



EGE ÜNİVERSİTESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MEME, AKCİĞER VE PROSTAT KANSERİNİN
ORTAK MİRNA'LARININ META-ANALİZ İLE
BELİRLENMESİ VE BİYOBELİRTEÇ
OLARAK KULLANIM POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Gizem ÖRS

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Sultan GÜLÇE İZ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi :09.08.2017

Bornova-İZMİR

2017

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MEME, AKCİĞER VE PROSTAT KANSERİNİN
ORTAK MİRNA'LARININ META-ANALİZ İLE
BELİRLENMESİ VE BİYOBELİRTEÇ
OLARAK KULLANIM POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Gizem ÖRS

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Sultan GÜLÇE İZ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi :09.08.2017

Bornova-İZMİR

2017

Gizem ÖRS tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Meme, Akciğer ve Prostat Kanserinin Ortak MiRNA’larının Meta-Analiz ile Belirlenmesi ve Biyobelirteç Olarak Kullanım Potansiyellerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 09.08.17 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Yrd. Doç. Sultan GÜLÇE İZ

.....


Raportör Üye : Prof. Dr. Kemal S. KORKMAZ

.....


Üye : Prof. Dr. Zekiye ALTUN

.....


EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Meme, Akciğer ve Prostat Kanserinin Ortak miRNA’larının Meta-Analiz ile Belirlenmesi ve Biyobelirteç Olarak Kullanım Potansiyellerinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

09 / 08 / 2017

GİZEM ÖRS

İmzası



ÖZET**MEME, AKCİĞER VE PROSTAT KANSERİNİN ORTAK
MİRNA'LARININ META-ANALİZ İLE BELİRLENMESİ
VE
BİYOBELİRTEÇ OLARAK KULLANIM
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖRS, Gizem

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Sultan GÜLÇE İZ

Ağustos 2017, 94 sayfa

Bu tez kapsamında; meme, akciğer ve prostat kanserinin erken teşhisi için kullanılabilen ortak miRNA biyobelirteçlerini tanımlamak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, meme, akciğer ve prostat kanseri ekspresyon profili veri setleri meta-analiz yaklaşımı ile incelenmiş ve biyolojik belirteç olarak tanımlanan miRNA'ların potansiyelleri araştırılmıştır.

Meme, akciğer ve prostat kanseri için seçilen 6 veri kümesinde rank tabanlı meta-analiz yöntemi uygulanmış, 24 adet ortak miRNA bulunmuştur. KEGG yolları ve Gen Ontolojisi (GO) kategorileri tanımlandı. Ayrıca deneysel validasyonu amacıyla meta-analiz ile belirlenen miR-145-3p temin edilerek ekspresyon analizi incelenmiştir. Üç farklı kanser sınıfını temsil eden 11 adet hücre hattında miR-145-3p'nin ekspresyon seviyesi araştırılmıştır. Hücrelerin, normoksi (atmosferik O₂) koşullarına ek olarak, hipoksi koşullarında ve serum yoksunluğunda metastaz eğilimleri artırılarak miR-145-3p'nin ekspresyon seviyesindeki değişiklikler belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: mikroRNA, meme kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, meta-analiz.



ABSTRACT**DETERMINING MIRNAS COMMONLY EXPRESSED
IN BREAST, LUNG AND PROSTATE CANCER
BY META-ANALYSIS
AND INVESTIGATION OF THEIR POTENTIAL USE AS
BIOMARKERS**

ÖRS, Gizem

MSc in Bioengineering Eng.

Supervisor: Asst. Assoc. Dr. Sultan GÜLÇE İZ

August 2017, 94 pages

In this thesis, it is aimed to define common miRNA biomarkers that can be used for the early detection of breast, lung and prostate cancers. For this purpose, breast, lung and prostate cancer expression profile data sets were examined by meta-analysis approach and the use potentials of miRNAs identified as biomarkers were investigated.

A rank-based meta-analysis method was applied to selected 6 data sets for breast, lung and prostate cancer, and 24 common miRNAs were found. KEGG pathways and Gene Ontology (GO) categories were identified. Expression analysis was also examined by providing miR-145-3p determined by meta-analysis for experimental validation. The expression level of miR-145-3p in 11 cell lines representing three different cancer classes was investigated. In addition to normoxic conditions (atmospheric O₂), changes in the expression level of miR-145-3p have been determined by increasing the metastatic properties of cell cultures under hypoxic conditions and serum deprivation.

Keywords: MicroRNA, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, meta-analysis.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında, bana her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan ve her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, ilk tanıdığım günden itibaren her zaman yanımda olduğunu bildiğim, danışmandan çok daha fazlası olan değerli hocam Yrd. Dr. Sultan GÜLÇE İZ'e,

Kantitatif PCR analizleri için laboratuvarında çalışmama izin veren, bünyesindeki her türlü imkan ve olanakları kullanmamızı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Mert DÖŞKAYA'ya,

Çalışmamın deneysel aşaması için gerekli olan RWPE-1 ve A-549 hücrelerini bizimle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Kemal S. KORKMAZ ve Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY'a,

Üyesi olmaktan gurur duyduğum Biyoteröpatikler & Biyodiagnostikler Lab. grubuna,

Lisans ve lisansüstü eğitimim süresince gerek akademik ve gerek manevi anlamda desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. S. İsmet DELİOĞLU GÜRHAN'a,

Son olarak, özellikle bilgisayar programları konusunda yardımlarıyla, yüksek lisans boyunca benim kadar yorulan, pes ettiğimde yola devam etmemi sağlayan, nişanlım Hasan Can KUMOĞLU'na, iyi, kötü her günümde yanımda olan kardeşim gibi sevdiğim canım dostum Sevil MASAT'a, her zaman olduğu gibi bu süreçte de moral ve motivasyon sağlayan, maddi, manevi desteklerini ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim canım babam Gazi ÖRS ve annem Sevda ÖRS'e, biricik kardeşim Ozan ÖRS'e yürekten teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. MİKORNA.....	4
2.1. MikroRNA Biyogenezi ve İşlevi	4
2.2. MikroRNA'lar ve Kanser	6
2.2.1. Akciğer Kanserinde MikroRNA'lar	6
2.2.2. Meme Kanserinde MikroRNA'lar	7
2.2.3. Prostat Kanserinde MikroRNA'lar.....	9
2.3. Kanser Metastazında MikroRNA'lar	10
2.3.1. Hipoksi ile indüklenen kanser metastazı.....	10
2.3.2. Serum yoksunluğunda kanser metastazı	11
3. META ANALİZ YAKLAŞIMI.....	12
4. REAL TIME PCR.....	13
4.1. RT-PCR ile miRNA'ların belirlenmesi	13
4.2. Taqman Prob Prensipleri.....	14
4.3. $2^{-\Delta\Delta CT}$ Analizi	16
5. MATERYAL VE METOT	19
5.1. Materyal	19
5.1.1. Kullanılan Hücre Hatları.....	19

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5.1.2. Kimyasallar	19
5.1.3. Kitler ve primerler.....	20
5.1.4. Cihazlar ve laboratuvar gereçleri	21
5.2. Metot	23
5.2.1. Meta-Analiz yaklaşımı.....	23
5.2.2. Hücre kültürü	29
5.2.3. Deney setleri	33
5.2.4. Total RNA izolasyonu	34
5.2.5. cDNA sentezi	35
5.2.6. Real-Time PCR.....	38
5.2.7. Veri analizi.....	39
5.3. İstatiksel Analiz	40
6. BULGULAR.....	41
6.1. Meta-miRNA Listelerinin oluşturulması	41
6.2. Meta-miRNA Listelerinin GeneVenn Programı ile Karşılaştırılması	43
6.3. Hücre Kültürü	44
6.4. RNA İzolasyon Sonuçları	58
6.5. Real-Time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	59
7. TARTIŞMA	66
8. SONUÇ.....	70
9. ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR DİZİNİ	74
ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 miRNA oluşum mekanizması.....	4
4.1 Polimerizasyon basamağı.....	14
4.2 Proben bağlanması.....	15
4.3 Hibridizasyon basamağı.....	15
4.4 Amplifikasyon basamağı	16
4.5 Real Time PCR amplifikasyonu sırasında floresan ışımaya grafiği.....	17
5.1 Genel Çalışma Şeması	28
5.2 Faz ayrımı	34
5.3 $\Delta\Delta CT$ hesaplamaları için gerekli formüller.....	39
6.1 Meta-miRNA listelerinin GeneVenn programı ile karşılaştırılması.....	43
6.2 MCF-7 hücre kültürü mikroskop görüntüleri	45
6.3 MDAMB231 hücre kültürü mikroskop görüntüleri	46
6.4 MDAMB-453 hücre kültürü mikroskop görüntüleri	47
6.5 MCF10A hücre kültürü mikroskop görüntüleri	48
6.6 DU145 hücre kültürü mikroskop görüntüleri	50
6.7 LNCAP hücre kültürü mikroskop görüntüleri.....	51
6.8 PC3 hücre kültürü mikroskop görüntüleri	52
6.9 RWPE-1 hücre kültürü mikroskop görüntüleri.....	53
6.10 A549 hücre kültürü mikroskop görüntüleri	55
6.11 MRC5 hücre kültürü mikroskop görüntüleri	56
6.12 NCI-H82 hücre kültürü mikroskop görüntüleri.....	57
6.13 Meme kanseri hücrelerinde ekspresyon değişimi	60
6.14 Prostat kanseri hücrelerinde ekspresyon değişimi	62
6.15 Akciğer kanseri hücrelerinde ekspresyon değişimi	64
6.16 Real Time PCR aplikasyon eğrileri	Hata! Yer işareti tanımlı değil.
7.1 MiR-145 geninin düzenlediği mekanizmalar.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
5.1 Gene Express Omnibus veri tabanlarında tarama sonuçları	23
5.2 Array Express veri tabanlarında tarama sonuçları	24
5.3 Akciğer kanseri için seçilen data setleri ve özellikleri.....	25
5.4 Meme kanseri için seçilen data setler ve özellikleri	25
5.5 Prostat kanseri için data setleri ve özellikleri	26
5.6 Seçilen miRNA ve referans genin sekans dizilimi	29
5.7 MCF10A büyüme ortamı.....	30
5.8 cDNA sentezi ve RT-PCR için kullanılan MikroRNA Assay primerleri.....	35
5.9 RT-PCR için reaksiyon karışımının hazırlanması	36
5.10 RT PCR için Thermal Cycler programı	37
5.11 Real-Time PCR reaksiyon karışımı	38
5.12 Real-Time PCR reaksiyon koşulları	38
6.1 Ortak meta-miRNA'ların Ortalama Rank ve Final Rank değerleri.....	41
6.2 Ortak meta-miRNA'ların KEGG yolları	42
6.3 Nanodrop sonuçları.....	58
6.4 Meme kanseri örneklerin $\Delta\Delta CT$ hesapları	59
6.5 Prostat kanseri örneklerin $\Delta\Delta CT$ hesapları	61
6.6 Akciğer kanseri örneklerin $\Delta\Delta CT$ hesapları	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler** **Açıklama**

μ l Mikrolitre

μ M Mikromolar

dk Dakika

ml Mililitre

ng Nanogram

μ g Mikrogram

$^{\circ}$ C Santigrat

Kısaltmalar **Açıklama**

3'-UTR 3'-Transle Edilmeyen Bölge

DMSO Dimetilsülfoksit

EDTA Etilendiamintetra Asetik Asit

FBS Fetal Sığır Serumı

DMEM Dulbecco'nun modifiye eagle vasatı

EGFR Epidermal büyüme faktörü reseptörü

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
miRNA	Mikro RNA
miR-145*	MikroRNA-145-3p
mRNA	Haberci RNA
ncRNA	Kodlanmayan ribonükleik asit
PBS	Tuz Fosfat Tamponu
RNA	Ribonükleik asit
RISC	RNA ile uyarılan sessizleştirme kompleksi
RT	Revers Transkripsiyon
Pri-miRNA	Primer MikroRNA
RNAi	İnterferans RNA
RT-qPCR	Ters transkripsiyon kantitatif polimerazyon zincir reaksiyonu
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenaz

1. GİRİŞ

MikroRNA'lar (miRNA'lar), hedef mRNA'nın yıkımını ya da translasyonunun baskılanmasını gerçekleştirerek post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen, 18-24 nükleotidden oluşan, tek zincirli, kodlanmayan RNA molekülleridir. miRNA'lar, mRNA'nın 3'UTR bölgesinde hedef transkripti ile baz eşleşmesi yaparak, bağlandığı transkriptlerin translasyonunu farklı mekanizmalar üzerinden baskırlar.

miRNA biyogenezi ve çalışma mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik yapılmış olan çalışmalar, miRNA'ların kanser patogeneziinde hücrel fonksiyonlarda görev aldığını göstermiştir. Ayrıca gen ekspresyonunun post-traskripsiyonel düzenlenmesi dışında metabolik regülasyon, embriyogenez, organogenez, farklılaşma ve büyüme kontrolü gibi mekanizmalarda rol aldığı bilinmektedir. MikroRNA'lar dokular arasında farklı seviyede eksprese oldukları gibi kan dolaşımında da bulunmaktadır.

Günümüzde kanser araştırmalarında herhangi bir genin tek başına incelenmesi yerine, gen ekspresyonunun analizinin yapılması, tanı açısından önem kazanmış ve farklı tümör dokularının gen ekspresyon profillerinin kıyaslanmasıyla, moleküler bir sınıflama yöntemi geliştirilmiştir. Gen ekspresyon profilleri, benzerlik gösteren tümörleri birbirinden ayırarak sınıflandırabilmekte ve hastalığın klinik süreci ya da tedaviye yanıt açısından bilgi vermektedir.

miRNA'ların gerek hücre siklusu regülasyonundaki rolü, gerek onkogenik, tümör süpresör ya da metastatik özellik göstermesi meme kanseri, akciğer kanseri veya prostat kanserlerinin teşhis ve tedavisinde önemini ortaya koymaktadır. MiRNA'ların gen ekspresyon regülatörleri olarak görev yaptıklarının belirlenmesinden sonra kanser tümörlerinin sınıflandırılmasında biyobelirteç ve prognostik indikatör olarak kullanılmasının mümkün olacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada amaç, meme, akciğer ve prostat kanseri veri setlerinin meta analiz analizi sonrası üç kanser tipinde de ortak olarak eksprese edildiği belirlenen miRNA'ların, aynı dokulardan türevlenen

metastatik özellik gösteren hücre hatlarının normoksi (atmosferik O₂) ve hipoksi (%1 O₂, %5 CO₂ ve % 94 N₂, 48 saat) şartlarında, ayrıca serumsuz besin ortamında metastazı indüklenerek, ekspresyon seviyelerinin karşılaştırmalı olarak incelemesi ve biyobelirteç olarak kullanım potansiyellerinin araştırılmasıdır. Meta-analiz yöntemi, belirli bir konu üzerinde çalışılmış olan bağımsız verilerin sonuçlarını birleştirerek, elde edilen bulgularının istatistiksel analizini yapan bir yaklaşımdır. Son yıllarda yaygın olarak kullanılan bu yöntemin ile sonuçların güvenilir bir şekilde gözden geçirilmesi ve sentezinin yapılması mümkün olacak ve yeni çalışmalara yol gösterecektir.

Tez çalışmasının hedeflerine ulaşabilmek için, meme, akciğer ve prostat kanseri miRNA ekspresyon profillerini içeren data setlerinin rank-tabanlı meta analiz yaklaşımı ile incelenmiştir. Data setlerinin yeniden düzenlenmesi ve yapılan istatistiksel analizler ile *P* değerlerinin bulunmasının ardından bu üç yumuşak doku tümöründe yüksek seviyede eksprese edilen ortak miRNA'ların belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu noktada, yapılan meta analizi ile belirlenen ortak miRNA'ların klasik literatür taraması ile belirlenmesinden daha güvenilir sonuçlara ulaşılmasını sağladığı düşünülmektedir.

Özetle, tez kapsamında, meme, akciğer ve prostat kanseri yumuşak doku tümörleri veri setlerinde meta analiz yöntemi kullanarak ortak olarak eksprese olduğu belirlenen miR-145-3p'nin aynı dokuların metastatik özellik gösteren hücre hatlarının normoksi ve hipoksi şartlarında, ayrıca serumsuz besin ortamında metastazı indüklenerek, ekspresyon seviyelerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi ve biyobelirteç olarak kullanım potansiyellerinin araştırılması yapılmıştır. Bu amaçla, ilk olarak, meme kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanserleri veri setleri meta analiz ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Analizlerin sonuçlarının doğrulanması için meme (MCF 10A, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453), akciğer (A549, NCI-H82, MRC5) ve prostat (PC3, LNCAP, DU 145, RWPE-1) hücre hatlarında meta-analiz ile belirlenen miRNA'ların ekspresyon seviyeleri karşılaştırmalı olarak incelenerek meta analiz sonuçlarının

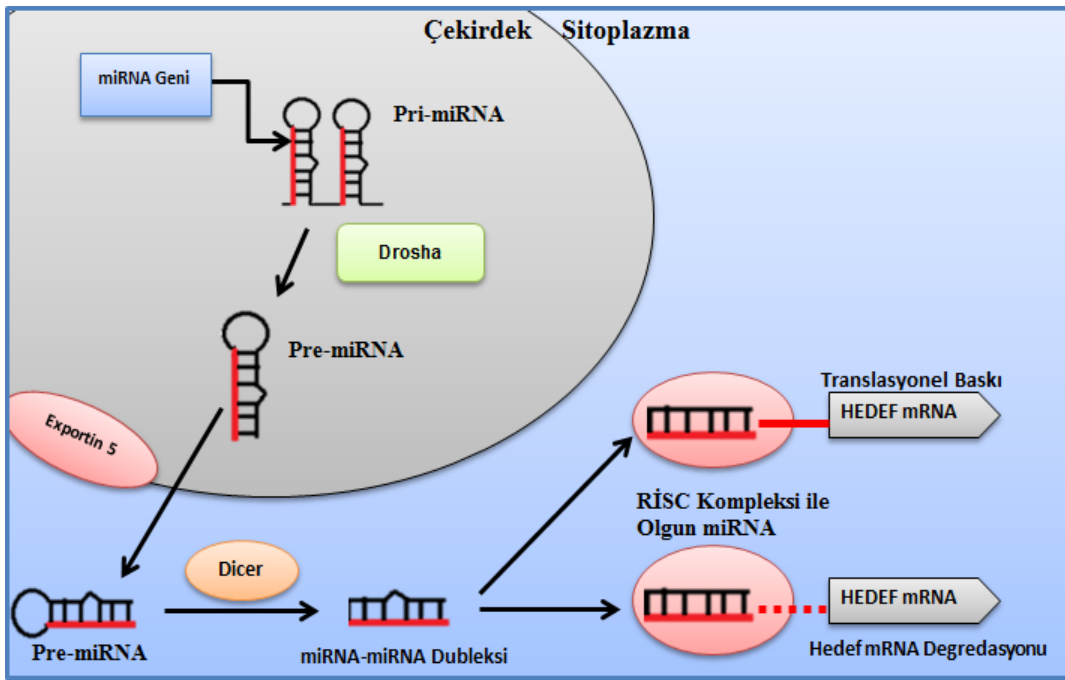
deneysel verilerle validasyonları gerçekleştirilecektir. Elde edilen sonuçlar ışığında seçilen miRNA biyobelirteçlerinin kanser metastazında rolünün ortaya çıkarılması ile kanda dolaşan tümör hücrelerinin belirlenmesinde kullanılabilirliğinin mümkün olacağı, ülkemizde de yaygın olarak görülen sağ kalım oranı düşük olan meme, akciğer ve prostat kanserleri ile mücadelede önemli bir yere sahip olan erken tanı yöntemlerinin geliştirmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



2. MİKRORNA

2.1. MikroRNA Biyogenezi ve İşlevi

Mikro-RNA'lar (miRNA'lar) bitkilerden (Bartel, 2004) memelilere (C.-Z. Chen et al., 2004) kadar birçok organizmada genin kodlanmayan bölgesinden oluşan yaklaşık olarak 22nt'lik uzunlukta olup hedef mRNA'yı degrades eden ya da translasyonel baskılanmayı sağlayan önemli derece düzenleyici görevleri olan kodlanmayan (noncoding) proteinlerdir (Lagos-Quintana et al., 2001).



Şekil 2.1 miRNA oluşum mekanizması

Şekil 2.1'de gösterildiği gibi, RNA polimeraz II tarafından sentezlenen ilk miRNA olan pri-miRNA'lar yaklaşık 700 baz uzunluğundadır (Lee et al., 2004). Pri-miRNA çekirdek içinde transkribe olur. Drosha (RNAaz III üyesi) kompleksi endonükleaz aktivitesi ile bu pri-miRNA'yı iki ucundan keser (Denli et al., 2004). Bu kesim işlemi sonucunda pri-miRNA, pre-miRNA olarak adlandırılır ve yaklaşık uzunluğu 70-100 bazdır. Pre-miRNA, pri-RNA'da sahip olduğu ortak loop yapısı gibi dizilimlerinde yanlış eşleşmeler barındırır. Pre-miRNA'lar "exportin-5" adı verilen

taşıyıcı bir protein vasıtasıyla çekirdekte sitoplazmaya aktarılır (Gregory et al., 2004). Sitoplazmaya aktarılan pre-miRNA'lar "Dicer" (Rnaz III üyesi) molekülüne bağlanır. Dicer, pre-miRNA'nın sahip olduğu sap ilmiğini keserek, iki tamamlayıcı ipliği olan kısa RNA molekülünü meydana getirir, ama bunlardan ipliklerden sadece biri RISC'e (RNA uyartılı susturma kompleksi) bağlanır (Lund et al., 2004).

miRNA'lar, hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesinde transkript ile baz eşleşmesi yaparak, bağlandığı andan itibaren transkriptlerin translasyonunu farklı mekanizmalar üzerinden baskılar (Pillai et al., 2007). Bu baskılama ile miRNA'ların onkogenleri bastırma, metastazı inhibisyonu, metastazı indüklenme, ilaç direnç mekanizmaları gibi rolleri vardır (Lin et al., 2012). Bununla birlikte meme kanseri türünde (Esquela-Kerscher ve Slack, 2006), akciğer kanserinde (Zhang et al., 2013), kolarektal kanserinde (M. Liu ve Chen, 2010) ve yumurtalık kanserinde (Kinose et al., 2014) ekspresyonu gerçekleşen miRNA'lardan bazıları tümör süpresörler olarak görev yaparken bazılarının onkogenik özellik gösterdiği yapılan ekspresyon analizleri çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır. miRNA'ların hedeflediği mRNA ifadelerini azaltıcı yönde etkilediğinin görüldüğü bir çalışmada yabancı miRNA'nın giriş yaptıkları HeLa hücrelerinde mRNA'ların çok sayıda azalmış ekspresyonunun olduğunu gösterilmiştir (Lim et al., 2005).

Caenorhabditis elegans türünde çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) homolog mRNA'ları parçalanmaya teşvik ettiğini gösteren Andrew Fire ve Craig Mello 'Ribonükleik asit interferansı' (RNAi) olarak adlandırılan mekanizmayı buldukları çalışma ile 2006 yılında Fizyoloji ve Tıp dalında Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir (Andrew ve Craig, 2006). Son yıllardaki çalışmalarda, başta agresif bir hastalık olan kanser dahil olmak üzere pek çok hastalığın prognozunda miRNA'larla ilgili işlev bozukluklarının bulunduğu belirtilmiştir. İşlev bozukluğunun oluşmasında en önemli grubu miRNA'nın ekspresyonundaki değişikliklerdir (Selbach et al., 2008).

MikroRNA'lar genlerin ifade düzeyindeki değişikliklerine sebep olarak, delesyonlar (Climent et al., 2007), amplifikasyonlar (Albertson, 2006) veya translokasyonlar (Oliveira ve Fletcher, 2003) gibi büyük ölçekli genom değişiklikleri

rol oynarlar. miRNA kodlayan dizide meydana gelebilecek delesyonlar ilgili miRNA'nın miktarını azaltırken, hedef mRNA'nın ve ondan kodlanan proteinin artmasına sebep olacaktır. Amplifikasyonlar ise tam tersi bir etki yaparak, miRNA miktarını artırırken hedef mRNA'yı ve bundan kodlanan proteini azaltır (Biggar vd. 2014). Translokasyonların etkisi ise yer değiştiren DNA parçasının yerleşme yerine göre ekspresyonu artırıcı ve ya azaltıcı yönde olabilir (Chiarle et al., 2011).

2.2. MikroRNA'lar ve Kanser

2.2.1. Akciğer Kanserinde MikroRNA'lar

Akciğer kanseri tüm dünyada kanserlerden kaynaklanan ölümlerin başlıca sebebi olup, küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olarak ikiye ayrılır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri tüm akciğer kanserlerinin %80'ini oluşturmaktadır. Teknolojinin gelişmesi ile radyoterapi ve kemoterapideki uygulamalar gelişse de ancak akciğer kanserinin sağ kalım oranı azalmamıştır (Jemal et al., 2009).

miRNA'lar çeşitli kanser türlerinde onkojenik özelliklere sahip olduklarından onkomir olarak adlandırılmaktadır. miR-17, miR-18a, miR-19a, miR20a, miR-92-1 gibi miRNA kodlayan miR 17-92 ailesinin ifade düzeyi, küçük hücreli akciğer kanseri ve insan B hücre lenfomasında artmıştır (O'Donnell et al., 2005).

Bununla beraber normal akciğer dokusunda yüksek seviyelerde bulunana Let-7 ailesine ait miRNA'lar, akciğer kanserinde azalmış ekspresyonunun göstermiştir. (Takamizawa et al., 2004). Let-7 ailesinin, delesyona uğrayan kromozomal bir bölgede bulunması ve gen ifadesinin azalmasının, bu aile üyelerinin tümör baskılayıcı olduğunu öngörülmüştür (Calin and Croce, 2006). CDK6, cyclin D2 ve K-RAS, c-MYC onkojenlerinin baskılanması Let-7 ailesi tarafından mümkündür(Liu et al., 2011).

2011 yılında yayınlanan bir çalışmada, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatlarında miR-192 ekspresyon artışının retinoblastoma1 (RB1) mRNA'sını

hedeflediğini ve inhibe ettiği ortaya çıkarılmıştır. Tümör baskılayacak bir etkiye sahip olduğunu ve hücre çoğalmasını baskıladığını bildirmişlerdir (Feng et al., 2011). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin, normal akciğer dokusu ile karşılaştırılması, hücrelerin farklı hsa-miR-125a-3p ve hsa-miR-125a-5p ifade düzeyinde farklılıklar görülmüştür. Jiang ve arkadaşları hsa-miR-125a-3p ve hsa-miR-125a-5p miRNA'ların A549 hücre hatlarında hücre invazyonu baskılayıcı olduğu bildirilmiştir (Jiang et al., 2010).

