

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2017-DR-001

**SAOS-2 OSTEOSARKOMA HÜCRE HATTINDA
BAİCALEİN'İN WNT/ β -KATENİN YOLAĞINA VE
MİR-25 İFADESİNE ETKİSİ**






Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Celal ÜLGER

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL tarafından hazırlanan ‘Saos-2 Osteosarkoma Hücre Hattında Baicalein’in Wnt/ β -Katenin Yolağına ve MiR-25 İfadesine Etkisi’ başlıklı tez, 07/04/2017 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Necdet SAĞLAM	Hacettepe Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Celal ÜLGER	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Muharrem BALKAYA	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI	Uludağ Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla(tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

07/04/2017

Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

ÖZET

SAOS-2 OSTEOSARKOMA HÜCRE HATTINDA BAICALEIN'İN WNT/ β -KATENİN YOLAĞINA VE MİR-25 İFADESİNE ETKİSİ

Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

Doktora Tezi, Biyoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Celal ÜLGER

2017, 106 sayfa

Osteosarkoma, en sık karşılaşılan primer kemik kanseri olup sıklıkla çocuklarda ve ergenlerde yüksek oranda ortaya çıkmaktadır. Bir flavonoid olan baicalein, biyolojik ve farmasötik etkilerini geniş bir yelpazede göstermektedir ve bunların arasında güçlü anti-tümör aktivitesi son yıllarda büyük ilgi görmektedir. MikroRNA'lar, insan kanserlerinin başlatılması ve ilerlemesinde değişiklikler içeren küçük düzenleyici RNA'ların bir sınıfını oluşturmaktadır. Son zamanlarda mikroRNA-25 (miR-25)'in insan kanserlerinde birçok kritik süreçte yer aldığı bulunmuştur. Bu çalışmada osteosarkoma hücre hattı Saos-2'de baicaleinin ve miR-25'in Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerine etkisi araştırılmıştır. Hücre canlılığı ve apoptoz saptanmış, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ile ilişkili β -katenin, GSK-3 β , Axin2 ve LRP-5 mRNA ve protein ifadeleri belirlenmiştir. Saos-2 hücrelerinde baicalein IC₅₀ ve AP₅₀ değerleri sırasıyla 35 μ M ve 50 μ M olarak bulunmuştur. Baicaleinin doza bağlı olarak Saos-2 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu tetiklediği aynı zamanda miR-25 ifadesini artırdığı saptanmıştır. Baicalein uygulaması ve miR-25 mimik tranfeksiyonu β -katenin, Axin2 ve LR5 ifadesinde düşüş meydana getirirken GSK-3 β ifadesi artmıştır. Anti-miR-25 uygulaması GSK-3 β ve LR5 ifadelerini düşürürken β -katenin ve Axin2 ifadelerinde artış meydana getirmiştir. Bu bulgular, baicaleinin Wnt/ β -katenin yolağı ile ilgili genleri miR-25 ifadesini düzenliyerek hedef alabileceğini ve osteosarkoma tedavisi için potansiyel bir Wnt/ β -katenin yolağı inhibitörü olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Osteosarkoma, Saos-2, Baicalein, miR-25, Wnt/ β -katenin

ABSTRACT

THE EFFECT OF BAICALEIN ON WNT/ β -CATENIN PATHWAY AND MIR-25 EXPRESSION IN SAOS-2 OSTEOSARCOMA CELL LINE

Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

PhD Thesis, Biology

Supervisor: Prof. Dr. Celal ÜLGER

2017, 106 sayfa

Osteosarcoma is the most common primary bone malignancy which occurs frequently in children and adolescents. The flavonoid baicalein, shows a wide range of biological and pharmaceutical effects, with its potent antitumor activity raising great interest in recent years. MicroRNAs are emerging as a class of small regulatory RNAs whose alterations are implicated in the initiation and progression of human cancers. MicroRNA-25 (miR-25) has recently been found to be involved in many critical processes in human cancers. In this study, the effect of baicalein and miR-25 on Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteosarcoma cell line Saos-2 was investigated. Cell viability and apoptosis was assessed, mRNA and protein expressions of β -catenin, GSK-3 β , Axin2 and LRP-5, which are associated with the Wnt/ β -catenin signaling pathway, were determined. In Saos-2 cells, baicalein IC₅₀ and AP₅₀ values were found to be 35 μ M ve 50 μ M, respectively. It is indicated that baicalein can inhibit the proliferation and induce apoptosis and also increase miR-25 expression of Saos-2 cells in a dose-dependent manner. Baicalein treatment and miR-25 mimic transfection decreased the expression of β -catenin, Axin2 and LRP-5, while increasing the expression of GSK-3 β . Anti-miR-25 treatment decreased the expression of GSK-3 β and LRP-5, while β -catenin and Axin2 expression increased. These findings demonstrate that baicalein may target genes related to the Wnt/ β -catenin pathway by regulating miR-25 expression and may be a potential Wnt/ β -catenin pathway inhibitor for osteosarcoma therapy.

Key Words: Cancer, Osteosarcoma, Saos-2, Baicalein, miR-25, Wnt/ β -catenin

ÖNSÖZ

Doktora sürecim boyunca bilgi birikimi ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Celal ÜLGER'e,

Tez çalışmam boyunca fikir ve bilimsel katkılarını esirgemeyen Prof Dr. Fevzi BARDAKCI ve Prof. Dr. Muharrem BALKAYA'ya,

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan laboratuvar ve cihaz paylaşımı için Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN ve Prof. Dr. Serhan SAKARYA'ya,

Tez çalışmamda ihtiyaç duyduğum ölçümleri gerçekleştirmem için laboratuvarlarını paylaşan TARBIYOMER'e,

İhtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK ve Prof. Dr. Oğuz TÜRKOZAN'a,

Laboratuvar çalışmalarımnda manevi desteğini ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşım İlkem CEYLAN'a,

Tez çalışmam boyunca her türlü desteği sağlayan, iyi günde kötü günde bana cesaret veren eşim Şinasi YAYLAGÜL'e,

Uzakta da olsalar her zaman yanımdaymış gibi bana destek olan aileme,

FEF-15019 numaralı 'Saos-2 Osteosarkoma Hücre Hattında Baicalein'in Wnt/ β -katenin Yolağına ve MiR-25 İfadesine Etkisi' adlı proje kapsamında yapmış olduğum tezi desteklemelerinden dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi'ne,

Teşekkür ederim.

Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxv
1 . GİRİŞ	1
1.1 . Kanser	3
1.1.1 . Osteosarkoma	4
1.2 . Baicalein.....	5
1.3 . MikroRNA	7
1.3.1 . MikroRNA-25	9
1.4 . Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı.....	10
1.5 . Proliferasyon	13
1.5.1 Hücre Canlılık Analizi	14
1.6 . Apoptoz.....	15
1.7 . Real-Time PCR	16
1.7.1 . Real-Time PCR ile MikroRNA Analizi	18
1.8 . Western Blotlama.....	23

2 . KAYNAK ÖZETLERİ.....	25
3 . MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1 . Hücre Hattı	29
3.2 . Hücre Hattı Kültür Koşulları	29
3.3 . Baicalein Hazırlanması.....	30
3.4 . Hücre Proliferasyonunun Saptanması	30
3.5 . Apoptoz Saptanması.....	32
3.6 . MikroRNA-25 Mimik ve İnhibitör Transfeksiyonu.....	34
3.6.1 . MikroRNA-25 İnhibitör Uygulaması	35
3.6.2 . MikroRNA-25 Mimik Uygulaması	37
3.7 . Total RNA İzolasyonu ve Real-Time PCR	38
3.7.1 . Total RNA İzolasyonu.....	38
3.7.2 . MikroRNA-25 için cDNA Sentezi ve RT-PCR	39
3.7.3 . mRNA İfadesi için cDNA Sentezi ve RT-PCR.....	42
3.8 . Western Blotlama	44
3.9 . İstatistiksel Veri Analizi	51
4 . BULGULAR	52
4.1 . Proliferasyon	52
4.2 . Apoptoz	53
4.3 . Real-Time PCR Sonuçları	55
4.3.1 . Baicalein Uygulaması Sonrası miR-25 İfadesi.....	55

4.3.2 . Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası miR-25 İfadesi	56
4.3.3 . MiR-25-mimik Transfeksiyonu Sonrası miR-25 İfadesi.....	58
4.3.4 . Baicalein Uygulaması Sonrası İlgili Genlerin mRNA İfadeleri.....	59
4.3.5 . Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası İlgili Genlerin mRNA İfadeleri	62
4.3.6 . MikroRNA-25-mimik Transfeksiyonu Sonrası İlgili Genlerin mRNA İfadeleri	65
4.4 . Western Blotlama Sonuçları.....	68
4.4.1 . Baicalein Uygulaması Sonrası Protein İfadeleri.....	68
4.4.2 . Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası İlgili Protein İfadeleri.....	72
4.4.3 . MikroRNA-25-mimik Transfeksiyonu Sonrası İlgili Proteinlerin İfadeleri	76
5 . TARTIŞMA VE SONUÇ.....	80
KAYNAKÇA.....	87
ÖZGEÇMİŞ	101

SİMGELER DİZİNİ

μl : Mikrolitre

μM : Mikromolar

dk : Dakika

Lt : Litre

ml : Mililitre

mM : Milimolar

nM : Nanomolar

$^{\circ}\text{C}$: Santigrat

KISALTMALAR DİZİNİ

3'-UTR	: 3'-Transle Edilmeyen Bölge
Anti-miR-25	: MikroRNA-25 İnhibitörü
AP	: Alkalen Fosfataz
APC	: Adenomatosis Poliposis Koli
BCIP	: 5-Bromo-4-kloro-3'indolilfosfat p-toluidin Tuzu
BrdU	: 5-Bromo-2'-deoksiüridin
BSA	: Sığır Serum Albümini
CK1	: Kazein Kinaz 1
DMSO	: Dimetilsülfoksit
Dsh	: Disheveled
EDTA	: Etilendiamintetra Asetik Asit
EdU	: 5-Etil-2'-deoksiüridin
FBS	: Fetal Sığır Serumu
FS	: Fosfatidilserin
FZD	: Frizzled
GSK-3 β	: Glikojen Sentaz Kinaz-3 β
LEF	: Lenfosit Çoğaltan Faktör
LRP-5/6	: Düşük-yoğunlukta lipoprotein reseptörü-bağlantılı proteinler-5/6
miR-25-mimik	: Sentetik mikroRNA-25
miRNA/miR	: mikroRNA

mRNA	: Haberci RNA
NBT	: Nitro-blue Tetrazolium Klorit
OS	: Osteosarkoma
PBS	: Tuz Fosfat Tamponu
PIC	: Proteaz İnhibitör Kokteyli
PMSF	: Fenilmetansülfonilflorit
PVDF	: Polivinilidindiflorit
RNA	: Ribonükleik asit
RISC	: RNA ile uyarılan sessizleştirme kompleksi
RT	: Revers Transkripsiyon
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TBS	: Tris Tuz Tamponu
TCF	: T-Hücre Faktörü
Wnt	: Wingless-type

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Baicalein	6
Şekil 1.2 MikroRNA yolağı	8
Şekil 1.3 Wnt/ β -katenin sinyal yolağı	12
Şekil 1.4 Muse™ Sayım & Canlılık Test Sistemi analiz görüntüsü	15
Şekil 1.5 Real-Time PCR amplifikasyon ve standart grafikleri	18
Şekil 1.6 MikroRNA Revers transkripsiyon ve Real-Time PCR aşamaları	19
Şekil 1.7 PCR reaksiyonu şekillerinde kullanılan işaret ve kısaltmalar	20
Şekil 1.8 MGB prob bağlanması ve polimerizasyon	21
Şekil 1.9 İplik uzaması	21
Şekil 1.10 DNA polimeraz işlevi	22
Şekil 1.11 Polimerizasyonun tamamlanması	22
Şekil 3.1 Saos-2 hücre hattı	29
Şekil 3.2 Muse Sayım & Canlılık Kiti ile yapılan ölçüm için örnek proliferasyon profili.....	32
Şekil 3.3 Muse™ Annexin V ölçümleri sonucu elde edilen örnek hücre profilleri33	
Şekil 4.1 Baicaleinin canlı hücre sayısına olan etkisi	52
Şekil 4.2 IC ₅₀ dozunun belirlenmesi için çizilen dağılım grafiği	53
Şekil 4.3 Uygulanan baicalein konsantrasyonlarına ait 24. ve 48. saatlerdeki apoptotik hücre yüzdelerindeki değişim	54
Şekil 4.4 AP ₅₀ dozunun hesaplanması için çizilen dağılım grafiği	54

Şekil 4.5 Baicalein uygulaması sonrası miR-25 ifade değişimi	55
Şekil 4.6 Anti-miR-25 uygulaması sonrası miR-25 ifade değişimi	56
Şekil 4.7 Anti-miR-25 ve baicalein uygulamaları sonrası miR-25 ifade değişimi..	57
Şekil 4.8 MikroRNA-25 mimik uygulaması sonrası miR-25 ifade değişimi	58
Şekil 4.9 Baicalein uygulaması sonrası β -katenin mRNA ifadesi	59
Şekil 4.10 Baicalein uygulaması sonrası Axin2 mRNA ifadesi	60
Şekil 4.11 Baicalein uygulaması sonrası LRP-5 mRNA ifadesi	61
Şekil 4.12 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası β -katenin mRNA ifadesi	62
Şekil 4.13 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası Axin2 mRNA ifadesi ..	63
Şekil 4.14 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası LRP-5 mRNA ifadesi .	64
Şekil 4.15 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası β -katenin mRNA ifadesi .	65
Şekil 4.16 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası Axin2 mRNA ifadesi	66
Şekil 4.17 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası LRP-5 mRNA ifadesi	67
Şekil 4.18 Baicalein uygulaması sonrası β -katenin protein ifadesi	68
Şekil 4.19 Baicalein uygulaması sonrası Axin2 protein ifadesi	69
Şekil 4.20 Baicalein uygulaması sonrası LRP-5 protein ifadesi	70
Şekil 4.21 Baicalein uygulaması sonrası GSK-3 β protein ifadesi	71
Şekil 4.22 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası β -katenin protein ifadesi	72
Şekil 4.23 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası Axin2 protein ifadesi .	73

Şekil 4.24 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası LRP-5 protein ifadesi ..	74
Şekil 4.25 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası GSK-3 β protein ifadesi ..	75
Şekil 4.26 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası β -katenin protein ifadesi ..	76
Şekil 4.27 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası Axin2 protein ifadesi ..	77
Şekil 4.28 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası LRP-5 protein ifadesi ..	78
Şekil 4.29 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası GSK-3 β protein ifadesi ..	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 MikroRNA çalışmalarında cDNA sentezi ve RT-PCR için kullanılan MikroRNA Test Sistemleri primerleri	40
Çizelge 3.2 MikroRNA çalışmaları için cDNA sentezi reaksiyon içeriği.....	40
Çizelge 3.3 MikroRNA çalışmaları için cDNA sentezi reaksiyon koşulları	40
Çizelge 3.4 MikroRNA Real-Time PCR reaksiyon karışımı içeriği.....	41
Çizelge 3.5 MikroRNA Real-Time PCR reaksiyon koşulları	41
Çizelge 3.6 cDNA sentezi reaksiyon karışımı içeriği	42
Çizelge 3.7 cDNA sentezi reaksiyon koşulları.....	42
Çizelge 3.8 Real-Time PCR için kullanılan primerler	43
Çizelge 3.9 Real-Time PCR reaksiyon karışımı	43
Çizelge 3.10 Real-Time PCR reaksiyon koşulları.....	44
Çizelge 3.11 Lizis tamponu.....	45
Çizelge 3.12 Poliakrilamid jel içerikleri	46
Çizelge 3.13 Yürütme tamponu	47
Çizelge 3.14 Yükleme tamponu.....	47
Çizelge 3.15 Transfer tamponu	48
Çizelge 3.16 TBS yıkama tamponu.....	49

1. GİRİŞ

Osteosarkoma (OS), çocuklarda ve ergenlerde en sık rastlanan primer kemik kanseri olup, patogenezinin bilinen heterojen yapısı nedeniyle teşhisi zordur. OS, tümör baskılayıcılarda fonksiyon bozukluğu ortaya çıkaran mutasyonlar ve onkogenlerin aktivasyonu gibi genetik ve sitogenetik anormalliklerle ilişkilendirilmiştir (Kumar vd., 2016).

Doğal moleküllerin kanser gelişimini inhibe edebileceği düşüncesi 100 yıldan çok daha önce ortaya atılmıştır ve laboratuvarlarda bitkilerden ve mantarlardan ekstrakte edilen küçük moleküllerin tümör gelişimi ve büyümesi üzerine etkileri incelenmeye başlanmıştır. Bu doğrultuda çalışmalar bu doğal bileşenlerin sinyal yollarını düzenleme ve hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi temel hücresel fonksiyonları kontrol edebilme kabiliyetlerine odaklanmıştır (Amado vd., 2014). Bu nedenle bitki kökenli doğal ürünler, anti-kanser işlevleri nedeniyle son yıllarda giderek daha fazla ilgi görmeye başlamıştır (Han vd., 2015). Flavonoidler, meyve, sebze ve bitki kökenli içeceklerde (şaraplar, çay, kakao ve meyve suları gibi) yaygın olarak bulunan doğal bileşiklerdir. On yıllar boyunca, flavonoidler, sağlık alanında yararları nedeniyle yaygın bir ilgi görmüştür. Aynı zamanda, flavonoidlerin anti-proliferatif etkileri, yapılarıyla yakından ilişkili olan en etkili terapötik biyoaktivitelerinden biri olarak düşünülmektedir (Wang vd., 2014).

Güçlü anti-tümör aktivitesi ve düşük toksisitesi nedeniyle baicalein, son yıllarda artan oranda ilgi toplamış bir flavonoiddir. Baicaleinden türetilmiş bileşikler üzerine yapılmış klinik öncesi çalışmaların umut verici sonuçlarına rağmen, çeşitli kanserler üzerindeki biyolojik etkilerini artırmak için ek araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Yine de, çok sayıda araştırmaya dayanarak baicaleinin potansiyel olarak yeni bir kanser ilacı olarak geliştirilebileceği, tek başına veya güncel popüler kemoterapötik ilaçlar ile birlikte uygulanabileceği, dolayısıyla daha etkin kanser tedavilerinin yapılabilmesi düşünülmektedir (Liu vd., 2016).

MikroRNA'lar (miRNA'lar, miR'ler), 18-25-nükleotit uzunluğunda kodlama yapmayan RNA'lardır ve farklılaşma, hücre büyümesi ve hücre ölümü gibi çeşitli biyolojik işlemler için kritik öneme sahiplerdir. Son zamanlarda tanınan etkileri olan yeni biyolojik belirteçler olarak tanımlanan mikroRNA nükleotit dizileri, hedeflenen mRNA'ların 3'-transle edilmeyen (3'-UTR) bölgelerine kısmen ya da

tamamen bağlanarak gen ifadesini baskılayabilme ya da gen ifadesini aktive edebilme özelliğine sahiptir (Kumar vd., 2016).

MikroRNA'lar, gelişimin her aşamasında gen ifadesinin önemli düzenleyicilerinden olup gelişimsel sinyal yolları ile miRNA'ların etkileşimi, hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozu gibi süreçlerde etkilidir. Anormal miRNA ifadesinden kaynaklanan kanser oluşumu, onkogenik miRNA'ların aşırı ifadesi, tümör baskılayıcı miRNA'ların genetik kaybı ve miRNA biyogenezini düzenleyen bileşenlerdeki genetik ve epigenetik değişikliklerden kaynaklanan miRNA azalması yoluyla ortaya çıkabilmektedir (Leichter vd., 2017).

MikroRNA'ların saptanması son yıllarda gerçekleştiği için, osteosarkomda miRNA'ların rolü tam olarak belirlenmemiştir. Bununla birlikte, osteosarkomanın ilerlemesinde bazı miRNA'ların rolü olduğunu bildiren birtakım kanıtlar vardır. Buna ek olarak, osteosarkomadaki spesifik miRNA fonksiyonlarının araştırılması osteosarkoma mekanizmalarını anlamak için önemlidir. Osteosarkomada miRNA'lara dayalı tedaviler iki ana stratejiyi içermektedir: Anti-miRNA'lar ile tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla onkogenik miRNA'ların ifadesini bloke etme ve miRNA taklitlerini (mimik) transfekte ederek tümör baskılayıcı miRNA'ların ifadesini artırmak (Miao vd., 2013). MikroRNA'ların önemli gelişimsel yollardaki bileşenleri düzenlediğine dair kanıtlar mevcuttur. Bu yollardan bir tanesi de Wnt/ β -katenin sinyal yolağıdır.

Yapılan çalışmalar, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonunun OS dokusunda/hücrelerinde yaygın olduğunu ve anormal aktivasyonunun OS tümör oluşumu, metastaz ve kemoterapötik yanıtlarda önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Ma vd., 2015). Wnt sinyal bileşenlerini düzenleyen miRNA'ların çeşitli kanserlerle ilişkili olduğunu destekleyen çalışmalar mevcuttur (Leichter vd., 2017). Biyomedikal araştırmalardaki son gelişmeler, deneysel ve biyoinformatik yaklaşımların miRNA'ların Wnt sinyal yolağı bileşenlerinin düzenleyicileri olduğunu belirlemesine olanak sağlamıştır. Böylece, hem miRNA'lar hem de Wnt sinyal yolları önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer alan önemli bir ağı oluşturmaktadır. OS'nin ilerlemesinde miRNA fonksiyonunun önemi ve katılımı, miRNA'ların olası yeni terapötik hedefler olarak kullanılabilmesinin yolunu açacaktır.

Çalışmada baicaleinin osteosarkoma hücre hattı Saos-2’de hücre proliferasyonu ve apoptozuna etkisi ve aynı zamanda miR-25 ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ilişkili genlerin ifadeleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bunun yanısıra Saos-2 hücrelerine miR-25 inhibitörü ve miR-25 mimikleri tranfekte edilerek miR-25 ifadesinin değişimi ve buna bağlı olarak da Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ilişkili genlerin ifadelerindeki değişim belirlenmiştir. Çalışma sonuçları miR-25 ve baicaleinin osteosarkoma tedavisi için potansiyel araçlar, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının ise potansiyel hedef olabileceğini göstermektedir.

1.1. Kanser

Kanser, vücudun diğer bölgelerine istila veya yayılma potansiyeline sahip anormal hücre büyümesi ile karakterize edilen bir hastalık sınıfıdır. 100’den fazla farklı kanser türü vardır ve her biri başlangıçta etkilenen hücre türüne göre sınıflandırılmıştır (Natal Cancer Institute, 2015). Belirli hücre türlerinde başlayan bazı kanser kategorileri şunlardır:

- Karsinoma: Epitelyal hücrelerden köken alan kanserlerdir. Bu grup en yaygın kanserler olan göğüs, prostat, akciğer, pankreas ve kolondaki neredeyse tüm kanserleri içerir.
- Sarkoma: Bağ dokusundan (kemik, kıkırdak, yağ, sinir) kaynaklanan kanserlerdir ve her biri kemik iliğinin dışındaki mezenşimal hücre orijinli hücrelerden gelişir.
- Lenfoma: Lenfositlerde (T hücreleri veya B hücreleri) başlayan kanserdir.
- Lösemi: Kemik iliğinin kan yapan dokusunda başlayan kanserlerdir.
- Multipl Miyelom: Plazma hücrelerinde başlayan kanserlerdir. Miyelom hücreleri denilen anormal plazma hücreleri, kemik iliğinde birikir ve tüm kemiklerde tümörler oluştururlar.
- Melanoma: Melanositlerde (melanin yapan özel hücreler) başlayan kanserlerdir.
- Germ hücreli tümörler: Genellikle testis (seminoma) veya yumurtalıkta (disgerminoma) ortaya çıkan pluripotent hücrelerden türemiş kanserlerdir.
- Blastoma: Olgunlaşmamış "prekürsör" hücrelerden veya embriyonik dokudan kaynaklanan kanserlerdir.

Kanser, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından dünya çapında bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. 2012 yılında yaklaşık 14 milyon yeni vaka meydana gelmiştir. 8.8 milyon kansere bağlı ölüm ile dünya çapında ölüme neden olan hastalıklarda ikinci sırada yer almaktadır. Önümüzdeki 20 yıl içerisinde yeni vaka sayısının %70 artması beklenmektedir (Yarla vd., 2016; WHO, 2017).

Kanserlerin çoğunluğu doku kitleleri oluşturan solid tümörlerdir. Lösemiler gibi kan kanserleri genelde katı tümörler oluşturmazlar. Habis (malign) tümörler yakındaki dokulara yayılabilir veya istila edebilirler. Ayrıca, bu tümörler büyüdükçe, bazı kanser hücreleri ayrılabilir ve kan veya lenf sistemi vasıtasıyla vücudun uzak bölgelerine seyahat edebilir ve orijinal tümörden uzakta yeni tümörler oluşturabilirler. Habis tümörlerden farklı olarak, iyi huylu (benign) tümörler dokulara yayılmaz veya dokulara nüfuz etmez. Genelde bir kapsül içindedir (National Cancer Institute, 2017).

Hastalıklar arasında ölüm ve görülme sıklığı ile üst sıralarda yer alan kanser, tedavi, teşhis ve korunma amacı ile çalışmaların önemli bir kısmını kapsamaktadır. Bu amaçla kanser ile ilgili olarak hem gelişim mekanizması hem de metastaz, apoptozdan kaçma ve anjiyogenez gibi belli karakteristik özelliklerin ortaya konulması değerli bilgiler sağlamaktadır. Son yıllarda kanserin ölüm ve görülme sıklığı oranları çevre kirliliği, çeşitli karsinojenler, sağlıksız yaşam tarzları, yüksek stres seviyeleri ve çalışma şartlarından dolayı hızla artış göstermiştir. Kemoterapi kanser hastalarının tedavisinde tümör hücrelerini öldürerek hayati bir rol oynamaktadır. Ancak, kemoterapi ajanları normal doku hücrelerinde de toksisiteye sebep olarak çeşitli yan etkiler ortaya koyabilmektedir. Aynı zamanda kemoterapinin etkinliği ilaç direncinin ortaya çıkması ile ciddi biçimde sınırlanmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinde yan etkileri daha az ve yüksek etkinliğe sahip yeni ilaçların bulunmasına yönelik çalışmalar günden güne artmaktadır (Liu vd., 2016).

1.1.1. Osteosarkoma

Osteosarkomalar olağandışı hücresel fonksiyonlara sahip hücreleri içeren çok yaygın primer malign (kötü huylu) kemik tümörleridir (Pautke, 2004). Tipik olarak uzun kemiklerin orta kısmında meydana gelir ve baskın olarak ergenler ve

genç yetişkinlerde gözlenir (Wang vd., 2016). Osteosarkoma cinsel bezlerin aktif çalışmaya başlamasıyla ergenlikte pik yapar. Osteosarkomanın erkeklerde görülme sıklığı kızlardan (15-18 yaş grubunda) iki kat daha fazladır (Kushlinskii vd., 2016).

Osteosarkoma son derece agresif, lokal olarak tahrip edici maligniteye ve aynı zamanda yüksek metastaz potansiyeline sahiptir (Ruan, 2016). Osteosarkoma için birincil tedavi tümörün cerrahi olarak çıkarılması ve yoğun adjuvan (yardımcı) kemoterapidir. Bununla birlikte 1970'lerden günümüze 5-yıllık hayatta kalma oranında anlamlı bir iyileşme gözlenmemekte ve mevcut tedavilerin sonuçları yetersiz kalmaktadır (Liu vd., 2016). Aynı zamanda, hastaların yarısı ilaçlara direnç geliştirmekte ve tümörün cerrahi olarak çıkartılmasından sonra ve kemoterapi sonrasında yüksek oranda yeniden ortaya çıkma ve metastaz riski taşımaktadır (Kushlinskii vd., 2016).

Osteosarkoma teşhisi için yapılan incelemeler/testler dizisi, özellikle gelişmekte olan ülkelerde pahalı ve zaman alıcı işlemlerdir ve hastalığa çoğunlukla ileri aşamalarda teşhis konulmaktadır (Li vd., 2015).

Bütün bunlar, osteosarkomanın erken tanısına yeni alternatif moleküler yaklaşımlar, ilaç tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesi ve tedavi-hastalık sürecine tümör cevabının tahmini için yeni yöntemlerin geliştirilmesini gerektirmektedir.

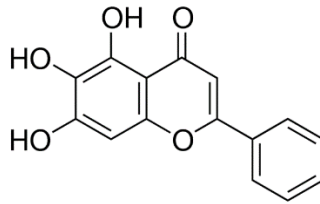
1.2. Baicalein

Geleneksel olarak kullanılan bazı doğal kimyasalların insan hastalıklarıyla ilgili etkili tedavisi dikkat çekicidir. Örneğin doksorubisin, fungal bir antrasiklin antibiyotiktir ve topoizomeraz II enzimini inhibe eder (Pecorino, 2005). Berberin, *Coptis chinensis*'in köklerinden elde edilen ünlü bir anti-kanser bitkisel üründür (Feng vd., 2015). Resveratrol, *Polygonum cuspidatum* ve bazı meyve kabuklarından izole edilen bir doğal anti-kanser ajandır (Ren vd., 2015). *Catharanthus roseus*'dan ekstrakte edilen cezayir menekşesi alkaloidleri kanser kürlerinde büyük başarı sağlamıştır (Da Rocha vd., 2001). Çok sayıda bitki arasında flavonoidler, kemoterapötik ajanlar olarak daha fazla kabul görmektedir (Romano vd., 2013). Ayrıca, bu doğal ajanlar, geleneksel kemoterapi ajanlarına

kıyasla daha yüksek erişilebilirlik ve karşılanabilirlik gibi birçok avantaja sahip olmalarının yanında düşük toksisiteye sahiptirler (Liu vd., 2016).

Scutellaria baicalensis güçlü anti-kanser etkilere sahip olmasından dolayı yaygın olarak kullanılan bir bitkidir. *Scutellaria*'nın ana bileşenleri baicalin, baicalein ve wogonin biyoaktif flavonlarıdır. Bu fitokimyasalların tümör büyümesini baskıladığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Bu flavonlar anti-tümör etkilerini hücre döngüsü tutulumlarını indüklemeleri, apoptoz ile ilişkili proteinlerin ifadelerini düzenlemeleri, adezyon ve migrasyon kapasitelerini düşürmeleri ve metastaz inhibisyonu gibi yetenekleri ile ortaya koymaktadırlar (Gong vd., 2014).

Baicalein (5,6,7-trihidroksiflavon) *Scutellaria baicalensis*'in köklerinden ekstrakte edilen bir flavonoiddir (Şekil 1.3) (Mu vd., 2016). Baicalein anti-bakteriyel (Luo vd., 2016), anti-viral (Zhao vd.,2016), anti-oksidatif (Sithisarn vd., 2016), anti-inflamatuar (Li vd., 2016), nöroprotektif (Choi vd., 2016), kardiyovasküler koruyucu (Zhao vd., 2015) ve antidiyabetik (Fu vd., 2014) özelliklerinin yanı sıra anti-kanser (Liu vd., 2016) etkileri de içeren birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Baicaleinin çok iyi antioksidan ve anti-enflamatuvar aktivitelere sahip olduğu, aynı zamanda kanser hücrelerinde metastazı baskılayarak (Chen vd., 2013) ve apoptozu indükleyerek (Ye vd., 2015) birçok kanser türünde anti-tümör etkiler sergilediği gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Baicalein (Sigma Aldrich)

1.3. MikroRNA

MikroRNA'lar (miRNA, miR) hem tek hücreli hem de çok hücreli ökaryotlarda bulunan, 18-27 nükleotit uzunluğunda, biyolojik süreçleri düzenleyen ve kodlama yapmayan RNA'ların büyük bir sınıfının üyeleridirler (Adams vd., 2014).

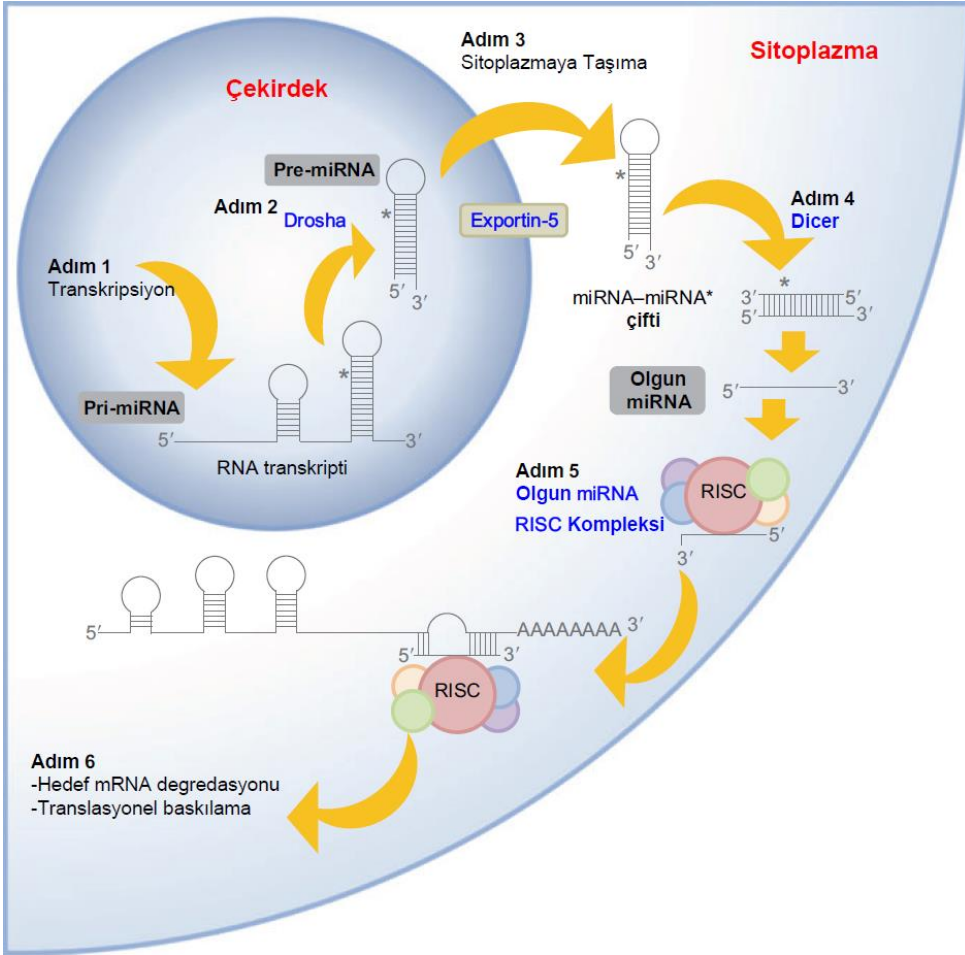
Yaklaşık 20 yıllık keşfedilme tarihi olan miRNA'lar oldukça yoğun çalışılan molekül gruplarından (Nana-Sinkam and Croce, 2013). Son PubMed taramasında yaklaşık 57.000 miRNA ilişkili çalışma bulunması, bu molekül grubunun üzerindeki ilgiyi ortaya koymaktadır. Bu çalışmaların yaklaşık 26000'i (%45.61) kanser ile bağlantılı çalışmalardan oluşmaktadır (Şubat 2017 PUBMED taraması). İlk olarak beş farklı tür için miRBase tarafından yayınlanan (v.1, Şubat 2002) 218 miRNA bulururken, şimdi bu sayı 223 tür için 35000 olgun miRNA dizisine ulaşmıştır (Kozomara vd., 2014). İnsanlarda 2500'den fazla olgun miRNA tespit edilmiştir (miRBase, 2017 taraması).

