

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE TWIST 1
EKSPRESYONUNUN miRNA PROFİLİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fadime KARAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

KONYA-2019

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE TWIST 1
EKSPRESYONUNUN miRNA PROFİLİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fadime KARAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17202071 Proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2019

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

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

Jüri Başkanı: Doç.Dr. Hüsamettin VATANSEV
Selçuk Üniversitesi

İmza



Danışman: Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK
Selçuk Üniversitesi

İmza



Üye: Dr. Öğr. Ü. Suray PEHLİVANOĞLU
Necmettin Erbakan Üniversitesi

İmza



ONAY:

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

İmza

Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

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

Hem eğitim sürecimde hem de tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren ve her daim bana sabır gösterip yardımcı olan değerli danışmanım Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her anında bilgisine başvurduğum, Necmettin Erbakan Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Suray PEHLİVANOĞLU'na ve Selçuk Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Nadir KOÇAK'a yardımları ve yol göstericiliği için teşekkür ederim.

Eğitimim esnasında her daim bana destek ve emek veren Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ali ÜNLÜ'ye ve değerli hocalarımız Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV, Doç. Dr. Abdullah SİVRİKAYA, Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU ve Doç. Dr. Esmâ MENEVŞE'ye çok teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan her zaman büyük bir keyif aldığım ve her zaman desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım İlkay SAK ve Hilal TESTİCİ'ye sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman ve her durumda yanımda olup, destek veren canım aileme, Mohammad AHMADBİK, Karam GHARAB'a ve isimlerini burada sayamadığım arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

3'UTR	3' Ucundaki Translasyona Uğramayan Bölge
AIB1	Amplified İn Breast Cancer 1
Ago2	Argonaute2
Akt2	Protein kinaz 2
APAF1	Apoptotik Peptidaz Aktive edici Faktör 1
ARF	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
BAFF	B hücresi aktivasyon faktörü
BHLH	Temel helix döngü helix
BMI1	Polycomb complex protein
BRCA1	Meme kanserine yakınlık geni 1
BRCA2	Meme kanserine yakınlık geni 2
BT-IC	Tümör başlatıcı hücreler
CASP3	Kaspaz 3
CASP9	Kaspaz 9
CCND1	Siklin D1
CCNA2	Siklin A2
CD44	Ekstraselüler matriks reseptörü III
CDK4/6	Siklin bağımlı kinazlar 4/6
CDK	Siklin bağımlı kinazlar
CDKI	Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
CDKN1	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit
c-fos	Proto-onkojen transkripsiyon faktör
c-jun	Proto-onkojen transkripsiyon faktör
c-myb	Proto-onkojen transkripsiyon faktör
c-myc	Proto-onkojen transkripsiyon faktör
CSC	Kanser kök hücresi
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Dinükleotittrifosfatlar

E2F	Estradiol transkripsiyon faktörü
E2F1	Estradiol transkripsiyon faktörü 1
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
EOC	Epitelyal over kanseri
ER-a	Östrojen reseptör-alfa
ERBB2	Tirozin kinaz reseptörünü kodlayan onkogen
ESR1	Östrojen Reseptörü 1
FBS	Fetal Bovin Serum
Fzd3	Frizzled3
HDAC	Histon deasetilaz
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HIF	Hipoksi ile indüklenebilir faktör
HOXD10	Homeobox D10
IFN	Tip 1 interferon
IL-17	İnterlökin-17
INF-a	İnterferon-a
ITGA5	İntegrin a5
K-RAS	Ras alt familyasına ait bir gen
MALAT1	Metastaz İlişkili Akciğer Adenokarsinom Transkripti 1
MAPK	Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz
MCF-7	Meme kanseri hücre serisi
miRNA	Mikro RNA
MMP16	Matriks metallopeptidaz 16
M-RIP	Miyozin fosfataz-Rho-interacting protein
mRNA	Mesajcı RNA
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
n-myc	Proto-oncogene protein
ORF	Open reading frame
p53	Tümör baskılayıcı gen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDCD4	Programlanmış hücre ölümü 4
PEBP1	Fosfatidiletanolamin Bağlayıcı Protein 1

PI3K	Fosfo inositid-3 kinaz
pre-miRNA	Prekürsör miRNA
Pri-miRNA	Primer mikro RNA
PTEN	Tümör baskılayıcı gen
qPCR	Kantitatif polimerazyon zincir reaksiyonu
Rb	Retinoblastoma
RDX	Radiksin
RhoA	Ras homoloğu olan gen ailesinin üyesi A
RhoC	Ras homologue gene family member C
RISC	RNA kaynaklı susturma kompleksi
RKIP	Raf kinase inhibitory protein
RNA	Ribo nükleik asit
SESN1	Sestrin 1
siRNA	Küçük interferans RNA
SNAI2	Snail family transcriptional repressor 2
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
T-IC	Tümör başlatıcı hücreler
TF	Transkripsiyon faktörü
TGF- B	Transforme edici büyüme faktörü-B
TPM1	Tropomiyosin 1
TNC	Tenascin C
TNFa	Tümör nekroz faktörü a
TWIST	Transkripsiyon faktörü
UTR	Untranslated region
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
ZEB1	Çinko Parmaklı E-Box Bağlama Homeobox 1

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1. 2018'de Dünya genelinde yeni kanser vakalarının ve kanser ölümlerinin yüzde olarak ifadeleri (GLOBOCAN 2018)

Şekil 1.2. Uluslararası Kanser Ajansı kanser yeni tanı ve ölüm vakaları dağılım grafiği (GLOBOCAN 2018)

Şekil 1.3. Uluslararası Kanser Ajansı Türkiye'deki kanser yeni tanı vakaları dağılım grafiği (GLOBOCAN 2018)

Şekil 1.4. Uluslararası Kanser Ajansı Türkiye'deki erkeklerde yeni tanı vakaları dağılım grafiği (GLOBOCAN 2018)

Şekil 1.5. Uluslararası Kanser Ajansı Türkiye'deki kadınlarda yeni tanı vakaları dağılım grafiği

Şekil 1.6. Dünya'da 2018'den 2040 yıllarına kadar oluşması tahmin edilen yeni kanser vaka grafiği

Şekil 1.7. Uluslararası Kanser Ajansı 2018 yeni kanser vaka verileri

Şekil 1.8. Uluslararası Kanser Ajansı 2018 kanser sebepli ölüm vaka verileri

Şekil 1.9. Uluslararası Kanser Ajansı 2018 kadınlarda yeni kanser vaka verileri

Şekil 1.10. Uluslararası Kanser Ajansı 2018 kadınlarda kanser kaynaklı ölüm vaka verileri

Şekil 1.11. miRNA oluşumu

Şekil 1.12. miRNA Biyogenezi

Şekil 1.13. miRNA'lar ve Twist1 arasındaki etkileşim

Şekil 4.1. p53 sinyal yolağı

Şekil 4.2. PI3K-AKT sinyal yolağı

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1.1. miRNA'lar ve Twist1 arasındaki ilişki

Çizelge 2.1. Poly(A) mix içeriği

Çizelge 2.2. poly (A) bağlanması için gereken süre ve sıcaklık

Çizelge 2.3. cDNA mix içeriği

Çizelge 2.4. BrightGreen MasterMix ve miRNA primer mix içeriği

Çizelge 2.5. Real time PCR ısı protokolü

Çizelge 3.1. miRNA paneli

Çizelge 3.2. Kontrol grubu ve transfekte edilen numunelerin miRNA değerleri

Çizelge 3.3. Eşik döngüsü ($-\Delta\Delta CT$) değerleri



ÖZET
T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Twist 1 Ekspresyonunun miRNA Profili
Üzerindeki Etkisinin Araştırılması**

Fadime KARAMAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2019

Meme kanseri, Dünya'daki kanser çeşitlerinin arasında yeni vakalarda ikinci sırada, ölüm vakalarında ise beşinci sırada gelmektedir. Gün geçtikçe tüm Dünya'da ve ülkemizde meme kanserinin görülme sıklığı artmaktadır.

Transkripsiyon faktörlerinden olan Twist1, epitel hücrelerinin yer değiştirme, düzenlenme, farklılaşma gibi faaliyetlerini düzenlemektedir. Tüm kanser türlerinde, kötü prognoz, yüksek dereceli invaziv ve metastatik lezyonlarla ilişkilendirilmiş ve ayrıca apoptozisi indüklediği belirtilmiştir. Ayrıca Twist1, anjiyogenez ve kromozomal instabiliteyi indükleyen MCF-7 hücrelerinde vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) sentezini artırabilir. Twist1, kanser ile ilişkilendirilen mikro RNA (miRNA)'ların da ekspresyonlarını düzenlemektedir.

miRNA'lar, fonksiyonel RNA molekülleridir. Gen ekspresyonunun fonksiyonel olarak düzenlenmesinde rol oynamaktadır. miRNA'ların meme kanseri patogenezinde rol oynadığının belirlenmesi, miRNA'ların ileride meme kanserinin tanı ve tedavisinde de yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre serisinde eksprese olan Twist1 geninin miRNA'ların ekspresyon düzeylerine etkisi Real Time PCR analizi ile incelendi.

Çalışma sonucunda, miR-1-1, miR-7-5p, miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-34c-5p, miR-39-3p, miR-183-5p ve miR-210-3p ekspresyonlarının up regüle olduğu tespit edildi.

Çalışmada elde edilen verilere göre, miR-1-1, miR-7-5p, miR-15a-5p, miR-34c-5p, miR-210-3p ve miR-183-5p'nin hücre döngüsünü, apoptozu ve metastazı etkileyebileceği gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: MCF-7; miRNA; Twist1.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TWIST 1 EXPRESSION ON THE miRNA PROFILE IN MCF-7 BREAST CANCER CELLS

Fadime KARAMAN

**DEPARTMENT OF MEDICAL BIOCHEMISTRY
MASTER'S THESIS / KONYA-2019**

Breast cancer is second among new types of cancers in the world and fifth in death cases. The prevalence of breast cancer is increasing day by day in our country and in the world.

Twist1 Transcription factor regulates the functions of epithelial cells such as displacement, regulation, and differentiation. In all types of cancer, poor prognosis is associated with high-grade invasive and metastatic lesions and has also been implicated in inducing apoptosis. In addition, Twist1 may enhance the synthesis of vascular endothelial growth factor (VEGF) in MCF-7 cells that induce angiogenesis and chromosomal instability. Twist1 also regulates the expression of micro-RNAs (miRNAs) associated with cancer.

miRNAs are functional RNA molecules. It plays a role in the functional regulation of gene expression. Whether miRNAs play a role in breast cancer pathogenesis suggests that miRNAs may be useful in the diagnosis and treatment of breast cancer in the future.

In this study, the effect of Twist1 gene on expression levels of miRNAs expressed in MCF-7 breast cancer cell line was investigated by Real-Time PCR analysis.

At the end of the study, the result of expressions of miR-1-1, miR-7-5p, miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-34c-5p, miR-39-3p, miR-183-5p and miR-210-3p were determined as up-regulated.

According to the data obtained in the study, it was observed that miR-1-1, miR-7-5p, miR-15a-5p, miR-34c-5p, miR-210-3p and miR-183-5p may affect cell cycle, apoptosis and metastasis.

Keywords: MCF-7; miRNA; Twist1.

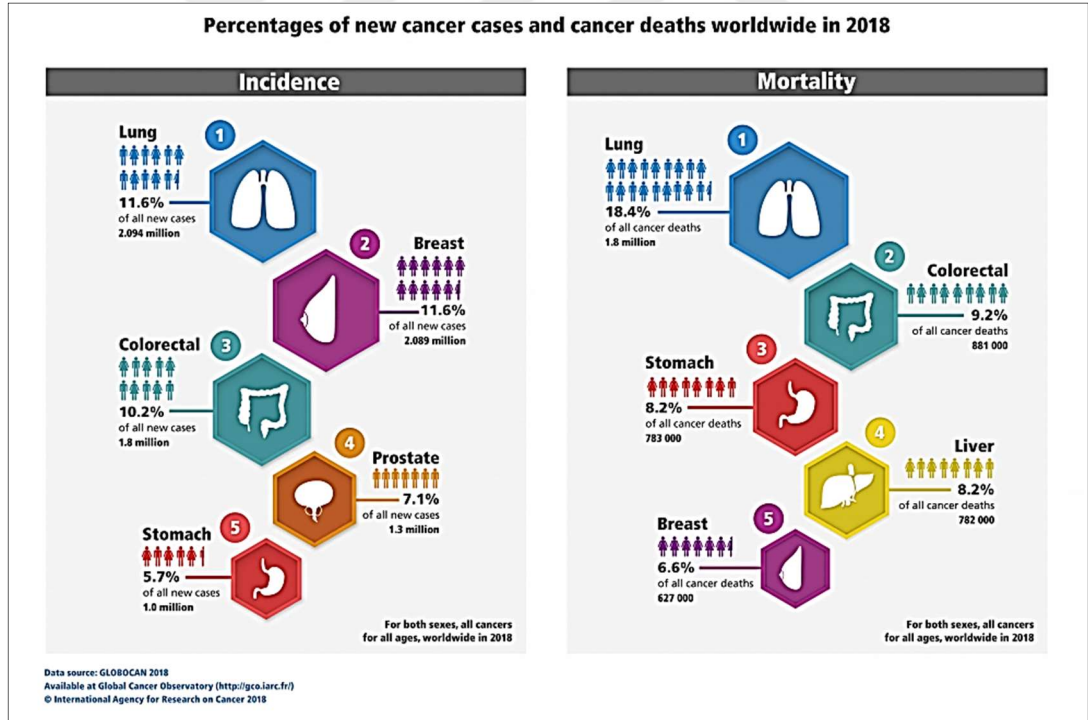
İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	i
SİMGELER ve KISALTMALAR	ii
ŞEKİL DİZİNİ	v
ÇİZELGE DİZİNİ	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1. Kanser	3
1.2. Meme Kanseri	6
1.2.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	8
1.2.2. Meme Kanseriyle İlgili Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler.....	9
1.2.3. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı	11
1.3. miRNA	11
1.3.1. miRNA'ların Tarihçesi ve Yapısı.....	12
1.3.2. miRNA'ların Biyogenezi.....	12
1.3.3. Meme Kanseri ve miRNA'lar.....	15
1.4. Twist1	16
2. GEREÇ ve YÖNTEM	26
2.1. Gereçler	26
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	26
2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar araçları.....	27
2.2. Yöntem	28
2.2.1. Hücre Kültürü	28
2.2.2. Real Time PCR Çalışma Prosedürü.....	30
3. BULGULAR	34
4. TARTIŞMA	38
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
6. KAYNAKLAR	48
7. EKLER	53
8. ÖZGEÇMİŞ	54

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, organizmayı oluşturan hücrelerin çevresel etkilere bağlı olarak değişime uğrayıp dokuları istila etmesiyle kontrolsüz ve bağımsız bir şekilde üreme yeteneği kazanarak sınırsız bölünmeleri sonucu oluşan anormal büyümeler olarak tanımlanmaktadır. Kanseri kontrol altına alabilmek için öncelikle kanser verilerinin (oluşan yeni vaka ve ölüm sayısı) belirlenmesi gerekmektedir (Lindsey 2012).

Yeni tahminlere göre Dünya’da ortaya çıkan yeni kanser vakalarında ve kanser sebepli ölümlerde bir önceki verilere göre artış gözlenmektedir. GLOBOCAN 2018 verilerine göre Dünya’daki toplam 18,078,957 yeni kanser vakası gelişmiş ve 9,555,027 kanser sebepli ölüm gerçekleşmiştir. Dünya’da en fazla tanı konulan kanserlerin başında akciğer (%11,6), meme (%11,6) ve kolon (%10,2) kanseri gelirken, kanser kaynaklı ölümlerin başında da akciğer (%18,4), kolon (%9,2), mide (%8,2) ve meme (%6,6) gelmektedir (GLOBOCAN 2018) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. 2018'de Dünya genelinde yeni kanser vakalarının ve kanser ölümlerinin yüzde olarak ifadeleri (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)

Meme kanserinin bütün dünyadaki görülme oranı giderek artmakta ve en çok kadınlarda rastlanan kanserdir. Meme kanseri, yeni kanser vakaları ile kanser sebepli ölümlerin arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Meme kanserinin nedenleri tam olarak

bilinmemektedir. Fakat yapılan çalışmalarda meme kanseri görülme riskinin bazı kriterlere sahip kadınlarda daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Bu kriterlere kısaca risk faktörü denilmektedir. Bu risk faktörlerinin (Yaş, yağlı beslenme, sigara ve alkol kullanımı, ergenlik süresi, cins, doğum kontrol hapı kullanımı, östrojen alınması, daha önce meme biyopsisi yapılmış olması gibi) azalmasına veya artmasına göre, meme kanserinin görülme sıklığı da farklılık göstermektedir (Moorman ve Terry 2004).

Twist1, spesifik DNA bölgelerine bağlanabilen ve özellikle genlerin faaliyetini kontrol eden transkripsiyon faktörüdür. Kanser hücresinde yeniden aktif hale gelmesi hastada kötü prognoza sebep olmaktadır. Twist1, kanser hücrelerinde invaziv ve metastatik mekanizmaları düzenlemektedir. Twist proteinlerinin, yaşlanmayı ve apoptoz indüksiyonunu önleyerek onkogenik özellikler gösterdiği bulunmuştur (Yang ve ark 2004).

