T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MCF 7 Meme Kanseri Hücrelerindeki Mikro RNA Üzerinde TGF-β Etkisi

Abdurrahman Süha CENGİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

KONYA-2017

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MCF 7 Meme Kanseri Hücrelerindeki Mikro RNA Üzerinde TGF-β Etkisi

Abdurrahman Süha CENGİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 15202010 Proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2017

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Abdurrahman Süha CENGİZ tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ali ÜNLÜ Selçuk Üniversitesi	İmza
Danışman:	Prof. Dr. Ali ÜNLÜ Selçuk Üniversitesi	İmza
Üye:	Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK Selçuk Üniversitesi	İmza
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Emine Nedime Korucu Necmettin Erbakan Üniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ..... tarih ……..sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

Enstitü Müdürü

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 ufkumu açan ve her zaman bana sonsuz sabır gösteren saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Ali ÜNLÜ' ye çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda derin bilgisi ile her konuda yardımcı olan Yük. Biyolog Ş.Buket Bozkurt'a teşekkür ederim.

Eğitimim esnasında bana her konuda yardımcı olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyesi hocalarıma, araştırma görevlilerine, yardımcı olan Yüksek Biyolog Aslı MERCAN, Yüksek Biyolog Yasemin KAHVECİ ve Yüksek Biyolog Özlem Şahin'e çok teşekkür ederim.

Son olarak, bu süreçte her zaman beni destekleyen başta sevgili eşim Merve CENGİZ olmak üzere tüm aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **i**

SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **iv**

TABLO DİZİNİ ..... **vii**

ŞEKİL DİZİNİ ..... **viii**

ÖZET ..... **ix**

SUMMARY ..... **x**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kanser 2

1.2. Meme Kanseri 3

1.2.1. Meme Kanserinin Moleküler Yapısı 4

1.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri 5

1.2.3. Klinikte Meme Kanseri 6

1.2.4. Meme Kanseri Tedavisi 6

1.3. TGF-β 7

1.3.1. Meme Kanseri ve TGF-β 10

1.4. miRNA 11

1.4.1. miRNA'ların Keşfedilmesi 12

1.4.2. miRNA'ların Biyogenezi 12

1.4.3. miRNA'ların İşlevleri 13

1.4.4. miRNA'nın Kanserle İlişkisi 14

2. GEREÇ VE YÖNTEM **16**

2.1. Gereçler 16

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar 16

2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar araçları 17

2.2. Metod 18

2.2.1. Hücre Kültürü 18

2.2.2. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı 18

2.2.3. RT-PCR Yöntemiyle Çalışma Yöntemi 19

3. BULGULAR 24

3.1. Real-Time PCR bulguları 24

4. TARTIŞMA 35

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 40

6. KAYNAKLAR 41

8. ÖZGEÇMİŞ 45

SİMGELER ve KISALTMALAR

Ago2	Argonat proteini 2
BC	Meme kanseri hücre hattı
CRISPR	Kısa tekrarlayan prokaryotik DNA parçacıkları
Cas9	Kısa tekrarlayan prokaryotik DNA parçacıkları
BSA	Bovin serum albumin
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDK1	Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
cDNA	Tamamlayacı deoksiribo nükleik asit
DGCR8	Mikro işlemci kompleks alt birimi
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle vasatı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ECa-109	Özofagus skuamöz hücreli karsinom hücre hattı
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
ESCC	Özofagal Skuamöz Hücreli Karsinoma
E2F	Transkripsiyon faktörü
FBS	Fetal bovin serum
GS	Glisin-Serin
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
IC_{50}	Hücrelerin %50'sinin çoğalmasını baskılayan doz
kDa	Kilodalton
K-RAS	Ras alt familyasına ait bir gen
KYSE-510	Kanser hücre hattı
LAP	Latent bağlayıcı protein

LCIS	İnvaziv olmayan lobüler karsinom
LTBP	Bağlama proteini
LTβ-B	Latent TGF- β
MALAT 1	Metastaz ilişkili akciğer adenokarsinomu
MCF-7	Meme kanseri hücre serisi
MDA	Meme kanseri hücre hattı
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	Mikro RNA
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ng	Nanogram
p15	Tümör baskılayıcı gen
p21	Tümör baskılayıcı gen
p53	Tümör baskılayıcı gen
P	Probability
piRNA	Protein ile etkileşimi olan RNA
pre-RNA	Prekürsör RNA
Pri-miRNA	Primer Mikro RNA
PBS	Fosfat tamponlu Tuz
PI3K	Fosfo inositid-3 kinaz
PTEN	Tümör baskılayıcı gen
PTPN9	Protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 9
RCC	Renal kanser karsinomu
Rb	Retinoblastoma
RISC	RNA kaynaklı susturma kompleksi
RNA	Ribo Nükleik Asit

RNAi	İnterferans RNA
ROCK1	Protein kinaz 1
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT-qPCR	Ters transkripsiyon-kantitatif polimerazyon zincir reaksiyonu
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü
TβR1	TGF- β tip 1 reseptörü
TβR2	TGF- β tip 2 reseptörü
TβR3	TGF- β tip 3 reseptörü
P53	Tümör protein 53
VEGF-A	Vasküler endotelyal büyüme faktörü A
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
β	Beta

TABLO DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada Kullanılan Mikro RNA Paneli 24

Çizelge 3.2 miRNA'ların Anlamlı Fold Regülation Değerleri 26

Çizelge 3.3 Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren miRNA'lar ($p<0,05$ değeri olarak anlamlı olan miRNA'lar.) 27

Çizelge 3.4 Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 2. , 4. ve 6. Saatlerdeki fold regülation ve p-value değerlerindeki miRNA değişiklikleri 28

Çizelge 3.5 Kontrol grubu hücreler ile TGF-β uygulamasını takiben 24. ve 48. Saatlerdeki Fold Regülation ve p-Value değerlerinde ki miRNA değişiklikleri 29

Çizelge 3.6 Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 2. Saatteki miRNA değişiklikleri. 30

Çizelge 3.7 Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 4. Saatteki miRNA değişiklikleri. 30

Çizelge 3.8 Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 6. Saatteki miRNA değişiklikleri. 31

Çizelge 3.9 Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 24. Saatteki miRNA değişiklikleri 32

Çizelge 3.10 Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 48. Saatteki miRNA değişiklikleri 33

Çizelge 3.11 Fold regülation, p-volue ve rawdata değerlerinden anlamlı çıkan miRNA' ların ortak reaksiyon verdiği saatler 34

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1. Tip I ve II TGF-β reseptör aileleri. (Massagué J, 2008)..... 9

Şekil 1.2. TGF- β'nın epitelyal-mezenkimal geçişi ve progenitör hücrenin kanser hücresine dönüşümündeki rolü. (Vural P. 2010)..... 10

Şekil 1.3. miRNA Biyogenezi (Tunalı N. E. ve Tiryakioğlu N. O. 2010) 13

Şekil 3.1 Heatmap tablosu 25

Şekil 4.1 P13-AKT sinyal yolağı……..39

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MCF 7 Meme Kanseri Hücrelerindeki Mikro RNA Üzerinde TGF-β Etkisi

Abdurrahman Süha CENGİZ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2017

TGF-β hücrenin proliferasyonu, diferansiasyonu, motilitesi, adhezyonu ve ölümü gibi birçok hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir. Bu fizyolojilerde oluşabilecek bozukluklar sonucunda aralarında kanser, osteoartrit, diabet gibi birçok hastalıkla da ilintili olduğu bilinmektedir. Bu çalışma, TGF-β'nın MCF7 insan meme kanseri hücresi miRNA'ları profilleri üzerine uygulamasının etkilerini incelemektedir.

Çalışmamızda, MCF-7 hücreleri TGF-β'nın farklı saatlerde (2, 4, 6, 24 ve 48) ile tek dozda (16 ng/ml) 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 23 tanesi farklı şekilde (fold regulation <2, fold regulation>2, $p<0.05$) eksprese edilmiştir.

Bu bulgular, MCF-7 hücrelerinin miRNA profillerine TGF-β'nın etkilerini vurgulamaktadır ve daha ileri çalışmalara yardımcı olabilir.

Anahtar Sözcükler: TGF- β; MCF-7; miRNA

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

TGF-β Effect on MicroRNA in MCF 7 Breast Cancer Cells

Abdurrahman Süha CENGİZ

Department of Medical Biochemistry

MASTER/ KONYA-2017

TGF-β has the ability to reverse many cell processes such as cell proliferation, differentiation, motility, adhesion, and death. As a result of the disorders that may occur in these physiologists, it is known that they are related to many diseases such as cancer, osteoarthritis and diabetes. This study examines the effects of TGF-β on the profiles of MCF7 human breast cancer cell miRNAs.

In our study, MCF-7 cells at different times of TGF-β (2, 4, 6, 24 and 48) with a single dose (16 ng/ml) 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-three of 84 miRNAs have been differentially expressed compared to control group (fold regulation <2, fold regulation>2, $p<0.05$).

Thesefindings highlight the effects TGF-β of to miRNA profiling of MCF7 cells and may be helpful for further studies.

Keywords: TGF- β; MCF-7; miRNA

1. GİRİŞ

Evrensel bir sorun olan ve her yıl milyonlarca insanın yaşamının sonlanmasına neden olan kanser, kalp hastalıklarından sonra ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Merey 2002, Nural 1995).

Dünya Sağlık Örgütü 2004 yılında 7,4 milyon ölümün kanser nedeniyle olduğunu ve eğer önlem alınmazsa bu sayının 2030 yılında 12 milyona ulaşacağını vurgulamaktadır. Tüm dünyada en sık ölüme neden olan kanserlerden ilk beşi sırasıyla akciğer, mide, kolon-rektum, karaciğer ve meme kanserleridir (www.who.int.).

Ülkemizde kanser insidansı Türkiye İstatistik Yıllığı 2009 Raporuna göre 2006 yılında erkeklerde yüz binde 256,4 kadınlarda ise yüz binde 158,1'dir. Ülkemizde görülen kanserlerin insidansı ve mortalitesi yaşa ve cinsiyete göre değişmektedir (www.who.int. 2010). İleri yaşta olmak, sigara, alkol, iyonize radyasyon, güneş ışınları, bazı kimyasallar, bazı hormonlar, yetersiz ve dengesiz beslenme, fiziksel aktivite eksikliği, şişmanlık kanser oluşumunda rolü olan bazı risk etmenleridir. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki kanser önlenebilen ve tedavi edilebilen bir hastalıktır. Kanserden ölümlerin %30'dan fazlası önlenebilmektedir (www.who.int. 2010). Ülkemizde 2014 istatistik verilerine göre en sık görülen kanser sırası ile akciğer, meme, troid ve kolorektal kanserler şeklindedir. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 2013 yılında ülkemizde yaklaşık 96.200 erkek ve 67.200 kadının kanser teşhisi aldığı tahmin edilmektedir. 2009-2013 arası yılların verileri değerlendirildiğinde; kanser sıklığında herhangi bir artış ya da azalış olmadığı söylenebilir (www.kanser.gov.tr).

