T.C.

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

LARİNGEAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMLU HASTALARDA CERNA DÜZENLEYİCİ YOLAKTA BULUNAN *UCA1*/*miR-138*/*CDK6* EKSPRESYON SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

DR. NESLİHAN CİNKARA

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Dr.Öğr.Üyesi Çiğdem YÜCE KAHRAMAN

ERZURUM 2022

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİ ve TEZİ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Adı, Soyadı : Neslihan CİNKARA	**Sınav tarihi:** 05 / 07 / 2022
Anabilim Dalı : Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı : Dr.Öğr.Üyesi Çiğdem YÜCE KAHRAMAN	
Tezin Konusu : Laringeal Skuamöz Hücreli Karsinomlu Hastalarda ceRNA Düzenleyici Yolakta Bulunan UCA-1/miR-138/CDK6 Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi	
Tezin Niteliği : ☒ Tıpta Uzmanlık Tezi	
Tez Sınavının Nasıl Yapıldığı: ☐ Yüz yüze katılım sağlanarak ☒ Online (Jürinin teşkil edilmesinde kurum dışından belirlenecek olan jüri üyesi, aynı il sınırları içerisinde bulunmadığından, tez sınavı dijital ortamda yapılmıştır.)	

II. KARAR

Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. maddesi gereğince yapılan tez savunma sınavının tamamlanması sonucunda adı geçenin tezinin, jüri üyelerince "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak;

☒ Kabulüne

1.Tez Sınavı ☐ Reddine (Eksikliklerin tamamlanması ve gerekli düzeltmelerin yapılması için uzmanlık öğrencisine, TUEY'nin 19. Maddesinin 5. fıkrası gereğince altı aylık ek bir süre verilmesine)

2.Tez Sınavı ☐ Reddine (TUEY'nin 19. Maddesinin 6. fıkrası gereğince, uzmanlık öğrencisinin uzmanlık öğrenciliği ile ilişiğinin kesilmesine)

☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

III. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

IV. JÜRİ ÜYELERİ

	Unvanı Adı Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurum Bilgisi	İmza
Jüri Başkanı	Prof.Dr. Mahmut Selman YILDIRIM	Tıbbi Genetik	Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi	
Jüri Üyesi	Dr.Öğr.Üyesi Ebru MARZİOĞLU ÖZDEMİR	Tıbbi Genetik	Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Jüri Üyesi	Dr.Öğr.Üyesi Çiğdem YÜCE KAHRAMAN	Tıbbi Genetik	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi	

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER……i

TABLOLAR DİZİNİ……iii

ŞEKİLLER DİZİNİ……iv

KISALTMALAR DİZİNİ……v

TEŞEKKÜR……vi

ÖZET……vii

ABSTRACT……ix

1.GİRİŞ VE AMAÇ……1

2.GENEL BİLGİLER……4

2.1. Larinksin Malign Patolojileri……4

2.2. Larinksin Anatomisi ……5

2.3. Laringeal Skuamöz Hücreli Karsinom……8

2.3.1. Epidemiyoloji……8

2.3.2. Etiyopatogenez……8

2.3.3. Semptomlar……9

2.3.4. Evreleme……10

2.3.5. Prognoz……10

2.3.6. Tanı ve Tarama……11

2.3.7. Tedavi/Yönetim……12

2.3.8. Kanser İlacı Direncinde RNA'lar……13

2.4. Kodlamayan RNA'lar (ncRNA)……..14

2.4.1. Long Noncoding RNA'lar (lncRNA)……..15

2.4.2. MikroRNA'lar (miRNA)……20

2.5. Kompetif Endojen RNA (CERNA) Ağı……25

2.5.1. Üretelyal Kanser İlişkili 1 (*UCA1*)……31

2.5.2. *MiR-138*……35

2.5.3. *CDK6*……38

3. GEREÇ VE YÖNTEM……..41

3.1. Hastaların Seçilmesi ve Kayıtların Tutulması……41

3.2. RNA'ların Ekspresyon Analizi……42

3.2.1. lncRNA ve mRNA Analizi……42

3.2.2. MiRNA Analizi……47

3.3. Verilerin Analizi……50

4. BULGULAR……52

4.1. Ekspresyon Analizi Bulguları……52

4.2. Ekspresyon Değerlerinin Karşılaştırılması……..52

5. TARTIŞMA……..56

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER……64

KAYNAKLAR……65

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Genomik Eliminasyon Karışımı……..44

Tablo 2. Ters transkripsiyon karışımı……45

Tablo 3. qRT – PCR için belirlenen malzemeler ve miktarları……46

Tablo 4. qRT – PCR döngü basamakları……46

Tablo 5. Ters transkripsiyon reaksiyonu için malzemeler ve miktarları……49

Tablo 6. . Termal döngü cihazındaki koşullar……49

Tablo 7. qRT-PCR için belirlenen malzemeler ve miktarları……50

Tablo 8. qRT –PCR döngü basamakları……50

Tablo 9. *UCA1*, *CDK6*, hsa-*miR-138*, GAPDH, GAPDHP61 ve RNU6 için tespit edilen ortalama Ct değerleri……53

Tablo 10. *UCA1*, *CDK6*, hsa-*miR-138*, GAPDH, GAPDHP61 ve RNU6 için kontrol grubuna kıyasla 'Kat Değişimi' değerleri ve p değerleri……54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Larinksin Anatomisi……7

Şekil 2. RNA ‘ların sınıflandırılması……14

Şekil 3. Genomdaki konuma göre lncRNA genlerinin sınıflandırılması……17

Şekil 4. Etki mekanizmasına göre lncRNA'nın sınıflandırılması……..18

Şekil 5. miRNA transkripsiyonundan hedef mRNA'nın baskılanmasına kadar olan süreç……23

Şekil 6. cerRNA mekanizması……28

Şekil 7. *UCA1* geni üç ekzondan (sarı kutular) oluşur ve iki intron (mavi kutular)……31

Şekil 8. lncRNA-*UCA1* aracılı kanserin moleküler mekanizması ilerleme ve metastaz……34

Şekil 9. Nano Maestro spektrofotometre cihazı……43

Şekil 10. RNA amplifikasyonunda kullanılan Real-Time PCR cihazı (Qiagen Rotor-Gene Q)……47

Şekil 11. RT-PCR amplifikasyon eğrileri……52

Şekil 12. Hasta ve kontrol gruplarının kat değişimi değerleri……54

KISALTMALAR DİZİNİ

AGO: Argonaute

CDK6: Siklin bağımlı kinaz

ceRNA: Kompetitif endojen RNA

CT: Döngü Eşiği

DGCR8: DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8

DICER1: Çift Sarmallı RNA'ya Özgü Endoribonükleaz

DROSHA: RNAaz enzimi (DGCR8 ile birlikte primer miRNA'ları prekürsör miRNA'lara çevirir.)

LncRNA: Uzun kodlamayan RNA

LSCC: Laringeal skuamöz hücreli karsinom

miRNA: MikroRNA

miRISC: MiRNA ilişkili RNA-indüklenmiş susturma kompleksi

MRE: MiRNA yanıt elemanı

ncRNA: Kodlamayan RNA

siRNA: Küçük interferans RNA

snoRNA: Küçük nükleolar RNA

PACT: Protein kinaz R'nin protein aktivatörü

piRNA: Piwi etkileşimli RNA

qRT-PCR: Niceliksel eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

RISC: RNA-indüklenmiş susturma kompleksi

TRBP: Trans-aktivasyon yanıtı RNA bağlayıcı protein

UCA1: Üretelyal kanser ilişkili 1

TEŞEKKÜR

Tıbbi genetik uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini aktaran, bana her konuda destek veren, tecrübelerinden ve insani değerlerinden oldukça istifade ettiğim, beni iyi bir hekim ve araştırmacı olmam için her zaman teşvik eden, tezimin hazırlanmasında katkıları olan anabilim başkanımız saygıdeğer Prof. Dr. Abdulgani Tatar hocama teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli ve danışman hocam Dr.Öğr.Üyesi Çiğdem Yüce Kahraman'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Bu araştırmanın yapılmasında emeği geçen Kulak-Burun-Boğaz AD. Öğretim üyesi Doç. Dr. Arzu Tatar'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm araştırma görevlisi arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Mustafa Yılmaz, Arş. Gör. Dr. Büşra Saruhan, Arş. Gör. Dr. Ziya Bulduk, Arş. Gör. Dr. Dilara Aydemir'e teşekkürlerimi sunuyorum. Yine çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve gelecekteki hayatında çok daha başarılı olacağına inandığım genetik camiasının parlayan gururu kıymetli Arş. Gör. Dr. Momen Kanjee'ye de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum anabilim dalımızın personel ve sekreterlerine teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca, örneklerin toplanmasında ve çalışılmasında bana her türlü desteği sağlayan Arş. Gör. Özel Çapık ve laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve tecrübelerini paylaşan biyologumuz Güller Özkan'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Yaşamımın ve zorlu eğitim sürecimin her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen anneme, babama, ablalarıma ve kardeşime teşekkür ederim.

Son olarak benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen hayat arkadaşıma ve kızıma teşekkür ederim.

ÖZET

LARİNGEAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMLU HASTALARDA CERNA DÜZENLEYİCİ YOLAKTA BULUNAN UCA-1/MİR-138/*CDK6* EKSPRESYON SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Noncoding RNA'lar (ncRNA'lar) birçok kanser türünde nüks ve prognozu öngörmek için biyolojik belirteç ve terapötik hedef olabilme potansiyeline sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çeşitli kanserlerde lncRNA - miRNA - mRNA ceRNA (Kompetitif endojen RNA) ilişkisi ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmanın amacı, LSCC (Laringeal Skuamöz Hücreli Karsinom) ve komşu normal doku örnekleri arasında *UCA1*/*miR-138*/*CDK6* ceRNA düzenleyici ağda ekspresyon seviyelerini ve birbirleriyle olan ilişkilerini araştırmaktır. Aynı zamanda LSCC'de ceRNA düzenleyici ağda lncRNA'ların hedef genleri nasıl düzenlediğini araştırmaktır. Ayrıca çalışmamızla, ncRNA'ların terapötik hedefler ve prognostik biyobelirteç olma potansiyeli düşünüldüğünde, ilerde bu alanda yapılacak çalışmalara katkı sunacak bilgiler elde etmeyi amaçlamaktayız.

Yöntem: KBB (Kulak-Burun-Boğaz) kliniğinde klinik olarak LSCC tanısı alarak, opere edilen hastaların laringeal doku örneklerinde çalışılacaktır. Çalışmada hastaların ameliyat sırasında çıkarılan dokularından, kanserli doku örnekleri ve kontrol olarak da normal komşu doku örneklerinden total RNA izolasyonu yapılacaktır. Kantitatif real-time PCR yöntemi ile *UCA1*, *miR-138* ve *CDK6* ekspresyon düzeyleri belirlenecektir. Hasta ve kontrol dokulardaki ekspresyon düzeyi kıyaslanacak ve istatistiki analiz yapılacaktır.

Bulgular: Kanserli doku örnekleri ve kontrol olarak da normal komşu doku örneklerinin ekspresyonları kıyaslanmıştır. Kanserli dokularda *CDK6* düzeylerinde artma daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir ama istatistiki olarak anlamlı bulunamamıştır. *UCA1* ve *miR-138* düzeylerinde değişiklik literatürle benzerdi fakat kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Tartışma ve Sonuç: Aşırı eksprese edilen metastazı teşvik eden ncRNA'lar, terapötik müdahale için olası hedeflerdir. Bu alanda, daha birçok çalışmaya ve in vivo karakterizasyona ihtiyaç vardır. Bu çalışmalar ncRNA'ların gelişim, hastalık ve diğer hücresel süreçlerdeki rolleri ve işlevlerini ortaya koyacaktır. Sonuçta, protein kodlayan genler ve miRNA'lar gibi, lncRNA'lar da kanserde biyolojik belirteç olarak kullanılabilir ve hatta yakın gelecekte kemoterapötik ilaç

geliştirme alanının hedefi haline gelebileceklerdir. LSCC'nin moleküler mekanizmasını anlamak adına *UCA1*/*miR-138*/*CDK6* ekseninin LSCC dokusunda yapılan ilk çalışmasıdır. Çalışmamızda, daha önce bildirilen raporlarla *UCA1-miR-138-CDK6*'nın ekspresyon seviyeleri uyumluydu fakat istatiksel olarak anlamlı bulunamadı. Bu çalışma, LSCC hücre dizilerinde yapılmamıştır. Mevcut bulguları destekleyecek hayvan deneylerinden ve ileriye dönük klinik çalışmalarıdan yoksundur. Bu nedenle, bu sinyal yolunun işlevini hayvanlarda olduğu kadar çoklu LSCC hücre dizilerinde daha fazla doğrulamak için gelecekte daha fazla çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Uzun kodlamayan RNA, lncRNA, Laringeal kanser, miRNA, *UCA1*, miR-138, *CDK6*

ABSTRACT

EVALUATION OF UCA-1/*MİR-138*/*CDK6* EXPRESSION LEVELS IN CERNA REGULATORY NETWORK IN PATIENTS WITH LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Objective: Noncoding RNAs (ncRNAs) have the potential to be biomarkers and therapeutic targets to predict recurrence and prognosis in many cancer types. Studies conducted in recent years have revealed the relationship between lncRNA - miRNA - mRNA ceRNA (competing endogenous RNA) in various cancers. The aim of this study was to investigate the expression levels and interrelationships between LSCC (Laryngeal Squamous Cell Carcinoma) and adjacent normal tissue samples in the *UCA1*/*miR-138*/*CDK6* ceRNA regulatory network. It is also to investigate how lncRNAs regulate target genes in the ceRNA regulatory network in LSCC. In addition, with our study, we aim to obtain information that will contribute to future studies in this field, considering the potential of ncRNAs to be therapeutic targets and prognostic biomarkers.

Method: The laryngeal tissue samples of patients who were operated on with the clinical diagnosis of LSCC in the ENT (Ear-Nose-Throat) clinic will be studied. In the study, total RNA will be isolated from the patients' tissues removed during surgery, from cancerous tissue samples and from normal neighboring tissue samples as a control. *UCA1*, *miR-138* and *CDK6* expression levels will be determined by quantitative real-time PCR method. The expression level in patient and control tissues will be compared and statistical analysis will be made.

Results: Expressions of cancerous tissue samples and normal adjacent tissue samples as controls were compared. The increase in *CDK6* levels in cancerous tissues supports previous studies, but it was not found statistically significant. The change in *UCA1* and *miR-138* levels is similar to the literature, but no significant difference was found when compared with the control group.

Discussion and Conclusion: Overexpressed metastasis-promoting ncRNAs are possible targets for therapeutic intervention. More studies and in vivo characterization are needed in this area. These studies will reveal the roles and functions of ncRNAs in development, disease and other cellular processes. Ultimately, like protein-coding genes and miRNAs, lncRNAs can be used as biomarkers in cancer and may even become targets of chemotherapeutic drug development in the near future. This is the first study of the *UCA1*/*miR-138*/*CDK6* axis in LSCC tissue to understand the

molecular mechanism of LSCC. In our study, the expression levels of *UCA1-miR-138-CDK6* were consistent with previously reported reports, but it was not found to be statistically significant. This study was not performed in LSCC cell lines. It lacks animal experiments and prospective clinical studies to support current findings. Therefore, further studies should be conducted in the future to further confirm the function of this signaling pathway in animals as well as in multiple LSCC cell lines.

Keywords: Long non-coding RNA, lncRNA, Laryngeal cancer, miRNA, *UCA1*, miR-138, *CDK6*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Laringeal kanser, baş ve boynun yaygın bir malign neoplazmıdır ve laringeal skuamöz hücreli karsinom (LSCC), tüm laringeal kanser vakalarının % 90'ından fazlasını oluşturur. Sık metastaz ve nüks nedeniyle LSCC hastalarının uzun vadeli prognozu kötü olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle, LSCC'nin moleküler mekanizmalarını daha iyi anlamak ve potansiyel terapötik hedefleri belirlemek önemlidir. Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) ve mikroRNA'lar (miRNA'lar) dahil olmak üzere birçok RNA tipi, memeli hücrelerinde çeşitli mRNA'ların ekspresyon seviyelerini düzenler ve kanser patogenezindeki rolleri son yıllarda daha çok ilgi çekici olmuştur. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi terapötik yöntemlerde önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, sık metastaz ve nüks nedeniyle LSCC hastalarının uzun vadeli prognozu iyi değildir. LSCC gelişimi ve ilerlemesinde düzenleyici mekanizmaların araştırılması, LSCC için etkili terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkı sunacaktır. Bu açıdan bakıldığında, belirli bir tedaviden fayda görecek hastaların seçilmesi ve klinik sonucun tahmin edilmesini sağlayan yeni biyobelirteçleri belirlemek önemli bir adım olacaktır (1).

İnsan genomunun yalnızca %2' sinden azının protein kodladığı ve %90'ından fazlasının da protein kodlamadığı bilinmektedir. Kodlamayan RNA (ncRNA)'ların, sinyal yolaklarını kontrol etmede görevleri olduğu bilinmektedir. İnsan genomunda ncRNA genleri protein kodlamaksızın fonksiyonel RNA moleküllerini oluştururlar ve hücre içinde kritik rollere sahip olan süreçlerde regülatör olarak görev yaparlar. Bu kodlamayan RNA'lar, uzunluklarına bağlı olarak iki ana kategoriye ayrılır. Küçük kodlamayan RNA'lar (Small Non-coding RNA: sncRNA), 200 nükleotidden daha kısadır ve büyük oranda mikroRNA'lar (miRNA) ve küçük nükleolar RNA'ları (snRNA) içermektedir. Uzun kodlamayan RNA'lar (long non-coding RNA: lncRNA) ise; 200 nükleotidden daha uzun ve kodlama potansiyeli olmayan farklı RNA moleküllerini içeren bir gruptur. NcRNA'lar, tümör hücrelerinin biyolojik davranışları üzerindeki modüle edici etkisi nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bu ncRNA'lar arasında lncRNA'lar ana ilgi odağıdır. Son çalışmalar, insan genomu tarafından kodlanan 15,000 farklı lncRNA'nın olduğunu göstermektedir (1). lncRNA'lar, protein kodlamayan, 200'den fazla nükleotid uzunluğunda RNA transkriptleri olarak sınıflandırılır. Genel olarak lncRNA'lar, kromatin modifikasyonu başta olmak üzere transkripsiyon ve post-transkripsiyonel süreçlerde gen ekspresyon seviyelerini değiştirir ve düzenleyici rol oynarlar (2).

Güncel literatürde, lncRNA'ların tümörigenezde ve tümör progresyonunda rol aldığı, ayrıca çeşitli kanser koşullarında metastatik özellikler gösterdiği bildirilmiştir (3). Çeşitli kanser hücrelerinde anormal bir şekilde eksprese edilen lncRNA'ların, kanserin birçok basamağında önemli rol oynadığı ve çeşitli malign tümörlerde prognozla ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (4). lncRNA, lncRNA-mikroRNA (miRNA) etkileşimi, lncRNA-protein etkileşimi ve lncRNA-haberci RNA (mRNA) etkileşimi dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla gen ekspresyonuna aracılık eder. Literatürdeki çalışmalar, lncRNA'ların, hücre proliferasyonu, invazyon, metastaz, karsinojenez ve kanser ilerlemesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir (2).

LncRNA'lar mRNA'ları bloke ederek, stabilize veya destabilize ederek protein translasyonuna da müdahale edebilirler. Çeşitli çalışmalar, miRNA için rekabetçi bir RNA (ceRNA) olarak lncRNA'nın tümör gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. CeRNA hipotezine göre lncRNA'lar, miRNA'larla rekabet ederek ceRNA'lar olarak hareket edebilir ve bu miRNA'ların mRNA üzerindeki spesifik bağlanma bölgelerine bağlanmasını engelleyebilir, böylece posttranskripsiyonel olarak hedef genleri düzenleyebilir (5). Bu etkileşim, miRNA seviyesini ve miRNA ile mRNA arasındaki etkileşimi azaltır ve böylece bu down-regülasyon mRNA'lar üzerindeki baskıyı hafifleterek mRNA'ları artırır. Fizyolojide öne çıkan işlevleri göz önüne alındığında, ceRNA'ların deregülasyonunun, kanser gelişmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. CeRNA teorisine dayanarak, araştırmacılar çeşitli kanserlerde lncRNA - miRNA - mRNA ceRNA ilişkisini çalışmışlardır. Bir onkojenik lncRNA olan; ürotelyal kanserle ilişkili 1 geni (*UCA1)* orijinal olarak mesane kanseri dokularında tanımlanmıştır. *UCA1*'in prostat kanseri, over kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri ve hepatosellüler karsinom dahil çeşitli kanserlerde up-regüle edildiği ve kanserojen etki gösterdiği ortaya konmuştur (6). Artmış *UCA1* ekspresyonu, ileri TNM evresi, pozitif lenf nodu metastazları, daha yüksek hücre canlılığı ve göçü, kemoterapi direnci ve daha kısa sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (7). Buna göre *UCA1* ekspresyonunun kanser hastaları için prognostik bir belirteç olabileceği öngörülmüştür. Bazı çalışmalarda, hastaların tümörlü doku örnekleri ve tümörsüz komşu doku örneklerinde *UCA1* ekspresyonunu değerlendirilmiştir ve tümörlü dokularda artmış *UCA1* ekspresyonunu bildirilmiştir. Sun ve arkadaşlarının yaptığı hücre hattı çalışmasında, LSCC'li hastalarında, komşu sağlıklı dokulara kıyasla tümör dokularında *UCA1*

ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde artmış bulunmuştur (8). Akciğer kanserinde, *UCA-1*,*miR - 138* ve *miR - 193* ve *CDK6* aksı üzerinde yapılan bir çalışmada, *UCA1*'in aşırı ekspresyonunun *miR - 138* veya *miR - 193*'ün tümör baskılayıcı etkisini tersine çevirerek kanser hücrelerinin, proliferasyon, migrasyon ve invazyon yeteneklerini artırdığı bildirilmiştir. Akciğer kanserinde yapılan bu çalışmada, *miR-138* ve *miR-193* ile *UCA1* ekpresyonları arasında negatif korelasyon gösterilmiştir (9).

MiRNA'lar, küçük endojen kodlamayan RNA'ların (yaklaşık 19–25 nükleotit) bir sınıfı olarak, hedef genlerin 3 ' tranlasyona uğramayan bölgelerine (3 ' UTR'ler) bağlanır. MiRNA'ların anormal ekspresyonu LSCC'nin ilerlemesini etkileyebilir. *MiR-138* temel olarak çeşitli tümör tiplerinde bir tümör baskılayıcı olarak görev görür. *MiR-138*'in glioblastoma gelişimini ve metastazı baskıladığı bildirilmiştir (4). Ayrıca baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde invazyonu baskıladığı ve apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir (6). Gao ve arkadaşları, *miR-138*'in LSCC dokularında, eşleştirilmiş normal laringeal dokuya kıyasla down-regüle edildiğini bildirmişlerdir. Ek olarak, *miR-138*'in LSCC hücrelerinin invazyonunu engellediğini bulmuşlardır (7).

Literatürde *UCA1*, *miR-138*, *CDK6* aksı, akciğer kanseri için çalışılmış ancak patofizyolojik olarak yakın mekanizmalar gösteren LSCC alanında çalışılmamıştır. Biz de bu çalışmamızda LSCC'de *UCA1*, *miR-138*, *CDK6* aksı ilişkini göstermek ve gelecekte kanser ilişkili prognostik biyobelirteç olma potansiyeli taşıyan lncRNA çalışmarına katkı sunmayı amaçlamaktayız. LSCC'li hastaların tümörlü doku ve normal komşu doku örneğinden *UCA1*-miR138-*CDK6* ağını ele alarak ekspresyon seviyelerini ve birbirleriyle olan ilişkilerini araştırmayı hedeflemekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Larinksin Malign Patolojileri

Laringeal kanserlerin büyük çoğunluğu iyi diferansiye skuamöz hücreli karsinomdur. Larinks malign tümörlerinin yaklaşık %95-98'i yassı epitel hücreli kanser olup, spindle cell, verrüköz karsinoma gibi varyantları da vardır. Larinksin premalign lezyonları genellikle lökoplaki olarak adlandırılır. Mikroskopik olarak hiperkeratozdan, epitelin yaygın displazisine kadar uzanırlar. Hafif ve orta derecede displazi bu iki ucun arasındadır. Karsinoma insitu, skuamöz epitelin bazal membrane invazyon yapmayan kanseridir ve kanserin en erken formudur.

Düşük insidanslı diğer larinks kanserleri;

- Küçük hücreli karsinom
- Mukoepidermoid karsinom
- Adenokarsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Sarkomlar (kondrosarkom, fibrosarkom, rabdosarkom vb.)

Differansiyasyon derecesine göre;

- İyi diferansiye
- Orta derecede diferansiye
- Az differansiye veya undifferansiye olarak sınıflandırılır.

Larinks kanserleri lokalizasyonlarına göre supraglottik, glottik, subglottik ve transglottik olarak 4 grupta incelenir. Glottik kanserler %56-60, supraglottik kanserler %41-45 ve subglottik kanserler %1-2 oranında görülmektedir(10). Supraglottik kanserler; epiglotun serbest kenarından ventriküle kadar olan alana lokalize tümörlerdir. Supraglottik bölgenin lenfatikten zengin olması nedeniyle lenfatik yayılımları kolay olan tümörlerdir. Bu nedenle ileri evre supraglottik tümörlerde, boyun klinik olarak negatif bile olsa boyun mutlaka tedavi planına eklenmelidir.