Twist1 geninin bir fonksiyonu olan DNA metilasyonu, sitozin halkasına metil grubu ekleyip transkripsiyonu engellemektedir. Transkribe engellenmek istenen bölgeye Twist1 bağlanarak gen bölgesinden mRNA sentezi engellenmektedir. Twist1, sadece protein kodlayan genlerin değil, miRNA'ların ifadesini de düzenlemektedir. miRNA'lar arasındaki Twist1, hücrel göçü ve istilayı pozitif olarak düzenlemekte, anjiyogenezi teşvik etmekte, apoptoz ve yaşlanmayı geçersiz kılarak ve metastazı indüklemektedir.

miRNA'lar, ~20–24 nükleotit içeren küçük ve protein kodlamayan RNA'lardır. Hedef mRNA'ların 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgelerini (3'UTR) hedefleyip transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenlemektedirler. Bir hedef mRNA'ya bağlanan miRNA, translasyonun inhibisyonuna ve ilgili mRNA'nın bozulmasına neden olan RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) ile sonuçlanmaktadır. miRNA'lar apoptoz, fibrojen, anjiyogenez, tümör metastazı ve kemoterapi direnci gibi çeşitli hücrel işlemlerin düzenlenmesinde yer almaktadır (Khanbabaei ve ark 2016).

miRNA'ların hem işlevsel öneminin anlaşılabilmesi hem de tanı/tedavi amaçlı kullanılabilmesi için gen ifadesini farklı seviyelerde nasıl düzenlediklerinin ve hedeflerine nasıl bağlandıklarının belirlenmesi gerekmektedir. Son yapılan çalışmalarda transkripsiyon faktörlerinin, kanser hücrelerindeki miRNA'lar üzerindeki

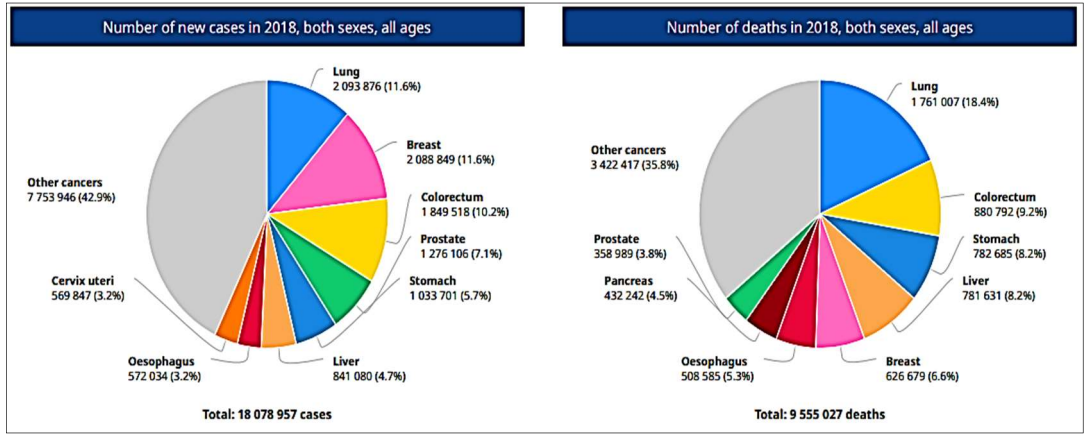
etkileri araştırılmaya başlanmıştır ve bu çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda MCF-7 hücre hattında Twist1 ve miRNA ilişkisi bakılmamıştır. Çalışmamızda, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Twist1 ekspresyonunun miRNA'lar üzerindeki etkisini inceledik ve bu çalışmayla Twist1 ile ilişkisi olan miRNA'ların bundan sonraki yapılacak olan çalışmalara kaynak ve yeni yaklaşımlar sunması hedeflendi.

1.1. Kanser

Kanser, DNA'da meydana gelen hasar sonucu hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalması ile oluşmaktadır. Normal hücre bölünmesi belli bir zaman sonra sona ererken, kanserli hücre bölünmesi durmaksızın devam eder. Oluştukları yerden diğer doku veya organlara, kan veya lenf damarları aracılığı ile taşınarak metastaz oluşturmaktadırlar. Normal hücrelerdeki hücre çoğalması ile apoptoza bağlı olarak gerçekleşen hücre kayıpları arasında bir denge varken kanserli hücrelerde bu denge bozulmakta ve kontrol mekanizması kaybolmaktadır (Ruddon 2010, Hanahan ve Weinberg 2011).

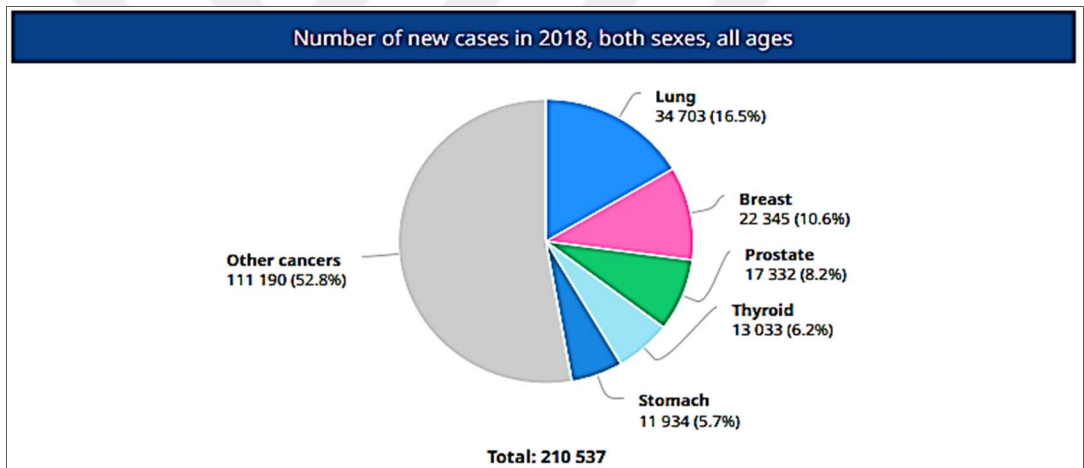
Gelişmiş ülkelerde ölüm vakalarının birçoğu kanser sebeplidir. Kanserinin kontrol altına alınabilmesi için ilk olarak, ortaya çıkan yeni kanser vakaları ve kanser kaynaklı ölüm sayısının tahmin edilmesi gerekmektedir.

2018 verilerine göre Dünya'daki yeni tanı konulan kanserli vaka sayısı ve kanser sebepli ölümlerde daha önceki yıllara göre artış görülmektedir. GLOBOCAN 2018 verilerine göre Dünya'daki yeni kanser vaka sayısı 18,078,957'ye, kansere bağlı ölüm 9,555,027'ye ulaşmıştır. Dünya'da en fazla tanı koyulan kanserlerin başında akciğer (%11,6), meme (%11,6) ve kolon (%10,2) kanseri gelirken, kanser kaynaklı ölümlerin başında da akciğer (%18,4), kolon (%9,2), mide (%8,2) ve meme (%6,6) gelmektedir (GLOBOCAN 2018) (**Şekil 1.2.**).



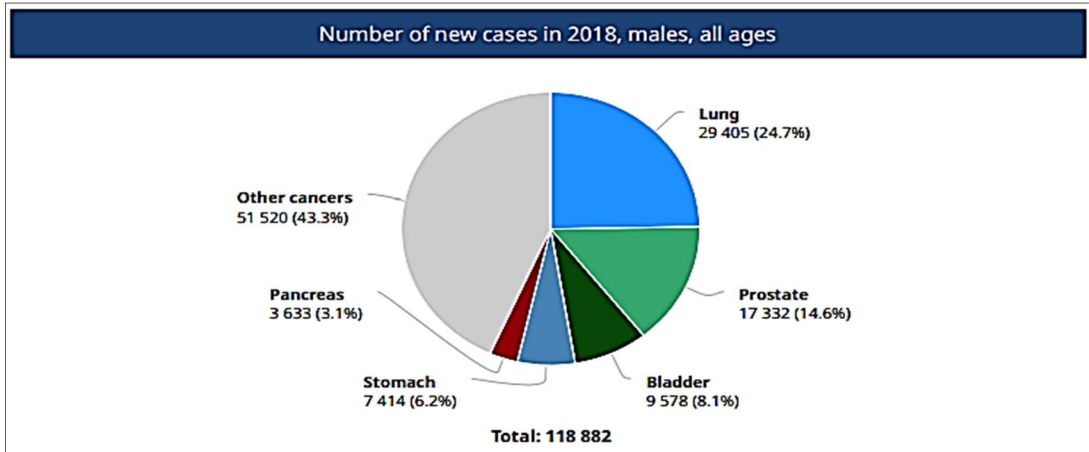
Şekil 1.2. Uluslararası Kanser Ajansı kanser yeni tanı ve ölüm vakaları dağılım grafiği (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)

GLOBOCAN 2018 verilerine göre Türkiye’de toplam yeni kanser vakası 210,537 iken kansere bağlı ölüm vakası 116,710 olarak belirlenmiştir (Şekil 1.3.).

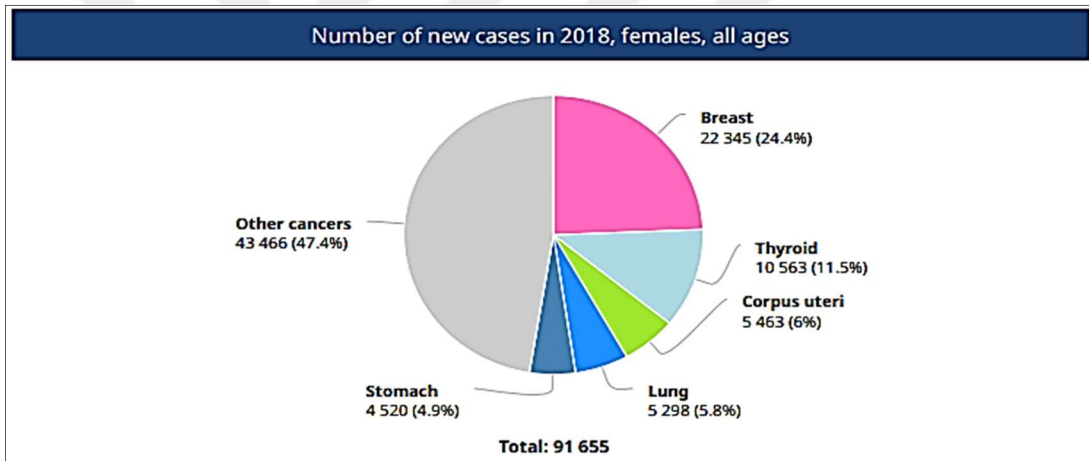


Şekil 1.3. Uluslararası Kanser Ajansı Türkiye’deki kanser yeni tanı vakaları dağılım grafiği (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)

Bu yeni kanser vakaların 118,882’si erkeklerden, 91,655’i ise kadınlardan oluşmaktadır. Erkeklerde yeni kanser vakalarının başında akciğer (%24,7), prostat (%14,6), mesane (%8,1) kanserleri gelirken, kadınlardaki yeni kanser vakalarının başında meme (%24,4), tiroit (%11,5), rahim (%6) kanserleri gelmektedir (Şekil 1.4., Şekil 1.5.).

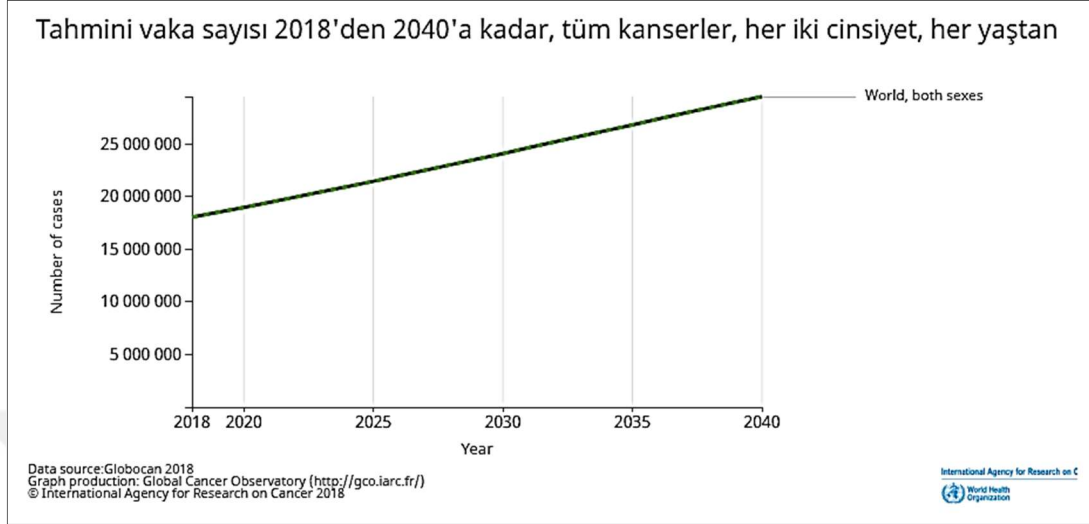


Şekil 1.4. Uluslararası Kanser Ajansı Türkiye’deki erkeklerde yeni tanı vakaları dağılım grafiği (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)



Şekil 1.5. Uluslararası Kanser Ajansı Türkiye’deki kadınlarda yeni tanı vakaları dağılım grafiği (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)

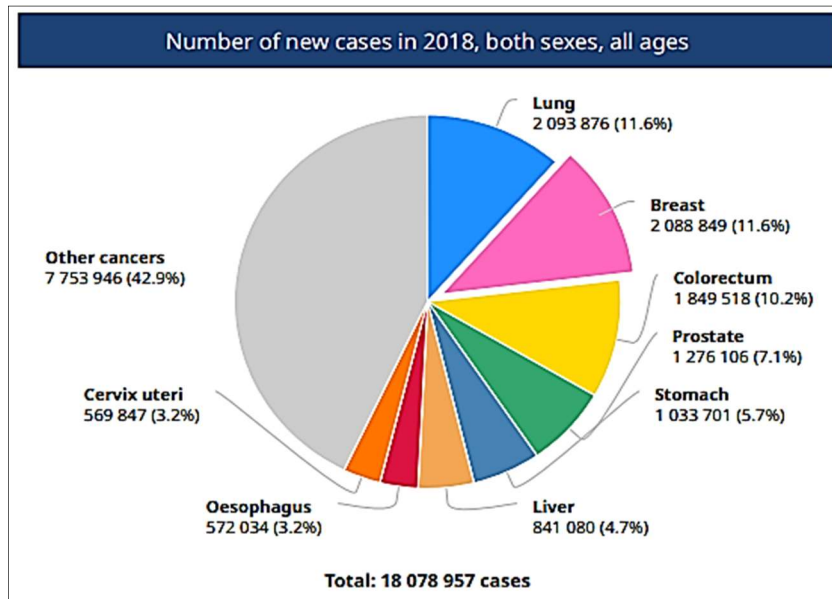
Uluslararası Kanser Ajansı'nın verilerine göre kanser artışının bu şekilde devam etmesi durumunda, Dünya'da yeni kanser vakalarındaki artışın 2040 yılına kadar 29,5 milyona ulaşacağı düşünülmektedir (Şekil 1.6).



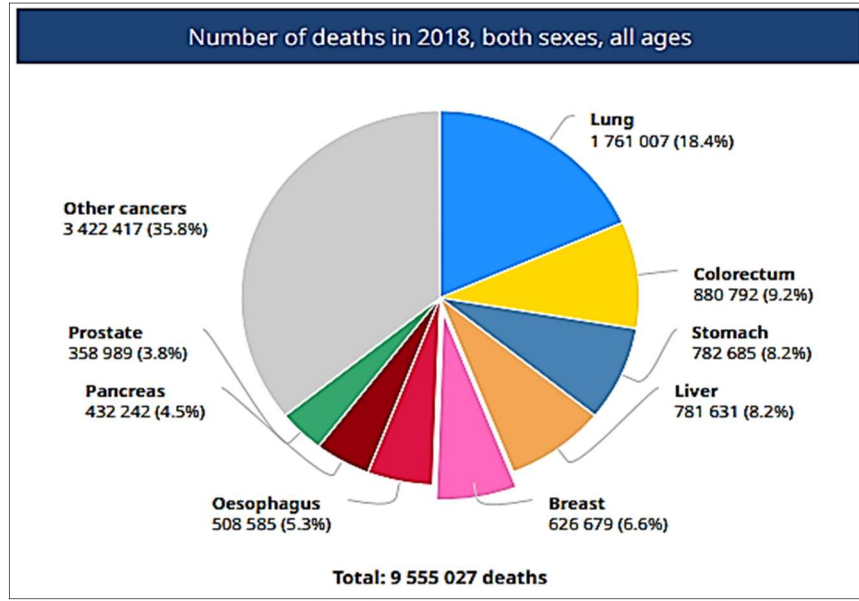
Şekil 1.6. Dünya'da 2018'den 2040 yıllarına kadar oluşması tahmin edilen yeni kanser vaka grafiği (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)

1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, Dünya'daki kanser çeşitlerinin arasında yeni vakalarda ikinci sırada, ölüm vakalarında ise beşinci sırada gelmektedir (GLOBOCAN 2018) (Şekil 1.7., Şekil 1.8.).

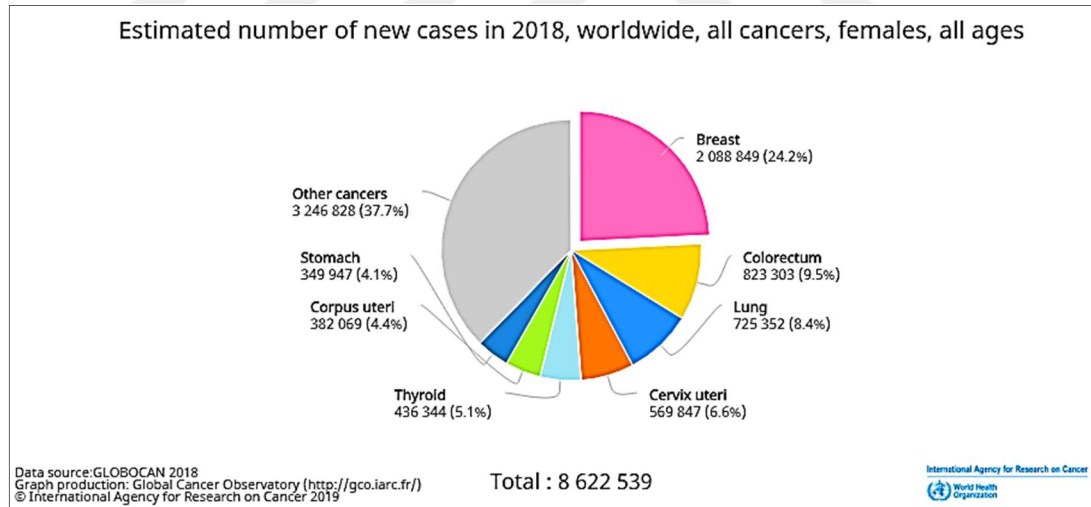


Şekil 1.7. Uluslararası Kanser Ajansı 2018 yeni kanser vaka verileri (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)



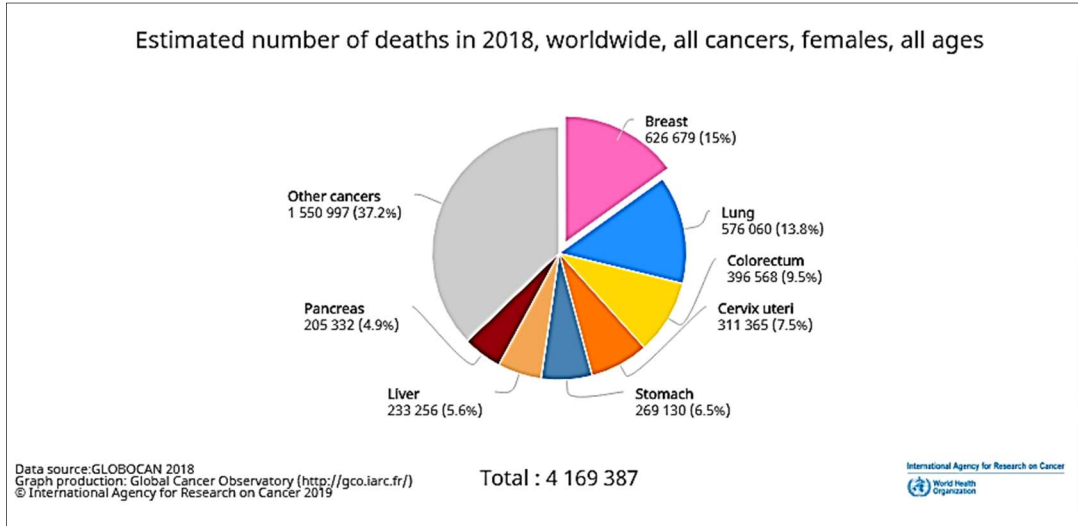
Şekil 1.8. Uluslararası Kanser Ajansı 2018 kanser sebebi ölüm vaka verileri (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)

Kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür (**Şekil 1.9.**). Gün geçtikçe tüm Dünya’da ve ülkemizde meme kanserinin görülme sıklığı artmaktadır (Shin ve ark 2010).