Yetersiz ve dengesiz beslenen, yeterince fiziksel aktivite yapmayan, sedanter yaşayan ya da şişman olan bireylerde kanser riski artmaktadır. Fazla yağlı gıdalarla beslenme tarzı kolon, uterus, prostat kanserine yakalanma riskini artırmaktadır. Fiziksel aktivite yapmayan ve şişman olan bireylerde ise meme, kolon, özofagus, böbrek ve uterus kanseri riski artmaktadır. (www.cancer.gov)

Birçok hücre tarafından sentezlenen TGF-β hücre bölünmesi (proliferasyon), farklılaşması (diferansiasyon) , adhezyon, morfogenez, ekstraselüler matriks oluşumu ve programlı hücre ölümü gibi çeşitli hücresel süreçlerin kontrolünü sağlamaktadır. Bu büyüme faktörünün sinyalizasyon yolu birçok farklı yollar ile etkileşerek hücrenin homeostazını sağlamaktadır. (Siegel ve ark 2003, Ten ve Hill 2004)

Son yıllarda TGF-β ’nın kanser gelişimindeki rolünün araştırılması büyük bir hız kazanmıştır. İki yüzlü bir molekül olan TGF-β hem tümör supresör, hem de onkogen gibi davranabilmektedir. TGF-β epitelyal hücrelerin bölünmesini baskılayarak tümör supresif etkisini göstermektedir. Mamafih, tümör hücreleri bu büyüme faktörünün antitümoral etkisini bertaraf etmektedir. Tümoral dokularda TGF-β onkogenik özellikler sergileyerek kontrolsüz proliferasyon, metaplazi, displazi ve aplazi gelişmesi, invazyon ve metastaz gibi olayların gerçekleşmesine aracılık etmektedir. (Derynck 2001, Wakefield ve Romerts 2002)

MikroRNA’lar (miRNA’lar) küçük, protein kodlamayan RNA moleküleridir. Hedef genleri baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi süreçlerde rol oynarlar. İlk olarak bazı miRNA’ların bu süreçleri tek bir hedef geni baskılayarak düzenledikleri belirlenmiş olsa da zamanla birçok miRNA’ nın tek başına birden fazla hedef geni baskılayabildiği anlaşılmıştır. (Selbach ve ark 2008, Baek ve ark 2008)

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 bakış açıları geliştirmek önemlidir. Meme kanseri hiç belirti ve bulgu vermeden ilerleyebildiği gibi, belirtileri, gelişimi ve sonuçları her hastada 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 TGF-β’nın 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

Kanser, hücrelerde DNA’nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Günde vücudumuzda (DNA’da) yaklaşık 10.000 mutasyon olmasına rağmen bağışıklık sistemimiz her milisaniye vücudumuzu tarar ve kanserli hücreleri yok eder. Sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini

kullanırlar. Fakat bu yetenekleri de sınırlıdır. Sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre ne zaman ve nerede bölünebileceğini bilme yeteneğine sahiptir. Buna karşın, kanser hücreleri bu bilinci kaybeder, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Kanser hücreleri tümörleri oluştururlar, tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanserin bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz denir. Kanserler oluşmaya başladıkları organ ve mikroskop altındaki görünüşlerine göre sınıflandırılırlar. Farklı tipteki kanserler, farklı hızlarda büyürler, farklı yayılma biçimleri gösterirler ve farklı tedavilere cevap verirler. (Barry ve ark 2002)

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 ark 2011)

1.2. Meme Kanseri

Kadınlarda en sık rastlanan kanser, meme kanseridir. Tanı ve tedavide yeni gelişmelerin artmasına rağmen, günümüzde hala önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. (Işıkdoğan ve ark 2003)

WHO'nun raporuna göre her yıl dünyada 1.000.000 kadında meme kanseri gelişmekte ve bu hastalıktan 370.000 kadın ölmektedir. Dünyada meme kanseri görülme sıklığı yıllık ortalama %0,5 oranında artmaktadır. (Goldberg ve ark 2006)

Birçok ülkede meme kanseri sıklığının, insan başına tüketilen yağ, şeker ve protein miktarlarına uygunluk gösterdiği saptanmıştır (Arsan 1999).

Meme kanseri şişmanlarda, normal kilolulardan daha fazla oranda görülmektedir. Şişman kadınlar tarafından üretilen aşırı östrojenin, meme epitel hücrelerinin gelişimini arttırdığı öne sürülmektedir.(Cris ve Baysal 1999)

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)

1.2.1. Meme Kanserinin Moleküler Yapısı

Kanser genetik bir hastalıktır. Kanser gelişimi ile ilgili değişik teoriler olmakla birlikte hücreler karsinogenez sürecinde genetik değişikliklerin ve çevresel faktörlerin etkisiyle çok basamaklı bir süreç içinde bazı temel özellikler kazanır. Kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için tümör hücrelerinde mutlaka bulunması gereken özellikler başlıca otonomi (bağımsız çoğalabilme), kontrolsüz çoğalma (kontak inhibisyon kaybı), apoptozisin baskılanması, anjiyogenez, ölümsüzlük, invazyon ve metastaz yeteneğidir. Bu özelliklere sahip olan hücrelerin çoğalması ile kanser hastalığı ortaya çıkar. (Akbulut ve Akbulut 2005)

Meme kanseri, genetik olarak hem locus hem de allel içeriğine göre yüksek derecede heterojendir. Şimdiye kadar ailesel meme kanseri vakalarının kabaca %50si herhangi bir bilinen kanser geni ile açıklanamamıştır. Bu tip bir heterojenite "yaygın hastalık, multiple nadir allel" ("common disease, multiple rare alleles") modeli olarak tanımlanmıştır.(Calin ve ark 2004)

Tüm meme kanseri vakalarının %70-80'ini oluşturan sporadik meme kanseri için risk faktörlerinin çoğu östrojen seviyesindeki artışla ya da östrojene uzun süre maruz kalma ile ilişkilidir (Berardo ve ark 1998).

Sporadik kanserlerle yapılan çalışmalarda en çok üzerinde durulan nokta kanser oluşumunda eksojen ve endojen karsinojenler ve bunların sebep olduğu genetik değişikliklerdir. Kanser gelişimine katkıda bulunan bir diğer özellik ise düşük penetranslı genlerdeki polimorfizmler ve mutasyonlara bağlı olarak oluşan genetik değişikliklerdir. (Mitrunen ve Hirvonen 2003)

Meme gelişiminde yer alan birçok sayıda hormon vardır. Östrojen, progesteron, adrenal kortikoidler, prolaktin, insülin, tiroksin ve büyüme hormonu meme gelişiminde koordinasyona sahiptir (McCarthy ve ark 1990).

1.2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserinin hangi nedenlerle ortaya çıktığı net olarak bilinmemekle beraber, yapılan araştırmalara göre bazı kriterlere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Campell 2002).

Meme kanserinin halen yeni bilgilerin ortaya çıktığı ve gelişmelerin yaşandığı oldukça geniş bir alan olduğu ifade edilmektedir. Bununla birlikte meme kanserinin hangi nedene bağlı olarak ortaya çıktığı tam olarak bilinmemekte, tüm dünyada yapılan araştırmalar sonucunda bazı özelliklere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmekte ve bu özelliklere de kısaca "risk faktörü" adı verilmektedir (Campell 2002).

Birçok risk faktörü ile ilişkili olan meme kanserinin, risk faktörlerinin azalmasına ve artmasına göre, görülme sıklığı da farklılık göstermektedir.(Kelsey ve Gammon 1991)

Kadınlarda meme kanseri görülme riskini yükselten faktörler şöyledir;

- Şişmanlık ve yağlı beslenme
- Alkol kullanımı
- Sigara kullanımı
- Şişmanlık
- Yağlı beslenme
- Doğum kontrol hapı kullanılması
- Östrojen alınması
- Yaş
- Cins
- Irk
- Fertil çağ süresi
- Kişisel meme kanseri hikayesi
- Ailede meme kanseri hikayesi
- Sosyo-ekonomik seviye
- Doğurganlık hikayesi
- Daha önce meme biyopsisi yapılmış olması

1.2.3. Klinikte Meme Kanseri

Meme kanserli kadınların %70 kadarında ilk bulgu memede bir kitlenin varlığıdır. Kanser nedeni ile oluşan kitlelerin büyük çoğunluğu (%45) üst –dış kadrandadır. Bunu % 25 ile santral kadran takip eder, üst iç kadranda %15, alt dıs kadranda %10, alt iç kadranda % 5'tir. Bu dağılım meme kadranlarının içerdiği meme dokusu ile paralellik gösterir. Meme dokusunun koltukaltı uzantısında da (aksiller kuyruk) kansere rastlanır. Klinik ve laboratuvar kontrollerde bu bölge de göz önüne alınmalıdır (Akın 2008).

Memedeki kitlenin ele gelmesi, bunun deriye yakın ya da derinde oluşuna ve memenin büyüklüğüne bağlı olmakla beraber genelde 1 santimetre boyuta ulaşmasını gerektirir. Tümör Cooper bağlarını infiltre etmiş ise deri retraksiyonuna yol açar. Tümör lenf akımını yavaşlattığında ise meme derisinde portakal kabuğu görünümü kazandırır. Lenfatikleri daha fazla tıkaması sonucu derinin beslenmesi bozulur, önce eritem oluşur ve zamanla beslenmesi daha da bozulan deride ülserasyonlar başlar. Memenin santral kadranındaki tümörlerde meme başı tümörün bulunduğu kadrana doğru çekilebilir. Meme kanserli kadınların yaklaşık % 10'unda ilk bulgu meme başında akıntı olmasıdır. Meme kanserli hastaların % 2-4'ü memede inflamasyon veya enfeksiyon bulguları, %2 'si ise meme başı ve areolada ekzematiform bir lezyon ve erozyon, ileri dönemde ülserasyon bulguları ile klinik gösterir.(Topuz ve ark 2003)

1.2.4. Meme Kanseri Tedavisi

Son yıllarda meme kanserindeki artışla beraber tedavi olanakları genişlemiş ve artmıştır. Kanserin tespit edildiği evreyle beraber farklı tedavi yöntemler uygulanabilmektedir.

Cerrahi Operasyon: Meme kanseri tanısı alan hastaların çoğuna cerrahi operasyon uygulanmaktadır. Operasyon; kemoterapi, hormonal tedavi, veya radyoterapi gibi tedavilerle birlikte uygulanabilir. Operasyon memedeki kanserden başka koltukaltı lenf bezlerinin de alınarak (aksiller diseksiyon) kanser yayılımının belirlenmesini sağlar**.**

En çok kullanılan cerrahi operasyon tipleri şunlardır;

Lumpektomi, Parsiyel mastektomi, Total mastektomi, Modifiye radikal mastektomi, Radikal mastektomi, Aksiller diseksiyon, Sentinel lenf nodu biyopsisi, Rekontrüktif cerrahidir.

Kemoterapi: Kanser hücrelerinin öldürülmesi için ilaçların kullanılmasıdır. İlaçlar genellikle, intravenöz veya oral uygulanmaktadır. İlk tedaviden sonra veya tanı anında yaygın hastalığı bulunanlarda uygulanmaktadır.

Kemoterapi cerrahi tedaviden sonra verilirse 'adjuvan kemoterapi' olarak isimlendirilir. Burada amaç vücuda yayılmış olması muhtemel kanser hücrelerinin ortadan kaldırılarak hastalığın tekrarlama riskinin azaltılmasıdır.

Kemoterapi cerrahi girişimden önce verilirse 'neoadjuvan kemoterapi' olarak isimlendirilir. Buradaki amaç kanser kitlesinin küçültülerek cerrahi girişimin kolaylaştırılmasıdır.

Radyoterapi: Kanser hücrelerini öldürmek için yüksek enerjili ışınların kullanılmasıdır. Cerrahi öncesinde tümörü küçültmek için kullanılabilir. Meme kanseri tedavisinde genellikle eksternal radyoterapi uygulanmaktadır.

Hormon tedavisi: Dişilik hormonu östrojen bazı kadınlarda meme kanseri hücrelerinin büyümesini arttırabilir. Östrojen etkilerini önleyen ilaçlar meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle biyopsi raporlarında östrojen ve progesteron reseptör pozitif olan hastalar hormon tedavisinden ciddi derecede fayda görmekte ve pseudoöstrojenik etkinliği olan tamoksifen hastalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Biyolojik tedavi: Metastatik meme kanseri olan bazı kadınlar hedefe yönelik tedavi görürler. Hastaların yaklaşık %10 kadarında direk ya da uzun süre tamoksifen tedavisi görmüş hastalarda zamanla gelişen direnç ile trozin kinaz aktivitesi artmaktadır. EGFR ailesinden olan HER2 proteinin bu tip hastalarda aşırı ekspresyonu sebebiyle meme tümörüne sahip kadınlarda uygulanan bir tedavidir. HER2'ye karşı geliştirilmiş olan monoklonal antikor (trastuzumab v.b.) HER2'yi bloke ederek, kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlatabilir ya da durdurabilir.

1.3. TGF-β

Transforme edici büyüme faktörü (TGF-β) yapısında bir disülfit köprüsü bulunan 25 kDa'luk bir homodimerdir. TGF-β ,hücrede inaktif pro-peptid şeklinde sentezlenir. LTB-β (latent TGFβ-bağlayan proteinler)ile kompleks oluşturarak latent TGF-β formunda salgılanır. Pro-peptidin N-terminalinde LAP olarak adlandırılan bir dizi bulunur.

