T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

D-Vitaminin Meme Kanseri Hücrelerinde Mikro RNA Üzerine Etkisi

Aslı MERCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

KONYA-2016

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

D-Vitaminin Meme Kanseri Hücrelerinde Mikro RNA Üzerine Etkisi

Aslı MERCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14202038 Proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2016

ÖNSÖZ

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

Tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren ve her daim bana sabır gösterip yardımcı olan değerli danışmanım Prof. Dr. Ali ÜNLÜ' ye çok teşekkür ederim.

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

Çalışmalarımda ve tez yazımında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın Prof. Dr. Murat AYAZ ve Arş. Gör. Nilüfer AKGÜN' e çok 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 Dr. E. Nedime KORUCU, Gülsüm TEKİN ve Yasemin KAHVECİ' ye çok teşekkür ederim.

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

SİMGELER ve KISALTMALAR

Ago2	Argonaute 2
AIs	Aromataz inhibitörleri
Akt	Protein kinaz
BRCA1	Meme kanserine yatkınlık geni 1
BRCA2	Meme kanserine yatkınlık geni 2
BSA	Bovin serum albumin
BT-474	Meme kanseri hücre serisi
C22	Karbon 22
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CerbB-2 (Her2/neu)	Büyüme faktörü reseptörü
COX	Siklooksijenaz
DBP	Vitamin D Bağlayıcı Protein
DCIS	İnvaziv olmayan duktal karsinom
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle vasatı
DMSO	Dimetil sülfoksit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	Östrojen reseptörü
FBS	Fetal bovin serum
FGF23	Fibroblast Growth Faktör 23
HER	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü
IC_{50}	Hücrelerin %50'sinin çoğalmasını baskılayan doz
IDC	İnvaziv duktal karsinom
ILC	İnvaziv lobüler karsinom
LCIS	İnvaziv olmayan lobüler karsinom
MAPK	Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz
MCF-7	Meme kanseri hücre serisi
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	Mikro RNA
NCI	Uluslararası kanser enstitüsü

ncRNA	Kodlanmayan ribonükleik asit
NIH/3T3	Malign olmayan meme kanseri hücresi
NP	Nanopartikül
ORF	Open reading frame
P	Probability
P1	Pürinoseptör
PIWI	P-element induced wimpy testis
piRNA	Protein ile etkileşimi olan RNA
pre-RNA	Prekürsör RNA
Pri-miRNA	Primer Mikro RNA
PBS	Fosfat tampon
PI3K	Fosfo inositidol-3 kinaz
PR	Progesteron reseptörü
PTEN	Tümör baskılayıcı gen
RISC	RNA kaynaklı susturma kompleksi
Rb	Retinoblastoma
RNAi	İnterferans RNA
RT-qPCR	Ters transkripsiyon-kantitatif polimerazyon zincir reaksiyonu
SERDs	Seçici östrojen reseptörlerini az oranda düzenleyicileri
SERMs	Seçici östrojen reseptör modülatürleri
PTH	Parathormon
T-47D	Meme kanseri hücre serisi
Vit D2	Ergokalsiferol
Vit D3	Kolekalsiferol

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

D-Vitaminin Meme Kanseri Hücrelerinde Mikro RNA Üzerine Etkisi

Aslı MERCAN
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2016

Vitamin D'nin aktif olan formu ($1,25(OH)_2D_3$) kalsiyum metabolizmasını düzenlemesinin yanısıra hücrenin proliferasyon, diferansiasyonunun düzenlenmesi gibi birçok fonksiyona da sahiptir. Bu fizyolojilerde oluşabilecek bozukluklar sonucunda aralarında kanser, osteoartrit, diabet gibi birçok hastalıkla da ilintili olduğu bilinmektedir. Bu çalışma, MCF7 insan meme kanseri hücresi miRNA'ları profilleri üzerine D-Vitamini uygulamasının etkilerini incelemektedir.

Çalışmamızda, MCF-7 hücreleri D-vitaminin farklı saatlerde (2, 4, 6, 24 ve 48) ile tek dozda (140 uM) 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 22 tanesi farklı şekilde (fold regulation <2, fold regulation>2, $p<0.05$) eksprese edilmiştir.

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: D vitamini; MCF-7; miRNA

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effect of Vitamin D on micro-RNA Levels in Breast Cancer Cells

Aslı MERCAN
Department of Medical Biochemistry

MASTER/ KONYA-2016

The active form of vitamin D (1,25 (OH)2D3) as well as the regulation of calcium metabolism, cell proliferation, it also has many functions, such as regulation of differentiation. These physiological disorders may occur as a result of including cancer, osteoarthritis, diabetes as are known to be associated with many diseases. This study examines the effect of Vitamin D treatment on MCF7 human breast cancer cells miRNAs. profiles.

In our study, MCF-7 cells at different times of vitamin D (2, 4, 6, 24 and 48) with a single dose (140 uM) were treated. 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, twenty-two of 84 miRNAs have been differentially expressed compared to control group (fold regulation <2, fold regulation>2, $p<0.05$).

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: Vitamin D; MCF-7; miRNA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **iv**
1.GİRİŞ 1
1.1.Kanser 3
1.2. Meme Kanseri 4
1.2.1.Meme Kanserinin Moleküler Biyolojisi 6
1.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri 7
1.2.3. Klinikte Meme Kanseri 8
1.3. Vitamin-D 8
1.4. miRNA 11
1.4.1. MikroRNA'ların Yapısı ve Tarihçesi 13
1.4.2. MikroRNA'ların Oluşumu 14
1.4.3. MikroRNA'ların Fonksiyonu 16
1.4.4. Meme Kanseri ve miRNAlar 16
2. GEREÇ ve YÖNTEM 18
2.1. Gereçler 18
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar 18
2.1.2.Cihazlar ve Laboratuvar gereçleri 19
2.2. Metod 19
2.2.1.Hücre Kültürü 19
2.2.2. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı 20
2.2.3. RT-PCR Yöntemiyle Çalışma Yöntemi 21
3. BULGULAR 27
3.1.Real-Time PCR bulguları 27
4.TARTIŞMA 1
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 8
6.KAYNAKLAR 9
8.ÖZGEÇMİŞ 13

1.GİRİŞ

Biyolojik olarak kanser, organizmayı oluşturan hücrelerin çevresel faktörlere bağlı değişime uğramaları ve normal dokuları işgal edecek şekilde bağımsız ve kontrolsüz biçimde üreme yeteneği kazanıp sınırsız ve aşırı disiplinsiz bölünmeleri sonucu anormal büyümeyle ifade edilen bir hastalıktır (Lindsey ve ark 2012).

Bütün dünyada görülme sıklığı gittikçe artmakta olan meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır (Aslan ve ark 2007).

Meme kanserinin epidemiyolojisinde; yaş, vücut ağırlığı, kilo değişimleri, laktasyonun zamanı ve sayısı, eksojen ve endojen hormon konsantrasyonu ve metabolizması, benign meme hastalığı öyküsü, radyasyona maruziyet, alkol kullanımı ve ailede meme kanseri öyküsü tanımlanmıştır. Meme kanseri insidansı oranlarındaki çarpıcı coğrafi farklılıklar; popülasyonlar arasındaki genetik farklılıklardan ve yaşam tarzı ya da beslenme gibi çevresel faktörlerden etkilenir (Moorman ve Terry 2004).

Meme kanseri ölüm oranları, düşük güneş ışığı seviyeleri ile daha çok kış güneşine sahip bölgelerde daha yüksektir. Epidemiyolojik çalışmalar düzenli olarak güneş ışığına maruz kalan ve D vitamini miktarı ortalamanın üzerinde kadınlarda, meme kanseri insidansının daha düşük olma eğiliminde olduğunu göstermiştir. Serum $1,25(OH)_2D_3$ en düşük çeyrek dilim içindeki kadınlar, en yüksek çeyreğinden 5 kat daha yüksek meme kanseri riskine sahip olduğu gösterilmiştir. Düşük $1,25(OH)_2D_3$ düzeyleri metastatik meme kanserinin daha hızlı ilerlemesi ile bağlantılıdır (Garland ve ark 2006).

Vitamin D'nin aktif olan formu $1,25(OH)_2D_3$ kalsiyum metabolizmasını düzenlemesinin yanısıra hücrenin proliferasyon, diferansiasyonunun düzenlenmesi gibi birçok fonksiyona da sahiptir. Bu fizyolojilerde oluşabilecek bozukluklar sonucunda aralarında kanser, osteoartrit, diabet gibi birçok hastalıkla da ilintili olduğu bilinmektedir (Uitterlinden ve ark 2004).

$1,25(OH)_2D_3$'ün hücresel proliferasyon ve farklılaşmayı düzenleyen mekanizması tam olarak anlaşılamamasına rağmen hem normal hem kanser hücresi proliferasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (Holick 2008).

D vitamininin üç ana metaboliti olan; vitamin D_3-25-hidroksilaz (25-OHaz, 25-hidroksilaz), 25-hidroksivitamin D_3-1α-hidroksilaz (1α-OHaz, 1α-hidroksilaz) ve 25-hidroksivitamin D_3-24-hidroksilaz (24-OHaz, 24-hidroksilaz) malign meme dokusunda varlıkları tanımlanmıştır. Diesing ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, MCF-7 hücrelerinin 24-hidroksilaz ekspresyonunun düzenlediğini ortaya koymuştur. Bu kalsitriol'ün antiproliferatif indükleyici etkisi ve apoptosise karşı kendilerini korumak için tümör hücrelerinde bir mekanizma olabilir (Diesing ve ark 2006).

Deneysel çalışmalar $1,25(OH)_2D_3$'ün, normal ve malign meme kanser hücrelerinde anjiogenezisi inhibe ettiğini, farklılaşma ve apoptozisi indüklediğini, hücre çoğalmasını inhibe ettiğini göstermiştir (Cui ve Rohan 2006).

Kalsitriol veya 1,25(OH)Vit D_3, MCF-7 meme kanseri hücresinin negatif büyüme düzenleyicisidir. Bu hücrelerde mitokondriyal bozulma içeren apoptozis aktivasyonu sebebiyle büyüme durması olur. Bu etki (MCF-7 D-resistant hücreleri) D vitamini dirençli hücrelerde baskılanmıştır (Marchionatti ve ark 2009).

Mikro RNA'lar (miRNA) küçük, kodlanmayan RNA molekülleridir. Bir ya da birden fazla hedef geni baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi süreçlerde rol oynarlar. miRNAlar 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 miRNAların neoplazi patojenezinde önemli rolleri olduğuna işaret eder. Birçok deneysel çalışma miRNAların yeni bir onkogen veya tümör baskılayıcı gen sınıfı oluşturabileceğini göstermiştir. Bazı miRNAlar epigenetik mekanizmalarla kontrol edilirken, bazıları da doğrudan veya dolaylı olarak epigenetik mekanizmada rol oynayan faktörleri hedef alırlar. miRNAların 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 uygun 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 da gösterebilmektedir. 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. Bizde çalışmamızda D vitamin'in insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinin miRNA profilleri üzerindeki etkisini moleküler bir yöntem olan yüksek kapasiteli real-time PCR yöntemiyle analiz etmeyi hedefledik.

1.1.Kanser

Hücrelerin kontrolsüz çoğalması, apoptotik ve antiapoptotik mekanizmalarının düzensiz işleyişi ve bulundukları dokudan diğer dokulara yayılmasıyla karakteristik bir hastalık olan kanserin 100'ün üzerinde çeşidi vardır. Genel olarak köken aldıkları dokuya göre sınıflandırmaları yapılır. Epitelyal hücrelerinden köken alanlar "karsinom", mezoderm hücrelerinden (kemik, kas gibi) köken alanlar "sarkom", meme hücreleri gibi salgı bezi hücrelerinden köken alanlar ise "adenokarsinom" olarak adlandırılırlar (Hanahan ve Weinberg 2011).

Kanserli hücreler normal hücrelerden en önemli iki karakteristik özelliği ile farklılık gösterirler. Hücrelerin kontrolsüz büyüme ve çoğalmaları yanı sıra dokuları istila etmesi yani invazyon ve metastaz ile farklı bölgelerde kolonize olmasıdır. Bulundukları yerden başka bölgelere kan veya lenf damarları ile taşınarak metastaz oluştururlar (Hanahan ve Weinberg 2011). 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. 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).