Başka bir çalışmada hasta olmayan bireyler ile kanser hastalarının balgam örnekleri karşılaştırıldığında, miR-21 ekspresyonunun aşırı eksprese olduğunu göstermişlerdir (Xie et al., 2010). Wang ve arkadaşları balgamda artmış miR-21 ekspresyonunun hassas duyarlılığa sahip ayrıca yüksek özgüllükle olduğunu, akciğer kanserinde bir potansiyel biyobelirteç olarak bildirmişlerdir (Wang et al., 2012). Bir başka çalışmada tümör dokularında, balgamda ve kontrol olarak normal dokularda yapılan karşılaştırmanın sonucunda miR-21, miR-486, miR-375 ve miR-200b'nin yüksek ekspresyonun göstermiştir (Yu et al., 2010). Buna ek olarak, Xing ve arkadaşları da akciğer kanserinin tanısında balgamda miR-205, miR-210 ve miR-708 ekspresyonu gözlenmiştir (Xing et al., 2010). Başka bir çalışmada tanı biyobelirteçleri olarak miR-574-5p ve miR-1254 miRNA'ları tavsiye edilmiştir.(Foss et al., 2011)

Akciğer kanseri tanı ve tedavisi için onkomirlerin ve tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin belirlenmesiyle, akciğer kanseri sağ kalım oranlarının artacağı düşünülmektedir.

2.2.2. Meme Kanserinde MikroRNA'lar

Moleküler yapı, mutasyon tipi, metastaz özelliği, prognoz ve tedaviye cevap açısından karışık ve heterojen bir hastalık olan meme kanseri, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) proteinlerine ait moleküler belirteçlerinin ekspresyon seviyelerine göre alt tiplere ayrılmaktadır (Reddy, 2011). Ancak bu belirteçler heterojeniteyi açıklamaya yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda moleküler teknolojik yöntemlerin uygulanması ile meme

tümörlerinin sınıflandırılması gen ekspresyon profiline göre yapılmaktadır (Anders et al., 2013).

Liu ve arkadaşları tarafından meme kanseri olan insan ve farelerde mikroçip teknolojisi ile 2004 yılında yapılan çalışmada, miRNA gen ekspresyonlarını normal doku ekspresyonu ile karşılaştırdıklarında anormal miRNA ekspresyon seviyelerinin varlığını gösterilmiştir (C.-G. Liu et al., 2004). Calin ve arkadaşları aynı yılda her dokunun kendine spesifik bir mikroRNA ekspresyonu olduğunu bildirmişlerdir (G. A. Calin et al., 2004). Buna karşılık Jiang ve ark. ise 32 kanser hücre hattındaki 222 miRNAları incelemiş ve meme ile prostat kanser hücre hatlarının birlikte kümelenme eğilimi gösterdiği, farklı dokularda benzer miRNA ekspresyon profilinin olduğunu bildirmiştir (TD et al., 2007). Shen ve ark. genetik varyasyonlar için ailesinde de meme kanseri hastalığı bulunan 42 hastanın DNA örneğini incelemiş ve 17 miRNA geninin meme tümör dokusunda ekspresyon seviyelerini göstererek BRCA1/2, ATM, PTEN, ve CHEK2 gibi meme kanserindeki önemli genleri düzenlediğini bildirmişlerdir (Shen et al., 2009).

Shenouda ve ark. tümör süpresör miRNA'ların, onkogenleri baskıladığını, insan meme kanserinde ErbB2 aşırı ekspresyon oranının yaklaşık %20 olduğunu bildirmişlerdir (Shenouda ve Alahari, 2009). SKBR3 hücrelerindeki miR125a ve miR125b aşırı ekspresyonu ErbB2'yi hedef alarak, ErbB2 protein seviyesini yaklaşık %40 oranında azaltmıştır (Z. Yu et al., 2010).

Normal insan meme epitel hücre çizgisi MCF10A kıyasla miR-145 insan kanser hücre hattı MCF-7 downregüle olduğunu gösterir. Plazmid tarafından miR-145 nin aşırı ekspresyonu, MCF-7 hücre büyümesini inhibe eder ve apoptoza neden olur. Meme kanserinde Zhu ve arkadaşları serum içinde miR-16, miR-145, miR-155 seviyeleri arasındaki ilişkiyi ve kanser riskini anlayabilmek için araştırmış ve miR-155 seviyelerinin progesteron reseptörlerinin durumu ile ilgili olduğunu bulmuşlardır (Zhu et al., 2009). Chen ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada doku örneklerinde ekspresyonu artmış olan miR-145 sağlıklı kontrolleri ile karşılaştırılan plazma örneklerinde ifade düzeylerinin azaldığını bildirilmiştir. Ancak doku ve plazma

örneklerinin stabil olmadığını rapor etmişlerdir (Ng et al., 2013). Bunun aksine Mar-Aguilar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miR-145 seviyesinin up-regüle olduğu bildirilmiştir (Mar-Aguilar et al., 2013).

2.2.3. Prostat Kanserinde MikroRNA'lar

Prostat kanseri (PCa), dünyadaki erkeklerde ikinci sırada görülen kanserdir ve kanser ölümlerinin beşinci önde gelen sebebidir (Hellerstedt ve Pienta, 2002). Bununla birlikte, PC'nin yaklaşık üçte biri agresif olup, vücudun diğer bölgelerinde metastaz eğilimindedir.

Yaklaşık 10 yıl önce ilk miRNA gen ekspresyonu profillemeye çalışmaları, prostat kansinoması da dahil olmak üzere klinik kanser numuneleri üzerinde gerçekleştirilmiştir (Volinia et al., 2006). Bu miRNA'lar kendi hedeflerine bağlandığında; miRNA ekspresyonunun kümeleme analizinin, farklı doku tiplerini açıkça birbirinden ayırdığı ve çok sayıda insan kanserinde sıklıkla ekspresyonu azalmış birkaç miRNA'nın tanımlandığı desteklenmiştir (Fu et al., 2010). Bu öncü çalışmalar kanser araştırması için miRNA profillemesinin potansiyelini vurgulamaktadır ve miRNA'ların doku ve tümör spesifik moleküler sınıflandırması için mRNA'lardan daha iyi olabileceğini önermektedir (Bonci et al., 2008). Başlangıçtaki yüksek verimli miRNA ifade çalışmaları, kötü huylu olmayan prostat dokusu ile PCa arasındaki farkları saptamaya çalışmıştır (Giraldez et al., 2006). Birçok çalışma ayrıca, farklı doku örnekleri setleri veya farklı nicel tekniklerle ilgili ek analizler yapılarak keşfi doğrulamıştır (Cimmino et al., 2005).

Let-7a, miR-106a ve miR-106b, miR-130b, dahil olmak üzere çeşitli doku kaynakları ve analiz platformlarında, kanserli olmayan dokuyla karşılaştırıldığında, MiR-18, miR-183, miR-200 ailesi, miR-21, miR-25, miR-32, miR-375, miR-141, miR-148a PCa'da ekspresyonun önemli ölçüde fazla sentezlendiği yaygın olarak bildirilmiştir (Mitchell et al., 2008). Buna karşın, miR-143/145 ailesinin ekspresyonlarının azaldığı bildirilmiştir (Mahn et al., 2011). MiRNA regülasyonunun bazı mekanizmaları PCa biyolojisinde nispeten iyi kurulmuşken, birkaç miRNA PCa

gelişiminde ve ilerlemesinde rutin olarak etkilenmiştir. PCa araştırma teknolojisi geliştikçe, hem miRNA ifade ve işlevinin anlaşılması, hem de yeni miRNA keşifleri için ışık tutacağı düşünülmektedir.

2.3. Kanser Metastazında MikroRNA'lar

2.3.1. Hipoksi ile indüklenen kanser metastazı

Hipoksi (%1 O₂, %5 CO₂ ve %94 N₂), mikro RNA'lar (miRNA'lar) da dahil olmak üzere hedef genlerin ekspresyonunu yönlendiren hipoksi uyarılabilir faktör (HIF) transkripsiyon faktörünün stabilize edilmesine yol açar. MikroRNA'ların, tümörojenez ile ilgili birçok geni düzenlediği bilinmektedir. Hipoksi ile düzenlenen miRNA'lar (HRM'ler) birçok kanser tipinde tanımlanmıştır. MiR-210 şu anda en sağlam HRM olarak kabul edilmekte ve böbrek ve baş boyun kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli farklı tümör tipleri boyunca HIF aktivasyonu sonucunda ekspresyonları artmaktadır (Camps et al., 2008).

Çeşitli kanser türlerinde mikroRNA'lardaki değişikliklerin, onkogen sinyali, parakrin faktörler ve pH değişiklikleri dahil olmak üzere birçok faktörün etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hipoksi, canlılık ve çoğalma gibi biyolojik olaylarda görev alan miRNA'ların harekete geçirilmesi için belirgin bir etkiye sahip olabilir (Ivanovic, 2009). Meme kanserinde miRNA metastazda rol oynadıklarını ortaya atan bir çok çalışmada hipoksi şartlarında çalışmalarını gerçekleştirmiştir. Kulshreshtha ve arkadaşları hipoksik bir ortamda indüklenen bir grup mikroRNA'yı tanımlamıştır. Burada, iyi bir tümör mikro çevre faktörü olan hipoksi ile mikroRNA ifadesi arasında işlevsel bir bağlantı gösterilmiştir (Kulshreshtha et al., 2007). Mikroarray temelli ekspresyon profilleri, düşük oksijene tepki olarak spesifik bir mikro RNA spektrumunun (miR-23, -24, -26, -27, -103, -107, -181, -210 ve -213 dahil) indüklendiğini ortaya çıkarmıştır. Camps ve arkadaşları ise hsa-miR-210 aşırı ekspresyonunun bir HIF-1 alpha ve VHL'ye bağlı şekilde hipoksi ile indüklendiğini ve meme kanseri örneklerinde ekspresyon düzeylerinin bağımsız bir prognostik faktör olduğunu göstermiştir (Camps et al., 2008). Hücre kültürü için hipoksik bir ortam

yaratabilen ve sürdürebilen güvenilir bir deney cihazı gerekmektedir. Böyle bir amaç için varolan birkaç model bulunmaktadır. Bunlardan biri, %1 O₂, % 5 CO₂ ve % 94 N₂ içeren düşük O₂ gazı ile doldurulabilen modüler inkübatör odasıdır (R. Wang, Jin, and Zhong, 2014). Bir başka hipoksi modeli, yüksek basınçlı sıvı azot tankı ile sağlanan N₂ infüzyonu ile O₂'yi yer değiştirerek bir hücre kültürü inkübasyon makinesidir (Post and Van Meir, 2003). Üçüncüsü, sıcaklık ve bağıl nemin yanı sıra O₂ ve CO₂'nin kesin kontrolü sunabilen hipoksi çalışma istasyonu adı verilen cihazlardır (Örn: In vivo2 Hypoxia Work Station (Ruskin Technologies)) (Esteban and Maxwell, 2005).

2.3.2. Serum yoksunluğunda kanser metastazı

Hücre kültürlerinin büyümesi için seruma ihtiyaç vardır. Serum, ilgilenilen hücrelerin hayatta kalması ve proliferasyonu ile ilgili sinyal yollarının aktivasyonuna katkıda bulunan çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerini içerir. Serumun kültür ortamından uzaklaştırılması, hücre kültürü üzerinde biyolojik bir değişimi başlatır. Hücrelerin uzun süre boyunca serumsuz kalması hücre döngüsünün durmasına hatta hücre ölümüne sebebiyet verir (Higuchi et al., 2006).

Charles ve arkadaşlarının 2005 yılında yayınladığı çalışmada, serum yoksunluğunda RGC-5 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir (Charles et al., 2005). Serum yoksunluğunun, HEK293 (insan embriyonik böbrek hücresi) hücrelerinin hücre ölümüne neden olduğu ve RelA içeren NF-κB'nin aktivasyonunun eşlik ettiği bilinmektedir (Higuchi et al., 2006). Bu sonuçlara benzer şekilde, foto-reseptör hücrelerinin foto-oksidatif kaynaklı hasarında NF-κB bağlanma aktivitesinin düşürülmesinin apoptoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Grimm, Bauer, Baeuerle, & Schulze-Osthoff, 1996). Bununla birlikte, serum deprivasyonu ile indüklenen apoptozda miRNA'nın rolü hakkında hala sınırlı bilgi bulunmaktadır. Birçok rapor, miR-145'in, serum açlığı veya antikanser ilaçları gibi strese tepki olarak transkripsiyonel olarak p53 tarafından indüklenebileceğini öne sürmektedir (Sachdeva and Mo, 2010b; Spizzo et al., 2010).

3. META ANALİZ YAKLAŞIMI

Biyobelirteçler, hücrenin normal ve patolojik işlerini değerlendirebilen, vücut sıvılarında, dokularda ve bütün organlarda ölçülebilir miktarda bulunan, aynı zamanda tedaviye yanıt olarak miktarında değişiklik gösteren moleküllerdir (Aerts et al., 2005). Hastalık patogenezinin daha iyi anlaşılması, etki değerlendirmesinin daha kesin olmasının sağlanması, doz-cevap ilişkisini belirlenmesi, hastalık olgusunun en erken aşamasını belirleme şansını vermesi açısından biyobelirteçlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Erken cevap belirteçleri hastalıklarının var olup olmadığını belirlemeye yönelik bir tarama aracı olma umudunu artırmaktadır (Tomatis et al., 1989). Önceden yapılmış olan çalışmaların sonuçlarının meta-analiz yaklaşımı ile incelenmesi, ortak verilerin tespit edilmesi, doğruluğunun sağlanması araştırılan kanser türlerinde biyobelirteçlerin belirme yolunda bize yarar sağlamaktadır (Vösa et al., 2013). Meta-analiz yöntemleri farklı kanser tiplerinde ve çeşitli hastalıklarda her geçen gün daha fazla kullanılmaktadır.

Meta-analiz, bağımsız çalışmalardan elde edilen verilerden istatistiksel olarak güçlü bir özet sağlamaktadır. Farklı araştırmacılar tarafından aynı konuda yapılan deneysel çalışmaların sonuçlarının birleştirilerek yorumlanması için modern istatistiksel yöntemler 20. yüzyıl itibariyle uygulanmaya başlanmış ve zamanla bu konuda yeni yöntemler geliştirilerek hızlı bir şekilde yayın sayısı artmıştır. İlk olarak 1976'da Glass bu çeşitli araştırmalara "Meta-analiz" adını vermiştir (Glass, 1976). Peto ve arkadaşları 1980'lerde Oxford'da yaptıkları çalışmalar sonucunda meta-analiz yöntemleri gelişmeye başlamıştır. Hedges ve Olkin 1985'te, Petitti 1994'te, meta-analizin istatistiksel yöntemlerini, Greenland ise 1987'de deneysel olmayan çalışmaların meta-analizi için istatistiksel yöntemleri detaylı bir şekilde tanımlamışlardır (Abramson and Abramson, 2009). Bu tanımlara göre ve Lipsey ve Wilson'un 2000 yılında belirttiği gibi, meta-analiz, belirli bir konuda yapılmış, birbirinden bağımsız, birden çok çalışmanın sonuçlarını birleştirme ve elde edilen araştırma bulgularının istatistiksel analizini yapma ve bunları yeniden yorumlama yöntemidir (Lipsey and Wilson, 2001).

4. REAL TIME PCR

4.1. RT-PCR ile miRNA'ların belirlenmesi

Son yıllarda bitkilerde ve hayvanlarda miRNA çalışmaları her geçen gün artarak devam etmektedir. miRNA belirlemeye yönelik birçok metot geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olanları Northern Blotting (Várallyay et al., 2008), In situ Hibridizasyon (Song et al., 2010), Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing, NGS)(Eminaga et al., 2013) ve Mikroarray analizleri(C.-G. Liu , 2008)'dir. miRNA Katitatif stem loop RT-PCR (high throughput stem-loop qRT-PCR) ekspresyon profillerinin yüksek kapasite ile belirlenmektedir. Chen ve arkadaşları tarafından 2005 yılında geliştirilen bu yöntemde, miRNA nicel belirleme yönteminde önce miRNA bir "stem-loop" primeri ile reverse transkripsiyona (RT) uğrattılıp daha sonra elde edilen cDNA'nın kalıp DNA olarak kullanıldığı TaqMan PCR analizi uygulanmaktadır. Geleneksel oligo-dt RT tepkimesine göre çok daha özgül cDNA'ların elde edilmesi ile genomik DNA kontaminasyonu da engellenmektedir (C. Chen et al., 2005). Bununla birlikte, günümüzde ters transkripsiyon (RT)-PCR tabanlı tahliller, gen örnekleme kalıplarını karakterize etmek veya doğrulamak ve farklı numune popülasyonlarında miRNA düzeylerini karşılaştırmak için en yaygın yöntemlerdir (Peltier and Latham, 2008).

Stem-loop qRT-PCR ile aynı zamanda diğer küçük RNA türleri için de uygundur. siRNA gibi diğer küçük kodlanmayan RNA'ların miktarları da belirlenebilmektedir. siRNA ve miRNA arasındaki önemli bir fark, siRNA mRNA ile tam dizi eşleşmesi yapmaya gerek duyarken, miRNA'lar ile birebir eşleşmezler (Bartel, 2004). Stem-loop RT primerleri kullanmanın çeşitli avantajları vardır. İlk olarak, miRNA'nın 3' ucuna kısa bir RT astar sekansı bağlanmasıyla, benzer miRNA'ların ayrılması için daha iyi bir spesifiteye sahiptir. İkincisi, çift sarmallı kök yapısı miRNA öncüleri ve diğer uzun RNA'ların RT astar ile hibridizasyonu engeller.

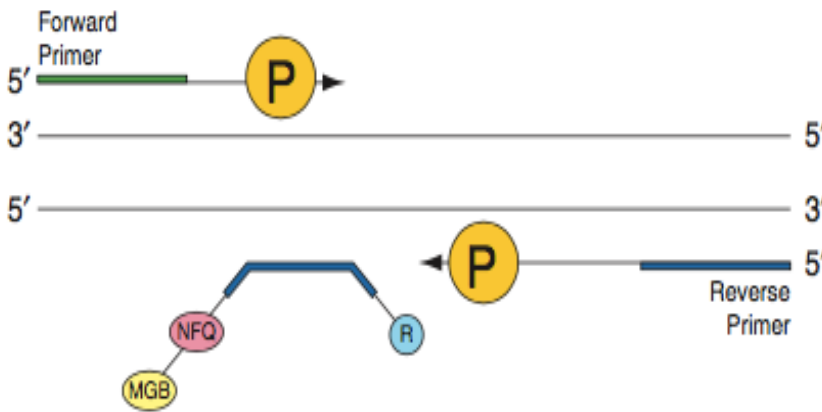
Diğer metotların aksine stem-loop qRT-PCR, yüksek hassasiyet göstermesi, sayısal olarak ölçüm olanağı sağlaması yönünden ön plandadır. Bu yöntem aynı

zamanda doku ve çeşitli hastalıklara özgül, hızlı ve duyarlı miRNA ekspresyon kalıplarının belirlenmesine de olanak vermektedir. RT- PCR yöntemi, olgun miRNA tespiti, tek baz farklılıkları ile tahlil özgüllüğü, toplam RNA miktarına karşı duyarlılık göstererek birçok avantajı sağlamaktadır. Ekspresyon değişimleri gösteren miRNA'ların belirlenmesi ile biyobelirteç özelliğine sahip olup olmadıkları araştırılır ve bu özelliğe bağlı olarak ilişkili hastalığın tanısında kullanılması mümkündür.

4.2. Taqman Prob Prensibi

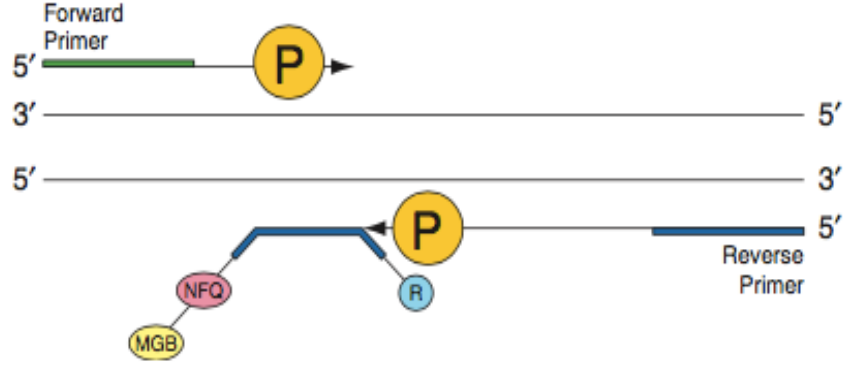
Kantitatif Real Time PCR, TaqMan® miRNA Assay'leri kullanılan bir cDNA sentez adımı gerektirir. İlk adımda, ters transkripsiyon (RT) adımı, cDNA, TaqMan® microRNA Assay'den küçük RNA'ya özgü stem-loop döngüsü RT primeri ve TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit'teki reaktifler kullanılarak toplam RNA örneklerinden ters transkripsiyonu gerçekleştirilir. İkinci adımda PCR adımı PCR ürünleri, TaqMan® Universal PCR Master Mix II ile birlikte TaqMan® Small RNA Assay kullanılarak cDNA örneklerinden amplifiye edilir (Afonina et al., 1997; Kutuyavin et al., 1997). TaqMan® MGB problemleri şunları içermektedir:

- ❖ Probu 5' ucuna bağlı bir raportör boya (FAM boyası)
- ❖ Probu 3' ucunda minör bir bağlayıcı (MGB)
- ❖ Probu 3' ucunda bir floresan söndürücü (NFQ)



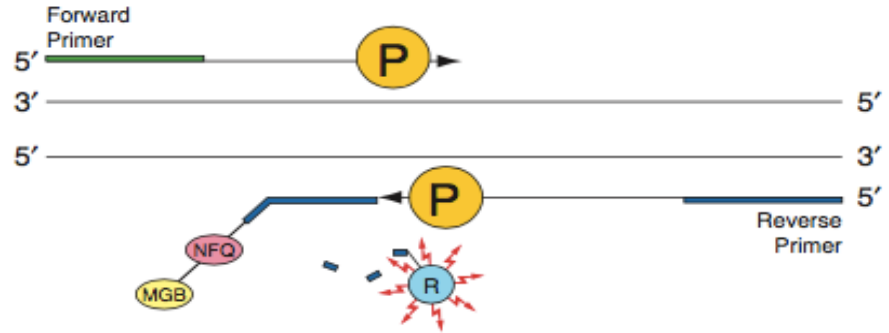
Şekil 4.1 Polimerizasyon basamağı

5' nükleaz süreci, PCR amplifikasyonu sırasında, her devirde gerçekleşir ve ürün birikimine müdahale etmez. PCR sırasında, TaqMan® MGB probu, özellikle ileri ve geri primer alanları arasındaki tamamlayıcı bir diziye bağlanır. Prob sağlam bir şekilde bağlandığı zaman, raportör boyasının söndürücü boya yakınlığı ile, Förster tipi enerji transferi tarafından raportör floresanının bastırılmasına neden olur (Förster et al., 1939) (Şekil 4.2).



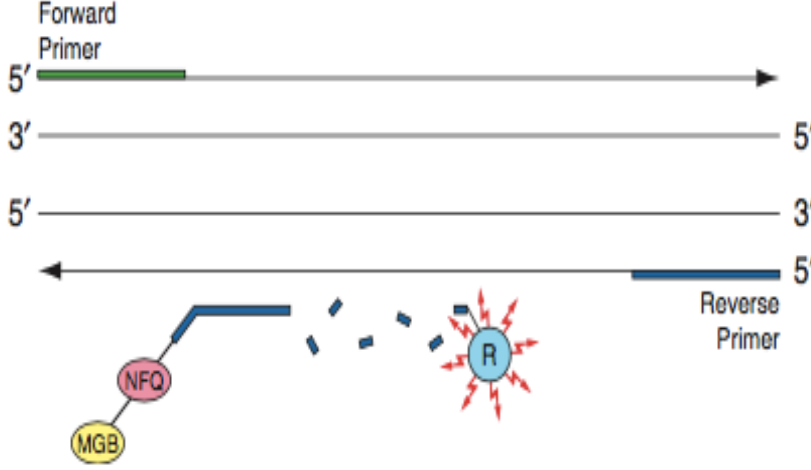
Şekil 4.2 Probu bağlanması

DNA polimeraz sadece hedefe hibridize olan probları parçalamaktadır. Parçalanma, raportör boya ve söndürücü boyayı ayırır; raportör boya tarafından floresansın artışı ile sonuçlanır.



Şekil 4.3 Hibridizasyon basamağı

Yalnızca hedef sekans, prob için tamamlayıcı olursa floresans sinyalindeki artış gerçekleşir ve PCR sırasında amplifiye edilir. Bu gereklilikler nedeniyle, spesifik olmayan amplifikasyon tespit edilmemektedir.



Şekil 4.4 Amplifikasyon basamağı

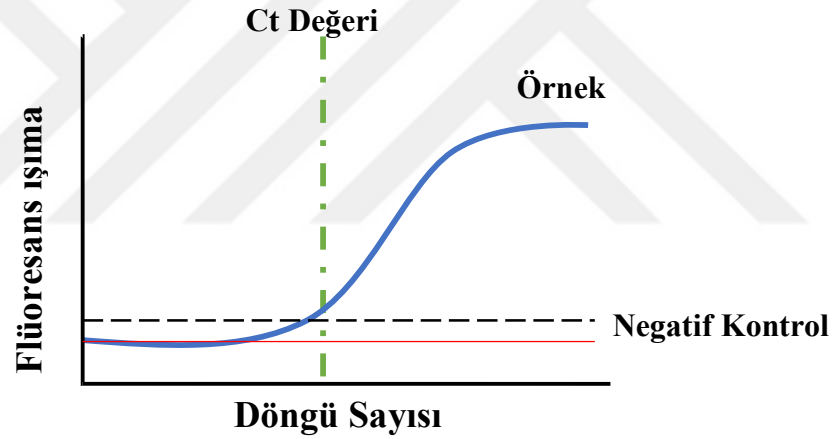
Şekil 4.4'de görüldüğü gibi ipliğin polimerizasyonu devam eder, fakat probun 3' ucu bloke edildiğinden, PCR sırasında probun uzaması olmaz (Applied Biosystems, 2005; Jung et al., 2013).

4.3. $2^{-\Delta\Delta CT}$ Analizi

Her Real Time PCR çalışması sonunda kantitatif analizlerin yapılması için oluşan çift zincirli ürün miktarı ölçülmektedir (Dvinge and Bertone, 2009). Amplifikasyon aşamasında floresan ışının eşik değerinin aşıldığı anki döngü sayısı yani saptanan eşik döngü değeri (threshold cycle=Ct) olarak adlandırılmaktadır. Verilen Ct değeri örnekteki ilk anlamlı artışın bulunduğu döngüyü gösterir ve bu Ct değeri deney analizinin hesaplanmalarında kullanılır.

Analiz kısaca, referans örneklere ait olan Ct değerleri ile, hedef örneğinin Ct değeri karşılaştırılarak yapılmaktadır. Bu nedenle, qPCR data analizlerinde standart olarak tanımlanan referans yani kontrol örneklerine ihtiyaç duyulur. Real Time PCR

yönteminde normalizasyon amacı ile deneysel uygulamalar sonucu ifade düzeyinin en az veya belirgin bir şekilde değişmediği bilinen bir referans gene ihtiyaç duyulur (Bustin, 2002). RT-qPCR deneylerinde, referans genler, şablon olarak kullanılan cDNA miktarlarındaki farklılıkların düzeltilmesi yoluyla verileri normalleştirmek için kontroller olarak kullanılır (Gutierrez et al., 2008; Huggett et al., 2005; Vandesompele et al., 2002). Dolayısıyla, mükemmel bir referans geni, çeşitli deneysel koşullardan veya zaman noktalarından örnekler arasında ekspresyonda değişiklikler göstermeyen genidir. GAPDH, ACTB veya rRNA gibi çeşitli genler referans genleri olarak sıklıkla kullanılır. Bununla birlikte, bir takım çalışmalar, bu genlerin ekspresyonunun dokular arasında veya tedaviler arasında önemli ölçüde farklılaştırabildiğini ve bu da onları referans gen olarak uygunsuz hale getirebileceğini göstermiştir. Bu nedenle, referans genler deneysel verilere dayanarak dikkatle seçilmelidir.



