonuçlarımız açıkça göstermektedir ki, KHDAK hücrelerinde TNF- $\alpha$  ile indüklenen NF-kB aktivitesi hücre invazyonunu bazı miRNA gen transkripsiyon seviyelerini arttırarak indüklemektedir. Literatür için bu yeni bir bulgudur. Bu miRNA'ların NF-kB tarafından başka transkripsiyon faktörlerinin indüklenmesi aracılığı ile dolaylı olarak mı yoksa direk olarak mı düzenlendiğinin tespit edilebilmesi için ve hangi genleri hedefleyerek invazyonu indüklediğinin araştırılması mekanizmanın tam çözümü için zorunludur. Bizim projemiz miRNAların saptanmasına yönelik çalışmaları kapsamaktadır. Hedef genlerinin bulunması, miRNA/hedef genleri ile spesifik ilişkisinin gösterilmesi gerekmektedir. Bu konuda bir proje önerisi yazılması planlanmaktadır.

## Kaynaklar

- Aggarwal, B. B. 2004. "Nuclear factor-kappaB: the enemy within." *Cancer Cell*, 6(3): 203-208.
- Ahmad, J., S. E. Hasnain, M. A. Siddiqui, M. Ahamed, J. Musarrat and A. A. Al-Khedhairi 2013. "MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: A new paradigm." *The Indian Journal of Medical Research*, 137(4): 680-694.
- Anrather, J., V. Csizmadia, C. Brostjan, M. P. Soares, F. H. Bach and H. Winkler 1997. "Inhibition of bovine endothelial cell activation in vitro by regulated expression of a transdominant inhibitor of NF-kappa B." *Journal of Clinical Investigation*, 99(4): 763-772.
- Ayaz, L., F. Cayan, S. Balci, A. Gorur, S. Akbayir, H. Yildirim Yaroglu, N. Dogruer Unal and L. Tamer 2014. "Circulating microRNA expression profiles in ovarian cancer." *J Obstet Gynaecol*, 34(7): 620-624.
- Baldwin, A. S. 1996. "THE NF- $\kappa$ B AND I $\kappa$ B PROTEINS: New Discoveries and Insights." *Annual Review of Immunology*, 14(1): 649-681.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon 2001. "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature*, 409(6818): 363-366.
- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura and R. Shiekhattar 2005. "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." *Nature*, 436(7051): 740-744.
- Ferraz da Costa, D. C., F. A. Casanova, J. Quarti, M. S. Malheiros, D. Sanches, P. S. Dos Santos, E. Fialho and J. L. Silva 2012. "Transient transfection of a wild-type p53 gene triggers resveratrol-induced apoptosis in cancer cells." *PLoS One*, 7(11): e48746.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya and N. Sonenberg 2008. "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?", *Nat Rev Genet*, 9(2): 102-114.
- Gao, Y., X. Fan, W. Li, W. Ping, Y. Deng and X. Fu 2014. "miR-138-5p reverses gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells via negatively regulating G protein-coupled receptor 124." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(1): 179-186.
- Gregory, R. I., T. P. Chendrimada, N. Cooch and R. Shiekhattar 2005. "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing." *Cell*, 123(4): 631-640.
- Gregory, R. I., K.-p. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch and R. Shiekhattar 2004. "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature*, 432(7014): 235-240.
- Gustin, J. A., O. N. Ozes, H. Akca, R. Pincheira, L. D. Mayo, Q. Li, J. R. Guzman, C. K. Korgaonkar and D. B. Donner 2004. "Cell type-specific expression of the I $\kappa$ B kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF-kappa B activation." *J Biol Chem*, 279(3): 1615-1620.
- Haldrup, C., N. Kosaka, T. Ochiya, M. Borre, S. Høyer, T. F. Orntoft and K. D. Sorensen 2013. "Profiling of circulating microRNAs for prostate cancer biomarker discovery." *Drug Delivery and Translational Research*, 4(1): 19-30.
- Hendrickson, D. G., D. J. Hogan, H. L. McCullough, J. W. Myers, D. Herschlag, J. E. Ferrell and P. O. Brown 2009. "Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA." *PLoS Biol*, 7(11): e1000238.
- Hurst, D. R., M. D. Edmonds and D. R. Welch 2009. "Metastamir: the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading." *Cancer Res*, 69(19): 7495-7498.
- Jeon, Y. J., J. Middleton, T. Kim, A. Lagana, C. Piovan, P. Secchiero, G. J. Nuovo, R. Cui, P. Joshi, G. Romano, G. Di Leva, B. K. Lee, H. L. Sun, Y. Kim, P. Fadda, H. Alder, M. Garofalo and C. M. Croce 2015. "A set of NF-kappaB-regulated microRNAs induces acquired TRAIL resistance in lung cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(26): E3355-3364.

