T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Timokinonun Meme Kanseri Hücrelerinin miRNA Düzeylerine Etkisi

Yasemin KAHVECİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

KONYA-2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Timokinonun Meme Kanseri Hücrelerinin miRNA Düzeylerine Etkisi

Yasemin KAHVECİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14202019 Proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK yönetiminde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Hem çalışma hayatımda hemde yükseklisans dönemimde bana sunduğu fırsatlar için ona sonsuzadek borçlu kalacağım ve hiç bir zaman hakkını ödeğemiceğim değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Ali ÜNLÜ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren ve her daim bana sabır gösterip yardımcı olan değerli danışmanım Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımda katkıda bulunan ve ilgisini esirgemeyen manevi desteğiyle yanımda olan ve çalışmalarıma yaptığı katkıları için de Doç.Dr. Hüsamettin VATANSEV'e ve tez çalışmalarımda yardımcı olan derin bilgisi ile her konuda yardımcı olan Yük. Biyolog Ş.Buket Bozkurt'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Kahraman TANRIVERDİ ve Toros gen çalışanlarına teşekkür ederim.

Eğitimim esnasında bana destek ve emek veren Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyesi hocalarıma, araştırma görevlilerine, özellikle laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Arş. Gör. E.Nedime KORUCU, Yük. Kimyager Gülsüm TEKİN, Yük. Gıda Müh. Hakan VATANSEV'e çok teşekkür ederim.

Son olarak, her zaman olduğu gibi bu süreçte de moral ve motivasyon sağlayan başta annem, olmak üzere tüm aileme, Sibel ERDOĞAN ve Özden GÜVEN'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ 1
1.1. Kanser 4
1.2. Apopitoz 4
1.3. Meme Kanseri 6
1.3.1. Meme Kanseri ile İlgili Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler 6
1.3.1.1. Büyüme Faktörü Reseptörleri 7
1.3.1.2. Sinyal İletimi ile İlişkili Genler 7
1.3.1.3. Meme Kanserinde Etkili Diğer Genler 8
1.3.1.4. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri 8
1.3.1.5. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı 8
1.4. Timokinon (TQ) 9
1.5. MikroRNA (miRNA) 10
1.5.1. MikroRNA'ların Biyogenezi 10
1.5.2. MikroRNA'ların İşlevleri 13
1.5.3. Meme Kanseri ve miRNA'lar 14
1.5.4. Hücre siklusunun ilerlemesinde rol alan miRNA'lar 15
1.5.5. Meme Kanserindeki Tümör Süpresör miRNA'lar 17
1.5.6. Meme Kanserindeki Onkogenik miRNA'lar 23
1.5.7. Meme Kanserindeki Metastatik miRNA'lar 25
2. GEREÇ ve YÖNTEM 28
2.1. Gereçler 28
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar 28
2.1.2.Cihazlar ve Laboratuvar gereçleri 29
2.2. Metod 30
2.2.1.Hücre Kültürü 30
2.2.2. RT-PCR Yöntemiyle Çalışma Yöntemi 30
2.2.2.1. Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu 30
2.2.2.2. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi 31
2.2.3.3.miRNA Ekspresyonlarının Biomark Real-Time PCR (Fluidigm) Cihazı ile Belirlenmesi 34
3. BULGULAR 36
3.1.Real-Time PCR bulguları 36

4.TARTIŞMA 41
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 47
6. KAYNAKLAR 48
7.EKLER 54
8. ÖZGEÇMİŞ 55

SİMGELER ve KISALTMALAR

143B	Malign kanser hücre serisi
Akt	Protein kinaz
α-Tomatin	Steroid yapılı bir glikoalkoloid
ALT	Alanin aminotransferaz
BRCA1	Meme kanserine yatkınlık geni 1
BRCA2	Meme kanserine yatkınlık geni 2
BT-474	Meme kanseri hücre serisi
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CerbB-2 (Her2/neu)	Büyüme faktörü reseptörü
COX	Siklooksijenaz
CsA	Siklosporin A
DCIS	İnvaziv olmayan duktal karsinom
DIM	Di-indol metan
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle vasatı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DOX	Doksorubisin
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	Östrojen reseptörü
FBS	Fetal bovin serum
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HaCaT	Malign olmayan meme kanseri hücresi
HeLa	Serviks kanseri hücre serisi
Hep G2	Karaciğer kanseri hücre serisi
HER	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HF	İnsan deri fibroblast hücre serisi
HL-60	Lösemi hücre serisi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromotografisi
HS-1793	Resveratrol türevi bir madde
HT-29	Kolon kanseri hücre serisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü
IC_{50}	Hücrelerin %50'sinin çoğalmasını baskılayan doz

IDC	İnvaziv duktal karsinom
ILC	İnvaziv lobüler karsinom
IR	İyonize radyasyon
İNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KBM-5	Lösemi hücre serisi
KB-V1 / Vbl	Serviks kanseri hücre serisi
KOH	Potasyum hidroksit
LCIS	İnvaziv olmayan lobüler karsinom
MAPK	Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz
MCF-7	Meme kanseri hücre serisi
mRNA	Mesajcı RNA
μM	Mikromolar
MTT	Toksisite değerlendirme metodu
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
NaOH	Sodyum hidroksit
NB4	Lösemi hücre serisi
NCI	Uluslararası kanser enstitüsü
NF-kB	Nükleer faktör kappa B
NIH/3T3	Malign olmayan meme kanseri hücresi
NP	Nanopartikül
NQO1	NADPH kinon oksidoredüktaz bir
ORF	Open reading frame
P1	Pürinoseptör
PBS	Fosfat tamponlu Tuz
PPAR	Peroksizom çoğaltıcısı ile uyarılan reseptör
PR	Progesteron reseptörü
PTEN	Tümör baskılayıcı gen
RNA	Ribo nükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
STZ	Streptozotosin
T-47D	Meme kanseri hücre serisi
TAM	Tamoksifen
TCA	Tümör kemo-duyarlılık testi

TG	Trigliserit
Tm	Melting temperature
TNF	Tümör nekroz faktörü
TQ	Timokinon
TQRF	Yüksek fraksiyonlu timokinon

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Timokinonun Meme Kanseri Hücrelerinin mirRNA Düzeylerine Etkisi

Yasemin Kahveci
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2015

Nigella Sativa (Çörek otu)'nın en önemli biyoaktif bileşeni olan timokinon ($C_{10}H_{10}O_2$; 2–izopropil-5-metil-1,4–benzokinon), hücre kültürü ve deneysel hayvan çalışmaları temelli antikanser özellikleri sergiler. Ancak, bu etkilerinin moleküler etki mekanizmaları net değildir. Bu çalışma, MCF7 insan meme kanseri hücresi miRNA'ları profilleri üzerine TQ uygulamasının etkilerini incelemektedir

Çalışmamızda, MCF-7 hücreleri timokinonun farklı dozları (5,25,50 uM) ile 70. saatte muamele edildi. Daha sonra total RNA, Roche yüksek saf miRNA İzolasyon Kiti (Roche Diagnostics) kullanarak izole edildi ve hücre lizatlarından cDNA sentezlendi. Gerçek zamanlı qPCR için 84 adet miRNA ekspresyonu, BioMarkTM 96,96 Dynamic Array (Fluidigm Corporation) ile saptanmıştır. İstatistiksel analiz Biogazelle en qase Plus 2,0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Göreceli gen ekspresyonu değerlerinin tayini 2-ΔΔCt yöntemi (numunenin normalize edilmiş Ct (eşik döngüsü) değeri- kontrolün normalize edilmiş Ct değeri) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel analizler sonucunda, kontrol grubuna kıyasla 84 miRNA'nın 12 tanesi farklı şekilde (fold regulation <2, fold regulation>2, $p<0.05$) eksprese edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla TQ uygulanan gruptaki miRNA'lardan 10 tanesi downregule (hsa-miR-1, let 7c-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-mir-202-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-98-5p) ve 2 tanesinin upregule (hsa-miR-22-3p, hsa-miR-132-3p) olduğu saptanmıştır.

Özelleştirilmiş veri tabanları kullanarak hesaplanan analizlere göre (DIANA miRPath v.2.0), PI3 kinaz/AKT (hsa04151), Wnt (hsa04310), MAPK (hsa04010) ve p53 (hsa 04115) sinyal yollakları (KEGG yolak numarası) bu miRNA grubunun temel hedefleri olduğu gibi görünmektedir. Bu bulgular, MCF-7 hücrelerinin miRNA profillerine TQ'nun etkilerini vurgulamaktadır ve daha ileri çalışmalara yardımcı olabilir.

Anahtar Sözcükler: MCF-7; miRNA; timokinon.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effect of Breast Cancer Cells Thymoquinone miRNA Levels

Yasemin Kahveci
Department of Medical Biochemistry

KONYA-2015

Thymoquinone (TQ), which is the most bioactive component of Nigella sativa (Black cumin),exhibits anticancer characteristics based on cell culture and experimental animal studies. However, molecular action mechanisms of these effects are not clear. This study investigates the effects of TQ treatment on MCF7 human breast cancer cell miRNAs profiles.

In our study, MCF7 cells were treated with different doses of TQ (5, 25, 50 μM) for 70 hours. Then total RNA was isolated by using Roche High Pure miRNA Isolation Kit (Roche Diagnostics) and cDNA was synthesized from cell lysates. The expressions of 84 miRNAs were determined by The BioMarkTM 96.96 Dynamic Array (Fluidigm Corporation) for real-time qPCR. Statistical analysis was performed using the Biogazelle's qbase PLUS 2.0 software. Determinations of relative gene expression values were carried out by using the 2-ΔΔCt method (normalized threshold cycle (Ct) value of sample minus normalized Ct value of control).

As a result of the statistically analysis, twelve of 84 miRNAs have been differentially expressed compared to control group (fold regulation <2, fold regulation>2, $p<0.05$). It was established that 10 miRNAs were down-regulated (hsa-miR-1, let 7c-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-mir-202-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-98-5p) and 2 miRNAs were up-regulated (hsa-miR-22-3p, hsa-miR-132-3p) in TQ's groups, comparing with control group.

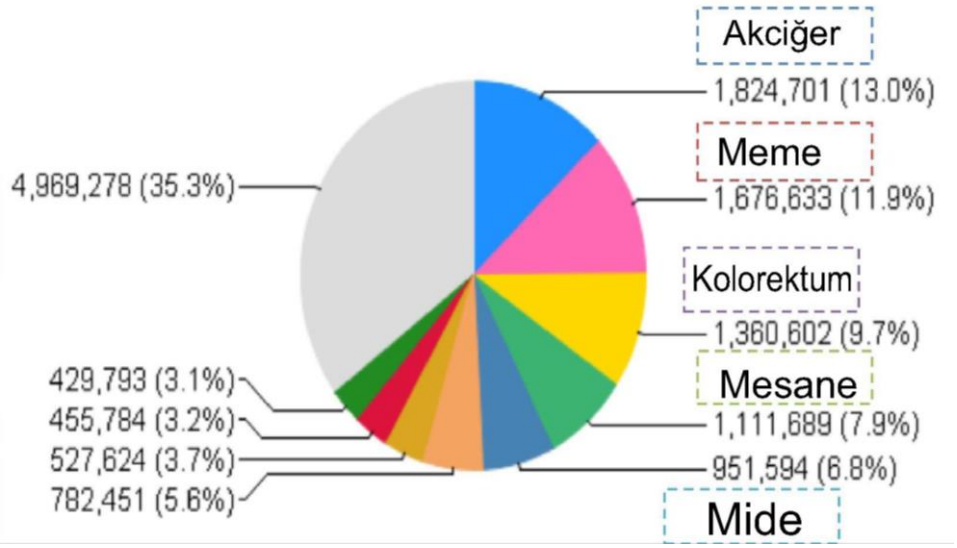
According to computational analyses using specialized databases (as DIANA miRPath v.2.0); PI3 kinase/AKT (hsa04151), Wnt (hsa04310), MAPK (hsa04010) and p53 (hsa 04115) signaling pathways (KEGG pathway number) seem to be the key targets of these miRNA group. Thesefindings highlight the effects of TQ to miRNA profiling of MCF7 cells and may be helpful for further studies.

Keywords: MCF-7; miRNA; thymoquinone.

1. GİRİŞ

Kanser değişik organlarda hücrelerin kontrolsüz çoğalmasından oluşan, klinik görünümü, tedavisi ve yaklaşımı birbirinden farklı olan bir hastalıklar grubudur. Kanserin kontrol altına alınması hususunda önceliklerin belirlenebilmesi için kanser yükünün insidansının bilinmesi gerekmektedir. Kanser gelişmiş ülkelerde ölüm nedenin ilk sıralarında gelmektedir(Lindsey ve ark 2012).

Yeni tahminlere göre Dünya'da yeni tanı alan kanserli hasta sayısı ve kanserden kaynaklanan ölümler bir önceki tahminlere göre artmıştır. GLOBOCAN 2012 verilerine göre 2012 yılında Dünya'da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Dünya'da en çok tanı konulan kanserler akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) iken kanserden ölümlerin ise en çok akciğer (%19,4), karaciğer (%9,1) ve mideden (%8,8) gerçekleştiği belirtilmiştir(GLOBOCAN 2012).



Şekil 1. Uluslararası kanser ajansı kanser dağılma grafiği(GLOBOCAN-2012) (http://globocan.iarc.fr/Default.aspx)

Bu şekilde kanser artış hızının devam etmesi durumunda, Dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2025 yılında toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir. Gerek kanser vakalarının (%56,8) gerekse de kanserden kaynaklanan ölümlerin (%64,9) yarısından fazlasının az gelişmiş ülkelerde olduğu gösterilmiştir.

Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) özellikle meme kanserindeki artışa dikkat çekmiştir. Kadınlarda meme kanser insidansının bir önceki tahminlere göre %20, meme kanserinden ölümlerin ise %14 arttığını belirtmiştir. Meme kanseri kadın kanserleri içinde en fazla görülen ve en fazla ölüme neden olan kanserdir. Dünyada kanser olan her 4 kadından biri meme kanseridir. Uluslararası Kanser Ajansı Başkanı Dr.Wild meme kanserinin özellikle yaşam koşullarındaki değişiminden kaynaklandığını ifade etmiştir. Meme kanseri insidansı gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksek, meme kanserinden ölüm ise gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha düşüktür. Dr.Wild, bu durumun az gelişmiş ülkelerde yaşayan kadınların meme kanseri teşhis, tarama ve tedavi hizmetlerine ulaşmaktaki sıkıntıdan kaynaklandığını belirtmiştir. Bu yüzden, özellikle az gelişmiş ülkelerde meme kanserinin erken teşhis, tarama ve tedavisine yönelik çabaların arttırılması gerekliliği üzerinde durmuştur(Lindsey ve ark 2012).

Nigella sativa (Çörek otu), çoğu ortadoğu ve uzak doğu ülkelerinde 2000 yılı aşkın süredir birçok hastalığın tedavisinde kullanılan şifalı bir bitki olarak tanımlanmaktadır. Halk arasında bilinen adıyla çörekotu, Nigella sativa türü bitkilerin kapsül içerisinde oluşan tohumudur. Tohumlar ortalama % 36 – 38 oranında sabit yağ, protein, alkoloid, saponin ve % 0,4 – 2,5 oranında uçucu yağ içerir (Ali ve ark 2003). Nigella sativa'nın uçucu yağı Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analizlenmiş ve temel bileşenlerinin timokinon (TQ), ditimokinon(DTQ), timohidrokinon (THQ) ve timol (THY) olduğu saptanmıştır. Çörekotu uçucu yağının temel biyoaktif bileşeni timokinondur ($C_{10}H_{12}O_2$; 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon) (Salem 2005).TQ'un antikanser etkisi çeşitli kanser hücresi serilerinde ve hayavan deneylerinde in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir.

miRNA’lar küçük, kodlanmayan RNA molekülleridir. Bir ya da birden fazla hedef geni baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi süreçlerde rol oynarlar. miRNA’lar protein kodlayan genlerin eksonik ve intronik bölgelerinde ve genler arası bölgelerde bulunabilirler. miRNA genlerinin %50’sinden fazlası kanser ile ilişkilendirilmiş genom üzerindeki bölgelerde veya kırılgan bölgelerde bulunur; bu durum da miRNA’ların neoplazi patojgenezinde önemli rolleri olduğuna işaret eder.

Bazı miRNA’lar epigenetik mekanizmalarla kontrol edilirken, bazıları da doğrudan veya dolaylı olarak epigenetik mekanizmada rol oynayan faktörleri hedef alırlar. miRNA’ların işlevsel önemlerinin tam olarak anlaşılabilmesi ve tanı veya tedavi amaçlı kullanımlarının gerçekleşebilmesi için hedeflerine nasıl bağlandıklarının ve gen ifadesini farklı seviyelerde nasıl düzenlediklerinin belirlenmesi gerekmektedir (Gebeshuber ve ark 2009).

Meme kanserine karşı önemli sayıda tedavi stratejisi bulunmasına rağmen bu patoloji dünya çapında büyük bir halk sağlığı yükü olmaya devam etmektedir. Bu nedenle meme kanserinin tedavisi ve ilerlemesinin önlenmesi için yeni stratejiler geliştirmek önemlidir. Meme kanseri hiç belirti ve bulgu vermeden ilerleyebildiği gibi, belirtileri, gelişimi ve sonuçları hastadan hastaya göre farklılık göstermektedir. Dünya üzerinde her yıl milyonlarca kadının meme kanseri tanısı aldığı günümüzde miRNA'lar, meme kanserinin sadece erken dönemde teşhisi ve hastalığın prognozunda değil aynı zamanda moleküler esaslı kanser tedavilerinde de yakın gelecekte etkili bir ajan olmaya aday gözükmektedir. Bütün bu bilgiler ışığında meme kanserine spesifik miRNA’ların belirlenmesi ve etkili oldukları hücresel yolaklardaki baskın mekanizmalarının belirlenmesi önem taşımaktadır.

Çalışmamızda meme kanseri MCF-7 hücre hattını TQ ile muamele edilerek miRNA ekspresyon düzeylerinde TQ’nun ortaya konması amaçlanmıştır. TQ uygulanmış ve uygulama neticesinde miRNA paneline(as DIANA miRPath v.2,0) bakılmış ve elde edilen miRNA’larımız PI3 kinase/AKT (hsa04151), Wnt (hsa04310), MAPK (hsa04010) ve p53 (hsa 04115) sinyal yollaklarında(KEGG pathway number) kanserin hücre siklüsüne, apopitoz, poliferasyon ve DNA transkripsiyonunu etkilediği gözlenmiştir.

1.1. Kanser

Kanser, vücuttaki bir hücre veya hücre grubunun iç ve dış etkilerle farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu meydana gelmektedir. Kanser hücreleri, komşu normal hücrelere göre daha hızlı çoğalırlar. Normal hücrelerin bölünmesi belli bir zaman sonra dururken, kanserli hücrelerin bölünmesi hiçbir zaman durmaz. Bulundukları yerden başka bölgelere kan veya lenf damarları ile taşınarak metastaz oluştururlar (Hanahan ve Weinberg 2000). Normal hücrelerde hücre çoğalması ile apopitoza bağlı hücre kayıpları arasında uyumlu bir denge vardır. Kanserli hücrelerde bu denge bozularak kontrol mekanizması kaybolur (Ruddon 2010). Vücudun değişik yerlerine taşınan kanserli hücreler invazyon yaparak organizma organlarına zarar verirler. Taşındıkları yerlerde kanserli hücreler büyüdükçe tümör kolonileri oluşturarak büyümeye devam ederler (Ringer ve ark 2014).