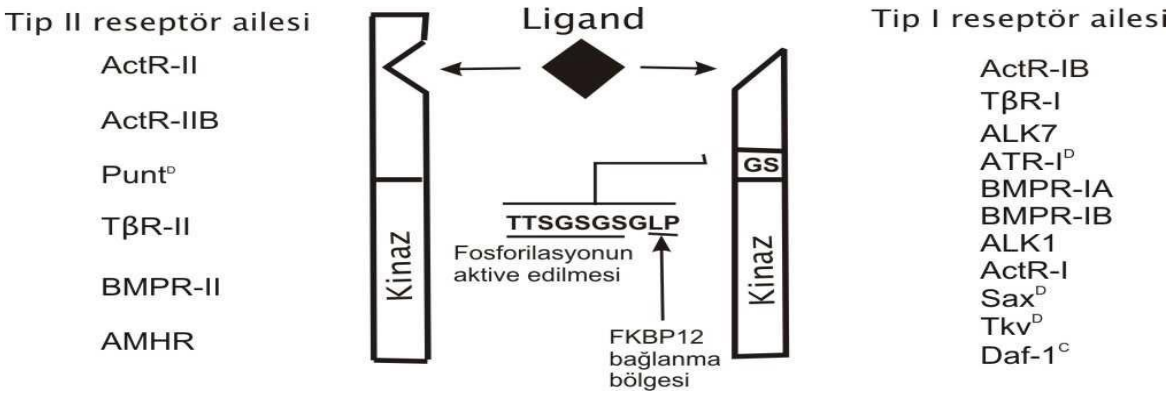
Latent TGF-β'nın yapısından LTBP ve LAP proteinlerinin serin proteazlar aracılığı ile uzaklaştırılması sonucu aktif TGF- β oluşur. (Wakefield ve Romerts 2002, Annes ve ark 2003)

TGF-β ailesi gelisimi çok yönlü kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubudur. Organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynayan TGF-β ailesi, yapısal olarak ilişkili çok sayıda polipeptid büyüme faktörleri içerir, bunların her biri hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir. (Massague 1998)

Kollajen sentezinin en güçlü uyarıcısı olarak bilinen TGF-β, yara kontraksiyonu ve matriksi organize edebilme özelliği nedeni ile de doku tamiri sonrası yeniden şekillenme fazında görev almaktadır. (Lawrence ve Diagelmann 1994)

TGF-β bilinen en güçlü immün-supresif moleküllerden biridir. TGF-β immün sistemin efektör T (Th1 ve Th2) ve sitostatik T hücrelerini baskılayarak, düzenleyici T-reg hücrelerini ise aktifleyerek immün ve inflamatuar cevabı baskılamaktır. (Li ve ark 2006)

Bir kaskad şeklinde ilerleyen TGF-β sinyalizasyon yolunun aktivasyonu ligandın reseptörlerine bağlanması ile başlatılır. Hücre membranında TGF- β tip I (TβRI) ve TGF β tip II (TβRII) olmak üzere iki tip reseptör bulunur. Endoglin ve betaglican olarak da adlandırılan TGF-β tip III reseptörleri (TβRIII) TGF-β 'nin ilk iki tip reseptörlerine bağlanmasını kolaylaştırır. TGF- β tip II reseptörün membran dışı bölgesine, sonra da tip I reseptörüne bağlanır. Oluşan ligand/reseptör kompleksi ikişer TβRI ve TβRII içeren bir heterotetramerdir. TβRI ve TβRII reseptörleri serin/treonin kinaz özelliğine sahiptir. TGF-β'nın tip II reseptörüne bağlanması, bu reseptörün kinaz aktivitesinin ortaya çıkmasını ve tip I reseptörün yapısında bulunan GS (glisin, serin) bölgesinin fosforilasyonunu sağlamaktadır. Bu şekilde aktiflenmiş TβRI sitozolde bulunan Smad proteinleri fosforiller. (Shi ve ark 2003)



Şekil 1.1. Tip I ve II TGF-β reseptör aileleri. (Massagué J, 2008).

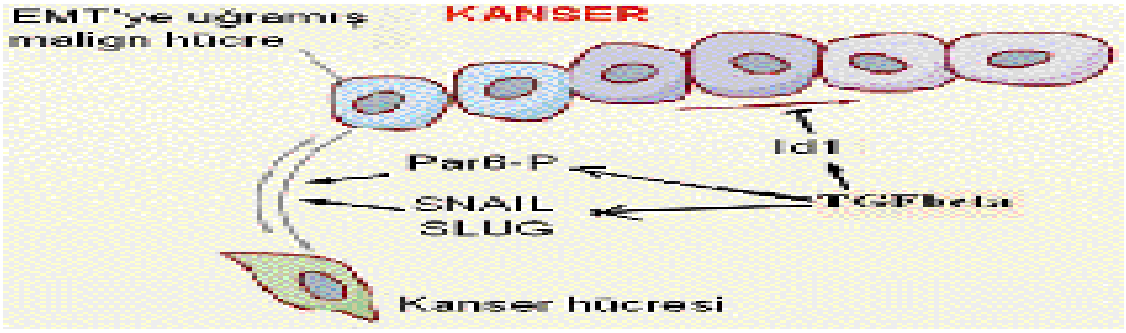
TGF-β sinyal iletim yolundaki değişiklikler insanlarda görülen birçok hastalıkta bildirilmiştir. Büyüme inhibitörü yanıtlarının TGF-β'ya iletiminin eksikliği kanser hücrelerinde sıklıkla görülen bir durumdur ve TGF-β aktivitesinin artısı akciğer, böbrek, karaciğer ve diğer organlarda dokular arasındaki matriks materyalinin aşırı bir şekilde artışı ile karakterize fibrotik hastalıklarda merkezi bir rol oynar. (Fynan ve Reiss 1993, Border ve Ruoslahti 1992)

Hücrenin G1 evresinde durdurulması, terminal farklılaşmanın artısı veya hücre ölümü mekanizmalarının aktivasyonu gibi hücre proliferasyonunun negatif regülasyonun değişik formları TGF- β'nın hedef hücreler üzerindeki etkileridir. (Massague 2004)

TGF-β yolu sitoplazmik kolu elemanlarının genlerindeki mutasyonlar kolorektal, pankreas, over, mide ve baş/boyun bölgesi kanserlerine neden olur. Bununla birlikte, meme, prostat, glioma, melanom ve hematopoetik hücre kanserlerinde *TGF*- β yolun sitoplazmik kolu etkilenmezken, yolun nükleer kolunda bazı değişiklikler meydana gelir. Deney hayvanlarında p15 ve p21 genlerinin delesyonu deri squamoz hücreli ve bazal hücreli karsinomu, ayrıca gastrointestinal kanserlere de neden olduğu gösterilmiştir (Jen ve ark 1994, Krimperfort ve ark 2007).

TGF-β hem tümör supresör hem de tümör promoteri olarak paradoksal rol oynar TGF-β tümörün büyümesini inhibe ederken diğer taraftan tümör progresyonuna neden olur (Hill ve ark 2001).

TGF-β epitelyal hücrelerin bölünmesini baskılayarak tümör supresif etkisini göstermektedir. Tümoral dokularda ise kontrolsüz proliferasyon, metaplazi, EMT, invazyon ve metastaz gibi olayların gerçekleşmesine aracılık etmektedir (40).



Şekil 1.2. TGF- β'nın epitelyal-mezenkimal geçişi ve progenitör hücrenin kanser hücresine dönüşümündeki rolü. (Vural P. 2010)

Bazı tümörler ise TGF-β gibi immun yanıtları baskılayan moleküller üretebilirler ya da büyüme inhibisyonu yapan genlerin transkripsiyonunu regüle eder (Truty ve Urritia 2007).

TGF-β, normal epitelyal hücrelerde ve erken evre kanser gelişiminde antiproliferatif faktör gibi davranır. Normal hücrelerde *TGF*- β sinyal yolunun aktivasyonu hücre siklusunu G1 evresinde durdurur. Bu ise proliferasyon, diferensiyasyon artışı ve apoptozisi durdurur (Lawrence 2001).

Kanser gelişiminde ise TGF-β 'nın hücre siklusu üzerindeki kontrolü azalır ve kanser hücreleri ve fibroblast hücreleri prolifere olur. TGF-β apoptozisi indükler. İmmun hücreler, fibroblast hücreleri, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinde TGF-β artar. İmmun süpresyon, anjiojenez ve invazyon başlar.(Momi ve ark 2012)

1.3.1. Meme Kanseri ve TGF-β

TGF-β meme kanseri hücrelerinin invazyon ve proliferasyonunu düzenleyen güçlü bir düzenleyicidir. Araştırmalar TGF-β1 ile özellikle meme kanserinin kemik metastazı ile direkt ilişkisi olduğunu göstermektedir.

TGF-β1 düzeyinin artışı immunsupresyon, ekstraselüler matriks artışı anjiogenez stimülasyonu ile tümör progresyonuna yol açmaktadır. (Katz ve ark 2013)

1.4. miRNA

İnsanlarda yaklasık 706 adet miRNA (Yu ve ark 2010) tespit edilmiş olup genomun %30'unu kontrol etmektedir. Bununla beraber miRBase veritabanında farklı organizmalara ait yani, her biri farklı genomik organizasyona ve farklı biyogenetik mekanizmaya sahip, 5000'den fazla miRNA girişi yapılmıştır.

DNA'nın yapısının yarım asır önce keşfedilmesinden sonra klinik tıp bilimleri alanında ilerlemek adına moleküler biyolojinin daha iyi anlaşılması ve yorumlanması gerektiği ortaya çıkmıştır.

Araştırmalar geniş ölçüde DNA dizisinin çözümlenmesine ve DNA dizisi tarafından kodlanan proteinlerin belirlenmesine odaklanmıştır. İnsan genomunda yer alan DNA'nın büyük bir bölümü, RNA kodlamasına rağmen bu genomun çok küçük bir miktarı (yaklaşık olarak %1.5) fonksiyonel proteinlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar genomun geri kalan kısmının çok az önem içerdiği düşünülmekteydi. Fakat bu görüş, küçük RNA moleküllerinin keşfi ile ortadan kalkmış oldu. Bu grup içine giren mikro RNA'lar(miRNA'lar), RNA'ların protein kodlamayan(non-coding) dizileri olarak adlandırılmaktadır. (Wijnhoven ve ark 2010)

Araştırmacılar, mikroRNA'ların hücresel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev aldığını, bununla birlikte, hücrede miRNA seviyelerinin normal koşulların dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir. Böylece, mikroRNA'ların tümör gelişiminde onkogen veya tümör süpresörler olarak fonksiyon gösterdikleri ortaya çıkmış oldu. Dolayısıyla bu konuda bir çalışma bilgisinin kanserin erken teşhisi ve tedavisi için önemli olabileceği çok açıktır. (Wijnhoven ve ark 2010)

miRNA'lar hedef mRNA'daki komplementine göre ya hedef mRNA'ların 3'UTR bölgelerine bağlanarak translasyonel baskılama yaparlar ya da hedef mRNA'yı keserek gen ekspresyonunu azaltarak düzenleme işlevi görürler. (Zhang ve ark 2006)

miRNA'ların insan genlerinin %30'undan fazlasını düzenlediği tahmin edilmektedir ve bu oranın devam eden çalışmalardan anlaşılacağı üzerine artış göstermesi beklenmektedir. (Hwang ve ark 2006)

miRNA' ların büyük çoğunluğu (%61) protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde bulunmaktadır, ancak genler arası bölgelerde veya eksonlarda da bulunabilirler. miRNA genlerinin %50'sin den fazlası kanser ile ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde veya kırılgan bölgelerde bulunur. Bu durum miRNA' ların neoplazi patojenezinde önemli rolleri olduğuna işaret eder. (Calin ve ark 2004)

1.4.1. miRNA'ların Keşfedilmesi

miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan ve gen ifadesini post-transkripsiyonel olarak regüle eden kısa RNA'lardır. İlk defa *C.elegans*'ın gelişimini araştıran Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında tanımlanmıştır. İlk tanımlanan miRNA, lin-4'dür(Lee ve ark 1993,Obernosterer ve ark 2006) . Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda, *miRBase release* 20 veri tabanında kayıtlı 1872 öncül insan miRNA sekansı tanımlanmıştır. Tanımlanan bu miRNA'ların en çok 1.kromozomda (161) en az ise Y kromozomunda (2) bulunduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar, insan miRNA'larının %50 den fazlasının kanserle ilişkili genomik bölgelerde ve kırılma noktalarına yakın bölgelerde lokalize olduğunu saptamıştır. (Calin ve ark 2004)