Meme kanserinin görülme sıklığındaki giderek artışın ekzojen hormonlar, mensturasyon durumu (erken menarş, geç menopoz), kilo, beslenme biçimi ve alkol tüketimi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Beral ve ark 2003, Reeves ve ark 2007, Monninkhof ve ark 2007). Meme kanserinde yaş ve cinsiyet en önemli risk faktörleridir. BRCA-1 ve BRCA-2 gibi tümör baskılayıcı gen mutasyonları, ailede meme ve yumurtalık kanseri bulunması gibi genetik faktörler de hastalığın ortaya çıkma riskini arttırmaktadır. Meme kanseri insidansı yaşam tarzı gibi temel bir takım sosyal karakteristikleri de içerir. Bunlardan biri güneş ışığına maruziyet, diğeri de beslenme alışkanlıklarıdır. Bu iki faktör de D vitamini seviyelerinin indirekt belirtecidir (Armstong ve ark 2000).

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 (GLOBOCAN 2012). 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).

Meme, süt bezleri ve üretilen sütü meme başına taşıyan kanallardan oluşur. Meme kanseri, lobülleri ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya devam etmeleriyle gelişmektedir. Meme kanserleri, kanser hücrelerinin lokalize olduğu yere veya yayılma eğilimlerine göre sınıflandırılabilirler. Meme kanseri metastazları akciğer, kemik, lenf nodu ve beyinde ortaya çıkmaktadırlar (Society 2007).

Meme kanseri kadınlarda en yaygın kanserdir (Jemal ve ark 2011). Östrojen, meme epitelyal hücrelerinin çoğalmasını sürdürür ve bu nedenle östrojen reseptör pozitif (ER +) Meme kanseri büyümesini teşvik eder. Meme kanserinin yaklaşık % 70'i ER + ve endokrin tedavisine cevap verir. ER+ meme kanseri tedavisinde kullanılan hormonal ilaçlar estrojenlerin mitojenik etkisini antagonize etmek için tasarlanmıştır ve şunlardır: tamoksifen ve raloksifen gibi ER'a bağlanan ve memede antagonist gibi aktiveleri olan seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERMs), ful ve strant gibi seçici östrojen reseptör az oranda düzenleyiciler (SERDs) ER'ü hedef alır ve bağlanırlar ve onu bozarlar; aromataz inhibitörleri (AIs) ki aromataz aktivitesini inhibe ederler. Aromataz, androjenik öncülerinden östrojen sentezini katalize eden enzimdir (Riemsma ve ark 2010).

Aromataz inhibitörleri postmenopozal kadınlarda meme kanserinin ilerlemesini önlemek için ER+ hastalarda ilk basamak tedavisidir Mevcut tedavilere rağmen, meme kanserinin oranı artmaya devam etmektedir. Meme kanseri gelişimini önlemek veya geciktirmek için besin ajanlarını kullanmak ve kanserojenlere maruz kalmayı azaltmak önemlidir (Goss ve Wu 2007).

Kalsitriol, D vitamini'nin hormonal olarak aktif olan formu, barsak, böbrek, paratiroid bezleri ve kemikteki dönüşümleriyle kalsiyum homeostazında önemli bir rol oynar (Feldman ve ark 2007). Son yıllarda, kalsiyum ve kemik homeostazı üzerindeki etkilerine ek olarak, kalsitriol meme kanseride dâhil olmak üzere kanserlerin önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel kullanımını gösteren anti-proliferatif ve farklılaşma öncesi aktiviteleri sergiler (Matthews ve ark 2010, Beer ve Myrthue 2004).

1.2.1.Meme Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Meme kanseri hem genetik hem epigenetik mekanizmalardaki bozukluklardan kaynaklanır. Bu bozuklukta hem ekzojen hem endojen kaynaklı iç ve dış çevresel faktörler rol oynadığı gibi, atalarından kalıtılan bozuk genler de rol alır. Meme kanserinin hem kalıtsal (ailesel) hem de sporadik tipleri mevcuttur. Birincil veya ikincil derece akrabalarında birden fazla kişide meme kanseri görülen ve diğer kanserlerin metastaz yapması sonucu (sekonder) oluşmamış olan meme kanserleri kalıtsal (ailesel) meme kanserleri olarak tanımlanır (Beckmann ve ark 2002).

Meme kanserlerinin %5-10'unda meme kanserine yatkınlık genlerinde mutasyonlar görülmektedir. Bu genlerden BRCA1, BRCA2, PTEN, TP53,LKB1/STK11 ve CDH1 yüksek risk genleri, CHEK2, TGF-β1, CASP8 ve ATM ise düşük risk genleri olarak kabul edilmektedir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar kalıtsal meme kanserlerinin üçte birinden sorumludur (Beckmann ve ark 2002). Kalıtsal meme kanserlerinin %40'ında BRCA1 geninde ve %30'unda BRCA2 geninde mutasyonlar saptamıştır. Bu mutasyonlar bazı populasyonlarda daha sık görülmektedir. Örneğin; Aşkenazi Yahudi kadınlarının %2'si BRCA1 185 del AG (185. bazda AG delesyonu), BRCA1 5382 ins C (5382. pozisyona ekstra baz eklenmesi) veya BRCA1 6174 del T (6174. pozisyonda T bazının delesyonu) mutasyonlarını taşır. BRCA2 999 del 5 (999. pozisyonda 5 bazın delesyonu) mutasyonu ise bu kadınlarda görülen kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %50'sinden sorumludur (McPherson 2000).

İki üç kuşak boyunca birinci dereceden akrabalarında meme kanseri öyküsüne rastlanmaksızın meme kanseri gözlenen hastalar sporadik meme kanseri hastalarıdır. Ailede meme kanseri ile birlikte farklı bir tip kanser öyküsü olan, otozomal dominant geçiş gösteren meme kanseri hastaları bu gruba dâhil edilmektedir (Beckmann ve ark 2002).

Sporadik meme kanserleri, kalıtsal mutasyonlar yerine ilk defa bireyin genomunda ortaya çıkan ve tamir sistemleri tarafından düzeltilemeyen mutasyonların birikimi sonucu oluşur. Onkogenlerin aktivasyonu ile birlikte tümör baskılayıcı

genlerin inaktivasyonu ve bunların yanında bu genlerin bir kaçında birden meydana gelen mutasyonların rol oynadığı bilinmektedir (Beckmann ve ark 2002).

1.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

İnsanlarda meme kanserinin hangi nedenlerle ortaya çıktığı kesin olarak bilinmemekle beraber, çok değişik ajanların kromozomal mutasyonlara neden olarak meme kanseri gelişimi ile yakından ilgili olduğu düşünülmektedir (Driedger ve Eyles 2001, Colak ve ark 2005). Meme kanserine neden olan tek bir faktör bulunmamakla beraber birtakım risk faktörlerinin bu hastalığa yakalanma ve gelişim sürecini hızlandırdığı belirtilmektedir (Topuz ve ark 2003). Meme kanserinin görülme sıklığı, bu risk faktörleriyle bağlantılı olarak değişkenlik göstermektedir (Aslan ve Gürkan 2007). Meme kanseri oluşumundan sorumlu birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar;

- Yaş
- Ailevi meme kanseri öyküsü
- Doğurganlık öyküsü
- Kişisel meme kanseri öyküsü
- Menstrüel aktivite
- Meme kanseri gelişimine yatkın genleri taşımak
- Geçirilmiş meme biyopsisi
- Işınlanma (radyoterapi)
- Erken menarş
- Östrojen replasman tedavisi
- Oral kontraseptiflerin kullanılması
- Alkol ve sigara kullanımı
- Obezite ve beslenme alışkanlıkları
- Geç menopoz
- Emzirme
- Doğum ve ilk doğum yaşı
- Over veya uterus kanser öyküsü

1.2.3. Klinikte Meme Kanseri

Meme kanserleri in situ (invaziv olmayan) ve invaziv karsinomlar olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. İn situ karsinomda kanser hücreleri meme içinde belli bir alanda olup yayılma göstermezler. İn situ lobüler karsinom (LCIS), süt bezlerinde görülürken in situ duktal karsinom (DCIS) süt kanalları içinde görülmektedir. İnvaziv karsinom ise meme kanseri, süt bezleri veya süt kanallarına yayılmış ve diğer organlara yayılma potansiyeline sahip kanserlerdir. İnvaziv lobüler karsinom (ILC), süt bezlerinden başlayarak çevre dokulara yayılır. İnvaziv duktal karsinom (IDC) da süt kanallarından başlayarak prolifere olur ve çevre dokulara yayılır. İnvaziv karsinomlar diğer organlara ve lenf düğümlerine metastaz yapabilme kabiliyetini lenfatik ve dolaşım sistemini invaze ederek sağlar (Aydıner ve ark 2000).

Patolojik tip ve derecesi, lenf düğümü durumu, tümör büyüklüğü, etnik yapı, lenfatik ve vasküler invazyon, ile tanı yaşı meme kanserinde önemli prognostik faktörlerdir. Bunun yanında onkogenler, tümör baskılayıcı genler, steroid hormon reseptörleri de meme karsinomu prognozu üzerine etkili moleküler faktörlerdir (Weigel ve Dowsett 2010).

1.3. Vitamin-D

Vitamin D, önemli bir hormondur ve güneş ışığını iyi alan ülkemizde diyetle alınımı az miktardadır. Başlıca ultraviyole (UV) B radyasyon güneş ışığına maruz kalan ciltten de üretilir. Eksikliğinde kas iskelet sisteminde ciddi sağlık sorunlarına neden olur. Bu sağlık sorunlarının başında; osteopeni, osteoporoz, kas zayıflığı, patolojik kırıklar, yaygın kanser türlerine yatkınlık, otoimmün enfeksiyoz ve kardiyovasküler hastalıklar sayılabilir (Holick 2007 ve Pe´rez-Lo´pez 2008). Son yıllarda yapılan önemli çalışmalarda Vitamin D'nin mortaliteyi azaltıcı, kanseri önleyici ve tedavi edici etkilere sahip olduğu gösterilmektedir. Meme bezindeki vitamin D nin patofizyolojisi ile ilgili bilimsel kanıtlar artmıştır. Bu durumda meme bezi, lokal hormon sentezi regülasyon için vitamin D'nin hidroksillendiği gibi vitamin

D reseptörlerine de sahiptir (Faustino ve ark. 2009). Fizyolojik olarak aktif hormon $1,25(OH)_2D_3$ en az 4 önemli biyolojik fonksiyona sahiptir bunlar:

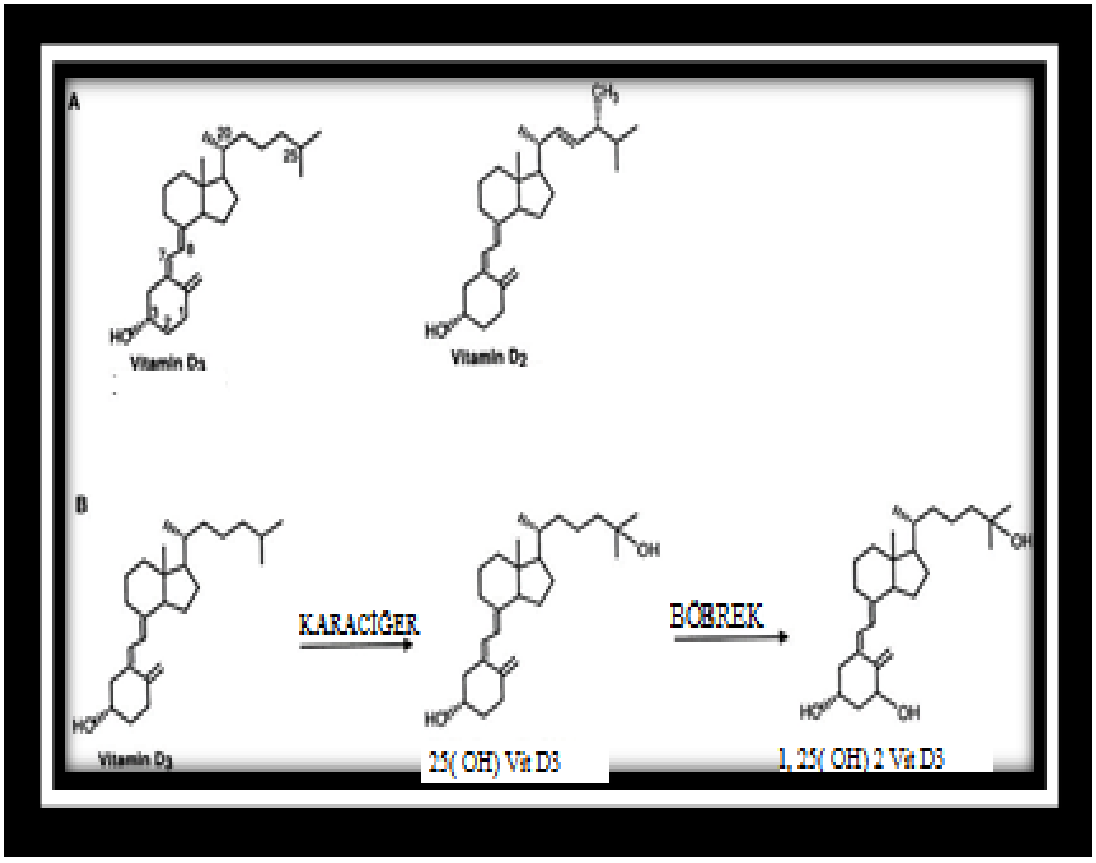
1)Kalsiyum ve fosfor homeostazisinin düzenlenmesi ve metabolizması,
2)Diğer hormonların düzenlenmesi,
3)Hücre farklılaşmasının indüksiyonu ve büyüme modülasyonu,
4)İmmün sistem regülasyonu.

