

siRNA TEDAV S NDE B YOK MYASAL  
DE ERLEND RMELER

BIOCHEMICAL EVALUATIONS OF siRNA THERAPY

GÖKNUR KARA

PROF. DR. EM R BAK DENKBA

Tez Danı manı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü E itim-Ö retim ve Sınav Yönetmeli inin

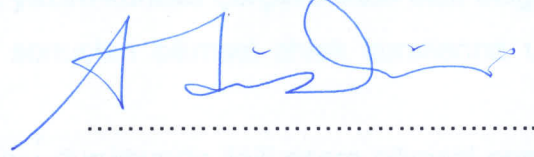
Kimya Anabilim Dalı için Öngördü ü

YÜKSEK L SANSTEZ olarak hazırlanmı tır.

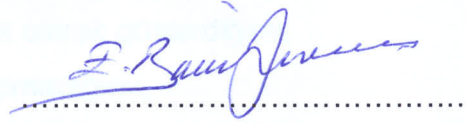
2014

GÖKNUR KARA' nın hazırladığı "siRNA Tedavisinde Biyokimyasal Değerlendirmeler" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA ANABİLİM DALI' nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

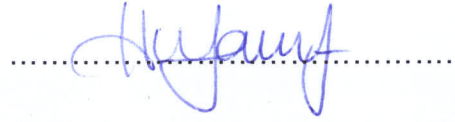
Prof. Dr. Adil DENİZLİ  
Başkan



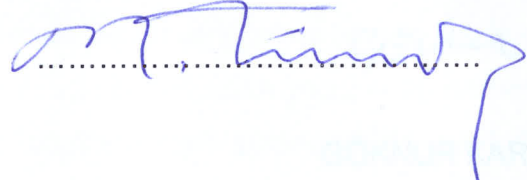
Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ  
Danışman



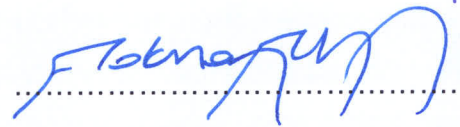
Doç. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ  
Üye



Doç. Dr. Mustafa TÜRK  
Üye



Doç. Dr. Lokman UZUN  
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri tez yazım kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili esere bilimsel nomlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

03 / 02 / 2014



GÖKNUR KARA

## ÖZET

siRNA TEDAVİSİNDE BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRMELER

Göknur KARA

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAZ

Ekim 2014, 85 sayfa

siRNA'ya dayalı RNAi mekanizması kullanılarak gen ifadenmesinin baskılanması sadece spesifik genlerin ifadesini araştırmada değil aynı zamanda viral enfeksiyonlar, genetik ve kardiyovasküler rahatsızlıklar ve kanser gibi hastalıklar için gelecek vaat eden bir gen terapisi tekniğidir. Kanser tedavisinde tek bir geni bloke etmek, hastalığı yok etmede çoğu zaman yeterli gelmez, bunun için birden fazla yola inel zamanlı inhibisyonu veya gen susturma stratejisinin başka tedavi yöntemleriyle kombine edilmesi gerekmektedir. Geleneksel kanser tedavisi yaklaşımlarından olan kemoterapi, sağlıklı hücrelere de zararı nedeniyle yerini, bu etkiyi bertaraf edecek yeni nesil tedavilere bırakmaktadır. Son yıllarda geleneksel kemoterapi ve yeni geliştirilen siRNA'ya dayalı tedavilerin kombinasyonu araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Böylece kemoterapötik ilaçların ve siRNA tedavisinin birlikte uygulanması, düşük doz ilaç kullanımını sağlayarak kemoterapinin yan etkilerinin azalmasına izin verir.

Sunulan tez çalışmasında ABCE1 spesifik siRNA, 5-FU ve irinotecan antikanser ajanlarıyla beraber kanser hücreleriyle etkileştirilerek, kanser tedavisinde kombine terapinin etkinliğini ve ABCE1 siRNA'nın potansiyel klinik kullanımını araştırmak ve

kanser hücrelerinin ilaç hassasiyetlerini arttırmak hedeflenmiştir. Çalışmanın ilk bölümünde 5-FU ve irinotecan ilaçlarının A 549 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Daha sonra bu ilaçların düşük dozları ve ABCE1 siRNA birlikte ve ayrı şekilde kanser hücrelerine verilmiştir. siRNA transfeksiyon reaktifi olarak ticari taşıyıcı kullanılmıştır. ABCE1 siRNA'nın, düşük derinlerdeki antikanser ilaçlarının etkinliğini artırıp artırmadığını incelemek amacıyla hücre proliferasyonu RTCA ile analiz edilmiştir. MTT testi yapılarak kombine tedavinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Ölen hücreleri morfolojik açıdan incelemek amacıyla apoptoz/nekroz ikili boyaması yapılmıştır. Çalışmanın ikinci kısmında hücrelerde ABCE1'in spesifik siRNA ile inhibe edildiği e zamanlı RT-PCR analiziyle gösterilmiştir. Ayrıca ABCE1 siRNA'nın ilaçlarla beraber kombine tedavi eklinin, kanser yollarında apoptozu ve hücre döngüsünü ya da hücre büyümesini regüle eden yollarda BCL-2 ve mTOR genlerinin hücresel düzeydeki seviyesine etkisini incelemek amacıyla e zamanlı RT-PCR analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, ABCE1 siRNA ve kemoterapötik ajanların kombinasyonunun kanser tedavisinde etkin bir terapötik seçenek olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: ABCE1, 5-FU, irinotecan, siRNA tedavisi, kombine kanser tedavisi.

## ABSTRACT

### BIOCHEMICAL EVALUATIONS OF siRNA THERAPY

Göknur KARA

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Emir Baki DENKBA

February 2014, 85 pages

Inhibition of gene expression by using RNAi is a promising gene therapy technique due to its use for not only investigation of specific gene functions, at the same time for therapies of various diseases such as viral infections, genetic diseases, cardiovascular disorders and cancer. In cancer therapy blocking of one single gene isn't sufficient many times to suppress the disease for that reason simultaneously inhibition of multiple pathways or combination of gene silencing strategy with other therapies are necessary. Chemotherapy, one of the conventional approach of cancer treatment, due to its harm to also healthy cells leaves its place to new generation therapies that eliminate this effect. In recent years combination of conventional chemotherapy and siRNA based new developed therapies drew attention of researchers. Thus, combined application of chemodrugs and siRNA therapy allows usage of low dose drugs and reduction the side effects of chemotherapy.

The aim of the presented study is to investigate the effect of combined therapy for cancer treatment and the potential clinical utility of ABCE1 specific siRNA and to enhance chemodrug sensitivity of cancer cells via co-delivery of ABCE1 siRNA with anticancer agents, 5-FU and irinotecan, together to cancer cells. In first part of the

study the cytotoxic effects of 5-FU and irinotecan on A 549 lung cancer cells were determined. Furthermore, the combined administration of both ABCE1 siRNA and low doses of chemodrugs into cancer cells was examined. A commercial carrier was used as siRNA transfection reagent. Cell proliferation was determined by RTCA whether ABCE1 siRNA increased the activity of chemodrugs with low doses. MTT test was carried out to examine cytotoxic effects of combined administration. Moreover, apoptosis/necrosis double staining was performed to investigate the morphology of dead cells. In the second part of the study the inhibition of ABCE1 by specific siRNA was demonstrated by Real Time RT-PCR analysis. Besides Real Time RT-PCR analysis was also carried out to investigate the effect of combination therapy on BCL-2 and mTOR genes that regulate cancer apoptosis and cell cycle or growth pathways. Our results suggest that combination treatment using ABCE1 siRNA and chemotherapeutic agents may be an effective therapeutic option for lung cancer.

Keywords: ABCE1, 5-FU, irinotecan, siRNA therapy, combined cancer therapy.

## TE EKKÜR

Tez çalı mam boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, deste ini ve zamanını esirgemeyen, de erli katkılarından dolayı sevgili danış man hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkba 'a,

Bana laboratuvarını açan, tez çalı malarımındaki büyük yardımı, deste i ve de erli fikirleri için sevgili hocam Doç. Dr. Mustafa Türk'e,

Bilgisiyle ve fikirleriyle tezimin olu masına katkıda bulunan sevgili hocam Doç. Dr. Nuray Yazıhan'a,

Tez çalı ması süresince ihtiyacım oldu u her an yanımda olan, bana sürekli moral veren, en zor anlarımdaki yardımlarını, desteklerini, dostluklarını benden esirgemeyen canım arkadaş larım Deniz rem Bulut, Didem Mimiro lu, Ebru Erdal, Sema Tuncer ve Zeynep Karahalilo lu'na,

Çalı malarımındaki yardımları ve e lenceli arkadaş lıklarından dolayı Aslı A ar, Canan Çakır Çoban, Esra Arat, Özlem Tutar, Rümeyya Akçapınar ve Selçuk Toklucu'ya,

Tez çalı malarım boyunca hiçbir yardım iste imi geri çevirmeyen, yüzümü güldüren, bana hep destek olan sevgili çalı ma arkadaş larım Biyopolimerik Sistemler Ara tırma Grubu (BSRG) üyeleri Ali Örs, Betül Bozdo an Pala, Cem Bayram, Didem Aksoy Körpe, Eda Yalçın, Murat Demirbilek, Soheil Malekghasemi, Tamer Çırak, Tayfun Vural ve U ur Aydın'a

Beni bugünlere getiren, bana her zaman güvenen, sonsuz sevgilerini ve desteklerini her zaman hissettiren canım aileme,

Sonsuz te ekkürlerimi sunarım.

Göknur KARA



## Ç NDEK LER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TE EKKÜR .....	v
Ç NDEK LER .....	vi
EK LLER .....	ix
Ç ZELGELER .....	xii
S MGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
1. G R .....	1
2. GENEL B LG LER .....	4
2.1. Gen Terapisi .....	4
2.1.1. Gen Tedavisi Yakla ımları .....	5
2.1.1.1. Somatik Hücre Gen Tedavisi .....	5
2.1.1.2. E ey Hücre Gen Tedavisi .....	6
2.2. Gen Susturma Stratejileri .....	6
2.2.1. Antisens Teknolojileri .....	8
2.2.1.1. RNA nterferans .....	9
2.2.1.1.1. RNA nterferans Mekanizması .....	11
2.2.1.1.1.1. siRNA .....	12
2.2.1.1.1.2. Dicer Enzimi .....	15
2.2.1.1.1.3. RISC .....	16
2.2.1.1.2. RNA nterferansın Terapötik Uygulama Alanları .....	17
2.3. Akci er Kanseri .....	18
2.4. ABCE1 Proteini .....	19

2.4.1. ABCE1 proteini IFN-Ba ımlı 2-5A/RNase L Sistemini nhibe Eder.....	20
2.4.2. ABCE1 Proteini Ökaryotik Translasyonla Yakından li kilidir.....	22
2.4.3. ABCE1 Proteini Tümörle ili kilidir .....	22
2.4.4. ABCE1 Proteini Kemodirençte Etkindir.....	23
2.5. 5-Florourasil .....	24
2.6. rinotecan .....	25
3.DENEYSEL ÇALI MALAR .....	26
3.1. Kimyasallar ve Malzemeler.....	26
3.2. In vitro Antikanser laç-siRNA Hücre Etkile imleri .....	27
3.2.1 Hücrelerin Hazırlanması .....	28
3.2.2. Sitotoksosite Testi (MTT).....	29
3.2.2.1. Antikanser laçların A 549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitelerinin Belirlenmesi.....	31
3.2.2.2. ABCE1 siRNA'nın A 549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitesinin Ara tırılması.....	31
3.2.2.3. ABCE1 siRNA/Antikanser laçların A 549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitelerinin Ara tırılması.....	32
3.2.3. ABCE1 siRNA/Antikanser laçların A 549 Hücreleri Üzerindeki Proliferasyonun xCELLigence RTCA ile Belirlenmesi .....	34
3.2.4. kili Boyama Yöntemi le Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi .....	36
3.2.4.1 kili Boyama Metodu .....	37
3.2.5. E Zamanlı RT-PCR Çalı maları.....	39
3.2.5.1. RNA zolasyonu.....	40
3.2.5.2. cDNA Sentezi .....	43
3.2.5.3. E Zamanlı RT-PCR Primer Analizi.....	44

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTI MA .....	46
4.1. Antikanser laç-siRNA Hücre Etkile im Sonuçları.....	46
4.1.1. Antikanser laçların A 549 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi .....	46
4.1.2. ABCE1 siRNA'nın A 549 Hücreleri Üzerine Etkisi .....	47
4.1.3. ABCE1 siRNA/Antikanser laçların Kombine Etkisinin A 549 Hücreleri Üzerine Sitotoksitesisi.....	50
4.1.4. Apoptoz/Nekroz kili Boyama Sonuçları.....	55
4.1.4.1. kili Boyama le Elde Edilen Apoptotik ndeks Sonuçları .....	55
4.1.4.2. kili Boyama le Elde Edilen Nekrotik ndeks Sonuçları .....	60
4.1.3. E Zamanlı RT-PCR Analizi Sonuçları .....	64
4.1.3.1. RNA zolasyonu .....	64
4.1.3.2. cDNA zolasyonu .....	65
4.1.3.3. E Zamanlı RT-PCR Primer Analizi .....	66
5. SONUÇLAR .....	71
KAYNAKLAR .....	74
ÖZGEÇM .....	85

## EK LLER

### Sayfa

ekil 2.1. Dünyada klinik gen tedavisi çalı malarının hastalıklara göre da ılımı .....	41
ekil 2.2. In vivo gen tedavisi .....	5
ekil 2.3. Ex vivo gen tedavisi .....	6
ekil 2.4. Gen Susturucu Ajanın Etkisi .....	47
ekil 2.5. Farklı antisens stratejilerinin kar ıla tırılması .....	19
ekil 2.6. Petunia'da chs geninin ekspresyonunun baskılanması ile de en pigmentasyon .....	104
ekil 2.7. RNAi mekanizması .....	124
ekil 2.8. Her iki ucunda 2 adet e le memi baz bulunan çift sarmal RNA .....	134
ekil 2.9. miRNA ve siRNA yolları .....	141
ekil 2.10. Dicer Enziminin domain yapısı .....	115
ekil 2.11. Argonaute proteinin domain yapısı .....	16
4 ekil 2.12. Akci er lobunda kanser kütlesi görünümü .....	18
ekil 2.13. 2-5A/RNase L sisteminin antiviral ve antitümör aktivitesini gösteren moleküler yola ı .....	421
ekil 2.14. Urasil ve 5-Floro-Urasil'in kimyasal yapıları .....	24
ekil 2.15. rinotecan hidroklorürün kimyasal yapısı .....	425
ekil 3.1. A 549 hücrelerinin görüntüsü .....	28
ekil 3.2. MTT yapısında tetrazolyum tuzları formazan kristallerine dönü mesinin ematik gösterimi .....	430
ekil 3.3. Apoptoz ve nekrozun morfolojik görünümleri .....	437

Formatted: Font: Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: (Default) Arial, 12 pt, Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: (Default) Arial, 12 pt, Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: (Default) Arial, 12 pt, Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: (Default) Arial, 12 pt, Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: Not Bold, Do not check spelling or grammar

ekil 4.1. 5-FU'nun A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi.....	46
ekil 4.2. Irinotecan'ın A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi.....	447
ekil 4.3. ABCE1 siRNA'nın hücre ço alması üzerine etkileri .....	48
ekil 4.4. ABCE1 siRNA'nın A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi.....	48
ekil 4.5. ABCE1 siRNA/5-FU'in hücre ço alması üzerine etkileri .....	450
ekil 4.6. ABCE1 siRNA/5-FU'nun A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi .....	51
ekil 4.7. ABCE1 siRNA/ rinotecan'ın hücre ço alması üzerine etkileri.....	452
ekil 4.8. ABCE1 siRNA/Irinotecan'ın A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi .....	53
ekil 4.9. ABCE1 siRNA/5-FU + Irinotecan'ın hücre ço alması üzerine etkileri .....	54
ekil 4.10. ABCE1 siRNA/5-FU + Irinotecan'ın A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi .....	455
ekil 4.11. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan kili boyamadan elde edilen apoptotik hücre foto rafları .....	457
ekil 4.12. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan kili boyamadan elde edilen apoptotik hüce foto rafları .....	458
ekil 4.13. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan kili boyamadan elde edilen apoptotik hüce foto rafları .....	594
ekil 4.14. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan kili boyamadan elde edilen apoptotik hüce foto rafları .....	60
ekil 4.15. Hoechst 33342 ve P floresan boya kullanılarak elde edilen nekrotik hücre foto rafları.....	62
ekil 4.16. Hoechst 33342 ve PI floresan boya kullanılarak elde edilen hücrelerin nekrotik foto rafları .....	63
ekil 4.17. Farklı deri imlerdeki siRNA'nın ABCE1, BCL-2 ve mTOR mRNA düzeylerine etkisi .....	66

Formatted: Font: Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: (Default) Arial, 12 pt, Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: (Default) Arial, 12 pt, Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: (Default) Arial, 12 pt, Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: (Default) Arial, 12 pt, Not Bold, Do not check spelling or grammar

Formatted: Font: (Default) Arial, 12 pt, Not Bold, Do not check spelling or grammar

ekil 4.18. 25 nM siRNA ABCE1'nin 1 $\mu$ M 5-FU ile muamele edilmi hücrelerde ABCE1, BCL-2 ve mTOR mRNA düzeylerine etkisi .....	68
ekil 4.19. 25 nM siRNA ABCE1'nin 1 $\mu$ M IH ile muamele edilmi hücrelerde ABCE1, BCL-2 ve mTOR mRNA düzeylerine etkisi .....	69

## ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 3.1. A 549 hücrelerinin hücre kültür ortamı .....	294
Çizelge 3.2. 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler üzerine eklenen gruplar .....	334
Çizelge 3.3. 96 e-plate'e ekilen hücreler üzerine eklenen gruplar .....	35
Çizelge 3.4. 48 kuyucuklu plaka ekilen hücreler üzerine eklenen gruplar .....	374
Çizelge 3.5. 6 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler üzerine eklenen gruplar .....	404
Çizelge 3.6. Tek bir reaksiyon için PCR komponent karışımı.....	44
Çizelge 3.7. Roche LightCycler 480 koşulları.....	45
Çizelge 4.1 siRNA'nın ve kanser ilaçları 5-FU, irinotecan ve 5-FU + irinotecanın ve bu ilaçların siRNA ile birlikte ve ayrı ayrı akciğer kanser hücre kültürlerinde etkiletilmeleri sonucu elde edilen % apoptotik indeksler.....	56
Çizelge 4.2. Kanser ilaçları 5-FU, irinotecan ve 5-FU + irinotecanın ve bu ilaçların siRNA ile birlikte ve ayrı ayrı akciğer kanser hücre kültürlerinde etkiletilmeleri sonucu elde edilen % nekrotik indeksler.....	61
Çizelge 4.3. Örneklerin RNA derinimleri.....	64
Çizelge 4.4. Örneklerin cDNA derinimleri.....	65

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Kısaltmalar

ABC	ATP Baılayıcı Kaset
ADA	Adenozin Deaminaz
BCL-2	B-Hücreli Lenfoma 2
cDNA	Komplementer DNA
chs	Chalcon Sentaz Enzimi
Cl	Hücre İndeksi
cLAP2	Hücresel Apoptoz İnhibitörü 2
CPT-11	Camptothecin-11 (irinotecan)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dsRNA	Çift Zincirli RNA
dTMP	Deoksitimidin monofosfat
DMSO	Dimetil sülfoksit
eIF	Ökaryotik Translasyon Baılama Faktörü
eRF	Ökaryotik Sonlandırma Faktörü
5-FU	5-Florourasil
FdUMP	Florodeoksiüridin Monofosfat
FITC	Florescein izotiyosyanat
FCS	Fetal Buza ı Serum
gDNA	Genomik DNA



GE2	gDNA Eliminasyon Tamponu
GMP	Gemcitabin monofosfat
HCl	Hidroklorik Asit
HP68	Host Protein
HPV	nsan Papilloma Virüsü
IC <sub>50</sub>	nhibisyon Konsantrasyonu
IFN	nterferon
IH	rinotecan
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	MikroRNA
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
MTC	Meduller Tiroid Karsinom
mTOR	Memeli Rapamisin Hedefi
Nek 2	NIMA- Ba ımlı Kinaz 2
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
Plk 1	Polo-Benzeri Kinaz 1
PI	Propidyum yodür
PTGS	Post-Transkripsiyonel Gen Susturulması
RET	Transfeksiyon esnasında yeniden düzenlenen gen
RISC	RNA - ndükleyici Susturucu Kompleks
RLI	RNAz L nhibitörü

RNA	Ribonükleik Asit
RNAi	RNA interferans
RNAz	Ribonükleaz
RNAz-L	Ribonükleaz -L
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
RT-PCR	Geri Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Siatemi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
siRNA	Küçük Engelleyici RNA
TGS	Transkripsiyonel Gen Susturulması

## 1. G R

Gen tedavisi, genetik rahatsızlıkları düzeltmek amacıyla terapötik etkiye sahip nükleik asitlerin hücrelere aktarılması i lemidir [1]. Birçok gen terapisi uygulamaları, hasarlı genin eski haline geri getirilip iyile tirilmesinin sa lanması veya gene hücre fenotipinde de i iklik yaratacak yeni bir fonksiyon kazandırma üzerine yo unla masına ra men nükleik asitler kullanılarak fonksiyon inhibisyonuna dayalı geli en tedavi ekillerine ilgi de günden güne artmaktadır. İlk olarak bitki ve mantarlarda post-transkripsiyonel susturma, daha sonra hayvan hücrelerinde RNA interferans olarak bilinen spesifik genlerin inhibisyonuna dayalı bu teknolojiler gen fonksiyon çalı malarında, ilaç hedeflerinin tanımlanma yöntemlerinin geli tirilmesinde ve bir çok hastalı ın tedavisinde umut vaat edici potansiyele sahiptir [2].

Mayalardan memeli hücrelerine tüm ökaryotlarda korunmu olan RNAi, hücrenin sitoplazmasında gerçekleşen, mRNA seviyesinde hedef gen ekspresyonunun durdurulması ile sonuçlanan do al bir kontrol mekanizmasıdır [3; 4]. RNAi aslında hücrede normal bir savunma sisteminin katalitik yolunu aktive eder. Bu i lemin temeli, hedef mRNA zincirine komplementer bir çift zincirli RNA'nın tek zincirini kullanmaktır. RNA interferans, Dicer adı verilen bir RNaz III enzimi tarafından çift zincirli RNA'nın küçük engelleyici RNA'lara (siRNA) kesilmesi ile ba lamaktadır [5]. 21-23 nükleotid uzunlu unda, çift zincirli, protein kodlamayan ve gen ifadesinin negatif düzenleyicisi olan siRNA, RNAi yola ının anahtar molekülüdür [6; 7]. Bu siRNA molekülü daha sonra multiprotein-RNA nükleaz kompleksi olan RNA-indükleyici susturucu kompleks (RISC) ile ba lanır ve bu yapı, ba lı siRNA'ya komplementer mRNA'yı bulmak için tüm hücre içi mRNA'ları tarar. Hedef mRNA, RISC kompleksi tarafından kesilir ve neticede hedef genin translasyonu inhibe edilerek ilgili protein ifadenmesi bloke edilmi olunur [8].

siRNA aracılı RNA interferans mekanizması biyolojik ara tırmalar için ileri düzeyde çok amaçlı bir araç oldu u gibi viral enfeksiyonlar, genetik hastalıklar, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve kanser gibi de i ik hastalıklar için gelecek vaat eden bir terapötik stratejidir [9]. Bununla beraber bir çok kanser türünde hastalı ı yok etmek için tek bir

geni baskılamak yeterli olmaz, birden fazla yola ı e zamanlı inhibe etmek veya gen susturmayı ba ka terapilerle kombine etmek gerekebilir [10].

Kanser dünyadaki ölüm oranlarının ana sebeplerinden birisidir ve kanserin görülme sıklı ı gün geçtikçe artmaya devam etmektedir [11]. Kanser tedavisinde tek terapötik stratejiye dayalı terapi yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Farklı mekanizmalara sahip iki veya daha fazla terapötik yakla ımların i birli i halindeki kombinasyonu kanser geli imini önleyebilir. Bu ekildeki yeni yakla ım terapötikler, sinerjistik veya kombine etkileriyle kanser tedavisinde etkili, umut vaat edici stratejiler haline gelmi tir [12].

Akci er kanseri, malign tümör açısından dünya genelinde di er kanser çe itlerine oranla en yüksek etkiye sahip olmakla beraber adenokarsinom en patolojik türlerinden biridir. Akci er kanserinin bilinmeyen geli imsel mekanizmasından, erken metastaz etkisinden, radyasyon ve kemoterapiye direnç göstermesinden dolayı hastaların kurtulma ınsı çok dü üktür. Bu nedenle, akci er kanserinin te hisinde ve tedavisinde etkin ve bu hastalı ın geli iminde rol oynayan yeni bulunmu ğenlerin incelenmesine ve yeni nesil terapötik ajanların geli tirilmesine ihtiyaç duyulur [13]. Son yıllarda geleneksel kemoterapi ve yeni geli tirilen siRNA'ya dayalı tedavilerin kombinasyonu ara tırmacıların dikkatini çekmi tir [12]. Kemoterapötik ilaçların farklı etkilerle kombine edilmesi ayrıca daha dü ük dozların kullanılmasına ve tolere edilemeyen yan etkilerin azaltılmasına da izin verir [14].

ATP ba layıcı kaset (ABC) proteinleri ailesinden olan ABCE1 proteini Ribonükleaz L (RNAz-L) inhibitörü olarak faaliyet göstermesinin yanında, tümör hücre proliferasyonu ve anti apoptoz gibi biyolojik fonksiyonlara sahiptir [15-17]. 19 tane ilaç dirençli hücre tipinde ABCE1 gen ekspresyonunun amplifike olması bu genin kemodirenç mekanizmasında etkin olabilce ini dü ündürmü tür [18]. Ayrıca ABCE1'in kanser patolojisinde ve geli iminde oldukça önemli olan translasyon mekanizmasının ba lama adımında esansiyel olması, bu proteininin i levini kaybetmesiyle tümör hücrelerinin hassasla abilece i dü ünülmü ve ABCE1'in terapötikler için potansiyel hedef olmasını sa lamı tır [19].

Sunulan alı manın hedefi, akci er adenokarsinom hücrelerinin, kemoterapide kullanılan 5-FU ve irinotecan ilaçların dü ük dozlarına kar ı hassasiyetlerini arttırmak için akci er adenokarsinomun geli iminde ve ilerlemesinde rolü oldu u bilinen ABCE1 proteinini siRNA ile baskılayıp ilaçlarla birlikte hücrelerde kombinasyon tedavi uygulamak ve etkilerini incelemektir. Bunun için A 549 hücrelerinde MTT testi yapılarak ilaçların doza ba ımlı hücre canlılık grafikleri elde edilmiştir. Belirlenen dü ük ilaç deri imleri ve farklı deri imlerdeki ABCE1 siRNA'ların tümör hücreleri üzerindeki kombine etkisini görmek adına RTCA ile hücre sayımı yapılmı ve zamana ba lı hücre proliferasyonlarına bakılmıştır. Ayrıca kombine tedavi ekleinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi de incelenmiştir. İkinci kısmında apoptoz/nekroz ikili boyaması yapılarak siRNA'nın, ilaçların tümör hücreleri üzerindeki tekli ve ikili etkisini arttırıp arttırmadığını veya bu etkiyi nasıl devam ettirdiğini incelemek için hücre ölümü morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Çalı manın son bölümünde siRNA ile baskılanan ABCE1 geninin ifadenme seviyesini göstermek için e zamanlı RT-PCR uygulaması yapılmıştır. Ayrıca aynı teknikte tekli ilaç, ikili ilaç ve siRNA ile birlikte hazırlanan formlarının hücrelere uygulanmasından sonra anti-apoptoz ve hücre büyümesi yollarında etkin BCL-2 ve mTOR genlerinin de hücresel ifadenme seviyeleri analiz edilmiştir.

## 2. GENEL B LG LER

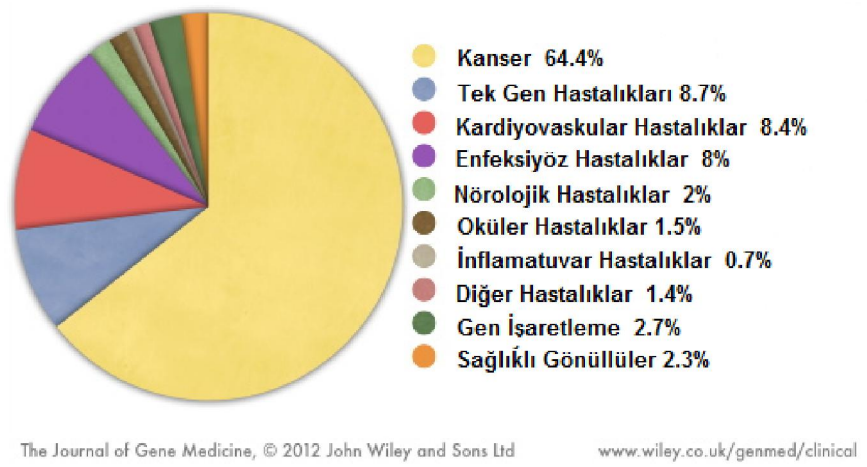
### 2.1. Gen Terapisi

Kromozomların üzerinde bulunan genler, hücre için hayati öneme sahip proteinlerin üretilmesinde etkili en küçük genetik birimdir. Genlerde meydana gelen herhangi bir mutasyon, protein i levini de i tirmesi sebebiyle hastalığı a yol açabilir. [20].

Gen tedavisi temel olarak, genetik ve enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde klinik yarar sağlamak için terapötik etkiye sahip genetik materyalin hedeflendirilmi spesifik hücreye veya dokuya minimum toksisite ile transfer edilmesi ekinde tanımlanabilir [21-23]. Gen transfer stratejileriyle, bir genin i levi engellenebilir, eski haline geri getirilip iyile tirilmesi sa lanabilir veya gene yeni bir fonksiyon kazandırılabilir [21].

nsanda ilk gen terapisi denemesi 1990 yılında Dr. French Anderson ve ekibi tarafından Adenozin deaminaz (ADA) enziminin eksikli inden kaynaklanan hastalığı a sahip iki çocukta uygulanmı tır. Tedavide ex vivo gen terapisi stratejisi ve gen taşıyıcı olarak retrovirüs kullanan bilim adamları uzun süren a ılama i lemleri sonucunda olumlu sonuçlar almı lardır [24].

Günümüzde gen tedavisi klinik uygulamaları ba lıca kanser, tek gen hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar ve enfeksiyöz hastalıklar üzerine yo unla mı tır.



ekil 2.1. Dünyada klinik gen tedavisi çalı malarının hastalıklara göre dağılımı, 2012.

### 2.1.1. Gen Tedavisi Yaklaşımları

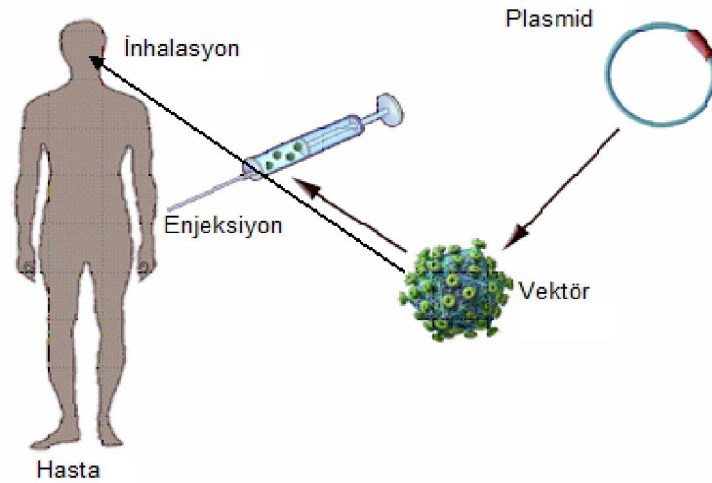
Gen tedavisi "somatik hücre gen tedavisi" ve "eşey hücre gen tedavisi" olmak üzere iki farklı şekilde yapılabilir.