Belirlenen ilk miRNA genleri, nematodlarda transkripsiyon sonrası lin-14 ifadesini düzenleyerek gelişim zamanlamasını kontrol eden mikroRNA lin-4'tür (Lee vd., 1993).

MikroRNA'lar, hücrel farklılaşma ve gelişme de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde yer alan binlerce geni düzenleyebilmektedirler. Tek bir miRNA çok sayıda hedef geni düzenlediğinden, miRNA'ların ifade edilmelerindeki düzensizlikler kanserler (Li vd., 2015), otoimmün rahatsızlıklar (Zhu vd.,2013), gelişimsel ve nörolojik bozukluklar (Bian ve Sun, 2011) ve daha birçok çeşitli patolojilerle ilişkilidir.

MikroRNA'lar kendi promotorlarını içeren özgün genlerinden ya da protein kodlayan genlerin birleştirilmiş parçalarından transkribe edilirler (Berezikov, 2011; Adams, 2014). MikroRNA sentezi çekirdekte başlayıp sitoplazmada biter ve çoğu miRNA çekirdekte RNA polimeraz II tarafından polisistronik veya monosistronik öncül transkriptler olan pri-mikroRNA (500-3000 nükleotit) şeklinde sentezlenir. Sonrasında RNazIII ailesi içinde yer alan enzimlerce yaklaşık 70 nükleotitlik pre-mikroRNA'ya dönüştürülürler. Pre-mikroRNA'lar eksportin ve Ran-GTP aracılığı ile çekirdekten sitoplazmaya çıkarılır. Burada pre-mikroRNA diğer bir RNazIII enzimi olan Dicer ile önce yaklaşık 22 nükleotitlik mikroRNA dubleksine, sonra da her bir dubleks RISC (RNA ile uyarılan sessizleştirme

kompleksi) ile birleşerek tek-iplikli mikroRNA'yı oluşturur (Şekil 1.4) (Huang vd., 2013).



Şekil 1.2 MikroRNA yolağı (Biggar ve Storey, 2015)

MikroRNA'lar hedef mRNA'ların 3'-UTR'leri ile tamamen ya da kısmen baz eşleşmesi yaparak gen ifadelerinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde son derece önemli rol oynarlar (Qu vd., 2016). Bu eşsiz özelliklerinden dolayı bir tek mikroRNA birçok hedefe sahiptir. Genellikle bu hedeflerden çoğu çeşitli sinyal yolları ile ilişkilidir. Böylece gen ifadesi üzerindeki etkisi önemli ölçüde artmaktadır (Sun vd., 2013).

MikroRNA'ların osteosarkomada Notch, RAS/p21, MAPK, PI3K/Akt, Wnt ve Jun/FOS gibi sinyal yollarını etkilediği bulunmuştur (Miao vd., 2013). MikroRNA'lar ve gelişimsel sinyal yolları arasındaki düzenleyici bağlantılar ağında bozulmalar meydana gelirse, hatalı sinyal iletimi, çoğalmanın güçlendiği bir ortamın teşvik edilmesine ve hücrelerin apoptozdan kaçmasına veya pluripotent bir durumda kalmasına neden olabilir. Bu durumda, normal büyüme düzenleyici süreçler kontrolü kaybedebilir ve bu nedenle tümör büyümesini başlatabilir (Leichter vd., 2017).

MikroRNA'ların Wnt sinyal yolları bileşenlerini düzenlediğinin bulunmasının ardından, bu bileşenler üzerine etkili olan miRNA'ların keşfi için çalışmalar hız kazanmıştır. Wnt sinyal yolları ve miRNA'lar gelişimin kritik düzenleyicileri olarak bilinmektedir. Anormal Wnt sinyal yolları ve miRNA seviyeleri, gelişimsel kusurlara ve kanseri de içeren çeşitli insan patolojilerine yol açmaktadır (Song vd., 2015).

MikroRNA'lar kanserlerin başlama ve ilerlemesi de dahil olmak üzere birçok önemli patofizyolojik süreçleri düzenlemektedirler (Liu vd., 2016). Tümör oluşumu ve metastaz sırasında onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak hareket edebilirler (Jiang vd., 2016).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar mikroRNA'ların insan osteosarkomalarında düzensiz bir ifadeye sahip olduklarını göstermektedir (Liang vd., 2013). MikroRNA'lar osteosarkomada hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak işlev görebilmektedir ve hedef genlerin düzenlenmesiyle osteosarkoma hücrelerinin fenotipik özelliğini etkilediği bilinmektedir. Osteosarkoma tümör hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu ve metastazı da miRNA ifadesinden etkilenmektedir (Kumar vd., 2016).

1.3.1. MikroRNA-25

MikroRNA-25 (miR-25) kanser gibi birçok insan hastalıkları ile ilişkisi tanımlanmış mikroRNA'lardan biridir. Minikromozom-idame-proteini-7 (MCM7) geninden transkribe olmaktadır ve olgun miR-25 22 nükleotit uzunluğundadır (Deng vd., 2016).

MikroR-25'in kanser oluşumunu ve çeşitli kanserlerin ilerlemesini düzenlediği yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Li vd.'nin 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada miR-25'in kolon kanseri dokularında ifadesinin düşük olduğunu ve hücre proliferasyonu ve migrasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlar doğrultusunda miR-25'in, kolon kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceği ortaya konmaktadır (Li vd.,2013). Bununla birlikte, melanoma hücre kültürü ve doku numuneleri ile yapılan bir çalışmada miR-25 ifadesinin azalmasının *in vitro* hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda miR-25'in Wnt sinyal yolağının aktivitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Huo vd., 2016). MikroRNA-25'in mide (Kim vd., 2009), prostat (Li vd., 2009) ve karaciğer (Feng vd., 2016) gibi çeşitli insan malign solid tümörlerinde yüksek ifadeye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu tür kanserlerde, miR-25 bir onkogen gibi davranmakta ve potansiyel proliferatif, anti-apoptotik ve hücre döngüsü uyarıcı olarak etkiler ortaya koymaktadır. Bu yüzden farklı kanser türlerinde onkogenik ya da tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceği için, miR-25'in kanser üzerine etkileri karmaşıktır (Qu vd., 2015).

1.4. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı

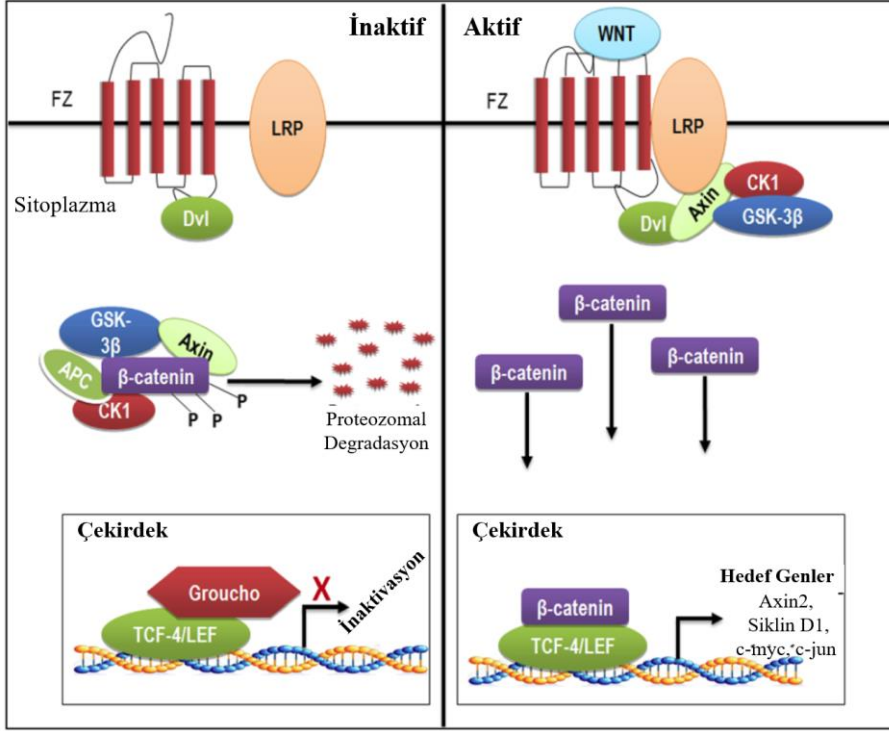
Wnt sinyal yolları evrim boyunca oldukça korunmuş sistemlerdir. Wnt sinyali, temel (kanonik) β -katenin bağımlı Wnt yolu, kanonik olmayan β -katenin bağımsız Wnt/düzlemsel hücre polaritesi (Wnt/PCP) ve Wnt/kalsiyum (Ca^{+2}) yolları olarak sınıflandırılmaktadır. Wnt sinyal yolları embriyonik gelişim sırasında ve aynı zamanda yetişkinlerde bol miktarda hücresel süreçlerde kullanılmaktadır. Wnt sinyal yolları transkripsiyonel düzenlemeden translasyon sonrası modifikasyona kadar her seviyede sıkı bir kontrol altındadır (Song vd., 2015).

Günümüzde insan genomunda tanımlanan 19 Wnt proteini bulunmaktadır ve hücre proliferasyonu, hayatta kalma, migrasyon, hücre akıbetinin belirlenmesi ve kök hücrelerde kendi kendini yenileme gibi farklı süreçlerin düzenlenmesinde önemli rollere sahiptirler (He ve Zhang, 2015). Bunun yanı sıra Wnt sinyal yollarının uygun olmayan şekilde harekete geçmesi birçok kanser türünün ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Liu vd.,2014).

Temel Wnt sinyalinin en önemli aracı olan β -katenin, çekirdekte transkripsiyonun düzenlenmesinde ve hücre-hücre temas kararlılığına katkı sağlayan kavşak bağlantıları da dahil çeşitli subselüler lokalizasyonlarda bulunur.

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı, Wnt ligandı Frizzled (FZD) reseptörlerine ve düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptör-ilişkili proteinler 5/6 (LRP5/6) koreseptörlerine bağlandığı zaman aktive olur (Stratford vd., 2014) ve çekirdek içine β -katenin translokasyonuna yol açan bir hücre içi kaskadını aktive eder (Guo vd., 2007). Wnt-FZD-LRP-5/6 kompleksi Disheveled (Dsh)'ın aktivasyonunu sağlar. Dsh aktivasyonu, GSK-3 β 'yı inhibe eder ve bundan sonra da ubiquitinyasyon ve proteazomal yollar vasıtasıyla β -katenin bozunumunu azaltır. Ayrıca Axin/Adenomatöz polipozis polimer (APC)/Glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β) kompleksinden β -katenin serbest kalır ve sitoplazmada β -katenin birikimine ve stabilizasyonuna sebep olur. β -katenin çekirdeğe transloke olduktan sonra, transkripsiyon faktörlerden T-hücre faktörü/Lenfosit çoğaltan faktör (Tcf/Lef) ailesine survivin, siklin D1, c-Myc, Axin2 ve matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) gibi hedef onkogenleri aktive etmek için bağlanır. Bunlar bir çok insan tümörlerinde kanser hücre proliferasyonu, apoptosiz, hücre döngüsü bozulması ve metastaz ile ilişkilidir (Polakis, 2000; Leow vd., 2010).

Wnt ligand etkileşiminin yokluğunda membran reseptör kompleksi inaktive olur. Böylece Wnt ligand/Fzd/LRP5-6 reseptörlerinden oluşan trimerik kompleksin kümelenmesini önlemekte ve sonunda β -katenin ubiquitinyasyona ve bozunmasına neden olmaktadır. Wnt/Fzd/LRP5-6 karmaşık modeli yaygın olarak kabul edilmekle birlikte, kesin oluşum mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Mevcut ve yaygın olarak kabul gören model, Kazein kinaz 1 (CK1) ve GSK-3 β kinazların, amino asidin ucunda bulunan bir dizi treonin ve serin amino asitlerinin fosforillenmesi yoluyla β -katenini hedef almasıdır. β -kateninin fosforilasyonu belirli bölgelerde eşzamanlı olarak meydana gelmektedir; Ser45 N-terminali, CK1 tarafından fosforile edilirken, Thr41, Ser33 ve Ser37 bölgelerindeki fosforilasyon GSK-3 β tarafından gerçekleştirilir. Bu fosforilasyon faaliyet dizilerinin sonucu yıkım kompleksine APC'nin kazandırılmasına neden olmaktadır. APC proteini yıkım kompleksinin diğer bileşenleri ile sinerji oluşturmakta ve sitoplazmik β -katenin bozunmasına aracılık etmektedir. β -katenin bozununca Wnt hedef genleri transkribe edilememektedir. Bu işlem, sitoplazmik β -katenin seviyesini düşük tutarak β -kateninin çekirdeğe translokasyonunu önlemektedir (Şekil 1.3; Onyido vd., 2016).



Şekil 1.3 Wnt/β-katenin sinyal yolağı (Onyido vd., 2016)

Bozulmuş Wnt/β katenin sinyalinin dejeneratif hastalıklar, metabolik hastalıklar, iskelet bozuklukları, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser ile bağlantısı bulunmaktadır (Stratford vd., 2014, Song vd., 2015). Wnt/β-katenin kök hücre yenilenmesi ve farklılaşmasında ana düzenleyici ve osteosarkoma da dahil olmak üzere birçok kanserde düzensiz bir biçimde aktive olan bir sinyal yolağıdır (Stratford vd., 2014). Wnt/β-katenin sinyali, normal osteoblast farklılaşması ile ilişkilidir ve anormal Wnt/β-katenin sinyali normal kemik gelişimini bozmakta ve osteosarkomada sıkça görülmektedir (Stratford vd., 2014).

1.5. Proliferasyon

Hücrelerin çoğalması ya da proliferasyonu hücre bölünmesi üzerinden gerçekleşmekte ve hücrelerin iki yavru hücreye bölünmesi işlemi hücre bölünmesi olarak adlandırılmaktadır. Normal dokulardaki hücre çoğalması genellikle dokuyu dolduran hücrelerle sınırlanır. Çoğu dokunun bu yenileme fonksiyonuna sahip olan kök hücreler içerdiği düşünülmektedir.

Hücre proliferasyonu hücre döngüsü içinde yer alan bazı kontrol noktaları tarafından düzenlenir. Hücre döngüsü proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi temel hücresel fonksiyonları düzenlemektedir. Bu düzenleme özelliğinin varlığı organizmadaki her türlü fizyolojik ve patolojik durumda (örneğin tümör oluşumu) hücre döngüsünün kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir (Ulukaya., 2001).

Kontrolsüz hücre çoğalması kanserin özelliklerinden biridir. Uzun yıllar boyunca somatik hücrelerde çeşitli mutasyonların birikmesi sonucunda kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünmesini engelleyen kontrol setleri ortadan kalkar. Hücre bölünme hızının tespiti, özellikle kanser gibi hastalıklarda önemlidir; böylece hücre bölünme zamanı gibi parametreler belirlenebilmektedir (Terzioğlu vd., 2013).

Proliferasyon ölçüm testlerini dört ana başlık altında toplamak mümkündür.

1. Deoksiribonükleik asit sentez hızının ölçülmesine dayalı testler: Bu testlerle floresan veya radyoaktif ışımaya özelliği gösteren nükleotit analoglarının yeni sentezlenen DNA zincirine eklenme hızı izlenmektedir. Bu testlerde 5-Bromo-2'-deoksiuridin (BrdU) ve 5-Etini-2'-deoksiuridin (EdU) gibi timidin nükleotit analogları kullanılmaktadır.

2. Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı testler: Bölünme döngüsüne giren hücrelerde metabolik aktivite de artış göstermektedir. Bu nedenle proliferasyon tespitinde sık kullanılan bir yöntemdir (Örneğin MTT, XTT Testleri).

3. Proliferasyon işaretleyicilerinin ölçümüne dayalı testler: Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA) gibi hücre döngüsü ile ilgili faktörlerin hücre içerisindeki miktarlarındaki değişiklikler saptanarak proliferasyon tayini yapılabilmektedir. PCNA gibi proliferasyon spesifik işaretçilere özgü antikorlar kullanılarak testler gerçekleştirilmektedir.

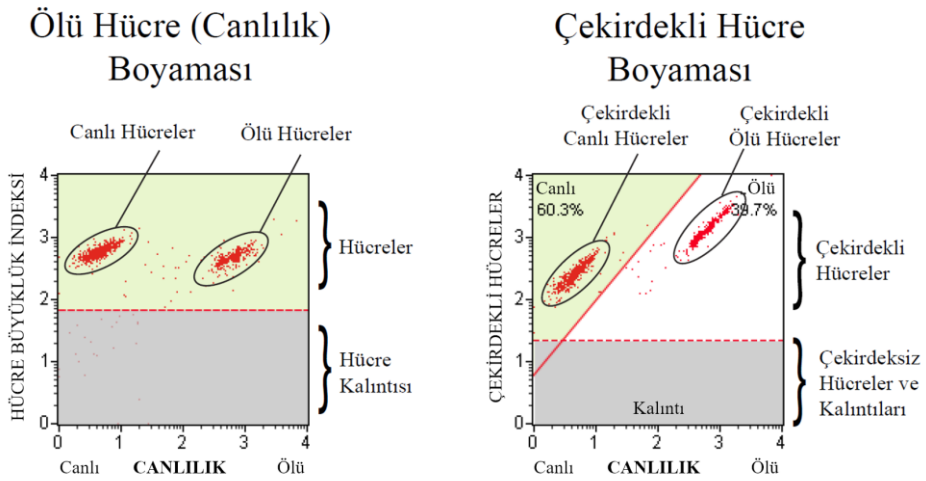
4. Hücrelerdeki ATP miktarının ölçümüne dayalı testler: Hücre bölünmesinin yüksek miktarda adenozintrifosfat (ATP) gerektiren bir süreç olduğu bilinmektedir. Hücre içerisindeki ATP miktarının ölçümü ile hücre proliferasyonu saptanabilmektedir (Örneğin ATP testi).

1.5.1 Hücre Canlılık Analizi

Muse™ Sayım & Canlılık Test Sistemi, Muse™ Hücre Analiz Cihazında hücre sayısının ve yaşayabilirliğinin niceliksel analizine olanak tanımaktadır. Tripan mavisi yerine kullanılabilen hızlı ve güvenilir bir alternatiftir.

Muse™ Sayım & Canlılık reaktifleri, çeşitli memeli hücre hatlarından elde edilen hücre süspansiyonlarındaki mutlak hücre sayısı ve canlılık hakkında veriler sağlamaktadır. Hem canlı hem de canlı olmayan hücreler, reaktandaki DNA bağlayıcı boyalara geçirgenliklerine göre farklı şekilde boyanmaktadır. Muse™ Sayım & Canlılık Yazılım Modülü otomatik olarak hesaplamalar yapmakta ve verileri iki grafik halinde görüntülemektedir.

- 1) Reaktifteki bir DNA bağlama boyası, membran bütünlüğünü kaybetmiş ölü ve ölmekte olan hücrelerin çekirdeğini boyamaktadır. Bu parametre 'CANLILIK' olarak görüntülenir ve yaşayanları (boyanmayan canlı hücreler) cansızlardan (boyanmış ölen ya da ölmekte olan hücreler) ayırt etmek için kullanılmaktadır.
- 2) Zardan geçebilen bir DNA boyama boyası, çekirdekli bütün hücreleri boyamaktadır. Bu parametre 'ÇEKİRDEKLİ HÜCRELER' olarak görüntülenmekte ve çekirdekli hücreleri çekirdeksiz hücrelerden ve hücre artıklarından ayırt etmek için kullanılmaktadır. Doğru hücre toplamını belirlemede serbest çekirdekleri ve hücre artıklarını hücrelerden ayırt etmek için hücresel boyut özelliklerini kullanmaktadır. Daha sonra Muse sistemi boyanmış çekirdekli hücreleri hesaplamaktadır (Şekil 1.4, Muse™ Sayım & Canlılık Kiti Kullanım Kılavuzu).



Şekil 1.4 Muse™ Sayım & Canlılık Test Sistemi analiz görüntüsü

1.6. Apoptoz

Apoptoz ilk kez Kerr vd. tarafından 1972 yılında tanımlanan programlanmış hücre ölüm yolağıdır (Kerr vd., 1972). Apoptoz embriyogenez, metamorfoz ve hücrel homeostazda önemli rol oynayan ve genetik olarak kontrol edilen bir süreçtir ve enfekte, hasar görmüş veya mutasyona uğramış hücrelerin uzaklaştırılması için bir savunma mekanizmasıdır (Srivastava, 2007). Apoptoz; hücre küçülmesi, çekirdek yoğunlaşması ve fragmentasyonu, dinamik membran bleb (kabarcık) oluşumu, ekstraselüler matriks ya da komşular ile adezyon kaybı gibi spesifik morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile karakterizedir (Ouyang vd., 2012).

Memeli hücrelerinde apoptoz iki farklı moleküler yol ile oluşmaktadır. Dahili veya mitokondriyal yol, hücre içi olaylarla aktive edilmekte ve mitokondriden pro-apoptotik faktörlerin salınmasına bağlıdır. Kanserle karşı standart kemoterapi ve radyoterapi esas olarak dahili yolak aracılığıyla apoptozu başlatmakta ve bu nedenle dahili apoptoz sinyalinin kaçabilen kanser hücrelerini seçebilmektedir. Aksine, harici apoptoz yolu ise, hücre dışı protein ölüm ligandlarının pro-apoptotik ölüm reseptörlerine bağlanması yoluyla sinyalleri almaktadır. Bazı kanser türleri harici apoptoz yolunu takip etmekte ve dahili apoptozun olmadığı durumlarda da hücre ölümü gerçekleşmektedir. Her iki yol da kaspazlar adı verilen

özel proteazların aktivasyonuna yol açar. Kaspaz enzim kaskadının aktivasyonu apoptozun morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Sayers, 2011).

Çok hücreli organizmalar, artık gerekli olmayan veya hasar gören hücreleri apoptoz olarak bilinen bu hücre intihar yolağı tarafından kontrollü olarak elimine edilmesiyle homeostazı sürdürürler. Apoptotik hücre ölüm mekanizmalarının düzensiz işlemesi, çeşitli insan hastalıklarında önemli bir patolojik faktördür. Bu yola uygun şekilde müdahale edilmemesi, kanser gelişiminin ve ilerlemesinin ayırt edici özelliklerinden biridir ve birçok kanser hücresi apoptoz sinyaline karşı belirgin direnç göstermektedir. Bunun yanında, kanser hücreleri, apoptozu sınırlayan moleküler modifikasyonlar kazanmış olmasına rağmen, yine de genomik ve diğer anormallikler vasıtasıyla bu yolu başlatmaya sürüklenir. Bu nedenle, apoptoz üzerindeki bu moleküler blokların atlanabildiği ya da kaçınılabildiği durumlarda, kanser hücreleri normal hücrelere göre apoptoza karşı daha duyarlı olabilir (Sayers, 2011).

1.7. Real-Time PCR

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR), hedef DNA molekülünü çoğaltırken reaksiyon sırasında ortaya çıkan floresanı her bir PCR döngüsü boyunca ampikon üretiminin bir göstergesi olarak (yani, gerçek zamanlı olarak) ölçmek için kullanılan bir yöntemdir (Higuchi vd., 1992).

Real-Time PCR sistemi, bir floresan belirtecin tespiti ve miktar tayini üzerine kurulmuştur. Bu sinyal bir reaksiyonda PCR ürününün miktarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır. Her PCR döngüsünde floresan emisyonunu kaydetmek suretiyle, PCR ürününün miktarındaki ilk önemli artışın hedef şablonun başlangıç miktarı ile korele olduğu logaritmik faz boyunca PCR reaksiyonunu izlemek mümkündür. Nükleik asit hedefinin başlangıç kopya sayısı ne kadar yüksek olursa, floresanda belirgin bir artış gözlenir. 3-15 döngü sırasında ölçülen başlangıç değerinin üstünde floresanda belirgin bir artış, birikmiş PCR ürününün saptanmasına olanak sağlar (Lee vd.1993, Livak vd.,1995).

DNA amplifikasyonu için üç ana floresan izleme sistemi vardır. Bunlar hidroliz problemleri, hibridizasyon problemleri ve DNA-bağlayıcı ajanlardır (van der Velden vd., 2003).

Daha ucuz alternatif, sıra dışı spesifik bir floresan interkalasyon ajanı (SYBR-green I veya etidyum bromid) kullanılarak ampikon üretiminin (spesifik olmayan amplifikasyon ve primer-dimer kompleksi dahil) miktarını belirleyen çift zincirli DNA bağlama boyası kimyasıdır. Bu boyalar tek zincirli DNA'ya bağlanmazlar. SYBR green, solüsyon halindeyken çok az floresan gösteren, ancak çift zincirli DNA'ya bağlandığında güçlü bir floresan sinyali veren florojenik bir boyadır (Morrison vd.,1998).

Eşik döngüsü veya C_T değeri, reaksiyonda belirgin bir artışın ilk tespit edildiği döngüdür. C_T parametresi, floresan emisyonunun sabit eşiğin üstünde olduğu döngü sayısı olarak da tanımlanır. Eşik döngüsü, sistem log-lineer faz boyunca PCR ürününün üstel büyümesi ile ilişkili floresan sinyalindeki artışı tespit etmeye başladığında geçerlidir.

Bağıl gen ifadesi karşılaştırmaları, seçilen endojen kontrolün (housekeeping) gen ifadesini daha bol olduğunda ve numuneler arasında toplam RNA ile orantılı olarak sabit kaldığında en iyi çalışmaktadır. Aktif bir referans olarak değişmez bir endojen kontrol kullanılarak, her bir reaksiyona eklenen toplam RNA miktarındaki farklılıklar için bir mRNA hedefinin miktar tayini normalize edilebilmektedir. Bu amaçla kullanılan, en yaygın endojen kontroller 18S rRNA, GAPDH (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) ve β -aktin'dir (Radonic vd., 2004).

Bu normalizasyon işlemi ΔC_T metodu olarak adlandırılmakta ve farklı örnekler arasında ilgilenilen genin ifadesinin karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Bağıl miktar ölçümünde en yaygın yöntem $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemidir. Normalizasyon işlemi hedefin C_T değerleri ile endojen kontrolün C_T değeri arasındaki fark ile başlamaktadır:

$$\Delta C_T = C_T (\text{hedef gen}) - C_T (\text{endojen kontrol})$$

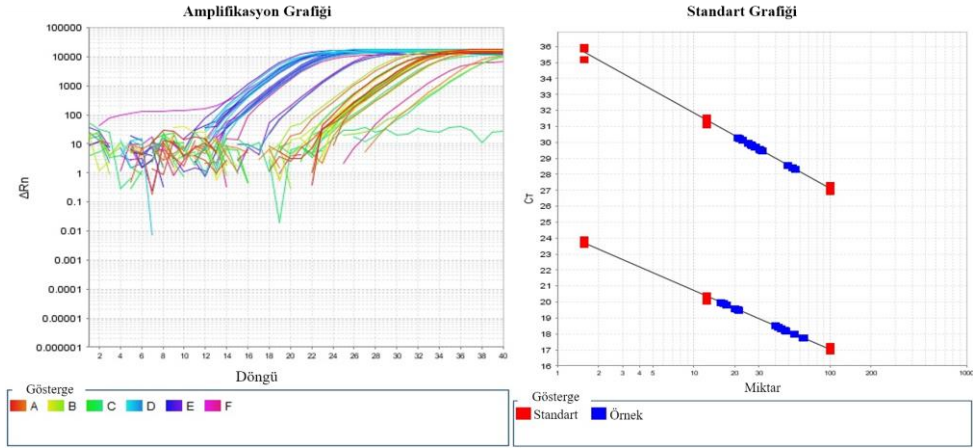
Bu değer, reaksiyondaki her bir örnek için ayrı ayrı hesaplanmaktadır. Bu örneklerden bir tanesi (örneğin ilaç uygulaması yapılmamış örnek) referans olarak seçilmektedir. Karşılaştırmalı $\Delta\Delta C_T$ hesaplaması, her bir örneğin ΔC_T değeri ile referans örneğin ΔC_T değeri arasındaki farkı bulmayı amaçlamaktadır.

$$\Delta\Delta C_T = [C_T (\text{hedef gen}) - C_T (\text{endojen kontrol})] - [C_T (\text{referans örneğe ait gen}) - C_T (\text{referans örneğe ait endojen kontrol})]$$

Hesaplama son adım bu değerleri mutlak değerlere dönüştürmektir. Bunun için (her döngüde %100 verimlilik veya ürünün iki katına çıkması varsayılarak):

$$\text{Karşılaştırmalı ifade seviyesi} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

formülü kullanılarak hesaplanmaktadır (Livak ve Schmittgen, 2001).



Şekil 1.5 Real-Time PCR amplifikasyon ve standart grafikleri

1.7.1. Real-Time PCR ile MikroRNA Analizi

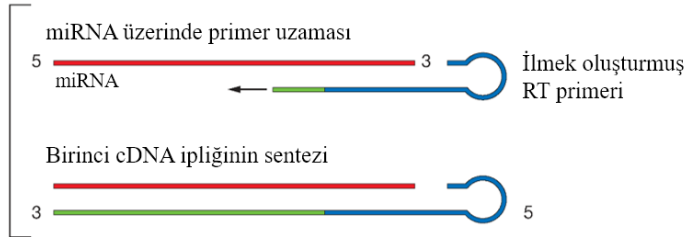
MikroRNA analizleri Kök-ilmek (stem-loop) Revers Transkripsiyon (RT) temelinde çalışmaktadır. Kök-ilmek RT primerleri, RT-PCR verimliliği ve özgünlüğü bakımından geleneksel primerlerden daha verimlidir. TaqMan miRNA test sistemleri, olgun miRNA'lar için spesifiktir ve bir nükleotit kadar küçük farklılık gösteren ilgili miRNA'ları bile ayırt edebilmektedir. Dahası, genomik DNA kontaminasyonundan etkilenmemektedirler. Çoğu miRNA için 25 pg'lık az miktardaki total RNA ile rutin olarak kesin miktar tespiti yapılabilmektedir. Bu yöntemin yüksek duyarlılığı, özgüllüğü ve hassasiyeti, nükleik asit saflaştırılması olmaksızın tek bir hücrenin doğrudan analizine olanak sağlamaktadır (Chen vd., 2005).

1.7.1.1. TaqMan MikroRNA Test Sistemi

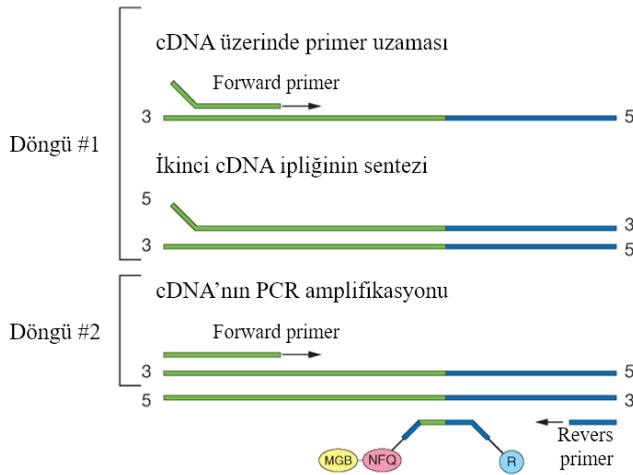
TaqMan MikroRNA Test Sistemleri ile miRNA analizi iki basamaklı RT-PCR kullanılarak yapılmaktadır. İlk olarak ters transkripsiyon (RT) basamağında cDNA, TaqMan MikroRNA Test Sistemlerinden spesifik miRNA primerleri ve TaqMan MikroRNA Revers Transkripsiyon Kit'teki reaktifler kullanılarak total RNA numunelerinden ters transkribe edilmektedir.

İkinci basamak olan PCR aşamasında PCR ürünleri, TaqMan Universal PCR Master Mix ile birlikte TaqMan MikroRNA Test Sistemi kullanılarak cDNA örneklerinden amplifiye edilmektedir.

Adım 1: Revers Transkripsiyon



Adım 2: Real-Time PCR



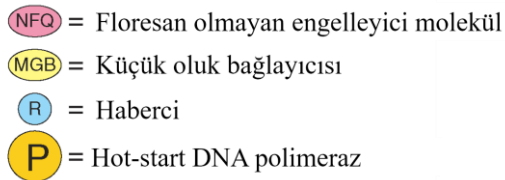
Şekil 1.6 MikroRNA Revers transkripsiyon ve Real-Time PCR aşamaları (Taqman MikroRNA Test Sistemleri Kullanım Klavuzu)

Her bir TaqMan MikroRNA Tets Sisteminde 2 tüp bulunmaktadır.

