T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

HCT116 KOLOREKTAL KARSİNOMA HÜCRE HATTI VE BEAS-2B BRONŞİYAL EPİTEL NORMAL HÜCRE HATTINDA *TMPRSS4, CALR, MAGEA3* GEN ANLATIMLARININ TRANSKRİPSİYONEL DÜZEYDE İNCELENMESİ

HÜMA TUĞÇE SEZGİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi FİLİZ SAĞLAM

İSTANBUL - 2020

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

HCT116 KOLOREKTAL KARSİNOMA HÜCRE HATTI VE BEAS-2B BRONŞİYAL EPİTEL NORMAL HÜCRE HATTINDA *TMPRSS4, CALR, MAGEA3* GEN ANLATIMLARININ TRANSKRİPSİYONEL DÜZEYDE İNCELENMESİ

HÜMA TUĞÇE SEZGİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi FİLİZ SAĞLAM

İSTANBUL – 2020

ÖZET

HCT116 KOLOREKTAL KARSİNOMA HÜCRE HATTI VE BEAS-2B BRONŞİYAL EPİTEL NORMAL HÜCRE HATTINDA *TMPRSS4, CALR, MAGEA3* GEN ANLATIMLARININ TRANSKRİPSİYONEL DÜZEYDE İNCELENMESİ

Hüma Tuğçe Sezgin
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı
Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Filiz Sağlam
2020

Kanser oluşumunda anlatım düzeyleri değişen genleri saptamak oldukça önemli bir konudur. Belirli gen anlatımlarının değişmesi, hücreyi normal siklusundan çıkarmakta, fonksiyonunu kaybettirmekte ve hücrenin kaderini tamamen değiştirmektedir. Bu çalışmada karsinogenezi direkt ya da dolaylı yoldan tetiklediği düşünülen *TMPRSS4, CALR* ve *MAGEA3* genlerinin ifade düzeyleri transkripsiyonel düzeyde incelenmiştir. Bu bağlamda HCT116 kolorektal karsinoma hücre hattından ve BEAS-2B sağlıklı bronşiyal epitel hücre hattından total RNA izolasyonu yapılarak kantitatif PCR gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, TMPRSS4 geninin ifadesinde 564,17 kat; CALR geninde 1,75 kat; MAGEA3 geninde 15,75 kat artış saptanmıştır. Bu üç genin de karsinogenezde farklı sinyal yolaklarıyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu yüzden fonksiyonel düzeyde ileri araştırmaların yapılmasının kanser oluşum mekanizmasını anlamaya ve yeni tedavi yaklaşımlarına bulunulmasında önemli katkılarının olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal karsinoma, qPCR, TMPRSS4, CALR, MAGEA3

ABSTRACT

EXPRESSION ANALYSIS OF *TMPRSS4, CALR* AND *MAGEA3* GENES AT TRANSCRIPTIONAL LEVEL ON HCT116 COLORECTAL CARCINOMA AND BEAS-2B BRONCHIAL EPITHELIAL CELL LINES

Huma Tugce Sezgin
Medical Biology and Genetics Master Program
Advisor: Asts. Prof.Filiz Saglam
2020

Detection of overexpressed genes during cancer formation is remarkably an important topic. Alteration of specific gene expressions lead to disruption of cell cyle, disfunction and changing the fate of the cell. In this study, expression of *TMPRSS4*, *CALR* ve *MAGEA3* genes which are directly or indirectly induce carcinogenesis was investigated at transcriptional level. In this context, HCT166 colorectal carcinoma cell line and BEAS-2B bronchial epithelial cell line were used. Total RNAs of these cells were isolated and qPCR was performed with using these RNAs samplea. As a result of this research; 564,17 fold, 1,75 fold and 15,75 fold increase was calculated in HCT166 cell line compared to BEAS-2B cells at expression of *TMPRSS4, CALR* and *MAGEA3* respectively. These genes are involved in carcinogenesis via different signalling pathways. Consequently, further research on their functional role may be necessary to better understanding of cancer formation mechanism and new therapeutic approaches.

Keywords: Colorectal carcinoma, qPCR, TMPRSS4, CALR, MAGEA3

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında beni destekleyen herkese teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim ve tez sürecim esnasında fikirleriyle bana yol gösteren, pozitif ve yol gösterici yaklaşımlarıyla bana destek olan Prof. Dr. Veysel Sabri Hançer, Dr. Öğr. Üyesi Süreyya Bozkurt, Dr. Öğr. Üyesi Filiz Sağlam ve Araştırma Görevlisi Hüseyin Ayhan'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde verdiğim kararlarda her zaman yanımda olan, sevgileri ve sabırlarıyla beni yetiştiren ailem; sevgili annem Hülya Sezgin'e sevgili babam Yusuf Sezgin'e ve sevgili kardeşim Mina Gökçe Sezgin'e verdikleri değerli emekleri için sonsuz teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte desteğini hiç esirgemeyen İstinye Üniversitesi'nin bana kattığı çok sevgili arkadaşım Büşra Köse'ye ve bu yolda desteğini ve güvenini hiç esirgemeyen hayatımda çok özel bir yeri olan Mehmet Sırrı Günay'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK
İÇ KAPAK
KABUL ONAY
ETİK BEYANI
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **iv**
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER LİSTESİ ..... **iv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vi**
TABLO LİSTESİ ..... **vii**
KISALTMALAR LİSTESİ ..... **viii**
GİRİŞ **1**
1. GENEL BİLGİLER **1**
1.1. KOLON KANSERİ 1
1.1.1. Epidemiyoloji 2
1.1.2. Kolon Kanseri Patofizyolojisi Ve Moleküler Mekanizması 2
1.2. HCT116 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI 4
1.3. *TMPRSS4*, *CALR* VE *MAGE-A3* GENLERİ 5
1.4. KANTİTATİF PCR (QPCR) 6
2. MATERYAL VE METOD **8**
2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ 8
2.1.1. Besiyeri İçeriği ve Hücrelerin Büyütülmesi 8
2.1.2. Hücre Stoklarının Hazırlanması 10
2.1.3. Hücre Sayımı 11
2.2. TOTAL RNA IZOLASYONU 12

2.3. KOMPLEMENTER (TAMAMLAYICI) DNA (CDNA) SENTEZİ 13
2.4. KANTİTATİF PCR (qPCR) 14
2.5. DELTA Ct (ΔCt) VE DELTA DELTA Ct (ΔΔCt) DEĞERLERİNİN HESAPLANMASI 15
3. BULGULAR 17
3.1. KANTİTATİF PCR SONUÇLARI 17
4. TARTIŞMA VE SONUÇ 20
KAYNAKLAR 22
EKLER
A.ÖZGEÇMİŞ 26

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Polipten kolorektal karsinoma oluşumu (Kuipers ve ark., 2015)..... 3
Şekil 2:SYBR Green çift iplikli DNA ajanının çalışma prensibi (Arya ve ark., 2005)..... 7
Şekil 3: HCT116 hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü 9
Şekil 4: BEAS-2B hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü 9
Şekil 5: Thoma Lamı 11
Şekil 6: *TMPRSS4* geninin Tm ve Ct grafiği 17
Şekil 7: *CALR* geninin Tm ve Ct grafiği..... 17
Şekil 8: *MAGEA3* geninin Tm ve Ct grafiği 18
Şekil 9: HCT116 hücre hattında *TMPRSS4* geninin anlatım düzeyinin BEAS-2B kontrol hücre hattına göre değişimi 19
Şekil 10: HCT116 hücre hattında *CALR* geninin anlatım düzeyinin BEAS-2B kontrol hücre hattına göre değişimi 19
Şekil 11: HCT116 hücre hattında MAGEA3 geninin anlatım düzeyinin BEAS-2B kontrol hücre hattına göre değişimi 19

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: RNA örneklerinin OD ve konsantrasyon değerleri 13
Tablo 2: cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri 13
Tablo 3: cDNA sentez reaksiyonu aşamaları..... 14
Tablo 4: Primer dizileri 14
Tablo 5: qPCR reaksiyon içeriği 15
Tablo 6: qPCR döngü aşamaları..... 15
Tablo 7: Ortalama Ct değerleriyle kat cinsinden ifade değişimi hesaplama sonuçları 18