#### 2.1.1.1. Somatik Hücre Gen Tedavisi

Somatik hücre gen tedavisinde, terapötik genler hasta somatik hücrelerine transfer edilir. Bu yaklaşımda ortaya çıkan etkiler hasta ile sınırlı olmakta ve hastanın çocuklarına veya sonraki kuşaklara aktarılmamaktadır [25].

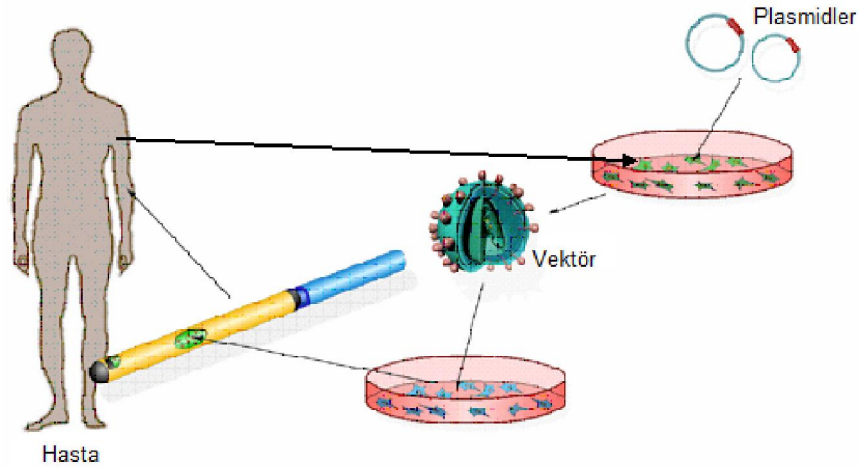
Somatik hücre gen tedavisi "in vivo" ve "ex vivo" olmak üzere iki şekilde yapılır. Yöntemlerden hangisinin uygulanacağı hedef hücrenin yapısının bilinmesine, terapötik genin ve salınım sisteminin iyi seçilmesine bağlıdır [26].

In vivo gen tedavisinde genetik materyal aktarımı hücreler hastanın vücudunda doğal yerleşim yerindeyken gerçekleştirilir [27].



ekil 2.2. In vivo gen tedavisi [28].

Ex vivo gen tedavisinde ise hastadan alınan hedef hücreler kültür edildikten sonra uygun terapötik gen transfer işlemi gerçekleştirilir ve ardından tedavi edilmiş hücreler hastaya geri verilir. Yöntemin başarısı hedef hücreye transfer edilen iyileştirici genin kalıcı bir entegrasyon sağlayıp sağlamamasına bağlıdır. Bu stratejide terapötik genin hedef hücrede kalıcı bir ifadenmesi söz konusudur. Ancak bu durumun in vivo koşullarında geçerli olmama olasılığı vardır. Kalıcı bir tedavi olmadıkça transfer edilen gen ürünü parçalanır ya da hücreden atılır [29, 30].



ekil 2.3. Ex vivo gen tedavisi [28].

#### 2.1.1.2. E ey Hücre Gen Tedavisi

Bitki ve hayvan çalı malarında oldukça ba arılı olmu e ey hücre gen tedavisi yöntemi, e ey hücrelerine yani yumurta ve spermle fonksiyonel genin entegre edilmesiyle gerçekleştirilir [25]. Yapılan de i iklikle kendinden sonra gelen tüm nesilleri etkilemesi, kalıtsal kusurluluk riski açısından bazı etik problemleri de beraberinde getirir [26, 29]. Oldukça etkili bir yöntem olmasına ra men birçok ülkede en azından imdilik teknik ve etik nedenlerle insan uygulamaları yasaklanmı tır [25].

#### 2.2. Gen Susturma Stratejileri

”Fonksiyonel genomik”, genotip ile fenotip arasında ba lantı kurmaya çalı an, adından da anla ıldı ı gibi özellikle genlerin, proteinlerin ve transkripsiyonda etkili ajanların i levleriyle ilgili bir çalı ma alanıdır [31]. Bu alanın geli mesiyle, genlerin fonksiyonu; onların ifadelendikten sonraki fenotip karakterlerine bakılarak tanımlandı ki bu “ileri genetik” olarak bilinir. Ters genetik ise bir genin i levini yerine getirememesi durumunda ortaya çıkan bazı özellikler sayesinde gen ürününün biyolojik fonksiyonunun incelenmesine ve belirlenmesine dayanır ve bu strateji “Gen Susturma Mekanizması”nı da kapsar [31, 32]. Benzer ekilde bir genin genetik mesajının hücresel proses ile kesilmesi “Knock-Down” veya “Knock-Out” olarak da isimlendirilir [33].

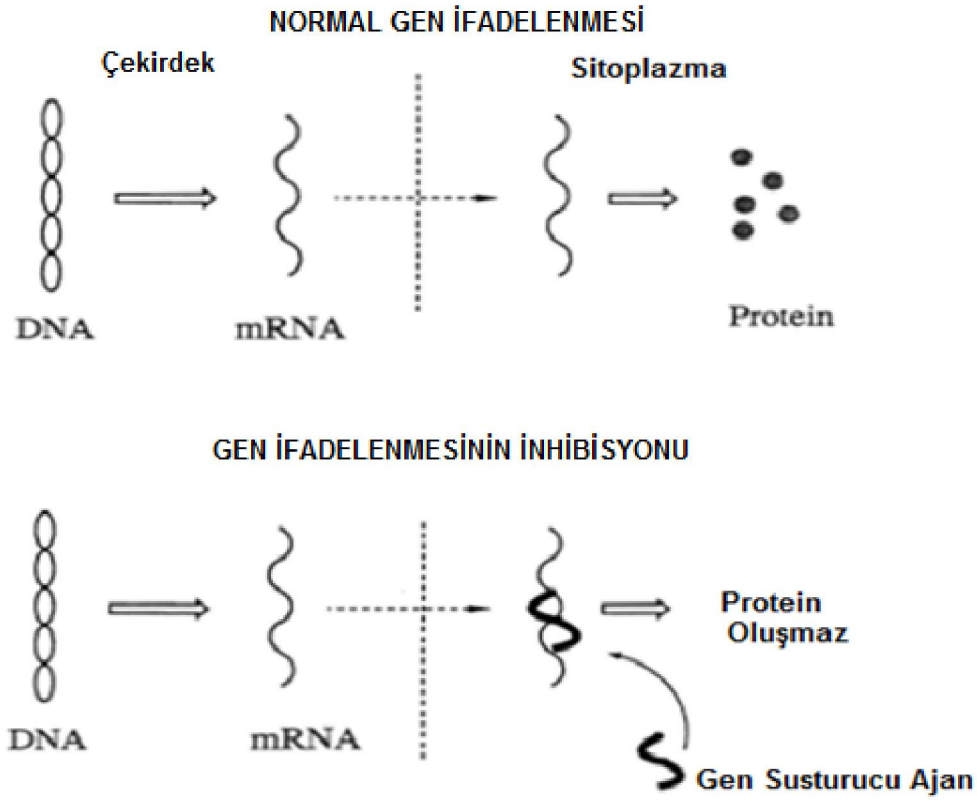
Günümüzde gen fonksiyonu ara tırmalarında en etkili yöntem olan gen susturma stratejisi biri transkripsiyonel (Transcriptional Gene Silencing, TGS) seviyede di eri de



transkripsiyonel sonrası (Post-transcriptional gene silencing, PTGS) seviyede olmak üzere iki farklı prosesle mümkündür [34].

Transkripsiyonel gen susturma mekanizması, ço unlukla bitki hücrelerinde gözlense de hayvan hücrelerinde de görülür. İgilenilen genin ifadenmesi, protein sentezinin transkripsiyon a amasında bloke edilir. Transkripsiyonel baskılanma kromatin modifikasyonundan veya DNA metilasyonundan kaynaklanabilir [35].

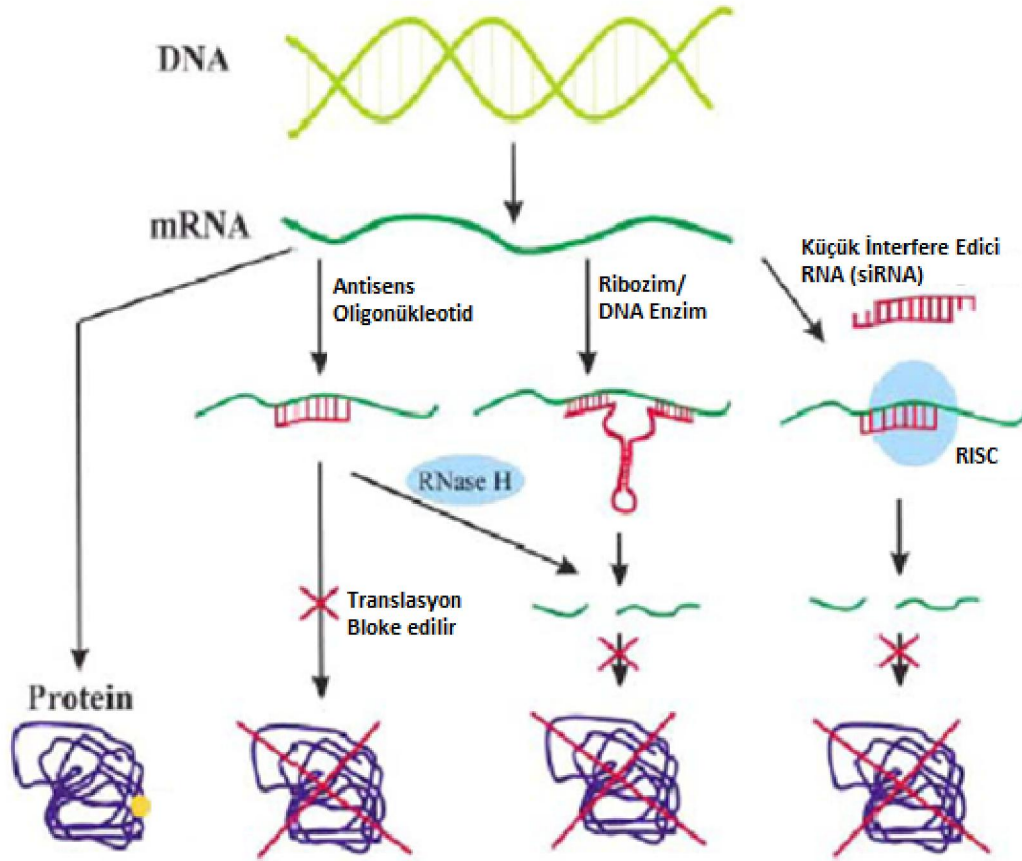
Transkripsiyon sonrası gen susturumunun temeli ise, spesifik bir genden transkriptte olan mRNA molekülünün diziyeye özgü ekilde yıkıma u ramasına veya translasyona girememesine dayanır. Bu esnada mRNA'nın köken aldığı genin transkripsiyon hızı veya eklinde bir de i iklik olmamakta, sentezlenmi olan mRNA'ya kodlanmayan bir nükleotid zincirinin ba lanması sonucu protein ifadenmesi baskılanmaktadır [36].



### 2.2.1. Antisens Teknolojileri

Antisens teknolojisini mümkün kılan yaklaşımlar; nükleik asitlerin komplementer özellikte olmalarından kaynaklanır. Bir spesifik hedef mRNA ile Watson-Crick baz eşleşme modeline göre hibritlenen sentetik oligonükleotidler kullanılarak gen ifadenmesini baskılamak mümkündür. Genelde DNA yapısında olan bu oligonükleotidler “antisens oligonükleotid” olarak adlandırılır. DNA’dan transkripte olan sitoplazmik mRNA “sens” oryantasyonunda olduğu için kullanılan “antisens” oligonükleotidlerin mRNA ile komplementer baz-çiftleşmesiyle translasyon engellenir olur. Böylelikle, uygun antisens nükleotid sekansının seçimiyle diğer hücresel bileşenleri direkt etkilemeksizin hücredeki herhangi bir gen ifadenmesinin baskılanması mümkündür. mRNA seviyesinde gen sessizlendirilmesi için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Anti-mRNA yaklaşımı genel olarak üç sınıfa ayrılabilir.

- İlk grup hedef mRNA’ya bağılanarak herhangi bir enzim aracılığı ile RNA degradasyonuna sebep olmadan RNA aktivitesini durduran tek zincirli yapıya sahip olan “Antisens oligonükleotidler” veya hedef mRNA yıkımını endogenik RNAz H enzimiyle tetikleyen oligonükleotidler,
- İkinci olarak sahip oldukları katalitik etkileriyle hedef mRNA yıkımını gerçekleştiren “Ribozimler ve DNA enzimleri”,
- Son olarak RNA interferans mekanizmasıyla hedef RNA’ları RISC enzimi vasıtasıyla degrade eden “Küçük interferen Edici RNA”lardır (siRNA) [37, 38].



ekil 2.5. Farklı antisens stratejilerinin kar ıla tırılması [38].

#### 2.2.1.1. RNA nterferans

Sentetik oligodeoksinükleotidlerin spesifik antisens etkisi ilk kez 1978 yılında Zamecnik ve Stephenson tarafından hücre hatlarında viral replikasyonun inhibe edilmesiyle ke fedildikten sonra [39] endojenik genlerin baskılanması ilk kez 1980'lerin sonunda Jorgensen ve arkadaş larının petunya bitkisindeki gen ekspresyon seviyesini artırmaya yönelik bir çalı mayla gösterilmi tir [40-42]. Bu çalı mada Jorgensen ve arkadaş ları petunya çiçe inde pigment olu umunu sa layan chalcone sentaz (chs) enziminin ifadelenmesinden sorumlu bir genin aktivitesini düzenlemek amacıyla bitkilere bu genin kopyası ekzojenik transgen aktarmı lardır. Bu genetik transformasyon çalı malarıyla ara tırmacılar daha koyu mor petunyalar elde etmeyi amaçlarken sürpriz bir ekilde çiçeklerin beyaz ya da alacalı renkte olduklarını gözlemlerlerdir. Ara tırmacılar pigment olu umunun inhibe olmasını, petunya bitkisine aktarılan chs

transgeninin ekspresyonunda gerçekleşmesi dđ ünđlen artı n tersine azalmanın gözlenmesiyle mümkün oldu unu açıklamı lardır. Ayrıca Jorgensen ve arkadaşları bu azalmayı sadece ekzojenik chs transgeninin ekspresyonunda değil hücrelerde endojenik halde bulunan chs genlerinde de gözlemlenmiştir [40, 41].



Şekil 2.6. Petunyada chs geninin ifadeleneşinin baskılanması ile de ğen pigmentasyon [41].

Chs geninin over-ekspresyonunun baskılanmasında, transgenik bölgede oluşan çift zincirli RNA (dsRNA) yapısının etkin oldu u, ayrıca chs geninden oluşan mRNA'nın transkripsiyon seviyesinde bir azalmanın olmaması hatta izole edilen nukleusta transkripsiyonun devam etmesi durumunun organizmada doğal olarak bulunan Transkripsiyon Sonrası Gen Susturumu Mekanizması ile ilgili olabilece ği rapor edilmiştir [43, 44]. Bununla birlikte hem ekzojenik hem endojenik genlerin ifadeleneşinin baskılanmasından dolayı bu prosese "co-suppression" adı da verilmiştir. Benzer şekilde 1992'de Romano ve arkadaşları *Neurospora crassa* fungusunda benzer gen baskılama çalışmaları yapmışlar ve adına "Quelling" denilmiştir [45].

1995 yılında Guo ve Kempheus *C. elegans* nematodunda yaptıkları çalışmaları gen baskılama mekanizmasında sens (hedef mRNA ile aynı baz dizisine sahip) RNA'nın antisens RNA kadar etkili oldu unu ilk kez ortaya koymuşlardır [46]. 1998 yılında Fire ve arkadaşları *C. elegans* ile yaptıkları çalışmada sekans-spesifik çift zincirli RNA (dsRNA) moleküllerinin, tek başına enjekte edilen sens veya antisens RNA'lara göre gen baskılama mekanizmasından on kat daha fazla etkili olduklarını keşfetmişlerdir.

Çift iplikli RNA' nın gen ifadelenmesini etkili olarak inhibe etmesi mekanizmasına "RNA interferans" ismi verilmiştir [47].

RNAi, Science dergisi tarafından 2001'de "yılın molekülü", 2002'de "2002 yılının en önemli bilimsel hamlesi" seçilmiştir ve 2006 yılında da RNAi ile ilgili yaptıkları çalışmaları ile Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello adlı araştırmacılar Fizyoloji ve Tıp alanında nobel ödülü almışlardır [48]. Elde edilen veriler, gerçekte tirilen genetik ve biyokimyasal çalışmalar bitkilerde, funguslarda ve ardı k olarak C. Elegans'ta rapor edilen ko-supresyon/PTGS, quelling ve RNAi mekanizmalarının ilimsel olarak benzer olduğunu ve dsRNA indükleyici gen baskılama temeline dayanan bu biyolojik yolların hemen hemen bütün ökaryotik organizmalarda biyolojik süreçte yer aldığını, RNAi'nin farklı etkileri olduğunu ortaya koymuştur [49].

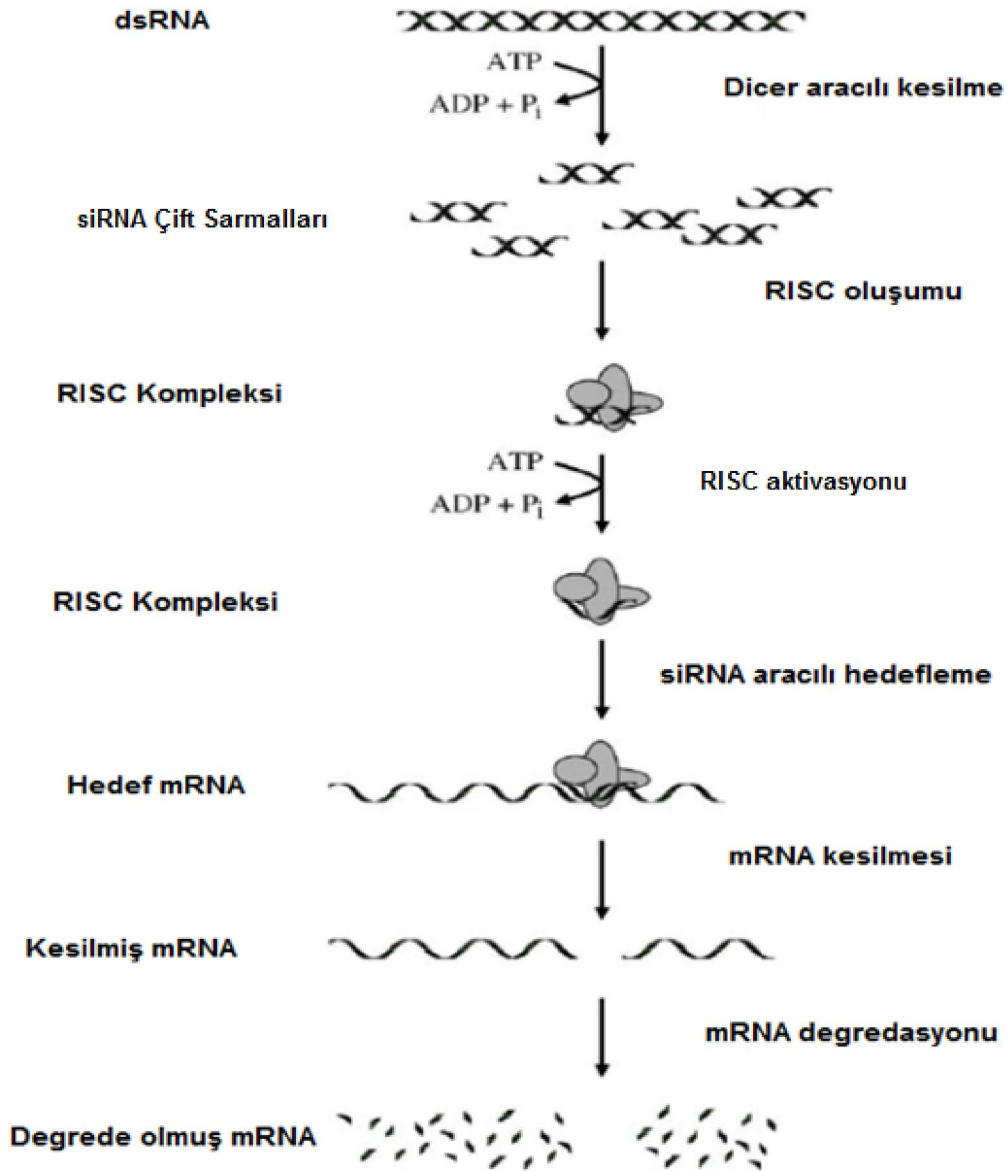
#### 2.2.1.1.1. RNA nterferans Mekanizması

RNAi mekanizması; araştırmacıların Drosophila'da yaptığı in vitro çalışmaları aydınlatılmıştır ve hücrenin sitoplazmasında gerçekte en mRNA seviyesinde gen ifadelenmesinin durdurulması ile sonuçlanan bir kontrol mekanizmasıdır [50, 4].

RNA interferans mekanizmasının tüm adımları,

- dsRNA tanıma ve tarama işlemi
- Bir RNAz III familyası (Dicer) enzimi eli inde çift zincirli dsRNA'nın tanınması ve kesilmesi,
- 21-23 nükleotid uzunlu unda siRNA' ların oluşması,
- siRNA-RISC kompleksi ikilisinin spesifik komplementer hedef mRNA ile Watson-Crick baz e le mesi prensibine göre hibritleşmesi ve
- RISC içindeki ekzonükleazlar tarafından hedef mRNA'nın degrades olmasıdır [5].

Mekanizmada, uzun dsRNA'ların RNA nükleazlar tarafından yaklaşık 21-23 nükleotidlik RNA fragmentlerine parçalandığı basama a "Ba langıç Fazı" (efektör moleküllerin üretim fazı) ve multinükleaz RISC kompleksi yapısına katılan siRNA rehberli inde hedef komplementer mRNA'nın degradasyonunun gerçekleşti i basama a da "Efektör Fazı" (asıl RNAi mekanizma fazı) adı verilir [51-54].



ekil 2.7. RNAi mekanizması [52].

Bu mekanizmada önemli rol oynayan bazı moleküller/bileşenler vardır; bunlar, sekans spesifik baskılama ajanı olarak ortaya çıkan en son keşif olan siRNA [55], Dicer enzimi ve RISC'dir.

#### 2.2.1.1.1.1. siRNA

Bağışçık fazında endojen veya ekzojen orijinli sekans-spesifik çift-zincirli RNA molekülleri, hedef mRNA ile hibritleşmeden önce ribonükleaz-III tipi protein ailesinden

olan Dicer enziminin aktivitesiyle [50, 56-58] sitoplazmada küçük interfere edici fragmentlere parçalanır. Bunlara siRNA denir [55]. siRNA'lar, RNAi mekanizmasında olan, 5'- fosfat ve 3'- hidroksil uçlara sahip ve 3'-hidroksil uçlarında 2 nükleotidlik çıkıntı bulunan 21-23 nükleotid uzunluğundaki çift zincirli yapıya sahip moleküllerdir [50, 58, 59].

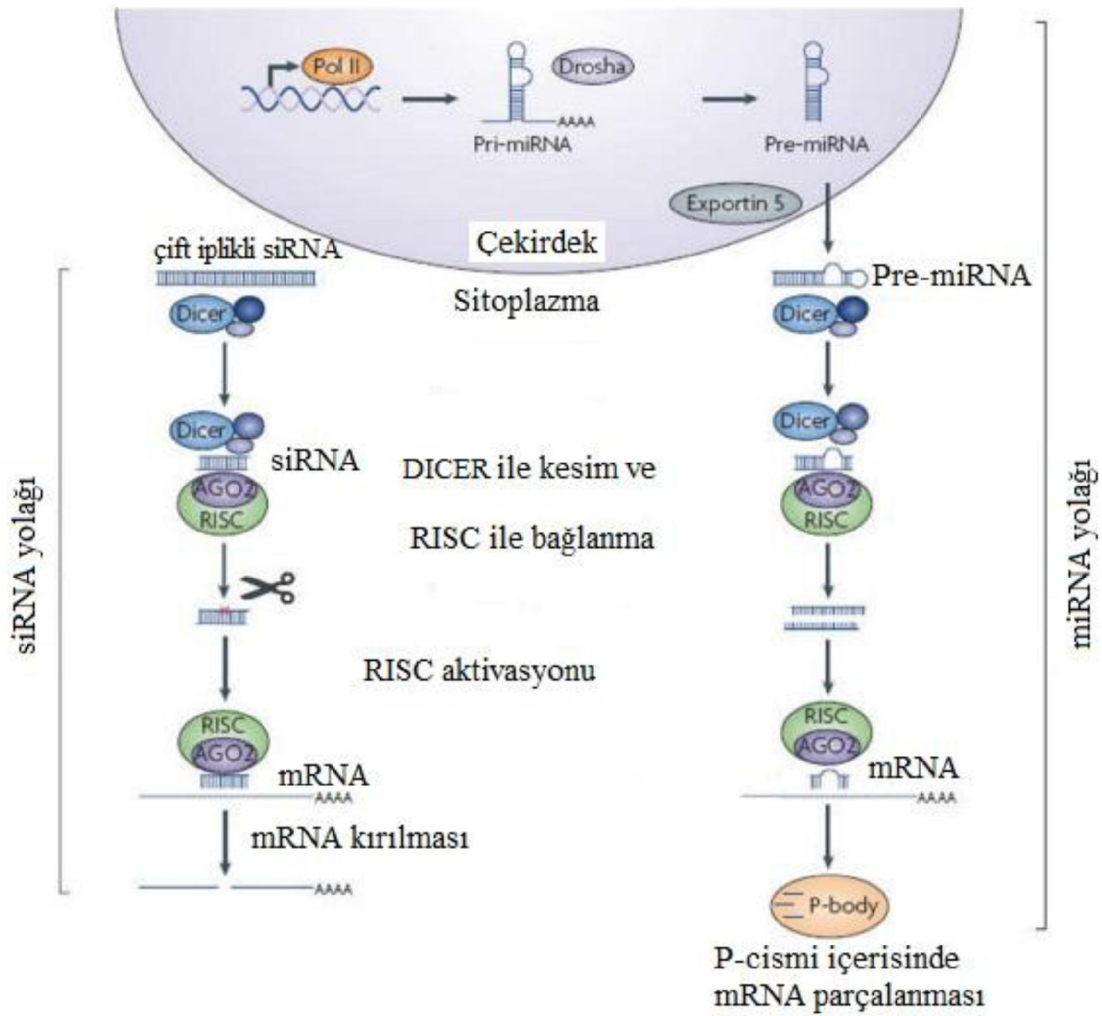


ekil 2.8. Her iki ucunda 2 adet e le memi baz bulunan çift sarmal RNA [60].

siRNA'nın bu yapısal özelliği RISC'e bağlanması ve RNAi mekanizmasının sonraki aşamaları için önemlidir [61, 62]. Uygulamalarda, uzun dubleks RNA'lar kullanılmış fakat, hücre ölümüne neden olan antiviral interferon (IFN) yanıtını uyardıkları için bu RNA'ların çoğu memeli hücreleri için etkin olmadığı anlaşılmıştır [32]. Buna benzer bir başka çalışmada 30 nükleotidden daha uzun çift iplikli RNA memeli hücrelerine verildiğinde özgül olmayan mRNA degradasyonu ve etkili olmayan translasyon baskılanması ile karşılaşılmıştır. Ancak daha küçük RNA'lar, 25 nükleotidlik antisens parçaları kullanıldığında ise etkili bir gen susturumu gözlenmiştir. Bu kısa RNA'ların bir çift iplikli RNA prekürsöründen kaynak aldığı düşünülmüştür. RNAi ile kısa çift iplikli RNA'ların ilişkisi *Drosophila melanogaster*'de kısa RNA'lar bulunduğunda anlaşılmıştır. Ayrıca kısa RNA'ların RISC'in hedef mRNA'yı tanımasında da etkin olduğu gözlenmiştir [63, 64].

Gen ifadenmesinin susturulmasını sağlayan bir başka efektör molekül olarak miRNA'lar (micro RNA) da ilk defa 1993 yılında belirlenmiş olup [65] 2001 yılından itibaren miRNA terimi kullanılmaya başlanmıştır [66]. miRNA'ların üretimi ise çekirdekte transkripsiyon sonucu intron bölgelerinde saç tokası şeklinde kıvrılıp e le mi kısımları olan RNA polimeraz II aktivitesiyle ilk miRNA'ların (pri-miRNA) oluşmasıyla başlar [67] ve RNaz III grubu bir endonükleaz olan Drosha enzimi aktivitesiyle pri-miRNA'lardaki bu kıvrımlı RNA parçası zincirin geri kalan kısmından ayrılır ve böylelikle prekürsör miRNA'lar (pre-miRNA) oluşur [68, 69].

Pre-miRNA çekirdek zarında bulunan taşıyıcı reseptör Exportin 5 ile sitoplazmaya taşınır [66]. Bu aşamadan sonra miRNA ve siRNA aynı işlemlerden geçer [36]. Etkin ortamda siRNA ve miRNA molekülleri ATP bağımlı bir biçimde RISC aktivitesiyle tek sarmal hale getirilirler. siRNA veya miRNA'nın antisens zincirlerinin hedef mRNA ile etkileşimleri RISC kompleksi içinde gerçekleşir [4].



Şekil 2.9. miRNA ve siRNA yolları [70].

siRNA'lar genellikle hedef mRNA molekülüne komplementer sekans dizisinde ve miRNA'lara göre mRNA ile mükemmel eşleşme özelliğine sahiptirler. siRNA ile



etkile tikten sonra mRNA molekülü e le me bölgelerinden endonükleazlar ile kesilerek ortamdan uzakla tırılır [36]. siRNA'ların tersine miRNA'lar hedef mRNA molekülüyle kısmen e le erek dü ük özgülükte ba lanır ve translasyon mRNA de grede olmadan baskılanır. Her iki mekanizmanın ortak sonucu protein sentezinin inhi be edilmesiyle sonuçlanır [71, 72]. Farklı organizmalarda var olan RNAi mekanizmasının genetik ve biyokimyasal incelemeleri, bu hücre sel mekanizmanın korundu u gerçe ini ortaya koymaktadır [32].

#### 2.2.1.1.1.2. Dicer Enzimi

RNAz III ailesi grubu enzimler çift zincirli RNA'lara spesifik özellik gösteren birkaç nükleaz arasındadır [73]. İlk olarak Bernstein ve arkadaş ları Drosophila'dan RNaz III benzeri bir enzimi izole edip, bu enzimin RNAi mekanizmasında üretilen 22 nükleotid büyüklü ünde fragmentler olu turma yetene ine sahip oldu unu göstermi lerdir [57]. Aynı ara tırmacılar bu enzimin RNAi mekanizmasının ba langıcında yer aldı nı da ispatlamı lardır. Çift zincirli RNA'ları homojen bir biçimde aynı büyüklükteki küçük RNA'lara kesme yetene inden dolayı bu enzime "Dicer" adı verilmi tir [57]. Bu nükleazlar nematodlarda, funguslarda, meyve sine inde bitkilerde ve memelilerde evrimsel olarak korunmu tur [55]. Ancak bunlar bazı farklılıklar gösterebilmektedir. Drosophila gibi dü ük ökaryotlarda Dicer enziminin kesim aktivitesi ATP gerektirirken memeli Dicer enzimi ATP gerektirmez [55, 74].