- Karin, M. and A. Lin 2002. "NF-kappaB at the crossroads of life and death." *Nat Immunol*, 3(3): 221-227.
- Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones 2011. "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue): D152-157.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl 2001. "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." *Science*, 294(5543): 853-858.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim 2004. "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *Embo j*, 23(20): 4051-4060.
- Li, Y., D. Xu, C. Bao, Y. Zhang, D. Chen, F. Zhao, J. Ding, L. Liang, Q. Wang, L. Liu, J. Li, M. Yao, S. Huang and X. He 2015. "MicroRNA-135b, a HSF1 target, promotes tumor invasion and metastasis by regulating RECK and EVI5 in hepatocellular carcinoma." *Oncotarget*, 6(4): 2421-2433.
- Lim, C.-A., F. Yao, J. J.-Y. Wong, J. George, H. Xu, K. P. Chiu, W.-K. Sung, L. Lipovich, V. B. Vega, J. Chen, A. Shahab, X. D. Zhao, M. Hibberd, C.-L. Wei, B. Lim, H.-H. Ng, Y. Ruan and K.-C. Chin 2007. "Genome-wide Mapping of RELA(p65) Binding Identifies E2F1 as a Transcriptional Activator Recruited by NF-kB upon TLR4 Activation." *Molecular Cell*, 27(4): 622-635.
- Lin, S. and R. I. Gregory 2015. "MicroRNA biogenesis pathways in cancer." *Nat Rev Cancer*, 15(6): 321-333.
- Lytle, J. R., T. A. Yario and J. A. Steitz 2007. "Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(23): 9667-9672.
- Matamala, N., M. T. Vargas, R. Gonzalez-Campora, R. Minambres, J. I. Arias, P. Menendez, E. Andres-Leon, G. Gomez-Lopez, K. Yanowsky, J. Calvete-Candenas, L. Inglada-Perez, B. Martinez-Delgado and J. Benitez 2015. "Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection." *Clin Chem*, 61(8): 1098-1106.
- Mehlen, P. and A. Puisieux 2006. "Metastasis: a question of life or death." *Nat Rev Cancer*, 6(6): 449-458.
- Nakazawa, K., N. Dashzeveg and K. Yoshida 2014. "Tumor suppressor p53 induces miR-1915 processing to inhibit Bcl-2 in the apoptotic response to DNA damage." *Febs j*, 281(13): 2937-2944.
- Okumura, T., Y. Shimada, T. Omura, K. Hirano, T. Nagata and K. Tsukada 2015. "MicroRNA profiles to predict postoperative prognosis in patients with small cell carcinoma of the esophagus." *Anticancer Res*, 35(2): 719-727.
- Ozes, O. N., L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer and D. B. Donner 1999. "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase." *Nature*, 401(6748): 82-85.
- Pan, H.-L., Z.-S. Wen, Y.-C. Huang, X. Cheng, G.-Z. Wang, Y.-C. Zhou, Z.-Y. Wang, Y.-Q. Guo, Y. Cao and G.-B. Zhou 2015. "Down-regulation of microRNA-144 in air pollution-related lung cancer." *Scientific Reports*, 5: 14331.
- Saunders, M. A., H. Liang and W. H. Li 2007. "Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(9): 3300-3305.
- Sun, K. X., Y. Chen, S. Chen, B. L. Liu, M. X. Feng, Z. H. Zong and Y. Zhao 2016. "The correlation between microRNA490-3p and TGFalpha in endometrial carcinoma tumorigenesis and progression." *Oncotarget*.
- Tan, G., X. Tang and F. Tang 2014. "The role of microRNAs in nasopharyngeal carcinoma." *Tumor Biology*, 36(1): 69-79.
- Tsuchiya, D., C. Gonzalez and S. Laceyfield 2011. "The spindle checkpoint protein Mad2 regulates APC/C activity during prometaphase and metaphase of meiosis I in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell*, 22(16): 2848-2861.
- White, N. M. A., H. W. Z. Khella, J. Grigull, S. Adzovic, Y. M. Youssef, R. J. Honey, R. Stewart, K. T. Pace, G. A. Bjarnason, M. A. S. Jewett, A. J. Evans, M. Gabril and G. M. Yousef 2011. "miRNA profiling in metastatic renal cell carcinoma reveals a tumour-suppressor effect for miR-215." *Br J Cancer*, 105(11): 1741-1749.