Kolayca tiroid kıkırdağa penetre olabildiklerinden ve preepiglottik alana yayılabildiklerinden prognozu kötüdür.

Glottik kanserler; genellikle vokal kordu ve ön komisürü tutar. İyi diferansiye tümör olmaları, lenfatiklerin yok denecek kadar az olması, tiroid kıkırdağın iyi bir bariyer oluşturması, yayılımın yavaş olmasını sağlayan en önemli faktörlerdir.

Subglottik kanserler; ön komisürde vokal kordların serbest kenarının 2-4mm ve vokal çıkıntıların ucundan 5-7mm kadar aşağısından başlayarak krikoid kıkırdak alt kenarına uzanır.

Transglottik kanserler; bir laringeal bölgeden glottisi geçerek diğer bölgeye atlayan tümörlere denir. Erken dönemde paraglottik alana yayıldıklarından prognozları kötüdür (11).

2.2. Larinksin Anatomisi

Larinks, boynun ön tarafında yer alan solunum yollarının kıkırdaklı bir segmentidir. İnsanlarda ve diğer omurgalılarda gırtlağın birincil işlevi, nefes alırken alt solunum yolunu gıdaları nefes borusuna aspire etmekten korumaktır. Aynı zamanda ses tellerini içerir ve ses üretmek için bir ses kutusu işlevi görür. Filogenetik bir bakış açısına göre, insanlarda gırtlak, omurgasızlarda ve balıklarda bulunmayan konuşmayı ifade etme kapasitesi ile en yüksek evrimsel gelişimini elde etmiştir. Larinks yaklaşık 4 ila 5 cm uzunluğunda ve genişliğinde olup, ön-arka çapı biraz daha kısadır (12). Kadınlarda erkeklerden daha küçük, ergenlik çağındaki büyümesi nedeniyle yetişkinlerde çocuklara göre daha büyüktür. Büyük bir gırtlak, daha derin bir sesle ilişkilidir.

Larinksin yeri C3 ila C7 omurları seviyesindedir ve kaslar ve bağlar tarafından yerinde tutulur. Larinksin en üst bölgesi, farinksin alt kısmına bağlı olan hyoid kemiğe bağlı olan epiglottur. Larinksin alt tarafı, trakeanın üst bölgesine bağlanır.

Larinks embriyolojik gelişim, fonksiyon ve lenfovasküler yapısı dikkate alınarak üç bölgeye ayrılır.

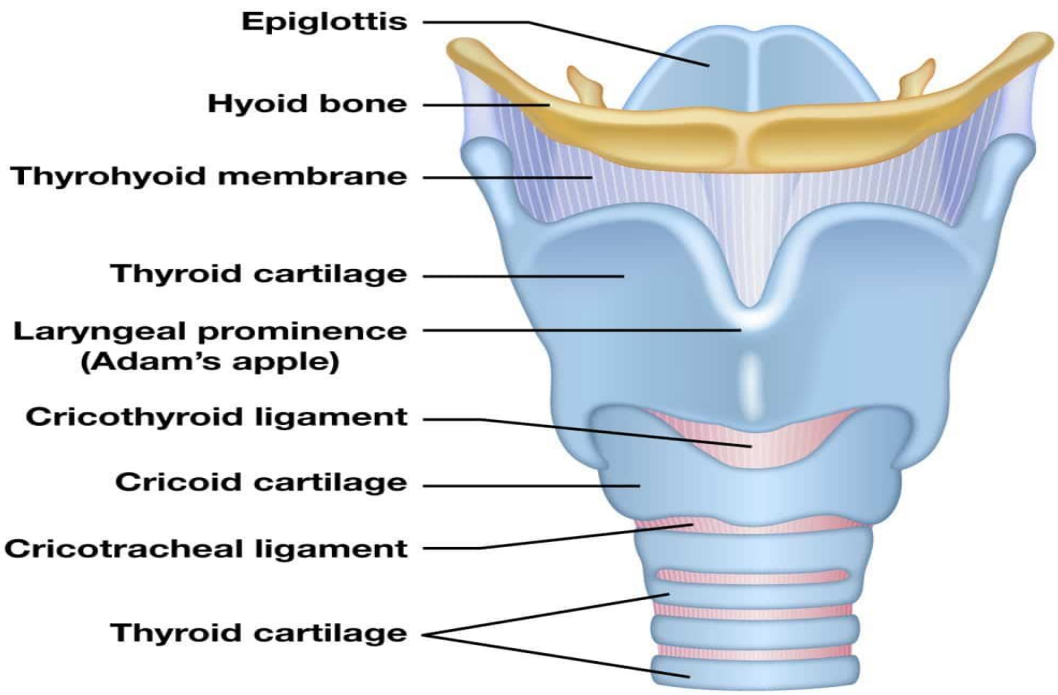
1. Supraglottik bölge: Epiglotun tepesinden laringeal ventrikülün apeksine uzanır. Epiglottis, aritenoidler, ariepiglottik plikalar, yalancı kordlar ve ventrikülleri içerir.

2. Glottik bölge: Vokal kordları içerir.

3. Subglottik bölge: Kord seviyesinin 5 mm altında glottis ve subglottisi ayıran horizontal düzlemden başlar. Subglottisin alt sınırı da krikoid kıkırdağın inferior kenarıdır.

Larinks, boynun ön tarafında 3-6. boyun vertebraları yüksekliğinde, dil koku ile trakea arasında bulunur. Larinks arkada farinksin alt parcası ile komşudur ve burada farenksin ön duvarını yapar. Önde ortada yalnızca fasya ve deri ile örtülüdür. Önde ve yanlarda sternohiyoid, sternotiroid, omohiyoid, tirohiyoid kaslar, damar sinir paketi, sternokleidomastoid kas ve tiroid glandı lobları ile komşudur (Şekil 1) (13). Yukarıda hiyoid kemiğine ligamanlar ve tirohiyoid kas ile bağlıdır. Bundan dolayı larinks özellikle yutma sırasında hiyoid kemiğin hareketlerini izler. Larinksin en üst kısmını oluşturan epiglot, mukozal plikalar ve bağ dokusu ile dil köküne komşudur. Larinks aşağıda trakea ile uzanır. Larinksin üst deliği solunum yolunu daraltabilecek ve gerektiğinde de tamamen kapatabilecek özelliktedir. Bu mekanizma sesin oluşumu ve yabancı cisimlerin solunum yoluna kaçmaması açısından önemlidir.

Larinksin iskeletini oluşturan kıkırdaklar üçü cift, üçü tek olmak üzere dokuz tanedir. Çift olanları aritenoid, kuneiformis, kornukulat; tek olanları tiroidea, krikoid ve epiglottur. Epiglot fenestrasyonlar içeren elastik kıkırdak, diğerleri hyalen tipte kıkırdaktır. Tiroid ve krikoid kıkırdağın kalsifikasyonu erkekte yirmili yaşlarda, kadında ise erkeğe göre daha geç başlar. Hyalen kıkırdak kanser yayılımına direncli olduğundan, tümörler bu tipte kıkırdaklara ancak kalsifikasyon sonrası yayılabilir. Vokal ligamanlar önde tiroid kıkırdağı, arkada aritenoid kıkırdakların vokal proseslerine yapışır. Larinksin ekstrensek kasları komşu yapılardan köken alarak tiroid, krikoid veya hiyoid kıkırdaklar üzerine yapışır (13). Bunlar omohiyoid, sternohiyoid, tirohiyoid kaslar olup çiğneme sırasında bir bütün halinde hareket ederler.



Şekil 1. Larinksin Anatomisi

Larinksin intrensek kasları 5 tanedir: krikotiroid, krikoaritoneides posterior, krikoaritenoides lateralis, tiroaritenoides kasları cift, aritenoid kas ise tektir. Larinks kaslarının iki önemli görevi vardır: yabancı cisimlerin solunum yollarına geçişini engellemek ve larinks kıkırdaklarının durumunu değiştirerek ses plikalarını ses oluşturacak şekle sokmaktır.

Larinksin motor ve duyusal sinirleri n.vagus'tan gelir. Larinks arterlerini süperior ve inferior tiroid arterden alır. Aynı isimli venler arterleri izler. Larinksin lenf damarları mukozal (yüzeyel) ve submukozal (derin) olmak üzere iki sistemden oluşur. Mukozal sistem tüm mukoza boyunca yayılırken submukozal sistem birbirinden bağımsız kompartmanlara ayrılmıştır. Bu durum kanser metastazlarının aranmasında veya metastaza göre kanserin larinksin hangi bölgesinde olduğunu saptamak açısından önemlidir (12).

Gerçek kordun lenfatik kanalları az sayıdadır; bu nedenle glottik karsinomun metastazı enderdir. Krikotiroid membranı delerek servikal lenfatiklere ulaşır. Supraglottik alan, lenfatiklerden zengindir; tirohiyoid membranı delerek üst servikal ve anterosüperior lenf nodlarına dökülür. Piriform sinuslerde de bol lenfatik bulunur. Lateralde derin servikal lenf

nodlarına bazen de paratrakeal lenf nodlarına dökülür. Subglottik alanın lenf sıvısı prelarengeal, paratrakeal, pretrakeal ve supraklavikuler lenf nodlarına drene olur.

2.3. Laringeal Skuamöz Hücreli Karsinom

Dünyada ölüm nedenleri içerisinde ilk sıralarda yer alan, önemli ve yaygın bir sağlık problem olan kanser, hücre çoğalmasındaki kontrolün ortadan kaybolması olarak tanımlanabilir. Laringeal karsinom, dünya çapında en sık teşhis edilen altıncı karsinom olarak derecelendirilen yaygın bir baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (SCC) türüdür. LSCC, solunum yollarının akciğer kanserinden sonra en sık görülen primer malign tümörüdür ve LSCC, tüm larinks kanseri vakalarının yaklaşık % 85 -% 90'ını oluşturur (14). Ayrıca baş ve boynun ikinci en sık görülen primer epitelyal malign tümörüdür. LSCC'nin başlangıç yaşı çoğunlukla 50 ile 70 arasındadır. Çoğu LSCC hastası, 4:1'lik bir cinsiyet oranı ile erkektir.

2.3.1. Epidemiyoloji

Amerikan Kanser Derneği'nin tahminlerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde 2020 yılında yaklaşık 12.370 hastaya LSCC tanısı konmakta ve bunların 3750'si kanserden ölmektedir (14). ABD'de larinks kanserinin yıllık insidansı 100.000 kişide yaklaşık 5, 5 yıllık sağkalım oranı ise % 60.6'dır (15). Sigara içmenin ve alkol kullanmanın LSCC'nin ortaya çıkması ve gelişmesi ile ilişkili olduğu ve sigara içenlerin ve alkol kullananların hayatta kalma oranlarının bu maddeleri kullanmayanlara göre daha düşük olduğu doğrulanmıştır (13). Tütün ve alkol tüketimindeki artış ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi toksik maddelere mesleki maruziyet nedeniyle son yıllarda LSCC prevalansı artmıştır.

2.3.2. Etiyopatogenez

LSCC'nin etyolojisinde birden fazla faktör rol oynamaktadır. Sigara içmek, larinks kanseri gelişiminde en önemli risk faktörüdür. İkinci olarak sigara ile birlikte sinerjik etkisi gösterilmiş olan

alkoldür. Yapılan çalışmalarda günde 2 paket sigara içenlerde kanser riski 4,4 kat, 2 paketten fazla içenlerde 10,4 kat artar. Risk faktörleri sigarayı bıraktıktan 15 yıl sonra ortadan kalkar (16). Laringeal kanser için diğer risk faktörleri şunları içerir (17):

- Radyasyon maruziyeti
- Genetik yatkınlık
- Anatomik varyasyonlar
- Gastro-özefageal reflü
- İlerlemiş yaş
- Yeşil yapraklı sebze tüketmeme
- Akut ve kronik larinks enfeksiyonları,
- Human papilloma virüs enfeksiyonu
- Boya, asbest maruziyeti ve benzin dumanına maruz kalma

2.3.3. Semptomlar

Larinks kanserleri, diğer organ maligniteleri ile prognostik açıdan kıyaslandığında nispeten daha iyi tümörlerdir. Bunun en önemli nedenlerinden birisi, bu hastalığa erken tanı konabilme şansının yüksek olmasıdır. Belirtiler, tümörün larinkste yerleştiği lokalizasyona göre farklılıklar gösterebilir.

Larinks maligniteleri en sık glottik bölgede görülmektedir, ikinci sıklıkta da supraglottik tümörler olup, sıklığı en az olan ise subglottik malignitelerdir (18).

Laringeal kanserli bir hastanın klinik prezentasyonu, tutulan larinksin anatomik bölgesine bağlıdır. Lenf nodu metastazına daha yüksek bir eğilim gösteren supraglottik tümörleri olan hastalar genelde klinik bulgu vermezler ve tanı konulduğunda tümor oldukça büyümüştür. Boyunda kitle veya daha büyük tümörlerde görülen lokal disfaji semptomları, boğuk ses veya hava yolu rahatsızlığı ile başvurabilirler (12). Glottik tümörlü hastalar sıklıkla kalıcı ses kısıklığı, yansıyan otalji, disfaji, kronik öksürük, stridor ve hemoptizi ile başvurabilir. Subglottik tümörleri olanlar ise

boğazda rahatsızlık hissi, dispne, hemoptizi görülürken tümör vokal kordlara uzanmıssa ses kısıklığı ortaya çıkar. Epiglottik tümörlerde ses kalitesinde değisiklik, havayolu tıkanıklığı, disfaji veya servikal metastaz izlenir. Priform sinüs tümörleri ise genellikle büyük olup odinofaji veya otalji mevcuttur (12).

2.3.4. Evreleme

Larinks kanserlerinin evrelemesinde; tümörün yerleşimini, uzanımını ve metastaz varlığını tanımlayan ve anatomik yayılımı baz alan, kanserin klinik ve biyolojik özelliklerini içermeyen Ocak 2018 yılında baskısı ile güncellenmiş en yeni American Joint Committe on Cancer (AJCC)'in sistemi kullanılmaktadır.

Laringeal kansere tipik olarak, anamnez, fizik muayene biyopsi ve görüntüleme testlerinin sonuçlarına dayalı olarak bir klinik evre verilir. Ameliyat yapılmışsa, patolojik evre (ayrıca cerrahi aşama) belirlenebilir. Laringeal kanserin evreleri, kanserin gırtlağın hangi bölümünde başladığına bağlı olarak biraz farklıdır:

-Supraglottis (ses tellerinin üzerindeki alan)

-Glottis (ses tellerini içeren alan)

- Subglottis (ses tellerinin altındaki alan)

2.3.5. Prognoz

Larinksin malign neoplazmalarının prognozunu çeşitli faktörler belirlemektedir. Bunlar konak, tümör ve tedavi olarak gruplandırılabilir. Konak faktörleri yaş, cinsiyet, beslenme durumu, fiziksel ve psikolojik performans durumu, komorbidite ve immünolojik yanıtı içerir. Tümör faktörleri, tümör bölgesini, TNM evresini, derecesini ve ikinci bir primer kanserin varlığını (senkron veya metakron) içerir. Tedavi faktörleri, tedaviye yönelik mevcut tüm yaklaşımları ve bu modalitelerin çeşitli kombinasyonlarını içerir (19).

Erken LSCC'li hastalar için 5 yıllık sağkalım oranı %70-90 kadardır. İlerlemiş LSCC'li hastalar için ise sadece %30'dur. Yayınlanmış bazı çalışmalarda, genç hastaların yaşlı hastalardan daha iyi sağkalım oranlarına ve prognoza sahip olduğu belirtilmiştir, ancak diğer çalışmalarda genç

hastaların yaşlı hastalardan daha yüksek nüks riskine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Cinsiyet, LSCC prognozu ile ilgili başka bir faktördür ve kadınların erkeklerden daha iyi prognoza sahip olduğu görülmektedir (9). Bununla birlikte, bu eğilim, sigara içme alışkanlıklarının erkekler ve kadınlar arasındaki eşit olmayan dağılımı gibi diğer faktörlere bağlı olabilir. Malnütrisyon ayrıca LSCC'nin bağımsız bir prognostik faktörü olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, komplikasyonların varlığı gibi hastaların genel durumu da prognozu ve sağkalımı etkileyebilir. Örneğin, tedavi öncesi hemoglobin düzeylerinin de prognozu etkileyen bir diğer faktör olduğu saptanmıştır. İmmünolojik yanıtla ilgili olarak, immünsüprese hastaların prognozu kötü görünmektedir. Primer tümörün yeri de prognozu etkileyebilir. Anatomik pozisyona göre, LSCC supraglottik, glottik ve subglottik olarak ayrılabilir. Son yıllarda, LSCC'nin paraglottik LSCC olarak sınıflandırılması tartışmalı hale gelmiştir ve Uluslararası Kanser Kontrol Birliği tarafından onaylanmamıştır (18). Paraglottik LSCC, laringeal boşluktan kaynaklanır ve supraglottik bölge ile glottik alanı geçer. Supraglottik kanserler, glottik ve subglottik kanserlerden daha kötü prognoza sahiptir. Bu durum, supraglottik kanserlerin lenf nodu metastazı riskinin daha yüksek olmasına bağlanabilir. Klinik evre diğer bir belirgin prognostik faktördür. İleri T ve N evreleri, daha yüksek nüks riskine ve kötü prognoza neden olabilir. Uzak metastazlar da kötü sağkalım ile ilişkilidir. Servikal lenf nodu metastazı olan hastalar, lenf nodu metastazı olmayanlara göre daha kötü prognoza sahiptir (18).

2.3.6. Tanı ve Tarama

Uygulanacak tedavi yönteminin seçiminde ve tümör evrelemesinde; iyi bir öykü alınması, fizik muayene yapılması ve görüntüleme yöntemleri ile desteklenmesi gereklidir. Larinks kanserli olguların erken dönemde tanınması fonksiyonel cerrahi tedavi şansını artırmaktadır. Görüntüleme çalışmaları, invazyon derecesini ve dolayısıyla klinik evreyi belirler; bununla birlikte, görüntüleme bazen yüzeysel mukozal lezyonları saptamaz. Endoskopik bulgular erken tanı açısından önemlidir; endoskopi, larinksin yüzeyel mukozasındaki patolojik değişiklikleri tanımlar (20).

Larinks tümörlerinde tanı; klinik bulgu ve semptomların değerlendirilmesi, direkt ve endoskopik muayene, görüntüleme ve histopatolojik bulguların incelenmesiyle konmaktadır. Ses kısıklığı, boğaz ağrısı, nefes darlığı, yutma güçlüğü ve boğazda şişlik hissi gibi belirtiler görülebilir.

Gırtlak ve mukozal yüzeyleri gözlemlemek için larinks muayenesine indirekt laringoskopi ile başlanmalıdır (12). Bu muayene lezyonun yeri, uzandığı bölgeler ve kord hareketleri hakkında bilgilenmemize yardımcı olur. Genel anestezi altında yapılan direkt laringoskopi ameliyat öncesi evreleme için gereklidir ve biyopsi alma imkanı sağlar. Endoskopik inceleme ve biyopsi ile kesin tanı sağlanmakla beraber, genel olarak larinks tümörlerinde kıkırdak invazyonunu, submukozal yayılımı, subglottik uzanımı, derin doku invazyonunu ve lenf nodu metastazlarını saptamak için görüntüleme yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (20). Tanı konulduktan sonra ayrıntılı klinik görüntüleme gereklidir. Yaygın görüntüleme teknikleri arasında bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) taraması bulunur (18).

2.3.7. Tedavi / Yönetim

Larinks kanserlerinin tedavisinde, günümüzde cerrahi ve radyoterapi olmak üzere geçerli iki ana tedavi yöntemi mevcuttur. Larinks malignitelerinde optimal tedavi şekli tartışma konusudur. Erken evre tümörlerde (Evre I-II) cerrahi ya da radyoterapi tek başına kullanılabilir. İleri evre tümörlerde genellikle kombine tedaviler uygulanır. Kemoterapi daha çok kombine tedavi planı içinde ya da palyatif tedavide yer alır. Her tedavi yönteminin avantaj ve dezavantajları vardır. Hekimin, hasta için en uygun tedaviyi planlaması gerekmektedir. Larinksteki tümörün yeri, yayılımı, evresi, boyun metastazlarının varlığı, hastanın genel durumu hangi tedaviyle en çok kür şansının olacağı ve larinks fonksiyonlarının ne kadar korunacağı, hastanın ve hekimin tercihi, tedavi seçimi konusunda önemli parametrelerdir (21).

İdeal yaklaşım şekli, Kulak Burun Boğaz, Radyasyon Onkolojisi, Medikal Onkoloji, Radyoloji ve Patoloji uzmanlarının katılımıyla, multidisipliner olarak her hastanın ayrı olarak değerlendirilmesidir. Tedavi yönteminin belirlenmesi, tedavi seçenekleri hastaya sunulması ve nihai kararın hastaya bırakılması şeklinde bir yaklaşım doğru bir yaklaşımdır.

a. Larinks Malignitelerinde Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavide primer tümörün rezeksiyonu (larinjektomiler) ile birlikte bölgesel lenf nodlarının eksizyonun (boyun diseksiyonları) yapılması esastır. Erken evre glottik kanserlerde lenf

nodu diseksiyonu gerekmez. Baş boyun kanserlerinde genel kural olarak gizli metastaz riski % 20'den fazlaysa boyunun elektif tedavisi önerilir.

b. Larinks Malignitelerinde Kemoterapi / Radyoterapi

Larinks kanserlerinde kemoterapi tek başına küratif değildir. Kemoterapi neoadjuvan (indüksiyon), adjuvan (cerrahi ve/veya Radyoterapi sonrası) ve konkomitan (eşzamanlı radyoterapi ile birlikte) olarak tedavide kullanılmaktadır.

Eşzamanlı primer kemoradyoterapi, cerrahi yapılamayacak ya da önerilen cerrahiyi kabul etmeyen hastalarda uygulanan organ koruyucu bir tedavi seçeneğidir (18).

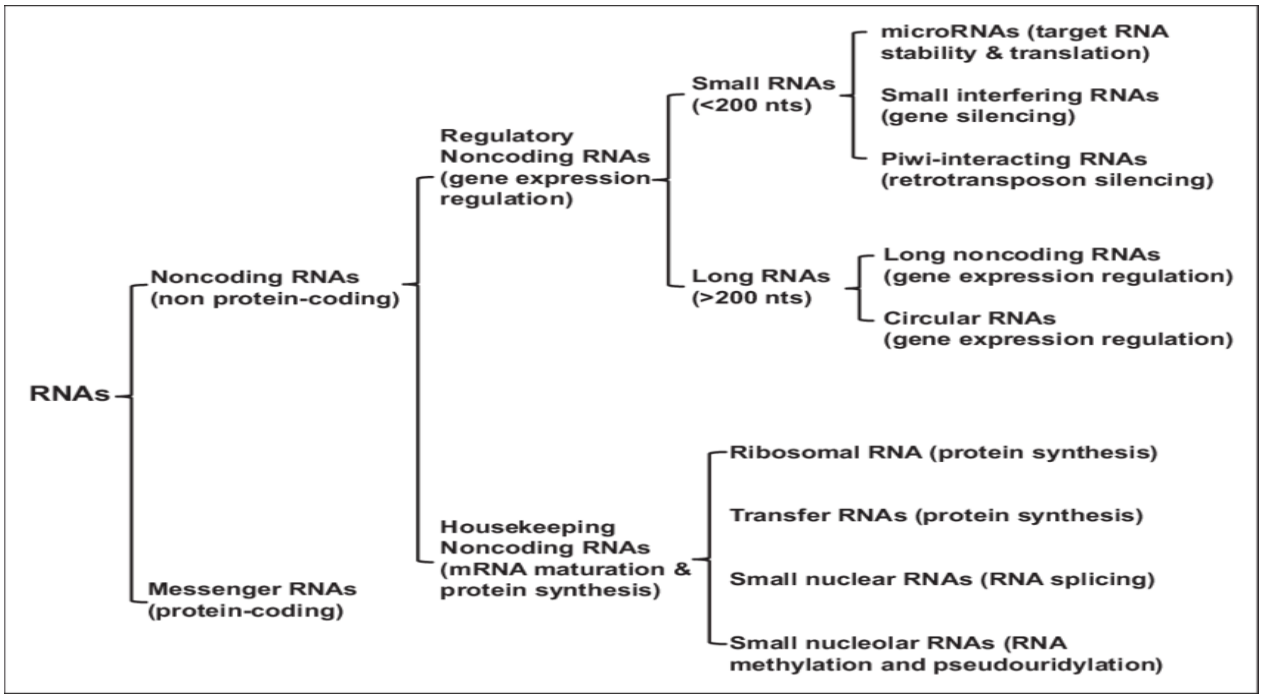
2.3.8. Kanser İlacı Direncinde RNA'lar

Kanser tedavisinde sistemik veya lokal kemoterapi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, intirinsik ve edinilmiş ilaç direnci, kanser tedavilerinin etkinliğini azaltır. Anti-kanser ilaç direncinin altında yatan mekanizmaları anlamada kayda değer ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen, birçok soru hala cevapsız kalmaktadır. Kanser hücreleri, kemoterapiden etkili bir şekilde kaçmak için farklı mekanizmalar kullanır. Bunlar, glutatyon transferaz ve topoizomeraz II'nin anormal ekspresyonu, suda çözünür ilaçların alımının azalması, DNA hasar onarımının artması, ilaç metabolizmasının artması, apoptozun azalması ve kemoterapötik ilaçların artan enerjiye bağımlı akışını içerir ve bunların tümü kanser terapötiklerinin etkilerini azaltır. Son yıllarda, gen fonksiyonunun mutasyona uğramadan düzenlenmesinda bir takım ncRNA'ların rolü ortaya konmuştur (22).