Dicer enzimi dört farklı domaine sahiptir. Bunlar; bir N-terminal helikaz domaini, 2 tane RNAz III kalıbı, bir tane C ucunda bulunan dsRNA'ların ba lanma domaini ve bir PAZ domainidir (110 amino asit domaine sahip, Piwi, Argo ve Zwiller/Pinhead proteinlerinden olu an domain) [51, 57, 75]. Ayrıca fonksiyonu hala tam olarak belli olmayan DUF 283 domaini de tanımlanmı tır [51, 75].



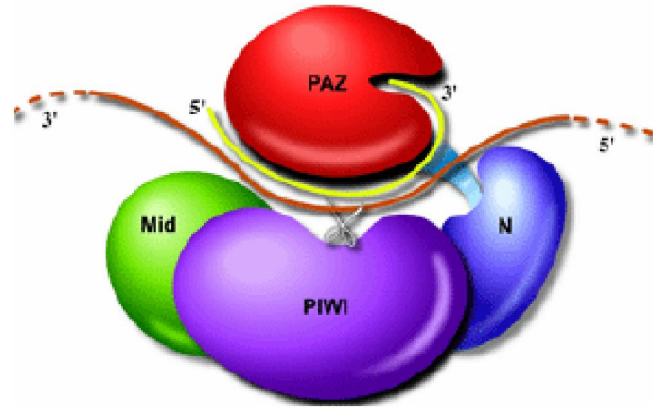
ekil 2.10. Dicer Enziminin domain yapısı (ematize edilmi tir) [49, 51, 75].

Dicer enziminin sahip oldu u PAZ domaininin çift zincirli RNA'ların enzime ba lanmasını [76], RNAz III domaininin ise çift zincirli RNA'ların kesim aktivitesini katalizledi i dü ünülmektedir [77].

#### 2.2.1.1.1.3. RISC

Hedef mRNA'yı degrede etmekten sorumlu sekans spesifik nükleaz aktivitesi Hammond ve arkadaşları tarafından RNA-indükleyici susturucu kompleks olarak isimlendirilmiştir [68]. Dicer aktivitesiyle oluşan siRNA, RISC ile etkileti inde siRNA'nın çift sarmalı açılır ve enzim kompleksinin aktivitesiyle hedef mRNA ile aynı baz dizisine sahip siRNA zinciri (sens dizi) uzaklaştırılır [78]. RISC; antisens diziyeye sahip siRNA zincirini, kendisine komplementer olan mRNA'yı Watson-Crick baz e lemesine göre bulması ve hibritleşmesi için rehber olarak kullanır ve bu enzim kompleksi hedef mRNA'nın 5' ucundan ölçerek 10. ve 11. nükleotidler arasındaki fosfodiester ba nını endonükleaz aktivitesiyle keser [79].

500 kDa büyüklüğündeki bu multikomponent RNAi nükleazın [80] protein bile enlerinden biri Argonaute protein ailesi üyesi olarak tanımlanmıştır ve Argonaute2 (AGO2) olarak adlandırılmıştır [55].



ekil 2.11. Argonaute proteinin domain yapısı [49].

130 kDa büyüklü ünde ve poliglutamin içeren AGO2 proteini, PAZ domainine ve Argonaute gen ailesi üyesine özgü olan PIWI domainine sahiptir [55]. PAZ domaini siRNA'nın antisens dizisinin 3' ucuna ba lanmayı katalizlerken yapısal olarak RNAz H'in aktif bölgesine benzeyen [81] PIWI domaini ise hedef mRNA'nın kesimini katalizlemektedir [82]. Hedef mRNA hidrolizi için ATP esansiyel de ildir ancak ATP varlı ında endonükleaz aktivitesi hızlanır. Ayrıca Mg<sup>2+</sup> iyonu mRNA degradasyonu için gereklidir [83]. RISC'den degrede olmu hedef mRNA'nın her iki fragmentinin ayrılabilmesi için ATP gerekmektedir. 5' 3' eksonükleaz XRN-1 (veya onun homologları) kesilmi hedef mRNA'nın 3' ucunu, ekzozom olarak bilinen ekzonükleazlar ise geriye kalan 5' ucunu parçalamaktadır [82].

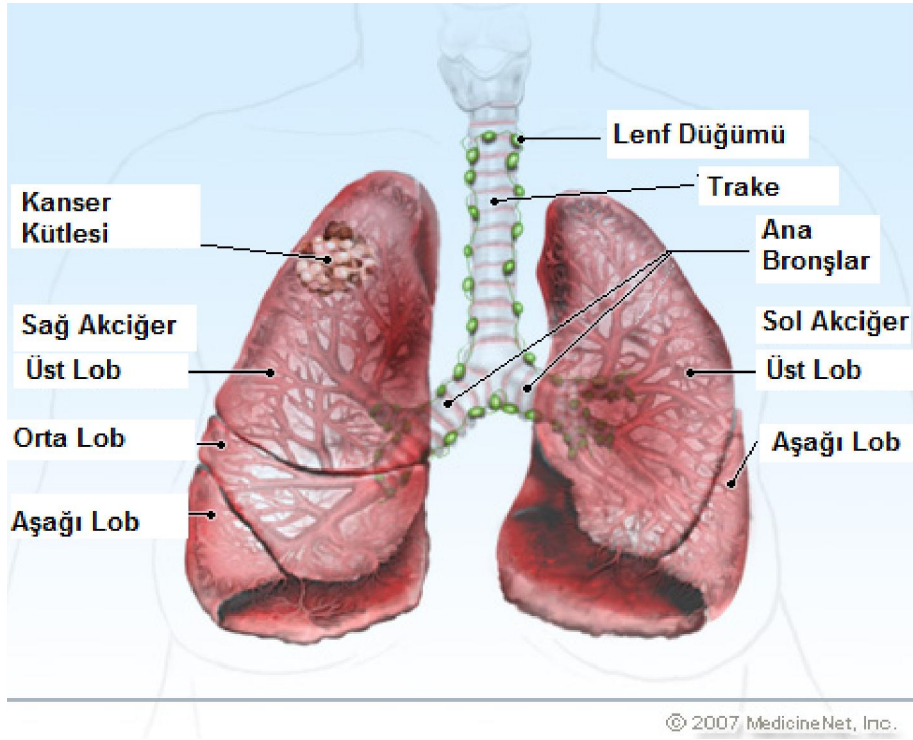
#### 2.2.1.1.2. RNAi'nin Terapötik Uygulama Alanları

RNA interferans, canlı organizmalarda do al olarak bulunan bir mekanizma olmasının yanında, gen ifadenmesini baskılamak için yapay siRNA'ların da sentezlenip kullanılmaya ba lanmasıyla son yıllarda bilim dünyasının heyecan verici bir noktasında yer almı tır [82]. In vitro ortamda sentezlenen siRNA'lar gen susturucu etkisiyle hem spesifik genlerin fonksiyon ara tırmalarında hem de bazı hastalıklar için terapötik ajan olarak kullanılmı tır [84]. RNAi' nin tedavi edici de eri çok sayıda in-vitro çalı mada gösterilmi tir. Bugüne kadar HIV/AIDS, hepatit, SARS, influenza, insan papillomavirus infeksiyonu gibi viral hastalıklar, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklar, malaria ve romatoid arthriti ve kanser gibi hastalıklarda hayvan deneylerinde ve insan uygulamalarında ümit veren geli meler vardır [82]. Ara tırmacılar, spesifik bir proteinin yüksek derecede ifadenmesinden veya mutant bir proteinin varlı ından kaynaklanan bazı hastalıklarda RNAi mekanizması vasıtasıyla zararlı etkiye sahip proteinin ekspresyon seviyesini azaltma yoluna giderek in vitro ve in vivo ko ullarda gen tedavisi uygulamı lardır [85].

RNAi mekanizması, sahip oldu u yüksek etkinlik ve spesifik özellikleriyle son yıllarda kansere de kar ı özellikle onkogenез yola ına, apoptoza, hücre döngüsü regülasyonuna, hücre ya lanmasına, tümör-hücre etkile imine, geleneksel tedavilere ve direnç mekanizmasına ait olan genleri hedef alan potansiyel terapötik strateji olarak kar ımıza çıkmaktadır [86].

### 2.3. Akci er Kanseri

Akci er kanseri dünya genelinde en sık görülen ve etkisi her geçen yıl % 0,5 oranında artan epidemik hastalıktır. Akci er kanserinin boyut ve da ılımı nedeniyle ameliyat ile tedavi bu hastalık için çok fazla efektif de ildir. Bu sebeple sadece kemoterapi ve radyasyon terapisi akci er kanseri tedavisi seçeneklerindedir. Buna ra men kemoterapi ve radyoterapi gören hastaların yakla ık % 80'i 1 yıllık bir tedavi sonucunda ölmekte ve hastalarda uzun süreli kurtulma sadece % 5-10 oranında gözlenmektedir [87].



ekil 2.12. Akci er lobunda kanser kütle görünümü.

Akci er kanseri kemoterapisinde en önemli engel kanser hücrelerinin ilaç direnci geli tirmeleridir. Kemoterapinin etkinli i bu yüzden kısıtlanmı tır. Bu direnci kırmak için kanser hastalarına yüksek dozda toksik antikanser ilaçları uygulanır, bu da sa lıklı organ ve dokuların da yan etkilere maruz kalmasıyla sonuçlanır [87].

Kanser tedavisinde kemoterapi etkili bir yöntem olmasına ra men kemoterapötik ajanların sulu çözeltilerde dü ük çözünürlükte olmaları (ilaç verilmesini zorla tırır),

vücutta ba tan ba a spesifik olmayan da ılımlarının olması (tümörde yetersiz penetrasyona neden olur), sa lıklı dokuların zarar görmesi (tedavinin dozunu ve sıklı nı limitler) ve kanser hücresi direnci gibi kemoterapinin etkinli ini engelleyecek limitasyonları mevcuttur [88].

Yeni yakla ım kanser tedavilerinde tek terapötik stratejiler artık yetersiz bulunmaktadır. Farklı mekanizmalara sahip iki veya daha fazla tedavi kombinasyonunun sinerjistik veya kombine etkisi kanser geli imini daha iyi önlemi ve kanser tedavisinde umut vaat edici bir yakla ım olmu tur. Bununla birlikte, RNA interferans mekanizmasına dayalı ileri tedavi teknikleri, özellikle hastalıkların tedavisinde mükemmel etki gösteren çe itli siRNA bazlı terapötikler geli tirilmi tir. Bu sebeple son yıllarda geleneksel kemoterapi ve yeni geli tirilen siRNA'ya dayalı tedavilerin kombinasyonu ara tırmacıların dikkatini çekmi tir [89]. Antikanser ilaçların farklı etkile imlerle kombinasyonu dü ük doz ilaç kullanımı ve ilaçların yan etkilerinin azalmasını sa lar [90].

Spänkuch ve ekibi siRNA veya antisens oligonükleotidlerle polo-benzeri kinaz 1 (Plk1) proteinini hedefleyerek meme kanseri hücrelerinin antikanser ilaç paclitaxele kar ı hassasiyetini geli tirmi lerdir [91]. Benzer bir ekilde Brahmbhatt ve arkadaş ları siRNA ve kemoterapötik ilacın beraber tümör bölgesine verilmesinin tek ba ına ayrı ayrı salınımlarından önemli ölçüde daha fazla terapötik etkiye sahip oldu unu rapor etmi lerdir [92]. Bununla birlikte maksimum etkiye ula ılması için siRNA ve ilacın e zamanlı olarak aynı tümoral hücreye ula ması ve hücrelerde optimum oranda birikmesi gerekti i beklenmektedir [93].

#### 2.4. ABCE1 Proteini

RNAz L inhibitörü (RLI) veya HP68 (host protein) olarak da bilinen ABCE1 proteini, ATP ba layıcı kaset proteinleri (ABC) süper ailesinin bir üyesidir [94].

ABC proteinleri, ATP'yi ba layarak aç ı a çıkan enerji ile eker, amino asit, metal iyonları, hidrofobik bile ikler ve çe itli metabolitler gibi bir çok molekülün plazma membranından veya mitokondri, peroksizom ve endoplazmik retikulumun intraselüler membranlarından geçi ini sa larlar [95, 96] Bugüne kadar hücrede çe itli fonksiyonlara sahip 49 tane ABC ailesine mensup transport proteini rapor edilmi tir.

Memelilerde ABCA'dan ABCG'ye kadar olmak üzere tüm grup 7 alt birime ayrılıp o ekilde isimlendirilmi tir [95].

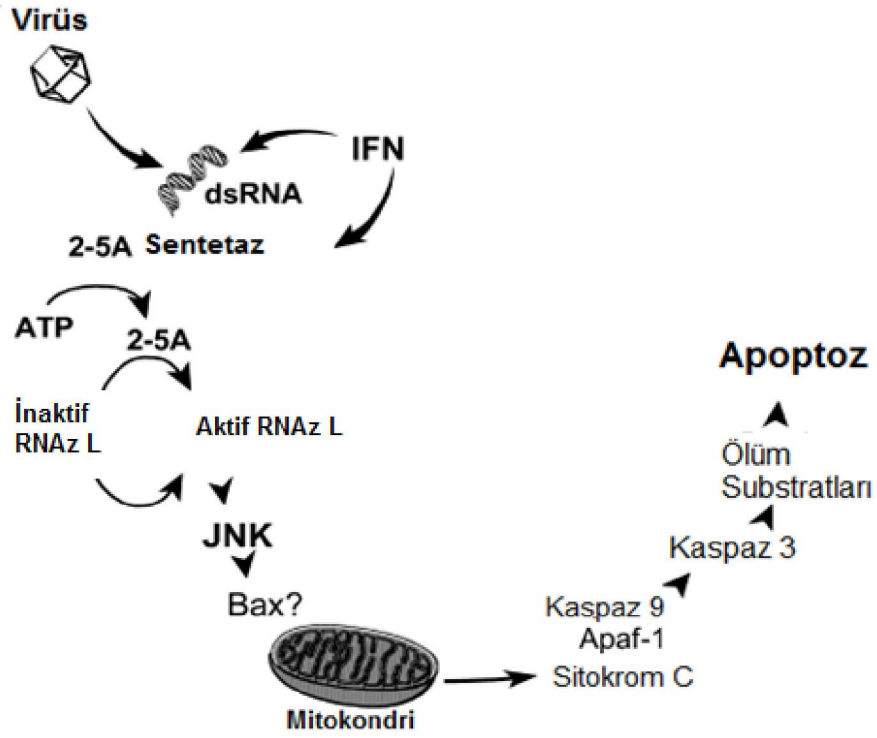
ABCE1 proteini 1995 yılında ilk olarak RNAz L inhibitörü ismiyle tanımlanmış tir [97]. 599 amino asitten oluş an ve moleköl a ırlı ı 67,515 kilodalton (kDa) olan bir proteindir [94]. ABCE1 proteini 4 yapısal domain içerir: bütün ABC proteinlerinde oldu u gibi NBD1 ve NBD2 olmak üzere 2 tane ATP-ba layıcı ya da nükleotid ba layıcı domain yapıları, bir destek domain [98] ve ayrıca N-terminal bölgesiyle koordine halinde olan (4Fe 4S)<sup>2</sup> kümelenmesi [99]. Fe S kümelenmeleri hücre canlılı ı için esansiyel oldu undan, ABCE1 proteininin hücre sel faaliyetlerde geni oranda yer aldı ı bilinmektedir [97]. ABCE1 geni ökaryotlarda, mayalarda ve archealarda evrimsel olarak korunmuş olup, bakterilerde bulunmamaktadır [94].

ABCE1 proteini bulundu u hücrede geni biyolojik role sahiptir.

#### 2.4.1. ABCE1 proteini IFN – Ba ımlı 2-5A/RNAz L Sistemini nhibe eder

Hücrelerdeki IFN ba ımlı 2-5A/RNAz L yola ı antiviral etkiye sahip bir sistemdir. Aynı zamanda sahip oldu u apoptotik, immonuregöl atör ve antiproliferatif özelli i sayesinde antitümör etkili bir biyokimyasal yoldur. Bu yola ın etkin molekölü endoribonükleaz L (RNAz L) proteindir [100]. Memeli hücrelerinde yüksek oranda ve inaktif halde bulunan bu protein, 2-5A (2'- 5' oligoadenilat) ile yüksek afinitede ba lanarak inaktif halden aktif hale geçer [101]. 2'- 5' oligoadenilat (2-5A) molekölü, 1970 yılların ortalarında I.M. Kerr ve arkadaş ları tarafından ke fedilen 2'- 5' oligoadenilat sentetaz enziminin çift zincirli RNA ile aktifle erek ATP ile etkile imi sonucu oluş ur [102].

Yapılan birçok ara tırmayla RNAz L sisteminin aktivasyonu ile apoptozun indüklendi i gösterilmi tir. Diaz-Guerra ve arkadaş ları memeli hücrelerini RNAz L geni üreten rekombinant vaccinia virüsü ile transfeke etmiş ler ve sonucunda hücrelerin apoptoza girerek öldüklerini rapor etmiş lerdir [103]. Aynı ekilde bir ba ka çalı mada ara tırmacılar mitokondriden sitokrom c'nin salınmasıyla devam eden apoptotik faaliyeti, hücrelerdeki RNAz L yola ını 2-5A transfeksiyonu ile aktive ederek gözlemlemiş lerdir [104].



ekil 2.13. 2-5A/RNAz L sisteminin antiviral ve antitümör aktivitesini gösteren moleküler yola ı [105].

Antiviral aktiviteye ve apoptozu indüklemesine ek olarak 2-5A/RNAz L sistemi aynı zamanda antiproliferasyon ve antitümör faaliyetlere de aracılık eder. 2-5A'nın hücreye verilmesi hücre büyümesinin inhibisyonuyla sonuçlanarak bu durum RNAz L'ye antiselüler proliferasyonda etkin rol kazandırmı tır [94].

2-5A'nın antitümör hücre aktivitesini indüklemesi ve etkin RNAz L'nin tümör baskılayıcı molekül adayı durumuna gelmesi, RNAz L temelli uygulamaların kanser tedavisinde ciddi avantaj sa lamasına yol açabilir [105].

ABCE1 proteini, RNAz L ile heterodimer yapısı olu turarak 2-5A'ya ba lanmasını engeller ve RNAz L'nin nükleaz aktivitesini inhibe eder [97, 104]. Bununla birlikte transfekte edilmi HeLa hücrelerinde yüksek ifadelenme seviyesindeki ABCE1 geninin interferonların antiviral aktivitesini inhibe etmesi bu genin viral enfeksiyon, tümör hücre proliferasyonu ve antiapoptozda aktif ve 2-5A/RNAz L yola ında önemli bir regülatör oldu unu dü ündürmü tür [94].



2-5A/RNAz L sisteminin memeli hücreleri dışında bulunmaması, bunun yanında ABCE1 proteininin tüm ökaryotiklerde ve archealarda oldukça fazla bulunması bu proteininin sadece RNAz L inhibitörü olarak değil başka fonksiyonlara da sahip olduğunu göstermektedir [106].

#### 2.4.2. ABCE1 Proteini Ökaryotik Translasyonla Yakından İlişkilidir

ABCE1'in pre-translasyon baskınlama kompleksini oluşturmak için ökaryotik translasyon baskınlama faktörleri eIF2 ve eIF5'e bağlanması bu proteininin hücre büyümesinde, gelişmesinde ve kesin patolojik süreçte önemli rolü olduğunu düşündürür [107].

Mayalarda ABCE1 proteini hücre bölünmesinde kritik rol oynar. Bununla birlikte ABCE1'in baskılanmasıyla HEK293 tümör hücre hattında proliferasyonun inhibe edildiği gösterilmiştir. ABCE1'in eIF5 ve eIF2 ile beraber immünopresipitasyon gösterdiği aynı çalışmayla rapor edilmiştir. Bu sebeple ABCE1 proteininin ilk rolü olarak, ökaryotik gelişimde etkin olması ve translasyon prosesi boyunca baskınlama kompleksleriyle birleşmesi eklenmiş düşünülmüştür [94].

Ayrıca ABCE1'in ökaryotlarda translasyon sonlandırma sürecinde ve ribozom geri dönüşümünde de önemli yeni rolleri olduğu belirtilmiştir. Mayalarda yapılan genetik çalışmalarda ABCE1'in sonlandırma faktörü eRF1 ile ve az oranda eRF3 ile fiziksel olarak etkileşim içerisinde olduğu gösterilmiştir [108]. ABCE1 protein ekspresyon seviyesinin azalmasının biti kodonunun tanınmasında bozukluğa yol açtığı aynı çalışmayla rapor edilmiştir [109].

ABCE1 ribozoma doğrudan bağlanamaz bunun yerine ribozomda eRF1'in veya homoloğu olan Pelota'nın konformasyonunu sabitleyerek sahip olduğu FeS domainiyle eRF1'in veya Pelota'nın karboksiterminal bölgesine bağlanır. Translasyon sonlanması peptid salınımına öncülük eder ve ABCE1 proteininin ATP hidroliziyle ribozom ayrılması ribozom geri dönüşümüne indüklenir [94].

#### 2.4.3. ABCE1 Proteini Tümörle İlişkilidir

Hücre proliferasyonu ile ilgili, antiapoptotik aktivitesi ve translasyon prosesindeki önemli rolü ABCE1 proteininin maligniteye sebep olabileceğini düşündürmüştür. Son



dönemlerde yapılan çalışmalar ABCE1'in tümör oluşumuyla, prognozla ve metastazla ilgili kisinin olduğunu kanıtlar niteliktedir [94].

Huang ve arkadaşları akciğer karsinoma dokularında ve metastatik lenf bezlerinde ABCE1'in ekspresyonunun normal dokulara göre çok daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar ABCE1 proteinini baskılayarak akciğer kanseri hücre hattında proliferasyonun ve envazyonun inhibe edildiğini göstermişler, ABCE1'in akciğer kanseri patogenezi için dahil bir protein olduğunu rapor etmişlerdir [110]. Bununla birlikte son araştırmalarda 48 tane akciğer adenokarsinom doku örneklerinde ABCE1 protein ve mRNA düzeylerinin oldukça fazla ifadenmiş olduğunu gösterilmiştir [111]. Aynı şekilde bir başka çalışmada melanom ve metastatik melanom hücre hatlarında ABCE1 geninin yüksek ifadenme seviyesinde olduğunu önemli ölçüde gözlenmiştir [112]. Retinablastom hücre hattı Y79'da da ABCE1 geninin de dahil olduğu yüksek mRNA ifadenmesine sahip çeşitli ABC ailesi genleri tanımlanmıştır [113]. Kolorektal kanser hastalarından alınan tümör dokularında ve neoplastik olmayan kontrol dokularında bulunan tüm ABC transport proteinlerinin transkript seviyeleri üzerine yapılan bir çalışmada ABCE1 geninin tümörlerde kontrol dokularına göre daha fazla regüle olduğunu belirtilmiştir [114]. Bu sonuçlar ABCE1 geninin tümör ilişkili bir gen olabileceğini iddia etmiştir [94].

Bununla birlikte ABCE1 geni lösemi ve kanserdeki yeniden düzenlenen yapılarla ilişkili kromozom bölgesinde lokalize olmaktadır. Bu nedenle bu gen bulunduğu konum gereği de bir aday tümör geni durumundadır [94].

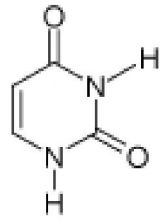
#### 2.4.4. ABCE1 Proteinini Kemodirençte Etkindir

ABCE1 proteini kemoterapi direnciyle ilişkilidir. İncelenmiş 23 tane ilaç-dirençli tümör hücre hattındaki ABCE1 geninin de dahil olduğu 13 tane ABC genlerinin ifadenmesinin, bu genin sonradan kazanılmış kemodirençte etkin olabileceğini önerilerek, ilaca hassas parental hücre hatlarından farklı olduğunu belirtilmiştir [115].

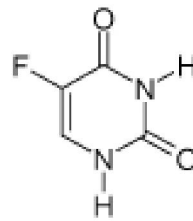
19 tane hepatoselüler karsinom hastalarında yapılan, çoklu ilaç direnciyle ilgili olan 15 ABC proteininin ifadenme araştırmasında ABCE1'in ifadenmesi, komünikasyonlu hücrelere göre tümör hücrelerinde artmıştır ve bu artışın hepatoselüler karsinomda kemoterapötik tedaviden önce olduğu sonucu çıkarılmıştır [94].

## 2.5. 5-Florourasil

5-Florourasil oldukça yaygın kullanılan bir antikanser ilaçtır. 1957'den beri kolon kanseri tedavisinde önemli bir rol oynamış aynı zamanda akciğer, meme ve boyun kanseri gibi diğer kanser çeşitlerinin tedavilerinde de kullanılmıştır [116]. 5-FU, DNA ve RNA moleküllerinin pirimidin halkasına benzer yapıda, heterosiklik aromatik halkaya sahip bir organik bileşiktir. Timin sentezine öncülük eden urasil'in C-5 pozisyonundaki hidrojen atomu yerine 5-FU'da flor atomu bulunur [117].



**Urasil**



**5-Floro-Urasil**

ekil 2.14. Urasil ve 5-Floro-Urasil'in kimyasal yapıları [116].

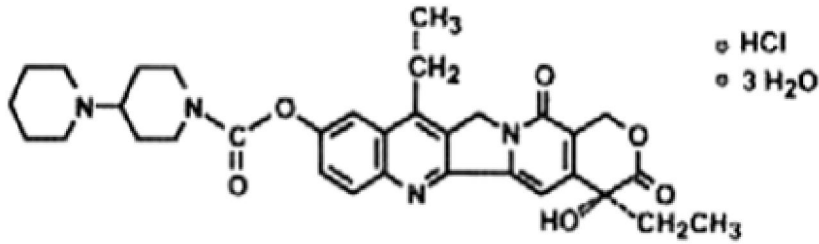
Yapısal özelliğinden dolayı 5-FU hücrede nükleosid metabolizmasıyla interfere olup hem RNA hem de DNA ile bütüncül olarak sitotoksikiteye ve hücre ölümüne yol açar [118]. 5-Florourasilin timidilat sentaz enziminin inhibitörü olarak geliştirilerek hücre ölümünde etkin bir kemoterapötik ilaç olması ve ayrıca pirimidin analogu olarak urasil veya timin yerine DNA ve RNA ile bütüncül olması, bu ilacın antitümör mekanizmaya sahip olduğunu kanıtlamıştır [116]. Memeli hücrelerinde 5-florourasil, timidilat sentaz ile stabil kompleks oluşturarak florodeoksiüridin monofosfata (FdUMP) dönüşür bu da deoksitimidin monofosfat (dTMP) üretimini inhibe eder. dTMP, DNA replikasyonu ve onarımı için esansiyel olup bu molekülün seviyesinin azalması sitotoksikiteye neden olur [119]. Bununla birlikte, bir çok avantajının yanı sıra hücre membranından ilaç girişi çıkışında anormal bir dehidrasyon olması, ilacın aktifliğinin azalması ve ilaç hedefindeki mutasyonlar sonucu oluşan ilaç direncinden dolayı 5-Florourasilin klinik uygulamaları fazlasıyla kısıtlanmıştır. Antitümör etkisinin yanında diyare, ağız ve boğazda yara, yutkunmada zorluk, iştahsızlık, düşük kan hücreleri üretimi, avuç içinde

ve ayak tabanında ağrı, kızamıklık ve kabarcıklanma gibi yan etkilere sahip bir ilaçtır [116].

## 2.6. Irinotecan

Irinotecan diğer bilinen adıyla CPT-11 (Camptothecin-11), orijin olarak Çin süs bitkisi *Camptotheca acuminata*'dan izole edilen camptothecin'in suda çözünür, yarı sentetik analogudur. Hücrede topoizomerez I'i (Topo I) inhibe ederek S-fazı spesifik hücre ölümüne neden olan bir kemoterapötik ajandır [120]. Nükleer Topo I / DNA kompleksini oluşturması DNA'nın tek zincirinde kırılmalara ve hücre ölümüne yol açar. Artan lipid peroksidasyonu da ayrıca irinotecan indüklü hücre ölümüne katkıda bulunur [121].

İlk kez 1983 yılında Japonya'da keşfedilen ve sentezlenen irinotecan küçük ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, kolorektal kanseri, meme kanseri, yumurtalık kanseri gibi bir çok tümör türünde potansiyel antitümör etki göstermiştir [120].



**Irinotecan Hidroklorür**

<http://www.rxlist.com/camptosar-inj-drug.htm>

ekil 2.15. Irinotecan hidroklorürün kimyasal yapısı

Irinotecan'ın anti-tümör etkisinin yanında zayıflatıcı, diyare, ince ve kalın bağırsakta histopatolojik değişiklikler, kript hücrelerinde ve bağırsak villilerinde dejenerasyon ve nekroz gibi doz sınırlayıcı toksik etkileri mevcuttur [121].

### 3. DENEYSEL ÇALI MALAR

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen çalı malar ba lıca üç ana bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde A 549 akci er kanseri hücreleri kültür ortamında ço altılarak hücre hatları hazırlanmış ve ABCE1 siRNA ile birlikte hücrelere verilmesi planlanan dü ük doz 5-FU ve irinotecan ilaçlarının deri imlerini belirlemek için MTT sitotoksikite testi yapılmıştır. Belirlenen dü ük ilaç deri imleri ve farklı deri imlerdeki ABCE1 siRNA'ların tümör hücreleri üzerindeki kombine etkisini görmek adına gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile hücre sayımı yapılmış ve zamana ba lı hücre proliferasyonlarına bakılmıştır. Ayrıca kombine tedavi eklinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi de incelenmiştir.

İkinci kısmında apoptoz/nekroz ikili boyaması yapılarak siRNA'nın, ilaçların tümör hücreleri üzerindeki tekli ve ikili etkisini artırıp artırmadığını veya bu etkiyi nasıl devam ettirdiğini incelemek için hücrelerin ölüm yollarından hangisini seçtiğini morfolojik olarak değerlendirilmiştir.

Çalı manın son bölümünde siRNA ile baskılanan ABCE1 geninin ifadenme seviyesini göstermek için eş zamanlı RT-PCR uygulaması yapılmıştır. Ayrıca tekli ilaç, ikili ilaç ve siRNA ile birlikte hazırlanan formlarının hücrelere uygulanmasından sonra BCL-2, mTOR ve ABCE1 genlerinin de ifadenme seviyelerini kontrol gruplarıyla karşıla tırmak için eş zamanlı RT-PCR uygulanmıştır.

#### 3.1. Kimyasallar ve Malzemeler

Antikanser ajan olarak kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan, ba ka ilaçlarla veya ikili kombine ekilde de uygulanan 5-FU ve irinotecan ilaçları kullanılmıştır.

RNA interferans çalı malarında ABCE1 genini baskılamak için kullanılan siRNA (Sens dizisi: 5'-CCGUGGAUCUGAAUUACAATT-3'; antisens dizisi:5'-UUGUAAUUCAGAUCCACGGAA-3') ve taşıyıcı olarak kullanılan HiperFect Transfeksiyon Reaktifisi Qiagen (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Hücre kültürü çalı maları için; insan akci er kanseri hücre hattı A 549 (ATCC), RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640; ATCC) besiyeri olarak, Fosfat Tamponu (PBS) Thermo Scientific (ABD), Tripsin-EDTA (Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit),

Fetal Buza ı Serumu (FCS), tripan mavisi kullanılmı tır. Sitotoksisite testinde kullanılan Tetrazolyum Tuzu (MTT) ve Dimetilsülfoksit (DMSO) Biological Industries (srail) firmalarından temin edilmi tir. Propidium yodür (Serva, srail), Hoechst 33342 (Serva, srail) ve Ribonükleaz A apoptoz/nekroz ikili boyama çalı malarında kullanılan kimyasallardır. E zamanlı RT-PCR çalı malarında total RNA izolasyonu için RNeasy Mini Kit ve cDNA izolasyonu için RT<sup>2</sup> HT First Strand Kit ayrıca RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermixes ve RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assays (ABCE1, BCL-2, mTOR ve -Actin primerleri) Qiagen firmasından temin edilmi tir. Tüm çalı malar süresince kullanılan bu kimyasallar, analitik saflıkta olmalarından dolayı herhangi bir ekstra safla tırma i lemine tabi tutulmamı lardır. Hücre kültür çalı ması, kültür kapları ve çoklu kuyucuklu plakalarda (Corning, ABD) yapılmı tır.