Kanser ve immun aracılı hastalıkları önlemedeki olası bir rolüdür. Son bulgularda, D vitamininin, meme hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde, hücresel farklılaşma ve proliferasyon kontrolünde ek roller oynadığını düşündürmektedir (Faustino ve ark 2009).

Bir ön hormon olan D vitamininin kolekalsiferol (vitamin D_3) ve ergokalsiferol (vitamin D_2) olmak üzere iki kaynağı vardır. (Şekil 1. 1) Vitamin D3, hayvansal kaynaklı iken vitamin D2 bitkisel kaynaklıdır (Holick ve Garabedian 2006). D_3 vitamini karbon 22 (C22) ile karbon 24 (C24) arasında çift bağa sahip olması ve karbon 24'te (C24) metil grubu içermesiyle D_3 vitaminden ayrılır. (Bikle 2007, Armas ve ark 2004). UV (ultraviyole) ışını etkisiyle, bitkisel bir sterol olan ergosterol'den vitamin D_2 (ergokalsiferol), 7- dehidrokolesterol (provitamin D_3)'den ise vitamin D_3 (kolekalsiferol) sentezlenir (Bikle 2007). Provitamin D_3, epidermiste 290-315 nm dalga boyundaki UV-B ışının etkisiyle previtamin D_3'e dönüşür. Previtamin D, daha sonra vitamin D'ye izomerize olarak hücre dışı boşluğa ve dermal kapiller damarlara geçerek dolaşımda vitamin-D bağlayıcı proteine (DBP) bağlanır ve bu şekilde karaciğere taşınır. Karaciğerde 25-hidroksilasyona uğrayarak (25-alfa hidroksilaz: CYP27 enzimi aracılığıyla) 25- OH-D (kalsidiol)'e dönüşür. 25-OH-D fizyolojik konsantrasyonlarda biyolojik aktiviteye sahip olmamasına rağmen vücuttaki D vitamini deposunu en iyi yansıtan parametredir. 25- OH-D, dolaşıma geçerek böbreğe taşınır ve burada 1-α hidroksilasyona uğrayarak (1- alfa hidroksilaz: CYP27B1 enzimi aracılığıyla) aktif metabolit olan $1,25(OH)_2D_3$ (kalsitriol)'e dönüşür (Holick 2004).

Renal dokudaki 1-alfa hidroksilaz aktivitesi parathormon (PTH) tarafından kontrol edilmektedir. Son zamanlarda 1-alfa hidroksilaz enziminin böbrek dışında

barsak, epidermis, makrofajlar, prostat, meme, pankreas ve paratiroid bezinde de bulunduğu; dolayısıyla böbrek dışı dokularda da 25-OH-D düzeylerinin yeterli düzeylerde olmasının aktif D vitamini üretimi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Bikle 2007). $1,25(OH)_2D_3$ aktif metabolit olmasına rağmen yarı ömrü çok kısa olduğundan (4-6 saat) vücuttaki D vitamini durumunu göstermek için iyi bir parametre değildir. Serum ve dokularda kalsiyum ve fosfor seviyesinin artışı ve FGF23 (fibroblast growth factor 23) CYP27B1 ekspresyonunu baskılayarak 1-hidroksilaz aktivitesini inhibe ederken, paratiroid hormon ve düşük kalsiyum/ fosfor düzeyleri ise 1-hidroksilaz aktivitesini arttırarak $1,25(OH)_2D_3$ üretimini arttırır (Bikle 2007, Holick 2007). $1,25(OH)_2D_3$'ün inaktivasyonu böbrekte 24 hidroksilasyon (24-hidroksilaz: CYP24A1 aracılığıyla) ile 24,25 $(OH)_2D_3$'e dönüşmesi ile gerçekleşir. Hiperkalsemi, hiperfosfatemi ve kalsitriol CYP24A1 ekspresyonunu arttırırken, hipokalsemi ve PTH azaltır (Bikle 2007).



Şekil 1.1 Genel Vitamin D Sentezi. A: Vitamin D3 ve D2. B: İkinci Basamak Hidroksilasyon (Holick 2007)

1.4. miRNA

Ribonükleik asit (RNA)'lerin bulunması ve işlevlerinin tanımlanmasıyla, RNA'ların canlı yaşamı için çok önemli süreçlerde rol oynadıkları belirlenmiştir. Özellikle insan genomunun %62'sini kapsayan ncRNA (kodlamayan RNA)'ların hücresel savunmada, gelişimsel süreçlerde, farklılaşmada, DNA replikasyonunda, transkripsiyonda ve post-transkripsiyonel susturumda görev aldıkları gösterilmiştir (Birney ve ark 2007). ncRNA'larda meydana gelen bozukluklar birçok hastalığa yol açmaktadır. İlişkili oldukları hastalıklardan bazıları kanserler, nörodejeneratif hastalıklar, immün yetmezlik hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklardır (Gehrke ve ark 2010).

Hastalıklardan sorumlu oldukları düşünülen ncRNA'lar, yeni tedavi yaklaşımlarında hem hedef hem de araç olarak görülmektedirler (Lu ve ark 2005). Tanımlanan ve fonksiyonu aydınlatılan ncRNA'ların sayısı her geçen gün artmaktadır. ncRNA'lar yaygın olarak uzunluklarına göre sınıflandırılmaktadır. (Çizelge 1. 1) ncRNA'ların büyük bir kısmı kısa düzenleyici RNA'lardan oluşmaktadır. Bu RNA'lar, RNA enterferans (RNA interference-RNAi) mekanizması ile gen susturumunu sağlayan moleküllerdir. Bu mekanizma, milyarlarca yıl önce, hücrelere saldıran virüslere karşı geliştirilmiş bir savunma mekanizmasıdır. Günümüzde artık, RNAi mekanizmasının gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apoptoz gibi önemli süreçlerin düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir (Voinnet 2009). Kısa düzenleyici RNA'ların uzunlukları 15-40 baz çifti arasında değişmektedir. Bunlara örnek olarak siRNA (small interfering RNA), mikro RNA (miRNA) ve PIWI (P-element induced wimpy testis) proteini ile etkileşimi olan RNA (piRNA) verilebilir (Erson ve Petty 2008).

MikroRNA'lar, hücresel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev almaktadır. Hücre içerisindeki seviyelerinin normal koşullar dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Kanser, hasarlı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve bu duruma devam etmesi sonucu tümör oluşumunun meydana gelmesiyle oluşur. 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 farklılaşmada yönlendirmek için açıp kapatmaktadır (Yu ve ark 2010, Lee ve ark 1993).

Çizelge 1.1: RNA Tipleri

İsim	Uzunluk	İnsandaki Sayısı	Fonksiyonu	Örnekler	Referans
Kısa ncRNA'lar					
miRNA	19-24 bç	>1.424	mRNA düzenlenmesi	miR-15/16, miR-124a, miR-34b/c, miR-200	He ve Hannon 2004
piRNA	26-31 bç	23.439	Germ hücrelerinde transpozon baskılanması, DNA metilasyonu	RASGRF1 LINE1 ve IAP elementlerini hedefleyen piRNA'lar	Aravin ve ark 2007
tiRNA	17-18 bç	>5.000	Transkripsiyon düzenlenmesi	Hedefi CAP1 geni olan	Taft RJ. 2009
Orta Uzunluktaki ncRNA'lar					
snoRNA	60-300 bç	>300	rRNA'nın modifikasyonu	USO, SNORD	Kiss-László ve ark 1996
Uzun ncRNA'lar					
lncRNA	>200 bç	>1000	DNA-kromatin kompleksinde scaffold işevi	HOTAIR, HOTTIP, lincRNA-p21	Mercer ve ark 2009
Diğer lncRNA	>200 bç	>3000	X kromozomunun inaktivasyonu	XIST, TSIX, TERRAs, p15AS, H19, HYMAI	Mercer ve ark 2009

Tümör süpresör ve onkojenlerin çoğu ilk önce DNA'dan RNA'ya transkript edilir ve sonra da etkilerini uygulamak 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 dâhil olmaktadır. Yapılan çalışmalar bu fikri doğrulamakla birlikte, tümör gelişiminde miRNA'ların tümör süpresörler veya onkogen olarak rol oynadığını açığa çıkarmıştır (Yu ve ark 2010, Lee ve ark 1993).

1.4.1. MikroRNA'ların Yapısı ve Tarihçesi

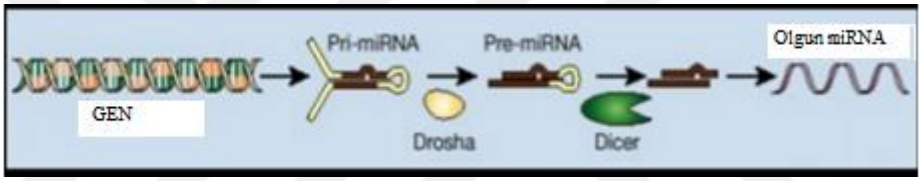
MikroRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir (Shenouda ve Alahari 2009). MikroRNA, fonksiyon olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli bir RNA molekül çeşididir. Pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler işlenerek, önce pre-miRNA adlı kısa sap-ilmik yapılarına, sonra da fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler. İnsan genomunda miRNA'ları kodlayan yüksek seviyede korunmuş yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir. Kasım 2010 tarihine kadar yapılan çalışımalarda insan genomunda 1048 adet mikroRNA tanımlanmıştır (www.mirbase.org).

İlk mikroRNA, Lee ve çalışma arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuarında keşfedilmiş olup, mikroRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (Lee ve ark 1993, Ruvkun 2001). Lee ve arkadaşları 1993 yılında yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans*'ı gen içeriği bakımdan taramışlar, lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotit uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini rapor etmişlerdir(Lee ve ark 1993). 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları *C.elegans*'da 22 nükleotit uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir mikroRNA keşfetmişlerdir (Reinhart ve ark2000). Let-7'nin insanları da içine alan türler arasında da korunmuş olduğu keşfedilmiş olup, bu durum let-7 nin önemli bir

biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir. Daha sonraki yıllarda let-4 ve let-7'ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiştir ve miRNA'lar olarak isimlendirilmiştir (Pasquinelli ve ark 2000, Lagos-Quintana ve ark 2001).