Modern tıpta kemoterapi, radyoterapi ve moleküler hedefli tedavide büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen hastaların prognozu halen iyi değildir. İlerlemiş LSCC'li hastaların genel sağkalım oranını iyileştirmek için, LSCC'de potansiyel kemoterapi direnci mekanizmasını ortaya çıkarmak ve hedefe yönelik tedavi için yeni biyobelirteçler bulmak önemlidir. LncRNA'lar, miRNA'lar ve mRNA'lardan oluşan düzenleyici ağ, tümör oluşumu ve ilerlemesi sürecinde yer alan moleküler biyolojik mekanizmaların araştırılmasında büyük ilgi görmüştür (22).

2.4. Kodlamayan RNA’lar (ncRNA)

Toplam genom dizisinin yaklaşık %2'sini oluşturan yaklaşık 20.000 protein kodlayan gen vardır; yine de genlerin en az %90'ı aktif olarak ncRNA'ya kopyalanır. NcRNA, protein işlevine sahip olmayan bir RNA türüdür (23). NcRNA'lar, ribozomal RNA'ları (rRNA'lar), kısa ncRNA'ları, dairesel RNA'ları (circRNA'lar), psödogenleri ve birçok lncRNA'ları içerir (5). Genlerin %80-90'ı aktif olarak kodlanmasına rağmen, insan genomunun sadece yaklaşık %2'si aktif olarak proteinleri kodlar (24). Kanser gelişimi, insan genomunun protein kodlayan bölgeleriyle bağlantılıdır; bununla birlikte, insan genomunun kodlamayan bölgeleri de kanserde disregüledir. Genomun büyük çoğunluğu, basit tekrarlayan diziler, transpozonlar ve psödogenlerin varlığı nedeniyle önceleri “Önemsiz DNA” olarak görülmekteydi (25). NcRNA'lar ise genellikle hiçbir işlevi olmayan yalnızca ara ürünler olarak kabul görmekteydi. Fakat moleküler biyolojideki gelişmeler, bu bilgilerin doğru olmadığını göstermiştir. Gen ekspresyonu sadece proteinler tarafından değil, aynı zamanda ncRNA'lar tarafından da düzenlendiği gösterilmiştir (26).



Şekil 2. RNA ‘ların sınıflandırılması

Dizileme teknolojisindeki son atılımlar, fonksiyonel genomik elementlerin daha geniş bir ölçekte karakterizasyonunu sağlayarak kanser biyolojisi alanında önemli bir gelişmeleri tetikledi. ENCODE (DNA Element Ansiklopedisi) ve FANTOM projesi, insan genomunun fonksiyonel öğelerini tanımlamak ve kataloglamak için yüksek verimli yöntemleri kullanarak genomun işlevsel elemanlarını şifrelemeyi amaçlamaktadır (24). RNA transkripsiyon bölgeleri, protein kodlama bölgeleri, transkripsiyon faktörleri, kromatin yapısı ve DNA metilasyonu arasındaki etkileşimler ile insan genomunun fonksiyonu hakkındaki önemli özellikler yorumlanmıştır. Araştırmalar, miRNA'lar, circRNA'lar ve lncRNA'lar dahil olmak üzere çok sayıda kodlamayan RNA'nın da transkribe edildiğini göstermektedir. Çeşitli ncRNA'ların önemli biyolojik süreçlerde anahtar roller oynadığı gösterilmiştir ve bunların deregülasyonları kanser dahil olmak üzere farklı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. NcRNA'lar, rRNA'lar, kısa ncRNA'lar ve uzun ncRNA'lar olarak kategorize edilebilen çeşitli RNA türlerini içerir (Şekil 2). Kısa ncRNA'lar miRNA'lar, küçük interferans RNA'lardan (siRNA), küçük nükleolar RNA'lardan (snoRNA), rRNA (Ribozomal RNA)'lardan, taşıyıcı RNA'lardan (tRNA) ve Piwi etkileşimli RNA'lardan (piRNA'lar) oluşur (24).

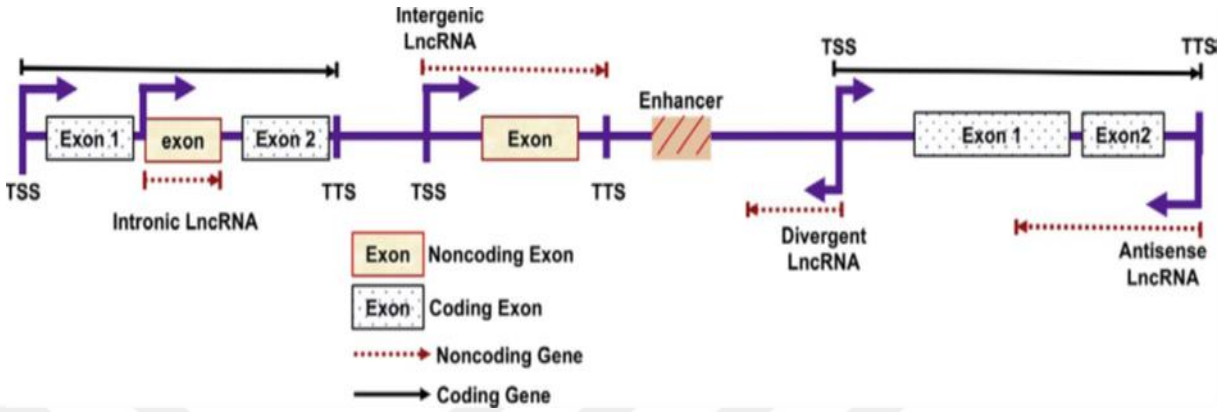
2.4.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar (LncRNA)

Biyogenezi ve Sınıflandırılması

LncRNA'lar, 200 nukleotidden daha uzun RNA molekülleridir, ancak protein kodlamazlar; sitozolik veya nükleer fraksiyonlarda yer alabilir (5). LncRNA'ların genel olarak %85'inin nükleusda, kalan %15'inin de sitoplazmada yer aldığı belirlenmiştir (26). ENCODE projesi temelinde, insan genomunun 28.000'den fazla farklı lncRNA'yı kodladığı tahmin edilmektedir, çoğu hala keşfedilmektedir. LncRNA genleri de protein kodlayan genler gibi RNA polimeraz tarafından transkribe edilir ve lncRNA'lar mRNA'lar gibi açık okuma çerçevesine (ing. "open reading frame"-AOC, bazı istisnalar hariç), 3'-translasyona uğramayan bölgeye (ing. "untranslated region"-UTR) ve translasyon sonlanma bölgelerine sahip değilldir. LncRNA biyogenezi, mRNA'nınkine benzer şekildedir. LncRNA'lar da poliadenile edilebilir ve alternatif bölünme, poliadenilasyon ve kesim (ing.splicing) ile ortaya çıkmaktadır. Aynı lokustan farklı izoformlar oluşabilmektedir. LncRNA'ların gen ekspresyonu mRNA'lara göre daha azdır ve ayrıca lncRNA genleri protein kodlayan genlere göre türler arasında evrimsel olarak daha az korunmaktadır.

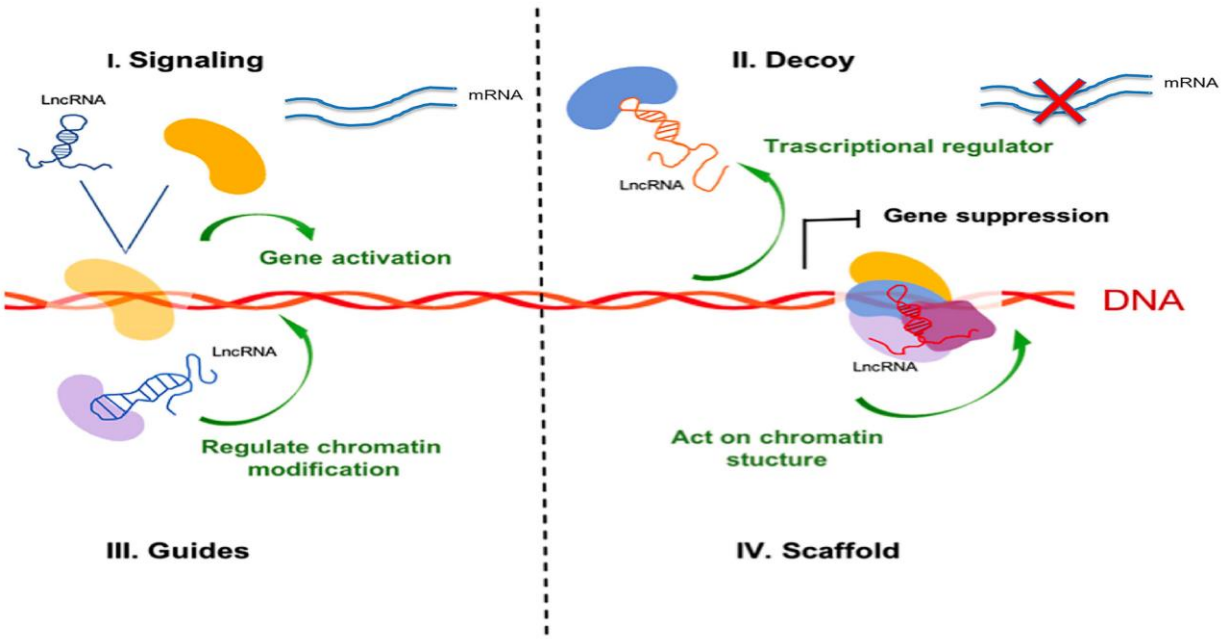
LncRNA’lar kromatin yeniden düzenlemesi, histon modifikasyonları, alternatif splicing ile genlerin modifikasyonu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (28). Spesifik genomik lokuslarda heterokromatin oluşumunu indüklemek için kromatin yeniden modelleme kompleksleri ile etkileşime girerek gen ekspresyonunun azalmasına neden olur. Ayrıca, lncRNA'lar, RNA bağlayıcı proteinler ve transkripsiyonel faktörlerin ortak aktivatörleri ile etkileşime girerek veya hedef genlerinin ana promotörlerini düzenleyerek transkripsiyonu modüle eder. Mekanik olarak, lncRNA'lar düzenleyici etkilerini DNA, mRNA'lar, ncRNA'lar ve proteinler ile iletişim yoluyla gösterir ve sinyaller, tuzaklar, yapı iskeleleri ve kanserle ilgili çeşitli hücresel süreçlerde kılavuz gibi farklı fonksiyonel moleküller olarak hizmet eder (5). Çekirdekte, lncRNA'lar sırasıyla transkripsiyonel kompleksi ve kromatin düzeneğini yönlendirerek genomun transkripsiyonel veya epigenetik düzenleyicileri olarak işlev görebilir. Bununla birlikte, sitoplazmada, lncRNA'lar allosterik düzenleme, hücre sinyalini kontrol etme, transkripsiyon sonrası mRNA işleme ve translasyon sonrası modifikasyonlar yaparak işlev görür. Sitoplazmik kodlamayan lncRNA’lar, miRNA'lar gibi diğer transkriptler veya proteinler için sünger *(ing.sponge*) gibi davranabilir, küçük peptitlerin sentezi için kalıp olarak işlev görebilir, mRNA degredasyonunu sağlayabilir ve translasyonunu düzenleyebilir (28).

LncRNA'lar genomik lokalizasyonları, etki modları ve işlevleri temelinde geniş bir şekilde sınıflandırılır (Şekil 3). LncRNA genlerinin genomik lokalizasyonları, intergenik, intronik, güçlendirici (ing.enhancer), çift yönlü, sens (kodlayan, 5→3’) veya antisens (kalıp,3’→5’) yönelimli olabilmektedir (29). İntronik lncRNA'lar, protein kodlayan genlerin intronlarından kaynaklanır; intergenik lncRNA'lar (lincRNA), iki protein kodlayan gen arasındaki bölgeden kaynaklanır; enhancer lncRNA'lar (elncRNA), enhancer bölgelerden kaynaklanır; çift yönlü lncRNA'lar, karşı ipliğin bir kodlama transkripti civarında lokalizedir; sense lncRNA'lar, DNA'nın sense dizisindeki farklı protein kodlayan genlerin bir veya daha fazla intronu ve ekzonu ile örtüşür; antisens transkriptleri, DNA'nın antisens zincirlerinden kaynaklanır ve onlar, sens zincirindeki protein kodlama dizilerini tamamlayıcı olabilir veya olmayabilir. Çift yönlü lncRNA’lar, birbirlerine zıt yönde transkribe olmaktadır ve bunların protein kodlayanlara benzer işlevlere sahip oldukları gösterilmiştir (30).



Şekil 3. Genomdaki konuma göre lncRNA genlerinin sınıflandırılması

İşlevsel olarak, lncRNA'lar sinyal, tuzak, kılavuz ve iskele lncRNA'ları olarak sınıflandırılır (Şekil 4). Sinyalleme lncRNA'ları, spesifik sinyal yollarıyla ilişkilidir ve ekspresyonları, sinyal sürecindeki rollerinden (doğrudan/dolaylı) bağımsız olarak aktif bir sinyal olayını gösterir. Bunlar, gen ve allele özgü ekspresyonun modulasyonunda görev almaktadır. Böyle eksprese edilen lncRNA'lar, kromatin modifiye edici enzimler (örneğin, histon metiltransferazlar) ile etkileşebilir, transkripsiyonel olarak engeller veya heterokromatin oluşturarak hedef genlerin susmasını sağlayabilirler (5). X-inaktif spesifik transkript *(XIST)* ekspresyonu ile kadınlarda X inaktivasyonu, buna bir örnektir.



Şekil 4. Etki mekanizmasına göre lncRNA'nın sınıflandırılması

Tuzak lncRNA'lar, transkripsiyon faktörleri ve represörler için moleküler havuzlar gibi davranır. Gen aktivasyonunu veya susturulmasını kolaylaştıran hedef gen promotörlerine bağlanmadan transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girer ve titre eder. Bu lncRNA lar hedeflenen proteinlerin ekspresyonlarını azaltarak regüle (ing. “downregulation”) etmek icin negatif düzenleyiciler olarak görev yapmaktadır. Tuzak fonksiyonu gösteren bu lncRNA’lar, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin genomik DNA’dan ayrılmasını sağlayan bir yem gibi hareket ederek hedef genleri dolaylı olarak düzenleyebilmektedir (31). CeRNA’ lar tuzak (ing. decoy) lncRNA olarak örnek verilebilir. Tuzak lncRNA'ların örnekleri arasında *GAS5* (growth arrest specific 5), *TERRA* (telomeric repeat-containing RNA) bulunur (32).

Kılavuz lncRNA'lar düzenleyici veya enzimatik olarak aktif protein komplekslerine bağlanır ve bunları belirli hedef gen promotörlerine veya gen ifadelerini düzenleyen genomik lokuslara yönlendirir. Bu genlerin ifadesini yakınındaki komşu genler için *“cis”*, uzaktaki genler icin *“trans”* düzenleme ile değiştirebilmektedir. Kılavuz lncRNA'ların örnekleri arasında *AIR, CCND1* (siklin D promotörü ile ilişkili lncRNA), *lincRNAp21* yer alır (24).

Ek olarak bazı lncRNA'lar ise ribonükleoprotein kompleksleri oluşturmak icin çoklu proteinleri bir araya getiren iskeleler olarak işlev görmektedir. İskele lncRNA'lar, ilgili moleküler bileşenler (proteinler veya RNA) monte edilebileceği bir platform gibi yapısal bir role sahiptir. LncRNA'lar, ribonükleoprotein karmaşımlarını oluşturmak için birçok proteini bir araya getirebilir. İskele lncRNA'lar, spesifik genomik lokusa veya kromozomal dinamikleri düzenleyen hedef gen promotörüne yönlendirilir. İskele lncRNA'larının örnekleri *HOTAIR (Hox Transkript antisens RNA)* ve *TERC*'dir (24).

LncRNA'ların Hastalıklarla İlişkisi

1990'ların başında *H19* ve *XIST* gibi birkaç lncRNA tanımlanmış ve kodlamadan bağımsız fonksiyon gösterdiklerıı karakterize edilmiştir. Ancak lncRNA'ların biyolojik önemi, on yıl sonra yavaş yavaş tanınmaya başlanmıştır. *XIST*, *H19*, *HOTAIR*, *MALAT1* (Metastaz ilişkili akciğer adenokarsinom Transkript 1) ve *NEAT1*(Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript1) gibi çeşitli lncRNAs, iyi çalışılmış ve X inaktivasyonu, imprinting, gelişme, epigenetik modifikasyonlar, mRNA işleme ve nükleer mimarinin organizasyonu gibi çeşitli süreçlerde kilit düzenleyici roller oynadığı artık bilinmektedir (33, 27). Son zamanlarda, ceRNA düzenlemesinde miRNA tuzak rolleri de önem kazanmıştır (24).

lncRNA'nın çeşitli hastalık süreçlerinde rol oynadığı gösterilmiştir. Örneğin, taurin-up regüleli 1 (*TUG1*), *NEAT1* ve *MEG3* (maternal olarak eksprese edilen 3), nörodejeneratif bozukluklarda deregüle olmuştur. *H19, XIST* ve lncRNA-*LALR1* (karaciğer rejenerasyonu 1 ile ilişkili uzun kodlamayan RNA) karaciğer patofizyolojisinde not edilmiştir (28). Prostat kanseri, meme kanseri, mide kanseri, karaciğer kanseri ve glioma dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde lncRNA'ların önemine de değinilmiştir (33). Raporlar, lncRNA'ların çeşitli kanserlerde tümör baskılayıcı veya onkogen olarak işlev görebileceğini ve tümör hücresi proliferasyonu, göçü ve metastazında rol oynadığını ortaya koymuştur. Fakat ayrıntılı mekanizmaları hala belirsizdir (33).

HOTAIR, *MALAT1, GAS5*, *PC3* ve *H19* gibi birkaç lncRNA'nın, çeşitli malign tümörlerde anormal ekspresyonu olduğu ve karsinogenez, metastaz ve prognoz ile ilişkilendirildiği bildirilmektedir. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom için lncRNA'lar üzerine araştırmalar sınırlı

olsa da, , ağız kanserlerinde *HOTAIR*, *NEAT1*, *UCA1* ve *MALAT1* gibi lncRNA'ların farklı şekilde eksprese edildiği bildirilmiştir (34).

Kanserde lncRNA'lar, miRNA'lara benzer şekilde delesyon veya duplikasyona uğrayabilir. Örneğin, 8q24.21 kromozomal bölgesinin ekstra kopyalarının birçok insan kanserinde yaygın olduğu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bölge sadece iyi bilinen onkogen *MYC*'yi değil aynı zamanda lncRNA *PVT1*'i de içerir. *MYC*'nin kopya sayısı değişikliğinin, MYC proteinini stabilize eden ve aktivitesini güçlendiren *PVT1* kopyalarının artışıyla korele olduğu gösterilmiştir (35).

Kopya sayısı değişiklikleri ve mutasyonlar, lncRNA'ların transkripsiyonel düzenlemesini değiştirebilir. Ayrıca, spesifik tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), spesifik hastalık riskinin artması veya azalması ile ilişkilendirilebilir. lncRNA *HULC*'deki rs7763881 varyantının, Hepatit B virüsü ile ilişkili hepatosellüler karsinom geliştirme riskinin azalmasına katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (22).

Kansere bağlı diğer bir önemli lncRNA, birçok kanser tipinde (akciğer, meme, kolon ve hepatokarsinoma) gösterilen *MALAT 1*' dir (5). Normalde, MALAT1, nükleer noktalarda mRNA splicing faktörleri ile etkileşime girer ve alternatif splicinge katılır. Bazı meme kanserleri, *MALAT1*'in splicing faktörü bağlanma bölgelerinde mutasyon vardır ve bu da splicing düzeninde bir değişikliğe neden olmaktadır (5).

2.4.2. MikroRNA' lar (miRNA'lar)

Tanım

Lee ve çalışma arkadasları tarafından 1993 yılında *Victor Ambros* laboratuarında yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans'ta lin-4* olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe etmesiyle rapor edilmiştir (36). Fakat ilk miRNA tanımı 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. 2000 yılında *Reinhart* ve arkadaşları tarafından yine *C.elegans'*da 22 nükleotid uzunluğunda*, let-7* olarak adlandırılan, bu organizmaların gelişim kaderini düzenleyen küçük RNA molekülleri olarak keşfedildilmiştir (37). Daha sonraki yıllarda *let-4* ve *let-7*'ye benzeyen birçok küçük RNA

molekülleri keşfedildi ve sadece gelişim aşamalarını değil, apoptoz, çoğalma ve farklılaşma gibi birçok hücre fonksiyonunu da düzenlediği belirlendi. 20 yıldan uzun bir süre önce ilk miRNA'nın keşfi moleküler biyolojide yeni bir çağın başlangıcı oldu. Şu anda insanlarda keşfedilen 2000'den fazla miRNA var ve bunların genomdaki genlerin üçte birini düzenlediğine inanılıyor. Biyogenezlerinde, ekspresyonlarında ve hedef mRNA'ya bağlanmalarında yer alan proteinlerdeki herhangi bir düzensizliğin hücre fizyolojisi üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmektedir.

MiRNA' lar yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden transkript olan fakat protein kodlamayan, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda küçük RNA molekülleridir (38). Bu protein kodlamayan RNA molekülleri kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA'lara miRNA yanıt elemanlarına (MRE) ile bağlanıp translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı ile post-transkripsiyonel gen ekspresyonunun regülasyonunu gerçekleştirirler (37). MiRNA'lar bu yolağı kullanarak hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması veya hücre ölümü gibi önemli süreçlerde rol oynarlar. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde değişikliğe uğramış miRNA ekspresyonu araştırılmıştır. Kanserin başlamasında ve ilerlemesinde, miRNA'lar hedefledikleri genin karakterine göre tümör süpresör veya onkogen gibi davranmaktadır.

MiRNA Biyogenezi

MiRNA biyogenezi, RNA polimeraz II/III transkriptlerinin transkripsiyon sonrası veya birlikte transkripsiyonel olarak işlenmesiyle başlar (39). Halihazırda tanımlanmış tüm miRNA'ların yaklaşık yarısı intrageniktir ve çoğunlukla intronlardan ve nispeten az sayıda protein kodlayan gen ekzonundan işlenirken, geri kalanı intergeniktir. Bir konakçı genden bağımsız olarak kopyalanır ve kendi promotörleri tarafından düzenlenir. MiRNA genleri, insan Y kromozomu hariç tüm kromozomlarda haritalanmıştır. MiRNA'nın biyogenezi, kanonik ve kanonik olmayan yollar olarak sınıflandırılır.

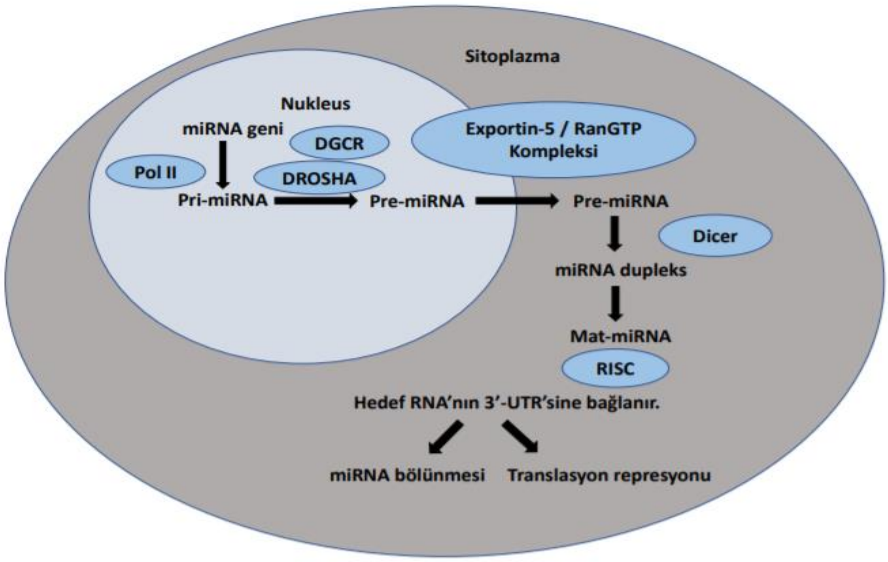
MiRNA'lar, birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonucunda meydana gelir. İlk adımda miRNA genlerinden primer miRNA (primiRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda primiRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür. Üçüncü ve son adımda olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir.