1.2. Apopitoz

Apopitoz (programlı hücre ölümü) ve nekroz memeli hücrelerini ölüme götüren iki önemli olaydır. Normal fizyolojik şartlarda, hasarlı veya yaşlı hücreler, apopitoz olarak adlandırılan, genetik olarak düzenlenen bir hücre ölüm programıyla kendi kendilerini öldürür, yani apopitoz; gelişim, homeostaz ve patojenezde önemli rol oynayan hücre intihar mekanizmasıdır (Hu ve ark 2002).

Apopitoz organizmada doğru bir şekilde işlemelidir. Ölmesi gereken hücrelerimiz zamanında ve gerekli sayıda ölmelidir. Bir şekilde hızlanmış veya yavaşlamış bir apopitoz patolojiktir. Programdaki bozukluğun neden olduğu aşırı hücre artışı kanser ve otoimmün hastalıklara, hücre azalışı ise AIDS ve nörodejenaratif hastalıklara neden olmaktadır. Apopitozun özellikle embriyonun gelişim ve farklılaşma işleminde de rolünün vazgeçilmez olduğu bilinmektedir (Krauss 2001).

Apopitozun diğer bir fonksiyonu hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin yıkımını sağlamasıdır. Bu tip hücreler mutasyon birikimine uğramadan ve bir tümör hücresine dönüşmeden önce apopitotik program ile öldürülmektedirler (Krauss 2001).

Hücre ölüm şekli olan apopitoz ve nekroz mekanizmaları arasında belirgin farklar olduğu ilk kez Kerr ve arkadaşları (1972) tarafından anlaşılmıştır. Nekroz, akut hasarda görülen, fizyolojik olmayan bir durumdur. Nekrotik hücrelerde şişme, sitoplazma organellerinin dağılması, hücre membranının bozulması ve patlaması karakteristik

özelliklerdir. Dokunun nekroza verdiği cevap ise inflamasyon oluşumu tarzındadır(David ve ark 1994). Apopitoza giden hücreler büzüşür, hücreler arası bağlantılarını kaybeder, yoğunlaşır, kromatin parçalanır ve küçük apoptotik cisimler oluşturmak üzere yıkılır. Apopitotik cisimler makrofajlar tarafından fagosite edilir, bu nedenle inflamasyon görülmez.

Apopitotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu durum ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir.

Apopitozun genetik ve moleküler mekanizmaları 1980'lerin sonunda bir nematod solucanı olan Caenorhabditis elegans'da, tam olarak 131 hücrenin öldürülüp 959 tanesinin kalmasıyla ortaya çıkarıldı (Plesnila ark 2001). Burada, apoptozda birbirini izleyen dört basamak vardır;

1. Hücre dışı ve hücre içi faktörlerin uyardığı hücre ölümü için hücrenin programlanması.

2. Kaspazlar (Sistein aspartik asit-özgün proteaz) olarak adlandırılan hücre içi proteazların aktivasyonuyla hücre ölümü ya da idamı.

3. Makrofajlar tarafından apoptotik cisimlerin fagositozu.

4. Apopitotik cisimlerin lizozomal yıkılması.

Apopitoz mekanizması çok sayıda ve çeşitte modülatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Apopitotik süreç boyunca hücre içine sürekli Ca^{+2} girişi gerçekleşir. Buna rağmen hücreye Ca^{+2} girişi apoptozisin gerçekleşmesi için her zaman gerekli değildir. Hücre kültürü çalışmaları çeşitli uyarılara karşı apoptotik yanıtı p53'ün indüklediğini ve bcl-2'nin baskıladığını açıkça göstermektedir (Pan ve ark 1997, Korsmeyer ve Zinkel 2001). Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik, apoptozu indükleyici etkiye sahiptir. Diğeri ise anti-apoptotik apoptozu baskılayıcı etkiye sahiptir. Pro-apopitotik olanlar, sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom C salıverilmesinin baskılarlar. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Apopitotik süreçte

kritik, geri dönülemez aşama mitokondrinin aktivasyonudur. Apopitozu başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür(Korsmeyer ve Zinkel 2001, Alles ve ark 1991).

1.3. Meme Kanseri

Meme kanseri, bütün dünyada kadınlar arasında en sık rastlanan kanser türüdür. Erkeklerde meme kanseri çok nadir olup, tüm meme kanserlerinin %1'den azı erkeklerde görülür. Görülme sıklığı gittikçe artmakta olan meme kanseri, kanserden ölüm nedenleri arasında da ikinci sırada yer almaktadır (Aslan ve ark 2007, Yarbro ve ark 2010). Uluslararası Kanser Enstitüsü (NCI) 2000-2007 verilerine göre her sekiz kadından birinde hayatı boyunca meme kanseri gelişebileceği ve her 30 kadından birinin meme kanseri nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir (Curado ve ark 2007). IARC online güncel veri tabanı olan GLOBOCAN 2012 verilerine göre 2012 yılında dünya'da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Dünya'da en çok tanı konulan kanserler; akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) olduğu belirtilmiştir (Cancer 2013). Ülkemizdeki duruma bakıldığında ise, sağlık bakanlığı istatistiklerine göre tüm kanser türleri arasında meme kanseri görülme oranının %24 olduğu ve kadınlarda daha yaygın görüldüğü bildirilmektedir. Ülkemizde mevcut verilere göre meme kanseri görülme sıklığının, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında olduğu tahmin edilmektedir (Özmen ve ark 2009, Somunoğlu 2009)(Şekil 1).

1.3.1. Meme Kanseri ile İlgili Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler

Meme kanseri, hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok aşamalı uzun bir süreçte ortaya çıkar. Kanser oluşumunda rol oynayan önemli onkogen ve tümör baskılayıcı genler vardır. Bu iki gen grubu kanser oluşumunda birbirine zıt etki gösterirler. Tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde görev alan genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerlerken onkogenler, malign dönüşümüne neden olur. Eğer bu tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkar (Osborne ve ark 2004, Öztürk 2006). Hem sağlıklı hem de kanserli meme dokularında en fazla görülen ve etkili olduğu düşünülen onkogenler Ras, Myc, CerbB-2 olarak söylenebilir (Klijn ve ark 1992, Winer ve ark 2001). Tümör baskılayıcı genlerden ise en çok p53 üzerinde durulmaktadır (Reed ve ark 2000).

1.3.1.1. Büyüme Faktörü Reseptörleri

a) CerbB-2 (HER2/Neu): HER2 reseptörleri hücre içindeki sinyal iletim yollarını etkinleştirerek hücrenin farklılaşmasına ve çoğalmasına neden olur. Meme kanseri için prediktif ve prognostik öneme sahip bir molekül grubudur. Bu gen, tümör gelişimi ve ilerlemesi ile yakından ilgili olup bu genin amplifikasyonu klinik olarak son derece önemlidir (Öztürk 2006, Atalay 2010).

b)EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), tirozin kinaz aktivitesine sahip erbB hücre reseptör grubunun üyesidir. Bu reseptörler, hücre dışında ligand bağlanma parçası ve hücre içi tirozin kinaz parçası olan trans membran glikoproteinlerdir. EGFR ailesi HER2, HER3 ve HER4 alt gruplarından oluşur. Epidermal büyüme faktörünün reseptörüne bağlanmasıyla epidermal büyüme faktörü hücre içine alınır. Bunun akabinde nukleustaki transkripsiyon faktörleri aktive olarak hücre bölünmesi uyarılır. EGFR, onkogenik herhangi bir mutasyona uğrarsa kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ile birlikte tümör oluşumu gerçekleşebilir. EGFR' nün fizyolojik olmayan bu aktivasyonu meme kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünde karşımıza çıkmaktadır (Kılıç 2012).

1.3.1.2. Sinyal İletimi ile İlişkili Genler

Farklı dokularda büyümeyi indükleyici steroidlerin ve büyüme faktörlerinin etkileri nuklear proto-onkogenler aracılığı ile gerçekleşltirilmektedir. Hücrelerin mitojenle etkileşimlerinden kısa bir süre sonra c-fos, c-myc, c-myb ve c-jun proto-onkogenleri indüklenir. Bu onkogenlerin indüksiyonu ile hücre proliferasyonu arasında bir bağlantı vardır. Meme kanserinde östrojen ve progesteron ile c-myc proto-onkogeninin etkili olduğu gösterilmiştir.

a)c-Myc: Bir transkripsiyon faktörü olan c-Myc, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apopitozda düzenleyici olarak görev yapan bir fosfoproteindir (Adhikary ve Eilers 2005). Hücre proliferasyonuyla birlikte RNA, protein sentezi ve enerji metabolizması üzerinde düzenleyici görevleri bulunmaktadır. Hücre büyümesinin kontrolünde c-Myc proteininin bu düzenleyici özellikleri göz önüne alındığında mRNA ya da protein düzeyindeki çok küçük bir değişim hücrede istenmeyen değişikliklere neden olmaktadır. c-Myc geninin yapısındaki değişiklikler veya aşırı üretiminin meme kanserine

neden olduğu bildirilmektedir. Dolayısıyla c-Myc aktivitesi çok sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir (Chung ve Levens 2005, Grandori ve ark 2005).

1.3.1.3. Meme Kanserinde Etkili Diğer Genler

a)Bcl-2 – Apopitoz genleri: Antiapopitotik ve proapopitotik genler olarak birbirine zıt etkili iki gruptan oluşan ve apopitozu düzenlemede en önemli role sahip onkoprotein grubudur (Altunkaynak ve Özbek 2008). Antiapopitotik grup elektron transport zincirine ve oksidatif fosforilasyona katılan sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını engelleyerek apopitozu baskılarken, proapopitotik grup ise sitokrom C'nin salınmasını sağlayarak apopitozu indüklemektedir. Meme tümör dokularında Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunu gösteren çalışmalar olup, Bcl-2 ekspresyonunun meme kanserinde bağımsız bir prognostik faktör olduğu tam olarak ortaya konmamıştır (Sierra ve ark 2000, Vinay ve ark 2004).

1.3.1.4. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri

Meme kanserli vakaların sadece %5-10'unda kalıtsal geçiş söz konusudur. Kalıtsal meme kanserlerinin %80'inden sorumlu iki gen vardır. Bunlar; BRCA-1 ve BRCA-2 genleridir.

a)BRCA1 ve BRCA2 genleri: BRCA1 geni, 17. kromozomun uzun kolunun 21. bölgesinde, BRCA2 geni ise 13. kromozomun uzun kolunun 12. bölgesinde yerleşiktir (Bellosillo ve Tusquets 2006, Balabas ve ark 2010). BRCA1 geni, DNA tamiri ve hücre döngüsünün kontrolünde görev alan bir tümör baskılayıcı gendir. Meme kanseri aile hikayesi olan kişilerin yaklaşık %20'si BRCA1 geninde mutasyon taşımaktadır. Meme kanseri oluşumunda BRCA2 genindeki mutasyonlar BRCA1 genine göre daha az etkilidir. Yapılan in vitro çalışmalarda BRCA1 gen ekspresyonundaki azalmanı, tümör büyüme seviyelerinde artış sağladığı görülürken; BRCA1 gen ekspresyonundaki artışın ise apopitoza ve büyümenin durdurulmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Mirza ve ark 2007). BRCA1 ve BRCA2 genleri meme kanseri için en etkin mutasyonları taşıdığından meme kanseri risk tespitinde mutasyon analizlerinin yapılması önemli parametrelerdendir.

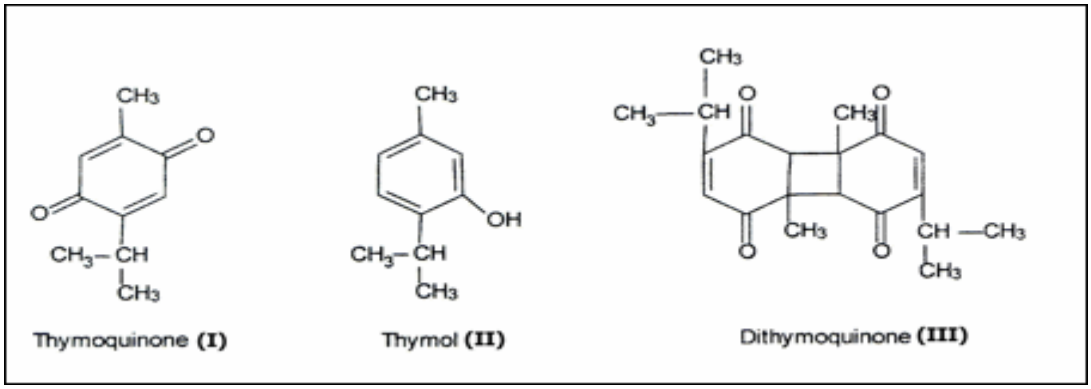
1.3.1.5. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı

Bir meme kanseri hücre soyu olan MCF-7 hücreleri, 69 yaşında invaziv duktal karsinomalı beyaz ırktan bir kadının plevral efüzyonundan 1970 yılında izole edilmiştir (Soule ve ark 1973). Hücre hattı Herbert Soule ve arkadaşları tarafından 1973 yılında

Detroit'te kurulmuş olan enstütüye atıfta bulunarak MCF-7, Michigan Kanser Vakfı - 7 'nin kısaltmasıdır. Kanser araştırmacıları için MCF-7'nin öncesinde bir kaç aydan daha uzun yaşama yeteneğine sahip olan bir meme hücre hattı elde etmek mümkün değildi. Morfolojisi epitelyal olup, insülin benzeri çoğalma faktörü bağlanma proteinleri sentezler. Ayrıca WNT7B onkogeninin ekspresyonu mevcuttur. HER-2 geninin ekspresyonu normaldir (Nieves-Neira ve Pommier 1999). Meme kanseri ve diğer birçok insan kanserinin oluşumunda, hücre döngüsü kontrol noktalarından siklin D1'de oluşan mutasyonlar MCF-7 hücrelerinde de mevcuttur (Nagasawa ve ark 1998). MCF-7 hücre hattında kaspaz -6, -7 ve -9 ekspresyonunun yanısıra BCL-2 ekspresyonu da oldukça iyidir. Diğer yandan p53 ve p21 genlerinin ekspresyonu ve düzenlenmesi normaldir (Nieves-Neira ve Pommier 1999). MCF-7 hücrelerinin çoğalma mekanizmalarında; aşırı artmış östrojen ekspresyonu ve östrojene bağlı proliferasyon, EGF'den bağımsız çoğalma, artmış Her-2/Neu/c-ErbB-2 ekspresyonu (Rait ve ark 2001) artmış N-ras (Sutherhland ve ark 1999) ve Rb proteininin hızlı fosforilasyonu rol oynamaktadır (Botos ve ark 2002).

1.4. Timokinon (TQ)

TQ ($C_{10}H_{10}O_2$; 2–izopropil-5-metil-1,4–benzokinon), çörek otu uçucu yağının temel biyoaktif bileşeni olup; çörek otu uçucu yağında %18,4-24 oranında bulunan 164,2 g/mol molekül ağırlığında birçok biyolojik ve farmakolojik yararı olan koyu sarı renkli kristallere sahip uçucu bir monoterpen kinondur(Arslan ve ark 2005, Pari ve Sankaranarayanan 2009, Cooper 2010). TQ'un ilk defa 1963 yılında El-Dakhakhny tarafından yapılan bir çalışma ile izole edildiği bildirilmiştir (Badary ve ark 2003, Khader ve ark 2009). Nigella Sativa'nın ana bileşeni TQ olmakla birlikte, timol, ditimokinon, timohidrokinon bileşiklerinin (Şekil 2) de bu bileşime eşlik ettiği yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi yöntemleri ile gösterilmiştir (Ghosheh ve ark 1999, Gali-Muhtasib ve ark 2006).



Şekil 2. Nigella sativa'nın temel bileşenleri (Ragheb ve ark 2009)

1.5. MikroRNA (miRNA)

MikroRNA'lar, hücresel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev almaktadır. Hücre içerisindeki seviyelerinin normal koşullar dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Hücreler; hem gelişim hem de ergin dönemde koordineli bir şekilde hücre bölünmesi, farklılaşma ve ölümün düzgün olarak gerçekleşmesinden emin olmak için çeşitli yöntemler geliştirmiştir. Birçok düzenleyici etken, genleri, çoğalma ve farklılaşmaya yönlendirmek için açıp kapatmaktadır. Tümör süpresör ve onkojenlerin çoğu ilk önce DNA'dan RNA'ya transkript edilir ve sonra da etkilerini göstermek için proteine dönüşür. Yakın zamanda elde edilen kanıtlar miRNA olarak isimlendirilen küçük protein kodlamayan moleküllerin tümör süpresör ve onkogen olarak görev yapabileceklerini göstermektedir. Bu yeni sınıf gen düzenleyicilerin insanlarda kanser ile ilişkisi daha yeni anlaşılmaktadır. Hücrelerde farklı durumların kontrollerini üstlenen miRNA'ların ekspresyonları bozulduğunda tümörgeneze dahil olmaktadır. Yapılan çalışmalar bu fikri doğrulamakla birlikte, tümör gelişiminde miRNA'ların tümör süpresörler veya onkogenler olarak rol oynadığını açığa çıkarmıştır (Yu ve ark 2010, Lee ve ark 1993).

1.5.1. MikroRNA'ların Biyogenezi

İnsan miRNA'larının çoğu protein kodlayan veya kodlamayan mRNA transkriptlerinin intronları içinde bulunur (Tavares ve ark 2008). Geriye kalan miRNA'lar ya genomdaki diğer transkriptlerden uzakta kodlayıcı olmayan mRNA genleri ekzonlarında, mRNA 3'UTR (untranslated region- çevrilmemiş bölgede)'lerinde yer alır ya da 19'uncu kromozom üzerindeki küme dahil diğer miRNA genleri ile birlikte kümelenir (Tavares ve ark 2008, Johnson ve ark 2007, Sevignani ve ark 2006).

MikroRNA'lar birbirini takip eden üç adımı kapsayan süreç sonucunda oluşur. İlk olarak miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lar nükleus içinde prekürsör miRNA (premiRNA)'lara dönüştürülür. Son olarak olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (Lu ve ark 2005).

Olgunlaşmış miRNA'ların aktivitesi mRNA'ların içinde bir hedef sekansının tanınmasına bağlıdır. Bunlar genellikle 3'UTR bölgesinde bulunur, kısa ve genellikle eksik tamamlayıcıdır. Tipik olarak hedef alanlar miRNA tohum sekansına (seed sequence) tamamlayıcı 6-7 nükleotid sekansı içerir, ardından poly A kuyruğu gelir. Bu kurallar miRNA hedeflerinin mRNA sekanslarından tahmin edilebilmesini sağlar. Ancak bu tarz tahmin algoritmalarının duyarlılık ve özgüllükleri güvenilir olmayıp her vakada deneysel olarak geçerliliklerinin sağlanması gerekmektedir (Sevignani ve ark 2006).