Şekil 1.9. Uluslararası Kanser Ajansı 2018 kadınlarda yeni kanser vaka verileri (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)

Uluslararası Kanser Ajansı’nın son verilerine göre meme kanseri yeni vaka sayısı Dünya’da 2,088,849’a, ülkemizde ise 22,345’e çıkmıştır. Ayrıca Dünya’daki meme kanserine bağlı ölüm sayısı 626,679’a çıkmıştır (**Şekil 1.10.**).



Şekil 1.10. Uluslararası Kanser Ajansı 2018 kadınlarda kanser kaynaklı ölüm vaka verileri (GLOBOCAN 2018) (<https://gco.iarc.fr/today/home>)

Meme kanserinin, genetik olarak allel ve lokus içeriğine göre heterojenliği yüksek seviyededir. Bu tip bir heterojenite “çoklu nadir allel, yaygın hastalık” modeli olarak tanımlanmaktadır (Calin ve ark 2004).

Meme gelişimini etkileyen birçok hormon bulunmaktadır. Bu hormonlar insülin, östrojen, prolaktin, progesteron, adrenal kortikoid, tiroksin ve büyüme hormonu olarak sıralanmaktadır.

Meme kanseri vakalarının %75-80’i sporadik meme kanserinden oluşmaktadır. Östrojene uzun süre maruz kalmak veya östrojen seviyesindeki artış, sporadik meme kanseri için risk faktörlerinin başında gelmektedir. Yapılan çalışmalarda, kanser oluşumunda eksojen ve endojen karsinojenler ile bunların neden olduğu genetik değişiklikler en çok üzerinde durulan noktalardır (Mitrinen ve Hirvonen 2003).

1.2.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserinin nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Fakat yapılan çalışmalarda meme kanseri görülme riskinin bazı kriterlere sahip kadınlarda daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Bu kriterlere kısaca risk faktörü denilmektedir. Bu risk faktörlerinin azalmasına veya artmasına göre, meme kanserinin görülme sıklığı da farklılık göstermektedir ve bu risk faktörleri şu şekilde sıralanabilir:

- Yaş

- Obezite
- Yağlı beslenme
- Sigara ve alkol kullanımı
- Ergenlik süresi
- Cins
- Irk
- Doğum kontrol hapı kullanımı
- Doğurganlık hikayesi
- Östrojen alınması
- Daha önce meme biyopsisi yapılmış olması
- Kişisel veya ailesel meme kanseri hikayesi

1.2.2. Meme Kanseriyle İlgili Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler

Meme kanseri, çok aşamalı uzun bir zaman diliminde ortaya çıkmaktadır. Bu aşamalar, hücrelerin büyüme ve gelişimine katılan, önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile gerçekleşmektedir. Kanserin oluşmasında etkili olan önemli tümör baskılayıcı ve onkogen genler bulunmaktadır. Bu gen grupları kanserin oluşmasında birbirinin tam tersi etki göstermektedirler. Tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde görev alan genleri kontrol etmektedirler. Bu genler tümör oluşmasını engellemektedirler. Eğer bu tümör supresör genlerde bir hasar oluşursa kontrollü büyüme ortadan kalkar ve kanser oluşumu gerçekleşir (Osborne ve ark 2004). Onkogenler ise kötü huylu tümör oluşumuna neden olmaktadır. Kanserli ve sağlıklı meme dokularında en çok rastlanan ve etkili olduğu düşünölen genler, tümör baskılayıcı genlerden p53 ve onkogenlerden Myc, Ras, ERBB2 olarak söylenebilir (Klijn ve ark 1992).

CerbB-2 (HER2/Neu): HER2 reseptörleri, hücre içindeki sinyal iletim yollarını etkinleştirmektedir. Bu reseptörler hücrenin çoğalmasına ve farklılaşmasına neden olmaktadır. Tümör gelişimi ve ilerlemesiyle yakından ilgili olan bu genin amplifikasyonu klinikte son derece önemlidir.

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), tirozin kinaz aktivitesine sahip olan tirozin kinaz reseptörünü kodlayan onkogen (ERBB2) hücre reseptör grubunun bir üyesidir. Bu reseptörler, trans membran glikoproteinlerdir.

HER2, HER3 ve HER4 EGFR ailesinin alt gruplarını oluşturmaktadır. Epidermal büyüme faktörü, EGFR'ye bağlanması ile hücre içine alınmaktadır. Bunun sonucunda nukleustaki transkripsiyon faktörleri aktifleşerek hücre bölünmesini uyarırlar. EGFR, herhangi bir onkogenik mutasyona uğradığı zaman kontrolsüz hücre bölünmesiyle birlikte tümör oluşumu gerçekleştirebilir.

Farklı dokularda büyümeyi indükleyen büyüme faktörlerinin ve steroidlerin etkileri nuklear proto-onkogenler sayesinde gerçekleşmektedir. Hücreler mitojen ile etkileşime geçtikten sonra c-fos, c-myc, c-jun ve c-myc proto-onkogenleri indüklenir. Hücre proliferasyonu ile bu onkogenlerin indüksiyonu arasında bir bağlantı bulunmaktadır. Meme kanserinde c-fos, c-myc ve c-jun proto-onkogenlerin aktifleşmesi, progesteron ve östrojen aracılığı ile olmaktadır.

c-myc: Bir transkripsiyon faktörü olan c-myc, fosfoprotein yapıdadır. Bu faktör hücrenin proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozunda; RNA, protein sentezi ve enerji metabolizmasında düzenleyici olarak görev yapmaktadır. c-myc'nin, hücre büyümesinin kontrolünde gerçekleştirdiği bu düzenleyici özellikler göz önüne alındığı zaman mRNA ya da protein düzeyinde gerçekleşen çok küçük bir değişim hücrede istenmeyen farklılıklara neden olabilmektedir. c-myc'nin, fazla üretimi veya yapısında gerçekleşen değişimler meme kanserine sebep olduğu için aktivitesinin çok sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir (Chung ve Levens 2005, Grandori ve ark 2005).

Bcl-2 – Apoptoz genleri: Bcl-2, apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoproteinlerdir. Birbirini ters yönde etkileyen, antiapoptotik ve proapoptotik genler olarak iki gruptan oluşmaktadır. Proapoptotik genler, sitokrom c'nin salınmasını sağlayarak apoptozu indüklerken, antiapoptotik genler ise oksidatif fosforilasyona ve elektron transport zincirine katılan sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını engelleyerek apoptozu baskılamaktadır.

Meme kanseri vakalarının %5-10'u kalıtsal kaynaklıdır. BRCA-1 ve BRCA-2 genleri, kalıtsal meme kanserlerinin %80'inden sorumlu genlerdir (Sierra ve ark 2000).

BRCA1 ve BRCA2 genleri: BRCA1 geni, 17. kromozomun uzun kolunun 21. bölgesinde, BRCA2 geni ise 13. kromozomun uzun kolunun 12. bölgesinde yerleşik

olarak bulunmaktadır (Bellosillo ve Tusquets 2006). BRCA1 geni, tümör baskılayıcı bir gen olup hücre döngüsünün kontrolü ve DNA tamirinde görev almaktadır (Balabas ve ark 2010). Meme kanseri oluşumunda BRCA1 genindeki mutasyonlar BRCA2 genine göre daha fazla etki göstermektedir. Meme kanseri için en etkin mutasyonları taşıdığından dolayı BRCA1 ve BRCA2 genleri, meme kanserinin risk tespitinde mutasyon analizlerinin yapılmasında önemli parametrelerdendir (Mirza ve ark 2007).

1.2.3. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı

1970 yılında 69 yaşındaki beyaz ırktan invaziv duktal karsinoması olan kadının plevral efüzyonundan MCF-7 hücresi izole edilmiştir. Hücre hattı, 1973 yılında Detroit'te Herbert Soule ve arkadaşları tarafından kurulmuştur, enstitüye atıfta bulunmak için Michigan Kanser Vakfı-7'nin kısaltması olarak hücre hattına MCF-7 denilmiştir. MCF-7 epitelyal yapıdadır ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerini düzenleyebilirler. Ayrıca HER-2 geninin ekspresyonu normal iken, WNT7B onkogeninin ekspresyonu bulunmaktadır. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi MCF-7 hücrelerinde de mutasyonlar, hücre döngüsünü kontrol eden noktalardan siklin D1'de oluşmaktadır (Nieves-Neira ve Pommier 1999). MCF-7 hücrelerinde kaspaz-6, -7 ve -9 ekspresyonu ile BCL-2 ekspresyonu iyiyken p21 ve p53 genlerinin düzenlenmesi ve ekspresyonu normaldir (Nagasawa ve ark 1998, Nieves-Neira ve Pommier 1999). MCF-7 hücrelerinin çoğalma mekanizmalarında; östrojene bağlı proliferasyon ve aşırı artmış östrojen ekspresyonu, EGF'den bağımsız çoğalma, artmış Rb ve N-ras proteinlerinin hızlı fosforilasyonu, artmış Neu/c-ErbB-2/Her-2 ekspresyonu rol oynamaktadır (Botos ve ark 2002) (www.mcf7.com).

1.3. miRNA

miRNA'lar, bazı hücresel temel işlevlerin düzenlenmesinde görev almaktadırlar. İnsanlarda miRNA seviyelerinin hücre içerisindeki normal miktarının dışına çıkmasının kanser gelişimi ile bağlantısı olduğu gösterilmektedir. Kanser, hasar görmüş hücrelerin kontrolden çıkmış bir şekilde çoğalması ve bu çoğalmanın devam etmesi sonucunda tümör oluşumu ile gerçekleşir. Hücreler; gelişim ve ergin dönemlerinde hücre bölünmesinin, farklılaşmasının ve hücre ölümünün düzenli bir şekilde gerçekleştiğinden emin olmak için çeşitli yöntemler geliştirmişlerdir. Genlerin,

çoğalma ve farklılaşmaya yönlendirilmesi bazı düzenleyici etkenlerin genleri açıp kapatması ile gerçekleşmektedir (Lee ve ark 1993, Yu ve ark 2010).

1.3.1. miRNA'ların Tarihçesi ve Yapısı

miRNA, 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında Lee ve çalışma arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Lee ve ark., yuvarlak solucanlardan *Caenorhabditis elegans*'ın gen içeriğini incelemişlerdir. lin-4 ismini verdikleri genin, hiç bir protein kodlaması yapmamasına rağmen 22 nükleotit uzunluğundaki küçük bir RNA'yı transkribe ettiğini raporlamışlardır (Lee ve ark 1993).

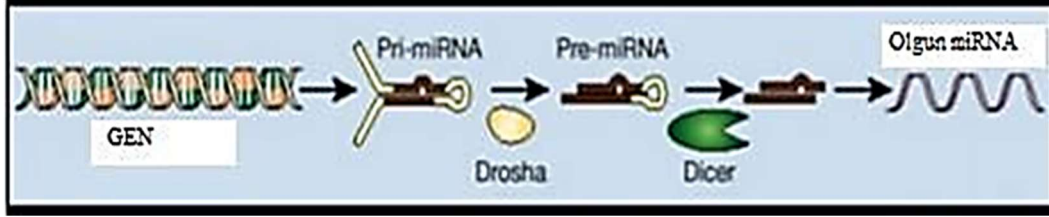
Reinhart ve arkadaşları ise 2000 yılında *C.elegans*'da let-7 olarak isimlendirdikleri farklı bir mikroRNA çeşidi keşfetmişlerdir. let-7, 22 nükleotit uzunluğundadır ve canlının gelişim zamanlamasını düzenlemektedir (Reinhart ve ark 2000).

Daha sonraki yıllarda nerdeyse bütün çok hücreli organizmalarda lin-4 ve let-7'ye benzerlik gösteren çok sayıda küçük RNA molekülü keşfedilmiş ve bunların hepsine miRNA'lar ismi verilmiştir (Pasquinelli ve ark 2000).

miRNA'ların transkripsiyonu, genom üzerindeki proteinleri kodlayan ekzon veya intron bölgeleri ile protein kodlamayan bölgelerindeki RNA genlerinden sağlanmaktadır. Ancak miRNA'ların proteine translasyonu gerçekleşmemektedir. miRNA, gen ekspresyonunun fonksiyonel olarak düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Shenouda ve Alahari 2009). Bir RNA molekül çeşidi olan miRNA, tek iplikçikten oluşmakta ve yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğundadır. Pri-miRNA olarak isimlendirilen primer transkriptler işlendikten sonra, ilk olarak pre-miRNA adı verilen kısa sap ilmik yapılarına, ardından da fonksiyonel miRNA'lara dönüşmektedirler. miRNA'ları kodlayan yüksek derecede korunmuş birçok gen bölgesi insan genomunda keşfedilmiştir. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda insan genomunda yaklaşık olarak 2000 adet mikroRNA tanımlanmıştır (www.miRbase.org).

1.3.2. miRNA'ların Biyogenezi

miRNA'lar, birbirini takip eden üç basamaklı işlem aşaması sonunda meydana gelmektedir. Önce miRNA'ların genlerinden primer miRNA'ların (primiRNA) transkripsiyonu gerçekleşmektedir. Sonra nükleus içerisinde primer miRNA'lar prekürsör miRNA'lara (pre-miRNA) dönüştürülmekte ve sonraki aşamada ise sitoplazma içerisinde olgun miRNA'lara dönüşümü gerçekleşmektedir (Kwak ve ark 2010) (Şekil 1.11.).



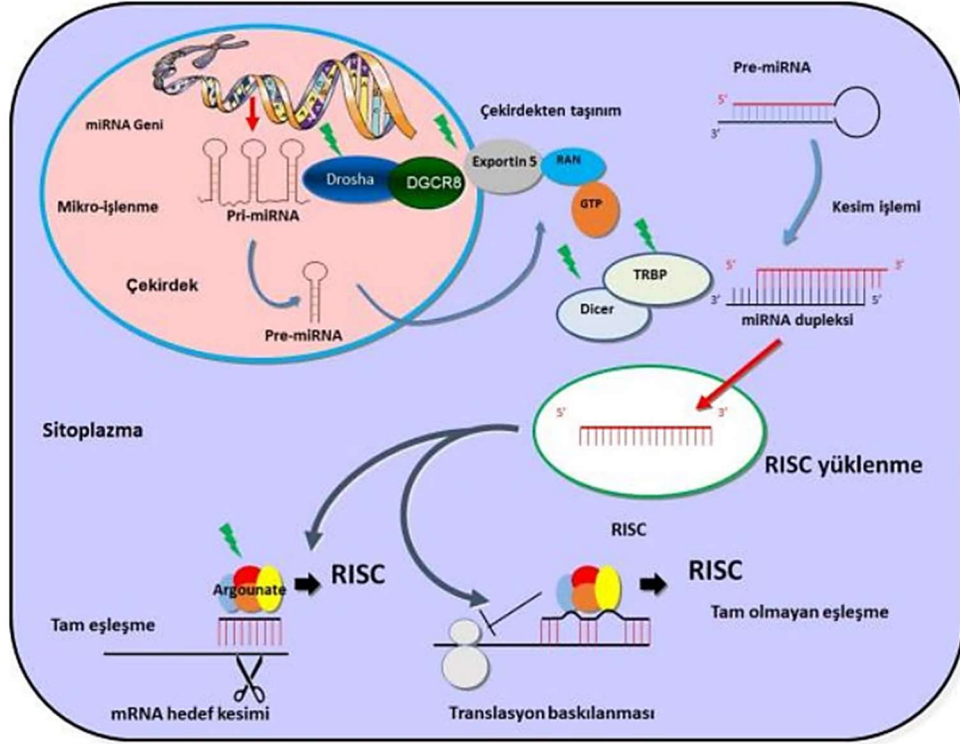
Şekil 1.11. miRNA oluşumu (Kwak ve ark 2010) (www.slideshare.net)

Olgunlaşan miRNA'ların aktivitesi, mRNA'ların içinde bulunan bir hedef sekansının tanınmasına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bunlar genellikle eksik ve kısa tamamlayıcı olarak 3'UTR bölgesinde bulunmaktadır.

miRNA'lar, genomik DNA'dan pri-miRNA olarak RNA polimeraz II enzimi aracılığı ile sentezlenmektedir. Pri-miRNA, 500-3000 bazdan oluşmakta ve poli A ile cap kuyruğuna sahip olan sap ilmik yapısında bulunmaktadır. Pri-miRNA çekirdekte, RNAaz III enzim ailesi endonükleazlarından olan Drosha ile kofaktörü Pasha (DGCR8) aracılığı ile ~70 nükleotit uzunluğundaki pre-miRNA'lara dönüştürülmektedir. Drosha ile Pasha'nın birlikte oluşturdukları yapıları mikroişlemci kompleks ismi verilmektedir (Esquela-Kerscher ve Slack 2006).

Pre-miRNA molekülü sitoplazmaya, nüklear taşıma reseptörlerinden Exportin 5 ile nüklear proteinlerinden RAN-GTP'ye bağlı şekilde taşınmaktadır. Sitoplazmaya taşınan pre-miRNA'lar, RNAaz III enzim ailesi üyelerinden olan Dicer isimli endonükleazla kesilip 18-24 nükleotit uzunluğundaki çift iplikli miRNA: miRNA'ya çevrilmektedir (Zhang ve ark 2002). Bunun yanı sıra Dicer, RNA ile tetiklenmiş olan susturma kompleksi (RISC) oluşumunu başlatmaktadır (Bernstein ve ark 2001). Dicer, pre-miRNA'nın sap ilmiğini keser ve miRNA: miRNA dubleksinden sadece birisi RISC kompleksine dâhil olmaktadır. RISC kompleksinin içerisinde bulunan RNAz çeşitlerinden *Argonaute*'un etkisiyle bu iki iplikçikten sadece 5' ucu kararlı olan seçilerek komplekse dâhil edilmektedir. Bu ipliğe kılavuz iplik ismi verilmiştir.

Diğer iplik ise ya anti-kılavuz ya da yolcu iplik şeklinde isimlendirilir ve RISC kompleksi substratı olarak sindirilmektedir (Şekil 1.12.). miRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olarak, ya protein translasyonunun baskılanmasına ya da argonaute proteinleri aracılığı ile mRNA'nın yıkımına neden olmaktadır (Gregory ve ark 2005).