Kanonik biyosentetik yolda, bir birincil miRNA (pri-miRNA) RNA polimeraz II enzimi tarafından hairpin (saç tokası) yapısında genomik DNA'dan kopyalanır (Şekil 5). Elde edilen transkript, 5' ucunda özel olarak modifiye edilmiş bir nükleotit (CAP) ile kapatılır , çoklu adenosinlerle (bir poli(A) kuyruğu) poliadenile edilir, ve birleştirilir. Daha sonra çift sarmallı RNA'ya özgü endoribonükleaz (DROSHA) enzimleri ve kofaktörü DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8 (DGCR8) dahil olmak üzere bir mikroişlemci kompleksi tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür (36). Pre-miRNA'lar daha sonra DICER enzimi ve protein kinaz R'nin protein aktivatörü (PACT) veya Trans-aktivasyon yanıtı RNA bağlayıcı protein (TRBP) gibi ko-faktörler tarafından daha fazla işlenmek üzere exportin 5 (XPO5)/RanGTP kompleksi ile sitoplazmaya aktarılır (37). Sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz miRNA'nın terminal loop'unu çıkarmasıyla 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksi oluşur (40). Bu çift-iplikli RNA molekülünün bir ipliği (-5p veya -3p) yıkılır, diğeri ise RISC (RNA kaynaklı susturma kompleksi) oluşturmak üzere Argonaute protein kompleksiyle birleşir. Çoğunlukla dupleks miRNA'nın bir kısmı (yolcu zincir) bozulurken, diğer zincir (kılavuz zincir) olgun miRNA olarak Ago'ya bağlı kalır. Hangi zincirin ''kılavuz'' olacağı ise dubleks miRNA'nın iki ucunun termodinamik stabilitesi ile belirlenir. Ayrıca, bazı miRNA'larda iki zincirin benzer stabiliteye sahip olduğu durumlarda her iki zincirin de seçilebileceği olasıdır.

RISC tek-iplikli olgun miRNA'yı, mRNA'nın 3' UTR' sine bağlanmaya yönlendirerek eşleşme düzeyine göre mRNA'nın ya yıkılmasına ya da translasyonun engellenmesine neden olur. RISC/miRNA kompleksi tarafından mRNA'nın tanınması genelde miRNA'nın 5' ucundaki 2-8 nükleotidin yer aldığı bir "tohum dizisi (ing. seed sequence)" bölgesi sayesindedir (34).

Ek olarak, fonksiyonel miRNA'ların üretimine yol açan kanonik olmayan miRNA biyogenez yolları da vardır. Bunlar, mRNA öncesi ekleme yoluyla üretilen mirtronları ve küçük nükleolar RNA (snoRNA'lar) öncüllerinden üretilen miRNA'ları içerir. Son zamanlarda, miRNA biyogenezi için birkaç alternatif yol açıklanmıştır. Birkaç farklı RNA sınıfı, yapısal ve işlevsel olarak miRNA'lara benzer; bununla birlikte, kanonik biyogenez yolundaki bir veya daha fazla adımı atlarlar. Drosha ve DGCR8, kanonik miRNA'ları işlemek için gereklidir ve bunların yokluğunda kanonik olmayan miRNA'lar oluşturulabilir (41). Kanonik olmayan miRNA'ların biyogenezinde, Drosha'dan bağımsız ve Dicer'den bağımsız yollar dahil olmak üzere birkaç yol vardır. İyi tanınan kanonik olmayan bir

yolda (mirtron), bazı dalları ayrılmış intronlar, miRNA öncesi saç tokaları olarak işlev görebilir (41). Drosha/DGCR8'den bağımsız olan mirtron yolunda, intronlar spliceosome tarafından kement mirtronlarına işlenir ve daha sonra kement ayırma enzimi tarafından dalları ayrılır, ardından pre-miRNA saç tokalarına katlanırlar. Daha sonra, bu pre-miRNA benzeri form, kanonik yollara devam etmek için XPO5 tarafından sitoplazmaya aktarılır.



Şekil 5. miRNA transkripsiyonundan hedef mRNA'nın baskılanmasına kadar olan süreç

Biyolojik Görevleri

Bugüne kadar yapılan çoğu çalışma, miRNA'ların, translasyonel baskılamayı ve mRNA deadenilasyonunu ve 5' kapak yapısının açılmasını indüklemek için hedef mRNA'larının 3' UTR'sinde spesifik bir diziye bağlandıları gösterilmiştir (40). MiRNA bağlanma bölgeleri, 5' UTR ve kodlama sekansı dahil olmak üzere diğer mRNA bölgelerinde ve ayrıca promotör bölgelerinde de tespit edilmiştir. MiRNA'ların 5' UTR'ye ve kodlama bölgelerine bağlanması gen ekspresyonu

üzerinde susturucu etki yaparken, promotör bölge ile miRNA etkileşiminin transkripsiyonu indüklediği rapor edilmiştir.

MRNA'nın kaderi, mRNA molekülü ile miRNA'nın 5' ucundaki 'tohum' bölgesi arasındaki baz eşleştirme tamamlayıcılığının derecesine bağlıdır. MikroRNA-mRNA bağlanma bölgesi kısadır (6-8 baz çifti) ve bu nedenle her bir mikroRNA, birden fazla farklı mRNA'yı hedefleme potansiyeline sahiptir (42). MiRNA biyolojisinin bir diğer önemli özelliği, tek bir miRNA'nın yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilmesi ve böylece tüm protein ağlarını düzenlemesidir. Tersine, bir mRNA birkaç miRNA tarafından hedeflenebilmektedir.

MiRISC (miRNA ilişkili RNA kaynaklı susturma kompleksi) kılavuz dizi ve AGO'dan oluşur. RISC'in temel bir bileşeni olarak argonaute (AGO), miRNA aracılı gen ekspresyon düzenlemesinde merkezi bir rol oynar. MiRISC'in hedef özgüllüğü, MRE'ler olarak adlandırılan hedef mRNA üzerindeki tamamlayıcı dizilerle etkileşiminden kaynaklanmaktadır (42). MRE'nin tamamlayıcılık derecesi, hedef mRNA'nın AGO2'ye bağlı parçalanmasını veya miRISC aracılı translasyon inhibisyonunu ve hedef mRNA bozulmasını belirler (42). Tamamen tamamlayıcı bir miRNA MRE etkileşimi AGO2 endonükleaz aktivitesini indükler ve mRNA parçalanmasini hedefler. Bununla birlikte, bu etkileşim AGO ile miRNA'nın 3' ucu arasındaki ilişkiyi bozarak bozunmasını teşvik eder.

RISC kompleksinin mRNA'lara yönelik etkisinin özgüllüğü, büyük ölçüde mRNA üzerindeki MRE ile miRNA zincirindeki tohum dizisi arasındaki tamamlayıcılığa bağlıdır. Ek olarak, MRE ve tohum dizileri arasındaki tamamlayıcılık derecesi genellikle mRNA'nın bozulup bozulmayacağını veya translasyonun bloke edilip edilmeyeceğini belirler.

MiRNA ve Kanser

Normal fizyolojik koşullarda hücre proliferasyonu, hücre metabolizması ve protein sentezi gibi hücresel süreçlerin uygun şekilde düzenlenmesini sürdürmek için miRNA'lar gerektiğinden, deregülasyonları tümör gelişimine, metastazına, ilerlemesine ve progresyonuna katkıda bulunan hücrelerin anormal büyümesine ve biyosentezine yol açar (43).

Geçtiğimiz on yıllarda, miRNA'ların insan kanserlerinde kapsamlı bir şekilde deregüle edildiği ve tümör başlangıcı, büyümesi ve metastazındaki önemli rollerini vurguladığı

gösterilmiştir. Spesifik miRNA'ların kanserdeki rolü ilk olarak Calin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ortaya çıkarılmıştır. Kronik lenfositik lösemi hastalarından alınan örneklerin çoğunda *miR-15* ve *miR-16* genomik lokuslarının delesyona uğradığını bulmuşlar ve bu iki miRNA'nın bir tümör süpresör aktiviteye sahip olduğu sonucuna varmışlardır. O zamandan beri, çok sayıda çalışma, çeşitli kanser türlerinde miRNA'nın değiştirilmiş ekspresyonlarını bildirmiştir ve bu miRNA'ların kanserdeki etkisi, hayvan modellerinde ve insan kanserindeki hücre hatlarında işlev kaybı ve işlev kazanımı deneyleriyle araştırılmıştır. Örneğin: Meme, kolon ve akciğer kanserlerinde *let-7* aşağı regüle edilir ve *let-7*'nin *RAS* veya *MYC*'yi baskılayarak tümör gelişimini önlemek için bir onkosupresör miRNA gibi davrandığı kanıtlanmıştır (44). *Tp53*'e yanıt veren bir *miR-34* ailesine ait olan *miR-34a*'nın da çeşitli kanser türlerinde azaldığı gözlenmiştir (45). Nazofaringeal karsinom hastalarında *miRNA-331-3p*'nin ekspresyon seviyesi azalmıştır ve aşırı ekspresyonu apoptozu indükleyerek hücre proliferasyonunun baskılanmasına neden olur. Bu tümör baskılayıcı miRNA'ların aksine, bazı miRNA'ların up-regüle ve onkojenik rolleri olduğu bilinmektedir. Bunlar, çeşitli solid tümörlerde ve hematolojik malignitelerde *miR-21*'i, B hücreli lenfoma ve meme kanserinde *miR-155* ve *miR-17~19b* ve akciğer kanseri ve metastatik meme karsinomunda *miR-106b-5p* gibi miRNA'lar onkomir özelliği taşımaktadır (39).

2.5. Kompetif Endojen RNA (CERNA) Ağı

Son yıllarda, birçok makale, kodlamayan RNA ile mRNA arasındaki etkileşimi, ceRNA hipotezine dayalı olarak incelemiştir (24). Genel olarak, lncRNA, miRNA, circRNA ve mRNA olmak üzere ceRNA düzenleyici ağlarda çeşitli RNA'lar yer alır. MiRNA, mRNA'nın translasyonunu inhibe etmek için mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesine bağlanabilir. CeRNA hipotezi, lncRNA'nın MRE'ler aracılığıyla miRNA'lara rekabetçi bir şekilde bağlandığını ve miRNA'lar tarafından mRNA translasyonunun down-regülasyonunu engellediğini öne sürmektedir (35).

RNA alanındaki geleneksel görüş, uzunluğu ~23 nt olan kısa endojen RNA miRNA'ların, kısmi tamamlayıcılık ile protein kodlayan mRNA'lardaki MRE'ler ile eşleşmesidir (46). Olgun miRNA'lar, miR-RISC kompleksini MRE'lere yönlendirdikten sonra, mRNA destabilizasyonu veya translasyon sonrası baskı aktif olarak tetiklenecek ve bu da gen ekspresyonunun inhibisyonuna yol açacaktır (25). Çoğu miRNA, aynı kökenli mRNA'lar ile kusurlu bir şekilde eşleşir. MRE'ler

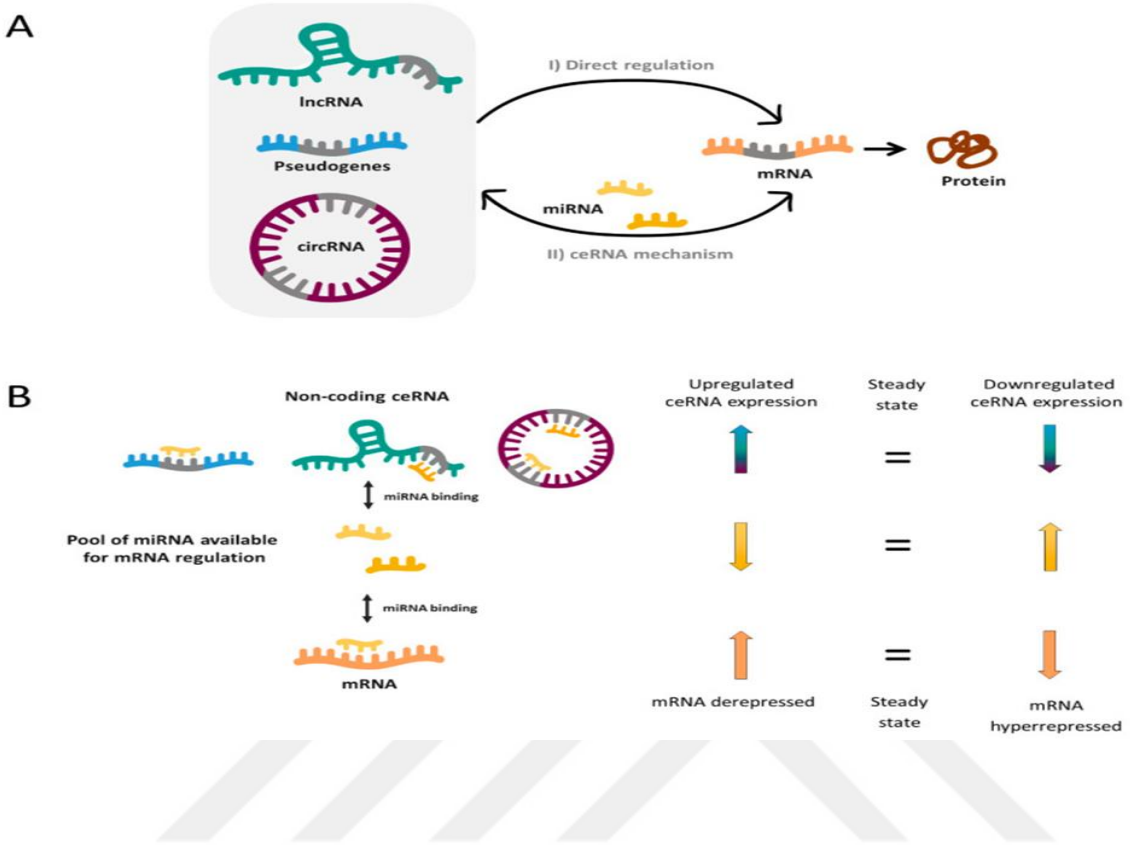
normalde kodlama dizilerinde, özellikle circRNA'lar, mRNA'lar, lncRNA'lar ve kopyalanmış psödogenler gibi çeşitli RNA türlerinin 3'-UTR'lerinde bulunur (24). Her miRNA, çok sayıda MRE'yi hedefleyebilir ve yüzlerce transkripti bastırabilir. Tüm 2-8 nükleotidli mükemmel ve kusurlu 3'UTR eşleşmelerini göz önünde bulundurarak en iyi tahmin, insan protein kodlayan genlerin %60'ından fazlasının miRNA'nın potansiyel hedefleri olduğu ve kanser dahil hastalıklarda miRNA–mRNA etkileşimi olduğu bilinmektedir (47). MiRNA'ların %50'sinin 1-400 mRNA'yı hedeflediği ve bazılarının 1000'e kadar çıktığı tahmin edilmektedir (46). Benzer şekilde, çoğu ceRNA 1 ila 10 MRE içerir ve sonuç olarak, çok sayıda RNA molekülü içeren karmaşık ceRNA ağları kurulur.

MiRNA'lar, 3' UTR'lerinde komplementer dizilere bağlanarak ortak MRE'leri paylaşan çok sayıda hedef transkript düzenleyebilir. CircRNA'lar, lncRNA'lar ve kopyalanmış psödogenler gibi çeşitli ncRNA'lar miRNA'ları süngerlemek için bir ceRNA gibi davranırlar. CeRNA'lar, paylaşılan MRE'ler içeren ve paylaşılan miRNA'lara bağlanma için rekabet ederek miRNA kullanılabilirliğini azaltan endojen transkriptlerdir. lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA düzenleyici ağların rolü, kronik miyeloid lösemi, kardiyovasküler hastalıklar, diyabetik katarakt ve miyokard enfarktüsü gibi farklı hastalıklarda ortaya çıkarılmıştır ve prognozu etkileyebileceği düşünülmüştür (48). MiRNA'lar, lncRNA'lar ve mRNA'lar gibi kanserle ilişkili ceRNA ağlarının kilit elemanlarını bozmak, ağ yapısının stabilitesini ve sağlamlığını bozabilir ve böylece karsinogeneze yol açabilir.

2011'de Salmena ve meslektaşları, mRNA'lar, lncRNA'lar ve diğer kodlamayan RNA'lar havuzunun, doğal miRNA "süngerleri" olarak hareket edebilen ve miRNA'ların işlevini, hedef mRNA üzerindeki MRE'lere rekabetçi şekilde bağlanıp engelleyen, miRNA'larla ortak MRE'leri paylaştığını belirten ceRNA hipotezini sundular (34). Bu teori, lncRNA'ların, miRNA'nın çekirdek tohum dizisine bağlanabilen MRE'ler içerdikleri için, hedef düzenleyici genlerin ekspresyonunu yalnızca doğrudan etkileşimle değil, aynı zamanda miRNA'larla rekabetçi bağlanma yoluyla dolaylı olarak düzenleyebileceği gerçeğine dayanmaktadır (49). Şu anda, ceRNA regülasyon teorisinin, ilgili bazı çalışmalarla kanserin gelişiminde rol oynadığı kanıtlanmıştır. Örneğin, Guo ve ark. lncRNA-*BGL3*'ün *miR-17*, *miR-93*, *miR-20a*, *miR-20b*, *miR-106a* ve *miR-106b* ve *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog) geninin mRNA'sını baskılayan miRNA'ların hedefi olduğunu buldular (34). CeRNA aktivitesi için ilk deneysel kanıt, psödogen *PTENP1*'in, paylaşılan miRNA'lar için rekabet ederek aynı kökenli gen olan *PTEN*'i düzenlemedeki fonksiyonel rolünün

araştırılmasıdır. *PTEN*, çeşitli insan kanserlerinde sıklıkta mutasyona uğrayan önemli bir tümör baskılayıcıdır. PTENP1 3' UTR'nin aşırı ekspresyonu, PTEN ekspresyonunu artırarak kanser hücresi büyümesinin inhibisyonuna yol açmış; *PTENP1'*in yıkılması ise *PTEN1* ekspresyonunu azaltarak kanser hücresi proliferasyonunu hızlandırmıştır (32). Ayrıca, lncRNA'ların ve ceRNA'lar olarak hareket eden circRNA'ların başka örnekleri giderek daha fazla bildirilmektedir. Örneğin, lncRNA *H19*, *miR-138* ve *miR-200a*'nın tuzakları olarak hareket ederek *VIM*, *ZEB1* ve *ZEB2*'nin ekspresyon seviyesini up-regüle etmiş, böylece kolorektal kanserde epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) ve tümör büyümesini teşvik etmiştir (50). Biyoinformatik teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, daha fazla araştırmacı, ceRNA ağlarını incelemek için veri analizi ve madencilik yöntemlerini önemsemiştir (34). Ayrıca miRTarBase, miRDB, TargetScan ve StarBase gibi bazı örnek veritabanları, ceRNA ağlarını incelemek için veri ve faydalı kaynaklar sağlar (34). Kanser Genom Atlası (TCGA) araştırma ekibi, çok sayıda tümör örneğini depolayan çok boyutlu moleküler spektroskopi için geniş kapsamlı bir kaynak yayınlamıştır (47). Bu veri kümeleri ile kanserde bir ceRNA düzenleyici ağ tahmini yapmak muhtemeldir.

Basitleştirilmiş bir şekilde, iki RNA molekülü aynı MRE'yi paylaştığında, potansiyel olarak aynı miRNA havuzu için rekabet ederler. Bu nedenle, bir ceRNA'nın ifadesi yukarı doğru düzenlendiğinde, daha fazla miRNA'yı bağlayacak ve titre edecektir (miRNA süngeri olarak adlandırılan fenomen), mRNA'yı paylaşılan MRE ile bağlamak için daha az miRNA molekülü bırakacaktır. Dolayısıyla, karşılık gelen mRNA dereprese olacaktır. Tersine, biyolojik bir bozukluğun bir sonucu olarak ceRNA seviyeleri düştüğünde, karşılık gelen mRNA, hiperrepresyon nedeniyle aşağı regüle edilecektir (Şekil 6).



Şekil 6. CerRNA mekanizması

Şekil 6’nın açıklaması: A) mRNA'lar transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenlemesi, lncRNA'lar, psödojenleri ve circRNA'lar içeren doğrudan ve dolaylı mekanizmalardan etkilenebilir. (I) Doğrudan mekanizmalar, spesifik RNA-RNA kompleksi aracılığıyla çekirdekteki transkripsiyon hızı üzerinde etkili olan bazı işlemleri ve sitoplazmada mRNA moleküllerinin stabilitesine yardımcı olan diğerlerini içerir. (II) CeRNA mekanizması, miRNA'ların aracılık ettiği çift yönlü bir dolaylı düzenleme mekanizmasıdır. MiRNA'lar lncRNA'ları, psödogenleri, circRNA'ları ve mRNA'ları MRE aracılığıyla bağlar. (B) CeRNA hipotezi. Belirli bir ceRNA (psödogen, lncRNA veya circRNA) ekspresyonunun yukarı regülasyonu, karşılık gelen miRNA'nın hücresel konsantrasyonlarını azaltabilir, bu da aynı MRE'leri (sol oklar) içeren diğer transkriptlerin (mRNA) derepresyonuyla sonuçlanır. Tersine, belirli bir ceRNA'nın aşağı regülasyonu, spesifik miRNA'ların artan konsantrasyonlarına ve dolayısıyla mRNA ekspresyonunun hiperrepresyonuna (sağ oklar) yol açacaktır.

Genel olarak, kanserlerdeki ceRNA'lar fonksiyonel olarak şu şekilde sınıflandırılabilir:

1- Kanser hücresi proliferasyonunu, göçünü ve istilasını teşvik etme/bastırma. Örneğin: *HOTAIR*, over kanseri ve mide kanserinde hücre çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu teşvik etmek için ceRNA olarak işlev görürken, *MEG3* hücre çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu inhibe ederek mide kanseri ilerlemesini kontrol etmek için ceRNA olarak hizmet eder (32).

2- Kanser hücresi Epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) teşvik etmek/bastırmak. *H19*, kolorektal kanser, mesane kanseri ve akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde EMT'yi düzenlemek için onkojenik bir ceRNA olarak bulunmuştur (51).

3- Tümör oluşumunu teşvik etme/ baskılama. lncRNA *RSU1P2*, lncRNA-*PAGBC* ve *LINC01234*'in ceRNA olarak hareket ederek tümör oluşumunu teşvik ettiği, *ZEB2*'nin ise ceRNA mekanizması yoluyla melanomda tümör oluşumunu baskılayabildiği bulunmuştur (32).

4- Kanser ilerlemesini, metastazını veya gelişimini teşvik etmek/bastırmak. Örneğin, lncRNA *TUG1* ve *NEAT1*, sırasıyla kanser progresyonunu ve gelişimini teşvik etmede çok önemli ceRNA'lar olarak tanımlanırken, circRNA *cir-ITCH*, ceRNA olarak işlev görerek mesane kanseri ilerlemesini inhibe edebilir (24).

5- İlaç tedavisine duyarlılığı arttırmak/bastırmak. Örneğin, lncRNA *CASC2*, prostat kanseri hücrelerinin dosetaksele duyarlılığını artırabilir ve lncRNA *TUG1* kolorektal kanserin metotreksat tedavisine direncini artırabilir.

CeRNA hipotezine göre, MRE'leri paylaşan RNA molekülleri, miRNA'lar için doğal tuzaklar olarak hizmet edebilir, böylece miRNA hedef gen ekspresyonunu yukarı regüle edebilir (49). Bununla birlikte, fizyolojik hücresel koşullar altında ceRNA karışmasının (crostalk) gerçekleşip gerçekleşemeyeceği, ceRNA bileşenlerinin ekspresyon seviyesi ve hücre altı lokalizasyonu, miRNA/ceRNA afinitesi ve MRE'lerin sayısı ve konumu gibi birçok faktörden etkilenir (32).

CeRNA aktivitesini etkileyen diğer bir faktör, öncelikle ceRNA MRE ve miRNA tohum bölgesi (miRNA'nın 5 ucundaki nükleotitler 2-8) arasındaki baz eşleşmesinin kapsamı ile belirlenen miRNA/ceRNA bağlanma afinitesidir (49). MRE'ler ve miRNA tohum bölgeleri arasındaki

tamamlayıcılık derecesinin yanı sıra, MRE'lerin sayısı ve konumu da ceRNA aktivitesini etkiler. Daha fazla MRE içeren bir ceRNA'nın, miRNA'ları rekabetçi bir şekilde bağlamada daha güçlü bir yeteneğe sahip olacağı düşünülebilir. Ayrıca, Denzler ve ark. proksimal MRE'lerin miRNA'yı sekestre etmek için işbirliği içinde hareket edebileceğini ve bu nedenle ceRNA aracılı gen derepresyonunun gücünü etkileyebileceğini buldu (28).

LncRNA'lar, mRNA'ları stabilize veya destabilize ederek protein translasyonuna da müdahale edebilirler. Çeşitli çalışmalar, miRNA için ceRNA olarak lncRNA'nın tümör gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. CeRNA teorisine göre lncRNA'lar, miRNA'larla rekabet ederek ceRNA'lar olarak hareket edebilir ve bu miRNA'ların mRNA üzerindeki spesifik bağlanma bölgelerine bağlanmasını engelleyebilir, böylece posttranskripsiyonel olarak hedef genleri düzenleyebilir (5). Bu etkileşim, miRNA seviyesini ve miRNA ile mRNA arasındaki etkileşimi azaltır ve böylece bu down-regülasyon mRNA'lar üzerindeki baskıyı hafifleterek mRNA'ları artırır.