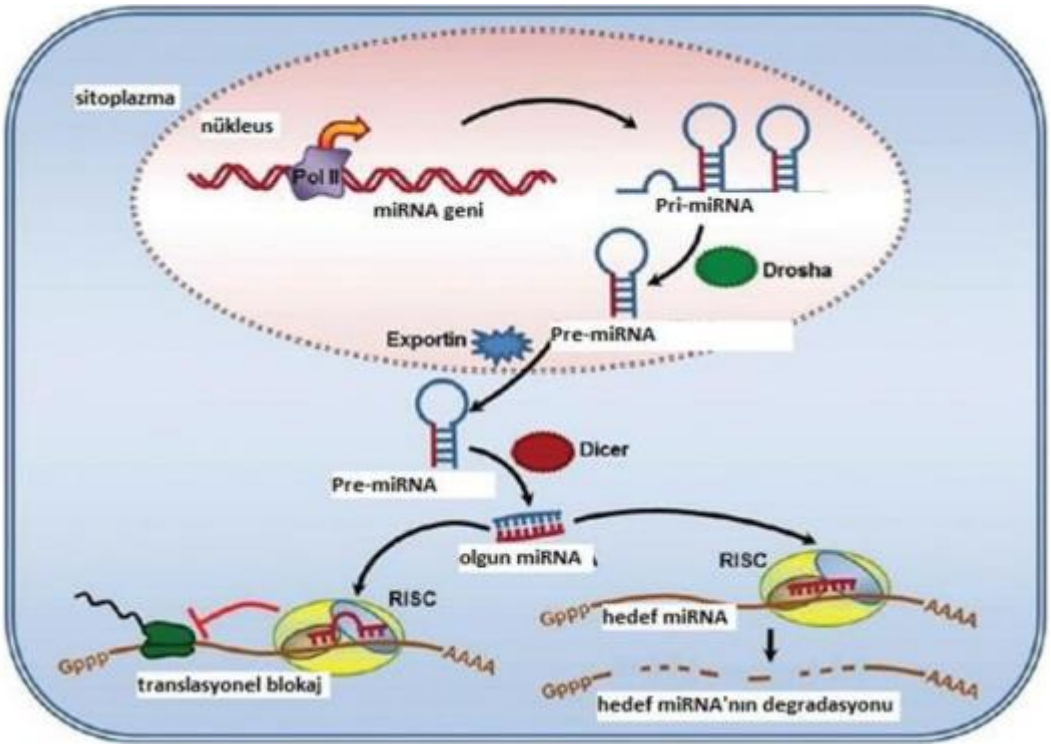
MikroRNA öncülleri (haberciler) genellikle protein kodlayan genler ile aynı şekilde ifade edilir. İlk önce RNA polimeraz II tarafından transkipte edilir ve sonra da poliadenillenip pri-miRNA oluşturmak üzere kapatılır (Sevignani ve ark 2006). RNA polimeraz II enzimi tarafından primer transkript olarak genomik DNA'dan sentezlenen pri-miRNA (500-3000 baz), "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahip, sap-ilmik (saç tokası) yapısındadır (Nakahara ve ark 2004). Çekirdekteki pri-miRNA'nın yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan premiRNA'ya dönüştürülmesi, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından gerçekleştirilir (Liu ve ark 2004).

Çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha ile bir nükleaz olan Drosha"nın oluşturduğu yapı mikro işlemci kompleks (Microprocessor complex) olarak isimlendirilir. Saç tokası şeklindeki yapının iki kolu arasında ortaya çıkan eksik kendini tamamlayıcı kısa saç tokası şeklindeki döngüler premiRNA olarak adlandırılır (Reinhart ve ark 2002, Shenouda ve ark 2009, Jiang ve ark 2005).

Mirton adı verilen bazı miRNA'lar Drosha işlemini pre-miRNA şeklinde birbirine eklenmiş bütün intronları uzatarak atlar (bypass eder) (Shen ve ark 2009). Bir nüklear taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nüklear bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı bir şekilde pre-miRNA molekülü sitoplazmaya taşınır (O'Day ve ark 2010, Liu ve ark 2008). Bunun ardından, sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz tarafından kesilen pre-miRNA'lar, yine Dicer etkisiyle TAR RNA bağlayan protein

(TRBP) veya polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aktive eden protein (PACT) ile etkileşimde bulunurak 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksine çevrilir (Şekil 3) (Liu ve ark 2008, Hossain ve ark 2006). Bu esnada Dicer etkisiyle, miRNA: miRNA çiftleri Argonaute1-4 oluşturarak, olgun RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır (Hossain ve ark 2006).

Pre-miRNA‟nın sap-ilmiği Dicer tarafından kesildikten sonra, RISC kompleksine miRNA dubleksinden sadece biri dâhil olur. Kusursuz miRNA, mRNA tamamlayıcılığının Argonaute2 tarafından bölünmesine yol açar. Bu da deneysel olarak önemli olmakla birlikte endojen memeli miRNA'larında oluşmadığı düşünülen small interfering RNA (siRNA) yollarıdır. Fakat genellikle bunun yerine eksik mRNA eşleşmeleri dönüşümünün aşağı yönlü regülasyonuna yol açar. Bunun gerçekleştiği mekanizmalar hala çok açık olmayıp bu dönüşümünün başlangıç veya uzatma süresi boyunca etkilendiğini destekleyen modeller vardır (Şekil 3) (Nakahara ve ark 2004).

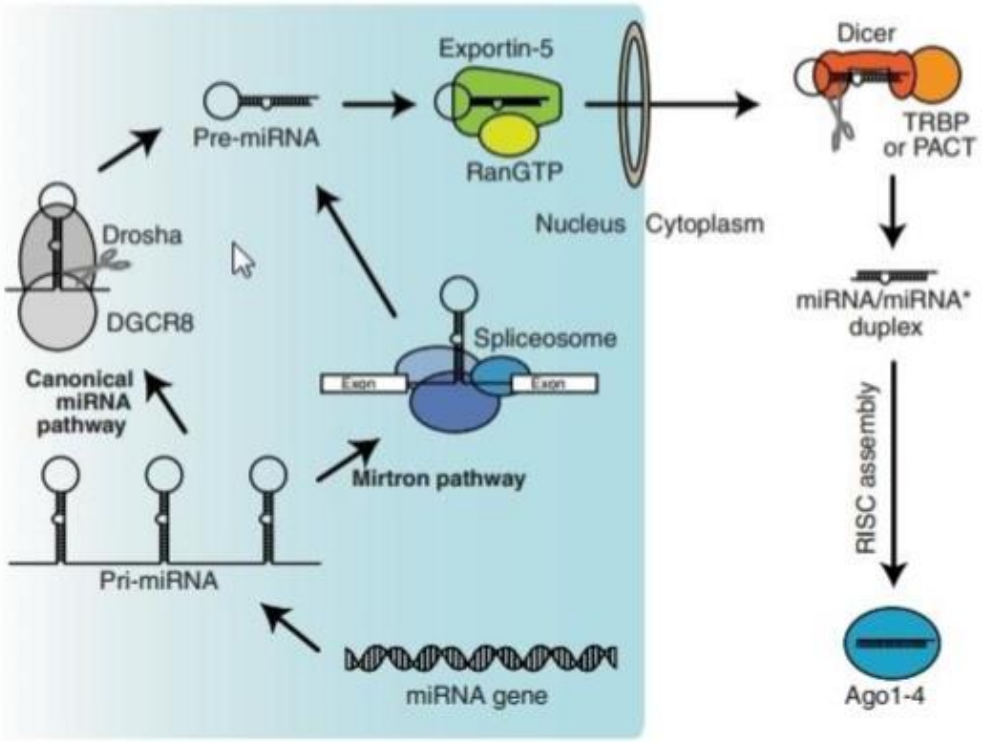


Şekil 3.MikroRNA sentez ve etki şekilleri (http://www.pulmonarycirculation.org)

Bir RNAz olan ve RISC kompleksinin içinde yer alan Argonaute'ın etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dâhil edilir. Bu ipliğe kılavuz iplik

(guide strand) adı verilirken diğer iplik de anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır ve sindirilme işlemi RISC kompleksinin substratı olarak gerçekleşir.

Aktif RISC kompleksine entegre olan miRNA'lar bu adımdan sonra, ya Argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (Şekil 4) (Liu ve ark 2008, Zhao ve ark 2008).



Şekil 4. MikroRNA'nın Biyolojik Oluşumu (Liu ve ark 2008)

1.5.2. MikroRNA'ların İşlevleri

Bu güne kadar tespit edilmiş miRNA'ların sadece küçük bir kısmının biyolojik rolleri aydınlatılmıştır. Hedef genlerin ekspresyonunu azaltan olgun miRNA'lar, protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. Kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahip miRNA'lar, RISC ile kompleks oluşturup baz çiftlerinin özelliği ile mRNA'ya bağlandıktan sonra protein translasyonunun inhibisyonuna ya da mRNA'nın yıkımına sebep olur (Şekil 3) (Wightman ve ark 1993).

MikroRNA, hedef mRNA'nın ORF (open reading frame-açık okuma çerçevesi) bölgesine veya hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanır ve bağlanma pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. 3'UTR bölgesine tam olarak bağlanmayan, kusurlu, eksik komplementerlik gösterir ve translasyonun baskılanması ile sona ererken ORF bölgesi içine bağlanması kusursuz olan tam komplementerliği gösterir ve mRNA'nın Argonaute1 tarafından yıkımı ile sonuçlanır ve RISC mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olur.

Ayrıca, her bir miRNA'nın birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve her bir mRNA'nın da birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir (Sun ve ark 2008).

1.5.3. Meme Kanseri ve miRNA'lar

Liu ve ark. 2004 yılında meme kanseri olan insan ve farelerde, mikroçip teknoloji kullanarak miRNA gen ekspresyonlarını profillemişler ve meme kanserinde, normal dokuyla karşılaştırıldığında, anormal miRNA ekspresyonunu varlığını bildirmişlerdir (Liu ve ark 2004). Calin ve ark. 2004 her bir dokunun özellikli bir miRNA gen profili olduğunu bildirmişlerdir (Calin ve ark 2004). Buna karşılık Jiang ve ark. 2005 ise insanlarda yaygın olarak görülen ve beşi meme kanseri (MDA231, T47D, SKBR3, MDA 361, and MCF-7) olmak üzere 32 kanser hücre-hattındaki 222 miRNA'ları incelemiş ve meme ile prostat kanser hücre hatlarının birlikte kümelenmeye eğiliminde olmasının farklı hücrelerde benzer miRNA ekspresyon profili olduğunu bildirmiştir (Jiang ve ark 2005).

Meme kanseri, genetik olarak hem locus hem de allel içeriğine göre yüksek derecede heterojendir. Şimdiye kadar ailesel meme kanseri vakalarının kabaca %50si herhangi bir bilinen kanser geni ile açıklanamamıştır. Bu tip bir heterojenite "yaygın hastalık, multiple nadir allel" (common disease, multiple rare alleles) modeli olarak tanımlanmıştır. Calin ve ark 2004 bilinen insan matür miRNA'larının yarısının kanserle ilişkili genomik bölgede veya frajil bölgelerde lokasyon göstermesinin kanserde rol oynabileceğini bildirmiştir (Calin ve ark 2004). Bu polisistron kümesine örnek olarak 13q31 kromozomunun c13 veya f25 locusundaki miR17-92 verilebilir. Bu locusun meme kanseri dâhil birçok kanser tipinde heterozigozite kaybına neden olduğu bilinmektedir (Calin ve ark 2004, Heneghan ve ark 2009).

Meme Ca'daki miRNA ekspresyon çalışmaları, hastalık taksonomisi ve prognostik araç geliştirilmesi açısından miRNA'ların önemini ve potansiyel kullanım alanını ortaya koymuştur. Hücre döngüsü, proliferasyonu ve tümörigenezin miRNA'lar tarafından kontrol edildiği gösterilmiş ve hücre döngüsünü kontrol eden siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK), siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) gibi proteinlerdeki artış ve/veya anormal miRNA ekspresyonunun meme kanseri patogenezinde sık sık gözlendiği bildirilmiştir. Örneğin, siklin D1, hücre siklusunun G1 fazından DNA seztez fazına geçmesini kontrol eder ve meme kanserinde %50'den fazla bir oranda ekspresyon artışı tespit edilmiştir ve bu durum in vivo ve in vitro da kanser hücre proliferasyonunun hız limitleyici faktörü olarak görev yapmaktadır. Siklin E hücre siklusunu düzenleyen diğer bir regülatör proteindir ve meme kanserinde %10'dan fazla bir oranda ekspresyon artışı vardır. Meme CA'nın erken safhasında da prognoz için iyi bir belirteç olmakla birlikte tümör agresivitesinin belirlenmesinde önemlidir. miRNA'lar; E2F, Rb, siklinler, CDKlar ve CDKI larla etkileşime girerek hücre bölünmesi ve siklus ilerleyişini kontrol ederler (Yu ve ark 2010). Bununla birlikte meme kanserinde eksprese olan miRNA'lardan bazılarının tümör süpresörler olarak görev yaparken diğer bazılarının onkogenik özellik gösterdiği yapılan profilleme çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır. Dolayısıyla tümör oluşumu ya tümör süpresör miRNA'ların redüksiyonu veya delesyonuyla ya da onkogenik miRNA'ların amplifikasyonu veya over-ekspresyonuyla gerçekleşebilir. Ayrıca tümör metastazı ise prometastatik miRNA'ların artmış ekspresyonuyla ve/veya anti-metastatik miRNA'ların downregülasyonuyla gerçekleşebilmektedir (O'Day ve ark 2010).

1.5.4. Hücre siklusunun ilerlemesinde rol alan miRNA'lar

Hücre siklusunun ilerleyişini hücre siklus proteinlerini hedef alarak kontrol eden 5 grup vardır; miR-15a/16 kümesi, miR-17/20 kümesi, miR-221/222 kümesi, let-7 ailesi, miR34 ailesi (Yu ve ark 2010).

a)miR-15a/16 kümesi: Kronik lenfositik lösemi hastalarının yaklaşık %70'inde miR-15a/16 kümesi delesyona uğramıştır ve/veya down regülasyon söz konusudur ve bu durum hipofiz adenomlarında, mide kanser cell-line'larında da görülmektedir. miR-15a/16 kümesi; siklin D1, E1, D3 ve CDK6 doğrultusunda hücre siklusunu G1 fazında tutar (Yu ve ark 2010, Liu ve ark 2008, Calin ve ark 2008).

b)miR-17/20 kümesi:1kb'lık genomik bölgede 6 olgun miRNA'yı kodlayan miR-17/20 kümesi, insan B hücre hatlarında ve meme kanser hücre hatlarında birçok hücre

siklus proteinini (E2F, c-myc, Rb ve siklin D1 gibi) hedefleyerek tümör gelişimini engellemektedir. Hücre siklusunun G1 fazında c-myc ve siklin D1 tetiklenerek E2F1'in Rb ile bağlı kalmasına dolayısıyla inaktivasyonuna neden olmaktadır. miR-17/20 kümesi G1/ S geçişinde yer almaktadır. Önceki çalışmalar miR-17/20 kümesinin E2F'nin resiprokal aktivasyonunun, c-myc tarafından E2F translasyonunun engellenmesi suretiyle azalttığını bildirmiştir. Bir Rb ailesi üyesi olan Rbl2 de miR-17-5p'nin hedefidir. miRNA'larin direk olarak siklin D1'in inhibisyonunu sağlayarak etkili olduğunu bildiren ilk çalışmalar, meme kanseri hücre hatlarında miR-17/20'nin siklin D1'in 3'UTR bölgesini hedef alarak, hücre döngüsünün durmasına ve proliferasyonun baskılanmasına neden olduğunu göstermiştir. Meme hatlarında, miR-17-5p, ayrıca östrojen reseptör-α (ER-α) koaktivatörü AIB1'i de inhibe etmektedir. Sonuç olarak yapılan tüm bu çalışmalar miR-17/20 kümesinin, hücre siklus ilerlemesini sağlayan genleri etkileyerek tümör baskılayıcı olarak rol oynadığını düşündürmektedir. Memeli bezlerinin aksine akciğer kanseri ve lenfomalardaki bu miRNA kümesindeki ekspresyon artışı hücre büyümesini arttırmaktadır. Bu da miR-17/20 fonksiyonunun hücre tipine bağlı olduğunu göstermektedir.

c)miR-221/222:CDK inhibitörlerini (CDKI) hedefleyerek hücre siklusunu kontrol ederler. miR-221/222'nin ektopik ekspresyonu CDK2'yi aktive ederek G1/S geçişini kolaylaştırır ve tümör büyümesini p27kip1 ve p57kip2'nin negatif regülasyonunu sağlayarak arttırır. Bu hem MCF-7 hatlarında hem de Her2/neu-pozitif primer insan meme kanseri dokularında gösterilmiştir. Ayrıca artmış miR221/222 ekspresyonunun meme kanserinde Tamoxifen resistansıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yu ve ark 2010, Miller ve ark 2008, Zhao ve ark 2008).

d)let-7: Bu aile, C. elegans'da hücre siklusundan çıkış süresini ve terminal diferensiyasyonu kontrol eder. Akciğer ve meme kanserini de içine alan çeşitli kanser tiplerinde let-7 ailesi üyelerinin miktarı azalmıştır. Akciğer kanseri hücre hatlarındaki let-7 ekspresyonu hücre siklus ilerleyişini baskılar ve hücre bölünmesi azalır. Tümör gelişimini kontrol eden let-7 mekanizması Ras, HMGA2 ve kaspaz genlerini hedef alarak etki eder. Ayrıca siklin D1, D3, A, CDK441, CCNA2, CDC25A, CDK6, CDK 8 gibi birçok önemli hücre siklus kontrol geni de let-7 tarafından baskılanır (Yu ve ark 2010, O'Day ve ark 2010).

e)miR-34: Bu aile (miR-34a, miR-34b ve miR-34c) p53 tümör süpresör ağının önemli bir parçasıdır. DNA hasarı ve onkogenik stres, p53'ü aktive eder. p53, mir-34a ve

mir34b/c promotörüne bağlanarak bunların ekspresyonlarını translasyonel seviyede indükler. miR-34 ailesinin ektopik ekspresyonu hücre döngüsünün durmasını ve apoptozu siklin D1, siklin E2, E2Fler ve CDK4/6 downregülasyonunu uyararak tetikler. Ayrıca iki farklı miRNA, miR192 ve miR-215 de p53 ağında yer almaktadır. Bu iki miRNA'nın upregülasyonu, karsinogenezi, p21Cip1 birikimi yoluyla baskılar (Yu ve ark 2010, O'Day ve ark 2010, Sun ve ark 2008).

1.5.5. Meme Kanserindeki Tümör Süpresör miRNA'lar

Onkogenleri baskılayarak tümörigenezi inhibe edebilirler. ErbB ailesi organizma gelişmesinde, hücre proliferasyonunda ve insan epitelyal malignitelerinin sürvisinde önemli bir role sahiptir. İnsan meme CA'larında ErbB2 amplifikasyonu ve/veya aşırı ekspresyonu oranı yaklaşık %20 ile %30 arasındadır. miR25 meme kanser hücrelerinde ErbB2'yi hedef alır. SKBR3 hücrelerindeki miR125a ve miR125b aşırı ekspresyonu ErbB2 protein seviyesini yaklaşık %40-%65 oranında azaltırken ErbB3 seviyesini yaklaşık %60-80 oranında azaltır. miR125a veya miR-125b aşırı ekspresyonu yapan SKBR3 hücrelerindeki büyüme, migrasyon ve invazyon kapasiteleri bozulmuştur (Yu ve ark 2010, Shenouda ve ar 2009, O'Day ve ark 2010).

