



PRİMER VE METASTATİK MEME VE KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA HİPOKSİK KOŞULLARDA EKSOZOMAL miRNA VE lncRNA İÇERİĞİNİN METASTAZDAKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

¹Neslihan Nur GÜRİSOY, ²Hilal Kabadayı ENSARİ, ³İbrahim Halil GÜRÇİNAR,

²Hafize Seda VATANSEVER

¹Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dönem VI Öğrencisi, Manisa, Türkiye

²Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Manisa, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi AD, İstanbul, Türkiye

Özet
Giriş: Eksozomlar; hücreler arası iletişimde rol oynayan ve çeşitli proteinler, DNA, mRNA, miRNA vb. içeren ekstrasellüler veziküllerdir. Eksozomların; anjiogenez, kanser hücrelerinin devamlılığı ve/veya metastazı, bağışıklık sistemi regülasyonu gibi hücrel bir çok mekanizmada rol oynadığı bilinmektedir. Yetersiz oksijen durumu olan hipoksi ile birlikte HIF aktivasyonu sayısız genin transkripsiyonunu değiştirerek bir çok tümör mikroçevresinde oluşur. Hipoksik yanıt; anjiyogenez, epitelyal-mezenkimal geçiş, metastaz ile ilişkili genlerin ekspresyonu, hücrelerin hayatta kalmasını ve hücrelerin hipoksik koşullara adaptasyonunu düzenleyen hücre içi sinyallerden sorumlu tutulmuştur. Yapılan araştırmalarda, çeşitli miRNA ve lncRNA'ların hipoksik koşullardaki artışı ile meme kanseri metastazında ve agresifliğinde rol alan kodlamayan RNA'lar olduğu da bildirilmiştir. Ancak hipoksik koşullar altında bir haberci rolü üstlenen eksozomlardan salgılanan farklı miRNA ve lncRNA'ların metastatik süreçteki rolleri net değildir. Primer ve metastatik hücreleri daha iyi sınıflandırmak ve prognostik ön tanıya destek sağlayacak yeni prognostik belirteçlere ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, primer meme (MCF-7) ve kolon (Colo-320) ile metastatik meme (M4A4) ve kolon (Colo-741) kanser hücre hatlarının in vitro hipoksik (%3 O₂) ve normoksik ortamda eksozom içeriğindeki miRNA ve lncRNA'ların varlığının tespiti ve metastazdaki rollerinin araştırılması amaçlandı.

Method: Projede Primer İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı (COLO-320), metastatik insan kolon kanseri hücre hattı (COLO-741), meme kanseri primer (MCF-7) ve metastatik (M4A4) hücre hatları kullanıldı. Hücreler hipoksik ve normoksik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılarak kültür vasatları toplandı ve miRCURY™ Exosome Isolation Kiti ile eksozomlar elde edildi. Hipoksi ile ilişkili olan miR21, metastaz ve agresiflikte rol aldığı düşünülen miR221, ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemi ile analiz edildi.

Sonuç: Normoksik ve hipoksik şartlarda kültüre edilen Colo320, Colo741, MCF7 ve M4A4 hücrelerinin kültür vasatlarındaki eksozomların eldesi sonrasında normoksik koşullarda Colo320 hücrelerden elde edilen eksozomlardaki total RNA miktarının 2.25 ng/µL olduğu, hipoksi uygulaması sonrasında ise total RNA miktarının azaldığı ve 1.54 ng/µL olduğu saptandı. Colo741 hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullardaki eksozomal total RNA miktarlarının benzer olduğu ve sırasıyla 4.19 ng/µL ve 4.34 ng/µL olduğu görüldü. MCF7 hücrelerinde de normoksik (0.6 ng/µL) ve hipoksik (0.86 ng/µL) koşullardaki eksozomal total RNA miktarlarının benzer olduğu izlendi. M4A4 hücrelerinde ise normoksik koşullarda 2.96 ng/µL olan eksozomal total RNA miktarının hipoksi sonrası artarak 3.7 ng/µL olduğu izlendi. Tüm hücre gruplarına bakıldığında ise normoksik şartlarda en fazla eksozomal total RNA miktarının Colo741 hücrelerinde iken, en az eksozomal total RNA miktarının MCF7 hücrelerinde olduğu izlendi. Normoksik ve hipoksik şartlarda kültüre edilen Colo320, Colo741, MCF7 ve M4A4 hücrelerinin kültür vasatlarındaki eksozomların eldesi sonrasında hedef gen olarak belirlenen miR-21 ve MiR-221 analizleri sonrasında miR-221 'in normoksik koşullarda Colo320 ve M4A4 hücrelerinde saptanır iken, hipoksik koşullarda sadece MCF7 hücrelerinde gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Kanser, noncoding RNA, eksozom