Shao ve ark. akciğer kanserinde düzensiz ceRNA-ceRNA etkileşimini tanımlamayı amaçlar ve birkaç ceRNA etkileşim modülünün tanısal biyobelirteçler olarak hizmet etme potansiyeline sahip olabileceğini öne sürer (28). LncRNA ile ilişkili ceRNA kanser ağını araştırmak, şüphesiz tümör oluşumu ve lncRNA işlevi hakkında önemli bilgilere yol açacaktır. Bununla birlikte, kanserde lncRNA'nın ceRNA işlevi hakkındaki bilgilerimiz hala sınırlıdır. Bu çalışmaların çoğu yalnızca belirli bir tümörü analiz etmeye odaklanmıştır ve bu nedenle farklı kanserler arasında lncRNA ile ilgili rekabetçi aktivitenin küresel anlayışından yoksundur. Ayrıca miRNA ve ceRNA, özellikle lncRNA'nın farklı dokularda ve hastalıklarda spesifik ekspresyon paternlerine sahip olduğu biliniyordu. Bu, ceRNA'ların farklı kanserler arasında farklı aktivite sergileyebileceğini ve bu nedenle ceRNA karışmasının çeşitli kanserlerde analizinin gerekli olduğunu göstermektedir.

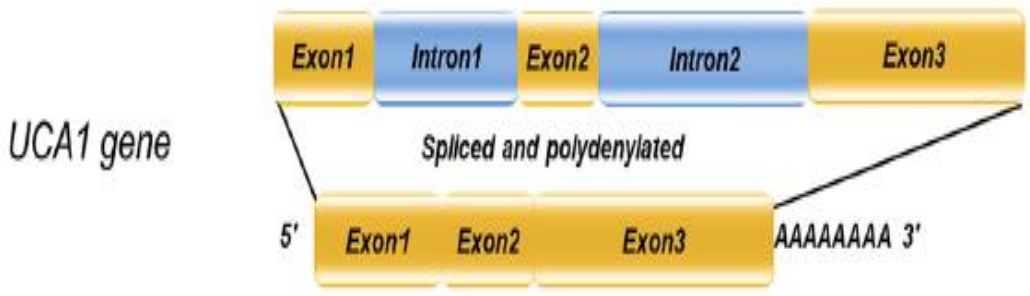
2.5.1. Ürotelyal Kanser İlişkili 1 (*UCA1*)

UCA1, çok çeşitli kanser dokularında ve hücrelerinde anormal ekspresyonu nedeniyle son yıllarda dikkat çekmiştir. *UCA1* geni, 1.4, 2.7 ve 2.2 kb uzunluğunda üç transkripti olup 19p13.12 kromozom bölgesinde yer alır (7,52). *UCA1*, 5–10 gebelik haftasında yukarı regüle edilir; 28. gebelik haftasından sonra serviks, böbrek, karaciğer, akciğer, bağırsak, deri, dalak ve mide ile karşılaştırıldığında mesane, kalp ve uterusta yüksek oranda eksprese edilir. Doğumdan sonra, kalp

ve dalak dışında çoğu dokuda ekspresyonu azalır (7). İlk olarak mesane kanserinde tanımlanmıştır ve çeşitli malign tümörlerde reaktive edilmiştir (53). *UCA1*, sistemik lupus eritematozus, diyabetik nefropati ve Parkinson hastalığı olmak üzere çeşitli hastalıklarla olan ilişkilerine ek olarak mesane kanseri, kolorektal kanser ve hepatosellüler karsinom dahil olmak üzere farklı kanser türlerinin ilerlemesinde rol oynar (54). Tümör büyümesinde, apoptozda, invazyonda, anti-kanser ilaç direncinde ve metabolizmada önemli bir rolleri vardır (Şekil 8) (52). *UCA1'in* aşırı eksprese edilmesi, TNM evresi, vasküler invazyon ve lenf nodu metastazı gibi kötü prognostik faktörler ve klinikopatolojik özelliklerle yakından ilişkilidir. Bu nedenle, kanserde *UCA1*'in fonksiyonel mekanizmasını anlamak büyük klinik öneme sahiptir.

***UCA1*'in Yapısı ve İzoformları**

UCA1 geni üç ekson, 2 intron olmak üzere 19p13.12 kromozom bölgesinde yer alır (Şekil 7). *UCA1*'in 1.4, 2.2 ve 2.7 kb olmak üzere birleştirilebilen ve poliadenile edilebilen üç izoformu vardır (55). *UCA1* dizisi birden çok durdurma kodonu içerir ve herhangi bir korunmuş uzun açık okuma çerçevesi (ORF'ler) içermez. In vitro translasyon tahlili, *UCA1*'in (1.4 kb) tam uzunluktaki cDNA'sının protein ürünleri üretmediğini bulmuştur (53). Birlikte ele alındığında, bu çalışmalar *UCA1*'in bir ncRNA olduğunu göstermektedir.



Şekil 7. *UCA1* geni üç ekzondan (sarı kutular) oluşur ve iki intron (mavi kutular)

Şu anda, çalışmaların çoğu, mesane kanseri, meme kanseri ve hepatoselüler karsinom gibi çeşitli kanserlerde *UCA1*'in en bol bulunan izoformu olduğundan, *UCA1*'in 1.4 kb izoformunun ekspresyon regülasyonu ve fonksiyonel önemine odaklanmaktadır (53). Not olarak, kanserlerde 2.7 kb *UCA1* izoformunun sekansı ve biyolojik rolü hakkında hala bir bilgi eksikliği vardır ve gelecekteki çalışmalar, kanserlerde farklı şekilde eksprese edilen üç *UCA1* izoformundan sorumlu transkripsiyonel düzenleyici mekanizmaları aydınlatacağı muhtemeldir.

Çoğalma

UCA1'in hücre proliferasyonundaki rolü ve mekanizması mesane kanseri, meme kanseri ve hepatoselüler karsinomda araştırılmıştır. *UCA1*, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (AKT) bağımlı sinyal yolları aracılığıyla cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) ekspresyonunu ve aktivitesini artırarak hücre döngüsü ilerlemesini ve mesane kanseri hücrelerinin hücre çoğalmasını destekler (52). Meme kanseri hücrelerinde *UCA1*, heterojen nükleer ribonükleoprotein I (hnRNP I) ile etkileşim yoluyla hücre proliferasyonunu arttırır ve p27 protein ekspresyonunun baskılanmasına yol açar (56). Ek olarak, *UCA1*'in miR-216b'yi inhibe ederek ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 (*FGFR1*)/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) yolunu aktive ederek hepatosellüler karsinom hücre proliferasyonunu desteklediği ve G0/G1 hücre döngüsü durmasını baskıladığı bildirilmiştir (55).

Apoptoz

UCA1'nın mesane kanseri hücrelerinde aşırı ekspresyonu, hücre apoptoz yolunun düzenleyici faktörleri olan tümör nekroz faktör reseptörü üst aile üyesini (Fas) ve mutasyona uğramış ataksi telenjiektazi genini (*ATM*) aşağı regüle eder (57). Ayrıca Ets-2, *UCA1* ekspresyonunu aktive eder ve AKT yolunu baskılayarak mesane kanseri hücre apoptozunu indükler (58). Önemli olarak, *UCA1*'in tükenmesi, AKT'nin downstream efektörleri olan proapoptotik Bax'ı up-regüle ederek ve antiapoptotik Bcl-2'yi down-regüle ederek hipoksik mesane kanseri hücre apoptozisini indükler (59). Bu bulgular, *UCA1*'nın Fas ve *ATM*'yi düzenleyerek mesane kanseri hücre apoptozunu kontrol edebileceğini ve *UCA1*'in en azından

kısmen AKT-Bax-Bcl-2 yolu yoluyla mesane kanseri hücre apoptozunu düzenlediğini göstermektedir.

İnvazyon ve Metastaz

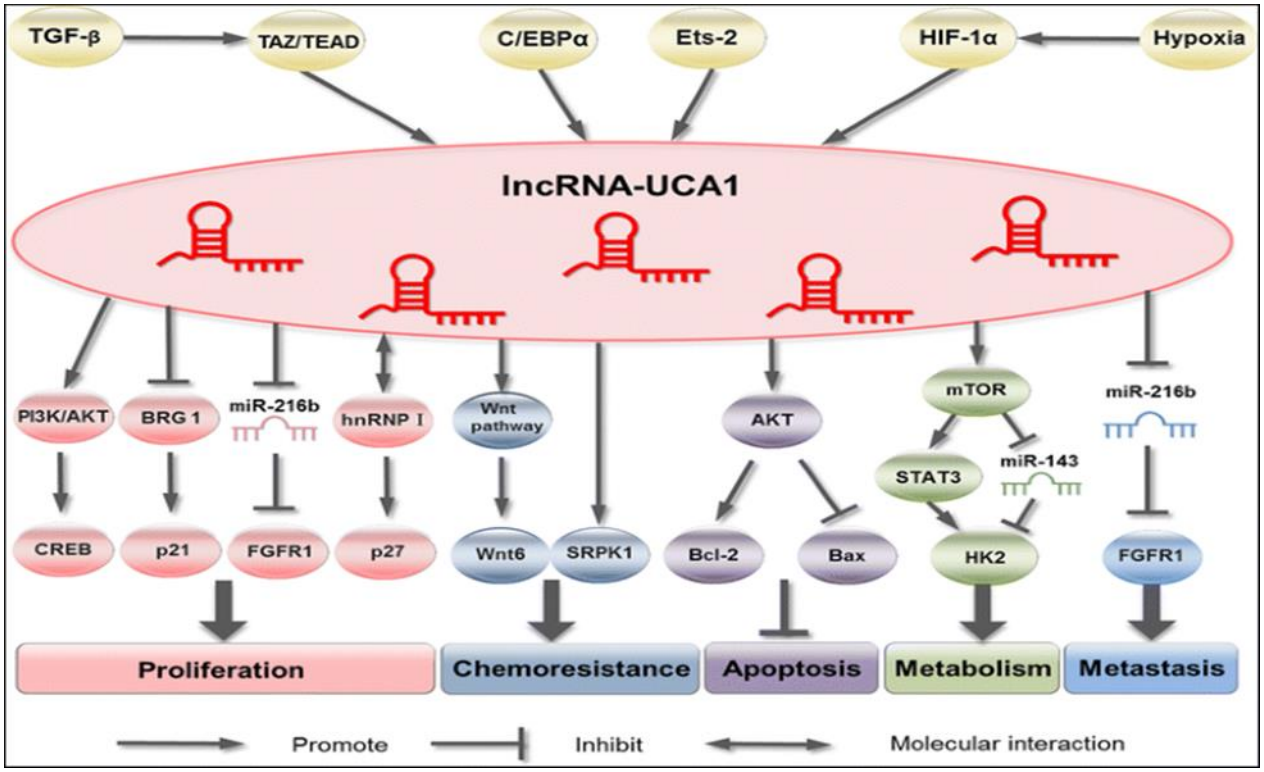
UCA1'in in vitro tahlillerinde aşırı ekspresyonu, birçok kanser hücresinin göçünü ve invazyonunu arttırır. Hipoksi koşulları altında, hipoksi ile indüklenebilir faktör1 (HIF-la), mesane kanseri hücrelerinde *UCA1* ekspresyonunu indükler, böylece mesane kanseri hücre göçünü ve invazyonunu teşvik eder (53). Benzer şekilde, TGF-B sinyal yolu da meme kanseri hücrelerinde *UCA1* ekspresyonunu indükleyebilir ve meme kanseri hücrelerinin daha malign fenotiplere dönüşmesine katkıda bulunabilir (60). Spesifik olarak, yakın tarihli bir çalışma, *UCA1*'in, hedef gen *FGFR1*'i düzenlemek için *miR-216b* için önemli bir ceRNA işlevi görerek hepatoselüler karsinom hücre göçünü ve istilasını desteklediğini göstermektedir (61). *UCA1*'in kanser metastazındaki moleküler mekanizmasını aydınlatmak önemli olacaktır ve bu mekanizmanın aydınlatılması nihayetinde kanser metastazı için potansiyel bir tedavi stratejisi sağlayacaktır.

Metabolizma

Warburg etkisi, normoksi koşullar altında normal hücrelerden daha fazla glikoz tüketen ve daha fazla laktat üreten kanser hücrelerinin önemli bir özelliğidir, böylece kanser hücresinin hayatta kalmasını ve çoğalmasını kolaylaştırır (62). LncRNA'ların Warburg etkisinin kilit düzenleyici faktörleri olarak hareket ettiği bulunmuştur. Ayrıca *UCA1*, glikoz metabolizmasını hızlandırmak için mTOR-STAT3-*miR143*-HK2 yolunu aktive eder.

Bu lncRNA'lar arasında, *UCA1*, glikolizin ilk hız sınırlayıcı enzimi olan heksokinaz 2'yi (HK2) düzenleyerek mesane kanseri hücrelerinde aerobik glikolizi önemli ölçüde artırır (53). *UCA1*, mesane kanseri hücrelerinde HK2'nin yukarı regülasyonuna iki yolla katkıda bulunur: İlk olarak, *UCA1*, HK2'nin transkripsiyonunu destekleyen STAT3'ün aktivasyonunu kolaylaştırır. İkincisi, *UCA1*, *miR143*'ü bastırır ve ardından posttranskripsiyonel olarak HK2 ekspresyonu artar. *STAT3* aktivasyonu olmadan HK2 mRNA yetersizdir; bununla birlikte, *miR143*'ün baskılanması olmadan, *UCA1/*mTOR/STAT3 tarafından HK2'nin artan mRNA seviyeleri, daha fazla HK2 proteini ile sonuçlanmaz. Bu ikili kontrol sisteminin önemi, *UCA1*'in mesane kanseri hücrelerinde glikolizini

hızlandırması için hem STAT3 aktivasyonunun hem de *miR143*'ün baskılanmasının gerekli olduğu anlamına gelir (53).



Şekil 8. lncRNA-*UCA1* aracılı kanserin moleküler mekanizması progresyon ve metastaz

UCA1, *BRG1, hnRNP I, CREB* veya *miR-216b* ile dolaylı veya doğrudan etkileşime girerek kanser hücresi çoğalmasını destekler. *UCA1, SPRK1, Wnt6* ve Wnt sinyal yolu aracılığıyla ilaç direncini arttırır. Ets-2 ve C/EBPa, *UCA1* ekspresyonunu düzenler ve *UCA1*'in yukarı regülasyonu, AKT-Bax-Bcl-2 sinyal yolu yoluyla hücre apoptozunu inhibe eder. *UCA1*, HK2'yi mTOR yolu aracılığıyla up-regüle ederek glikolizi destekler.

Kemorezistans

İlaç direnci, kanser hastalarının etkili tedavisinin önünde büyük bir engeldir. Son çalışmalar, *UCA1*'in mesane kanseri hücrelerinin sisplatin direncinde rol oynadığını ve *UCA1* ekspresyonunun Wnt6 ekspresyonunu yukarı regüle ederek ve Wnt sinyal yolunu aktive ederek

sisplatin direncini indüklediğini göstermiştir (63). Ayrıca, *UCA1*'in over kanseri hücresi kemoterapi direncindeki düzenleyici rolü, sisplatine duyarlı bir protein olarak tanımlanan serin/arginin açısından zengin proteine özgü kinaz 1'in (SRPK1) ekspresyonu ile ilişkilidir (52).

***UCA1*'in Kanserlerde Deregülasyonu**

UCA1 ilk olarak mesane kanserinde keşfedilmiştir ve son çalışmalar, geniş bir insan kanseri yelpazesine her zaman *UCA1* anormal ekspresyonu eşlik ettiğini doğrulamıştır (64). Ayrıca, *UCA1* ekspresyonu klinik parametrelerle ilişkilidir ve kanser hücresi proliferasyonu, apoptoz, göç ve metastazı düzenler (54).

Önceki çalışmalar, *UCA1*'in mesane kanseri, kolorektal kanser ve meme kanseri gibi tümörlerde yüksek oranda eksprese edildiğini bildirmiştir. Ayrıca, *UCA1*, PDK, Wnt ve Akt gibi sinyal yolları aracılığıyla mesane kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını destekleyebilir (65). Çeşitli kanserler üzerinde yürütülen lncRNA'ların ekspresyon profili ve fonksiyonel deneyleri, lncRNA'ların tümör malignitesinde hayati rollerini destekleyen kanıtlar sağlamıştır. Sun ve arkadaşları, LSCC ilerlemesine sıklıkla lncRNA değişikliklerinin eşlik ettiğini ve lncRNA *UCA1*'in LSCC'nın patogenezinde anahtar bir faktör olduğunu bildirmektedir. Bununla birlikte, LSCC'deki lncRNA *UCA1*'in potansiyel mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Over kanserinin klinik örneklerinde, kanser dokularında parakanser dokularına kıyasla daha yüksek *UCA1* ekspresyonu gözlemlenmiştir, ayrıca yüksek lncRNA *UCA1* ekspresyonu, LSCC'da Wnt/β-katenin'i aktive ederek hücre invazyonunu ve göçünü destekler (64). LncRNA *UCA1*, over kanserinde aşırı eksprese edildiğinde sisplatin direnci oluşabilir. *UCA1*-miRNA-mRNA ekseni, kanser büyümesi, invazyon, ilaç direnci ve metabolizma dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlevlere katılmaktadır.

2.5.2. MiR-138

MiRNA'lar, birçok önemli hedef genin ekspresyonunu transkripsiyon sonrası hedef mRNA'nın 3'-UTR bağlanarak düzenleyebilen, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, küçük ve kodlamayan RNA moleküllerinden oluşan bir sınıftır (66). İlginç bir şekilde, bazı miRNA'ların da doğrudan kodlama bölgesini hedefleyerek gen ekspresyonunu düzenlediği bulunmuştur. Hepimizin bildiği gibi, bir miRNA birden fazla mRNA'yı düzenleyebilir ve benzer

şekilde her mRNA, çok sayıda miRNA için potansiyel hedef bölgeler içerir. Gittikçe daha fazla çalışma, miRNA'ların hücre proliferasyonu, apoptoz, metastaz, invazyon ve hatta kemorezistans dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçlerde yer aldığını göstermektedir (66). *MiR-138*, son zamanlarda serviks kanseri, osteosarkom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, over kanseri ve safra kesesi karsinomu gibi çoklu malignitelerde önemli bir tümör baskılayıcı miRNA olduğu ortaya çıkmıştır (67). *MiR-138* proliferasyonu inhibe eder, apoptozu indükler, hem metastazı hem de invazyonu engeller ve çoklu hedeflerin baskılanması yoluyla tümör hücrelerinin kemosensitivitesini arttırır (68). Bütün bunlar, *miR-138*'in farklı kanserlerin biyolojik süreçlerinde çeşitli genleri hedefleyerek çeşitli işlevler gösterebildiğini göstermektedir.

MiR-138, omurgalılar arasında yüksek oranda korunmuştur. İki primer transkript, pri-*miR-138*-1 ve pri-*miR-138*-2, sırasıyla kromozom 3 (3p21) ve 16 (16q13) üzerinde kodlanır ve olgun *miR-138*'i oluşturulur (69). Bu kromozomal lokusların silinmesi tiroid karsinomlarında sıklıkla saptanır ve her ikisinde de heterozigotluk kaybı oral skuamöz hücreli karsinomda da keşfedilmiştir (70). Bu kanserlerdeki biyolojik fonksiyonların *miR-138*'in downregülasyonu ile ilişkili olabileceğini açıklar. Halihazırda, insan kanserlerinde *miR-138* deregülasyonu üzerindeki mekanizmalar rapor edilmiştir ve kanıtlar epigenetik mekanizmanın, transkripsiyonel faktör düzenlenmesinin, hormonal düzenlenmenin ve diğer moleküllerin dahil olduğunu göstermektedir (67).

Epigenetik mekanizmalardan biri olan DNA metilasyonunun miRNA ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. *MiR-203, miR-155, miR-137, miR-193a* ve *miR-200c* gibi birçok tümör baskılayıcı miRNA, anormal hipermetilasyon ile susturulur (71). *MiR-138*'e gelince, *miR-138-2, miR-138-1'e* kıyasla insan meme örneklerinde daha yüksek metilasyon varyasyonu gösterir ve ayrıca ekspresyonu ile DNA metilasyonu arasında negatif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (72). Benzer şekilde histonların deasetilasyonunun da miRNA'ların ekspresyonu ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu düşünülmüştür. Histonların deasetilasyonu, kanserin ilerlemesini engelleyebilen genleri baskılayarak veya tümör anjiyogenezini, göçünü ve invazyonunu ilerleten genlerin ekspresyonunu indükleyerek tümör oluşumunu teşvik etme kabiliyetine sahiptir (73). *MiR-138*, insan baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC) hücrelerinde aşağı regüle edildiği bilinmektedir (70).

Belirli bir miRNA'nın ekspresyon seviyesi, spesifik miRNA'nın kanserlerde tümör baskılayıcı veya onkojenik bir rol oynayıp oynamadığını belirlemek için kullanılmıştır. Bir miRNA'nın kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği bulunursa, miRNA'nın tümör baskılayıcı genleri hedefleyerek onkojenik işlevler oynaması beklenebilir. Öte yandan, bir miRNA'nın düşük ekspresyon seviyesi, bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilmiştir ve bu miRNA'ların sıklıkla onkogenleri hedef aldığı bulunmuştur. *MiR-138*'in birçok kanser türünde düzensiz olduğu bildirilmiştir (68). The Cancer Genome Atlas (TCGA) Konsorsiyumu tarafından kanserli hasta örnekleri üzerinde yapılan global transkriptom analizine göre, *miR-138*'in birçok insan kanseri türünde düşük seviyede eksprese ettiği bulunmuştur (71). HeLa, melanom, meme, nöroblastom ve pankreas tümörü dahil olmak üzere hücre hattı çalışmalarından elde edilen kümülatif veriler, *miR-138*'in çeşitli onkogenleri hedefleyerek tümör baskılayıcı bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (66). *MiR-138*'in ektopik aşırı ekspresyonu, fokal adezyon kinazını (FAK) doğrudan baskılayarak invazivliği azaltır ve kemoterapiye duyarlılığı artırır (69). *MiR-138* ekspresyonundaki değişiklikler hücre proliferasyonunu, metastatik yeteneğini ve ilaç direncini etkileyebilir.

MiRNA'ların ekspresyonu ayrıca çeşitli transkripsiyon faktörleri (TF)' nden biri olan *P53* tarafından da düzenlenmiştir, ve *p53*-miRNA'ların karşılıklı düzenlenmesinde bir "TF-miRNA geri besleme döngüsü" vardır (70). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, *p53*'ün insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinde aktive edildikten sonra *miR-138*'de belirgin bir artış olduğunu göstermiştir, ancak sıçan ve fare hücrelerinde bu artış olmamıştır (74). Daha da ilginç olarak, fare ve sıçan hücrelerinde, p53'ün *miR-138* tarafından düzenlenebildiği, ancak bu, insan NSCLC hücrelerinde gerçekleşmediği bulunmuştur. Bu nedenle, *p53* ve *miR-138* arasındaki karşılıklı düzenlemenin türe özgü olduğu tahmin edilmiştir. *P53*'e benzer şekilde, *GATA1*, *miR-138*'in transkript ekspresyonunu yönlendiren başka bir TF'dir. Aşırı eksprese edilen *GATA1*, pri-*miR-138*-2 ve olgun *miR-138*'in in vivo ekspresyonunu yukarı regüle eder. *GATA1*'in ekspresyonu ve transkripsiyonel aktivitesi, BCR-ABL tarafından modüle edilir (75). Ayrıca imatinib, BCR-ABL tirozin kinaz aktivitesini inhibe edebilir ve *GATA1*'i aktive ederek *miR-138* transkripsiyonunun yukarı regülasyonuna yol açar. Yüksek seviyeli *miR-138*, sırayla, hem BCR-ABL'nin ekspresyonunu baskılar hem de imatinib'in klinik etkinliğini artırır.

2.5.3. *CDK6* (Siklin Bağımlı Kinaz 6)

Hücre bölünmesi, sağlıklı bir organizmanın gelişimi ve bakımı için gereklidir. Hücre siklusu ilerlemesi, oldukça regüle bir süreçtir. Hücre döngüsü birkaç farklı aşamadan oluşmaktadır. Hücre başarılı bir hücre bölünmesinden hemen sonra hareketsiz durum olan G0'a girer ve muhtemelen çoğalma durumuna girmeden önce burada kalır (76). Hücre proliferatif bir duruma geçtiğinde, hücre G1'e ve DNA sentezinin gerçekleştiği sentez fazına (S fazı), daha sonra hücrenin iki özdeş yavru hücreye bölündüğü G2 ve mitoz fazına (M fazı) girer (77). Hücre döngüsü kontrol noktaları, işlemlerin dikkatli bir şekilde yürütülmesini ve hücre bir sonraki aşamaya girmeden önce DNA ve diğer hücre içeriklerinin uygun şekilde kopyalanmasını sağlar. Herhangi bir mitotik hücre bölünmesi, S fazında gerçekleşmesi için doğru DNA replikasyonu gerektirir. Mitoz sırasında, kromozom ayrılması için gerekli mekanizma mevcut olup, yavru hücrelerin oluşumuna yol açar. Siklin bağımlı kinaz (CDK), hücre siklusu ilerlemesi, transkripsiyon ve nöronal işlevlerin kontrolünde rol oynayan heterodimerik serin / treonin kinaz ailesinin katalitik alt birimleridir (77). Burada, CDK'ler hücre döngüsünün farklı aşamalarında farklı işlevler gerçekleştirir. CDK'lar, S fazından önce kromozomlar boyunca DNA replikasyon bölgelerinin başlamasından başlayarak, S ve M fazları sırasında histon proteinlerini fosforile ederek kromatin konformasyonunu gerçekleştirir. Bunun yanı sıra, M fazının başlangıcında laminler veya nükleoporinler gibi nükleer proteinlerin fosforilasyonu ile nükleer membranın bozulmasını düzenlerler ve mitoza hazırlık olarak sentrozomla ilişkili proteinlerin fosforilasyonuna katılır (77).