İnsan miR-17/20 kümesinin genomik lokasyonu kromozom 13q31'dedir ve meme kanseri dahil çeşitli kanserlerde heterozigosite kaybıyla ilişkilidir. miR-17/20 kümesi siklin D1 miktarını azaltır, MCF-7 hücre proliferasyonunu baskılar, G1/S geçişini engeller. Meme kanser hücre hatlarındaki azalmış miR-17/20 ekspresyonu ters olarak yüksek siklin D1 miktarıyla ilişkilidir. İnsan meme kanser örneklerindeki miR17/20 ekspresyon azalışı normal meme dokusuyla karşılaştırıldığında yüksek siklin D1 miktarıyla ilişkilidir. Hedeflenen gen delesyonu göstermiştir ki miR-17/20 kümesi olmayan fareler doğumdan kısa bir süre sonra ölmektedir bu nedenle memeli tümörigenezinde miR-17/20 fonksiyonunun belirlenmesi için gen delesyon çalışmaları ve doku spesifik transgenik teknikler gereklidir (Yu ve ark 2010, Eiriksdottir ve ark 1998). ER-α'ya bağlanan östrojen meme CA gelişiminde önemlidir (Yu ve ark 2010, Kondo ve ark 2008).

a)Mir-125a ve miR-125b: HER2 (ERBB2) geni, tirozin kinazların epidermal büyüme faktör reseptör ailesinin bir üyesini kodlar. Bu proteinin kendisine ait bir ligand bağlama domeni yoktur ve bundan dolayı büyüme faktörü bağlayamaz. Ancak, bu ailenin ligandla bağlanabilen diğer bir üyesiyle sıkıca bağlanarak bir heterodimer oluştur ve bu

şekilde hem ligand bağlama aktivitesini stabilize eder hem de mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), fosfatidil inositol-3 kinaz gibi kinaz aracılı downstream sinyal yollarının artmasına neden olur. Bu genin amplifikasyonu ve/veya overekspresyonu meme tümörlerini de içine alan birçok kanser türünde bildirilmiştir (O'Day ve ark 2010).

b)miR-200 ailesi: İnvazyon ve metastaz malign tümör ilerlemesinin göstergelerindendir. Günümüzde anormal EMT (epithelial-mesenchymal transition) aktivasyonunun birçok kanser türünde malign oluşumlara neden olduğu görüşü kabul edilmektedir. EMT; SNAIL ailesi ile ZFH ailesine ait transkripsiyon faktörlerini içine alan EMT-indükleyici transkripsiyonel represörler tarafından aktive edilmektedir. Bu proteinler E-cadherini kodlayan genler gibi epitelyal genlerin transkripsiyonunu engellemektedir. Yakın zamanlarda bir ZFH ailesi üyesi olan ZEB1'in meme kanseri dahil insan kanserlerinde en önemli EMT aktivatörü olduğu gösterilmiş olup fare ksenograft modellerinde ise ZEB1'in metastazı ilerlettiği gösterilmiştir. miR-200 ailesine ait miRNA'lar EMT tetikleyicileri olan ZEB1 ve ZEB2 ekspresyonlarını baskılayarak epitelyal fenotipe katkıda bulunurlar. Bunun dışında miR-200 ekspresyonunun AKT2 tarafından azaltıldığı bildirilmiş olup çoğu durumda meme kanseri metaztazının Akt-miR-200-Ecadherin yollarının kontrolünde olduğu ileri sürülmüştür. İlginç olarak bir çalışmada fare meme kanser hücre hatlarında miR-200 ekspresyonunun beklenmedik bir şekilde makroskopik metastazı geliştirdiği gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak araştırıcılar, bazı tümörler için metastatik bölgelerdeki tümör kolonizasyonunun mezenkimal-epidermal geçişi ile geliştiğini ve ayrıca tümörün epitelyal doğasının metastatik sonucu göstermediğini ileri sürmüşleridir. Bu çalışma miR-200 ailesinin metastaz gelişimiyle direk ilişkili olduğunu ve miR-200 seviyesindeki değişimlerin tümörigenezin gelişimiyle ilişkili olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Örneğin, normal over dokuyla karşılaştırıldığında insan over kanserlerinde miR-200 ailesinin upregülasyonu söz konusudur. Bunun da ötesinde miR-200 ailesinin overekspresyonu önemli ölçüde düşük hayatta kalımla korelasyon göstermektedir. miR-200a ekspresyonunun önemli ölçüde olmadığı hastalarla karşılaştırıldığında yüksek miR-200a eksperesyonuna sahip over tümörlü hastalarda yaklaşık %50 civarında ortalama hayatta kalım oranı gösterilmiştir. Bunun da ötesinde miR-200 kümesini kodlayan kromozom 1'deki bölgenin birçok epitelyal, over, meme kanserleri ve melanoma vakasında amplifiye olduğu gösterilmiştir. Kanser kök hücresi ile normal kök hücrenin kendi kendilerini yenilemesinin kontrolünde 3 miRNA kümesinin(miR-200c-141, miR-200b-200a-429 ve miR-183-96-182) rolüyle ilgili olarak

yeni bir çalışmada yapılmıştır. Bu miRNA'lar; insan meme kanser kök hücrelerinde, normal insan ve fare meme kök/progenitör hücrelerinde, embriyonel karsinom hücrelerinde olduğu gibi downregüledir. Araştırıcılar BMI1 (kendi kendine yenilenmeyi sağlayan bir gen)'nin özellikle bu miRNA'lar tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir ve embriyonel karsinom hücrelerindeki miR-200c'nin ektopik overekspresyonunun büyüme gerilemesine ve nöronal diferansiyasyona neden olduğunu ve in vivo da meme kanser kök hücrelerinin tümörigenisitesini baskıladığını göstermişlerdir. Bütün bu çalışmalar doğrultusunda miR-200 ailesinin tümör ilerlemesi ve metastazının regülasyonunda önemli rolleri olduğu kabul edilmektedir (O'Day ve ark 2010, Korpal ve ark 2008, Iliopoulos ve ark 2009).

c)MiR-200c: DeltaEF1 (E-cadherin'in transkripsiyonel represörüdür), meme kanserinde epitelyal plastisiteyi regüle eder. E-cadherin down-regülasyonu epitelyal-mezenkimal dönüşümünde çok önemlidir. DeltaEF1, miR-200c için potansiyel bir hedeftir. MDA-MB-231'deki (östrojen reseptör-negatif hücre hattındaki) anormal/ektopik miR-200c ekspresyonunun E-cadherin ekspresyonunu etkileyerek hücre morfolojisini değiştirdiği bildirilmiştir (Shenouda ve ark 2009).

d)MiR-206: Fonksiyonel çalışmalar miR-206 hedefinin insanlarda östrojen reseptörü-α (ER-α) oğlduunu göstermektedir. miR-206, ER-α mRNA ve protein seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır. miR-206'nın ERα mRNA'ısnı susturması, 3'UTR bölgesindeki 2 sekans spesifik bölgesiyle olmaktadır (Shenouda ve ark 2009). Yapılan çalışmalar miR206'nın ESR1-mRNA'nın ekspresyonunu, ESR1'in 3′ UTR bölgesindeki 2 bağlanma domenini engelleyerek gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca sonraki çalışmalar miR-206 ekspresyonunun feed-back loop varlığına bağlı olarak αE Ragonistleri (ERβ agonistleri veya progesteron tarafından değil) tarafından sıkı bir Şekilde baskılandığını göstermiştir (O'Day ve ark 2010). Kondo ve arkadaşlarının (Kondo ve 2008) de çalışmasında ER α - pozitif insan meme kanser dokusunda miR-206 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiş ve miR206'nın, ER-β veya E-cadherin gibi başka genlerle etkileşmediğini bildirmiştir. miR-206'nın ekspresyon düzeyi meme kanser dokularında ER-α ile ters ilişkili olup bu ilişki ER-β mRNA'ısnda yoktur (Shenouda ve ark 2009). Bir diğer çalışmada insanlarda, ERα-pozitif meme kanserli dokularda, ESR1 ekspresyonunu baskılayarak MCF-7 meme Ca hücrelerinin büyümesini engelleyen miR-206 ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir. miR-206'ya ek olarak araştırıcılar meme kanserli olgularda ESR1 mRNA'sını direk olarak hedefleyen diğer miRNA'ları da

bildirmişlerdir: miR-18a, miR-18b, miR193b ve miR-302c. Bunun da ötesinde miR-18a, miR-18b, miR-193b, miR-206 ve miR-302c'nin hücre siklus arrestini arttırdığı, östrojenle indüklenen proliferasyonu engellediği gösterilmiştir. ERα ekspresyonunun disregülasyonunun çoğu insan meme kanser vakalarında ayırıcı özellik göstermesinden dolayı bu çalışmalar meme kanser patolojisine neden olan moleküler olayları açıklama da oldukça önemlidir. miR-206'nın meme kanserindeki tümör baskılayıcı rolü; metastatik meme kanser hücrelerinde parental hücrelerle karşılaştırıldığında miR-206, miR-335 ve miR-126'nın etkin downregülasyonunun ortaya konmasıyla doğrulanmıştır. Bu miRNA'ların ekspresyonlarının düzeltilmesi ise invazif kapasitelerinde azalmaya neden olmaktadır. Araştırıcılar miR-335 için 4 hedef tanımlamışlardır: PTPRN2, MERTK, TNC ve SOX4. Bunlar arasında bir ekstrasellüler matriks bileşenini kodlayan TNC ve tümörigenezde yer alan bir transkripsiyon faktörünü kodlayan SOX4; metastazla ilişkili fonksiyonel hedefler olarak bildirilmiştir. Metastatik hücrelerde miR-206 ekspresyonunun düzeltilmesi proliferasyon veya apoptoza hassasiyeti etkilememekte ancak hücresel morfolojiyi değiştirmektedir ki bu muhtemelen hücre motilitesinde azalmaya neden olarak metastatik hücrelerin migrasyonunu sınırlandırmaktadır. Bu bulgular meme kanseri terapisinde miR-206'nın aday gen olacağını düşündürmektedir (O'Day ve ark 2010).

e)miR-17-5p: miR-91 olarak da bilinen miR-17-5p, kromozom 13q31 da yerleşik olıup bu genomik bölge meme kanseri dâhil çeşitli kanser tiplerinde heterozigosite kaybına uğramıştır. miR-17-5p, hem ER-α hem de E2F'nin transkripsiyonel aktivitesini arttıran bir steroid reseptör koaktivatörüd olan AIB1 (amplified in breast cancer 1) geninin mRNA'sına komplementerdir. Dolayısıyla AIB1, miR-175p'nin doğrudan hedefidir. miR-17-5p, AIB1 mRNA translasyonunu baskılayarak E2F1 ve EαR fonksiyonlarını engeller. MiR-17-5p aracılı AIB1 down-regülasyonu ayrıca östrojen reseptör aracılı ve östrojen reseptör bağımsız meme Ca hücrelerinin proliferasyonunda gerilemeye de neden olur (Yu ve ark 2010, Heneghan ve ark 2009, Shenouda ve ark 2009, O'Day ve ark 2010). Yakın zamanlarda insan kanserlerinin yaklaşık %50sinde overekspresyon gösteren siklin D1 geninin (CCND1) meme kanseri hücrelerinde de miR17-5p'nin direk hedefi olduğu gösterilmiştir. miR-17-5p; meme kanser hücrelerinin proliferasyonunu, siklin D1 proteininin sentezini baskılayarak engellemektedir ve bu etki siklin-D1'i olmayan meme kanser hücrelerinde CCND1 siRNA tarafından ortadan kaldırılmaktadır. Bu çalışma ayrıca siklin D'nin miR17-5p ekspresyonunu indükleyerek kendi ekspresyonu negatif feedback ile sınırlandırdığı bir regülatör mekanizmayı tanımlamaktadır (O'Day ve ark 2010).

f)let-7 ailesi: let-7 çoğu insan kanser türlerinde çok az eksprese edilmektedir ya da delesyona uğramıştır. Hem hematolojik maliniteler hem de solid tümörlerden elde edilen bilgiler doğrultusunda her birinin tümör oluşumunu başlamasında rol oynayan minör bir hücre popülayonundan oluştuğu bildirilmiştir. Bu tümör başlatıcı hücreler (T-ICler) tümör kök hücrelerin özelliklerine sahip olup asimetrik hücre bölünmesine ve kendi kendine yenilenme özelliğine sahiptir. T-ICler tümörde daha çok differasnsiye olmuş hücreler yığını arasında sadece minör bir fraksiyon oluştururlar. Kanser kök hücre hipotezine dayanarak, T-ICler inisiasyon, progresyon, metastaz ve tedavi direncinden sorumludur. Meme T-ICleri (BT-ICleri) hücre suspansiyonlarınan CD44+CD24– purifikasyonu ve bunların sıralamadaki azlığına göre ya da kendi kendine replike olan hücrelerin (mammospheres) küresel biçimli yığınlarının purifikasyonuyla elde edilirler. Meme kanser hücre hatlarında yapılan bir çalışmada kendi kendine yenilenen ve farklılaşmış hücrelerdeki miRNA ekspresyonları karşılaştırılmış ve let-7 ekspresyonunun BTIClerde çok fazla miktarda azaldığı ve farklışalma ile arttığı gösterilmiştir. BT-IClere let-7 uygulaması bunların in vivo proliferatif kapasitesitelerinin, mammosphere oluşturma kapasitelerinin, tümör formasyon ve metastaz kapasitelrinin azalmasına neden olmuştur. Aksine let-7 knock-downu in vitro da non-T-IClerde kendi kendine yenilenmeyi arttırmıştır. let-7'nin bilinen onkogenik hedefleri arasında HRAS ve HMGA2 bulunmaktadır ve bunlar let-7 overekspresyonuyla downregüle edilmektedir. BT-IC ile zenginleştirilmiş bir hücre hattında HMGA2 knock-downu farklılaşmayı arttırıp kendi kendine yenilenmeyi etkilemezken H-RAS susturulması kendi kendine yenilenmeyi azaltmış ancak farklılaşma üzerine etki göstermemiştir. Bu sonuçlar let-7'nin birçok BT-IC kök hücre benzeri özelliği regüle ettiğini ve let7'nin teröpatik RNA kullanarak tümör kök hücresine saldıran tek güç olduğunu göstermektedir. let-7 miRNAsının tümöre sunumu, hücresel diferansiyasyonun indüklenmesinden dolayı potansiyel olarak kök hücreleri azalmaktadır. Yeni yapılan bir çalışmada, RKIP (Raf kinase inhibitory protein) proteinini let-7 ve meme kanser metastazı ile ilişkilendirmiştir. RKIP (PEBP1 olarak da bilinir) MAPK, G protein ilişkili reseptör kinaz-2 ve NF-κB sinyal yollarını inhibe etmektedir. Araştırıcılar fare modellerinde RKIP'ın meme kanser hücrelerinin metastatik invazyonunu inhibe ettiğini ve meme kanser hücre intravazyonunu ile kemik metastazını represe ettiğini bildirmişlerdir. MAPK inhibisyonu MYC tarafından LIN28 transkripsiyonunu azaltmaktadır ve let-7 biyogenez inhibitörü olan LIN28'in downregülasyonu meme kanser hücrelerinde let-7 ekspresyonunu arttırmaktadır. Bunun sonucunda da SNAIL gibi

proinvaziv ve prometastatik genleri aktive eden, kromatin-remodelleme proteini olan HMGA2 ekspresyonu azalmaktadır. Sonuç olarak RKIP; MAPK, MYC, LIN28, let7 kaskadları ve HMGA2 gibi let-7'nin downstream hedef proteinleri yoluyla invazyon ve metastazı represe etmektedir (Yu ve ark 2010, O'Day ve ark 2010, Clarke ve ark 2006, Garimella ve ark 2009).

g)miR-34: miR-34a birçok kanser türünde downreguüledir ve p53 tarafından transkripsiyonel olarak regüle edilmektedir. Normal epitelyal hücre hatları ve HER-2+ hücre hatlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada miR-34a seviyelerinin; üçlü negatif ve mezenkimal meme kanser hücre hatlarında azaldığı bildirilmiştir. Araştırıcılar meme kanserinin bu alt tiplerindeki p53 mutasyonlarının, düşük miR-34a ekspresyonuna katkıda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir (Yu ve ark 2010, O'Day ve ark 2010, Sun ve ark 2008).

h)miR-31: miR-31'in prometastatik genlerin ekspresyonlarını inhibe ederek bir çok kademede metastazı engellediği bildirilmiştir. miR-31 normal meme hücrelerinde eksprese olmaktadır ancak tümörün metastatik safhasına bağlı olarak miktarı değişmektedir. miR-31 miktarı non-metastatik meme kanser hüce hatlarında kısmen azalmıştır ve metastatik fare ve insan meme kanser hücre hatlarında neredeyse tespit edilememektedir. Araştırıcılar miR-31'in metastatik meme kanser hücre hatlarına uygulanmasının in vitro da metastazla ilgili fonksiyonların (motilite, invazyon ve anoikis resistansı); in vivo da metastazın baskılanmsına neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca her ne kadar miR-31'i overeksprese eden meme kanser hücreleri daha büyük ve proliferativ tümörler oluştursa da bu tümörler çok iyi kapsüle edildiklerinden daha az invaziftirler ve bundan dolayı da miR31, metastazı, metastazın erken safhalarında engellemektedir. miR-31 overeksprese eden hücrelerin doğrudan dolaşıma injeksiyonun hücrelerin hayatta kalımları ile akciğerlerde sekonder tümör oluşumunu engellemesi miR31'in metastazı birçok kedemede engellediğini düşündürmektedir. Aksine, in vivo da miR-31 inhibisyonu invazif yeteneği arttırmakta ve metastazı ilerletmektedir. miR-31'in foksiyonel olarak anti-metastatik etkisini uyguladığı ilişkili mRNA hedeflerini belirlemek için araştırıcılar, miRNA-hedef tahmin algoritmaları, TargetScan ve PicTar tarafından belirlenmiş miR-31'in kabul edilmiş olan hedefleri için gen-ontoloji analizleri yapmışlar. Bu yaklaşımla, insan meme kanser hücrelerinde miR-31 için 6 hedef olduğunu onaylamışlardır: frizzled3 (Fzd3), integrin α5 (ITGA5), miyozin fosataz-Rho-interacting protein (M-RIP), matriks metallopeptidaz 16 (MMP16), radiksin (RDX) ve ras homoloğu olan gen ailesinin üyesi A (ras homolog gene family member A)

(RhoA). İlginç olarak araştırıcılar, metastatik meme kanser hücrelerinde bu genlerden 3'ünün: ITGA5, RDX and RhoA re-eksprese olarak miR-31'e atfedilen motilite defektlerini ortadan kaldırdığını, bozulmuş olan invazyon ve direnç defektlerini tersine çevirdiğini göstermişler ve dolayısıyla bu 3 genin miR-31 için önemli fonksiyonel hedefler olduklarını ileri sürmüşlerdir. Sonuç olarak bütün bu bulgular miR-31'in meme kanseri için etkin bir teropatik hedef olabileceğini göstermektedir çünkü miR-31 antimetastatik etkisini birçok prometastatik geni hedefleyerek göstermektedir (O'Day ve ark 2010, Valastyan ve ark 2009).