1.4.2. miRNA'ların Biyogenezi

miRNA'ların biyolojik oluşum süreci, hücre çekirdeğinde başlayıp sitoplazmada son bulan bir dizi işlemler sonucunda meydana gelmektedir. (Kim ve ark 2009)

Hayvanlarda olgun miRNA'nın oluşumu 2 basamakta gerçekleşmektedir;

1) miRNA transkriptinin (pri-miRNA), 70 nükleotid uzunluğundaki prekürsöre (pre-miRNA) dönüşmesiyle

2) Pre-miRNA prekürsörünün 21-25 nükleotid uzunluğundaki olgun miRNA'yı oluşturması için kesilmesiyle oluşur. (Hwang ve ark 2006)

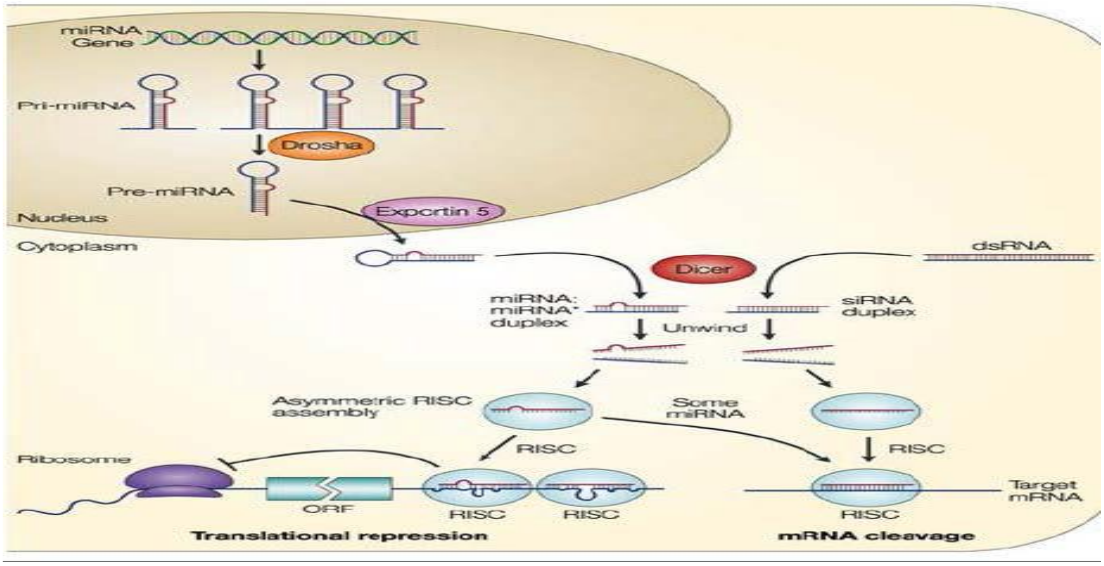
miRNA'ların sentezi miRNA genlerinden RNA polimeraz II (RNA pol II) enzimi aracılığıyla öncü miRNA (pri-miRNA) sentezlenmesiyle başlar. Saç tokası şeklinde oluşan pri-miRNA nükleusta bulunan bir RNaz olan Drosha ve RNA bağlanma noktası bulunan bir protein DGCR8/Pasha'dan oluşan mikroişlemci komplekse bağlanır ve 60 ile 70 nükleotidlik parçalar haline getirilerek pre-miRNA haline dönüştürülür. (Le ve Caldas 2010, Bartel 2004, Bohnsack 2004)

Nükleusta oluşan pre-miRNA.lar Exportin 5 adı verilen molekül aracılığıyla sitoplazmaya taşınır. (Garzon ve ark 2006)

Sitoplazmaya geçen pre-miRNA RNA-polimeraz III'ün bir türü olan dicer tarafından kesilerek 20-25 nükleotidlik olgun miRNA ve onun komplementeri miRNA' dan oluşan çift sarmal halini alır. (Grishok ve ark 2001,Hutvaner ve ark 2001)

Daha sonra miRNA ikilisi helikaz tarafından çözülerek olgun miRNA'ya dönüşür (Gregory ve ark 2007).

AGO2 adı verilen argonat proteini olgun miRNA'yı 5. ucundan seçer. AGO2, miRNA ve çeşitli proteinler, kısaca RISC olarak tanımlanan RNA ile uyarılmış susturma kompleksini oluştururlar. miRNA'yı içeren RISC kompleksi, mRNA'yı hedefleme yeteneğine sahiptir (Le ve Caldas 2010).



Şekil 1.3. miRNA Biyogenezi (Tunalı N. E. ve Tiryakioğlu N. O. 2010)

1.4.3. miRNA'ların İşlevleri

Hayvanlarda ve bitkilerde önemli düzenleyici işlevleri vardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların translasyonu baskılayarak ya da mRNA'yı keserek genlerin ekspresyonunu sağladıkları gösterilmiştir. Bunun yanı sıra bazı mRNA'ların hücre proliferasyonunda, gelişmesinde, farklılaşmasında, kök hücrenin yenilenmesinde, hücre stres yanıtlarında ve apoptozis gibi çok önemli olaylarda düzenleyici olarak işlev gördükleri

gözlenmiştir. Ayrıca bazı miRNA'ların onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak da işlev gördükleri saptanmıştır. (www.ambion.com)

1.4.4. miRNA'nın Kanserle İlişkisi

Hücrelerin anormal ve düzensiz çoğalmaları sonucu kanserin ortaya çıktığı baz alındığında hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi oluşumlarda rol oynadığı bilinen miRNA' nın kanser ilişkisi kaçınılmazdır.

Protein kodlayan onkogen ve/veya tümör supresör genlerdeki değişimlerin kansere neden olduğu bilinmektedir. Son yıllarda tümör oluşumunda miRNA'ların da etkili olduğunun gösterilmesi ile kanserin genetik nedenlerinin daha karmaşık olduğu bildirilmiştir (Calin ve Croce 2006).

Kanserle ilişkilendirilmiş genomik alanlar ya da frajil bölgelerin %50 sinden fazlasının miRNA'yı kodlayan genlerden oluşması miRNA'ların kanser patojenezinde önemli olduğunu ortaya koymuştur (Calin ve ark 2004).

Çeşitli kanser vakalarında, ekspresyonları artan miRNA'lar onkogen miRNA olarak adlandırılmaktadır. Onkomir olarak tanımlanan miRNA'lar tümör baskılayıcı genleri ya da hücre farklılaşmasını kontrol eden genleri etkileyerek tümör gelişimine neden olabilirler (Wiemer 2007). Tümör baskılayıcı miRNA'lar ise tümör oluşumunu, onkogenleri baskılayarak engeller.

Meme kanserindeki miRNA ekspresyon çalışmaları, hastalık taksonomisi ve prognostik araç geliştirilmesi açısından miRNA'ların önemini ve potansiyel kullanım alanını ortaya koymuştur. Hücre döngüsü, proliferasyonu ve tümörigenezin miRNA'lar tarafından kontrol edildiği gösterilmiş ve hücre döngüsünü kontrol eden siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK), siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI), 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, CDK'lar ve CDKI'larla etkileşime girerek hücre bölünmesi ve siklus ilerleyişini kontrol ederler (Yu ve ark 2010). Bununla birlikte meme kanserinde eksprese olan miRNA'lardan bazılarının tümör supresörler olarak görev yaparken diğer bazılarının onkogenik özellik gösterdiği yapılan profilleme çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır.

Dolayısıyla tümör oluşumu ya tümör supresör miRNA'ların redüksiyonu veya delesyonuyla ya da onkogenik miRNA'ların amplifikasyonu veya over-ekspresyonuyla gerçekleşebilir. Ayrıca tümör metastazı ise prometastatik miRNA'ların artmış ekspresyonuyla ve/veya anti-metastatik miRNA'ların down regülasyonuyla gerçekleşebilmektedir (O'Day ve Lala 2010).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- Transforming Growth Factor-Beta 1 , human recombinant (hTGF-β1) 1 µg, Sigma
- 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_2C0_3: Sigma-Aldrich S7795
- $CuS0_4.5\ H_20$: Merck A897690 739
- Folinciocalteu's fenol: Merck HC140610
- Cell Lysis Buffer Solution: Merck MSP010065
- NaOH: Sigma-Aldrich S8045
- BSA (Bovin Serum Albumin): Sigma-Aldrich A2153
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) : Biological Industries Kibutz Haemek Israel Cat No: 01-lA
- Penisilin-Streptomisin: Penicillin-Streptomycin Solution 10,000 units/ml Penicil (BIO-IND,BI03-031-1C)
- Glutamin-L-glutamin Solution, 29.2mg/ml in Saline (200 mmol) (BIO-IND,BI030201B)
- Fetal Bovin Serum (FBS): Foetal Bovine Serum (FBS) European Grade Heat Inactivated (BIO-IND,BI04-127-1B)
- Phosphate Buffered Saline (PBS): Biological Industries Kibutz Haemek Israel Cat No:02-La

- Tripsin-EDTA: Trypsin EDTA, Solution C (0.05%) EDTA (0.02%), with Phenol (BIO-IND,BI03-053-lB)
- Roche High Pure miRNA Isolation Kit (RocheDiagnostics, 05080576001) miScript II RT Kit (Qiagen)
- Exonuclease Kit (New England Biolabs, #MO293L)

2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar araçları

- C02 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 cm2, 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 içeren solüsyonla karıştırılması ve 1,5 ml'lik kriyo tüplere alınarak, -20°C'de 1 gece bekletildikten sonra -80°C'de ve sonra sıvı azot tankına saklanmasıyla 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 besiyeriyle 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, olup Thoma lamının alt ve üst bölümlerinde bulunan 16 küçük karede hücre sayımı yapılmış ve ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

2.2.2. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı

MCF-7, 69 yaşında bir Kafkas kadınının göğüs dokusundan 1970 yılında izole edilen bir hücre dizisidir. Alınan iki mastektomiden ilk çıkan doku, benign olarak çıkarılan dokuyu buldu. Beş yıl sonra, ikinci bir ameliyattan, MCF-7 için alınan hücrelerden plevral efüzyonda malign adenokarsinom saptandı. MCF-7 hücreleri, in vitro meme kanseri çalışmaları için faydalı bir hücre hattıdır, çünkü hücre dizisi, meme epiteline özgü birçok özelliğe sahiptir ve in vitro çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlar, MCF-7 hücrelerinin hücre sitoplazmasında östrojen reseptörleri vasıtasıyla estradiol formunda östrojen işleme kabiliyetinin içerir. Bu MCF-7 hücre hattını bir östrojen reseptörü pozitif kontrol hücre dizisi haline getirir (www.mcf7.com).

TGF-β Uygulaması:

TGF-β, 1000 ng/ml olacak şekilde distile suda çözüldü, 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilerek -80˚C'de saklandı. Diğer dozlar hazırlamış olduğumuz bu TGF-β'dan dilüsyon yapılarak hazırlandı.

Kültüre edilen hücreler deney için 16 kuyulu e-platelere önce 100'er µl DMEM koyuldu, ardından hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 10.000 hücre olacak şekilde hücre eklendi. MCF-7 hücreleri, daha önceden tespit edilen IC50 dozu olan 16 ng/ml dozunda belirlenmiş olan TGF-β ile 24 ve 48 saat saat muamele edildi.

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), Bindingbuffer, Binding Enhancer, Washbuffer, Elutionbuffer, Filtreli tüpler, Collection tüpler vardır.

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 içeriğinde 5X miScript HiSpec Buffer, 10X miScript Nucleics Mix, miScript Reverse Transcriptase Mix bulunmaktadır. Kullanılmadan önce bütün solüsyonlar ve RNA örnekleri buz üzerinde tutularak erimeye bırakıldı. cDNA sentezinde 95 örnek için ölü hacimler hesaplanarak aşağıdaki cDNA karışımı hazırlandı.

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

Karışım 16 kanallı otomatik pipet aracılığıyla 96 kuyuluk piko plağa her kuyuda 3,5 µl olacak şekilde bölündü. 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.