Şekil 4.5 Real Time PCR amplifikasyonu sırasında floresan ışıma grafiği

Real Time PCR gerçekleştirirken, örnekteki hedef sekansın veya genin miktarı belirlenmektedir. PCR reaksiyonu sırasında amplifikasyon gerçekleşirken floresan ışınması ile sinyal birikimi ilerlemesi görülmektedir. Ancak sinyalinden anlamlı bilgiler toplamak için göz ardı edilmesi gereken çok sayıda arka plan flüoresansı da bulunmaktadır. PCR yapmadan önce bir eşik seviyesi belirlenir. Bu, grafikte arka plan flüoresansının üstünde bir seviyeyi temsil eden bir çizgidir; ancak, bunun da üstel fazın

başlangıcında bir yerde reaksiyon eğrisini kesmesi gerekir (Şekil 4.5). Tepki eğrisinin eşik çizgisiyle kesiştiği nokta Ct veya "eşik döngüsü" şeklindedir. Bu nokta, örneklerinizden gerçek bir sinyali algılamak için geçen döngü sayısını gösterir. Herhangi bir Real Time PCR çalışmasında, her örnek bir Ct değerine sahiptir.

Ct değerleri örneklerdeki nükleik asit miktarının tersidir yani örnekteki kopya sayısı ile ilişkilendirilir. Düşük Ct değerleri, hedeflenen nükleik asidin yüksek miktarlarını gösterirken, daha yüksek Ct değerleri, hedef nükleik asidin daha düşük (ve hatta çok az) miktarlarını ifade etmektedir. Genellikle, 29 siklusun altındaki Ct değerleri, bol miktarda nükleik asitler gösterir. Öte yandan 38 siklusun üzerindeki Ct değerleri, asgari miktarları ve muhtemelen bir enfeksiyonu veya çevre kirliliğini gösterir. Döngünün üstel fazı başındaki floresan miktarını okumak, reaksiyonun bitiş noktasındaki floresan miktarını okumaktan daha doğrudur. Reaksiyonun son noktasına ulaşıldığında, birikmiş inhibitörler, PCR enstrüman sisteminiz, her döngü için floresan verilerini (genellikle çift sarmallı bir DNA bağlama boyasından veya bir boya etiketli sonradan) toplamaktadır. Yaklaşık 15 döngüye ulaşıldıktan sonra, arka plan flüoresan seviyesi sıfır döngüsü noktasından başlayarak düz bir çizgi olarak görünmektedir. Eşik seviyesi, bunun hemen üstündedir, örnekler de döngünün üstel faza geçmeye başladığı noktada görünmektedir. Günümüzdeki bilgisayar programları bu noktayı hesaplayabilmektedir.

Kullanılan yazılımlar ayrıca örneklerin Ct değerlerini hesaplamakta ve çizelgeler sunmaktadır. Burada yapılan hesaplama manuel olarak da yapılabilir. Hücre kültüründen veya doku kültüründen izole edilen RNA miktarında ve RNA'dan sentezlenen cDNA miktarındaki başlangıç farklılıkları, deneysel hataları normalize etmek için ilgilenilen genin ifade düzeyi, referans genin yani housekeeping genin ifade düzeyine oranlanır (Wong and Medrano, 2005). miRNA datalarında normalizasyonu için karşılaştırmalı Ct yöntemi olan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analiz istatistik yöntemi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Livak and Schmittgen, 2001). $\Delta\Delta Ct$, referans genlerinin değerleri ile örnek değerleri arasındaki farkı ölçer. Bu yöntem, referans ve hedef numunelerinizin amplifikasyon (PCR) etkinliklerinin aynı olduğunu göz önünde bulundurarak bir ana varsayım yapmaktadır.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Materyal

Aşağıdaki hücre hatları, kültür ortamları, primerler, kitler ve cihazlar çalışma materyali olarak seçildi ve kullanıldı.

5.1.1. Kullanılan Hücre Hatları

MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-10A, PC-3, LN-CAP, DU-145 ve MRC-5 hücre hatları EGE Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Biyoteröpatikler & Biyodiagnostikler Laboratuvarından, RWPE-1 hücre hattı ve A-549 hücre hattı Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Kanser Araştırmaları ve İmmun Sistem Mühendisliği Laboratuvarından temin edilmiştir.

5.1.2. Kimyasallar

- ❖ RPMI 1640 (Merck F1215, 500mL)
- ❖ Leibovitz's L-15 Medium (Sigma L5520, 500mL)
- ❖ DMEM/F12 (Sigma, D6421)
- ❖ DMEM (Sigma D5546, 500mL)
- ❖ EMEM (Sigma M4655, 500mL)
- ❖ Keratinocyte-SFM (1X) (Gibco 10725-018)
- ❖ Bovine Pituitary Extract (BPE) (Gibco 13028-014, 25 mg)
- ❖ EGF, Human Recombinant (Gibco 10450-013, 2,5 µg)
- ❖ Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom S0115) 56°C'de 30 dakika serum inaktivasyonu yapıldıktan sonra 50 mL'lik falkonlara alikotlandı ve -20°C'de saklandı.

- ❖ Gentamicin (Merck, A2712)
- ❖ Trypsin-EDTA (Sigma, T6689)
- ❖ Horse serum (Biochrom, S9135)
- ❖ L-glutamine (Sigma, G7513)
- ❖ PBS (Merck, L1825)
- ❖ DMSO (Sigma, D2650)
- ❖ Pen/Strep (Biochrom, S9135)
- ❖ EGF (Sigma, E9644, 2 mg) Ana stok steril ddH₂O ile hazırlandı. Konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde alıktlandı, -20°C’de depolandı.
- ❖ Hydrocortisone: (Sigma No. H-0888, 1g) Stok solüsyonu 200-proof etanol ile 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve alıktlanarak -20°C’de depolandı.
- ❖ Cholera toxin: (Sigma, C-8052, 2mg) Stok steril ddH₂O ile hazırlandı ve konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde alıktlandı, +4°C’de depolandı.
- ❖ Insulin (Sigma I-1882, 100mg) %1 glacial asetik asit içeren steril ddH₂O ile konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan solüsyon karıştırıldı, 10-15 dakika bekletildi, alıktlandı, -20°C’de depolandı.
- ❖ Trizol (Invitrogen™ Ambion™ TRIZOL™ Reagent, 15596018)
- ❖ İzopropil alkol (ALDRICH, W292907)
- ❖ Etanol, (200 proof, molecular biology, Sigma Aldrich, E7023)
- ❖ Kloroform (Merck, 102445)
- ❖ RNase, DNase free water (Biological Industries, 018661A)

5.1.3. Kitler ve primerler

Total RNA izolasyonundan elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi için TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4366596)

kullanıldı. Real-Time PCR için kit LightCycler® TaqMan® Master Mix (Roche Molecular Biochemicals, 04735536001) kullanıldı. Meta analiz sonrası belirlenen hsa-miR-145* için, TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-145-3p (Applied Biosystems, 4427975, Assay ID 002149), kontrol primeri olarak RNU6B (Küçük nükleolar RNA) (Applied Biosystems, 4427975, Assay ID 001093) temin edildi.

5.1.4. Cihazlar ve laboratuvar gereçleri

- ❖ CO₂'li inkübatör (Thermoscientific Forma Steri- Cycle, 371, ABD)
- ❖ Soğutmalı İnkübatör (Sanyo Incubator MIR-154, Japonya)
- ❖ Santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5810R, Almanya)
- ❖ Mini santrifüj (Eppendorf MiniSpin 22331, Almanya)
- ❖ Sıcak su banyosu (Mettler WNB14, Almanya)
- ❖ Laminar akışlı kabin (Heraeus HERAsafe HS 12 Class 2, Almanya)
- ❖ PCR cihazı (Thermo Electron Co. HBFX2220, ABD)
- ❖ Real Time PCR cihazı (Roche LightCycler 1.5, ABD)
- ❖ NanoDrop cihazı (Thermo Scientific, ND-1000, ABD)
- ❖ Işık mikroskobu (Olympus CX31, Japonya)
- ❖ Ters Faz Mikroskop (Zeiss Axio Vert A.1, Almanya)
- ❖ Hipoksi Chamber (Stem cell Technologies L chamber, 27310)
- ❖ Vorteks karıştırıcı (Heidolph Reax Top)
- ❖ Buzdolabı (+4 °C, INDESIT RG 2410 TR ECO)
- ❖ Buzdolabı (-20°C, BEKO BK 7102 DF)

- ❖ Buzdolabı (-80°C, Thermo Scientific Forma 88400V, ABD)
- ❖ Azot tankı (Thermo Scientific Cryo Tank Locator Jr 8237, ABD)
- ❖ Karışım tüpü (%1 O₂, %5 CO₂, %94 N₂, Güneş Sanayi Gazlar, Türkiye)
- ❖ Neubauer lamı (Superior)
- ❖ Hücre kültürü flaskı (filtreli 25cm², SPL 70025), (filtresiz 75cm², SPL 70175)
- ❖ Hücre kültürü çok gözlü plakalar (6 well plate, Corning® Costar® TC-Treated Multiple Well Plates, Sigma CLS3516)
- ❖ Serolojik pipet (5 mL SPLife-91005, 10mL SPLife- 91010)
- ❖ Mikropipet seti (1000, 200, 10µl)(Thermo Scientific, 4700860N)
- ❖ Santrifüj tüpü 50mL(SPLife-50050)
- ❖ Santrifüj tüpü 15mL(SPLife-50015)
- ❖ Kriyo tüp 2mL (Greiner, 122278)
- ❖ Pastör pipet (ISOLAB, 084.22.001)
- ❖ Eppendorf tüpü 1.5mL (ISOLAB 078.03.022)
- ❖ PCR tüpü
- ❖ Kapiler tüp

5.2. Metot

5.2.1. Meta-Analiz yaklaşımı

5.2.1.1. Data setlerinin seçimi

Meta analiz yönteminin uygulanması için gerekli olan data setlerinin seçimi dört adımda gerçekleştirildi. İlk adımda meme kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanseri ile ilgili miRNA çalışmalarının mikroarray verileri Gene Express Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) veri tabanında taratıldı. GEO veri tabanında anahtar kelime olarak “miRNA”, “microarray”, “breast cancer” terimleri birlikte kullanılarak taratıldı ve 213 miRNA mikroarray çalışması bulundu.

Bu tarama sonuçlarına ek olarak “homo sapiens”, “non-coding rna profiling”, “tissue” filtreleri birlikte uygulandığında mikroarray çalışmalarının 34’ünün doku örnekleri ile miRNA ekspresyon profili çıkardığı görüldü.

Aynı şekilde prostat kanseri için “miRNA”, “microarray”, “prostate cancer” terimleri ile birlikte taratılıp, yukarıda bahsedilen filtreler uygulandığında 110 mikroarray çalışmasının 25’inin doku örneklerinde miRNA profili çıkardığı tespit edildi. Akciğer kanseri için ise “miRNA”, “microarray”, “prostate cancer” terimleri beraber taratıldığında 95 mikroarray çalışması, Tablo 1’de belirtilen filtreler uygulandığında 28’inin doku örnekleriyle çalışıldığı görüldü.

Çizelge 5.1 Gene Express Omnibus veri tabanlarında tarama sonuçları (Erişim Tarihi: 01.12.2015)

Gene Express Omnibus			
Kanser türü	MiRNA*, Microarray*	Homo sapiens**, Non-coding RNA Profiling**	Tissue**
Meme Kanseri*	213	85	34
Prostat Kanseri*	110	47	25
Akciğer Kanseri*	95	46	28
*Taratılan Anahtar Kelimeler, ** Veri Tabanında Uygulanan Filtreler			

2. adımda ise üç kanser türü için yapılmış olan mikroarray çalışmaları Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) veri tabanlarında belirtilen anahtar kelimeler kullanılarak taratıldı. Array Express veri tabanında yapılan taramalarda meme kanseri için “miRNA”, “microarray”, “breast cancer” terimleri ile 192 yayın bulunmuş, filtreler uygulandığında 157’sinin data setlerine ulaşıldı. Prostat kanseri için data seti var olan 80 yayın var iken, akciğer kanseri için 99 data seti mevcuttur.

Çizelge 5.2 Array Express veri tabanlarında tarama sonuçları (Erişim Tarihi: 01.12.2015)

Array Express			
Kanser türü	MiRNA*, Microarray*	Homo sapiens**, RNA Assay**	Data Sets**
Meme Kanseri*	192	170	157
Prostat Kanseri*	90	86	80
Akciğer Kanseri*	137	106	99
*Taratılan Anahtar Kelimeler, ** Veri Tabanında Uygulanan Filtreler			

3. Adımda bu çalışmalar içinden i)Derleme olanlar ii)Organizma türü insan olmayanlar iii)Kontrol grubu içermeyenler iv)Doku çalışmaları olmayan çalışmalar çıkarıldı. 4. adımda geriye kalan data setleri manuel olarak gözden geçirildi, her kanser türü için 2 data seti seçildi.

5.2.1.2. Akciğer kanseri için seçilen data setleri

Ohba ve Nagano tarafından yapılan GSE19945 data setinde Agilent Human 0.6K miRNA Microarray G4471A platformu kullanıldı. Bu data setinde 8 normal doku, 46 tümör doku örneğini içermektedir.

Bjaanaes ve ark. tarafından yapılan GSE48414 data setinde Agilent-031181 Unrestricted Human miRNA V16.0 Microarray (miRBase release 16.0 miRNA ID version) platformu kullanıldı. Bu data setinde 20 normal doku, 154 tümör doku örneğini içermektedir.

Çizelge 5.3 Akciğer kanseri için seçilen data setleri ve özellikleri

miRNA ID	Platform İsmi	Normal doku	Kanser doku
GSE19945	Agilent Human 0.6K miRNA Microarray G4471A	8	46
GSE48414	Agilent-031181 Unrestricted_Human_miRNA_V16.0_Microarray (miRBase release 16.0 miRNA ID version)	20	154
Toplam		28	200

5.2.1.3. Meme kanseri için seçilen data setleri

Lee ve arkadaşları tarafından yapılan GSE45666 data setinde Agilent-021827 Human miRNA Microarray G4470C platformu kullanıldı. Bu data setinde 15 normal doku, 101 tümör doku örneğini içermektedir.

Aure ve arkadaşları tarafından yapılan GSE58210 data setinde Agilent-029297 Human miRNA Microarray v14 Rev.2 platformu kullanıldı. Bu data setinde 6 normal doku, 277 tümör doku örneğini içermektedir.

Çizelge 5.4 Meme kanseri için seçilen data setler ve özellikleri

miRNA ID	Platform İsmi	Normal doku	Tümör doku
GSE45666	Agilent-021827 Human miRNA Microarray G4470C (Feature Number version)	15	101
GSE58210	Agilent-029297 Human miRNA Microarray v14 Rev.2 (miRNA ID version)	6	277
Toplam		21	378

5.2.1.4. Prostat Kanseri İçin Seçilen Data Setleri

Gandellini ve ark. tarafından yapılan GSE76260 data setinde Illumina Human v2 MicroRNA expression beadchip platformu kullanıldı. Bu data setinde 32 normal doku, 32 tümör doku örneğini içermektedir.

Taylor ve arkadaşları tarafından yapılan GSE21036 data setinde Agilent-019118 Human miRNA Microarray 2.0 G4470B platformu kullanıldı. Bu data setinde 28 normal doku, 113 tümör doku örneğini içermektedir.

Çizelge 5.5 Prostat kanseri için data setleri ve özellikleri

miRNA ID	Platform İsmi	Normal doku	Tümör doku
GSE76260	Illumina Human v2 MicroRNA expression beadchip	32	32
GSE21036	Agilent-019118 Human miRNA Microarray 2.0 G4470B (miRNA ID version)	28	113
Toplam		60	145

5.2.1.5. Veri kümelerinin yeniden yapılandırılması

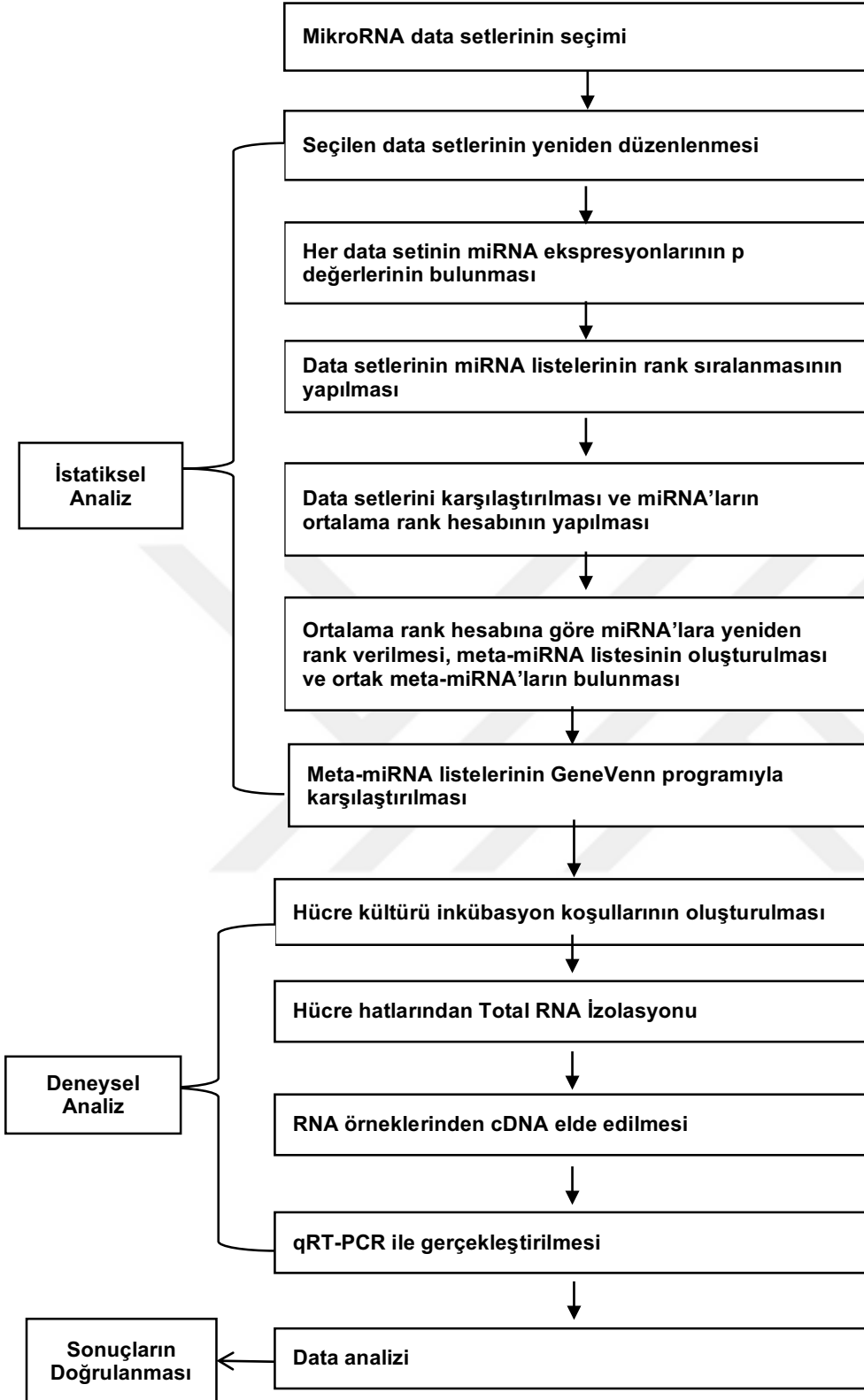
GEO ve Array Express veri tabanlarının karşılaştırılması sonucunda seçilen data setleri (GSE45666, GSE58210, GSE76260, GSE21036, GSE19945, GSE48414) seçildikten sonra genel akış şemasında da gösterildiği gibi ilk olarak GEO2R programı yardımı ile kontrol ve test gruplarına göre tekrardan gruplandırılarak düzenlendi. Bu aşamada örnekler “Grupları Tanımlayın” sekmesi ile test grupları, kontrol grupları şeklinde grup kategorileri belirlendi. Eğer data setinde birden fazla platform kullanılmışsa bu dikkate alındı ve ilgilendiğimiz platform seçildikten sonra, tablonun sağ üst köşesindeki “sütun ayarları” bölümünden sütunlarda görmek istediğimiz başlıklar ayarlandı.

Örnekler tanımlanan grup kategorilerine göre normal doku örnekleri kontrol grubu olacak şekilde, kanser dokuları ise grade sınıflarına göre tanımlanmış test grupları olacak şekilde gruplara atandı. Gruplara atanmış örnekleri test etmek için “Top 250” sekmesine tıkladığımızda karşımıza p değerlerine göre sıralanan ID numaraları ile listelenmiş miRNA ekspresyon sonuçlarına ulaşıldı. *P* değeri bize o miRNA'nın örnek grupları içindeki anlamlılık düzeyini vermektedir. *P* değerinin çok küçük olması söz konusu miRNA'nın diğer miRNA'lara göre belirgin derecede çok ya da az eksprese olduğu anlamına gelmektedir. Listede en küçük *P* değerine sahip

miRNA'lara göre bir dizilim oluşturuldu. "Seç" bölümünden örneklerin özellik ve açıklama sütunlarını değiştirmek mümkündür. Her değişiklik sonrası "Yeniden Hesapla" butonuna basıldı ve yapılan düzenlemelerin tabloya uygulanması sağlandı. "Sonuçları kaydet" butonu ile oluşturulan tabloyu kaydedildi.

Daha sonra, dosya excel programında aktarıldı ve her data setinin p değerlerine göre sıralanmış olan miRNA tabloları düzenlendi. Oluşturulan excel tablosu Microsoft Access 2010 (Moffat, 2012) programı içine aktarıldı. Her kanser türü için 2, toplamda 6 olan data setlerinin kendi aralarında karşılaştırmalarını yapabilmek için P değerlerine göre listelenen miRNA listelerine Access programı yardımıyla rank tabanlı sıralama uygulandı. Verilen ranklar, söz konusu miRNA'nın diğer data setindeki sıralamasını göstermektedir. Rank değerleri bulunduktan sonra bu rankların ortalaması alınıp, bir sonraki sütuna ortalama değerleri yazılarak, bu sütuna "Ortalama Rank" adı verilerek ve küçükten büyüğe sıralandı.. Oluşturulan listedeki sıraya göre "Final Rank" olarak adlandırılan yeni bir sütuna tekrardan rank değerleri verildi.

Seçilen 6 data setinin karşılaştırılmasından sonra, kanser türlerinin kendi aralarında da karşılaştırılması yapıldı. Meme Kanseri için seçilen GSE45666 ve GSE58210 data setlerinin yeniden düzenlenmesiyle oluşturulan miRNA tabloları ACCESS programına aktarılıp karşılaştırıldı ve tekrar rank değerleri verildi. Aynı basamaklar ayrı olarak prostat kanseri için seçilen GSE76260 ve GSE21036 data setlerine uygulandığı gibi akciğer kanseri için seçilen GSE19945 ve GSE48414 data setlerine uygulandı. Meme, akciğer ve prostat kanseri için seçilen data setleri için ayrı ayrı oluşturulan tablolardan elde edilen miRNA listeleri GeneVenn (<http://genevenn.sourceforge.net/>) programına aktarıldı. Ayrıca belirlenen meta-miRNA'ların DIANA mirPath v.3 (<http://goo.gl/3MjaUR>) ile yolak analizi yapıldı.



Şekil 5.1 Genel Çalışma Şeması

Meta-analiz yöntemi ile belirlenen ortak meta-miRNA listesinden rank tabanlı sıralamaya göre anlamlılık değeri diğerlerinden fazla olan ilk miRNA seçildi. Tablo 7'de ise miR-145* ve referans gen olarak seçilen RNU6B'ın (endojen, kodlanmayan, small RNA) sekans dizilimi bulunmaktadır.

Çizelge 5.6 Seçilen miRNA ve referans genin sekans dizilimi

Primer	Tür	Sekans
hsa-miR-145-3p	insan	GGAUCCUGGAAAUACUGUUCU
RNU6B	insan	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTTT

5.2.2. Hücre kültürü

Tez kapsamında miR-145-3p'nin kanser metastazında potansiyel bir rolünün kanıtlanması için her kanser türüne ait metastatik bölgeden türevlenen 2 ya da 3 hücre hattı, ayrıca karşılaştırılması için aynı dokudan türevlenen 1 adet normal hücre hattı olmak üzere toplam 11 hücre hattı seçildi. Bu aşamada meme, akciğer ve prostat normal hücre hatlarının çoğalabildiği uygun kültür şartları oluşturuldu. Hücre hatlarının inkübasyon koşulları, kültür ortamları, pasajlama, dondurma ve çözme işlemleri alt başlıklar halinde belirtildi.

5.2.2.1. İnkübasyon

❖ **MCF-7 hücre kültürü:** Hücrelerin büyümesini sağlamak için RPMI 1640 besin ortamı içerisine %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Gentamisin ve %0,1 Penisilin-Streptomisin eklenildi. Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik monolayer kültür kaplarında 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kültür kaplarındaki büyüme ortamları 2 günde bir tazelenildi.

❖ **MCF-10A hücre kültürü:** Hücrelerin büyümesini sağlamak için çizelge 5.7. büyüme ortamı hazırlandı. Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik monolayer kültür

kaplarında 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kültür kaplarındaki büyüme ortamları 2 günde bir tazelandı.

Çizelge 5.7 MCF10A büyüme ortamı

Malzeme	Final Konsantrasyonu
EGF	20ng/mL
Hydrocortisone	0,5µg/mL
Chlora Toxin	100ng/mL
Insulin	10µg/mL
Pen/Strep	%1
DMEM/F12	%94
Horse Serum	%5

❖ **MDA-MB-231 hücre kültürü:** Hücrelerin büyümesini sağlamak için Leibovitz's L-15 Medium besin ortamı içerisine %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Gentamisin ve %0,1 Penisilin-Streptomisin eklendi. Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik kültür kaplarında 37°C'de inkübe edilerek çoğaltıldı. Filtresiz kültür kaplarındaki büyüme ortamları 2 günde bir tazelandı.

❖ **MDA-MB-453 hücre kültürü:** Hücrelerin büyümesini sağlamak için Leibovitz's L-15 Medium besin ortamı içerisine %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Gentamisin ve %0,1 Penisilin-Streptomisin eklendi. Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik kültür kaplarında 37°C'de inkübe edilerek çoğaltıldı. Filtresiz kültür kaplarındaki büyüme ortamları 2 günde bir tazelandı.

❖ **LNCAP hücre kültürü:** Hücrelerin büyümesini sağlamak için RPMI 1640 besin ortamı içerisine %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Gentamisin ve %0,1 Penisilin-Streptomisin eklendi. Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik monolayer kültür kaplarında 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kültür kaplarındaki büyüme ortamları 2 günde bir tazelandı.