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ATCC	: American Type Tissue Culture Collection
CALR	: Calreticulin
cDNA	: Complementary DNA
Ct	: Cycle of Treshold
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dNTP	: Deoksi-Nucleoside triphosphate
DTT	:Dithiothreitol
EGF	: Epidermal Growth Factor
EMT	: Epithelial Mesenchymal Transition
FBS	: Fetal Bovine Serum
g	: Gravite
IARC	: International Agency For Research on Cancer
M	: Molar
MAGE-A3	: Melanom-associacted antigen-3
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase
mL	: Mililitre
mRNA,	: Messenger RNA
ng	: Nanogram
OD	: Optic Densite
P13K	: Phospatidylinositol 3-kinase
PCR	: Polymerase Chain Reaction
qPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction
rpm	: Rounds per minute
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Institute-1640
RTE	: Reverse Transciption Enzyme
SOX9	: Sex-determining Region Y box 9
TGFB	: Transforming Growth Factor Beta

TGFBR2	: Transforming Growth Factor Beta Receptor 2
Tm	: Melting temperature / Erime sıcaklığı
TMPRSS4	: Transmembrane Serine Protease 4
ΔΔCt	: Delta Delta Cycle of Treshold

GİRİŞ

Kolon kanseri oluşumunda karsinogenezi etkileyen genlerin anlatım düzeyi değişimleri, kanserin oluşum mekanizmasının anlaşılması açısından önemlidir. Onkogen ve proto-onkogenlerdeki mutasyonların yanısıra, karsinogenezle ilgili genlerin ifade düzeylerinin saptanması yeni inhibitör ve antikor bazlı ilaçların geliştirilmesi ve ilaç hedefi olabilecek reseptörlerin belirlenmesi için önemlidir. Bu çalışmada, ait oldukları hücresel sinyal veya metabolik yolaklar ile karsinogeneze etki ettikleri bilinen *TMPRSS4, CALR* ve *MAGE-A3* genlerinin anlatım düzeyleri transkripsiyonel düzeyde araştırılmıştır. Araştırmada sağlıklı bronşiyal epitel hücre hattı olan BEAS-2B ve kolorektal karsinoma hücre hattı olan HCT116 hücreleri kullanılmıştır. Hücre hatlarından total RNA izolasyonu yapılmış ve komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Sonrasında ilgili gen bölgelerine spesifik primerler ile kantitatif PCR (qPCR) ile genlerin anlatım düzeyleri belirlenmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. KOLON KANSERİ

Kolon kanseri, birkaç on yıl öncesine kadar düşük insidanslı bir kanser olmasına rağmen yıllar içerisinde predominant bir kanser haline gelmiştir ve batı ülkelerinde kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerdeki bu artışın sebepleri arasında yaşlı nüfusun artması, modern diyet alışkanlıkları, sigara kullanımı, düşük fiziksel aktivite ve obezite sayılabilir. Kolon kanseri, kalıtsal sebeplerle olabileceği gibi çoğunlukla sporadiktir.

Kolon kanseri karsinogenezinde ilk aşama kolon mukozasında spesifik tipli neoplastik poliplerin oluşumudur. En yaygın iki histolojik tip ise hiperlastik ve adenomatozdur. Kolon kanserlerinin çoğu adenoma kökenlidir ve adenomadan karsinomaya dönüşür (Cappell, 2008). Kolorektal karsinoma, kolon ve rektumda oluşan kanserleşmeyi kapsarken, kolon kanseri yalnızca kolondaki kanserleşmeyi ifade eder.

Primer ve metastatik kolon kanseri için geliştirilen yeni yöntemler arasında; primer hastalık için laparoskopik ameliyat, hastalığın metastaz yaptığı bölgeler için

rezeksiyon ya da radyoterapi, neoadjuvan ve palyatif kemoterapi sayılabilir (Hainsworth ve ark., 2004; Papamichael ve ark., 2015). Ameliyat yöntemlerinde ve medikal terapilerdeki büyük ilerlemelere karşın, hastaların kür ve uzun dönem yaşama oranı az miktarda artmıştır. Bu bilgilerin ışığında, kolon kanseri kendini polipler ile göstermesine rağmen, yeni nesil görüntüleme teknikleri (fekal immünokimyasal test, fekal DNA testi gibi non-invasive yöntemler) erken tanı için hız kazandırmıştır.

Geliştirilen yöntemlere ve şimdiye kadar edinilen bilgi birikimine rağmen kolon kanserine ait karsinogenez ve metastaz mekanizmaları henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmadığı için araştırılmaya devam edilmesi gerekmektedir.

1.1.1. Epidemiyoloji

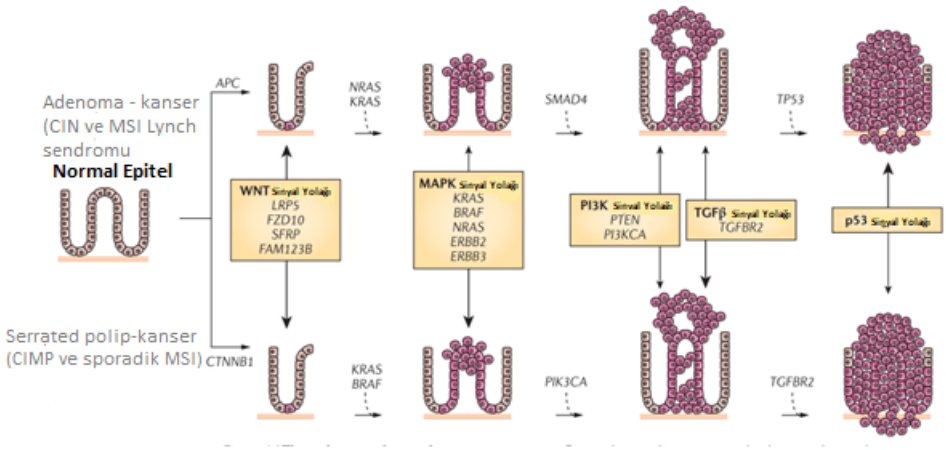
Kolorektum kanseri, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) 2018 yılı raporlarına göre dünya çapında insidans olarak akciğer ve meme kanserinden sonra 3. sırada yer almaktadır. Kansere bağlı ölümlerde ise akciğer kanserinden sonra 2. sırada yer almaktadır. Güncel olarak, 2018 yılında 1,8 milyon tanı ile toplam kanser vakalarının %10,2 sini oluşturmaktadır (Bray ve ark., 2018).

Dünya genelinde erkeklerde en çok tanı koyulan ve ölüme sebep olan kanser türü akciğer kanseriyken, bu sıra prostat kanseri ve kolorektal kanser tarafından takip edilmektedir. Kadınlarda ise meme kanseri insidans ve ölümcüllük açısından ilk sırada yer alırken, akciğer kanseri ikinci sırada ve kolorektal kanser %9,5 ile üçüncü sırada yer almaktadır (Bray ve ark., 2018). 2015 yılı Türkiye kanser istatistiklerine göre Türkiye'de hem kadınlarda hem erkeklerde üçüncü sırada yer almaktadır. Erkeklerde 23,1/100.000 ve kadınlarda ise 14,4/100.000 sıklığında görülmektedir (TÜİK, 2015).

1.1.2. Kolon Kanseri Patofizyolojisi Ve Moleküler Mekanizması

Karsinogenezin ilk aşaması, kolon mukozasında neoplastik poliplerin oluşmasıdır. Bu poliplerin histolojisi malignansi potansiyelinin tanımlanması için çok önemlidir. En yaygın iki histolojik tip hiperplastik ve adenomatöz poliplerdir. Birçok hiperplastik polip kanserle hiç ilişkili olmasa da bazıları direkt olarak kanserle ilişkilendirilmiştir (Winawer ve ark., 2006). Hiperplastik poliplerin, son zamanlarda yapılan yeni sınıflandırmaya göre "çıkıntılı adenoma" olarak adlandırılan yapılar aracılığıyla kanserle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Higuchi & Jass, 2004).