CDK'lar protein fosforilasyonu yapan enzim ailesindendir (76). CDK'lar siklin'e bağlandığında aktifleşerek aktif siklin-CDK komplekslerini meydana getirirler. Siklinler bu komplekslerin düzenleyici alt birimleri, CDK'lar ise katalitik alt birimlerini oluşturmaktadır. CDK, siklin (yapısal proteini) ve kinaz (enzim)'dan oluşur. Her bir CDK katalitik altbirimi farklı düzenleyici altbirimle bir araya gelebilir. Hücre siklusu boyunca kinaz komplekslerinin aktivite düzeyi değişir.

Hücre döngüsündeki her faz geçişi, belirli bir siklin ve CDK alt kümesi tarafından düzenlenir. CDK'ler, kısıtlama noktaları (R-noktaları) yoluyla tüm hücre döngüsü geçişlerini hassas bir şekilde kontrol eden anahtar düzenleyici enzimler olarak yer alır (76). Serin/treonin kinazlar arasında CDK'ler, ayrı bir enzim alt ailesini temsil eder (77). Siklinlerle birlikte CDK'ler, bir hücrenin

hücre döngüsü boyunca ilerlemeye devam edip etmediğini veya hücre büyümesinin durdurulduğu bir aşamaya girip girmediğini belirleyen moleküler makinenin temel bileşenleridir (78).

Hücre Döngüsü CDK'lerinin Düzenlenmesi

Daha spesifik olarak, G0'dan gelen hücreler döngüye girdiğinde, *CDK4* ve *CDK6*, D tipi siklinler (D1, D2, D3) ile aktif kompleksler oluşturur ve diğer proteinlerin yanı sıra retinoblastoma proteinini (pRb) fosforile eder (78). *Rb*, hücrelerin normal koşullar altında hücre döngüsüne girmesini önleyen CDK'nın en önde gelen araştırılmış tümör baskılayıcı protein substratlarından biridir. Rb'nin CDK'ler tarafından fosforilasyonu, inaktivasyonuna neden olur ve hücrelerin yeni bir hücre döngüsüne girmesine izin verir. Fosforile edilmiş formunda, hücre döngüsü ilerlemesi için gerekli olan RB1'in E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanması serbest bırakılır. Fosforillenmemiş veya düşük fosforlu bir durumda, pRb, E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanarak baskılayıcı kompleksler oluşturur (77). Ayrıca, *CDK2*/siklin E kompleksi, *Rb* ailesi üyelerini fosforile eder ve onları inaktive eder. Transkripsiyon faktörlerinin müteakip salınımı, hücrelerin R-noktasını geçmesine ve G1'den S fazına geçmesine izin verir

Kanser Oluşum Mekanizmasında CDK 4/6 Rolü

CDK4 / 6-Siklin D / INK4 / Rb yolu, insan kanserlerinde en sık mutasyona uğramış önemli yollardan biridir (68). Sağlıklı bir hücrede döngü şu şekildedir; Aktif *CDK4* / 6 *Rb'*u fosforiller ve pRb inaktif hale gelerek, hücre döngüsünü devam ettirir (79). M döneminde hücresel fosfatazlar ile pRb'den fosfat grupları atılır. Böylece yeniden hipofosforile şekil ortaya çıkar ve pRb yeniden aktifleşerek siklusu durdurur. Kanser hücrelerinde G1 ilerlemesi ve S fazı başlangıcının kontrolü bozulur. *CDK4* / 6 aktivitesinin ve D-tipi siklinlerin aşırı ekspresyonu, pRb'de mutasyon, delesyon, direkt inaktivasyon hücre siklusunu kontrolsüz olarak artırır. *P16*'nın çok fazla eksprese olması bile döngüde supresör etki yapmaz ve hücre proliferasyonu devam eder. Kontrolsüz proliferasyon sonucunda kanser hücresi gelişimi başlar (76).

CDK4 çok çeşitli tümörlerde ve tümör hücre dizilerinde çoğalır ve aşırı eksprese edilir. Bazıları, esas olarak gliomlar, sarkomlar, meme tümörleri ve serviks karsinomlarıdır (68). *CDK6* geni ise yassı epitel hücreli karsinomlar ve gliomlar ve lenfoid tümörler olmak üzere belirli tipte malignitelerde ekspresyonu artmıştır. *CDK6*, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda ve

özellikle larinks karsinomlarında yüksek oranda eksprese edilmektedir ve tümör progresyonu ile önemli ölçüde koreledir (80),81).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastaların Seçilmesi ve Kayıtların Tutulması

Bu çalışma vaka-kontrol çalışması olarak planlanmıştır. Çalışma için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurul'undan 01-9 nolu 04.03.2021 tarihli etik kurul onayı alınmıştır. Çalışmaya LSCC tanılı 18-70 yaş aralığında 30 hasta dahil edilmesi planlanmıştır. Tüm katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır. Mart 2020'den Mart 2021'ye kadar KBB (Kulak-Burun-Boğaz) kliniğinde LSCC öntanısı almış bireylerin laringeal doku örnekleri cerrahi olarak çıkartılmış otuz çift LSCC dokusu ve eşleşen komşu normal doku örnekleri toplanmıştır. Hastaların hiçbiri ameliyattan önce kemo/radyoterapi veya biyoterapi almamıştır. Tüm numuneler, rezeksiyondan sonra 5 dakika içinde sıvı nitrojen içinde donduruldu ve daha sonra RNA analizi için bir sonraki kullanıma kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Çalışmaya Alınma Kriterleri

1-LSCC tanısı almış olmak

2-Bu çalışmaya katılmayı kabul etmek ve onam formunu imzalamış olmak

Çalışmaya Alınmama Kriterleri

1-LSCC haricinde bir başka neoplazi öyküsü olmak

2- Herhangi bir genetik hastalığı olmak

3- lncRNA - miRNA - mRNA düzeylerini değiştirebilecek bir başka kronik hastalık hikayesi olmak

4- lncRNA - miRNA - mRNA düzeylerini değiştirebilecek uzun süreli tedavi almış olmak

Hastaların dahil edilme ve dışlanma kriterleri göz önünde bulundurulduktan sonra, dokulardan veya hücrelerden alınan toplam total RNA izolasyonu, cDNA sentezi, kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile *UCA1*, *miR-138* ve *CDK6* ekspresyon analizi gerçekleştirildi. Hastaların laboratuvar ve ölçüm parametreleri ile kaydedildi. Normalizasyonu sağlamak için bir takım kontrol genleri çalışmaya dahil edilmiştir. LncRNA için *GAPDHP61*, mRNA için *GAPDH*, miRNA için *RNU6* kontrol genleri seçilmiştir.

3.2. RNA’ların Ekspresyon Analizi

3.2.1. LncRNA ve mRNA Analizi

LncRNA-miRNA-mRNA etkileşim verileri, lncRNA ile ilişkili rekabet eden üçlüleri tanımlamak için geliştirilen ilk olarak miRcode ve TargetScan dahil olmak üzere dört miRNA hedef tahmin yöntemine dayanan miRNA-lncRNA etkileşimlerini tahmin ettik. MiRNA-mRNA etkileşimleri, miRDB ve mirTarBase dahil olmak üzere iki yüksek kaliteli veri tabanından elde edilmiştir. Bir miRNA'yı paylaşan LncRNA-mRNA çiftleri, bir aday lncRNA-miRNA-mRNA rekabet etkileşimi olarak *UCA1-miR-138-CDK6* ağı oluşturuldu.

Total RNA İzolasyonu

Tüm hücre gruplarından RNA izolasyonu, RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Kat. No: 74134) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit, hücrelerden tüm RNA’ ların elde edilmesini sağlar. Kit, hücrelerin RNAaz’ ları hızlı bir şekilde inaktif hale getirerek RNA’nın bozulmadan izolasyonunu gerçekleştiren yüksek guanidin-izotiyosiyanat içeren tampon içinde lizize ve homojenize edilmesinin ardından, lizatın önce DNA’ yı seçici bir şekilde uzaklaştıran yüksek tuz içeriğine sahip dönüş kolonundan, ardından etanol uygulanmasıyla birlikte RNA’ yı bağlayan membrandan oluşan dönüş kolonundan geçirilmesi temeline dayanmaktadır.

Protokol:

1.Doku parçalandı ve lizatı uygun hacimde Tampon RLT'de homojenleştirildi. Lizat maksimum hızda 3 dakika santrifüjlendi. Pipetleme ile süpernatant dikkatlice çıkarıldı.

2.Lizata 1 hacim %70 etanol eklendi ve pipetleme yaparak iyice karıştırıldı.

3. Herhangi bir çökelti dahil olmak üzere 700 µl'ye kadar numuneyi 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş bir RNeasy Mini döndürme kolonuna aktarıldı. Kapağı kapatıldı ve ≥8000 x g'de 15 saniye santrifüjlendi.

4. RNeasy döndürme kolonuna 700 µl Tampon RW1 eklendi. Kapağı kapatıldı ve ≥8000 x g'de 15 saniye santrifüjlendi.

5. RNeasy döndürme kolonuna 500 µl Buffer RPE eklendi. Kapağı kapatıldı ve ≥8000 x g'de 15 saniye santrifüjlendi.

6. RNeasy döndürme kolonuna 500 µl Buffer RPE eklendi. Kapağı kapatıldı ve ≥8000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi.

7.RNeasy döndürme kolonu yeni bir 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirildi. Doğrudan spin kolon membranına 30–50 µl RNaz içermeyen su eklendi. Kapağı kapatıldı ve RNA'yı ayrıştırmak için ≥8000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi.

8. Beklenen RNA verimi >30 µg ise, başka bir 30–50 µl RNaz içermeyen su kullanarak veya adım 7'deki ayrıştırılmış karışım kullanılarak (yüksek RNA konsantrasyonu gerekiyorsa) 7. Adım tekrarlanabilir. 7. adımdaki toplama tüpü yeniden kullanıldı.

CDNA Sentezi

Elde edilen RNA'nın konsantrasyonunun ölçümü Nano Maestro (şekil 9) cihazı ile yapıldı. A260/A280 absorbsiyon oranına bakılarak total RNA'lar cDNA dönüşümü için -80'de korundu. PCR'da çoğaltılmak üzere RNA'lar, RNA hidrasyon solüsyonu ile 100 ng/ul olacak şekilde sulandırıldı.

Şekil 9. Nano Maestro spektrofotometre cihazı

Elde edilmiş total RNA'dan lncRNA ve mRNA cDNA'sı elde edilmek üzere RT HT First Strand Kit (QIAGEN) ile üreticinin protokolüne uygun basakmaklar izlenerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Aşağıda cDNA eldesi aşamaları sıralanmıştır.

1. Elde edilen RNA örneklerini buz üzerinde ve qRT-PCR için gerekli olan diğer kimyasallar oda ısısında çözdürüldü.

2. İçeriği tüplerin dibine getirmek için RT2 First Strand Kit reaktifleri (10–15 saniye) kısaca santrifüjlendi.

3. Tablo 1'e göre steril bir PCR tüpünde her RNA örneği için genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlandı. Yukarı ve aşağı pipetleyerek hafifçe karıştırıldı ve ardından kısaca santrifüjlendi.

Tablo 1. Genomik Eliminasyon Karışımı

Bileşenler	Miktar
RNA	25 ng- 5 µg
GE Tamponu	2 µl
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Toplam hacim	10 µl

4. Genomik DNA eliminasyon karışımı 5 dakika 42°C'de inkübe edildi, ardından hemen en az 1 dakika buz üzerine koyuldu.

5. Reverse transkripsiyon karışımı Tablo 2'ye göre hazırlandı.

Tablo 2. Ters transkripsiyon karışımı

Bileşenler	Her örnek için hacim
5x Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 ters transkripsiyon karışımı	2 µl
Nükleaz içermeyen su	3 µl
Toplam hacim	10 µl

6. Genomik DNA eliminasyon karışımını içeren her tüpe 10 µl reverse transkripsiyon karışımı eklendi. Yukarı ve aşağı pipetleyerek hafifçe karıştırıldı.

7. 37°C'de tam olarak 60 dakika inkübe edildi, ardından 95°C'de 5 dakika inkübe ederek reaksiyon hemen durduruldu.

8. Reaksiyonlar buz üzerine yerleştirildi ve her reaksiyona 90 µl nükleazsız su eklendi. Birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırıldı.

9. Real-time PCR protokolü ile devam edildi.

Real-Time PCR aşaması

LncRNA (*UCA1*) ve mRNA (*CDK6*) ekspresyon düzeyinin ölçümü için QIAGEN üretici talimatları doğrultusunda 30 kanserli doku ve 30 komşu normal doku olmak üzere toplam 120 reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

PCR verilerinin rölatif kuantifikasyon ile normalizasyonu için *GAPDHP61* (lncRNA için) ve *GAPDH* (mRNA için) referans genleri kullanıldı.

1. İçeriği tüplerin dibine getirmek için RT2 SYBR Green Mastermix, RT2 lncRNA qPCR Assay, RT2 qPCR Primer Assay, ve cDNA sentez reaksiyonu (10–15 saniye) kısaca santrifüjlendi.

2. PCR bileşenleri Tablo 3'te açıklandığı gibi nükleaz içermeyen bir tüpte hazırlandı.

Tablo 3. qRT – PCR için belirlenen malzemeler ve miktarları

Bileşenler	Her bir örnek için hacim
Nükleaz içermeyen su	10.5 µl
RT2 SYBR Green Mastermix	12.5µl
cDNA	1 µl
RT2 lncRNA qPCR Assay (10 µM stock) (Belirlenen primer)	1 µl
Toplam hacim	25 µl

3. PCR bileşenleri karışımı 25 ul olacak şekilde tüplere pipetlendi ve Rotor Gene Q (Qiagen Germany) real-time döngüleyici (cycler) cihazında (şekil 10) 72'lik platform kullanılarak çalışıldı. qRT-PCR reaksiyonu basamakları ve şartları Tablo 4'de belirtilmiştir.

Tablo 4. qRT – PCR döngü basamakları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Siklus sayısı
Başlama denatürasyonu	95 °C	10 dk	1
Denatürasyon	95 °C	15 sn	40
Bağlanma	55 °C	30 sn	
Uzama	72 °C	30 sn	

RT-qPCR işlemi sonrasında her bir örnek için fluoresan ışıma miktarını gösteren CT (Cycle of threshold) değerleri hesaplandı. Tüm tüpler için CT değerlerini, PCR Veri Analizi Şablonu Excel veya Web tabanlı yazılım kullanılmak üzere boş bir Excel elektronik tablosuna aktarıldı.

Şekil 10. RNA amplifikasyonunda kullanılan Real-Time PCR cihazı (Qiagen Rotor-Gene Q)

3.2.2. MiRNA analizi

Total RNA İzolasyonu

Total RNA eldesinde miRNeasy Mini Kit 50 (QIAGEN) üreticinin talimatları doğrultusunda kullanıldı.

Aşağıda RNA izolasyonu aşamaları sıralanmıştır:

1- Doku parçalandı (≤30 mg) ve lizatı uygun hacimde Tampon RLT'de homojenleştirildi.
2- Uygun hacimde buffer AL eklendi ve iyice karıştırıldı. 3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Homojenize lizatı, 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş bir gDNA Eliminator döndürme kolonuna aktarıldı.
3- ≥8000 x g'de (≥10.000 rpm) 30 saniye santrifüjlendi. Süpernatanı atıldı.
4- Elde edilen karışım yeni bir 2 ml'lik reaksiyon kabına aktarıldı. 20 ul Tampon RPP eklendi. Tüp kapağını kapatıldı ve 20 saniye vorteksleyerek kuvvetlice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
5- Çökeltiyi peletlemek için oda sıcaklığında 3 dakika 12.000 x g'de santrifüjlendi.

6- 1 hacim izopropanol eklendi ve pipetleyerek iyice karıştırıldı. Numunenin tamamı bir RNeasy® Mini sütununa aktarıldı. Kapağı kapatıldı ve ≥8000 x g'de 15 saniye santrifüjlendi. Kolonun altındaki sıvı kısım atıldı.
7- Numunenin geri kalanı kullanılarak 6. adım tekrarlandı.
8- RNeasy Mini döndürme kolonuna 700 µl Tampon RWT pipetlendi. Kapağı kapatıldı ve ≥8000 x g'de 15 saniye santrifüjlendi. Kolonun altındaki sıvı kısım atıldı.
9- RNeasy Mini döndürme kolonuna 500 µl Buffer RPE pipetlendi. Kapağı kapatıldı ve ≥8000 x g'de 15 saniye santrifüjlendi. Kolonun altındaki sıvı kısım atıldı.
10- RNeasy Mini döndürme kolonuna 500 µl %80 etanol eklendi. Kapağı kapatıldı ve ≥8000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi. Kolonun altındaki sıvı kısım ve toplama tüpü atıldı.
11- RNeasy Mini döndürme kolonu 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Döndürme kolonunun kapağı kapatıldı ve membranı kurutmak için tam hızda 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Kolonun altındaki sıvı kısım ve toplama tüpü atıldı.
12- RNeasy Mini döndürme kolonu yeni bir 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirildi. Doğrudan spin kolon membranının merkezine 30−50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dakika inkübe edildi. Kapağı kapatıldı ve RNA'yı ayrıştırmak için tam hızda 1 dakika santrifüjlendi.

CDNA Sentezi

Elde edilmiş total RNA'dan miRNA cDNA'sı elde edilmek üzere A.B.T.™ Single miRNA qPCR Assay (Atlas Biyoteknoloji) ile üreticinin protokolüne uygun basakmaklar izlenerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Aşağıda cDNA eldesi aşamaları sıralanmıştır.

1. Tüm reaktifler buz üzerinde çözüldü, hafifçe karıştırıldı ve kullanımdan önce kısaca santrifüj edildi.
2. Reaktifler oda sıcaklığında çözüldü. İyice karıştırıldı ve çözüldükten hemen sonra buz üzerine koyuldu.
3. Ters transkripsiyon reaksiyonu için aşağıdaki Tablo 5'te önerilen bileşen hacimleri gösterilmektedir.

Tablo 5. Ters transkripsiyon reaksiyonu için malzemeler ve miktarları

Bileşenler	Her örnek için hacim
miR-cDNA sentez kiti	9 µl
miRNA	1 µl
Total hacim	10 µl

4. Pipetleme ve ardından mikrosantrifüjde kısa bir döndürme ile reaksiyonlar iyice karıştırıldı.

5. Tüpler bir termal döngü cihazına aktarıldı ve Tablo 6'daki gibi çalıştırıldı.

Tablo 6. Termal döngü cihazındaki koşullar

Ters transkripsiyon basamakları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Siklus sayısı
Basamak 1	25	10 dk	1
Basamak 2	37	20 dk	1
Basamak 3	85	5 dk	1
Basamak 4	4	-	-

6. Real-time PCR basamağı için ileride kullanılmak üzere –20°C'de saklandı.

QRT-PCR Aşaması

Real-Time PCR reaksiyonu için Tablo 7'de önerilen bileşen hacimleri gösterilmektedir.

Tablo 7. qRT-PCR için belirlenen malzemeler ve miktarları

Bileşenler	Her bir örnek için hacim
miR-qPCR MasterMix	9 µl
miRNA	1 µl
Toplam hacim	10 µl

7. Pipetleme ve ardından mikrosantrifüjde kısa bir döndürme ile reaksiyonların iyice karışması sağlandı.

8. Tüpler RT-PCR cihazına aktarıldı ve Tablo 8'deki gibi çalıştırıldı.

Tablo 8. qRT –PCR döngü basamakları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Siklus sayısı
Başlama denatürasyonu	95	10 dk	1
Denatürasyon	95	10 sn	40
Bağlanma	60	25 sn	

3.3. Verilerin Analizi

PCR reaksiyonu sırasında amplifikasyon işlemi gerçekleştikçe SYBER Green boyasının salınarak verdiği floresans Real-Time PCR cihazı tarafından kaydedilerek her örneğin başlangıç

konsantrasyonuna göre vermiş olduğu Ct değerleri cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Her bir örnek için *UCA1*, *CDK6*, *miR-138* çalışıldı ve normalizasyon için *GAPDH, GAPDHP61* ve *RNU6* genleri referans olarak kullanıldı.

Rotor- Gene Software programında vaka ve kontrol olarak kabul edilen 30 çift örneğin Ct değerleri ve Ct eğri grafileri analiz edilip kaydedildi.

Elde edilen veriler kullanılarak lncRNA, mRNA ve miRNA ekspresyon değişiklikleri aşağıdaki gibi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) yöntemiyle hesaplandı:

Bu metoda göre $2^{-\Delta Ct}$ (ΔCt (delta Ct) = CT Hedef Gen – CT Referans Gen) formülü ile referans gen ve hedef genin Ct değerleri arasındaki katlı değişimleri (fold change) hesaplandı.

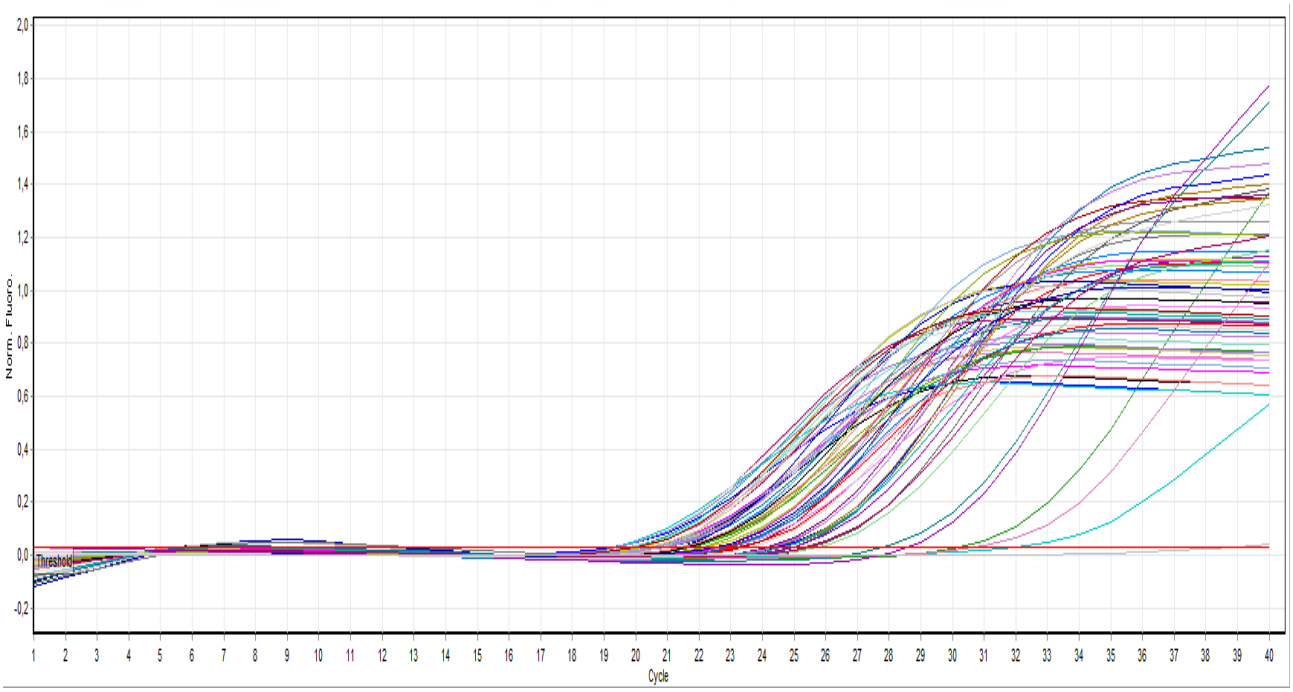
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (ΔΔCt = Hasta Grubu ΔCt – Kontrol Grubu ΔCt) ile hasta ve kontrol grupları arasındaki katlı değişim bulundu.

Çalışma kapsamında veriler tanımlayıcı istatistikler kullanılarak özetlendi. Bu amaçla RNA ekspresyon düzeyleri için ortalama değerler hesaplandı. Bağımsız iki grubu normal dağılım gösteren sayısal değişkenler açısından karşılaştırmak için Student T testi kullanıldı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Ekpresyon Analizi Bulguları

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubu örneklerinin her birinden *UCA1*, *CDK6*, *miR-138* ve normalizayonda kullanılmak üzere *GAPDH, GAPDHP61* ve *RNU6* genlerinin ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. RT-PCR çalışmalarından birine ait amplifikasyon eğrisi şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11. RT-PCR amplifikasyon eğrileri

4.2. Ekspresyon Değerlerinin Karşılaştırılması

RT-PCR çalışmaları sonucunda hasta ve kontrol gruplarına ait elde edilen ortalama Ct ve ortalama delta Ct değerleri Tablo 9'da verilmiştir.