1.5.6. Meme Kanserindeki Onkogenik miRNA'lar

a)miR-27a:miR-27a meme kanserinde onkomiR olarak bildirilmiş olup transkripsiyonel ko-faktör olan ZBTB10 genini regüle eder. miR-27a'nın potansiyel hedefi olan bu çinko parmak ZBTB10 geni, hücre siklusunun G0-G1'den S fazına geçişini sağlayan ve bir transkripsiyon faktörü olduğu düşünülen onkogen spesifik proteinlerin (Sp) kabul edilen represörüdür. MDA-MB-231 hücrelerindeki miR-27a inaktivasyonu ZBTB10 ekspresyonunu arttırdığı ve Sp genlerinin miktarını azalttığı bildirilmiştiır. Bununla birlikte miR-27a, MDA-MB-231 hücrelerinde, cdc2/siklin B inhibitörü olan Myt-1 ekspresyonunu baskılayarak cdc2/siklin B aktivitesini arttırır ve meme kanser hücrelerini proliferasyona teşvik eder(Yu ve ark 2010, Shenouda ve ark 2009). Tedaviye yönelik yapılan çalışmalarda ise histon deasetilaz inhibitörü olan LAQ824 ile proapoptotik doz kullanılarak yapılan tedavi sonrasında SKBR3 hücre hatlarında miR-27a'nın downregülasyonu bildirilmiştir (Shenouda ve ark 2009).

b)miR-10b: miR-10b, insan kanser hücrelerinde potansiyel metastatik etkisi olan ilk miRNA olarak bulunmuştur. Çoğu meme tümöründe overekspresе olan miR-155'in aksine miR10b sadece metastatik kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese olmaktadır ve in vitro da hücre migrasyonu ile invazyonunu ilerlettiği in vivo da tümör invazyonu ve metastazını başlattığı bildirilmiştir. miR-10b ekspresyonu transkripsiyon faktörü olan Twist tarafından tetiklenir ve ardından miR-10b diğer bir transkripsiyon faktörü olan homeobox D10 (HOXD10) translasyonunu inhibe eder. Bu inhibisyon ise kanser hücre migrasyonu ve invazyonunu tetikleyen bir prometastatik gen olan RHOC (ras homologue gene family member C) ekspresyonunun indüksiyonunu da içeren birçok hücresel değişimlere neden olan yolakları çalıştırır (O'Day ve ark 2010).

c)miR-21: miR-21 de meme kanseri dahil çoğu tümörde overeksperese durumdadır. Meme tümörlerinde normal meme dokularıyla karşılaştırıldığında oldukça yüksek seviyede upregüle olmaktadır ve onkogenik fonksiyon göstemektedir. Hücre kültürlerinde miR-21'in onkogenik rolünü araştıran çalışmalar fare ksenograftlarında da yapılmış olup miR-21 knock down'unun hücre büyümesini engelleyerek meme tümör gelişimini baskıladığı bildirilmiştir. MCF-7 hücrelerinde tümör süpresör olan tropomiyosin 1 (TMP1) miR-21'in hedeflerinden biridir. TPM1, aktin filament bağlama proteinlerine dahil olan bir tropomiysin izoformudur. Meme kanseri dokularından kökenlenen epitel hücrelerinde ekspresyonu yoktur. TPM1 downregülasyonu, bağlanma yerinden bağımsız (anchorageindependent reorganization) mikrofilament reorganizasyonunu ve bağlanma yerinden bağımsız büyümeyi (anchorage-independent growth) arttırır (Shenouda ve ark 2009). miR-21 hedeflerine daha geniş bir çerçeveden bakıldığında birçok p53 ile regüle edilen mRNAların (FAM3c, ACTA2, APAF1, BTG2, FAS, CDKN1A (p21), PDCD4 ve SESN1 gibi) da olduğu görülür ki bu da akla miR-21 ile p53 tümör süpresör yolağı arasında fonksiyonel bir bağ olabileceğini getirir (Yu ve ark 2010, Shenouda ve ark 2009, O'Day ve ark 2010). miR-21'in tümör süpresör gen programlı hücre ölümünü down-regüle etmesi de miR-21'in hücre proliferasyonundaki etkisini ortaya koyar (O'Day ve ark 2010). Yapılan famakolojik çalışmalarda da araştırıcılar, MCF-7 hücrelerindeki miR-21 antagonizasyonunun apoptoza neden olduğunu ve bunun da anti-miR-21 ile transfekte edilen hücreler ile bu hücrelerden kökenlenen tümörlerdeki düşük Bcl-2 protein ekspresyonu ile ilişkili olduğunu göstermişler ve Bcl-2'nin dolaylı olrak miR-21 hedefi olabileceğini ileri sürmüşlerdir. miR-21'in diğer önemli bir hedefi ise fosfataz ve tensin homoloğu tümör süpresör gen olan PTEN'dir. Ayrıca Maspin de miR-21'in direk hedefidir. Bu 3 genin metastatik meme kanser hücre hatlarında invazif kapasitedeki düşmelerden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak mir-21 onkogenik bir miRNA'dır ve sadece tümör gelişiminde değil ayrıca invazyon ile tümör metastazında birçok anti-metastatik geni hedefleyerek önemli rol oynamaktadır (O'Day ve ark 2010).

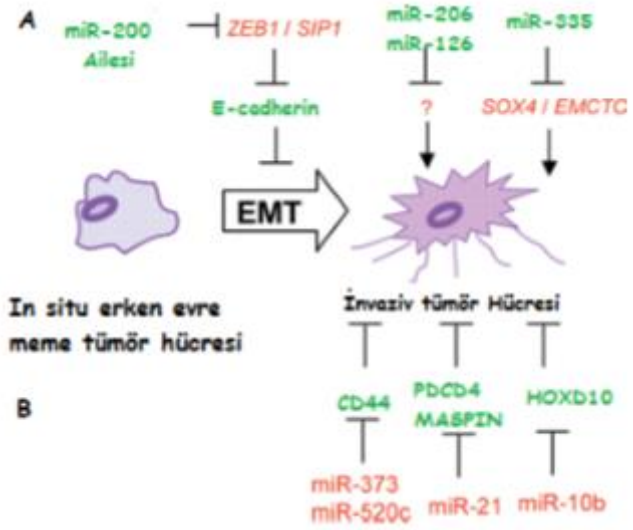
d)miR-155: miR-155, meme kanseri dâhil çoğu insan malignitelerinde overeksprese durumdadır. Farelerde normal meme bezi epitelyum (NMuMG) hücrelerinde yapılan bir çalışmada miR-155'in TGF-β/Smad4 yolağı ile upregüle edildiği ve TGF-β ile uyarlan EMT ve hücre invazyonuna aracılık ettiği bildirilmiştir. Mekanizmada miR-155'in hücre adezyonu, motilitesi, polaritesi gibi birçok hücresel olayları regüle eden ve ayrıca hücre bağlantı oluşumunda ve stabilizasyonunda önemli bir aracı olan RhoA

ekspresyonunu doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir. Daha sonraki çalışmalarla da araştırmacılar, invazif tümörlerde (noninvazif kanser dokularında değil) miR-155'in oldukça yüksek oranda eksprese edildiğini göstererek, insan primer meme karsinomlarında miR-155'in kanser invazivitesiyle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (O'Day ve ark 2010, Volinia ve ark 2006, Kong ve ark 2008).

e)miR-373/520c ailesi: Metastatik olmayan meme kanser hücre (MCF-7) hatlarında miR-373/520c ailesinin prometastatik özellikte olduğu gösterilmiştir. In vivo ve in vitro da yapılan diğer çalışmalar da miR-373 ve miR-520c'nin kanser hücre migrasyonu ve invazyonunu ilerlettiğini göstermiştir. Mekanizma çalışmaları, bazı kanser hücre hatlarının migrasyon için miR-373'e gereksinim duyduğunu ve bu hücrelerin migratör fenotipe, metastaz represörü olan CD44 ekspresyonunu inhibe ederek geçtiğini bildirilmiştir (O'Day ve ark 2010).

1.5.7. Meme Kanserindeki Metastatik miRNA'lar

Metastaz herhangi bir kanser türünün ilerleyişinde son ve fatal basamak olup karmaşık bir süreç olarak ifade edilmektedir, çünkü primer solid tümör hücreleri komşu hücreleri istila ederek sekonder tümöre gelişirler (Şekil 5 A ve B) (Yu ve ark 2010, Shenouda ve ark 2009). Tümör hücre intravazyonu, dolaşımda bulunuşu, uzak organlara ekstravazyonu, anjiyogenez ve sınırsız büyümesi metastatik sürecin içindedir. Bu süreçlerdeki moleküler ihtiyaçlar ise doku spesifik olabilmektedir. Meme karsinomlarında daha çok kemik ya da akciğer metaztazı sözkonusudur (Shenouda ve ark 2009).



Şekil 5. Meme kanseri metastazının miRNA'lar tarafından regülasyonu. A:Metastazındaki inhibitör miRNA'lar. B:Metastazdaki indükleyici miRNA'lar (Yu ve ark 2010)

miRNA ve meme Ca metaztaz ilişkisi son yıllarda ortaya çıkarılmıştır. Meme kanser hücreleri, büyümeye ve çoğalmaya devam edebilecekleri vücudun herhangi bir yerine yayılma potansiyeline sahiptir. Metastaz süpresör gen olan CD44 ekspresyonu meme kanser progresyonundan metastatik fenotipe kadar olan süreç boyunca azalır. miR-373 ve miR-520c, insan meme kanser hücre migrasyonunu ve invazyonunu in vitro ve in vivo da CD44 ekspresyonunu baskılamak suretiyle uyarır. miR-21, meme kanser invazyonunu ve metastazını, birçok tümör/metastaz süpresör geni hedefleyerek ilerletir. Hem primer insan meme epitelyum hücreleri hem de MCF-10A hücreleri ile karşılaştırıldığında, meme kanser hücrelerinde miR-10b'nin belirgin bir Şekilde upregülasyonu söz konusudur (Yu ve ark 2010). Ma ve ark. (Ma ve ark 2007) meme Ca metastatik hücrelerinde, miR-10b'nin, metastatik olmayan hücrelere göre daha fazla eksprese edildiğini göstermiştir. Metastatik olmayan hücrelerdeki miRNA-10b overekspresyonu güçlü bir invazyon ve metastazı teşvik ederken hücre proliferasyonuna etki etmez (Shenouda ve ark 2009). miR-10b, HOXD10 genini hedefleyerek (homeobox D10'u şifreleyen mRNA'yı da engelleyerek) çok iyi karakterize edilmiş olan pro-metastatik gen olan RHOC'un ekspresyonunu arttırarak in vitroda hücre migrasyonunu kolaylaştırdığı ve in vivoda meme kanser invazyonunu başlattığı gösterilmiştir (Yu ve ark 2010, Shenouda ve ark 2009). miR-10b, in vitro da Twist (sapma) epitelyal mezenkimal geçişini (EMT) ve meme tümör metaztazını ilerletir ve miR-10b direk olarak transkripsiyonel açıdan Twist ile regüle edildiği bildirilmiştir (Yu ve ark 2010). Bu

sonuçlar Gee ve ark. (Gee ve ark 2008) tarafından 92 nodal metaztazı olan ve 127 nod-negatif olan primer meme kanseri teşhisi konmuş hastalarda tekrar araştırılmış ve miR-10b seviyeleri ile metastaz ya da prognoz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ikişki gözlenmediği bildirilmiştir (Shenouda ve ark 2009). Aksine, miR-335, miR-206 ve miR-126 insan meme kanser metaztazının süpresör miRNA'ları olarak tanımlanmıştır. miR-335 veya miR-206 overekspresyonu akciğer metastatik LM2 hücreleri ile kemik metastatik BoM1 hücrelerinin migrasyonlarını azaltır. İnsan meme tümörlerindeki miR-335 ve miR-126 ekspresyonu metastatik nüks ile ters ilişkilidir (Yu ve ark 2010). Tavazoie ve arkadaşları miR- 335, miR-126 ve miR-206'nın metastatik loci'de down-regüle olduğunu göstermiştir(Tavazoie ve ark 2008). miR-335 ve miR-126 özellikle metastaz yapmayan döngü ile zayıf bir ilişki göstermektedir (Shenouda ve ark 2009). Metastatik hücrelerde 6 protein kodlayan genin miR-335 tarafından baskılandığı gösterilmiştir. Bu protein hedefleri arasındaki transkripsiyon faktörlerinden tenascic C ve progenitör hücre gelimesini ve migrasyonunu regüle ettiği bilinen transkripsiyon faktörü SOX4'ün susturulması in vitro ve in vivo da metastatik potansiyeli azaltmaktadır. Bu sonuçlar; miR-335 kaybının metaztazda kritik effektör olarak rol oynadığına işaret etmektedir. Benzer şekilde let-7 ailesi, kök hücre benzeri özelliklere sahip olan ve potansiyel olarak meme tümörü oluşumunu başlatan hücrelerde, çoğunlukla sabit olarak down-regüle edilen miRNA'lardandır. let-7 ailesi üyeleri HRAS ve HMGA2 gibi birden fazla hedefi susturabilmektedir (Shenouda ve ark 2009). miR-200 ailesi ve miR-205 tümör metaztazında önemli bir erken evre olarak kabul edilen EMT'yi regüle ederler. Mezenkimal fenotipteki invazif meme kanseri hücre hatlarında, bu miRNA'larin ekspresyonları azalır. Düşük ekspresyonu, TGF-B aracılı EMT'yi önler. Aksine bu miRNA'ların mezenkimal hücrelerde aşırı ekspresyonları mezenkimalden epitelyal dönüşümünü başlatır. miR-200 ailesi EMT indüksiyonu ve tümör metastazında rol alan ZEB1 ve SIP1'i represe eder. ZEB1-miR200 ailesi feedforward döngüsü EMT'yi stabilize edebilir ve dolayısıyla kanser hücre invazyonunu ilerletebilir. miRNA'ların metastazı regüle ettiğiyle ilgili kültür hücrelerinde yapılan bu bulgulardan dolayı transgenik ve knockout farelerde yapılan ve yapılacak olan in vivo miRNA çalışmaları oldukça önem arz etmektedir (Yu ve ark 2010, Shenouda ve ark 2009).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- Timokinon: Sigma-Aldrich 27-4666
- Etanol: Merck K38169483 750
- KH_2P0_4:Merck A0047373 923
- KOH: Merck B0201933 811
- KC1: Sigma-Aldrich 12636
- Sodyum-Potasyum tartarat: Merck A875387 811
- Na_2C0_3: Sigma-Aldrich S7795
- $CuS0_4.5\ H_20$: Merck A897690 739
- Folinciocalteu's fenol: Merck HC140610
- Cell Lysis Buffer Solution: Merck MSP010065
- NaOH: Sigma-Aldrich S8045
- BSA (Bovin Serum Albumin): Sigma-Aldrich A2153
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) : Biological Industries Kibutz Haemek Israel Cat No: 01-lA
- Penisilin-Streptomisin: Penicillin-Streptomycin Solution 10,000 units/ml Penicil (BIO-IND,BI03-031-1C)
- Glutamin-L-glutamin Solution, 29.2mg/ml in Saline (200 mmol) (BIO-IND,BI030201B)
- Fetal Bovin Serum (FBS): Foetal Bovine Serum (FBS) European Grade Heat Inactivated (BIO-IND,BI04-127-1B)
- Phosphate Buffered Saline (PBS): Biological Industries Kibutz Haemek Israel Cat No:02-lA
- Tripsin-EDTA: Trypsin EDTA, Solution C (0.05%) EDTA (0.02%), with

Phenol (BIO-IND,BI03-053-lB)

- Roche High Pure miRNA Isolation Kit (RocheDiagnostics, 05080576001) miScript II RT Kit (Qiagen)
- Exonuclease Kit (New England Biolabs, #MO293L)

2.1.2.Cihazlar ve Laboratuvar gereçleri

- C02 inkübatörü: SANYO O2/CO2 INCUBATOR MCO-175M
- Laminar akımlı kabin: Steril VBH Compact
- Santrifüj: Sigma 3K30
- Işık mikroskobu: Leica Dmil Led (inverted microscop)
- Buzdolabı (+4 °C ve -20°C): ALTUS AL 302
- -40°C buzdolabı: SANYO MDF-U425
- -80°C buzdolabı: SANYO MDF-U5186S
- Azot tankı: LS 750 Las Systems Taylor-Wharton
- Thoma lamı: IsoLab, Tiefe depth profendeur 0,200mm
- Steril filtre: 0,45µm Lot No: N0403113103
- Flask: TC Flask,75 cm^2, Canted Neck, Anti-Tip, Plug Seal, Sterile (CORNING, CC430720)
- Falcon tüp: 352098 Blue max™ 50ml polypropyleneconicaltube 30x115mm style
- Kriyo tüp: REF:C12ARBIPS
- Piko Real-Time PCR System(ThermoScientific)
- Serolojik pipet: Corning® Costar® Stripette® serological pipettes, bulkpacked (5 ve 10 ml)
- Dynamic Array chipe(Fluidigm)
- Mikropipet (1000, 200, 10µl): Gilson

2.2. Metod

2.2.1.Hücre Kültürü

MCF-7 hücre serisi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyokimya A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Abdülkerim Bedir tarafından hediye edilmiştir.

MCF-7 hücreleri nemlendirilmiş, %5 CO2 içeren ve 37°C'lik atmosferde, %10 FBS ve %1 PSG içeren DMEM besi yerinde kültüre edildi.

Hücrelerin pasajlanması 4-5 günde bir olacak şekilde, tripsin-EDTA ile kaldırılması ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 75 cm2'lik flasklarda besi yerine alınması şeklinde yapıldı.

Hücre stoklanması ise tripsinlenen hücrelerin, santrifüj'den sonra besi yerinin uzaklaştırılması, %10 DMSO ve %90 FBS içeren solüsyonla karıştırılması ve 1,5 ml'lik kriyo tüplere alınarak, -20°C'de 1 gece beklettikten sonra -80°C'de ve sonra sıvı azot tankına konularak saklanması şeklinde gerçekleştirildi. Bu şekilde depolanan hücreler gerektiğinde hızlıca 37 °C'de çözülüp, üzerine 3 ml besi yeri ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, hücre pelleti tekrar 1 ml besi yerinde çözülerek, petri kabında taze besi yeriyle pasajlandı.

Hücre sayımı için; tripsinlenen hücreler 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra, kalan hücre pelleti, 1-2 ml besi yerine alındı. Karıştırılarak 10'ar µl Thoma lamının alt ve üst kısımlarına aktarılarak, Thoma lamının alt ve üst bölümlerinde bulunan 16 küçük karede hücre sayımı yapılmış ve hücre sayısı 1000000 olacak şekilde petri kaplarına ekim yapıldı.

2.2.2. RT-PCR Yöntemiyle Çalışma Yöntemi

Mersin Üniversitesi Toros Gen laboratuvarında RT-PCR yöntemiyle daha sonraki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.1. Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu

Hücre kültürü örneklerinden RNA izolasyonu için Roche High Pure miRNA Isolation Kit (RocheDiagnostics, 05080576001) kullanılarak yapıldı.