1.4.2. MikroRNA'ların Oluşumu

MikroRNA'lar, birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonucunda meydana gelir. İlk adımda miRNA genlerinden primer miRNA(primiRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir.(Şekil 1. 2) İkinci adımda primiRNA'lar prekürsör miRNA(pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür. Üçüncü ve son adımda olgun miRNA'ların stoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (Kwak ve ark 2010)

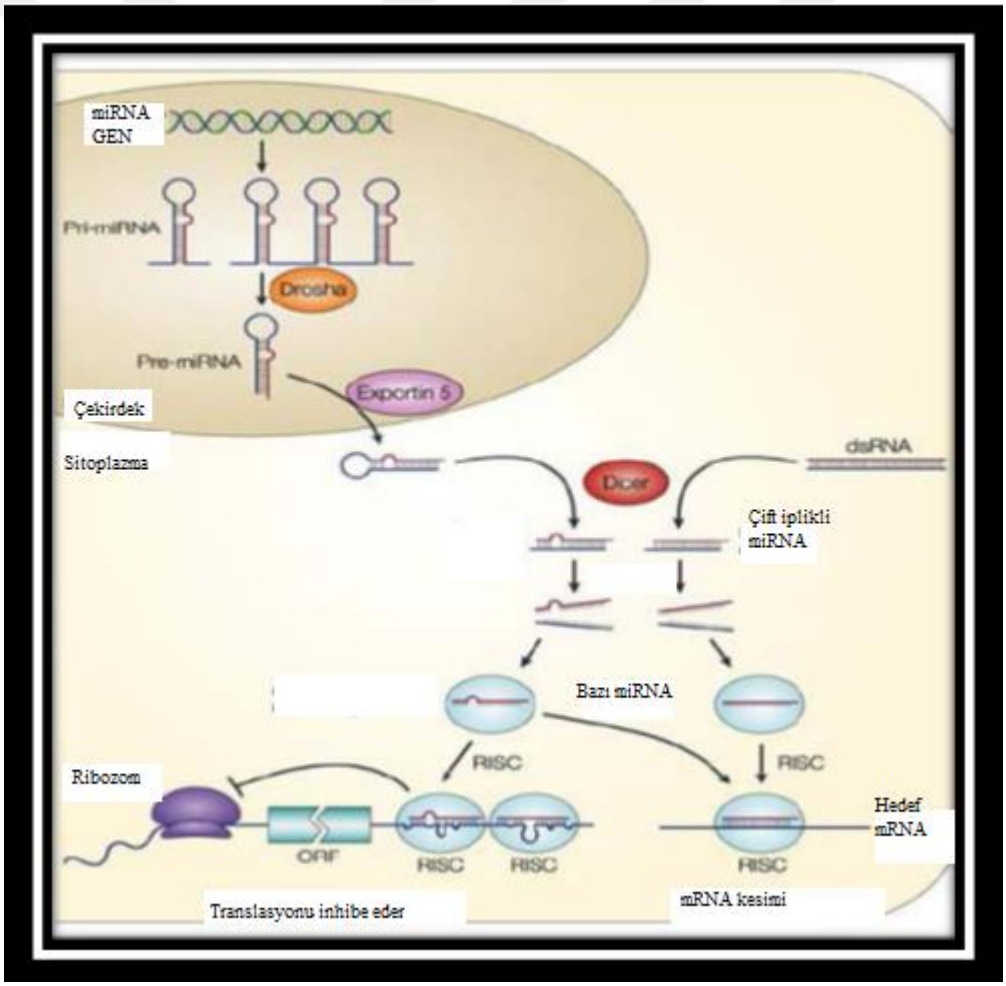


Şekil 1.2 miRNA oluşumu (www.slideshare.net)

MikroRNA'lar, primer transkript(pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Pri-miRNA (500-3000 baz), "cap'' ve "poli A" kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır. Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha(veya DGCR8), tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür (Lee ve ark 2003). Bir nükleaz olan Drosha ile çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha'nın oluşturduğu komplekse mikroişlemci kompleks (Microprocessor complex) adı verilir (Esquela ve ark 2006).

Pre-miRNA molekülü bir nüklear taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nüklear bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır (Lund ve ark 2004). Sonrasında, pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksine çevrilir (Zhang ve ark 2002). Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş

susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır (Bernstein ve ark 2001). Dicer, pre-miRNA'nın sap-ilmiğini kestikten sonra, miRNA: miRNA dubleksinden sadece biri RISC kompleksine dâhil olur. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan argonaute'un etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dâhil edilir. Bu iplik kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılır. Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır, RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir.(Şekil 1. 3) MikroRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (Gregory ve ark 2005).



Şekil 1. 3: Mikro RNA'LARIN biyogenezi (Pillai ve 2005)

1.4.3. MikroRNA'ların Fonksiyonu

Olgun mikroRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. MikroRNA'lar kendi nükleotid dizilerine komplimenter hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. MiRNA, RISC ile kompleks oluşturur, baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanır, sonrasında protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkımına neden olur (Shenouda ve Alahari 2009).

MikroRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye (untranslated region-UTR) veya hedef mRNA'nın ORF (open reading frame) bölgesine bağlanır. Bağlanma pozisyonu mikroRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlıdır. 3' UTR bölgesine bağlanma kusurlu, tam olmayan, eksik komplementerliği ihtiva eder ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. ORF bölgesi içine bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği gösterir ve Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır (Sun ve ark 2010). Ayrıca, mikroRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla mikroRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir (Pillai 2005).

1.4.4. Meme Kanseri ve miRNAlar

Calin ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları araştırmaya göre meme kanseri, genetik olarak hem locus hem de allel içeriğine göre yüksek derecede heterojendir. Ailesel meme kanseri vakalarının kabaca %50' si 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 miRNAlarının yarısının kanserle ilişkili genomik bölgede veya fragil bölgelerde lokasyon göstermesinin kanserde rol oynabileceğini bildirmiştir (Calin ve ark 2004). Bu polisistron kümesine örnek olarak 13q31kromozomunun c13 veya f25 locusundaki miR17-92 verilebilir. Bu locusun meme kanseri dahil birçok kanser tipinde heterozigozite kaybına neden olduğu bilinmektedir. Kanser hücrelerinin malign özellik seviyelerinden sorumlu olan ve meme kanseri gelişiminde rol oynayan

ve diğer miRNAlar (miR-196 and miR-10a) homeobox kümelerinde lokalizedir (Heneghan ve ark 2009) .

Meme kanserindeki miRNA ekspresyon çalışmaları, hastalık taksonomisi ve prognostik araç geliştirilmesi açısından miRNAların önemini ve potansiyel kullanım alanını ortaya koymuştur. Hücre döngüsü, proliferasyonu ve tümörigenezin miRNAlar tarafından kontrol edildiği gösterilmiş ve hücre döngüsünü kontrol eden siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK), siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI), retinablastoma (Rb) 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 kanserinin 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 miRNAlardan 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 miRNAların amplifikasyonu veya over-ekspresyonuyla gerçekleşebilir. Ayrıca tümör metastazı ise prometastatik miRNAların artmış ekspresyonuyla ve/veya anti-metastatik miRNAların downregülasyonuyla gerçekleşebilmektedir (O'Day ve ark 2010).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- D-Vitamini: Sigma-Aldrich
- Etanol: Merck K38169483 750
- DMSO: Dimetil Sülfoksit Sigma-Aldrich D2650
- KH_2P0_4:Merck A0047373 923
- KOH: Merck B0201933 811
- KC1: Sigma-Aldrich 12636
- Sodyum-Potasyum tartarat: Merck A875387 811
- Na_2CO_3 Sigma-Aldrich S7795
- $CuSO_4.5\ H_20$: 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

- CO_2 inkübatörü: SANYO O2/CO2 INCUBATOR MCO-175M
- Santrifüj: Sigma 3K30
- Sıcak su banyosu: Wise Bath fuzzy systems
- Falcon tüp: 352098 Blue max™ 50ml polypropyleneconicaltube 30x115mm style
- Kriyo tüp: REF:C12ARBIPS
- Dynamic Array chipe (Fluidigm)
- Laminar akımlı kabin: Steril VBH Compact
- 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)
- Piko Real-Time PCR System (ThermoScientific)
- Serolojik pipet: Corning® Costar® Stripette® serological pipettes, bulkpacked (5 ve 10 ml)
- Mikropipet (1000, 200, 10µl): Gilson

2.2. Metod

2.2.1.Hücre Kültürü

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

MCF-7 hücreleri nemlendirilmiş 37°C'lik atmosferde ve , %5 CO2 içeren, %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 besiyerinin uzaklaştırılması, %90 FBS ve 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 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra, kalan hücre pelleti, 1-2 ml besiyerine alındı. Karıştırılarak 10'ar µl Thoma lamının alt ve üst kısımlarına aktarılmış, Thoma lamının alt ve üst bölümlerinde bulunan 16 küçük karede hücre sayımı yapılmış ve ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

Vitamin- D' nin IC_{50} değeri Selçuk Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında daha önce yapılan çalışmalarda 140 nM bulunmuştur. Bu yüzden bizde çalışmamızda MCF- 7 hücre hattına 140 nM D- Vitamini ile muamele edilmiştir.

2.2.2. 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 kurulmuştur, 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 artmış N-ras ve Rb proteininin hızlı fosforilasyonu rol oynamaktadır (Rait ve ark 2001, Sutherhland ve ark 1999, Botos ve ark 2002).

2.2.3. RT-PCR Yöntemiyle Çalışma Yöntemi

2.2.3.1. Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu

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

Kit içeriği: Proteinaz K (Liyofilize), Binding buffer, Binding enhancer, Washbuffer, Elutionbuffer, Filtreli tüpler, Collection tüpler bulunmaktadır.

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.

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.

2.2.3.2. Total RNA'dan 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 Mix oluşturmaktadır. 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.

Çizelge 2. 1 cDNA Karışımı.

10X miScript Nucleics Mix	84 µl
5X miScript HiSpec Buffer	168 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 plağa 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.

Pre- amplifikasyon Aşaması**:** Preamplifikasyon aşamasında 95 örnek için ölü hacimler de hesaba katılarak aşağıdaki karışım hazırlandı.

Çizelge 2. 2 Pre- Amplikasyon Aşamasındaki Karışım.

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 µl olacak şekilde dağıtıldı. Karışımın üzerine dilüe edilmiş cDNA örneklerinden 2 µl eklenerek reaksiyon final hacmi 10 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
4°C ∞

} 12 Döngü

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.

Eksonükleaz Aşaması: Preamplifikasyon ürünlerinin primer dimerlerinden 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 100 µl preamplifiye cDNA'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.

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

Çizelge 2. 3 Primer Plak Karışımı.

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 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.

Örneklerin Hazırlanması; aşağıdaki karışım hazırlanarak, örnekler Dynamic Array chiplere yüklemeye hazır hale getirildi.

Çizelge 2. 4 Dinamik Array Chip Karışımı.

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 µl olacak şekilde dağıtıldı. Karışımın üzerine dilüe edilmiş olan preamplifiye cDNA örneklerinden 2 µl eklenerek final hacmi 6 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. Fluidigme Dynamic Real time PCR cihazı Gaziantep Onkoloji Hastanesi laboratuarında olduğundan real time PCR analizi Gaziantep'te gerçekleştirilmiştir.

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
70°C'de 30 saniye
60°C- 95°C Melting curve

} 24 döngü

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.

İstatistiksel Analiz: MCF-7 hücre hattındaki miRNA dataları karşılaştırmalı Ct yöntemi olan 2-ΔΔCt analiz istatistik yöntemi ve basic student t testleri kullanıldı (Livak ve Schmittgen 2001). Data analizi SPSS software programı kullanılarak yapıldı. $P<0,05$ anlamlılık seviyesi olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

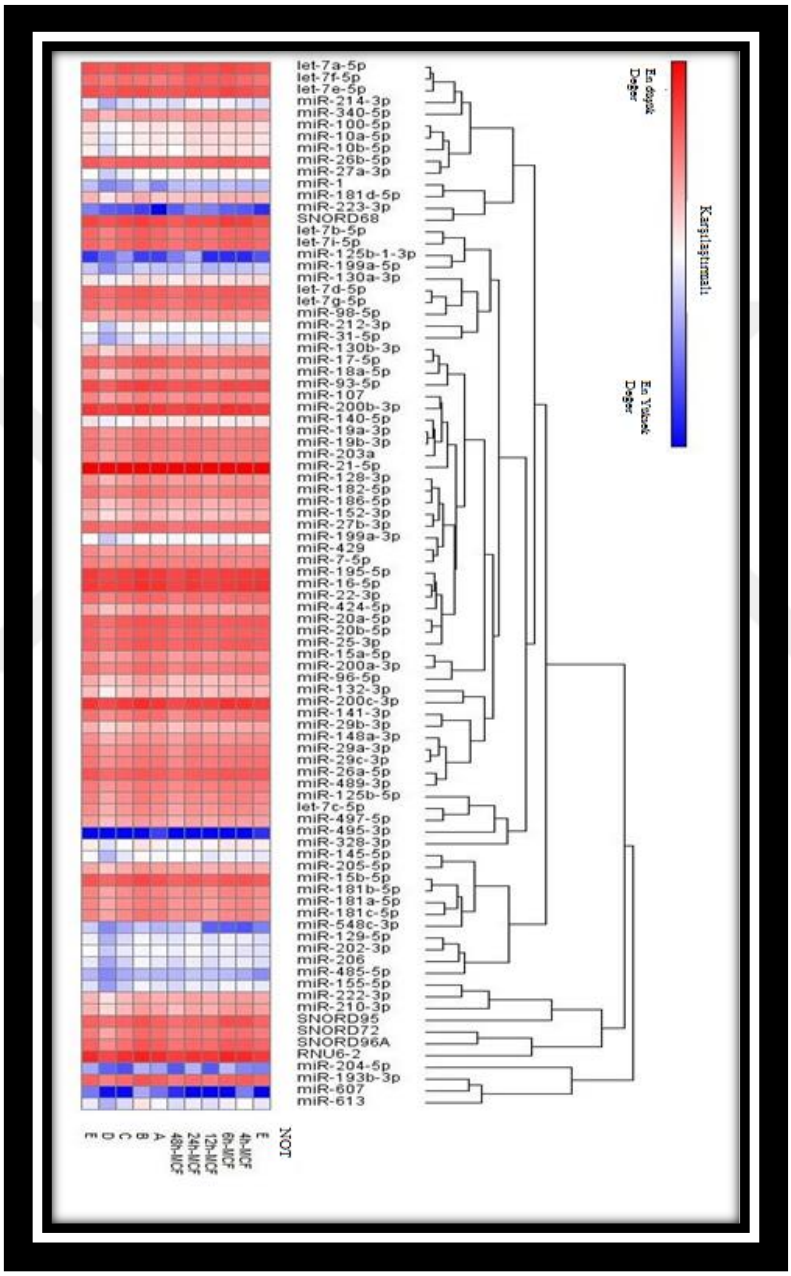
3.1.Real-Time PCR bulguları

Ekspre ettiğimiz 84 miRNA Çizelge 3. 1' de özetlenmiş ve bir tür veya organizmanın her hücresi için her zaman sabit düzeylerde eksprese olan Housekeeping gen çalışmamızda içerisinden uygun olan SNORD61 seçildi.