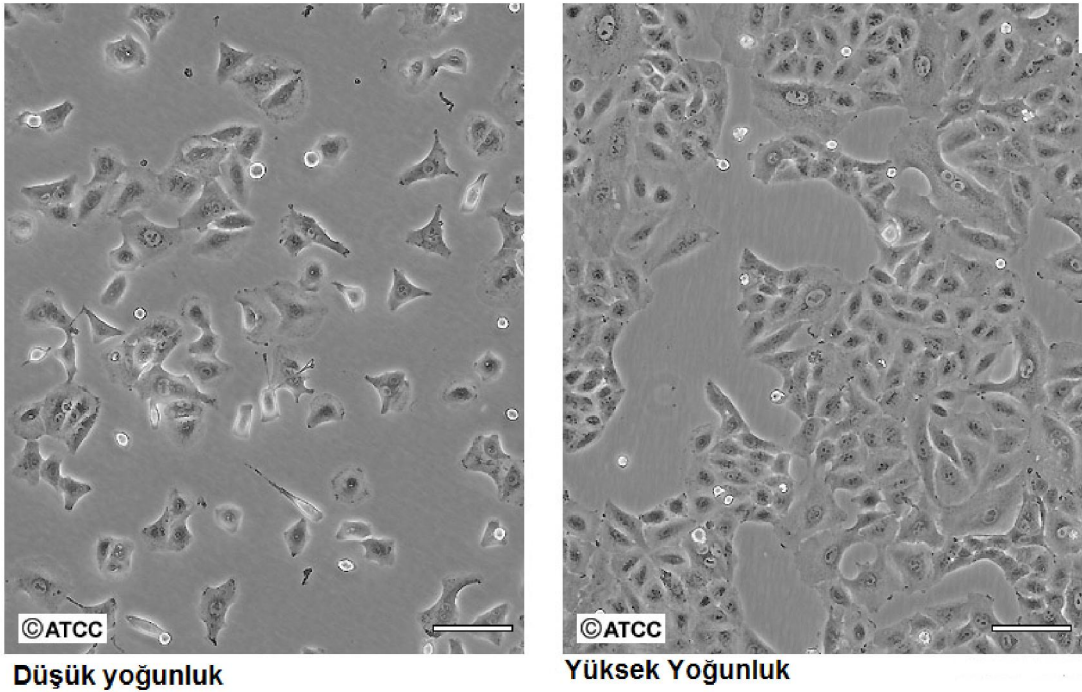
### 3.2. in vitro Antikanser İlaç – siRNA Hücre Etkile imleri

Hücre kültürü, canlı bir doku veya organdan alınan küçük bir parçanın in vitro ortamda ve kontrol edilebilir ko ullar altında büyütülmesi ve ço altılması i lemine verilen isimdir. Hücre kültürü terimi ile genellikle ökaryotik hayvan hücreleri kast edilse de bitki, fungi, virus ve bakterilerin de kültürü yapılır. Hücrelerin in vitro ortamda ya ayabilmeleri, büyümeleri ve ço almaları için uygun besiyerlerine ihtiyaçları vardır. yi bir besiyeri esansiyel ve non-esansiyel amino asitleri, vitaminleri, tuzları, ekerleri, serum, penisilin ve streptomisin gibi antibiyotikleri Na, K, Ca, Mg, Cl, P, NaHCO<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> gibi iyonları, Fe, Zn, Se gibi iz elementleri ve kolin, inositol gibi lipidleri ihtiva etmelidir. Kültür ortamını etkileyen di er faktörler ise sıcaklık, pH, nem, gaz fazı bile enleri, ozmolarite ve ı ıktır.

Hücre kültürlerinde yapılan çalı maların günümüzde önemli bir yeri vardır. Sa lıklı ya da patolojik durumlarda bir hücre ya da dokuda bulunan bir maddenin ya da üretilmi bir maddenin i levlerini belirlemek amacıyla bir hücre serisinden ço altılan hücrelerde çalı malar yapılarak in vitro sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca hücre/doku kültürü, gen tedavisi, çe itli enzimlerin ve hormonların üretimi, DNA ve RNA replikasyonu ara tırması, kök hücre ara tırmaları, doku mühendisli i ve genetik manipulasyon ve immortalizasyon gibi bir çok alanda kullanılmaktadır.

### 3.2.1. Hücrelerin Hazırlanması

Dondurulmuş ekilde  $-80^{\circ}\text{C}$  de derin dondurucuda bulunan kriyotüplerdeki A 549 hücreleri derin dondurucudan alınarak çözülür. %10 FCS içeren RPMI-1640 besiyeri ortamı hazırlanır. Çözülen A 549 hücreleri falkon tüp içerisine konularak üzerine 3 mL hazırlanan besi yerinden koyulur ve 2500 rpm'de 2 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılır ve pellet 4'er mL besi yeri ile süspansiyon edilip  $75\text{ cm}^3$  lük flasklara aktarılır. Flaskların kapağı hafif gevretilir ve  $37^{\circ}\text{C}$  de %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatöre koyulur. Mantar ve bakteri kontaminasyonlarına karşı her 24 saatte bir flask yüzeyinde hücrelerin çoalmaları mikroskopik olarak incelenir. Hücrelerin çoalmalarına bağlı olarak yüzey kaplaması tamamlandı ında kültürler tripsin enzimiyle muamele edilerek 1/4 pasaj yapılır ve hücreler yeni flasklara aktarılır.



ekil 3.1. A 549 hücrelerinin görüntüsü.

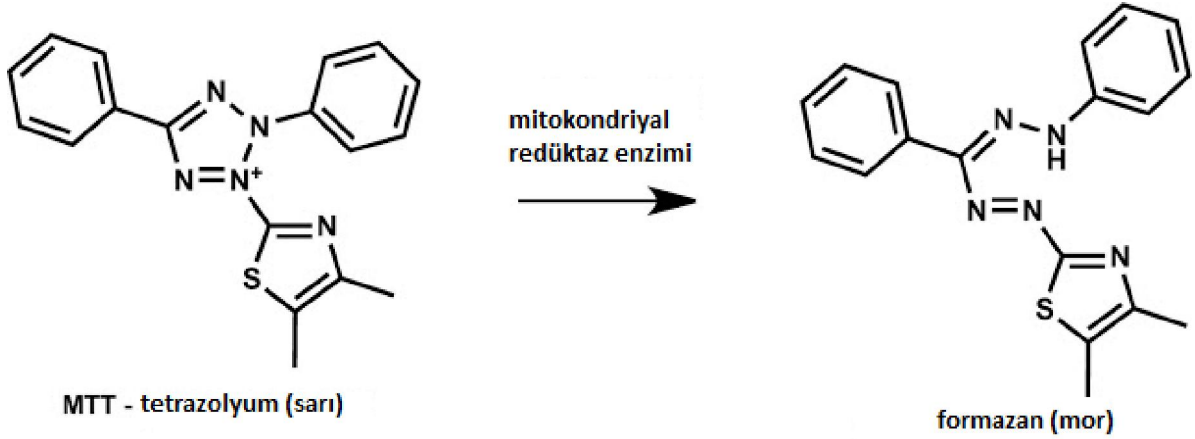
Çizelge 3.1. A 549 hücrelerinin hücre kültür ortamı

Hücre Türü	Akciğer Kanseri Hücre Hattı (A 549)
Kültür Kabı	75 cm <sup>3</sup> 'lük polistren flask, yüzeyi hücre tutunmasına uygun
Kültür Vasatı	%10 Fetal buzağı serumu içeren RPMI-1640
Rutin sub-kültür	1/4
Kültür Özelliği	Monolayer
Toplam Hacim	5 mL
pH	7,2-7,5
Sıcaklık	37±0,5°C
İnkübasyon Ortamı	% 5'lik CO <sub>2</sub> etüvü

### 3.2.2. Sitotoksikite Testi (MTT)

MTT testi, hücre canlılığının tesbiti için kullanılan testlerden biridir. Antiproliferatif ajanların sitotoksik olup olmadıkları veya sitotoksikite oranları bu test ile saptanabilir.

Genel olarak, mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin tetrazolyum boyasını indüklenme kapasitelerini ölçmeye dayalı kolorometrik bir yöntemdir. Sadece canlı hücreler tarafından sarı renkli tetrazolyum mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür [122].



ekil 3.2. MTT yapısında tetrazolyum tuzları formazan kristallerine dönüşümünün matematik gösterimi [122].

Ölümün formazan ürününü çözmek için genellikle DMSO, asitlenmiş etanol çözeltisi ya da seyrelmiş HCl içeren SDS çözeltisi eklenir. Bu mor renkli çözeltinin absorbans değeri, 500-600 nm aralığındaki bir dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak hesaplanır. MTT, hücrelerin aktivitelerini, proliferasyon ve canlılıklarını ölçmede etkin, hassas, güvenilir, kantitatif bir sitotoksikite yöntemidir.

A 549 kanser hücreleri flakslarda çoğaltılıp %70-80 oranında yüzeyi kapladıktan sonra hücre vasatı atılır, 3 mL PBS ile hücreler yıkanır. Daha sonra hücrelere 1 mL tripsin-EDTA eklenir ve flask 3-4 dakika inkübatörde bekletilir. inkübasyon sonrasında hücrelerin mikroskopik olarak flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak incelendikten sonra, flaska 3 mL taze besi yeri eklenip hücreler falkon tüpe aktararak 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırılır ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 mL taze besi yeri eklenir ve süspansiyon edilerek hücre sayımı yapılır. Hücre sayımı için hücreler tripan mavisi ile boyanıp otomatik hücre sayım cihazı (Cell Counter) ile sayılır. Bu sayımda mavi boyanmış hücreler ölü, parlak ve boyanmamış hücreler canlı hücreleri göstermektedir.



### 3.2.2.1. Antikanser İlaçların A549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Antikanser ilaçlarının ABCE1 siRNA ile birlikte hücelere verilmesi için, ilaçların dü ük deri imlerini belirlemek amacıyla A 549 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara  $5 \times 10^4$  hücre/mL deriimde ekilmiştir. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra 96 kuyucuklu plaklardaki hücre vasatı atılmış ve hücre besi yeriyle seyreltilmiş farklı deriimlerdeki 5-FU (1, 5, 25, 100, 150 ve 200  $\mu\text{M}$ ) ve irinotecan (1, 10, 50, 100, 200 ve 300  $\mu\text{M}$ ) ilaçları A 549 hücrelerinin üzerine 200  $\mu\text{L}$  olarak pipetlenmiştir. Plaklar 24 saat  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra plaktaki vasat atılmış ve kuyucuklara 100  $\mu\text{l}$  taze vasat ve 13  $\mu\text{l}$  MTT çözeltisi (5 mg/mL, PBS ile seyreltilmiştir) pipetlenmiştir. Plaklar 4 saat karanlıkta, etüvde inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki vasat ve MTT çözeltisi dikkatlice alınmış ve kuyucuklara 150  $\mu\text{L}$  DMSO pipetlenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildikten sonra plaklar 570 nm'de Mikro plate okuyucuda okutulmuştur.

Yapılan MTT testinde, 96 kuyucuklu plakların ilk sütunundaki sekiz kuyucuk kontrol çalıması olarak kullanılmıştır ve hücreler besi yerinin haricinde herhangi bir aktif ajan ile muamele edilmemiştir. Farklı deriimlerdeki antikanser ilaçlar sekiz tekrarlı olarak çalılmıştır. Kontrol plaktan alınan absorbansların ortalaması %100 kabul edilmiştir olup, test kuyucuklarından alınan absorbansların ortalamaları ile karşılaştırılmış ve ilaçların sitotoksitesi E itlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır [123].

$$\text{Hücre canlılığı } (\%) = \frac{(\text{ )}}{(\text{ )}} \times 100 \quad \text{E itlik 3.1.}$$

### 3.2.2.2. ABCE1 siRNA'nın A549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitesinin Ara tırılması

Farklı deriimlerdeki ABCE1 siRNA'nın A 549 kanser hücreleri üzerine etkisini incelemek için hücreler 96 kuyucuklu plaklara  $5 \times 10^4$  hücre/mL deriimde ekilmiştir. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. Son hacim 100  $\mu\text{L}$  besi yerinin içinde deriimleri 1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 nM olacak şekilde siRNA'lar 20  $\mu\text{M}$  stok

siRNA'dan RNAz içermeyen su ve serumsuz besi yeri ile seyreltilerek hazırlanmıştır. siRNA transfeksiyonunda ta iyıcı olarak ticari Hiperfect kullanılmıştır. Hazırlanan siRNA'lara 0.75 µL ta iyıcı ilave edilip vortekslenmiştir. siRNA ve ta iyıcının komplekslemesi için yarım saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan alınan hücrelerin vasatı atılmış ve farklı deri imlerdeki siRNA'lar hücrelerin üzerine 17 µL olarak pipetlenmiştir. Ta iyıcının hücreler üzerinde toksik etkisinin olup olmadığını incelemek için bir grup hücre de sadece ta iyıcı ile muamele edilmiştir. 30 dakika etüvde bekletilen plaka alınıp siRNA gruplarının üzerine 73 µL serumsuz medyum eklenip tekrar etüve alınmıştır. 4 saat sonra siRNA ile muamele edilen hücre gruplarına 10 µL serum ilave edilmiştir. Plaklar bu andan itibaren 24 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra plaktaki vasat atılmış ve kuyucuklara 100 µL taze vasat ve 13 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL, PBS ile seyreltilmiştir) pipetlenmiştir. Plaklar 4 saat karanlıkta, etüvde inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki vasat ve MTT çözeltisi dikkatlice alınmış ve kuyucuklara 150 µL DMSO pipetlenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildikten sonra plaklar 570 nm'de Mikro plate okuyucuda okutulmuştur.

Yapılan MTT testinde, 96 kuyucuklu plakların ilk sütunundaki sekiz kuyucuk kontrol çalması olarak kullanılmıştır ve hücreler besi yerinin haricinde herhangi bir aktif ajan ile muamele edilmemiştir. Farklı deri imlerdeki siRNA'lar sekiz tekrarlı olarak çalılmıştır. Kontrol plaktan alınan absorbansların ortalaması %100 kabul edilmiş olup, test kuyucuklarından alınan absorbansların ortalamaları ile kıyaslanmıştır.

### 3.2.2.3. ABCE1 siRNA/Antikanser İlaçların A 549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitelerinin Araştırılması

5-FU ve irinotecanın düşük konsantrasyonlarının A 549 kanser hücreleri üzerindeki etkinliğini arttırmak için hücreler farklı deri imlerdeki ABCE1 siRNA'larla birlikte muamele edilmiştir.

Çizelge 3.2. 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler üzerine eklenen gruplar

1 $\mu$ M 5-FU	1 $\mu$ M Irinotecan	1 $\mu$ M 5-FU + 1 $\mu$ M Irinotecan
1 $\mu$ M 5-FU + 25 nM siRNA	1 $\mu$ M IH + 25 nM siRNA	1 $\mu$ M 5-FU + 1 $\mu$ M IH + 25 nM siRNA
25 nM siRNA		
Kontrol		

Bunun için A 549 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara  $5 \times 10^4$  hücre/mL deri imde ekilmi tir. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edilmi tir. Sadece ilaç ile etkile ecek hücrelerin üzerine 100  $\mu$ L besi yerinin içinde deri imleri 1  $\mu$ M olacak ekilde 5-FU ve irinotecan ilaçları pipetlenmi tir. Son hacim 100  $\mu$ L besi yerinin içinde deri imleri 1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 nM olacak ekilde siRNA'lar 20  $\mu$ M stok siRNA'dan RNAz içermeyen su ve serumsuz besiyeri ile seyreltilerek hazırlanmı tir. siRNA transfeksiyonunda ta ıyıcı olarak ticari Hiperfect kullanılmı tir. Hazırlanan siRNA'lara 0.75  $\mu$ L transfeksiyon ajanı ilave edilip vortekslenmi tir. siRNA ve ta ıyıcının kompleksle mesi için yarım saat oda sıcaklı ında bekletilmi tir. 24 saatlik inkübasyondan alınan hücrelerin vasatı atılmı ve farklı deri imlerdeki siRNA'lar hücrelerin üzerine 17  $\mu$ L olarak pipetlenmi tir. Ta ıyıcının hücreler üzerinde toksik etkisinin olup olmadı ını incelemek için bir grup hücre de sadece ta ıyıcı ile muamele edilmi tir. 30 dakika etüvde bekletilen plak alınıp, son hacim 100  $\mu$ L'lik besi yerinin içinde deri imleri 1  $\mu$ M olacak ekilde serumsuz besi yerinde hazırlanan 5-FU, irinotecan ve 5-FU + irinotecan ilaç formülasyonlarından 73  $\mu$ L, siRNA ilave edilmi hücre gruplarının üzerine eklenip tekrar etüve alınmı tir. 4 saat sonra siRNA ve ilaç ile muamele edilen hücrelere 10  $\mu$ L serum eklenip son hacim 100  $\mu$ L'ye tamamlanmı tir. Plaklar bu andan itibaren 24 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmi tir. Daha sonra plaktaki vasat atılmı ve kuyucuklara 100  $\mu$ L taze vasat ve 13  $\mu$ L MTT çözeltisi (5 mg/mL, PBS ile seyreltilmi tir) pipetlenmi tir. Plaklar 4 saat karanlıkta, etüvde inkübe edildikten sonra

kuyucuklardaki vasat ve MTT çözeltisi dikkatlice alınır ve kuyucuklara 150 µL DMSO pipetlenir. 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildikten sonra plaklar 570 nm'de Mikro plate okuyucuda okutulmuştur.

### 3.2.3. ABCE1 siRNA/Antikanser ilaçların A549 Hücreleri Üzerindeki Proliferasyonun xCELLigence RTCA ile Belirlenmesi

xCELLigence sistemi, etiketleme gerektirmeyen gerçek zamanlı hücre sayım cihazıdır. Sistem elektriksel empedansı ölçerek çalışmaktadır. Empedans ölçümüyle hücre sayısı ve morfolojisi hakkında niceliksel bilgiler vermektedir.

Elektrotların üzerindeki hücrelerin varlığı, elektrot-çözelti ara yüzeyindeki iyonik ortamı etkiler, bunun sonucunda da elektrot empedansı artar. Ne kadar çok hücre elektroda tutunursa, empedanstaki artış da o kadar çok olur. Elektrot empedansı hücre indeksi (CI) olarak adlandırılır. E ser ortamda hücre yoksa veya hücreler elektroda iyi tutunmadıysa CI değeri sıfır olur. Elektroda ne kadar çok hücre tutunursa, CI değeri de o kadar çok büyür.

Farklı derişimlerdeki ABCE1 siRNA'nın ve 5-FU-irinotecan ilaçlarıyla kombine edilmenin A 549 kanser hücreleri üzerindeki proliferasyonunu incelemek ve hücre IC<sub>50</sub> (inhibisyon konsantrasyonu) değerini belirlemek için gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA SP instrument, Roche, Almanya) kullanılmıştır. Bunun için de hücreler 5000/well olacak şekilde altın kaplı 96 kuyucuklu e-plate'e ekimi yapılarak hücrelerin bir gün süre ile RTCA-SP sisteme bağlı inkübatör proliferasyonu takip edilecektir. E-plate'in her kuyucu başına 100 µL besiyeri konulur. E-plate 37°C etüvde bulunan xCELLigence'e yerleştirildikten sonra plate ile cihazın aynı sıcaklığa gelmesi için 10 dakika beklenir. 1 dakika cihazda zemin okuması yapıldıktan sonra e-plate çıkarılır. A 549 hücreleri kuyucuklara 100 µL pipetlenir. Tekrar e-plate etüve yerleştirilip, 10 dakika beklenir. 10 dakika sonunda okuma başlatılır. Hücrelerin plate'e tutunması ve çoğalması için yaklaşık 12 saat bekletilir. 12 saat sonunda hücreler büyüme fazına geçtiğinde Çizelge 3.3. 'deki formülasyonlar hücrelere ilave edilir.

Çizelge 3.3. 96 e-plate'e ekilen hücreler üzerine eklenen gruplar

1 µM 5-FU	1 µM Irinotecan	1 µM 5-FU + 1 µM Irinotecan
1 µM 5-FU + 25 nM siRNA	1 µM IH + 25 nM siRNA	1 µM 5-FU + 1 µM IH + 25 nM siRNA
25 nM siRNA		
50 nM siRNA		
75 nM siRNA		
100 nM siRNA		
Kontrol		

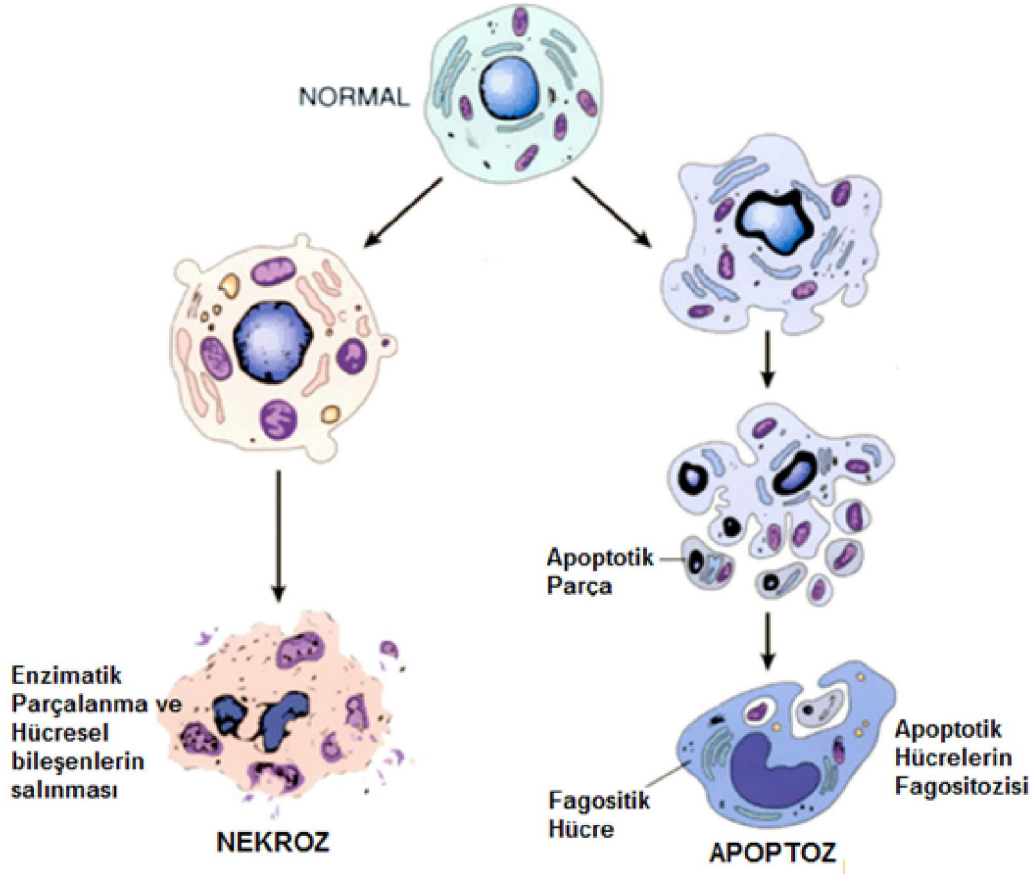
Sadece ilaç ile etkile ecek hücrelerin üzerine 100 µL besi yerinin içinde deri imleri 1 µM olacak ekilde 5-FU ve irinotecan ilaçları pipetlenmi tir. Son hacim 100 µL besi yerinin içinde deri imleri 25, 50, 75 ve 100 nM olacak ekilde siRNA'lar 20 µM stok siRNA'dan RNAz içermeyen su ve serumsuz besiyeri ile seyreltilerek hazırlanmı tir. siRNA transfeksiyonunda ta ıyıcı olarak ticari Hiperfect kullanılmı tir. Hazırlanan siRNA'lara 0.75 µL transfeksiyon ajanı ilave edilip vortekslenmi tir. siRNA ve ta ıyıcının kompleksle mesi için yarım saat oda sıcaklı nda bekletilmi tir. 12 saatin sonunda e-plate etüvden çıkarılır, kuyucuklardaki besi yeri bo altılır ve farklı deri imlerdeki siRNA'lar hücrelerin üzerine 17 µL olarak pipetlenmi tir. 30 dakika etüve konulan ve okumaya devam edilen e-plate bu sürenin sonunda etüvden çıkarılarak, son hacim 100 µl'lik besi yerinin içinde deri imleri 1 µM olacak ekilde serumsuz besi yerinde hazırlanan 5-FU, irinotecan ve 5-FU + irinotecan ilaç formülasyonlarından 73 µL, siRNA ilave edilmi hücre gruplarının üzerine eklenip tekrar etüve alınmı tir. 4 saat sonra siRNA ve ilaç ile muamele edilen hücrelere 10 µL serum eklenip son hacim 100 µL'ye tamamlanıp etüve konularak cihazın okumasına devam edilmi tir. Böylece hücrelerin 96 saat süre ile kültürü yapılacak ve 30 dakika

ara ile sistemden gerçek zamanlı olarak empedans ölçümü alınacaktır. Bu eklede cihaz monitöründen zamana ba lı hücre proliferasyonu kayıt edilerek gözlenir. Sonunda zamana ba lı hücre proliferasyonu gösteren bir grafik elde edilecektir.

#### 3.2.4. kili Boyama Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

Hücre ölümü apoptoz ve nekroz olarak iki sınıfa ayrılabilir. Apoptoz, hücresel sinyal yollarıyla regüle edilen, canlı organizmaların geli iminde ve hayatlarını devam ettirmelerinde esansiyel olan kontrollü hücre ölümüdür [124]. Apoptaza girmi hücrelerde nükleer yo unlaşma ve parçalanma, kromozomal DNA'nın internükleozomal parçalara ayrılması ve plazma membran bütünlü ü bozulmadan ölmü hücrelerin apoptotik parçalar ekinde paketlenmeleri gibi morfolojik de i imler hücre yapılarında gözlenmektedir. Apoptotik parçalar, fagositik hücreler tarafından tanınırlar ve yok edilirler bu yüzden ölen hücre ekstraselüler çevresinde enflamasyon olmaması apoptozu ayrıca önemli kılar. Ölüm reseptörlerinin ligasyonu, apoptotik araçların mitokondriden salınmaları ve kaspaz proteinlerin (sistein proteazları) aktivasyonu apoptozun karakteristik morfolojik özelliklerine sahip olmasını sa lar. Kanserde; normal, sa lıklı bir hücre malign hücreye dönü ü ve bu durum genetik de i iklikleri beraberinde getirir. Di er bir yandan apoptoz potensiyel malignan hücreleri elimine etmesiyle bilinir ancak kanser hücrelerinin apoptoz yeteneklerinin az olması, bu durumun kanser geli iminde kilit rol oynadı ı dü üncesine yol açar [124].

Fizyolojik süreç olan apoptozun aksine nekroz patolojiktir. Nekroz, enfeksiyon, toksinler veya hücresel bile iklerin kontrolsüz yıkımına sebebiyet verecek travmalar gibi eksternal faktörlerden dolayı olu ur. Apoptozun organizmaya genelde yararlı etkileri olurken nekrozun etkileri her zaman zararlı ve ölümcüldür [125]. Nekroza giren hücrelerde de i im ilk önce mitokondride ba lar, çekirdekte de i im çok az gözlenir. Bu durum organellerin da ılması ve hücre membranının seçici geçirgen özelli ini kaybetmesiyle devam eder. Sonuç olarak hücreler i er ve intraselüler bile enler sitoplazma dı na salınır. Lizozom da parçalanınca hidrolazlar serbest kalır bu da hücre degradasyonuna sebebiyet verir [126].



ekil 3.3. Apoptoz ve nekrozun morfolojik görünümüleri.

#### 3.2.4.1. kili Boyama Metodu

Çalı manın bu kısmında; tek ba ına kanser ilaçları (5-FU ve irinotecan), tek ba ına ABCE1 siRNA ve ilaç-siRNA karı ımları kullanılarak bu ajanların A 549 kanser hücre kültürlerinde apoptotik ve nekrotik etkileri ara tırılmı tır.

Çizelge 3.4. 48 kuyucuklu pla a ekilen hücreler üzerine eklenen gruplar

1 $\mu$ M 5-FU	1 $\mu$ M Irinotecan	1 $\mu$ M 5-FU + 1 $\mu$ M Irinotecan
1 $\mu$ M 5-FU + 25 nM siRNA	1 $\mu$ M IH + 25 nM siRNA	1 $\mu$ M 5-FU + 1 $\mu$ M IH + 25 nM siRNA
25 nM siRNA		
Kontrol		

Bunun için A 549 hücreleri 48 kuyucuklu plaklara  $5 \times 10^4$  hücre/mL deri imde ekilmi tir. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edilmi tir. Sadece ilaç ile etkile ecek hücrelerin üzerine 200  $\mu$ L besi yerinin içindeki deri imleri 1  $\mu$ M olacak ekilde 5-FU ve irinotecan ilaçları pipetlenmi tir. Son hacim 200  $\mu$ L besi yerinin içinde deri imleri 25 nM siRNA'lar 20  $\mu$ M stok siRNA'dan RNAz içermeyen su ve serumsuz besiyeri ile seyreltilerek hazırlanmi tir. siRNA transfeksiyonunda ta ıyıcı olarak ticari Hiperfect kullanılmı tir. Hazırlanan siRNA'lara 1.5  $\mu$ L transfeksiyon ajanı ilave edilip vortekslenmi tir. siRNA ve ta ıyıcının kompleksle mesi için yarım saat oda sıcaklı ında bekletilmi tir. 24 saatlik inkübasyondan alınan hücrelerin vasatı atılmı ve farklı deri imlerdeki siRNA'lar hücrelerin üzerine 34  $\mu$ L olarak pipetlenmi tir. 30 dakika etüvde bekletilen plak alınıp, son hacim 200  $\mu$ L'lik medyumun içinde deri imleri 1  $\mu$ M olacak ekilde serumsuz besi yerinde hazırlanan 5-FU, irinotecan ve 5-FU + irinotecan ilaç formülasyonlarından 146  $\mu$ L, siRNA ilave edilmi hücre gruplarının üzerine eklenip tekrar etüve alınmi tir. 4 saat sonra siRNA ve ilaç ile muamele edilen hücrelere 20  $\mu$ L serum eklenip son hacim 200  $\mu$ L'ye tamamlanmi tir. Plaklar bu andan itibaren 24 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmi tir. inkübasyonun ardından 48 kuyucuklu plakta bulunan hücre vasatları atılmı ve tüm kuyucuklara 10 mL PBS, 100  $\mu$ L Ribonükleaz A, 500  $\mu$ L Hoechst 33342 ve 100  $\mu$ L PI boyalarını içeren ikili boyama solüsyonundan 70  $\mu$ L pipetlenip plak 15 dakika etüvde bekletilmi tir.