❖ **PC-3 hücre kültürü:** Hücrelerin büyümesini sağlamak için RPM1 1640 besin ortamı içerisine %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Gentamisin ve %0,1 Penisilin-Streptomisin eklendi. Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik monolayer kültür kaplarında 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kültür kaplarındaki büyüme ortamları 2 günde bir tazelandı.

❖ **DU145 hücre kültürü:** Hücrelerin büyümesini sağlamak için RPM1 1640 besin ortamı içerisine %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Gentamisin ve %0,1 Penisilin-Streptomisin eklendi. Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik monolayer kültür kaplarında 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kültür kaplarındaki büyüme ortamları 2 günde bir tazelandı.

❖ **RWPE-1 hücre kültürü:** Hücrelerin büyümesini sağlamak için K-SFM besin ortamı içerisine son konsantrasyonu 5ng/mL olacak şekilde EGF, 0,05mg/mL BPE eklendi. Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik monolayer kültür kaplarında 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kültür kaplarındaki büyüme ortamları 2 günde bir tazelandı.

❖ **A-549 hücre kültürü:** Hücrelerin büyümesini sağlamak için DMEM besin ortamı içerisine %10 FBS, %1 L-glutamin ve %0,1 Penisilin-Streptomisin eklendi. Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik monolayer kültür kaplarında 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kültür kaplarındaki büyüme ortamları 2 günde bir tazelandı.

❖ **MRC-5 hücre kültürü:** Hücrelerin büyümesini sağlamak için EMEM besin ortamı içerisine %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Gentamisin ve %0,1 Penisilin-Streptomisin eklendi. Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik monolayer kültür kaplarında 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kültür kaplarındaki büyüme ortamları 2 günde bir tazelandı.

❖ **NCI-H82 hücre kültürü:** Hücrelerin büyümesini sağlamak için RPM1 1640 besin ortamı içerisine %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Gentamisin ve %0,1

Penisilin-Streptomisin eklenildi. Hücreler 25 ya da 75 cm²'lik süspanse kültür kaplarında 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kültür kaplarındaki büyüme ortamları 2 günde bir tazelenildi.

5.2.2.2. Pasajlama

Genel olarak pasajlama prosedürü şu şekildedir. Monolayer kültür için hücreler flaskın yüzeyinin %70-80'ni kapladığında flask içerisindeki kültür ortamı pipetle alındı, PBS (25 cm² için 2 mL) ile yıkandı, ardından PBS pipetle uzaklaştırıldı ve hücrelerin tutunduğu flask yüzeyinden kaldırılması için 1 mL tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildikten sonra 37°C, CO₂'siz inkübatörde 5-10 dakika bekletildi. Mikroskopla bakılarak hücrelerin yüzeyden kalktığı görüldükten sonra, tripsinin inhibisyonu için tripsin hacminin en az iki katı kadar taze besin ortamı flaska eklendi ve hücre süspansiyonu 15 mL hacimli bir tüp içerisine alındı. Süspanse kültürlerde tripsinizasyon yapılmadan hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne aktarıldı. Santrifüj tüpü 1000 rpm'de 5 dakika 4 °C' de santrifüj edildi, ardından süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler taze besin ortamı ile homojenize edilerek 1:3 veya 1:4 oranında yeni kültür kaplarına aktarıldı.

5.2.2.3. Dondurma

Hücrelerin stoklanması aşamasında %10 dimetilsülfoksit (DMSO), %90 FBS içeren ortam ile 2 ml'lik tüplere 1'er mL olacak şekilde bölünmüştür. +4°C'de 1 saat, -20 °C 'de 4 saat bekletildikten sonra -80°C'de bir gece dondurulduktan sonra sıvı azot tankına alınarak stok olarak saklandı.

5.2.2.4. Çözdürme

Çözdürme işlemi uygulanacak hücrenin besin ortamı 15mL santrifüj tüpüne 5mL şeklinde konuldu. Sıvı azot tankından çıkarılan kriyotüpler, 37°C'ye ayarlanan su banyosunda çözüldü. Ardından kriyotüpün içerisindeki serum ve DMSO karışımının içinde bulunan hücre süspansiyonu önceden ayarlanan santrifüj tüpüne aktarıldı. Santrifüj tüpü 1000 rpm'de 5 dakika 4°C' de santrifüj edildi, ardından süpernatant

uzaklaştırıldı. Hücreler taze besin ortamı ile homojenize edilerek uygun kültür kabına aktarıldı.

5.2.3. Deney setleri

Pasajlanan hücreler deney setinde ayarlanan inkübasyon şartlarına uygun bir şekilde 48 saat inkübe edildi. Meme, akciğer ve prostat dokusunu temsil eden 11 hücre hattının normoksi koşullarına ek olarak, hipoksi (%1 O₂, %5 CO₂ ve % 94 N₂) koşullarında ve serum yoksunluğunda inkübasyonları kapsayan 3 farklı deney seti kuruldu.

5.2.3.1. Normoksi koşulları

Bu deney setinde hücrelerin normal koşullarda büyümesi gerçekleştirildi. Her hücre hattından 6 gözlü plakalara 1x10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin yüzeye tamamen tutunabilmesi için hücreler 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücrenin büyüme ortamı uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyi PBS ile 2-3 kez yıkandıktan sonra hücrelere yeni ortam eklendi. 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

5.2.3.2. Hipoksi koşulları

Oksijen yoksunluğundan kanser metastazının arttığını ve bunun da hücrelerde miRNA ifadesinde de değişiklik meydana getirebileceği varsayıldı. Bunun üzerine kurulan ikinci deney setinde her hücre hattından 6 gözlü plakalara 1x10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin yüzeye tamamen tutunabilmesi için hücreler 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücrenin büyüme ortamı uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyi PBS ile 2-3 kez yıkandıktan sonra hücrelere yeni ortam eklendi. Hücreler kültür plakaları Hipoksi Chamber'a konuldu. Kilitlerinin tamamen kapatıldığından emin olduktan sonra %1 O₂, %5 CO₂ ve %94 N₂ içeren gaz karışım tüpü Chamber'a bağlandı, içerdeki havanın dışarı atılması ve yeni gaz karışımının içeride kalması için 5 dk boyunca Chamber'ın içinden gaz geçirildi. Daha

sonra hava çıkış boruları tamamen kapatıldı ve içerisinde %1O₂, %5CO₂ ve %94N₂ içeren gaz karışım bulunan Chamber 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

5.2.3.3. Serumsuz ortam koşulları

Serum yoksunluğundan etkilenen ve biyolojik olarak değişimler yaşayan hücrenin miRNA ifadesinde de değişiklik meydana getirmesi varsayıldı. Bunun üzerine kurulan üçüncü deney setinde her hücre hattından 6 gözlü plakalara 1x10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin yüzeye tamamen tutunabilmesi için hücreler 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücrenin büyüme ortamı uzaklaştırıldı. Serumun tamamen uzaklaştırılması için hücrelerin yüzeyi PBS ile 2-3 kez yıkandı. Ardından hücrelere içinde serum bulundurmayan besin ortamı eklendi. Hücreler, 48 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

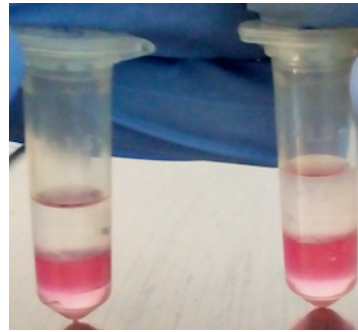
5.2.4. Total RNA izolasyonu

❖ 6 gözlü hücre kültürü plakalarındaki her bir göz için (2x10⁶ hücre başına) 1 mL TRIZOL reaktifi hücrelerin üzerine aktarıldı ve iyice pipetaj yapılarak homojenize edildi. Daha sonra hücreleri içeren lizat 1,5 mL eppendorf tüpüne aktarıldı.

❖ İçinde TRIZOL reaktifi ve hücreleri bulunduran eppendorf tüpleri +4°C'de 13.000rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni eppendorf tüpüne aktarıldı ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

❖ Süpernatantın üzerine 0,2 ml kloroform eklendi ve eppendorf tüpü hızlı bir şekilde 15 sn boyunca çalkalandı. 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve +4°C'de 13.000 rpm de 15 dakika santrifüj edildi.

❖ Santrifüj sonrası eppendorf tüpünde 3 ayrı faz görüldü. Üstte kalan şeffaf kısımdan 400µL altındaki faza dokunulmadan yeni eppendorf tüpüne aktarıldı.



Şekil 5.2 Faz ayrımı

- ❖ Üzerine 0,5 ml izopropil alkol eklenip, ve 5-10 defa alt üst edildi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletilip ve +4°C’de 13.000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi.
- ❖ Eppendorfun tabanında total RNA’nın beyaz jelimsi bir şekilde presipite olduğu görüldü. Süpernatant pipetle uzaklaştırıldı.
- ❖ RNA peletinin üzerine soğuk %75 etanol eklendi ve pipetle süspanse edildi. +4°C’de 10.000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- ❖ Süpernatant pipetle uzaklaştırıldı ve eppendorfun kapağı açıldı, RNA’lar 15-20 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- ❖ Kuruma işlemi bittikten sonra RNA’ların üzerine 50 µL RNase içermeyen su eklendi ve RNA ölçümü için 5 µL örnek yeni eppendorf aktarıldı. Kalan 45 µL RNA -86 °C’ye alındı. Kullanılmadan önce NanoDrop cihazında ölçüm yapıldı.

5.2.5. cDNA sentezi

RNA örneklerinden cDNA eldesi için TaqMan® MicroRNA Reverse Transkripsiyon kiti kullanıldı. Kit prosedürü aşağıda belirtilen şekilde uygulandı. MikroRNA’lar için cDNA sentezinde özel olarak tasarlanmış hsa-miR-145-3p (4427975; Thermo Fisher Scientific) ve RNU6B Kontrol (001093; Thermo Fisher Scientific) TaqMan mikroRNA test sistemleri (5X) kullanılmıştır.

Çizelge 5.8 cDNA sentezi ve RT-PCR için kullanılan MikroRNA Assay primerleri

cDNA sentezi ve RT-PCR için kullanılan primerler	
Hsa-miR-145-3p (5X-20X)	5'-GGAUCCUGGAAAUACUGUUCU-3'
RNU6B (5X-20X)	5'-CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTCCATATTTTT -3'

5.2.5.1. Master Karışımın Hazırlanması

- ❖ Kit bileşenleri buz üzerinde çözüldü.
- ❖ RT (reverse transcriptase) Çizelge 5.9’da görüldüğü gibi hazırlandı.
- ❖ Listelenen kit bileşenlerinden belirtilen hacimler alınarak RT master karışımı bir adet 1.5 mL santrifüj tüpü içerisinde buz üzerinde hazırlandı.

Çizelge 5.9 RT-PCR için reaksiyon karışımının hazırlanması

Reaksiyon İçeriği	Karışım Miktarı
100 mM dNTP’ler	0,15 µL
MultiScribe Revers Transkriptaz, 50U/ µl	1 µL
10X Revers Transkripsiyon Tamponu	1,5 µL
RNaz inhibitörü, 20U/ µl	0,19 µL
Nükleaz içermeyen distile su	4,16 µL
Toplam	7µL

- ❖ Nazikçe karıştırıldı. Tüpün tabanına solüsyonu getirmek için kısa bir santrifüj yapıldı.
- ❖ RNA örnekleri hazırlanana kadar RT master karışımı buz üzerine bekletildi.

5.2.5.2. RT reaksiyonunun hazırlanması

- ❖ Buz üzerinde 5 x RT primerini ve RNA şablonunu çözüldü.
- ❖ İzole edilen RNA’lar kullanılmadan önce düşük hızda 4-5 saniye kadar santrifüjlenerak karışmaları sağlandı. Her bir 15-µL RT reaksiyonu için, 0.2 mL’lik

PCR tüpüne 7 µL master karışından eklendi üzerine 5 µL Total RNA (reaksiyon başına 1 ila 10 ng RNA) konuldu.

- ❖ Tüpün tabanına solüsyonu getirmek için kısa bir santrifüjleme yapıldı.
- ❖ Kullanmadan hemen önce, karıştırılması için RT primer tüpleri vortekslendi, ardından kısa bir süre santrifüj yapıldı.
- ❖ PCR tüpünde bulunan 12 µL'lik karışımın üzerine 5X RT primerinden 3 µL eklendi.
- ❖ Karışım iyice çalkalandıktan sonra termal cycler yüklemeye hazır oluncaya kadar buz üzerinde tutuldu.

5.2.5.3. Ters transkripsiyonun gerçekleştirilmesi

- ❖ Termal cycler programlamak için aşağıdaki parametre değerlerini kullanıldı.

Çizelge 5.10 RT PCR için Thermal Cycler programı

Zaman	Sıcaklık
30 dakika	16 ° C
30 dakika	42 ° C
5 dakika	85 ° C
∞	4 ° C

- ❖ Reaksiyon hacmini 15.0 µL'ye ayarlandı.
- ❖ Reaksiyon tüpleri PCR cihazına yüklendi.
- ❖ Programı başlatıldı.
- ❖ Real Time PCR aşamasına kadar RT reaksiyonunundan elde edilen cDNA örnekleri - 20 ° C'de saklanmıştır.

5.2.6. Real-Time PCR

TaqMan mikroRNA test sistemleri kullanılarak sentezlenen cDNA'lar ile Real Time PCR'da miR-145-3p'nin ifadesi incelendi. LightCycler® TaqMan® Master Mix ile mikroRNA assay sistemleri (20X; miR-145-3p ve RNU6B Kontrol; Çizelge 5.7) ve LightCycler® 1.5 cihazı kullanılarak Real-Time PCR gerçekleştirildi.

Çizelge 5.11 Real-Time PCR reaksiyon karışımı

Reaksiyon içeriği	Reaksiyon karışım miktarı
Taqman Universal PCR Master mix II (5X)	2 µL
Nükleaz içermeyen su	6,835 µL
Taqman Small RNA Test Sistemi (20X RT primer)	0,5 µL
cDNA	0,665 µL
Toplam	10 µL

Çizelge 5.12 Real-Time PCR reaksiyon koşulları

Zaman	Sıcaklık	50 Döngü
10 dakika	95 °C	
15 saniye	95 °C	
60 saniye	60 °C	

5.2.7. Veri analizi

MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-10A, DU145, LNCAP, PC-3, RWPE-1, A549, MRC-5, NCI-H82 hücre hatlarındaki miRNA datalarında karşılaştırmalı Ct yöntemi olan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analiz istatistik yöntemi kullanıldı (Livak and Schmittgen, 2001). Referans olarak snRNA U6 kullanılarak normalleştirme gerçekleştirildi (RNU6B Taqman mikroRNA Assay, Applied Biosystems). $P < 0,05$ anlamlılık seviyesi olarak kabul edildi.

Ct değerleri excel programına aktarıldı. Endojen kontrolün yani RNU6B'nin (referans) Ct değerlerinin ortalaması alındı. Aynı şekilde normoksi inkübasyonundaki örneğine (kalibratöre) ait miR-145-3p'nin Ct değerlerinin ortalaması alındı. Bu iki CT farkı işlenmemiş örneğin ΔCT değerini vermektedir.

$$\Delta CT = \text{ortalama CT(hedef gen)} - \text{ortalama CT(referans)}$$

$$\Delta\Delta CT = \text{ortalama } \Delta CT (\text{test}) - \Delta CT(\text{kalibratör})$$

Şekil 5.3 $\Delta\Delta CT$ hesaplamaları için gerekli formüller

Daha sonra örnek Ct değerlerinin standart sapması hesaplandı ve ΔCT değerine eklendi. ΔCT , yukarıdaki formüle göre hesaplandıktan sonra, $2^{-\Delta\Delta CT}$ cinsinden ifade edildi. ΔCT , miRNA ve U6 ampliconları arasındaki eşik döngüleri arasındaki farktır. Buradan çıkarılan yorum ise şöyledir; ekspresyonu artan genin (upregüle) $1-\infty$ ölçeği arasında bulunurken ekspresyonu azalan genin (down regüle) olan genin $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri 0-1 arasındadır.

5.3. İstatiksel Analiz

Tez kapsamında yapılan deneylerin değerlendirmelerinde, qRT-PCR sonuçları Roche LightCycler yazılımı ile kantite edilmiştir. miR-145 miRNA'sının verileri RNU6B geniyle normalize edilip $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülünden çıkan verilerle istatistiksel analiz gerçekleştirildi. miR-145'in ekspresyon düzeyi normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğu deney setleri arasında anlamlı bir farkın olup olmadığını incelemek için ANOVA tabanlı T-Test analizi uygulandı.



6. BULGULAR

6.1. Meta-miRNA Listelerinin oluşturulması

GEO ve Array Express veri tabanlarının karşılaştırılması sonucunda seçilen data setleri (GSE45666, GSE58210, GSE76260, GSE21036, GSE19945, GSE48414) genel akış şemasında da gösterildiği gibi ilk olarak GEO2R programı ile düzenlendi.

Çizelge 6.1 Ortak meta-miRNA'ların Ortalama Rank ve Final Rank değerleri

miRNA_ID	GSE45666 Rank	GSE58210 Rank	GSE76260 Rank	GSE21036 Rank	GSE19945 Rank	GSE48414 Rank	Ortalama Rank	Final Rank
hsa-miR-145*	16	118	86	5	11	73	32,67	1
hsa-miR-130b	36	42	119	31	4	20	40,17	2
hsa-miR-183	55	224	84	30	2	46	41,17	3
hsa-miR-139-5p	1	15	49	53	103	54	52,17	4
hsa-miR-218	47	98	202	34	88	28	72,17	5
hsa-miR-96	70	173	203	46	3	74	73,67	6
hsa-miR-30c	38	68	195	64	74	18	75,50	7
hsa-miR-210	28	13	156	139	43	27	88,67	8
hsa-miR-99a	3	6	293	26	183	11	90,33	9
hsa-miR-125b-2*	4	70	167	94	127	112	99,67	10
hsa-miR-30c-2*	94	73	24	228	6	75	109,17	11
hsa-miR-30a*	12	24	129	238	47	10	112,33	12
hsa-miR-30e*	18	190	1	116	215	215	113,50	13
hsa-miR-378*	57	111	253	155	102	58	130,00	14
hsa-miR-638	66	126	208	219	5	145	143,67	15
hsa-miR-328	14	261	104	266	231	12	148,83	16
hsa-miR-502-5p	79	139	103	249	243	67	165,00	17
hsa-miR-125a-5p	556	165	122	176	249	202	246,83	18
hsa-miR-7-1*	198	218	171	127	131	839	265,50	19
hsa-miR-495	77	94	138	170	197	910	277,00	20
hsa-miR-142-3p	98	87	291	91	202	909	280,33	21
hsa-miR-200c	217	184	281	152	78	818	283,00	22
hsa-miR-454	223	197	189	269	99	902	325,17	23
hsa-miR-193a-5p	394	242	236	288	167	868	373,50	24

Data setlerinden elde edilen listeler Microsoft Access 2010 programına aktarıldı ve rank tabanlı meta analiz yöntemi uygulandı. 6 adet data setine ait meta-miRNA listeleri karşılaştırıldığında Çizelge 6.1'deki veriler elde edildi.

Çizelge 6.2 Ortak meta-miRNA'ların KEGG yolakları

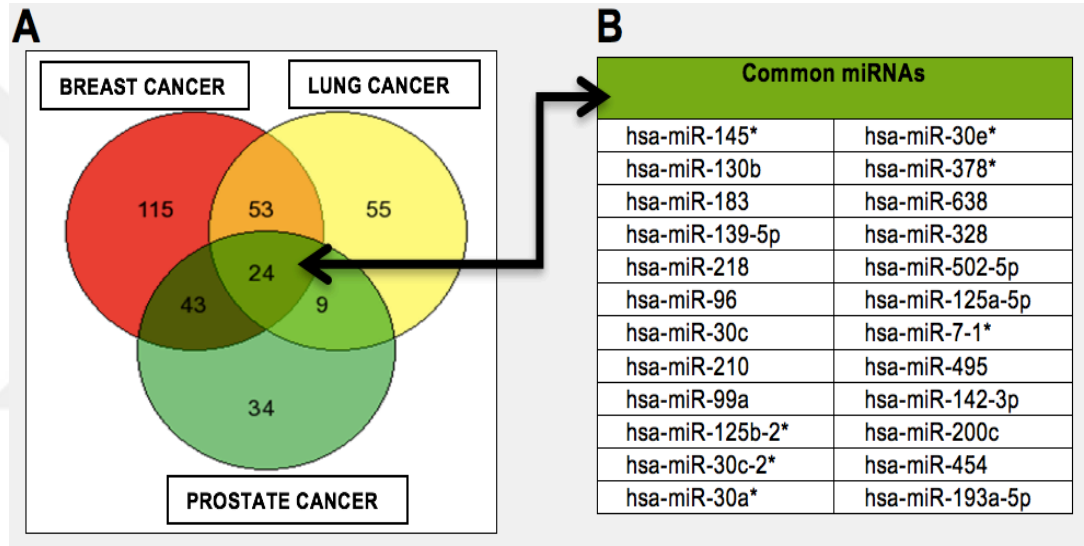
Sıra	KEGG yolakları	p- değeri	genler	miRNA'lar
1	Proteoglycans in cancer (hsa05205)	2,89E-04	137	23
2	Prostate cancer (hsa05215)	1,35E+05	66	23
3	ErbB signaling pathway (hsa04012)	1,83E+05	61	22
4	Hippo signaling pathway (hsa04390)	3,91E+05	89	21
5	Pathways in cancer (rno05200)	5,99E+05	233	24
6	Estrogen signaling pathway (hsa04915)	1,75E+06	62	23
7	p53 signaling pathway (hsa04115)	2,08E+06	50	19
8	Focal adhesion (hsa04510)	3,12E+06	130	23
9	Endometrial cancer (hsa05213)	5,00E+06	39	22
10	Cell cycle (hsa04110)	7,14E+03	81	20
11	Pancreatic cancer (hsa05212)	0,00017	45	21
12	Colorectal cancer (hsa05210)	0,00018	42	20
13	Renal cell carcinoma (hsa05211)	0,0002	47	21
14	Chronic myeloid leukemia (hsa05220)	0,0003	50	22
15	TNF signaling pathway (hsa04668)	0,00042	73	23
16	Small cell lung cancer (hsa05222)	0,00102	57	22
17	Non-small cell lung cancer (hsa05223)	0,00125	38	21
18	Phosphatidylinositol signaling system (hsa04070)	0,00284	52	19
19	Central carbon metabolism in cancer (hsa05230)	0,00284	43	20
20	Bladder cancer (hsa05219)	0,00526	28	16
21	Transcriptional misregulation in cancer (hsa05202)	0,00574	107	21

Meme, akciğer ve prostat kanseri için seçilen 6 data setinde meta analiz yöntemi ile ortak olan 24 adet miRNA bulundu. Bu 24 miRNA'nın DIANA mirPath v.3 ile yapılan yolak analizinde ($p < 0.01$) 21'inin bilinen bir kanser sinyalleme yolağı olan

Hippo yolağında (Harvey et al., 2013) ve kanser proteoglikan yolağındaki (Edwards, 2012) genleri ortak olarak kontrol ettiği görülmektedir (<http://goo.gl/3MjaUR>).

6.2. Meta-miRNA Listelerinin GeneVenn Programı ile Karşılaştırılması

Meta-analizi yöntemi kullanılarak bir önceki adımda meme, akciğer ve prostat kanseri için oluşturulan üç meta-miRNA listesinden ortak olanlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla meme kanseri meta-miRNA listesi, akciğer kanseri meta-miRNA listesi, prostat kanseri meta-miRNA listesi alınarak programında birbiriyle etkileşimleri incelenmiştir.



Şekil 6.1 Meta-miRNA listelerinin GeneVenn programı ile karşılaştırılması

GeneVenn programı ile sadece meme ve akciğer kanseri için 53, sadece meme ve prostat kanseri için 43, sadece akciğer ve prostat için 9 adet ortak miRNA belirlenmiştir. ACCESS programında yapılan rank tabanlı meta analizi yönteminde görüldüğü gibi GeneVenn programında yapılan venn şemasında da 3 kanser türü için ortak 24 adet meta-miRNA belirlenmiştir.

Meta analiz yöntemi sayesinde oluşturulan meta-miRNA listesinden tez çalışması kapsamından bir adet miRNA seçilmiştir. Seçilen miRNA listenin ilk sırasında bulunan mir-145*'tir.

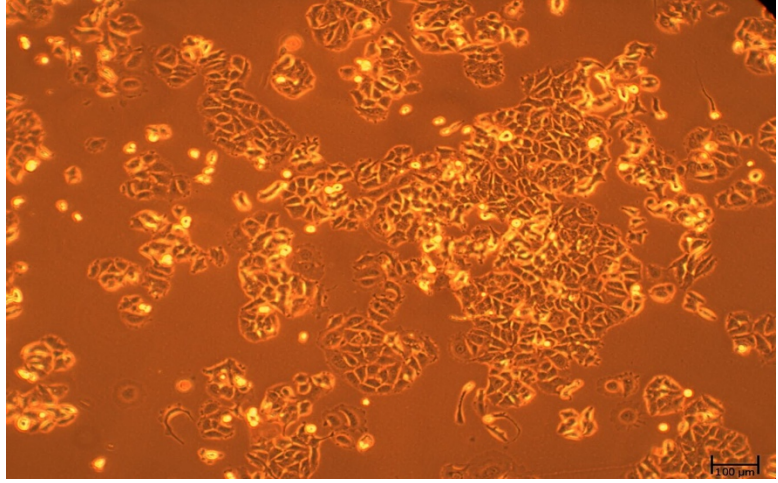
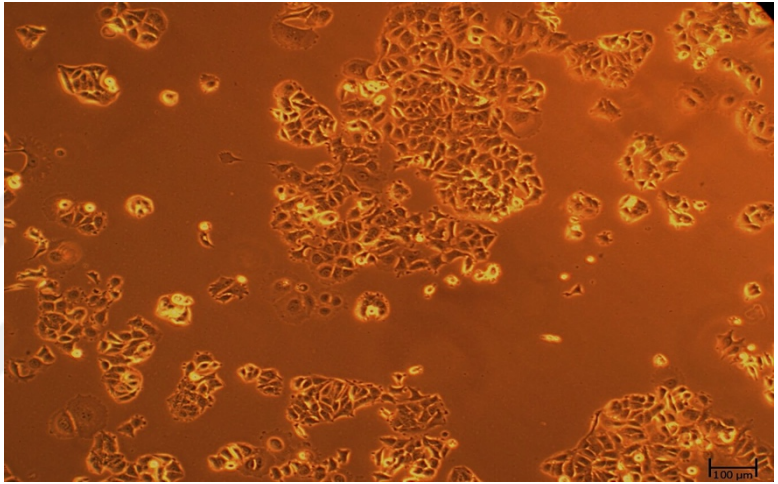
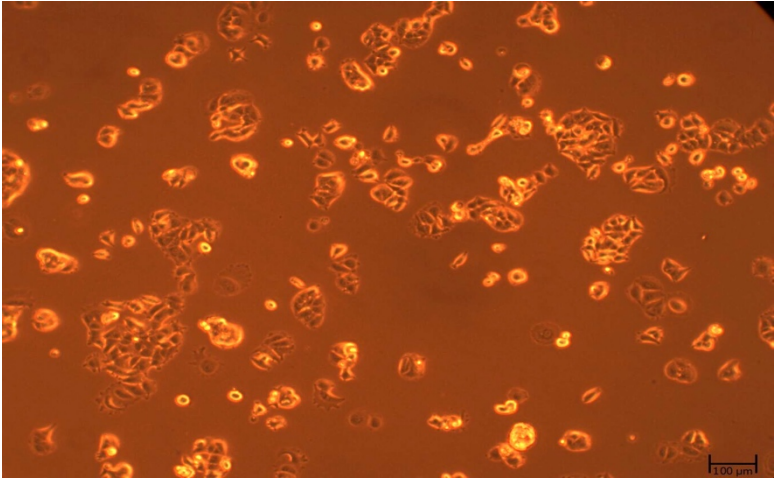
6.3. Hücre Kültürü

MCF-7 hücre kültürü: Meme adenokarsinom hastalığına sahip olan 69 yaşındaki Kafkas asıllı bir kadının meme bezinden izole edilmiş bir meme kanseri hücre hattıdır. Epitel hücre morfolojisinde, monolayer büyüme özelliğinde ve ikilenme süresi 30-50 saat olan bu hücre hattından kurulan normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğunu içeren 3 farklı deney setinde belirgin bir şekilde hücre çoğalmasında farklılık söz konusudur.