Çizelge 3. 1 Çalışmamızda Kullandığımız Mikro RNA Paneli

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

HeatMap tablosu tüm miRNA'ları kapsayan bir diyagramdır. Bu tabloda kırmızı renkli olan miRNA'lar de azalış ve mavi renkli olan miRNA'lar ise artış düzeyleri göstermektedir. Ayrıca bu tabloda ki gruplandırmalar aynı etkiye sahip olan miRNA'ları göstermektedir.(Şekil 3. 1)



Şekil 3. 1 Artan-azalan miRNA'lar HeatMap analizi olarak verilmiştir.

Çalışmamızda uygulama D-Vitamini tek doz (140nM) ve 5 farklı saat olarak uygulandı. House keeping gen SNORD61'e karşı miRNA fold regulation değerleri tablo 3' te gösterilmiştir. Çizelge 3. 2' de artış-azalış kat değerleri anlamlı olanlar verilmiştir. Çalışmamıza dahil ettiğimiz 84 miRNA çeşidinden sadece 29 tanesinin deregüle olduğu gözlenmiştir. Şekilde mavi renklendirdiğimiz seviyeler azalan düzeyleri kırmızı renklendirdiğimiz seviyeler ise artan düzeyleri ifade etmektedir. Kırmızı ve mavi olarak gösterilen artış-azalışlar kat artış azalış anlamına gelmekte ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterenlerdir ($p<0,05$).

Çizelge 3. 2 miRNA'ların Fold Regülation Değerleri

Sıra	Mature ID	2.SAAT FOLD REGULATION	4.SAAT FOLD REGULATION	6.SAAT FOLD REGULATION	24.SAAT FOLD REGULATION	48.SAAT FOLD REGULATION
1	miR-1	-7,49	1,50	-1,03	1,77	-2,34
2	miR-100-5p	-1,57	-2,96	-1,35	-1,33	-1,26
3	miR-10a-5p	-1,42	-2,36	-1,07	-1,43	-1,48
4	miR-125b-1-3p	-2,06	2,06	193,71	1,19	-19,70
5	miR-130b-3p	-1,19	1,06	1,47	1,17	-2,04
6	miR-140-5p	-1,34	1,04	1,65	-1,06	-2,01
7	miR-145-5p	1,49	2,20	2,10	-1,22	-3,20
8	miR-181d-5p	-2,21	1,10	1,14	1,22	-1,17
9	miR-18a-5p	-1,16	1,32	1,90	-1,29	-2,90
10	miR-199a-3p	-1,23	1,09	2,13	1,45	-1,49
11	miR-199a-5p	-1,53	1,38	2,04	1,26	-1,30
12	miR-19a-3p	-1,45	1,13	1,59	-1,08	-2,11
13	miR-19b-3p	-1,37	1,17	1,57	-1,12	-2,21
14	miR-202-3p	1,93	1,69	2,52	1,03	-1,13
15	miR-203a	-1,54	-1,06	1,29	-1,20	-2,11
16	miR-204-5p	3,73	4,48	-9,36	-1,007	10,40
17	miR-205-5p	1,39	1,59	1,70	1,24	-3,13
18	miR-20a-5p	-1,2	1,08	1,53	-1,10	-2,01
19	miR-21-5p	-1,5	-1,26	1,17	-1,01	-2,96
20	miR-222-3p	-1,70	-1,58	-1,13	-1,93	-3,16
21	miR-223-3p	-4,27	-2,44	2,99	4,35	1,04
22	miR-31-5p	-1,37	1,48	2,03	1,09	-1,52
23	miR-485-5p	4,651	1,57	2,03	1,62	-1,8
24	miR-495-3p	1,84	-1,02	6,68	44,8	-2,06
25	miR-548c-3p	7,35	74,10	62,80	1,06	-1,46
26	miR-607	62,62	4,83	7,89	63,45	32,79
27	miR-613	1,61	2,53	1,61	1,26	-1,26
28	miR-7-5p	-1,36	1,15	1,82	1,56	-2,48
29	miR-96-5p	-1,03	1,61	2,30	2,18	-1,01

MCF-7 hücrelerine D vitamini uygulaması ile elde edilen miRNA artış-azalışları kontrol grubuna göre kıyaslandığında anlamlı çıkan, deregüle 23 miRNA Çizelge 3. 3 ‘ te verilmiştir.

Çizelge 3. 3 Kontrol grubuna göre anlamlı artış-azalış gösteren miRNA’lar

Sıra	miRNA	2.SAAT P-Değeri X (10^{-3})	4.SAAT P-Değeri X (10^{-3})	6.SAAT P- Değeri X (10^{-3})	24.SAAT P- Değeri X (10^{-3})	48.SAAT P- Değeri X (10^{-3})
1	miR-100-5p	168,22	8,24	118,93	133,54	509,99
2	miR-10a-5p	124,75	032,04	476,74	97,40	299,65
3	miR-125b-1-3p	941,08	478,87	1,179	918,64	407,08
4	miR-130b-3p	285,34	786,98	0,14	215,2	19,49
5	miR-140-5p	48,53	941,52	0,35	666,23	9,11
6	miR-145-5p	120,83	9,08	0,83	55,67	32,09
7	miR-18a-5p	68,13	23,33	0,62	238,89	17,58
8	miR-199a-3p	221,90	779,93	0,087	3,35	6,43
9	miR-199a-5p	334,76	326,51	3,15	129,04	67,44
10	miR-19a-3p	2,23	91,47	7,71	590,77	8,56
11	miR-19b-3p	1,90	19,69	7,09	436,14	17,66
12	miR-202-3p	132,25	2,02	2,612	823,04	552,15
13	miR-203a	33,81	616,97	32,19	326,29	29,73
14	miR-205-5p	17,59	8,45	0,48	60,58	2,24
15	miR-20a-5p	152,33	524,20	0,10	375,47	25,94
16	miR-21-5p	7,69	319,61	360,33	992,46	10,32
17	miR-31-5p	19,18	18,65	8,59	587,29	115,03
18	miR-485-5p	586,36	221,40	0,49	16,37	177,27
19	miR-495-3p	828,14	744,81	285,84	62,87	4,95
20	miR-548c-3p	159,29	43,99	11,70	989,01	408,87
21	miR-7-5p	4,29	632,82	0,20	1,30	0,76
22	miR-96-5p	735,88	28,66	3,90	0,005	901,62
23	miR-613	51,26	0,08	10,43	10,23	113,27

Kontrol grubu hücreler ile D vitamin uygulamasını takiben bakılan hücrelerin kıyaslamasında 84 miRNA’ dan deregüle 23 adet miRNA tespit edilmiştir. Ancak istatislik sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda miR-495-3p’nin Rawdata değeri 999,00 çıktığından dolayı anlamlı miRNA sayısı 22 adet olarak düzeltilmiştir. 2. Saat, 4. Saat ve 6. saatde ekspre edilen deregüle 22 miRNA Çizelge 3. 4’ de verilmiştir. Şekilde mavi renklendirdiğimiz seviyeler azalan düzeyleri kırmızı renklendirdiğimiz seviyeler ise artan düzeyleri ifade etmektedir.

Çizelge 3. 4 Kontrol grubu hücreler ile D vitamin uygulamasını takiben 2, 4 ve 6 Saatteki Fold Regülation ve p-value değerlerindeki miRNA değişiklikleri

Saatler	2.Saat		4.Saat		6.Saat	
	Fold Regülation	**P-Value X (10^{-3})**	**Fold Regülation**	**P-Value X (10^{-3})**	**Fold Regülation**	**P-Value X (10^{-3})**
miR-100-5p	-1,57	168,22	-2,96	8,24	-1,36	118,93
miR-10a-5p	-1,42	124,75	-2,36	32,04	-1,07	476,74
miR-125b-1-3p	-2,07	941,08	2,06	478,87	193,71	1,17
miR-130b-3p	-1,18	285,34	1,06	786,98	1,47	0,14
miR-140-5p	-1,33	48,53	1,04	941,52	1,65	0,35
miR-145-5p	1,48	120,83	2,20	9,08	2,10	0,83
miR-18a-5p	-1,16	68,13	1,33	23,33	1,90	0,62
miR-199a-3p	-1,22	221,90	1,09	779,93	2,12	0,08
miR-199a-5p	-1,53	334,76	1,38	326,51	2,04	3,15
miR-19a-3p	-1,45	2,23	1,14	91,47	1,59	7,71
miR-19b-3p	-1,37	1,90	1,18	19,69	1,57	7,09
miR-202-3p	1,93	132,25	1,69	2,02	2,52	2,61
miR-203a	-1,55	33,81	-1,07	616,97	1,29	32,19
miR-205-5p	1,40	17,59	1,59	8,45	1,70	0,48
miR-20a-5p	-1,23	152,33	1,08	524,20	1,59	0,10
miR-21-5p	-1,53	7,69	-1,27	319,61	1,17	360,33
miR-31-5p	-1,38	19,18	1,49	18,65	2,02	8,59
miR-485-5p	4,65	586,36	1,57	221,40	2,03	0,49
miR-613	1,61	51,26	2,53	0,07	7,88	10,43
miR-548c-3p	7,35	159,29	74,10	43,99	62,80	11,70
miR-7-5p	-1,36	4,29	1,15	632,82	1,82	0,20
miR-96-5p	-1,03	735,88	1,61	28,66	2,30	3,90

24. Saat ve 48. saatde ekspre edilen deregüle 22 miRNA' lar Çizelge 3. 5' de verilmiştir. Şekilde mavi renklendirdiğimiz seviyeler azalan düzeyleri kırmızı renklendirdiğimiz seviyeler ise artan düzeyleri ifade etmektedir. Çizelgede mavi renklendirdiğimiz seviyeler azalan düzeyleri kırmızı renklendirdiğimiz seviyeler ise artan düzeyleri ifade etmektedir.