Kuyucuklara tek tek bakılarak floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza u ramı ve FITC (480-520 nm dalga boyunda) nekroza u ramı hücrelerin de erlendirilmesi yapılmı tir. De erlendirme floresan mikroskop kullanılarak (Leica DMI70, Almanya) yapılmı olup apoptotik indeks yüzde (%) olarak ifade edilmi tir. De erlendirmede normal, apoptotik olmayan hücreler, çekirdekleri sönük mavi, çekirdekte DNA da ılmamı , hücrede veziküller olu mamı olarak görülmektedir. Apoptoza girmi hücre çekirdekleri ise normal hücre çekirdeklerine göre çok parlak, çekirdek homojenli i kaybolmu , çekirdek kenarları düzgün de il ve DNA parçalanmi parlak mavi görünümündedir. kili boyama sonucunda apoptoza girmi hücrelerin çekirdekleri Hoechst 33342 floresan boyası ile boyanmi tir. kili boyamada kullanılan di er boya PI ise nekroza u ramı hücreleri göstermek amacı ile kullanılmı tir. PI



floresan boyası normalde canlı ve hücre zarlarında hasar olmayan hücrelere girememekte ve bu hücreler PI ile boyanmamaktadırlar. Fakat hücre nekroza uğradığında veya hücre zarı hasar gördüğünde hücre içerisine girmekte ve çekirdeği kırmızıya boyamaktadır. Floresan ı ık (FITC veya kırmızı floresan ı ık) altında bakıldığında nekroza uğrayan hücrelerin çekirdekleri kırmızı renkte görülmektedir.

### 3.2.5. E Zamanlı RT-PCR Çalışmaları

RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) RNA ifadenme seviyelerini belirlemek için moleküler biyolojide sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [127]. Bu teknikte floresan prob kullanılarak hedef genin çoğaltılması kantitatif olarak tayin edilir. Sunulan tez çalışmasında floresan prob olarak SYBR Green Master Mix kullanılmıştır. RT-PCR'da kalıp olarak kullanılan RNA ilk olarak ters transkriptaz enzimiyle komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülür. Daha sonra bu cDNA üzerinden, hedef gen primerleri, DNA'ya bağlanabilen floresan probları ve uygun denatürasyon, bağlanma ve uzama şartları altında hedef gen ifadenmesinin kantitatif analizi yapılır. Belirli bir gen ekspresyon analizi için optimum primer dizaynı oldukça önemlidir. Elde edilen cDNA'da yüzlerce gen olduğu için optimize edilmiş primerler ilgili geni spesifik şekilde çoğaltarak spesifik olmayan çoğaltmaları da bertaraf etmiş olurlar.

Bu yöntem RNA seviyelerini tayin etmede oldukça güçlü ve hassas bir yöntemdir. Genetik hastalıkların teşhisinde, tekli ve çoklu genlerin ifadenme analizinde, enfeksiyon ve hastalıkların ifadenme kalıplarını tanımlamada kullanılır.

Çalışmanın bu kısmında ABCE1 proteininin siRNA ile mRNA seviyesinde inhibe edilmesini göstermek amacıyla RT-PCR analizi de yapılmıştır. Ayrıca tekli ilaç, ikili ilaç ve siRNA ile birlikte hazırlanan formlarının hücrelere uygulanmasından sonra BCL-2, mTOR ve ABCE1 genlerinin de ifadenme seviyelerini kontrol gruplarıyla karşılaştırmak için RT-PCR uygulanmıştır.

Çizelge 3.5. 6 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler üzerine eklenen gruplar

1 $\mu$ M 5-FU	25 nM siRNA
1 $\mu$ M 5-FU + 25 nM siRNA	50 nM siRNA
1 $\mu$ M IH	75 nM siRNA
1 $\mu$ M IH + 25 nM siRNA	100 nM siRNA
Kontrol	

A 549 hücreleri 6 kuyucuklu plaklara  $5 \times 10^5$  hücre/mL deri imde ekilmi tir. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edilmi tir. Sadece ilaç ile etkile ecek hücrelerin üzerine 2 mL besi yerinin içinde deri imleri 1  $\mu$ M olacak ekilde 5-FU ve irinotecan ilaçları pipetlenmi tir. Son hacim 2 mL besi yerinin içinde deri imleri 25, 50, 75 ve 100 nM olacak ekilde siRNA'lar 20  $\mu$ M stok siRNA'dan RNAz içermeyen su ve serumsuz besiyeri ile seyreltilerek hazırlanmı tir. siRNA transfeksiyonunda ta ıyıcı olarak ticari Hiperfect kullanılmı tir. Hazırlanan siRNA'lara 12  $\mu$ L transfeksiyon ajanı ilave edilip vortekslenmi tir. siRNA ve ta ıyıcının kompleksle mesi için yarım saat oda sıcaklı nda bekletilmi tir. 24 saatlik inkübasyondan alınan hücrelerin vasatı atılmı ve farklı deri imlerdeki siRNA'lar hücrelerin üzerine 340  $\mu$ L olarak pipetlenmi tir. 30 dakika etüvde bekletilen plak alınıp, son hacim 2 mL'lik medyumun içinde deri imleri 1  $\mu$ M olacak ekilde serumsuz besi yerinde hazırlanan 5-FU ve irinotecan çözeltilerinden 1460  $\mu$ L, siRNA ilave edilmi hücre gruplarının üzerine eklenip tekrar etüve alınmı tir. 4 saat sonra siRNA ve ilaç ile muamele edilen hücrelere 200  $\mu$ L serum eklenip son hacim 2 mL'ye tamamlanmı tir. Plaklar bu andan itibaren 24 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmi tir.

### 3.2.5.1. RNA zolasyonu

Çizelge 3.5'teki gruplarla 24 saat inkübe edilen hücrelerden, her bir örnekten RNA izolasyonu yapmak için a a ıdaki i lem takip edilmi tir.

Kuyucuklardan hücre vasatının alınması ve hücrelerin PBS ile yıkanması



% 0.25 tripsin içeren PBS ile hücrelerin kaldırılması



Falkon tüplerde 2500 rpm'de 2 dk santrifüj

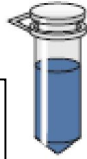


Süpernatantın atılması ve 350 µL lizis çözeltisi RLT ilavesi



Lizatın 30 sn boyunca  
homojenizatörde  
homojenize edilmesi

350 µL Etanol ilavesi

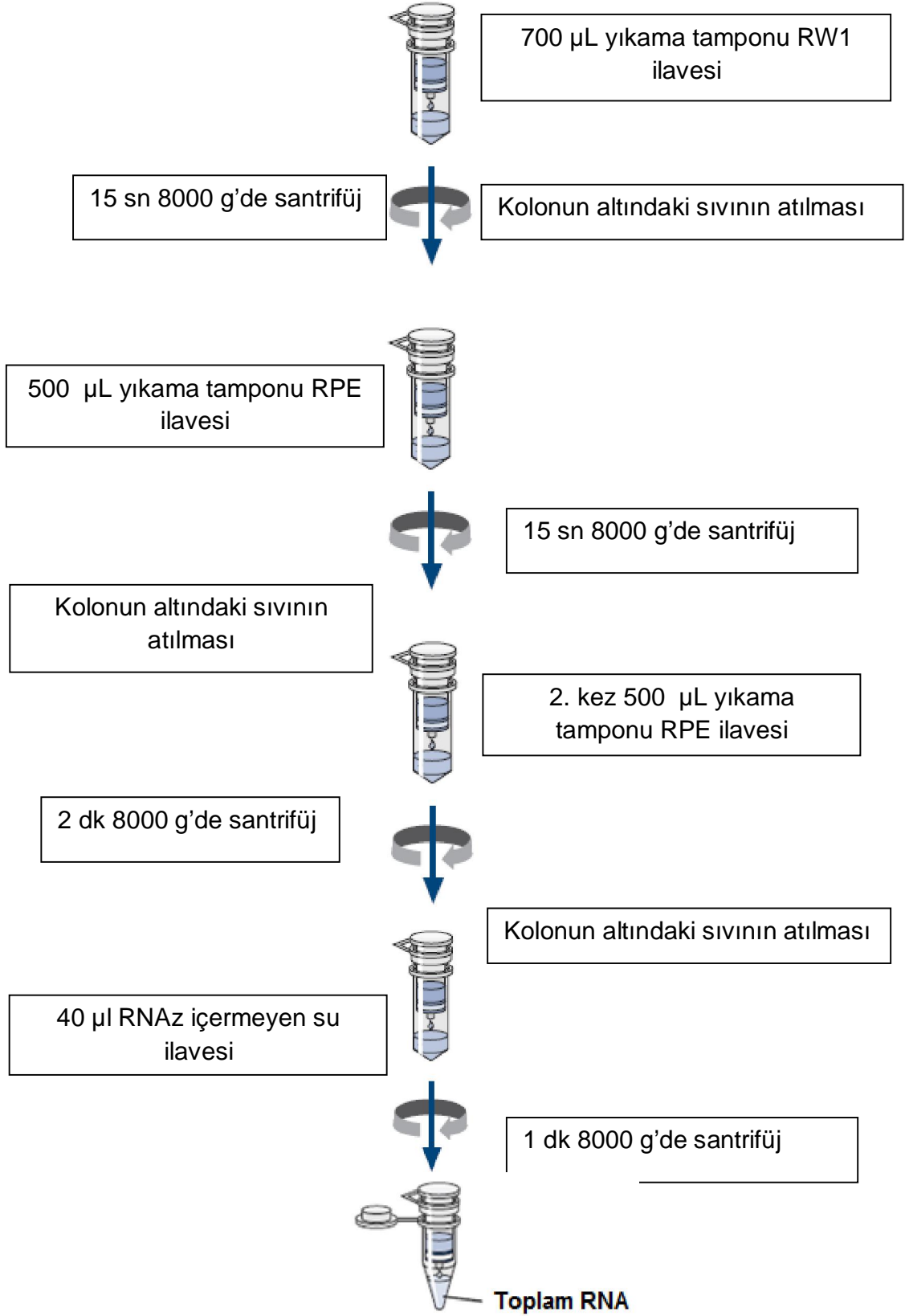


Kolona aktarım ve 15 sn  
10000 rpm'de santrifüj



Kolonun altındaki sıvının atılması

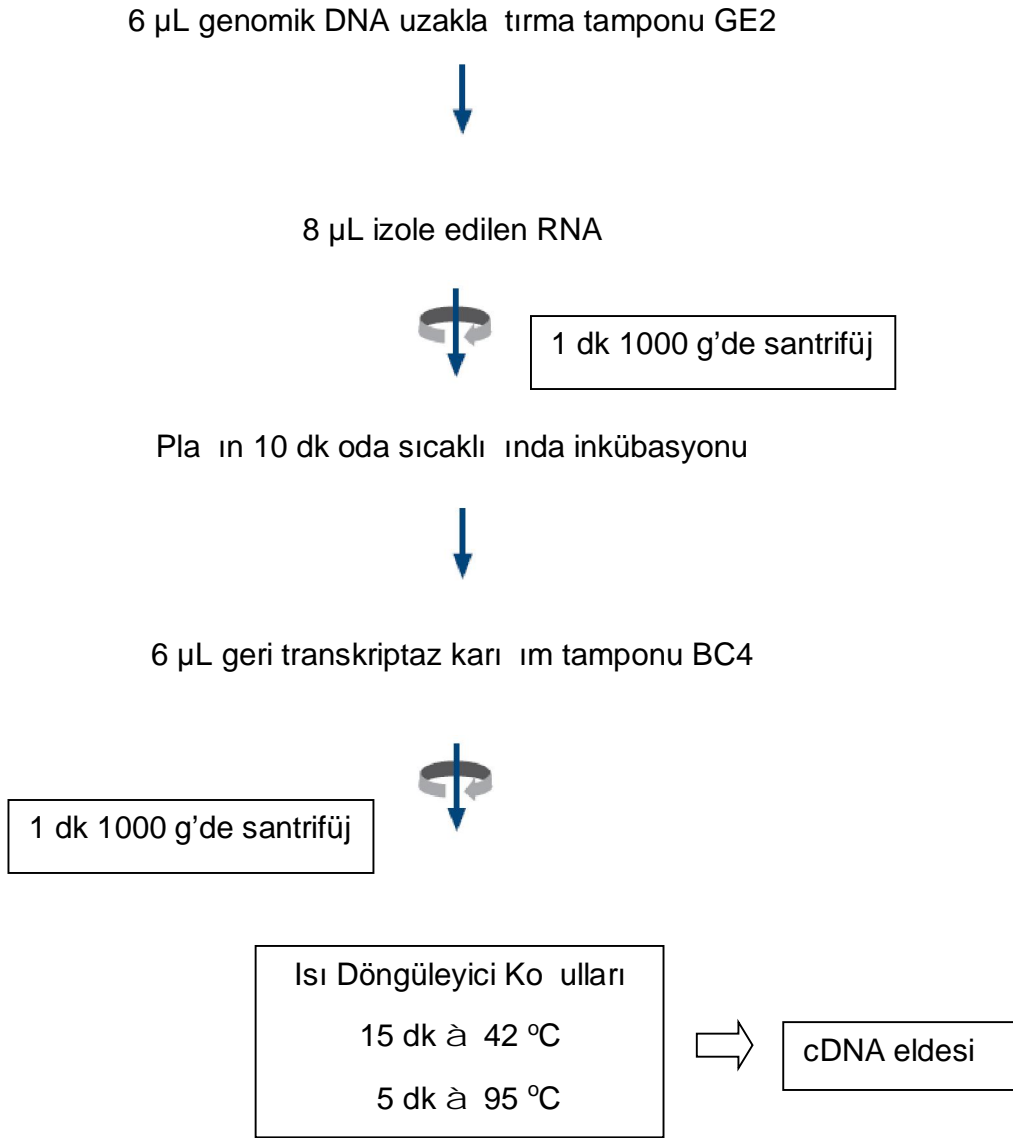
**Total RNA'nın  
kolona bağlanması**



Elde edilen RNA'ları cDNA'ya dönü türme reaksiyonundan önce her birinin deri imi örneklerden 2' er  $\mu\text{L}$  alınarak Nano Drop (Thermo Scientific, ABD) cihazı ile 260 nm'de ölçülmü tür.

### 3.2.5.2. cDNA Sentezi

Her bir gruptan izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlemek için a a ıdaki protokol takip edilmi tir. PCR kullanımına özgü 96 kuyucuklu plak kullanılmı tır. Kuyucuklara a a ıdakiler sırasıyla eklenip ardından ısı döngüleyici kullanılarak önerilen geri transkripsiyon mekanizması ko ulları uygulanmı tır.



Her bir gruba ait total cDNA'ların deri imlerini belirlemek için örneklerden 2' er µL alınarak Nano Drop (Thermo Scientific, ABD) cihazı ile 260 nm'de ölçülmü tür. Bunun için önce elde edilen cDNA'lar 91 µl RNAz içermeyen su ile seyreltilmi daha sonra ölçüm yapılmı tır.

### 3.2.5.3. E Zamanlı RT-PCR Primer Analizi

Çalı ılan gruplarda siRNA ile baskılanan ABCE1 geninin ifadenmesinin inhibe edildi ini göstermek amacıyla RT-PCR Primer analizi yapılmı tır. Ayrıca bu baskılanmanın antiapoptotik yola ı düzenleyen genlerden olan BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) ve hücre büyümesini, ço almasını, protein sentez ve transkripsiyonunu regüle edici genlerden olan mTOR'un (Mammalian Target of Rapamycin) gen ifadenme düzeylerini etkileyip etkilemedi ini veya etkilediyse ne ekilde etkiledi ini ara tırmak için RT-PCR Primer Analizi yapılmı tır.

ABCE1, BCL-2 ve mTOR genlerinin ifadenme analizleri için bu genlere spesifik primerler kullanılmı tır. Referans gen olarak -Actin seçilmi tir. RT-PCR cihazı olarak Roche LightCycler 480 kullanılmı ve analiz cihaza özgü 96 kuyucuklu plakta gerçekleştirilmi tir. Analiz edilecek her bir gen için Çizelge 3.6.'daki reaksiyon hazırlanmı tır.

Çizelge 3.6. Tek bir reaksiyon için PCR komponent karı ımı

Bile en	Hacim (µL)
SYBR Green Mastermix	12.5
cDNA sentez reaksiyonu	5.0
Primer	1.0
RNAz içermeyen su	6.5
Toplam Hacim	25.0

96 kuyucuklu plak pipetlemelerden  
sonra 1 dk 1000 g'de santrifüj  
edilmi tir.



Çizelge 3.7. Roche LightCycler 480 ko ullanı

Döngüler	Zaman	Sıcaklık
1	10 dk	95°C
45	15 sn	95°C
	1 dk	60°C

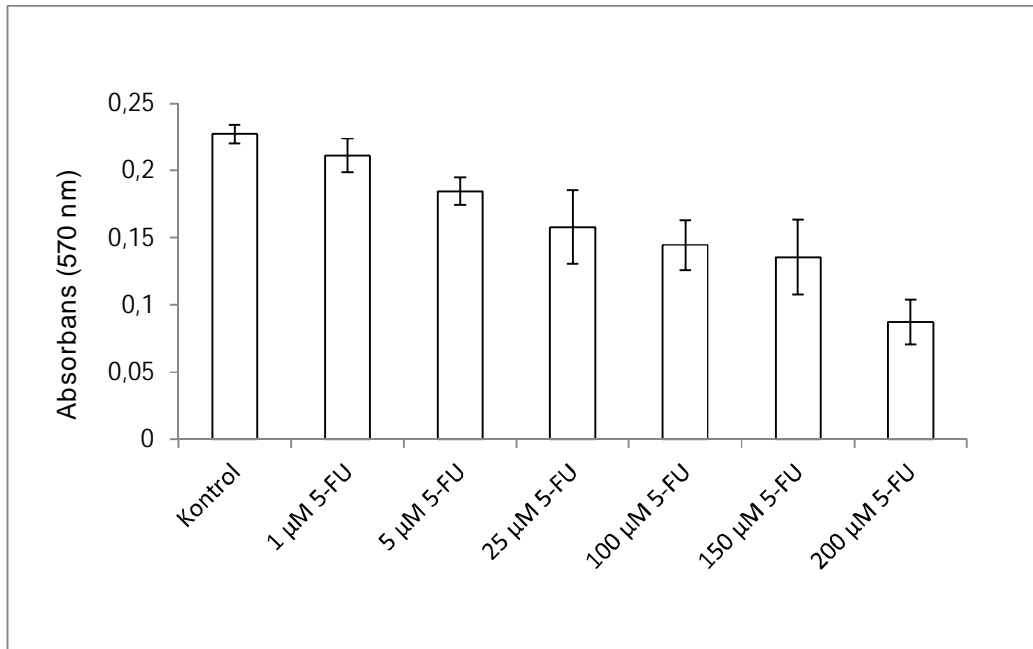
Çizelge 3.7.'deki ko ullanlar sa lanarak, gruplarda 4 genin ifadenme analizi incelenmi tir.

## 4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTI MA

### 4.1. Antikanser laç – siRNA Hücre Etkile im Sonuçları

#### 4.1.1. Antikanser laçların A 549 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

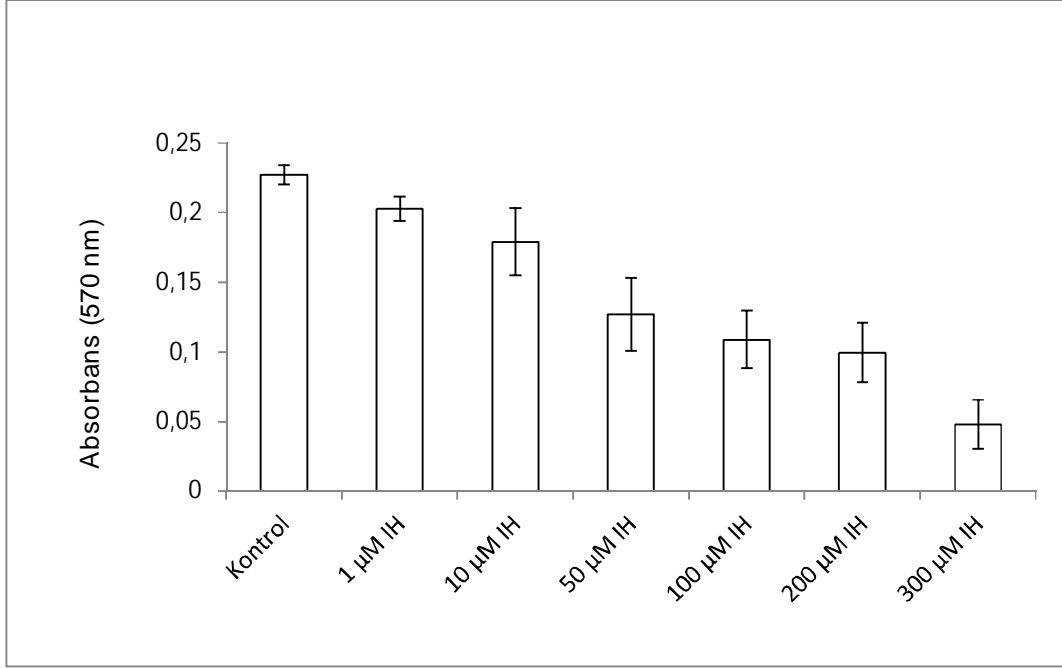
Bu çalı mada 1, 5, 25, 100, 150 ve 200  $\mu\text{M}$  deri imlerdeki 5-FU ve 1, 10, 50, 100, 200 ve 300  $\mu\text{M}$  deri imlerdeki irinotecan ilaçlarının A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkileri MTT testiyle incelenmi tir.



ekil 4.1. 5-FU'nun A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi.

1-200  $\mu\text{M}$  arası de i en 5-FU miktarı arttıkça hücre canlılı ında kontrole göre azalı oldu u gözlenmi tir. 1  $\mu\text{M}$  5-FU'in hücreler üzerindeki canlılık etkisi % 93.01 olarak belirlenmi tir. Yüksek deri imdeki antikanser ajanlarının sa lıklı hücelere zararını bertaraf etmek adına ABCE1 siRNA ile dü ük deri imdeki ilacın etkisinin artırılması hedeflenmekteydi. Bu kapsamda siRNA ve ilacın ikili kombine etkisini incelemek için dü ük 5-FU deri imi 1  $\mu\text{M}$  olarak seçilmi ve ilerleyen çalı malarda bu de erle devam edilmi tir.





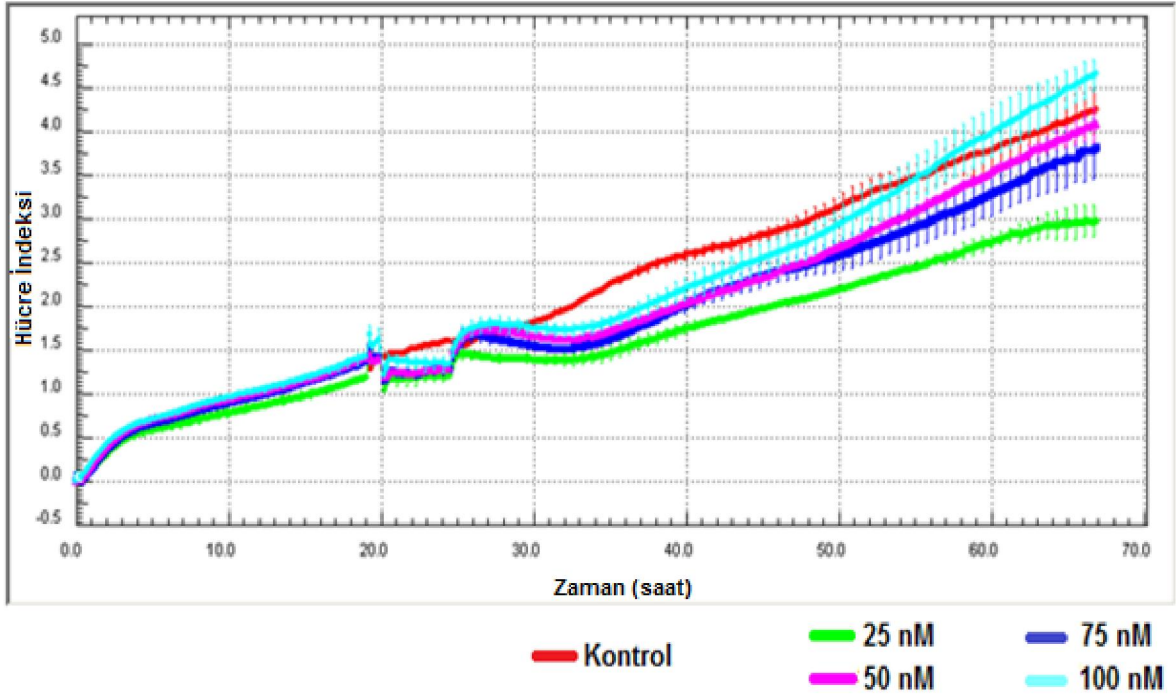
ekil 4.2. Irinotecanın A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi.

1-300 µM arası de i en irinotecan miktarı arttıkça hücre canlılı ında kontrole göre azalı oldu u gözlenmi tir. 1 µM irinotecanın hücreler üzerindeki canlılık etkisi % 89.21 olarak belirlenmi tir. 2010 yılında keda ve arkada larının yaptıkları çalı mada 3-100 µM arası de i en irinotecan konsantrasyonları kullanılarak A 549 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi incelenmi ve benzer sonuçlar gözlemlemi lerdir [120].

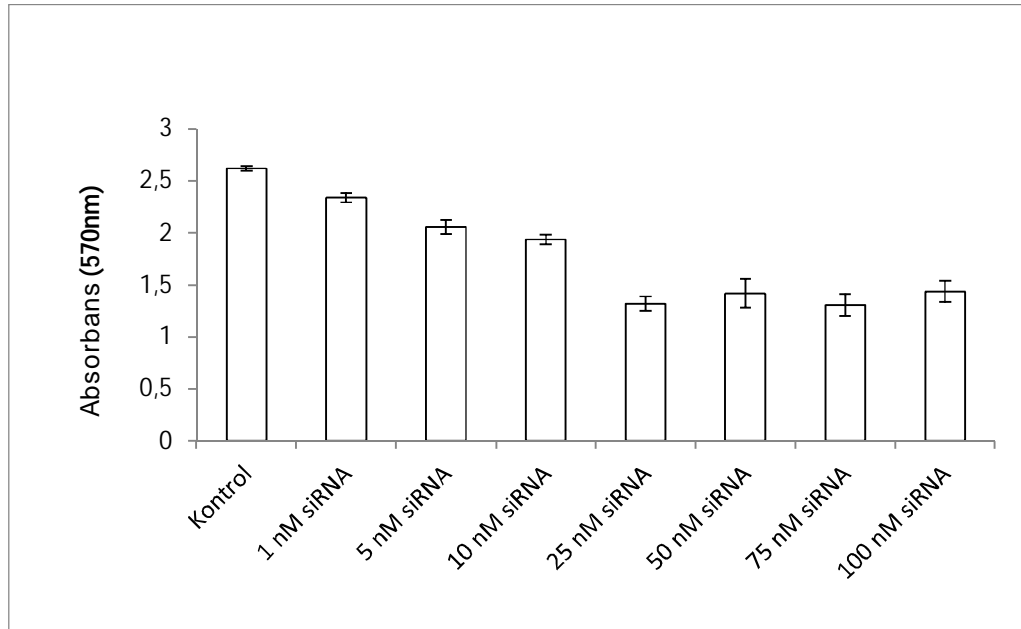
Yüksek deri imdeki antikanser ajanlarının sa lıklı hücelere zararını bertaraf etmek adına ABCE1 siRNA ile dü ük deri imdeki ilacın etkisinin artırılması hedeflenmekteydi. Bu kapsamda siRNA ve ilacın ikili kombine etkisini incelemek için dü ük irinotecan konsantrasyonu 1 µM olarak seçilmi ve ilerleyen çalı malarda bu de erle devam edilmi tir.

#### 4.1.2. ABCE1 siRNA'nın A549 Hücreleri Üzerine Etkisi

Bu çalı mada ABCE1 proteinininin 1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 nM siRNA'lar ile baskılamasının A 549 hücrelerinin canlılı ı üzerine etkisi MTT testi ve RTCA ile analiz edilmi tir. ekil 4.3. ve ekil 4.4.'e göre hem MTT testi hem de RCTA testleri birbirlerine uyumlu ekilde görölmektedir.



ekil 4.3. ABCE1 siRNA'nın hücre çoğalması üzerine etkileri.



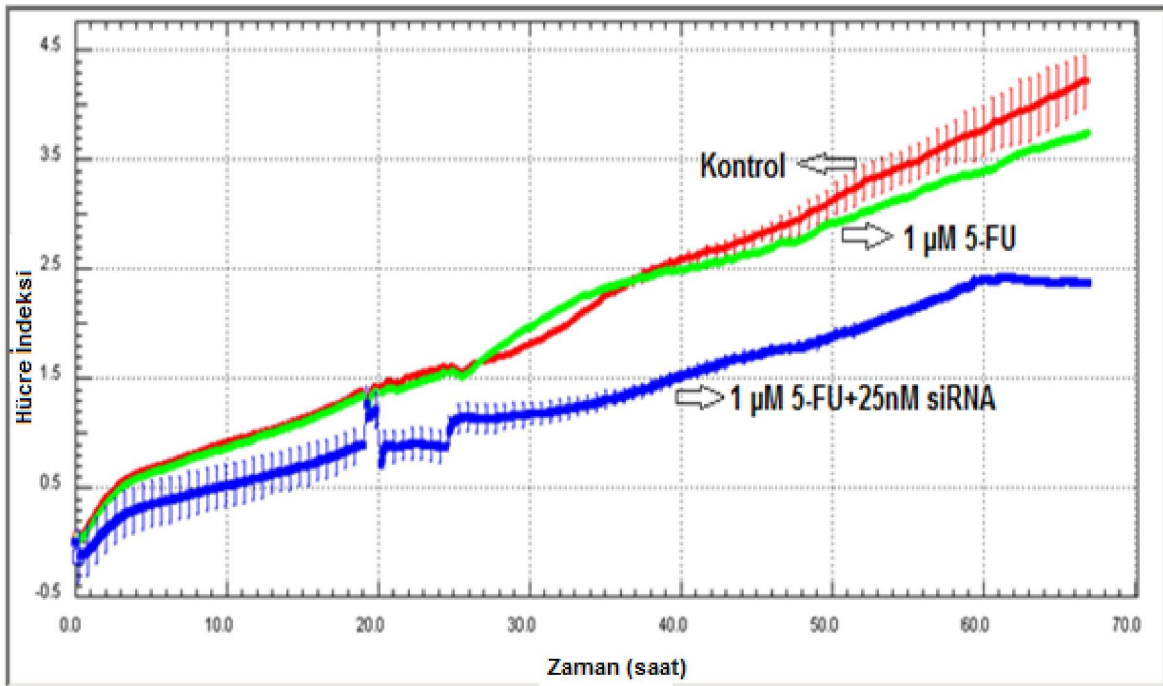
ekil 4.4. ABCE1 siRNA'nın A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi.

ABCE1'in, RNAz L'yi ve onun hücre büyümesi ve proliferasyonundaki etkisini inhibe etme özelliğinden dolayı bu proteinin tümör gelişimine katkısı olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda protein sentezinin translasyon adımında da etkin rol oynamaktadır. Böylece ABCE1'in baskılanması, kanser patolojisinin gelişiminde önemli olan translasyon basamağının yavaşlamasına veya durmasına ve tümör hücrelerinin proliferasyonunun inhibe edilmesine neden olacaktır. Sonuçlara göre farklı doku türlerindeki ABCE1 siRNA'nın hücreler üzerinde farklı sitotoksik ve anti proliferatif etkisi vardır. Elde edilen MTT sonucuna göre özellikle 25, 50, 75 ve 100 nM siRNA'lar ile etkilenen hücrelerde 1, 5 ve 10 nM siRNA kullanılan gruplara göre % canlılık oranı azalmıştır. Her iki analiz sonucuna göre hücreler siRNA'lar ile muamele edildikten 24 saat sonraki en etkin toksik ve antiproliferatif etki 25 nM siRNA'da gözlenmiştir. MTT testi sonucuna göre 25 nM siRNA ile etkilenen hücrelerin canlılık oranı % 50.44'tür. 50, 75 ve 100 nM siRNA'ların 25 nM siRNA etkinliğinden daha yüksek olması beklenirken, daha düşük etkiye sahip olmaları yüksek doku türlerindeki siRNA'nın yanlış hedefleme (off-target) etkisine neden olabileceğinden dikkatli olmalıdır. Bu etki, hücrelerin hedef genin etkin şekilde susturacak düşük fakat yeterli dozlardaki siRNA'lar ile muamele edilmesiyle azalabilir [128].