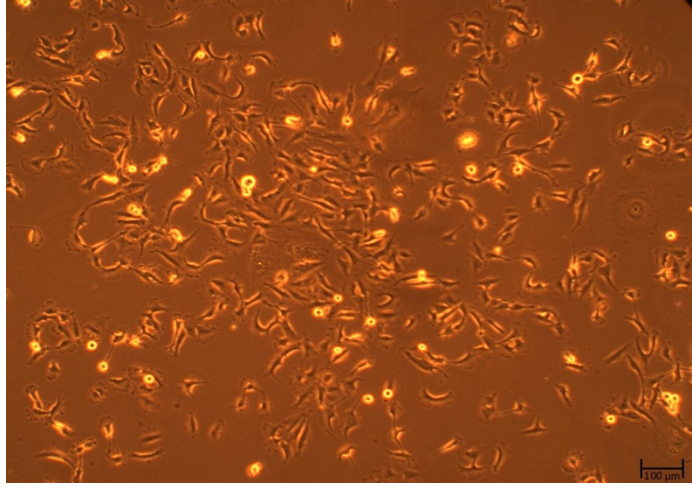
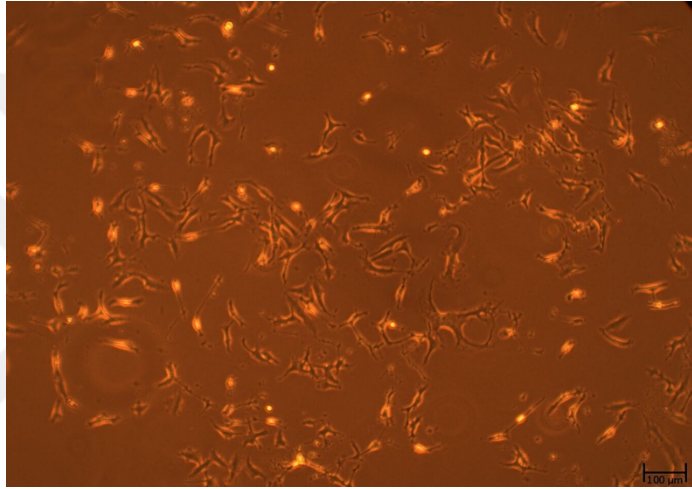
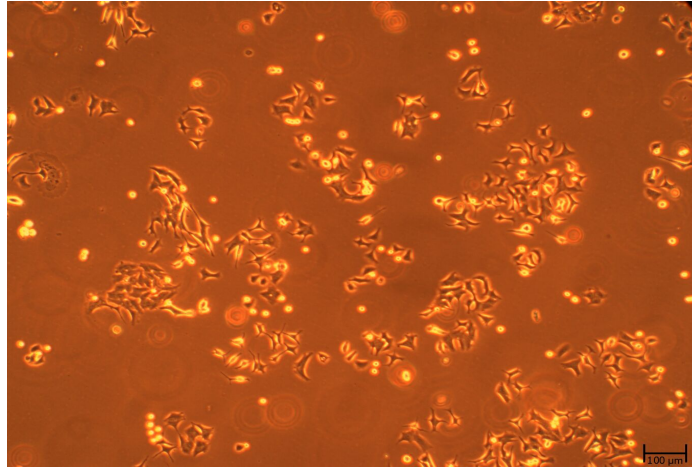
MDA-MB-231 hücre kültürü: Meme karsinom hastalığına sahip olan 51 yaşındaki Kafkas asıllı bir kadının meme bezinden izole edilmiş bir meme kanseri hücre hattıdır. Epitel hücre morfolojisinde, monolayer büyüme özelliğinde ve ikilenme süresi 25-30 saat olan bu hücre hattından kurulan normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğunu içeren 3 farklı deney setinde belirgin bir şekilde hücre çoğalmasında farklılık söz konusudur.

MDA-MB-453 hücre kültürü: Meme metastatik karsinom hastalığına sahip olan 48 yaşındaki Kafkas asıllı bir kadının meme bezinden izole edilmiş bir meme kanseri hücre hattıdır. Epitel hücre morfolojisinde, monolayer büyüme özelliğinde ve ikilenme süresi 40-50 saat olan bu hücre hattından kurulan normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğunu içeren 3 farklı deney setinde belirgin bir şekilde hücre çoğalmasında farklılık söz konusudur.

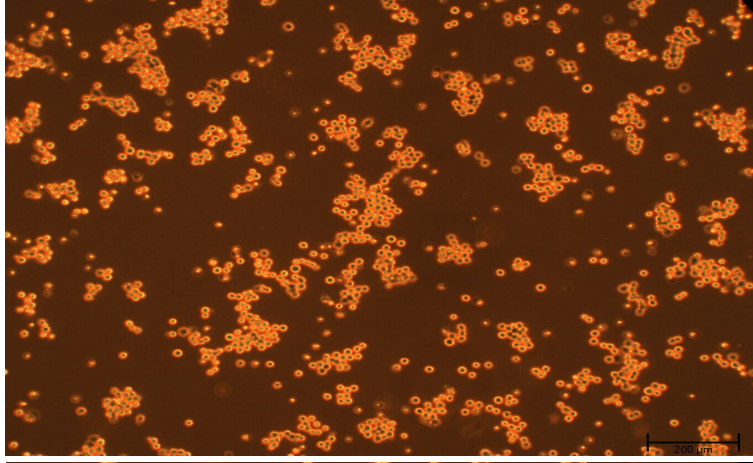
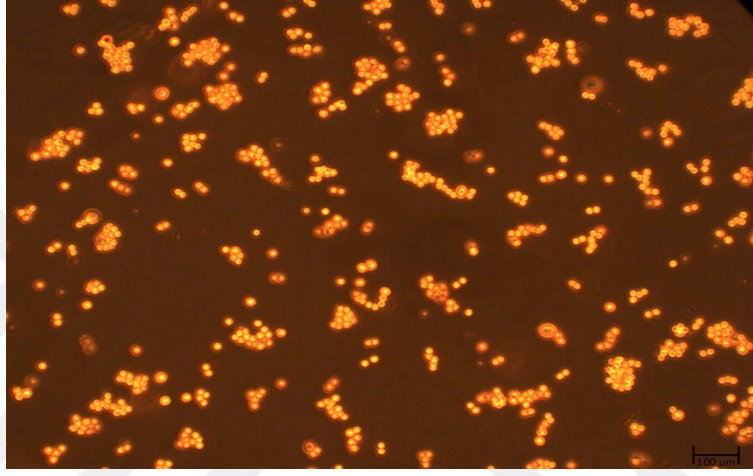
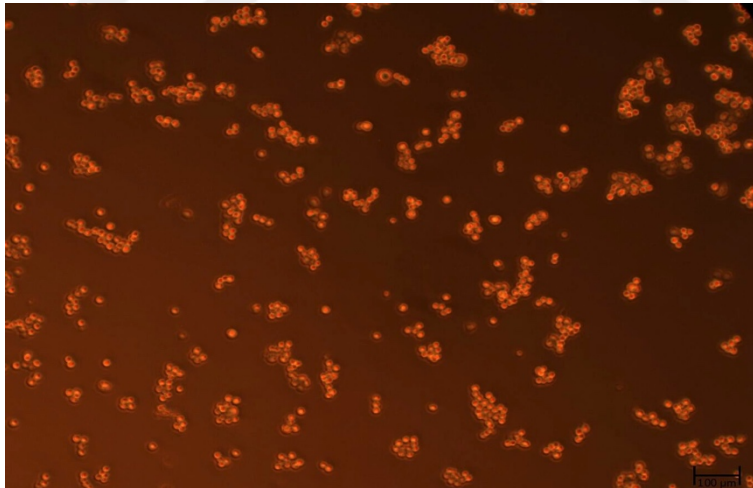
MCF-10A hücre kültürü: 36 yaşındaki Kafkas asıllı bir kadının meme bezinden izole edilmiş bir hücre hattıdır. Epitel hücre morfolojisinde, monolayer büyüme özelliğinde ve ikilenme süresi 25-30 saat olan bu hücre hattından kurulan normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğunu içeren 3 farklı deney setinde belirgin bir şekilde hücre çoğalmasında farklılık söz konusudur.

A**B****C**

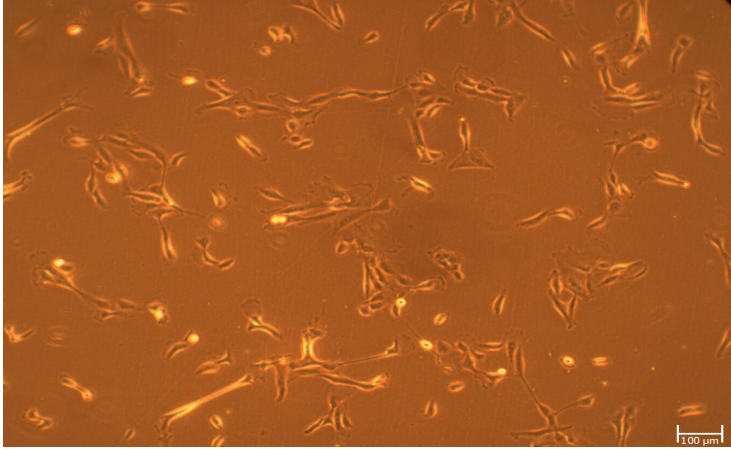
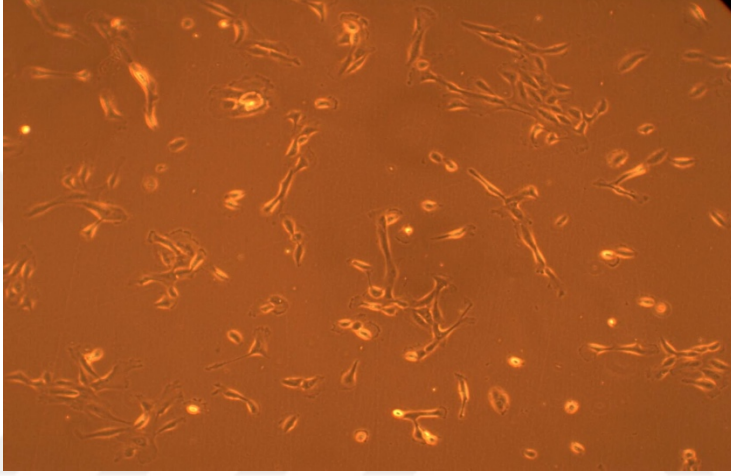
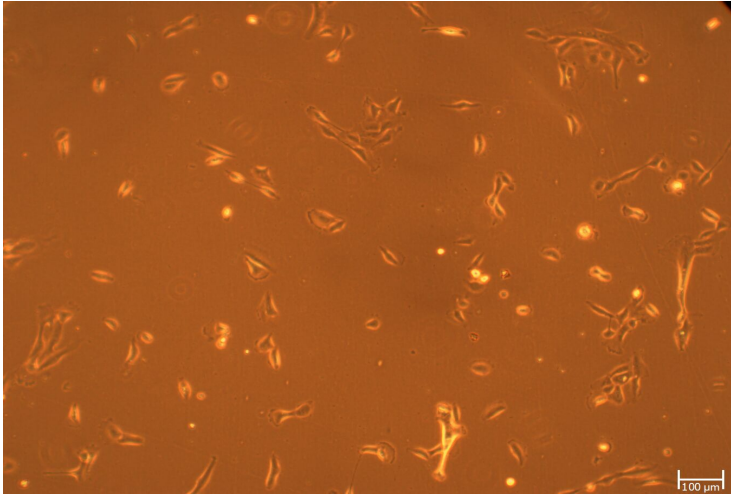
Şekil 6.2 MCF-7 hücre kültürü mikroskop görüntüleri (10X), A. Normoksi, B. Hipoksi, C. Serum yoksunluğu

A**B****C**

Şekil 6.3 MDAMB231 hücre kültürü mikroskop görüntüleri (10X), A. Normoksi, B. Hipoksi, C. Serum yoksunluğu

A**B****C**

Şekil 6.4 MDAMB-453 hücre kültürü mikroskop görüntüleri (10X),A. Normoksi, B. Hipoksi, C. Serum yoksunluğu

A**B****C**

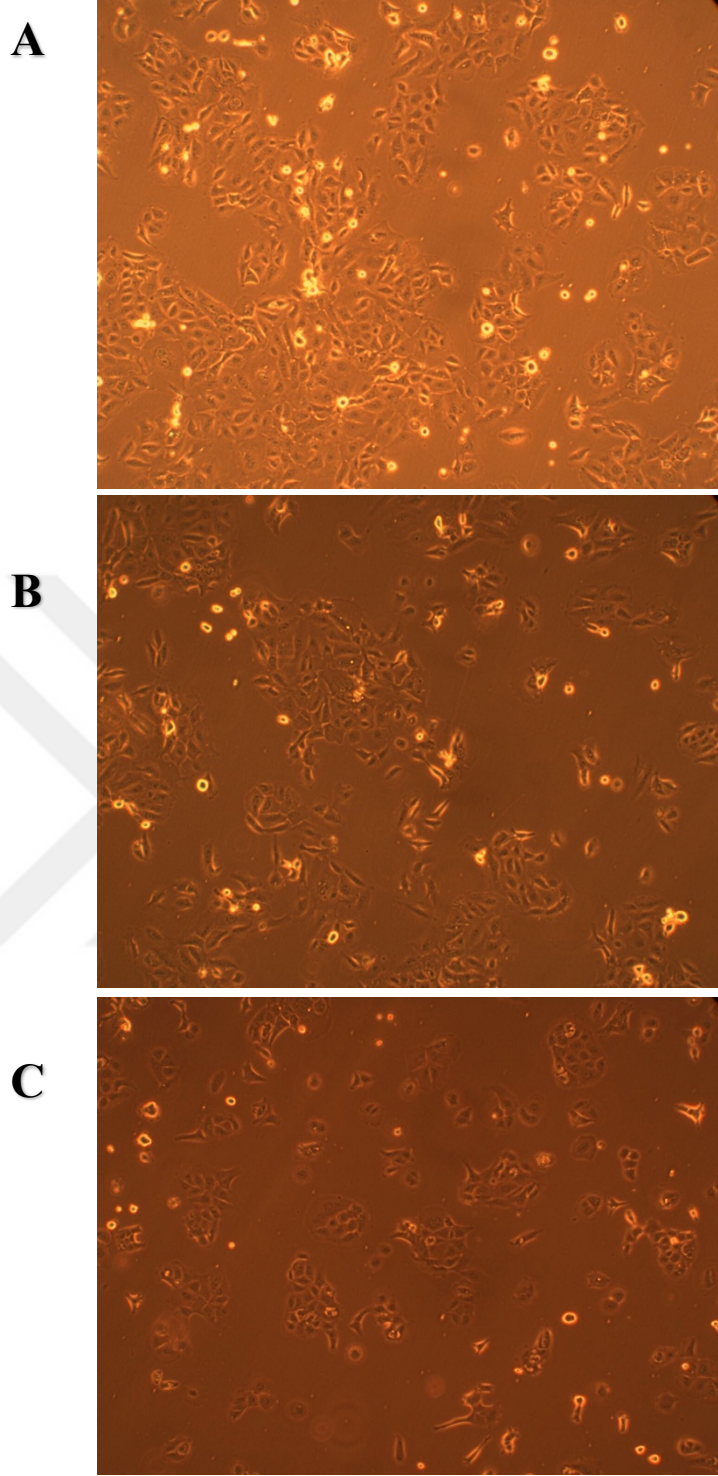
Şekil 6.5 MCF10A hücre kültürü mikroskop görüntüleri (10X), A. Normoksi, B. Hipoksi, C. Serum yoksunluğu

DU145 hücre kültürü: Prostat karsinom hastalığına sahip olan 69 yaşındaki Kafkas asıllı bir erkeğin prostat dokusundan izole edilmiş bir prostat kanseri hücre hattıdır. Epitel hücre morfolojisinde, monolayer büyüme özelliğinde ve ikilenme süresi 30-40 saat olan bu hücre hattından kurulan normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğunu içeren 3 farklı deney setinde belirgin bir şekilde hücre çoğalmasında farklılık söz konusudur.

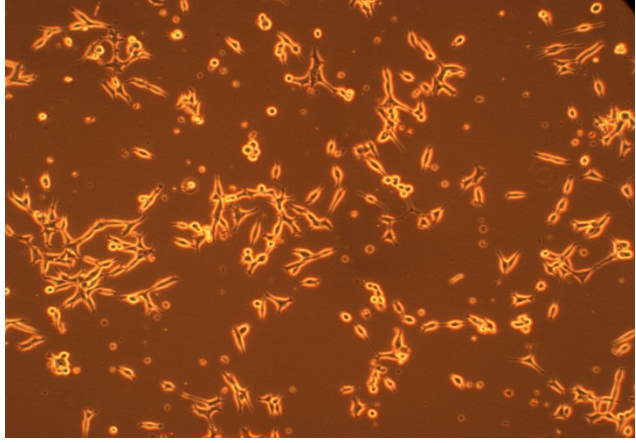
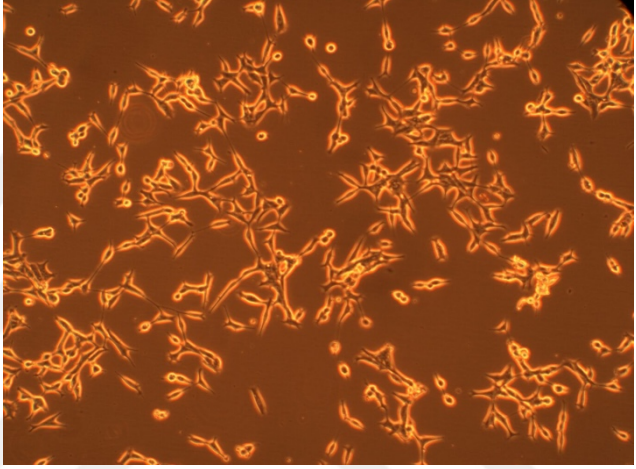
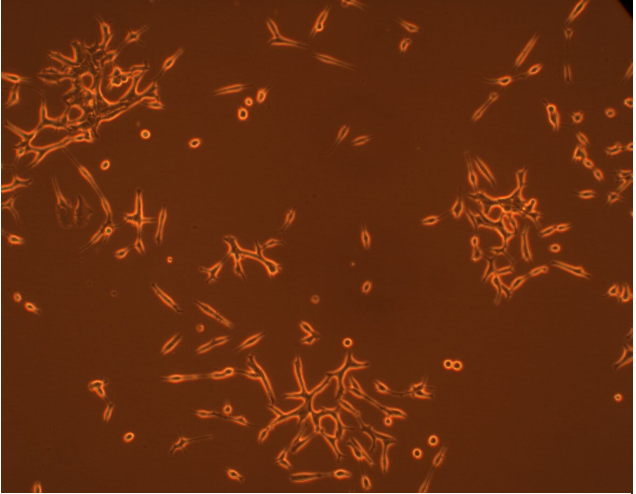
LNCAP hücre kültürü: Prostat karsinom hastalığına sahip olan 50 yaşındaki Kafkas asıllı bir erkeğin prostat dokusundan izole edilmiş bir prostat kanseri hücre hattıdır. Epitel benzeri hücre morfolojisinde, monolayer büyüme özelliğinde ve ikilenme süresi 40-60 saat olan bu hücre hattından kurulan normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğunu içeren 3 farklı deney setinde belirgin bir şekilde hücre çoğalmasında farklılık söz konusudur.

PC-3 hücre kültürü: Prostat adenokarsinom hastalığına sahip olan 62 yaşındaki Kafkas asıllı bir erkeğin prostat dokusundan izole edilmiş bir prostat kanseri hücre hattıdır. Epitel hücre morfolojisinde, monolayer büyüme özelliğinde ve ikilenme süresi 25-30 saat olan bu hücre hattından kurulan normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğunu içeren 3 farklı deney setinde belirgin bir şekilde hücre çoğalmasında farklılık söz konusudur.

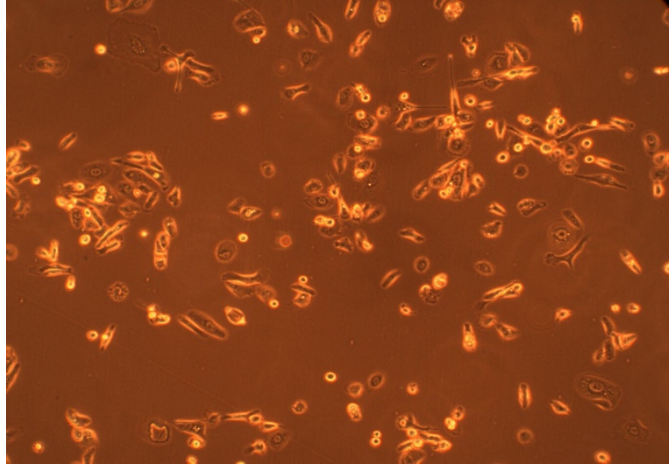
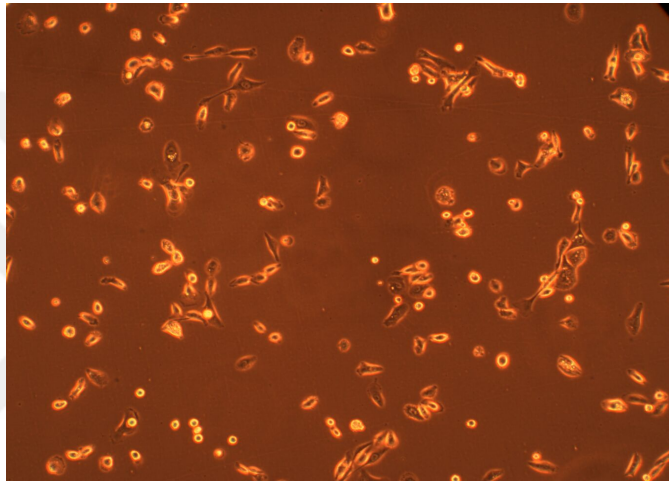
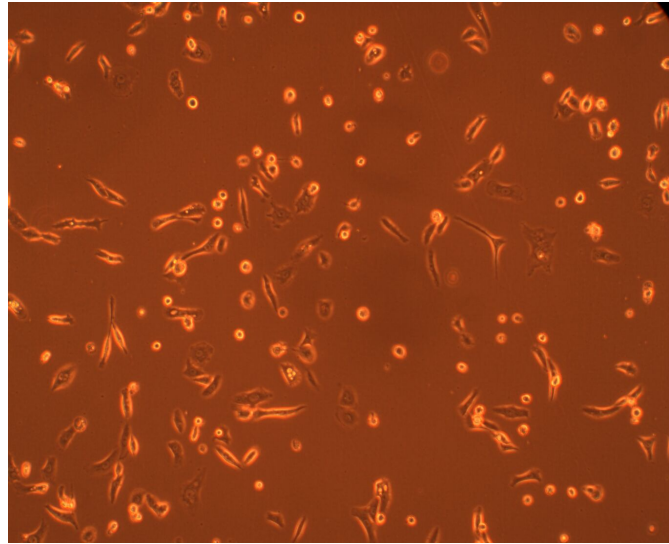
RWPE-1 hücre kültürü: 54 yaşındaki Kafkas asıllı bir erkeğin prostat dokusundan izole edilmiş bir hücre hattıdır. Epitel hücre morfolojisinde, monolayer büyüme özelliğinde ve ikilenme süresi 40-60 saat olan bu hücre hattından kurulan normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğunu içeren 3 farklı deney setinde belirgin bir şekilde hücre çoğalmasında farklılık söz konusudur.



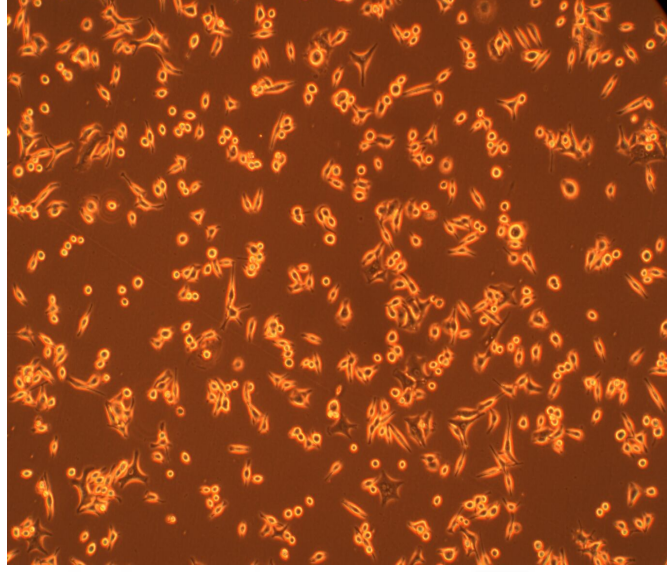
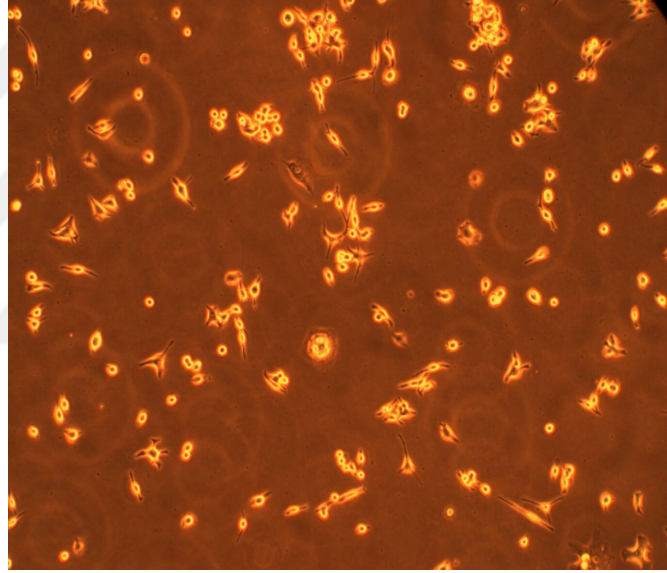
Şekil 6.6 DU145 hücre kültürü mikroskop görüntüleri (10X). A. Normoksi, B. Hipoksi, C. Serum yoksunluğu.