Çizelge 3. 5 Kontrol grubu hücreler ile D vitamin uygulamasını takiben 24 ve 48. Saatteki Fold Regülation ve p-value değerlerinde ki miRNA değişiklikleri

Saatler	**24.Saat**		**48.saat**	
	Fold Regülation	**P-Value X (10^{-3})**	**Fold Regülation**	**P-Value X (10^{-3})**
miR-100-5p	-1,33	133,54	-1,26	509,99
miR-10a-5p	-1,43	97,40	-1,48	299,65
miR-125b-1-3p	1,19	918,64	-19,69	407,08
miR-130b-3p	-1,17	215,26	-2,04	19,49
miR-140-5p	-1,06	666,23	-2,01	9,11
miR-145-5p	-1,22	55,67	-3,20	32,09
miR-18a-5p	-1,29	238,89	-2,89	17,58
miR-199a-3p	1,45	3,35	-1,49	6,43
miR-199a-5p	1,26	129,04	-1,30	67,44
miR-19a-3p	-1,08	590,77	-2,10	8,56
miR-19b-3p	-1,12	436,14	-2,21	17,66
miR-202-3p	1,03	823,04	-1,13	552,15
miR-203a	-1,20	326,29	-2,10	29,73
miR-205-5p	1,24	60,58	-3,12	2,24
miR-20a-5p	-1,10	375,47	-2,01	25,94
miR-21-5p	-1,01	992,46	-2,96	10,32
miR-31-5p	1,09	587,29	-1,52	115,03
miR-485-5p	1,62	16,372	-1,89	177,27
miR-613	1,26	10,23	-1,26	113,27
miR-548c-3p	1,06	989,01	-1,46	408,87
miR-7-5p	1,56	1,30	-2,47	0,76
miR-96-5p	2,17	0,01	-1,01	901,62

Kontrol grubuna göre D vitamin uygulanan hücrelerdeki değişiklikler tablo 7'de daha sadeleştirilerek şematize edilmiştir. Çizelge 3. 6' da kontrol grubu hücreler ile D vitamin uygulamasını takiben Fold regülation, p-value ve raw data değerlerinden anlamlı çıkan miRNA' ların ortak reaksiyon verdiği saatler verilmiştir. Kırmızı renk ile gösterilen miRNA' ların upregüle olduğunu mavi renk ile gösterilen miRNA' ların down regüle oluşu ifade etmektedir. miR-145-5p 4. ve 6. Saatte artarken 48. Saatte azalma göstermiştir. Diğer 21 miRNA seviyesinde ise ya azalma yada artış gözlenmiştir.

Çizelge 3. 6 Fold regülation, p-value ve raw data değerlerinden anlamlı çıkan miRNA' ların ortak reaksiyon verdiği saatler.

Sıra	miRNA	2.saat	4.saat	6.saat	24.saat	48.saat
1	miR-100-5p		-			
2	miR-10a-5p		-			
3	miR-145-5p		+	+		-
4	miR-548c-3p		+	+		
5	miR-613		+			
6	miR-125b-1-			+		
7	miR-199a-3p			+		
8	miR-199a-5p			+		
9	miR-202-3p			+		
10	miR-31-5p			+		
11	miR-96-5p			+	+	
12	miR-485-5p			+		
13	miR-130b-3p					-
14	miR-140-5p					-
15	miR-18a-5p					-
16	miR-20a-5p					-
17	miR-21-5p					-
18	miR-19a-3p					-
19	miR-19b-3p					-
20	miR-7-5p					-
21	miR-203a					-
22	miR-205-5p					-

Bakılan 84 miRNA‘ dan kontrol grubundan farklılık göstermeyen 2. saat ama fold regülation veren 8 miRNA’ya ait fold regülation ve p değerleri Çizelge 3. 7’ de verilmiştir.

Çizelge 3. 7 Kontrol grubu hücreler ile D vitamin uygulamasını takiben 2. Saatteki miRNA değişiklikleri.

Sıra	**miRNA**	**Fold Regulation Değeri**	**P-Value X (10^{-3})**
1	miR-1	-7,49	692,87
2	miR-125b-1-3p	-2,06	941,08
3	miR-181d-5p	-2,21	71,38
4	miR-204-5p	3,73	927,94
5	miR-223-3p	-4,27	437,08
6	miR-485-5p	4,65	586,36
7	miR-548c-3p	7,35	159,29
8	miR-607*	62,61	75,23

* miR 607 analizinde yazılım uyarı işaret verdiğinden artış gözükse de anlamlı kabul edilmemiştir.

Bakılan 84 miRNA ‘dan kat artış yada azalışları baz alınarak 4. Saatteki bu artış/azalışı gösteren 9 miRNA kıyaslaması yapılmıştır.(Çizelge 3. 8) Anlamlı miRNA’ lara Raw Data değerlerine de bakılıp kontrol edildi. miR-100-5p ve miR-10a-5p down regüle olurken miR-145-5p, miR-548c-3p ve miR-613 upregüle olmuştur.

Çizelge 3. 8 Kontrol grubu hücreler ile D vitamin uygulamasını takiben 4. Saatteki miRNA değişiklikleri.

Sıra No	miRNA	Fold Regulation Değeri	p-Value X (10^{-3})
1	miR-100-5p	-2,95	8,24
2	miR-10a-5p	-2,35	32,04
3	miR-125b-1-3p	2,06	478,87
4	miR-145-5p	2,19	9,08
5	miR-204-5p	4,48	983,66
6	miR-223-3p	-2,43	925,37
7	miR-548c-3p	74,10	43,99
8	miR-607	4,83	360,75
9	miR-613	2,52	0,07

Bakılan 84 miRNA 'dan kat artış yada azalışları baz alınarak 6. saatteki bu artış/azalışı gösteren 13 miRNA kıyaslaması yapılmıştır (Çizelge 3. 9). Anlamlı miRNA' lara Raw Data değerlerine de bakılıp kontrol edildi. miR-125b-1-3p, miR-145-5p, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-202-3p, miR-31-5p, miR-485-5p, miR-548c-3p ve miR-96-5p upregüle olmuştur.

Çizelge 3. 9 Kontrol grubu hücreler ile D vitamin uygulamasını takiben 6. Saatteki miRNA değişiklikleri.

Sıra No	miRNA	Fold Regulation Değeri	p-Value X (10^{-3})
1	miR-125b-1-3p	193,71	1,17
2	miR-145-5p	2,09	0,83
3	miR-199a-3p	2,12	0,08
4	miR-199a-5p	2,04	3,15
5	miR-202-3p	2,52	2,61
6	miR-204-5p	-9,36	308,85
7	miR-223-3p	2,99	578,94
8	miR-31-5p	2,02	8,59
9	miR-485-5p	2,03	0,49
10	miR-495-3p	6,67	285,84
11	miR-548c-3p	62,80	11,70
12	miR-607	7,88	285,72
13	miR-96-5p	2,30	3,90

Bakılan 84 miRNA ‘dan kat artış yada azalışları baz alınarak 24. saatteki bu artış/azalışı gösteren 4 miRNA kıyaslaması yapılmıştır (Çizelge 3. 10). Anlamlı miRNA’ lara Raw Data değerlerine de bakılıp kontrol edildi. miR-96-5p upregüle olmuştur.

Çizelge 3. 10 Kontrol grubu hücreler ile D vitamin uygulamasını takiben 24. Saatteki miRNA değişiklikleri.

Sıra	**miRNA**	**Fold Regulation**	**p-Value X (10^{-3})**
1	miR-223-3p	4,35	944,09
2	miR-495-3p	44,83	62,87
3	miR-607	63,45	76,74
4	miR-96-5p	2,17	0,01

Bakılan 84 miRNA‘ dan kat artış yada azalışları baz alınarak 48. saatteki bu artış/azalışı gösteren 17 miRNA kıyaslaması yapılmıştır. P değerleri 0,05’ ten büyük olanlar anlamsız, p değerleri 0,05 ten küçük olan miRNA’lar anlamlıdır (Çizelge 3. 11). Anlamlı miRNA’ lara Raw Data değerlerine de bakılıp kontrol edildi. miR-130b-3p, miR-140-5p, miR-145-5p, miR-18a-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-203a, miR-205-5p, miR-20a-5p, miR-21-5p ve miR-7-5p downregüle olmuştur. Çizelgeye göre miR-495-3p de anlamlı gibi gözüksede raw data değerlerinde 999,00 çıkarak anlamsız olmaktadır.

Çizelge 3. 11 Kontrol grubu hücreler ile D vitamin uygulamasını takiben 48. Saatteki miRNA değişiklikleri

Sıra No	miRNA	Fold Regulation Değeri	p-Value (t değeri)
1	miR-1	-2,34	83,48
2	miR-125b-1-3p	-19,69	407,08
3	miR-130b-3p	-2,04	19,49
4	miR-140-5p	-2,01	9,11
5	miR-145-5p	-3,20	32,09
6	miR-18a-5p	-2,89	17,58
7	miR-19a-3p	-2,10	8,56
8	miR-19b-3p	-2,21	17,66
9	miR-203a	-2,10	29,73
10	miR-204-5p	10,40	997,49
11	miR-205-5p	-3,12	2,24
12	miR-20a-5p	-2,01	25,94
13	miR-21-5p	-2,96	10,32
14	miR-222-3p	-3,16	53,17
15	miR-495-3p	-2,05	4,92
16	miR-607	32,78	624,77
17	miR-7-5p	-2,47	0,76

4. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınların yakalandığı en sık kanser türü 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.

Meme kanseri ölüm oranları, düşük güneş ışığı seviyeleri ile daha çok kış güneşi alan alanlarda daha yüksektir. Epidemiyolojik çalışmalar düzenli olarak güneş ışığına maruz kalan ve D vitamini miktarı ortalamanın üzerinde kadınlarda, meme kanseri insidansının daha düşük olma eğiliminde olduğunu göstermiştir.

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.

D vitamini, özellikle meme kanseri tedavisinde kemoterapi ve antiöstrojenlerle hormon tedavisinin kullanımına yeni bir alternatif teşkil etmektedir. Hem in vitro hem de in vivo araştırmalar, vitamin D bileşenlerinin meme kanseri hücrelerini inhibe edebileceğini göstermiştir.

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). Bizde çalışmamızda 84 farklı miRNA ekspresyonlarını mikroarray yöntemi ile araştırdık. miR-21 çalışmamızda taranmamıştır, miR-155, miR-10b, miR-125b ve miR-145'de çalışmamızda taranmamış ama aynı aileye bağlı miR-155-5p, miR-10a-5p, miR-10b-5p, miR-125b-1-3p, miR-125b-5p, miR-145-5p taranmıştır. Çıkan sonuçlarda miR-10b-5p, miR-125b-5p ve miR-155-5p için anlamlı veriler elde edilmemiştir. Ancak miR-10a-5p 4.saatte downregüle, miR-125b-1-3p 6.saatte upregüle ve miR-145-5p 4. ve 6. saatlerde upregüle olurken 48.saatte downregüle olmuştur.

Hur ve arkadaşları tarafından 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-10 ailesinde bulunan miR-10a-5p'nin 140 μM dozunda ki ekspresyonunda D-vitaminin 4.saatinde downregüle olduğunu gözlemledik.

Zhao ve arkadaşlarının mide kanserinde yaptıkları çalışmada kanseri belirleyecek bir biyobelirteç bulmak için miRNA taraması yapılmış ve çalışmada mir-202-3p anlamlı derece downregüle olduğu saptanmış. Mir- 202- 3p γ-catenin ve Bcl-2 ekspresyonunu inhibe ettiğini ve bulgular ele alındığında mir-202-3p tek başına mide kanseri için uyun bir biyobelirteç olabileceği düşünülmüştür (Zhao ve ark 2008). Bizim çalışmamızda D-vitamini ile muamele ettiğimiz MCF-7 meme kanseri hücre hattından çıkan sonuçlarda farklı olarak miR-202-3p'nin 140μM dozunda ki ekspresyonunda D-vitaminin 6.Saatinde upregüle olduğu saptanmıştır.

miR-31'in prometastatik genlerin ekspresyonlarını inhibe ederek birçok kademede metastazı engellediği bildirilmiştir. miR-31 normal meme hücrelerinde

eksprese olmaktadır ancak tümörün metastatik safhasına bağlı olarak miktarı değişmektedir. 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 (O'Day ve Lal 2010; Valastyan ve ark 2009). Bizim çalışmamızda D-vitamini ile muamele ettiğimiz MCF-7 meme kanseri hücre hattından çıkan sonuçlarda miR-31 aiesinden olan miR-31-5p 140μM dozunda ki ekspresyonunda D-vitaminin 6.Saatinde upregüle olmuştur.

Igarashi arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre kolorektal kanserde epidermal büyüme reseptörü (EGFR) gen mutasyonuna dirençli olduğu gözlenmiş ve miRNA profili araştırıldığında mir 31-5p'nin downregüle olduğu gözlenmiştir (Igarashi ve ark 2014). Yaptığımız çalışmamızda miR-31-5p 'nin 140nM dozunda ki ekspresyonunda D-vitamininin 6.saat uygulamasında miRNA düzeyinin bu çalışmadan farklı olarak upregüle olduğu saptanmıştır.