5X miScript PreAmp Buffer	230 µl
HotStartTaq DNA Polymerase	92 µl
Primer Pool	230 µl
DNase, RNase İçermeyen su	322 µl
miScript PreAmp Universal Primer	46 µl
TOPLAM	920 µl

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

95°C'de 15 dakika	
94°C'de 30 saniye	12 döngü
60°C'de 3 dakika 4°C	∞

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

Eksonükleaz Aşaması: Preamplifikasyon ürünlerinin primer dimerlerinden ayrıştırılması 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 hesaba katılarak 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.

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

Hazırlanan karışım 96'lık assay plağının tüm kuyularına, 8 kanallı otomatik pipetler yardımı ile her kuyuda 6,0 µl olacak şekilde dağıtıldı. Primer plağı film ile kapatıldı. Plak karıştırıcı üzerinde el ile bastırılarak 10 saniye vortekslendi, 4-5 saniye ara verilerek bu işlem 3 kez tekrarlandı ve plak santrifüjünde 2 dakika santrifüj edildi.

Örneklerin Hazırlanması:

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

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

Hazırlanan karışım 16 kanallı otomatik pipet yardımı ile 96 kuyuluk piko plak'a her kuyuda 4,0 µl olacak şekilde dağıtıldı. Karışımın üzerine dilüe edilmiş olan preamplifiye cDNA örneklerinden 2,0 µl eklenerek final hacmi 6,0 µl olarak ayarlandı. Plak film ile kapatıldı, 3000 rpm'de 3 dakika plak karıştırıcıda karıştırıldı, kısaca plak santrifüjünde santrifüj edildi. Hazırlanan primer ve örnek plakları PRIME işlemi tamamlanan chipin örnek ve assay kuyularına pipetlendi ve chip IFC controller cihazına tekrar yüklenerek LOAD işlemine alındı. Bu aşamanında tamamlanması ile cihazdan alınan chip Biomark RT-PCR cihazına yüklenerek aşağıdaki termal programa alındı.

50°C'de 2 dakika
70°C'de 30 dakika
25°C'de 10 dakika
95°C'de 10 dakika
94°C'de 15 saniye
55°C'de 30 saniye
70°C'de 30 saniye
} 24 döngü
60°C- 95°C Melting curve

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

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.

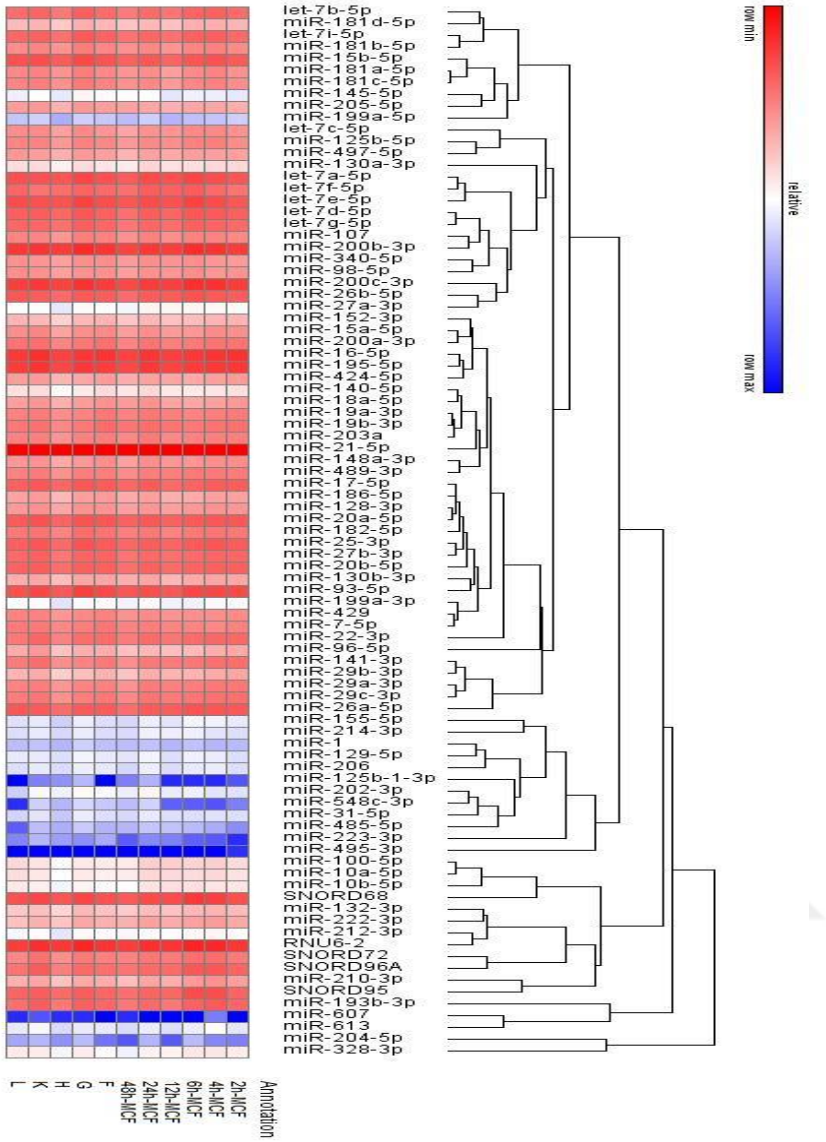
3. BULGULAR

3.1. Real-Time PCR bulguları

Ekspre ettiğimiz 84 miRNA Çizelge 3.1' de özetlenmiş ve bir tür veya organizmanın her bir hücresi için her zaman sabit düzeylerde eksprese edilmiş olan Housekeeping gen çalışmamızda içerisinden uygun olan SNORD61 seçildi.

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Mikro RNA Paneli

Position	**Mature ID**				
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



Şekil 3.1. Heatmap tablosu

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)

Çalışmamızda TGF- β uygulama tek doz (16 ng/ml) ve 5 farklı saat olarak uygulandı. Çalışmamıza dahil ettiğimiz 84 miRNA çeşidinden sadece 30 tanesinin deregüle olduğu gözlenmiştir. TGF-β uygulaması ile oluşan miRNA fold değerleri çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Çizelgede mavi renklendirdiğimiz seviyeler azalan düzeyleri kırmızı renklendirdiğimiz seviyeler ise artan düzeyleri ifade eder. 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 Anlamlı 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	let-7f-5p	1,40	1,36	1,24	-3,16	-1,20
2	miR-1	1,36	3,61	3,08	-1,30	-1,59
3	miR-100-5p	-1,29	-1,94	-1,25	-2,71	1,04
4	miR-10a-5p	-1,19	-1,46	1,04	-2,28	1,04
5	miR-125b-1-3p	1,55	286,14	193,6	-7,91	-161,6
6	miR-129-5p	1,89	1,89	2,24	-1,84	-1,35
7	miR-145-5p	1,95	3,69	3,30	-1,25	-2,97
8	miR-17-5p	-1,16	1,28	2,03	-1,30	-1,34
9	miR-181a-5p	1,32	1,50	2,11	1,10	-1,09
10	miR-181c-5p	1,34	1,58	2,02	1,10	-1,05
11	miR-18a-5p	-1,10	1,30	2,30	-1,40	-2,05
12	miR-199a-3p	1,28	1,43	2,40	-1,14	-1,08
13	miR-199a-5p	-1,05	2,08	2,43	-1,27	-1,17
14	miR-202-3p	3,15	4,46	4,37	-2,05	-5,58
15	miR-204-5p	6,35	9,70	1,18	-1,19	12,08
16	miR-206	1,47	1,46	2,57	-1,44	-1,26
17	miR-210-3p	-1,83	-2,09	-1,34	-1,47	-1,01
18	miR-222-3p	1,52	-1,34	-1,10	-2,36	-3,09
19	miR-223-3p	318,7	11,35	46,06	4,53	2,66
20	miR-27a-3p	-1,11	1,22	1,25	-2,13	-1,04
21	miR-31-5p	1,25	2,16	1,99	-1,56	-2,01
22	miR-424-5p	-1,35	-1,07	2,11	-1,07	1,08
23	miR-429	1,13	1,51	2,13	-1,00	-1,03
24	miR-485-5p	16,89	4,25	3,00	-1,78	-47,4
25	miR-495-3p	-1,09	1,80	7,83	-1,11	-1,70
26	miR-548c-3p	43,65	180,73	120,6	-1,31	-368,3
27	miR-607	121,5	-10,65	31,50	17,20	-1,80
28	miR-613	1,24	-1,56	2,15	1,16	1,00
29	miR-7-5p	1,18	1,70	2,49	-1,19	-1,27
30	miR-96-5p	-1,14	1,07	2,43	2,21	1,32

İstatistikte modern p değerinin kullanımı 1920'lerde Ronald Fisher tarafından popularize edilmiştir. Fisher kesin bir kural olmasa da, test edilen hipoteze karşı standart bir sonuç oluşturması için $p<0.05$ (%5 anlamlılık) olması gerektiğini savunmuştur. (Fisher 1925)

Bizde çalışmamızda p değerini anlamlılığı olarak 0,05 küçük olan değerleri kullandık. MCF-7 hücrelerine TGF- β uygulaması ile elde edilen miRNA artış ve azalışları

kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı çıkan, deregüle 27 miRNA p değerleri Çizelge 3.3'te verilmiştir

Çizelge 3.3. Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren miRNA'lar (p<0,05 değeri olarak anlamlı olan miRNA'lar.)

Sıra	miRNA	2.SAAT P-Değeri	4.SAAT P-Değeri	6.SAAT P-Değeri	24.SAAT P-Değeri	48.SAAT P-Değeri
1	let-7f-5p	78,56	961,58	25,34	0,39	44,54
2	miR-1	196,92	2,68	3,59	307,15	118,53
3	miR-100-5p	173,49	16,02	212,82	9,73	871,09
4	miR-10a-5p	122,08	91,10	724,56	8,66	628,21
5	miR-125b-1-3p	392,2	0,05	36,13	169,10	24,26
6	miR-129-5p	1,05	3,29	0,12	8,99	169,07
7	miR-145-5p	7,63	0,10	0,08	18,74	16,06
8	miR-17-5p	424,92	15,07	0,22	138,19	52,77
9	miR-181a-5p	27,81	27,04	0,05	190,63	303,96
10	miR-181c-5p	24,58	0,62	0,01	153,85	473,96
11	miR-18a-5p	945,11	17,72	0,01	111,56	16,93
12	miR-199a-3p	137,48	138,29	0,003	108,19	254,56
13	miR-199a-5p	790,27	6,47	1,13	128,04	888,44
14	miR-202-3p	0,35	5,24	0,01	2,62	3,85
15	miR-206	24,33	160,78	1,21	77,87	17,66
16	miR-210-3p	0,24	0,004	0,40	0,67	750,77
17	miR-222-3p	0,06	18,11	70,40	0,003	25,40
18	miR-223-3p	56,31	166,47	24,01	844,08	912,84
19	miR-27a-3p	503,41	689,09	11,36	0,46	648,99
20	miR-31-5p	125,97	0,06	12,69	6,67	18,9
21	miR-424-5p	115,53	58,35	0,95	386,43	341,03
22	miR-429	342,65	0,55	0,007	863,34	551,70
23	miR-485-5p	102,61	12,56	11,41	44,60	47,62
24	miR-548c-3p	2,89	0,008	0,36	237,01	7,07
25	miR-613	222,90	11,85	0,10	11,01	965,17
26	miR-7-5p	297,13	10,97	0,001	49,39	17,77
27	miR-96-5p	458,58	833,07	0,006	4,89	1,55

2. 4. ve 6. Saatlerde ekspre edilmiş anlamlı artış-azalış gösteren 22 miRNA çizelge 3.4 'de gösterilmiştir. 2. Saatte 8 adet miRNA'da artış varken 1 adet miRNA'da azalış gözlenmiştir. 2. Saatte 12 miRNA 'da artış 4 miRNA'da azalış gözlenmiştir. 4. Saatte 18 miRNA 'da artış 1 miRNA'da azalış gözlenmiştir.