- 1 tüp: miRNA-spesifik RT primeri (5X)
- 1 tüp: – miRNA-spesifik forward PCR primeri
 - spesifik revers PCR primeri
 - MikroRNA-spesifik TaqMan MGB (minor groove binder) probu

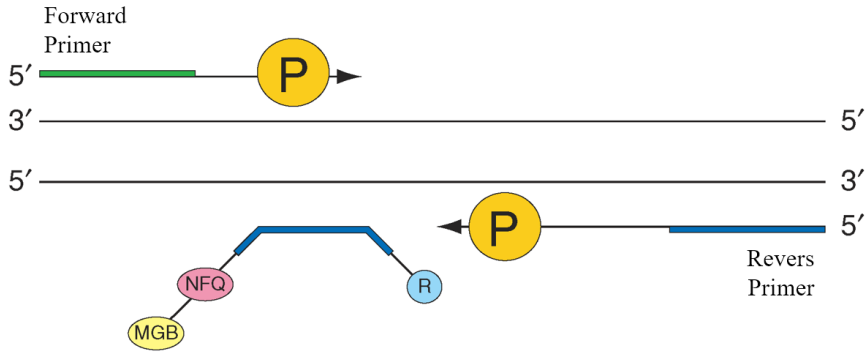
TaqMan MGB probu, 5' ucuna bağlı bir raportör boyası (FAM™ boyası) ve 3' ucunda küçük bir oluk bağlayıcı prob (MGB) içermektedir. Bu modifikasyon, prob uzunluğunu artırmadan erime sıcaklığını (Tm) artırmakta (Afonina vd., 1997; Kutuyavin vd., 1997), bu da daha kısa problemlerin tasarımına izin vermektedir. Probu 3' ucunda raportör boya verilerinin daha doğru ölçülebilmesine olanak sağlayan bir floresan engelleyici molekül (söndürücü=Nonfluorescent Quencher=NFQ) bulunmaktadır.

5' nükleaz aktivite süreci PCR amplifikasyonu sırasında gerçekleşmektedir. Bu işlem her döngüde gerçekleşir ve ürün birikmesine etki etmez.

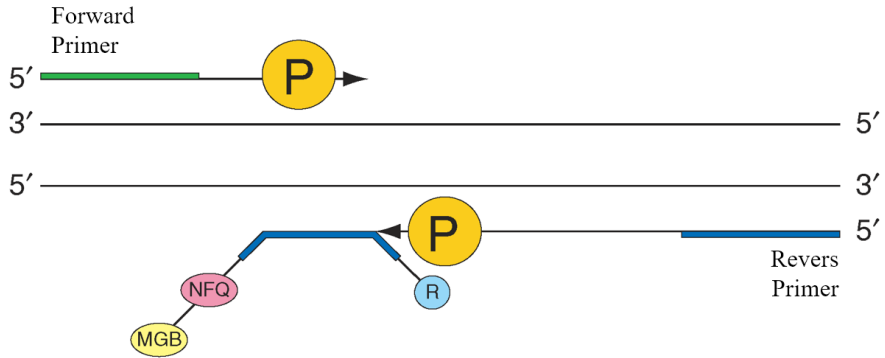


Şekil 1.7 PCR reaksiyonu şekillerinde kullanılan işaret ve kısaltmalar (TaqMan MikroRNA Test Sistemleri Kullanım Klavuzu)

PCR sırasında TaqMan MGB probu, özellikle forward ve revers primer arasındaki tamamlayıcı bir diziyeye bağlanmaktadır (Şekil 1.8–1.9).

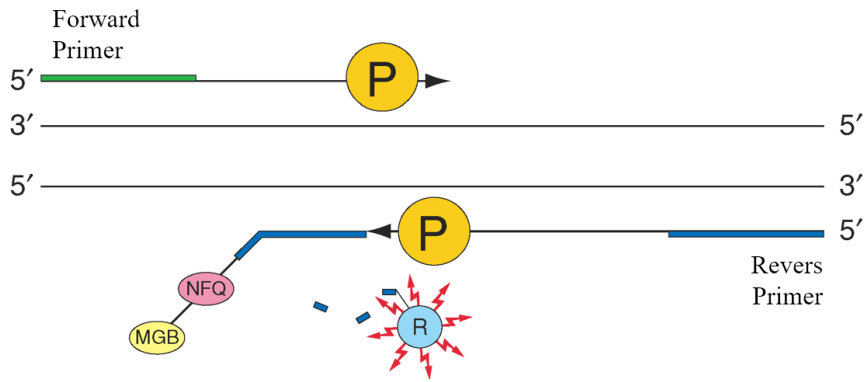


Şekil 1.8 MGB prob bağlanması ve polimerizasyon (TaqMan MikroRNA Test Sistemleri Kullanım Klavuzu)



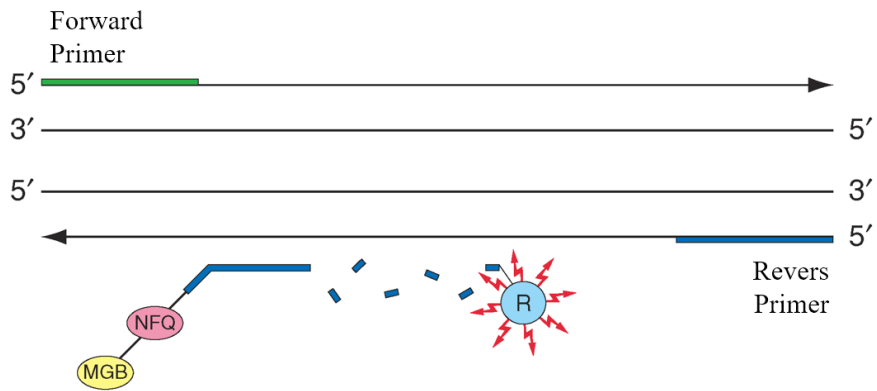
Şekil 1.9 İplik uzaması (TaqMan MikroRNA Test Sistemleri Kullanım Klavuzu)

DNA polimeraz sadece hedefe hibridize olmuş problemleri kesebilir. Bu kesim, raportör boyayı engelleyici boyadan ayırır. Ayrılma sonucunda raportörün ortamda birikmesiyle floresan artışı gerçekleşir. Floresan sinyalindeki artış, ancak hedef dizi proba tamamlayıcı ve PCR sırasında amplifiye edildiğinde ortaya çıkmaktadır. Bu gereklilikler nedeniyle, spesifik olmayan amplifikasyon tespit edilmez (Şekil 1.10).



Şekil 1.10 DNA polimeraz işlevi (TaqMan MikroRNA Test Sistemleri Kullanım Klavuzu)

Zincirin polimerizasyonu devam etmekte, ancak probun 3' ucu bloke edildiği için, PCR sırasında probun uzaması gibi bir durum söz konusu değildir (Şekil 1.11).



Şekil 1.11 Polimerizasyonun tamamlanması (TaqMan MikroRNA Test Sistemleri Kullanım Klavuzu)

Karşılaştırmalı C_T yönteminde TaqMan endojen kontrolleri, PCR reaksiyonlarına konulan cDNA miktarındaki farklılıkları normalize etmek için kullanılmaktadır (Taqman MikroRNA Test Sistemleri, Applied Biosystem).

1.8. Western Blotlama

Western blotlama jel elektroforezinin ayırıcı gücü ile antikor özgülüğünü birleştiren hücre biyolojisi ve moleküler biyolojide kullanılan önemli bir tekniktir. Bu yöntem kullanılarak hücrelerden ekstrakte edilen protein komplekslerinden spesifik proteinleri tanımlamak mümkündür.

Bu teknikte 3 ana unsur yer almaktadır. Bunlar; 1)proteinleri büyüklüklerine göre ayırmak, 2) sabit bir yüzeye transfer etmek, 3) uygun birer primer ve sekonder antikor kullanarak hedef proteini işaretleyerek görünür hale getirmek.

Proteinlerin elektroforetik ayrımı genellikle poliakrilamid jellerde yapılmaktadır. Protein karışımı jele yüklenip elektrik akımı verildiğinde küçük moleküller büyüklere kıyasla jelde daha hızlı ilerlemektedir. Protein karışımını ayırıştırıcı en güçlü teknikte, proteinler jel elektroforezinden önce ve sonra iyonik bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) ile muamele edilmektedir. SDS, hidrofobik yan zincirlere bağlanıp proteinin kararlı konformasyonuna katkı yapan hidrofobik etkileşimleri bozarak proteinleri kısmen denatüre etmektedir. SDS işlemi doğal yapılarıdaki şekil farklılıklarını elimine ettiğinden, kütleyle karşılık gelen zincir uzunluğu, proteinlerin SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) ilerleme hızını belirleyen ana faktördür. Bu yöntemle moleküler ağırlıkları yüzde 10'dan az farklılık gösteren zincirler bile ayrılabilir (Lodish vd., 2011).

SDS-PAGE ile molekül ağırlığına göre ayrılan proteinler, boyama yapılmaksızın sabit bir yüzeye (membrana) aktarılmaktadır. Western blotta sıklıkla nitroselüloz membran veya polivinilidindiflorit (PVDF) membran kullanılmaktadır (Petrasovits, 2014). Bu tip saptamaların jelden çok membran üzerinde yapılmasının önemli nedenleri vardır: Belirteçler (örneğin, antikorlar) membran yüzeyindeki proteinlerle daha kolay etkileşir, böylece jelin içinde gömülü durumda iken saptanamayan, ancak membrana aktarıldıktan sonra yüzeyde toplanan çok az miktardaki proteinler de kolaylıkla belirlenebilmektedir. Böylece işlemler daha az belirteçle daha kısa sürede gerçekleştirilmektedir (Temizkan ve Arda, 2008).

Daha sonra istenen proteini tanımlamak amacıyla iki farklı antikor kullanılmaktadır. Birinci antikor (primer antikor) istenen proteine spesifiktir. İkinci antikor (sekonder antikor) ise birinci antikora bağlanan ve birinci antikorun

tespitini sağlayacak bir enzim veya diğerk bir moleküle bağılı olan bir antikordur. İkinci antikor seçimi birinci antikorun geliştirildiğı canlıya bağılıdır. Yani birinci antikor hangi canlının antijenine karşı geliştirilmişse, ikinci antikor da yine o canlıya ait olmalıdır. İkinci antikora bağılanan enzimler ya görünen renkli bir ürün ya da kemiluminesans adı verilen süreçle, film veya hassas bir dedektör tarafından kolaylıkla saptanan ışık üretmektedirler (Lodish vd., 2011). Nitro-blue tetrazolium klorit (NBT) ve 5-bromo-4-kloro-3'indolilfosfat p-toluidin tuzu (BCIP) solüsyonu antikor problemleri için popüler bir enzim kojugatıdır ve alkale fosfataz (AP) ile reaksiyona girdiğinde çözünmez siyah-mor renk ortaya çıkararak bantların membran üzerinde görünürlüğünü sağlamaktadır (Invitrogen).

Bu çalışmada Saos-2 osteosarkoma hücre hattında anti-kanser özellikleri bilinen baicaleinin ve miR-25'in Wnt/ β -katenin sinyal yolağına, hücre proliferasyonuna ve apoptoz üzerine etkileri incelenmiştir. Baicalein uygulamasının miR-25 ifadesi üzerindeki etkisi ile Wnt/ β -katenin sinyal yolağında yer alan genlerin ifadesi arasındaki ilişki araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kanser, dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden ve büyük küresel sağlık sorunlarından biridir. Kemoterapi kanser hastalarının tedavisinde tümör hücrelerini kontrol altına almada önemli bir rol oynamaktadır. Ancak kemoterapi ajanlarının normal doku hücrelerinde sebep olduğu çeşitli yan etkiler, kanser tedavisinde yan etkileri az ve yüksek etkinliğe sahip yeni ilaçların bulunmasını gerektirir.

Doğal bileşiklerin anti-kanser terapide önemli rol oynadıkları iyi bir şekilde ortaya konmuştur. Birçok çalışma bu doğal bileşiklerin tümör-ilişkili sinyal yollarını modüle etme ve bu özelliklerinin anti-kanser etkileri ile ilişkisindeki kabiliyetlerine odaklanmıştır. Doğal bileşiklerin bazıları Wnt/ β -katenin sinyal yolağını düzenleyebilmektedir. Farmokolojik aktiviteleri ile ilgili birçok kanıt bulunan baicalein güçlü antitümör aktivitesi ve düşük toksik etkileri nedeni ile son yıllarda çalışmalar yapılan bileşiklerden biridir.

Mu vd. (2016) baicaleinin mide kanserinde hücrelerin büyümesini inhibe ettiğini ve Bcl-2 protein seviyesini düşürüp Bax protein seviyesini artırarak hücre apoptozunu indüklediğini göstermişlerdir.

Baicalein ile yapılan bir başka çalışmada ise hücre apoptozuna öncülük eden mitokondriyel fragmentasyonu indüklediği gösterilmiştir (Ye vd., 2015).

Meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücreleri ile yapılan çalışmada baicaleinin doz ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu (istila) baskıladığı sonucu ortaya konmuştur. Aynı çalışmada çıplak (nude) farelere uygulanan yabancı doku aşısı yöntemi ile de baicaleinin *in vivo* tümör metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (Ma vd., 2016).

Zhang vd. (2013), baicaleinin siklin-D1 ve siklin-bağımlı-kinaz-4 ifadesini düşürerek osteosarkoma hücre büyümesini inhibe ettiğini ve bunu takiben hücre döngüsü ilerlemesini bölünmenin G1 fazında bloke ettiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda baicalein uygulamasının kaspaz-3'ün aktivasyonuna, Bcl-2 ifadesinin azaltılmasına ve Bax ifadesinin artmasına sebep olarak apoptoz üzerinde etkili olduğunu bildirmektedirler. Ayrıca baicaleinin MMP-9 ve MMP-2 ifadesini

düşürerek osteosarkoma hücrelerinin migrasyon ve invazyonunun düşüşüne sebep olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2016).

Ma vd. (2016), baicaleinin meme kanseri hücre hattında Wnt/ β -katenin yolağındaki hedef genlerin transkripsiyon seviyelerini ve β -katenin ve Wnt1 proteinlerinin ifadelerini azaltarak düzenlediğini göstermişlerdir.

Aktive olan Wnt/ β -katenin sinyali c-Myc gen transkripsiyonunu indüklemekte ve osteosarkoma gelişimine katkıda bulunan osteositlerde karsinomatöz değişikliği sebep olmaktadır. MG-63 osteosarkoma hücreleri ile yapılan çalışmada baicaleinin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve Wnt sinyali ile c-Myc genini hedef alarak apoptozu indüklediği ortaya konmuştur (He ve Zhang, 2015).

Fare meme bezlerinde Wnt'lerin onkogenik aktivitesinin keşfedilmesinin ardından, kanserdeki Wnt sinyal yollarının kompleks rolleri değerlendirilmeye başlanmıştır. Geliştirilmiş ilaç keşfi platformları ve yeni teknolojiler, klinik öncesi modellerde Wnt sinyalini değiştirecek ajanlar keşfedilmesini kolaylaştırmıştır ve böylece insanlarda klinik çalışmalara başlanmıştır. Temel Wnt sinyal aktivasyonu apoptozdaki azalmayla ilişkilendirilmiştir (Ma vd., 2013). İlk olarak *Xenopus* embriyolarında bir Wnt sinyalinin önleyicisi olarak tanımlanan Axin'in doğrudan APC, β -katenin ve GSK-3 β 'ya bağlandığı gösterilmiştir. *Xenopus*, *Drosophila* ve kültüre alınan memeli hücrelerindeki *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla Axin'in β -katenin seviyesinin azaltılmasında merkezi bir önemi olduğu gösterilmiştir (Polakis vd., 2000).

Son birkaç yıldır, miRNA'ların transkripsiyon sonrası seviyede gen ifadelerinin düzenleyicileri olmalarının yanı sıra, sinyal molekülleri ile etkileşerek hücre fonksiyonlarına etki eden yapılar olarak da tanımlanmaktadır. MikroRNA'lar, gelişimleri ve hastalık ilerlemesi üzerinde yaygın etkilere neden olabilecek özelliklerinden dolayı birçok hastalıkla birlikte araştırılmıştır (Onyido vd., 2016). Artık, miRNA'ların kanserde kritik rol oynadığı yaygın olarak bilinmektedir. Kanser gelişimiyle ilişkili anormal miRNA ifadesi, her biri erken gelişimi büyük ölçüde değiştirebilen ve çocukluk çağındaki kanserlerin patogenezinin neden olabilecek kritik bir olay olan bir dizi farklı mekanizma aracılığıyla ortaya çıkabilmektedir (Leichter vd., 2017).

MikroRNA'ların kanser ile ilişkisi, kanserdeki miRNA terapötikleri kanserlerin başlama, ilerleme, anjiyogenez, epitelyal-mezenşimal geçiş ve metastazında miRNA'ları hedef alması ya da taklit etmesi ile ilişkilidir. MikroRNA aktivitesinin inhibisyonu, RNA, DNA ve DNA analogları (miRNA antisens tedavisi), küçük molekül inhibitörleri, miRNA süngerleri veya miRNA maskeleyesi yoluyla miRNA inhibitörleri ve oligomerleri kullanılarak kolayca sağlanabilmektedir. Aynı zamanda, miRNA fonksiyonunun artırılması (miRNA replasman tedavisi), miRNA dizilerini taşıyan plazmit veya lentiviral vektörler gibi modifiye miRNA mimikleri kullanılarak başarılabilmektedir (Gambari vd., 2016).

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı bileşenleri ile miRNA'lar arasındaki etkileşim sonucu farklı kanser türlerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağında bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. MikroRNA'lar hedef genlerin ifadelerini düzenleyerek gelişim ve hastalıklarda temel rol oynamaktadırlar (Anton vd., 2011).

Kanser araştırmaları miR-25'in kanser oluşumunu ve çeşitli kanserlerin ilerlemesini düzenlediğine işaret etmektedir. Kolon kanseri doku ve hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, miR-25 ifadesi artışının hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe ettiğini ve Smad7'yi hedefleyerek bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceği ortaya konmuştur (Li vd., 2013).

Meme kanseri hücre hatları ile yapılan bir başka çalışmada ise Smad7'nin β -katenini stabilize ederek hücre adezyonunu teşvik ettiğini ve dolayısıyla plazma zarında β -katenin-E-kadherin kompleks seviyesini artırdığını göstermişlerdir. Aynı zamanda Smad7-Axin etkileşiminin GSK-3 β ve β -katenini Axin'den ayırdığını ve bir E3 ligaz olan Smurf2'nin β -katenin ile etkileşimini inhibe ederek β -katenini fosforilasyon ve bozunumdan koruduğunu bildirmişlerdir (Tang vd., 2008).

Bir başka çalışma, miR-25'in, tiroid karsinomada hücre proliferasyonu ve yayılımında rol alan onkogen EZH2'yi hedefleyerek hücre proliferasyonunu ve koloni oluşumunu inhibe edebildiğini bildirmiştir (Esposito vd., 2012). Aynı zamanda insan meme kanseri hastalarından alınan dokular ile yapılan bir başka çalışmada ise GSK-3 β 'nin EZH2 ile etkileşime girerek onkogenik fonksiyonlarını ve enzimatik aktivitesini baskıladığı bildirilmiştir (Ko vd., 2016).

Yumurtalık kanseri teşhisi konmuş hastalar ile yapılan çalışmada, bu kişilerde miR-25 ifadesinin önemli ölçüde azalmış olduğu ve yumurtalık karsinogenezinde ve kemoterapi direncinde rol aldığı keşfedilen Wnt sinyalini hedef aldığını ortaya koymuşlardır (Langhe vd., 2015).

Anton vd. (2011) miR-25'in Wnt yolağının aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini doğrulamışlardır. MikroRNA-25 bu etkisini β -kateninin kodlama dizinini hedefleyerek β -katenin seviyesinde ortaya koymaktadır. Böylece, miR-25 ifade artışı, hayatta kalmaları için sürekli β -katenin sinyalizasyonuna bağımlı olduğu bilinen insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir.

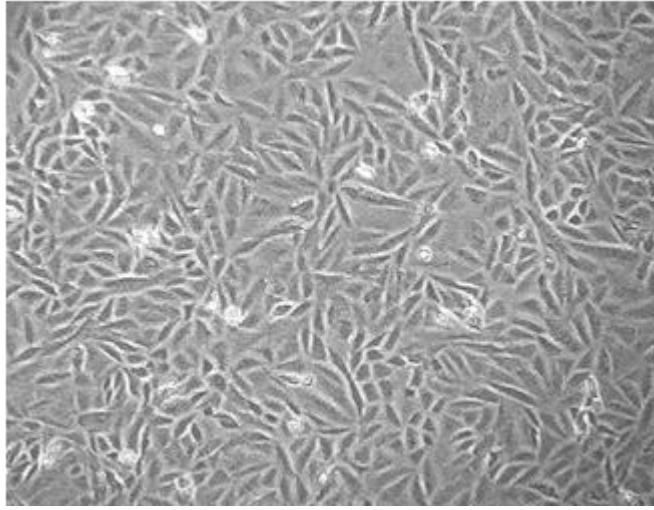
MikroRNA-25, insan prostat kanseri hücrelerinin yüksek osteotropik kanser kök/progenitör alt popülasyonunda ciddi bir biçimde azalmaktadır (Zoni vd., 2105). MikroRNA-25'in aşırı ifadesi metastatik yayılımı azaltmakta, böylece miR-25'in kanser kök hücre oluşumu ve kemik metastazlarında kilit düzenleyicisi olduğu fikrini desteklemektedir (Zoni ve van der Pluijm., 2016).

MikroRNA'ların osteosarkomada farklı gen ifadesi modellerine dayanarak, çok sayıda miRNA, teşhis potansiyeli olmasından dolayı biyolojik belirteç olarak tanımlanmaktadır. Son yıllardaki araştırmalar, mikroRNA'ların serumda ve diğer vücut sıvılarında serbestçe dolaşımında olduğunu ve hücre dışındaki formlarının son derece kararlı olduğunu göstermiştir (Ouyang vd., 2013; Mishra, 2014; Li vd., 2015). Dolaşımdaki miRNA'lar dokuya özgü özellikte olduğu için metastazın orijinini belirlemede kullanılabilir (Mitchell vd., 2008) ve kanserler için girişimsiz (noninvaziv) biyolojik belirteç olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptirler (Lian vd., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Hattı

Çalışmada 1973 yılında 11 yaşında beyaz kız çocuğuna ait primer osteosarkomadan köken alan Saos-2 hücre hattı kullanılmıştır (Fogh vd., 1977). Hücre hattı Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilmiştir (Saos-2/An1, HÜKÜK no: 02111901).



Şekil 3.1 Saos-2 hücre hattı (Faz-kontrast mikroskop görüntüsü, 100X)

3.2. Hücre Hattı Kültür Koşulları

Saos-2 hücrelerinin büyümesini sağlamak amacı ile McCoy's 5A (Biological Industries) besi yeri içerisine %15 Fetal Sığır Serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific) ve %5 Penisilin-Streptomisin (Biological Industries) eklenerek kullanılmıştır.

Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik kültür kaplarında 37 °C'de %5 CO₂ ve %96 nem içeren etüvde inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Kültür kaplarındaki besi yerleri 2 günde bir tazelenmiştir.

Çoğalan hücreler kültür kabının yüzeyini kapladıktan sonra pasajlama işlemine geçilmiştir. Pasajlama işlemi için kültür kabı içerisindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve kültür kabında bulunan hücre yüzeyi 1X PBS ile yıkanmıştır. 25 cm²'lik kültür kaplarına 1 ml, 75 cm²'lik kültür kaplarına 3 ml Tripsin-EDTA eklenmiş ve hücreler 5 dakika etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kültür kabının yüzeyinden ayrılan hücreler üzerine kullanılan Tripsin-EDTA'nın 5 katı besi yeri (Tripsin-EDTA aktivitesini durdurmak için) ilave edilmiş ve 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 800 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti besi yeri ile resüspanse edilerek yeni kültür kaplarına aktarılmıştır.

Hücrelerin bir kısmı stok olarak saklanmak üzere %10 dimetilsülfoksit (DMSO) ve %20 FBS (Fetal Sığır Serumu) içeren besi yeri ile 2 ml'lik tüplere aktarılmış ve -80 °C'de bir gece dondurulduktan sonra sıvı azot tankına alınarak stok olarak saklanmıştır.

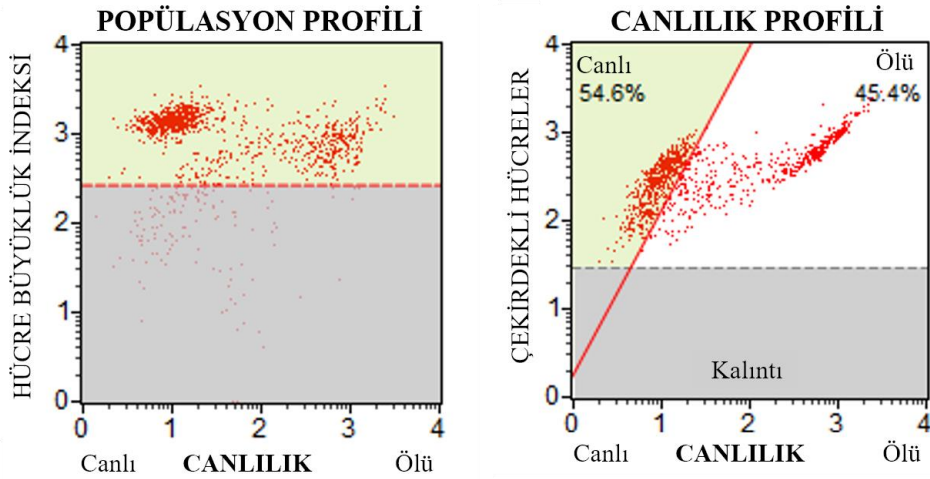
3.3. Baicalein Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan baicalein (%98, 465119, Sigma-Aldrich) toz halde temin edilmiştir. Baicalein çözeltisinin hazırlanması aşamasında çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. Konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde baicalein stok çözeltisi hazırlanmış ve besi yeri ile seyreltmeler yapılmıştır. İlaç uygulaması 24. ve 48. saatler için yapılmıştır.

3.4. Hücre Proliferasyonunun Saptanması

Hücre proliferasyonunun belirlenmesi için Muse Sayım & Canlılık Kiti kullanılarak ölçümler Muse hücre analiz cihazında (Merck Millipore) yapılmıştır. Canlı hücre saptanması, ölü hücrelerin hücre zarlarını doğrudan geçen ve DNA'ya bağlanan propidyum iyodit boyası temelinde saptanmaktadır. Muse™ Sayım & Canlılık Kiti kullanılarak hücre canlılığı ile uygulanan dozlar arasındaki ilişki belirlenmiştir. Uygulamalar aşağıdaki protokole göre 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

1. Proliferasyon deneyleri için 6-kuyucuklu-plaklar içerisine her kuyucuğa 200.000 hücre aktarılmıştır.
2. Deneyler en az üç bağımsız tekrarlı olarak yapılmış olup, baicaleinin artan konsantrasyonlarda uygulaması yapılmıştır. Kullanılan baicalein dozları sırasıyla 4-10-15-20-40 ve 80 μM 'dır.
3. Kimyasal uygulama gruplarının yanı sıra iki adet kontrol grubu kullanılmıştır. Bu gruplardan bir tanesi besi yeri ilaveleri ve ilgili hücreyi içerirken; diğer kontrol grubu ise baicaleinin solüsyon haline getirilmesi sırasında çözücü olarak kullanılan DMSO'nun uygulamadaki en yüksek konsantrasyonda bulunan miktarını içermektedir.
4. Uygulanan baicalein konsantrasyonlarının hücre bölünmesini durdurucu etkisi ve hücrelerdeki ölüm oranı 24. ve 48. saatler için belirlenmiştir.
5. Baicalein uygulamasının ardından 24. ve 48. saatlerde hücreler 500 μl Tripsin-EDTA ile 5 dakika etüvde inkübe edilerek tutundukları yüzeyden kaldırılmıştır. Üzerlerine besi yeri eklendikten sonra santrifüj tüplerine aktarılarak 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak hücreler 100 μl besiyeri içerisinde resüspanse edilmiştir.
7. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 50 μl alınarak 450 μl Muse Sayım & Canlılık Kit solüsyonu ile mikrosantrifüj tüpü içerisinde 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
8. Süre sonunda tüp Muse hücre analiz cihazına yerleştirilerek protokol başlatılmıştır.
9. Öngörülen protokole göre öncelikle hücre büyüklüğü baz alınarak hücre popülasyonu saptanmış ve hücre popülasyonunun dışında kalan ölçümler (hücre olmayan kalıntıları elimine etmek için) kalıntı olarak işaretlenip hesaplama dışı bırakılmıştır.
10. Sonraki aşamada canlı ve ölü hücrelerin ayrımı canlılık profilinde işaretlenerek analize devam edilmiştir.
11. Analiz sonucu total hücre içerisindeki canlı ve ölü hücre yüzdeleri grafik olarak raporlanmıştır (Şekil 3.2).
12. Hücre analiz cihazından elde edilen sonuçlara göre uygulanan doz ile hücre canlılığı arasındaki ilişki, çözücü olarak kullanılan DMSO uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırma yapılarak belirlenmiştir.
13. Hesaplamalar doğrultusunda %50 inhibisyon dozu IC_{50} konsantrasyonu olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).

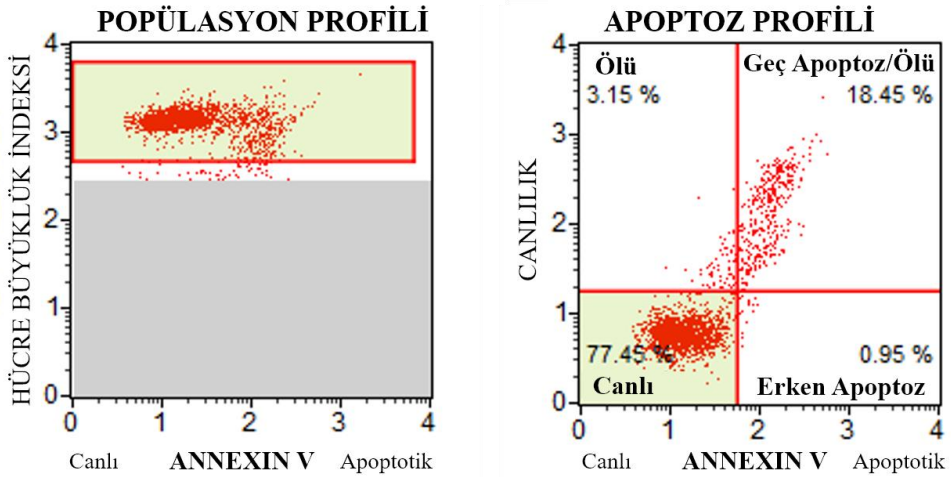


Şekil 3.2 Muse Sayım & Canlılık Kiti ile yapılan ölçüm için örnek proliferasyon profili

3.5. Apoptoz Saptanması

Apoptoz çalışmaları, Muse Annexin V Ölü Hücre kiti kullanılarak Muse hücre analiz cihazında yapılmıştır. Normal hücrelerde fosfatidilserin (PS) sitoplazmik yüzeydedir ve apoptotik hücrelerde PS hücre içinden dışarıya transloke olur. Antikoagülant Annexin V'in PS'ye yüksek ilgisi vardır. Alexa Flor 488 gibi boylarla işaretli Annexin V'in PS ile etkileşimi apoptotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Muse hücre analiz cihazında Annexin V kiti ile yapılan ölçümler 4 farklı popülasyon hakkında bilgi verir. Bunlar canlı hücreler, ölü hücreler (nekroz sonucu ölenler), erken apoptotik ve geç apoptotik hücrelerdir (Şekil 3.3). Bu dört grubun toplamı toplam hücre sayısını vermektedir. Hücreler Annexin V kiti ile muamele edildikten sonra Muse hücre analiz cihazına yüklenir ve total hücre içerisindeki canlı hücre, ölü hücre (nekroz sonucu ölenler), erken apoptotik ve geç apoptotik hücre yüzdeleri grafik olarak raporlanır.



Şekil 3.3 Muse™ Annexin V ölçümleri sonucu elde edilen örnek hücre profilleri

Apoptoz belirleme çalışmaları için deneyler aşağıdaki protokole göre 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

1. Apoptoz deneyleri için 6-kuyucuklu-plaklar içerisine her bir kuyucuğa 200.000 hücre aktarılmıştır.
2. Kullanılan baicalein dozları sırasıyla 10, 35 ve 55 μM 'dir. Kullanılan baicalein dozları proliferasyon deneylerinden elde edilen veriler doğrultusunda seçilmiş olup 35 μM IC_{50} proliferasyon konsantrasyonudur.
3. Kimyasal uygulama gruplarının yanı sıra çözücü kontrol grubu kullanılmıştır. Uygulanan baicalein konsantrasyonlarının apoptoz üzerine etkisi ve apoptotik hücre yüzdeleri 24. ve 48. saatler için belirlenmiştir.
4. Uygulama saatleri sonucunda hücreler Tripsin-EDTA yardımı ile tutundukları yüzeyden alınmış ve santrifüj yardımı ile hücre peletleri elde edilmiştir.
5. Hücre peletleri uygun miktarda FBS içeren besiyeri ile çözülmüş ve Annexin V kit solüsyonu ile karıştırılarak 20 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.
6. Süre sonunda Muse™ hücre analiz cihazında kontrol ve baicalein uygulama dozlarına ait 24. ve 48. saatlerdeki apoptotik hücre yüzdelerindeki değişim saptanmıştır. Bu verilerden yola çıkarak %50

apoptoz (AP_{50}) meydana getiren dozu hesaplamak için Annexin-V deneylerinden elde edilen veriler ile dağılım grafiği çizilmiş ve grafiğin eğim formülünden AP_{50} dozu hesaplanmıştır (Şekil 4.4).

3.6. MikroRNA-25 Mimik ve İnhibitör Transfeksiyonu

MikroRNA mimik ya da inhibitörlerinin transfeksiyonu belirli mikroRNA'ların rollerini ve hedeflerini tanımlamak için kullanılan bir tekniktir. MikroRNA mimikleri olgun endojen miRNA'ları taklit etmek için tasarlanan küçük, sentetik çift iplikli RNA molekülleridir. MikroRNA inhibitörleri ise özgün olarak olgun miRNA'lara bağlanan ve fonksiyonlarını inhibe etmek için tasarlanmış küçük, sentetik tek iplikli RNA molekülleridir.

MikroRNA mimik ya da inhibitörünün hücre içine aktarılması Lipofectamine 2000 transfeksiyon reaktifi ile yapılabilmektedir. Lipofectamine reaktifi sulu ortamda lipozom oluşturabilen lipit alt üniteleri içermektedir. Lipozomlar, miRNA mimik ya da inhibitörü ile inkübe edilerek birleşmeleri sağlanır. Daha sonra lipozom ve miR mimik ve inhibitör hücre kültürlerine uygulanır ve canlı hücrelerin negatif yüklü plazma zarı ile birleşerek miRNA mimik ya da inhibitörün sitoplazmaya geçişine olanak sağlanır. Böylece replikasyon ve ifade çalışmaları için hücre kültürleri hazır hale getirilmiş olur.