Zhaofeng ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmaya göre, 56 adet mide kanseri dokularında ters transkripsiyon-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemi ile belirledikleri miRNA'ların analizini gerçekleştirmişlerdir. Belirli bir miRNA ve (yaş, cinsiyet, tümör boyutu, tümör nodu tutulumu evre ve lenf nodu metastazı dahil) doku örnekleri ile ilgili klinik verileri arasındaki ilişki incelenmiştir. 31 farklı şekilde eksprese olan miRNA' ların dizisi belirlenmiştir. Tespit edilen miRNA' lar miR-551b-3p, miR-133b, miR-100-5p'dir. Ekspresyon seviyeleri miR-363-3p önemli ölçüde mide kanseri dokularında azaldığı belirlenmiştir (Zhaofeng ve ark 2015).

Meme kanseri, glioblastoma ve pankreatik kanser gibi çeşitli kanserlerde yüksek derecede eksprese edilirler. Pro-Apopitotik genleri inhibe ederek onkogen olarak işlev yaparlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda miR-21 geninin tümör süpresör olan PTEN'i hedefleyerek etkisini gösterdiği bildirilmiştir (Zhang ve ark 2006, Hammond 2006). Bizde çalışmamızda miR-21 ailesinden olan miR-21-5p'nin 140 μM dozunda ki ekspresyonunda D-vitaminin 48.saaatttinde down regüle olduğunu saptadık.

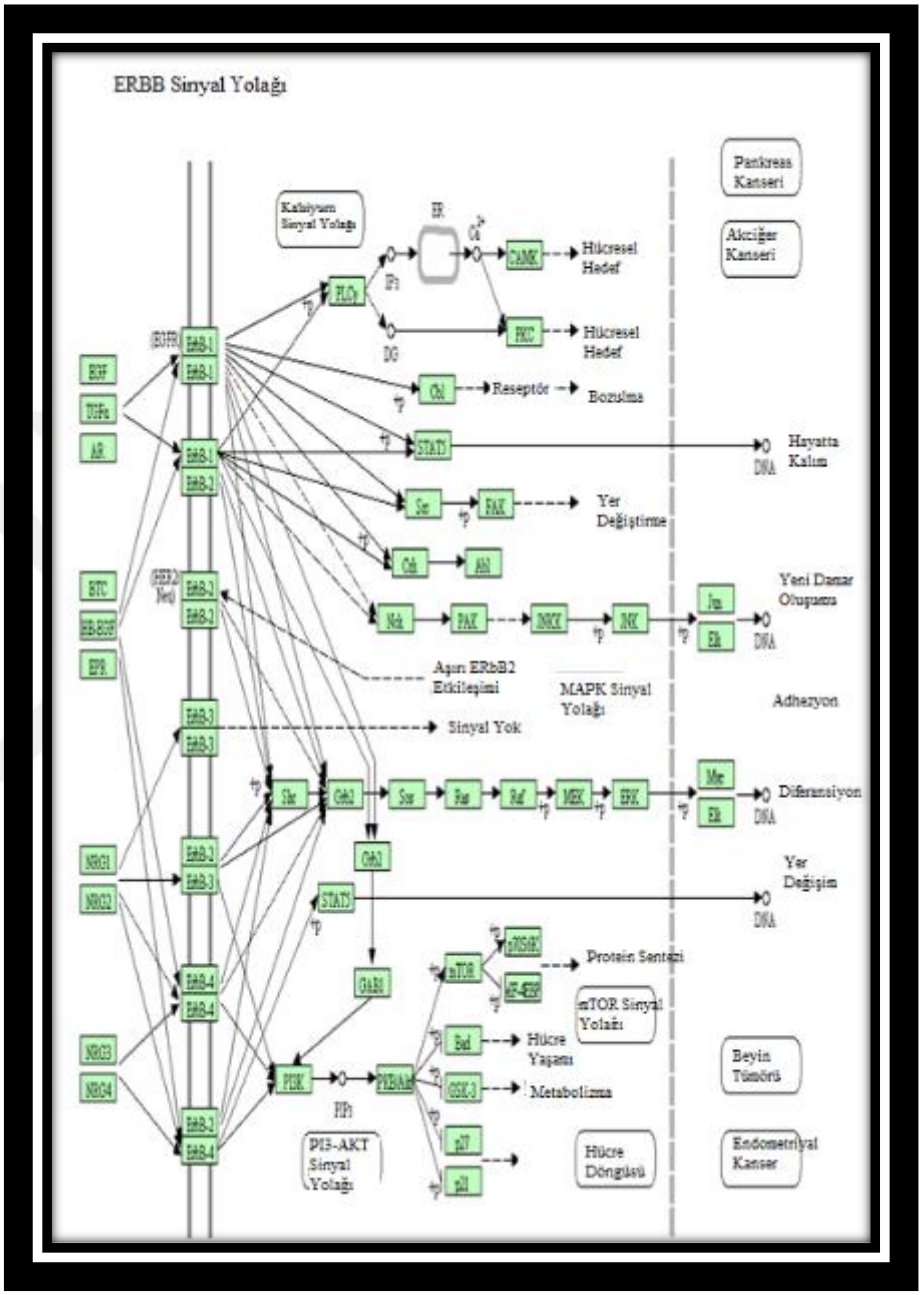
Mir 125 ailesinin ligandla bağlanabilen diğer bir üyesiyle sıkıca bağlanarak bir heterodimer oluştur ve bu şekilde hem ligand bağlama aktivitesini stabilize eder. Bu genin amplifikasyonu ve/veya overekspresyonu meme tümörlerini de içine alan birçok kanser türünde bildirilmiştir (O'Day ve Lal 2010). HER2 amplifikasyonu ve/veya overekspresyonu olan meme kanseri hastalarında miR-125a ve miR-125b'nin önemli derecede downregüle olduğu gösterilmiştir. Bu iki miRNAda potansiyel tümör süpresörlerdendir (Shenouda ve Alahari 2009, O'Day ve Lal 2010).

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 düzeyleri araştırılmıştır. miR-125b-1-3p'nin 140 μM dozunda ki ekspresyonunda D-vitaminin 6.saatinde upregüle olmuştur.

miR-548 ailesi birçok kanser patogenezinde önemli rol aldığı bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak meme kanserindeki rolü tam olarak belirlenemiştir. Shi ve arkadaşları bu tedaviyi araştırmak için qRT-PCR yöntemi ile klinik örneklerdeki meme kanseri hücrelerinde miR-548c-3p' yi araştırmışlardır. Sonuçta anlamlı derecede azaldığını görmüşlerdir (Shi ve ark 2015). miR-548c-3p down regülasyonu meme kanser dokularında gösterilmiş ve artışının apoptozisi indüklediği gösterilmiştir(Shi ve ark 2015). Bizim yaptığımız çalışmamızda miR-548c-3p'nin 140nM dozundaki ekspresyonunda D-vitamininin 6.saat uygulamasında miRNA düzeyinin bu çalışmadan farklı olarak upregüle olduğu saptanmıştır. D vitamini kaynakllı apoptozisin muhtemel sebeplerinde birisi miR-548c-3p upregülasyonu olabilir.

ERBB sinyal yolağı 4.saatteki miRNA' ların 4 tanesi (miR-100-5p, miR-10a-5p, miR-145-5p ve miR-548c-3p) toplam 39 geni etkilemektedir (Şekil 4. 1). Bunlardan 35 tane geni yalnız miR-548c-3p tek başına etkilemektedir. Bu genlerin genel profiline bakıldığında bu patwaydeki miRNA etkilerine bakıldığında hayatta

kalım oranını, proliferasyonu, anjiogenezi, adesyonu ve yer değişimlerini etkilemektedir.



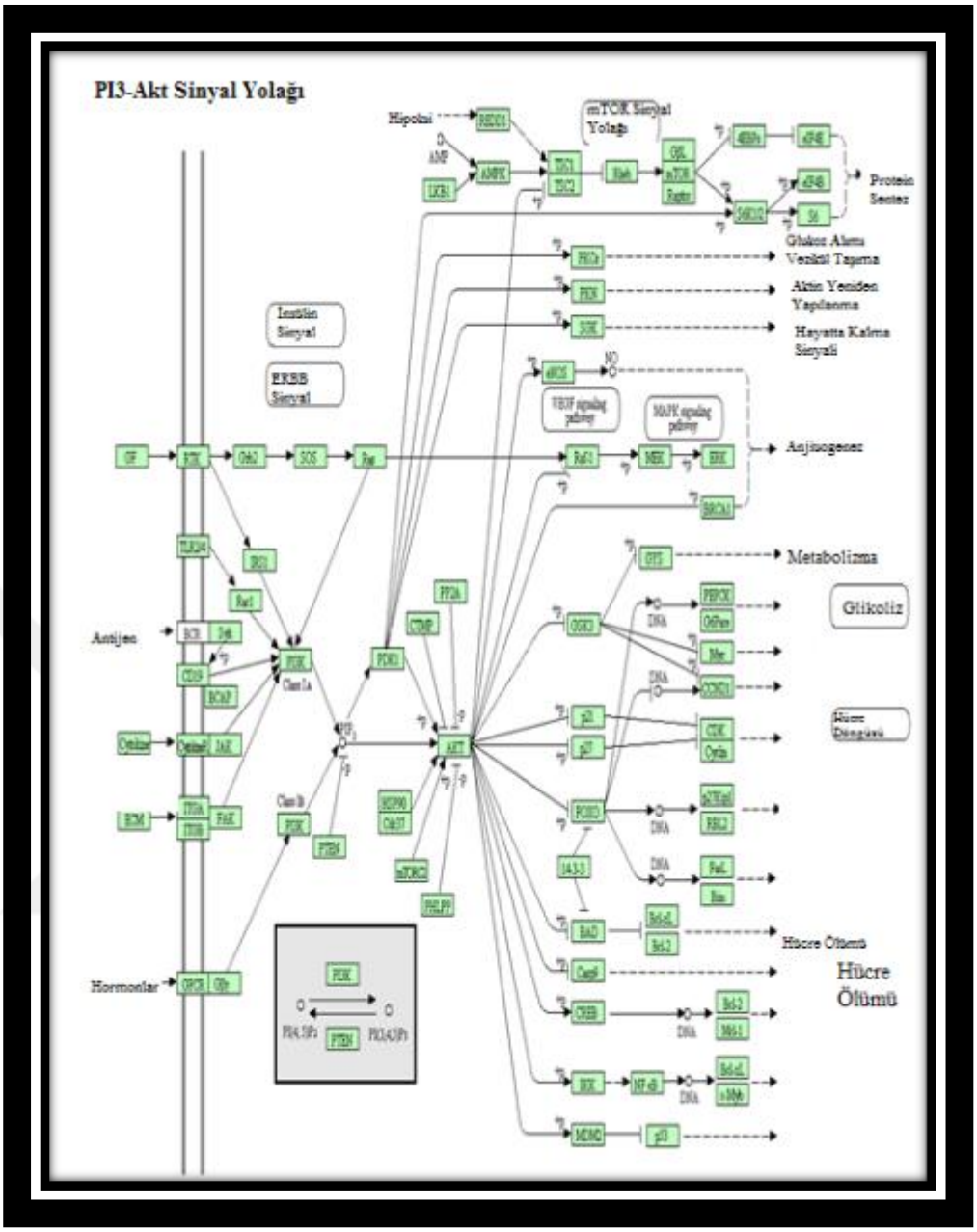
Şekil 4. 1 ERBB sinyal yolağı (http://diana.imis.athena-innovation.gr)

Erken meme kanserinin tesbiti için yeni biomarkerların tanımlanması büyük bir ilerleme olabilir. Sabit vücut sıvıları ve tümör hücrelerinde biomarkerların rolünden dolayı miRNA' lar bir teşhis aracı olarak cezbedicidir. Clin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada meme kanseri tespitinde miRNA' ların potansiyelini değerlendirmek ve meme tümörlerinde miRNA' yı tanımlamaktır. 11 sağlıklı meme

dokusu örnekleri ve 122 meme tümörlerinden elde edilen parafine gömülmüş dokularda 1919 adet insan miRNA' sının genetik yapısı incelenmiştir. Microarray yöntemi ile 25 miRNA sınıfları belirlendi ve meme kanserinde çok sayıda miRNA tanımlandı. 10 adet miRNA ek çalışmalar için seçildi. Bunlardan 4 tanesi (miR-505-5p, miR-125b-5p, miR-21-5p ve miR-96-5p) sağlıklı bireyler ile kıyaslandığında meme kanserine sahip ön tedavi edilmiş hastalarda öenmli derecede aşırı expre edildiği ortaya çıkmıştır. Yapılan bir çalışmada en değerli biomarkerlar miR-505-5p ve miR-96-5p olarak belirlenmiştir (Clin ve ark 2015). Bizim yaptığımız çalışmamızda da miR-96-5p 'nin 140nM dozunda ki ekspresyonunda D-vitamininin 6. ve 24. saatlerinde miRNA düzeyinin upregüle olduğu saptanmıştır. Yapılan tüm bu araştırmalardan çıkan zıt sonuçların göz önüne alındığında araştırmaların devam etmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Pl3K-Akt sinyal yolağında çalışmamızın 24.saatteki miR-96-5p; hücre dögüsünü etkiler. PTEN susturulması ile PIP3 aktif hale geçer ve burdan PDK1 ve Llk genleri ile Akt3 aktifleşir hücre yaşamında FOXO3 susturulduğun da CASP9 ve BAD genlerini etkilemektedir (şekil 4. 2).