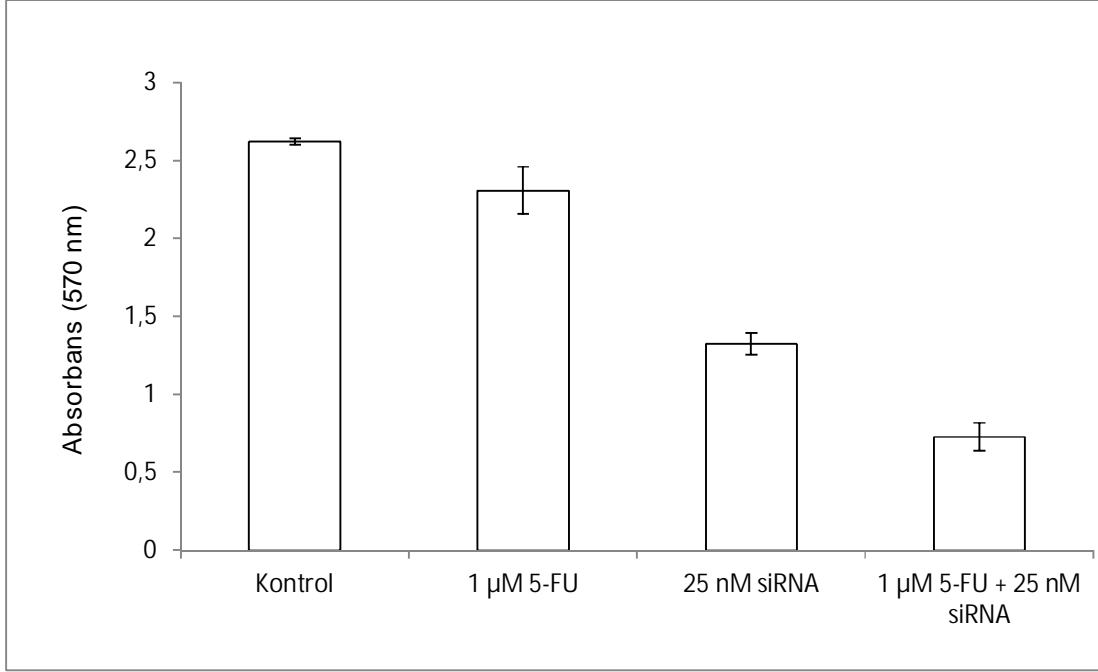
Chen ve arkadaşlarının insan tümör hücre hattı HEK293 ile yaptıkları bir çalışmada hücrelerin ABCE1 siRNA ile transfeksiyonu sonucu proliferasyonun etkin şekilde inhibe edildiği gözlenmiştir ve ABCE1 ekspresyonunun hücre proliferasyonu ile ilişkili olabileceğinden dikkatli olmalıdır [129]. Benzer şekilde bir başka çalışmada ABCE1 siRNA ile 24 saat muamele edilen küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı NCI-H446'da % 25-29 oranında hücre inhibisyonu görülmüştür [110]. Ren ve arkadaşları ABCE1 geninin akciğer adenokarsinom hücrelerindeki rolüyle ilgili yaptıkları çalışmada ABCE1'in inhibisyonuyla A549 hücrelerinde % 42 oranında 24 saatlik sitotoksik etki elde etmişlerdir [107]. Sunulan tez kapsamında elde edilen sonuçlar literatürü destekler niteliktedir. Hücre canlılığı inhibisyonunda en etkin siRNA doku türü 25 nM'da gözlemlendiği için ilaç çalışmalarında bu doku türüyle devam edilmelidir.

#### 4.1.3. ABCE1 siRNA/Antikanser İlaçların Kombine Etkisinin A 549 Hücreleri Üzerine Sitotoksitesisi

Bu çalışmada A 549 hücrelerinin düşük dozlardaki antikanser ilaçlara karşı gösterdikleri hassasiyeti arttırmak amacıyla 1  $\mu\text{M}$  5-FU, 1  $\mu\text{M}$  irinotecan tekli ilaç ve 1  $\mu\text{M}$  5-FU + 1  $\mu\text{M}$  irinotecan ikili ilaçlar 25 nM ABCE1 siRNA ile etkileştirilerek kombine tedavinin uygulamasının A 549 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi MTT testi ve RTCA ile analiz edilmiştir.



ekil 4.5. ABCE1 siRNA/5-FU'in hücre çoğalması üzerine etkileri.

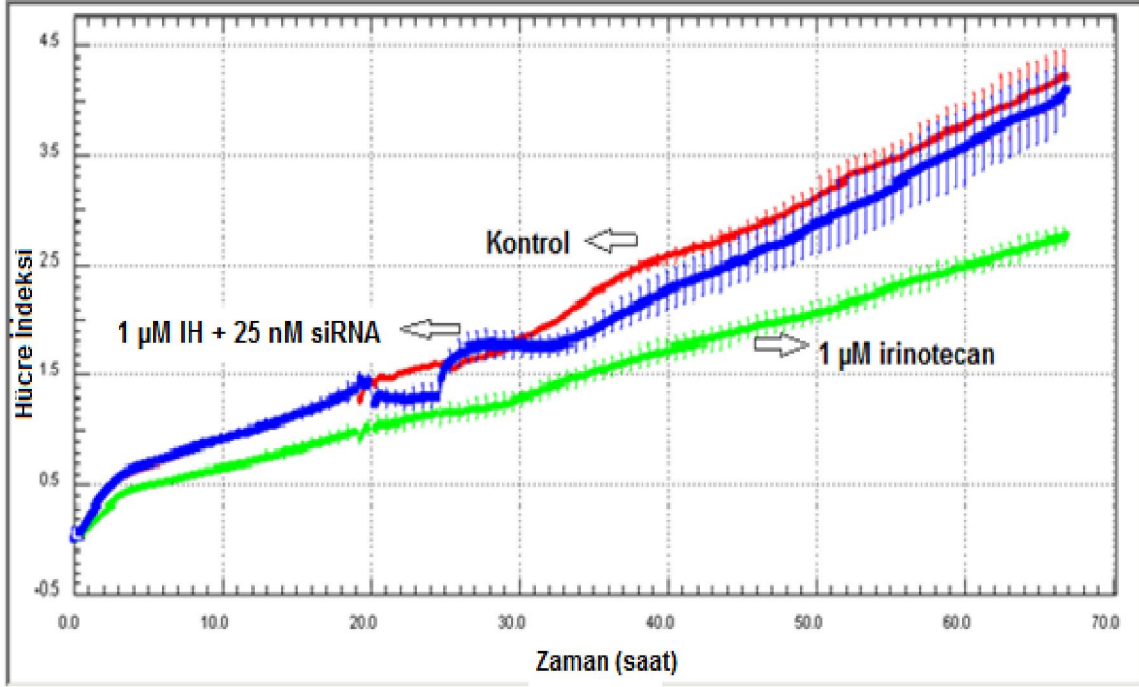


ekil 4.6. ABCE1 siRNA/5-FU'nun A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi.

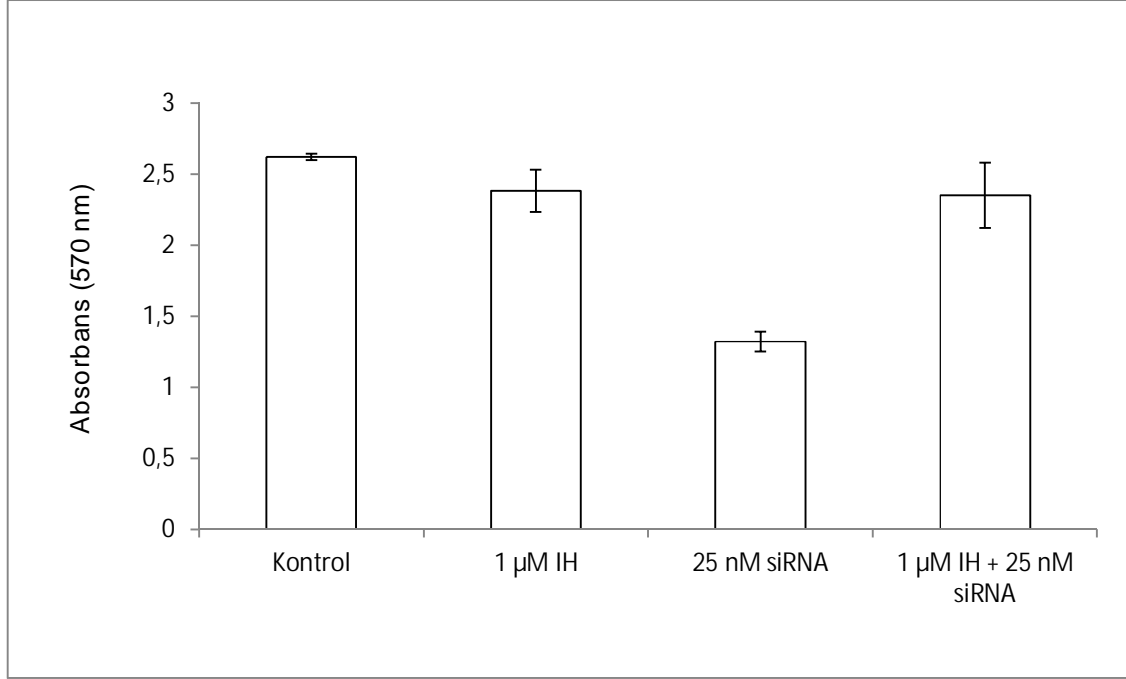
5-FU, akci er, kolon, meme ve cilt kanseri kemoterapisinde sıklıkla kullanılan bir ilaç olmasına rağmen yüksek yan etkileri ve tümör hücrelerin ilaç direnci geli tirmesi sebebiyle klinik kullanımı kısıtlanmıştır. ekil 4.5. ve 4.6'da görüldü ü gibi ABCE1 siRNA ve 5-FU'in kanser hücrelerine birlikte verilmesinin, hücre proliferasyonu ve toksisitesi üzerine her iki ajanın tekli etkisinden daha efektif oldu u ve ABCE1 degradasyonunun tümör hücrelerinin bu ilaca hassasiyetlerini arttırdı ı gözlenmiştir. RTCA ve MTT testleri birbiriyle uyumlu sonuçlar göstermekte olup elde edilen sonuçlar literatürdeki benzer çalı malarla paralellik içindedir.

Kanser tedavisinde siRNA'ların terapötik kullanımının sitotoksik kemoterapi ilaçlarıyla kombine edilmesi yakın zamanda bir çok çalı mayla gösterilmiştir. 2010 yılında kolorektal kanser hücreleri DLD-1'de kombinasyon tedavinin hücre proliferasyonundaki etkisini incelemek üzere Suzuki ve arkadaşlarının yaptıkları çalı mada, hücre bölünmesinde etkin gen olan Nek2'yi hedef alan siRNA ve cisplatin ilacının birlikte etkile tirilmesinin tümör inhibisyonunda, ayrı ekilde hücrelere verilmesinden çok daha etkin oldu unu gözlemlenmiştir [130]. Aynı ekilde 2007 yılında yapılan bir çalı mada meme kanseri hücrelerinde paclitaxel ve Herceptin

ilaçları ve onkogen olarak bilinen Plk1 genini baskılayan siRNA ile kombinasyon tedavi ekileri uygulanmı ve bunun sonucunda hücre proliferasyonu önemli derecede azalmı tır [91]. Karasawa 2009 yılında antiapoptotik gen cLAP2 siRNA'nın tümör hücrelerinin 5-FU hassasiyetini önemli ölçüde arttırdı nı rapor etmi tir [131].



ekil 4.7. ABCE1 siRNA/ irinotecan'ın hücre ço alması üzerine etkileri.

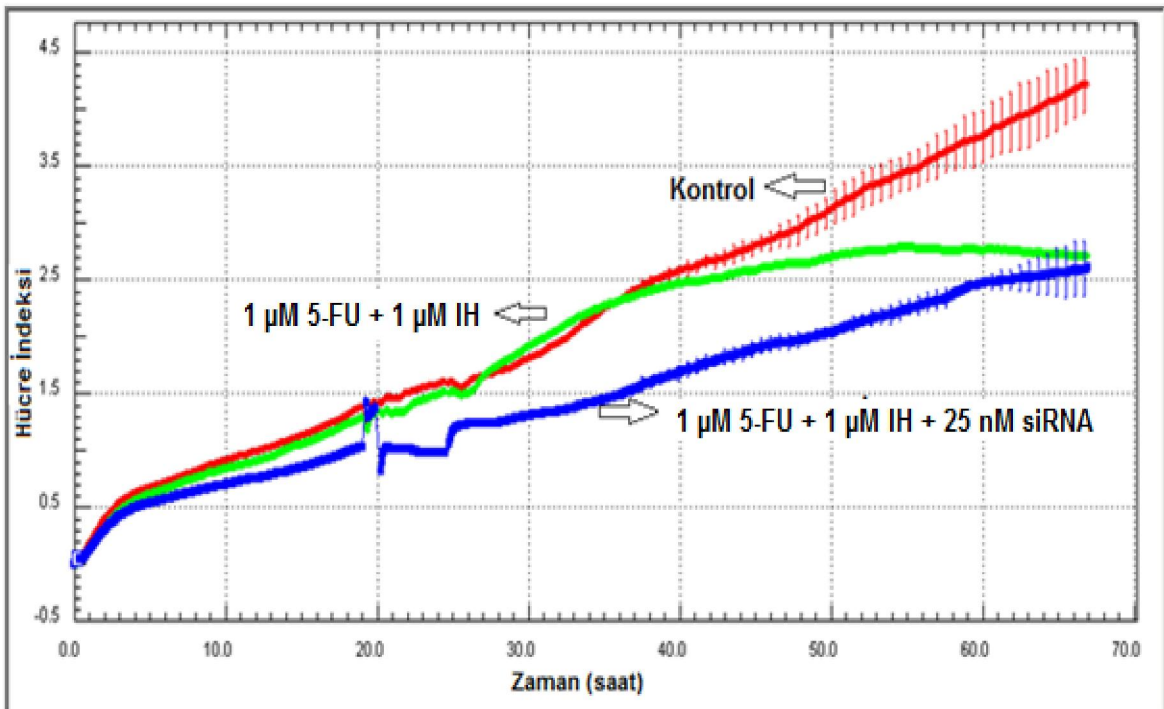


ekil 4.8. ABCE1 siRNA/Irinotecan'ın A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi.

irinotecan kolon, rektum, akciğer ve kemik kanseri kemoterapisinde sıklıkla kullanılan bir ilaç olmasına rağmen yüksek yan etkileri ve tümör hücrelerin ilaç direnci geliştirmesi sebebiyle klinik kullanımı kısıtlanmıştır. ekil 4.7. ve 4.8.'de görüldüğü gibi ABCE1 siRNA'nın irinotecan ile birlikte hücrelerle etkilemesi sonucunda siRNA'nın ilacın antiproliferatif ve sitotoksik etkisini azalttığı gözlemlenmiştir. RTCA analiziyle 1 µM irinotecan ve 1 µM irinotecan + 25 nM siRNA'nın hücre etkileşimlerine bakıldığında tek başına ilacın antiproliferatif etkisinin, siRNA ile kombine halde uygulanmasından daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. ekil 4.8.'deki MTT sonucuna göre ise hücre sitotoksitesinde tekli ve ikili etkileşim arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir fakat tek başına ABCE1 siRNA'nın etkisinin irinotecanla kombine edildiğinde önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir.

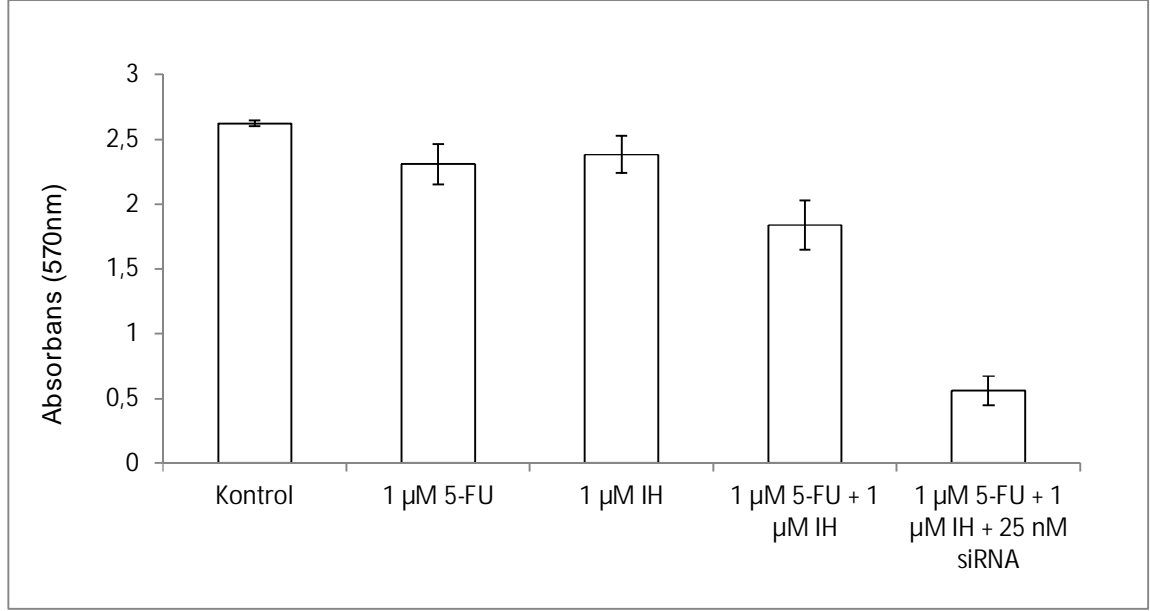
Etkileşim halinde olan ajanların birbirleri üzerine sinerjistik veya katkı sağlayıcı etkinin olabileceği gibi antagonistik etkileri de olabilir. Yapılan deneyde bu beklenmedik sonuç ABCE1 siRNA ve irinotecanın antagonistik etkileşim içerisinde olduklarını düşündürmektedir.

Koivusalo ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada tüm servikal tümör dokularında oldukça yüksek oranda bulunan HPV genini baskılamaları ve ardından carboplatin, cisplatin, doxorubicin, etoposid ve daha bir çok ilaç ile hücreleri muamele etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçta göre siRNA ve kemoterapinin kombine sitotoksik etkisi kullanılan ilaca bağılı olarak değişim göstermiştir. Örneğin hedef genin siRNA ile inhibe edilmesi HeLa hücrelerini doxorubicin ve gemcitabin ilaçlarına karşı hassaslaştırmasına rağmen cisplatin ve etoposid'in sitotoksik etkisinin yok olmasına neden olmuştur [132].



ekil 4.9. ABCE1 siRNA/5-FU + Irinotecan'ın hücre çoğalması üzerine etkileri.





ekil 4.10. ABCE1 siRNA/5-FU + Irinotecan'ın A 549 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi.

Kanser kemoterapisinde ikili ilaç etkileimleri hastalığın seyrine göre uygulanmaktadır. ekil 4.9'da RTCA analiz sonucuna göre 25 nM ABCE1 siRNA'nın 1 µM 5-FU ve 1 µM irinotecan ikili ilaç etkileimine ilavesiyle A 549 hücrelerinin proliferasyonu azalmıştır. ekil 4.10'da gösterildiği gibi, yapılan MTT testine göre tüm ajanların tek başına hücelere toksik etkisi ve tüm ajanların hepsinin kombine edilmiş hücelere toksik etkileri incelenmiştir. En fazla sitotoksik etki ikili ilacın ve siRNA'nın A 549 hücreleriyle etkiletiği grupta gözlenmiştir. Yapılan deneyde elde edilen sonuçlara göre ABCE1'in inhibe edilmesi A 549 hücrelerinin 1 µM 5-FU ve 1 µM irinotecanın ikili ilaç kombinasyonuna hassasiyetini önemli ölçüde artırmıştır. RTCA ve MTT testleri birbiriyle uyumlu sonuçlar göstermektedir.

#### 4.1.4. Apoptoz/Nekrotik İki Boyama Sonuçları

##### 4.1.4.1. İki Boyama ile Elde Edilen Apoptotik İndeks Sonuçları

Sunulan tez çalışmaları kapsamında A 549 hücreleri 25 nM ABCE1 siRNA ile transfekte edilmiş ve 1 µM 5-FU, 1 µM irinotecan, 1 µM 5-FU + 1 µM irinotecan ve bu ilaçların 25 nM ABCE1 siRNA ile birlikte hazırlanan formülasyonları ile etkiletiler ve iki boyama yöntemi ile boyanmıştır. Hücre etkileimleri apoptotik-nekrotik

mekanizmaların de erlendirilmesi için floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Apoptotik oranlar Hoechst 33342 boyama ile tespit edilmiş ve Çizelge 4.1.'de sunulmuştur. Yapılan çalışmada elde edilen mikroskop foto rafları ekil 4.11. - ekil 4.14.'te sunulmuştur. De erlendirmede normal, apoptotik olmayan hücreler, çekirdekleri sönük mavi, çekirdekte DNA da ılmamış, hücrede veziküller oluşmamış olarak görülmektedir. Apoptoza girmiş hücre çekirdekleri ise normal hücre çekirdeklerine göre çok parlak, çekirdek homojenliği kaybolmuş, çekirdek kenarları düzgün değil ve DNA parçalanmış parlak mavi görünümündedir.

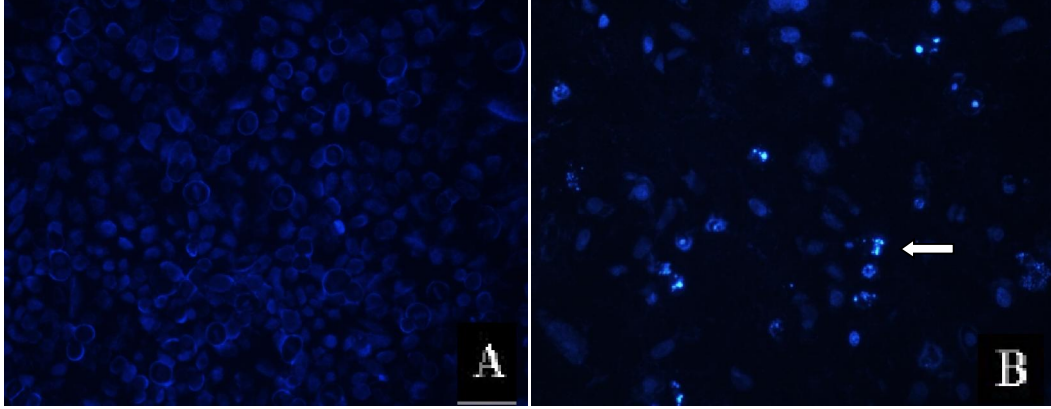
Çizelge 4.1. siRNA'nın ve kanser ilaçları 5-FU, irinotecan ve 5-FU + irinotecanın ve bu ilaçların siRNA ile birlikte ve ayrı ayrı akciğer kanser hücre kültürlerinde etkiletilmelerinin sonucu elde edilen % apoptotik indeksler

siRNA Deri imi (nM)	ABCE1 siRNA
25	20 ± 2

ABCE1 siRNA	1 µM 5-FU	1 µM irinotecan	1 µM 5-FU + 1 µM irinotecan
(-)	8 ± 2	34 ± 1	30 ± 1
25 nM	52 ± 1	9 ± 2	63 ± 2

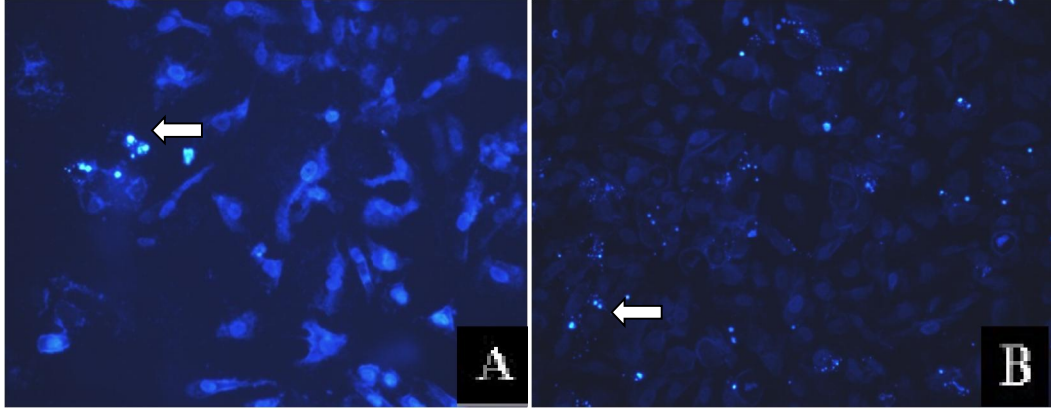
ekil 4.11.'de Hoechst 33342 ile boyanmış hücrelerin kontrol grubunun foto rafları görülmekte olup hücre çekirdeklerinde morfolojik olarak farklılık görülmemektedir. ABCE1'in siRNA ile inhibe edilmesi apoptozu indüklemiştir. 25 nM siRNA deri iminde apoptotik hücre çekirdeklerinin parçalandığı, bu hücrelerin apoptoza uğramayan

hücrelere göre daha parlak mavi renkte oldu u görülmü tür. 25 nM siRNA ile inhibe edilen hücrelerde apoptotik etkinin % 20 civarında oldu u tespit edilmi tir.



ekil 4.11. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan kili boyamadan elde edilen apoptotik hücre foto rafları; (A) Hoechst 33342 ile boyanmış ilaç ve siRNA'lar ile muamele edilmemiş A 549 hücreleri (kontrol grubu); Hücreler komplekslerle etkiletilmediğinden apoptoza uğramamış, çekirdek sınırları normal, çekirdek parçalanmamış, (B); 25 nM ABCE1 siRNA ile etkiletilmiş A 549 hücreleri, Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Apoptoza uğramış hücre çekirdekleri parlak, parçalanmış, apoptoza uğramayanlar soluk mavi görünmektedir.

Huang ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada akciğer kanseri NCI-H446 hücrelerinde ABCE1'in siRNA ile inaktivasyonunu gerçekleştirerek sonucunda apoptozun indüklendiğini ve ABCE1'in bu hücrelerde antiapoptotik mekanizmayı düzenleyen bir gen olabileceğini Annexin V ve PI boyamasıyla göstermişlerdir [110]. Benzer bir çalışmada akciğer kanseri 95-D hücrelerinde apoptozun, ABCE1 geninin susturulduğu hücrelerde kontrole göre çok daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır [111]. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalarla paralellik içindedir.

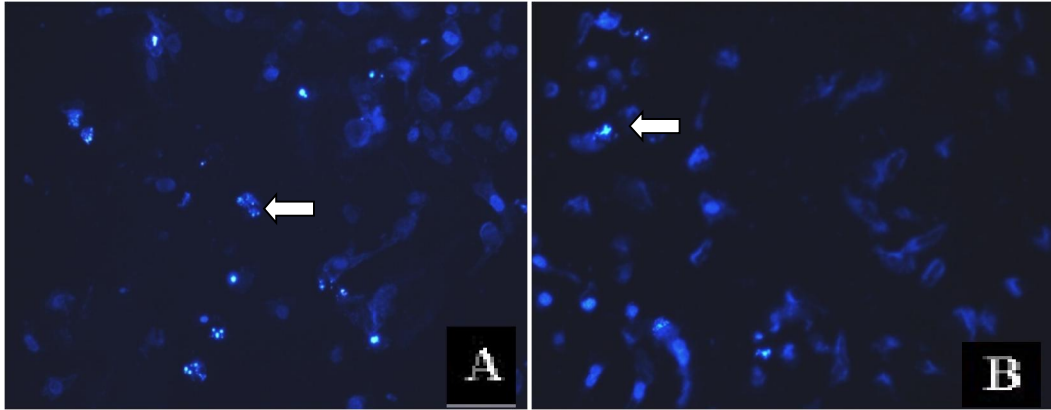


ekil 4.12. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan kili boyamadan elde edilen apoptotik hücre foto rafları; (A) Hoechst 33342 ile boyanmış 1 µM 5-FU ile muamele edilen A 549 hücreleri, (B) 25 nM ABCE1 siRNA ve 1 µM 5-FU ile etkiletilmiş A 549 hücreleri. Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir

ekil 4.12.'de 5-FU ve ABCE1 siRNA/5-FU ile etkiletilmiş ve Hoechst 33342 ile boyanmış A 549 hücreleri görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre düşük doz antikanser ilacın kanser hücrelere apoptotik etkisi oldukça düşük gözlenmiştir. 25 nM ABCE1 siRNA ile ilacın hücrelere birlikte uygulanması apoptoz oranını yükseltmiştir.

RET siRNA'nın ve bu ajanın irinotecanla kombine tedavide etkinliğinin, meduller tiroid karsinom (MTC) hücre büyümesini in vivo ve in vitroda inhibe edip etmediğini incelemek amacıyla gerçekleştirilen çalışmada irinotecan ve siRNA'nın hücrelere birlikte uygulanmasının kontrol gruplarına göre apoptotik hücreleri yüksek oranda indüklemesine sebep olduğu gözlenmiştir [133]. 2013 yılında yapılan in vivo çalışmada etkin akciğer kanseri tedavisi elde etmek için Zhang ve arkadaşları c-myc genini hedefleyen siRNA ve Gemcitabin monofosfat (GMP)'yi sistemik dolaşım ile fare modellerine uygulamaları ve en yüksek apoptotik etkiyi siRNA ve ilacın birlikte uygulandığı hücrelerde gözlemlenmiştir [134].

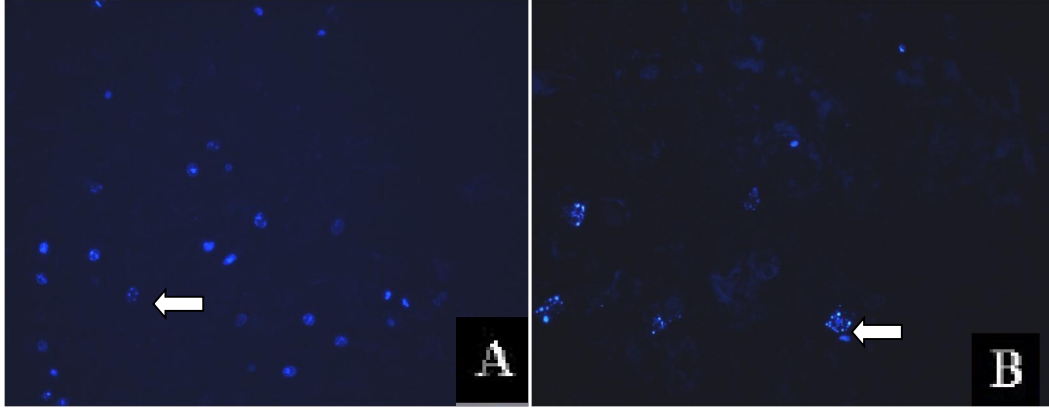
ekil 4.13.'de irinotecan ve ABCE1 siRNA/irinotecan ile etkiletilmiş ve Hoechst 33342 ile boyanmış A 549 hücreleri görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre düşük doz antikanser ilacın apoptoz indeksinin, 25 nM ABCE1 siRNA ile ilacın hücrelere birlikte uygulandığı grubun indeksine göre düşük oranda yüksek çıktığı gözlenmiştir.



ekil 4.13. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan kili boyamadan elde edilen apoptotik hücre foto rafları; (A) Hoechst 33342 ile boyanmış 1  $\mu$ M irinotecan ile muamele edilen A 549 hücreleri, (B) 25 nM ABCE1 siRNA ve 1  $\mu$ M irinotecan ile etkile tirilmiş A 549 hücreleri. Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. ABCE1 siRNA ve irinotecanın kombine ekilde etkile tirildi i hücre grubunda, sadece irinotecan ile etkile tirilen hücelere göre apoptozun suprese olması siRNA ve irinotecanın birbirlerine antagonistik etki gösterdi i ekinde yorumlanabilir.