- Widodo, M. S. Djati and M. Rifa'i 2016. "Role of MicroRNAs in carcinogenesis that potential for biomarker of endometrial cancer." *Annals of Medicine and Surgery*, 7: 9-13.
- Xing, Y., Y. Yang, F. Zhou and J. Wang 2013. "Characterization of genome-wide binding of NF- $\kappa$ B in TNF $\alpha$ -stimulated HeLa cells." *Gene*, 526(2): 142-149.
- Yamaguchi, G., M. Takanashi, M. Tanaka, K. Fujita, T. Ohira, M. Kuroda and N. Ikeda 2012. "Isolation of miRNAs that target EGFR mRNA in human lung cancer." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(2): 411-416.
- Yanokura, M., K. Banno, M. Iida, H. Irie, K. Umene, K. Masuda, Y. Kobayashi, E. Tominaga and D. Aoki 2015. "MicroRNAs in endometrial cancer: recent advances and potential clinical applications." *Excli j*, 14: 190-198.
- Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara and B. R. Cullen 2003. "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev*, 17(24): 3011-3016.
- Yu, C., M. Wang, Z. Li, J. Xiao, F. Peng, X. Guo, Y. Deng, J. Jiang and C. Sun 2015. "MicroRNA-138-5p regulates pancreatic cancer cell growth through targeting FOXC1." *Cellular Oncology*, 38(3): 173-181.



**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. HAKAN AKÇA
Proje No:	112S636
Proje Başlığı:	Transkripsiyonel Faktör NfκB İçin Hedef miRNA Genlerinin Saptanması ve NfκB Tarafından İndüklenen miRNA'ların NSCLC İnvazyonu Üzerindeki Olası Etki Mekanizmalarının Araştırılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. TIP F. TEMEL TIP BİLİMLERİ B. TIBBİ BİYOLOJİ ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2013 - 15/04/2016
Onaylanan Bütçe:	369400.0
Harcanan Bütçe:	341890.36
Öz:	<p>Akciğer kanseri, tüm dünyada kanser ilişkili ölümlerde birinci sırada gelmektedir. Akciğer kanseri hastalarının ölüm sebebinin yaklaşık %90'ı metastazdan dolayıdır. İnvazyon, kanser hücrelerinin metastaz yapması için kritik ve önemli adımdır. Önceki çalışmamızda KHDAK'de, Akt/NF-κB yolağının sürekli aktif olduğunu ve hücre invazyonu uyardığını ve PTEN'in bu yolağı inhibe ederek invazyonu baskıladığını göstermiştik. Bu çalışmada TNF-α uyarımlı NF-κB aktivasyonu ile KHDAK invazyonunu indükleyen miRNA'ları belirlemeyi amaçladık. TNF-α tarafından aktive edilen NF-κB aracılı miRNAların tespiti için ChIP kit (Kromozom immunipresitasyon kiti) kullanıldı. H1299, PC14, PC3 hücreleri ChIP yöntemi için TNF-α (30ng/ml) muamale edildiler. Kromotin örnekleri 250-500 bp fragment aralığında 3 hücre için hazırlandı. ChIP sekans ile okunan kromotin bölgeleri biyoenformatik araçlar kullanılarak analiz edildi. NF-κB ile ilişkili ve KHDAK invazyonunda potansiyel rolleri olan miRNAların bulunması için ayrıca bir bioinformatic analiz de yapılmıştır. NF-κB tarafından aktive edilip KHDAK invazyonu ile ilişkili olabilecek 16 miRNA saptandı. İlk olarak H1299, PC14 ve PC3 hücreleri bu 16 mimik miRNA ile transfekte edildi ve onların KHDAK invazyonuna etkileri invazyon chamber yöntemi ile araştırıldı. Sonuçlarımız açıkça göstermektedir ki; miR-548a-3p, miR-548as-3p, miR-8078, miR-1915, miR-6814-3p, miR-548q mimikleri H1299 hücre invazyonunu, miR-548v, miR-548h-5p, miR-138-5p, miR-548a-3p, miR-548as-3p ve miR-8078 mimikleri PC14 hücre invazyonunu, miR-138-5p, miR-1203, miR-4651 mimikleri PC3 hücre invazyonunu indüklemektedirler. Biz bu yukarıda saptadığımız invazyonu indükleyen miRNAların NF-κB tarafından düzenlendiğinden emin olmak için sonuçlarımızı RT-PCR ile doğrulamak istedik.</p> <p>Sonuç olarak, miR-548q, miR-548a-3p, miR-548as-3p, miR-1915 ve miR-8078 H1299 hücrelerinde, miR-138-5p, miR-548a-3p, miR-548as-3p ve miR-8078 PC14'de, miR-1203 ise PC3 de hücre invazyonunu indüklediği ve bu miRNA genlerinin transkripsiyonlarının NF-κB tarafından pozitif yönde regüle edildiğini bulmuş olduk.</p>
Anahtar Kelimeler:	KHDAK, TNF-α, NF-κB, miRNA, ChIP.
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- NFκB mediated induction of miRNA genes expression is responsible for NSCLC invasion (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 2- The inhibitory effects of several NFκB specific inhibitors on NFκB activity and cellular invasion on PC3, PC14 and H1299 NSCLC cell lines. (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),