A**B****C**

Şekil 6.7 LNCAP hücre kültürü mikroskop görüntüleri (10X). A. Normoksi, B. Hipoksi, C. Serum yoksunluğu.

A**B****C**

Şekil 6.8 PC3 hücre kültürü mikroskop görüntüleri (10X). A. Normoksi, B. Hipoksi, C. Serum yoksunluğu

A**B**

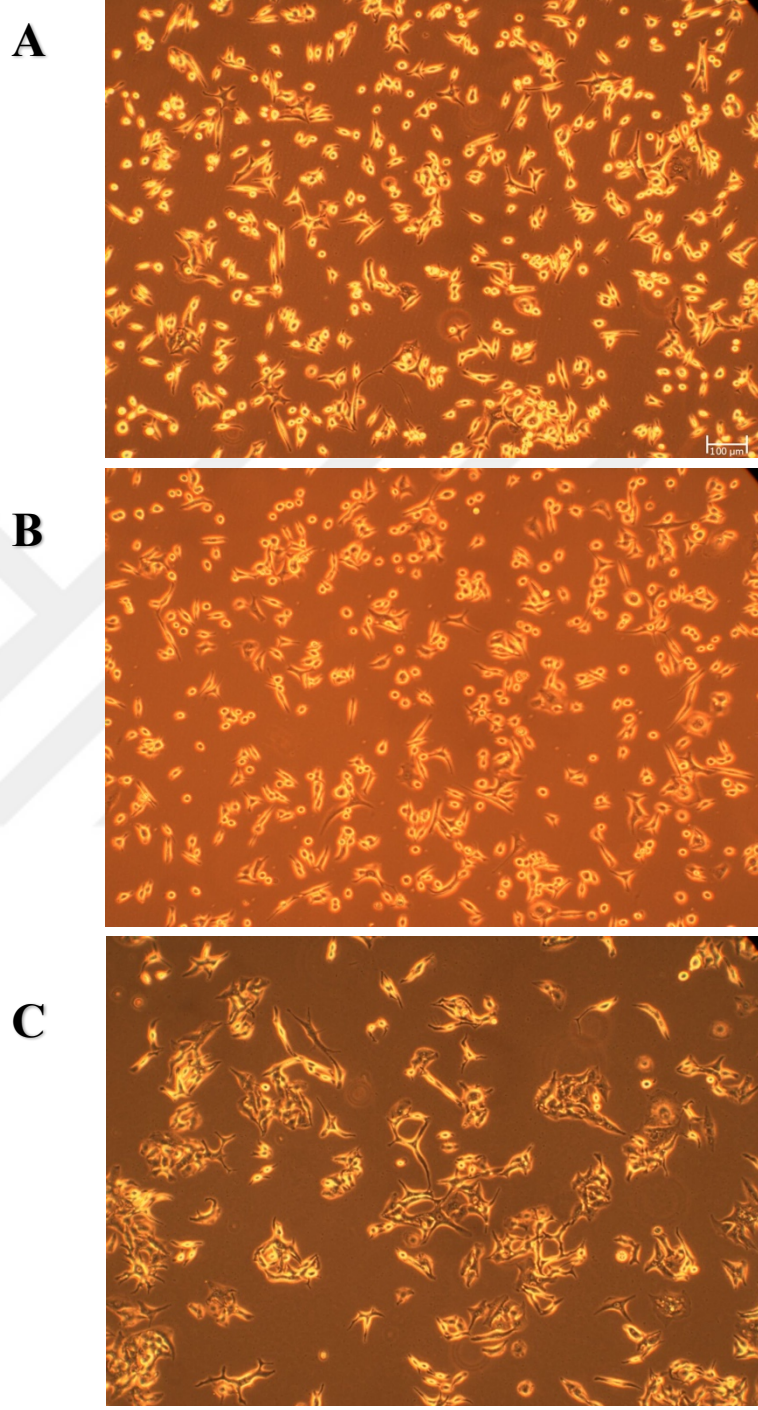
Şekil 6.9 RWPE-1 hücre kültürü mikroskop görüntüleri (10X)

A. Normoksi, B. Hipoksi, C. Serum yoksunluğu

A549 hücre kültürü: Akciğer karsinom hastalığına sahip olan 58 yaşındaki Kafkas asıllı bir erkeğin akciğer dokusundan izole edilmiş bir akciğer kanseri hücre hattıdır. Epitel benzeri hücre morfolojisinde, monolayer büyüme özelliğinde ve ikilenme süresi 30-40 saat olan bu hücre hattından kurulan normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğunu içeren 3 farklı deney setinde belirgin bir şekilde hücre çoğalmasında farklılık söz konusudur.

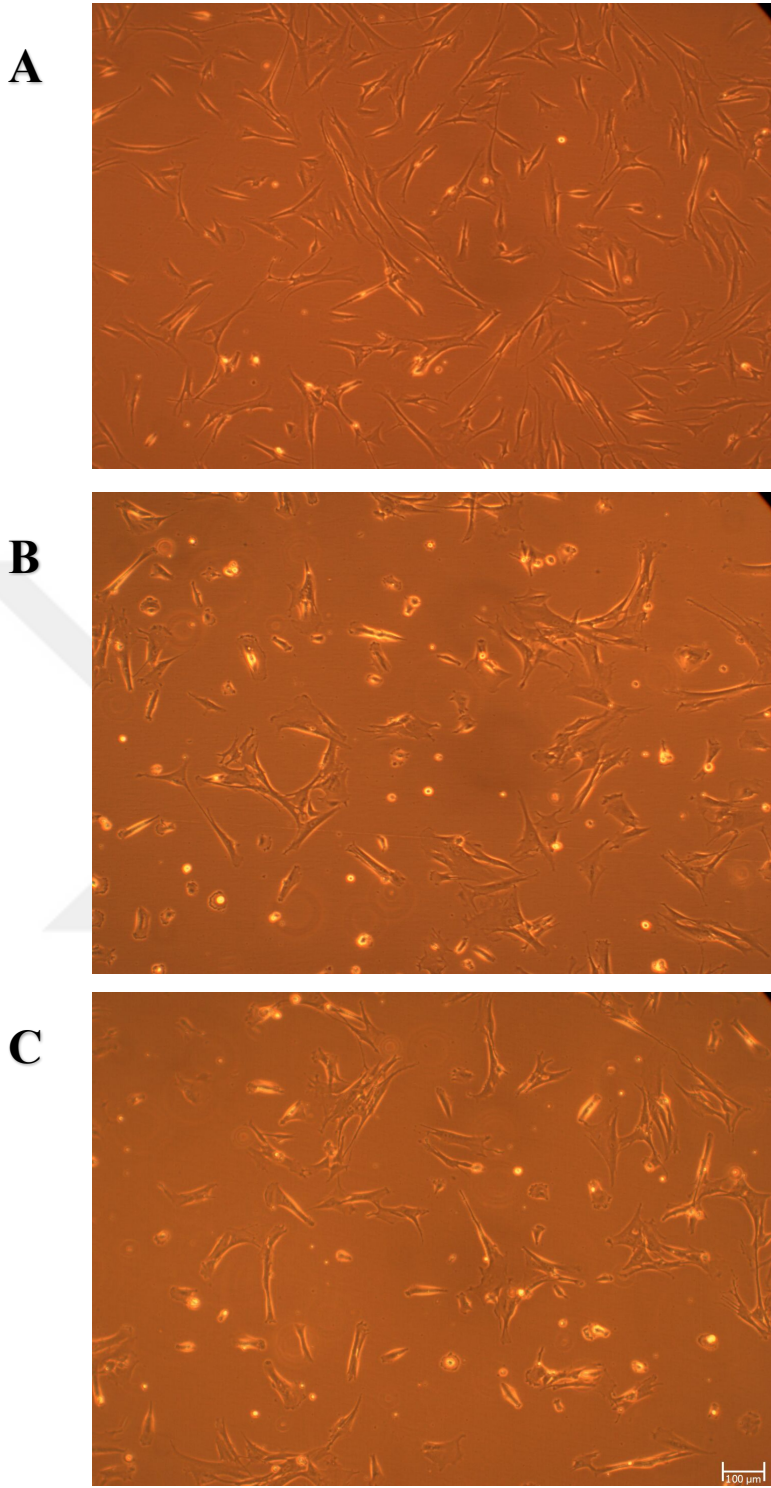
MRC-5 hücre kültürü: 14 haftalık Kafkas asıllı bir bebeğin akciğer dokusundan izole edilmiş bir normal akciğer hücre hattıdır. Fibroblast hücre morfolojisinde, monolayer büyüme özelliğinde ve ikilenme süresi 30-40 saat olan bu hücre hattından kurulan normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğunu içeren 3 farklı deney setinde belirgin bir şekilde hücre çoğalmasında farklılık söz konusudur.

NCI-H82 hücre kültürü: Akciğer karsinom hastalığına sahip olan 40 yaşındaki Kafkas asıllı bir erkeğin akciğer dokusundan izole edilmiş bir akciğer kanseri hücre hattıdır. Epitel benzeri hücre morfolojisinde, süspanse büyüme özelliğinde ve ikilenme süresi 30-40 saat olan bu hücre hattından kurulan normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğunu içeren 3 farklı deney setinde belirgin bir şekilde hücre çoğalmasında farklılık söz konusudur.

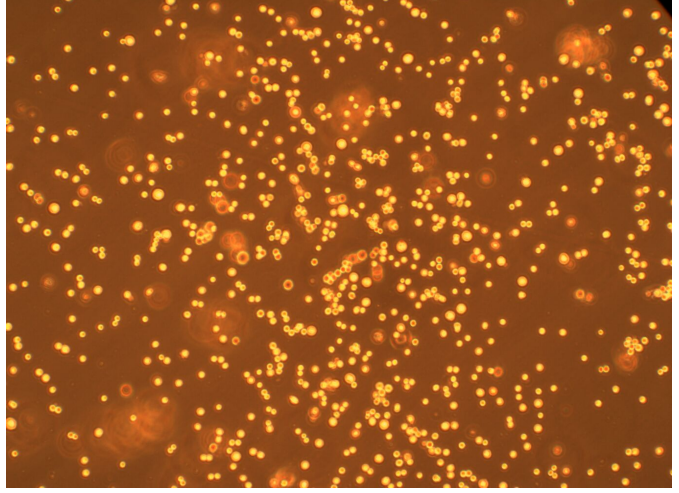
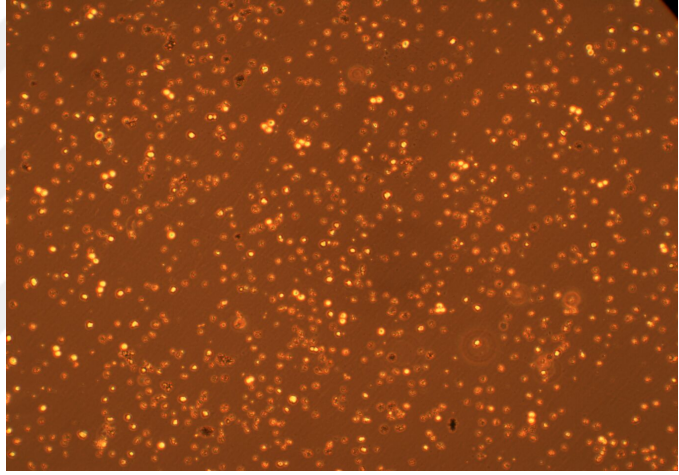
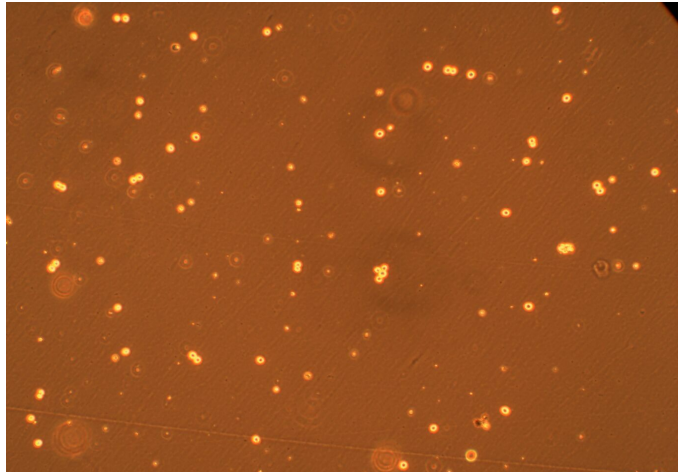


Şekil 6.10 A549 hücre kültürü mikroskop görüntüleri (10X)

A. Normoksi, B. Hipoksi, C. Serum yoksunluğu



**Şekil 6.11 MRC5 hücre kültürü mikroskop görüntüleri (10X).
A. Normoksi, B. Hipoksi, C. Serum yoksunluğu**

A**B****C**

Şekil 6.12 NCI-H82 hücre kültürü mikroskop görüntüleri (10X)

A. Normoksi, B. Hipoksi, C. Serum yoksunluğu

6.4. RNA İzolasyon Sonuçları

Hücre kültürlerinden elde edilen RNA örneklerinin nanodrop sonuçları Çizelge 6.3'te belirtildi. RNA konsantrasyonları 3ng/μL olacak şekilde seyreltildi ve cDNA sentezine kadar -80°de saklandı. A260/A280 oranı numunedeki protein kontaminasyonunun bir göstergesidir. Saf RNA A260/A280 oranı 2.1, ancak 1.8-2.0 arasındaki değerler birçok protokol için kabul edilebilir.

Çizelge 6.3 Nanodrop sonuçları

Orjin	Hücre hattı	İnkübasyon	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
MEME	MCF-7	Normoksi	100,51	2,513	1,384	1,82	0,24
	MDAMB231	Normoksi	232,07	5,802	3,192	1,82	0,4
	MDAMB453	Normoksi	33,53	0,838	0,466	1,8	0,29
	MCF10A	Normoksi	343,59	8,59	4,481	1,92	0,58
	MCF-7	Hipoksi	427,72	10,693	5,194	2,06	0,74
	MDAMB231	Hipoksi	38,84	0,971	0,575	1,69	0,45
	MDAMB453	Hipoksi	86,23	2,156	1,166	1,85	0,71
	MCF10A	Hipoksi	157,44	3,936	2,287	1,72	0,37
	MCF-7	Serum yok.	24,6	0,615	0,336	1,83	0,22
	MDAMB231	Serum yok.	43,51	1,088	0,663	1,64	0,14
	MDAMB453	Serum yok.	16,01	0,4	0,228	1,76	0,1
	MCF10A	Serum yok.	190,84	4,771	2,77	1,72	0,39
	PROSTAT	DU145	Normoksi	104,66	2,616	1,535	1,7
LNCAP		Normoksi	357,35	8,934	4,544	1,97	0,71
PC3		Normoksi	673,55	16,839	10,665	1,58	0,25
RWPE-1		Normoksi	754,42	18,86	11,939	1,58	0,26
DU145		Hipoksi	341,36	8,534	4,473	1,91	0,64
LNCAP		Hipoksi	196,67	4,917	2,824	1,74	0,34
PC3		Hipoksi	230,11	5,753	3,208	1,79	0,39
RWPE-1		Hipoksi	178,62	4,465	2,606	1,71	0,32
DU145		Serum yok.	302,7	7,567	3,964	1,91	0,54
LNCAP		Serum yok.	273,8	6,845	3,675	1,86	0,46
PC3		Serum yok.	407,22	10,18	4,879	2,09	1
RWPE-1		Serum yok.	128,33	3,208	1,935	1,66	0,28
AKCİĞER		A549	Normoksi	431,15	10,779	5,656	1,91
	MRC5	Normoksi	338,2	8,455	4,416	1,91	0,55
	NCI-H82	Normoksi	334,75	8,405	4,495	1,87	0,58
	A549	Hipoksi	436,78	10,919	5,597	1,92	0,69
	MRC5	Hipoksi	170,93	4,273	2,425	1,76	0,46
	NCI-H82	Hipoksi	174,91	4,373	2,574	1,7	0,32
	A549	Serum yok.	678,57	16,964	10,638	1,59	0,4
	MRC5	Serum yok.	359,44	8,986	4,72	1,9	0,67
	NCI-H82	Serum yok.	314,46	7,861	4,233	1,86	0,57

6.5. Real-Time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Aşağıdaki çizelgede, bir hedefin (miR-145-3p) ve bir endojen kontrolün (RNU6B) ekspresyon düzeylerinin değerlendirildiği PCR verilerini göstermektedir. Bu verilerde, farklı inkübasyon şartlarına maruz bırakılan örneklerin seviyelerini, normal inkübasyonda bırakılmış örneklerle (kalibratör) karşılaştırıldı. Her örnek CT ortalaması hesaplandı ve her bir ortalama CT değeri için standart sapma hesaplandı. Çizelgede, ortalama Δ CT değerleri ve standart sapma $\Delta\Delta$ CT hesaplamasında kullanıldı. Meme kanserinden türevlenmiş hücre hatlarında normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğu gibi farklı inkübasyonlarının miR-145-3p ifadesinde değişiklik meydana getirdiği görüldü.

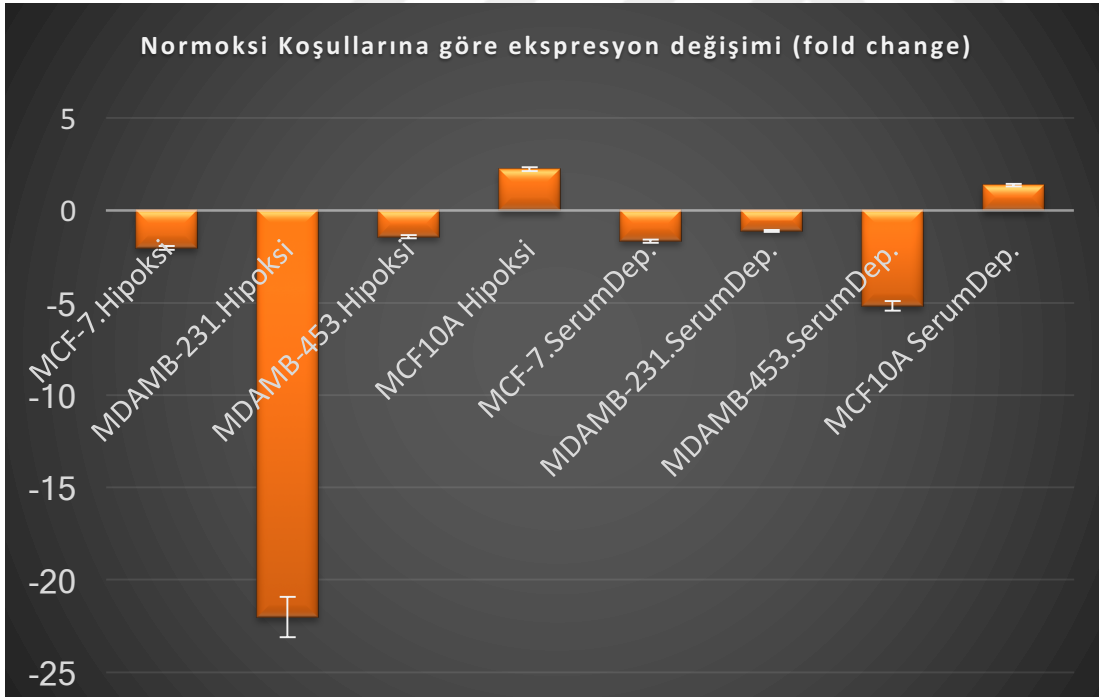
Çizelge 6.4 Meme kanseri örneklerin $\Delta\Delta$ CT hesapları

Örnek adı	Ortalama miR1453p Ct	Ortalama RNU6B Ct	Δ CT (miR1453p-RNU6B)	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT
MCF-7 Normoksi	35,7±0,02	29,54±0,008	6,16	0,012	0,991716731
MDAMB231 Normoksi	36,4±0,05	30,57±0,105	6,83	-0,055	1,038859103
MDAMB453 Normoksi	36,11±0,015	28,53±0,15	7,58	0,025	0,982820599
MCF10A Normoksi	39,42±0,02	32,99±0,003	6,43	0,017	0,988285652
MCF-7 Hipoksi	39,5±0,045	32,32±0,02	7,18	1,02	0,493116352
MDAMB231 Hipoksi	39,1±0,15	28,81±0,089	10,29	3,46	0,045436641
MDAMB453 Hipoksi	38,795±0,02	30,7±0,093	8,095	0,515	0,699792933
MCF10A Hipoksi	38,36±0,01	32,09±0,003	5,27	-1,16	2,234574276
MCF-7 SerumDep.	35,1±0,089	28,21±0,002	6,89	0,73	0,602903914
MDAMB231 SerumDep.	37,1±0,093	30,12±0,089	6,98	0,15	0,901250463
MDAMB453 SerumDep.	38,6±0,097	28,65±0,03	9,95	2,37	0,193445624
MCF10A SerumDep.	38,21±0,015	32,24±0,015	5,97	-0,46	1,375541818

❖ Normoksi koşullarına göre hipoksi koşullarına maruz kalan MCF-7 hücre kültüründe miRNA'nın ifadesinde azalma yönünde olduğu, miR-145-3p'nin ifadesinin 2,02 kat azaldığı görüldü ($p < 0,05$). Serum yoksunluğunda inkübe edilen hücrelerdeki miRNA seviyesinin de 1,65 kat azaldığı görüldü.

❖ Normoksi koşullarına göre hipoksi koşullarına maruz kalan MDAMB-231 hücre kültüründe miRNA'nın ifadesinin azalma yönünde olduğu, miR-145-3p'nin ifadesinin 22 kat azaldığı görüldü ($p < 0,05$). Serum yoksunluğunda inkübe edilen hücrelerdeki miRNA ifadesinin 1,1 kat azaldığı, anlamlı bir sonuç elde edilmediği görüldü.

❖ Normoksi koşullarına göre hipoksi koşullarına maruz kalan MDAMB-453 hücre kültüründe miRNA'nın ifadesinin azalma yönünde olduğu, miR-145-3p'nin ifadesinin %1,42 kat azaldığı görüldü ($p < 0,05$). Serum yoksunluğunda inkübe edilen hücrelerdeki miRNA seviyesinin de 5,17 kat azaldığı görüldü ($p < 0,05$).



Şekil 6.13 Meme kanseri hücrelerinde normoksi koşullarına göre ekspresyon değişimi

Prostat kanserinden türevlenmiş hücre hatlarında normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğu gibi farklı inkübasyonlarının miR-145-3p ifadesinde değişiklik meydana getirdiği görüldü.

Çizelge 6.5 Prostat kanseri örneklerin $\Delta\Delta CT$ hesapları

Örnek adı	Ortalama miR1453p Ct	Ortalama RNU6B Ct	ΔCT (miR1453p-RNU6B)	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
DU145 Normoksi	34,2±0,008	29,74±0,04	4,46	0,008	0,994470169
LNCAP Normoksi	36,63±0,105	33,01±0,121	3,62	0,006	0,995849753
PC3 Normoksi	37±0,091	31,76±0,02	5,24	0,009	0,993781093
RWPE-1 Normoksi	39,4±0,113	36,89±0,12	3,51	-0,002	1,001387256
DU145 Hipoksi	38,58±0,117	30,73±0,01	7,85	3,39	0,095391201
LNCAP Hipoksi	37,31±0,121	32,02±0,0097	5,29	1,67	0,314253344
PC3 Hipoksi	36,86±0,1	29,89±0,03	6,97	1,73	0,301451957
RWPE-1 Hipoksi	38,77±0,12	36,5±0,04	2,27	-1,24	2,361985323
DU145 SerumDep.	38,92±0,13	32,74±0,02	6,18	1,72	0,303548721
LNCAP SerumDep.	37,87±0,03	34±0,015	3,87	0,25	0,840896415
PC3 SerumDep.	39,69±0,04	33,09±0,02	6,6	1,36	0,38958229
RWPE-1 SerumDep.	40,31	34,52±0,02	5,79	2,28	0,205897754

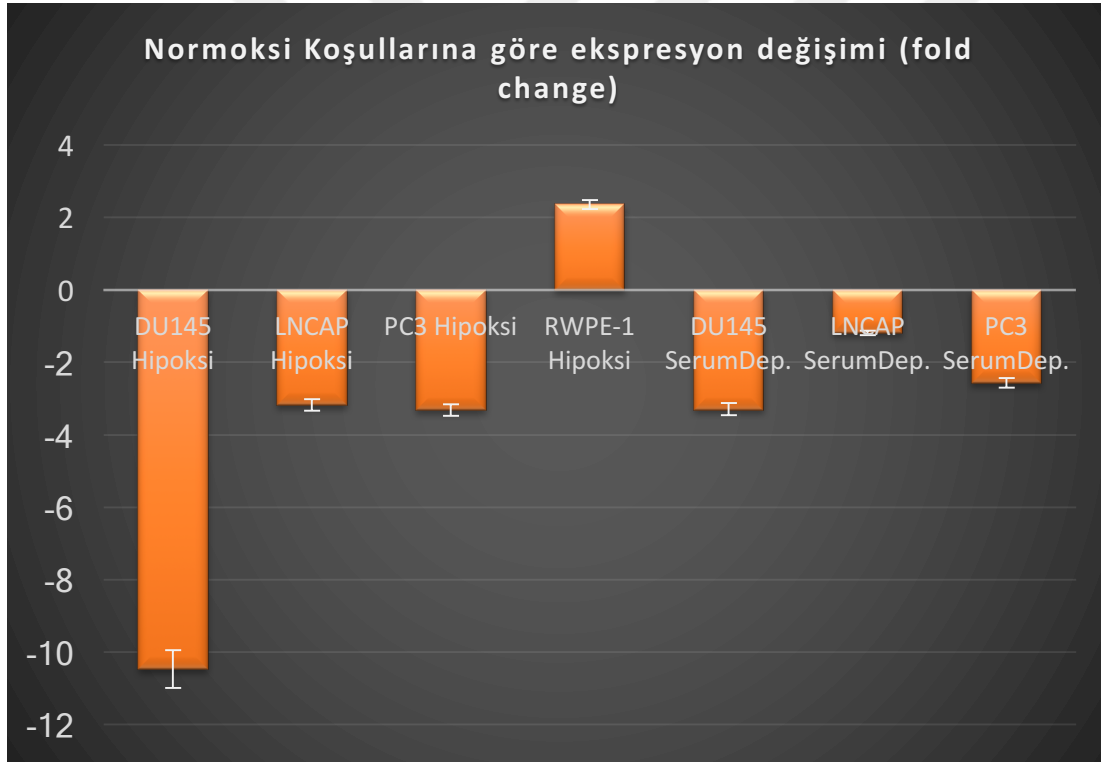
❖ Normoksi koşullarına göre hipoksi koşullarına maruz kalan DU145 hücre kültüründe miRNA'nın ifadesinde azalma yönünde olduğu, miR-145-3p'nin miktarının 10 kat azaldığı görüldü ($p < 0,05$). Serum yoksunluğunda inkübe edilen hücrelerdeki miRNA seviyesinin de yaklaşık 3,3 kat azaldığı görüldü ($p < 0,05$).