Şekil 1.12. miRNA Biyogenez (Yang ve Lai 2011)

Olgun miRNA, hedef genin ekspresyonunu azaltıp proteinlerin sentezlerinin düzenlenmesine katılmaktadırlar. miRNA'lar kendi nükleotit dizilerini tamamlayan hedef geni tanıma kapasitesine sahiptirler. miRNA'lar, RISC ile kompleks oluşturarak, bazların çiftleşme özelliğiyle mRNA'ya bağlanıp proteinlerin translasyonunun inhibisyonuna veya mRNA'ların yıkımına sebep olmaktadır (Shenouda ve Alahari 2009).

miRNA, hedef mRNA'ların açık okuma bölgesine (ORF) veya 3'ucundaki translasyona uğramayan bölgesine (UTR) bağlanmaktadır. Bağlanma şekli, miRNA kompleksinin mRNA'ları nasıl tamamlayıcı olduğuna göre değişir. 3'UTR alanına bağlanma; eksik, hatalı ve tamamlanmamış komplementerliği kapsamaktadır ve translasyonun baskılanmasıyla sonuçlanmaktadır. ORF alanı içerisine bağlanma, tam

ve hatasız komplementerliği göstermektedir. Ve mRNA'nın Argonaute2 (Ago2) tarafından yıkılmasıyla sonuçlanmaktadır (Sun ve ark 2010).

Ayrıca, mRNA'ların her birinin birçok miRNA tarafından hedeflenebildiği ve miRNA'ların her birinde bazı mRNA'ların ekspresyonunu düzenleyebildiği görülmüştür (Pillai 2005).

1.3.3. Meme Kanseri ve miRNA'lar

Liu ve ark. 2004 yılında, meme kanseri olan fare ve insanlarda, mikroçip teknolojisini kullanıp miRNA'ların gen ekspresyonlarını profilemiş ve ayrıca meme kanserindeki, sağlıklı dokuyla karşılaştırıldığı zaman, anormal miRNA'ların ekspresyonunun olabildiğini bildirmişlerdir (Liu ve ark 2004, Shenouda ve Alahari 2009).

Calin ve ark. Yaptıkları çalışmada, her bir dokuya ait miRNA'ların gen ekspresyonunun gerçekleştiğini bildirmiş, bunun aksine Jiang ve ark. ise insanlarda çok fazla görülen ve beş tanesinin meme kanseri (MCF-7, MDA 361, MDA231, SKBR3 ve T47D) olduğu 32 adet kanser hücre hattında bulunan 222 miRNA'yı incelemişler ve prostat ile meme kanseri hücre hatlarının beraber kümelenmeye eğilimli olmasının, diğer dokularda birbirine benzeyen miRNA'ların ekspresyon profili olduğunu göstermiştir.

Meme kanseri, genetik bakımından allel ve locus içeriğine göre ileri seviyede heterojeniteye sahiptir. Meme kanserde ailesel olan vakaların yaklaşık olarak %50'si bilinen kanser genlerinden hiçbirisi ile açıklanamamaktadır. Bu tip heterojenlik multiple nadir allel, yaygın hastalık modeli olarak tanımlanmaktadır.

Bilinen insan olgun miRNA'larının yarısının kanserle ilişkili fragil veya genomik bölgede lokasyon göstermesi kanserlerde rol oynayabileceği bildirilmektedir. Polisistron kümelerine örnek olarak, 13q31 kromozomunun f25 ve/veya c13 locuslarındaki miR-17-92 gösterilebilir. Bu locusun birçok kanser türünde (meme kanserini de içeren) heterozigote kaybına sebep olduğu bildirilmektedir (Calin ve ark 2004).

Meme kanserindeki miRNA ekspresyon çalışmaları, prognostik araç geliştirilmesi ve hastalık taksonomisi açısından, miRNA'ların potansiyel kullanım

alanını ve önemini ortaya koymaktadır. miRNA'ların hücre döngüsünü, proliferasyonu ve tümör oluşumunu kontrol ettiği gösterilmektedir. Meme kanseri patogeneğinde hücre döngüsünün kontrolünü yapan; siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI), siklinler, retinablastoma (Rb) ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) gibi proteinlerdeki artış ve/veya anormal miRNA'ların ekspresyonunun fazla gözlemlendiği bilinmektedir. Örneğin; siklinD1, hücre siklusundaki G1 fazdan DNA sezteleme fazına geçişini kontrol etmektedir ve ayrıca meme kanserinde % 50'nin üzerinde bir ekspresyon artışı gözlemlenmiştir. Bu durumda *in vitro* ve/veya *in vivo*'da kanser hücrelerinin proliferasyonunda hız belirleyici faktör olarak görev yapar. Diğer bir regülatör protein olan siklin E hücre siklusunu düzenlemekte ve meme kanserinde % 10'un üzerinde ekspresyon artışı görülmektedir. Meme kanserinin hem erken safhasının prognozu için iyi bir belirteç olup hem de tümör agresivitesinin belirlenmesinde önemli rolü vardır (O'Day ve Lal 2010, Yu ve ark 2010).

miRNA'lar; siklinler, Rb, E2F, CDKI'lar ve CDK'lar ile etkileşime girerek siklus ilerleyişini ve hücre bölünmesini kontrol etmektedirler. Ayrıca meme kanserinde eksprese olan miRNA'lardan bazılarının onkogenik özellik gösterdiği, bazılarının da tümör supresörler olarak görev yaptığı gerçekleştirildiği profillemeye çalışmaları ile ortaya konmaktadır. Tümör oluşumu, onkogenik miRNA ya over-ekspresyonu ya da amplifikasyonu veya tümör supresör miRNA'ların delesyonu veya redüksiyonu ile olurken, tümör metastazı ise anti-metastatik miRNAların down-regülasyonu veya prometastatik miRNA'ların artmış ekspresyonu ile gerçekleşebilir (O'Day ve Lal 2010).

1.4. Twist1

Twist1, spesifik DNA bölgelerine bağlanabilen ve özellikle genlerin faaliyetini kontrol eden transkripsiyon faktörüdür. Thisse ve arkadaşları tarafından, 1987'de *Drosophila*'da (sirke sineği) tanımlanmıştır. Genin resmi adı "büküm ailesi bHLH transkripsiyon faktörü 1" dir. Twist1, genin resmi sembolüdür. bHLH (bazik sarmal ilmek-sarmal) motifi ile Twist1 proteinleri hücre içine bağlı olarak E-box cevap elementlerini (CANNTG) tanıyabilir ve transkripsiyon baskılayıcı veya aktivatör olarak davranır. Twist1 proteinleri farklı homojen veya hetero dimerler oluşturma özelliğine de sahiptir (Gong ve Li 2002, Qin ve ark 2012).

Twist1, E-cadherinin E-box elemanlarına bağlanarak E-cadherin ekspresyonunu bastırırken, N-cadherinin E-box elemanlarına bağlanarak N-cadherin ekspresyonunu artırmaktadır. E-cadherin'den N-cadherin'e (cadherin-switch) geçiş, EMT'nin temel bir işaretidir. Ve epitel hücrelerinin, normal gelişim ve tümör metastazı sırasında görüldüğü gibi hareketli bir fenotip elde edecek şekilde birbirinden ayrılmasına izin vermektedir (Qin ve ark 2012, Zhang ve ark 2014). Ayrıca, Twist1, gen baskısı için nükleozom remodeling ve deasetilaz kompleksi almaktadır. Sonuç olarak; tümör göçüne, istilasına ve metastazına yol açan Akt2, BMI1 proto-onkogen, polikete halka parmağının (BMI1) up-regülasyonu yoluyla E-cadherin ekspresyonunu inhibe eder (Wheelock ve ark 2008, Qin ve ark 2012).

Yetişkin insanlarda bulunan Twist proteinleri temel olarak, farklılaşmamış durumlarını koruyarak miyojenik, osteoblastik, kondroblastik, odontoblastik ve miyelomonositik soyları içeren öncül hücrelerde eksprese edilmektedir. Yapılan çalışmalarda, Twist1 proteininin, termogenezin kilit bir düzenleyicisi olarak işlev gördüğü kahverengi yağda da eksprese edildiği bulunmuştur (Pan ve ark 2009). Ayrıca Twist proteinlerinin lenfosit fonksiyonu ve olgunlaşmasında önemli roller üstlendiği bilinmektedir. Twist1 ekspresyonu, IL-17 ve BAFF sitokinleriyle B hücresi stimülasyonunun ardından indüklenip hem saf veya hafıza B hücresinin hayatta kalması ve çoğalması hem de immünoglobülin üreten hücrelere farklılaşması için gereklidir. Twist1 T lenfosit hücrelerinde, IFN- γ , IL-2 ve TNF- α üretimini inhibe eder, böylece pro-enflamatuar etkilerini önler (Niesner ve ark 2008). Hem B hem de T lenfositlerinde Twist1, erken düzenleme geni olarak davranır ve genel düzenleme mekanizmaları önerir. Benzer şekilde, makrofajlarda, IFN ile indüklenen Twist1 ekspresyonunun, TNF- α üretimini önlediği, enflamatuar yanıtın aşağı modüle edilmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Ansieau ve ark 2008).

Twist proteinlerinin, yaşlanmayı ve apoptoz indüksiyonunu önleyerek onkojenik özellikler gösterdiği bulunmuştur. Bu iki onkosupresif mekanizmanın premalign lezyonlarda işlev gördüğü bilinmektedir ve malign transformasyon için inhibisyonu gerekir. Twist1 anti-apoptotik özellikler başlangıçta embriyonik gelişimde vurgulanmıştır, çünkü Twist1 - / - fareler, somitlerinde apoptozun önemli bir artışını göstermişlerdir. Bu gözlem daha sonra Twist1 fonksiyonunun azalması nedeniyle insanda kranial malformasyon sendromu olan Saethre-Chotzen sendromu

hastalarında apoptotik osteoblastların tespiti ile desteklenmiştir (Valesia-Wittmann ve ark 2004). Twist proteinleri, c-myc ile indüklenen apoptozis ile mücadele edebilen proteinler olarak tanımlandı. Bu gözlem doğrultusunda, Twist1 aşırı ekspresyonunun, p53 geninin genellikle mutasyona uğramadığı, n-myc kaynaklı apoptozu hafifleterek tümör büyümesini teşvik eden nöroblastomalarda yaygın bir p53 inaktivasyon mekanizması olduğunu göstermektedir (Rodrigues ve ark 2008). Son zamanlarda, Twist proteinlerinin, hem Rb hem de p53'e bağlı yolları nötralize ederek onkojene bağlı yaşlanmayı önleyebildiğini ve murin primer fibroblast transformasyonunda RASV12 veya ERBB2 gibi onkojenlerle işbirliği yaptığı da gösterilmiştir. p53 ve Rb'ye bağlı yolların etkisizleştirilmesi, esas olarak, Twist1 proteinlerinin, siklin-kinaz inhibitörleri p21CIP1, p16INK4A ve ARF kodlayan genlerin indüklenmesini önleme kabiliyetine dayanmaktadır. Ayrıca, Twist proteinleri doğrudan p53 ile etkileşime girer ve post-translasyonel modifikasyonlarla aktivasyonunu önler (Stasinopoulos ve ark 2005). Bu nedenle, Twist proteinlerinin, tümör ilerlemesinin ilk aşamalarında fiili bir rol oynayarak kötü huylu tümöre dönüşümü teşvik etmesi muhtemeldir. Bu yüzden, Twist1 ekspresyonunun mesane, karaciğer, yumurtalık, prostat, pankreas tümörlerinin yanı sıra melanom ve feokromositomaların malign dönüşümü sırasında indüklendiği gösterilmiştir.

Twist proteinleri, EMT'yi teşvik ederek, hücelere motilite sağlar, böylece hücre metastazını teşvik eder. Twist1 ve SNAI2 dahil olmak üzere çeşitli EMT indükleyicileri, en agresif meme tümörlerini karakterize eden kanser-kök hücre imzasına katılır (Hennessy ve ark 2009). Ek olarak, metastatik meme kanserlerinden kaynaklanan yayılmış hücrelerin çoğu, mezenkimal ve kök hücre benzeri özellikler gösterir. Bu veriler embriyonik transkripsiyon faktörleri, EMT ve kanser kök hücrelerin oluşumu arasındaki ters ilişkiyi vurgulamaktadır (Aktas ve ark 2009). Sonuç olarak, Twist transkripsiyon faktörleri nüks ile ilişkilidir ve ekspresyonları radyo veya kemoterapötik tedavilerden sonra artar. Direnç ayrıca, özellikle Salyangoz ailesinin üyeleri olmak üzere ek embriyonik transkripsiyon faktörleri ile sağlanır. Salyangoz ve Twist proteinleri, p53 yolunu aşağı regüle etme ve EMT'yi destekleme yeteneğini paylaşır. Henüz açıklığa kavuşturulmamasına rağmen, her iki özellik, daha yüksek dirençli hücrelerin sağlanmasına katkıda bulunabilir. İlave fonksiyonlar Twist onkogenik özelliklere katkıda bulunur (Ansieau ve ark 2008). HIF1a ve HIF2a aktivasyonuna cevap olarak hipoksik koşullarda indüklenen Twist1, VEGF üretimini

teşvik eder ve böylece neoangiogenezi indükler. p53 aktivitesini azaltarak, Twist proteinleri ayrıca kromozomal instabiliteyi teşvik eder, ikincil olayların oluşumunu destekler ve böylece tümörün ilerlemesine katkıda bulunur (Mironchik ve ark 2005, Vesuna ve ark 2006).

Elde edilen kanıtlar, Twist proteinlerinin (ve muhtemelen çoğu embriyonik EMT indükleyicinin) tümörün ilerlemesinde öncül ve olağandışı rolünü destekler. Malign dönüşüm, kanser hücresi yayılımı, kendini yenileme özelliklerinin kazanılması, kromozomal instabilite ve neoanjiyogenez kazanımını eşzamanlı olarak destekleyebilirler. Kanserde prognostik bir belirteç olarak Twist kavramının kanıtı, hem mRNA hem de protein seviyelerinde, çeşitli epitelyal kanserler ile melanomlar ve sarkomlarda gösterilmiştir (Fondrevelle ve ark 2009). Twist proteinlerinin gelecekteki terapötik hedefler olarak ilgisi, nöroblastom ve melanom hücre çizgilerinde RNA ekspresyonu yoluyla gen ekspresyonunun inhibisyonunu takiben insanda apoptoz ve yaşlanma programlarının reaktivasyonu ile ortaya çıkar (Valsesia-Wittmann ve ark 2004, Ansieau ve ark 2008).

Twist1 ifadesinin baskılanması aynı zamanda bir epitel fenotipini geri kazandırarak epitelyal kanser hücrelerinin invazif ve metastatik yeteneklerini azaltır. *In vivo* inhibisyonu, tümör hücre çizgilerinin transformasyonunun tümörjenik ve metastatik potansiyellerini ortadan kaldırır ve geleneksel terapilere karşı hassasiyetlerini geri kazandırır (Li ve ark 2009).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, Twist1'in miRNA'ları da düzenleyebildiği ortaya çıkmıştır (**Çizelge 1.1**).

Çizelge 1.1. miRNA'lar ve Twist1 arasındaki ilişki

mikroRNA	Hareket mekanizması	Kanser türü	Morfoloji değişiklikleri
A			
miR-300/539/543	Hedefler Twist1'in 3'UTR'sı, FAK	Meme kanseri, endometrial kanser	EMT ve metastaz bozukluğu
miR-300/494/495/544	Hedefler Twist1'in 3'UTR'si, BMI1	Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom, meme kanseri	EMT ve metastaz bozukluğu
miR-494/539	Hedefleri ZEB1'in 3'UTR	Meme kanseri	EMT ve metastaz bozukluğu
miR-186, miR-137	Hedefler Twist1'in 3'UTR'ı	Epitelyal over kanseri, gastrointestinal stromal tümör	EMT bozukluğu
miR-580, miR-720	Hedefler Twist1'in 3'UTR'ı	Meme kanseri	EMT bozukluğu
miR-17-5p/20a/93/106b ve miR-520d-5p	Hedefler Twist1'in 3'UTR'ı	Tip II endometrial karsinom	EMT bozukluğu
miR-675	Hedefler Twist1'in 3'UTR'si, Rb	Hepatosellüler kanser	Proliferasyonu artırır ve EMT'yi tersine çevirir
miR-33b	HMGA2, ZEB1 ve Twist1'in 3'UTR Hedefleri	Melanom	EMT bozukluğu
miR-145a-5p / 151-5p / 337-3p	Hedefler Twist1'in 3'UTR'ı	Akciğer karsinomu	EMT bozukluğu
miR-33a	Hedefler Twist1'in 3'UTR'ı	Osteosarkom	Kemoresorluğun uyarılması
miR-21	Akt, E2F1, Twist1 aktivasyonunu artırır; miR-135a / b, Salyangoz 1 / 2'yi aşırı eksprese eder; Twist1 ifadesine izin veren PDCD4'ü küçültür	Akciğer kanseri, kolon kanseri, Sezary Sendromu hücreleri	Kemo direnç ve EMT'yi uyarır
miR-520h	PP2A / C'nin 3'UTR Hedefleri	Çoklu insan kanseri hücre çizgileri	Hücre göçünü ve istilasını teşvik eder
miR-7	SETDB1'in 3'UTR Hedefleri	Meme kanseri	EMT bozukluğu
miR-15a / 29b / 16/141 / 132 / 146b-5p / 124	Twist1 ile ters korelasyon gösteriyor	Glioma, prostat kanseri, osteosarkom, hipofiz tümörü	EMT bozukluğu

miR-26a /100 / 23a / 130b / 210/ 146b-5p / 221	Olumlu Twist1 ile korele	Meme kanseri, tiroid kanseri, endometrial kanseri, dil skuamöz hücreli karsinom, akciğer kanseri	EMT'yi uyarır
B			
miR-106a	Hedefler Twist1'in 3'UTR'ı	Hepatosellüler kanser	Kemo direnç ve EMT'yi bozar
miR-106a miR-214	NF-κB, p-AKT, Twist1, AP-1 ve Salyangoz'u düzenler	gliyom	Kemo direnç ve EMT'yi uyarır
	Hedefler Twist1'in 3'UTR'ı	İntrahepatik kolanjiokarsinom	EMT bozukluğu
miR-214 miR-181a	Twist1, sırasıyla PTEN ve IKKβ'yı hedef alan miR- 214 ve miR- 199a'yı indükler	Epitelyal over kanseri	Hızlı hücre proliferasyonunu indükler
	Hedefler Twist1'in 3'UTR'ı	Dil skuamöz hücreli karsinomu	EMT bozukluğu
miR-181a	Twist1, sırasıyla RASSF1A, TIMP3 ve NLK'yı hedef alan miR-181a'yı indükler	Hepatosellüler kanser	Kemoresorluğun uyarılması
C			
miR-372/373	Twist1, miR-372 / 373'ün E-kutu elemanına bağlanır ve bu sırada, miR- 15b / 16 ve miR-21 ile birlikte RECK'in 3'UTR değerini hedefler.	Çoklu insan kanseri hücre çizgileri	Anjiyogenez, istila, metastaz ve tümör büyümesini indükler
miR-10b	Twist1, sırayla HOXD10'u hedef alan miR-10b'nin E-kutu elemanına bağlanır	Meme kanseri, nazofarengeal karsinom, mide kanseri, miyelodisplastik sendromlar, baş boyun skuamöz hücreli karsinom	EMT, göç ve istilaya neden olur
Let-7i	Twist1 BMI1 ile işbirliği yapıyor ve let-7i'yi bastırıyor, let-7i doğrudan NEDD9 ve DOCK3'ü hedef alıyor	Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom	EMT ve kök benzeri özellikleri indükler