Çalışmamızda MCF-7 meme kanseri hücre hattına uyguladığımız D-Vitamini'nin miRNA paneline olan etkisini inceledik ve elde ettiğimiz bulguların literatür ile paralellik gösterdiğini gözlemledik. Vitamin D' nin kansere karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu sonucunu desteklemiştir. Uygulama neticesinde miRNA paneline bakılmış ve elde edilen miRNA' larımız sinyal yolaklarında kanserin ücre siklusuna, apopitoz, poliferasyon ve DNA transkripsiyonunu etkilediği gözlenmiştir.(Şekil 4. 3)



Şekil 4. 2 P13-AKT sinyal yolağı (http://diana.imis.athena-innovation.gr)

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma D-vitamini'nin, insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zamana bağımlı olarak inhibe ettiğini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle ortaya koymuştur. Elde edilen hücrelerden meme kanseri de MCF-7 hücre hattı kullanılarak D-vitamini'nin, tedaviye yanıt olarak miRNA ekspresyon profilleri incelenmiştir. Kontrol grubu hücreler ile D vitamin uygulamasını takiben; 2. saatteki miRNA değişikliklerinde anlamlı sonuç bulunamamıştır. 4. Saatteki miRNA değişiklikleri; miR-100-5p ve miR-10a-5p downregüle olurken miR-145-5p, miR-548c-3p ve miR-613 upregüle olmuştur. 6.saatteki miRNA değişiklikleri miR -125b-1-3p, miR -548c-3p, miR145-5p, 199a-3p, miR-199a-5p, miR-202-3p, miR-31-5p, miR-96-5p ve miR-485-5p upregüle olmuştur. 24.saatteki miRNA değişimi miR-96-5p upregüle olmuştur. 48.saatteki miRNA değişiklikleri miR-130b-3p, miR140-5p, miR-145-5p, miR-18a-5p, miR-20a-5p, miR21-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-7-5p, miR-203a ve miR-205-5p downregüle olmuştur.

miR-145-5p 4. ve 6. saatte upregüle olmuşken 48. saatte down regüle olmuştur. miR-96-5p 6.ve 24. saattlerde upregüle olmuştur. miR-548c-3p 4.saatte ve 6. saatte upregüle olmuştur Bu miRNA'ların meme kansernde rol aldığı saptanmıştır.

Tez çalışmamın verilerinden görüldüğü üzere D-vitamininin meme kanserinin tedavisinde olumlu etkisi olabileceği görülmektedir. D vitamin uygulaması ile elde edilen apoptoziste tümör supressor miRNA olarak değerlendirebileceğimiz, miR-548c-3p ve miR-96-5p artışı tezimizde elde ettiğimiz en çarpıcı bulgulardır. D vitamin etkisi ile gelişen apoptotik süreçte, miR-548c-3p artışının önemli rolü olduğunu düşünmekteyiz. Bu bulguların sonraki çalışmalara ışık tutacağı kanısındayım.

6. KAYNAKLAR

Aravin A A, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon G J. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. Science 2007; 316: 744–7. doi:10. 1126/science.1142612.

Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 5387-5391.

Aslan A, Temiz M, Yiğit Y, Can R, Canbolant E, Yiğit F. Hemşirelik Yüksek Okulu öğrencilerinin meme kanseri hakkında bilgi, tutum ve davranışları. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni.2007; 6(3): 193-198.

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

Beckman MJ, DeLuca HF. Regulation of renal vitamin D receptor is an important determinant of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) levels in vivo. Arch Biochem Biophys. 2002;401: 44-52.

Beer TM, Myrthue A. Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic. Mol Cancer Ther 2004;3(3):373–81.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 2001;409:363-366.

Bikle DD. What's new in vitamin-D: 2006-2007. Curr Opin Rheumatol 2007; 19: 383-388.

Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. Nature 2007; 447:799–816. doi:10. 1038/ nature05874.

Botos J, Barhoumi R, Burghardt R, Kochevar DT. Rb localization and phosphorylation kinetics correlate with the cellular phenotype of cultured breast adenocarcinoma cells In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2002 Apr;38(4):235-41.

Calin GA1, 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. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Aug 10;101(32):11755-60. Epub 2004 Jul 29.

Calin GA1, 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. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Aug 10;101(32):11755-60. Epub 2004 Jul 29.

Cui Y and Rohan TE. Vitamin D, Calcium and Breast Cancer Risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 2006; 15(18): 1427-37.

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

Diesing D, Cordes T, Fischer D, Diedrich K, Friedrich M. Vitamin D-metabolism in the human breast cancer cell line MCF-7. Anticancer Res. 2006 Jul-Aug;26(4A):2755-9.

Erson AE, Petty EM. MicroRNAs and in development and disease. Clin Genet 2008; 74:296-306. doi:10.1111/j.1399-0004.2008.01076.x.

Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet 2011; 18:12:861-74. doi:10.1038/nrg3074.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.Nat Rev Cancer.2006;6:259-269.

Faustino R. Pérez-López, Peter Chedraui and Javier Haya. Vitamin D Acquisition and BreastCancer Risk. ReproductiveSciences 2009; 16: 7-19.

Feldman D, Malloy PJ, Krishnan AV, Balint E. Vitamin D: biology action and clinical implications. In: Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ, editors. Osteoporosis, 3rd ed, vol. 1. San Diego: Elsevier; 2007.

Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB and Holick MF. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention American Journal of Public Health, 2006; 96(2): 252-61.

Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J. 2009. hsa-miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. EMBO Rep 10: 400–405.

Gehrke S, Imai Y, Sokol N, Lu B. Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. Nature 2010; 466: 637–41. doi:10.1038/nature09191.

Goss P, Wu M. Application of aromatase inhibitors in endocrine responsive breast cancers. Breast 2007;16(Suppl). 2S114–2S119.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. Cell 2005;123:631-640.

Hammond SM: MicroRNAs as oncogenes. Curr Opin Genet Dev 2006; 16: 4–9.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144:646-74.

He L, Hannon, G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet 2004; 5:522 31. doi:10.1038/nrg1379.

Heneghan HM1, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Kerin MJ. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. J Oncol. 2009;2009:950201. doi: 10.1155/2010/950201. Epub 2009 Jul 20.

Holick MF, Garabedian M. Vitamin D photobiology, metabolism, mechanism of action and clinical application. In: Favus MJ (ed). Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism (6th ed). Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2006: 106-114.

Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 2004; 80 (Suppl): 1678S-1688S.

Holick MF. Vitamin D and Sunlight: Strategies for Cancer Prevention and Other Health Benefits. Clin J Am Soc Nephrol, 2008;3:1548–54.

Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med. 2007;357: 266-2811.

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.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res 2005;65:7065–7070.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61(2):69–90.

Kiss-László Z, Henry Y, Bachellerie J P, Caizergues-Ferrer M, Kiss T. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. Cell 1996; 85, 1077–88.

Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. Cancer Sci 2010; 101: 2309-2315.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science 2001;294:853–858.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993; 75: 843–854.

Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature 2003; 425:415-419.

Lindsey. Who should treat rectal cancer and how? Colorectal Dis. 2012 Dec;14(12):1439-40. doi: 10.1111/codi.12070.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25, 4, 402-8.

Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005; 435:834–8. doi:10.1038/nature03702.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. Science 2004; 303:95-98.

Marchionetti AM, Picotto G, Narvaez CJ, Welsh J, Tolosa de Talamoni NG. Antiproliferative action of menadione and 1,25(OH)2D3 on breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 2009;113(3-5):227-32.

Matthews D, LaPorta E, Zinser GM, Narvaez CJ, Welsh J. Genomic vitamin D signaling in breast cancer: insights from animal models and human cells. J Steroid Biochem Mol Biol 2010;121(1–2):362–7.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ.2000;321:624-628.

Mercer T R, Dinger M E, Mattick J S. Long non-coding RNAs insight into functions. Nature Rev Genet 2009; 10, 155–9. doi:10.1038/ nrg2521.

Moorman G and Terry PD. Consumption of dairy products and the risk of breast cancer. Patricia Am J Clin Nutr 2004;80:5–14.

Nagasawa H, Keng P, Maki C, Yu Y, Little JB. Absence of a radiation-induced first-cycle G1-S arrest in p53+ human tumor cells synchronized by mitotic selection. Cancer Res. 1998 May 1;58(9):2036-41.

Nieves-Neira W1, Pommier Y. 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. Int J Cancer. 1999 Jul 30;82(3):396-404.

O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. Breast Cancer Res. 2010;12(2):201.

Özmen V, Fidaner C, Aksaz E, Bayol Ü, Dede İ, Göker E, Güllüoğlu BM, Işıkdoğan A, Topal U, Uhri M. Türkiye'de meme kanseri erken tanı ve tarama programlarının hazırlanması-Sağlık Bakanlığı meme kanseri erken tanı ve tarama alt kurulu raporu. Meme SağlığıDergisi. 2009; 5(3):125-134.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature 2000;408(6808):86–89.

Pe´rez-Lo´pez FR. Sunlight, the vitamin D endocrine system, and their relationships with gynaecologic cancer. Maturitas. 2008; 59:101-113.

Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms fora tiny RNA? RNA 2005;11:1753–1761.

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

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature 2000;403, 901–906.

Riemsma R, Forbes CA, Kessels A, Lykopoulos K, Amonkar MM, Rea DW, et al. Systematic review of inhibitors in the first-line treatment for hormone sensitive advanced or metastatic breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2010;123(1):9–24.

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. Oncotarget. The induction of the p53 tumor suppressor protein bridges the apoptotic and autophagic signaling pathways to regulate cell death in prostate cancer cells. 2014 Nov 15;5(21):10678-91.

Ruddon RW. Introduction to the molecular biology of cancer: translation to the clinic Prog Mol Biol Transl Sci. 2010;95:1-8. doi: 10.1016/B978-0-12-385071-3.00001-0.

Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. Science 2001; 294: 797–799.

Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? Cancer Metastasis Rev. 2009;28:369–378.

Shi Y, Qiu M, Wu Y, Hai L. MiR-548-3p functions as an anti-oncogenic regulator in breast cancer. Biomed Pharmacother 2015;75: 111-6.

Somunoğlu S. Meme kanseri: belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi. 2009; 4(10): 103-122.

Soule HD, Vazguez J, Long A, Albert S, Brennan M.A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast CarcinomaJ Natl Cancer Inst. 1973 Nov;51(5):1409-16.

Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S. microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. Annu Rev Biomed Eng 2010;12:1-27.

Sutherhland RL, Watts C K, Lee CSL, Musgrove EA. Breast cancer. In: Masters JRW, Palsson B. Human cell culture, 1999; II: Cancer cell lines. Part 2. Kluwer Academic Publishers, Boston: 79–106.

Taft R J. Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals. Nature Genet 2009; 41:572–8. doi:10.1038/ng.312.

Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. Gene Sep, 2004;338(2):143-56.

Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szasz AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 2009;137:1032-1046.

Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. Cell 2009; 136:669–87. doi:10.1016/j.cell.2009.01.046.

Yu Z, Baserga R, Chen L, Wang C, Lisanti MP, Pestell RG. microRNA, cell cycle, and human breast cancer. Am J Pathol. 2010;176(3):1058-64.

Zhang B, Pan X, Cobb GP et al: MicroRNAs as ongogenes and tumor suppressors. Dev Biol 2006; 289: 3–16.

Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. EMBO J 2002; 21:5875-5885.

Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, Coppola D, Cheng JQ. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. J Biol Chem 2008;283:31079–31086.

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Balıkesir' de doğdu. İlk ve orta tahsilini Balıkesir' de yaptı. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2012 Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yılında yüksek lisans eğitimine başladı.