Kolon kanseri, moleküler genetik perspektifinden en iyi anlaşılmış kompleks kanserdir. Kolon kanserine sebep olan çevresel ve genetik faktörler, kolon epitel hücrelerinde kanserin "ayırıcı özelliklerini " aktive ederek kanserleşmeyi başlatırlar. Bu ayırıcı özelliklerin aktifleştirilmesinin bir yolu, onkogenleri aktive eden ve proto-onkogenlerin susturan genetik mutasyonların ve epigenetik bozulmaların birikimidir. Genetik ve epigenetik stabilitenin bozulması erken neoplastik lezyonların hemen hepsinde görülmektedir. Stabilitenin bozulmasının, kolon kanserinin başlangıcında ve gelişiminde en önemli moleküler ve patofizyolojik olay olduğu düşünülmektedir (Colussi, Brandi, Bazzoli, & Ricciardiello, 2013; Grady & Carethers, 2008). Kolonda, epitel hücrelerin adenokarsinomaya evrilmesi bir dizi öngörülebilir histolojik, genetik ve epigenetik değişim ile gerçekleşir. "Klasik" kolon kanseri oluşumu modelinde, kanserlerin büyük çoğunluğu polipin şeklinin bozulmasıyla başlar ve sonrasında erken adenomaya evrilir (<1 cm boyutta). Adenoma, ileri adenomaya dönüşür (>1 cm boyutta ve villöz yapılı) ve sonunda kolon kanseri oluşumu gerçekleşir. Tüm bu proses genetik ve epigenetik mutasyonlar tarafından yönetilir ve normalde 10-15 yıllık olan bu süreç Lynch sendromu gibi durumlarda çok daha hızlı ortaya çıkabilir (Jones ve ark., 2008). Polipten kolorektal karsinoma oluşumunda rol oynayan önemli mutasyon ve sinyal yolakları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Polipten kolorektal karsinoma oluşumu (Kuipers ve ark., 2015)

5-10 yıl öncesine kadar tübüler ve tübülovilöz adenomatöz polipler sadece kanser geliştirme potansiyeli olan lezyonlar olarak düşünülmekteydi. Bununla birlikte, poliplerin yaklaşık %5-10'unu oluşturan ve "durağan çıkıntılı polip (sessile serrated polyps)" olarak adlandırılan poliplerden kanser geliştiği gözlenmiştir (Bettington ve

ark., 2013). Serrated polipler sağ kolonda ortaya çıkarken genellikle metinall (MSI) özelliği gösterirler ve CpG adalarında aşırı derecede DNA metilasyonu gösterirler, bu fenomen CpG adaları metilatör fenotip (CIMP) olarak adlandırılır. Tam aksine sol kolonda ortaya çıkan polipler mikrosatellit kararlıdır ancak genellikle *KRAS* mutasyonu taşırlar ve bir grubu da CIMP'nin bozulmuş formuna sahiptir (Bettington ve ark., 2013; Jass, 2004).

Kolorektal kanser, taşıdığı özelliklere göre çeşitli alt gruplara ayrılmıştır. Alt gruplara ait spesifik yeni mutasyonlar ve epigenetik değişimler hala tanımlanmaktadır. Yine de *APC* ve SMAD family member 4 (*SMAD4*) mutasyonları tüm alt gruplarda ortaktır, bu da kolorektal kanserde ana role sahip olduklarına işaret etmektedir (Chittenden et al., 2008). En yaygın mutasyonlar; WNT-β-catenin, epidermal growth factor (EGF), mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ve TGFβ sinyal yolakları gibi anahtar rol oynayan yolakları ya da DNA onarımı, proliferasyon gibi temel yolakları bozan mutasyonlardır. Bu mutasyonlar *APC*, catenin-β1 (*CTNNB1*), *KRAS*, *BRAF*, *SMAD4*, transforming growth factor-β receptor 2 (*TGFBR2*), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit-α (*PIK3CA*), sex-determining region Y box 9 (*SOX9*) genlerinde gerçekleşir (Brennan ve ark., 2013; Grady & Pritchard, 2014). Kolorektal kanser genellikle WNT sinyal yolağındaki mutasyonlarla başlar ve neoplastic hücreleri karsinogeneze dahil eder. Sonrasında RAS-RAF-MAPK-TGFβ ve P13K-AKT sinyal yolaklarında bozulmalar meydana gelir (Bardelli ve ark., 2003).

1.2. HCT116 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI

Bu çalışmada deney grubu olarak HCT116 kolorektal karsinoma hücre hattı ve kontrol grubu olarak BEAS-2B akciğer sağlıklı hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatları, American Type Tissue Culture Collection (ATCC) firmasından temin edilmiştir.

HCT116 hücre hattı, 1981 yılında Brattain ve ekibi tarafından kolorektal karsinoma sahibi olan yetişkin erkek hastanın tümöründen elde edilerek ölümsüzleştirilmiştir. Kültür ortamında adherent olarak çoğalırlar. Transfeksiyon çalışmaları için uygun bir konaktır. Transforming growth factor beta 1 (*TGFB1*) ve beta 2 (*TGFB2*) ekspresyonu pozitiftir. Ayrıca p21ras proto-onkogeninde mutasyon

taşıyan bu hücre hattı, kolon kanseri araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (LGC, ATCC CCL-247).

BEAS-2B hücre hattı ise ilk olarak 1989'da R. R. Reddel ve ekibi tarafından immortalize edilmiştir. Bronş epiteli kökenlidir ve kültür kabı zeminine yapışarak çoğalır. Hücreler, kültür ortamındaki seruma yanıt olarak skuamöz farklılaşma yeteneğini korur ve diferansiyasyonu ya da karsinogenezi etkileyen biyolojik/kimyasal ajanların görüntülenmesi için kullanılabilir (LGC, ATCC CRL-9609).

1.3. *TMPRSS4*, *CALR* VE *MAGE-A3* GENLERİ

Transmembrane serine protease 4 (*TMPRSS4*) geni, 11. kromozomun uzun kolunda (11q23.3) lokalize olan bir gendir (NCBI, Gene ID: 56649). Serin proteaz ailesinin bir üyesini kodlamaktadır. İlk kez pankreatik karsinomada aşırı eksprese olan bir gen olarak tanımlanmıştır. Kodlanan protein N-ucu dizisi sayesinde membrana bağlanmaktadır ve glikozillenmiş ekstrasellüler bölgesi serin proteaz domenini içerir. Bu gen, 48.597 baz çiftinden oluşur ve 13 ekzon, 12 intron içerir. Genin farklı izoformlarını kodlayan çeşitli transkiptleri bulunmaktadır (NCBI). *TMPRSS4* geninin kolonda, duodenumda, apandistte, özofagusta, safra kesesinde, endometriyumda, böbrekte, deride, midede ve mesanede anlatımı olduğu bilinmektedir. En yüksek anlatım düzeyinin kolonda olduğu gösterilmiştir (Fagerberg ve ark., 2014).

TMPRSS4'ün proteolitik domeni type 2 transmembrane serine protease (TTSP)'ler arasında yüksek oranda korunmuştur ve aktivitesi Histidin, Aspartik asit ve Serin aminoasitlerinden oluşan "katalitik üçlünün" varlığına bağlıdır. Ayrıca enzimatik aktivite, enzim spesifitesini de belirleyen substrat bağlanan cep kısmı tarafından da düzenlenir (Antalis ve ark., 2010). Aktif TMPRSS4 proteaz domeni hücrelerden salınıp kültür medyasında bulunabilir (Min, Lee, Lee, & Kim, 2014). Bu bulgu, çözünebilir moleküllerin tümör taşıyan hastaların serumlarında saptanabilmesinin önünü açmış ve dolayısıyla TMPRSS4'ün non-invaziv tanı belirteci olarak kullanılabileceğine işaret etmektir.

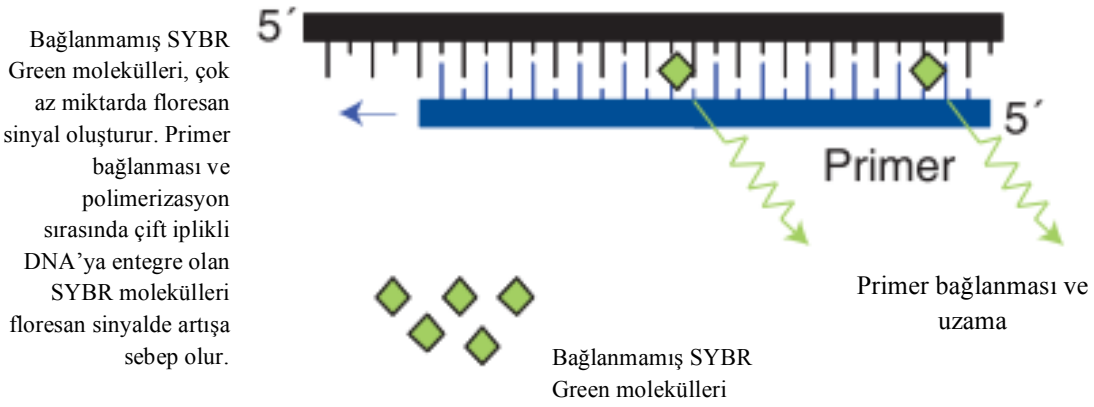
Calreticulin (*CALR*) geni 19 kromozomun kısa kolunda (19p13.13) lokalize bir gendir (NCBI, Gene ID: 811). 9 ekzon taşımaktadır. Endoplazmik retikulumun lümeninde Ca^{+2} bağlayıcı olarak görev yapan multifonksiyonel bir proteindir. Hücre içinde sentezi tamamlanan proteinlerin doğru yapılarına kavuşmalarını sağlayan şaperon protein olarak da görev yapmaktadır (NCBI, UniProtKB - P27797).