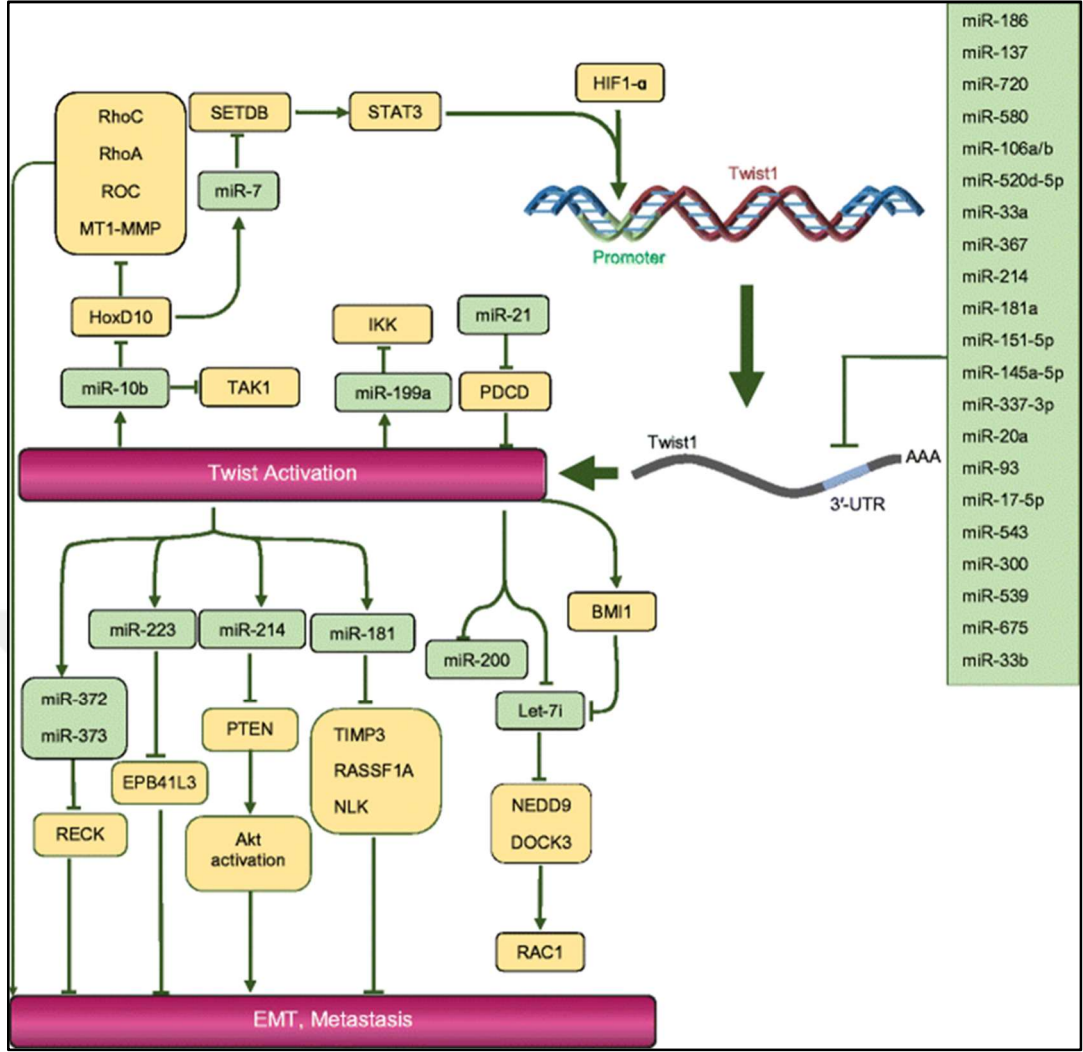
Let-7	Twist1 ile ters korelasyon gösteriyor	Oral skuamöz hücreli karsinom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri	Kemo direnç ve EMT'yi bozar
miR-223	Twist1, miR-223 ifadesini doğrudan destekler	Gastrik karsinom	Göç, işgali teşvik eder
miR-200a / 200b / 200c / 141/205	Twist1, ZEB1 ve Salyangoz ile ters korelasyon gösterir	Meme kanseri, mesane kanseri, kolon kanseri, safra kanalı tümör trombüslü hepatoselüler karsinom, akciğer kanseri, endometrial karsinosarkom	EMT bozukluğu
D			
Ajan	Hareket Mekanizması	Kanser Türü	Morfoloji Değişiklikleri
SK228	HDAC aktivitesini baskılar ve miR-200c promotörünün DNA metilasyon durumunu azaltır	Meme kanseri	EMT değişikliklerini ters çevirir
RWJ67657 (p38 inhibitörü)	miR-199/ 303 / 302 / 200 ve miR-328'in değiştirilmiş ifadesiyle birlikte Twist1, Snail, Slug ve ZEB ifadesini azaltır	Meme kanseri	EMT değişikliklerini ters çevirir
Adriamisin	miR-448'i bastırır	Meme kanseri	EMT'yi uyarır
Pterostilbene	miR-448'i indükler	Meme kanseri	EMT bozukluğu

A) Twist1 ekspresyonunu düzenleyen miRNA'lar, **B)** Kanser tipine bağlı Twist1 ekspresyonunu düzenleyen miRNA'lar, **C)** Twist1 tarafından düzenlenen miRNA ekspresyonları, **D)** Twist1 ve/veya miRNA ekspresyonunu düzenleyen ajanlar (Khanbabaei ve ark 2016).

Yukarıda belirtildiği gibi, çeşitli miRNA'lar, Twist1 aktivitesini düzenler ve bu, miRNA'lar ve Twist1 arasındaki karmaşık bir ağı gösterir. Bu nedenle, bu ağ EMT sürecini düzenleyerek kanserin farklı aşamalarında yer almaktadır. Bu ağ farklı metastaz aşamalarını düzenler. İlk olarak, Twist1 doğrudan E-kadherin promotörüne bağlanır ve ekspresyonunu baskılar, böylece EMT indüksiyonu ve tümör hücrelerinin primer tümörden ayrılması ile sonuçlanır. Bununla birlikte, bir miRNA dizisi Twist1'in

yukarısında işlev görür ve ekspresyonunu doğrudan ve dolaylı olarak düzenler(Khanbabaie ve ark 2016).

Tümör hücreleri, sırayla Twist1-miR-10b-HoxD10 ile ekspresyonu artan MT1-MMP'ler gibi proteazların aracılık ettiği çevre dokularına invaze olmaktadır. Ayrıca, Twist1 ve BMI1 aracılı let-7i baskılanması, mezankimal mod hareketini destekleyen RAC1 aktivasyonunu indükler. Son olarak, Twist 1 ve Rb'nin inhibe edilmesi yoluyla miR-675, gelişmiş proliferasyon kapasitesi ve kütle oluşumunu destekleyen azaltılmış istila kapasitesi ile tümör hücrelerinin oluşumunu sağlar. Ayrıca, Twist1 up-regülasyonu, tümör hücresi göçünü ve istilasını desteklemektedir. Ek olarak, miRNA'lar ve Twist1 arasındaki karışma kök hücre benzeri özelliklerin geliştirilmesine yol açar. Örneğin, Twist1'in let-7i inhibisyonu sadece hücre hareketliliği arttırmakla kalmaz aynı zamanda kök hücre benzeri özellikleri de indükler. Twist1'in up-regülasyonu ile sonuçlanan miR-7'nin down-regülasyonu EMT'yi teşvik ederek istilayı ve CSC popülasyonunu artırır. Twist1, hepatoselüler CSC popülasyonlarında miR-181a ve miR-181b'yi yukarı doğru düzenler ve bu yukarı düzenleme, farklılaşmamış durum ve CSC'nin işgal kapasitesinin korunmasında kritik bir rol oynamaktadır. Metastatik potansiyel ve kök hücre benzeri özellikleri düzenlemenin yanı sıra, Twist1, onkogen ve kemoterapinin etkisiz hale getirdiği apoptoz ve yaşlanmayı geçersiz kılar ve miR-10b'yi düzenleyerek anjiyogenezi artırır (Khanbabaie ve ark 2016) (**Şekil 1.13.**).



Şekil 1.13. miRNA'lar ve Twist1 arasındaki etkileşim (Khanbabaei ve ark 2016)

Son zamanlarda, anti-metastatik potansiyele sahip olduğu ve miRNA'lar ile Twist1 arasındaki ağı modüle ederek, kısmen metastaz inhibisyonuna aracılık eden çeşitli ajanlar tespit edilmiştir. Örneğin, adenovirüs tip 5 E1A (E1A) geni, kanser önleyici gen terapisinde önemli bir rol oynar. E1A, Twist1 ekspresyonunun inhibisyonu ile sonuçlanan miR-520h'nin baskılanması yoluyla metastaz inhibisyonuna aracılık eder. E1A aracılı Twist1 inhibisyonu, meme kanseri hücrelerinin göç ve istila özelliklerini azaltır. E1A, E1A'nın anti-metastatik etkisine muhtemel katılımlarının ele alınması gereken çoklu miRNA'ların ekspresyonunu modüle eder. Ek olarak, *Cordyceps* spp.'nin aktif bileşeni olan Cordycepin'in, anti-metastatik bir etkiye sahip olduğu ve etkisini Twist 1, ZEB1 ve HMGA2'nin ekspresyonunu engelleyen miR-33b'nin up-regülasyonu yoluyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, yaygın olarak bir antikoagülan ilaç olarak kullanılan heparin, trombine bağlanma yoluyla anjiyogenezi inhibe eder, böylece Twist1 ve miR-10b'nin

trombinin indüklediği ekspresyonunu inhibe eder ve *in vivo* olarak anjiyogenezi bozar (Khanbabaei ve ark 2016).

miRNA işlevine ve farklı kanserdeki durumuna bağlı olarak miRNA bazlı tedaviler geliştirmek için iki yaklaşım vardır. Birinci yaklaşım, onkojenik miRNA'ları, anti-sens miRNA'ları ve kilitli nükleik asitleri içeren antagonistler tarafından inhibe etmeyi amaçlar. miR-223 ve miR-181 antagonistleri uygun bir bağlamda terapötik araçlar olarak test edilebilir. Buna karşılık, ikinci bir strateji olan miRNA replasmanı, bir tümör baskılayıcıyı geri yüklemek için miRNA mimiklerini kullanır. Bu durumda, metastaz bağlamında down-regüle edilen ve özellikle Twist1 ekspresyonunu inhibe eden miRNA'lar, miRNA replasman tedavisi olarak test edilebilir (Khanbabaei ve ark 2016).



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- DMEM/Ham's F-12 Merc FG 4815
- Etanol: Merck K38169483 750
- Phosphate Buffered Saline (PBS): Biological Industries Kibutz Haemek Israel Cat No:02-La
- DMSO: Dimetil Sülfoksit Sigma-Aldrich D2650
- Fetal Bovin Serum (FBS): Foetal Bovine Serum (FBS) European Grade Heat Inactivated (BIO-IND,BI04-127-1B)
- Trypsin-EDTA: Trypsin EDTA, Solution C (0.05%) EDTA (0.02%), with Phenol (BIO-IND,BI03-053-1B)
- Twist1 geni anti-sense klonlanmış Twist1-pcDNA3.1 vektörü
- Lipofectamine 2000 invitrogen 11668-027
- RTA total miRNA izolasyon kiti
 - RTA total miRNA izolasyon kitinin içeriği
 - DNase 1
 - DNase Working Buffer
 - Lysis Buffer
 - Wash Buffer
 - Binding Buffer
 - Elution Buffer
 - Proteinaz K⁺
 - Applied Biological Materials (abm) cDNA izolasyon kiti
 - BrightGreen miRNA qPCR mastermix
 - Applied Biological Materials (abm) Polly (A) kiti
 - SNORD 68 Referans Gen Primerleri
 - Hedef miRNA Primerleri

2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar araçları

- Laminar akımlı kabin: Steril VBH Compact
- CO₂ inkübatörü: SANYO O₂/CO₂ INCUBATOR MCO- 175M
- Santrifüj: Sigma 3K30
- Sıcak su banyosu: Wise Bath fuzzy systems
- Işık mikroskobu: Leica Dmil Led (inverted microscop)
- Buzdolabı (+4 °C ve -20°C): ALTUS AL 302
- -40°C buzdolabı: SANYO MDF-U425
- -80°C buzdolabı: SANYO MDF-U5186S
- Falcon tüp: 352098 Blue max™ 50ml polypropyleneconicaltube 30x115mm style
- Kriyo tüp: REF:C12ARBIPS
- Thoma lamı: IsoLab, Tiefe depth profendeur 0,200mm
- Steril filtre: 0,45µm Lot No: N0403113103
- BIO-RAD T100 Termal Cycler
- IKA dry block heater 4
- Real Time PCR (LightCycler® 96)
- Roche LightCycler 96 Multiwell Plate
- Vorteks karıştırıcı Heidolph reax top
- Mikrosantrifüj VWR klnetlc energy 26 joules
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5 ml, 2.0 ml)
- Spin Kolon RTA 2 ml'lik
- Toplama Tüpleri
- DNase,RNase free eppendorf tüp
- ElüsyonTüpleri
- Serolojik pipet: Corning® Costar® Stripette® serological pipettes, bulkpacked (5 ve 10 ml)
- Mikropipet (1000, 200, 10µl): Gilson

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürü

2.2.1.1. Hücrelerin Ekimi, Pasajlanması ve Sayımı

ATCC-HTB-22 kod numaralı, 3822 0000 gümrük tarife numaralı, US menşeli, 16.03.2015 teslim tarihli MCF-7 meme kanseri hücresi, ATCC firmasından temin edilmiştir.

MCF-7 meme kanseri hücresi, nemlendirilmiş 37°C'lik %5 CO₂ olan atmosferde ve %10 FBS ve %1 PSG bulunan DMEM besiyerinde kültüre edildi.

Hücrelerin pasajlanması 4-5 günde bir yapıldı. Pasajlama Tripsin-EDTA ile kaldırılma ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ederek besiyeri bulunan 75 cm²'lik flasklara alınmasıyla yapıldı.

Hücre stoklanması ise tripsin ile kaldırılan hücrelerin, santrifüjden sonra besiyerinin uzaklaştırılması, %90 FBS içeren solüsyonla karıştırılması ve 1,5 ml'lik kriyo tüplere konarak, -20°C'de bir gece bekletildikten sonra -80°C'de ve sonra sıvı azot tankına saklanmasıyla oluşturuldu. Bu şekilde depolanan hücreler gerektiğinde hızlıca 37 °C'de çözülüp kullanıma hazır şekilde saklandı.

Çalışmada -80°C'de bulunan MCF-7 hücre serisi donuk haldeyken 1 ml besiyeri ilave edilerek pipetaj ile çözdürüldü. Boş falkona 5 ml besiyeri alındı ve üzerine çözülen hücreler eklenip pipetaj ile karıştırıldı. 1500 rpm'de 3 dk santrifüjlendi. Süpernat atıldı ve hücre pelletine 1 ml besiyeri eklendi. Petri kabında 6 ml taze besiyeri ile pasajlandı. Hücre sayımı için, 2 ml PBS ile yıkanan hücreler, 1,5 ml tripsin ile kaldırdı. 3 dk inkubasyona bırakıldı. Falkon tüpe 5 ml besiyeri alındı ve üzerine hücreleri eklendi. 1100 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra, kalan hücre pelleti 1 ml besiyerine alındı ve pipetajlandı. Epondofa 50 µl alındı ve 50 µl tripan blue ile pipetajlandı. Karışımdan 10'ar µl Thoma lamının alt ve üst kısımlarına konuldu ve Thoma lamının alt ve üst bölümlerinde bulunan 16 küçük kareye yayıldı ve mikroskop altında hücre sayımını gerçekleştirdi. Sayımı yapılan hücreler transfeksiyon işlemi için 6'lı pleyte ekildi (300.000 hücre=27,2 µl).

2.2.1.2. Transfeksiyon İşlemi

MCF-7 hücrelerine, Twist1 geni sense klonlanmış Twist1-pcDNA3.1 vektörünün transfekte işlemi için lipofektamin 2000 transfeksiyon reaktifi kullanıldı.

Nanodrop ile yaptığımız ölçüm sonucunda Twist1 geni vektörü konsantrasyonunu 1 mg- 0,9 µL olarak tespit edildi.

6'lı pleytin sadece 2 kuyucuğu kullanıldı. Kuyucuklardaki besiyerleri atılıp 2 kez PBS ile yıkandı. 2ml antibiyotiksiz ve neomisinli besiyeri ekleyerek 5 dk inkübatöre kaldırıldı. İki temiz ependorf alınarak 150'şer µl antibiyotiksiz-serumsuz besiyeri eklendi. Ependorflardan birisine 12 µl lipofektamin, diğerine ise plazmit ve 20 µl twist sens eklendi. Hazırlanan iki ependorf temiz bir ependorfta birleştirildi ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Son olarak pleyttteki hücrelerin üzerine ependorfta hazırlanan miksdan 250'şer µl damla damla eklendi ve inkübatöre kaldırıldı.

Twist1 geni sense klonlanmış Twist1-pcDNA3.1 vektörü transfekte edilen hücreler yeterli sayıya ulaşıncaya kadar her 48 saatte bir besiyeri değiştirildi.

2.2.1.3. RNA İzolasyon Ön Hazırlık Aşaması

Transfeksiyonlu ve kontrol grubu hücreleri için aynı işlemler uygulanmıştır. Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. 2ml PBS ile yıkayıp 1,5 ml tripsin eklenerek hücreler kaldırıldı. Falkon tüpüne 5ml besiyeri ekleyip üzerine hücreler alındı. 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve dibe çöken hücreleri 1ml besiyeri ekleyerek pipetaj yapıldı. Temiz bir ependorfa 50µl hücre, 50 µl toluen blue ekleyerek pipetaj yapıldı ve toma lamına 10 µl yayarak mikroskop altında sayıldı.