❖ Normoksi koşullarına göre hipoksi koşullarına maruz kalan LNCAP hücre kültüründe miRNA'nın ifadesinin azalma yönünde olduğu, miR-145-3p'nin miktarının yaklaşık 3,2 kat azaldığı görüldü ($p < 0,05$). Serum yoksunluğunda inkübe

edilen hücrelerdeki miRNA seviyesinin ise yaklaşık 1,2 kat azaldığı, anlamlı bir sonuç elde edilmediği görüldü.

❖ Normoksi koşullarına göre hipoksi koşullarına maruz kalan PC3 hücre kültüründe miRNA'nın ifadesinin azalma yönünde olduğu, miR-145-3p'nin miktarının 3,3 kat azaldığı görüldü ($p < 0,05$). Serum yoksunluğunda inkübe edilen hücrelerdeki miRNA seviyesinin de 2,6 kat azaldığı görüldü ($p < 0,05$).

❖ Normoksi koşullarına göre hipoksi koşullarına maruz kalan RWPE-1 hücre kültüründe miRNA'nın ifadesinin artma yönünde olduğu, miR-145-3p'nin miktarının yaklaşık 2,4 kat arttığı görüldü ($p < 0,05$). Tam aksine, serum yoksunluğunda inkübe edilen hücrelerdeki miRNA seviyesinin de 4,8 kat azaldığı görüldü ($p < 0,05$).



Şekil 6.14 Prostat kanseri hücrelerinde normoksi koşullarına göre ekspresyon değişimi

Akciğer kanserinden türevlenmiş hücre hatlarında normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğu gibi farklı inkübasyonlarının miR-145-3p ifadesinde değişiklik meydana getirdiği görüldü.

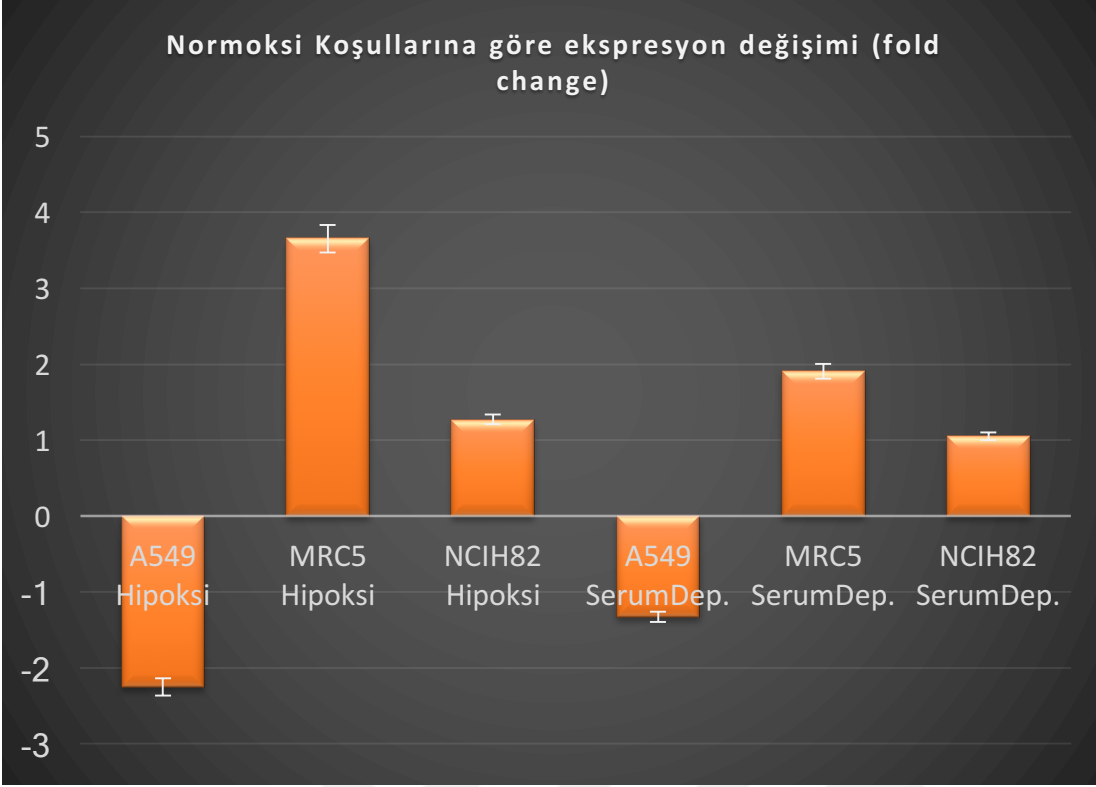
Çizelge 6.6 Akciğer kanseri örneklerin $\Delta\Delta CT$ hesapları

Örnek adı	Ortalama miR1453p Ct	Ortalama RNU6B Ct	ΔCT (miR1453p-RNU6B)	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
A549 Normoksi	36,32±0,005	30,64±0,054	5,68	-0,04	1,033945247
MRC5 Normoksi	34,75±0,012	32,46±0,11	2,29	0,0008	0,999442903
NCIH82 Normoksi	36,92±0,051	33,14±0,053	3,78	-0,002	1,001477415
A549 Hipoksi	37,17±0,054	30,32±0,055	6,85	1,17	0,444421341
MRC5 Hipoksi	31,18±0,011	30,76±0,058	0,42	-1,87	3,655325801
NCIH82 Hipoksi	38,58±0,053	35,15±0,053	3,43	-0,35	1,274560627
A549 SerumDep.	37,62±0,055	31,53±0,057	6,09	0,41	0,752623374
MRC5 SerumDep.	33,93±0,01	32,57±0,069	1,36	-0,93	1,905275996
NCIH82 SerumDep.	38,66±0,003	34,95±0,065	3,71	-0,07	1,049716684

❖ Normoksi koşullarına göre hipoksi koşullarına maruz kalan A549 hücre kültüründe miRNA'nın ifadesinin azalma yönünde olduğu, miR-145-3p'nin miktarının 2,25 kat azaldığı görüldü ($p < 0,05$). Serum yoksunluğunda inkübe edilen hücrelerdeki miRNA seviyesinin ise 1,32 kat azaldığı görüldü.

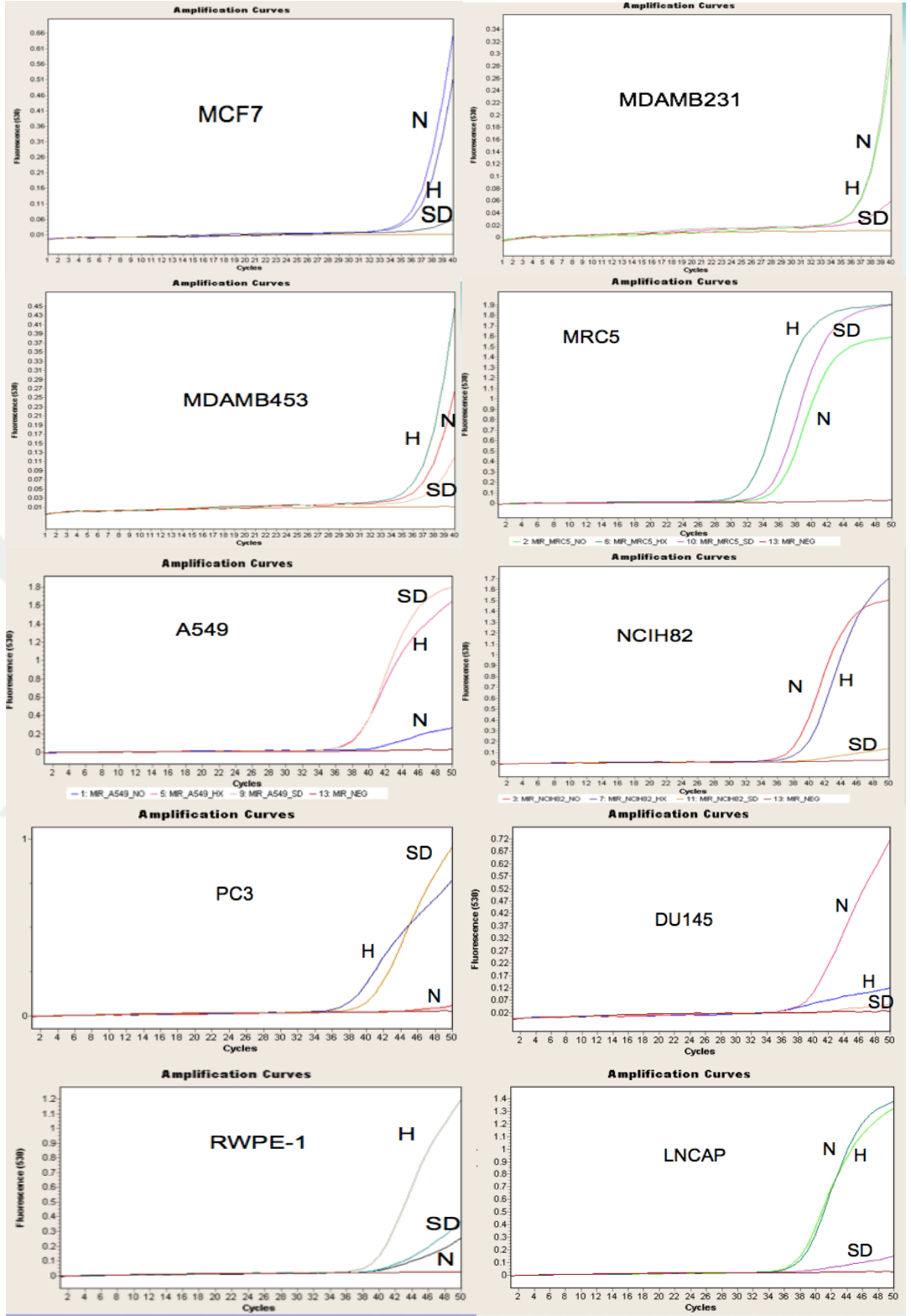
❖ Normoksi koşullarına göre hipoksi koşullarına maruz kalan MRC5 hücre kültüründe miRNA'nın ifadesinin artma yönünde olduğu, miR-145-3p'nin miktarının 3,6 kat arttığı görüldü ($p < 0,05$). Serum yoksunluğunda inkübe edilen hücrelerdeki miRNA seviyesinin de yaklaşık 2 kat arttığı görüldü ($p < 0,05$).

❖ Normoksi koşullarına göre hipoksi koşullarına maruz kalan NCIH82 hücre kültüründe miRNA'nın ifadesinin artma yönünde olduğu, miR-145-3p'nin miktarının 1,3 kat arttığı görüldü ($p < 0,05$). Serum yoksunluğunda inkübe edilen hücrelerdeki miRNA seviyesinin de 1,04 kat arttığı görüldü.



Şekil 6.15 Akciğer kanseri hücrelerinde normoksi koşullarına göre ekspresyon değişimi

Amplifikasyon eğrileri incelendiğinde ise MCF-7 hücresine ait örneklerin eşik değerinden çıkış zamanlarının Ct değerleri ile tutarlı olduğu görüldü. MDAMB-231 hücresine ait örneklerin eşik değerlerinde ise hipoksi koşullarında belirgin bir fark görüldü, ancak bu durum serum yoksunluğunda görülmedi. MDAMB-453 hücresine ait örneklerin eşik değerinden çıkış zamanlarının Ct değerleri ile tutarlı olduğu görüldü. Hem hipoksi hem de serum yoksunluğu ile inkübasyona bırakılan hücrelerden elde edilen örneklerin anlamlı Ct değerleri verildiği görüldü (Şekil 6.16). A549 hücresine ait örneklerin eşik değerlerinde normoksi, hipoksi ve serum yoksunluğu koşullarında belirgin bir fark görüldü, ancak bu durum hipoksi ve serum yoksunluğu arasında görülmedi. NCIH82 hücresine ait örneklerin eşik değerlerinde normoksi ve hipoksi arasında belirgin bir fark görülmedi. DU145, PC3 ve RWPE-1 hücresine ait örneklerin eşik değerlerinde ise hipoksi koşullarında belirgin bir fark görüldü, fakat LNCAP hücrelerinin örnekleri bu farklılık arasında görülmedi.



Şekil 6.16 Real Time PCR aplikasyon eğrileri

7. TARTIŞMA

GEO ve Array Express veri tabanlarında taratılarak veri analizinde kullanılan GSE45666, GSE58210, GSE76260, GSE21036, GSE19945 ve GSE48414 datasetlerinin meta-analiz yöntemi ile incelendikten sonra, belirlenen özgün miRNA'lerden oluşan tablolarının kesişim noktalarında bulunan miRNA'lar belirlendi. Tez kapsamında istatistiksel ve biyoinformatik açıdan incelen miR-145-3p ile deneysel sonuçların birbiri içinde tutarlı olduğu görüldü.

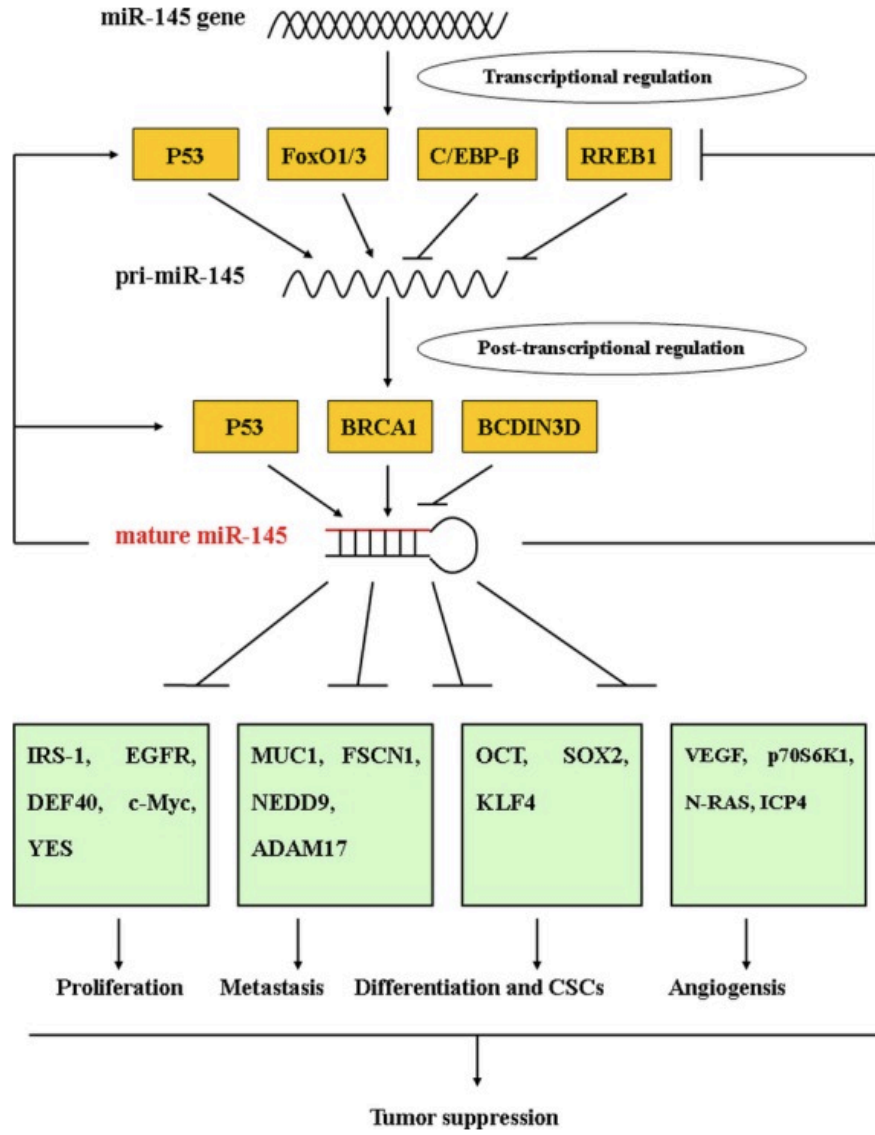
Potansiyel bir aday miRNA biyobelirteci olan miR-145-3p'in, metastazı indüklenmiş hücre hatlarında test edilmiş olmasının sebebi, seçtiğimiz miRNA seviyelerinin metastaz ile değişebileceğinin düşünülmesidir. Bu hipoteze dayanarak meme, akciğer ve prostat dokusunu temsil eden 11 hücre hattının normoksi koşullarına ek olarak, hipoksi koşullarında ve serum yoksunluğunda inkübasyonları kapsayan 3 farklı deney seti kurulmuştur. Kanserın erken tanısı için kanser türlerinin moleküler özelliklerinin daha ayrıntılı olarak belirlenmesi gerekmekte bunun için de miRNA'lerden yararlanılması için güncel tanı yaklaşımları oluşturmak ve tümör davranışının anlaşılmasına katkı sağlamak hedeflenmektedir.

Birçok kanser türünde miR-145'nin ekspresyonunun azalmış olduğu bildirilmiştir (Dong et al., 2014; Matsushita et al., 2016; Zhu et al., 2009). Ancak miR-145'in ekspresyonunun azalmasının sebebi tam olarak bilinmemektedir. Cui ve arkadaşlarının yayınladığı makalede miR-145'nin ifadesini düzenleyen transkripsiyonel faktörden bahsetmişlerdir. P53 ve FoxO1/3 pri-miR-145 transkripsiyonunu teşvik ederken, RREB1 ve C/EBP- β transkripsiyonunu inhibe etmektedir. P53, BRCA1, BCDIN3D ve DDX6, miR-145'in ifadesini transkripsiyon sonrası seviyede düzenler (Cui et al., 2014). MiR-145'in hedeflediği genler arasında IRS-1, EGFR, c-Myc, MUC1, FSCN1, OCT4 ve SOX2 yer almaktadır. Bu genler birden çok kanser mekanizmasını etkileyerek, proliferasyon, apoptoz, farklılaşma, invazyon ve anjiyogenez gibi farklı hücrel prosesleri düzenlemektedir (M. Shi et al., 2010). Matsushita ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miR-145-3p'nin meme kanseri

hücrelerinde tümör baskılayıcı gibi davrandığını gösterilmiştir, ayrıca miRNA ipliğinin insan kanseri patogenezinde kilit rolleri olduğu gösterilmiştir (Matsushita et al., 2016).

Mataki ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, miR-145-3p'nin (yolcu ipliğinin) akciğer skuamöz hücreli karsinoma (SCC) hücrelerinde miR-145-5p (kılavuz şerit) gibi anti-tümör fonksiyonlara sahip olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada miR-145-5p'nin akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde anti-tümör fonksiyon gösterdiği belirtilmiştir (Mataki et al., 2016). Daha önceki çalışmalara dayanarak, miR-145-5p ve miR-145-3p'lerin her ikisi de kanser hücrelerinde anti tümör miRNA'lar gibi davranmaktadır.

miR-145, IRS-1, IGF-IR ya da epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi büyüme faktörü ile ilgili geni hedef alan kanser hücresi proliferasyonu baskılayabilir (B. Shi et al., 2007). Dahası, DFF45, CFBF, CLINT1, PPP3CA veya c-Myc'yi inhibe ederek hücre apoptozunu ve hücre döngüsünü durması yönünde indüklenmesi de miR-145 aracılı tümör büyümesinin bastırılmasına katkıda bulunmaktadır (Sachdeva and Mo, 2010). MIC1, FSCN1, NEDD9 ve SOX9 gibi kanser hücresi invazyonu ve metastazına karışan bazı kanserojenlerin miR-145 tarafından doğrudan düzenlenmesi, birçok kanser hastasında tespit edilmiştir (Sachdeva and Mo, 2010). Buna ek olarak, miR-145'in OCT4, SOX2 ve KLF4 gibi çekirdeği yeniden programlama faktörlerini hedefleyerek hücre farklılaşmasını düzenleme konusunda önemli bir rolü olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (N. Xu et al., 2009). Bu arada, miR-145, VEGF, hipoksi ile HIF-1 α (uyarılabılır faktör 1 α) veya N-RAS'ı hedefleyerek anjiyogenez sürecini geciktirebilir (Q. Xu et al., 2012). Dahası, ICP4 (enfekte hücreli polipeptid 4) gibi bazı kanserle ilişkili virüs genleri, miR-145 için hedefler olarak doğrulanmıştır (C. Y. F. Lee et al., 2009). miR-145 bu hedef genleri düzenleyerek, güçlü bir tümör baskılayıcı etki yapar. Bununla birlikte, hedef gen sayısı hala büyümekte olup, miR-145'in karmaşık bir düzenleyici ağına sahip olduğu belirtilmektedir.



Şekil 7.1 MiR-145 geninin düzenlediği mekanizmalar (M. Shi et al., 2010).

MiR-145 ilk olarak faredeki miRNA'lara ile benzerliğine dayalı doğrulandıktan sonra akabinde kolorektal kanserde önemli ölçüde azalır seviyeleri ile insanlarda da doğrulandı (Michael et al., 2003). MiRNA genlerinin yarısından fazlası (% 52.5) genomdaki kansere bağlı bölgelerde bulunmaktadır. miR-145, insan genomunda kırılğan bir bölge olarak bilinen kromozom 5 (5q32-33) üzerinde stabil bir şekilde bulunur. Birçok kanser tipinde miR-145'ün down regülasyonu gözlemlenmiş ve bu

durumun tümör baskılayıcı olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür (Lei et al., 2014).

Şu ana kadar, miR-145'ün birden fazla onkogeni hedefleyerek, hücre döngüsü, çoğalması, apoptozis ve invazyon gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenlemeye dahil olduğu gösterilmiştir (La Rocca et al., 2009). Dahası, azaltılmış miR-145 ifadesi, bir çok kanser için daha kötü bir prognoz ile ilişkilidir (X. Chen et al., 2010); bu durum, potansiyel bir kanser biyolojik belirteci ve kanser tedavisi için cazip bir hedef görevi görebileceğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında, miR-145'in hücre kültürü üzerinde hipoksi şartları ve serum yoksunluğunda biyolojik fonksiyonlarına etkileri özetlemeyi amaçlamaktadır.

Çalışmada oluşturulan deney setlerinden bir diğeri ise serum yoksunluğuydu. Serum yoksunluğu inkübasyonunun Real-Time PCR sonuçlarının karmaşık ve öngörülemez oluşunun nedeninin, hücre tipine ve ikilenme zamanına bağlı olduğu düşünüldü. Mevcut literatür çalışmalarını hesaba katmakla birlikte, serum açlığıyla uyarılan moleküler olayların basit bir mekanizmaya dayandırılabilceği düşünülmemektedir. Hassasiyet, tutarlılık ve tekrarlanabilirlik açısından miR-145-3p'deki anlamlı ifade değişiklikleri için bu deney seti fizyolojik olarak uygun değildir. Farklı sinyal yolları, aynı hücre tipinde karşıt değişimler gösterdi. Bazal ortam birçok önemli makro besin maddelerini (glikoz, amino asitler) içerdiğinden, deney süresinin serum yoksunluğu etkisinin gösterebilmesi açısından elde edilen ifade değişikliklerindeki kararsızlık miRNA metabolizmasının bir yansıması değildir.

8. SONUÇ

Meta analiz yaklaşımının kanser çalışmalarında kullanılmaya başlanması ile ortak miRNA'ların ortaya çıkarılması daha anlamlı sonuçlar sunmuştur. Aynı dokulardan türevlenen kanser hücre hatlarında ekspresyonları Real Time PCR ile belirlenerek, istatistiksel olarak elde edilen verilerin deneysel olarak doğrulanması da mümkün olmuştur. Böylece, miR-145'nin kanser metastazında biyobelirteç olarak kullanımını olası kılmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle de miRNA'ların, dominant olarak aktarılan nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün rahatsızlıklar, kanser ve viral enfeksiyonların gelişiminde önemli rol oynadıkları görülmektedir. Meme kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanseri için yapılan çalışmaların moleküler alt tiplendirilmesinde farklı yöntemlerin kullanılması, doğruluğunun bilinmemesi, elde edilen sonuçların karşılaştırılmaması, birbirinden bağımsız çok fazla bilginin bulunması tümör davranışlarının doğru bir şekilde yorumlanmasında problem oluşturmaktadır. Bu problemin minimize edilmesi için, günümüzde oldukça sıklıkla kullanılan bir yaklaşım olan meta-analiz yöntemi ile daha önceden yapılan kanser çalışmalarının karmaşıklığının giderilmesi ve var olan bulguların bir araya getirilip niceliksel olarak güvenilir bir şekilde değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu değerlendirme sayesinde metastatik yayılım gösteren yumuşak doku kaynaklı meme, akciğer ve prostat tümör hücreleri gibi farklı hücrelerin kesişim noktasında eksprese olan miRNA'lar bulunarak, istatistiksel analizin deneysel olarak doğrulanabilmesi için normal hücre hatlarında, metastaz özelliği gösteren kanser hücre hatlarında ve metastazı indüklenmiş hücre hatlarında bu miRNA'ların ekspresyon profillerinin çıkarılması ve biyobelirteç olarak kullanım potansiyellerinin araştırılması hedeflenmektedir.

Aday miRNA biyobelirteçlerinin, özellikle metastatik özellik gösteren hücre hatlarında ve kontrol grubu olarak kullanılan normal hücre hatlarında karşılaştırılması ve test edilmesi, ek olarak metastazı indüklenmiş hücrelerde de bu miRNA'ların potansiyellerinin belirlenmesi, kanda dolaşan miRNA'ların tespit edilebilmesindeki temel basamağı oluşturmaktadır.

Bu çalışma hedefleri ve çıktıları ile hem her üç kanser türü için ortak biyobelirteç özelliği gösteren miRNA'lar istatistiksel ve deneysel olarak bulunabilecek hem de bu çalışma ile elde edilen bilgiler daha sonra yapılacak olan çalışmalara ve kanda dolaşan miRNA'ların tespiti ile oluşturulabilecek hızlı tanı kitlerinin geliştirilmesine de ışık tutulabilecektir.

Moleküler yapı, mutasyon tipi, metastaz özelliği, klinik süreç ve tedaviye cevap açısından karışık ve heterojen bir hastalık olan meme, akciğer ve prostat kanser alt tiplerinin miRNA biyobelirteçleri ile belirlenmesi ve miRNA biyobelirteçleri ile hızlı tanı kitlerini üreten sistemlerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Bu tanı kitlerinin uygulanabilirliğinin ve erişebilirliğinin kolay olması da kanserin erken teşhisinde avantaj olarak görülmektedir.

9. ÖNERİLER

Hedef mRNA'nın yıkımını ya da translasyonunun baskılanmasının gerçekleştirerek post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen mikroRNA'ların mekanizmasının açığa çıkartılması ve dokuya spesifik miRNA gen ifade düzeylerinin belirlenmesi, meme, akciğer ve prostat kanseri hastalıklarının erken tanı ve tedavisindeki doğruluğunu artırması bakımından önemli bir avantaj sağlayarak hatalı teşhis ve yanlış tedavi uygulamalarının sebep olduğu düşük sağ kalım oranlarının yükseltileceği öngörülmektedir.

Prostat kanseri, akciğer kanseri ve meme kanseri erken teşhisi ve prognozu ile ilgili yapılan araştırmalar taratıldığında, yeni bir biyobelirteç yaklaşımı olarak kanda dolaşan miRNA seviyelerini inceleyen çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Özetle miRNA'ların stabilitesi, yüksek duyarlılığı ve kanda tespit edilmesi ile ulaşılabilirliğinin kolay olması, kanda dolaşan miRNA'ların kanser tanı ve tedavisinde kullanılmasına olanak sağlayacaktır.