Çizelge 3.4. Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 2. , 4. ve 6. Saatlerdeki fold regülation ve p-value değerlerindeki miRNA değişiklikleri

Saatler	**2.Saat**		**4.Saat**		**6.Saat**	
	Fold Regülation	**P-Değeri**	**Fold Regülation**	**P-Değeri**	**Fold Regülation**	**P-Değeri**
let-7f-5p	1,40	78,56	1,36	961,58	1,24	25,34
miR-1	1,36	196,92	3,61	2,68	3,08	3,59
miR-100-5p	-1,29	173,49	-1,94	16,02	-1,25	212,82
miR-10a-5p	-1,19	122,08	-1,46	91,10	1,04	724,56
miR-129-5p	1,89	1,05	1,89	3,29	2,24	0,12
miR-145-5p	1,95	7,63	3,69	0,10	3,30	0,08
miR-17-5p	-1,16	424,92	1,28	15,07	2,03	0,22
miR-181a-5p	1,32	27,81	1,50	27,04	2,11	0,05
miR-181c-5p	1,34	24,58	1,58	0,62	2,02	0,01
miR-18a-5p	-1,10	945,11	1,30	17,72	2,30	0,01
miR-199a-3p	1,28	137,48	1,43	138,29	2,40	0,003
miR-199a-5p	-1,05	790,27	2,08	6,47	2,43	1,13
miR-202-3p	3,15	0,35	4,46	5,24	4,37	0,01
miR-206	1,47	24,33	1,46	160,78	2,57	1,21
miR-210-3p	-1,83	0,24	-2,09	0,004	-1,34	0,40
miR-222-3p	1,52	0,06	-1,34	18,11	-1,10	70,40
miR-27a-3p	-1,11	503,41	1,22	689,09	1,25	11,36
miR-31-5p	1,25	125,97	2,16	0,06	1,99	12,69
miR-424-5p	-1,35	115,53	-1,07	58,35	2,11	0,95
miR-429	1,13	342,65	1,51	0,55	2,13	0,007
miR-613	1,24	222,90	-1,56	11,85	2,15	0,10
miR-7-5p	1,18	297,13	1,70	10,97	2,49	0,001
miR-96-5p	-1,14	458,58	1,07	833,07	2,43	0,006

24. ve 48. Saatlerde ekspre edilmiş anlamlı artış-azalış gösteren 22 miRNA ise çizelge 3.5' de gösterilmiştir. 24. Saatte 10 miRNA'da azalış 2 miRNA'da artış gözlenmiştir. 48. Saatte 7 miRNA'da azalış gözlenirken ölçtüğümüz miRNA'ların hiç birinde artış gözlenmemiştir. Çizelgelerde mavi renklendirdiğimiz ifadeler azalan seviyeleri, kırmızı renklendirdiğimiz ifadeler ise artan seviyeleri göstermektedir.

Çizelge 3.5. Kontrol grubu hücreler ile TGF-β uygulamasını takiben 24. ve 48. Saatlerdeki Fold Regülation ve p-Value değerlerinde ki miRNA değişiklikleri

Saatler	**24.Saat**		**48.saat**	
	Fold Regülation	**P-Değeri**	**Fold Regülation**	**P-Değeri**
let-7f-5p	-3,16	0,39	-1,20	44,54
miR-1	-1,30	307,15	-1,59	118,53
miR-100-5p	-2,71	9,73	1,04	871,09
miR-10a-5p	-2,28	8,66	1,04	628,21
miR-129-5p	-1,84	8,99	-1,35	169,07
miR-145-5p	-1,25	18,74	-2,97	16,06
miR-17-5p	-1,30	138,19	-1,34	52,77
miR-181a-5p	1,10	190,63	-1,09	303,96
miR-181c-5p	1,10	153,85	-1,05	473,96
miR-18a-5p	-1,40	111,56	-2,05	16,93
miR-199a-3p	-1,14	108,19	-1,08	254,56
miR-199a-5p	-1,27	128,04	-1,17	888,44
miR-202-3p	-2,05	2,62	-5,58	3,85
miR-206	-1,44	77,87	-1,26	17,66
miR-210-3p	-1,47	0,67	-1,01	750,77
miR-222-3p	-2,36	0,003	-3,09	25,40
miR-27a-3p	-2,13	0,46	-1,04	648,99
miR-31-5p	-1,56	6,67	-2,01	18,9
miR-424-5p	-1,07	386,43	1,08	341,03
miR-429	-1,00	863,34	-1,03	551,70
miR-613	1,16	11,01	1,00	965,17
miR-7-5p	-1,19	49,39	-1,27	17,77

Araştırmamızda kullandığımız 84 miRNA'dan kontrol grubunda 2.Saatte farklılık gösteren ve fold regülation veren 5 miRNA 'ya ait fold regülation ve p değerleri Çizelge 3.6'da verilmiştir

Çizelge 3.6. Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 2. Saatteki miRNA değişiklikleri.

Sıra No	miRNA	Fold Regulation Değeri	P-Değeri
1	miR-202-3p	3,15	0,035
2	miR-204-5p	6,34	261,45
3	miR-223-3p	318,76	56,31
4	miR-485-5p	16,89	102,61
5	miR-548c-3p	43,65	2,89

Fold regulation ve p-value değerlerine bakılarak son olarak raw data kontrol edilmiştir. Buna göre miR-202-3p ve miR548-3p anlamlı olarak artış göstermiş her ikisinin de upregüle olduğu gözlenmiştir

Araştırmamızda kullandığımız 84 miRNA'dan kontrol grubunda 4.Saatte farklılık gösteren ve fold regülation veren 12 miRNA 'ya ait fold regülation ve p değerleri Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 4. Saatteki miRNA değişiklikleri.

Sıra No	miRNA	Fold Regulation Değeri	P-Değeri
1	miR-1	3,61	2,68
2	miR-125b-1-3p	286,13	0,005
3	miR-145-5p	3,69	0,10
4	miR-199a-5p	2,07	6,47
5	miR-202-3p	4,46	5,24
6	miR-204-5p	9,70	94,48
7	miR-210-3p	-2,09	0,004
8	miR-223-3p	11,35	166,47
9	miR-31-5p	2,15	0,062
10	miR-485-5p	4,25	012,56
11	miR-548c-3p	180,73	0,008
12	miR-607	-10,65	746,76

Fold regülation ve p-Value değerlerine bakılarak son olarak raw data değeri kontrol edilmiştir. Buna göre miR-1, miR-125b-1-3p, miR-145-5p, miR-199a-5p, miR-202-3p, miR-31-5p, miR-485-5p, miR-548c-3p anlamlı olarak upregüle olduğu gözlenmiştir. miR-210-3p ise anlamlı olarak down regüle olmuştur.

Araştırmamızda kullandığımız 84 miRNA'dan kontrol grubunda 6.Saatte farklılık gösteren ve fold regülation veren 22 miRNA 'ya ait fold regülation ve p değerleri Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 6. Saatteki miRNA değişiklikleri.

Sıra No	miRNA	Fold Regülation Değeri	P-Değeri
1	miR-1	3,07	3,59
2	miR-125b-1-3p	193,60	36,13
3	miR-129-5p	2,24	0,12
4	miR-145-5p	3,30	0,008
5	miR-17-5p	2,02	0,22
6	miR-181a-5p	2,11	0,05
7	miR-181c-5p	2,02	0,01
8	miR-18a-5p	2,30	0,01
9	miR-199a-3p	2,39	0,003
10	miR-199a-5p	2,43	1,13
11	miR-202-3p	4,36	0,01
12	miR-206	2,57	1,21
13	miR-223-3p	46,06	4,01
14	miR-424-5p	2,11	0,95
15	miR-429	2,12	0,007
16	miR-485-5p	3,00	11,41
17	miR-495-3p	7,83	354,99
18	miR-548c-3p	120,68	0,36
19	miR-607	31,49	148,01
20	miR-613	2,15	0,10
21	miR-7-5p	2,49	0,001
22	miR-96-5p	2,43	0,006

Fold regülation ve p-Value değerlerine bakılarak son olarak raw data değeri kontrol edilmiştir. Buna göre miR-1, miR-125b-1-3p, miR-129-5p, miR-145-5p, miR-17-5p, miR-181a-5p, miR-181c-5p, miR-18a-5p, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-202-3p, miR-206, miR-223-3p, miR-424-5p, miR-429, miR-485-5p, miR-548c-3p, miR-613, miR-7-5p, miR-96-5p anlamlı olarak upregüle olduğu gözlenmiştir.

Araştırmamızda kullandığımız 84 miRNA'dan kontrol grubunda 24.Saatte farklılık gösteren ve fold regülation veren 10 miRNA 'ya ait fold regülation ve p değerleri Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 24. Saatteki miRNA değişiklikleri

Sıra	miRNA	Fold Regulation	P-Değeri
1	let-7f-5p	-3,16	0,03
2	miR-100-5p	-2,71	9,73
3	miR-10a-5p	-2,28	8,66
4	miR-125b-1-3p	-7,91	169,10
5	miR-202-3p	-2,05	2,62
6	miR-222-3p	-2,36	0,003
7	miR-223-3p	4,52	844,08
8	miR-27a-3p	-2,13	0,46
9	miR-607	17,20	183,15
10	miR-96-5p	2,20	0,006

Fold regülation ve p-Value değerlerine bakılarak son olarak raw data değeri kontrol edilmiştir.

Buna göre miR-96-5p anlamlı olarak upregüle; let-7f-5p, miR-100-5p, miR-10a-5p, miR-202-3p, miR-222-3p, miR-27a-3p anlamlı olarak down regüle olmuştur.

Araştırmamızda kullandığımız 84 miRNA'dan kontrol grubunda 48.Saatte farklılık gösteren ve fold regülation veren 10 miRNA 'ya ait fold regülation ve p değerleri Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.10. Kontrol grubu hücreler ile TGF- β uygulamasını takiben 48. Saatteki miRNA değişiklikleri

Sıra No	miRNA	Fold Regulation	P-Değeri
1	miR-125b-1-3p	-161,61	24,26
2	miR-145-5p	-2,97	16,06
3	miR-18a-5p	-2,05	16,93
4	miR-202-3p	-5,58	3,85
5	miR-204-5p	12,08	735,15
6	miR-222-3p	-3,09	25,40
7	miR-223-3p	2,65	912,84
8	miR-31-5p	-2,01	18,9
9	miR-485-5p	-47,47	47,62
10	miR-548c-3p	-368,39	7,07

Fold regülation ve p-Value değerlerine bakılarak son olarak raw data değeri kontrol edilmiştir

Buna göre miR-145-5p, miR-18a-5p, miR-202-3p, miR-222-3p, miR-31-5p anlamlı olarak down regüle olmuştur. miR-125b-1-3p, miR-485-5p ve miR-548c-3p her ne kadar anlamlı çıksa da raw data değerlerini kontrol ettiğimizde 999,00 çıktığından anlamsız kabul edilmişlerdir ve değerlendirmeye alınmamışlardır.

Çizelge 3.11. Fold regülation, p-volue ve rawdata değerlerinden anlamlı çıkan miRNA' ların ortak reaksiyon verdiği saatler

Sıra	miRNA	2.saat	4.saat	6.saat	24.saat	48.saat
1	**let-7f-5p**				-	
2	**miR-1**		+	+		
3	**miR-100-5p**				-	
4	**miR-10a-5p**				-	
5	**miR-129-5p**			+		
6	**miR-145-5p**		+	+		-
7	**miR-17-5p**			+		
8	**miR-181a-**			+		
9	**miR-181c-**			+		
10	**miR-18a-5p**			+		-
11	**miR-199a-**		+	+		
12	**miR-199a-**			+		
13	**miR-202-3p**	+		+	-	-
14	**miR-206**			+		
15	**miR-210-3p**		-			
16	**miR-222-3p**				-	-
17	**miR-27a-3p**				-	
18	**miR-31-5p**		+			-
19	**miR-424-5p**			+		
20	**miR-429**			+		
21	**miR-613**			+		
22	**miR-7-5p**			+		
23	**miR-96-5p**			+	+	

4. TARTIŞMA

Meme kanseri meme hücrelerinde başlayan kanser türü olup akciğer kanserinden sonra dünyada görülme sıkılığı en yüksek olan kanser çeşididir. Cinsiyet olarak değerlendirme yapıldığında ise kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Erken tespitinde hastaların neredeyse tamamına yakını yaşam şansına sahip oldukları için özellikle tanı ve tedavisinde son yıllarda bilim insanları yoğun bir çaba sarf etmektedirler.

Meme kanserine yakalanma riski yaş, beslenme, gebelik, fiziksel aktivite ve genetik yatkınlık gibi parametrelerle artış/azalış göstermektedir.