Transfekte ve kontrol grubu hücreler için 3'er ependorf alındı. Transfeksiyonlu için her bir ependorfa 130'ar µl (yaklaşık 1.000.000 hücre) hücre ilave edildi. Kontrol grubunda ise her bir ependorfa 125'er µl (yaklaşık 1.000.000 hücre) hücre ilave edildi. Ependorfları 1500 rpm'de 3 dk santrifüj ederek üst kısımdaki süpernatant atıldı. Her bir ependorfun dibine çöken hücrelerini 150'şer µl PBS ile yıkayıp yine 1500 rpm'de 3 dk santrifüj ederek üst kısımdaki süpernatantı atıldı. Her bir ependorfun dibine çöken hücrelerinin üzerine 150'şer µl liziz buffer eklendi ve önce mikro pipet ile sonra da enjektör yardımı ile iyice homojen karışıma kadar pipetaj yapıldı. 1500 rpm'de 3

dk santrifüj ederek süpernatant kısımları temiz ependorflara alınarak -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.2. Real Time PCR Çalışma Prosedürü

2.2.2.1. RNA İzolasyonu

Hücrelerden RNA izolasyonunu yapmak için RTA Total miRNA İzolasyon Kiti kullanıldı. RNA izolasyonu, RTA Total miRNA İzolasyon Kiti (lot: AR2264118) protokolüne uygun yapılmıştır.

İzolasyon Protokolü:

- Transfeksiyonlu ve kontrol grubu hücreleri için aynı işlemler uygulandı.
- -80°C'den çıkarılan hücreler çözündüğünde üzerine 350 µl Lysis Buffer ve 20 µl Proteinaz K çözeltisi ekleyerek hafifçe pipetaj yapıldı.
- IKA dry block heater 4'de 60°C'de 20 dk inkübe edildi (Her 5 dk'da bir 2-3 sn çalkalama yapıldı.).
- İnkübasyon sonrasında 11000 xg'de 1 dk santrifüj yaparak hücreleri temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- Kalıntı DNA'ları temizlemek için hücrelerin üzerine 20 µl DNase I Working Tamponu ve 10 µl DNase I ekleyerek pipetaj yapıldı ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında hücrelerin üzerine 350 µl Binding Buffer ekleyip yavaşça pipetaj yapıldı.
- Lizatı, 2ml'lik mikrosantrifüj toplama tüpüne yerleştirilen miRNA Spin Kolonuna aktarıldı, kapağı kapatıldı ve 11000 xg'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolona 500 µl Wash Buffer eklendi ve 11000 xg'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirip kalan etanolü uzaklaştırmak için 11000 xg'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolonu, temiz bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- Kolondaki filtrenin merkezine önceden 65°C'de ısıtılmış Elution Buffer'den 50 µl ekledik ve 3 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında 8000 xg'de 1dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında mikrosantrifüj tüpünde kalan kısım miRNA içermektedir ve diğer aşamalar için hazırdır.

2.2.2.2. RNA'ya Poly (A) Bağlama

Elde edilen miRNA'lara, poly A kuyruğu takmak için abm miRNA cDNA synthesis kitinin (cat: G270) içerisinde bulunan poly A mixi kullanıldı.

(Çizelge 2.1.)

Çizelge 2.1. Poly(A) mix içeriği

Poly(A) mix içeriği	Her bir örnek başına düşen miktar	Totalde hazırlanan miktar (x4)
ATP(10 mM)	1,25 µl	5 µl
Poly(A) Polymerase, Yeast (1 U/µl)	1 µl	4 µl
5x Poly(A) Polymerase, Yeast Reaction Buffer	5 µl	20 µl
25 mM MnCl ₂	2,5 µl	10 µl
Nuclease-free H ₂ O	5,25 µl	21 µl
Toplam	15 µl	60 µl

- Her bir grup için 2 ependorf olacak şekilde 4 tane 200 µl'lik ependorf alındı, her bir ependorfa 15 µl hazırlanan Poly (A) mixinden ve daha önceden elde ettiğimiz RNA'lardan 10'ar µl eklendi.
- BİO-RAD T100™ Thermal Cycler cihazında inkübe edildi (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. poly (A) bağlanması için gereken süre ve sıcaklık

20 dk	37°C
20 dk	65°C

2.2.2.3. cDNA Sentezi

miRNA OneScript® cDNA Synthesis Kiti kullanılmıştır ve kitin protokolüne uygun olarak çalışılmıştır.

cDNA Sentez Protokolü:

- İnkübasyondan çıkan örnekleri buz içerisine alındı.
- Her bir örnek için yeni bir ependorf olarak (toplamda 4 ependorf) her birine 10'ar µl hazırladığımız poly (A) + RNA mixinden eklendi.
- Her bir örnek üzerine 2'şer µl miRNA Oligo (dT) adapter eklendi.

- T100 Thermal Cycler cihazında 65°C’de 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan çıkan örneklerin üzerlerine 8’er µl hazırladığımız mixden eklendi (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. cDNA mix içeriği

cDNA mix içeriği	Her bir örnek başına düşen miktar	Totalde hazırlanan miktar (x4)
dNTPs (10 mM)	1 µl	4 µl
5x RT Buffer	4 µl	16 µl
RNase OFF Ribonuclease İnhibitör (40 U/µl)	0,5µl	2 µl
OneScript® RTase (200 U/µl)	1 µl	4 µl
RNase-free H ₂ O	1,5 µl	6 µl
Toplam	8 µl	32 µl

- T100 Thermal Cycler cihazında önce 42°C’de 15 dk sonra reaksiyonu durdurmak için 70°C’de 10 dk inkübe edildi.
- İnkübe olan örnekleri bir sonraki aşamaya kadar -20°C’ye kaldırıldı.

2.2.2.4. miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Hazırlanılan cDNA’lar, inhibisyona maruz kalmamaları için 6 kat dH₂O ile dilüe edildi (20µl cDNA + 100 µl dH₂O).

45 adet liyofilize miRNA primerleri 300 µl dH₂O ile çözüldü ve vortekslendi. Primer sayısı kadar temiz ependorf hazırlayıp 83,3 µl dH₂O ve 16,6 µl primerlerden (forward primer) eklendi, ara stok oluşturuldu.

Liyofilize reverse primer (sabit primer) de 530 µl dH₂O ile çözümlenip vortekslendi. Temiz bir ependorfa 50 µl reverse primer ve 250 µl dH₂O ekleyerek ara stok oluşturuldu.

Çizelge 2.4. BrightGreen MasterMix ve miRNA primer mix içeriği

Mix içeriği	Her bir örnek başına düşen miktar	Totalde hazırlanan miktar (x4)
BrightGreen miRNA qPCR MasterMix (dNTP, taq polimeraz, MgCl ₂ , fluorescent detection dye, reference dye, buffer, dH ₂ O)	5 µl	20 µl
Forward Primer	0,5 µl	2 µl
Reverse Primer	0,5 µl	2 µl
Nuclease-free Water	2,25 µl	9 µl
Toplam	8,25 µl	33 µl

Hazırlanılan mix (Çizelge 2.4.) her forward primeri için tek tek hazırlanmıştır. 0,1 ml'lik 96'lı pleytin kuyucuklarına 8,25 µl hazırlanılan mix eklendi. Üzerlerine ise 1,75 µl cDNA'ları ekleyip pleytin üzerini şeffaf film ile kapatıldı. Pleyt Çizelge 2.5.'de belirtilen ısı protokolü uygulanarak Light Cycler96 sisteminde real time PCR işlemine alındı.

Çizelge 2.5. Real time PCR ısı protokolü

Denatürasyon	95°C de 10 dk.
Amplifikasyon Bu döngü 40 kez tekrarlanır. (1,6°C/sn, saniyedeki ısı değişimi)	95°C de 10 sn. 60°C de 15sn 72 °C de 30sn Okuma
Melting Curve	95°C de 30 sn. 50 °C de 1 dk. 90 °C de continue(Acquisitions 3 per/°C)
Cooling	40 °C de 1 dk.

Çalışmamızda elde edilen miRNA değerlerinin (kontrol grubu ile transfekte edilen numuneler arasındaki) nispi gen ekspresyon seviyelerini $\Delta\Delta CT$ metodundaki formüle uygun olarak hesapladık (Rao ve ark 2013).

$$\Delta CT = CT (\text{numune/kontrol}) - CT (\text{housekeeping gen})$$

$$-\Delta\Delta CT = -[(\text{Numune } \Delta CT - \text{Housekeeping } \Delta CT) - (\text{Kontrol } \Delta CT - \text{Housekeeping } \Delta CT)]$$

3. BULGULAR

Çalışmamızda ekspre ettiğimiz 45 miRNA **Çizelge 3.1.**'de gösterilmiştir. Bir organizmanın her hücresi için her zaman sabit düzeylerde eksprese olan gene **Housekeeping gen** denir. Çalışmamıza en uygun Housekeeping gen SNORD 68 olarak belirlendi.

Çizelge 3.1. miRNA paneli

Primer miRNA	Primer miRNA
HSA-let-7a-5p	HSA-miR-134-5p
HSA-miR-122-5p	HSA-miR-29b-3p
HSA-miR-196a-5p	HSA-miR-135b-5p
HSA-miR-148a-3p	HSA-miR-206
HSA-miR-146a-5p	HSA-miR-124-3p
HSA-miR-21-5p	HSA-miR-1-1
HSA-miR-150-5p	HSA-miR-27b-3p
HSA-let-7i-5p	HSA-miR-7-5p
HSA-miR-181b-5p	HSA-miR-127-5p
HSA-miR-126-3p	HSA-miR-15b-5p
HSA-miR-133b	HSA-miR-16-5p
HSA-miR-20b-5p	HSA-miR-210-3p
HSA-miR-335-5p	HSA-miR-17-5p
HSA-miR-184	HSA-miR-98-5p
HSA-miR-214-3p	HSA-miR-19a-3p
HSA-miR-15a-5p	HSA-miR-193a-5p
HSA-miR-378a-3p	HSA-miR-18a-5p
HSA-let-7b-5p	HSA-miR-126-3p
HSA-miR-205-5p	HSA-miR-27a-3p
HSA-miR-193b-3p	HSA-miR-39-3p
HSA-miR-183-5p	Human snord 68
HSA-miR-34c-5p	Human snord 44
HSA-miR-30c-5p	

■ Tümör baskılayıcı miRNA
■ Onkogen miRNA
■ Bilinmiyor
■ Housekeeping miRNA

Çalıştığımız kontrol grubu ve transfekte edilen numunelerin miRNA değerleri **Çizelge 3.2.**'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Kontrol grubu ve transkrite edilen numunelerin miRNA değerleri

Primer miRNA	Kontrol grubu		Transkrite grup		Primer miRNA	Kontrol grubu		Transkrite grup	
	miRNA değerleri	Ortalama değer	miRNA değerleri	Ortalama değer		miRNA değerleri	Ortalama değer	miRNA değerleri	Ortalama değer
let-7a-5p	24,66	23,78	24,22	24,41	miR-30c-5p	26,37	26,28	26,32	26,12
miR-122-5p	19,76	19,16	19,46	19,54	miR-134-5p	21,52	21,11	21,31	20,26
miR-196a-5p	25,08	25,06	25,07	25,41	miR-296-3p	26,01	23,15	24,58	24,57
miR-148a-3p	29,5	29,7	29,6	30,15	miR-135b-5p	18,33	17,49	17,91	19,72
miR-146a-5p	28,96	28,8	28,88	28,74	miR-206	24,72	23,79	24,25	24,39
miR-21-5p	23,5	23,7	23,6	24,65	miR-124-3p	21,43	19,6	20,51	20,64
miR-150-5p	27,12	27,93	27,52	27,39	miR-1-1	32,23	37,15	34,69	38,3
let-7i-5p	24,86	24,72	24,79	24,30	miR-27b-3p	23,5	23,62	23,56	24,77
miR-181b-5p	24,98	24,83	24,90	24,06	miR-7-5p	27,4	27,72	27,56	26,4
miR-126-3p	27,06	26,83	26,94	26,96	miR-127-5p	26,31	25,43	25,87	26,64
miR-133b	21	22,36	21,68	22,29	miR-15b-5p	22,91	22,85	22,88	22,06
miR-20b-5p	26,92	25,03	25,97	25,53	miR-16-5p	30,19	30,12	30,15	31,77
miR-335-5p	28,65	28,5	28,57	28,28	miR-210-3p	23,36	25,2	24,28	22,64
miR-184	23,7	23,74	23,72	23,71	miR-17-5p	20,06	20,03	20,04	19,6
miR-214-3p	21,88	21,42	21,65	21,57	miR-98-5p	24,38	24,9	24,64	26,07
miR-15a-5p	21,67	20,33	21	20	miR-19a-3p	26,6	26,7	26,65	26,77
miR-378a-3p	19,93	18,62	19,27	19,61	miR-193a-5p	25,56	25,36	25,46	24,21
let-7b-5p	20,85	20,93	20,89	21,62	miR-18a-5p	38,12	38,59	38,35	37,5
miR-205-5p	17,52	17,45	17,48	16,72	miR-126-3p	25,5	25,8	25,65	25,78
miR-193b-3p	25,01	25,5	25,25	26,51	miR-27a-3p	27,33	27,42	27,37	27,36
miR-183-5p	23,12	24,84	23,98	22,93	miR-39-3p	33,84	34,28	34,06	29,75
miR-34c-5p	25,35	24,99	25,17	22,76	SNORD 68	24,1	22,8	23,45	25,23
									24,55

Çizelge 3.3. Eşik döngüsü (- $\Delta\Delta$ CT) değerleri. Çalışmamızda 2 kat ve üzerindeki artış veya azalışlar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Çizelgede kırmızı renkle gösterilen seviyeler 2 kat ve üzeri artan düzeyleri ifade etmektedir.

miRNA	Kontrol grubu		miRNA	Kontrol grubu		- $\Delta\Delta$ CT değeri	Transfekte grup		- $\Delta\Delta$ CT değeri					
	Δ CT değerleri	Ortalama Δ CT		Δ CT değerleri	Ortalama Δ CT		Δ CT değerleri	Ortalama Δ CT						
let-7a-5p	0,56	0,98	0,77	0,59	-0,88	-0,14	0,91	2,27	3,48	2,87	2,25	0,89	1,57	1,3
miR-122-5p	-4,34	-3,64	-3,99	-4,35	-5,67	-5,01	1,02	-2,58	-1,69	-2,14	-2,08	-4,97	-3,52	1,38
miR-196a-5p	0,98	2,26	1,62	1,64	0,07	0,86	0,76	1,91	0,35	1,13	-0,29	-0,66	-0,47	1,6
miR-148a-3p	5,4	6,9	6,15	6,22	4,97	5,6	0,55	-5,77	-5,31	-5,54	-5,76	-5,51	-5,63	0,09
miR-146a-5p	4,86	6	5,43	4,87	3,5	4,19	1,24	0,62	0,99	0,8	0,36	-0,84	-0,24	1,04
miR-21-5p	-0,6	0,9	0,15	0,72	-0,53	0,1	0,05	-2,67	-3,2	-2,94	-3,79	-4,03	-3,91	0,97
miR-150-5p	3,02	5,13	4,07	3,45	2,22	2,84	1,23	8,13	14,35	11,24	4,1	13,07	8,59	2,65
let-7i-5p	0,76	1,92	1,34	0,22	-0,72	-0,25	1,59	-0,6	0,82	0,11	0,89	-0,39	0,25	-0,14
miR-181b-5p	0,88	2,03	1,45	-0,12	-0,87	-0,49	1,94	3,3	4,92	4,11	2,62	1,17	1,9	2,21
miR-126-3p	2,96	4,03	3,49	1,99	2,82	2,41	1,08	2,21	2,63	2,42	1,39	1,41	1,4	1,02
miR-133b	-3,1	-0,44	-1,77	-1,76	-2,76	-2,26	0,49	-1,19	0,05	-0,57	-2,79	-3,17	-2,98	2,41
miR-20b-5p	2,82	2,23	2,52	1,64	0,31	0,98	1,54	6,09	7,32	6,7	7,89	7,63	7,76	-1,06
miR-335-5p	4,55	5,7	5,12	4,54	2,92	3,73	1,39	-0,74	2,4	0,83	-1,24	-3,5	-2,37	3,2
miR-184	-0,4	0,94	0,27	-0,53	-1,15	-0,84	1,11	-4,04	-2,77	-3,41	-4,28	-4,91	-4,59	1,18
miR-214-3p	-2,22	-1,38	-1,8	-2,38	-3,58	-2,98	1,18	0,28	2,1	1,19	0,73	0,84	0,79	0,4
miR-15a-5p	-2,43	-2,47	-2,45	-4,61	-4,5	-4,55	2,1	2,5	3,9	3,2	3,01	1,54	2,28	0,92
miR-378a-3p	-4,17	-4,18	-4,18	-4,83	-5,05	-4,94	0,76	1,46	2,56	2,01	1,06	-1,02	0,02	1,99
let-7b-5p	-3,25	-1,87	-2,56	-2,79	-3,07	-2,93	0,37	14,02	15,79	14,9	13,81	12,27	13,04	1,86
miR-205-5p	-6,58	-5,35	-5,97	-7,73	-7,94	-7,83	1,86	1,4	3	2,2	1,57	0,55	1,06	1,14
miR-193b-3p	0,91	2,7	1,8	1,31	2,61	1,96	-0,16	3,23	4,62	3,92	3,32	2,13	2,73	1,19
miR-183-5p	-0,98	2,04	0,53	-1,18	-2,07	-1,62	2,15	9,74	11,48	10,61	6,02	4,52	5,27	5,34
miR-34c-5p	1,25	2,19	1,72	-1,24	-2,35	-1,79	3,51							

miR-15a-5p, miR-183-5p, miR-1-1, miR-7-5p ve miR-15b-5p'nin düzeylerinde **2 ile 3 kat** arasında artış olmuştur.

miR-34c-5p, miR-210-3p ve miR-39-3p'nin düzeylerinde **3 kat ve üzeri** artış olmuştur.



4. TARTIŞMA

Dünya üzerinde hemen hemen her gün milyonlarca kadına meme kanseri teşhisi konmaktadır. Gün geçtikçe artan meme kanseri, tanı ve tedavisinde son yıllarda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Shin ve ark 2010).

miRNA ve meme kanseri ile ilgili çalışmalar son yıllarda daha da hız kazanmıştır. miRNA'ların meme kanseri patogeneğinde rol oynadığının belirlenmesi, miRNA'ların ileride meme kanserinin tanı ve tedavisinde de yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda miRNA'ların ekspresyonunun düzenlenmesinde Twist1'inde rol aldığı görülmüştür (Mironchik ve ark 2005).