Kit içeriği:

1. ParaffinTissueLysisbuffer 20 ml
2. Proteinaz K (Liyofilize) 100 mg(Üzerine 4.5 ml elutionbuffer)

3. Bindingbuffer 80 ml
4. BindingEnhancer 20 ml
5. Washbuffer 2x10ml(Üzerine 40 ml absolute etanol)
6. Elutionbuffer 30 ml
7. Filtreli tüpler 100 adet
8. Collection tüpler 100 adet

a)İzolasyon Prosedürü:

İzolasyon, kit üreticisinin yapışık hücre kültürü örnekleri için önerdiği üzere iki aşamalı yapıldı. Birinci aşama ile hücre kültür plaklarından hücreler alındı ve hücrelerin parçalanarak hücre içeriğinin elde edilmesi sağlandı, 2. aşama ile hücre lizatından RNA izolasyonu yapıldı.

b)İzolasyon Protokolü:

1. İçerisinde hücre 150 µl hücre lizatı bulunan tüplere 312 µl Binding Buffer, 200 µl Binding Enhancer eklendi ve karıştırıldı. Karışım filtreli toplama tüpüne alınarak 14.000 rpm'de 30 sn.ye santrifüj edildi.

2. Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi ve 14.000 rpm'de 30 sn.ye santrifüj edildi.

3. Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, üzerine 300 µl Wash Buffer eklendi ve 14.000 rpm'de 30 sn.ye santrifüj edildi.

4. Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.

5. Filtre yeni bir kapaklı ependorf tüpe aktarıldı, filtrenin tam ortasına gelecek şekilde 50 µl Dnase, RNase içermeyen su eklendi, oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edildi ve 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.

6. İçinde Total RNA bulunan tüp içeriği, çalışmanın ilerleyen aşamalarında kolaylık sağlaması açısından 96 kuyuluk piko plaklar içerisine alındı, film ile kaplandı ve -80^{0}C'de saklandı.

2.2.2.2. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi

Elde edilen RNA'ları komplamenter DNA'ya çevirmek için miScript II RT Kit (Qiagen) kullanıldı. Kit içeriğini 5X miScript HiSpec Buffer, 10X miScript Nucleics Mix,

miScript Reverse Transcriptase Mixoluşturmaktadır. Kullanıma başlamadan önce bütün solüsyonlar ve RNA örnekleri buz üzerinde tutularak erimeye bırakıldı.

cDNA sentezinde 95 örnek için ölü hacimler hesaplanarak aşağıdaki cDNA karışımı hazırlandı.

5X miScript HiSpec Buffer	168 µl
10X miScript Nucleics Mix	84 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	84 µl
Dnase, RNase içermeyen su	84 µl
TOPLAM	420 µl

Karışım 16 kanallı otomatik pipet yardımı ile 96 kuyuluk piko plağ'a her kuyuda 3,5 µl olacak şekilde dağıtıldı. Karışım üzerine 3,5µl RNA örneği yine 16 kanallı otomatik pipet yardımı ile dağıtıldı, böylece reaksiyon final hacmi 7.0 µl olacak şekilde hazırlandı. Plak film ile kapatılarak plak karıştırıcıda 3000 rpm'de 3 dk. karıştırıldı, plak santrifüjünde santrifüj edildi ve Piko Real-Time PCR System (ThermoScientific) cihazında aşağıdaki ısı döngülerine maruz bırakıldı.

37°C'de 60 dakika 95°C'de 5 dakika 4°C ∞

Bu aşamanın tamamlanması ile cDNA sentezi tamamlandı, aynı adımlar diğer 95 örnek için de uygulandı ve örnekler bir sonraki adım için -20'de muhafaza edildi.cDNA örnekleri preamplifikasyon aşamasından hemen önce 1:5 oranında DNA Suspension Buffer ile dilüe edildi.

a)Pre-amplifikasyon Aşaması: Preamplifikasyon aşamasında 95 örnek için ölü hacimler de hesaba katılarakaşağıdaki karışım hazırlandı.

5X miScript PreAmp Buffer	230 µl
HotStartTaq DNA Polymerase	92 µl
Primer Pool	230 µl
DNase, RNase İçermeyen su	322 µl
miScript PreAmp Universal Primer	46 µl

TOPLAM 920 µl

Hazırlanan karışım 16 kanallı otomatik pipet yardımı ile 96 kuyuluk piko plak'a her kuyuda 8,0 µl olacak şekilde dağıtıldı. Karışımın üzerine dilüe edilmiş cDNA örneklerinden 2,0 µl eklenerek reaksiyon final hacmi 10,0 µl olarak ayarlandı. Plak film ile kapatıldı, 3000 rpm'de 3 dakika plak karıştırıcıda karıştırıldı, kısaca plak santrifüjünde santrifüj edildi ve PikoReal-Time PCR System de aşağıdaki ısı döngülerine maruz bırakıldı.

95°C'de 15 dakika

94°C'de 30 saniye
60°C'de 3 dakika } 12 döngü

4°C ∞

Bu aşamanın sona ermesi ile preamplifikasyon aşaması tamamlandı, aynı adımlar diğer 95 örnek için de uygulandı ve örnekler bir sonraki adım için -20'de muhafaza edildi.

b)Eksonükleaz Aşaması: Preamplifikasyon ürünlerinin primerdimerlerinden arındırılması için uygulanan bu aşamada Exonuclease Kit (New England Biolabs, #MO293L) kullanıldı. Kit içeriğini Exonuclease I ReactionBuffer ve Exonuclease I Enzim oluşturmaktadır. Exonuclease karışımı 95 örnek için ölü hacimler hesaplanarak hazırlandı. Karışımda örnek başına 0.08 µl Exonuclease I ReactionBuffer, 0.16 µl Exonuclease I Enzim ve 0.56 µl DNAse-RNAse içermeyen su kullanılarak hazırlandı ve 16 kanalı otomatik pipet yardımı ile içerisinde 10.0 µl preamplifiyecDNA'lar bulunan plak'a 0.8 µl dağıtıldı. Piko plak film ile kapatıldı, 3000 rpm'de 3 dakika plak karıştırıcıda karıştırıldı, kısaca plak santrifüjünde santrifüj edildi ve PikoReal-Time PCR System cihazında aşağıdaki ısı döngülerine maruz bırakıldı.

37^0C'de 15 dakika, 95^0C'de 5 dakika, 4°C ∞

Bu aşamanın da tamamlanması ile örnekler 1:5 oranında DNA Suspension Buffer ile dilüe edildi, aynı adımlar diğer 95 örnek için de gerçekleştirildi ve miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için Real-Time PCR işlemine geçildi.

2.2.3.3.miRNA Ekspresyonlarının Biomark Real-Time PCR (Fluidigm) Cihazı ile Belirlenmesi

Dynamic Array chipe (Fluidigm) kontrol kanalı sıvıları enjekte edildikten sonra chip IFC Controller cihazına yüklendi ve PRIME işlemine alındı.

a)Primer Plağın Hazırlanması:

Liyofilize olarak temin edilen miRNA primerleri aşağıdaki karışım hazırlanarak sulandırıldı ve Dynamic Array chiplere yüklemeye hazır hale getirildi.

PCR Universal Primer	180 µl
2X Assay Loading Reagent	360 µl
DNase, RNase içermeyen su	180 µl
TOPLAM	720 µl

Hazırlanan karışım 96'lık assay plağının tüm kuyularına, 8 kanallı otomatik pipetler yardımı ile her kuyuda 6.0 µl olacak şekilde dağıtıldı. Primer plağı film ile kapatıldı. Plak karıştırıcı üzerinde el ile bastırılarak 10 saniye vortekslendi, 4-5 saniye ara verilerek bu işlem 3 kez tekrarlandı ve plak santrifüjünde 2 dakika santrifüj edildi.

b)Örneklerin Hazırlanması:

Aşağıdaki karışım hazırlanarak, örnekler Dynamic Array chiplere yüklemeye hazır hale getirildi.

qPCR Master Mix	360 µl
20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	36 µl
DNse-RNase içermeyen su	84 µl
TOPLAM	480 µl

Hazırlanan karışım 16 kanallı otomatik pipet yardımı ile 96 kuyuluk piko plak'a her kuyuda 4,0 µl olacak şekilde dağıtıldı. Karışımın üzerine dilüe edilmiş olan preamplifiye cDNA örneklerinden 2,0 µl eklenerek final hacmi 6,0 µl olarak ayarlandı. Plak film ile kapatıldı, 3000 rpm'de 3 dakika plak karıştırıcıda karıştırıldı, kısaca plak santrifüjünde santrifüj edildi.

Hazırlanan primer ve örnek plakları PRIME işlemi tamamlanan chipin örnek ve assay kuyularına pipetlendi ve chip IFC controller cihazına tekrar yüklenerek LOAD işlemine alındı. Bu aşamanında tamamlanması ile cihazdan alınan chip Biomark RT-PCR cihazına yükleneren aşağıdaki termal programa alındı.

50°C'de 2 dakika

70°C'de 30 dakika

25°C'de 10 dakika

95°C'de 10 dakika

94°C'de 15 saniye
55°C'de 30 saniye
} 24 döngü

70°C'de 30 saniye

60°C- 95°CMeltingcurve

Melting Curve aşamasında her 0,2°C'lik ısı artışı için geçen süre 1 saniyedir. Melting Curve sırasında sıcaklık yavaş yavaş yükseltilir, artan sıcaklığa bağlı olarak çift sarmal zincirler ayrılmaya başlar ve floresans ışıma miktarında azalma olur. Bu aşamada belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı ölçülür. Melting Curve analizi ile her amplikonun Tm (melting temperature) derecesi saptanır ve primer dimer oluşup oluşmadığı izlenebilir. Amplifikasyon sonrası çoğaltılan her DNA ürününün içerdiği nükleotid kompozisyonuna ve amplikon büyüklüğüne göre özgün bir Tm derecesi vardır.

3. BULGULAR

3.1.Real-Time PCR bulguları

Ekspre ettiğimiz 84 miRNA tablo 6 da özetlenmiş ve bir tür veya organizmanın her hücresi için her zaman sabit düzeylerde eksprese olan Housekeeping gen çalışmamızda içerisinden uygun olan SNORD61 seçildi.

Tablo 1. Meme kanserinde tarama yaptığımız 84 adet miRNA içeren panelimiz ve 6 adet housekeeping gen

Position	Mature ID		
1	let-7a-5p	46	miR-200c-3p
2	let-7b-5p	47	miR-202-3p
3	let-7c-5p	48	miR-203a
4	let-7d-5p	49	miR-204-5p
5	let-7e-5p	50	miR-205-5p
6	let-7f-5p	51	miR-206
7	let-7g-5p	52	miR-20a-5p
8	let-7i-5p	53	miR-20b-5p
9	miR-1	54	miR-21-5p
10	miR-100-5p	55	miR-210-3p
11	miR-107	56	miR-212-3p
12	miR-10a-5p	57	miR-214-3p
13	miR-10b-5p	58	miR-22-3p
14	miR-125b-5p	59	miR-222-3p
15	miR-125b-1-3p	60	miR-223-3p
16	miR-128-3p	61	miR-25-3p
17	miR-129-5p	62	miR-26a-5p
18	miR-130a-3p	63	miR-26b-5p
19	miR-130b-3p	64	miR-27a-3p
20	miR-132-3p	65	miR-27b-3p
21	miR-140-5p	66	miR-29a-3p
22	miR-141-3p	67	miR-29b-3p
23	miR-145-5p	68	miR-29c-3p
24	miR-148a-3p	69	miR-31-5p
25	miR-152-3p	70	miR-328-3p
26	miR-155-5p	71	miR-340-5p
27	miR-15a-5p	72	miR-424-5p
28	miR-15b-5p	73	miR-429
29	miR-16-5p	74	miR-485-5p
30	miR-17-5p	75	miR-489-3p
31	miR-181a-5p	76	miR-495-3p
32	miR-181b-5p	77	miR-497-5p
33	miR-181c-5p	78	miR-548c-3p
34	miR-181d-5p	79	miR-607
35	miR-182-5p	80	miR-613
36	miR-186-5p	81	miR-7-5p
37	miR-18a-5p	82	miR-93-5p
38	miR-193b-3p	83	miR-96-5p
39	miR-195-5p	84	miR-98-5p
40	miR-199a-3p	85	SNORD68•
41	miR-199a-5p	86	SNORD72•
42	miR-19a-3p	87	SNORD95•
43	miR-19b-3p	88	SNORD96A•
44	miR-200a-3p	89	RNU6-2•
45	miR-200b-3p	90	SNORD61•

Çalışmamızda uygulana 3 farklı doz ve Fold regulation değerleri Tablo 7 de gösterilmiştir. Tablo da mavi renklendirdiğmiz seviyeler upregüle düzeylerini, kırmızı renklendirdiğmiz seviyeler ise downregüle düzeyleri ifade eder(Tablo 3).

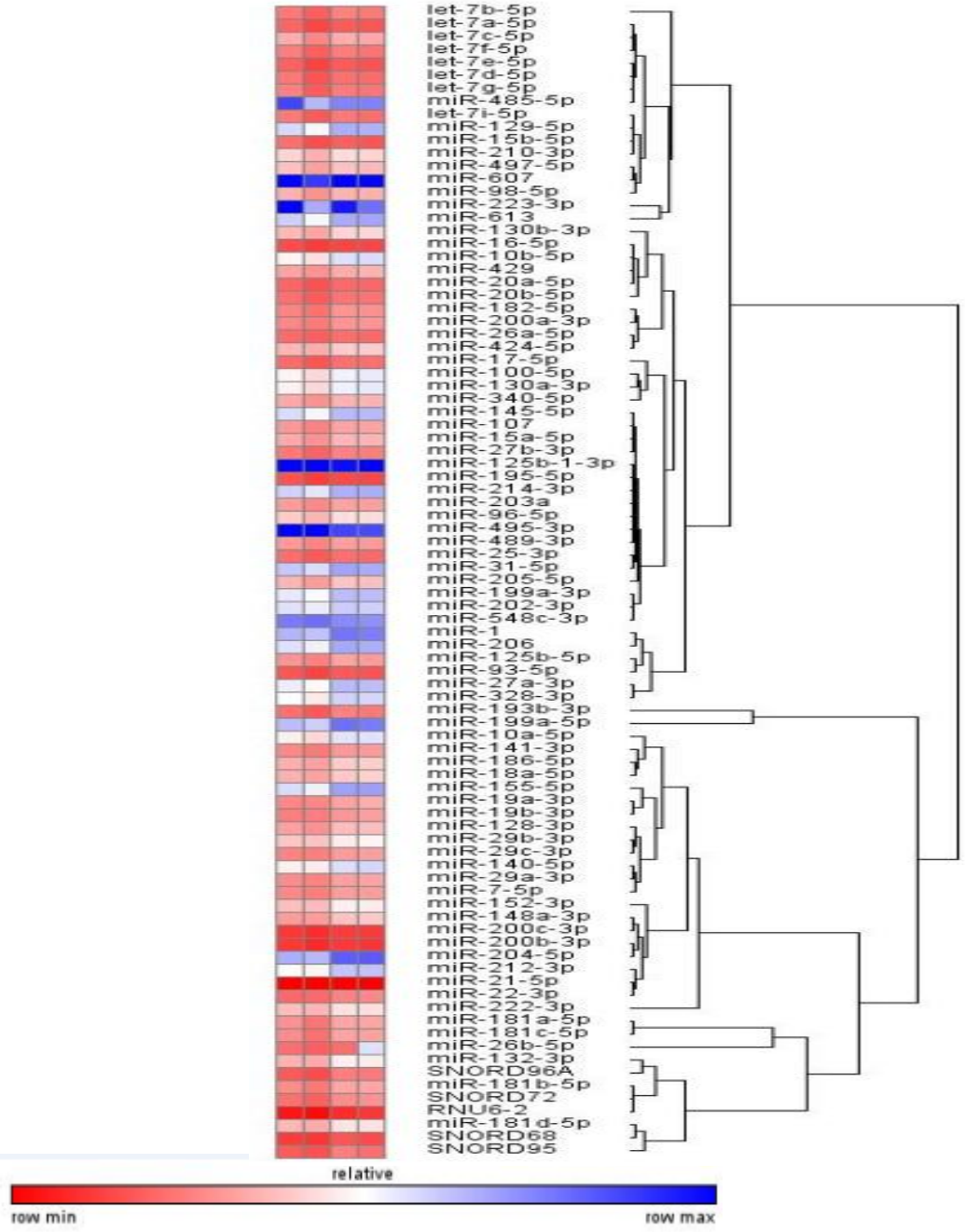
Tablo 2. 5µM, 25µM,50µM TQ dozun MCF-7 hücre mikroRNA düzeyleri

		5µM	**25µM**	**50µM**
		Fold Regulation	Fold Regulation	Fold Regulation
Position				
1	Let-7c-5p	-1,006	-1,04091	-2,2546
2	Mir-1	-1,6701	-2,2829	-1,6321
3	Mir-125b-1-3p	-10,3563	-74,0423	-28,9925
4	Mir-132-3p	-1,15	1,3215	2,2965
5	Mir-15b-5p	-1,0118	-1,6821	-2,4449
6	Mir-202-3p	-3,8425	-4,9025	-3,0097
7	Mir-210-3p	-1,0917	-1,824	-2,952
8	Mir-214-3p	-1,4949	-1,0636	2,1232
9	Mir-22-3p	-1,1766	-3,5469	-587,6522
10	Mir-223-3p	-12,3072	-3,5469	-587,6522
11	Mir-26b-5p	189,5144	84,1681	106,3985
12	Mir-31-5p	-2,038	-3,2709	-2,7727
13	Mir-424-5p	1,3736	-2,0081	-1,2505
14	Mir-485-5p	-12,2631	-3,894	-97,3292
15	Mir-495-3p	-37,7397	-531,4314	-208,0908
16	Mir-497-5p	1,0238	-2,1985	-3,0216
17	Mir-548c-3p	-46,1949	-79,4973	-20,5502
18	Mir-607	-5,0571	-11,3702	-29,1206
19	Mir-98-5p	1,1835	-1,5644	-2,194
	SNORD61	1	1	1

Tablo 3. 5µM, 25µM,50µM TQ dozunda MCF-7 hücrelerinde anlamlı olan miRNA'lar

Position		**5 µM**	**25 µM**	**50 µM**
1	let-7c-5p	0,975655	0,001258	0,002014
2	miR-1	0,000877	0,002438	0,008947
3	miR-132-3p	0,117895	0,079581	0,000318
4	miR-15b-5p	0,985616	0,000298	0,000067
5	miR-202-3p	0,062036	0,000241	0,004535
6	miR-210-3p	0,25356	0,001036	0,000235
7	miR-214-3p	0,177834	0,009978	0,035804
8	miR-22-3p	0,085214	0,256959	0,000021
9	miR-223-3p	0,031862	0,005979	0,001295
10	miR-31-5p	0,017762	0,017762	0,001298
11	miR-424-5p	0,093315	0,000217	0,006009
12	miR-495-3p	0,049249	0,00218	0,002204
13	miR-497-5p	0,741211	0,000081	0,000015
14	miR-548c-3p	0,04344	0,001563	0,015069
15	miR-98-5p	0,174818	0,000017	0,004163
	SNORD61	0	0	0

P<0,05 altında olan değerler kırmızı ile gösterilmiştir.(Tablo 4)



Şekil 6. MikroRNA panelimizin HeatMap şeması

HeatMap tablosu tüm miRNA'ları kapsayan bir diyagramdır. Bu tabloda kırmızı renkli olan miRNA'lar de artışı ve mavi renkli olan miRNA'lar ise azalıştaki düzeyleri göstermektedir. Ayrıca bu tabloda ki gruplandırmalar aynı etkiye sahip olan miRNA'ları göstermektedir(Şekil 6).