Özellikle son yıllarda ciddi artış gösteren, her yıl milyonlarca kadına meme kanseri tanısı konulduğu günümüzde erken tanı ve etkin tedavi yöntemleri çok önem kazanmıştır.

miRNA'lar, meme kanserinin sadece erken dönemde teşhisi ve hastalığın prognozunda değil ayrıca moleküler esaslı kanser tedavilerinde de yakın gelecekte etkili bir ajan olmaya aday görünmektedir. Bütün bu bilgiler ışığında meme kanserine spesifik miRNA'ların belirlenmesi ve etkili oldukları hücresel yolaklardaki baskın mekanizmalarının belirlenmesi önem arz etmektedir.

Son yıllarda TGF-β' nın kanser gelişimindeki rolünün araştırılması büyük hız kazanmıştır. İki yüzlü bir molekül olan TGF-β hem tümör supresör, hem de onkogen gibi davranabilmektedir. TGF-β onkogenik özellikler sergileyerek, kontrolsüz proliferasyon, metaplazi, invazyon ve metastaz gibi olayların gerçekleşmesine aracılık etmektedir (Padua ve ark 2009).

miRNA'lar, keşfi yapıldıktan sonra 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 de rol oynadığının belirlenmesi, miRNA'ların ileride meme kanserinin erken tanı, teşhis ve tedavisinde de kullanılabileceğini düşündürmüştür. Bu sebeple, 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 supresör 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. Sonuçlarımızı kontrol ettiğimizde miR-10a-5p 24. Saatte down regüle, miR-145-5p 4. ve 6. Saatlerde upregüle, 48. Saate down regüle olduğu gözlenmiştir.

Anwar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada meme kanserinde onkogen olan A1B1 'nin miR-17-5p ile ilişkini açıklamışlardır. miR-17-5p'nin meme kanseri hücrelerinde tümör suppresör olduğunu ortaya koymuşlardır. (Hossain ve ark 2006) Bizde çalışmamızda miR-17-5p'nin 16 ng/ml dozundaki ekspresyonunda TGF-β 'nın 6. Saatte upregüle olduğunu gözlemledik.

Liu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada miR-1'in in vitro ortamda proliferasyonu, hareketliliği ve artmış apoptozu inhibe ettiğini K-RAS ve MALAT 1 'i hedefleyerek tümör supresör olarak işlem gördüğünü; in vivo çalışmada miR-1'in metastazı inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak miR-1'in meme kanserinde tümör supresör miRNA olarak görev aldığı sonucuna varmışlardır. (Liu ve ark 2015) Bizde çalışmamızda miR-1'in 16 ng/ml dozundaki ekspresyonunda TGF-β 'nın 4. ve 6. Saatlerde upregüle olduğunu gözlemledik.

Khan ve arkadaşları hasta izni ve etik onay alarak meme kanseri olan hastalardan ameliyat sırasında doku örnekleri almışlardır. Normal, malign ve fibroadenom dokularda RQ-PCR ile değerlendirme yapmışlardır. Elde ettikleri veriler ışığında miR-10a'nın tümör supresör olduğu sonucuna varmışlardır. (Khan ve arkadaşları 2015) Bizde çalışmamızda miR-10a-5p'nin 16 ng/ml dozundaki ekspresyonunda TGF-β 'nın 24. Saatte down regüle olduğunu gözlemledik.

Yoshino ve arkadaşları yaptıkları çalışmada miR-210-3p'nin renal hücreli karsinomda upregüle edilmesinin fonksiyonel sonuçlarını klinik açıdan değerlendirmek için miR-210-3p'yi RCC hücre hatlarında CRISPR/ Cas9 gen düzenleme sistemini kullanmışlar ve karakterize etmişlerdir. (Yoshino ve ark 2017) Bizde çalışmamızda miR-210a-3p'nin 16 ng/ml dozundaki ekspresyonunda TGF-β 'nın 4. Saatte down regüle olduğunu gözlemledik.

Wang arkadaşları meme kanserinde miR-129'un down regülasyonunu, meme kanserinin göçü ve motilitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. (Wang ve ark 2012) Transwell göç testi ile miRNA'ların hücre hareketliliği üzerindeki etkisini değerlendirmek için model olarak yüksek metastaz yeteneği olan MDA-MB-231'i seçmişlerdir. Buldukları sonuçları baz alarak miR-129'un fazla sentezlenmesinin meme kanseri hareketliliğini ve göçü engelleyebileceğini ve miR-129'un down regülasyonunun meme kanseri göçü ve metastazına katılabileceğini söylemişlerdir. (Wang ve ark 2012) Bizde çalışmamızda miR-129 ailesinden miR-129-5p'nin 16 ng/ml dozundaki ekspresyonunda TGF-β 'nın 6. Saatte up regüle olduğunu gözlemledik.

Wu ve arkadaşları meme kanserinde miRNA'ların rolünü miR-613 üzerinden spesifik olarak araştırmışlardır. (Wu ve ark 2016) miR-613'ün hedef geni VEGFA proteinini negatif olarak düzenleyerek meme kanseri hücre çoğalmasını engellediğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak miR-613'ün VEGFA'yi olumsuz şekilde düzenlediğini ve meme kanseri hücre hatlarının proliferasyonunu ve istilasını engellediğini belirtmişlerdir. (Wu ve ark 2016) Bizde çalışmamızda miR-613'ün 16 ng/ml dozundaki ekspresyonunda TGF-β 'nın 6. Saatte up regüle olduğunu gözlemledik.

Hong ve arkadaşları miR-96 'nın meme kanserinde ekspresyon modelini tespit etmek ve kanser gelişimini sürecinde biyolojik rolünü araştırmak için, miR-96'nın doğrudan hedef geni PTPN9 olarak tanımlamışlardır. Yapılan çalışmada miR-96'nın in vivo olarak hücre proliferasyonunu, göç ve invazyonunu ve in vivo tümör büyümesini önemli ölçüde yükselttiğini belirtmişlerdir. Hong ve arkadaşları meme kanseri hücrelerinde miR-96'nın up regüle olduğunu belirlemişlerdir. (Hong ve ark 2016) Bizde çalışmamızda miR-96 ailesinden miR-96-5p'nin 16 ng/ml dozundaki ekspresyonunda TGF-β 'nın 6. ve 24. Saatte up regüle olduğunu gözlemledik.

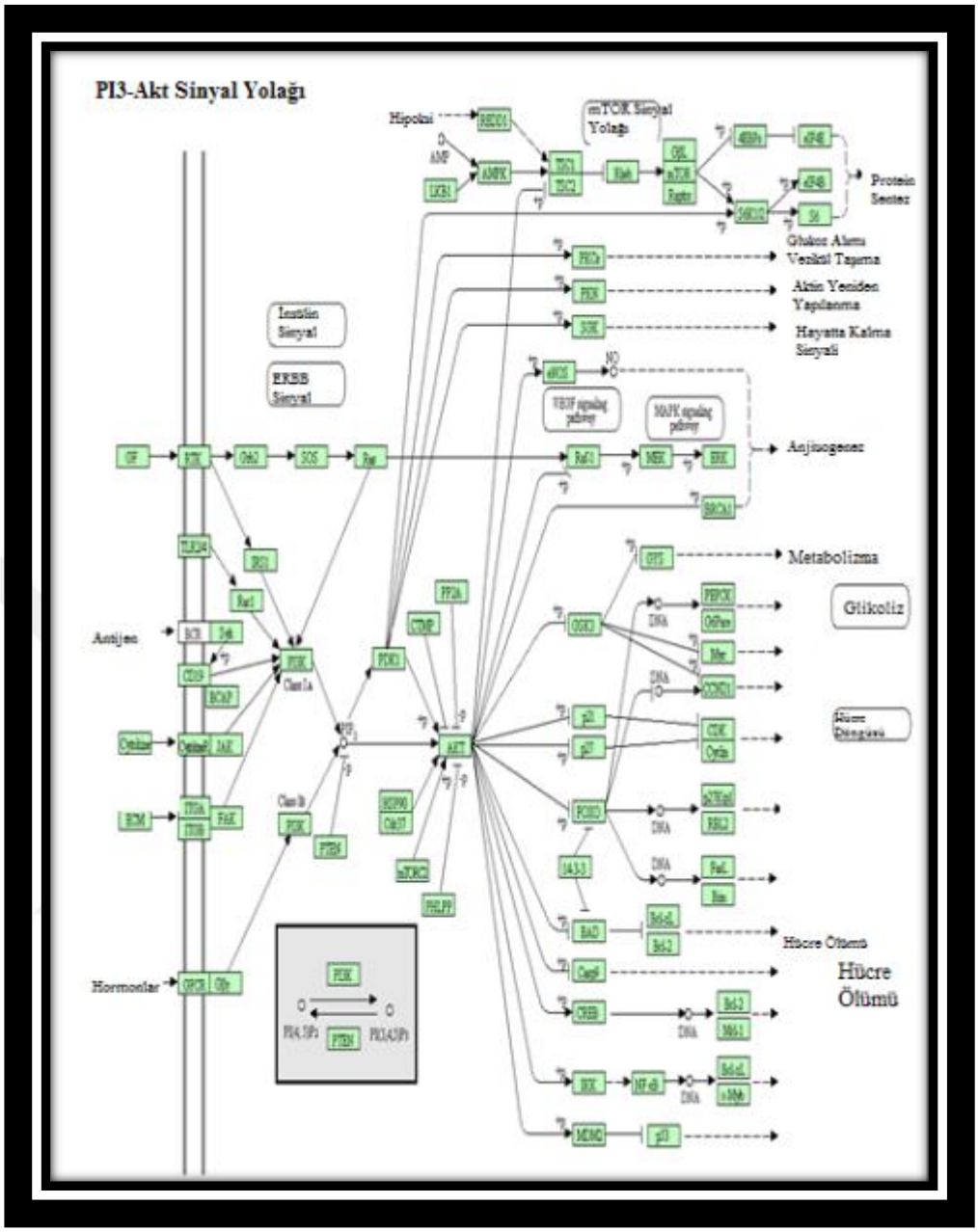
Spizzo ve arkadaşları insan meme kanserinde miR-145'in aktivitesini gözlemlemek için proliferasyon ve apoptozu testlerini kullanarak BC hücre hatlarında TP53'ün aktivasyonuna bağlı bir apoptotik etki sergilediğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak BC

hücre çizgilerinde miR-145'in tümör supresör özellikte olduğunu gözlemişlerdir.(Spizzo ve ark 2010) Bizde çalışmamızda miR-145 ailesinden miR-145-5p'nin 16 ng/ml dozundaki ekspresyonunda TGF-β 'nın 4. ve 6. Saatlerde up regüle, 48. Saatte down regüle olduğunu gözlemledik.

Zheng ve arkadaşları meme kanseri progresyonunda miR-145'in rolünü saptamak için, 88 çift meme kanseri dokusuyla komşu normal dokuları kantitatif gerçek zamanlı PCR karşılaştırmıştır. miR-145'in yeni bir hedef geni olarak Rho ile bağlantılı ROCK 1'i kullanmıştır. Araştırma sonucunda miR-145' in tümör supresör etki yaptığı gözlenmiş olup, meme kanseri tedavisinde potansiyel diagnostik ve terapotik hedef olarak ROCK 1'İ içeren mekanizma yoluyla meme kanseri progresyonuna katkıda bulunabileceği sonucuna varmışlardır. (Zheng ve ark 2016) Bizde çalışmamızda miR-145 ailesinden miR-145-5p'nin 16 ng/ml dozundaki ekspresyonunda TGF-β 'nın 4. ve 6. Saatlerde up regüle, 48. Saatte down regüle olduğunu gözlemledik.

Meng ve arkadaşları ESCC gelişiminde ve ilerlemesinde miR-202'nin fonksiyonu ve mekanizmasını araştırmışlardır. Sonuçlar incelendiğinde ESCC dokularında ve hücre çizgilerinde miR-202'nin önemli seviyede down regüle olduğunu görmüşlerdir. ECa-109 ve KYSE-510 hücrelerinde miR-202'nin aşırı ekspresyonu hücre proliferasyonunu belirgin şekilde bastırmış ve hücre apoptozunu indüklediğini gözlemlemişlerdir. (Meng ve ark 2016) Bizde çalışmamızda miR-202 ailesinden miR-202-3p'nin 16 ng/ml dozundaki ekspresyonunda TGF-β 'nın 2. , 4. ve 6. Saatlerde up regüle; 24. ve 48. Saatlerde down regüle olduğunu gözlemledik.