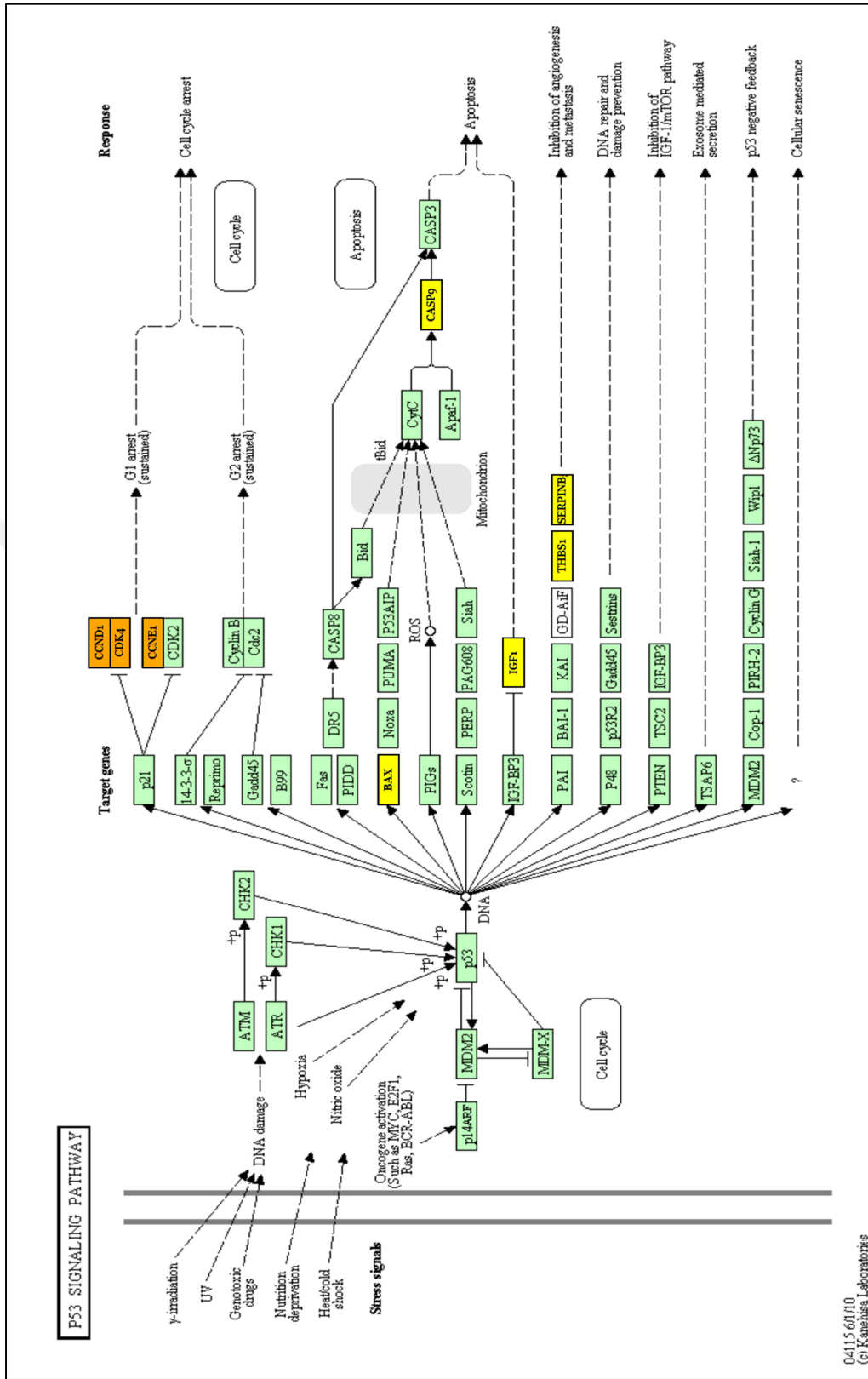
Transkripsiyon faktörlerinden olan Twist1, epitel hücrelerin yer değiştirme, düzenlenme, farklılaşma gibi faaliyetlerini düzenlemektedir. Tüm kanser türlerinde, kötü prognoz, yüksek dereceli invaziv ve metastatik lezyonlarla ilişkilendirilmiş ve ayrıca apoptozisi indüklediği belirtilmiştir. Ayrıca Twist1, anjiyojenezi ve kromozomal instabiliteyi indükleyen MCF-7 hücrelerinde vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) sentezini arttırabilir. Son yıllarda, kanser türlerinde Twist1'in rolü derinlemesine araştırılmaya başlanmıştır (Mironchik ve ark 2005, Aktas ve ark 2009).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, Twist1 gen aktivitesindeki değişikliklerin invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilen miR-10b, miR-20a, miR-34a, miR-151-5p, miR-129-5p, miR-200b, miR-373, miR-424 ve miR-448' in ekspresyon düzeylerini etkileyebileceği sonucuna ulaşılmıştır (Li ve ark 2011, Li ve ark 2013, Nairismagi ve ark 2013, Wang ve ark 2013). Bu çalışmalarda Twist1 gen inhibisyonunun, onkogenik miRNA ekspresyon düzeylerini down regüle edebileceği, tümör supresör miRNA'ların ekspresyon düzeylerini de up regüle edebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Başka bir çalışmada ise Twist1 geni inhibisyonunu sağlamak için miR-145a-5p, miR-151-5p, miR-300, miR-337-3p ve miR-720 gibi miRNA' lara bakılmıştır (Yu ve ark 2014, Chen ve ark 2015, Drasin ve ark 2015).

Yaptığımız çalışmada, daha önceki çalışmalarda meme kanserinde miRNA Twist1 ilişkisi bakılmamış olan bir miRNA paneli alınmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda Twist1 ekspresyonu yapılan MCF-7 hücre hattında miR-15a-5p, miR-183-5p, miR-1-1, miR-7-5p, miR-15b-5p, miR-34c-5p, miR-210-3p ve miR-39-3p'nin ekspresyonlarının up regüle olduğu tespit edilmiştir.

Yaptığımız çalışma sonucunda up regüle olan miRNA'lardan miR-7-5p, miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-1-1, miR-210-3p miR-34c-5p ve miR-183-5p'nin; DIANA TOOLS'de yapmış olduğumuz tarama sonucunda p53 sinyal yolağında 11 geni ve PI3K-Akt sinyal yolağında ise 49 geni etkileyebileceği gözlemlenmiştir. Çalışmada up regüle olan miR-39-3p'nin ise DIANA TOOLS'de yapmış olduğumuz tarama sonucunda kanser yolaklarına katılmadığı ve hiç bir geni etkilemediği gözlemlenmiştir.

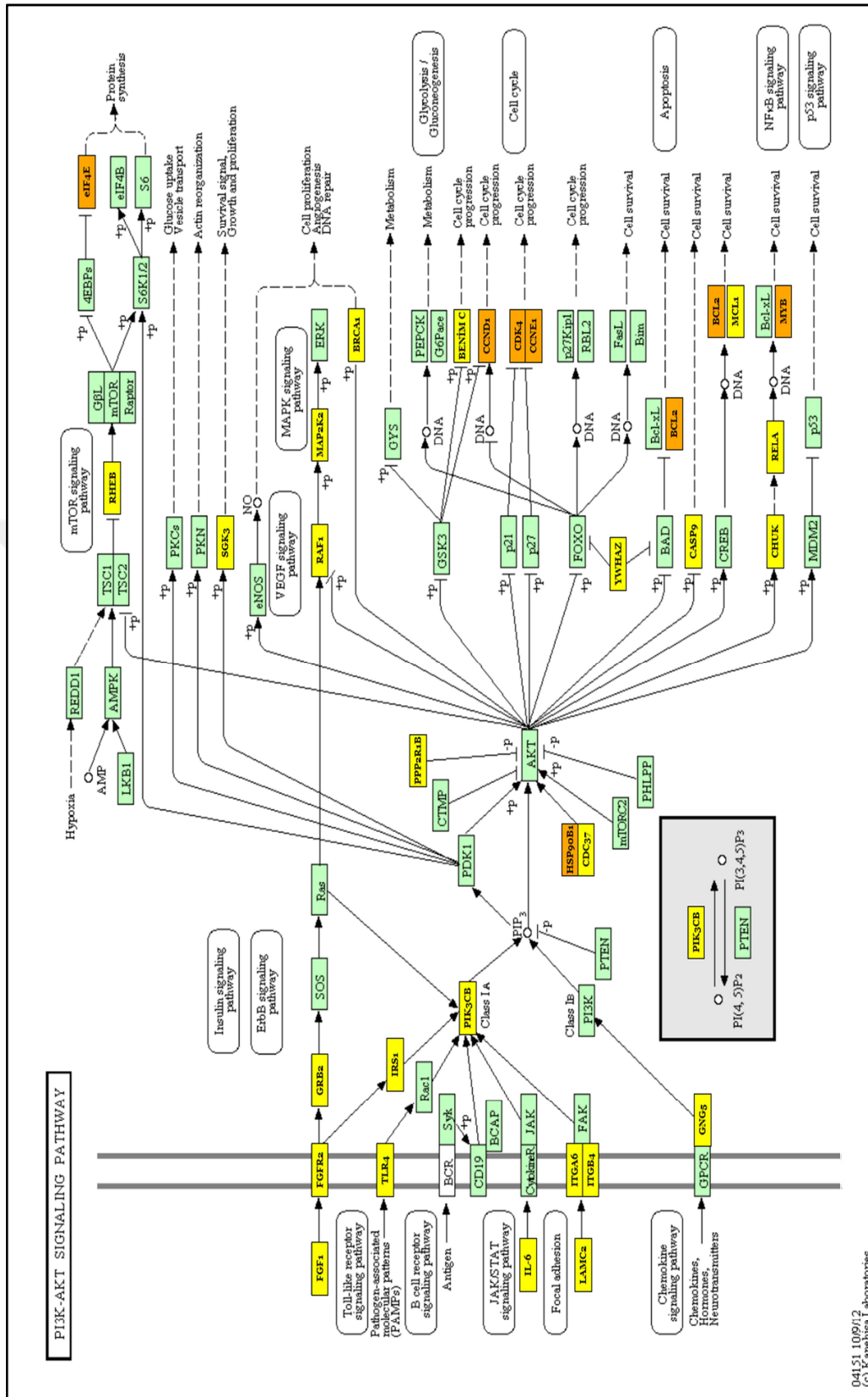
DIANA TOOLS'de yapmış olduğumuz tarama sonucunda, p53 sinyal yolağına etki eden miR'ların; siklin D1 (CCND1) (miR-15a-5p, miR-1-1, miR-183-5p ve miR-15b-5p), CDK4/6 (miR-1-1 ve miR-34c-5p), siklin E'yi (CCNE1) (miR-15a-5p ve miR-15b-5p) baskılamasıyla hücre döngüsünün durmasını artırabileceği gözlemlenmiştir. BAX'ın (miR-1-1) aktifleşmesiyle CASP9 (miR-7-5p) ve CASP3 aktive olmasının apoptozu artırabileceği gözlemlenmiştir. Ayrıca thrombospondin 1'in (THBS1) (miR-1-1) inhibe olup maspin (SERPINB5) (miR-1-1) geninin aktifleşmesiyle de angiogenez ve metastazın inhibe olabileceği gözlemlenmiştir. (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. p53 sinyal yoluğu (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>)

DIANA TOOLS'de yapmış olduğumuz tarama sonucunda, PI3K-AKT sinyal yolağında ise miRNA'ların siklin D1 (CCND1) (miR-15a-5p, miR-1-1, miR-15b-5p ve miR-183-5p), siklin E (CCNE1) (miR-15a-5p ve miR-15b-5p) ve CDK4/6'yı (miR-1-1 ve miR-34c-5p) baskılamasıyla hücre döngüsünün susturulabileceği, BCL2'yi (miR-15a-5p, miR-1-1, miR-34c-5p ve miR-15b-5p) baskılayarak ve CASP9'u (miR-7-5p) aktive ederek apoptozu artırabileceği gözlemlenmiştir. Ayrıca BRCA1'in (miR-15a-5p) aktive olmasıyla hücre proliferasyonu ile anjiyojenezin baskılanabileceği ve DNA tamirinin başlayabileceği gözlemlenmiştir (**Şekil 4.2.**).





Şekil 4.2. PI3K-AKT sinyal yolağı (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>)

04151 10/9/12
© Kanelias Laboratories

Zhang HY ve ark.'nın yaptığı çalışmada miR-7 ekspresyonunun, miR-7'nin varsayılan promotörüne doğrudan bağlanan HOXD10 tarafından indüklendiği gözlemlenmiştir. HOXD10 tarafından indüklenen miR-7, SETDB1 kodlayan haberci RNA'nın translasyonunu inhibe etmeye devam eder. Aynı zamanda da miR-7, Twist1 ve c-myc'nin down regülasyonuna sebep olan, STAT3'ün ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır (Zhang ve ark 2014).

Foekens ve ark. hastalısız sağkalım ile yüksek HSA-miR-7-5p ekspresyonu ile ilişkilendirmiştir. miR-7'nin meme kanseri metastaz inhibitörü olarak işlev gördüğü ve sitotoksik T lenfosit aracılı meme kanseri hücrelerinin erimesine aracılık ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, miR-7'nin hücre proliferasyonunu baskıladığı ve farklı meme kanseri hücre hatlarında apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Foekens ve ark 2008).

Yaptığımız çalışmada da miR-7-5p ekspresyonun 2,21 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu artışın DIANA TOOLS'de yapmış olduğumuz tarama sonucunda p53 ve PI3K-AKT sinyal yollarında CASP 9'un aktive olmasıyla apoptozu indükleyebileceği gözlemlenmiştir.

Samaan S ve ark.'nın yaptığı çalışmada miR-210-3p'nin, hedef genleri baskılayarak veya destekleyerek kanser hücrelerinde hayatta kalma ve metastazı etkileyebileceği gösterilmektedir. Meme kanseri, prostat kanseri ve mide karsinomu gibi çeşitli tümörlerin biyolojik işlevlerinde etkili oldukları gösterilmiştir. miR-210-3p'nin aşırı ekspresyonu ile invazyon ve metastazın önemli ölçüde azalabileceği ve *in vivo* tümör ilerlemesini baskılayabileceği gözlemlenmiştir (Samaan ve ark 2015). Yaptığımız çalışmada da miR-210-3p ekspresyonunun 3,2 kat arttığı gözlemlenmiştir.

Liu ve ark.'nın yaptıkları çalışmada miR-1 ailesinin üyeleri proliferasyonu ve artmış apoptozu inhibe ederek K-RAS ve MALAT1'i hedef alarak meme kanserinde tümör supresör miRNA olarak görev yaptığı bildirilmiştir. *In vivo* çalışmalarda miR-1 ailesinin metastazı inhibe edebileceği görülmüştür (Liu ve ark 2015).

Liu ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, meme kanseri kök hücrelerinin (CSC'ler) ve CSC dışı tümör hücrelerinin miRNA profillerini miRNA mikrodizisi ile araştırmışlar ve değiştirilmiş miR-1 ekspresyonunun meme CSC'lerinin çoğalması ve göçü üzerindeki etkisini belirlemişlerdir. miR-1 *in vitro* meme CSC'lerinin proliferasyonunu, göçünü ve yara iyileşmesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Geliştirilmiş miR-1 ekspresyonu, implante edilmiş MCF-7 / CSC'lerin büyümesini inhibe ederken, miR-1 inhibisyonu, *in vivo* olarak implante edilmiş MCF-7 / CSC'lerin büyümesini teşvik etmiştir (Liu ve ark 2015).

Bizim yaptığımız çalışmada da miR-1-1 ekspresyonu 2,65 kat artış göstermiştir. Ve bu artışın DIANA TOOLS'de yapmış olduğumuz tarama sonucunda p53 sinyal yolağında maspini (SERPINB5) aktive ederek angiogenezi ve metastazı inhibe edebileceği gözlemlenmiştir. PI3K-AKT sinyal yolağında ise BCL2'nin baskılanmasıyla apoptozun indükleyebileceği gözlemlenmiştir.

Kratassiouk ve ark.'nın yaptıkları çalışmada onkogenik bir hücre döngüsü düzenleyicisi olan WEE1'in düzenlenmesini, RNA bağlama kompleksleri CPEB1 ve miR-15b/RISC ile analiz etmişlerdir. miR-15b/RISC ve CPEB1'in WEE1 translasyonu üzerinde koordineli bir etkisi olduğunu göstermişlerdir. miR-15b/RISC ve CPEB1, G1 ve S fazı sırasında WEE1 protein ekspresyonunu baskırlar. İlginç bir şekilde bu 2 faktör G2/M geçişinde, WEE1'in aşırı eksprese olmasıyla hücre döngüsü sırasında inhibe edici aktivitelerini kaybederler (Kratassiouk ve ark 2016).

Yaptığımız çalışmada miR-15b-5p ekspresyonunun 2,41 kat arttığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda literatüre paralel olarak DIANA TOOLS'de yapmış olduğumuz tarama sonucunda CCND1 ve CCNE1 genlerini baskılayarak G1/S fazını inhibe edebileceği gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda, miR-15a'nın akciğer kanseri, prostat kanseri ve yumurtalık kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde anormal şekilde aşağı eksprese edildiğini görülmektedir.

Mei ve ark.'ı miR-15 kümesi tarafından kodlanan miRNA'ların (miR-15a/15b/16), G1 kontrol noktaları ve anti-apoptotik B hücresi lenfoma 2 (BCL-2) genini hedefleyerek G1 tutuklamasını ve apoptozisi tetiklediğini bildirmişlerdir (Mei ve ark 2015).

Patel ve ark.'ı miR-15a ve miR-16'nın, DNA onarımını engelleyen BMI1'in aşağı regülasyonuna aracılık ettiğini gösterirken, yüksek seviyelerde meme kanseri hücrelerini apoptotik hücre ölümüne yol açan doksorubisine duyarlı hale getirebildiğini gözlemlenmiştir. Çalışma sonucuna göre aşırı eksprese edilen miR-15a ve miR-16, sadece BMI1 seviyesini baskılamakla kalmayıp aynı zamanda meme kanseri hücrelerinde apoptozu tetikleyerek meme kanserini kemoterapötik ilaç doksorubisine karşı hassaslaştırır (Patel ve ark 2017).

Yaptığımız çalışmada miR-15a-5p ekspresyonunun 2,1 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu artışa göre DIANA TOOLS'de yapmış olduğumuz tarama sonucunda hücre döngüsünde CCND1, CCND2 ve CCNE1 genlerinin baskılanmasıyla G1 fazının

susturulabileceği gözlemlenmiştir. Ayrıca PI3K-AKT sinyal yolağında da BCL2 geninin susturulup apoptozun indüklenebileceği gözlemlenmiştir.

Yamakuchi ve arkadaşları, SIRT1'in kolon kanseri hücrelerinde miR-34a ve miR-34c tarafından tanınabileceği ve hedeflenebileceğini kanıtlamışlardır. miR-34'ün aracılık ettiği SIRT1 inhibisyonunun, p53 asetilasyonunun artmasına neden olarak stabilitesini ve aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Yamakuchi ve Lowenstein 2009).