İstatislik sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda 3 farklı TQ doz seviyesinde ekspre edilmiş 12 miRNA elde edildi (Tablo 5).

Tablo 4. Eksprese olan miRNA'lar ve düzeyi

DOZLAR	**5µM TQ**		**25 µM TQ**		**50 µM TQ**	
MİRNA	Fold regulation	P value	Fold regulation	P value	Fold regulation	P value
Let-7c-5p	1,006	0,975655	-1,409	0,01258	-2,2548	0,002014
Mir-1	-1,6701	0,00877	-2,2829	0,002438	1,6321	0,00894
Mir-132-3p	-1,15	0,117895	1,3215	0,079581	2,2965	0,00318
Mir-15b-5p	-1,0118	0,985616	-1,6821	0,000298	-2,4449	0,000067
Mir-202-3p	-3,8425	0,062036	-4,9025	0,00241	-3,0097	0,004535
Mir-210-3p	-1,0917	0,25356	-1,824	0,001036	-2,952	0,000235
Mir-214-3p	-1,4947	0,177834	-2,399	0,009978	-2,1263	0,035804
Mir-22-3p	1,1766	0,85124	-1,0636	0,256959	2,1232	0,000021
Mir-31-5p	-2,038	0,017762	-3,2709	0,017762	-2,7727	0,001298
Mir-424-5p	1,3736	0,093315	-2,081	0,00217	-1,2505	0,006009
Mir-497-5p	1,0238	0,741211	-2,1985	0,00218	-3,0216	0,000015
Mir-98-5p	1,1835	0,174818	-1,5644	0,000017	-2,194	0,004163

Let-7c-5p, miR-15b-5p, miR-210-3p, miR-98-5p miRNA 5 µM ve 25 µM dozlarda bir azalış ve artış olmamış 50 µM dozda miRNA düzeyi downregüle olmuştur.

miR-1, miR-424-5p miRNA 5 µM ve 50 µM dozlarda bir azalış ve artış olmamış 25 µM dozda miRNA düzeyi downregüle olmuştur.

miR-132-3p, miR-22-3p miRNA 5 µM ve 25 µM dozlarda bir azalış ve artış olmamış 50 µM dozda miRNA düzeyi upregüle olmuştur.

mİR-202-3p, miR-31-3p miRNA 5 µM, 25 µM ve 50 µM dozların hepsinde miRNA düzeyi downregüle olmuştur

miR-214-3p, miR-497-5p miRNA 5 µM dozda bir azalış ve artış olmamış olmamış 25 µM ,50 µM dozlarda miRNA düzeyi downregüle olmuştur.

4.TARTIŞMA

Meme kanseri kadınların en sık kanseri olup, tanı ve tedavisinde son yıllarda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Meme kanserinin moleküler biyolojisinin aydınlatılması ile hedefe yönelik tedaviler bulunmuş ve bu tedaviler hastalığın prognozuna olumlu katkılar sağlamıştır.

TQ Nigella Sativa tohumları yağının önemli bileşenlerinden birisidir. TQ 'un insan sağlığı üzerinde yararlı terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. TQ ile muame edilimiş farklı kanser hücre serilerinde apopitozun kalasik özeliği arasında sayılan kromatin yoğunlaşması, plazma zarında fosfotidil serin translokasyonu, DNA fragmantasyonu gözlemlenmiştir(Banerjee ve ark 2010).

miRNA'lar, son on yıldır üzerinde çalışmalar yapılan ve kanser ile yakın ilişkisi bulunduktan sonra önemi her geçen gün daha da artan moleküllerdir. miRNA'ların meme kanseri patogenezinde rol oynadığının belirlenmesi, miRNA'ların ileride meme kanserinin tanı ve tedavisinde de kullanılabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle, miRNA ve meme kanseri ile ilgili çalışmalar son yıllarda daha da hız kazanmıştır.

Meme kanserinde miRNA ile ilgili ilk çalışma, Iorio ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışma olmuştur (Iorio ve ark 2005). Bu çalışmada 245 farklı miRNA, tümör dokusu ve sağlam dokuda mikroarray yöntemi ile araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, tümör dokusunda bazı miRNA'ların ekspresyon düzeyi yüksek, bazılarınınki ise düşük bulunmuştur. Ekspresyon düzeyi yüksek bulunan miR-21 ve miR-155'in meme kanserinde birer onkogen; ekspresyon düzeyi düşük bulunan miR-10b, miR-125b ve miR145'in ise meme kanserinde birer tümör süpresör gen gibi görev yaptığı gösterilmiştir (Iorio ve ark 2005).

Hur ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada miR-10b'nin meme kanseri gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca miR-10b, meme kanserinde klinik progresyon ve metastaz ile ilişkili bulunmuştur (Hur ve ark 2015). Bizim çalışmamızda miR-10b ailesinde bulunan miR-10b-5p eksprese edilmiş, 3 farklı dozda uygulana TQ'un düzeyinde bir değişikliklik gözlenmemiştir.

Scott ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada, meme kanserinde miR-27a, ZBTB10 adlı transkripsiyon faktörü üzerinden etki gösteren, onkogenik potansiyele sahip bir miRNA olarak bulunmuştur. Scott ve arkadaşları, miR-125a ve miR125-b'nin meme

kanserinde tümör süpresör gen olarak görev yapan miRNA'lar olduğunu göstermiştir. (Scott ve ark 2007). Bu çalışmada, miR-125a ve miR125-b'nin HER2 ve HER3 adlı tirozin kinaz reseptörlerinin ekspresyonunu baskılayarak etki ettiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ki miR-125b ailesinden olan miR-125b-5p ve miR-125b-1-3p ekspresyon düzeylerinde bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir.

Xiong ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada, endometrium kanserinde let 7c-5p downregüle olduğu Endometrial moleküler patogenezi ışık tutacak ve erken tanı ve sistemik tedavi için yeni olanaklar sunabileceği gözlemlenmiştir(Xiong ve ark 2014). Bizim çalışmanzda Let-7c-5p ekspresyonu 5 μM ve 25 μM dozlarındaki TQ bir değişme olmamış 50 μM dozdaki TQ miRNA düzeyi downregüle olduğu saptanmış ve bu çalışmayla bir paralellik sağlamıştır.

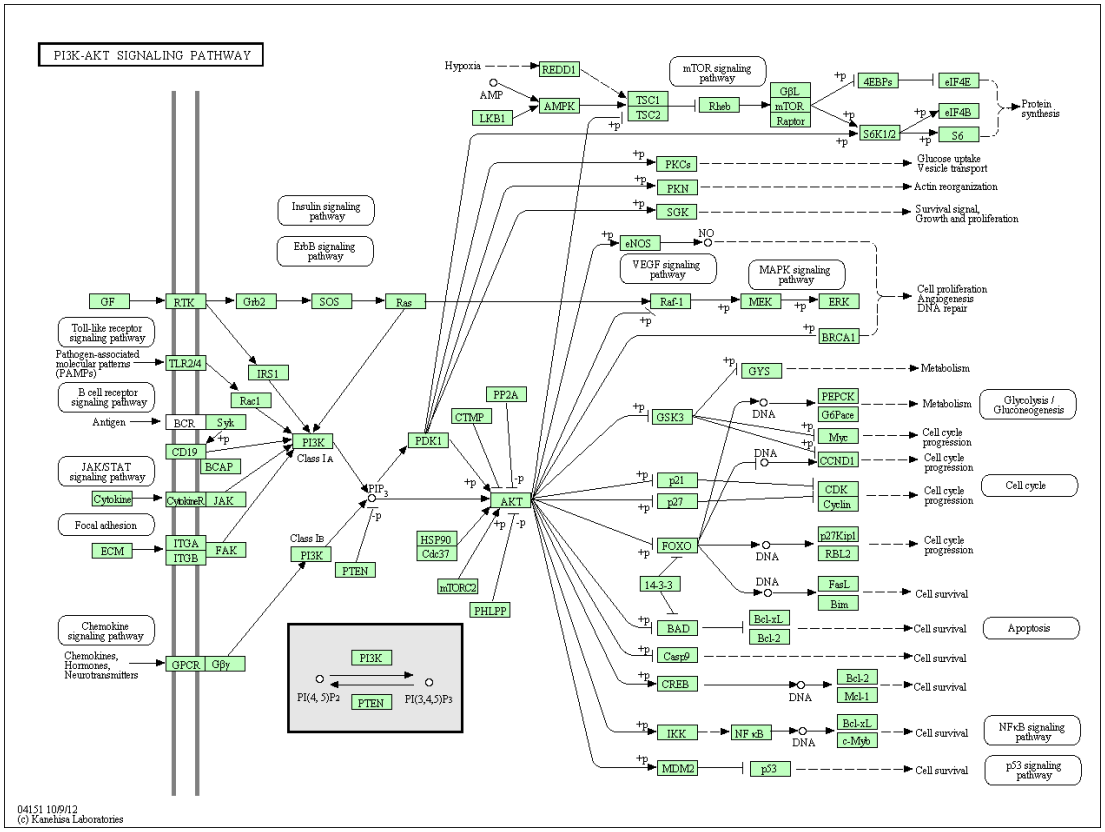
Beltran ve ark. 2011 yılında yaptıkları çalışmada MDA-MB-231,meme kanseri hücre hattında, miR-1 gibi potansiyel onkojenik miRNA'ların, downregüle olduğu gösterilmiştir(Beltran ve ark 2011). Bizde çalışmamızda MCF-7 meme kanseri hücre hattında miR-1 ekspresyonunun 25 μM TQ dozunda, benzer şekilde downregüle olduğunu gözlemledik.

Jiang ve ark. 2014 yılında yaptığı çalışmada mesane kanserili hastaların serum düzeylerinde PCR yöntemi ile miRNA profili analizi yapılmış ve miRNA panalinde mir 15b-5p'nin anlamlı derecede yükseldiği gözlemlenmiştir(Jiang ve ark 2014). Bizim çalışmamızda miR-15b-5p'nin 5 μM ve 25 μM dozlarında ki TQ ekspresyonunda her hangi bir farklılık gözlenmez iken 50 μM dozunda downregüle olduğunu saptadık.

Wang ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada yeni biyobelirteç bulmak için epitelyal over kanserinde (EOC) yaptıkları araştırmalarda miRNA taraması yapılmışlar. Bu amaçla çalışmada sağlıklı ve kanserli dokular kullanılmış ve miRNA paneli için PCR cihazı kullanılmış ve çalışma sonucunda miR 15b-5p normal dokularda over kanseri dokularına nazaran daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir(Wang ve ark 2014). Çalışmamızda ise MCF-7 meme kanseri hücrelerinde eksprese edilmiş ve miR-15b-5p downregüle olduğu saptanmıştır.

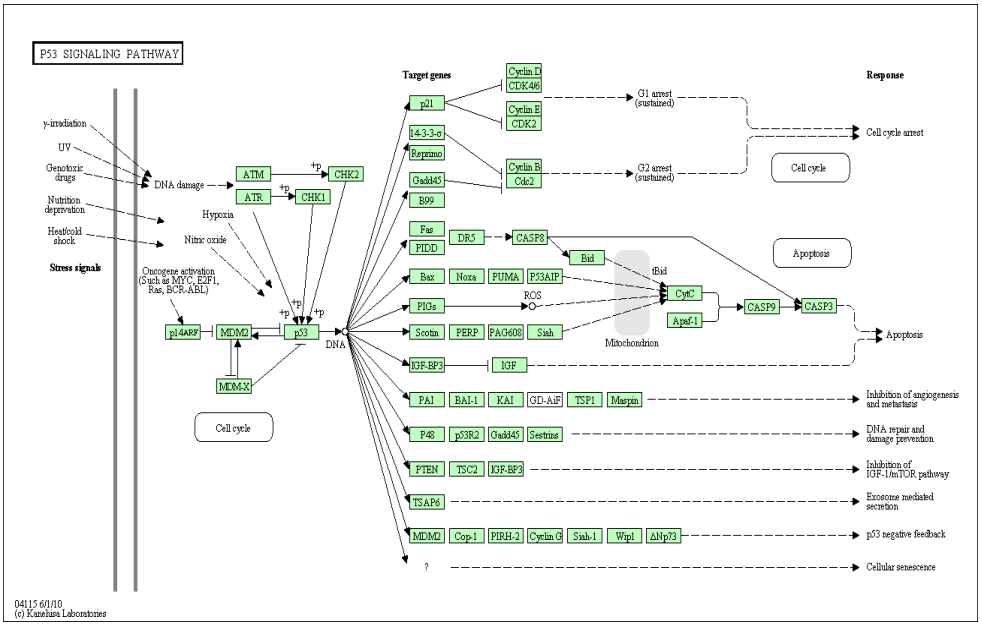
Shen ve ark. 2009 yılında yaptıkları çalışmada genetik varyasyonlar için ailesel meme ca hikayesi olan 42 hastanın DNA örneğini incelemiş ve 17 miRNA geninin meme tümör dokusunda yüksek veya düşük ekspreyon seviyelerini göstererek BRCA1/2, ATM,

PTEN, and CHEK2 gibi meme kanserindeki önemli genleri regüle ettiğini bildirmiştir (Shenouda ve ark 2009).



Şekil 7. MikroRNA'larla ilgili P13-AKT sinyal yolağı (http://diana.imis.athena-innovation.gr)

Pl3K-Akt sinyal yolağında hücre dögüsünü etkiler ve bu etkili durumda mir-124-3p 'nin ekspresyon düzeyi azalır, mir-132-3p ekspresyon düzeyi ise artar. Bu sinyal yolağında ayrıca PTEN genin susturulması ile PIP3 aktif hale geçer ve burdan PDK1 ve Llk genleri ile Akt3 aktifleşir. Akt3 genin aktifleşmesi ile mir-15b-5p ve mir-424-5p ekspresyon düzeyi azalır, mir-132-3p ekspresyon düzeyi ise artar. Akt3 genin aktifleşmesi ile hücre yaşamında önemli olan FOXO3 geni susturulduğun da CASP9 ve BAD genlerini apoptozun azaltır (Şekil 7).

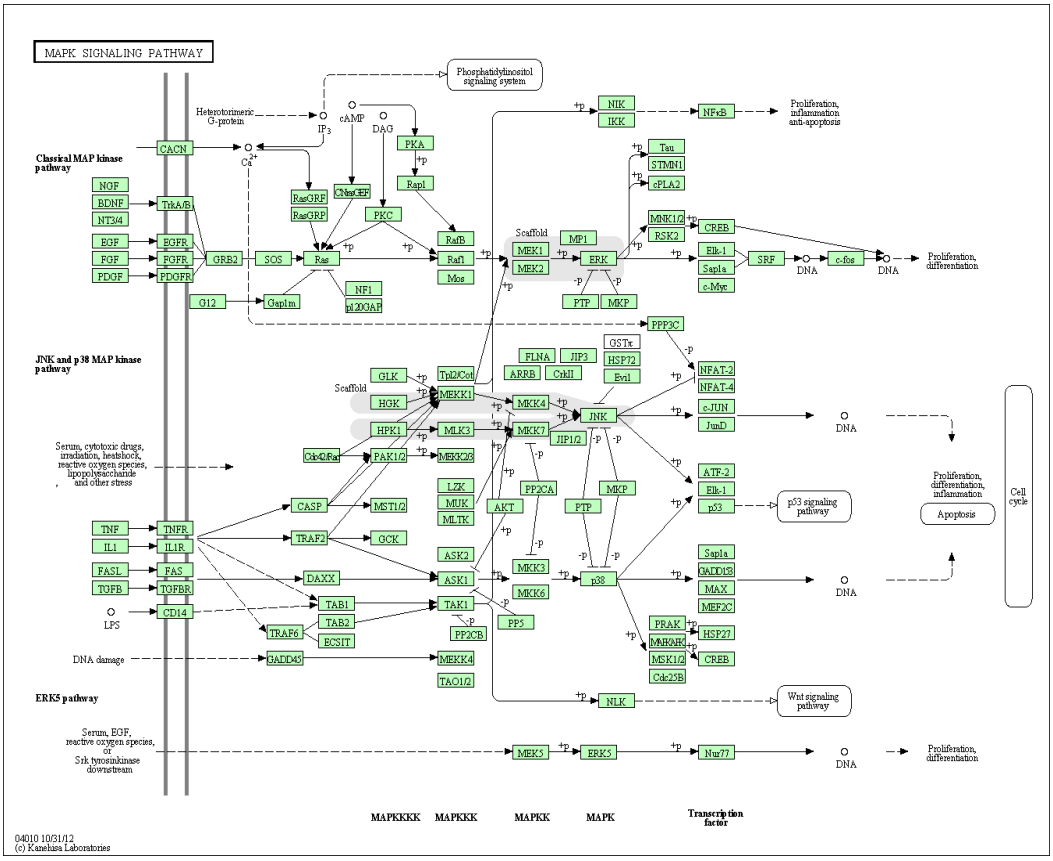


Şekil 8. MikroRNA'larla ilgili P53 sinyal yolağı (http://diana.imis.athena-innovation.gr)

P53 sinyal yolağında hücre döngüsünde etkili olan Myc, E2F1,Ras, BCR-ABL onkogenlerin aktifleşmesiyle MDM2,MDM4 genileri susturur ve bu mekanizmada mir-132-5p ekspresyon düzeyinde artma gözlenmiştir.

MDM2 genin inaktif olduğu durumlarda p53 geni baskılanır ve p53 geni de MDM4 genini baskılar ve bu baskılama DNA transkripsiyonu artırır bu yolakta mir-31-5p'nın ekspresyon düzeyinde azalma gözlenmiştir.Sinyal yolağında etkili olan PIDD1 geninin inaktif forma getirilmesiyle CASP8 aktifleşir ve CASP3 artar bu artışla apoptozun artışı gözlenir bu olay esnasında mir-214-3p ekspresyon düzeyinde azalma gözlenmiştir.

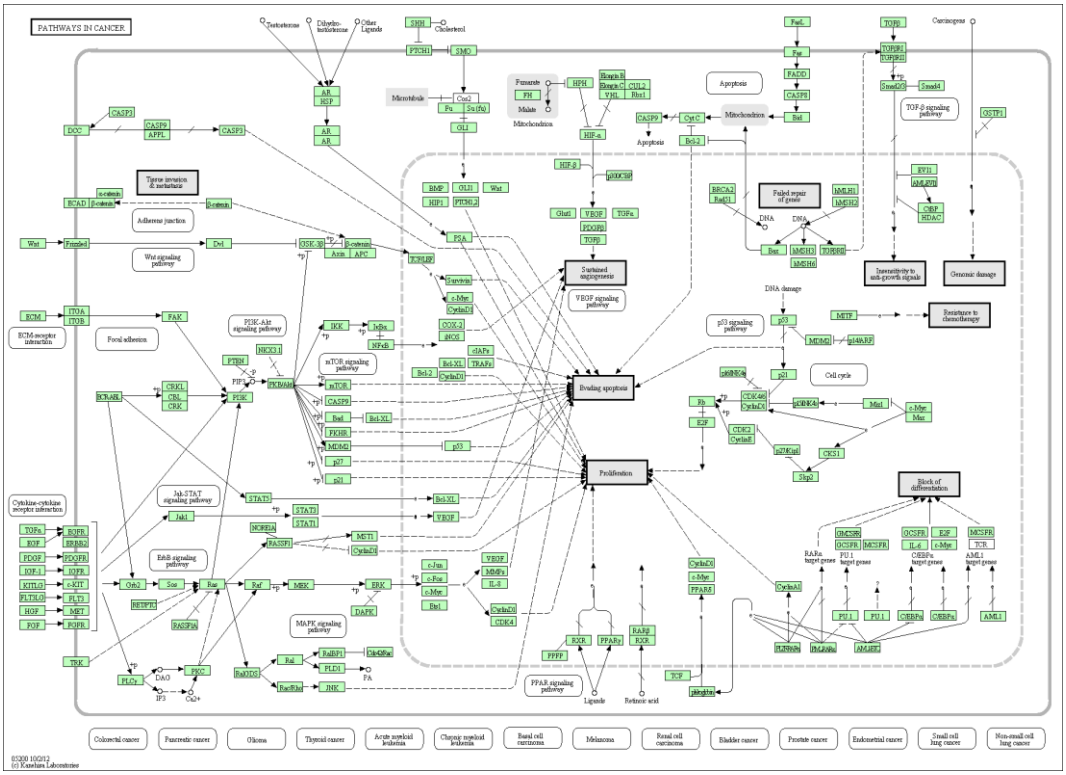
P53 genin susturulmasıyla DNA transkripsiyonu artar ve bu artış ile yolakta var oaln Cytc geni CASP9, CASP9,CASP3 aktifleştirip apopitozu artırır bu mekanizma içerisinde mir-15b-5p, mir-214-3p ekspresyon düzeyi azalıken mir-132-3p ekspresyon düzeyi artar (Şekil 8).