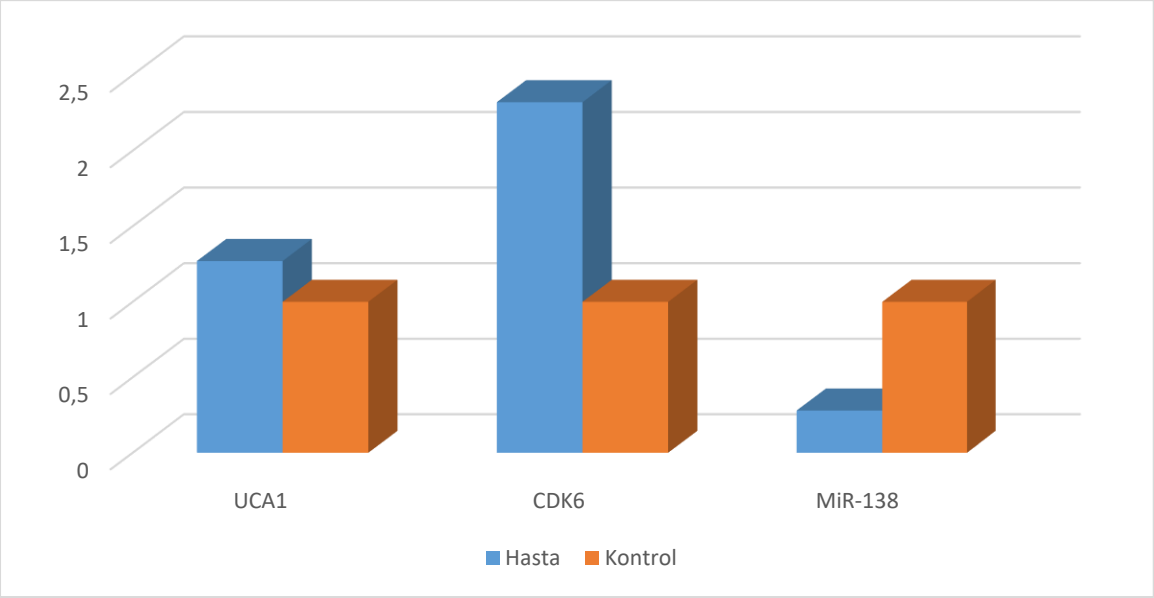
Tablo 9. *UCA1*, *CDK6*, hsa-*miR-138, GAPDH, GAPDHP61* ve *RNU6* için tespit edilen ortalama Ct ve delta Ct değerleri

	Ortalama Ct değerleri		Ortalama delta Ct değerleri (Ct (hedef RNA)- Ct (referans RNA))	
	Hasta grubu	Kontrol grubu	Hasta grubu	Kontrol grubu
UCA1	26,43	27,06	6,95	7,29
CDK6	22,26	23,56	3,59	4,80
miR-138	20,12	20,87	0,88	-1,95
GAPDHP61	14,98	15,97	0	0
GAPDH	20,11	19,76	0	0
RNU6	19,23	22,00	0	0

Hasta ve kontrol gruplarındaki ΔCT değerlerinden kontrol grubunun ortalama ΔCT değerinin çıkartılması ile ΔΔCT değerleri, daha sonra bu değerlerin logaritması alınarak kat değişimi diğer adıyla fold change (kat değişimi, 2 -ΔΔCT) değerleri hesaplandı. Bu değerlerin ortalaması (2 -ΔΔCT) ve Student t testi uygulamasıyla elde edilen p değerleri Tablo 10'de verilmiştir. $P<0.05$ olan ölçümler istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 10. *UCA1*, *CDK6*, hsa-*miR-138*, *GAPDH*, *GAPDHP61* ve *RNU6* için kontrol grubuna kıyasla 'Kat Değişimi' değerleri ve p değerleri

	'Kat Değişimi' ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct$ = Hasta Grubu ΔCt – Kontrol Grubu ΔCt)	P - değerleri
UCA1	**1,27**	**0,354709**
CDK6	**2,32**	**0,080144**
miR-138	**0,28**	**0,254873**
GAPDH	1	N/A
GAPDHP61	1	N/A
RNU6	1	N/A



Şekil 12. Hasta ve kontrol gruplarının kat değişimi değerleri

LSSC ve komşu normal dokularda *UCA1*, *miR-138*, *CDK6* ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. *CDK6*'nın larinks kanserinde kontrole göre kat değişimi Şekil 12'de verilmiştir. *CDK6*'nın kat değişimi kontrole göre larinks kanserinde 2,32 kat artmıştır ($p< 0,08$). İstatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

UCA1'in normal dokulara kıyasla laringeal kanser dokularında 1,27 kat yüksek eksprese edildiği görülmüştür fakat istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte, kanser dokularında normal dokulara göre *miR-138* RNA seviyelerinde 0,28 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 12). İki grup arasındaki miRNA ekspresyon düzeylerindeki farklılık istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

LSCC, nadir fakat ölümcül bir malignitedir. Laringeal skuamöz hücreli karsinom (LSCC), baş ve boyundaki en yaygın malignitelerden biridir (64). Larinks nefes almada, yutkunmada ve seslendirmede anahtar rol oynar ve cerrahi rezeksiyon hastaların ileri evredeki yaşam kalitesi üzerinde büyük etkiye sahiptir. Bu nedenle, LSCC'nin erken tespiti, LSCC'nin moleküler belirteçlerinin araştırılması ve yeni terapötik hedefler çok önemlidir (82). LSCC'nin moleküler mekanizmalarını anlamadaki ilerlemeye rağmen, bu hastalığın etiyolojisi büyük ölçüde hala bilinmemektedir (81). Günümüzde LSCC için prognostik bir biyobelirteç geliştirme çabaları devam etmektedir ama henüz klinikte kullanılabilen bir biyobelirteç elde edilememiştir. Bu çalışma kapsamında LSCC vakalarında lncRNA-miRNA-mRNA ilişkili ekspresyon profilleri incelenerek LSCC vakaları için prognostik önemi olabilecek, tedaviye katkı sunabilecek RNA'ların incelenmesi hedeflenmiştir.

CeRNA ağlarının devasa büyüklüğünün bir sonucu olarak, hesaplama yöntemleri, ceRNA ağlarının inşasında etkili yaklaşımlar haline gelmiştir (103). Mevcut yöntemler iki temel ilkeye dayalı olarak geliştirilmektedir: (1) CeRNA çiftleri yeterli sayıda mikroRNA'yı paylaşmalıdır ve (2) ceRNA çiftleri birlikte ifade edilmelidir. İlk ölçüm için, bir ceRNA çiftinin, ikisi arasında ortak ifadenin önemini değerlendirmek için hipergeometrik tabanlı bir test kullanılır. Hipergeometrik testi kullanmanın arkasındaki mantık, 2 genin herhangi bir biyolojik veya fonksiyonel ilişkisi varsa, bunların şans eseri beklenenden daha fazla sayıda örnekte birlikte eksprese edildiğinin bulunmasıdır. İkincisi için, istatistiksel indeksler iki sınıfa ayrılabilir: (1) Pearson korelasyon katsayısı (PCC) ve karşılıklı bilgi (MI) gibi ikili korelasyon; ve (2) duyarlılık korelasyonu (SI), çoklu duyarlılık korelasyonu ve koşullu karşılıklı bilgi (CMI) (104).

Pearson korelasyon katsayısı (PCC), sabit aralıklı değişkenler arasındaki doğrusal ilişkinin bir ölçümü olarak işlev görmektedir. Korelasyon katsayısının mutlak değeri ne kadar büyükse, iki değişken arasındaki korelasyon o kadar güçlüdür (105). Sıfırdan büyük PCC, pozitif bir korelasyonu temsil ederken, sıfırdan küçük PCC, negatif bir korelasyona işaret etmektedir (105). LSCC'de diferansiyel olarak eksprese edilen RNA'ların potansiyel hedef ilişkisi, PCC temelinde circRNA'lar -

miRNA'lar - mRNA'lar ve lncRNA'lar - miRNA'lar - mRNA'lar ağları daha önceki raporlarda oluşturulmuştur. Buradan yola çıkarak çalışmamızda LSCC'deki RNA hedeflerini tahmin ettik.

Hastalığın tanısal ve prognostik miRNA biyobelirteçlerini tahmin etmek için artan sayıda veri tabanı ve yöntem geliştirilmektedir. Hastalıkla ilişkili miRNA'lardan oluşan bir ağ oluşturmak popüler araştırma stratejileridir. İlk olarak miRcode veritabanı, lncRNA ile miRNA'lar arasındaki etkileşimleri tahmin etmek için kullanılmıştır. MiRcode, 10.000'nin üzerinde lncRNA geni dahil olmak üzere kapsamlı GENCODE gen anotasyonuna dayalı "bütün transkriptome" insan mikroRNA hedef tahminleri sağlar (34). MiRcode web sitesi platformunda ilgili lncRNA ve miRNA'nın adı girilerek miRNA hedefleri bilimsel olarak tahmin edilebilir. Ayrıca, The Cancer Genome Atlas (TCGA) araştırma grubu, büyük miktarda tümör örneğinin çok boyutlu moleküler profillerini depolayan kapsamlı bir kaynak geliştirmiştir (28). Bu veri kümelerinin tümü değerli kaynaklardır ve kanserde ceRNA ağının analizini entegre etme imkanı sağlamaktadır.

Daha sonra miRNA hedefli mRNA'ları almak için miRTarBase, miRDB ve TargetScan veritabanlarını kullanılmıştır. MiRTarBase, ilgili literatürü manuel olarak inceleyerek ve miRNA'ların işlevsel çalışmalarıyla ilgili araştırma makalelerini filtrelemek için metni sistematik olarak inceleyerek toplanan üç yüz altmış binden fazla miRNA hedef etkileşimi biriktiren bir veritabanıdır (34). MiRDB, miRNA hedef tahmini ve işlevsel açıklamalar için çevrimiçi bir veritabanıdır. MiRDB'deki tüm hedefler, yüksek verimli dizi deneylerinden binlerce miRNA-hedef etkileşimini analiz ederek geliştirilen Targetscan tarafından tahmin edilmiştir. TargetScan, her bir miRNA'nın tohum bölgesiyle eşleşen korunmuş 8mer, 7mer ve 6mer bölgelerinin varlığını araştırarak miRNA'ların biyolojik hedeflerini tahmin etmektedir (106,34).

CeRNA düzenlemesindeki anormal değişiklikler de hastalık patogenezine katkıda bulunabilir. Normal ve tümör durumları arasındaki ceRNA aktivitesinin karşılaştırılması, tümörijenezde ceRNA aktivitesinin altında yatan mekanizmanın daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir (83). Sonuç olarak, ceRNA düzenlemesinin normalden tümör durumlarına büyük ölçüde değiştiğini gösteren birçok yayın mevcuttur.

Son yıllarda birçok farklı kanserde önemli bir rol oynadığı ortaya konan bir dizi lncRNA'lar ve miRNA'lar karakterize edilmiştir (84). Son zamanlarda, miRNA'ların mRNA'yı bağlayarak ve

mRNA ekspresyonunu inhibe ederek ceRNA ağında önemli bir rol oynadığını öne süren ceRNA ağı hipotezi dikkat çekmektedir(85). LncRNA'lar ve miRNA'lar arasındaki düzenleyici ağlar birçok tümörde araştırılmıştır. LncRNA'lar, paylaşılan miRNA'lar için rekabet ederek mRNA'larla iletişim kurmak için ceRNA'lar olarak işlev görebilir; diğer yandan miRNA'lar ayrıca lncRNA ekspresyonunu negatif olarak modüle edebilir ve ayrıca bazı lncRNA'lar miRNA'ların seviyesini pozitif olarak düzenleyebilir (85). Bu etkileşimlerin keşfi, kanser tedavisine yeni bir bakış açısı sunmuştur.

Tümör progresyonu, onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin genetik irregülasyonunu içeren çok aşamalı bir süreçtir. LSCC oluşumunun ve gelişiminin altında yatan mekanizmalar hakkında derinlemesine çalışma kritik öneme sahiptir. LSCC ile ilgili gen ekspresyon çalışmalarında, ekspresyonu artan birçok lncRNA'nın, LSCC'nin tümörijenez ve metastazında yer aldığı bildirildi (86). Örneğin, Tai ve arkadaşları, lncRNA *SOX2OT*'nin, metiltransferaz *EZH2* yoluyla *PTEN*'i epigenetik olarak inhibe ederek in vitro ve in vivo LSCC hücre büyümesini desteklediğini ortaya çıkarmıştır (80). Sun ve arkadaşları, lncRNA *UCA1*'in Wnt/β-katenin sinyal yolunu aktive ederek in vitro LSCC hücre çoğalmasını, invazyonunu ve göçünü desteklediğini bildirmiştir (64). Bir başka çalışma ise Liu ve arkadaşları, *LINC00339*'un yıkılmasının, *miR-145* ekspresyonunu düzenleyerek LSCC hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve epitelyal-mezenkimal transizyonunun ilerlemesini inhibe ettiğini göstermiştir (87).

Bugüne kadar birçok çalışmada kanserde lncRNA'ların çoklu işlevleri araştırılmıştır. Ancak lncRNA'ların laringeal karsinom ilerlemesinde bir rolü olup olmadığı belirsizdi. Daha önce, Li ve arkadaşları bir lincRNA *HOTAIR'*ı normal doku ile karşılaştırıldığında LSCC dokusunda önemli ölçüde ekspresyonda artış olduğunu göstermişlerdir (88). *HOTAIR*, *Hep-2* hücrelerinde *PTEN* metilasyonunda rol almıştır (86). Ayrıca, *HOTAIR*'ın ekspresyon seviyesi, özofagus skuamöz hücreli karsinom ilerlemesi ve prognozu ile koreledir (89). *MALAT-1'*in de LSCC'nin progresyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (90). Reis ve arkadaşları ise baş ve boyun kanserlerinin tümörsüz ve tümörlü dokuları arasında büyük ölçekli bir transkriptom analizi üzerinde çalışmışlardır (91).

Çeşitli çalışmalar, çeşitli tümör türlerinde *UCA1*'in anormal ekspresyonunu ve *miR-193a-3p*, *miR-216b*, *miR-16* ve *miR-143* gibi miRNA'lar aracılığıyla bir tümörün ilerlemesinin regülasyonunu ortaya çıkarmıştır (92). Sünger miRNA'ların aksine, *UCA1*, miRNA'lar tarafından

negatif olarak modüle edilebilir. Yakın tarihli bir çalışma, *miR-1*'in *UCA1* ekspresyonunu inhibe ettiğini ve *miR-1*'in yıkılmasının mesane kanseri hücrelerinde *UCA1* up-regülasyonu ile sonuçlandığını bildirmiştir (93) . Ek olarak, *UCA1*, potansiyel bir 'onco-miR' olarak işlev gören ve çoklu tümörlerde up-regüle edilen *miR-196a-5p*'nin ekspresyonunu artırarak tümör büyümesini de destekleyebilir (7).

LncRNA *UCA1*, tipik olarak, bu tümörlerin gelişimini ve ilerlemesini desteklemedeki rolüyle tutarlı olan, farklı tipte malignitelerin tümör dokularında aşırı eksprese edilir (54). Ancak, LSCC'de lncRNA *UCA1*'in ekspresyon paterni çok az çalışmada bildirilmiştir. Sun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, UCA1, LSCC'li hastaların çoğunda komşu sağlıklı dokulara kıyasla tümör dokularında önemli ölçüde up-regüle edilmiştir (64). *UCA1* aşırı ekspresyonu, LSCC hücrelerinin çoğalma, göç ve invazyon yeteneklerini arttırmıştır. Ayrıca, *UCA1*'in Wnt/β-katenin sinyal yolunu aktive ederek LSCC hücrelerinin hücre çoğalmasını, invazyonunu ve göçünü destekleyebileceği sonucuna varılmıştır (64). Bir başka çalışmada, lncRNA *UCA1* ekspresyonunun 30 LSCC dokusunda ve 5 LSCC hücre hattında önemli ölçüde up-regüle edildiği ve *UCA1* ekspresyonunun inhibisyonunun LSCC hücre göçünü ve proliferasyonunu belirgin şekilde azalttığını gözlemlendi, ayrıca bu bulgular önceki bir raporla tutarlıydı (65). Bu çalışmada ayrıca aşırı eksprese edilen homeobox A13 (*HOXA13*)'ün, up-regüle edilmiş *miR185-5p*'nin Tu 177 hücrelerinin göçü ve çoğalması üzerindeki baskılayıcı etkilerini önemli ölçüde azalttığını gözlemlediler; bu, *UCA1*'in, Tu 177 hücrelerinin *miR-185-5p/HOXA13* ekseni yoluyla çoğalmasını ve göçünü düzenlediğini düşündürmektedir (65).

Başka bir kodlayıcı olmayan RNA türü olan miRNA'lar, kanser biyolojisinde de önemli oyunculardır (43). CeRNA hipotezinde açıklandığı gibi, lncRNA'lar miRNA'ları sekestre etmek için ceRNA'lar olarak işlev görebilir, böylece hedef protein kodlayan genlerinin düzenlenmesini bloke edebilir (25). Bu ceRNA modeli, LSCC'de ve diğer birçok kanser türünde tanımlanmıştır (34). *MiR-138*, omurgalılar arasında oldukça korunmuştur ve organogenezde rol oynadığı rol oynadığı gösterilmiştir (69). *MiR-138*'in işlev bozukluğu, çeşitli tümör türlerinde gözlenmiştir. *MiR-138*, dil SCC'de *VIM, ZEB2* ve *EZH2*'yi hedefleyerek epitelyal-mezenkimal geçişi engeller (94). *MiR-138,* HIF-1a ekspresyonunu da inhibe ederek berrak hücreli renal hücreli karsinom hücrelerinde apoptoz artışına ve migrasyonun azalmasına yol açar (95). Ayrıca, *miR-138*'in yakın zamanda tümör büyümesini inhibe ettiği ve siklin D3'ü (*CCND3*) hedefleyerek hepatoselüler karsinomun

hücre siklusunun arrestini bloke ettiği gösterilmiştir (96). Siklin D1'i (*CCND1*) hedefleyerek nazofaringeal karsinom tümör oluşumunu baskıladığı doğrulanmıştır (97). Ek olarak, *miR-138* akciğer kanserinde, tiroid kanserinde ve lösemi dahil olmak üzere birçok tümörde *miR-138*'in downregülasyonu sıklıkla gözlenmiştir (37). *MiR-138*'in, farklı onkogenleri hedef alarak belirli kanser türlerinde genel olarak bir tümör baskılayıcı olarak hareket ettiği bulunmuştur. Yukarıdaki gibi *miR-138*'in tümör baskılayıcı rolüyle uyumlu olarak, bir başka çalışmada, *miR-138*'in glioblastoma multiforme (GBM) tümör büyümesini etkili bir şekilde inhibe ettiğini gösterilmiştir (68).

LSCC büyümesinde *miR-138*'in düzenleyici rolü ve altında yatan mekanizmalar belirsizliğini sürdürmekte ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *TRPM2-AS* /*miR-138*/*SOX4* ekseninde *miR-138*'i aday miRNA olarak seçilmiştir (51). *TRPM2-AS*'nin LSCC hücrelerinde *SOX4* fonksiyonu üzerindeki baskısını ortadan kaldırmak için *miR-138*'i süngerlediğini buldular. Önceki literatürle uyumlu olarak LSCC'de *miR-138*'in downregülasyonu gösterdiler (51). Tümör süpresör olarak tanımlanan *miR-138*'in kanser hücrelerinde down-regüle olduğu, histon metiltransferaz *EZH2*'yi hedeflediği ve kanser hücrelerinin metastazını azalttığı gösterilmiştir (68). *EZH2*'nin çeşitli insan kanser türlerinde destekleyici rolü olduğu bildirilmiştir. *miR-138* ve *EZH2* arasındaki ilişki, NSCLC, glioblastoma, berrak hücreli renal hücreli karsinom ve osteosarkom dahil olmak üzere diğer birçok kanser türünde de rapor edilmiştir (94). Aynı şekilde LSCC hücre hatlarında yapılan bir çalışmada *miR-138*'in LSCC'de önemli ölçüde down-regüle edildiği ve *EZH2* ekspresyonunu ve PI3K/AKT sinyalini inhibe ederek LSCC hücre proliferasyonunda baskılayıcı bir role sahip olduğu ileri sürülmüştür (82). Bu nedenle *miR-138*/*EZH2* etkileşimi, LSCC tedavisi için yararlı bir terapötik hedef haline gelebilir. Bu bulgularla uyumlu olarak, Gao ve arkadaşları, eşleştirilmiş normal laringeal doku ile karşılaştırıldığında LSCC dokularında *miR-138*'in down-regüle edildiğini bildirmiştir (67). Ek olarak, *miR-138*'in *ZEB2* mRNA'sını inhibe ederek metastazları baskıladığını, LSCC hücrelerinin invazyonunu engellediğini bulmuşlar. Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak LSCC örneklerinde *miR-138* düzeylerinde azalma saptanmıştır, ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

CDK ailesinin bir üyesi olan *CDK6*, G1/S hücre döngüsü geçişi sağlayan anahtar düzenleyicidir (79). *CDK6*, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda yüksek oranda eksprese

edilir ve tümör progresyonu ile önemli ölçüde koreledir (76). *CDK6'nın* hücre proliferasyonu, döngüsü, farklılaşması ve metastazı gibi çeşitli hücresel süreçlerde anahtar roller oynadığı bildirilmiştir (77). *CDK6* ekspresyonunun yukarı doğru düzenlendiği ve LSCC'de bir onkogen olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (80).

CDK6, hücre döngüsünün G1/S geçişinde kritik olan bir GBM onkogeni olarak tanımlanmış ve *CDK6*'nın tükenmesi, GBM hücre dizilerinde ve intrakraniyal ksenograftlarda hücre proliferasyonunu ve canlılığını baskılamıştır (98). *CDK6, miR-138*'in doğrudan fonksiyonel hedefi olarak doğrulanmış ve *CDK6*'yı hedefleyerek GBM ve medulloblastom proliferasyonunu inhibe etmiştir (68). Ayrıca, *CDK6* glioma dokularında tümör baskılayıcı özelliği olan *miR-138* ile ters orantılı olduğu not edilmiştir. Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak CDK6 ve miR-138 ters orantılı bulunmuştur.

NEAT1'in LSCC'deki onkojenik rolünü gösteren bir çalışmada, *NEAT1*'in *miR-107* ekspresyonunu inhibe ederek *CDK6*'yı up-regüle ettiği gösterilmiştir (81). Bu sonuçlar, LSCC hücrelerinde *NEAT1* yıkımının LSCC hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu engellerken, *NEAT1* ekspresyon artışı ise *miR-107*'yi baskılayarak LSCC hücrelerinde *CDK6* düzeylerinin artışına sebeb olmuştur (81).

CDK6 ekspresyonunun yukarı doğru düzenlendiği ve LSCC'de bir onkogen olarak işlev gördüğü bir başka çalışmada, *CDKN2B-AS1*, *miR-497/CDK6* eksenini hedefleyerek LSCC progresyonunu desteklemiştir (80). Komşu normal dokulara kıyasla LSCC dokularında *CDK6* ekspresyonunun arttığını ve *CDK6* ekspresyonunun LSCC dokularında *CDKN2B-AS1* ekspresyonu ile pozitif korele olduğunu bulmuşlardır (80). Ayrıca LSCC dokularında ve komşu normal dokularda *miR-497* ekspresyonunun LSCC dokularında komşu normal dokulara göre azaldığını tespit ettiler. Bu sonuçlar, *CDKN2B-AS1*'in LSCC hücrelerinde bir *miR-497* süngeri olduğunu ve böylece *CDK6* ekspresyonunu up-regüle ettiğini göstermiştir. Çalışmamızda, daha önce bildirilen raporlarla uyumlu olarak *CDK6*'nın ekspresyon seviyeleri, komşu sağlıklı dokulara kıyasla tümör dokularında yukarı regüle edilmiştir.

Bu çalışmada, laringeal kanser dokularının ve eşleştirilmiş normal dokuların ekspresyon profillerini karşılaştırmak için PCR teknikleri kullanıldı; bu, LSCC için *UCA1-CDK6-miR-138* ceRNA

ağının ekspresyon profilini sağlayan ilk çalışmadır. Çalışmamızda, LSCC tanılı 30 hasta dahil edilmesi planlandı. Kanserli doku örnekleri ve kontrol olarak da normal komşu doku örneklerinin ekspresyonları kıyaslanmıştır. Kanserli dokularda *CDK6* düzeylerinde artma daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir ama istatistiki olarak anlamlı bulunamamıştır. *UCA1* ve *miR-138* düzeylerinde değişiklik literatürle benzerdir fakat kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Biyobelirteçler, hastalığın başlangıcını, ilerlemesini ve tedavi etkilerini objektif olarak gösterebilen ölçülebilir ve değerlendirilebilir tıbbi markırların bir sınıfıdır (32). Hastalık teşhisi, evrelemesi ve izlenmesi ve klinik prognozu tahmin etmek için güçlü araçlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (32). Biyobelirteçler, erken bir karsinogenez göstergesi sağlayabilirlerse veya kanser ilerlemesinin ve terapötik yanıtın izlenmesini mümkün kılarlarsa, kanser yönetimi için büyük potansiyele sahiptir (90). Bu nedenle, hassas tıp ve sağlık hizmetini teşvik etmek için sistematik bir tarama ve biyobelirteçlerin kanser araştırmalarına uygulanması gereklidir.