Ayrıca tez kapsamında meta analiz yöntemi ile belirlenen 24 adet miRNA'nın da meme, akciğer ve prostat hastalarının kan örneklerinde ekspresyonlarının araştırılması ve doğrulanması ile üç kanser türü için ortak biyobelirteç sayısının artırılacağı düşünülmektedir. Tez kapsamında bir adet tümör süpresör miRNA seçilmiştir. Buna ek olarak bir adet veya daha fazla onkogen özellik gösteren miRNA'nın seçilmesi ile çalışmanın doğruluğu artırılabilir. Bu sayede, kanser mekanizmaların meta-analiz yöntemlerinin yardımıyla detaylı ve kapsamlı bir şekilde araştırılmasının tanı ve tedavi için alternatif ve etkin hedeflerin belirlenmesine olanak sağlaması mümkündür.

Real Time PCR aşamasında en az iki tane referans gen kullanmak hesapların normalizasyonu kolaylaştıracak çalışmanın doğruluğunu artıracaktır. Deney setlerinde yapılan farklı uygulamalardan en az şekilde etkilenmesi ve bu sayede referans genlerindeki tüm değişiklikleri engellenmesi mümkün olabilir. Ayrıca RNA kalitesinin yüksek tutulması ile cDNA eldesindeki çevre kirliliğini azaltacaktır. A260/A280

oranının 1.8-2.0 arasında tutulması, gerekli olan RNA miktarının sabit tutulması önemlidir.

Gelecekte meta analiz sonuçlarının daha kapsamlı olarak ele alınmasını sağlayan otomotize edilmiş sistemlerin oluşturulması ve miRNA ekspresyon modellemelerinin yapılması ile birlikte hedefe yönelik tedavi modellerinin geliştirilmesine katkı sağlanacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abramson, J. H., & Abramson, Z. H.**, 2009, *Making Sense of Data: A Self-Instruction Manual on the Interpretation of Epidemiological Data* *Making Sense of Data: A Self-Instruction Manual on the Interpretation of Epidemiological Data*.
- Aerts, J. M. F. G., Hollak, C. E. M., Breemen, M., Maas, M., Groener, J. E. M., & Boot, R. G.**, 2005, Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases, *Acta Paediatrica*, 94, 43–46. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1651-2227.2005.tb02110.x/abstract>
- Afonina, I., Zivarts, M., Kutyaev, I., Lukhtanov, E., Gamper, H., & Meyer, R. B.**, 1997, Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder, *Nucleic Acids Research*, 25(13), 2657–2660.
- Albertson, D. G.**, 2006, Gene amplification in cancer, *Trends in Genetics*, 22(8), 447–455.
- Anders, C. K., Zagar, T. M., & Carey, L. A.**, 2013, The management of early-stage and metastatic triple-negative breast cancer: A review, *Hematology/Oncology Clinics of North America*.
- Andrew, F., & Craig, M.**, 2006, The discovery of RNA interference, *Karolinska Institute*, 1–10.
- Applied Biosystems**, 2005, TaqMan® Gene Expression Assays Protocol, *Gene Expression*, (Flybase ID), 68. Retrieved from http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_041280.pdf
- Bartel, D. P.**, 2004, MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function, *Cell*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Biggar, K. K., Wu, C. W., & Storey, K. B.**, 2014, High-throughput amplification of mature microRNAs in uncharacterized animal models using polyadenylated RNA and stem-loop reverse transcription polymerase chain reaction, *Analytical Biochemistry*, *462*, 32–34. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2014.05.032>
- Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., ... De Maria, R.**, 2008, The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities., *Nature Medicine*, *14*(11), 1271–1277.
- Bustin, S. A.**, 2002, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems, *Journal of Molecular Endocrinology*.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., ... Croce, C. M.**, 2004, Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 2999–3004.
- Calin, G. a, & Croce, C. M.**, 2006, MicroRNA signatures in human cancers., *Nature Reviews. Cancer*, *6*(11), 857–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060945>
- Camps, C., Buffa, F. M., Colella, S., Moore, J., Sotiriou, C., Sheldon, H., ... Ragoussis, J.**, 2008, hsa-miR-210 Is Induced by Hypoxia and Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer, *Clinical Cancer Research*, *14*(5), 1340–1348. Retrieved from <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-07-1755>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Charles, I., Khalyfa, A., Kumar, D. M., Krishnamoorthy, R. R., Roque, R. S., Cooper, N., & Agarwal, N.,** 2005, Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *46*(4), 1330–1338.
- Chen, C.-Z., Li, L., Lodish, H. F., & Bartel, D. P.,** 2004, MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation., *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5654), 83–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657504>
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., ... Guegler, K. J.,** 2005, Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *Nucleic Acids Research*, *33*(20).
- Chen, X., Gong, J., Zeng, H., Chen, N., Huang, R., Huang, Y., ... Zhou, Q.,** 2010, MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression, *Cancer Research*, *70*(7), 2728–2738.
- Chiarle, R., Zhang, Y., Frock, R. L., Lewis, S. M., Molinie, B., Ho, Y.-J., ... Alt, F. W.,** 2011, Genome-wide Translocation Sequencing Reveals Mechanisms of Chromosome Breaks and Rearrangements in B Cells., *Cell*, *147*(1), 107–119.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V, Ferracin, M., Shimizu, M., ... Croce, C. M.,** 2005, miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2, *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(39), 13944–13949. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/102/39/13944.full.pdf>
- Climent, J., Dimitrow, P., Fridlyand, J., Palacios, J., Siebert, R., Albertson, D. G., ... Martinez-Climent, J. a.,** 2007, Deletion of chromosome 11q predicts response to anthracycline-based chemotherapy in early breast cancer, *Cancer Research*, *67*(2), 818–826.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cui, S. Y., Wang, R., & Chen, L. B.**, 2014, MicroRNA-145: A potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *18*(10), 1913–1926.
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. a, Ketting, R. F., & Hannon, G. J.**, 2004, Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex., *Nature*, *432*(7014), 231–235.
- Dong, R., Liu, X., Zhang, Q., Jiang, Z., Li, Y., Wei, Y., ... Kong, B.**, 2014, miR-145 inhibits tumor growth and metastasis by targeting metadherin in high-grade serous ovarian carcinoma., *Oncotarget*, *5*(21), 10816–29. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4279412&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Dvinge, H., & Bertone, P.**, 2009, HTqPCR: High-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R, *Bioinformatics*, *25*(24), 3325–3326.
- Edwards, I. J.**, 2012, Proteoglycans in prostate cancer, *Nature Reviews Urology*, *9*(4), 196–206. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2012.19>
- Eminaga, S., Christodoulou, D. C., Vigneault, F., Church, G. M., & Seidman, J. G.**, 2013, Quantification of microRNA expression with next-generation sequencing, *Current Protocols in Molecular Biology*, (SUPPL.103).
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J.**, 2006, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer., *Nature Reviews. Cancer*, *6*(4), 259–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557279>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Esteban, M. a., & Maxwell, P. H.**, 2005, Manipulation of oxygen tensions for in vitro cell culture using a hypoxic workstation., *Expert Review of Proteomics*, 2, 307–314.
- Feng, S., Cong, S., Zhang, X., Bao, X., Wang, W., Li, H., ... Zhang, B.**, 2011, MicroRNA-192 targeting retinoblastoma 1 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in lung cancer cells, *Nucleic Acids Research*, 39(15), 6669–6678.
- Foss, K., Sima, C., Ugolini, D., Allen, K., & Weiss, G.**, 2011, miR-1254 and miR-574-5p Serum-Based microRNA Biomarkers for Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer, *Journal of Thoracic Oncology*, 6(3), 482–488. Retrieved from http://journals.lww.com/jto/Abstract/2011/03000/miR_1254_and_miR_574_5p_Serum_Based_microRNA.11.aspx
- Förster, T., Energiewanderung, Z., & Von, F.**, 1939, Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Annalen Der Physik*, 248(1938), 55–75.
- Fu, X., Xue, C., Huang, Y., Xie, Y., & Li, Y.**, 2010, The activity and expression of microRNAs in prostate cancers., *Molecular bioSystems*, 6(12), 2561–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20957285>
- Giraldez, A. J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Inoue, K., ... Schier, A. F.**, 2006, Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs., *Science (New York, N.Y.)*, 312(5770), 75–79.
- Glass, G. V**, 1976, Primary , Secondary , and Meta-Analysis of Research, *Educational Researcher*, 5(10), 3–8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gregory, R. I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R.**, 2004, The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs., *Nature*, 432(7014), 235–240.
- Grimm, S., Bauer, M. K., Baeuerle, P. a, & Schulze-Osthoff, K.**, 1996, Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis., *The Journal of Cell Biology*, 134(1), 13–23.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Guénin, S., Pelloux, J., Lefebvre, J. F., Louvet, R., ... Van Wuytswinkel, O.**, 2008, The lack of a systematic validation of reference genes: A serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants, *Plant Biotechnology Journal*, 6(6), 609–618.
- Harvey, K. F., Zhang, X., & Thomas, D. M.**, 2013, The Hippo pathway and human cancer, *Nat Rev Cancer*, 13(4), 246–257. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23467301
- Hellerstedt, B. A., & Pienta, K. J.**, 2002, The current state of hormonal therapy for prostate cancer., *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 52(3), 154–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12018929>
- Higuchi, A., Shimmura, S., Takeuchi, T., Suematsu, M., & Tsubota, K.**, 2006, Elucidation of apoptosis induced by serum deprivation in cultured conjunctival epithelial cells., *The British Journal of Ophthalmology*, 90(6), 760–4. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1860219&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A.**, 2005, Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations., *Genes and Immunity*, *6*(4), 279–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15815687>
- Ivanovic, Z.**, 2009, Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm, *Journal of Cellular Physiology*.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., & Thun, M. J.**, 2009, Cancer statistics, 2009., *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *59*(4), 225–49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474385>
- Jiang, L., Huang, Q., Zhang, S., Zhang, Q., Chang, J., Qiu, X., & Wang, E.**, 2010, Hsa-miR-125a-3p and hsa-miR-125a-5p are downregulated in non-small cell lung cancer and have inverse effects on invasion and migration of lung cancer cells., *BMC Cancer*, *10*, 318.
- Jung, U., Jiang, X., Kaufmann, S. H. E., & Patzel, V.**, 2013, A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA, *RNA*, *19*, 1864–1873.
- Kinose, Y., Sawada, K., Nakamura, K., & Kimura, T.**, 2014, The role of microRNAs in ovarian cancer., *BioMed Research International*, *2014*, 249393. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4177088&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F. J., ... Ivan, M.**, 2007, A MicroRNA Signature of Hypoxia, *Molecular and Cellular Biology*, *27*(5), 1859–1867. Retrieved from <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01395-06>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kutyavin, I. V., Lukhtanov, E. A., Gamper, H. B., & Meyer, R. B.,** 1997, Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: Base composition and backbone effects on hybridization, *Nucleic Acids Research*, 25(18), 3718–3723.
- La Rocca, G., Badin, M., Shi, B., Xu, S.-Q., Deangelis, T., Sepp-Lorenzinoi, L., & Baserga, R.,** 2009, Mechanism of growth inhibition by MicroRNA 145: the role of the IGF-I receptor signaling pathway., *Journal of Cellular Physiology*, 220(2), 485–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19391107>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T.,** 2001, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs., *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), 853–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679670>
- Lee, C. Y. F., Rennie, P. S., & Jia, W. W. G.,** 2009, MicroRNA regulation of oncolytic herpes simplex virus-1 for selective killing of prostate cancer cells, *Clinical Cancer Research*, 15(16), 5126–5135.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N.,** 2004, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II., *The EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=524334&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lei, P., Xie, J., Wang, L., Yang, X., Dai, Z., & Hu, Y.,** 2014, microRNA-145 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by targeting ROCK1, *Molecular Medicine Reports*, 10(1), 155–160.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., ... Johnson, J. M.**, 2005, Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs., *Nature*, *433*(7027), 769–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15685193>
- Lin, J., Teo, S., Lam, D. H., Jeyaseelan, K., & Wang, S.**, 2012, MicroRNA-10b pleiotropically regulates invasion, angiogenicity and apoptosis of tumor cells resembling mesenchymal subtype of glioblastoma multiforme, *Cell Death and Disease*, *3*(10), e398. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2012.134>
- Lipsey, M. W., & Wilson, D. B.**, 2001, Practical meta-analysis, *Applied Social Research Methods Series*, *49*, 264.
- Liu, C.-G., Calin, G. A., Volinia, S., & Croce, C. M.**, 2008, MicroRNA expression profiling using microarrays, *Nature Protocols*, *3*(4), 563–78. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18388938?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
- Liu, C.-G., Liu, C.-G., Calin, G. A., Calin, G. A., Meloon, B., Meloon, B., ... Croce, C. M.**, 2004, An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(26), 9740–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15210942>
- Liu, M., & Chen, H.**, 2010, The role of microRNAs in colorectal cancer., *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, *37*(6), 347–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20621017>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, X., Sempere, L. F., Guo, Y., Korc, M., Kauppinen, S., Freemantle, S. J., & Dmitrovsky, E.**, 2011, Involvement of microRNAs in lung cancer biology and therapy., *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 157(4), 200–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3072599&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.**, 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method, *METHODS*, 25, 402–408. Retrieved from <http://www.idealibrary.com>
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U.**, 2004, Nuclear export of microRNA precursors., *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654), 95–98.
- Mahn, R., Heukamp, L. C., Rogenhofer, S., Von Ruecker, A., Müller, S. C., & Ellinger, J.**, 2011, Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer, *Urology*, 77(5).
- Mar-Aguilar, F., Mendoza-Ramírez, J. A., Malagón-Santiago, I., Espino-Silva, P. K., Santuario-Facio, S. K., Ruiz-Flores, P., ... Reséndez-Pérez, D.**, 2013, Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers, *Disease Markers*, 34(3), 163–169.
- Mataki, H., Seki, N., Mizuno, K., Nohata, N., Kamikawaji, K., Kumamoto, T., ... Inoue, H.**, 2016, Dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p) coordinately targeted MTDH in lung squamous cell carcinoma., *Oncotarget*, 7(44), 72084–72098. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27765924>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Matsushita, R., Yoshino, H., Enokida, H., Goto, Y., Miyamoto, K., Yonemori, M., ... Seki, N., 2016, Regulation of UHRF1 by dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p): Inhibition of bladder cancer cell aggressiveness., *Oncotarget*, 7(19). Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=27072587&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.18632/oncotarget.8668>

Michael, M. Z., O' Connor, S. M., van Holst Pellekaan, N. G., Young, G. P., & James, R. J., 2003, Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia., *Molecular Cancer Research : MCR*, 1(12), 882–891.

Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., ... Tewari, M., 2008, Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10513–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18663219>

Moffat, S., 2012, *Access 2010 Part IVEbook*.

Ng, E. K. O., Li, R., Shin, V. Y., Jin, H. C., Leung, C. P. H., Ma, E. S. K., ... Kwong, A., 2013, Circulating microRNAs as Specific Biomarkers for Breast Cancer Detection, *PLoS ONE*, 8(1).

O'Donnell, K. a, Wentzel, E. a, Zeller, K. I., Dang, C. V, & Mendell, J. T., 2005, c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression., *Nature*, 435(7043), 839–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944709>

Oliveira, A. M., & Fletcher, J. A., 2003, Translocation Breakpoints in Cancer, *Genome*, 1–11. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/npg.els.0006066>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Peltier, H. J., & Latham, G. J., 2008, Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues., *RNA (New York, N.Y.)*, *14*(5), 844–52. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2327352&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., & Filipowicz, W., 2007, Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?, *Trends in Cell Biology*, *17*(3), 118–126. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096289240600359X>

Post, D. E., & Van Meir, E. G., 2003, A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy, *Oncogene*, *22*(14), 2065–2072. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12687009%5Chttp://www.nature.com/onc/journal/v22/n14/pdf/1206464a.pdf>

Reddy, K. B., 2011, Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options., *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, *18*(4), e173–e179.

Sachdeva, M., & Mo, Y.-Y., 2010a, miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis., *American Journal of Translational Research*, *2*(2), 170–180.

Sachdeva, M., & Mo, Y. Y., 2010b, MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1, *Cancer Research*, *70*(1), 378–387.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N.**, 2008, Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs., *Nature*, *455*(7209), 58–63.
- Shen, J., Ambrosone, C. B., & Zhao, H.**, 2009, Novel genetic variants in microRNA genes and familial breast cancer., *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *124*(5), 1178–1182.
- Shenouda, S. K., & Alahari, S. K.**, 2009, MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor?, *Cancer and Metastasis Reviews*, *28*(3–4), 369–378.
- Shi, B., Sepp-Lorenzino, L., Prisco, M., Linsley, P., Deangelis, T., & Baserga, R.**, 2007, Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells, *Journal of Biological Chemistry*, *282*(45), 32582–32590.
- Shi, M., Liu, D., Duan, H., Shen, B., & Guo, N.**, 2010, Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion, and metastasis., *Cancer Metastasis Reviews*, *29*(4), 785–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20938719>
- Song, R., Ro, S., & Yan, W.**, 2010, In situ hybridization detection of microRNAs., *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *629*, 287–294.
- Spizzo, R., Nicoloso, M. S., Lupini, L., Lu, Y., Fogarty, J., Rossi, S., ... Calin, G. A.**, 2010, miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells., *Cell Death and Differentiation*, *17*(2), 246–54. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3648637&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., ... Takahashi, T.**, 2004, Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival., *Cancer Research*, 64(11), 3753–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15172979>
- TD, S., EJ, L., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., TS, E., & Chen, C.**, 2007, Real-time PCR quantification of precursors and mature microRNA, *ScienceDirect*, 31–38.
- Tomatis, L., Aitio, A., Wilbourn, J., & Shuker, L.**, 1989, Human carcinogens so far identified, *Japanese Journal of Cancer Research*, 80(9), 795–807.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, ilip, Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, rank**, 2002, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology*, 3(711), 34–1. Retrieved from <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.1%5Cnhttp://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034>
- Várallyay, E., Burgyán, J., & Havelda, Z.**, 2008, MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes., *Nature Protocols*, 3(2), 190–196.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., ... Croce, C. M.**, 2006, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2257–61. Retrieved from [/pmc/articles/PMC1413718/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC1413718/?report=abstract)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Võsa, U., Vooder, T., Kolde, R., Vilo, J., Metspalu, A., & Annilo, T.**, 2013, Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer., *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *132*(12), 2884–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23225545>
- Wang, Q., Wang, S., Wang, H., Li, P., & Ma, Z.**, 2012, MicroRNAs: novel biomarkers for lung cancer diagnosis, prediction and treatment, *Experimental Biology and Medicine*, *237*(3), 227–235.
- Wang, R., Jin, F., & Zhong, H.**, 2014, A novel experimental hypoxia chamber for cell culture., *American Journal of Cancer Research*, *4*(1), 53–60.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F.**, 2005, Real-time PCR for mRNA quantitation.pdf, *BioTechniques*, *39*(1), 75–85.
- Xie, Y., Todd, N. W., Liu, Z., Zhan, M., Fang, H., Peng, H., ... Jiang, F.**, 2010, Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer., *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *67*(2), 170–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2846426&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Xing, L., Todd, N. W., Yu, L., Fang, H., & Jiang, F.**, 2010, Early detection of squamous cell lung cancer in sputum by a panel of microRNA markers., *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *23*(8), 1157–1164. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2010.111>
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J. A., & Kosik, K. S.**, 2009, MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells, *Cell*, *137*(4), 647–658.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Xu, Q., Liu, L.-Z., Qian, X., Chen, Q., Jiang, Y., Li, D., ... Jiang, B.-H., 2012, MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis., *Nucleic Acids Research*, *40*(2), 761–74. Retrieved from [/pmc/articles/PMC3258133/?report=abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917858%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3258133](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3258133/?report=abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917858%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3258133)

Yu, L., Todd, N. W., Xing, L., Xie, Y., Zhang, H., Liu, Z., ... Jiang, F., 2010, Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers., *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *127*(12), 2870–8. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77955516533&partnerID=tZOtx3y1>

Yu, Z., Baserga, R., Chen, L., Wang, C., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G., 2010, microRNA, cell cycle, and human breast cancer., *The American Journal of Pathology*, *176*(3), 1058–1064.

Zhang, W.-C., Liu, J., Xu, X., & Wang, G., 2013, The role of microRNAs in lung cancer progression., *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, *30*(3), 675. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23925663>

Zhu, W., Qin, W., Atasoy, U., & Sauter, E. R., 2009, Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects., *BMC Research Notes*, *2*(1), 89. Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/2/89>

ÖZGEÇMİŞ

İLETİŞİM BİLGİLERİ

E-Posta : gizemors@gmail.com
Adres Bilgileri : Mustafa Kemal Cad. Süsler Apart. No:14 Daire:9
BORNOVA/İZMİR
Cep Telefonu : 90 (542) 760 24 64

KİŞİSEL BİLGİLER

Medeni Durumu : Bekâr
Uyruk : TC
Doğum Tarihi : 25.07.1990
Doğum Yeri : Kocasinan/KAYSERİ
Sürücü Belgesi : -

EĞİTİM DURUMU

Yüksek Lisans : Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik
Anabilim Dalı (Biyoteröpatikler & Biyodiagnostikler Lab),
İZMİR
Lisans : Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik (% 30 İngilizce Eğitim) Bölümü, 2015
Lise : Atatürk Süper Lisesi, 2008, ADANA
Ortaokul : A. İbrahim Karaoğlanoğlu İlköğretim Okulu, 2005, ADANA

YAYINLAR

Sultan GÜLÇE İZ, **Gizem ÖRS**, Cytoprotective Effect of A Functional Anti-Pollutant Blend of Plant Extracts Through Reducing B[A]P İnduced İntracellular Oxidative Stress and UV İrradiation, Biotechnology Letters-(*değerlendirme aşamasında*)

BİLDİRİLER

Sultan Gulce-Iz, Mert Döşkaya, Rie Nakajima, Jozelyn Pablo, Aarti Jain, Hüseyin Can, Esra Atalay- Şahar, Muhammet Karakavuk, Aytul Gül, **Gizem Örs**, Aysu Değirmenci-Döşkaya, A. Yuksel Gürüz, D. Huw Davies, Philip L. Felgner, Aykut Özdarendeli, Nazif Elaldi, Discovery of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) Vaccine Candidate Antigens by Protein Microarray Scanning and Verification of the Determined Antigens by Recombinant ELISA, 5-7 Ekim- 2017, Fransa- (Basvuru asamasında)

Gizem ÖRS, Elif ÇELİK, Sultan GÜLÇE İZ, Cytoprotective effect of a functional anti-pollutant blend of plant extracts through reducing BaP induced intracellular oxidative stress, 13th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants: Emerging Roles of ROS-RNS Interplay in Plants, 10-13 Eylül 2017, Kuşadası (*Sözlü sunum kabul edildi*)

Gizem ÖRS, Sultan GÜLÇE İZ, 'Meme, Prostat Ve Akciğer Kanseri Veri Setlerindeki Ortak MiRNA Biyobelirteçlerinin Meta-Analiz Yaklaşımı İle Belirlenmesi' II. Türkiye in Vitro Diyagnostik Sempozyumu, 2017, İzmir (*Sözlü sunum*)

Gizem ÖRS, Gülhan IŞIK, *Derin Kültür Fermentasyonu Yöntemi İle Coniothyrium Fuckelii ATCC 74227 Suşundan A-Amilaz Üretiminin Optimizasyonu*, II. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, 2014, İzmir (*Poster sunumu*)

İŞ DENEYİMLERİ

- ❖ Özel Ders Öğretmeni, 2016 (8 Ay),
- ❖ Gönüllü Proje Öğrencisi, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, *Rekombinant Protein Üretimi*, 015 (5 Ay),
- ❖ Stajyer Biyomühendis, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Amilaz Enzimi Üretiminin Optimizasyonu, 2015 (5 Ay),
- ❖ Mağaza Satış Danışmanı ve Kasiyer, Kartal Yuvası - Bjk Store 2014 (3Ay),
- ❖ Stajyer Biyomühendis, Erciyes Üniversitesi Viroloji Anabilim Dalı, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Aşısı geliştirme çalışmaları, 2013 (2 Hafta)
- ❖ Stajyer Biyomühendis, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Nöroblastoma kanser tanı ve tedavi çalışmaları, doku bankasının oluşturulması, kanser kök hücresi invitro çalışmaları, 2013 (3 Ay)

İŞ YETKİNLİKLERİ

- ❖ Memeli hücre hattı bankası oluşturulması
- ❖ Antioksidan etkinliğinin belirlenmesi
- ❖ Hücre ve doku kültürü uygulamaları
- ❖ RT- PCR, Real-Time PCR, RFLP PCR, ITS PCR, Gradient PCR, Multiplex PCR ve analizleri
- ❖ DNA ve RNA Ekstraksiyonu
- ❖ Sitotoksosite ve Genotoksosite testleri
- ❖ HPLC, Diğer Analitik Cihazlar
- ❖ Elektroporasyon Cihazı
- ❖ Elektroforez Cihazları

ALINAN KURSLAR

- ❖ Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Yaz Kursu Eğitim Programı, 2013, İzmir
- ❖ Temel Hücre Kültürü Ve Hücre Ölümü Analiz Yöntemleri Uygulamalı Kursu-IV, 2017, İzmir

KATIDIĞI SEMPOZYUMLAR

- ❖ New Approaches to Stem Cell Applications in Patient-Based Therapy, 2017, Celal Bayar Üniversitesi, Manisa
- ❖ II. Türkiye in Vitro Diyagnostik Sempozyumu, 2017, Türk Biyokimya Derneği, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir
- ❖ II. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, Ege Üniversitesi, İzmir
- ❖ Kök Hücre Sempozyumu, 2012, EBİLTET, İzmir
- ❖ Doku Mühendisliği Sempozyumu, 2011, Ege Üniversitesi, İzmir

GÖREV ALINAN ORGANİZASYONLAR

- ❖ Temel Hücre Kültürü Ve Hücre Ölümü Analiz Yöntemleri Uygulamalı Kursu-IV, Ege Üniversitesi, 2017
- ❖ 11. Biyomühendislik Günleri, Ege Üniversitesi, 2014
- ❖ 10. Biyomühendislik Günleri, Ege Üniversitesi, 2013
- ❖ 9. Biyomühendislik Günleri, Ege Üniversitesi, 2012

SERTİFİKA BİLGİLERİ

- ❖ Kalite - Denetim - İç Denetçilik Sertifikası - Mart, 2014
- ❖ ISO 9001:2008 Temel Kalite Yönetimi - Mart, 2014
- ❖ ISO 14001 Çevre Yönetimi Eğitimi - Mart, 2014
- ❖ ISO 22000 Gıda Güvenliği Eğitimi - Mart, 2014
- ❖ ISO 18001 İş Güvenliği Ve İşçi Sağlığı Eğitimi - Mart, 2014
- ❖ ISO 19011 İç Tetkik Eğitimi - Mart, 2014

BİLGİSAYAR YETKİNLİKLERİ

- ❖ Edraw Max
- ❖ Matlab
- ❖ Microsoft Office
- ❖ Design Expert
- ❖ Graphpad Prism 6.0/7.0