CALR proteini nukleusta da saptanmıştır. Bu çıktı, CALR'nin çeşitli hormonların ve genlerin işleyiş mekanizmaları için transkripsiyonel düzeyde görevi olduğunu düşündürmektedir (Perrone ve ark., 1999).

Melanoma-associated antigen (MAGEA) gen ailesinin üyesi olan *MAGE-A3* geni X kromozomunun uzun kolunda (Xq28) lokalizedir (NCBI, Gene ID: 4102). 6 ekzon taşımaktadır. MAGEA ailesinin genleri kodladıkları protein dizileri bakımından %50-80 benzerlik gösterirler. MAGEA genlerine ait promotörler ve birinci ekzonlar farklılık gösterebilir ve bu da farklı transkripsiyonel kontroller altında aynı fonksiyonu gösterdiklerini düşündürmektedir. Sağlıklı dokularda yalnızca testislerde anlatımı saptanmıştır. Embriyonel gelişimde ve tümör oluşumunda rolü olduğu ve Nuclear Factor - κB (NF-κB) sinyal yolağı ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (The Human Protein Atlas, MAGEA3; Lu ve ark., 2017). Olgunlaşmış hücrelerde işlevinin olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

1.4. KANTİTATİF PCR (QPCR)

Kantitatif ya da eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR ya da qPCR), nükleik asit miktarının ölçülmesini sağlayan hızlı, hassas ve tekrar edilebilir bir yöntemdir. İlk kez Higuchi ve arkadaşları tarafından, 1992 yılında geliştirilmiştir. Bu teknikte klasik PCR yöntemine benzer olarak; bir çift spesifik primer, deoksinükleotit trifosfatlar (dNTPs), reaksiyon tamponu, DNA polimeraz ve deteksiyonu sağlayan bir floresan molekül ya da DNA'ya bağlanan farklı ajanlar kullanılır. Günümüzde en yaygın kullanılan ajanlardan biri SYBR Green boyasıdır. SYBR Green çift iplikli DNA'ya entegre olmakta ve DNA polimerizasyonuyla doğru orantılı olarak artan floresan sinyali sayesinde gen ifadesinin miktar hesabına olanak sağlamaktadır. Çalışma prensibi Şekil 1'de verilmiştir. Floresan sinyalin eşik değeri aştığı noktadaki döngü sayısı "Cycle of treshold (Ct)" olarak ifade edilir.



Şekil 2.SYBR Green çift iplikli DNA ajanının çalışma prensibi (Arya ve ark., 2005)

PCR döngüsü seri halinde yapılan sıcaklık değişimleri döngülerinden oluşur. Herbir döngü 3 adıma ayrılabilir:

- **Denatürasyon:** 95 °C'de çift iplikli DNA'nın ayrılması
- **Primerlerin bağlanması:** Primerlerin 50-60 °C'de hedef DNA'ya hizalanması
- **Uzama ya da polimerizasyon:** 68-72 °C'de, DNA'ya karşılık gelen dNTPlerin bağlanması

qPCR ile gen ifadelerinin göreceli analizi yapılırken en yaygın kullanılan metot $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodudur. Bu yöntemde, herbir döngüde DNA miktarının ikiye katlandığı ve referans genin hep aynı düzeyde ifade edildiği kabul edilir. Deney ve kontrol grubuna ait genler, referans gen ile normalize edilerek delta Ct (ΔCt) değerleri bulunur. Sonrasında deney grubunun ΔCt değerinden kontrol grubuna ait ΔCt çıkartılır ve ΔΔCt elde edilir. Gen anlatımının kat cinsinden değişimi ise $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ile hesaplanır (Livak & Schmittgen, 2001).

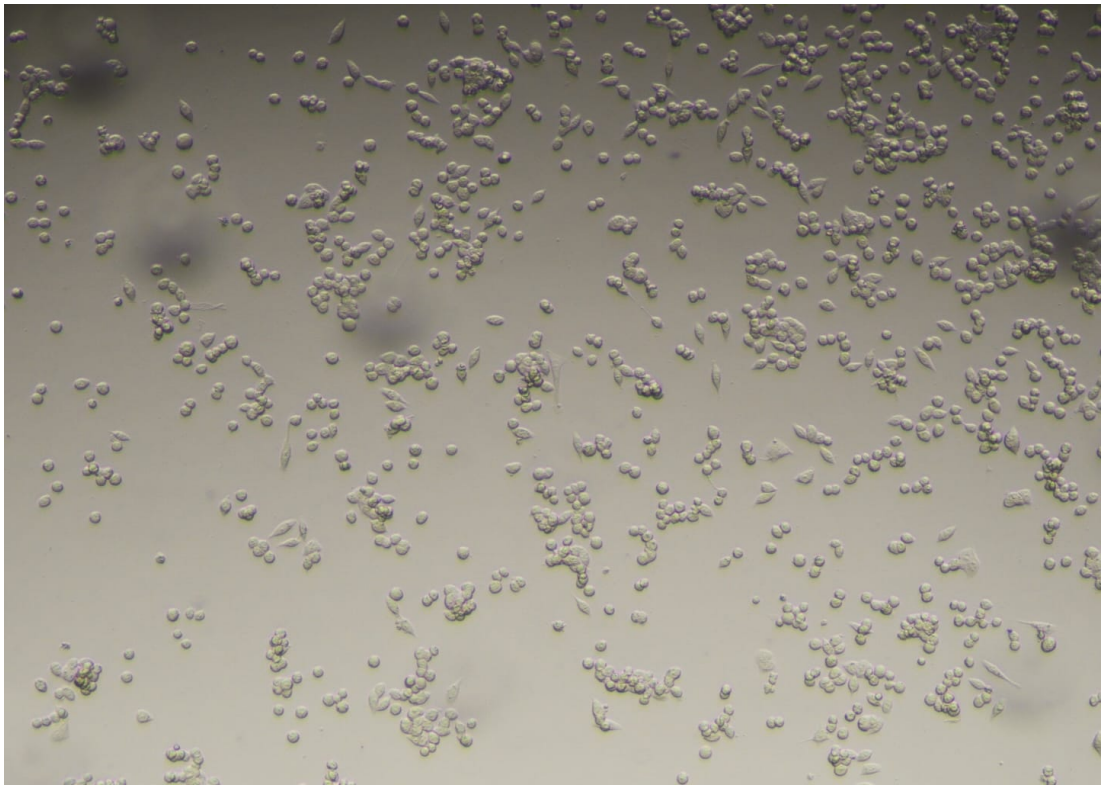
2.MATERYAL VE METOD

2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

2.1.1.Besiyeri İçeriği ve Hücrelerin Büyütülmesi

Kontrol grubu olarak kullanılan sağlıklı bronşiyal epitel hücre hattı olan BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) ve kolorektal kanser hücre hattı olan HCT116 (ATCC® CCL247™) hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS, Pan Biotech, P30-1904) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Pan Biotech, P06-07100) içeren Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyeri içinde kültür edilmiştir.

Kriyo tüpler içerisinde, sıvı azotta saklanan hücreler protokole uygun olarak 50 °C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde hızlı bir şekilde çözdürülmüştür. 15 mililitrelik (mL) santrifüj tüplerine alınan hücreler, Dimetil sülfoksit DMSO'nun uzaklaştırılması amacıyla 21 °C, 800 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı kısım (süpernatant) aspire edilip üzerine 1 mL sıvı besiyeri ilave edilmiştir. Nazikçe pipetaj yapılarak hücre pelletinin çözülmesi sağlanmış ve hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hücre süspansiyonu, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan 25 santimetre karelik (cm^2) kültür flasklarına alınarak 37 °C sıcaklıkta, %5 karbondioksit içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Sağlıklı ve kanser hücre hatlarının her ikisi de kültürde tek tabaka halinde, flask zeminine yapışarak büyütülmüştür. (Hücrelerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri Şekil 1 ve Şekil 2'de verilmiştir.)



Şekil 3. HCT116 hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü



Şekil 4. BEAS-2B hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü

Besiyerinin değiştirilmesi gerektiğinde, flask içerisinde halihazırda bulunan besiyeri aspire edildikten sonra 1X 2 mL steril fosfat tampon çözeltisi (PBS) eklenerek hücrelerin bulunduğu yüzeyde nazikçe yıkama yapılmıştır. Sonrasında PBS ortamdan aspire edilmiştir ve flask içerisine 5 mL taze besiyeri eklenmiştir.

Hücreler, flask yüzeyinin %60-70'ini kapladıkları durumda (konfluent olduklarında) pasajlanmaları amacıyla üzerlerindeki besiyeri aspire edilmiştir. Hücre yüzeyi serum ve besiyeri kalıntılarının tamamen uzaklaştırılması için, 1X 2mL PBS ile nazikçe yıkanmıştır. Hücrelerin tutundukları yüzeyden kaldırılması için 0,5 mL %0,05'lik Tripsin-EDTA solüsyonu eklenmiş ve hücreler 37 °C, %5 karbondioksit içeren inkübatörde 5 dakika inkübe edilmiştir. Mikroskopta yüzeyden ayrıldığına emin olunan hücrelere, tripsin enziminin zarar vermesini önlemek için kullanılan tripsin miktarının on katı (5 mL) besiyeri eklenmiştir. Böylece tripsin enzimi inhibe edilmiştir.

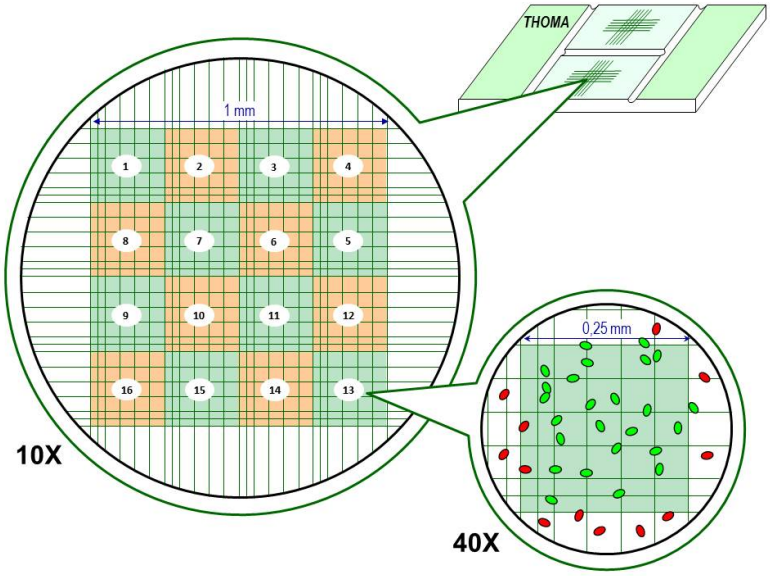
Süspansiyon haline getirilen hücreler, 15 mL'lik santrifüj tüplerine alınıp 21 °C, 800 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildikten süpernatant kısım aspire edilmiştir. Hücre peletine 1 mL besiyeri eklenip pelet nazikçe pipetlenerek çözüldüktünden sonra 75 cm^2'lik flasklara alınarak 37 °C, %5 karbondioksit içeren inkübatöre bırakılmıştır. Bu şekilde, hücrelerin istenen sayıda üretimleri gerçekleştirilmiştir.

2.1.2.Hücre Stoklarının Hazırlanması

Mikroskop ile konfluent hale geldiği tespit edilen hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stoklanmıştır. Bu amaçla öncelikle flask içindeki besiyeri aspire edilip hücre yüzeyi 1X 2 mL PBS ile nazikçe yıkanmıştır. Sonrasında hücreleri tutundukları yüzeyden kaldırmak için %0,05'lik Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılmıştır. Flasklar, 37 °C, %5 karbondioksit içeren inkübatörde 5 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında tripsin enzimini inhibe etmek için, kullanılan tripsin miktarının on katı besiyeri ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu 15 mL'lik santrifüj tüplerinde, 21 °C, 800 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreleri dondururken kullanılan medya 5 mL dimetil sülfoksit (DMSO, Neofroxx 1264), 5 mL FBS (Pan Biotech, P30-1904), 40 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Pan Biotech P04-03590) şeklinde hazırlanmıştır. Hücre pelletleri bu medyanın içerisinde dikkatlice çözülmüştür ve 1,5 mL medya ile herbir tüpte 1 milyon hücre olacak şekilde dağıtılmıştır. Ardından -80 °C'de saklanmıştır.

2.1.3.Hücre Sayımı

Hücreler sayılırken Thoma Lamı kullanılmıştır. (Şekil 3.) Hücreler, tripsin uygulanarak yüzeyden kaldırıldıktan sonra hücre süspansiyonundan 10 mikrolitre (µL) alınarak üzerine %0,5 olacak oranda tripan mavisi (Neofroxx, 1475) eklenerek pipetaj yapılmıştır. Tripan mavisiyle karışan hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak Thoma lamına konulmuş ve mikroskop altında lam üzerindeki beş alana düşen hücreler sayılmıştır. Bulunan sayı, dilüsyon katsayısı ile çarpılarak 1 mL medya içindeki hücre sayısı hesaplanmıştır.



Şekil 5. Thoma Lamı

$$\text{Konsantrasyon (hücre/mL)} = \frac{\text{Hücre sayısı x } 10.000}{\text{Sayılan alan x Dilüsyon katsayısı}}$$

Dilüsyon katsayısı : 1:10 sulandırma için, 0,1

1:100 sulandırma için, 0,01

2.2. TOTAL RNA İZOLASYONU

Total RNA izolasyonu yapılırken, ticari bir RNA izolasyon kiti kullanılmıştır (Omega Biotek, R6834). 1 x 10^6 hücreden izolasyon gerçekleştirilmiştir. İzolasyon yapılırken kit protokolüne uygun olarak trizol içerikli TRK solüsyonuna, çeker ocak içerisinde 1 mL/20 µL beta-merkaptoetanol eklenmiştir. 1 mL medya içerisindeki hücre süspansiyonuna 350 µL TRK solüsyonu eklenmiş ve 21G ölçülü 5 mL'lik steril şırıngalı enjektör ile 10 kez mekanik olarak homojenizasyon yapılmıştır.

Hücre lizatına 500 µL %70'lik etanol eklenip vorteklendikten sonra 700 µL'si kit bileşenlerinden spin kolonlu koleksiyon tüpüne alınmıştır ve +4 °C, 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpüne inen sıvı uzaklaştırılıp santrifüj tekrar edilmiştir.

Kit bileşenlerinden RNA Wash Buffer I'den 500 µL kolonlu tüpe eklenip +4 °C, 10.000 g'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Tüpe inen sıvı boşaltıldıktan sonra aynı koşullardaki santrifüj, %99'luk etanol ile dilüe edilmiş RNA Wash Buffer II'den 500 µL eklenerek tekrarlanmıştır. Bu işlem bir kez daha yapılmıştır. Ardından ekleme yapılmadan santrifüj tekrarlanıp, tüpe inen sıvı uzaklaştırılmıştır.

Kolonlu tüp, koleksiyon tüpten ayrılıp kitte mevcut olan temiz bir koleksiyon tüpüne oturtularak herhangi bir ekleme yapılmaksızın +4 °C, 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

Kolonlu tüp, boş 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak 60 µL kitte mevcut olan nükleazdan arındırılmış steril distile su eklenip +4 °C, 10.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece RNA, su ile çözünüp kolondan ayrılarak serbest kalacaktır. Santrifüj sonunda tüpün içerisindeki sıvıda suda çözünmüş halde elde edilmiştir. Elde edilen bu RNA, konsantrasyonu ve optik dansitesi (OD) ölçüldükten sonra deney zamanına kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

RNA konsantrasyon ve saflık oranını ölçmek için, "SPECTROstar Nano Absorbance Plate Reader" cihazı ve "LVis Plate" fonksiyonu kullanılmıştır. LVis Plate'teki örnek ölçüm noktacıklarına 2 µL RNA koyulmuştur. RNA örneklerinin ölçüm değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. RNA örneklerinin OD ve konsantrasyon değerleri

Örnek	**OD Ölçümü**	**Konsantrasyon (ng/mL)**
HCT116	1,89	91,88
BEAS-2B	2,05	2,6
Blank: Su		

2.3. KOMPLEMENTER (TAMAMLAYICI) DNA (CDNA) SENTEZİ

Komplementer DNA sentezi için QuantiTect Reverse Transcription Kiti kullanılmıştır (Qiagen).

Kit protokolü izlenerek her bir örnekten alınan 10 µL total RNA, primerlerin RNA iplikleri üzerinde uygun yerlere bağlanması için 65 °C sıcaklıkta, 5 dakika inkübe edilerek işleme başlanmıştır. Hemen ardından, spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 5 dakika boyunca buzda bekletilmiştir.

5 µL 5X konsantrasyondaki reaksiyon tamponu, 2 µL deoksinükleozit trifosfat (dNTP) çözeltisi, 5,25 µL randomize primerler, 0,5 M RNaz inhibitörü, 1,25 M da dikloro difenil trikloroethan (DTT), 1 M reverse transkriptaz enzimi ve son olarak 10 µL RNA örnekleri eklenerek reaksiyon tüpü 25 °C'de 10 dakika, 50 °C'de 60 dakika ve son olarak 85 °C'de 5 dakika olmak üzere 75 dakikalık reaksiyona bırakılmış, reaksiyon sonunda ise tüpler 4 °C'de sabit tutulmuştur. cDNA sentezi bileşenleri Tablo 2'de, sentez aşamaları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 2. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	**Miktar**	**Final Konsantrasyonu**
5X Reaksiyon tamponu	5 µL	1X
dNTP	2 µL	10 mM
Random primerler	5,25 µL	100 µM
RNaz inhibitörü	1 µL	0,5 mM
DTT	0,25 µL	1,25 mM
RT (200 U/µL)	1,5 µL	1 M
RNA	10 µL	3 M
Toplam	25 µL	

Tablo 3. cDNA sentez reaksiyonu aşamaları

Döngü Aşamaları	
Bağlanma	65 °C, 5 dakika; 4 °C, 5 dakika
Polimerizasyon	25 °C, 10 dakika; 50 °C, 60 dakika
Enzim deaktivasyonu	85 °C, 5 dakika

2.4. KANTİTATİF PCR (QPCR)

Gen ifadelerinin eş zamanlı olarak analiz edilmesi amacıyla yapılan qPCR'da kullanılan primer dizileri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Primer dizileri

Gen	**Primer dizisi**
TMPRSS4	Forward: CCTGGCGAGTATCATCATTGTG Reverse: GATCGGTCCTTGGAGAGGCG
MAGEA3	Forward: AAGCCGGCCCAGGCTCGGT Reverse: GCTGGGCAATGGAGACCCAC
CALR	Forward: AAGTTCTACGGTGACGAGGAG Reverse: GTCGATGTTCTGCTCATGTTTC
ACTB	Forward: TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT Reverse: AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA

qPCR, Corbett Research Real-Time PCR Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, forward ve reverse primerlerin her birinden 1,5 µL, 4 µL cDNA, 4 µL nükleazdan arındırılmış su ve 10 µL 2X SYBR Green (HibriGen, mg-sybr-01-400) olarak tüpte hazırlanmıştır. Reaksiyon içeriği Tablo 5'te, aşamaları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 5. qPCR reaksiyon içeriği

Bileşen	**Miktar**	**Final Konsantrasyonu**
Forward Primer	1,5 µL	0,3 µM
Reverse Primer	1,5 µL	0,3 µM
cDNA	4 µL	<500 ng
Su	4 µL	
2X SYBR Green	10 µL	1 X
Toplam	21 µL	

Tablo 6. qPCR döngü aşamaları

qPCR aşamaları		
Denatürasyon		94 °C, 4 dakika
Çoğalma	1. Denatürasyon	95 °C, 30 saniye
	2. Bağlanma	58 °C'de 30 saniye
	3. Uzama	72 °C'de 30 saniye
Son Uzama		72 °C'de 10 dakika
		X 36 DÖNGÜ

2.5.DELTA CT (ΔCT) VE DELTA DELTA CT (ΔΔCT) DEĞERLERİNİN HESAPLANMASI

Gen ifadelerinin analizi, üç bağımsız tekrarlı deneyin sonucunda elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alınarak yapılmıştır. Bu çalışmada *β-aktin* geni referans gen olarak kulanılmıştır. Öncelikle araştırılmak istenen ilgili genin Ct değeri, referans genin Ct değerinden çıkartılarak normalize edilmiş ve delta Ct (ΔCt) değeri hesaplanmıştır. Sonrasında kontrol grubunun ΔCt değerleri, deney grubunun ΔCt değerlerinden çıkartılarak ΔΔCt değeri bulunmuştur. Gen ifadelerinin kat cinsinden artan ya da azalan değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak hesaplanmıştır. Bu anlatım aşağıda formülize edilmiştir.

$$\Delta Ct = Ct_{(kontrol)} - Ct_{(referans)}$$

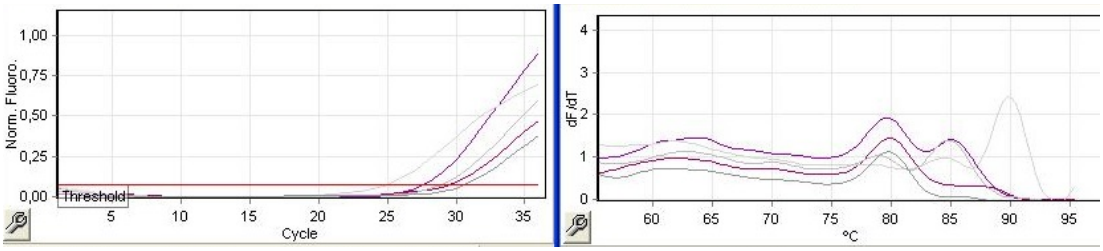
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(hedef)} - \Delta Ct_{(kontrol)}$$

$$\text{Kat değişimi} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

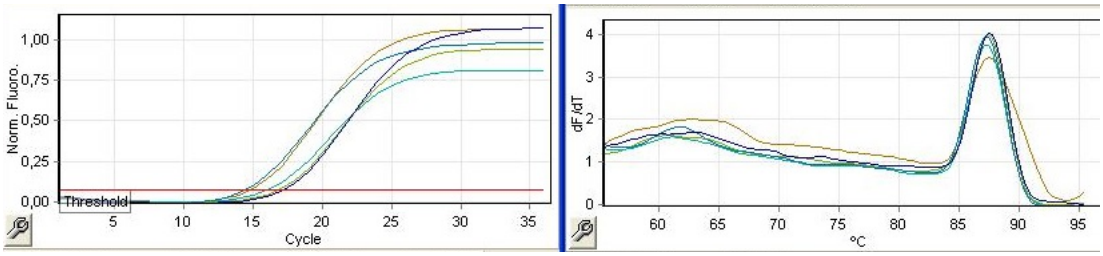
3.BULGULAR

3.1. KANTİTATİF PCR SONUÇLARI

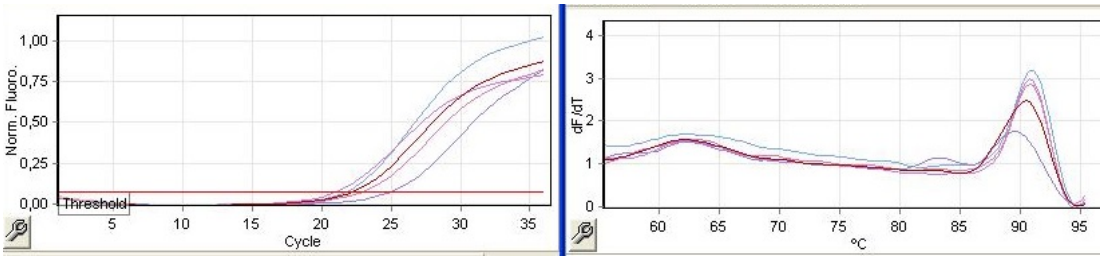
Yapılan kantitatif PCR analizinde; *TMPRSS4, CALR* ve *MAGEA3* genlerinin anlatım düzeyleri ACTB genine göre normalize edilerek araştırılmıştır. İlgili genlerin Ct ve Tm değerlerinine ait grafikler Şekil 6,7 ve 8'de verilmiştir.



Şekil 6. *TMPRSS4* geninin Tm ve Ct grafiği



Şekil 7. *CALR* geninin Tm ve Ct grafiği



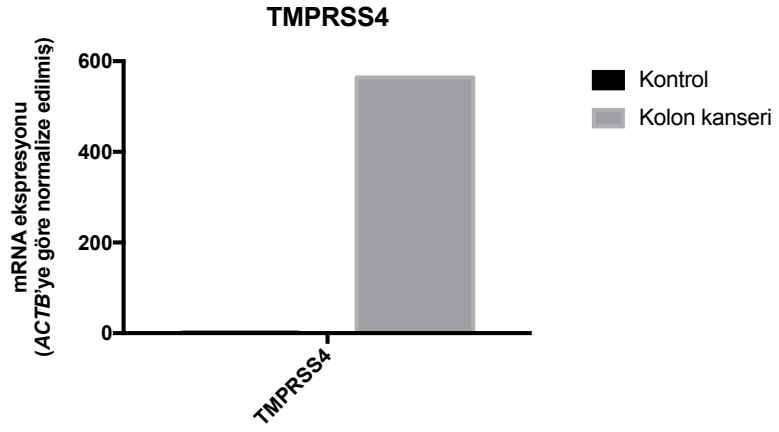
Şekil 8. *MAGEA3* geninin Tm ve Ct grafiği

TMPRSS4, CALR ve *MAGEA3* genlerinin ifade düzeylerinin kat cinsinden artış oranları hesaplanırken kullanılan değerler tablo halinde Tablo 7'de verilmiştir. HCT116 hücre hattı, deney grubu olarak kullanılırken BEAS-2B hücre hattı, kontrol olarak kullanılmıştır. Herbir deney üç bağımsız tekrarlı olarak yapılmıştır ve gen ifadeleri analiz edilirken bu üç deneyin ortalaması kullanılmıştır. Gen anlatımlarının normalize edilmesi için *ACTB* geni referans gen olarak alınmıştır.

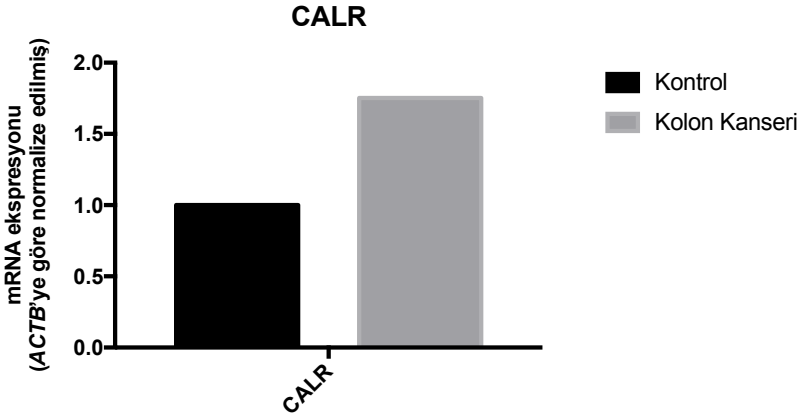
Tablo 7. Ortalama Ct değerleriyle kat cinsinden ifade değişimi hesaplama sonuçları

	Ortalama Ct Değeri (BEAS-2B)	**Ortalama Ct Değeri (HCT116)**	**ΔCt (BEAS-2B)**	**ΔCt (HCT116)**	**ΔΔCt**	**İfade Değişimi (Kat) $2^{-\Delta\Delta Ct}$**
TMPRSS4	29,35	24,77	2,27	-6,87	-9,14	564,1754
CALR	16,75	15,96	-14,87	-15,68	-0,81	1,753211
MAGEA3	24,92	20,96	-6,7	-10,68	-3,98	15,77972
ACTB	31,62	31,64				

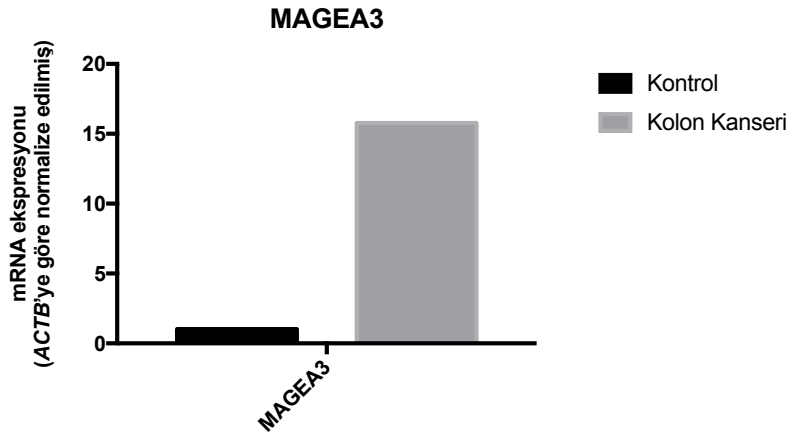
Tablo 7'de hesaplanan değerler Şekil 9,10 ve 11'de grafik olarak verilmiştir. Yapılan qPCR analizine göre HCT116 hücre hattında BEAS-2B kontrol hücre hattına göre, ΔΔCt hesaplaması ile *TMPRSS4* geninin ifadesinde 564,17 kat, *CALR* geninin ifadesinde 1,75 kat ve *MAGEA3* geninin anlatımında 15,77 kat artış saptanmıştır.



Şekil 9. HCT116 hücre hattında *TMPRSS4* geninin anlatım düzeyinin BEAS-2B kontrol hücre hattına göre değişimi



Şekil 10. HCT116 hücre hattında *CALR* geninin anlatım düzeyinin BEAS-2B kontrol hücre hattına göre değişimi



Şekil 11. HCT116 hücre hattında MAGEA3 geninin anlatım düzeyinin BEAS-2B kontrol hücre hattına göre değişimi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

TMPRSS4, kanserle bağlantısından dolayı ve klinikte kullanılma potansiyeli olduğu düşünüldüğü için son zamanlardaki kanser araştırmalarında dikkat çekici bir hedef haline gelmiştir. Yapılan önceki çalışmalara göre *TMPRSS4*'ün genel olarak embriyo gelişimi ve kanser ile ilişkisi olduğu bilinmektedir.. Bu genin aşırı düzeyde ifadesi pankreas, yumurtalık, tiroit, kolorektal, akciğer, meme, serviks ve karaciğer kanserlerinde tespit edilmiştir (Wallrapp ve ark.,2000; Jung ve ark., 2008; Ohler ve Becker-Pauly, 2011; Larzabal ve ark.,2011; Li ve ark., 2011; Takahashi ve ark., 2013). Genin kanserde ekspresyonunun artması gen amplifikasyonu, kromozomal düzenlemeler, transkripsiyonel bozukluklar gibi mekanizmaların hangisinden kaynaklandığı henüz bilinmemektedir. Sağlıklı karciğerde *TMPRSS4* promotörü metillenmiş halde bulunurken, hepatosellüler karsinomada hipometile durumdu olduğu gösterilmiştir (Stefanska ve ark., 2011). Bu bulgu, genin kanserde artan anlatımından epigenetik düzenlemelerin sorumlu olduğunu düşündürmektedir ancak ileri deneylerle validasyona ihtiyaç duyulmaktadır.

Jung ve ark, 2008 yılında yaptıkları çalışmada *TMPRSS4* geninin aşırı ifadesinin kolon kanserinde migrasyonu ve invazyonu artırdığı saptanmıştır.

Ayrıca *TMPRSS4*, epitelyalden mezenkimale dönüşüm (epithelial mesenchymal transition, EMT) süreci için de gereklidir (Jung ve ark., 2008; Larzabal ve ark., 2011). Kolon kanseri hücrelerindeki aşırı anlatımı FAK, ERK1/2, Akt, Src ve Rac1 proteinlerinin dahil olduğu sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açmaktadır. FAK ve Rac1 sinyal yolağının, TMPRSS4 tarafından yönlendirilen invazyon, hücre morfolojisindeki değişimler ve EMT için gerekli olduğu bildirilmiştir. Dahası, TMPRSS4'ün aşırı anlatımının olduğu hücrelerde spesifik ajanlarla P13K ya da Src inhibisyonu invazyonu düşürmüş ve E-cadherin ifadesinde düzenleme olmaksızın aktin yeniden-organizasyonuna sebep olmuştur (Kim ve ark., 2010).

Bu çalışmada, kontrol grubu olarak kullanılan sağlıklı BEAS-2B hücrelerinden ve kolorektal karsinoma hücre hattı olan HCT116'dan total RNA izolasyonu yapılmış ve *TMPRSS4* geninin anlatımı transkripsiyonel düzeyde qPCR ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *TMPRSS4* ifadesi HCT116 hücre hattında BEAS-2B hücre

hattına göre 564,17 kat fazla bulunmuştur. Bu sonuç literatür ile paralellik göstermektedir.

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, *TMPRSS4'* ün karsinogenezdeki öncü rolü dikkat çekmektedir ve kanser tedavisine yaklaşımda yeni bir potansiyel hedef olarak gösterilmektedir.

Bu araştırmada HCT116 kolorektal karsinoma hücre hattında BEAS-2B sağlıklı hücre hattına göre ifadesi yüksek bulunan diğer gen ise *CALR* genidir. Yapılan qPCR sonucuna göre *CALR* geninin anlatım düzeyi 1,75 kat artmıştır.

2017 yılında yayınlanan bir çalışmada, apoptoz indükleyici özelliği ile bilinen epibrasinolit (EBR) ile muamele edilmiş kolon kanseri hücrelerinin ER stresine maruz kaldıklarını ve bunun sebebinin *CALR* geninin anlatımı olduğunu bildirmişlerdir. EBR, *CALR* geninin kolon kanseri hücrelerinde anlatımını bozarak kaspaz-bağımlı apoptozun gerçekleşmesini sağlamıştır. *CALR* geninin sessizleştirmesi, EBR ile indüklenmiş apoptozu engellemiştir (Obakan-Yerlikaya ve ark., 2017).

Ayrıca CALR proteini yara iyileşmesi, immün cevap, hücre büyümesi, proliferasyon, migrasyon ve hücre adezyonu ile de ilişkilendirilmiştir (Klampfl ve ark., 2013). CALR proteinin immün yanıtta rol olmasını sağlayan anti-enflamatuar ve anti-kanser yanıt oluşturmasını sağlayan özelliklerinin olduğu da düşünülmektedir. Dahası, çevresindeki kanserleşmekte olan hücreler için de ekstrasellüler bir şaperon olarak işlev yaptığı bildirilmiştir (Clarke ve ark., 2007). Anti-enflamatuar yanıtta NF-κB yolağı vasıtasıyla sitokin üretimini teşvik ettiği rapor edilmiştir. CALR proteini, şaperon görevini de NF-κB sinyal yolağı aracılığıyla yapmaktadır (Bajor ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında araştırılan ve HCT116 hücre hattında kontrol grubuna göre anlatımının 15,77 kat arttığı tespit edilen gen *MAGEA3* genidir. Literatürde birçok kanser türünde anlatımının arttığı bildirilmiştir.

2018 yılında yapılan bir araştırmaya göre miR-1273g isimli mikro RNA *MAGEA3/6*'nın anlatımını durdurup AMPK sinyal yolağını aktive ederek kolon kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe etmiştir (Wu ve ark., 2018).

82 kolon kanseri hastası örneği ile yapılan çalışmada, *MAGEA3* anlatım düzeyinin testisteki anlatımına kıyasla oldukça yüksek olduğu saptanmıştır (Santha Kumara et al., 2012).

NF-κB sinyal yolağının immün yanıtla ve hayatta kalım ile doğrudan ilişkili olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Bu yolaktaki herhangi bir işlev bozukluğu

hücrenin kaderini direkt olarak etkilemektedir. *MAGEA3* geni ise bu yolağın devamlı olarak açık kalmasını sağlayarak hücreye ölümsüzlük kazandırır.

Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, kolon kanseri hücre hattında anlatımı artan *TMRPSS4, CALR,* ve *MAGEA3* genlerinin kolon kanseri karsinogeneziyle direkt ya da dolaylı olarak ilişkili olabileceği sonucuna varıldı. Kanser tedavisi yaklaşımı olarak bu genlerin işlev analizleri ile birlikte monoklonal antikor tasarlanmasında, hedefli gen terapileri geliştirilmesinde bu genler hedef olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

Antalis, T.M., Buzza, M.S., Hodge K.M., Hooper, J.D., Netzel-Arnett, S. (2010). The cutting edge: membrane-anchored serine protease activities in the pericellular microenvironment. Biochem J 428(3): 325–346.

ATCC. BEAS-2B cell line: CRL-9609 Ürün açıklama "*https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-9609.aspx?geo_country=tr*" 23 Mayıs 2019 tarihinde alınmıştır.

ATCC. HCT116 cell line: CCL-247 Ürün açıklama **"***https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-247.aspx?geo_country=tr#generalinformation*" 23 Mayıs 2019 tarihinde alınmıştır.

Bardelli, A., Parsons, D. W., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Saha, S., ve ark. (2003). Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science*, *300*(5621), 949. https://doi.org/10.1126/science.1082596

Bettington, M., Walker, N., Clouston, A., Brown, I., Leggett, B., & Whitehall, V. (2013). The serrated pathway to colorectal carcinoma: Current concepts and challenges. *Histopathology*, *62*(3), 367–386. https://doi.org/10.1111/his.12055

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A.(2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S. R., ve ark. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, *155*(2), 462. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034

Cappell, M. S. (2008). Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, *37*(1), 1–24. https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.12.002

Chittenden, T. W., Howe, E. A., Culhane, A. C., Sultana, R., Taylor, J. M., Holmes, C., & Quackenbush, J. (2008). Functional classification analysis of somatically mutated genes in human breast and colorectal cancers. *Genomics*, *91*(6), 508–511. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.03.002

Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F., & Ricciardiello, L. (2013). Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(8), 16365–16385. https://doi.org/10.3390/ijms140816365

Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., ve ark. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, *13*(2), 397–406. https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600

Grady, W. M., & Carethers, J. M. (2008). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*, *135*(4), 1079–1099. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.076

Grady, W. M., & Pritchard, C. C. (2014). Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicologic Pathology*, *42*(1), 124–139. https://doi.org/10.1177/0192623313505155

Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E. ve

ark.,(2004). *new england journal*. 2335–2342.

Higuchi, T., & Jass, J. R. (2004). My approach to serrated polyps of the colorectum. *Journal of Clinical Pathology*, *57*(7), 682–686. https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015230

Jass, J. R. (2004). SPECIAL REPORTS AND REVIEWS Hyperplastic Polyps and Colorectal Cancer: Is There a Link? *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *2*, 1–8. https://doi.org/10.1053/S1542-3565(03)00284-2

Jones, S., Chen, W. D., Parmigiani, G., Diehl, F., Beerenwinkel, N., Antal, T., ve ark. (2008). Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 105, pp. 4283–4288. https://doi.org/10.1073/pnas.0712345105

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Min, H. J., Lee, M. K., Lee, J. W., & Kim, S. (2014). TMPRSS4 induces cancer cell invasion through pro-uPA processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *446*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.013

Obakan-Yerlikaya, P., Arisan, E. D., Coker-Gurkan, A., Adacan, K., Ozbey, U., Somuncu, B., ve ark. (2017). Calreticulin is a fine tuning molecule in epibrassinolide-induced apoptosis through activating endoplasmic reticulum stress in colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, *56*(6), 1603–1619. https://doi.org/10.1002/mc.22616

Papamichael, D., Audisio, R. A., Glimelius, B., de Gramont, A., Glynne-Jones, R., Haller, D., ve ark. (2015). Treatment of colorectal cancer in older patients: International Society of Geriatric Oncology (SIOG) consensus recommendations 2013. *Annals of Oncology*, *26*(3), 463–476. https://doi.org/10.1093/annonc/mdu253

Santha Kumara, H. M. C., Grieco, M. J., Caballero, O. L., Su, T., Ahmed, A.,

Ritter, E., ve ark. (2012). MAGE-A3 is highly expressed in a subset of colorectal cancer patients. *Cancer Immunity*, *12*(2), 1–9.

Winawer, S. J., Zauber, A. G., Fletcher, R. H., Stillman, J. S., O'Brien, M. J., Levin, B., ve ark. (2006). Guidelines for Colonoscopy Surveillance After Polypectomy: A Consensus Update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *Gastroenterology*, *130*(6), 1872–1885. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.03.012

Wu, F., Liu, F., Dong, L., Yang, H., He, X., Li, L., ve ark. (2018). miR-1273g silences MAGEA3/6 to inhibit human colorectal cancer cell growth via activation of AMPK signaling. *Cancer Letters*, *435*(April), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.07.031

NCBI. CALR calreticulin. [Homo sapiens (human)] "*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/811"* Gene ID: 811, Son güncelleme tarihi: 11 Eylül 2019

NCBI. MAGE family member A3. [Homo sapiens (human)] "*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4102*" Gene ID: 4102, Son güncelleme tarihi: 11 Eylül 2019.

NCBI. TMPRSS4 transmembrane serine protease 4 [*Homo sapiens* (human)] "*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56649#gene-expression*" Gene ID: 56649, Son güncelleme tarihi 11 Eylül 2019.

ÖZGEÇMİŞ

Hüma Tuğçe Sezgin 16 Ekim 1993 yılında İstanbul'da doğdu. 2016 yılında İstanbul Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünden mezun oldu. Lisans süresince, bir çok alanda staj yaptı. 2016 yılında University of British Columbia'da "Visiting Researcher" olarak 6 ay boyunca immünoloji üzerine çalıştı. Global bir klinik araştırma firmasında "Merkez Başlatma Sorumlusu" olarak çalışmaktadır.