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. 1).



Şekil 4. 1 P13-AKT sinyal yolağı (http://diana.imis.athena-innovation.gr)

Sonuçları incelediğimizde saatler baz alındığı zaman 9 tane miRNA'nın onkogen olarak sadece artış gösterdiğini, 1 miRNA'nın tümör supresör olarak azalış gösterdiğini gözlemlemekteyiz.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma TGF-β ‘nın 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 kanserinde MCF-7 hücre hattı kullanılarak TGF-β ‘nın tedaviye yanıt olarak miRNA ekspresyon profilleri incelenmiştir. Kontrol grubu hüreler ile TGF-β uygulamasını takiben 2. Saatteki miRNA değişiklikleri; miR-202-3p up regüle olmuştur. 4. Saatteki miRNA değişiklikleri; miR-1, miR-145-5p, miR-145-5p, miR-199a-5p, miR-202-3p, miR-31-5p up regüle olurken, miR-210-3p down regüle olmuştur.

6. Saatteki miRNA değişiklikleri; miR-1, miR-129-5p, miR-145-5p, miR-17-5p, miR-181a-5p, miR-181c-5p, miR-18a-5p, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-202-3p, miR-206, miR-424-5p, miR-429, miR-613, miR-7-5p; miR-96-5p up regüle olmuştur. Down regüle olan anlamlı miRNA yoktur.

24. saatteki miRNA değişiklikleri; miR-96-5p up regüle olurken, let-7-5f, miR-100-5p, miR-10a-5p, miR-202-3p, miR-222-3p, miR-27a-3p down regüle olmuştur.

48. saatteki miRNA değişiklikleri; miR-145-5p, miR-18a-5p, miR-202-3p, miR-222-3p, miR-31-5p, down regüle olurken anlamlı olarak up regüle olan miRNA yoktur.

miR-145-5p 4. ve 6. Saatlerde upregüle olurken 48. Saatte down regüle olmuştur. miR-202-3p 2. , 4. ve 6. Saatlerde upregüle olurken 24. ve 48. Saatlerde down regüle olmuştur. miR-96-5p 6. ve 24. Saatlerde up regüle olmuştur. Yaptığım araştırmalar sonucunda bu miRNA’ların meme kanserinde rol oynayabileceğini söyleyebiliriz.

Tez çalışmamdaki veriler ışığında TGF-β’nın meme kanserinin tedavisinde etkisi olduğunu söyleyebiliriz. TGF-β uygulaması ile elde edilen apoptoziste tümör supresör miRNA olarak değerlendirmeye aldığımız miR-96-5p’nin anlamlı artışı, kanserle direkt ilişkisi olduğu gerçeğini yansıtmaktadır. miR-96-5p’nin anlamlı artışı meme kanserinin erken teşhis ve tedavisiyle ilişkili olduğu düşüncesindeyim.

Sonuç olarak çalışmamızı detaylıca incelediğimiz zaman TGF-β’nın meme kanserinde supresör genlerin aktivitesini arttırğını yorumlayabiliriz. Bizden önce yapılan araştırmaları da incelediğimizde TGF-β’nın meme kanserinin erken teşhisinde ve metastazında işlev görebileceğini söyleyebiliriz.

6. KAYNAKLAR

Akbulut, H. ve Akbulut K.G. 2005. Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. Sayfa 23

Akın I. 2008. Meme kanserli hastalarda COX-2 ekspresyonunun immunhistokimyasal olarak araştırılması, klinik ve histopatolojik değişkenlerle karşılaştırılması

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF-beta activation. J Cell Sci 2003; 116: 217-24. www.ambion.com/techlib/resources/miRNA. Erişim tarihi: 01/05/2009.

Arsan M. 1999. Meme hastalıkları. Actual Medicine 7(8): 67-73.

Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bar tel DP. 2008. Theim pact of microRNAs on protein out put. Nature ;455(7209):64-71

Barry, B. Lowitz A. 2002 Dennis A, Casciato, F, Medical Oncology & Principles of Cancer Biology

Bartel DP. 2007. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function). Cell;131:11.29.

Berardo MD, Allred DC, O'Connell P. Breast Cancer.1998. *Principles of molecular medicine,* 31: 625-632.

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. Rna-A Publication of the Rna Society. 10:185-91.

Border WA, Ruoslahti E. 1992. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. J Clin Invest. 90:1-7

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. 2004. Proc Natl Acad Sci U S A. 2;101(9):2999-3004

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. 2006. Nat Rev Cancer. 6(11): 857-66.

Campell JB. Breast cancer-race, ethnicity and survival: aliterature review.2002. Breast Cancer Res and Threatment, 74: 187–192.

Cancer Risk Factors. National Cancer Institute http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/cancer/page4 Erişim tarihi: 17.01.2017

Criss WE, Baysal A. 1999. Kanserden Korunmak İçin Beslenme Rehberi. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. 2001. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. Nat Genet. 29: 117-29

Fynan TM, Reiss M. 1993. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. Crit Rev Oncology. 4:493-540.

Fisher R.A. 1925. Statistical Methods for Research Workers, Edinburgh: Oliver and Boyd, 43

Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM.2006. MicroRNA expression and function in cancer. Trends Mol Med. 12(12):580-7.

Goldberg JI, Borgen JI. 2006. Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. Expert Rev Anticancer Ther.6:1205-14.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. 2007. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing (Reprinted from Cell, vol 123, pg 631-640, 2007).

Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I et al. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C-elegans developmental timing. Cell. 106:23-34.

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

Hill Rp, Rodemann HP, Hendry JH, Roberts SA, Anscher MS. 2001. Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic. Int J Radiat Oncol Biol Phys 49:353- 65.

Hong Y, Liang H, Uzair-Ur-Rehman, Wang Y, Zhang W, Zhou Y, Chen S, Yu M, Cui S, Liu M, Wang N, Ye C, Zhao C, Liu Y, Fan Q, Zhang CY, Sang J, Zen K, Chen X. 2016. miR-96 promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting PTPN9 in breast cancer. 18;6:37421

Hossain A, Kuo M. T, Saunders G. F. 2006. Mir-17-5p Regulates Breast Cancer Cell Proliferation by Inhibiting Translation of AIB1 mRNA, 26(21): 8191-8201

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. 2001. A cellular function for the RNA- interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science,293:834-8.

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

Işıkdoğan A, Zinciroğlu SB, Dirier A, Ayyıldız O. 2003. Metastatik meme kanserinde birinci basamak tedavide antrasiklin içeren kombinasyon kemoterapi sonuçlarımız. Dicle Tıp Dergisi, 30:1-4.

Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Wilson JK, Kinzler KW, Vogelstein B.1994. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. Cancer Res, 54: 63-53-8. http://kanser.gov.tr/Dosya/2017Haberler/2017_4_subat.pdf Erişim tarihi: Şubat 2017

Khan S, Wall D , Curran C , Newell J, Kerin MJ, Dwyer RM. 2015. 2; 15:345

Kelsey, J.L. Gammon, M.D. The Epidemiology of Breast Cancer. 1991. CA-A Cancer Journal for Clinicians May/June, 41(3):146-165.

Kim VN, Han J, Siomi MC. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol, 10:126-139.

Krimperfort P, Ijpenberg A, Song JY, van der Valk M, Navijn M, Zevenhoven J, Berns A. 2007. p15Ink4b is a critical tumor suppressor in the absence of p16Ink4a. Nature, 448: 943-6.

Lawrance DA. 2001. Latent-TGF-beta: an overview. Mol Cell Biochem 219:163-70.

Lawrence WT, Diagelmann DF. 1994. Growth factor on wound healing. Clin Dermatol. 12: 157-169.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. 1993. Elegans heterochro-nic gene lin-4 encodes 151 small RNAs with antisense comp-lementarity to lin-14. Cell. 75:843-854.

Le Quesne J, Caldas C. 2010. Micro-RNAs and breast cancer. Moleculer Oncology. 4:23041.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Falvell RA. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. Annu Rev Immunol. 24: 99-146.

Liu R, Li J, Lai Y, Liao Y, Liu R, Qui W. 2015. Hsa-miR-1 suppresses breast cancer development by down-regulating K-ras and long non-coding RNA MALAT1. 81: 491-7

Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem. 67:753-91.

Massague J. 2004. G1 cell-cycle control and cancer. Nature. 432:298-306.

McCarthy K, Carpenter SA, Georgiade GS. 1990. The breast: embryology, anatomy, and physiology. In: Georgiade NG, Georgiade GS, Riefkohl R, Eds. Aesthetic Surgery of the Breast. New York: Saunders Co. 3-17.

Meng X, Chen X, Lu P, Ma W, Yu D, Song L, Fan Q. 2016. MicroRNA-202 inhibits tumor progression by targeting LAMA1 in esophageal squamous cell carcinoma. 13;473(4):821-7

Merey S. 2002. Kadınlarda meme kanseri tarama davranışları İstanbul Ünv. Sağl. Bil. Ens. İstanbul.

Mitrunen K, Hirvonen A. 2003. Molecular epidemiyology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. Mutation Research. 544: 9-41.

M.J. Truty, Urritia R. 2007. Basics of TGF-beta and pancreatic cancer. Pancreatology 7:423–435.

N. Momi, S. Kaur, S. R. Krishn, S. K. Batra. 2012. Discovering the route from inflammation to pancreatic cancer PMC. 58: 283–297.

Nural N. 1995. Kanser riski altında olan kişilerin saptanmasında hemşirelerin rolü yayınlanmamış doktora tezi, Doktora Tezi Hacettepe Ünv. Sağl. Bil. Ens. Ankara.

Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, Martinez J. 2006. Post-transcriptional regulation of microRNA expression RNA. 12: 1161-1167.

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

Padua D, Zhang XH , Wang Q , Nadal C , Gerald WL , Gomis RR, Massague J. 2008. TGFbETA primers Breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin- like 4. Cell. 133:66-77.

Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. 2008. Wides pre ad changes in protein synthe sis in duced by microRNAs. Nature 455(7209):58-63.

Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 113: 685-700.

Siegel PM, Massague J. 2017. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. Nat Rev Cancer 2003; 3: 807-21. Society.

Spizzo R, Nicoloso MS, Lupini L, Lu Y, Fogarty J, Rossi S, Zagatti B, Fabbri M, Veronese A, Liu X, Davuluri R, Croce CM, Mills G, Negrini M, Calin GA. 2010. miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells. 17(2):246-54.

Ten Dijke P, Hill CS. 2004. New insights into TGF-beta- Smad signaling. Trends Biochem Sci 29: 265-73.

Topuz E, Aydıner A, Dinçer M. 2003. Meme Kanseri Nobel Kitapevi İst. Sf:28.

Türk Klinik Biyokimya Derg. 2010. TGF -β 'nın Kanserde Baskılayıcı Rolü 8:35.

Wakefield LM, Romerts AB. 2002. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. Curr Opin Genet Dev. 12: 22-9.

Wang QY, Tang J, Zhou CX, Zhao Q. 2012. The down-regulation of miR-129 in breast cancer and its effect on breast cancer migration and motility. 64(4):403-11

Wiemer EAC. 2007. The role of microRNAs in cancer: No small matter. European Journal of Cancer. 43(10):1529-44.

Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI. 2007. MicroRNAs and cancer. Br J Surg. 94: 23–30.

World Health Organization (WHO). http://www.who.int/topics/cancer/en/index.html Erişim tarihi: 01 Kasım 2010.

Wu J, Yuan P, Mao Q, Lu P, Xie T, Yang H, Wang C. 2016. miR-613 inhibits proliferation and invasion of breast cancer cell via VEGFA. 9;478(1):274-8

Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Tatarano S, Kofuji S, Nohata N, Nakagawa M, Enokida H. 2017. microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma Feb 1. doi: 10.18632/oncotarget.14930.

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

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

Zheng M, Sun X, Li Y, Zuo W. 2016. MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1. 37(6):8199-96

8. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Konya' da doğdu. İlk ve orta tahsilini Konya' da yaptı. 2011 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında 2012 yılında yüksek lisans eğitimine başladı.