MikroRNA mimik ve inhibitör çalışmalarında, her deneyde sonuçların nonspesifik olup olmadığını gösterecek negatif bir kontrolün transfekte edilmesi gerekir. Negatif kontrol bilinen memeli genlerine herhangi bir homoloji içermez.

Bir çalışmada transfeksiyon yapılan miRNA sonuçları ile negatif kontrolden elde edilen sonuçların karşılaştırılması, çalışma koşullarında gözlemlenen spesifik miRNA sonuçlarını doğrulamak için kullanılabilir. Negatif kontrolden elde edilen sonuçlar aynı zamanda transfekte edilmeyen hücrelerden elde edilen sonuçlarla da kıyaslanabilir. Gen ifadesinin hem transfekte edilmeyen hücrelerde hem de negatif kontrol ile transfekte edilen hücrelerde benzer olması beklenir.

Transfeksiyon sonrası hücrelerdeki miRNA ve ilgili genlerin ifade seviyelerindeki değişimi gözlemek amacı ile Saos-2 hücrelerine miRNA mimik, miRNA

inhibitörü ve her ikisine ait negatif kontrolleri Lipofectamine 2000 transfeksiyon reaktifi kullanılarak aktarılmıştır.

3.6.1. MikroRNA-25 İnhibitör Uygulaması

Hücre içindeki miR-25 gen ifadesinin baskılanması ve buna bağlı olarak Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki hedef genlerin ifadesinin belirlenmesi amacıyla baskılamada kullanılacak olan inhibitör anti-miR-25 uygulaması için uygun doz belirleme çalışması yapılmıştır. Çalışmalar aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

1. Hücre içerisine anti-miR-25'in transfekte edilmesi için Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) reaktifi kullanılmıştır.
2. Saos-2 hücreleri anti-miR-25 uygulamasından bir gün önce 24-kuyucuklu plaklara her kuyucukta 40000 hücre olacak şekilde aktarılmış ve hücrelerin plaklara tutunması ve büyümesi sağlanmıştır.
3. Ertesi gün hücrelerin üzerinden Mc Coys 5A besiyeri alınarak 450 μ l Opti-MEM besi yeri eklenmiştir.
4. Saos-2 hücrelerine 5-10-20-30 ve 40 μ M dozlardaki miR-inhibitörü (anti-miR-25) içerisinde serum bulunmayan Opti-MEM besi yeri ile hacim 25 μ l olacak şekilde karıştırılmıştır.
5. Aynı zamanda 1 μ l Lipofectamine 2000 reaktifi de 24 μ l serum içermeyen Opti-MEM besiyeri ile karıştırılarak 5 dakika oda sıcaklığında lipozom oluşumu için inkübe edilmiştir.
6. Daha sonra anti-miR-25 içeren besi yeri ile Lipofectamine 2000 reaktifi içeren besi yeri birbiri ile karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
7. Süre sonunda hücrelerin bulunduğu plaklardaki her bir kuyucuğa 50 μ l anti-miR-25 + Lipofectamine 2000 reaktifi karışımı ilave edilmiştir.
8. Uygulamadan 8 saat sonra transfeksiyon karışımı Mc Coy's 5A besi yeri ile değiştirilmiştir.
9. Uygulamadan sonra 24. ve 48. saatlerde hücreler TRIzol® (ThermoFisher) ile tutundukları yüzeyden kaldırılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır.
10. Her bir susturma deneme dozu için cDNA sentezi gerçekleştirilerek RT-PCR ile miR-25 ifadesinin analizleri gerçekleştirilmiştir.

Doz belirleme çalışmasından elde edilen cDNA'lar ile RT-PCR'da miR-25 ifadesi analiz edilmiş ve 15 μ M anti-miR-25 dozunun miR-25 ifadesinin baskılanması için uygun doz olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6). Doz belirleme çalışmalarının ardından 15 μ M anti-miR-25 dozu ile yapılan deneyler aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

1. Uygulamadan bir gün önce hücreler 6-kuyucuklu plaklara 200.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde aktarılmıştır.
2. Ertesi gün 15 μ l (15 μ M) anti-miR-25 ile 110 μ l Opti-MEM, başka bir tüpte ise 2,5 μ l Lipofectamine 2000 reaktifi ile 122,5 μ l Opti-MEM karıştırılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3. Eş zamanlı olarak 15 μ l (15 μ M) inhibitör negatif kontrol (anti-miR-25 Negatif Kontrol) ile 110 μ l Opti-MEM, başka bir tüpte ise 2,5 μ l Lipofectamine 2000 reaktifi ile 122,5 μ l Opti-MEM karıştırılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Daha sonra anti-miR-25 içeren Opti-MEM ile Lipofectamine 2000 reaktifi içeren Opti-MEM birbiri ile karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda inhibitör negatif kontrolünü içeren Opti-MEM ile Lipofectamine 2000 reaktifi içeren Opti-MEM birbiri ile karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
5. Hücrelerin üzerinden Mc Coy's 5A besiyeri alınarak 2250 μ l Opti-MEM besi yeri eklenmiştir.
6. Süre sonunda Lipofectamine 2000 reaktifi + anti-miR-25 karışımından 250 μ l, Opti-MEM ve hücre içeren kuyucuklara eklenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılacak kuyucuğa da 250 μ l Lipofectamine 2000 reaktifi + inhibitör negatif kontrol karışımı eklenmiştir.
7. Anti-miR-25 uygulamasından 8 saat sonra Opti-MEM besiyeri uzaklaştırılarak ortama Mc Coy's 5A besiyeri eklenmiştir.
8. Aynı zamanda anti-miR-25 uygulanmış hücrelere uygulamadan 8 saat sonra 35 μ M ve 50 μ M baicalein uygulaması yapılmıştır.
9. Baicalein uygulamasından 24 ve 48 saat sonra total RNA izolasyonu için TRIzol[®], protein izolasyonları için Tripsin-EDTA ile hücreler toplanmıştır.

3.6.2. MikroRNA-25 Mimik Uygulaması

Hücre içindeki miR-25 ifadesinin artırılması ve buna bağlı olarak Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki hedef genlerin ifadesinin belirlenmesi amacıyla kullanılacak olan miR-25-mimik uygulaması için uygun doz belirleme çalışması yapılmıştır.

1. Saos-2 hücreleri miR-25-mimik uygulamasından bir gün önce 24-kuyucuklu plaklara her kuyucukta 40000 hücre olacak şekilde aktarılmış ve hücrelerin plaklara tutunması ve çoğalması sağlanmıştır.
2. Ertesi gün hücrelerin üzerinden Mc Coy's 5A besiyeri alınarak 450 μ l Opti-MEM besi yeri eklenmiştir.
3. Saos-2 hücrelerine 5-25-50 ve 75 nM miR-25-mimik uygulaması için ilgili dozlar içerisinde serum bulunmayan Opti-MEM besiyeri ile toplam hacim 25 μ l olacak şekilde hazırlanmıştır.
4. Aynı zamanda 1 μ l Lipofectamine 2000 reaktifi de 24 μ l serum içermeyen Opti-MEM besiyeri ile karıştırılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
5. Daha sonra miR-25-mimik içeren besi yeri ile Lipofectamine 2000 reaktifi içeren besi yeri birbiri ile karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. Süre sonunda hücrelerin bulunduğu plakalardaki her bir kuyucuğa Lipofectamine 2000 reaktifi + miR-25-mimik karışımından 50 μ l ilave edilmiştir.
7. Uygulamadan sonra 24. ve 48. saatlerde hücreler toplanmış ve hücrelerden TRIzol[®] ile total RNA izolasyonu yapılmıştır.
8. Total RNA izolasyonu sonrası her bir miR-25-mimik dozu için cDNA sentezi gerçekleştirilerek RT-PCR ile miR-25 ifadesinin analizi için gerekli materyal hazırlanmıştır.

Elde edilen cDNA'lar ile RT-PCR'da mir-25 ifadesi analiz edilmiş ve 5 nM miR-25-mimik dozunun hücrelerdeki miR-25 ifadesinin artırılması için kullanılabilecek uygun doz olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8). Doz belirleme çalışmalarının ardından 5 nM miR-25-mimik dozu ile deneyler aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

1. Uygulamadan bir gün önce hücreler 6-kuyucuklu plaklara 200.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde aktarılmıştır.

2. Ertesi gün 2,5 µl (5 nM) miR-25-mimik ile 122,5 µl Opti-MEM, başka bir tüpte 2,5 µl Lipofectamine 2000 reaktifi ile 122,5 µl Opti-MEM karıştırılarak beş dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3. Eş zamanlı olarak 2,5 µl (5 nM) miR-25-mimik negatif kontrolü ile 122,5 µl Opti-MEM, başka bir tüpte 2,5 µl Lipofectamine 2000 reaktifi ile 122,5 µl Opti-MEM karıştırılarak beş dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Daha sonra miR-25-mimik içeren Opti-MEM ile Lipofectamine 2000 reaktifi içeren Opti-MEM birbiri ile karıştırılarak yirmi dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
5. Aynı zamanda miR-25-mimik negatif kontrolü içeren Opti-MEM ile Lipofectamine 2000 reaktifi içeren Opti-MEM birbiri ile karıştırılarak yirmi dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
6. Hücrelerin üzerinden Mc Coy's 5A besi yeri alınarak 2250 µl Opti-MEM besiyeri eklenmiştir.
10. Süre sonunda Lipofectamine 2000 reaktifi + anti-miR-25 karışımından 250 µl her bir Opti-MEM içeren kuyucuklara eklenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılacak kuyucuğa da 250 µl Lipofectamine 2000 reaktifi + miR-25-mimik negatif kontrol karışımından eklenmiştir.
7. MikroRNA-25-mimik uygulamasından 8 saat sonra Opti-MEM besiyeri uzaklaştırılarak ortama Mc Coy's 5A besiyeri eklenmiştir.
8. Besi yerinin değiştirilmesinden 24 ve 48 saat sonra total RNA izolasyonları için TRIzol[®], protein izolasyonları için Tripsin-EDTA ile hücreler toplanmıştır.

3.7. Total RNA İzolasyonu ve Real-Time PCR

Saos-2 hücrelerine baicalein, anti-miR-25 ve miR-25-mimik uygulamalarından sonra elde edilen hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. MikroRNA-25 ve çalışılan genlerin mRNA ifadesi için ayrı ayrı cDNA sentezi yapılarak RT-PCR (Applied Biosystem)'da gen ifadeleri belirlenmiştir.

3.7.1. Total RNA İzolasyonu

Saos-2 hücrelerine baicalein (35 µM ve 50 µM), anti-miR-25 ve negatif kontrolü (15 µM) ayrıca miR-25-mimik ve negatif kontrolü (5nM) uygulamalarından sonra

elde edilen hücrelerden total RNA izolasyonu TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) ile aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

1. Kültür kabında bulunan kontrol ve uygulama yapılmış hücreler üzerine 1 ml TRIzol® eklenerek hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılmaları sağlanmış ve mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
2. Hücre bulunan mikrosantrifüj tüplerine 200 µl kloroform eklenerek tüpler 15 saniye alt-üst edilmiştir.
3. 3 dakika oda ısısında inkübasyonun ardından 12000 g'de 15 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonrası üst faz dikkatlice yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
5. Üzerine 0,5 µl glikojen (20 µg/µl) ve 500 µl isopropanol eklenerek karıştırılmış ve 10 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.
6. İnkübasyon sonrası 12000 g'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
7. Süpernatant kısmı uzaklaştırılıp pelet üzerine 1 ml soğuk %75 etil alkol eklenerek pelet yıkanmıştır. Daha sonra 7500 g'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
8. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak RNA peleti 5-10 dakika kurumaya bırakılmıştır.
9. Pelet üzerine 30 µl RNaz içermeyen distile su eklenerek 55-60 °C ısı bloğunda 10 dakika inkübe edilmiştir.
10. Çözünmüş RNA örnekleri -80 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.7.2. MikroRNA-25 için cDNA Sentezi ve RT-PCR

cDNA sentezi

MikroRNA çalışmaları için TaqMan MicroRNA Revers Transkripsiyon kiti (Applied Biosystems) kullanılarak total RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. MikroRNA'lar için cDNA sentezinde özel olarak tasarlanmış hsa-miR-25 (000403; Thermo Fisher Scientific) ve RNU6B Kontrol (001093; Thermo Fisher Scientific) TaqMan mikroRNA test sistemleri (5X) kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 MikroRNA çalışmalarında cDNA sentezi ve RT-PCR için kullanılan MikroRNA Test Sistemleri primerleri

1. MikroRNA çalışmalarında cDNA sentezi ve RT-PCR için kullanılan primerler	
Hsa-miR-25 (5X-20X)	5'-CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA-3'
RNU6B (5X-20X)	5'-CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCAT ATTTTT-3'

Çizelge 3.2 MikroRNA çalışmaları için cDNA sentezi reaksiyon içeriği

2. MikroRNA için cDNA sentezi reaksiyon içeriği	
Reaksiyon içeriği	cDNA PCR Reaksiyon karışımı
100 mM dNTP'ler (dTTP'li)	0,15 µl
MultiScribe Revers Transkriptaz, 50U/ µl	1 µl
10X Revers Transkripsiyon Tamponu	1,5 µl
RNaz inhibitörü, 20U/ µl	0,19 µl
Nükleaz içermeyen distile su	4,16 µl
Taqman Small RNA Test Sistemi (5X RT primer)	3 µl
Total RNA (10 ng)	5 µl
Toplam hacim	15 µl

Çizelge 3.3 MikroRNA çalışmaları için cDNA sentezi reaksiyon koşulları

3. MikroRNA çalışmaları için cDNA sentezi reaksiyon koşulları	
Zaman	Sıcaklık
30 dakika	16 °C
30 dakika	42 °C
5 dakika	85 °C
∞	4 °C

RT-PCR

TaqMan mikroRNA test sistemleri kullanılarak sentezlenen cDNA'lar ile RT-PCR'da miR-25 ifadesine bakılmıştır. Taqman Universal PCR Master mix II ile mikroRNA test sistemleri (20X; miR-25 ve RNU6B Kontrol; Çizelge 3.4) kullanılarak RT-PCR'da uygulama öncesi ve sonrası RQ (Relative Quantification) değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 3.4 MikroRNA Real-Time PCR reaksiyon karışımı içeriği

4. MikroRNA RT-PCR reaksiyon karışımı içeriği	
Reaksiyon içeriği	RT-PCR Reaksiyon karışımı
Taqman Universal PCR Master mix II (2X)	5 µl
Nükleaz içermeyen distile su	3 µl
Taqman Small RNA Test Sistemi (20X RT primer)	0,5 µl
cDNA	1,5 µl
Toplam hacim	10 µl

Çizelge 3.5 MikroRNA Real-Time PCR reaksiyon koşulları

5. MikroRNA RT-PCR reaksiyon koşulları	
Zaman	Sıcaklık
2 dakika	50 °C
10 dakika	95 °C
15 saniye	95 °C
60 saniye	60 °C

40 Döngü

3.7.3. mRNA İfadesi için cDNA Sentezi ve RT-PCR

cDNA sentezi

Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki genlerin mRNA ifadelerini RT-PCR ile belirlemek için öncelikle TaqMan revers transkripsiyon reaktifleri (Applied Biosystems) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon içeriği Çizelge 3.6'da, cDNA sentezi reaksiyon koşulları ise Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.6 cDNA sentezi reaksiyon karışımı içeriği

6. cDNA sentezi reaksiyon içeriği	
Reaksiyon içeriği	cDNA PCR reaksiyon karışımı
dNTP Karışımı (with dTTP, her biri 2.5 mM)	10 μ l
10X Reaksiyon Tamponu	5 μ l
MgCl₂ Solusyonu(25 mM)	11 μ l
RNaz inhibitörü, 20U/ μl	1 μ l
Random hegzamerler (50 μM)	1,25 μ l
Oligo d(T) (50 μM)	1,25 μ l
MultiScribe Revers Transkriptaz, 50U/ μl	1,25 μ l
Total RNA (1 μg) + Nükleaz içermeyen distile su	19,25 μ l
Total hacim	50 μl

Çizelge 3.7 cDNA sentezi reaksiyon koşulları

7. cDNA sentezi reaksiyon koşulları	
Zaman	Sıcaklık
10 dakika	25 °C
30 dakika	48 °C
5 dakika	95 °C
∞	4 °C

RT-PCR

RT-PCR reaksiyonları SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) ve β -katenin, Axin2 ve LRP-5 primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve kontrol gen olarak GAPDH kullanılmıştır (Çizelge 3.8). RT-PCR reaksiyon karışımı içeriği Çizelge 3.9'da, reaksiyon koşulları Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.8 Real-Time PCR için kullanılan primerler

8. RT-PCR için kullanılan primerler	
β-katenin	(F) 5'-TTCTGGTGCCACTACCACAGC-3' (R) 5'-TGCATGCCCTCATCTAATGTC-3'
Axin2	(F) 5'-GAATGAAGAAGAGGAGTG-3' (R) 5'-AAGACATAGCCAGAACC-3'
LRP-5	(F) 5'-CCCGTCACAGGTACATGTACT-3' (R) 5'-GAACGAGCCGTCCAGGTT-3'
GAPDH	(F) 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' (R) 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

Çizelge 3.9 Real-Time PCR reaksiyon karışımı

9. RT-PCR Reaksiyon karışımı içeriği	
Reaksiyon İçeriği	RT-PCR Reaksiyon Karışımı
SYBR Green Master mix	5 μ l
Nükleaz içermeyen distile su	3,6 μ l
Forward primer (5 μM)	0,2 μ l
Revers Primer (5 μM)	0,2 μ l
cDNA	1 μ l
Total hacim	10 μl

Çizelge 3.10 Real-Time PCR reaksiyon koşulları

10. RT-PCR reaksiyon koşulları	
Zaman	Sıcaklık
10 dakika	95 °C
15 saniye	95 °C
60 saniye	60 °C

40 Döngü

3.8. Western Blotlama

Saos-2 hücrelerine baicalein, anti-miR-25 ve miR-25-mimik uygulamaları sonrası 24. ve 48. saatlerdeki β -katenin, Axin2, LRP-5 ve GSK-3 β proteinlerinin ifadeleri belirlenmiştir.

Hücre lizatı elde edilmesi

1. Baicalein uygulama grubu için 1 milyon, anti-miR-25 ve miR-25-mimik uygulamaları için 200 bin hücre kullanılmıştır. Bunun için gerekli miktarda hücre bir gün önceden hücre kültür kaplarına aktarılmış ve çoğalmaya bırakılmıştır.
2. Deneilerde kullanılacak olan baicalein (35 μ M ve 50 μ M), anti-miR-25 ve negatif kontrolü (15 μ M), miR-25-mimik ve negatif kontrolü (5nM) için seçilen dozlar toplam kültür ortamı miktarı göz önünde bulundurularak hücre ortamına eklenmiştir. Anti-miR-25 uygulanan hücrelere 8 saat sonra baicalein (35 μ M ve 50 μ M) uygulaması yapılmıştır.
3. Uygulamadan sonra 24. ve 48. saatlerde hücreler Tripsin-EDTA ile muamele edilerek tuttukları yüzeyden ayrılmış ve santrifüj tüplerine besiyeri ile birlikte alınmıştır.
4. Kültür ortamından alınan hücreler +4 °C de 5 dk 800 rpm hızda santrifüjlenerek çöktürülmüştür.
5. Süpernatant atılıp üzerine 1 ml soğuk PBS ilave edilerek resüspanse edilmiştir.

6. Tekrar aynı şekilde santrifüjlenerek PBS uzaklaştırılmıştır. PBS ile yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanmıştır.
7. Pelet üzerine lizis tamponu ilave edilerek [1milyon hücre için=100 µl lizis tamponu (Çizelge 3.11), 1,25 µl 100 mM PMSF (Fenilmetansülfonilflorit), 1,25 µl PIC (Proteaz İnhibitör Kokteyli)] +4 °C de 20 dk 10000 g hızda santrifüj edilmiştir.
8. Süpernatant dikkatli bir şekilde başka bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak -20 °C'de saklanmıştır. Tüm örneklere bu işlemler yapılarak uygulamalara ait 24. ve 48. saatler için total proteinler elde edilmiştir.

Çizelge 3.11 Lizis tamponu

11. Lizis tamponu	
NaCl	150 mM
Tris-Base	50 mM
Triton X-100	50 µl

SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi

Elde edilen hücre lizatlarından protein ifadesinin belirlenmesi amacıyla öncelikle SDS-Poliakrilamit Jel elektroforezi kullanılarak lizat içerisindeki proteinlerin ayrımı sağlanmıştır. Öncelikle proteinleri yüklemek için poliakrilamit jel hazırlanmıştır.

1. Alkol ile iyice temizlenmiş iki cam (biri spacer özellikte) üst üste yerleştirilerek jel dökme düzeneğine yerleştirilmiştir.
2. İlk olarak %10'luk ayırma jeli için karışım (Çizelge 3.12) hazırlanarak iki cam arasına hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat ederek pipetlenmiştir.
3. Jelin üst kısmında düzgün bir yüzey oluşturmak ve hava ile temasını kesmek için üzerine 1 ml distile su yavaşça pipetlenmiştir.
4. Ayırma jeli polimerleştikten sonra üst kısımdaki distile su dikkatlice dökülmüş ve %4'lik yükleme jeli karışımı (Çizelge 3.12) ayırma jeli üzerine pipetlenmiştir.

5. Son olarak yükleme jelinini üst kısmına 1 mm tarak yerleştirilerek jel polimerleşmeye bırakılmıştır. Böylece kuyucukların oluşması sağlanmıştır.

Çizelge 3.12 Poliakrilamit jel içerikleri

12. Poliakrilamit jel içerikleri			
Ayrırma Jeli (% 10)		Yükleme Jeli (% 4)	
Akrilamit: Bisakrilamit (30:0.8)	2,5 ml	Akrilamit: Bisakrilamit (30:0.8)	660 µl
1 M Tris-HCl (pH:8.8)	3 ml	1 M Tris-HCl (pH:6.8)	630 µl
%20 SDS	38 µl	%20 SDS	25 µl
Distile su	1,9 ml	Distile su	3,6 ml
%10 APS	36 µl	%10 APS	25 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl

6. Elektroforez işlemi için öncelikle hazırlanan jel dikey elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiş ve jel kuyucuklarının üzerini kapatacak şekilde tankın içi yürütme tamponu (Çizelge 3.13) ile doldurulmuştur.
7. Mikropipet yardımı ile yürütme tamponu kuyucuktan alınıp bırakılarak jel kuyucukları yıkanmıştır.

Çizelge 3.13 Yürütme tamponu

13. Yürütme tamponu	
Tris-Base	50 mM
Glisin	40 mM
SDS	7 mM

8. Yükleme işleminden önce hazırlanan lizatlardan 10 µl mikrosantrifüj tüpü içerisine alınarak üzerine 10 µl yükleme tamponu (2X) (Çizelge 3.14) ilave edilmiştir ve ısıtıcıda 100 °C’de 3 dakika ısıtılmıştır.

Çizelge 3.14 Yükleme tamponu

14. Yükleme tamponu	
1 M Tris-HCl (pH: 6,8)	2,4 ml
% 20 SDS	3 ml
Gliserol	3 ml
β-merkaptoetanol	1,6 ml
Bromfenol mavisi	0,006 g
Toplam hacim	10 ml

9. Poliakrilamit jelin ilk kuyucuğuna 5 µl protein marker (Geneaid prestained protein ladder V), daha sonra diğer kuyucuklara sırasıyla örnekler yüklenmiştir.
10. Yükleme işleminin ardından dikey elektroforez tankının kapağı kapatılarak elektrotlar güç kaynağına doğru bir biçimde yerleştirilmiştir.
11. Yürütme tankı buz dolu bir kap içerisine yerleştirilerek güç kaynağı çalıştırılmıştır.
12. Örnekler ayırma jeline geçene kadar (yaklaşık 30 dk) 100 V, ayırma jeline geçtikten sonra 200 V’da yaklaşık 45 dakika boyunca yürütülerek proteinlerin ayrılması sağlanmıştır.

13. Yükleme boyalarının yürüme mesafesi kontrol edilerek jelin alt kısmına geldiklerinde yürütme işlemi sonlandırılmıştır.

Proteinlerin membrana transferi

1. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel cam aparatlar arasından dikkatlice alınarak transfer tamponu (Çizelge 3.15) bulunan kap içerisine bırakılmıştır.
2. Islak transfer sistemini hazırlamak için düzenekte yer alacak süngerler ve Whatman kağıtları transfer tamponu içine alınarak ıslatılmıştır.
3. PVDF membran önce saf metanol içerisinde aktif hale gelmesi için 5 dk inkübe edilip, sonrasında transfer tamponunda yıkanmıştır.
4. Sandviç modeli, jel ve membran doğru akım yönünde olacak ve arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde hazırlanmıştır.
5. Sandviç aparatının bir yüzü beyaz bir yüzü siyah renklerden oluşmaktadır. Bu ayırım elektrik akımının yönü açısından önemlidir. Sandviç aparatının siyah kısmı altta kalacak şekilde üzerine sırasıyla sünger- whatman kağıdı-jel-membran-whatman kağıdı-sünger konularak sandviç aparatı hava kabarcığı oluşturmadan kapatılmıştır.
6. Sandviç aparatı, içinde buz aküsü bulunan transfer tankına (aparatın siyah kısmı tankın siyah kısmı ile karşılıklı gelecek şekilde) yerleştirilmiş ve transfer tankı buz dolu bir kap içerisine yerleştirilerek 1 saat 100 V'da transfer işlemi yapılmıştır.
7. Transfer tamamlandıktan sonra membran sandviç aparatının içinden jelden ayrılarak alınmıştır.

Çizelge 3.15 Transfer tamponu

15. Transfer tamponu	
Tris-Base	20 mM
Glisin	150 mM
Metanol	200 ml

8. Transfer sonrası orbital çalkalayıcıda Ponceau S (0,5 g/lt) ile 1 dakika boyanıp protein transferi doğrulanmıştır.
9. Membran saf metanol içerisinde 10 dk orbital çalkalayıcıda yıkanmıştır.
10. Metanolün uzaklaşması için membran TBS (Tris tuz tamponu) ile 15 dakika boyunca yıkanmıştır (Çizelge 3.16).

Çizelge 3.16 TBS yıkama tamponu

16. TBS Yıkama tamponu	
Tris-Base	20 mM
NaCl	137 mM

Membran bloklama işlemi

Membran ile antikorlar arasındaki non-spesifik bağlanmaları en aza indirmek için bloklama işlemi yapılmıştır.

1. Bloklama işlemi için %0.1 Tween 20 içeren TBS (TBST) içinde %5 yağsız süt çözeltisi kullanılmıştır (TBST= 100 ml TBS+100 µl Tween 20). Bu çözeltiliye bloklama sütü ismi verilmektedir.
2. Membran bloklama sütü içerisinde 1 saat oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.
3. Bloklama sonrası membran TBS (8 dk) ve TBST (7 dk) ile orbital çalkalayıcıda yıkanarak antikor uygulama aşamasına geçilmiştir.

Antikor uygulaması

1. Kullanılacak olan primer antikorlar %5'lik BSA (Sığır serum albümini) ya da bloklama sütü içerisinde 1/500 oranında olacak şekilde hazırlanmıştır.
2. Membran bu karışım içerisinde 4 °C'de orbital çalkalayıcıda gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

3. Bu çalışmada β -katenin, Axin2, LRP-5, GSK-3 β , GAPDH ve Aktin antikorları (Katalog numaraları sırasıyla; 9582, 5863, 5731, 9315, 2118 - Cell Signaling, ve sc-7210 Santa Cruz Biotechnology) kullanılmıştır.
4. Ertesi gün membran primer antikor (konak canlı rabbit) içeren çözeltiden çıkarıldıktan sonra sırasıyla TBS (5 dk) ve TBST (10 dk) ile yıkanmıştır.
5. Sonrasında 10 ml bloklama sütü içerisine 10 μ l sekonder antikor (Katalog no. 7054 Anti-rabbit IgG AP-linked Antibody, Cell Signaling) eklenmiştir.
6. Membran bu karışım içinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.
7. Membran yeniden TBS (5 dk) ve TBST (10 dk) ile yıkandıktan sonra görüntüleme adımına geçilmiştir.

Görüntüleme

1. Proteinlerin görüntülenmesi BCIP/NBT Kit (Invitrogen) kullanılarak doğrudan membran üzerinde bantların boyanarak görünür hale getirilmesi ile yapılmıştır.
2. Bant yoğunlukları ImageJ (<https://imagej.nih.gov>) programı ile ölçülerek değerlendirilmiştir.

Veri Analizi

1. Western blot yöntemiyle membran üzerinde elde edilen görüntülerin fotoğrafı taranarak bilgisayar ortamına aktarılmış ve Image J programı kullanılarak analizi yapılmıştır.
2. Analizde her bir bandın alanı hesaplanmıştır.
3. Hesaplanmak istenen proteine ait her saat dilimi için elde edilen değerleri (24. ve 48. saatler) tek tek referans proteinin hesaplanan alan değerlerine bölünmüştür.
4. Referans protein ile normalize edilen uygulama grubu değerleri (24. ve 48. saatler) 100 ile çarpılıp kontrol grubu (baicalein için DMSO kontrol; anti-miR-25 ve miR-25-mimik için negatif kontrolleri) değerine bölünerek bağıl ifade değerleri elde edilmiştir.
5. Elde edilen bu değerler ile grafikler çizilmiştir.

6. Referans protein olarak Aktin ve GAPDH kullanılmıştır. Analizler için her örneğin en az üç ayrı verisi kullanılmıştır.

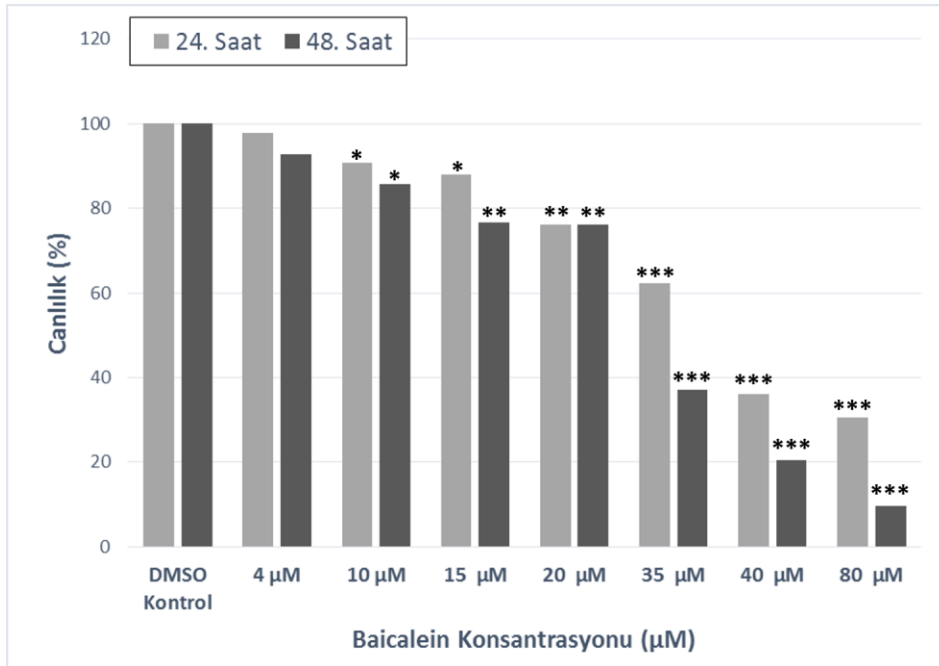
3.9. İstatistiksel Veri Analizi

Tez çalışması sırasında yürütülen proliferasyon, apoptoz, RT-PCR ve western blotlama deneyleri sonucunda elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 20.0 versiyonunda Student's t-testi kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık seviyesi (p) olarak 0,05 kabul edilmiş olup, p değerinin 0,05'ten küçük ya da 0,05'e eşit olduğu ($p \leq 0,05$) değerler için istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu, p değerinin 0,05'ten büyük olduğu değerler ($p > 0,05$) için ise istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı yorumları yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

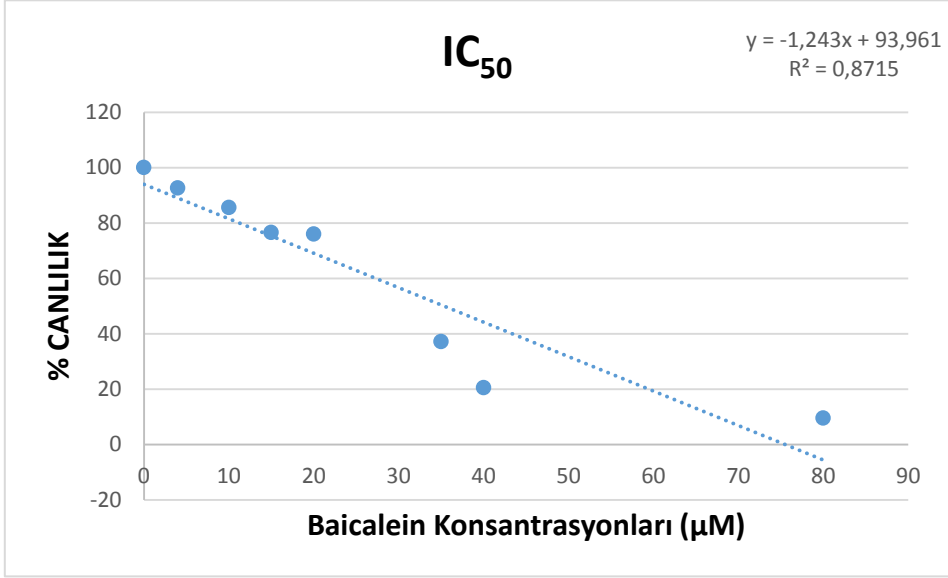
4. BULGULAR

4.1. Proliferasyon

Baicaleinin tümör hücre proliferasyonuna etkisi süreye ve doza bağlı olarak araştırılmış ve Muse™ (Merck Millipore) hücre analiz cihazı ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde baicaleinin uygulanan dozları (4-10-15-20-35-40 ve 80 μM) 24. ve 48. saatte DMSO kontrol hücreleriyle karşılaştırılmıştır. Özellikle 48. saatte 35, 40 ve 80 μM 'lık konsantrasyonun canlı hücre sayısını %50'nin üzerinde azalttığı görülmektedir (Şekil 4.1). Deneyler sonucu elde edilen veriler ile çizilen grafiğin eğiminden IC_{50} (%50 inhibisyon konsantrasyonu) değeri 35,4 μM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2). IC_{50} için sonraki gen ifadesi çalışmaları da 35 μM baicalein konsantrasyonu kullanılmıştır.