Şekil 9. MikroRNA'larla ilgili MAPK sinyal yolağı (http://diana.imis.athena-innovation.gr)

MAPK sinyal yolağında poliferasyon farklılaşmasında etkili olan BNNF geni NTRK2 susturulması sırasında mir-214-3p ekspresyon düzeyinde bir farklılık gözlenmiş ve GRB2 genin aktifleştirildiği tespit edilmiş. MAPK sinyal yolağında büyüme faktörü EGF geni EGFR aktifleştirirken iki büyüme faktörünü etkiler, birincisi FGF geni bu gen aktifleştiği durumda mir-497-5p ekspresyonunda negatif bir ilerleme gözlenmiş, ikinci aktifleşen gen ise FGFR1 dir.FGFR1 geninin aktifleşmesi sırasında mir-15b-5p, mir-214-3p, mir-497-5, mir-424-5p ekspresyon düzeylerinde bir azalma bir gözlenmiştir.

MAPK sinyal yolağında etkili olan GRB2, KRAS, MAP2K1 genleri DNA transkripsiyonu artırırken, hücre poliferasyon azalma gözlenir bu hücre olaylarında mir-15b-5p, mir-424-5p, mir-497-5p miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde bir azalma bir gözlenmiştir. MAPK sinyal yolağındaki TGFB2 geninin inaktif hale getirilmesi durumda p38 aktiflenmesiyle DNA transkripsiyonu artar bu durum ile apopitoz artar bu olay sürecinde mir-132-3p ekspresyon düzeyinde bir azalma gözlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 10.Tüm kanser vakalarında etkili olan sinyal (http://diana.imis.athena-innovation.gr)

MCF-7 meme kanseri hücre hattına uyguladığımız TQ'un miRNA paneline olan etkisini incelediğimiz ve çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların literatür ile paralellik gösterdiğini gözlemledik ve bunun yanında çalışmamızı diğer çalişmalardan ayıran en büyük fark ilk defa meme kanseri hücrelerine 5 µM, 25 µM ve 50 µM olmak üzere 3 doz TQ uygulama neticesinde miRNA panaline bakılmış ve elde edilen miRNA'larımızın P53, MAPK, PI3K-Akt, WİNT sinyal yollaklarında kanserin hücre siklüsüne, apopitoz, poliferasyon ve DNA transkripsiyonunu etkilediği gözlenmiştir (Şekil 10).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

İstatistiksel analizler sonucunda, kontrol grubuna kıyasla 84 miRNA'nın 12 tanesi farklı şekilde (fold regulation>2, $p<0.05$) eksprese edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla TQ uygulanan gruptaki miRNA'lardan 10 tanesi downregule (hsa-miR-1, let 7c-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-mir-202-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-98-5p) ve 2 tanesinin upregule (hsa-miR-22-3p, hsa-miR-132-3p) olduğu saptanmıştır. Özelleştirilmiş veri tabanları kullanarak hesaplanan analizlere göre (DIANA miRPath v.2,0), PI3 kinaz/AKT (hsa04151), Wnt (hsa04310), MAPK (hsa04010) ve p53 (hsa 04115) sinyal yollakları (KEGG yolak numarası) bu miRNA grubunun temel hedefleri olduğu gibi görünmektedir. Bu bulgular, MCF-7 hücrelerinin miRNA profillerine TQ'nun etkilerini vurgulamaktadır ve daha ileri çalışmalara yardımcı olabilir.

6. KAYNAKLAR

Adhikary S, Eilers M, 2005. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. Nature reviews. Molecular cell biology, 6, 8, 635-45.

Alles A, Alley K, Barrett JC, Buttyan R, Columbano A, Cope FO, Copelan EA, Duke RC, Farel PB, Gershenson LE, et al., 1991. Apoptosis: a general comment. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 5, 8, 2127-8.

Atalay C, 2010.HER2 pozitif meme kanserine cerrahi yaklaşım nasıl olmalı? Meme Sağlığı Dergisi, 6–1.

Attoub S, Sperandio O, Raza H, Arafat K, Al-Salam S, Al Sultan MA, Al Safi M, Takahashi T, Adem A, 2013. Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. Fundamental & clinical pharmacology, 27, 5, 557-69.

Aslan A, Temiz M, Yiğit Y, Can R, Canbolant E, Yiğit F, 2007. Hemşirelik Yüksek Okulu öğrencilerinin meme kanseri hakkında bilgi, tutum ve davranışları. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 6, 193-198.

Aslan FE, Gürkan A, 2007. Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. Meme Sağlığı Dergisi, 3, 63-68.

Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH, 2003. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. Drug and chemical toxicology, 26, 2, 87-98.

Balabas A, Skasko E, Nowakowska D, Niwinska A, Blecharz P, 2010. Novel germline mutations in BRCA2 gene among breast and breast-ovarian cancer families from Poland. Familial cancer, 9, 3, 267-74.

Banerjee S, Padhye S, Azmi A, Wang Z, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH, Mohammad RM, 2010. Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer. Nutrition and cancer, 62, 7, 938-46.

Bellosillo B, Tusquets I, 2006. Pitfalls and caveats in BRCA sequencing. Ultrastructural pathology, 30, 3, 229-35.

Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, Stern PL, Stanley M, Arbyn M, Poljak M, Cuzick J, Castle PE, Schiller JT, Markowitz LE, Fisher WA, Canfell K, Denny LA, Franco EL, Steben M, Kane MA, Schiffman M, Meijer CJ, Sankaranarayanan R, Castellsague X, Kim JJ, Brotons M, Alemany L, Albero G, Diaz M, de Sanjose S, 2013. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. Vaccine, 31 Suppl 7, H1-31.

Botos J, Barhoumi R, Burghardt R, Kochevar DT, 2002. Rb localization and phosphorylation kinetics correlate with the cellular phenotype of cultured breast adenocarcinoma cells. In vitro cellular & developmental biology. Animal, 38, 4, 235-41.

Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM, 2004. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 32, 11755-60.

Camps C, Saini HK, Mole DR, Choudhry H, Reczko M, Guerra-Assuncao JA, Tian YM, Buffa FM, Harris AL, Hatzigeorgiou AG, Enright AJ, Ragoussis J, 2014. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia. Molecular cancer, 13, 28.

Cancer IARC. Globocan 2012.Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012,Lyon, France, 2013.

Caponi S, Funel N, Frampton AE, Mosca F, Santarpia L, Van der Velde AG, Jiao LR, De Lio N, Falcone A, Kazemier G, Meijer GA, Verheul HM, Vasile E, Peters GJ, Boggi U, Giovannetti E, 2013. The good, the bad and the ugly: a tale of miR-101, miR-21 and miR-155 in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 24, 3, 734-41.

Chung HJ, Levens D, 2005. c-myc expression: keep the noise down! Molecules and cells, 20, 2, 157-66.

Dawson B, Trapp RG, 2004. Basic & Clinical Biostatistics (LANGEBasic Science) city, McGraw-Hill Medical.

Eiriksdottir G, Barkardottir RB, Agnarsson BA, Johannesdottir G, Olafsdottir K, Egilsson V, Ingvarsson S, 1998. High incidence of loss of heterozygosity at chromosome 17p13 in breast tumours from BRCA2 mutation carriers. Oncogene, 16, 1, 21-6.

Fisher DE, 1994. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. Cell, 78, 4, 539-42.

Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R, 2006. Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. The international journal of biochemistry & cell biology, 38, 8, 1249-53.

Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J, 2009. miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. EMBO reports, 10, 4, 400-5.

Gee HE, Camps C, Buffa FM, Colella S, Sheldon H, Gleadle JM, Ragoussis J, Harris AL, 2008. MicroRNA-10b and breast cancer metastasis. Nature, 455, 7216, E8-9; author reply E.

Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA, 1999. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (Nigella sativa L.). Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 19, 5, 757-62.

Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, White RJ, 2005. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. Nature cell biology, 7, 3, 311-8.

Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Kerin MJ, 2009. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. Journal of oncology, 2009, 950201.

Hossain A, Kuo MT, Saunders GF, 2006. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. Molecular and cellular biology, 26, 21, 8191-201.

Hu BH, Henderson D, Nicotera TM, 2002. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. Hearing research, 166, 1-2, 62-71.

Hur W, Lee JH, Kim SW, Kim JH, Bae SH, Kim M, Hwang D, Kim YS, Park T, Um SJ, Song BJ, Yoon SK, 2015. Downregulation of microRNA-451 in non-alcoholic steatohepatitis inhibits fatty acid-induced proinflammatory cytokine production through the AMPK/AKT pathway. The international journal of biochemistry & cell biology, 64, 265-76.

Iborra M, Beltran B, Nos P, 2011. [New knowledge in genetics and inflammatory bowel disease. Are there any practical applications?]. Gastroenterologia hepatologia, 34, 9, 591-8.

Iliopoulos D, Polytarchou C, Hatziapostolou M, Kottakis F, Maroulakou IG, Struhl K, Tsichlis PN, 2009. MicroRNAs differentially regulated by Akt isoforms control EMT and stem cell renewal in cancer cells. Science signaling, 2, 92, ra62.

Jiang F, Ye X, Liu X, Fincher L, McKearin D, Liu Q, 2005. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in Drosophila. Genes & development, 19, 14, 1674-9.

Jiang Q, Meng X, Meng L, Chang N, Xiong J, Cao H, Liang Z, 2014. Small indels induced by CRISPR/Cas9 in the 5' region of microRNA lead to its depletion and Drosha processing retardance. RNA biology, 11, 10, 1243-9.

Johnson-Anuna LN, Eckert GP, Franke C, Igbavboa U, Muller WE, Wood WG, 2007. Simvastatin protects neurons from cytotoxicity by up-regulating Bcl-2 mRNA and protein. Journal of neurochemistry, 101, 1, 77-86.

Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA, 1992. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. Endocrine reviews, 13, 1, 3-17.

Kılıç A, 2012. Epidermal Büyüme Faktör Reseptör İnhibitörleri ve Dermatolojik Yan Etkiler. Türk J. Dermatol, 6–4.

Kondo N, Toyama T, Sugiura H, Fujii Y, Yamashita H, 2008. miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. Cancer research, 68, 13, 5004-8.

Kong D, Li Y, Wang Z, Banerjee S, Ahmad A, Kim HR, Sarkar FH, 2009. miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells. Stem cells (Dayton, Ohio), 27, 8, 1712-21.

Korpal M, Kang Y, 2008. The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. RNA biology, 5, 3, 115-9.

Krauss DA, Lieberman JD, Olson J, 2004. The effects of rational and experiential information processing of expert testimony in death penalty cases. Behavioral sciences & the law, 22, 6, 801-22.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 75, 5, 843-54.

Lindsey I, 2012. Who should treat rectal cancer and how? Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland, 14, 12, 1439-40.

Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM, 2004. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 26, 9740-4.

Liu Z, Sall A, Yang D, 2008. MicroRNA: An emerging therapeutic target and intervention tool. International journal of molecular sciences, 9, 6, 978-99.

Lobbes D, Rallapalli G, Schmidt DD, Martin C, Clarke J, 2006. SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. EMBO reports, 7, 10, 1052-8.

Lorio AK, 2005. Transfer dependent. Rehab management, 18, 7, 22, 4-6.

Lyu H, Huang J, Edgerton SM, Thor AD, He Z, Liu B, 2015. Increased erbB3 promotes erbB2/neu-driven mammary tumor proliferation and co-targeting of erbB2/erbB3 receptors exhibits potent inhibitory

effects on breast cancer cells. International journal of clinical and experimental pathology, 8, 6, 6143-56.

Miller S, Jones LE, Giovannitti K, Piper D, Serra MJ, 2008. Thermodynamic analysis of 5' and 3' single- and 3' double-nucleotide overhangs neighboring wobble terminal base pairs. Nucleic acids research, 36, 17, 5652-9.

Mirza S, Sharma G, Prasad CP, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R, 2007. Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. Life sciences, 81, 4, 280-7.

Nagasawa H, Keng P, Maki C, Yu Y, Little JB, 1998. Absence of a radiation-induced first-cycle G1-S arrest in p53+ human tumor cells synchronized by mitotic selection. Cancer research, 58, 9, 2036-41.

Nieves-Neira W, Pommier Y, 1999. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI Anticancer Drug Screen: multifactorial relationships with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. International journal of cancer. Journal international du cancer, 82, 3, 396-404.

Nosho K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H, Shinomura Y, 2014. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. Carcinogenesis, 35, 4, 776-83.

Osborne C, Wilson P, Tripathy D, 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. The oncologist, 9, 4, 361-77.

Özmen V, Fidaner C, Aksaz E, Bayol Ü, Dede İ, Göker E, Güllüoğlu BM, Işıkdoğan A, Topal U, Uhri M, 2009.Türkiye'de meme kanseri erken tanı ve tarama programlarının hazırlanması,Sağlık Bakanlığı meme kanseri erken tanı ve tarama alt kurulu raporu. Meme Sağlığı Dergisi, 5,125-134.

Öztürk M, 2006. Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 15–26.

Pari L, Sankaranarayanan C, 2009. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Life sciences, 85, 23-26, 830-4.

Pede V, Rombout A, Vermeire J, Naessens E, Mestdagh P, Robberecht N, Vanderstraeten H, Van Roy N, Vandesompele J, Speleman F, Philippe J, Verhasselt B, 2013. CLL cells respond to B-Cell receptor stimulation with a microRNA/mRNA signature associated with MYC activation and cell cycle progression. PloS one, 8, 4, e60275.

Plesnila N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qiu J, Chiarugi A, Thomas SS, Kohane DS, Korsmeyer SJ, Moskowitz MA, 2001. BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 26, 15318-23.

Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A, 2009. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia, 20, 5, 741-52.

Rait AS, Pirollo KF, Rait V, Krygier JE, Xiang L, Chang EH, 2001. Inhibitory effects of the combination of HER-2 antisense oligonucleotide and chemotherapeutic agents used for the treatment of human breast cancer. Cancer gene therapy, 8, 10, 728-39.

Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Gundersen S, Host H, Marthin J, 2000. The prognostic value of p53 and c-erb B-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years. Cancer, 88, 4, 804-13.

Ringer L, Sirajuddin P, Tricoli L, Waye S, Choudhry MU, Parasido E, Sivakumar A, Heckler M, Naeem A, Abdelgawad I, Liu X, Feldman AS, Lee RJ, Wu CL, Yenugonda V, Kallakury B, Dritschilo A, Lynch J, Schlegel R, Rodriguez O, Pestell RG, Avantaggiati ML, Albanese C, 2014. The induction of the p53 tumor suppressor protein bridges the apoptotic and autophagic signaling pathways to regulate cell death in prostate cancer cells. Oncotarget, 5, 21, 10678-91.

Ruddon RW, 2010. Introduction to the molecular biology of cancer: translation to the clinic. Progress in molecular biology and translational science, 95, 1-8.

Salem ML, 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. International immunopharmacology, 5, 13-14, 1749-70.

Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM, 2006. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society, 17, 3, 189-202.

Shen X, Sun W, Shi Y, Xing Z, Su X, 2015. Altered viral replication and cell responses by inserting microRNA recognition element into PB1 in pandemic influenza A virus (H1N1) 2009. Mediators of inflammation, 2015, 976575.

Shenouda SK, Alahari SK, 2009. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? Cancer metastasis reviews, 28, 3-4, 369-78.

Sierra A, Castellsague X, Escobedo A, Lloveras B, Garcia-Ramirez M, Moreno A, Fabra A, 2000. Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alterations: a pathway to metastatic progression in human breast cancer. International journal of cancer. Journal international du cancer, 89, 2, 142-7.

Somunoğlu S, 2009. Meme kanseri: belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi, 4,10, 103–122.

Soule HD, Vazguez J, Long A, Albert S, Brennan M, 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. Journal of the National Cancer Institute, 51, 5, 1409-16.

Sun BK, Tsao H, 2008. Small RNAs in development and disease. Journal of the American Academy of Dermatology, 59, 5, 725-37; quiz 38-40.

Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massague J, 2008. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. Nature, 451, 7175, 147-52.

Valastyan S, Benaich N, Chang A, Reinhardt F, Weinberg RA, 2009. Concomitant suppression of three target genes can explain the impact of a microRNA on metastasis. Genes & development, 23, 22, 2592-7.

Warnecke-Eberz U, Chon SH, Holscher AH, Drebber U, Bollschweiler E, 2015. Exosomal onco-miRs from serum of patients with adenocarcinoma of the esophagus: comparison of miRNA profiles of

exosomes and matching tumor. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 36, 6, 4643-53.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G, 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell, 75, 5, 855-62.

Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM, 1999. Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. Cancer research, 59, 16, 4083-9.

Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH, 2012. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. Biochem Pharmacol, 83, 4, 443-51.

Xiong H, Li Q, Liu S, Wang F, Xiong Z, Chen J, Chen H, Yang Y, Tan X, Luo Q, Peng J, Xiao G, Jiang Q, 2014. Integrated microRNA and mRNA transcriptome sequencing reveals the potential roles of miRNAs in stage I endometrioid endometrial carcinoma. PloS one, 9, 10, e110163.

Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY, 2008. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. RNA (New York, N.Y.), 14, 11, 2348-60.

Yu L, Todd NW, Xing L, Xie Y, Zhang H, Liu Z, Fang H, Zhang J, Katz RL, Jiang F, 2010. Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. International journal of cancer. Journal international du cancer, 127, 12, 2870-8.

Yu Z, Baserga R, Chen L, Wang C, Lisanti MP, Pestell RG, 2010. microRNA, cell cycle, and human breast cancer. The American journal of pathology, 176, 3, 1058-64.

Zhao T, Wang W, Bai X, Qi Y, 2009. Gene silencing by artificial microRNAs in Chlamydomonas. The Plant journal : for cell and molecular biology, 58, 1, 157-64.

8. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Konya'da doğdu. İlk ve orta tahsilini Konya'da yaptı. 2008 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2012 Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yılında yüksek lisans eğitimine başladı.