Ilisso ve ark.'ı yaptıkları çalışmada, AdoMet ve miR-34a/miR-34c kombinasyonunun, p53 asetilasyonunun artmasına paralel olarak SIRT1 ve HDAC1 ekspresyonunu bastırdığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca AdoMet ve miR-34a/miR-34c ile kombine tedavinin MCF-7 hücrelerinde AdoMet kaynaklı apoptozu büyük ölçüde güçlendirdiği görülmüştür (Ilisso ve ark 2018).

Yaptığımız çalışmada ise miR-34c-5p ekspresyonunu 3,51 kat artırdığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda bu artış nedeniyle DIANA TOOLS'de yapmış olduğumuz tarama sonucunda CDK4 ile CCNE2 genlerinin susturulup hücre döngüsünün durdurulabileceği ve ayrıca BCL2 geninin susturulmasıyla da apoptozun indüklenebileceği gözlemlenmiştir.

Lowery ve ark. miR-183'ün *Ezrin*'i baskılayarak meme kanserinde hücre göçünü önlediğini bildirmişlerdir. miR-183'ün meme kanserinde düzensiz olduğunu ayrıca östrojen reseptörü ve HER2/neu reseptörü ifadesi ile bağlantılı olduğunu göstermişlerdir. İndüklenmiş miR-183 aşırı ekspresyonunun, meme kanseri hücrelerinin göçünü inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bu bulgu, miR-183'ü aşırı eksprese eden hücrelerden RQ-PCR ile kanıtlanmış ve bu da birçok göç ile istilaya bağlı genlerin düzensizliğini göstermiştir (Lowery ve ark 2010).

Buna karşılık Li ve ark. çalışmalarında miR-183/96/182 kümesinin çoğu meme kanserinde yüksek oranda eksprese olduğunu ve transkripsiyonunun meme kanserlerinde düzensiz olduğunu bildirmişlerdir. miR-183/96/182 kümesi aynı pri-miRNA içerisinde kopyalanırlar ve transkripsiyonları ZEB1 ve HSF2 tarafından düzenlenmektedir. Ayrıca miR-183, meme kanserinde doğrudan RAB21 genini hedeflemektedir. Meme kanserinde hücre proliferasyonunu ve göçünü arttırdığı için onkogen olarak işlev görmektedir. Çelişen bu iki çalışmaya bakıldığında miR-183/96/182 kümesinin kanserin türüne, konumuna ve evresine bağlı olarak onkogen veya tümör baskılayıcı olarak işlev görebildiği düşünülmektedir (Li ve ark 2014).

Yaptığımız çalışmada da miR-183-5p'nin ekspresyonunun 2,15 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu artışla DIANA TOOLS'de yapmış olduğumuz taramaya göre miR-183'ün hücre döngüsünde CCND1 aracılığıyla etkisini gösterebileceği düşünülmektedir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada insan meme kanseri MCF-7 hücre hattında, kontrol grubu hücreleri ile Twist1 geni sense klonlanmış Twist1-pcdna 3.1 vektörü transfeksiyonu uygulanmış hücreler arasında, 43 miRNA'nın ekspresyon düzeylerindeki değişimler

incelendi. RT-PCR sonuçlarına göre miR-1-1, miR-7-5p, miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-34c-5p, miR-39-3p, miR-183-5p ve miR-210-3p'nin ekspresyon düzeylerinin up regüle olduğu gözlemlendi.

Twist1 ekspresyonu sonucu tümör supresör miR-1-1, miR-7-5p, miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-34c-5p, miR-39-3p ve miR-210-3p'nin down regüle olması beklenirken up regüle olduğu gözlemlenmiştir. DIANA TOOLS'de yaptığımız taramaya göre miR-1-1, miR-7-5p, miR-15a-5p, miR-34c-5p, miR-210-3p ve miR-183-5p'nin hücre döngüsünü, apoptozu ve metastazı etkileyebileceği gözlemlenmiştir.

Yaptığımız literatür taramalarında MCF-7 hücre hattında Twist1 geni ile miRNA ilişkilendirmesine rastlanmamıştır. Twist1 geni transfeksiyonu sonucu elde edilen miRNA ekspresyon verilerinin ileriki çalışmalara kaynak olabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S, 2009. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 11, 4.
- Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, de Fromental CC, Puisieux A, 2008. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell*, 14, 1, 79-89.
- Balabas A, Skasko E, Nowakowska D, Niwinska A, Blecharz P, 2010. Novel germline mutations in BRCA2 gene among breast and breast-ovarian cancer families from Poland. *Fam Cancer*, 9, 3, 267-74.
- Bellosillo B, Tusquets I, 2006. Pitfalls and caveats in BRCA sequencing. *Ultrastruct Pathol*, 30, 3, 229-35.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ, 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 6818, 363-6.
- Botos J, Barhoumi R, Burghardt R, Kochevar DT, 2002. Rb localization and phosphorylation kinetics correlate with the cellular phenotype of cultured breast adenocarcinoma cells. *In Vitro Cell Dev-An*, 38, 4, 235-41.
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM, 2004. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *P Natl Acad Sci USA*, 101, 32, 11755-60.
- Calin GA, Sevignani C, Dan Dumitru C, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM, 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *P Natl Acad Sci USA*, 101, 9, 2999-3004.
- Chen D, Dang BL, Huang JZ, Chen M, Wu D, Xu ML, Li R, Yan GR, 2015. MiR-373 drives the epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis via the miR-373-TXNIP-HIF1 alpha-TWIST signaling axis in breast cancer. *Oncotarget*, 6, 32, 32701-12.
- Chung HJ, Levens D, 2005. c-myc Expression: Keep the noise down! *Mol Cells*, 20, 2, 157-66.
- Drasin DJ, Guarnieri AL, Neelakantan D, Kim J, Cabrera JH, Wang CA, Zaberezhnyy V, Gasparini P, Cascione L, Huebner K, Tan AC, Ford HL, 2015. TWIST1-Induced miR-424 Reversibly Drives Mesenchymal Programming while Inhibiting Tumor Initiation. *Cancer Res*, 75, 9, 1908-21.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ, 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 4, 259-69.
- Foekens JA, Sieuwerts AM, Smid M, Look MP, de Weerd V, Boersma AWM, Klijn JGM, Wiemer EAC, Martens JWM, 2008. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *P Natl Acad Sci USA*, 105, 35, 13021-6.
- Fondrevelle ME, Kantelip B, Reiter RE, Chopin DK, Thierry JP, Monnier F, Bittard H, Wallerand H, 2009. The expression of Twist has an impact on survival in human bladder cancer and is influenced by the smoking status. *Urol Oncol-Semin Ori*, 27, 3, 268-76.
- Gong XQ, Li L, 2002. Dermo-1, a multifunctional basic helix-loop-helix protein, represses MyoD transactivation via the HLH domain, MEF2 interaction, and chromatin deacetylation. *J Biol Chem*, 277, 14, 12310-7.
- Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, White RJ, 2005. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol*, 7, 3, 311-U121.

- Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R, 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123, 4, 631-40.
- Hanahan D, Weinberg RA, 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 5, 646-74.
- Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, Fridlyand J, Sahin A, Agarwal R, Joy C, Liu WB, Stivers D, Baggerly K, Carey M, Lluch A, Monteagudo C, He XP, Weigman V, Fan C, Palazzo J, Hortobagyi GN, Nolden LK, Wang NJ, Valero V, Gray JW, Perou CM, Mills GB, 2009. Characterization of a Naturally Occurring Breast Cancer Subset Enriched in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics. *Cancer Res*, 69, 10, 4116-24.
- Illiso CP, Delle Cave D, Mosca L, Pagano M, Coppola A, Mele L, Caraglia M, Cacciapuoti G, Porcelli M, 2018. S-Adenosylmethionine regulates apoptosis and autophagy in MCF-7 breast cancer cells through the modulation of specific microRNAs. *Cancer Cell Int*, 18.
- Khanbabaei H, Teimoori A, Mohammadi M, 2016. The interplay between microRNAs and Twist1 transcription factor: a systematic review. *Tumor Biol*, 37, 6, 7007-19.
- Klijn JGM, Berns PMJJ, Schmitz PIM, Foekens JA, 1992. The Clinical-Significance of Epidermal Growth-Factor Receptor (Egf-R) in Human Breast-Cancer - a Review on 5232 Patients. *Endocr Rev*, 13, 1, 3-17.
- Kratassiouk G, Pritchard LL, Cuvellier S, Vislovukh A, Meng Q, Groisman R, Degerny C, Deforz E, Harel-Bellan A, Groisman I, 2016. The WEE1 regulators CPEB1 and miR-15b switch from inhibitor to activators at G2/M. *Cell Cycle*, 15, 5, 667-77.
- Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y, 2010. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*, 101, 11, 2309-15.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, 1993. The C-Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small Rnas with Antisense Complementarity to Lin-14. *Cell*, 75, 5, 843-54.
- Li P, Sheng C, Huang L, Zhang H, Huang L, Cheng Z, Zhu Q, 2014. MiR-183/-96/-182 cluster is up-regulated in most breast cancers and increases cell proliferation and migration. *Breast Cancer Res*, 16, 6, 473.
- Li QQ, Chen ZQ, Cao XX, Xu JD, Xu JW, Chen YY, Wang WJ, Chen Q, Tang F, Liu XP, Xu ZD, 2011. Involvement of NF-kappa B/miR-448 regulatory feedback loop in chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Cell Death Differ*, 18, 1, 16-25.
- Li QQ, Xu JD, Wang WJ, Cao XX, Chen Q, Tang F, Chen ZQ, Liu XP, Xu ZD, 2009. Twist1-Mediated Adriamycin-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Relates to Multidrug Resistance and Invasive Potential in Breast Cancer Cells. *Clin Cancer Res*, 15, 8, 2657-65.
- Li X, Xu F, Chang CK, Byon J, Papayannopoulou T, Deeg HJ, Marcondes AM, 2013. Transcriptional regulation of miR-10a/b by TWIST-1 in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 98, 3, 414-9.
- Lindsey I, 2012. Who should treat rectal cancer and how? *Colorectal Dis*, 14, 12, 1439-40.
- Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM, 2004. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *P Natl Acad Sci USA*, 101, 26, 9740-4.
- Liu R, Li J, Lai Y, Liao Y, Liu R, Qiu W, 2015. Hsa-miR-1 suppresses breast cancer development by down-regulating K-ras and long non-coding RNA MALAT1. *Int J Biol Macromol*, 81, 491-7.
- Liu T, Hu K, Zhao Z, Chen G, Ou X, Zhang H, Zhang X, Wei X, Wang D, Cui M, Liu C, 2015. MicroRNA-1 down-regulates proliferation and migration of breast cancer stem cells by inhibiting the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncotarget*, 6, 39, 41638-49.

- Lowery AJ, Miller N, Dwyer RM, Kerin MJ, 2010. Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells. *Bmc Cancer*, 10, 502.
- Mei Z, Su T, Ye J, Yang C, Zhang S, Xie C, 2015. The miR-15 family enhances the radiosensitivity of breast cancer cells by targeting G2 checkpoints. *Radiat Res*, 183, 2, 196-207.
- Mironchik Y, Winnard PT, Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, Kominsky S, Artemov D, Bhujwalla Z, Van Diest P, Burger H, Glackin C, Raman V, 2005. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res*, 65, 23, 10801-9.
- Mirza S, Sharma G, Prasad CP, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R, 2007. Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ER alpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci*, 81, 4, 280-7.
- Mitrunen K, Hirvonen A, 2003. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer - The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat Res-Rev Mutat*, 544, 1, 9-41.
- Moorman PG, Terry PD, 2004. Consumption of dairy products and the risk of breast cancer: a review of the literature. *Am J Clin Nutr*, 80, 1, 5-14.
- Nagasawa H, Keng P, Maki C, Yu YJ, Little JB, 1998. Absence of a radiation-induced first-cycle G(1)-S arrest in p53(+) human tumor cells synchronized by mitotic selection. *Cancer Res*, 58, 9, 2036-41.
- Nairismagi ML, Fuchtbauer A, Labouriau R, Bramsen JB, Fuchtbauer EM, 2013. The Proto-Oncogene TWIST1 Is Regulated by MicroRNAs. *Plos One*, 8, 5.
- Niesner U, Albrecht I, Janke M, Doebis C, Loddenkemper C, Lexberg MH, Eulenburg K, Kreher S, Koeck J, Baumgrass R, Bonhagen K, Kamradt T, Enghard P, Humrich JY, Rutz S, Schulze-Toppfhoff U, Aktas O, Bartfeld S, Radbruch H, Hegazy AN, Lohning M, Baumgart DC, Duchmann R, Rudwaleit M, Haupl T, Gitelman I, Krenn V, Gruen J, Sieper J, Zeitz M, Wiedenmann B, Zipp F, Hamann A, Janitz M, Scheffold A, Burmester GR, Chang HD, Radbruch A, 2008. Autoregulation of Th1-mediated inflammation by twist1. *J Exp Med*, 205, 8, 1889-901.
- Nieves-Neira W, Pommier Y, 1999. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: Multifactorial relationships with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. *Int J Cancer*, 82, 3, 396-404.
- O'Day E, Lal A, 2010. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12, 2.
- Osborne C, Wilson P, Tripathy D, 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*, 9, 4, 361-77.
- Pan DN, Fujimoto M, Lopes A, Wang YX, 2009. Twist-1 Is a PPAR delta-Inducible, Negative-Feedback Regulator of PGC-1 alpha in Brown Fat Metabolism. *Cell*, 137, 1, 73-86.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G, 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 6808, 86-9.
- Patel N, Garikapati KR, Pandita RK, Singh DK, Pandita TK, Bhadra U, Bhadra MP, 2017. miR-15a/miR-16 down-regulates BMI1, impacting Ub-H2A mediated DNA repair and breast cancer cell sensitivity to doxorubicin. *Sci Rep*, 7, 1, 4263.
- Pillai RS, 2005. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? *Rna*, 11, 12, 1753-61.
- Qin Q, Xu Y, He T, Qin CL, Xu JM, 2012. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Res*, 22, 1, 90-106.
- Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X, 2013. An improvement of the 2^{-delta delta CT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3, 3, 71-85.

- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G, 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 6772, 901-6.
- Rodrigues CO, Nerlick ST, White EL, Cleveland JL, King ML, 2008. A Myc-Slug (Snail2)/Twist regulatory circuit directs vascular development. *Development*, 135, 11, 1903-11.
- Ruddon RW, 2010. Introduction to the Molecular Biology of Cancer Translation to the Clinic. *Prog Mol Biol Transl*, 95, 1-8.
- Samaan S, Khella HWZ, Girgis A, Scorilas A, Lianidou E, Gabril M, Krylov SN, Jewett M, Bjarnason GA, El-said L, Yousef GM, 2015. miR-210 Is a Prognostic Marker in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Mol Diagn*, 17, 2, 136-44.
- Shenouda SK, Alahari SK, 2009. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metast Rev*, 28, 3-4, 369-78.
- Shin HR, Masuyer E, Ferlay J, Curado MP, IX ACC, 2010. Cancer in Asia - Incidence Rates Based on Data in Cancer Incidence in Five Continents IX (1998-2002). *Asian Pac J Cancer P*, 11, 11-5.
- Sierra A, Castellsague X, Escobedo A, Lloveras B, Garcia-Ramirez M, Moreno A, Fabra A, 2000. Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alterations: A pathway to metastatic progression in human breast cancer. *Int J Cancer*, 89, 2, 142-7.
- Stasinopoulos IA, Mironchik Y, Raman A, Wildes F, Winnard P, Raman V, 2005. HOXA5-Twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 280, 3, 2294-9.
- Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S, 2010. microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng*, 12, 1-27.
- Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V, Krause A, Leissner P, Puisieux A, 2004. Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell*, 6, 6, 625-30.
- Vesuna F, Winnard P, Raman V, Glackin C, 2006. Twist overexpression promotes chromosomal instability in the breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Genet Cytogen*, 167, 2, 189-91.
- Wang X, Chang XS, Zhuo GZ, Sun MJ, Yin K, 2013. Twist and miR-34a Are Involved in the Generation of Tumor-Educated Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Int J Mol Sci*, 14, 10, 20459-77.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR, 2008. Cadherin switching. *J Cell Sci*, 121, 6, 727-35.
- Yamakuchi M, Lowenstein CJ, 2009. MiR-34, SIRT1 and p53 The feedback loop. *Cell Cycle*, 8, 5, 712-5.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA, 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117, 7, 927-39.
- Yang JS, Lai EC, 2011. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell*, 43, 6, 892-903.
- Yu JS, Xie FR, Bao X, Chen WT, Xu Q, 2014. miR-300 inhibits epithelial to mesenchymal transition and metastasis by targeting Twist in human epithelial cancer. *Mol Cancer*, 13.
- Yu L, Todd NW, Xing LX, Xie Y, Zhang H, Liu ZQ, Fang HB, Zhang JA, Katz RL, Jiang F, 2010. Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *Int J Cancer*, 127, 12, 2870-8.
- Yu ZR, Baserga R, Chen LD, Wang CG, Lisanti MP, Pestell RG, 2010. microRNA, Cell Cycle, and Human Breast Cancer. *Am J Pathol*, 176, 3, 1058-64.
- Zhang HD, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W, 2002. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J*, 21, 21, 5875-85.

Zhang HY, Cai K, Wang J, Wang XY, Cheng K, Shi FF, Jiang LW, Zhang YX, Dou J, 2014. MiR-7, Inhibited Indirectly by LincRNA HOTAIR, Directly Inhibits SETDB1 and Reverses the EMT of Breast Cancer Stem Cells by Downregulating the STAT3 Pathway. *Stem Cells*, 32, 11, 2858-68.



7. EKLER



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2017/18

Toplantı Tarihi : 01.11.2017

Karar Sayısı 2017/307 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Bahadır ÖZTÜRK'ün "MCF-7 meme kanseri hücrelerinde TWIST 1 ekspresyonunun miRNA profili üzerindeki etkisinin araştırılması" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 18.10.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Doç.Dr.Bahadır ÖZTÜRK'ün "MCF-7 meme kanseri hücrelerinde TWIST 1 ekspresyonunun miRNA profili üzerindeki etkisinin araştırılması" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.



8. ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Fadime KARAMAN
Doğum Yeri : Afyonkarahisar
E-posta : fadimekaraman@gmail.com
Tel : +905415165001

Eğitim

Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D.

Katıldığı Bazı Kongreler, Sempozyum & Eğitimler

- Tıbbi Bilimlerde Lisansüstü Öğrencilere Yönelik Bilimsel Araştırma ve Proje Hazırlama Eğitimi (TÜBİTAK PROJE EĞİTİMİ)
- Kök Hücre Bölge Toplantıları-1
- Western blot (ProteinEkspresyon Çalışması)
- qRT-PCR (Gen Ekspresyon Çalışması)
- Tıbbi ve aromatik bitki Yetiştiriciliği