Koivusalo ve arkadaşlarının yaptıkları çalı manın sonucunda RNAi'nin kemoterapiyle kombine edilmesinin kanser tedavisinde potansiyet terapötik etkiye sahip oldu unu ancak farklı antikanser ilaçların siRNA ile kombinasyonunda nasıl çalı tıklarını bilmenin de önemini vurgulamı tır [132]. Elde edilen sonuçlara göre ABCE1 inhibisyon mekanizmasının, irinotecan yola ının ve bunların etkile im mekanizmalarının detaylı ekilde bilinmesi gerekmektedir.

ekil 4.14.'te 5-FU + irinotecan ve siRNA/1  $\mu$ M 5-FU + 1 $\mu$ M irinotecan ile etkile tirilmiş ve Hoechst 33342 ile boyanmış A 549 hücreleri görölmektedir. Elde edilen sonuçlara göre dü ük doz antikanser ilacın kanser hücelere apoptotik etkisi % apoptoz oranları kar ıla tırıldı ında 25 nM ABCE1 siRNA ile ilacın hücelere birlikte uygulandı ı sonucuna göre daha yüksek çıkmı tır.



ekil 4.14. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan kili boyamadan elde edilen apoptotik hücre foto rafları; (A) Hoechst 33342 ile boyanmış 1 µM 5-FU + 1 µM irinotecan ile muamele edilen A 549 hücreleri, (B) 25 nM ABCE1 siRNA ve 1 µM 5-FU + 1 µM irinotecan ile etkile tirilmiş A 549 hücreleri. Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir.

Bazı kanser kemoterapi stratejilerinde tümör hücrelerinde apoptotik yola ın daha etkin ekilde indüklenmesi için ikili ilaç kombineleri uygulanmaktadır. Sunulan tez kapsamında elde edilen sonuçlara bakıldı ında dü ük dozlarda uygulanan 1 µM 5-FU + 1 µM irinotecan ilaçlarının hücreler üzerindeki apoptotik etkinin, 25 nM ABCE1 siRNA ile birlikte kanser hücrelerine verildi inde arttı ı gözlenmiştir. Bu sonuç ABCE1'in baskılanma mekanizması ve ilaçların hücredeki yola ının birbirleriyle sinerjistik veya katkı sa layan etkile im içerisinde bulduklarının göstergesidir.

#### 4.1.4.2. kili Boyama ile Elde Edilen Nekrotik ndeks Sonuçları

kili boyama metodunda kullanılan bir di er boya ise PI floresan boyası olup ilaç ve siRNA/ilaç formülasyonlarıyla etkile tirilen kanser hücrelerin nekrotik oranı tespit edilmiştir. PI floresan boya ölü ve plazma membranı hasarlı hücrelerin zarlarından geçerek, çekirdeklerin floresan ı ık altında kırmızı görünmelerini sa lar. Nekrotik olmayan hücreler PI ile boyanmazken, apoptotik ve nekrotik hücre ise ye il renkte olup FITC floresan filtresi ile görüntülendi inde ye il renkte görülmektedirler. Sunulan tez çalı masında nekrotik indeks saptanması 480-520 nm dalga boyunda floresan ı ık (FITC filtresi ile) altında incelenmiştir ve bu dalga boyunda aynı anda nekrotik

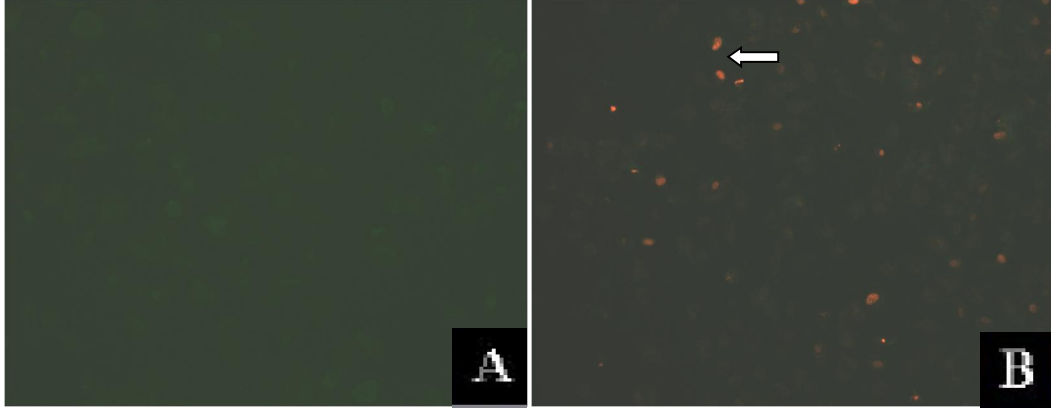
hücrelerin çekirdeği kırmızı ve hücrelerin zarları yeşil renkte görünmektedir. Nekrotik hücreleri gösteren foto raflar ekil 4.15. - ekil 4.19.'da sunulmuştur ve % nekrotik indeksi Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Çizelge 4.2.'de görüldüğü gibi, düşük deri imlerinde nekrotik indeks çok yüksek değildir. Fakat deri iminin artması toksisiteyi de artırdığı için nekrozun da artmasına sebep olmuştur.

Çizelge 4.2. Kanser ilaçları 5-FU, irinotecan ve 5-FU + irinotecanın ve bu ilaçların siRNA ile birlikte ve ayrı ayrı akciğer kanser hücre kültürlerinde etkiletilmeleri sonucu elde edilen % nekrotik indeksler

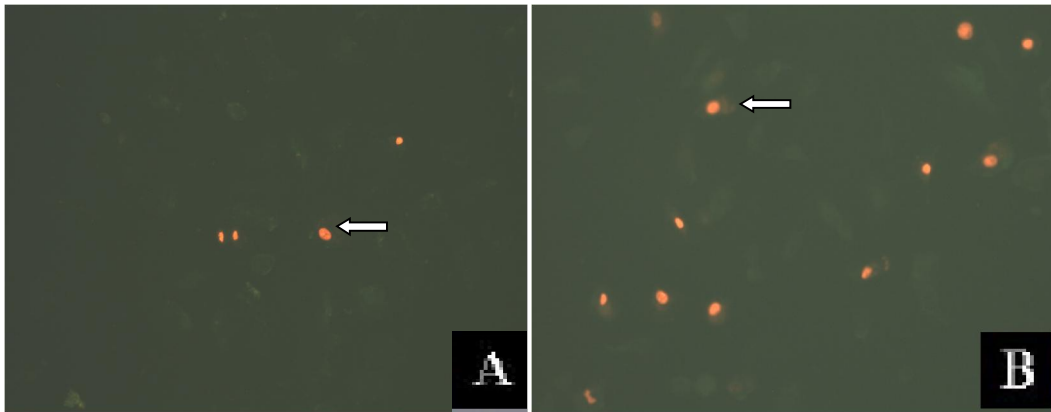
siRNA Deri imi (nM)	ABCE1 siRNA
25	15 ± 2

ABCE1 siRNA	1 µM 5-FU	1 µM irinotecan	1 µM 5-FU + 1 µM irinotecan
(-)	4 ± 1	11 ± 1	8 ± 1
25 nM	18 ± 1	6 ± 2	18 ± 2

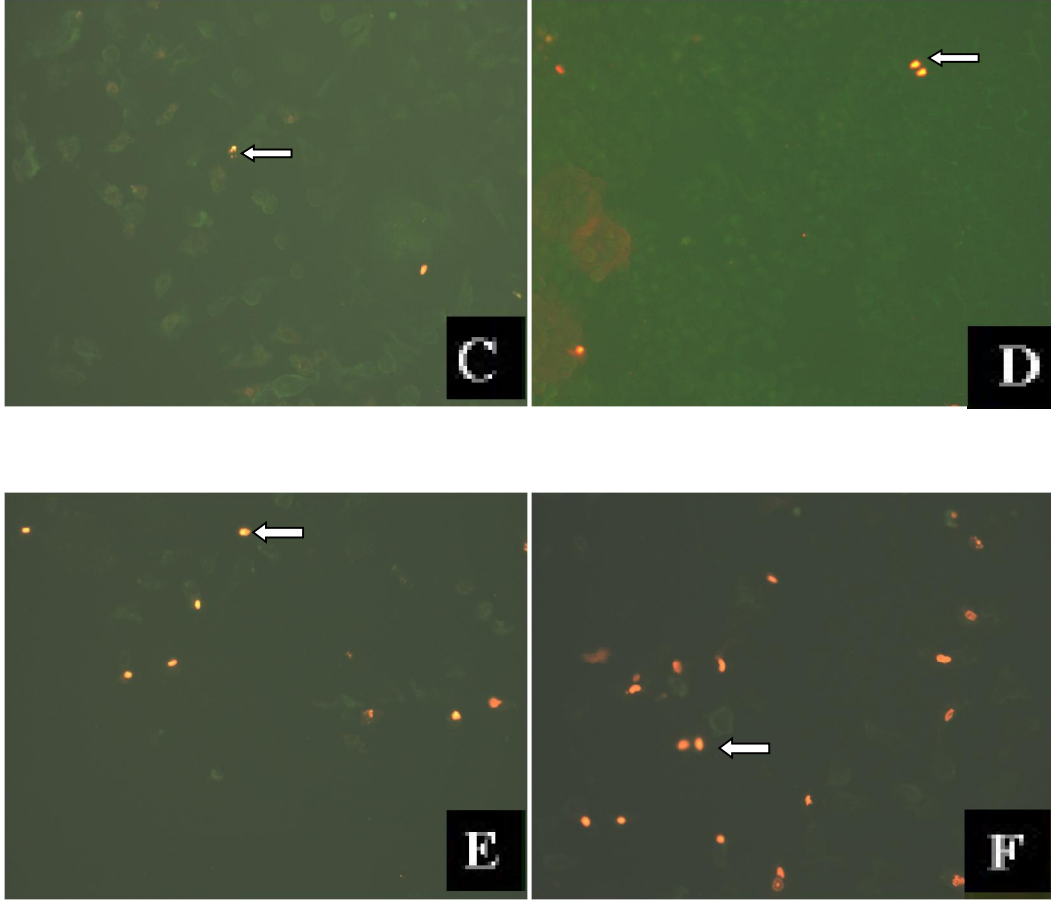
ekil 4.15.'te PI ile nekrotik boyama yapılmış hücrelerin kontrol grubunun foto rafları görülmekte olup hücre çekirdeklerinde morfolojik olarak farklılık görülmemektedir. ABCE1'in siRNA ile baskılanması hücrelerdeki nekrotik mekanizmayı da tetiklemiştir. 25 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerde nekrotik etki gözlenmiştir ve bu oran yaklaşık % 15'tir.



ekil 4.15. Hoechst 33342 ve PI floresan boya kullanılarak elde edilen nekrotik hücre foto rafları; (A) ilaç ve siRNA'lar ile muamele edilmemi A 549 hücreleri (kontrol grubu); Hücreler komplekslerle etkile tirilmedi inden nekroza u ramamı ve hücre çekirdekleri kırmızı görünmemekte, (B); 25 nM ABCE1 siRNA ile etkile tirilmi A 549 hücreleri, Nekroza u ramı hücre çekirdekleri kırmızı, hücre zarları ise Hoechst 33342 ile boyandı ndan ye il görünmektedir. Oklar nekrotik hüclerlerden bazılarını göstermektedir.







ekil 4.16. Hoechst 33342 ve PI floresan boya kullanılarak elde edilen hücrelerin nekrotik foto rafları; (A); 1  $\mu\text{M}$  5-FU ile etkile tirilmi A 549 hücreleri, (B) 25 nM ABCE1 siRNA ve 1  $\mu\text{M}$  5-FU ile etkile tirilmi A 549 hücreleri, (C); 1  $\mu\text{M}$  irinotecan ile muamele edilen A 549 hücreleri, (D) 25 nM ABCE1 siRNA ve 1  $\mu\text{M}$  irinotecan ile etkile tirilmi A 549 hücreleri, (E); 1  $\mu\text{M}$  5-FU + 1  $\mu\text{M}$  irinotecan ile etkile tirilen A 549 hücreleri, (F); 25 nM ABCE1 siRNA ve 1  $\mu\text{M}$  5-FU + 1  $\mu\text{M}$  irinotecan ile etkile tirilen A 549 hücreleri. Nekroza u ramı hücre çekirdekleri kırmızı, hücre zarları ise Hoechst 33342 ile boyandı ndan ye il görünmektedir. Oklar nekrotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Foto raflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmi tir. Ölçek 20 $\mu\text{m}$  mesafeyi göstermektedir.

Yapılan nekroz analizinde elde edilen sonuçlara göre ABCE1 siRNA aynı zamanda nekrotik mekanizmayı da tetiklemitir. RTCA sonuçlarına göre siRNA ile muamele edilen hücrelerde proliferasyon azalmaktaydı. Hücre ölümlerinin bir kısmının apoptotik

bir kısmının da nekrotik yolak ile gerçekleştiği böylece anlaşılmıştır. siRNA ile muamele edilen hücrelerde nekroz görülmesi MTT sonucunu da doğrular niteliktedir.

Şekil 4. 16.'ya göre 1 µM 5-FU ve 1 µM 5-FU/ ABCE1 siRNA ile etkileştirilen hücrelerde nekrotik indeks kombine etkileşimde daha yüksek çıkmıştır. Aynı durum 1 µM 5-FU + 1 µM irinotecan ve 1 µM 5-FU + 1 µM irinotecan / ABCE1 siRNA için de aynıdır. Fakat siRNA ile antagonistik etkileşimde olduğu düşünülen irinotecanın tekli etkisinde, 1 µM irinotecan / ABCE1 siRNA grubuna göre daha yüksek nekrotik oran görülmüştür.

#### 4.1.3. E Zamanlı RT-PCR Analizi Sonuçları

##### 4.1.3.1. RNA izolasyonu

ABCE1 proteininin siRNA ile inhibe edilmesini mRNA seviyesinde göstermek amacıyla eş zamanlı RT-PCR analizi uygulanmıştır. Bunun için de öncelikle 25, 50, 75 ve 100 nM siRNA ve 1 µM 5-FU, 1 µM 5-FU + 25 nM siRNA, 1 µM irinotecan ve 1 µM irinotecan + 25 nM siRNA ile muamele edilen hücre gruplarından toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA derişimleri NanoDrop'da ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3.'deki gibidir.

##### Çizelge 4.3. Örneklerin RNA derişimleri

Örnek	Konsantrasyon (ng/µL)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
Kontrol	610.5	2.10	1.94
25 nM siRNA	392.9	2.08	0.87
50 nM siRNA	464.1	2.06	2.05
75 nM siRNA	282.7	2.09	0.87
100 nM siRNA	326.6	2.09	1.67
1 µM 5-FU	399.7	2.07	2.16
1 µM 5-FU + 25 nM siRNA	342.3	2.07	2.10
1 µM irinotecan	417.4	2.08	1.99
1 µM irinotecan + 25 nM siRNA	567.8	2.15	2.04

Nükleik asitler protein ve organik bileşikler gibi moleküllerle çabuk kontamine olma özelliindedirler.  $A_{260/280}$  ve  $A_{260/230}$  deeri nükleik asitlerin saflık derecelerini belirlemek için kullanılır. RNA için  $A_{260/280}$  deeri ~2,  $A_{260/230}$  deeri ise 1,7'den büyük olmalıdır. cDNA sentezi protokolüne göre her bir reaksiyon içerisinde kullanılması gereken RNA miktarı 25 ng ile 5 µg arasında olmalıdır. Her bir örnekten elde edilen RNA deeri imleri bu deeri ler arasında çıkmı tır.

#### 4.1.3.2. cDNA zolasyonu

25, 50, 75 ve 100 nM siRNA ve 1 µM 5-FU, 1 µM 5-FU + 25 nM siRNA, 1 µM irinotecan ve 1 µM irinotecan + 25 nM siRNA ile muamele edilen hücre gruplarından izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlenmi ve deeri imleri NanoDrop'da belirlenmi tır. Elde edilen deeri ler Çizelge 3.4.'deki gibidir.

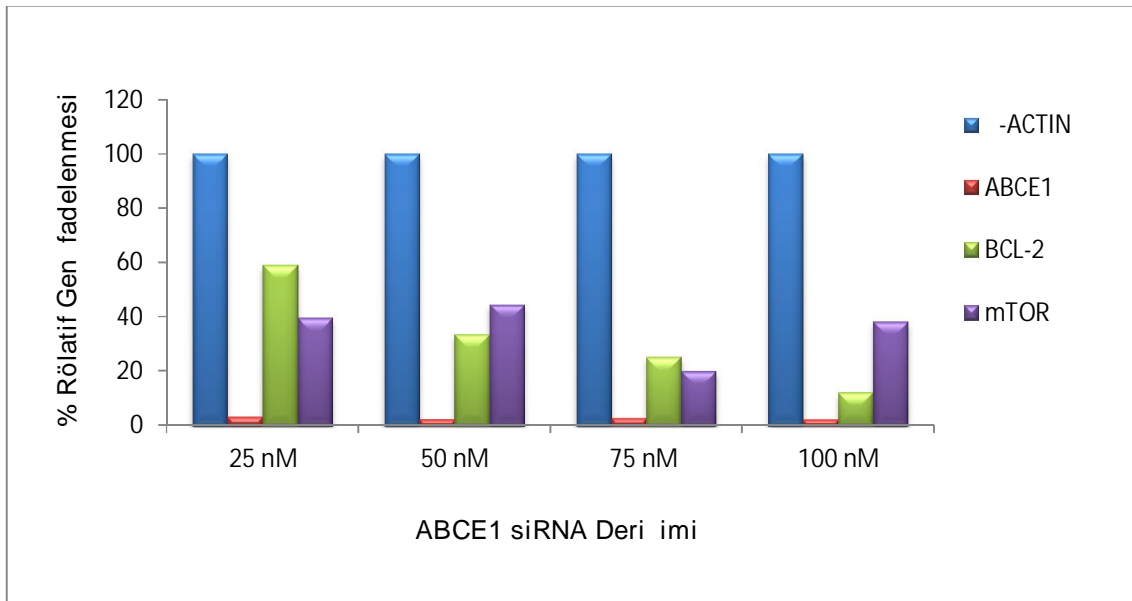
#### Çizelge 4.4. Örneklerin cDNA deeri imleri

Örnek	Konsantrasyon (ng/µL)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Kontrol	1652.1	1.84	1.93
25 nM siRNA	1540.5	1.83	1.67
50 nM siRNA	1595.4	1.83	1.93
75 nM siRNA	1340.4	1.78	1.68
100 nM siRNA	1516.5	1.81	1.88
1 µM 5-FU	1537.9	1.82	1.92
1 µM 5-FU +25 nM siRNA	1454.3	1.81	2.04
1 µM irinotecan	1422.1	1.81	1.92
1 µM irinotecan + 25 nM siRNA	1486.0	1.82	1.98

DNA için  $A_{260/280}$  deeri ~1.8,  $A_{260/230}$  deeri ise 1.5'ten büyük olmalıdır.

#### 4.1.3.3. E Zamanlı RT-PCR Primer Analizi

25 nM, 50 nM, 75 nM ve 100 nM ABCE1 siRNA ile ve 1  $\mu$ M 5-FU, 1  $\mu$ M 5-FU + 25 nM siRNA, 1  $\mu$ M irinotecan ve 1  $\mu$ M irinotecan + 25 nM siRNA muamele edilen A 549 hücrelerinde ABCE1 geninin susturulmasının ve bu etkinin hücrede antiapoptotik gen olan BCL-2 ve hücre büyümesini, çoğalmasını, protein sentez ve transkripsiyonunu düzenleyici genlerden olan mTOR ifadelenebilirlik seviyelerine etkisinin araştırılması için RT-PCR primer analizi yapılmıştır. Hedef genlerin analizi referans gen -Actin kullanılarak standardize edilmiştir.

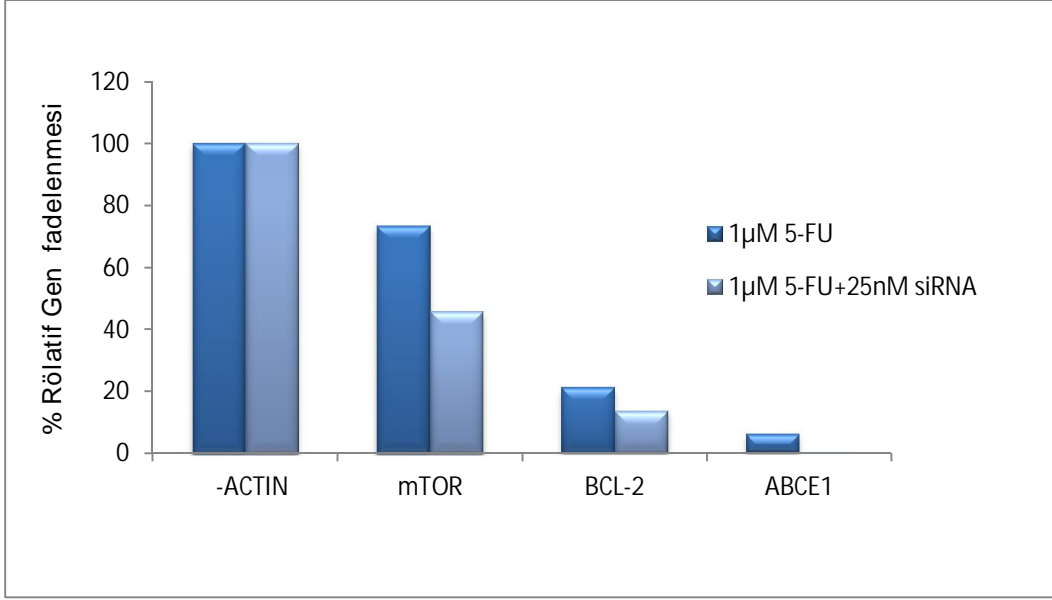


ekil 4.17. Farklı deri imlerdeki siRNA'nın ABCE1, BCL-2 ve mTOR mRNA düzeylerine etkisi.

ekil 4.17.'ye göre tüm konsantrasyonlardaki siRNA molekülleri, ABCE1 genini oldukça yüksek derecede inhibe etmişlerdir. Bu sonuç siRNA'nın gen susturmadaki etkinliğini göstermektedir. ABCE1 geninin susturulmasından sonra A 549 akciğer kanseri hücrelerinde ABCE1'in potansiyel fonksiyonunu göstermek amacıyla 2 farklı genin hücredeki ifadelenebilirlik seviyelerinin de deri imi de analiz edilmiştir. ABCE1 geninin baskılanmasıyla, artan siRNA deri imiyle doğru orantılı şekilde BCL-2 gen ifadelenebilirlik seviyesinde azalma gözlemlenmiştir. BCL-2 geninin apoptozu inhibe edici etkisinden dolayı bu genin ABCE1 siRNA transfeksiyonundan sonra ekspresyonunun

azalması ABCE1 geninin de antiapoptotik özelli i oldu unu göstermi tir. ABCE1 siRNA ile muamele edilen hücrelerde uygulanan ikili boyama çalı masında apoptotik indeksin, kontrol grubuna göre yüksek olmasıyla ABCE1 geninin inhibisyonunun A 549 hücrelerinde apoptozu indükledi i ve RT-PCR çalı masında da ABCE1 geninin inhibisyonun A 549 hücrelerinde apoptotik yolda negatif ekilde etkili olan BCL-2 ifadelenmesinin de azalmasını sa laması bu iki sonucun birbiriyle uyumlu oldu unu göstermektedir.

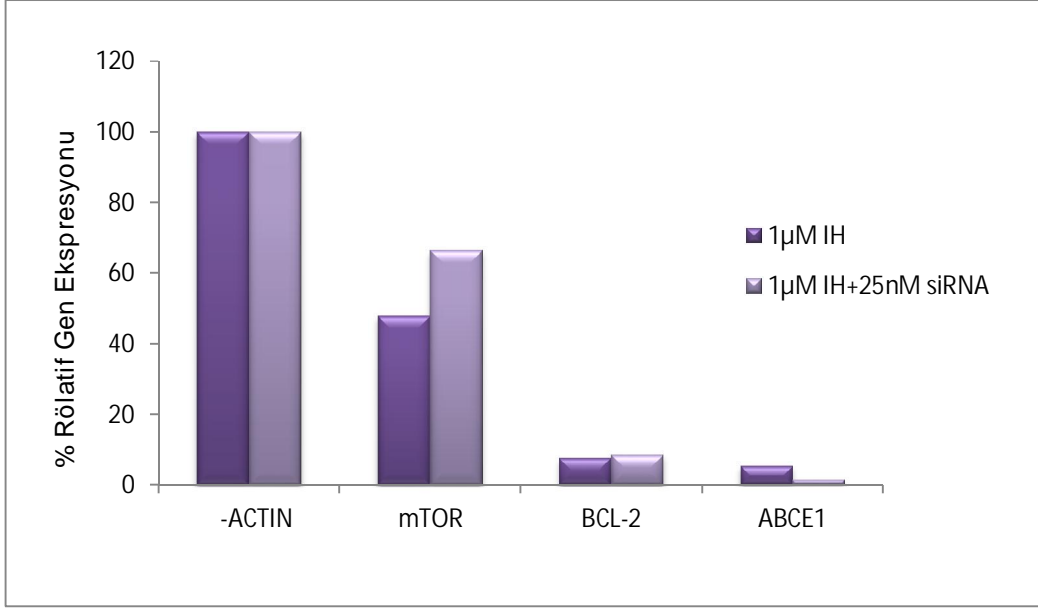
ABCE1 siRNA transfeksiyonundan sonra gen ifadelenmesi incelenen bir di er gen mTOR'dur. Tüm deri imlerdeki siRNA ile etkile tirilen hücrelerde mTOR gen seviyesinde kontrole göre azalma gözlenmi tir. ABCE1'in baskılanmasıyla, mTOR'un proliferatif özelli inden dolayı bu genin de düzeyinin azalması, ABCE1 geninin hücre ço almasını düzenleyici bir gen oldu unu do rulamaktadır. ABCE1 siRNA ile muamele edilen hücrelerde uygulanan hücre proliferasyon testleri MTT ve RTCA analizinde hücre canlılı ının, kontrol grubuna göre dü ük olmasıyla ABCE1 geninin inhibisyonunun A 549 hücrelerinde hücre antiproliferatif yola ı indükledi i ve RT-PCR çalı masında da ABCE1 geninin inhibisyonun A 549 hücrelerinde hücre büyümesi, ço alması ve protein sentezinde pozitif ekilde etkili olan mTOR ifadelenmesinin de azalmasını sa laması bu üç sonucun birbiriyle uyumlu oldu unu göstermektedir.



ekil 4.18. 25 nM siRNA ABCE1'nin 1 µM 5-FU ile muamele edilmi hücrelerde ABCE1, BCL-2 ve mTOR mRNA düzeylerine etkisi.

1 µM 5-FU ve 1 µM 5-FU + 25 nM siRNA ile etkile tirilen hücrelerde siRNA'nın spesifik gen baskılama etkisini göstermek amacıyla ABCE1 geninin seviyesi her iki grupta incelenmi tir. Elde edilen sonuçlara göre siRNA uygulanan grupta ABCE1 geninin oldukça yüksek oranda inhibe edildi i gözlenmi tir. Ancak siRNA ile etkile tirilmemi sadece 5-FU ile etkile tirilen hücrelerde de ABCE1 geninin seviyesinin oldukça dü ük olması dikkat çekicidir.

Yapılan MTT, RTCA ve ikili boyama çalı malarına ek olarak A 549 hücrelerinde 25 nM ABCE1 siRNA'nın dü ük dozdaki 5-FU'nun anti proliferatif ve apoptotik etkinli ini arttırdı nı gen ifadenmesi analiziyle de göstermek amacıyla BCL-2 ve mTOR genlerinin seviyeleri incelenmi tir. ekil 4.18.'e göre siRNA transfeksiyonuyla sadece 1 µM 5-FU ile muamele edilen hücrelere göre BCL-2 ve mTOR genlerinin ifadenmesinin daha da azaldı ı gözlenmi tir. Elde edilen sonuçlara göre yapılan hücre canlılı ı, proliferasyonu ve ikili boyamaları analizlerinin RT-PCR sonucuyla paralel oldu u anla ılmı tir.



ekil 4.19. 25 nM siRNA ABCE1'nin 1 μM IH ile muamele edilmi hücrelerde ABCE1, BCL-2 ve mTOR mRNA düzeylerine etkisi.

1 μM irinotecan ve 1 μM irinotecan + 25 nM siRNA ile etkile tirilen hücrelerde siRNA'nın spesifik gen baskılama etkisini göstermek amacıyla ABCE1 geninin seviyesi her iki grupta incelenmi tir. Elde edilen sonuçlara göre siRNA uygulanan grupta ABCE1 geninin oldukça yüksek oranda inhibe edildi i gözlenmi tir. Ancak siRNA ile etkile tirilmemi sadece irinotecanla etkile tirilen hücrelerde de ABCE1 geninin seviyesinin oldukça dü ük olması dikkat çekicidir.

Yapılan MTT, RTCA ve ikili boyama çalı malarında A 549 hücrelerinde 25 nM ABCE1 siRNA'nın dü ük dozdaki irinotecanın anti proliferatif ve apoptotik etkinli ini arttırması hedeflenirken elde edilen sonuçlara göre kombine etkinin irinotecan fonksiyonuna katkısı olmadı ı gözlenmi ti. Bu çalı mada ABCE1'in inhibisyonun BCL-2 ve mTOR genlerinin seviyelerine etkisi de incelenmi tir. ekil 4.19.'a göre siRNA transfeksiyonuyla BCL-2 geninin ifadelenmesinin çok fazla de i memi oldu u, mTOR geninin ifadelenmesinin ise arttı ı görülmü tür. Bu sonuçlara göre ABCE1 siRNA'nın irinotecan ile antagonistik etkile imde olabilece i dü üncesi, siRNA ve ilacın kombine etkisinin oldu u hücre grubunda hem proliferasyonun artması ve bunu destekleyen mTOR gen seviyesinin de artmasıyla, ayrıca apoptozun

indüklenmediğinin hem ikili boyamada hem de BCL-2 gen seviyesinde görülmesiyle desteklenmiştir.

Liu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada siklooksigenaz-2 inhibitörü olan NS38 metaboliti ile etkileştirilen LNCaP prostat kanseri hücrelerinde apoptozun, BCL-2 gen ekspresyonunun azalmasıyla indüklendiği rapor edilmiştir [135]. Apoptozun BCL-2 gen seviyesiyle ilişkili olduğunu belirten bir başka çalışmada ise meduller tiroid karsinom TT hücrelerinin RET siRNA ile transfekte edilmesidir [133]. Böhm ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada akut miyeloid lösemi hücrelerinde mTOR gen ifadenin seviyesinin azalmasının hücre büyümesine negatif etkide bulunduğunu açıklamışlardır [136].



## 5. SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamındaki tüm çalımlar sonucunda elde edilen bulgular ve bulguların ı ı ı altında ortaya konulan sonuç özetleri a a ıda sunulmu tur.