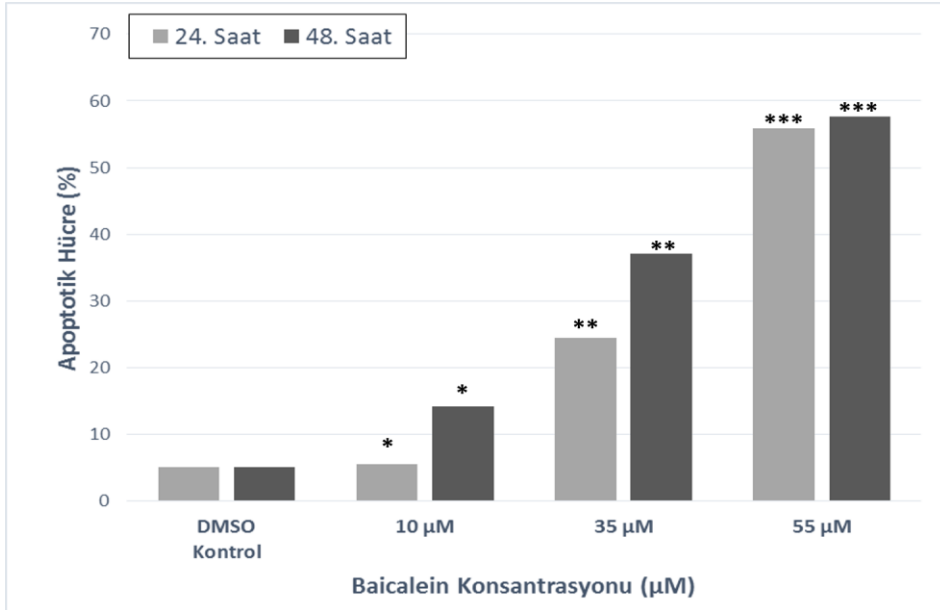
Şekil 4.1 Baicaleinin canlı hücre sayısına olan etkisi (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$)



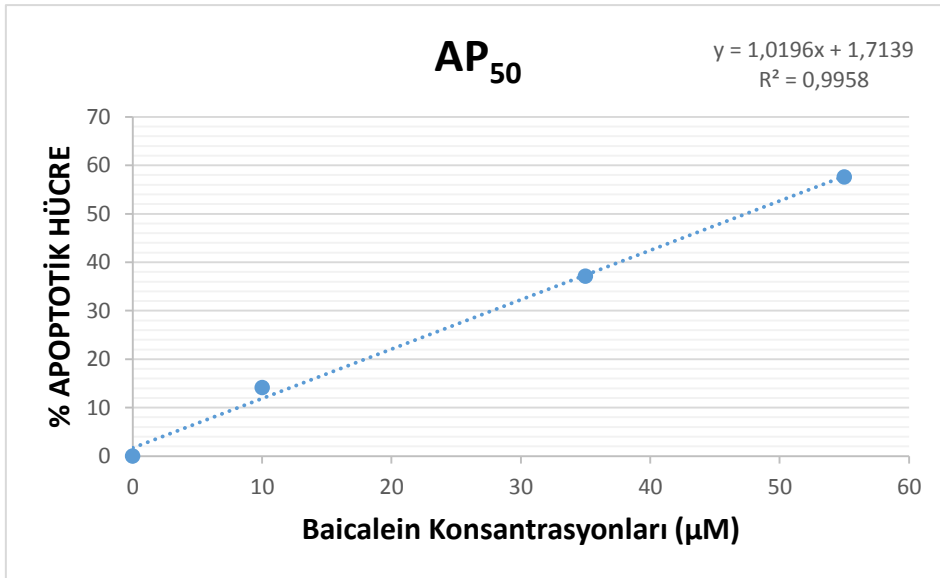
Şekil 4.2 IC₅₀ dozunun belirlenmesi için çizilen dağılım grafiği (3 tekrarlı deney sonuçlarına göre)

4.2. Apoptoz

Baicalein uygulaması sonrası apoptozun saptanması amacı ile Muse™ Annexin V ölü hücre kiti kullanılarak Muse™ hücre analiz cihazında ölçüm yapılmıştır. Yapılan proliferasyon deneyinde elde edilen ve etkin olduğu belirlenen 35 µM konsantrasyonun yanı sıra 10 ve 55 µM baicalein dozları da uygulanarak 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonucunda apoptotik hücre verileri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda uygulanan dozlardaki apoptotik hücre oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir oranda ($p < 0,05$) arttığı görülmektedir (Şekil 4.3). Çizilen grafiğin eğimine AP₅₀ (%50 apoptoz konsantrasyonu) dozu 47,6 µM olarak göre hesaplanmıştır (Şekil 4.4). AP₅₀ için sonraki gen ifadesi çalışmalarında 50 µM baicalein konsantrasyonu kullanılmıştır.



Şekil 4.3 Uygulanan baicalein konsantrasyonlarına ait 24. ve 48. saatlerdeki apoptotik hücre yüzdelerindeki değişim (3 tekrarlı deney sonuçlarına göre; * $p<0,01$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0001$)



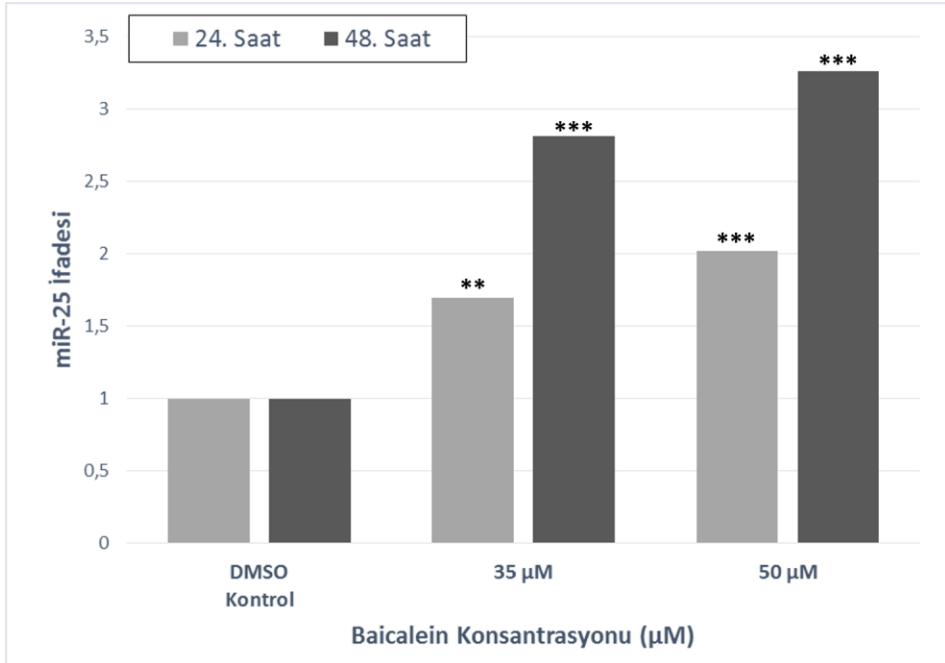
Şekil 4.4 AP₅₀ dozunun hesaplanması için çizilen dağılım grafiği

4.3. Real-Time PCR Sonuçları

Saos-2 osteosarkoma hücreleri ile gerçekleştirilen deneylerde hücrelere 35 ve 50 μM baicalein, 15 μM anti-miR-25 ve negatif kontrolü, 5 nM miR-25-mimik ve negatif kontrolü uygulamaları ayrı deneyler olarak yapılmıştır. Elde edilen cDNA örneklerinde miR-25, β -katenin, Axin2 ve LRP-5 ifadelerindeki değişimler belirlenmiştir.

4.3.1. Baicalein Uygulaması Sonrası miR-25 İfadesi

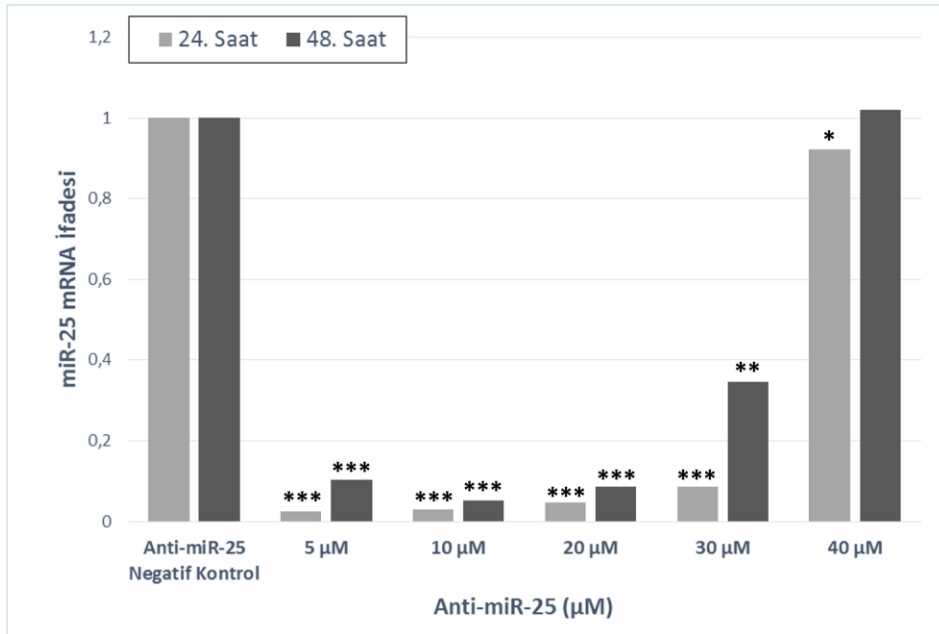
Saos-2 hücrelerine 35 μM ve 50 μM baicalein uygulanarak 0., 24. ve 48. saatlerde miR-25 ifadesinin zamana ve doza bağlı olarak değişimi RT-PCR ile belirlenmiştir. Uygulanan her iki baicalein konsantrasyonunun doza ve zamana bağlı olarak miR-25 ifadesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Baicalein uygulaması sonrası miR-25 ifade değişimi (** p<0,001; *** p<0,0001)

4.3.2. Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası miR-25 İfadesi

Saos-2 hücrelerindeki miR-25 ifadesini baskılamak için uygulanacak anti-miR-25 inhibitör konsantrasyonunu belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda 24. ve 48. saatler için uygulama yapılmıştır. Elde edilen örneklerden cDNA sentezlenerek miR-25 ifadesi değerlendirilmiştir. Uygulanan 5-10-20 ve 30 μ M dozlarda miR-25 ifadesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüş gözlenirken, 40 μ M anti-miR-25 dozunun baskılamada etkili olmadığı görülmüştür (Şekil 4.6). Veriler doğrultusunda anti-miR-25 inhibitör dozu olarak 10 ve 20 μ M verilerinin en etkili dozlar olduğu bulunmuş ve ortalama 15 μ M anti-miR-25 dozunun sonraki çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir.

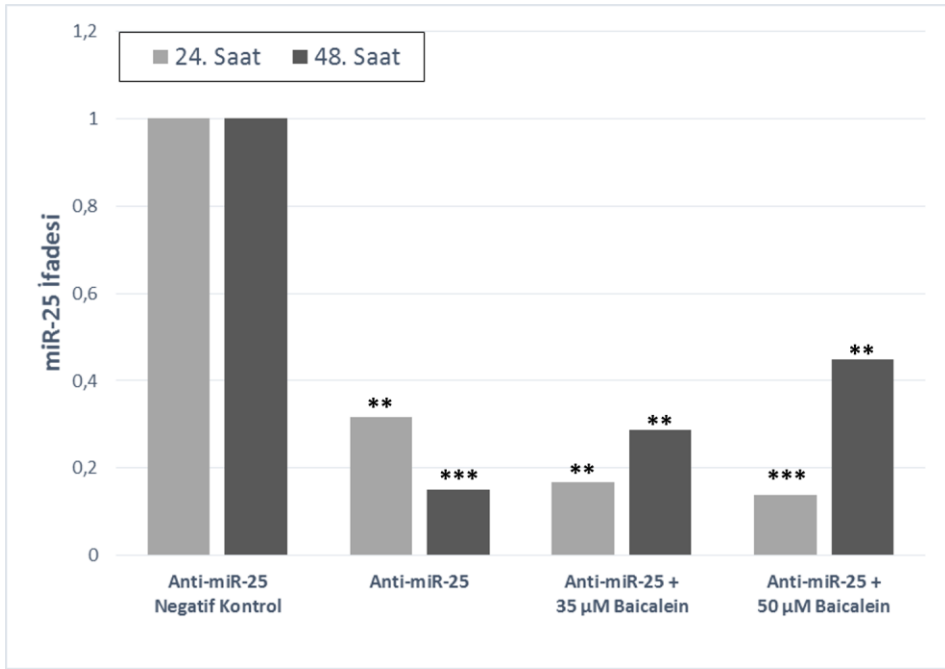


Şekil 4.6 Anti-miR-25 uygulaması sonrası miR-25 ifade değişimi (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$)

15 μ M anti-miR-25 ve 15 μ M negatif kontrol dozu kullanılarak hücrelere uygulama yapılmıştır. Uygulamadan 8 saat sonra anti-miR-25 uygulanan 2 grupta besiyeri değiştirilerek 35 μ M ve 50 μ M baicalein uygulanmış ve 24. saat ve 48.

saatlerde hücreler toplanmıştır. Anti-miR-25 negatif kontrol ve yalnızca anti-miR-25 uygulanan gruplarda sadece besiyeri değiştirilmiştir. Uygulama yapılan tüm gruplarda miR-25 ifadeleri değerlendirilmiştir.

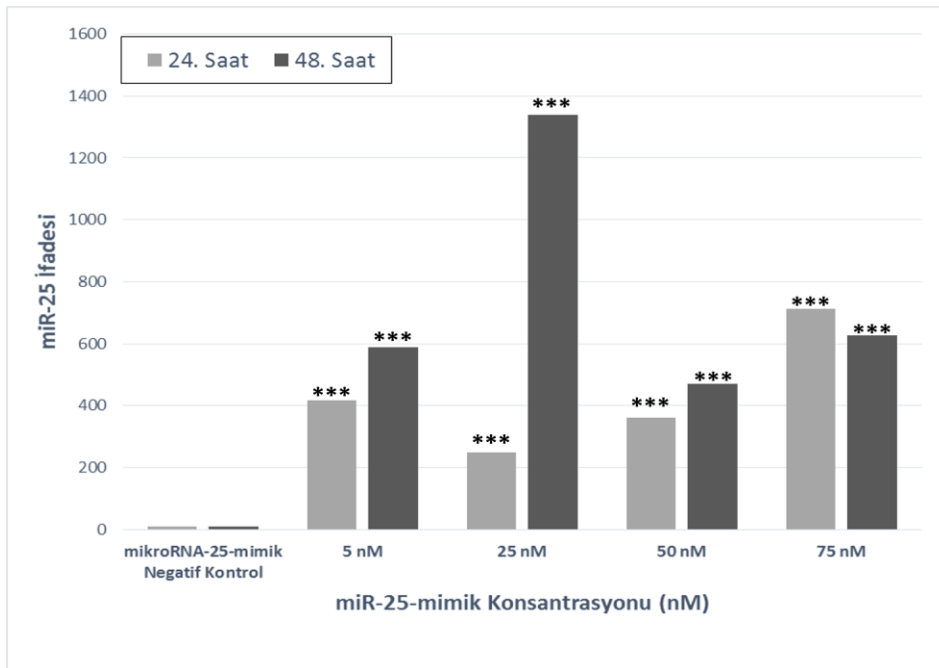
Anti-miR-25 ve anti-miR-25 + baicalein uygulaması sonuçları anti-miR-25 negatif kontrol grubu karşılaştırıldığında, hem anti-miR-25 uygulanan grupta hem de anti-miR-25 ile birlikte baicalein (35 ve 50 μ M) uygulanan gruplarda miR-25 ifadesinde azalma meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Anti-miR-25 ve baicalein uygulamaları sonrası miR-25 ifade değişimi (** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$)

4.3.3. MiR-25-mimik Transfeksiyonu Sonrası miR-25 İfadesi

Saos-2 hücrelerindeki miR-25 ifadesinin artırılmasında kullanılacak sentetik miR-25-mimik dozunun belirlenmesi için hücelere 5, 25, 50 ve 75 nM konsantrasyonlarda miR-25-mimik dozları uygulanmıştır. Uygulamadan 24 ve 48 saat sonra hücreler toplanarak total RNA izolasyonu yapılmış ve RT-PCR ile elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda uygulanan bütün konsantrasyonların miR-25 ifadesinde artışa neden olduğu gözlenmiştir. Üretici firmanın önerdiği dozlar baz alınarak 5 nM miR-25-mimik dozunun hücredeki miR-25 seviyesini artırmada kullanılacak yeterli doz olduğuna karar verilmiştir (Şekil 4.8).

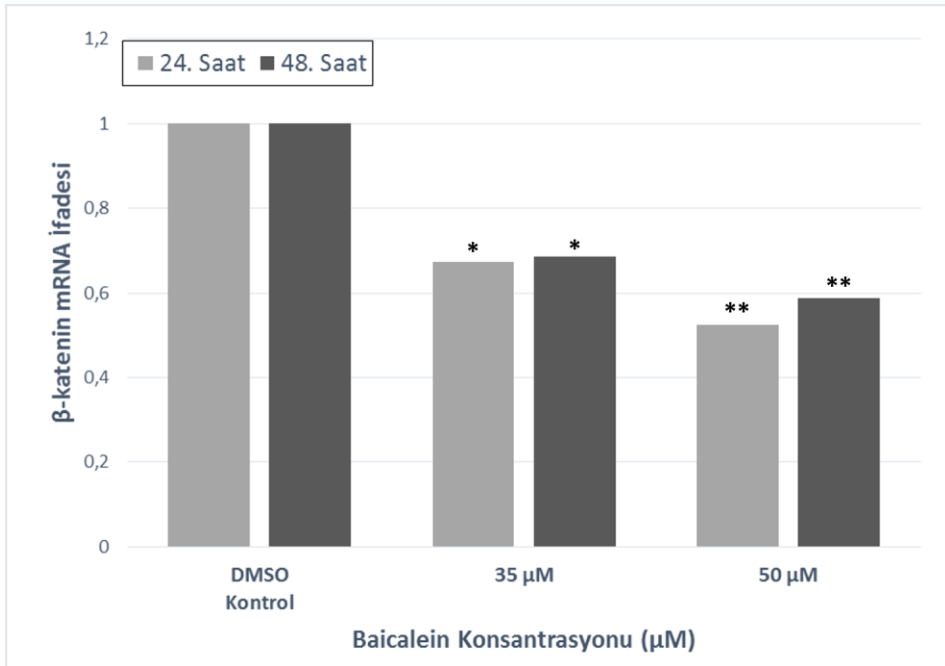


Şekil 4.8 MikroRNA-25 mimik uygulaması sonrası miR-25 ifade değişimi (***)
p<0,0001)

4.3.4. Baicalein Uygulaması Sonrası İlgili Genlerin mRNA İfadeleri

β -katenin

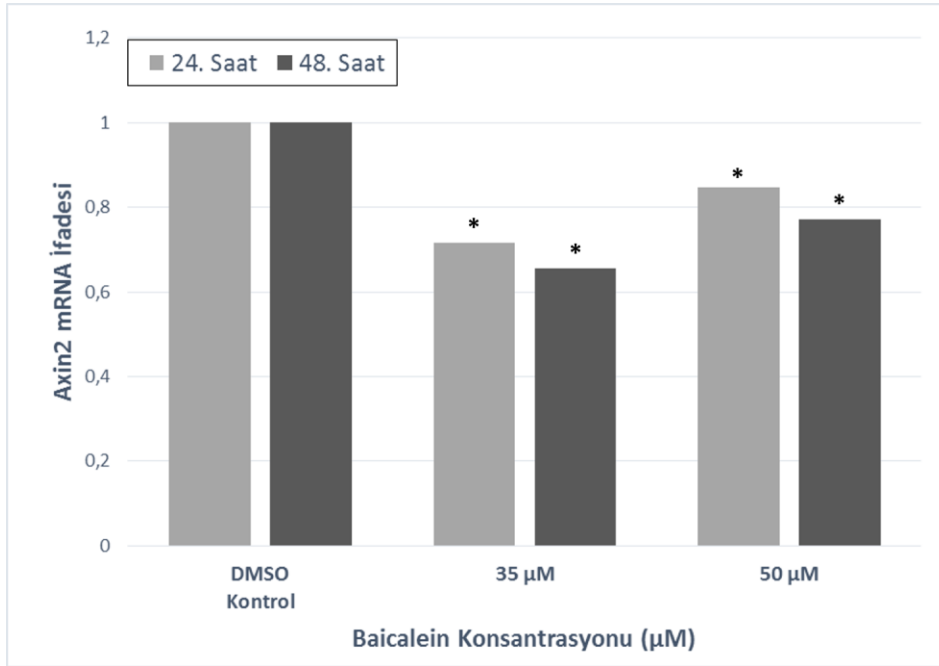
Saos-2 hücrelerine 35 μ M ve 50 μ M baicalein uygulamasının kontrol ile kıyaslandığında β -katenin ifadesinde doza ve zamana bağlı istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Baicalein uygulaması sonrası β -katenin mRNA ifadesi (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$)

Axin2

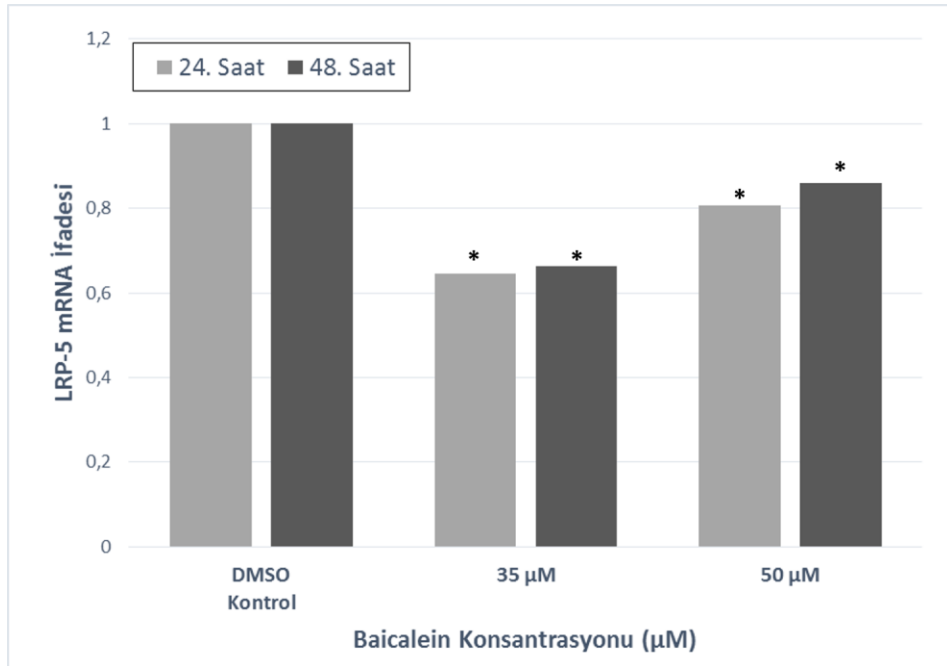
Saos-2 hücrelerine baicalein uygulaması sonucunda Axin2 ifadesi değerlendirilmiş ve DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Axin2 ifadesinde her iki baicalein dozunda 24. ve 48. saatlerde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Baicalein uygulaması sonrası Axin2 mRNA ifadesi (* p<0,01)

LRP-5

Saos-2 hücrelerine baicalein uygulamasının ardından LRP-5 ifadesi belirlenmiştir. Veriler sonucunda DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki baicalein dozu uygulamasında LRP-5 ifadesinin 24. ve 48. saatlerde azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.11).

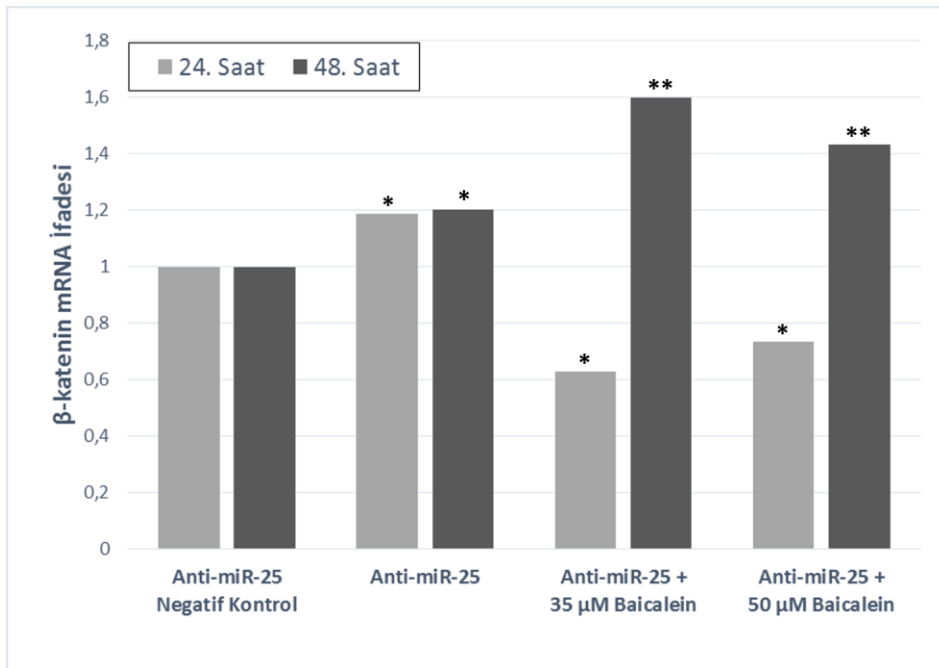


Şekil 4.11 Baicalein uygulaması sonrası LRP-5 mRNA ifadesi (* p<0,01)

4.3.5. Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası İlgili Genlerin mRNA İfadeleri

β -katenin

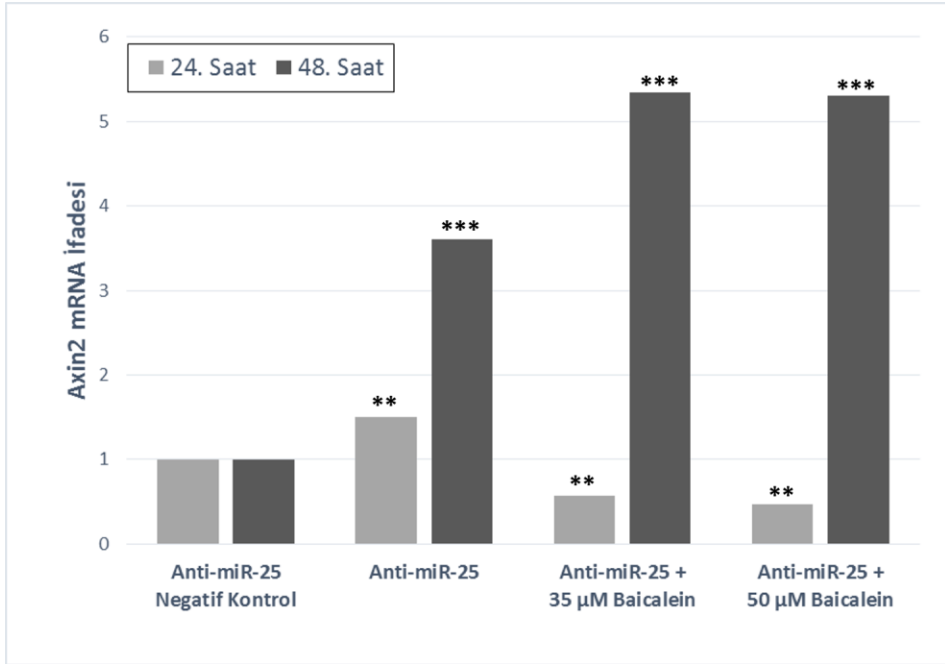
Saos-2 hücrelerinde anti-miR-25, anti-miR-25 + 35 μ M baicalein ve anti-miR-25 + 50 μ M baicalein dozları anti-miR-25 negatif kontrol grubu ile β -katenin ifadesi için karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Anti-miR-25'in tek başına uygulandığı grupta 24. ve 48. saatlerde β -katenin ifadesinde artış gözlenmiştir. Anti-miR-25'in her iki baicalein dozu ile kombinasyonunda β -katenin ifadesi 24. saatte azalırken, 48. saatte ifadenin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası β -katenin mRNA ifadesi (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$)

Axin2

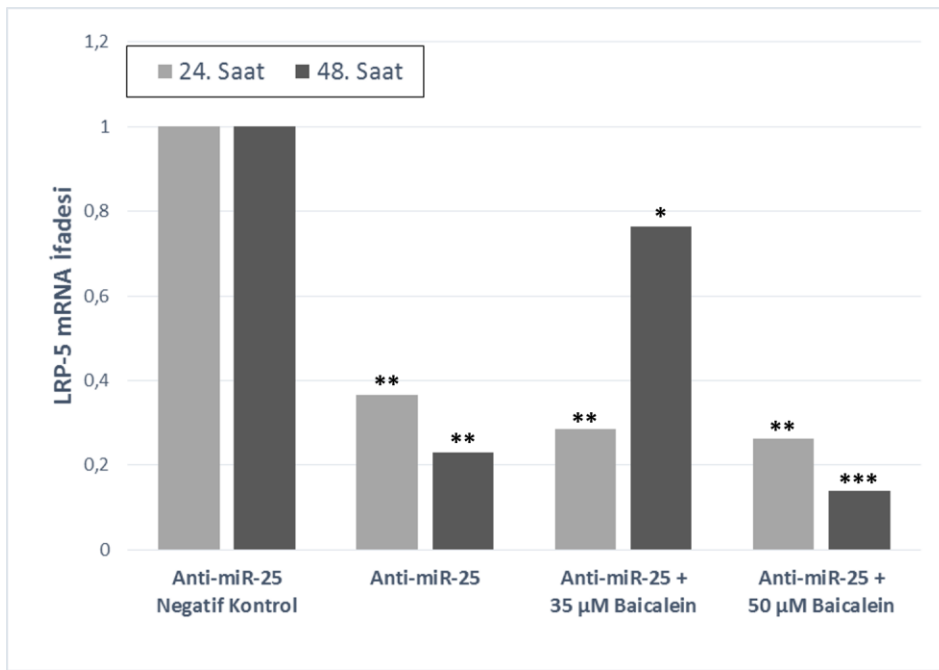
Saos-2 hücrelerine anti-miR-25 ve anti-miR-25'in 35 ve 50 μ M baicalein ile birlikte uygulanması sonucunda meydana gelen Axin2 ifade değişimi belirlenmiş ve sonuçlar anti-miR-25 negatif kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Anti-miR-25'in tek başına uygulandığı grupta Axin2 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Anti-miR-25'in 35 ve 50 μ M baicalein ile birlikte uygulandığı gruplarda 24. saatte Axin2 ifadesinde azalma meydana gelirken, 48. saatte her iki baicalein dozunda da Axin2 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası Axin2 mRNA ifadesi (** p<0,001; *** p<0,0001)

LRP-5

Saos-2 hücrelerine anti-miR-25'in tek başına ve 35 ve 50 μ M baicalein konsantrasyonları ile birlikte uygulanması sonucunda meydana gelen LRP-5 mRNA ifadesindeki değişim belirlenmiş ve sonuçlar anti-miR-25 negatif kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Anti-miR-25'in hem tek başına hem de baicalein dozları ile kombinasyonundan elde edilen verilere göre 24. ve 48. saatlerde LRP-5 mRNA ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (şekil 4.14).