Biyobelirteçler olarak ceRNA'ların potansiyeli, ncRNA'ların kan veya idrar gibi vücut sıvılarında veya eksozomlar da dahil olmak üzere hücre dışı veziküllerin içinde bulunması gerçeğiyle daha da artmaktadır; Bu temelde, çeşitli hastalıklarda ncRNA'ların rolü üzerine bir takım araştırmalar ortaya çıkmıştır (99). Bu araştırmada, LSCC vakalarında biyobelirteç olarak ceRNA ağlarının potansiyeli tartışılmaktadır. Çalışmamızda da kanserde biyobelirteç olma potansiyeli taşıyan ceRNA ağlarından biri olan *UCA1*/*miR-138*/*CDK6 ekseni* LSCC dokularında çalışılmıştır.

MiRNA'lar ve lncRNA'lar gibi ceRNA ağının bileşenleri, yapılan çalışmalarda kanser teşhisi ve tedavisi için biyobelirteçler olarak kabul edilmiştir. Örneğin, birçok tümör baskılayıcı genleri negatif olarak modüle eden onkojenik bir miRNA olan *miR-21*, glioblastoma, meme kanseri, akciğer kanseri, mide kanseri ve kolorektal kanser olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde bir biyobelirteç olarak hizmet edebilir (100). Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı idrarda biyobelirteç olarak bakılan lncRNA *PCA3*, prostat kanseri için serum prostat spesifik antijene (PSA) kıyasla daha spesifik ve hassas bir biyobelirteçtir (101). Ayrıca*, BC-819* plazmitine klonlanmış *H19* promotörü ile normal hücreleri etkilemeden tümör hücresi büyümesinin durmasını gösteren *in*

vitro deneylere dayalı olarak, lncRNA *H19* hedefli tedavi için mesane, pankreas ve over kanserli hastalarda faz I/II klinik deneyleri devam etmektedir (102). Benzer şekilde, lncRNA'lar *HOTAIR*, tanısal ve prognostik biyobelirteç olarak hizmet edebildiği birçok kanserde aşırı eksprese edilmeleri ile geniş ölçüde tanımlanmıştır (102). Kanser, tümörijenez sürecinde çeşitli sinyal ağlarının bozulmasından kaynaklanan karmaşık bir hastalıktır; bu nedenle, kanserle ilişkili ceRNA ağları içindeki etkileşimlerin sistematik olarak araştırılması, karsinogenez anlayışımıza daha fazla fayda sağlayacaktır.

LSCC'nin moleküler mekanizmasını anlamak adına *UCA1*/*miR-138*/*CDK6* ekseninin LSCC dokusunda yapılan ilk çalışmasıdır. Ancak bu çalışma, LSCC hücre dizilerinde yapılmamıştır. Mevcut bulguları destekleyecek hayvan deneylerinden ve ileriye dönük klinik çalışmalardan yoksundur. Bu nedenle, bu sinyal yolunun işlevini hayvanlarda olduğu kadar çoklu LSCC hücre dizilerinde daha fazla doğrulamak için gelecekte daha fazla çalışmalar yapılmalıdır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. *UCA1* ekspresyon düzeyleri tümör doku grubunda kontrol olarak kullanılan sağlıklı normal dokuya göre arttığı görülmüştür fakat istatiksel olarak anlamlı değildir.

2. *MiR-138* ekspresyon düzeyleri literatürle uyumlu olarak kanser grubunda kontrollere göre düşük bulunmuştur. Bu değişiklik istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

3. Bir onkogen olarak *CDK6*'nın kanser hücrelerinde aşırı eksprese edildiği literatüre rapor edilmiştir. Kanser grubundaki kontrollere kıyasla görülen ekpresyon artışı saptanmış fakat istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4. LSCC gibi kanserlerde ncRNA ekspresyonunu belirlemek için daha büyük boyutlu, çok merkezli ve daha kaliteli çalışmalar yapılması ve bunun literatüre daha fazla katkı sunması muhtemeldir.

5. Devam eden ve gelecekteki araştırmalar, kanserlerde ncRNA ekspresyonunun transkripsiyonel ve epigenetik düzenleyici mekanizmalarına ve tümör büyümesi ve metastazında ncRNA'lar tarafından düzenlenen moleküller ve sinyal yollarına odaklanması faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Turgut Coşan D, Yağcı E, Kurt H. Epigenetikten Kansere Uzanan Çizgiler: Uzun Kodlamayan RNA'lar. Osman J Med. 2018;40(3):114-21.

2. Liu H, Sun Y, Tian H, Xiao X, Zhang J, Wang Y, vd. Characterization of long non-coding RNA and messenger RNA profiles in laryngeal cancer by weighted gene co-expression network analysis. Aging. 2019;11(22):10074-99.

3. Shen Z, Li Q, Deng H, Lu D, Song H, Guo J. Long Non-Coding RNA Profiling in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance: Potential Biomarkers for LSCC. Ramqvist T, editör. PLoS ONE. 2014;9(9):e108237.

4. Yao F, Wang Q, Wu Q. The prognostic value and mechanisms of lncRNA *UCA1* in human cancer. Cancer Manag Res. 2019;Volume 11:7685-96.

5. Cossu AM, Mosca L, Zappavigna S, Misso G, Bocchetti M, De Micco F, vd. Long Non-coding RNAs as Important Biomarkers in Laryngeal Cancer and Other Head and Neck Tumours. Int J Mol Sci. 2019;20(14):3444.

6. Sun S, Gong C, Yuan K. LncRNA *UCA1* promotes cell proliferation, invasion and migration of laryngeal squamous cell carcinoma cells by activating Wnt/β-catenin signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2019;17(2):1182-1189.

7. Xuan W, Yu H, Zhang X, Song D. Crosstalk between the lnc RNA UCA 1 and micro RNA s in cancer. FEBS Lett. 2019;593(15):1901-14.

8. Ghafouri-Fard S, Shoorei H, Branicki W, Taheri M. Non-coding RNA profile in lung cancer. Exp Mol Pathol. 2020;114:104411.

9. Xun G, Ma M, Li B, Zhao S. MIR -138 and MIR -193 target long non-coding RNA *UCA1* to inhibit cell proliferation, migration, and invasion of lung cancer. Thorac Cancer. 2020;11(9):2681-9.

10. Grégoire V, Grau C, Lapeyre M, Maingon P. Target volume selection and delineation (T and N) for primary radiation treatment of oral cavity, oropharyngeal, hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2018;87:131-7.

11. Colizza A, Gilardi A, Greco A, et al. Carcinosarcomas of the larynx: systematic review of the literature of a rare nosologic entity. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2022;279(3):1167-1173.

12. Obid R, Redlich M, Tomeh C. The Treatment of Laryngeal Cancer. Oral Maxillofac Surg Clin N Am. 2019;31(1):1-11.

13. Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, Higgins KA, Saba NF. An update on larynx cancer: An Update on Larynx Cancer. CA Cancer J Clin. 2017;67(1):31-50.

14. Zhang Q, Wang H, Zhao Q, Zhang Y, Zheng Z, Liu S, vd. Evaluation of Risk Factors for Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: A Single-Center Retrospective Study. Front Oncol. 2021;11:606010.

15. Tang Z, Wei G, Zhang L, Xu Z. Signature microRNAs and long noncoding RNAs in laryngeal cancer recurrence identified using a competing endogenous RNA network. *Mol Med Rep*. 2019;19(6):4806-4818.

16. Goyal N, Hennessy M, Lehman E, et al. Risk factors for head and neck cancer in more and less developed countries: Analysis from the INHANCE consortium. *Oral Dis*. 2022;10.1111

17. Tsiambas E, Mastronikolis N, Fotiades PP, Kyrodi E. c-Jun/c-Fos complex in laryngeal squamous cell carcinoma. *J BUON*. 2020;25(2):618-620.

18. Seebauer CT, Hackenberg B, Grosse J, Rennert J, Jung EM, Ugele I, vd. Routine restaging after primary non-surgical treatment of laryngeal squamous cell carcinoma—a review. Strahlenther Onkol. Mart 2021;197(3):167-76.

19. Bradford CR, Ferlito A, Devaney KO, Mäkitie AA, Rinaldo A. Prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. Laryngoscope Investig Otolaryngol. 2020;5(1):74-81.

20. Ünal Ö. Larinks kanserinin evrelemesinde pre-operatif bt ve radyolog deneyiminin etkisi. 2014;86.

21. Kim DH, Kim Y, Kim SW, Hwang SH. Use of narrowband imaging for the diagnosis and screening of laryngeal cancer: A systematic review and meta-analysis. Head Neck. 2020;42(9):2635-43.

22. Russo F, Fiscon G, Conte F, Rizzo M, Paci P, Pellegrini M. Interplay Between Long Noncoding RNAs and MicroRNAs in Cancer. *Methods Mol Biol*. 2018;1819:75-92.

23. Yang C, Wu D, Gao L, Liu X, Jin Y, Wang D, vd. Competing endogenous RNA networks in human cancer: hypothesis, validation, and perspectives. Oncotarget. 2016;7(12):13479-90.

24. Chan J, Tay Y. Noncoding RNA:RNA Regulatory Networks in Cancer. Int J Mol Sci. 2018;19(5):1310.

25. Cen L, Liu R, Liu W, Li Q, Cui H. Competing Endogenous RNA Networks in Glioma. Front Genet. 2021;12:675498.

26. Li H, Wang FL, Li W, Fei YH, Wang YT, Zhang JE, vd. Aberrant expressed long non-coding RNAs in laryngeal squamous-cell carcinoma. Am J Otolaryngol. 2019;40(5):615-25.

27. Choudhari R, Sedano MJ, Harrison AL, Subramani R, Lin KY, Ramos EI, vd. Long noncoding RNAs in cancer: From discovery to therapeutic targets. *Adv Clin Chem*. 2020;95:105-147.

28. Zhang Y, Xu Y, Feng L, Li F, Sun Z, Wu T, vd. Comprehensive characterization of lncRNA-mRNA related ceRNA network across 12 major cancers. Oncotarget. 2016;7(39):64148-67.

29. Renganathan A, Felley-Bosco E. Long Noncoding RNAs in Cancer and Therapeutic Potential. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1008:199-222.

30. Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. Cell Mol Life Sci. 2016;73(13):2491-509.

31. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. MolCell. 2011 ; 43(6): 904–914.

32. Qi X, Lin Y, Chen J, Shen B. Decoding competing endogenous RNA networks for cancer biomarker discovery. Brief Bioinform. 2020;21(2):441-57.

33. Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. Cancer Res. 2017;77(15):3965-81.

34. Fang XN, Yin M, Li H, Liang C, Xu C, Yang GW, vd. Comprehensive analysis of competitive endogenous RNAs network associated with head and neck squamous cell carcinoma. Sci Rep. 2018;8(1):10544.

35. Wang L, Cho KB, Li Y, Tao G, Xie Z, Guo B. Long Noncoding RNA (lncRNA)-Mediated Competing Endogenous RNA Networks Provide Novel Potential Biomarkers and Therapeutic Targets for Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2019;20(22):5758.

36. Lao TD, Le TAH. MicroRNAs: Biogenesis, Functions and Potential Biomarkers for Early Screening, Prognosis and Therapeutic Molecular Monitoring of Nasopharyngeal Carcinoma. Processes. 2020;8(8):966.

37. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. Trends Mol Med. 2014;20(8):460-9.

38. Li P, Liu H, Wang Z, He F, Wang H, Shi Z, vd. MicroRNAs in laryngeal cancer: implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Am J Transl Res*. 2016;8(5):1935-1944.

39. Ali Syeda Z, Langden SSS, Munkhzul C, Lee M, Song SJ. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. Int J Mol Sci. 2020;21(5):1723.

40. Roy B, Lee E, Li T, Rampersaud M. Role of miRNAs in Neurodegeneration: From Disease Cause to Tools of Biomarker Discovery and Therapeutics. Genes. 2022;13(3):425.

41. Santovito D, Weber C. Non-canonical features of microRNAs: paradigms emerging from cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2022;10.1038/s41569-022-00680-2.

42. Kondkar AA, Azad TA, Sultan T, Radhakrishnan R, Osman EA, Almobarak FA, vd. Polymorphism rs3742330 in microRNA Biogenesis Gene DICER1 Is Associated with Pseudoexfoliation Glaucoma in Saudi Cohort. Genes. 2022;13(3):489.

43. Yu X, Li Z. The role of MicroRNAs expression in laryngeal cancer. *Oncotarget*. 2015;6(27):23297-23305.

44. Frederick MI, Siddika T, Zhang P, Balasuriya N, Turk MA, O'Donoghue P, vd. miRNA-Dependent Regulation of AKT1 Phosphorylation. Cells. 2022;11(5):821.

45. Li S, Wei X, He J, Cao Q, Du D, Zhan X, vd. The comprehensive landscape of miR-34a in cancer research. Cancer Metastasis Rev. 2021;40(3):925-48.

46. Moreno-García L, López-Royo T, Calvo AC, Toivonen JM, de la Torre M, Moreno-Martínez L, vd. Competing Endogenous RNA Networks as Biomarkers in Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci. 2020;21(24):9582.

47. Kong X, Qi J, Yan Y, Chen L, Zhao Y, Fang Z, vd. Comprehensive analysis of differentially expressed profiles of lncRNAs, mRNAs, and miRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma in order to construct a ceRNA network and identify potential biomarkers. J Cell Biochem. 2019;120(10):17963-74.

48. Ala U. Competing Endogenous RNAs, Non-Coding RNAs and Diseases: An Intertwined Story. Cells. 2020;9(7):1574.

49. Yang C, Wu D, Gao L, Liu X, Jin Y, Wang D, vd. Competing endogenous RNA networks in human cancer: hypothesis, validation, and perspectives. Oncotarget. 2016;7(12):13479-90.

50. Liang WC, Fu WM, Wong CW, Wang Y, Wang WM, Hu GX, vd. The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer. Oncotarget. 2015;6(26):22513-25.

51. Wang N, Wang L, Pan X. Long Non-Coding RNA TRPM2-AS Promotes Cell Migration and Invasion by Serving as a ceRNA of *miR-138* and Inducing SOX4-Mediated EMT in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Cancer Manag Res. 2020;Volume 12:7805-12.

52. Wang H, Guan Z, He K, Qian J, Cao J, Teng L. LncRNA *UCA1* in anti-cancer drug resistance. Oncotarget. 2017;8(38):64638-50.

53. Xue M, Chen W, Li X. Urothelial cancer associated 1: a long noncoding RNA with a crucial role in cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2016;142(7):1407-19.

54. Xu T, Yan S, Wang M, Jiang L, Ma P, Lu B, vd. LncRNA *UCA1* Induces Acquired Resistance to Gefitinib by Epigenetically Silencing CDKN1A Expression in Non-small-Cell Lung Cancer. Front Oncol. 2020;10:656.

55. Ghafouri-Fard S, Taheri M. *UCA1* long non-coding RNA: An update on its roles in malignant behavior of cancers. Biomed Pharmacother. 2019;120:109459.

56. Huang J, Zhou N, Watabe K, Lu Z, Wu F, Xu M, vd. Long non-coding RNA *UCA1* promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). Cell Death Dis. 2014;5(1):e1008-e1008.

57. Wang Y, Chen W, Yang C, et al. Long non-coding RNA *UCA1*a(CUDR) promotes proliferation and tumorigenesis of bladder cancer. *Int J Oncol*. 2012;41(1):276-284.

58. Wu W, Zhang S, Li X, Xue M, Cao S, Chen W. Ets-2 Regulates Cell Apoptosis via the Akt Pathway, through the Regulation of Urothelial Cancer Associated 1, a Long Non-Coding RNA, in Bladder Cancer Cells. Dahiya R, editör. PLoS ONE. 2013;8(9):e73920.

59. Maddika S, Ande S, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, vd. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. Drug Resist Updat. 2007;10(1-2):13-29.

60. Hiemer SE, Szymaniak AD, Varelas X. The Transcriptional Regulators TAZ and YAP Direct Transforming Growth Factor β-induced Tumorigenic Phenotypes in Breast Cancer Cells. J Biol Chem. 2014;289(19):13461-74.

61. Wang F, Ying HQ, He BS, Pan YQ, Deng QW, Sun HL, vd. Upregulated lncRNA-*UCA1* contributes to progression of hepatocellular carcinoma through inhibition of miR-216b and activation of FGFR1/ERK signaling pathway. Oncotarget. 2015;6(10):7899-917.

62. Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JFH. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. Mol Cancer. 2013;12(1):152.

63. Fan Y, Shen B, Tan M, Mu X, Qin Y, Zhang F, vd. Long non-coding RNA *UCA1* increases chemoresistance of bladder cancer cells by regulating Wnt signaling. FEBS J. 2014;281(7):1750-8.

64. Sun S, Gong C, Yuan K. LncRNA *UCA1* promotes cell proliferation, invasion and migration of laryngeal squamous cell carcinoma cells by activating Wnt/β-catenin signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2019;17(2):1182-1189.

65. Sun YD, Liu Q, Yang HX, et al. Long non-coding RNA *UCA1* mediates proliferation and metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma cells via regulating miR-185-5p/HOXA13 axis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021;25(3):1366-1378.

66. Zhu Y, Shi LY, Lei YM, Bao YH, Li ZY, Ding F, vd. Radiosensitization effect of hsa-*miR-138*-2-3p on human laryngeal cancer stem cells. PeerJ. 2017;5:e3233.

67. Gao S, Wang J, Xie J, Zhang T, Dong P. Role of *miR-138* in the regulation of larynx carcinoma cell metastases. Tumor Biol. 2016;37(12):15601-6.

68. Qiu S, Huang D, Yin D, Li F, Li X, Kung H fu, vd. Suppression of tumorigenicity by MicroRNA-138 through inhibition of EZH2-CDK4/6-pRb-E2F1 signal loop in glioblastoma multiforme. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis. 2013;1832(10):1697-707.

69. Yeh M, Oh CS, Yoo JY, Kaur B, Lee TJ. Pivotal role of microRNA-138 in human cancers. *Am J Cancer Res*. 2019;9(6):1118-1126.

70. Jin Y, Chen D, Cabay RJ, Wang A, Crowe DL, Zhou X. Role of microRNA-138 as a potential tumor suppressor in head and neck squamous cell carcinoma. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013;303:357-385.

71. Sha HH, Wang DD, Chen D, Liu SW, Wang Z, Yan DL, vd. *miR-138*: A promising therapeutic target for cancer. Tumor Biol. 2017;39(4):101042831769757.

72. Kozaki K ichi, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of Tumor-Suppressive MicroRNAs Silenced by DNA Hypermethylation in Oral Cancer. Cancer Res. 2008;68(7):2094-105.

73. Liep J, Rabien A, Jung K. Feedback networks between microRNAs and epigenetic modifications in urological tumors. Epigenetics. 2012;7(4):315-25.

74. Li J, Xia W, Su X, Qin X, Chen Y, Li S, vd. Species-specific mutual regulation of p53 and *miR-138* between human, rat and mouse. Sci Rep. 2016;6(1):26187.

75. Xu C, Fu H, Gao L, Wang L, Wang W, Li J, vd. BCR-ABL/*GATA1*/*miR-138* mini circuitry contributes to the leukemogenesis of chronic myeloid leukemia. Oncogene. 2014;33(1):44-54.

76. Arslan G, Önkol T, ÖzçeliK AB. Siklin Bağımlı Kinaaz 4/6 ve inhibitörleri. Ank Univ Eczacilik Fak Derg. 2022;193-208.

77. DiPippo AJ, Patel NK, Barnett CM. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer: Past, Present, and Future. *Pharmacotherapy*. 2016;36(6):652-667.

78. Hamilton E, Infante JR. Targeting CDK4/6 in patients with cancer. Cancer Treat Rev. 2016;45:129-38.

79. Chilosi M, Doglioni C, Yan Z, et al. Differential expression of cyclin-dependent kinase 6 in cortical thymocytes and T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemia. *Am J Pathol*. 1998;152(1):209-217.

80. Cui X, Yu T, Shang J, Xiao D, Wang X. Long Non-Coding RNA CDKN2B-AS1 Facilitates Laryngeal Squamous Cell Cancer Through Regulating miR-497/*CDK6* Pathway. OncoTargets Ther. 2019;Volume 12:8853-62.

81. Wang P, Wu T, Zhou H, Jin Q, He G, Yu H, vd. Long noncoding RNA NEAT1 promotes laryngeal squamous cell cancer through regulating miR-107/*CDK6* pathway. J Exp Clin Cancer Res. 2016;35(1):22.

82. Si F, Sun J, Wang C. MicroRNA-138 suppresses cell proliferation in laryngeal squamous cell carcinoma via inhibiting EZH2 and PI3K/AKT signaling. Exp Ther Med. 2017;14(3):1967-74.

83. Shi Y, Yang D, Qin Y. Identifying prognostic lncRNAs based on a ceRNA regulatory network in laryngeal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2021;21(1):705.

84. Tong Y, Peng M, Li J, Niu Y. Comprehensive Analyses of Stromal-Immune Score-Related Competing Endogenous RNA Networks In Colon Adenocarcinoma. Zhang Y, editör. Dis Markers. 2022:1-12.

85. Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? Cell. 2011;146(3):353-8.

86. Shen Z, Li Q, Deng H, Lu D, Song H, Guo J. Long Non-Coding RNA Profiling in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance: Potential Biomarkers for LSCC. Ramqvist T, editör. PLoS ONE. 2014;9(9):e108237.

87. Liu S, Duan W. Long noncoding RNA LINC00339 promotes laryngeal squamous cell carcinoma cell proliferation and invasion via sponging miR-145. J Cell Biochem. 2019;120(5):8272-9.

88. He W, Li D, Zhang X. LncRNA HOTAIR promotes the proliferation and invasion/metastasis of breast cancer cells by targeting the miR-130a-3p/Suv39H1 axis. *Biochem Biophys Rep*. 2022;30:101279.

89. Lv XB, Lian GY, Wang HR, Song E, Yao H, Wang MH. Long Noncoding RNA HOTAIR Is a Prognostic Marker for Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression and Survival. Aziz SA, editör. PLoS ONE.2013;8(5):e63516.

90. Chen FJ, Sun M, Li SQ, et al. Upregulation of the long non-coding RNA HOTAIR promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. *Mol Carcinog*. 2013;52(11):908-915.

91. Reis EM, Ojopi EPB, Alberto FL, Rahal P, Tsukumo F, Mancini UM, vd. Large-scale Transcriptome Analyses Reveal New Genetic Marker Candidates of Head, Neck, and Thyroid Cancer. Cancer Res. 2005;8.

92. Nie W, Ge H juan, Yang X qun, Sun X, Huang H, Tao X, vd. LncRNA-*UCA1* exerts oncogenic functions in non-small cell lung cancer by targeting miR-193a-3p. Cancer Lett. 2016;371(1):99-106.

93. Chang YN, Zhang K, Hu ZM, et al. Hypoxia-regulated lncRNAs in cancer. *Gene*. 2016;575(1):1-8.

94. Zhu Z, Tang J, Wang J, Duan G, Zhou L, Zhou X. *miR-138* Acts as a Tumor Suppressor by Targeting EZH2 and Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis in Osteosarcoma Cells. Ahmad A, editör. PLOS ONE. 2016;11(3):e0150026.

95. Song T, Zhang X, Wang C, et al. *miR-138* suppresses expression of hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) in clear cell renal cell carcinoma 786-O cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(5):1307-1311.

96. Huang B, Li H, Huang L, Luo C, Zhang Y. Clinical significance of microRNA 138 and cyclin D3 in hepatocellular carcinoma. J Surg Res. 2015;193(2):718-23.

97. Liu X, Lv XB, Wang XP, Sang Y, Xu S, Hu K, vd. *miR-138* suppressed nasopharyngeal carcinoma growth and tumorigenesis by targeting the CCND1 oncogene. Cell Cycle. 2012;11(13):2495-506.

98. Alonso MM, Fueyo J, Shay JW, Aldape KD, Jiang H, Lee OH, vd. Expression of Transcription Factor E2F1 and Telomerase in Glioblastomas: Mechanistic Linkage and Prognostic Significance. JNCI J Natl Cancer Inst. 2005;97(21):1589-600.

99. Chen JS, Wang YF, Zhang XQ, et al. H19 serves as a diagnostic biomarker and up-regulation of H19 expression contributes to poor prognosis in patients with gastric cancer. *Neoplasma*. 2016;63(2):223-230.

100. Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Cancer: Opportunities and Challenges. BioMed Res Int. 2015;2015:1-17.

101. Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. Mol Cancer. 2007;6(1):25.

102. Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, vd. Long Noncoding RNA *HOTAIR* Regulates Polycomb-Dependent Chromatin Modification and Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancers. Cancer Res. 2011;71(20):6320-6.

103. Wen X, Gao L, Song T, Jiang C. CeNet Omnibus: an R/Shiny application to the construction and analysis of competing endogenous RNA network. BMC Bioinformatics. 2021 Feb 18;22(1):75.

104. Song Y, Li J, Mao Y, Zhang X. ceRNAshiny: An Interactive R/Shiny App for Identification and Analysis of ceRNA Regulation. Front Mol Biosci. 2022 May 13;9:865408.

105. Liu S, Xie X, Lei H, Zou B, Xie L. Identification of Key circRNAs/lncRNAs/miRNAs/mRNAs and Pathways in Preeclampsia Using Bioinformatics Analysis. Med Sci Monit. 2019 Mar 5;25:1679-1693.

106. Zhao R, Li FQ, Tian LL, Shang DS, Guo Y, Zhang JR, Liu M. Comprehensive analysis of the whole coding and non-coding RNA transcriptome expression profiles and construction of the circRNA-lncRNA co-regulated ceRNA network in laryngeal squamous cell carcinoma. Funct Integr Genomics. 2019 Jan;19(1):109-121.