- ✓ İlk olarak kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan 5-FU ve irinotecan ilaçlarının A 549 akci er kanseri üzerine sitotoksik etkilerini belirlemek için belirli deri imlerdeki ilaçlar hücrelerle etkile tirilmi ve MTT testi uygulanmı tır. İlaçların hücre canlılı ını çok az etkiledi i dü ük doz, her iki ilaç için de 1 µM olarak belirlenmi tir.
- ✓ ABCE1 proteinini, mRNA seviyesinde baskılamak için spesifik siRNA kullanımı ve farklı deri imlerdeki siRNA'ların A 549 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi MTT testiyle, hücre canlılık analizi de RTCA ile incelenmi tir. siRNA deri imi arttıkça hücre proliferasyonu azalmı , 25 nM'dan yüksek deri imlerdeki siRNA'nın etkisinde anlamlı bir fark gözlenmedi i için en etkin deri im olarak 25 nM belirlenip sonraki çalı mlara bu de erde devam edilmi tir. Yapılan MTT ve RTCA sonuçları birbirini destekler niteliktedir.
- ✓ 25 nM ABCE1 siRNA, 1 µM 5-FU, 1 µM irinotecan ve 1 µM 5-FU + 1 µM irinotecan ile birlikte A 549 hücreleriyle etkile tirilerek, bu kombine etkinin hücreler üzerine sitotoksik etkisi MTT testiyle, hücre canlılık analizi de RTCA ile incelenmi tir. Elde edilen sonuçlara göre 5-FU tekli ve 5-FU + irinotecan ikili ilacın tek ba ına etkisinin, ABCE1 siRNA ile birlikte verildi i formülasyona göre daha dü ük oldukları gözlenmi tir. Tam tersi irinotecanın ise ABCE1 siRNA ile birlikte hücrelerle muamele edildi inde beklenmedik ekilde sitotoksik etkisinin nerdeyse de i medi i, antiproliferatif etkisinin ise azaldı ı tespit edilmi tir.
- ✓ ABCE1 siRNA'nın ilaçlarla birlikte hücelere etkisinde aynı zamanda ikili boyama da yapılarak, apoptoz/ nekroz indekslerine bakılmı tır. Hücre ölümlerinin morfolojik olarak de erlendirilmesi için ABCE1 siRNA'lar ile ABCE1 siRNA'nın 5-FU ve irinotecanın tekli ve ikili formülasyonlarının kombinasyonu ekinde A 549 hücreleri ile etkile tirilip, Hoechst 33342 ve PI boyaları kullanılarak ikili boyama yöntemi ile boyanmı ve hücre etkile imleri apoptotik-nekrotik mekanizmaların de erlendirilmesi için floresan mikroskop yardımıyla incelenmi tir. Apoptoz/nekroz sonuçları de erlendirildi inde 5-FU tekli ve 5-FU + irinotecan ikili ilacın tek ba ına hücreler

üzerindeki apoptotik indeksinin, ABCE1 siRNA ile birlikte verildi i formülasyona göre daha düşük oldukları gözlenmiştir. Tam tersi irinotecanın ise ABCE1 siRNA ile birlikte hücrelerle muamele edildi inde beklenmedik şekilde apoptozun azaldığı gözlenmiştir.

✓ İkili boyamada hücrelerle muamele edilen tüm grupların nekrotik etkileri incelendi inde nekrozun genel olarak tüm gruplarda daha az görüldü ü tespit edilmiştir. Aynı şekilde 5-FU tekli ve 5-FU + irinotecan ikili ilacın tek başına hücreler üzerindeki nekrotik indeksinin, ABCE1 siRNA ile birlikte verildi i formülasyona göre daha düşük oldukları gözlenmiştir. Tam tersi irinotecanın ise ABCE1 siRNA ile birlikte hücrelerle muamele edildi inde beklenmedik şekilde nekrozun azaldığı gözlenmiştir.

✓ E zamanlı RT-PCR analiziyle ABCE1 siRNA'lar ile ABCE1 siRNA'nın 5-FU ve irinotecanın tekli formülasyonlarının kombinasyonu şeklinde A 549 hücreleri ile etkiletilir ve siRNA'nın ABCE1 genini susturma etkinliği tespit edilmiştir ve de i en deri imlere göre oldukça yüksek oranda, belirli bir gen inhibisyonu sağlanmıştır. Ayrıca tüm gruplarda ABCE1 gen inhibisyonunun, hücrede önemli görevlere sahip BCL-2 ve mTOR genlerinin ifadenme seviyelerine etkisi araştırılmıştır. Bu sonuca göre ABCE1 geninin susturulmasıyla her iki genin de hücredeki gen düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. ABCE1 siRNA ve irinotecanın birlikte hücreye verilmesi, ABCE1 inhibisyonu sağlanmasına rağmen diğer grupların aksine mTOR gen seviyesinde artış gözlenirken, BCL-2 gen seviyesinde ise anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre genel çıkarım,

Ü ABCE1'in protein sentezinin translasyon basamağında önemli bir yer tuttu u ve bu proteinin inhibe edilerek hücre çoğalmasını azalttığı tespit edilmiştir. Yeni nesil kanser tedavilerinde ABCE1'in klinik etkinliğinin olduğu, hedef terapötik gen olarak sınıflandırılabilirliği gösterilmiştir.

Ü ABCE1 siRNA'nın, kanser tedavisinde geleneksel kemoterapi ajanlarla kombinatilde kullanılabilirliği ilk kez gösterilmiştir. Hem ABCE1 siRNA'nın hem de kanser ilaçlarının kanser hücre gelişimi üzerindeki etkisini arttırmak için ABCE1 siRNA, antikanser ilaçlar 5-FU ve irinotecan ile birlikte kullanılarak yeni bir terapötik strateji oluşturulmuştur. ABCE1 siRNA'nın 5-FU ve 5-FU + irinotecan ile kombinasyonu, tekli

siRNA veya tekli ilaç etkisine göre A 549 hücrelerinin inhibe edilmesinde çok daha ba arılı sonuçlar vermi tir. Ayrıca ABCE1 siRNA'nın 5-FU ve 5-FU + irinotecan ile kombine tedavisi, yüksek doz kanser ilacı kullanımını engelleyerek yan etkilerin azalmasına imkan verebilecek potansiyelde oldu u gösterilmi tir.

Ü Ayrıca elde edilen sonuçlara göre ABCE1 siRNA'nın, 5-FU ve 5-FU + irinotecan ile birbirlerine sinerjistik veya katkı sa layıcı etkile imde oldukları, irinotecan ile ise birbirlerine antagonistik etkile imde oldukları yorumlanmı tir.

Ü A 549 hücrelerinde ABCE1 siRNA indüklü apoptozun, BCL-2 gen ifadenmesinin azalmasıyla ve ABCE1 siRNA indüklü hücre antiproliferasyonunun, mTOR gen ifadenmesinin azalmasıyla ili kili oldu u tespit edilmi tir.

## KAYNAKLAR

- [1] Rubanyi, G. M., The future of human gene therapy, *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 113-142, 2001.
- [2] Caplen N. J., Gene Therapy Progress and Prospects. Down regulating gene expression: the impact of RNA interference , *Gene Therapy*, 11, 1241–1248, 2004.
- [3] Akhtar S., Benter I.F., Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3623–3632, 2007.
- [4] David, S., Pitard, B., Benoit, J. P., Passirani, C., Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery, *Pharmacological Research*, 62, 100–114, 2010.
- [5] Karagüzel A., Kalay E., Celep F., Gen Sessizle tirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları, *Uludag Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 33 (1) 41-44, 2007.
- [6] Hannon G. J., RNA interference, *Nature*, 418, 244-251, 2002.
- [7] Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391, 806-811, 1998.
- [8] Guo P., Coban O., Snead N. M., Trebley J., Hoeplich S., Guo S., Shu Y., Engineering RNA for Targeted siRNA Delivery and Medical Application, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(6), 650-666, 2010.
- [9] Zhu C., Jung S., Luo S., Meng F., Zhu X., Park T. G., Zhong Z., Co-delivery of siRNA and paclitaxel into cancer cells by biodegradable cationic micelles based on PDMAEMA–PCL–PDMAEMA triblock copolymers, *Biomaterials*, 31(8), 2408-2416, 2010.
- [10] Masiero M., Indraccolo G. N. S., Favaro E., RNA interference : Implications for cancer treatment, *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 143-166, 2007.
- [11] Xiong X. B., Lavasanifar A., Traceable Multifunctional Micellar Nanocarriers for Cancer-Targeted Co-delivery of MDR-1 siRNA and Doxorubicin, *ACS Nano*, 5(6), 5202-5213, 2011.
- [12] Sun T. M., Du J. Z., Yao Y. D., Mao C. Q., Dou S., Huang S. Y., Zhang P. Z., Leong K. W., Song E. W., Wang J., Simultaneous Delivery of siRNA and Paclitaxel via a “Two-in-One” Micelleplex Promotes Synergistic Tumor Suppression, *ACS Nano*, 5(2), 1483-1494, 2011.

- [13] Ren Y., Li Y., Tian D., Role of the ABCE1 gene in human lung adenocarcinoma, *Oncology Reports*, 27, 965-970, 2012.
- [14] Kim E., Jung Y., Choi Y., Yang J., Suh J. S., Huh Y. M., Kim K., Haam S., Prostate cancer cell death produced by the co-delivery of Bcl-xL shRNA and doxorubicin using an aptamer-conjugated polyplex, *Biomaterials*, 31, 4592-4599, 2010.
- [15] Bisbal C., Martinand C., Silhol M., Lebleu B., and Salehzada T., Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5 A pathway, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 13308-13317, 1995.
- [16] Le Roy F., Bisbal C., Silhol M., Martinand C., Lebleu B., and Salehzada T., The 2-5A/RNase L/RNase L inhibitor (RLI) [correction of (RNI)] pathway regulates mitochondrial mRNAs stability in interferon alpha-treated H9 cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 48473-48482, 2001.
- [17] Huang B., Gao Y., Tian D., Zheng M., A small interfering ABCE1-targeting RNA inhibits the proliferation and invasiveness of small cell lung cancer, *International Journal of Molecular Medicine*, 25, 687-693, 2010.
- [18] Yasui K., Mihara S., Zhao C., Okamoto H., Saito-Ohara F., Tomida A., Funato T., Yokomizo A., Naito S., Imoto I., Tsuruo T., Inazawa J., Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance, *Cancer Research*, 64(4), 1403-1410, 2004.
- [19] Chen Z. Q., Dong J., Ishimura A., Daar I., Hinnebusch A. G., Dean M., The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors, *The Journal of Biological Chemistry*, 28, 7452-7457, 2006.
- [20] Blankenstein T., *Gene Therapy Principles and Applications*, Basel, 379, 1999.
- [21] Barnes, M. N., Deshane, J. S., Rosenfeld, M., Siegal, G.P., Curiel, D.T., Alvarez, R.D., Gene therapy and ovarian cancer: a review, *Obstetrics Gynecology*, 89, 145-55, 1997.
- [22] Gottesman, M., Cancer gene therapy: An awkward adolescence, *Cancer Gene Therapy*, 10, 501-508, 2003.
- [23] Anas, E., Current strategies in cancer gene therapy, *European Journal of Pharmacology*, 498, 1- 8, 2004.
- [24] Candotti, F., Blaese, R.M., Gene therapy of primary immunodeficiencies, Springer, *Seminars in Immunopathology*, 19, 493-508, 1998.

- [25] Akbaba, H., Gen tedavisi amacıyla DNA yüklü katı lipid nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 147, 2010.
- [26] Stribley, M. J., Rehman, S. K., Niu, H., Christman G. M., Gene therapy and reproductive medicine, *Fertility and Sterility*, 77, 4, 645-657, 2002.
- [27] Aydın, D., Fare IL-18 veya CD40L Genlerini taşıyan rekombinant Salmonella Typhimurium Arop suşlarının oluşturulması ve gen tedavisi vektörü olarak değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 226, 2006.
- [28] Özdemir, N., Gen taşıması için polimerik nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 124, 2006.
- [29] Ledley, F. D., Prenatal application of somatic gene therapy, *Obstetrics&Gynecology Clinics of North America*, 20, 611–20, 1993.
- [30] Mulligan, R. C., Gene transfer and gene therapy: principles, prospects and perspective, In *Etiology of human disease at the DNA level*, Raven, New York, 143–89, 1991.
- [31] McManus, M. T. and Sharp, P. A., Gene silencing in mammals by small interfering RNAs, *Nature Reviews Genetics*, 3, 737–747, 2002.
- [32] Dorsett, Y. and Tuschl T., siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics, *Nature*, 3, 318–329, 2004.
- [33] Karaboz, . ve Çolak, C., Antisens Teknolojisi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 05, 2, 14-37, 2007.
- [34] Sifuentes-Romero, I., Milton, S. L., García-Gasca, A., Post-transcriptional gene silencing by RNA interference in non-mammalian vertebrate systems: Where do we stand?, *Mutation Research*, 728, 3, 158–171, 2011.
- [35] Hammond, S. M., Caudy, A. A., Hannon, G. J., Post-Transcriptional Gene Silencing by Double Stranded RNA, *Nature Reviews&Genetics*, 2, 110-119, 2001.
- [36] Bodur, E. ve Demirpençe E., Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41, 82-89, 2010.
- [37] Bennett C. F., Swayze E. E., RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 259-293, 2010.

- [38] Kurreck J., Antisense Technologies improvement through novel chemical modifications, *European Journal of Biochemistry*, 270(8), 1628-1644, 2003.
- [39] Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide, *Proceedings of the National Academy of the United States of America*, 75(1), 280–284, 1978.
- [40] Jorgensen R.A., Altered Gene Expression in Plants Due to Trans Interactions Between Homologous Genes, *Trends Biotechnology*, 8, 340- 344, 1990.
- [41] Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R., Introduction of A Chimeric Chalcone Synthase Gene Into Petunia Result in Suppression of homologous Reversible Co-suppression of Homologous Genes in Trans, *The Plant Cell*, 2, 279-289, 1990.
- [42] Van Blokland, Transgene-Mediated Suppression of Chalcone Synthase Expression in Petunia hybrida Results From An Increase in RNA Turnover, *Plant Journal*, 6, 861- 877, 1994.
- [43] Jorgensen R. A. , Cluster P.D., English J., Que Q., Napoli C.A., Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences, *Plant Molecular Biology*, 32(5):957-973, 1996.
- [44] Metzlafl., RNA-Mediated RNA Degradation and Chalcone Synthase A Silencing in Petunia, *Cell*, 88, 845- 854, 1997.
- [45] Romano N., Macino, G., Quelling: Transient Inactivation of Gene Expression in *Neurospora crassa* by Transformation With Homologous Sequences, *Molecular Microbiology*, 6, 3343- 3353, 1992.
- [46] Guo S., Kempthues K.J., par-1, A gene Required For Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos, Encodes A Putative Ser/Thr Kinase That is Asymmetrically Distributed, *Cell*, 81, 611- 620, 1995.
- [47] Fire A., Potent and Specific Genetic Interference by Double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391, 806- 811, 1998.
- [48] Ross, J.S., Carlson, J.A., Brock, G., miRNA: The new gene silencer, *American Journal of Clinical Pathology*, 128(5), 830-836, 2007.
- [49] Çakmak, F., Vasküler endotelial büyüme faktörünü kodlayan genin susturulmasına ili kin in vitro çalışmaları, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 196, 2010.
- [50] Zamore P.D., RNAi: Double-Stranded RNA Directs The ATP Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals, *Cell*, 101, 25- 33, 2000.

- [51] Jaskiewicz, L. and Filipowicz, W., Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 320, 77-97, 2008.
- [52] Aigner A., Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs, *Journal of Biotechnology*, 124(1), 12-25, 2006.
- [53] Gewirtz A.M., On Future's Doorstep: RNA Interference and The Pharmacopeia of Tomorrow, *The Journal of Clinical Investigation*, 117 (12), 3612- 3614, 2007.
- [54] Takahashi, Y., Nishikawa, M., Takakura, Y., Nonviral vector-mediated RNA interference: Its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 760–766, 2009.
- [55] Agrawal N., RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4), 657- 685, 2003.
- [56] Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C., A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants, *Science*, 286, 5441, 950–952, 1999.
- [57] Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. H., Role For A Bidentate Ribonuclease in The Initiation Step of RNA Interference, *Nature*, 409, 363- 366, 2001.
- [58] Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T., RNA Interference is Mediated by 21- and 22- Nucleotide RNAs, *Genes & Development*, 15, 188- 200, 2001.
- [59] Putnam, D. and Doody, A., RNA-interference effectors and their delivery, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 23, 2, 137–164, 2006.
- [60] Lee, S. H. and Sinko, P. J., siRNA—Getting the message out, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 401-410, 2006.
- [61] Hannon G.J., RNA Interference, *Nature*, 418, 244- 251, 2002.
- [62] Szweykowska- Kulinska Z., Jarmołowski A., Figlerowicz M., RNA Interference and Its Role in The Regulation of Eucaryotic Gene Expression, *Acta Biochimica Polonica*, 50 (1), 217- 229, 2003.
- [63] Kim, N., RNA Interference in Functional Genomics and Medicine, *Journal of Korean Medical Science*, 18, 309-18, 2003.
- [64] Göktürk, D., TAF7 ekspresyonunun siRNA ile baskılanması sonrasında apoptotik süreçteki de i ikliklerin ara tırılması, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, zmir, 151, 2007.



- [65] Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V., The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, 75, 843-54, 1993.
- [66] Saydam, F., De ırmenci, ., Güne , H. V., MikroRNA'lar ve kanser, *Dicle Tıp Dergisi*, 38, 1, 113-120, 2001.
- [67] Lee, Y. S. and Dutta, A., Micro RNAs in cancer, *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*, 4, 199-227, 2009.
- [68] Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. J., An RNA directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells, *Nature*, 404, 293-6, 2000.
- [69] Zeng, Y., Yi, R., Cullen, B. R., MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 5779-84, 2004.
- [70] enel, B., siRNA Ta ıyıcı Sistem Geli tirme ve De erlendirme Çalış maları, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eski ehir, 131, 2012.
- [71] Meister, G. and Tuschl T., 2004, Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA, *Nature*, 431, 343–9, 2004.
- [72] Tang, G., 2005, siRNA and miRNA: an insight into RISCs, *Trends Biochem. Sci.*, 30, 106–14.
- [73] Nicholson, A. W., Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases, *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 371–390, 1999.
- [74] Betz N., RNAi: RNA Interference, *Promega Notes*, 83, 33- 36, 2003.
- [75] Tijsterman, M. and Plasterk, P. H., Dicers at RISC; the mechanism of RNAi, *Cell*, 117,1, 1-3, 2004.
- [76] Zhang., *Biochemistry and Modeling of Human Dicer, A Key Protein Involved in RNA Interference*, Ph.D. Thesis, Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, 2004.
- [77] Khanna D., Balgir P.P., Gurlovleen K., RNA Interference: An Ancient Mechanism For Novel Therapeutics, *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*, 2 (2), 1- 45, 2007.
- [78] Selli, Ç., TRPC iyon kanallarının i levsel ekspresyon kalıplarının post-transkripsiyonel gen susturma ile ara tırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, zmir, 125, 2011.

- [79] Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., Wang, X., Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation, *Cell*, 123, 621- 629, 2005.
- [80] Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., Hannon, G. J., Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi, *Science*, 293, 1146–1150, 2001.
- [81] Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., Joshua-Tor, L., Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity, *Science*, 305, 1434–1437, 2004.
- [82] Gündo du R., Çelik V., 2009, Rna nterferans (Rnai), Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 25, 1-2, 34 – 47, 2009.
- [83] Oh, Y. K. and Park, T. G., siRNA delivery systems for cancer treatment, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 850–862, 2009.
- [84] Downward J., RNAi and Cancer Research, *The Biochemist*, 26 (5), 12- 14, 2004.
- [85] Eggleston A., RNAi Therapy , Nature Publishing Group, 54, 2005.
- [86] Masiero, M., Nardo G., Indraccolo, S., Favaro E., RNA interference: Implications for cancer treatment, *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 143–166, 2007.
- [87] Ganesh S., Iyer A. K., Weiler J., Morrissey D. V., Amiji M. M., Combination of siRNA-directed Gene Silencing With Cisplatin Reverses Drug Resistance in Human Non-small Cell Lung Cancer, *Molecular Therapy—Nucleic Acids* , 2, 110, 2013.
- [88] Creixella M., Peppas N. A., Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance, *Nano Today*, 7(4) , 367-379, 2012.
- [89] Sun T. M., Du J. Z., Yao Y. D., Mao C. Q., Dou S., Huang S. Y., Zhang P. Z., Leong K. W., Song E. W., Wang J., Simultaneous Delivery of siRNA and Paclitaxel via a “Two-in-One” Micelleplex Promotes Synergistic Tumor Suppression, *ACS Nano* 5(2), 1483-1494, 2011.
- [90] Kima, E., Junga, Y., Choi, H., Yangc, J., Suhc, J., Huhc, Y., Kimb, K., Haam, S., Prostate cancer cell death produced by the co-delivery of Bcl-xL shRNA and doxorubicin using an aptamer-conjugated polyplex, *Biomaterials*, 31, 4592-4599, 2010.
- [91] Spänkuch B., Kurunci-Csacsco E., Kaufmann M., Strebhardt K., Rational combinations of siRNAs targeting Plk1 with breast cancer drugs, *Oncogene*, 26(39), 5793–5807, 2007.

- [92] Macdiarmid, J. A., Amaro-Mugridge N. B., Madrid-Weiss J., Sedliarou I., Wetzel S., Kochar K., Brahmhatt V. N., Phillips L., Pattison S. T., Petti C., Stillman B., Graham R. M., Brahmhatt H., Sequential Treatment of Drug-Resistant Tumors with Targeted Minicells Containing siRNA or a Cytotoxic Drug, *Nature Biotechnology*, 27, 643–651, 2009.
- [93] Sun, T., Du, J., Yao, Y., Mao, C., Dou, S., Huang, S., Zhang, P., Kam, W., Leong, K., Song, E. and Jun Wang, J., Simultaneous Delivery of siRNA and Paclitaxel via a “Two-in-One” Micelle Promotes Synergistic Tumor Suppression, *ACS Nano*, 5, 2, 1483-1494, 2011.
- [94] Tian Y., Han X., Tian D. L., The Biological Regulation of ABCE1, *Life*, 64(10), 795-800, 2012.
- [95] Dean M., Hamon Y., Chimini G., The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *Journal of Lipid Research*, 42, 1007–1017, 2001.
- [96] Dean M., Allikmets R., Evolution of ATP-binding cassette transporter genes, *Current Opinion in Genetics and Development*, 5(6), 779-785, 1995.
- [97] Bisbal, C., Martinand, C., Silhol, M., Lebleu, B., and Salehzada, T., Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5 A pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 270, 13308–13317, 1995.
- [98] Karcher A., Schele A., Hopfner, K. P., X-ray structure of the complete ABC enzyme ABCE1 from *Pyrococcus abyssi*, *The Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7962–7971, 2008.
- [99] Barthelme D., Scheele U., Dinkelaker S., Janoschka A., Macmillan F., Albers S. V., Driessen A. J., Stagni M. N., Bill E., Meyer-Klaucke W., Schünemann V., Tampé R., Structural organization of essential iron-sulfur clusters in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1, *The Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14598–14607, 2007.
- [100] Zhou A., Hassel B. A., Silverman R. H., Expression cloning of 2-5A dependent RNase: a uniquely regulated mediator of interferon action, *Cell*, 72(5), 753–776, 1993.
- [101] Floyd-Smith G., Slattery E., Lengyel P., Interferon action: RNA cleavage pattern of a (20-50) oligoadenylate-dependent endonuclease, *Science*, 212, 1030–1032, 1981.
- [102] Bisbal C., Silverman R. H., Diverse functions of RNase L and implications in pathology, *Biochimie*, 89(6-7), 789-798, 2007.
- [103] Diaz-Guerra M., Rivas C., Esteban M., Activation of the IFN-inducible enzyme RNase L causes apoptosis of animal cells, *Virology*, 236(2), 354-363, 1997.

- [104] Liang S. L., Quirk D., and Zhou A., (2006) RNase L: Its biological roles and regulation, *IUBMB Life*, 58(9), 508–514, 2006.
- [105] Silverman R. H., Implications for RNase L in prostate cancer biology, *Biochemistry*, 42(7), 1805–1812, 2003.
- [106] Zheng M. G., Gao Y., Huang B., Tian D. L., Yang C. Lu., Suppression of ABCE1 Leads to Decreased Cell Proliferation and Increased Apoptosis in 95-D/NCI-H446 Lung Carcinoma Cells, *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 36(11), 1475-1482, 2009.
- [107] REN, Y., LI, Y. and TIAN, D., Role of the ABCE1 gene in human lung adenocarcinoma, *ONCOLOGY REPORTS*, 27: 965-970, 2012.
- [108] Khoshnevis S., Gross T., Rotte C., Baierlein C., Ficner R., and Krebber H., The iron-sulphur protein RNase L inhibitor functions in translation termination *EMBO Reports*, 11(3), 214–219, 2010.
- [109] Pisarev A. V., Skabkin M. A., Pisareva V. P., Skabkina O. V., Rakotondrafara A. M., Hentze M. W., Hellen C. U., Pestova T., The role of ABCE1 in eukaryotic post-termination ribosomal recycling, *Molecular Cell*, 37(2), 196–210, 2010.
- [110] Huang B., Gao Y., Tian D., and Zheng M., A small interfering ABCE1 targeting RNA inhibits the proliferation and invasiveness of small cell lung cancer, 25, 687–693, *International Journal of Molecular Medicine*, 25(5), 687–693, 2010.
- [111] Mao-Gen, Z., Ying, G., Bo, H., Da-Li, T., Chun-Lu, Y., Suppression of ABCE1 Leads to Decreased Cell Proliferation and Increased Apoptosis in 95-D/NCI-H446 Lung Carcinoma Cells, *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 36(11): 1475~1482, 2009.
- [112] Heimerl S., Bosserhoff A. K., Langmann T., Ecker J., and Schmitz G., Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells, *Melanoma Research*, 17(5), 265–273, 2007.
- [113] Hendig D., Langmann T., Zarbock R., Schmitz, G., Kleesiek K., and Götting C., Characterization of the ATP-binding cassette transporter gene expression profile in Y79: a retinoblastoma cell line, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 328 (1-2), 85-92.
- [114] Hlavata I., Mohelnikova-Duchonova B., Vaclavikova R., Liska V., Pitule P., , Novak P., Bruha J., Vycital O., Holubec L., Treska V., Vodicka P., Soucek P., The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer, *Mutagenesis*, 27(2), 187–196, 2012.
- [115] Yasui K., Mihara S., Zhao C., Okamoto H., Saito-Ohara, F., Tomida A., Funato T., Yokomizo A., Naito S., Imoto I., Tsuruo T., Inazawa J., Alteration in copy

- numbers genes as a mechanism for acquired drug resistance, *Cancer Research*, 64(4), 1403–1410, 2004.
- [116] Zhang N., Yin Y., Xu S. J., Wei-Shan Chen W. S., 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies, *Molecules*, 13(8), 1551-1569, 2008.
- [117] Grem J. L., 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development, *Investigational New Drugs*, 18(4), 299-313, 2000.
- [118] Thomas D. M., Zalcborg J. R., 5-fluorouracil: a pharmacological paradigm in the use of cytotoxics, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 25, 887-895, 1998.
- [119] Parker W. B., Cheng Y. C., Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil, *Pharmacology and Therapeutics*, 48(3), 381-395, 1990.
- [120] Ikeda R., Vermeulen L.C., Lau E., Jiang Z., Pomplun M., Kolesar J. M., Establishment and characterization of irinotecan-resistant human non-small cell lung cancer A549 cells, *Molecular Medicine Reports*, 3(6), 1031-1034, 2010.
- [121] Hardman W. E., Moyer M. P., Cameron I. L., Fish oil supplementation enhanced CPT-11 (irinotecan) efficacy against MCF7 breast carcinoma xenografts and ameliorated intestinal side-effects, *British Journal of Cancer*, 81(3), 440-448, 1999.
- [122] Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65 (1–2), 55–63, 1983.
- [123] Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A., A practical note on the use of cytotoxicity assays, *International Journal of Pharmaceutics*, 288(2), 369–376, 2005.
- [124] Sankari S. L., Masthan K. M., Babu N. A., Bhattacharjee T., Elumalai M., Apoptosis in Cancer - An Update, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13 (10), 4873-4878, 2012.
- [125] Danial N. N., Korsmeyer S. J., Cell death: critical control points, *Cell*, 116(2), 205-219, 2004.
- [126] Ramírez C. R., Carracedo A. J., Moreno Aguilar F. C., Apoptosis and disease. *Alergología E Inmunología Clínica*, 14, 367-4, 1999.
- [127] Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE, Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential, *BioTechniques*, 26 (1): 112–22, 1999.

- [128] Caffrey D. R., Zhao J., Song Z., Schaffer M. E., Haney S. A., Subramanian R. R., Seymour A. B., Hughes J. D., siRNA Off-Target Effects Can Be Reduced at Concentrations That Match Their Individual Potency, *Plos One*, 6(7), 2011.
- [129] Chen, Z. Q., Dong, J., Ishimura, A., Daar, I., Hinnebusch, A. G., and Dean, M., The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 7452–7457, 2006.
- [130] Novel combination treatment for colorectal cancer using Nek2 siRNA and cisplatin, Suzuki K., Kokuryo T., Senga T., Yokoyama Y., Nagino M., Hamaguchi M., *Cancer Science*, 101(5), 1163–1169, 2010.
- [131] Karasawa H., Miura K., Fujibuchi W., Ishida K., Kaneko N., Kinouchi M., Okabe M., Ando T., Murata Y., Sasaki H., Takami K., Yamamura A., Shibata C., Sasaki I., Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells, *Cancer Science*, 100(5), 903-913, 2009.
- [132] Koivusalo R., Krausz E., Helenius H., Hietanen S., Chemotherapy Compounds in Cervical Cancer Cells Primed by Reconstitution of p53 Function after Short Interfering RNA Mediated Degradation of Human Papillomavirus 18 E6 mRNA: Opposite Effect of siRNA in Combination with Different Drugs, *Molecular Pharmacology*, 68(2), 372-382, 2005.
- [133] Koga K., Hattori Y., Komori M., Narishima R., Yamasaki M., Hakoshima M., Fukui T., Maitani Y., Combination of RET siRNA and irinotecan inhibited the growth of medullary thyroid carcinoma TT cells and xenografts via apoptosis, *Cancer Science*, 101(4), 941-947, 2010.
- [134] Zhang Y., Peng L., Mumper R. J., Huang L., Combinational delivery of c-myc siRNA and nucleoside analogs in a single, synthetic nanocarrier for targeted cancer therapy, *Biomaterials*, 34(33), 8459-8468, 2013.
- [135] Liu, X., Yao, X., Kirschenbaum, A. and Levine, A.C., NS398, a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Induces Apoptosis and Down-Regulates bcl-2 Expression in LNCaP Cells, *CANCER RESEARCH*, 58, 4245-4249, 1998.
- [136] Bohm, A., Aichberger, K.J., Mayerhofer, M., Herrmann, H., S. Florian, S., Krauth, M.T., Derdak, S., Samorapoompichit, P., Sonneck, K., Vales, A., Gleixner, K.V., Pickl, W.F., Sperr, W. and Valent, P., Targeting of mTOR is associated with decreased growth and decreased VEGF expression in acute myeloid leukaemia cells, *European Journal of Clinical Investigation*, Vol 39, 395 405, 2009.

## ÖZGEÇM

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Göknur KARA

Do um Yeri : Samsun

Do um Tarihi : 1986

Medeni Hali : Bekar

E-Posta : goknurkara@hacettepe.edu.tr

Adresi : Seyhan Mah. 164.sok. 17347 Ada No:11 A 7/2 Blok Eryaman

### E itim

Lise : Özel Ordu Fen Lisesi (2001-2004)

Lisans : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi - Biyokimya Bölümü (2004 -2010)

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce – İyi

İspanyolca – Orta

### Deneyimi

Ocak 2011 – Kasım 2011: Ordu Üniversitesi, Kimya Bölümü, Araştırma Görevlisi

Kasım 2011 – : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Araştırma Görevlisi

### Deneyim Alanları

Kanser ve siRNA mekanizması

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

BAB6080-968 no'lu proje, 18769.00 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar -

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar -