



KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE LET-7B-5P'NİN APOPTOTİK GENLER İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE ASSOCIATION OF LET-7B-5P WITH APOPTOTIC GENES IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS

Esra BOZGEYİK 

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Tekirdağ, TÜRKİYE

Öz

Amaç: Akciğer kanseri dünya genelinde kansere bağlı gerçekleşen ölümlerde kadınlarda ve erkeklerde ilk sıralarda yer almaktadır. Erken tanı yöntemlerinde ki gelişmeler ve yeni hedeflenen ajanların sayısının artmasına rağmen akciğer kanseri halen erken teşhis edilememekte ve etkin bir şekilde tedavi edilememektedir. Akciğer kanserinin tanısı için doğru ve güvenilir belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, akciğer kanserinde let-7b-5p'nin rolü ve terapötik potansiyelini ortaya koyan çalışmaların oldukça yeterli olduğu gözükmektedir. Bu çalışmada A549 hücrelerinde let-7b-5p'nin ifade seviyesi miRNA mimik uygulaması ile artırılarak apoptoz ile ilişkili genler ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Let-7b-5p'nin hedefi olabilecek apoptoz ile ilişkili genler online veri tabanlarından biyoinformatik araçlarla belirlenmiştir. Let-7b-5p'nin ifade seviyesinin A549 hücrelerinde artırılması amacıyla, let-7b-5p mimiği hücrelere HiPerFect transfeksiyon ajanı ile transfekte edilmiştir. Daha sonra, elde edilen RNA'lardan let-7b-5p ve apoptoz ilişkili genlerin ifade seviyeleri qPCR yöntemi ile belirlenmiştir.

Bulgular: Akciğer kanseri hücrelerinde let-7b-5p'nin ifade seviyesinin artırılmasının ardından BCL2, RB1, XIAP, CASP9, TP53 ve PTEN genlerinin ifade seviyelerinin kontrol gruplarına kıyasla düştüğü bulunmuştur. Bunun aksine BAX geninin ifade seviyesinin arttığı ve CASP3 ve BCL2L1 genlerinin ifade seviyelerinde herhangi bir değişim olmadığı bulunmuştur. In silico analizler sonucunda TP53 geninin 3' UTR bölgesinde iki farklı pozisyonda let-7b-5p bağlanma alanı olduğu gösterilmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular let-7b-5p'nin apoptoz mekanizmasında yer alan genleri hedefleyebileceğini ve bu miRNA'nın akciğer kanserinin tanı ve/veya tedavisine yönelik önemli bir biyobelirteç olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, apoptoz, miRNA, let-7b, TP53

Abstract

Aim: Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths in men and women worldwide. Developments in early diagnostics and the number of new targeted agents have increased, lung cancer still cannot be diagnosed early and treated effectively. Therefore, accurate and reliable markers are needed for the diagnosis of lung cancer. Furthermore, studies showing the role and therapeutic potential of let-7b-5p in lung cancer seem to be quite limited. In this study, the expression level of let-7b-5p was increased by miRNA mimic applications in A549 cells to investigate the relationship between let-7b-5p and apoptosis-related genes.

Materials and Methods: The genes involved in the apoptosis and predicted to target let-7b-5p were determined by bioinformatics tools from online databases. In order to increase the expression levels of let-7b-5p in A549 cells, let-7b-5p mimics were transfected into the cells with the HiPerFect transfection reagent. Then, expression levels of let-7b-5p and apoptosis related genes were determined by qPCR method.

Results: It was found that the expression levels of BCL2, RB1, XIAP, CASP9, TP53 and PTEN genes decreased after increasing expression levels of let-7b-5p as compared to control groups in lung cancer cells. In contrast, the expression level of the BAX gene increased and no changes were observed in the expression levels of CASP3 and BCL2L1 genes. As a result of the in silico analysis, the TP53 gene was shown to have let-7b-5p binding site at two different positions in the 3'UTR region.

Conclusion: In conclusion, our findings suggest that let-7b-5p can target genes involved in apoptosis and this miRNA might be an important biomarker for the diagnosis and/or treatment of lung cancer.

Keywords: Apoptosis, miRNA, let-7b, lung cancer, TP53

GİRİŞ

Akciğer kanseri, dünya çapında kanser ölümlerinin en önde gelen nedenlerindedir. GLOBOCAN 2018 verilerine göre; 2,09 milyon yeni akciğer kanseri vakası teşhisi konulduğu ve akciğer kanseri kaynaklı 1,76 milyon ölüm olduğu

tahmin edilmektedir¹. Histolojik olarak akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Diğer kanser türlerinde de olduğu gibi akciğer kanserinin gelişimi ve

Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Esra BOZGEYİK

Adres: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye

E-posta: gyk.esra@gmail.com

Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 08.05.2019

Date Accepted / Kabul Tarihi: 23.06.2019

ilerlemesi genetik ve çevresel birçok faktör tarafından etkilenen oldukça karmaşık bir süreçtir. Genetik faktörlerin yanı sıra çevresel risk faktörleri arasında sigara kullanımı, radyasyon, çevre kirliliğinden kaynaklı havadan solunan partiküller sıralanmaktadır².

Akciğer kanseri tanısı genellikle ileri evrede konulmaktadır. Bilgisayarlı tomografi (BT) ile erken tarama mortaliteyi azaltsa da, tümör invazyonu ve göç aracılı hastalık ilerlemesi standart tedaviye rağmen kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenini temsil etmektedir³. Son zamanlarda kat edilen gelişmelere rağmen, akciğer kanseri halen etkin bir şekilde tedavi edilememektedir. Bu nedenle, akciğer kanseri tanı ve tedavisi için daha doğru, etkin yöntemlerin geliştirilmesine acilen ihtiyaç vardır.

Mikro RNA'lar (miRNA), gen ifadesini negatif yönde düzenleyen küçük düzenleyici ve kodlama potansiyeli olmayan RNA molekülleridir. Boyutları 18-24 nükleotid arasında değişen bu RNA molekülleri genomda protein kodlayan genlerin intron veya ekzon bölgelerinden veya intergenik bölgelerden kodlanabilen RNA transkriptleridir. Bu küçük RNA molekülleri, gen ifadesini post-transkripsiyonel seviyede düzenleyerek çoğalma, büyüme, farklılaşma ve hatta hücre ölümü gibi kritik süreçlerin düzenlenmesine aracılık etmektedirler⁴.

İlk kodlanmayan RNA, lin-4, *Caenorhabditis elegans* solucanlarında 1993 yılında keşfedilmiştir, ancak miRNA'lar 2000'li yılların başlarında tanınmaya başlanmıştır ve bu süreçten sonra miRNA'lar ile ilişkili kapsamlı çalışmalar ciddi bir ivme kazanmıştır⁵. Yapılan araştırmalar miRNA'ların olgun miRNA haline gelebilmeleri için bir seri enzimatik işleminden geçtiği bir biyogenez mekanizması olduğunu açıklığa kavuşturmuştur. miRNA'ların miRNA genomik lokuslarından

transkripte edilip olgun hale gelmesi çok aşamalı bir süreçtir. RNA polimeraz II tarafından transkripte edilen 500-3000 nt uzunluğundaki primer miRNA transkriptleri (pri-miRNA) mRNA'lar gibi 5' 7-metil guanozin başlık ve 3' poli(A) kuyruğu içermektedirler. Henüz çekirdekte olan bu pri-miRNA'lar, RNaz III endonükleaz olan Drosha ve kofaktörü Pasha ile birlikte ilk kesilime uğrar ve ortalama 70 nt uzunluğundaki prekürsor miRNA'lar (pre-miRNA) elde edilir⁶. Pre-miRNA'lar Exportin-5 aracılığı ile çekirdekten sitoplazmaya taşınır ve burada ikinci bir kesilime uğrar⁷. Bu kesilim Dicer enzimi ile katalizlenir ve sonucunda (yaklaşık 18-22 nu uzunluğunda) çift zincirli miRNA:miRNA dubleksi oluşur. Dicer enzimi olgun miRNA'yı oluşturabilmek için RISC (RNA-induced silencing complex) oluşumunu tetikler ve çift zincir miRNA:miRNA dubleksinden yalnızca birisi bu komplekse dahil edilir. RISC'deki tek zincirli miRNA, tamamlayıcı mRNA'yı tanıyan bir şablon olarak işlev görür ve daha sonra, miRNA'nın ve hedef mRNA'nın tamamlayıcılığına bağlı olarak mRNA ifadesini ya doğrudan mRNA parçalanmasıyla da transkripsiyonun baskılanması yolu ile negatif yönde düzenler⁸.

Yaygın bir şekilde ifade edilen let-7 ailesi memelilerde ilk tanımlanan miRNA'lardandır⁹. Let-7 ailesinin let-7-a1, a2, a3, b, c, d, e, f1, f2, g, i ve miR-98 olmak üzere 12 üyesi bulunmaktadır ve bunlar farklı genomik lokuslarda haritalanmıştır¹⁰. Yapılan çalışmalar let-7'nin embriyonik gelişimde yer aldığını, kanser hücrelerinin ve kanser kök hücrelerinin çoğalmasına ve istilasına katıldığını göstermektedir. Let-7 aile üyelerinin ifade seviyeleri birçok kanser çeşidinde düşük olarak bulunmuştur¹¹. Let-7 aile üyeleri çeşitli kötü huylu insan tümörlerinde onkogenlerin ve mitojenik yolağın temel düzenleyicilerini baskılayarak tümör baskılayıcı olarak görev yaparlar¹². Buna ek olarak let-7b'nin ifadesindeki değişimin akciğer, meme ve

hepatoselüler kanserlerde tümör büyümesini etkili bir şekilde baskıladığı gösterilmiştir^{2, 12-14}.

Diğer kanser türlerinde let-7b-5p hakkında önemli veriler elde edilmiş olsa da, akciğer kanserinde let-7b-5p'nin rolü ve terapötik potansiyelini ortaya koyan çalışmaların oldukça yetersiz olduğu gözükmemektedir. Bu nedenle, apoptoz ile ilişkili genler ve let-7b-5p arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi ve bu miRNA'nın apoptozdaki olası rollerinin ortaya konulması son derece önem arz etmektedir. Yaptığımız bu çalışmada, let-7b-5pifade seviyesi mimik transfeksiyonu ile arttırılmış ve apoptoz ilişkili genlerin üzerine olan etkileri belirlenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada A549 akciğer kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Let-7b-5p mimik transfeksiyonları ve kontrol grupları bu hücrelerde oluşturulmuştur. Kullanılan akciğer kanseri hücreleri ATCC (The American Type Culture Collection) firmasından ticari olarak temin edilmiş olup etik kurul izni gerektirmemektedir. Çalışmanın deneysel aşamaları Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Tıbbi Genetik laboratuvarlarında yapılmıştır. Bu çalışma için herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

Let-7b-5p'nin hedeflediği tahmin edilen apoptoz ile ilişkili genlerin biyoinformatik araçlarla belirlenmesi

Online miRNA-mRNA etkileşimlerini gösteren veri tabanlarında let-7b-5p miRNA molekülünün hedefi olabilecek apoptoz ile ilişkili genler belirlenmiştir. Let-7b-5p'nin hedeflerinin belirlenmesinde kullanılan veri tabanları şu şekildedir: DIANA Tools¹⁵, miRo¹⁶, miRDB¹⁷ ve mirTarBase¹⁸. Let-7b-5p ile ilişkisi olası olan genler sırasıyla XIAP, RB1, BAX, BCL2, BCL2L1, CASP3, CASP9, TP53 ve PTEN olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Farklı veri tabanlarında let-7b-5p'nin hedefi olabilecek apoptoz ilişkili genler

Gen sembolü	Gen adı	DIANA Tools	miRo	miRDB	mirTarBase
XIAP	X'e bağlı apoptoz baskılayıcısı (X-linked inhibitor of apoptosis)	X	✓	X	✓
RB1	Retinoblastoma transkripsiyonel baskılayıcısı1 (RB transcriptional corepressor 1)	✓	X	✓	✓
BAX	BCL2 ile ilişkili X, apoptoz düzenleyicisi (BCL2 associated X, apoptosis regulator)	✓	X	X	X
BCL2	B hücreli lösemi/lenfoma 2 (B cell leukemia/lymphoma 2)	✓	✓	X	✓
BCL2L1	BCL2 benzeri 1 (BCL2 like 1)	✓	X	✓	✓
CASP3	Kaspaz 3 (Caspase 3)	✓	✓	✓	✓
CASP9	Kaspaz 9 (Caspase 9)	X	✓	X	X
TP53	Tümör Protein 53 (Tumor protein 53)	✓	✓	✓	✓
PTEN	Fosfataz ve tensin homoloğu (Phosphatase and tensin homolog)	X	✓	X	X

Akciğer kanseri hücre hatlarının kültür edilmesi

Akciğer kanseri hücre hattı, A549, karbondioksit inkübatöründe 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ve %95 nemli ortamda kültür edilmiştir. Hücreleri çoğaltmak için %10 FBS (fetal sığır serum, Sigma-Aldrich, Almanya) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. DMEM içerisine %5 oranında 50 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik eklenmiştir. Besiyeri içerisinde uygun koşullarda çoğaltılan hücreler uygun sayıya eriştiğinde HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich, Almanya) solüsyonu ile yıkama işlemlerine tabi tutulmuştur ve Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, Almanya) yardımı ile hücreler flasklardan toplanmıştır. Tripsin-EDTA'nın etkisini nötrlemek için FBS içeren besiyeri eklenmiştir ve hücreler 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Besi yeri uzaklaştırılan hücreler mimik deneyleri, toplam RNA izolasyonu veya miRNA izolasyonu için kullanıma hazır hale getirilmiştir.

A549 hücrelerine let-7b-5p mimik transfeksiyonu

Let-7b-5p miRNA molekülünün ifade seviyesi arttırmak için sentetik olarak sentezlenmiş let-7b-5p mimik (Ürün No: 219600; Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Uygun koşullarda çoğaltılan hücreler 12 kuyucuklu kültür kaplarına 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekilmiştir. Mimik transfeksiyonu için, 4 µl HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Almanya), 0,6 µl 5mol let-7b-5p mimik ve 100 µl DMEM içerecek şekilde karışım hazırlanmıştır ve 30 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda karışım damla damla kuyucuklara verilmiştir ve ortalama dört saat sonra toplam hacimde %10 olacak şekilde FBS eklenmiştir.

Hücrelerden toplam RNA ve miRNA izolasyonu

Pellet halinde çöktürülen akciğer kanseri hücrelerinden toplam RNA izolasyonu yapmak için Qiagen RNeasy RNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. İşlemler üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, toplanan hücreleri parçalamak için 700 µl QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır ve çözünen hücreler steril ependorf tüplere alınarak oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Kitin prosedürüne uygun olarak gerekli solüsyonlar eklenerek yıkama işlemleri yapılmıştır. Son olarak steril tüplere RNA'ları aktarmak için 30 µl RNaz içermeyen su kullanılmıştır. RNA'ların konsantrasyon ve kirliliklerini belirlemek için NanoDrop® ND-1000 spektrofotometrede 260-280 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Bir sonraki aşamalar için konsantrasyonu ve kirliliği uygun olan örnekler tercih edilmiştir.

miRNA izolasyonları da toplam RNA izolasyonlarında izlenen yöntem ile yapılmıştır.

miRNA elde etmek için miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. İzole edilen miRNA'ların konsantrasyon ve kirliliklerini belirlemek için NanoDrop® ND-1000 spektrofotometre kullanılmıştır.

Tek sarmal cDNA sentezi

miRNA örneklerinin komplementer DNA'ya çevrilmesi için miScript® II RT Kit miRNA cDNA sentez kiti (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Tek sarmal cDNA sentezlenmesinde, her bir örnek için toplam hacim 20 µl olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Karışımın içeriğinde 4 µl 5x miScript HiFlex Buffer, 2 µl 10x miScript Nucleics Mix, 2 µl miScript Reverse Transcriptase Mix (1x), son hacimde 100 ng/ µl RNA ve 20 µl'ye tamamlamak için steril çift distile su bulunmaktadır. Hazırlanan bu karışım PCR cihazında 37 °C'de 60 dk ve enzim inaktivasyonu için 95 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir.

RNA örneklerinden cDNA sentezi RT² First Strand Kit (Qiagen, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Kitin prosedürüne uygun olarak hazırlanan karışıma RNA örnekleri eklenerek PCR cihazında (42 °C'de 15 dk ve enzim inaktivasyonu için 95 °C'de 5 dk) reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tek sarmal cDNA örnekleri qPCR deneylerine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Real-Time PCR (qPCR) deneyleri

Real-Time PCR (qPCR) deneyleri ile let-7b-5p mimik ile muamele edilmiş hücrelerdeki apoptoz ile ilişkili genlerin ifade seviyesi belirlenmiştir. A549 akciğer kanseri hücrelerinde negatif kontrol (muamele edilmemiş), mimik kontrol (transfeksiyon ajanı ile birlikte scramble eklenen örnek) ve let-7b-5p mimik transfeksiyonu sonrasında üç örnekte gen ifadesi deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler bağımsız olarak üç kez tekrar edilmiştir.

Gruplar arasındaki let-7b-5p'nin ifade seviyesinin belirlenebilmesi için bu miRNA'ya özgül primer kullanılmıştır (let-7b-5p hedef dizilimi; 5'-UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU-3') ve normalizasyon için RNA-U6 primeri kullanılmıştır. İfade seviyeleri miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. Let-7b-5p'nin ifade seviyesinin belirlenmesi için PCR karışımı hazırlanmıştır ve karışımın içeriği şu şekildedir: 6,25 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix; 1,25 µl 10x miScript Universal Primer; 1,25 µl 10x miScript Primer Assay; 2,75 µl distile su ve 1 µl cDNA. Hazırlanan PCR karışımları Rotor-Gene Q cihazında 95 °C'de 15 dk, 95°C'de 15 sn 55 °C'de 30 sn ve 70 °C'de 30 sn (40 döngü) olacak şekilde termal şartlara tabi tutulmuştur.

Apoptoz ile ilişkili genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesi için QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Genlerin ifade seviyelerinin belirleyebilmek için özgül primerler tasarlanmıştır. Primer tasarımı NCBI veritabanının "Primer Blast" arayüzü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tasarım yapılırken, primer boyutu, ürün boyutu, bağlanma sıcaklığı, GC oranı gibi parametreler göz önünde bulundurulmuştur ve primerlerin özellikleri Tablo 2'de verilmiştir. Ayrıca, referans olarak GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase (GAPDH) geni kullanılmıştır.

Gen ifadesi deneyleri için karışım hazırlanmıştır ve her bir örnek için karışım içeriği şu şekildedir: 6,25 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix; 0,3 µl forward primer (10 µM); 0,3 µl reverse primer (10 µM); 4,65 µl distile su ve 1 µl cDNA. Hazırlanan PCR karışımları Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazında 95 °C'de 15 dk, 95°C'de 15 sn 60 °C'de (bağlanma sıcaklığı her primer çifti için optimize edilerek en uygun sıcaklık belirlenmiştir) 30 sn ve 72 °C'de 30 sn (40 döngü) termal şartlara tabi tutulmuştur. Her reaksiyon sonunda 55-95°C arasında erime eğrisi analizi yapılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Kantitatif PCR sonucunda elde edilen Ct (cycle threshold) değerleri $2^{-\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplanarak analiz edilmiştir ($\Delta Ct = \text{Hedef gen} - \text{Referans Gen}$)¹⁹. Daha önce de belirtildiği üzere miRNA gen ifadesi için küçük RNA molekülü RNA-U6; apoptoz ile ilişkili genlerin ifade seviyesini belirlemek için ise GAPDH geni referans gen olarak kullanılmıştır. Hesaplanan veriler GraphPad Prism6 paket programına aktarılarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Karşılaştırmalar için t testi kullanılmıştır, ayrıca normal dağılım göstermeyen örnekler için ise Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Delta Ct hesaplama yönteminin yanı sıra kat değişimleri de analiz edilmiştir. Kat değişimi için ise $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılmıştır ($\Delta\Delta Ct = [\text{muamele edilen}(\text{Hedef gen} - \text{Referans Gen}) - \text{kontrol}(\text{Hedef gen} - \text{Referans Gen})]$)¹⁹. Bütün sonuçlar için $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 2. Apoptoz ilişkili genlerin primer dizilimleri ve özellikleri

Genler	Primer Adı	Dizilimi (5'---3')	Ürün Boyutu	Tm (°C)
XAIP	XIAP-Fw	CGAGGAACCCCTGCCATGTAT	194	59,53
	XIAP-Rv	TTCTGACCAGGCACGATCAC		60,04
RB1	RB1-Fw	GTCCGGTTTTCTCAGGGGA	289	59,60
	RB1-Rv	TTCAAACCTCAAGCCTGACGAGA		59,60
BAX	BAX-Fw	GTCGCCCTTTTCTACTTTGCC	154	59,80
	BAX-Rv	TGGTCACGGTCCAACCACC		62,11
BCL2	BCL2-Fw	ATAACGGAGGCTGGGATGC	149	59,55
	BCL2-Rv	TCACTTGTGGCCAGATAGG		59,09
BCL2L1	BCL2L1-Fw	TCAGCCACCATTGCTACCAG	197	60,04
	BCL2L1-Rv	CCAAGGAGCTGGTTAGGGG		60,03

Tablo 2. Apoptoz ilişkili genlerin primer dizilimleri ve özellikleri (Devam)

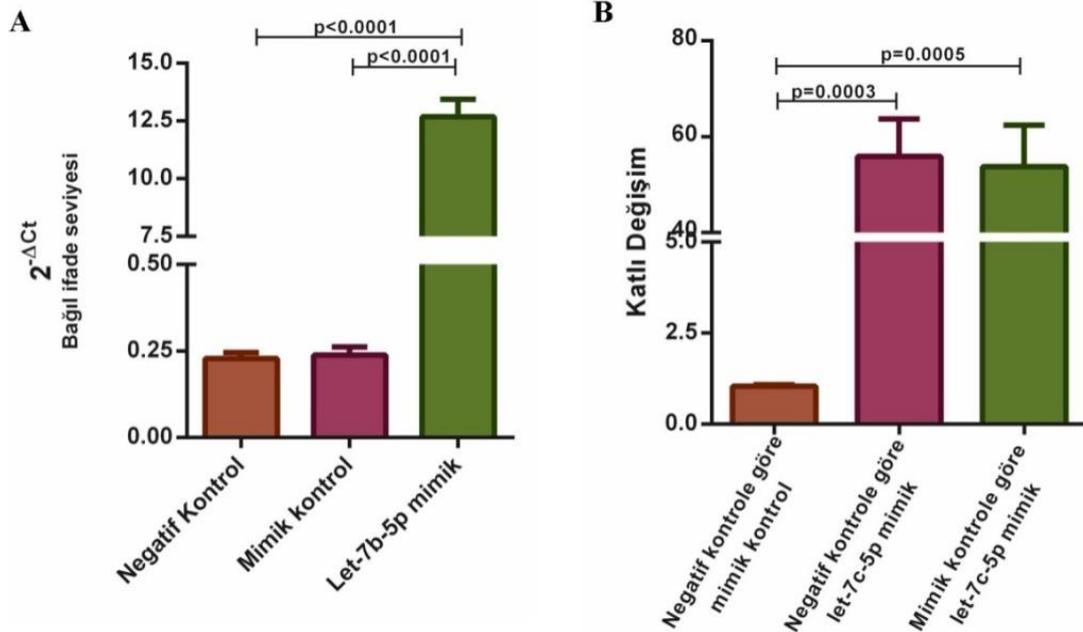
Genler	Primer Adı	Dizilimi (5'--3')	Ürün Boyutu	Tm (°C)
CASP3	CASP3-Fw	CTCTGGTTTTCGGTGGGTGT	288	60,18
	CASP3-Rv	TGAGGTTTCTGCATCGACA		60,25
CASP9	CASP9-Fw	TCAGGCCCATATGATCGAG	499	58,73
	CASP9-Rv	ACCATGAAATGCAGCGAGGA		60,04
TP53	TP53-Fw	TTTTCCCTCCCATGTGCTC	223	59,96
	TP53-Rv	GCTCGACGCTAGGATCTGAC		60,04
PTEN	PTEN-Fw	CTGCAGAAAGACTTGAAGGCG	395	59,80
	PTEN-Rv	GGAATAGTTACTCCCTTTTGT		57,25
GAPDH	GAPDH-Fw	GATCATCAGCAATGCCTCCT	197	57,73
	GAPDH-Rv	TGTGGTCATGAGTCTTCCA		58,27

BULGULAR

Akciğer kanseri hücre hattında let-7b-5p'nin ifade seviyesinin artırılması

Apoptoz ile ilişkili genlerin düzenlenmesinde let-7b-5p'nin rolünü ortaya koymak amacıyla A549 hücreleri let-7b-5p mimiği ile transfekte edilmiştir ve bu miRNA'nın ifade düzeyi artırılmıştır. A549 hücrelerinde let-7b-5p mimik transfeksiyonu sonrasında let-7b-5p'nin ifade seviyesinde ciddi artış sağlanmıştır ($p < 0,0001$) (Şekil 1A). Negatif kontrole göre kıyaslandığında let-7b-5p mimik

transfeksiyonu sonrasında bu miRNA'nın ifade seviyesi yaklaşık 55 kat ($p = 0,0003$) artarken, mimik kontrole göre kıyaslandığında yaklaşık 53 kat ($p = 0,0005$) artış gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca negatif kontrol ile mimik kontrol kendi aralarında kıyaslandıklarında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 1B). Böylelikle A549 akciğer kanseri hücrelerinde let-7b-5p'nin ifade seviyesi önemli derece artırılmıştır ve apoptoz ile ilişkili genlerin ifadesinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

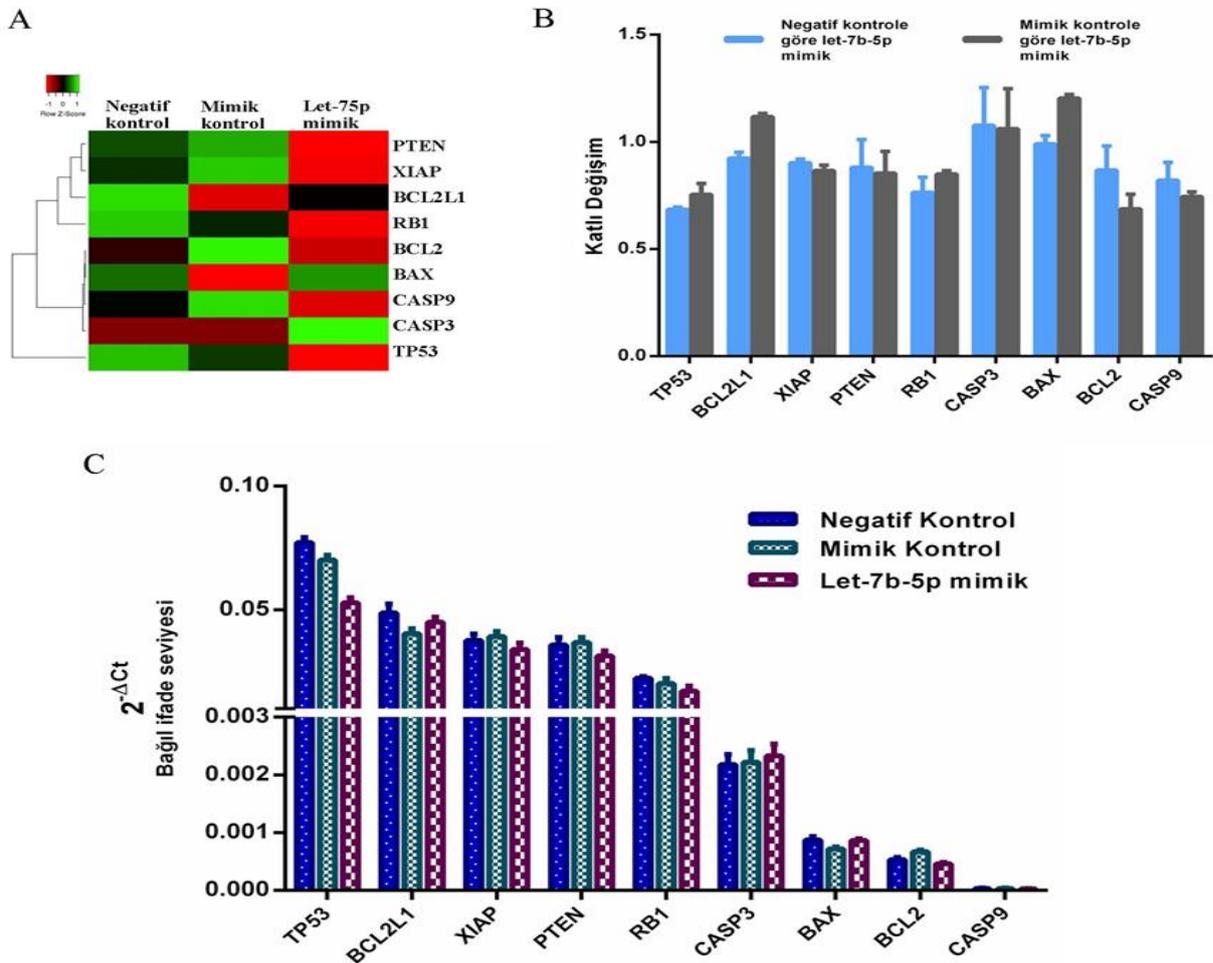


Şekil 1. A549 akciğer kanseri hücre hattında let-7b-5p'nin mimik edilmesiyle ifade seviyesinin artırılması. **A.** Negatif kontrol, mimik kontrol ve let-7b-5p mimik transfeksiyonu sonrasında let-7b-5p'nin ifade seviyesinin bağıl değişimi gösterilmiştir. **B.** Negatif kontrol, mimik kontrol ve let-7b-5p mimik transfeksiyonu sonrasında let-7b-5p'nin ifade seviyesinin katlı değişim oranları gösterilmiştir.

Yüksek let-7b-5p ifade seviyesinin apoptotik genlere etkisi

Let-7b-5p ifadesi artırılmış A549 hücrelerinde TP53, BCL2L1, XIAP, PTEN, RB1, CASP3, BAX, BCL2 ve CASP9 genlerinin ifade seviyeleri qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. Genel olarak apoptoz ile ilişkili genlerin ifade seviyelerinde mimik transfeksiyonundan sonra bir azalma olduğu gösterilmiştir, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 2A). Let-7b-5p mimik edilmiş akciğer kanseri hücrelerinde negatif

kontrole ve mimik kontrole göre kıyaslandığında BCL2, RB1, CASP9, XIAP, TP53 ve PTEN genlerinin ifade seviyesi azalma gösterirken, BAX geninin ifade seviyesinde artış görülmüştür. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bunun yanı sıra, BCL2L1 ve CASP3 genlerinin ifade düzeylerinde gruplar arasında herhangi bir değişim görülmemiştir (Şekil 2B). Negatif kontrole ve mimik kontrole göre kıyaslanan let-7b-5p mimik ile transfekte edilmiş hücrelerdeki apoptoz ile ilişkili genlerin ifade seviyeleri arasında herhangi bir değişim söz konusu değildir (Şekil 2C).

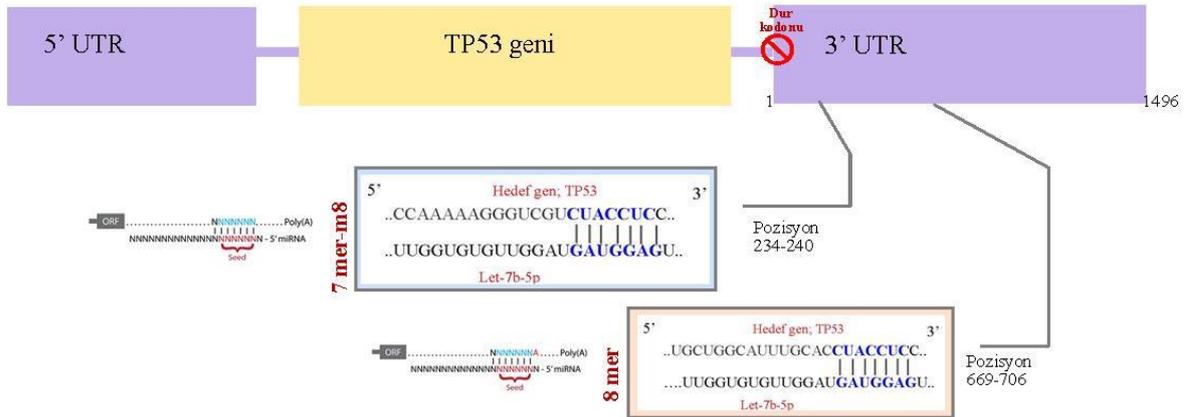


Şekil 2. A549 hücrelerinde let-7b-5p'nin ifade seviyesinin artırılmasının ardından online veri tabanlarından ilişkisi olduğu tahmin edilen apoptotik genlerin değişimi gösterilmiştir. **A.** Negatif kontrol, mimik kontrol ve let-7b-5p mimik transfeksiyonu sonrasında apoptotik genlerin ifade seviyeleri heatmap grafiği ile gösterilmiştir (heatmap grafiği online olarak "expression heatmapper" arayüzü kullanılarak yapılmıştır; <http://www.heatmapper.ca/expression/>). **B.** Negatif kontrol, mimik kontrol ve let-7b-5p mimik transfeksiyonu sonrasında apoptotik genlerin ifade seviyelerinin kat değişimleri gösterilmiştir. **C.** Negatif kontrol, mimik kontrol ve let-7b-5p mimik transfeksiyonu sonrasında apoptotik genlerin ifade seviyelerinin bağıl değişimleri gösterilmiştir.

Let-7b-5p TP53'ün doğrudan hedefleyebilir

Let-7b-5p mimik transfeksiyonu sonrasında en çok azalma TP53 geninde olmuştur. Hem negatif kontrole hem de mimik kontrole kıyasla TP53 geninin ifade seviyesi düşüş göstermektedir. Negatif kontrole kıyasla 1,47 kat düşüş gösterirken, mimik kontrole kıyasla 1,33 kat düşüş göstermektedir. Dolayısıyla bu bulgular let-7b-

5p'nin TP53'ü doğrudan hedefleyebileceğini göstermektedir (Şekil 3). Ancak let-7b-5p TP53'ü doğrudan hedefler diyebilmemiz için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, let-7b-5p mimik transfeksiyonunda, mimik konsantrasyonuna bağlı olarak TP53 geninin ifade seviyesindeki değişim aralarındaki ilişkinin açıklanmasına yardımcı olabilir.



Şekil 3. TP53 geninin 3' UTR bölgesinde iki farklı pozisyonda let-7b-5p bağlanma bölgesinin olduğu gösterilmiştir. İlk bağlanma bölgesi 234-240 pozisyonunda 7mer-m8 (bağlanma motifi: ORF...NNNNNNN...Poly(A); N (herhangi bir nükleotid) miRNA ile uyum gösteren kısım) uyuşum gösterirken, ikinci bağlanma bölgesi 669-704 pozisyonunda 8mer (bağlanma motifi: ORF...NNNNNNNA...Poly(A); N (herhangi bir nükleotid) miRNA ile uyum gösteren kısım) uyuşum göstermektedir. TP53 geni ile let-7b-5p'nin aralarındaki kısmi tamamlayıcılık gösterilirken TargetScan veri tabanından (<http://www.targetscan.org>) yararlanılmıştır.

TARTIŞMA

Normal hücreler hayatta kalmak veya programlı bir şekilde ölmek için birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Ancak kanser hücrelerinde bu durum söz konusu değildir. Özellikle apoptoz mekanizmasındaki düzensizlikler sonucunda tümörleşme kaçınılmaz olmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, mikroRNA'ların hem kanserin başlanmasında hem de ilerlemesinde önemli roller oynadığını göstermektedir. Özellikle apoptoz sürecinde doğrudan veya dolaylı olarak birçok genin düzenlenmesinde görev yaparak apoptozu baskılayıcı veya tetikleyici fonksiyonları bilinmektedir. İlk tanımlanan miRNA olan let-7 ailesinin üyelerinin hedef genlerini post-transkripsiyonel seviyede düzenleyerek hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik özellikler

gösterdiği ve apoptoz mekanizmasının düzenlenmesine aracılık ettikleri bildirilmiştir¹².

Let-7b, birçok kanser türünde düzensiz ifade edilerek çeşitli kanser süreçleri ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin; böbrek kanseri dokularında let-7b'nin ifadesinin normal dokulara kıyasla düşük olduğu ve bu düzensiz ifade seviyesinin böbrek kanserlerinde kemoterapiye direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir²⁰. Buna ek olarak, multipl miyelom doku ve hücre hatlarında let-7b-5p'nin ifade seviyesi anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Multipl miyelom hücre hatlarında mimik transfeksiyonu sonrasında hücre çoğalmasının baskılandığı, hücrelerin S/G2 fazında durduğu ve IGF1R'yi hedefleyerek apoptozu uyardığı bulunmuştur²¹. Evre I akciğer kanseri hastalarından alınan dokularda let-7bifade

seviyesi normal dokulara kıyasla anlamlı olarak artış göstermektedir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının dokularındaki let-7b'nin aşırı ifadesi bu molekülün prognostik bir belirteç olarak yararlı olabileceğini düşündürmektedir²². Bunun yanı sıra, sigara içen ve içmeyen küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında let-7b ifade seviyesi farklılık göstermektedir. Sigara içmeyen hastaların kanserli akciğer dokularında let-7b ifade seviyesi kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur.

Johnson ve arkadaşları, let-7 ailesi üyelerinin ifade kaybının, çeşitli insan tümörlerinin patogeneze katkıda bulunan bir onkogen olan RAS'ın ifade seviyesinin ciddi bir şekilde artması ile sonuçlandığını bildirmişlerdir²⁴. Ayrıca, let-7 ailesi üyeleri siklin bağımlı kinazlar, siklinler, transkripsiyon faktörleri ve anti-apoptotik faktörleri düzenleyerek hücre döngüsünü ve apoptozu da etkilemektedir. Let-7'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde baskılanması hücre bölünmesini artırırken, aşırı ifade edilmesi sonucunda hücre büyümesinin baskılandığı görülmüştür. Buna benzer etkiler ksenograftlarda ve transgenik fare modellerinde de gözlenmiştir. KRAS geninin 3'-UTR bölgesinde let-7 ile tamamlayıcı dizilim içeren 6. nükleotid pozisyonunda tek bir nükleotid polimorfizmi, orta derecede sigara içenler arasında artmış küçük hücreli olmayan akciğer kanseri riski ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında let-7 polimorfizminin görülme sıklığı yaklaşık %20 iken sağlıklı popülasyonda sadece %6 olarak bulunmuştur²⁶. Bu bulgular akciğer kanserinde normal seviyelerdeki let-7 fonksiyonun hedeflediği mRNA'lardaki değişikliklerden etkilenebileceğini göstermektedir. Bununla beraber, miRNA ile ilişkili polimorfizmlerin yanı sıra, farklı miRNA

paternlerinin akciğer kanseri hastalarının klinik bulguları ile de ilişkili olduğunu göstermiştir.

Bcl-2 proteinleri, mitokondriyal dış zarın bütünlüğünü düzenleyerek hücrenin kaderini belirleyen moleküllerdir. Bunun yanında let-7b'nin mitokondride yaygın bir şekilde ifade edildiği ve mitokondriyal biyogenezinin düzenlenmesinde rol oynadığı ortaya konulmuştur²⁸. Bunun yanı sıra, trombositlerin apoptozunda let-7b, BCL2L1'i hedefleyen anahtar bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır ve depolama sırasında let-7b ifadesinin artırılması, anti-apoptotik BCL2L1 ifade seviyesini azaltmaktadır ve trombosit apoptozunu uyararak için Bak'ı serbest bırakmaktadır²⁹. Bizim çalışmamızda ise, akciğer kanseri hücrelerinde let-7b-5p'nin ifade seviyesinin artırılmasının ardından BCL2 geninin ifade seviyelerinin kontrol gruplarına kıyasla azaldığı ve BAX geninin ifadesinin arttığı bulunmuştur. Dolayısıyla let-7b içsel apoptoz yolağının uyarılmasında pro-apoptotik ve anti-apoptotik genleri doğrudan veya dolaylı bir biçimde negatif yönlü düzenleyerek kilit rol oynayabilir.

Fosfataz ve tensin homologu (PTEN, phosphatase and tensin homolog), ilk olarak 1997'de tanımlanan bir tümör baskılayıcı genidir. PTEN'in meme kanseri, pankreas kanseri, kolorektal kanser, karaciğer kanseri, prostat kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri de dâhil olmak üzere insan kanseri türlerinde sıklıkla silindiği veya mutasyona uğradığı bildirilmiştir. Akciğer kanseri hücrelerinde PTEN'in aşırı ifade edilmesi sonucunda G0/G1 fazındaki hücre popülasyonunun arttığı ve S fazındaki hücre sayısının azaldığı, dolayısıyla G0/G1 fazında hücre döngüsünün durakladığı gösterilmiştir. Ayrıca, PTEN, G0/G1 duraklamasını ve apoptozu uyararak küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin büyümesini baskıladı

bulunmuştur³⁰. Hücre döngüsü ve apoptoz gibi kritik süreçlerde birçok fonksiyonu bilinen PTEN geninin düzenlenmesinde miRNA'lar da önemli bir yer teşkil etmektedir. Saffari ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, prostat kanseri dokularında let-7b'nin ifade seviyesinin normale kıyasla düşük olduğu ve let-7b'nin PTEN ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir³¹. Bizim çalışmamızda ise let-7b-5p'nin ifade seviyesinin artması sonucunda PTEN'in ifade seviyesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmasa da let-7b'nin PTEN ifade seviyesine etki ettiği görülmektedir. Dolayısıyla, let-7b'nin kanserde PTEN ifade seviyesini hedefleyerek onkojenik bir miRNA gibi davranabileceği ve anti-apoptotik etkilere sahip olabileceği görülmektedir. Ancak, bu bulguların ileride yapılacak olan kapsamlı çalışmalar ile desteklenerek daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

Hücrelerin hayatta kalma kararının verilmesinde hücre içerisinde bazı kritik genler sorumludur. Bu genler kanserlerde tümör baskılayıcı özellik gösterirler. En iyi bilinen tümör baskılayıcı genler RB1 ve TP53'tür. RB1, genellikle hücre dışından gelen büyüme baskılayıcılarına karşı etki göstermektedir³². RB1, DNA sentezinde önemli işlevleri olan E2F transkripsiyon faktörünün hedef genlerini baskılayarak G1/S geçişini engeller ve apoptoz yolağında önemli işlevleri olan APAF-1, BCL-2, CASP3 gibi genlerin aktivasyonu ile hücre ölümünü uyarır. TP53 ise, hücre içerisinde oluşan bir hata sonucu hücre döngüsünü tüm durumlar normalleşene kadar duraksatır, eğer hata çözülemeyecek boyutta ise apoptoz sürecinin başlaması için hücreleri uyarır³². Apoptotik süreçte bu denli etkin olan baskılayıcı genlerin düzenlenmesinde birçok miRNA'nın görevli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir³³. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde miR-34a'nın TP53 ile pozitif bir etkileşim içerisinde

olduğu, TP53/miR-34a sinyalizasyonunun restore edilmesinin Bax'a bağlı apoptozu uyardığı gösterilmiştir³⁴. Ayrıca, akciğer kanseri hücrelerinde TP53 ile uyarılmış miR-34a ifadesi MYCN ifadesini baskılayarak cisplatin duyarlılığını etkilediği gösterilmiştir³⁵. miR-34a bilinen iyi tümör baskılayıcı miRNA'lardandır ve TP53 miR-34a ifadesini pozitif yönde hedefleyerek apoptozu uyarılmaktadır. miR-34a ifade seviyesinin artmasının anti-apoptotik genlerin ifadesini düşürdüğü ortaya konulmuştur. miR-34a tabanlı antikanser ilacı MRX34 (lipozomal miRNA mimik) faz II aşamasında durdurulmuştur. Bizim çalışmamızda, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde let-7b-5p'nin aşırı ifade edilmesinin ardından TP53 geninin ifade seviyesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. In silico analizler neticesinde let-7b-5p'nin 3' UTR bölgesinde iki tane bağlanma alanı olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, elde ettiğimiz bulgular let-7b-5p'nin TP53'ü hedefleyerek apoptotik genlerin ifadesini düşürebileceği göstermektedir. Bu bulgular, PTEN'e benzer şekilde, let-7b-5p'nin TP53 gibi önemli bir tümör baskılayıcı gen hedefleyerek onkojenik bir miRNA gibi davranabileceğini ve anti-apoptotik etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde let-7b-5p'nin ifadesinin arttırılması sonucunda apoptoz ile ilişkili genlerin ifadesinin azaldığı bulunmuştur. Let-7b-5p'nin artmış ifadesine karşın TP53'ün ifade seviyesinin azalması ve iki farklı bağlanma bölgesinin bulunması bu miRNA'nın direkt hedefi olabileceğini öne sürmektedir. Bu bağlamda, let-7b-5p'nin ifadesinin artması apoptoz ile ilişkili genleri etkileyerek apoptozu uyarabilir ve bu durum let-7b-5p'nin tanı/tedaviye yönelik bir belirteç olma potansiyelini arttırmaktadır. Bu

anlamda daha açık ifadeler kullanabilmemiz için A549 hücrelerindeki apoptoz seviyesinin gösterilmesi ve akciğer kanseri vakalarında let-7b-5p'nin apoptoz sürecindeki rollerin ortaya konulması gereklidir.

Kaynaklar

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D, Piñeros M et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-53.
2. Goulart BH, Ramsey SD. Moving beyond the national lung screening trial: discussing strategies for implementation of lung cancer screening programs. *Oncologist*. 2013;18(8):941-46.
3. Church TR, Black WC, Aberle DR, Berg CD, Clingan KL, Duan F, et al. Results of initial low-dose computed tomographic screening for lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(21):1980-91.
4. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):597-610.
5. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
6. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415.
7. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-8.
8. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259.
9. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(5):903-6.
10. Park SM, Shell S, Radjabi AR, Schickel R, Feig C, Boyerinas B, et al. Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle*. 2007;6(21):2585-90.
11. Balzeau J, Menezes MR, Cao S, Hagan JP. The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Front Genet*. 2017;8:31.
12. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*. 2007;315(5818):1576-79.
13. Wu KL, Tsai YM, Lien CT, Kuo PL. The Roles of MicroRNA in Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1611.
14. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C. et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007;131(6):1109-23.
15. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellos I. et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. *Nucleic Acids Res*. 2017;46(D1):D239-D245.
16. Laganà A, Forte S, Giudice A, Arena M, Puglisi PL, Giugno R. et al. miRo: a miRNA knowledge base. Database (Oxford). 2009;2009:bap008.
17. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2014;43(D1):D146-D152.
18. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW. et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2017;46(D1):D296-D302.
19. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101.
20. Peng J, Mo R, Ma J, Fan J. let-7b and let-7c are determinants of intrinsic chemoresistance in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2015;13:175.
21. Xu H, Liu C, Zhang Y, Guo X, Liu Z, Luo Z, et al. Let-7b-5p regulates proliferation and apoptosis in multiple myeloma by targeting IGF1R. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014;46(11):965-72.
22. Edmonds MD, Eischen CM. Differences in miRNA expression in early stage lung adenocarcinomas that did and did not relapse. *PloS one*. 2014;9(7):e101802.
23. Jusufović E, Rijavec M, Keser D, Korošec P, Sodja E, Iljazović E. et al. let-7b and miR-126 are down-regulated in tumor tissue and correlate with microvessel density and survival outcomes in non-small-cell lung cancer. *PloS one*. 2012;7(9):e45577.
24. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A. et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-47.
25. Trang P, Medina PP, Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M. et al. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene*. 2010;29(11):1580.