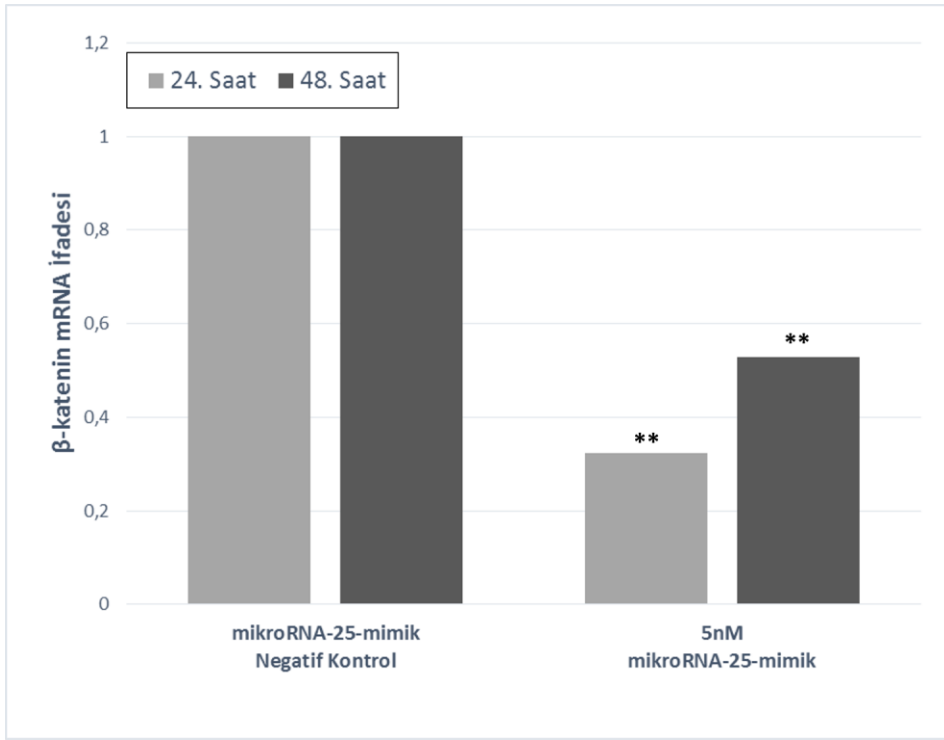


şekil 4.14 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası LRP-5 mRNA ifadesi (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$)

4.3.6. MikroRNA-25-mimik Transfeksiyonu Sonrası İlgili Genlerin mRNA İfadeleri

β -katenin

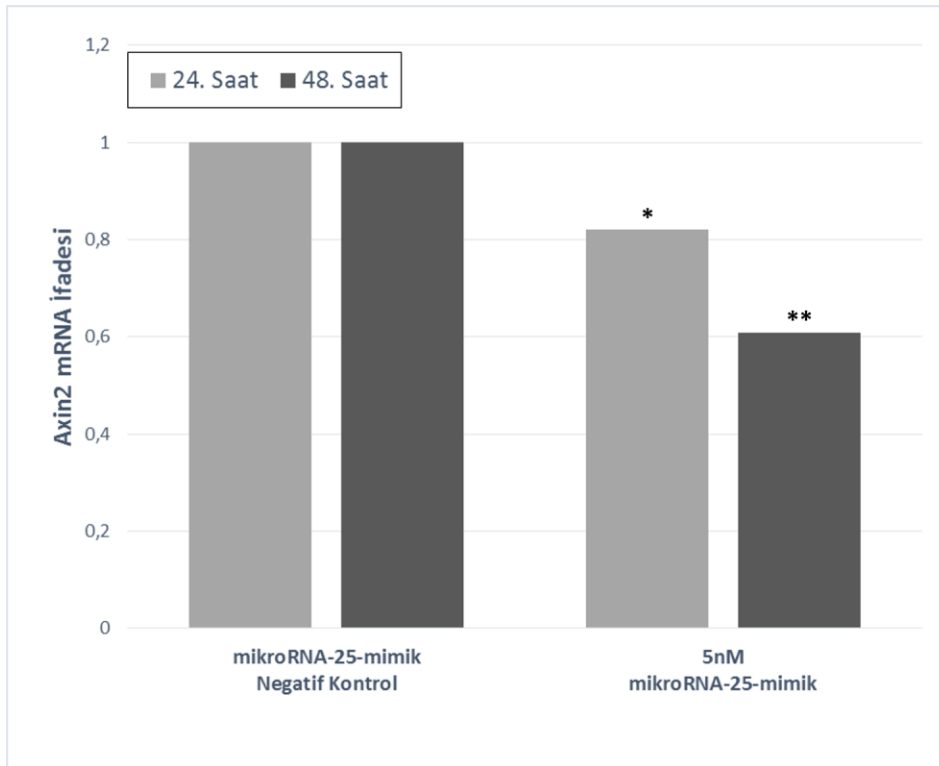
Saos-2 hücrelerine 5 nM miR-25-mimik transfeksiyonu sonrasında elde edilen gen ifadesi sonuçları miR-25-mimik negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında β -katenin mRNA ifadesinde 24. ve 48. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası β -katenin mRNA ifadesi (** p<0,001)

Axin2

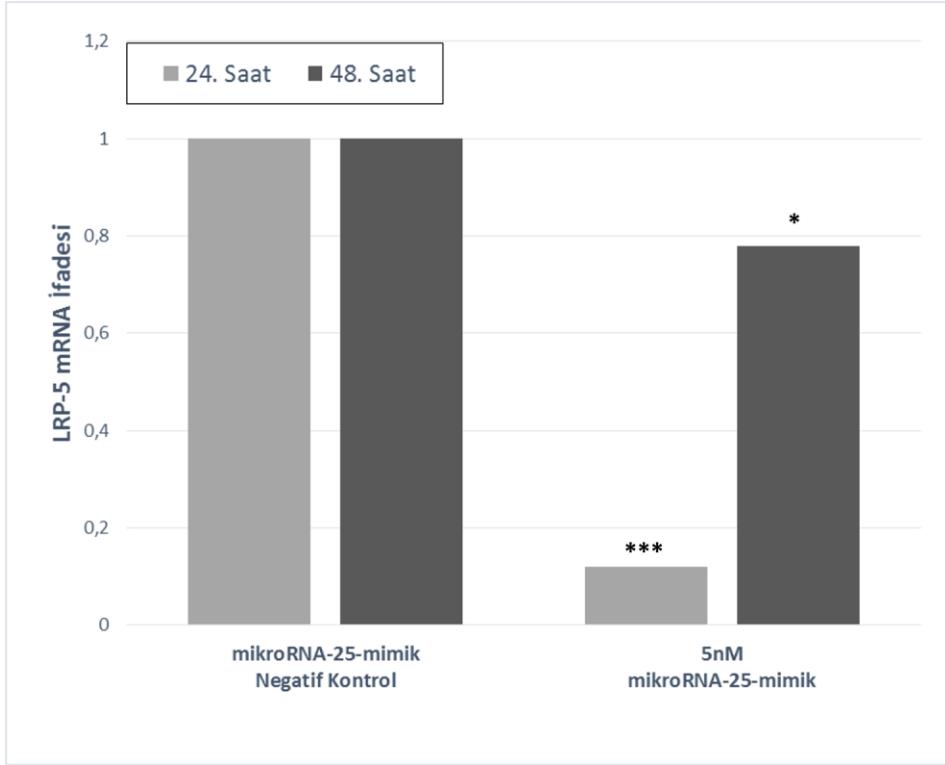
Saos-2 hücrelerine 5nM miR-25-mimik transfeksiyonu sonrası 24. ve 48. saatlerde örnekler alınmış ve Axin2 gen ifadeleri saptanmıştır. Sonuçlar miR-25-mimik negatif kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. MikroRNA-25-mimik negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24. ve 48. saatlerde Axin2 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası Axin2 mRNA ifadesi (* p<0,01; ** p<0,001)

LRP-5

Saos-2 hücrelerine 5 nM miR-25-mimik transfeksiyonu sonrasında elde edilen sonuçlar miR-25-mimik negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında LRP-5 ifadesinde 24. ve 48. saatlerde azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası LRP-5 mRNA ifadesi (* p<0,01; *** p<0,0001)

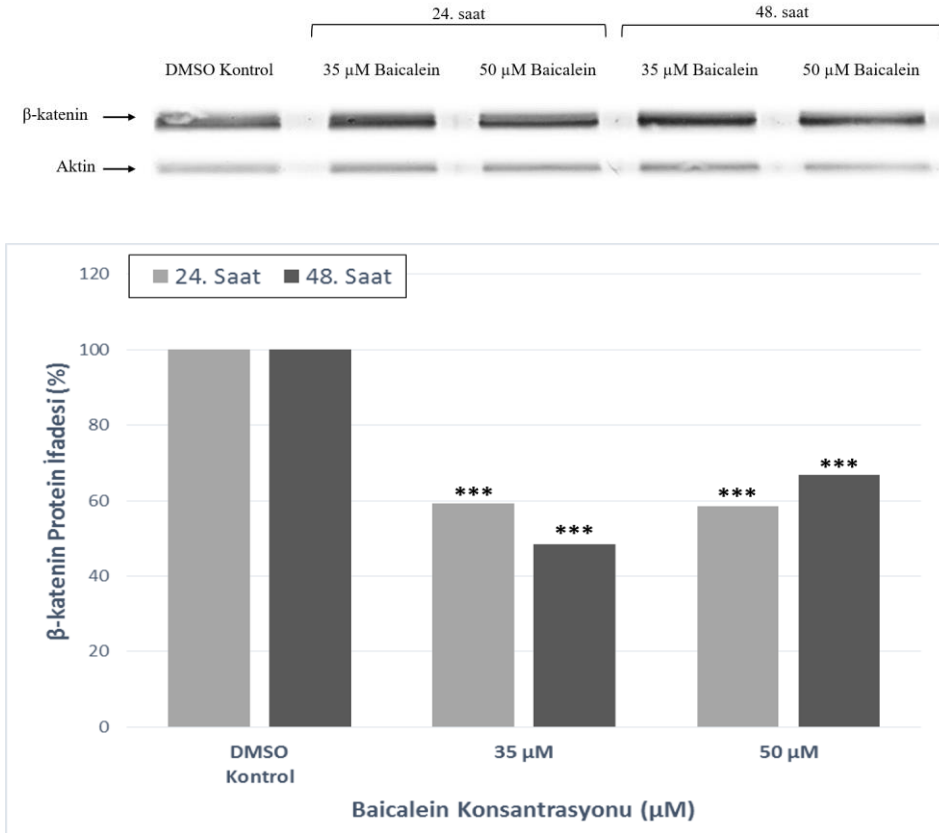
4.4. Western Blotlama Sonuçları

Çalışmada, DMSO, 35 ve 50 μM baicalein, 15 μM anti-miR-25 ve anti-miR-25 negatif kontrolü, 5 nM miR-25-mimik ve miR-25-mimik negatif kontrolü ile 24 saat ve 48 saat muamele edilen Saos-2 hücrelerinde β -katenin, Axin2, LRP-5 ve GSK-3 β protein ifadelerindeki değişim belirlenmiştir.

4.4.1. Baicalein Uygulaması Sonrası Protein İfadeleri

β -katenin

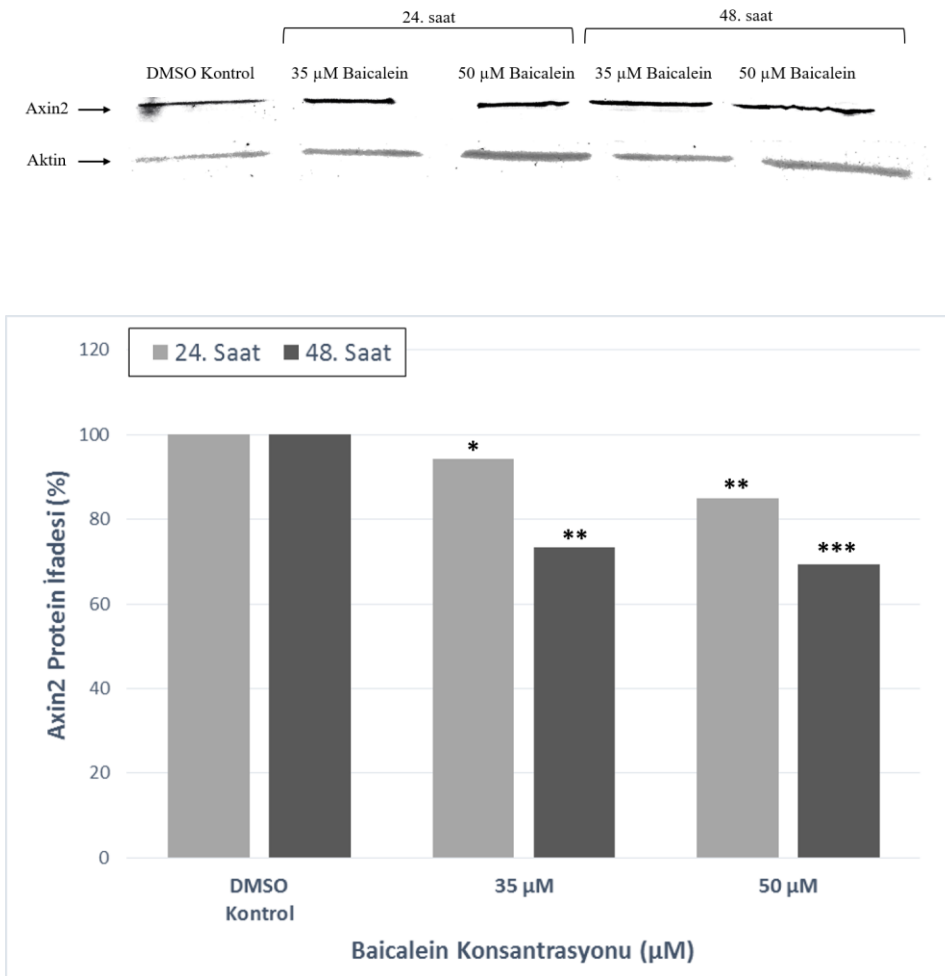
Saos-2 hücrelerine 35 μM ve 50 μM baicalein uygulamasından sonra 24. ve 48. saatlerdeki β -katenin protein ifade verileri değerlendirildiğinde, DMSO kontrol grubuna kıyasla kullanılan her iki baicalein dozunun da β -katenin ifadesinin azalmasında etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4.18, $p < 0,05$).



Şekil 4.18 Baicalein uygulaması sonrası β -katenin protein ifadesi (***) $p < 0,0001$)

Axin2

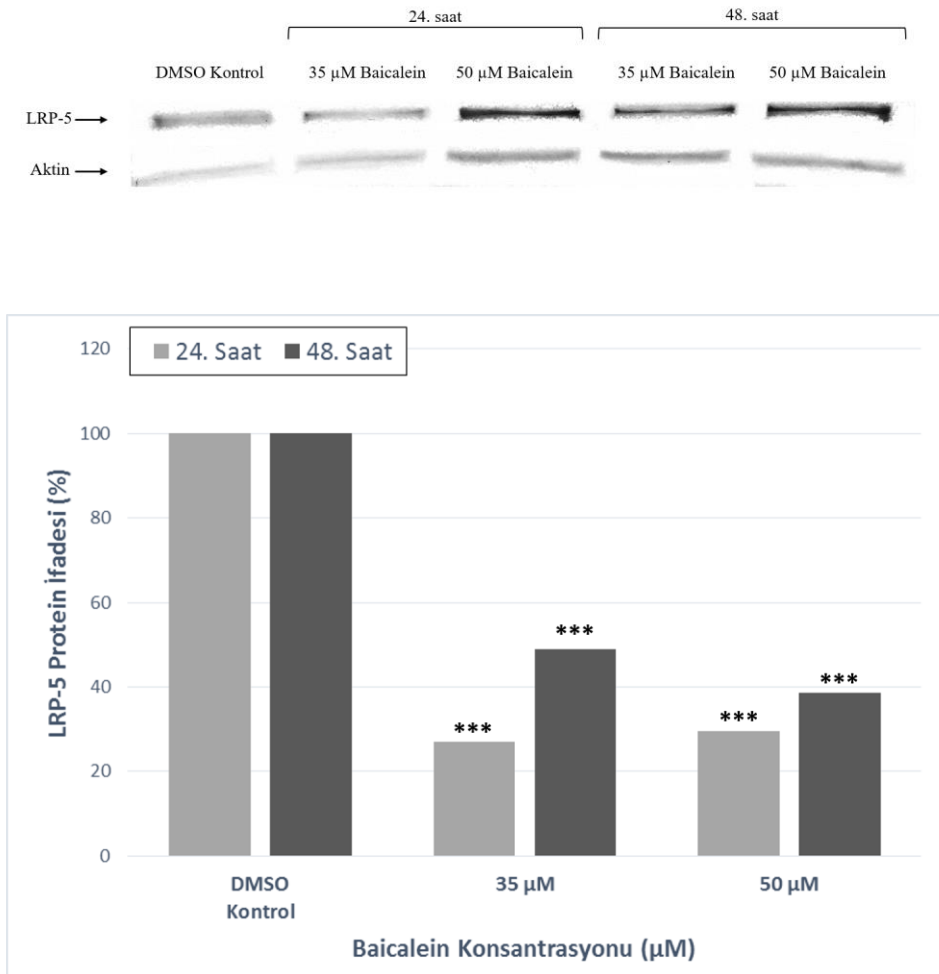
Baicalein (35 μ M ve 50 μ M) uygulaması sonrası yapılan western blot analizi ile elde edilen protein ifadesi verileri değerlendirildiğinde, DMSO kontrol grubuna kıyasla kullanılan her iki baicalein dozunun zamana bağlı olarak Axin2 ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmasında etkili olduğu saptanmıştır (Şekil 4.19; $p < 0,05$).



Şekil 4.19 Baicalein uygulaması sonrası Axin2 protein ifadesi (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$)

LRP-5

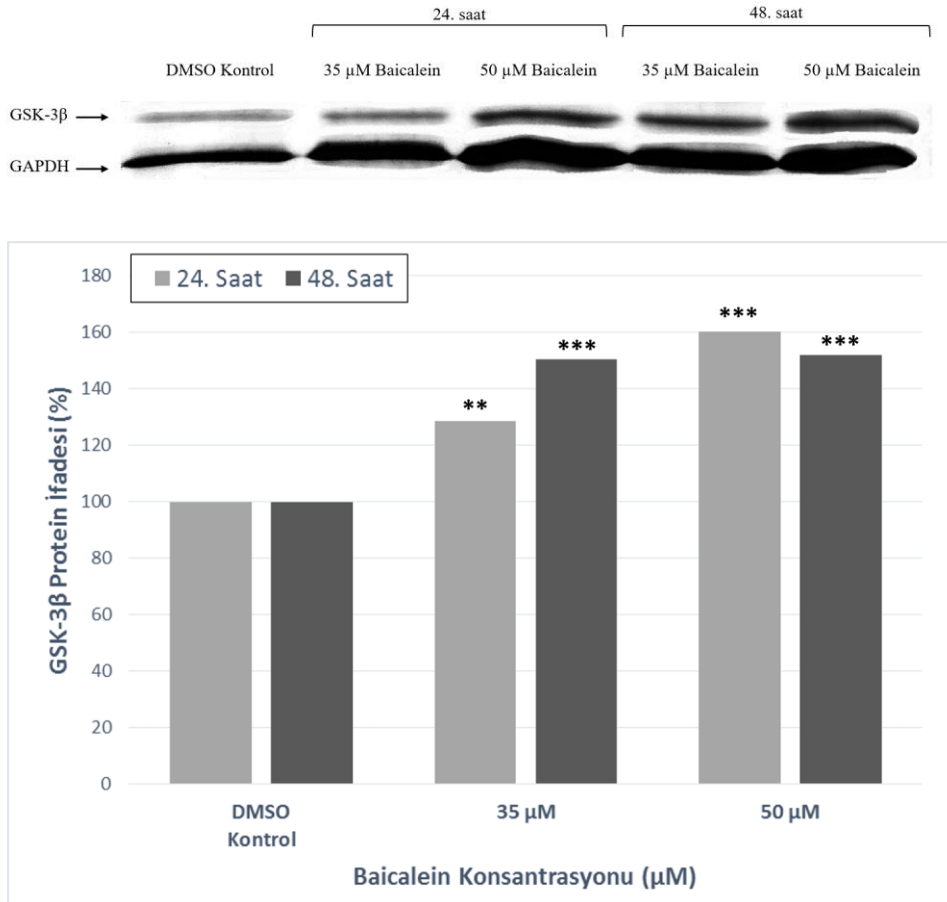
Hücrelere 35 μM ve 50 μM baicalein uygulamasının ardından elde edilen örneklerde LRP-5 protein ifadesi değerlendirilmiştir. 24. ve 48. saat verileri DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığında LRP-5 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (Şekil 4. 20).



Şekil 4.20 Baicalein uygulaması sonrası LRP-5 protein ifadesi (*** $p < 0,0001$)

GSK-3 β

Saos-2 hücrelerine 35 μ M ve 50 μ M baicalein uygulamasının GSK-3 β protein ifadesine etkisini belirlemek amacıyla yapılan protein ifadesi çalışmalarından elde edilen verilere göre GSK-3 β ifadesinde DMSO kontrol grubuna göre 24. ve 48. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.21; $p < 0,05$).

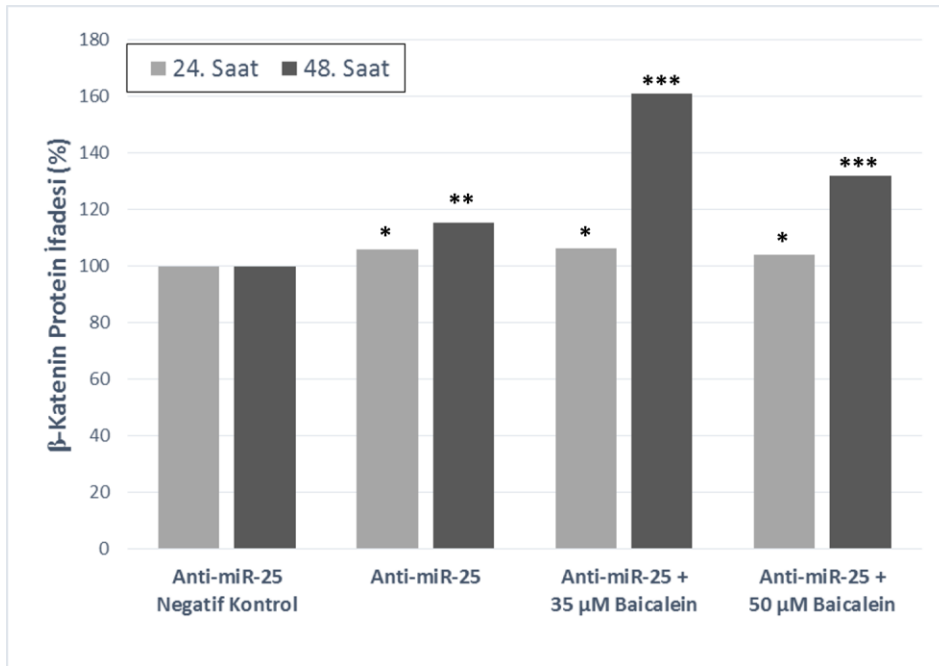
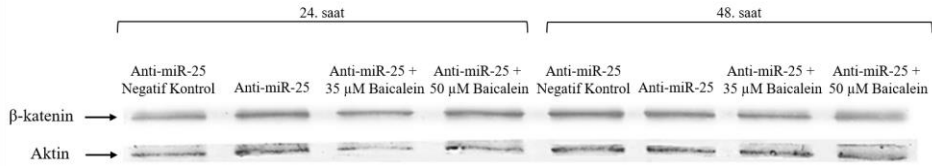


Şekil 4.21 Baicalein uygulaması sonrası GSK-3 β protein ifadesi (** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$)

4.4.2. Anti-miR-25 Transfeksiyonu Sonrası İlgili Protein İfadeleri

β -katenin

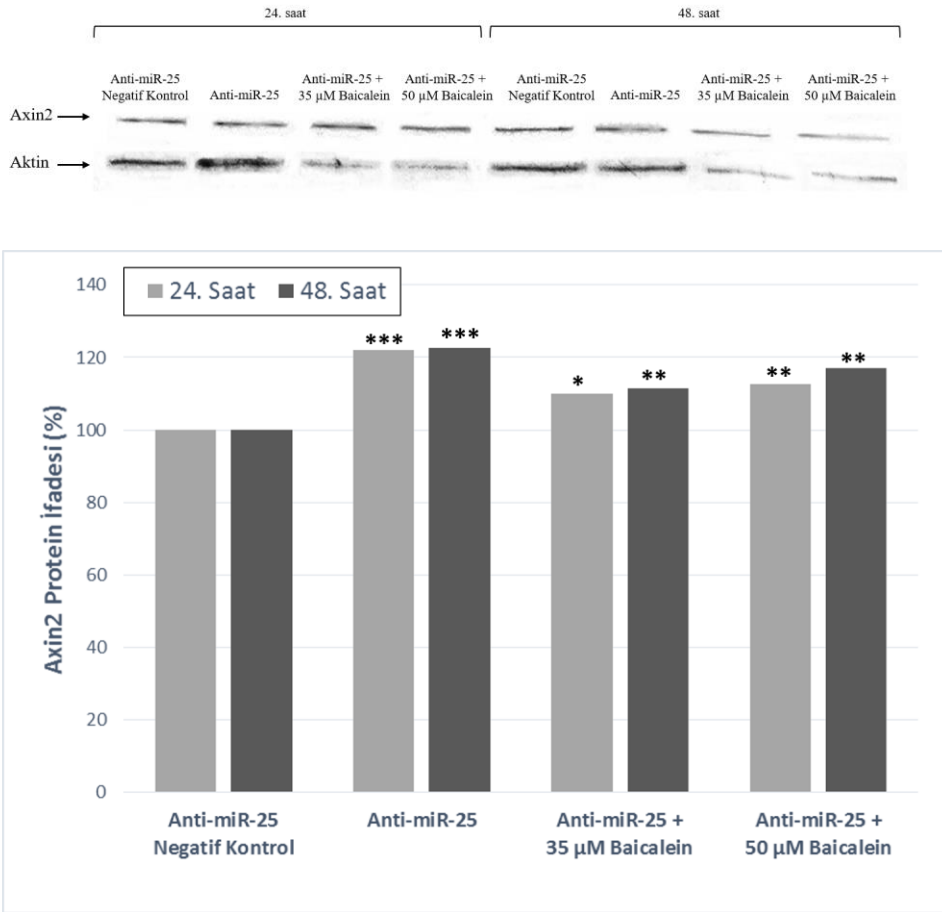
Anti-miR-25 uygulama sonrası β -katenin protein ifadelerindeki değişimler belirlenmiş ve sonuçlar anti-miR-25 negatif kontrol grubu ile karşılaştırılarak ifade değişimi değerlendirilmiştir. Anti-miR-25'in hem tek başına hem de baicalein dozları (35 μ M ve 50 μ M) ile birlikte uygulandığı gruplarda 24. ve 48. saatlerde β -katenin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası β -katenin protein ifadesi (* p<0,01; ** p<0,001; *** p<0,0001)

Axin2

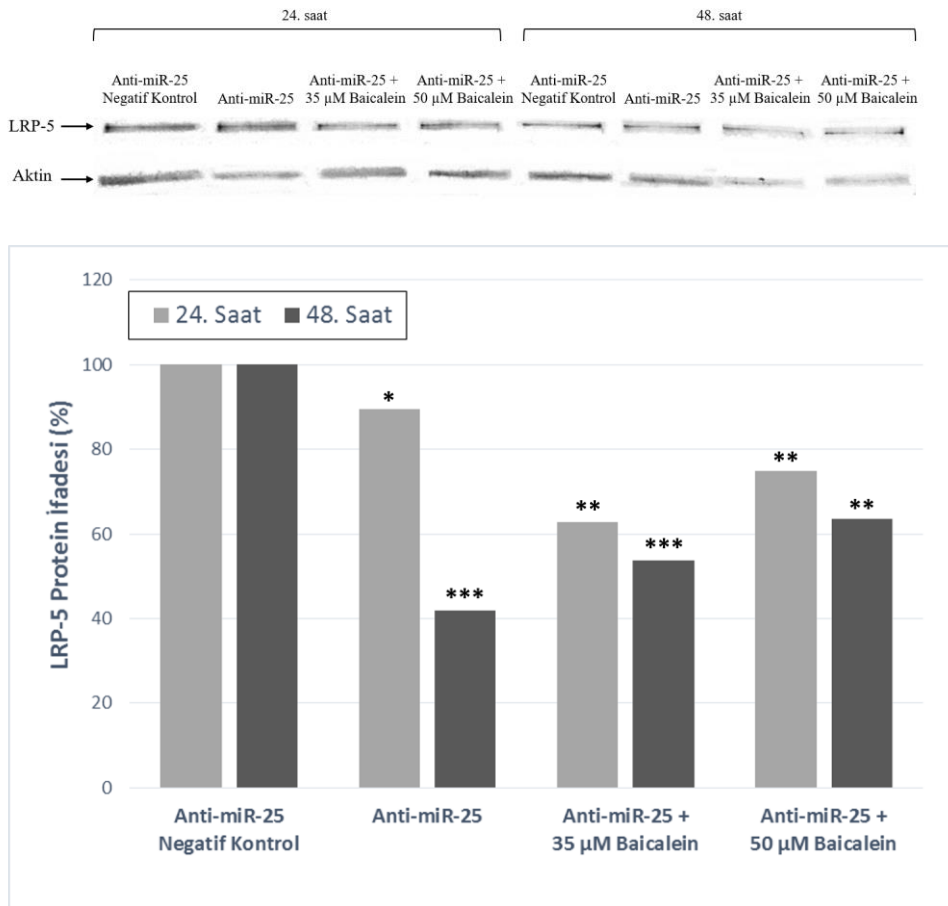
Anti-miR-25 uygulaması sonrası Axin2 protein ifadelerindeki değişimler Şekil 4.23’de verilmiştir. Sonuçlar anti-miR-25 negatif kontrol grubu ile karşılaştırılarak ifade değişimi değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre anti-miR-25’in hem tek başına uygulandığı grupta hem de baicalein dozları (35 μ M ve 50 μ M) ile 24 ve 48. saatlerde Axin2 ifadesinde artış gözlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.23 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası Axin2 protein ifadesi (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$)

LRP-5

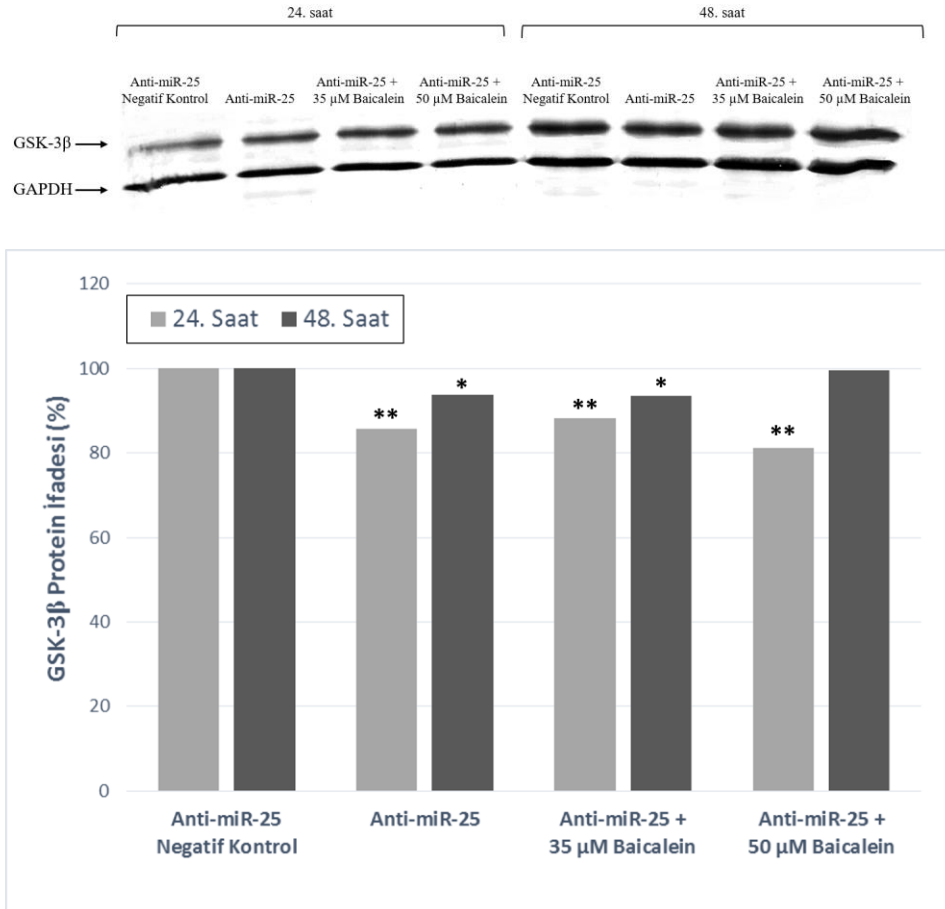
Anti-miR-25 uygulaması sonrası LRP-5 protein ifadesindeki değişimler aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.24). Sonuçlar anti-miR-25 negatif kontrol grubu ile karşılaştırılarak ifade değişimi değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre anti-miR-25'in hem tek başına uygulandığı grupta hem de baicalein dozları ile birlikteliğinde 24 ve 48. saatlerde LRP-5 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.24 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası LRP-5 protein ifadesi (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$)

GSK-3 β

Anti-miR-25 uygulama sonrası GSK-3 β protein ifadesindeki değişimler western blotlama ile belirlenmiştir. Anti-miR-25 negatif kontrol grubu ile karşılaştırılarak ifade değişimi değerlendirilmiştir. Anti-miR-25'in tek başına uygulandığı grupta 24 ve 48. saatlerde GSK-3 β ifadesinde azalma gözlenmektedir. Anti-miR-25 ve 35 μ M baicalein dozunun birlikte uygulandığı gruplarda 24. ve 48. saatlerde GSK-3 β protein ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.25). Anti-miR-25 ve 50 μ M baicalein dozunun birlikte uygulandığı gruplarda ise 24. saatte GSK-3 β protein ifadesi azalırken ($p<0,05$), 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir değişim meydana gelmemiştir ($p>0,05$).



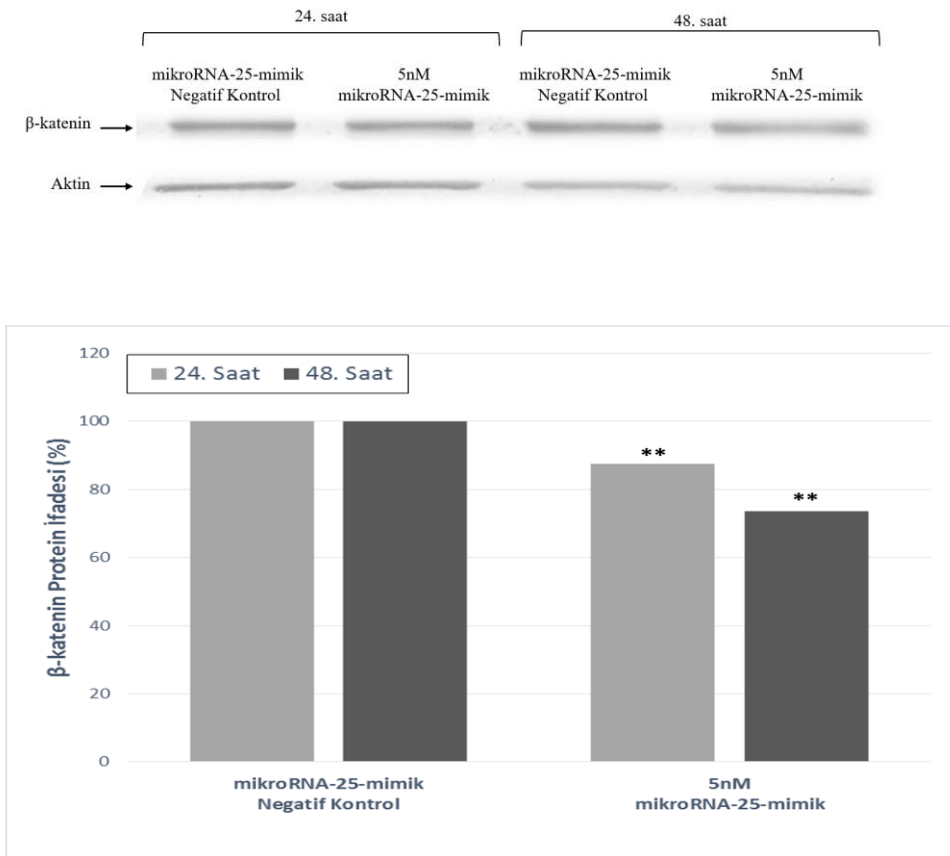
Şekil 4.25 Anti-miR-25 ve baicalein uygulaması sonrası GSK-3 β protein ifadesi (* $p<0,01$; ** $p<0,001$)

4.4.3. MikroRNA-25-mimik Transfeksiyonu Sonrası İlgili Proteinlerin İfadeleri

Saos-2 hücrelerine 5nM miR-25-mimik ve 5 nM miR-25-mimik negatif kontrolü transfeksiyonu sonrasında western blotlama deneyleri gerçekleştirilmiş ve β -katenin, Axin2, LRP-5 ve GSK-3 β protein ifadesi sonuçları değerlendirilmiştir.

β -katenin

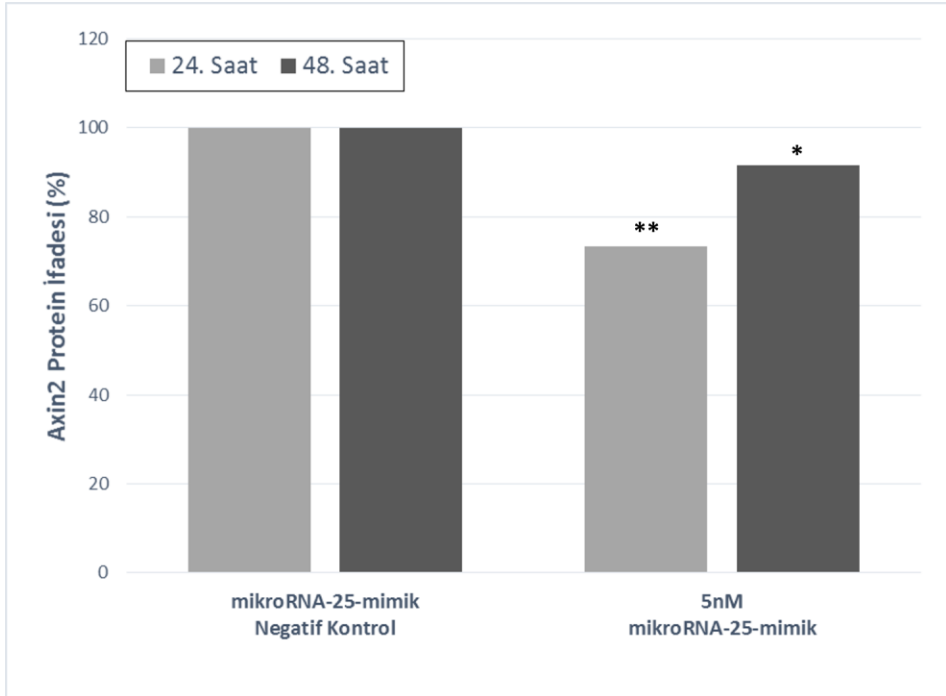
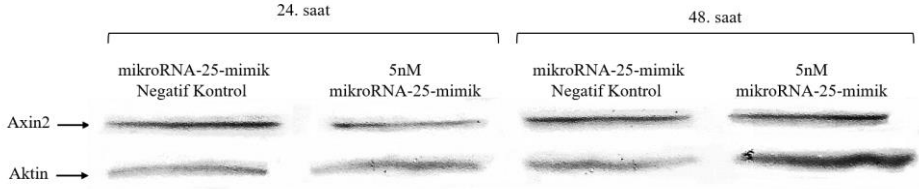
Saos-2 hücrelerine 5nM miR-25-mimik transfeksiyonu sonrasında elde edilen β -katenin protein ifadesi sonuçları mimik kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24. ve 48. saatlerde β -katenin protein ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir azalmayı gözlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası β -katenin protein ifadesi (**
p<0,001)

Axin2

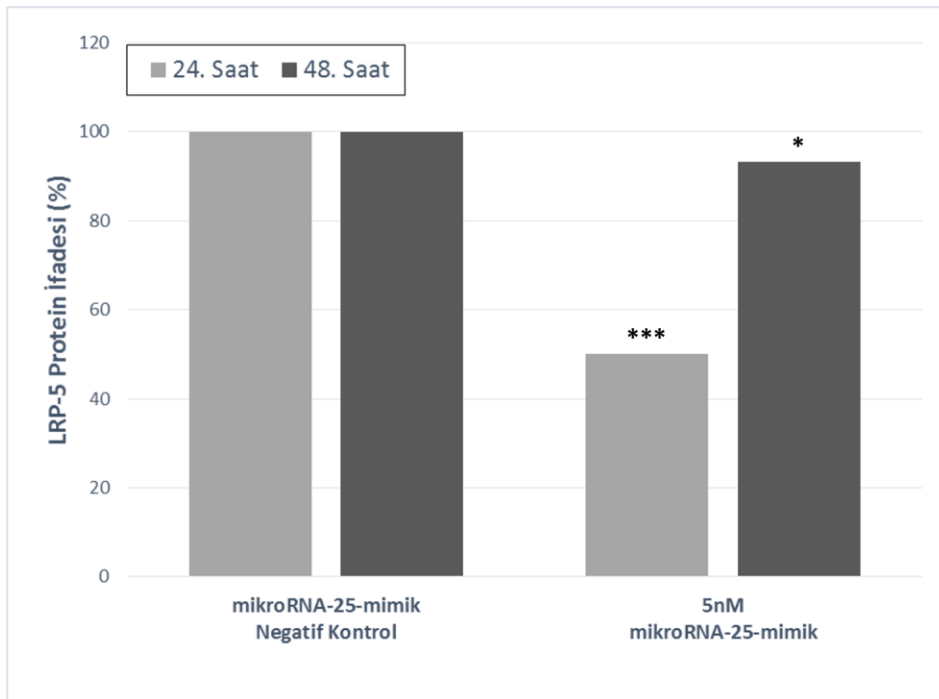
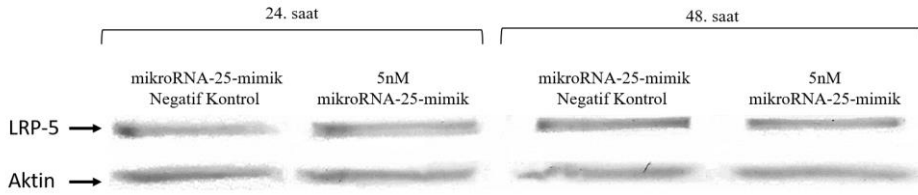
Saos-2 hücrelerine 5nM miR-25-mimik transfeksiyonu sonrasında elde edilen protein ifadesi sonuçları miR-25-mimik negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24. ve 48. saatlerde Axin2 protein ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası Axin2 protein ifadesi (* p<0,01; ** p<0,001)

LRP-5

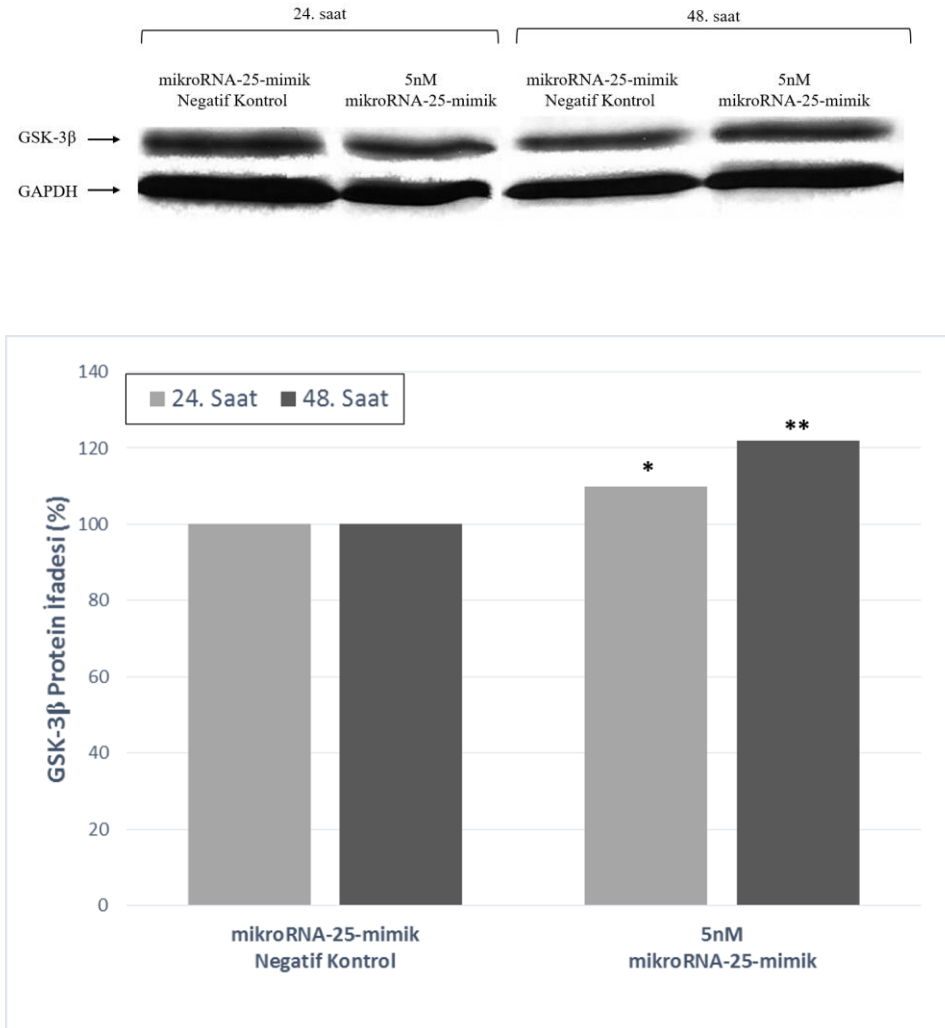
Saos-2 hücrelerine 5nM miR-25-mimik transfeksiyonu sonrasında elde edilen protein ifadesi sonuçları mimik kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24. ve 48. saatlerde LRP-5 protein ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası LRP-5 protein ifadesi (* p<0,01; *** p<0,0001)

GSK-3 β

Saos-2 hücrelerine 5nM miR-25 mimik transfeksiyonu sonrasında elde edilen GSK-3 β protein ifadesi sonuçları mimik kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24. ve 48. saatlerde GSK-3 β protein ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 MikroRNA-25-mimik uygulaması sonrası GSK-3 β protein ifadesi (* p<0,01; ** p<0,001)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Osteosarkoma, ergenler ve genç yetişkinler arasında en sık rastlanan primer malign kemik tümörüdür. Bununla birlikte, hastalık gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmalar tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Hastalık tedavisinde yeni yaklaşımlar ve alternatif uygulamalar tedavi başarısı için umut vericidir. Birçok yaklaşım bu amaçla çalışılmaktadır. Bunların bir kısmını organik kökenli bazı ekstraktlardan elde edilen bileşiklerin etkileri ve moleküler mekanizmaları oluşturmaktadır. Baicalein *Scutellaria baicalensis*'in köklerinden izole edilen doğal bir bitki flavonudur ve çeşitli kanser türlerine karşı anti-tümör etki sergilediği, apoptozu indüklediği ve antiproliferatif özelliği farklı hücre tiplerinde tanımlanmıştır (Wang vd., 2014; Han vd., 2015; Ye vd., 2015; Liu vd., 2016). Hücrede gen ifadesi düzenleyicisi olarak işlev gören miR-25'in kanser ilişkili düzenleyici özelliği ve Wnt yolağındaki etkileri de yine bazı çalışmalarla ortaya konulmuştur (Kim vd., 2009; Li vd., 2009; Feng vd., 2016; Huo vd., 2016). Literatürde baicalein ile sadece miR-21 (Gao vd., 2013) ve miR-124 (Dong vd., 2015) ifadesi üzerine çalışma bulunurken, mikroRNA-25 ifadesi ile baicalein arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, baicaleinin Saos-2 osteosarkoma hücrelerinde Wnt/ β -katenin yolağı ve miR-25 ifadesi üzerine etkisi belirlenmiştir. Baicalein uygulaması ile gen ifadesinde artış saptanan miR-25'in Wnt/ β -katenin yolağında yer alan belirteç genlerin ifadelerine etkisi de saptanmıştır.

Baicaleinin osteosarkoma hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ($IC_{50}=35 \mu M$) ve apoptozu indüklediği ($AP_{50}=50 \mu M$) saptanmıştır (Şekil 4.1- 4.3). Baicaleinin antiproliferatif ve apoptik etkisinin olduğu birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalarda kullanılan baicalein konsantrasyonları kullandığımız baicalein dozları ile benzerlik göstermektedir (He vd., 2015; Liu vd., 2016). 2013 yılında yapılan bir çalışma, baicaleinin T24 mesane kanseri hücrelerinde mitokondri-bağımlı kaspaz yolunu aktive ederek ve Akt fosforilasyonunu inhibe ederek apoptozu başlattığı bildirilmiştir. Ayrıca, baicaleinin bölünmenin G1/S safhasında hücre döngüsü ilerlemesini bloke ederek ve kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktive edip, Bcl-2 ifadesini azalttığı ve Bax ifadesini artırarak apoptozu indüklediği, böylece T24 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ortaya konmuştur (Li vd.,2013). Yakın tarihli bir çalışmada baicaleinin intraselüler ROS üretimi ve BNIP3'ün aktivasyonu yoluyla

MG-63 osteosarkoma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu artırdığı gösterilmiştir (Ye vd., 2015). Bu sonuçlar, baicalein aracılı apoptozun farklı kanser hücrelerinde moleküler hedeflerinin farklı olduğunu göstermektedir (Chen vd., 2013; Han vd., 2015; Liu vd., 2016).

Oldukça korunumlu olan temel Wnt/ β -katenin yolağı, en çok çalışılan Wnt sinyal yoludur. Yetişkinlerin embriyonik gelişiminde ve doku homeostazında hayati bir rol oynamaktadır. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının düzenlenmesi, kanser dahil olmak üzere birçok hastalık ile yakından ilişkilidir. Kemik oluşumu sırasında osteoblast farklılaşmasına yol açan en önemli yolaklardan biri Wnt sinyal yolağıdır (Takani vd., 2011). Wnt ligandlarının transmembran reseptöre bağlanması sonucu LRP-5/6 ile kompleks oluşur ve bu kompleks Disheveled'ın (Dsh) fosforillenerek aktive olmasını sağlar. Dsh aktivasyonu, glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β)'yı inhibe eder ve bundan sonra ubiquitinasyon ve proteazomal yolaklar vasıtasıyla β -katenin bozunumu azalır. β -kateninin sitoplazmada birikip çekirdeğe translokasyonu sonucu oluşan kompleks hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz gibi hücresel süreçlerde yer alan bir çok genin transkripsiyonunu düzenler (Huang vd., 2010). Wnt yolağının düzenlenmesi çalışmalarında yolakta yer alan β -katenin, GSK-3 β ve Axin2 gibi gen ifadeleri hedeflenir. Bu gen ifadelerindeki değişiklik yolağın aktif ya da inaktif olduğunu ortaya koyar. Önceki çalışmalar, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivasyonunun osteosarkoma dokusunda/hücrelerinde yaygın olduğunu ve anormal aktivasyonunun osteosarkoma tümör oluşumu, metastaz ve kemoterapötik yanıtlarda önemli bir rol oynadığını bildirmiştir (Cai vd., 2010). Baicaleinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağında bulunan hedef genler ile ilişkisi farklı çalışmalarla ortaya konulmuştur (He vd., 2015; Liu vd., 2016; Ma vd., 2016). Bu çalışmada kullanılan baicalein dozları ile Wnt/ β -katenin sinyal yolağında etkili olan genlerin mRNA ve protein ifadeleri değerlendirilmiştir.

β -katenin, Wnt/ β -katenin sinyal yolunda önemli bir moleküldür ve osteosarkoma hücrelerinde sitoplazma ve çekirdek arasındaki geçişte Wnt/ β -katenin yolağının aktivasyon durumu açısından önem teşkil etmektedir (Haydon vd., 2002; Ma vd., 2015). Bu çalışmada elde edilen β -katenin ifadesine ait veriler değerlendirildiğinde, 35 ve 50 μ M baicalein uygulaması sonrasında 24. ve 48. saatlerde β -kateninin hem mRNA hem de protein ifadesinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.9- 4.18). Artmış β -katenin seviyeleri hücre döngüsünde G1'den S fazına geçişi kontrol eden c-Myc gibi proteinlerin transkripsiyonel aktivasyonunu

başlatabilmekte ve sonucunda da S fazına girerek DNA replikasyonu ve mitozun devamına neden olmaktadır (Stolz ve Bastians, 2015). Artmış β -katenin ifadesi meme kanseri hastalarında hastalığın kötü seyri ile güçlü bir korelasyon göstermektedir. Bu birikim β -katenin mutasyonları, β -katenin yıkım kompleksindeki eksiklikler, Wnt ligandlarının aşırı ifadesi ve inhibitörlerin kaybı gibi birçok faktöre bağlı olabilmektedir (Taketo, 2004). He ve Zhang'ın 2015 yılında MG-63 osteosarkoma hücre hattı kullanarak yapmış oldukları çalışmada, baicaleinin c-Myc genini hedefleyerek doza bağlı olarak Wnt sinyal yolu aracılığıyla hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada baicalein uygulaması sonucu β -katenin ifadesinde azalma meydana geldiği belirtilmiştir. Benzer şekilde farklı hücre hatları ile yapılan çalışmalarda baicaleinin β -katenini hedefleyerek Wnt/ β -katenin yolağını etkilediği ortaya konulmuştur (Park ve Choi, 2010; Zheng vd., 2014). Bu çalışmada elde edilen proliferasyonun baskılanması, apoptozun indüklenmesi ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağı genlerinden β -katenin ifadesinin azalması sonuçları, baicaleinin etkisini ortaya koymaktadır. Axin2 (Axis inhibisyon protein 2), β -katenin/TCF'nin transkripsiyonel bir hedefidir. Axin2 ifadesi, Wnt yolağının aktivasyonunun bir göstergesi olarak düşünülmektedir (Lustig vd., 2002). Çalışmamızda baicalein uygulaması Axin2 ifadesinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.10- 4.19). Bu azalma β -katenin'nin ifadesinin azalması ve dolayısıyla çekirdeğe translokasyonunun azalması ile ilişkili gözükmemektedir. β -kateninin çekirdeğe transloke olması c-Myc, c-jun, siklin D1 ve Axin2 gibi hedef Wnt genlerinin transkripsiyonunu aktive eder (Onyido vd., 2016). Ma vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada baicaleinin MDA-MB-231 meme adenokarsinoma hücrelerinde Wnt1 ve β -katenin ifadesini belirgin olarak inhibe ettiğini ve hem siklin D1 hem de çekirdekteki Axin2 ifadesini transkripsiyon seviyesinde doz ve zamana bağlı olarak düşürdüğünü göstermişlerdir. Akut lenfoblastik lösemi hücre hattı ile yapılan çalışmada ise baicaleinin hem β -kateninin hem de β -katenin hedefi olan çekirdekteki c-Myc, siklin D1 ve Axin2 ifadelerini mRNA ve protein düzeyinde azalttığını bildirmişlerdir (Liu vd., 2016).

Çalışmamızda Saos-2 hücrelerine uygulanan baicalein dozlarında GSK-3 β protein ifadesinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.21). GSK-3 β , sitoplazmada Axin ve adenomatöz polipozis koli (APC) içeren yıkım kompleksinin bir parçası olarak bulunur. GSK-3 β sitoplazmik β -kateninin hızlı bir şekilde fosforilasyonuna neden olur. β -kateninin yıkım kompleksi tarafından bu post-translasyonel fosforilasyonu,

β -katenini ubiquitinyasyon ve sonrasında proteazomal bozunum için hedef haline getirmekte ve böylece nükleusta β -katenin birikimi önlenmektedir (Song vd., 2015). Suzuki vd. (2008)'nin yapmış oldukları çalışmada Saos-2 hücrelerinde GSK-3 β 'nin inaktivasyonu ile Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktive olduğunu bildirmişlerdir. MG-63 osteosarkoma hücreleri ile yapılan çalışmada baicalein uygulaması sonrası GSK-3 β ve sitoplazmadaki Axin protein ifadelerinde sonuçlarımıza paralel olarak artış meydana geldiği bildirilmiştir (He ve Zhang, 2015). Elde ettiğimiz baicalein dozuna bağlı β -katenin protein miktarının azalması ve GSK-3 β protein ifadesinin artışı, β -kateninin GSK-3 β tarafından ubiquitinyasyon ve dolayısıyla proteozomal parçalanma ile düşürüldüğü fikrini vermektedir.

Wnt/ β -katenin sinyal yolağının karakteristik bir özelliği, Wnt koresaptörlerinden LRP-5 ve LRP-6 içermesidir. Wnt ligand etkileşiminin yokluğunda membran reseptör kompleksi inaktive olmakta, böylece Wnt ligand/Fzd/LRP reseptörlerinden oluşan kompleksin kümelenmesini önlemekte ve sonunda β -kateninin ubiquitinyasyon ve bozunmasına neden olmaktadır. Çalışmada baicalein uygulamaları sonrasında LRP-5'e ait mRNA ve protein ifadeleri değerlendirilmiştir. Uygulanan baicalein dozlarının LRP-5 ifadesinin RNA ve protein düzeyinde azalmasında etkili olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11- 4.20). 2004 yılında osteosarkoma dokularından Wnt koresaptörü LRP-5'in ifadesi incelenmiş ve ifade artışının hastalık gelişimi ile korele olduğu bildirilmiştir (Hoang vd., 2004). Aynı zamanda *in vivo* nude fare deneylerinde tümör oluşumunun ve metastazın azalması ile negatif korele olduğu gösterilmiştir (Guo vd., 2008). LRP-5 sonuçları baicaleinin Wnt koresaptörü LRP-5 üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Baicalein uygulamasının kontrol hücre grubuna göre wnt ligantının bağlanacağı reseptörlerle ilişkili LRP-5 ifadesini düşürerek Wnt/ β -katenin yolağının aktivasyonunu reseptör ilişkili olarak düzenlediği fikrini vermektedir.

MikroRNA'ların hücre ve dokulardaki varlığı, yokluğu ya da miktarlarındaki değişim yeni biyolojik belirteçler olarak kullanılmalarına olanak sağlamaktadır. MikroRNA nükleotit dizileri hedeflenen mRNA'ların 3'-transle edilmeyen bölgelerine kısmen ya da tamamen bağlanır. Bu bağlanma mRNA'ların translasyonunu engelleyerek ya da parçalanmasını indükleyerek gen ifadesini baskılar (Langhe vd., 2015). Gen ifadelerini baskılama özelliklerine ek olarak, bazı miRNA'lar gen ifadesini aktive de edebilir (Li vd., 2015). MikroRNA'ların bu özellikleri belli hücresel yollarda düzenleyici olarak görev aldıklarını göstermektedir. MikroRNA'ların işlevini anlamının en iyi yollarından biri

fonksiyonel hedeflerin aydınlatılmasıdır. Bu da spesifik mikroRNA'nın bir işlev kazancı veya işlev kaybını takiben hedef genlerdeki ya da yolaklardaki değişikliklerin analizi ile mümkün olmaktadır.

Osteosarkoma teşhisi konmuş hastalardan ve sağlıklı kontrollerden alınan serum örnekleri ile yapılan çalışmada, osteosarkomalı hastaların serumunda sağlıklı kontrollere göre miR-25 ifadesinin daha az olduğu tespit edilmiş ve miR-25'in tümör baskılayıcı olarak görev aldığı sonucuna varılmıştır (Li vd., 2015). Hua vd., 2016 yılında nazofarenks kanser hücrelerinde miR-25 ifade artışının metastaz ve invazyon üzerine baskılayıcı etkileri olup olmadığını araştırmışlar ve miR-25 artışının baskılayıcı etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışma ise, miR-25'in G2/M fazında hücre döngüsü tutulmasını indükleyerek anaplastik tiroid karsinoma hücrelerinin proliferasyonunu ve koloni oluşumunu inhibe ettiğini göstermektedir (Esposito vd., 2012). Tümör baskılayıcı etkisinden farklı olarak, miR-25'in mide (Kim vd., 2009), prostat (Li vd., 2009) ve karaciğer (Feng vd., 2016) gibi çeşitli insan malign solid tümörlerinde yüksek ifadeye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu tür kanserlerde, miR-25 bir onkogen gibi davranmakta ve potansiyel proliferatif, anti-apoptotik ve hücre döngüsü uyarıcı olarak etkiler ortaya koymaktadır.

Çalışmamızın ikinci aşamasında baicaleinin Saos-2 hücrelerinde miR-25 ifadesini nasıl etkilediği ve buna bağlı olarak değişen miR-25 ifadesinin Wnt/ β -katenin yolağında yer alan genlerin ifadesindeki etkisi araştırılmıştır. Saos-2 hücrelerine 24. ve 48. saatler için uygulanan baicalein dozlarında miR-25 ifadesinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.5). Wnt/ β -katenin yolağında baicalenin mi yoksa kimyasal uygulaması ile artan miR-25 ifadesinin mi etkili olduğunu saptamak için hücrelere baicalein ile birlikte inhibitör uygulanarak miR-25 ifadesi düşürülmüştür (Şekil 4.7). Aynı zamanda mimik transfeksiyonu ile Saos-2 hücrelerinde miR-25 ifadesi artırılarak (Şekil 4.8) baicalein uygulaması yapılmaksızın sadece miR-25'in Wnt/ β -katenin yolağında yer alan genlerin ifadesindeki etkisi saptanmıştır. MikroRNA-25 inhibitör uygulaması ile miR-25 ifadesinin düşürüldüğü grupta β -katenin ve Axin2 mRNA ve protein ifadeleri artarken, GSK-3 β protein ifadesinde azalma meydana gelmiştir. İnhibitör ile baicaleinin birlikte uygulandığı örneklerde ise 24. ve 48. saatlerde β -katenin ve Axin2 protein ifadeleri artarken, mRNA seviyesinde bu iki genin ifadesi 24. saatte bir miktar düşmüş ve protein ifadelerine paralel her iki genin ifadesi 48. saatte artış göstermiştir (Şekil 4.12- 4.13- 4.22- 4.23). GSK-3 β protein ifadesi ise bu uygulamada azalma göstermiştir (Şekil 4.25).

Mimik uygulamasında ise yine β -katenin ve Axin2 için RNA ve protein ifadelerinde düşüş gözlenirken (Şekil 4.15- 4.16- 4.26- 4.27), GSK-3 β protein ifadesinde artış meydana gelmiştir (Şekil 4.29).

MikroRNA'ların ifadelerindeki değişimin Wnt/ β -katenin sinyal yolağının bileşenlerini düzenlediğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Hem miRNA'lar hem de Wnt sinyal yolları, çeşitli biyolojik işlemleri düzenlemek üzere etkileşime girmektedir (Yan vd., 2012; Song vd., 2015; Leichter vd., 2017). Wnt sinyal yolağında yer alan miRNA'lar üzerine yapılan bir çalışmada, miR-25'in bu yolakta yer aldığı ve kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu baskılanmasında inhibitör etki gösterdiğini bildirilmiştir (Anton vd., 2011). Anti-miR-25 ile baicaleinin birlikte uygulanması ve mimik transfeksiyonu, miR-25'in Wnt/ β -katenin yolağının düzenlenmesinde β -katenin, Axin2 ve GSK-3 β ifadelerini değiştirerek etkili olduğunu göstermektedir.

2013 yılında yapılan bir çalışmada miR-25'in etkisine benzer şekilde, miR-34'ün, Axin2'nin 3'-UTR'si ile etkileşmesi yoluyla GSK-3 β ifadesinin ve Wnt sinyal yolağının düzenlenmesinde kilit rol oynadığı bildirilmiştir (Kim vd., 2013).

Çalışmada, LRP-5'e ait mRNA ve protein ifadeleri, anti-miR-25 (baicaleinsiz ve baicalein ile birlikte) ve miR-25-mimik uygulamaları sonrasında değerlendirilmiştir. Saos-2 hücrelerinde miR-25 inhibisyonu, baicalein ile birlikte inhibitör uygulanması ve miR-25-mimik transfeksiyonu sonrası LRP-5 mRNA ve protein ifadelerinde azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.14- 4.17- 4.24- 4.28). MikroRNA-25 ifadesinin hücrelerde baskılanması ya da artırılması sonucunda iki uygulama arasında LRP-5 ifadesi bakımından farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar LRP-5 ifadesinin miR-25 ifadesi ile bağlantılı olmadığını göstermektedir.

Çalışma sonucunda elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, Saos-2 osteosarkoma hücrelerinde baicaleinin hücre proliferasyonunu inhibe edebileceği ve apoptozu uyurabileceği ortaya konulmuştur. Proliferasyonun durdurulması ve apoptozun indüklenmesinde Wnt/ β -katenin yolağı etkili görülmektedir. Baicaleinin IC₅₀ ve AP₅₀ dozlarında Wnt/ β -katenin yolağında yer alan ve ifadelerindeki değişiklik ile yolağın aktivitesi hakkında bilgi veren β -katenin ve hedefi olan Axin2'nin mRNA ve protein seviyeleri azalırken, GSK-3 β protein ifadesinin arttığı görülmüştür. İfadesi artan GSK-3 β , β -kateninin sitoplazmadaki

seviyesini düşürmekte ve çekirdek içine geçen β -katenin miktarında azalma meydana gelmektedir (Song vd., 2015). Bu azalma Axin 2 protein seviyesinde düşüşe ve Wnt/ β -katenin yolağının bloke olmasına neden olmaktadır. Baicaleinin Wnt/ β -katenin yolağı üzerinde etkisi, miR-25 ifadesi ile ilişkili görünmektedir. Baicalein uygulaması ile artan miR-25 ifadesi inhibitör ve mimik uygulamalarının da ortaya koyduğu üzere β -katenin, Axin2 ve GSK-3 β gen ifadelerini değiştirmektedir. Bu genler üzerindeki etkisi miR-25'in Saos-2 osteosarkoma hücre hattında Wnt/ β -katenin yolağını düzenlediğini göstermektedir. MikroRNA-25 Wnt/ β -katenin yolağını düzenlemede tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir.

Baicaleinin Saos-2 hücre hattında anti-kanser etki gösterdiği görülmektedir. Baicaleinin Saos-2 osteosarkoma hücre hattında Wnt/ β -katenin sinyal yolağını hedeflemesi osteosarkomalarda tedavi amaçlı kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca baicaleinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki etkisinin miR-25 gen ifadesi ile paralellik göstermesi moleküler mekanizmanın miR-25 ile ilişkili olduğu fikrini vermektedir. Bu moleküler mekanizmada miR-25'in hedef genlerinin daha ayrıntılı ortaya konulması ve bu yolak üzerinden proliferasyon ve apoptoz ile ilişkisinin aydınlatılması için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKÇA

- Adams, BD., Kasinski, AL., Slack, FJ. 2014. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. **Curr Biol.**, 24(16): R762-76.
- Afonina, I., Zivarts, M., Kutuyavin, I., *et al.* 1997. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor Groove binder. **Nucleic Acids Res.**, 25:2657–2660.
- Amado, NG., Predes, D., Moreno, MM., Carvalho, IO., Mendes, FA., Abreu, JG. 2014. Flavonoids and Wnt/ β -Catenin Signaling: Potential Role in Colorectal Cancer Therapies. **Int. J. Mol. Sci.**, 15: 12094-12106.
- Anton, R., Chatterjee, SS., Simundza, J., Cowin, P., Dasgupta, R. 2011. A Systematic Screen for Micro-RNAs Regulating the Canonical Wnt Pathway. **Plos One.**, 6(10): e26257.
- Berezikov, E. 2011. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nat. Rev. Genet.**, 12: 846–860.
- Bian, S., Sun, T. 2011. Functions of noncoding RNAs in neural development and neurological diseases. **Mol Neurobiol.**, 44(3): 359–373.
- Biggar, KK., Storey, KB. 2015. Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. **The Journal of Experimental Biology**, 218: 1281-1289.
- Cai, Y., Mohseny, Ab, Karperien, M., Hogendoorn, Pc., Zhou, G., Cleton-Jansen, Am. 2010. Inactive Wnt/Beta Catenin Pathway In Conventional High-Grade Osteosarcoma. **J. Pathol.**, 220(1): 24-33.
- Chen, C., Ridzon, DA., Broomer, AJ., Zhou, Z., Lee, DH., Nguyen, JT., Barbisin, M., Xu, NL., Mahuvakar, VR., Andersen, MR., Lao, KQ., Livak, KJ., Guegler, KJ. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 33(20): e179.

- Chen, K., Zhang, S., Ji, Y., Li, J., An, P., Ren, H., Liang, R., Yang, J., Li, Z. 2013. Baicalein Inhibits The Invasion And Metastatic Capabilities Of Hepatocellular Carcinoma Cells Via Down-Regulation of The ERK Pathway. **PLoS One.**, 8(9): e72927.
- Choi, EO., Jeong, JW., Park, C., Hong, SH., Kim, GY., Hwang, HJ., Cho, EJ., Choi, YH. 2016. Baicalein protects C6 glial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis through regulation of the Nrf2 signaling pathway. **Int J Mol Med.**, 37(3): 798-806.
- Da Rocha, AB., Lopes, RM., Schwartzmann, G. 2001. Natural products in anticancer therapy. **Curr. Opin. Pharmacol.**, 1: 364–369.
- Deng, T., Yuan, Y., Zhang, C., Zhang, C., Yao, W., Wang, C., Liu, R., Ba, Y. 2016. Identification of Circulating miR-25 As a Potential Biomarker For Pancreatic Cancer Diagnosis. **Cell Physiol Biochem.**, 39: 1716-1722.
- Dong, N., Xu, B., Shi, H., Tang, X. 2015. Baicalein Inhibits Amadori-Glycated Albumin-Induced MCP-1 Expressions in Retinal Ganglion Cells via a MicroRNA-124-Dependent Mechanism. **Retinal Cell Biology**, 56: 5844-5853.
- Esposito, F., Tornincasa, M., Pallante, P., Federico, A., Borbone, E., Pierantoni, GM., Fusco, A. 2012. Down-Regulation of the miR-25 and miR-30d Contributes to the Development of Anaplastic Thyroid Carcinoma Targeting the Polycomb Protein EZH2. **J Clin Endocrinol Metab.**, 97: E710–E718.
- Feng, M., Luo, X., Gu, C., Li, Y., Zhu, X., Fei, J. 2015. Systematic analysis of berberine-induced signaling pathway between miRNA clusters and mRNAs and identification of miR-99a approximately 125b cluster function by seed-targeting inhibitors in multiple myeloma cells. **RNA Biol.**, 12: 82–91.
- Feng, X., Jiang, J., Shi, S., Xie, H., Zhou, L., Zheng, S. 2016. Knockdown of miR-25 increases the sensitivity of liver cancer stem cells to TRAIL-induced apoptosis via PTEN/PI3K/Akt/Bad signaling pathway. **Int J Oncol.**, 49(6): 2600-2610.

- Fogh, J., Fogh, JM., Orfeo, T. 1977. One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice. **J Natl Cancer Inst.**, 59(1): 221-226.
- Fu, Y., Luo, J., Jia, Z., Zhen, W., Zhou, K., Gilbert, E., Liu, D. 2014. Baicalein Protects against Type 2 Diabetes via Promoting Islet β -Cell Function in Obese Diabetic Mice. **Int J Endocrinol.**, 2014: 846742.
- Gambari, R., Brognara, E., Spandidos, DA., Fabbri, E. 2016. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: New trends in the development of miRNA therapeutic strategies in oncology (Review). **International Journal of Oncology**, 49: 5-32, 2016.
- Gao, Y., Lu, J., Zhang, Y., Chen, Y., Gu, Z., Jiang, X. 2013. Baicalein Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats Through Inhibition of miR-21. **Pulmonary Pharmacology Therapeutics**, 26(6): 649-654.
- Gong, WY., Wu, JF., Liu, BJ., Zhang, HY., Cao, YX., Sun, J., Lv, YB., Wu, X., Dong, JC. 2014. Flavonoid Components in *Scutellaria baicalensis* Inhibit Nicotine-Induced Proliferation, Metastasis and Lung Cancer-Associated Inflammation *in vitro*. **International Journal of Oncology**, 44: 1561-1570.
- Guo, Y., Zi, X., Koontz, Z., Kim, A., Xie, J., Gorlick, R., Holcombe, RF., Hoang, BH. 2007. Blocking Wnt/Lrp5 Signaling by a Soluble Receptor Modulates The Epithelial to Mesenchymal Transition and Suppresses Met And Metalloproteinases in Osteosarcoma Saos-2 Cells. **Journal of Orthopaedic Research**, 25(7): 964-71.
- Guo, Y., Rubin, EM., Xie, J., Zi, X., Hoang, BH. 2008. Dominant Negative LRP5 Decreases Tumorigenicity and Metastasis of Osteosarcoma in an Animal Model. **Clin Orthop Relat Res.**, 466: 2039-2045.
- Han, Z., Zhu, S., Han, X., Wang, Z., Wu, S., Zheng, R. 2015. Baicalein inhibits hepatocellular carcinoma cells through suppressing the expression of CD24. **International Immunopharmacology**, 29(2): 416-22.

- Haydon, RC., Deyrup, A., Ishikawa, A., Heck, R., Jiang, W., Zhou, L., Feng, T., King, D., Cheng, H., Breyer, B., Peabody, T., Simon, MA., Montag, AG., He, TC. 2002. Cytoplasmic and/or Nuclear Accumulation Of The β -Catenin Protein is A Frequent Event in Human Osteosarcoma. **Int. J. Cancer**, 102: 338–342.
- He, N., Zhang, Z. 2015. Baicalein suppresses the viability of MG-63 osteosarcoma cells through inhibiting c-MYC expression via Wnt signaling pathway. **Mol Cell Biochem.**, 405: 187–196.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, PS., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology (NY)**,10(4): 413-7.
- Hoang, BH., Kubo, T., Healey, JH., Sowers, R., Mazza, B., Yang, R., Huvos, AG., Meyers, PA., Gorlick, R. 2004. Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP-5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma. **Int J Cancer.**, 109(1): 106-11.
- Hua, WF., Zhong, Q., Xia, TL., Chen, Q., Zhang, MY., Zhou, AJ., Tu, ZW., Qu, C., Li, MZ., Xia, YF., Wang, HY., Xie, D., Claret, FX., Song, EW., Zeng, MS. 2016. RBM24 suppresses cancer progression by upregulating miR-25 to target MALAT1 in nasopharyngeal carcinoma. **Cell Death and Disease**, 7(9): e2352.
- Huang, K., Zhang, J., Han, L., You, Y., Jiang, T., Pu, P., Kang, C. 2010. MicroRNA Roles in Beta-Catenin Pathway. **Molecular Cancer**, 9: 252-263.
- Huang, Y., Yang, YB., Zhang, XH., Yu, XL., Wang, ZB., Cheng, XC. 2013. MicroRNA-21 gene and cancer. **Medical Oncology**, 30(376): 1-9.
- Huo, J., Zhang, Y., Li, R., Wang, Y., Wu, J., Zhang, D. 2016. Upregulated MicroRNA-25 Mediates the Migration of Melanoma Cells by Targeting DKK3 through the WNT/ β -Catenin Pathway. **Int. J. Mol. Sci.**, 17: 1124.

- Jiang, D., Zheng, X., Shan, W., Shan, Y. 2016. The Overexpression of MiR-30a Affects Cell Proliferation Of Chondrosarcoma via Targeting Runx2. **Tumor Biol.**, 37: 5933–5940.
- Kerr, JFR., Wyllie, AH., Currie, AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, 26: 239–257.
- Kim, YK., Yu, J., Han, TS., Park, SY., Namkoong, B., Kim, DH., Hur, K., Yoo, MW., Lee, HJ., Yang, HK., Kim, VN. 2009. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. **Nucleic Acids Research**, 37(5): 1672–1681.
- Kim, NH., Cha YH., Kang, SE., Lee, Y., Lee, I., Cha, SY., Ryu, JK., Na, JM., Park, C., Yoon, HG., Park G., Yook, J., Kim, HS. 2013. P53 Regulates nuclear GSK-3 Levels Through miR-34-mediated Axin2 suppression in colorectal cancer cells. **Cell Cycle**, 12(10): 1578- 1587.
- Ko, HW., Lee, H., Huo, L., Xia, W., Yang, C., Hsu, JL., Li, L., Lai, C., Chan, L., Cheng, C., Labaff, AM., Liao, H., Lim, S., Li, C., Wei, Y., Nie, L., Yamaguchi, H., Hung, M. 2016. GSK3 β Inactivation Promotes the Oncogenic Functions of EZH2 and Enhances Methylation of H3K27 in Human Breast Cancers. **Oncotarget**, 7(35): 57131-57144.
- Kozomara, A., Griffiths-Jones S. 2014. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Research**, 42: D68-73.
- Kumar, RMR., Boro, A., Fuchs, B. 2016. Involvement and Clinical Aspects of MicroRNA in Osteosarcoma. **International Journal of Molecular Sciences**, 17: 877.
- Kushlinskii, NE., Fridman, MV., Braga, EA. 2016. Molecular Mechanisms and mikroRNAs in Osteosarcoma Pathogenesis. **Biochemistry (Moscow)**, 81(4): 315:328.

- Kutyavin, I.V., Lukhtanov, E.A., Gamper, H.B., and Meyer, R.B. 1997. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. **Nucleic Acids Res.**, 25:3718–3723.
- Langhe, R., Norris, L., Saadeh, FA., Blackshields, G., Varley, R., Harrison, A., Gleeson, N., Spillane, C., Martin, C., O'Donnell, DM., D'Arcy, T., O'Leary, J., O'Toole, S. 2015. A novel serum microRNA panel to discriminate benign from malignant ovarian disease. **Cancer Letters**, 356: 628–636.
- Lee RC., Feinbaum RL., Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell.**, 75(5): 843-54.
- Lee, LG., Connell, CR., Bloch, W. 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. **Nucleic Acids Res.**, 21(16): 3761-6.
- Leichter, AL., Sullivan, MJ., Eccles, MR., Chatterjee, A. 2017. MicroRNA expression patterns and signalling pathways in the development and progression of childhood solid tumours. **Molecular Cancer**, 16(1): 15.
- Leow, PC., Tian, Q., Ong, ZY., Yang, Z., Ee, PL. 2010. Antitumor Activity of Natural Compounds, Curcumin and PKF118-310, as Wnt/ β -catenin Antagonists Against Human Osteosarcoma Cells. **Invest New Drugs.**, 28: 766–782.
- Li, H., Zhang, K., Liu, LH., Ouyang, Y., Guo, HB., Zhang, H., Bu, J., Xiao, T. 2015. MicroRNA screening identifies circulating microRNAs as potential biomarkers for osteosarcoma. **Oncology Letters**, 10: 1662-1668.
- Li, HL., Zhang, S., Wang, Y., Liang, RR., Li, J., An, P., Wang, ZM., Yang, J., Li, ZF. 2013. Baicalein induces apoptosis via a mitochondrial-dependent caspase activation pathway in T24 bladder cancer cells. **Mol. Med. Rep.**, 7: 266–270.

- Li, J., Ma, J., Wang, K.S., Mi, C., Wang, Z., Piao, L.X., Xu, G.H., Li, X., Lee, J.J., Jin, X. 2016. Baicalein inhibits TNF- α -induced NF- κ B activation and expression of NF- κ B-regulated target gene products. **Oncol Rep.**, 36(5): 2771-2776.
- Li, Q., Zou, C., Zou, C., Han, Z., Xiao, H., Wei, H., Wang, W., Zhang, L., Zhang, X., Tang, Q., Zhang, C., Tao, J., Wang, X., Gao, X. 2013. MicroRNA-25 functions as a potential tumor suppressor in colon cancer by targeting Smad7. **Cancer Letters**, 335: 168–174.
- Li, Y., Tan, W., Neo, T.W., Aung, M.O., Wasser, S., Lim, S.G., Tan, T.M. 2009. Role of the *miR-106b-25* microRNA cluster in hepatocellular carcinoma. **Cancer Sci.**, 100(7): 1234–1242.
- Lian, F., Cui, Y., Zhou, C., Gao, K., Wu, L. 2015. Identification of a Plasma Four-microRNA Panel as Potential Noninvasive Biomarker for Osteosarcoma. **PLoS One.**, 10(3): e0121499.
- Liang W., Gao, B., Fu, P., Xu, S., Qian, Y., Fu, Q. 2013. The microRNAs in the Pathogenesis of Osteosarcoma. **Front. Biosci. (Landmark Ed.)**, 18: 788-794.
- Liu, B., Li, G., Wang, X., Liu, Y. 2014. A furin inhibitor downregulates osteosarcoma cell migration by downregulating the expression levels of MT1-MMP via the Wnt signaling pathway. **Oncology Letters**, 7: 1033-1038.
- Liu, H., Dong, Y., Gao, Y., Du, Z., Wang, Y., Cheng, P., Chen, A., Huang, H. 2016. The Fascinating Effects of Baicalein on Cancer: A Review. **Int. J. Mol. Sci.**, 17: 1681.
- Liu, X., Liang, Z., Gao, K., Li, H., Zhao, G., Wang, S., Fang, J. 2016. MicroRNA-128 Inhibits EMT of Human Osteosarcoma Cells By Directly Targeting Integrin α 2. **Tumor Biol.**, 37: 7951–7957.
- Liu, X., Liu, S., Chen, J., He, L., Meng, X., Liu, S. 2016. Baicalein suppresses the proliferation of acute T-lymphoblastic leukemia Jurkat cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling. **Ann Hematol.**, 95(11): 1787-93.

- Livak, KJ., Flood, SJ., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods Appl.**, 4(6): 357-62.
- Livak, KJ., Schmittgen, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25(4): 402-8.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, CA., Krieger, M., Scott, MP., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. 2011. Moleküler Hücre Biyolojisi. (Çeviri: Geçkil H., Özmen M., Yeşilada Ö.), 6. Baskı. **Palme Yayıncılık**, Ankara.
- Luo, J., Kong, JL., Dong, BY., Huang, H., Wang, K., Wu, LH., Hou, CC., Liang, Y., Li, B., Chen, YQ. 2016. Baicalein attenuates the quorum sensing-controlled virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and relieves the inflammatory response in *P.aeruginosa*-infected macrophages by downregulating the MAPK and NFκB signal-transduction pathways. **Drug Des Devel Ther.**, 10: 183-203.
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, PM., Birchmeier, W., Behrens, J. 2002. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. **Mol. Cell Biol.**, 22: 1184-1193.
- Ma, X., Yan, W., Dai, Z., Gao, X., Ma, Y., Xu, Q., Jiang, J., Zhang, S. 2016. Baicalein Suppresses Metastasis Of Breast Cancer Cells By Inhibiting EMT via Downregulation of SATB1 and Wnt/β-catenin Pathway. **Drug Des Devel Ther.**, 10: 1419-41.
- Ma, Y., Ren, Y., Han, EQ., Li, H., Chen, D., Jacobs, JJ., Gitelis, S., O'Keefe, RJ., Kontinen, YT., Yin, G., Li, TF. 2013. Inhibition of the Wnt-β-catenin and Notch signaling pathways sensitizes osteosarcoma cells to chemotherapy. **Biochem Biophys Res Commun.**, 431(2): 274-279.

- Ma, Y., Zhu, B., Liu, X., Yu, H., Yong, L., Liu, X., Shao, J., Liu, Z. 2015. Inhibition of oleandrin on the proliferation show and invasion of osteosarcoma cells in vitro by suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, 34: 115.
- Miao, J., Wu, S., Peng, Z., Tania, M., Zhang, C. 2013. MicroRNAs in osteosarcoma: diagnostic and therapeutic aspects. **Tumor Biol.**, 34: 2093-2098.
- miRBase. 2017. Human mature miRNA sequence. Erişim tarihi 01.03.2017 [<http://www.mirbase.org/cgi-bin/query.pl?terms=hsa>]
- Mishra PJ. 2014. MicroRNAs as promising biomarkers in cancer diagnostics. **Biomarker Research**, 2: 19.
- Mitchell, PS., Parkin, RK., Kroh, EM., Fritz, BR., Wyman, SK., Pogosova-Agadjanyan, EL., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, KC., Allen, A., Lin, DW., Urban, N., Drescher, CW., Knudsen, BS., Stirewalt, DL., Gentleman, R., Vessella, RL., Nelson, PS., Martin, DB., Tewari, M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proc Natl Acad Sci. USA**, 105(30): 10513-8.
- Morrison, TB., Weis, JJ., Wittwer, CT. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, 24(6): 954-8, 960, 962.
- Mu, J., Liu, T., Jiang, L., Wu, X., Cao, Y., Li, M., Dong, Q., Liu, Y., Xu, H. 2016. The Traditional Chinese Medicine Baicalein Potently Inhibits Gastric Cancer Cells. **Journal of Cancer**, 7(4): 453-461.
- Nana-Sinkam, SP., Croce, CM. 2013. Clinical Applications for microRNAs in Cancer. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 93(1): 98-104.
- National Cancer Institute. 2017. **About Caner**, [<https://www.cancer.gov/about-cancer>], Erişim Tarihi: 25.02.2017.

- National Institutes of Health. **Image J. Image Processing and Analysis in Java**, [<https://imagej.nih.gov/ij/>], Erişim tarihi: 25.12.16.
- Onyido, EK., Sweeney, E., Nateri, AS. 2016. Wnt-signalling pathways and microRNAs network in carcinogenesis: experimental and bioinformatics approaches. **Molecular Cancer**, 15: 56.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, FT., Zhou, TT., Liu, B., Bao, JK. 2012. Programmed Cell Death Pathways in Cancer: A Review of Apoptosis, Autophagy and Programmed Necrosis. **Cell Prolif.**, 45: 487–498.
- Ouyang L, Liu P, Yang S, Ye S, Xu W, Liu X. 2013. A three-plasma miRNA signature serves as novel biomarkers for osteosarcoma. **Med Oncol.**, 30: 340.
- Park, S., Choi. J. 2010. Inhibition of beta-catenin/Tcf signaling by flavonoids. **J Cell Biochem.**, 110(6): 1376-85.
- Pautke, C., Schieker, M., Tischer, T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W., Milz, S. 2004. Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison To Human Osteoblasts **Anticancer Research**, 24: 3743-3748.
- Pecorino, L. 2005. Molecular Biology of Cancer; Mechanisms, Targets and Therapeutics. **Oxford University Press Inc.**, New York.
- Petrasovits, La. 2014. Protein Blotting Protocol For Beginners. **Methods in Molecular Biology**, 1099: 189-99.
- Polakis, P. 2000. Wnt Signaling and Cancer. **Genes Dev.**, 14(15): 1837-51.
- Pubmed. 2017. **Natinal Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, National Institute of Health**, [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>], Erişim Tarihi: 12.02.2017.
- Qu J., Li M., Zhong W., Hu C. 2015. Prognostic role of microRNA-25 in cancers: evidence from a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med.**, 8(8): 12921-12927.

- Qu, F., Li, CB., Yuan, BT., Qi, W., Li, HL., Shen, XZ., Zhao, G., Wang, JT., Liu, YJ.. 2016. MicroRNA-26a Induces Osteosarcoma Cell Growth And Metastasis via The Wnt/ β -catenin Pathway. **Oncology Letters**, 11: 1592-1596.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, IM., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 313: 856–862.
- Ren, X., Bai, X., Zhang, X., Li, Z., Tang, L., Zhao, X., Li, Z., Ren, Y., Wei, S., Wang, Q., Liu, C., Ji, J. 2015. Quantitative nuclear proteomics identifies that miR-137-mediated EZH2 reduction regulates resveratrol-induced apoptosis of neuroblastoma cells. **Mol. Cell. Proteom. MCP**, 14: 316–328.
- Romano, B., Pagano, E., Montanaro, V., Fortunato, AL., Milic, N., Borrelli, F. 2013. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. **Phytother. Res. PTR**, 27: 1588–1596.
- Ruan, W., Wang, P., Feng, S., Xue, Y., Li, Y. 2016. Long Non-Coding Rna Small Nucleolar Rna Host Gene 12 (Snhg12) Promotes Cell Proliferation And Migration By Upregulating Angiomotin Gene Expression in Human Osteosarcoma Cells. **Tumor Biol.**, 37: 4065–4073.
- Sayers TJ. 2011. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother**, 60: 1173–1180.
- Sithisarn, P., Nantateerapong, P., Rojsanga, P., Sithisarn, P. 2016. Screening for Antibacterial and Antioxidant Activities and Phytochemical Analysis of *Oroxylum indicum* Fruit Extracts. **Molecules**, 21(4): 446.
- Song, JL., Nigam, P., Tektas, SS., Selva, E. 2015. MicroRNA Regulation of Wnt Signaling Pathways in Development and Disease. **Cellular Signaling**, 27: 1380-1391.
- Srivastava, R. 2007. Apoptosis, Cell Signaling, And Human Diseases; Molecular Mechanisms. **Humana Press Inc.**, 6, Totowa, New Jersey.

- Stolz, A., Bastians, H. 2015. Fresh WNT into the regulation of mitosis. **Cell Cycle**, 14(16): 2566-70.
- Stratford, EW., Daffinrud, J., Munthe, E., Castro, R., Waaler, J., Krauss, S., Myklebost, O. 2014. The Tankyrase-Specific Inhibitor Jw74 Affects Cell Cycle Progression and Induces Apoptosis and Differentiation in Osteosarcoma Cell Lines. **Cancer Medicine**, 3(1): 36–46.
- Sun, X., He, Y., Huang, C., Ma, T., Li, J. 2013. Distinctive microRNA Signature Associated of Neoplasms with the Wnt/ β -catenin Signaling Pathway. **Cellular Signaling**, 25(12): 2805-2811.
- Suzuki, A., Ozono, K., Kubota, T., Kondou, H., Tachikawa, K., Michigami, T. 2008. PTH/cAMK/PKA Signaling Facilitates Canonical Wnt Signaling Via Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 β in Osteoblastic Saos-2 Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, 104: 304-317.
- Takatani, T., Minagawa, M., Takatani, R., Kinoshita, K., Kohno, Y. 2011. AMP-activated protein kinase attenuates Wnt/ β -catenin signaling in human osteoblastic Saos-2 cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 339: 114– 119.
- Taketo, MM. 2004. Shutting down Wnt signal-activated cancer. **Nat Genet.**, 36: 320–322.
- Tang, Y., Liu, Z., Zhao, L., Clemens, TL., Cao, X. 2008. Smad7 Stabilizes β -Catenin Binding to E-Cadherin Complex and Promotes Cell-Cell Adhesion. **The Journal of Biological Chemistry**, 283(35): 23956-23963.
- Taqman microRNA Assays. 2017. **Thermo Fisher Scientific**, [<https://genome.med.harvard.edu/documents/qpcr/microRNATaqManAssayProtocol.pdf>], Erişim Tarihi: 03.03.2017.
- Temizkan, G., Arda, N. 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. **Nobel Tıp Kitapevi**, İstanbul.

- Terzioğlu G., Keskin AÜ., Demirel GY. 2013. Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. **Turk J Immunol.**, 1(3): 74-89.
- Ulukaya, E. 2001. Hücre siklusu ve Apoptozis. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar. Editörler: Engin, K., Özyardımcı N. **Avrupa Tıp Kitapçılık**, 539, İstanbul.
- van der Velden, VH., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., van Dongen, JJ. 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. **Leukemia**, 17(6): 1013-34.
- Wang, N., Ren, D., Deng, S., Yang, X. 2014. Differential effects of baicalein and its sulfated derivatives in inhibiting proliferation of human breast cancer MCF-7 cells. **Chemico-Biological Interactions**, 221: 99–108.
- Wang, Z., He, R., Xia, H., Wei, YU., Wu, S. 2016. MicroRNA-101 Has A Suppressive Role in Osteosarcoma Cells Through The Targeting of c-FOS. **Experimental And Therapeutic Medicine**, 11: 1293-1299.
- World Health Organization, Media Centre, Fact Sheet, 297, (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>), 2015. Erişim Tarihi: 12.10.2016.
- Yan, K., Gao, J., Yang, T., Ma, Q., Qiu, X. Fan, Q., Ma, B. 2012. MicroRNA-34a Inhibits The Proliferation and Metastasis of Osteosarcoma Cells Both *in vitro* and *in vivo*. **PLoS One**, 7(3): e33778.
- Yarla, NS., Bishayee, A., Sethi, G., Reddanna, P., Kalle, AM., Dhananjaya, BL., Dowluru, KS., Chintala, R., Duddukuri, GR. 2016. Targeting Arachidonic Acid Pathway By Natural Products For Cancer Prevention And Therapy. **Semin Cancer Biol.**, 40-41: 48-81.
- Ye, F., Wang, H., Zhang, L., Zou, Y., Han, H., Huang, J. 2015. Baicalein Induces Human Osteosarcoma Cell Line MG-63 Apoptosis Via ROS-Induced BNIP3 Expression. **Tumor Biology**, 36: 4731-4740.

- Zhang, Y., Song, L., Cai, L., Wei, R., Hu, H., Jin, W. 2013. Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, 53: 325–333.
- Zhao, F., Fu, L., Yang, W., Dong, Y., Yang, J., Sun, S., Hou, Y. 2015. Cardioprotective effects of baicalein on heart failure via modulation of Ca(2+) handling proteins *in vivo* and *in vitro*. **Life Sci.**, 145: 213-23.
- Zhao, Q., Chen, XY., Martin, C. 2016. *Scutellaria baicalensis*, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants. **Sci Bull (Beijing)**., 61(18): 1391-1398.
- Zheng, YH., Yin, LH., Grahn, TH., Ye, AF., Zhao, YR., Zhang, QY. 2014. Anticancer Effects of Baicalein on Hepatocellular Carcinoma Cells. **Phytother. Res.**, 28: 1342-1348.
- Zhu, S., Pan, W., Qian, Y. 2013. MicroRNA in immunity and autoimmunity. **J Mol Med.**, 91: 1039-1050.
- Zoni, E., van der Horst, G., van de Merbel, AF., Chen, L., Rane, JK., Pelger, RC., Collins, AT., Visakorpi, T., Snaar-Jagalska, BE., Maitland, NJ., van der Pluijm, G. 2015. MiR-25 modulates invasiveness and dissemination of human prostate Cancer Cells via regulation of α v- and α 6-Integrin expression. **Cancer Res.**, 75(11): 2326-2336.
- Zoni, E., van der Pluijm, G. 2016. The role of microRNAs in bone metastasis. **J Bone Oncol.**, 5(3): 104-108.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

Doğum Yeri Ve Tarihi : Karacabey / 11.09.1983

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

A. YAYINLAR

-SCI

- **Yaylagul EO.**, Cansev M., Kasimoğulları SÇ. 2015. *In vivo* protective effect of Uridine, a pyrimidine nucleoside, on genotoxicity induced by Levodopa/Carbidopa in mice. **Food and Chemical Toxicology**, 82: 36–41.

- Cetinkaya M., Cansev M., Cekmez F., Tayman C., Canpolat FE., Kafa IM., **Yaylagul EO.**, Kramer BW., Sarici SU. (2015). Protective effects of valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, against hyperoxic lung injury in a neonatal rat model. **PLoS One**, 10(5): e0126028.

- Cansev M., Orhan F, **Yaylagul EO.**, Isik E., Turkyilmaz M., Aydin S., Gumus A., Sevinc C., Coskun N., Ulus I. H., Wurtman R. J. 2015. Evidence for the Existence of Pyrimidinergic Transmission in Rat Brain. **Neuropharmacology**, 91: 77-86.

- Cansev, M., Minbay, Z., Goren, B., **Yaylagul EO.**, Cetinkaya, M., Alkan T. 2013. Neuroprotective effects of uridine in a rat model of neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy. **Neuroscience Letters**, 542: 65-70.

B. BİLDİRİLER

• Uluslararası Kongreler

- **Yaylagül EÖ.**, Yavasoglu Sİ., Köşlüoğlu Ç., Ceylan İ., Akiner M., Çağlar SS., Şimsek FM. and Ulger C., Determination of Glutathione S-Transferase and Acetylcholine Esterase Enzymes Activities of *Anopheles sacharovi* Populations in Turkey. 13th ICZEGAR (International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions),7-11/10/2015, Irakleio, GREECE, Poster.

- Ceylan İ., Yavasoglu Sİ., Bursalı F., **Yaylagül EÖ.**, Akiner M., Çağlar SS., Şimsek FM., and Ulger C., Knockdown resistance of *Anopheles sacharovi* and *Anopheles superpictus* populations in Southern Turkey., 13th ICZEGAR (International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions),7-11/10/2015, Irakleio, GREECE, Poster.

- Şimsek FM., Ceylan İ., Bursalı F., Yavasoglu Sİ., **Örenlili E.**, Akiner M., Çağlar SS. and Ulger C., Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles sacharovi* and *Anopheles superpictus* based on ace-1 mutation in Turkey., 19th E-SOVE (European Society for Vector Ecology) Conference,14-17/09/2014, Thessaloniki, Greece, Poster.

- **Yaylagul E.O.**, Babat Y., Ceylan I., Akat E., Ulger C., The effect of Baicalein on miR-25 and PDCD6IP expression in osteosarcoma cell line Saos-2, 3rd International Congress of Molecular Biology and Biotechnology, 02-06/06/2014, Sarajevo/Bosnia-Herzegovina, Oral presentation, 04/06/2014.

- Cansev, M., **Yaylagul, E.O.**, Orhan, F., Turkyilmaz, M. (2013). Uridine enhances *in vivo* acetylcholine release in rat striatum. Joint Annual Meeting of the ASPET/BPS at Experimental Biology (EB) (Uluslararası), 20-24/04/2013, Boston, MA, Oral presentation.

- Cetinkaya M, Alkan T, Cansev M, Minbay Z, Serter S, **Orenlili E**, Koksal N. (2012) The Neuroprotective Effects of Valproic Acid, an Histone Deacetylase Inhibitor in a Neonatal Hypoxic-Ischemic Rat Model. *Arch Dis Child* 2012 97:A320 (doi: 10.1136/archdischild-2012-302724.1115). Poster.
- Cetinkaya M, Cansev M, Cekmez F, Tayman C, Canpolat FE, Kafa IM, **Orenlili E**, Uysal S, Sarıcı SU. Valproic Acid-Mediated Protection Against Hyperoxic Lung Injury Via Histone Deacetylase Inhibition in a Neonatal Rat Model. *Arch Dis Child* 2012 97: A173. (doi:10.1136/archdischild-2012-302724.0597). Poster.
- Alkan T., Minbay, Z., Cetinkaya, M., Goren, B., **Orenlili E.**, Cansev, M., Investigation of mechanisms whereby uridine exhibits neuroprotective effects in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy., 8th FENS Forum of Neuroscience, 14-18/07/2012, Barcelona, SPAIN, Poster, 16/07/2012.
- Cansev, M., **Orenlili E.**, Orhan, F., Aydin, S., Isik, E., Ulus, I.H., Characterization of pyrimidineric transmission in rat brain by *in vivo* microdialysis., 8th FENS Forum of Neuroscience, 14-18/07/2012, Barcelona, SPAIN, Poster, 16/07/2012.
- Cansev, M., Minbay, Z., Alkan, T., Goren, B., **Orenlili, E.**, Uridine reduces matrix metalloproteinase-9 expression in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy., 2nd Annual Conference of COST Action ECMNET 'Brain Extracellular Matrix in Health and Disease', 12-13/07/2012, Barcelona, SPAIN, Oral presentation, 13/07/2012.
- Alkan T., Minbay Z., Cetinkaya M., Goren B.,**Orenlili E.**, Koksal N., Cansev M., Neuroprotective effects of uridine in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy., 8th IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE (International Brain Research Organization) - 14-18/07/2011, Florence, ITALY, Poster.
- Cansev M., **Orenlili E.**, Kanar F., Işık E., Ulus İ.H., Effect of Exogenous Uridine Administration on Brain Extracellular Uridine Nucleotide Concentrations *in vivo.*, Pharma-Nutrition 2011- Discussing the interface

between pharma and nutrition., 18–20/04/2011, Amsterdam, THE NETHERLANDS, Poster.

- **Ulusal Kongreler**

- **Yaylagül E.Ö.**, Babat Y., Ceylan İ., Ülger C., Baicaleinin osteosarkoma hücre hattı Saos-2 hücrelerinde miR-25 ve hedef gen ifadesi üzerine etkisi., 22.Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27/06/2014,Eskişehir, Sözlü sunum, 24/06/2014.

- Ceylan İ., **Yaylagül E.Ö.**, Şahin B.A., Ülger C., İnsan kolon kanseri Ht-29 hücre hattında Emodin uygulamasının CYP1A1 gen ifadesine etkisi, 22.Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27/06/2014,Eskişehir, Sözlü sunum, 25/06/2014.

-**Yaylagül E.Ö.**, Babat Y., Ceylan İ., Ülger C., Osteosarkoma hücre hattı Saos-2 hücrelerine Baicalein uygulamasının miR-25 ifadesine etkisi, XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası katılımlı), 27-30/10/2013, Aydın, Poster, 29/10/2013.

-Ceylan İ., Şahin A. Burcu, Babat Y., **Yaylagül E.Ö.**, Ülger C., Meme kanseri hücre hattı Mcf-7 hücrelerine Escin uygulamasının *p21* gen ifadesine etkisi, XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası katılımlı), 27-30/10/2013, Aydın, Poster, 27/10/2013.

- **Örenlili E.**, Bozdemir S., Cansev M., Çelikler S., Parkinson tedavisi ilaçlarının genotoksik etkilerinin kısa süreli *in vivo* genotoksisite test yöntemleri ile araştırılması, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), 3-7/09/2012, İzmir, Sözlü Sunum, 06/09/2012.

- Hacıoğulları S., Bozdemir S., Tanıtan M., **Örenlili E.**, Parkinson Hastalığında Kullanılan L-Dopa'nın Genotoksik Etkileri Üzerine Bazı Bitki Ekstraktlarının Potansiyel Antigenotoksik Etkilerinin *in vitro* Değerlendirmesi., Uludağ Üniversitesi 4. Ulusal Biyoloji Toplulukları Kongresi 4-6/05/2012, BURSA, Sözlü sunum.

- Cansev M., **Orenlili E.**, Kanar F., Aydın S., Işık E., Ulus İ.H., Sıçan Beyninde Primidinerjik Transmisyonun *in vivo* Mikrodializ Yöntemiyle Kanıtlanması., 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 19-22/10/2011 – ESKİŞEHİR, Poster.
- Alkan T., Minbay Z., Cetinkaya M., Goren B., **Orenlili E.**, Koksal N., Cansev M., 19. Ulusal Neonatoloji Kongresi (UNEKO-19), 17–20/04/2011, Marmaris, MUĞLA, Sözlü sunum.
- **Orenlili E.**, Kanar F., Işık E., Cansev M., Dışarıdan Verilen Üridinin Sıçan Striatumunda Ekstraselüler Üridin Nükleotid Düzeylerine Etkisi., 10. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 9–12/04/2011, İstanbul Üniversitesi, İSTANBUL, Poster.
- Kanar F., **Orenlili E.**, Aydın S., Cansev M., Dışarıdan Verilen Üridinin Sıçan Striatumunda Ekstraselüler Asetilkolin ve Kolin Düzeylerine Etkisi., 10. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 9–12/04/2011, İstanbul Üniversitesi, İSTANBUL, Poster.

C. KATILDIĞI PROJELER

- **05/2015–05/2017:** Saos-2 Osteosarkoma Hücre Hattında Baicalein'in Wnt/ β -Katenin Yolağına ve MiR-25 İfadesine Etkisi (Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: FEF-15019, **Araştırmacı**)
- **05/2014–05/2015:** Osteosarkoma hücre hattı Saos-2 hücrelerinde miR-25 ifadesine baicaleinin etkisi (Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: FEF-14042, **Araştırmacı**)
- **01/2013–01/2016:** Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu, Akdeniz ve Ege Bölgelerinde Anopheles (Culicidae: Diptera) Türlerinin İnsektisit Direnci (TÜBİTAK Projesi, Proje No: 112T479, **Bursiyer öğrenci**)
- **09/2010–2012:** Nörolojik Hastalıklarda Kullanılan Bazı İlaçların Genotoksik Etkilerinin Kısa Süreli *in vivo* Genotoksisite Test Yöntemleri ile Araştırılması (Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: UAP(F) 2010/60, **Yardımcı Araştırmacı**)

- **09/2009–2012:** *Hypericum olympicum* L. ve *Hypericum adenotrichum* Spach. Türlerinin Genotoksik/Antigenotoksik ve Antioksidatif Özelliklerinin *in vitro* Test Yöntemleri ile Araştırılması (Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: UAP(F) 2009/28, **Yardımcı Araştırmacı**)
- **08/2009–08/2012:** Dışarıdan Verilen Pirimidin Bileşiklerinin Sıçanlarda Pirimidinerjik Nörotransmisyona Etkileri: Diğer Nörotransmitter Sistemleri ile Etkileşimler (TÜBİTAK Projesi, Proje No: 108S354, **Bursiyer öğrenci**)

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : esra.orenlili@gmail.com

Tarih : 07/04/2017