

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN MEME HÜCRELERİ MCF-7 VE MDA-MB-435'İN
MİKRORNA (miRNA) PROFİLLERİ**

ŞERİFE BUKET BOZKURT

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ali Ünlü

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13202042 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2016

ÖNSÖZ

Bir kayboluşun varoluşa dönüşme yolculuğuydu doktora eğitimi benim için. Hayatımın önemli mihenk taşlarından biri. Öyle kolay değildi dönüp geriye baktığım zaman ama iyiki bu yolu seçmişim diyeceğim kadar anlamlı, üstüne ekleneceklerle hem kendim hem de etkisini hissedecek insanlar için bir o kadar değerli bir süreç.

Bu zorlu yolculukta bilgisi, tecrübesi ve ileri görüşlülüğüyle doğru yol haritaları belirleyen, tez projemin planlanmasından sonuçlanana kadar olan süreçteki emeklerinden dolayı Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'dan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali Ünlü'ye sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez projemin sonuçlarının oluşturulması ve istatistiksel değerlendirmesindeki katkıları için Massachusetts Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Moleküler Farmakoloji Bölümü'nden Sayın Prof. Dr. Kahraman Tanrıverdi'ye, tez projemin sonuçlarının yorumlanması ve daha etkili veriler elde etmem konusunda bilgisi, tecrübesi ve desteğini esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'dan Sayın Doç. Dr. Bahadır Öztürk'e, elde ettiğimiz sonuçların biyoinformatik değerlendirme aşamasında vermiş olduğu bilimsel destek için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD'dan Sayın Yrd. Doç. Dr. Nadir Koçak'a, tez izleme komitemde yeralan bilgisi, anlayışı ve güler yüzü ile her zaman desteğini hissettiğim Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD'dan Sayın Prof. Dr. Hülagü Barışkaner'e, doktora eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesiyle bizlere örnek olan hiçbir zaman destek ve yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'dan Sayın Doç. Dr. Hüsamet Vatansev'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Akademik hayatta vermiş olduğu destekle heran gelişimime katkı sağlayan duruşuyla bizlere örnek olan Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji AD'dan Sayın Prof. Dr. Sema Hakkı'ya vefa içerisinde saygılarımı sunarım.

Deneylerin gerçekleşme sürecinde verdiği emek, sergilemiş olduğu arkadaşlık ve konukseverlik için Başak Sayın'a ve bu araştırmayı 13202042 nolu projeye destekleyerek gerekli maddi olanağı sağlayan Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Bana herkesten çok inanan ve bunu hissettiren bu işin görünmez kahramanları olan başta annem ve babam olmak üzere bütün aileme beni farklı kılan değerler kattıkları için saygı ve sevgiyle teşekkür ederim.

Şerife Buket BOZKURT

2016

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

v

ÖZET

vii

SUMMARY

viii

1. GİRİŞ

1

1.1. Meme Kanseri

1

1.2. mikroRNA

2

1.2.1. mikroRNA Biyogenezi

5

1.2.2. mikroRNA Terminoloji

8

1.3. mikroRNA ve Meme Kanseri

9

1.4. Meme Kanseri Patogeneğinde Etkin Tümör Baskılayıcı miRNA'lar

14

1.4.1. hsa-miR-206

14

1.4.2. hsa-miR-125

15

1.4.3. hsa-miR-200

16

1.4.4. let-7 Ailesi

16

1.5. Meme Kanseri Patogeneğinde Etkin OnkomiRNA'lar

17

1.5.1. hsa-mir-21

17

1.5.2. hsa-miR-155

17

1.5.3. hsa-miR-10

18

1.5.4. hsa-mir-17-92 Ailesi

18

1.6. Meme Kanseri ve Genel Tanı Parametreleri

18

2. GEREÇ VE YÖNTEM

21

2.1. Meme Kanseri Hücre Hatları

21

2.2. Hücre Kültürü Koşulları

21

2.3. Hücre Proliferasyon Deneyleri

22

2.3.1. MCF-7 Hücre Proliferasyon Deneyi

22

2.3.2. MDA-MB-435 Hücre Proliferasyon Deneyi

24

2.4. Hücre İnvazyon Deneyleri

24

2.4.1 xCELLigence Sistem ile Hücre İnvazyon Deneyleri

24

2.4.2. HTS Transwell-96 Permeable Support Systems and Plates ile Hücre İnvazyon Deneyleri

26

2.5. miRNA Analizleri

27

2.5.1. miRNA İçeren Total RNA İzolasyonu

27

2.5.2. miRNA İçeren Total RNA Miktar ve Kalite Analizi	29
2.5.3. Complementary DNA (cDNA) Sentezi	29
2.5.4. cDNA örneklerinin Preamplifikasyon Basamağı	30
2.5.5. Yüksek Kapasiteli Real-time PCR Deneyleri	31
2.6. İstatistiksel Yöntemler	40
3. BULGULAR	41
3.1. Hücrelerin Mikroskop Görüntüleri	41
3.2. miRNA İçeren Total RNA Miktar ve Analizi Sonucu	41
3.3. Proliferasyon Deney Sonuçları	42
3.4. İnvazyon Deney Sonuçları	45
3.4.1. HTS Transwell-96 Permeable Support Systems and Plates ile hücre invazyon deney sonuçları	45
3.4.2. xCelligence Sistem ile Hücre İnvazyon Deney Sonuçları	47
3.5. Meme Kanseri Hücrelerinde Yüksek Kapasiteli Real-time PCR Deney Sonuçları	50
3.5.1. MCF-7 Hücrelerinin miRNA Ekspresyon Profilleri	50
3.5.2. MDA-MB-435 Hücrelerinin miRNA Profili	53
3.5.3. MDA-MB-435 ve MCF-7 Hücrelerinin Karşılaştırmalı miRNA Profilleri	55
3.5.4. Karşılaştırmalarda Sürekli Artış Azalış Gösteren miRNAlar	66
3.6. MCF-7 ve MDA-MB-435 Hücrelerinin miRNAlarının Yolak Analizi	68
3.6.1. MCF-7 Hücrelerinin miRNAlarının Yolak Analizi	68
3.6.2. MCF-7’de Sürekli Ekspresyon Gösteren miRNAların Etkin Olduğu Yolaklar	70
3.6.3. MDA-MB-435 Hücrelerinin miRNAlarının Yolak Analizi	71
3.6.4. MDA-MB-435’de Sürekli Ekspresyon Gösteren miRNAların Etkin Olduğu Yolaklar	73
3.6.5. MDA-MB-435 ve MCF-7 Hücrelerinin Karşılaştırmalı miRNAlarının Yolak Analizi	73
3.6.6. MDA-MB-435 Hücrelerinin MCF-7 Hücrelerine Göre Sürekli Ekspresyon Gösteren miRNAların Etkin Olduğu Yolaklar	74
4. TARTIŞMA	75
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	97
6. KAYNAKLAR	101
7. EKLER	113
EK-A Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Kararı	113
8. ÖZGEÇMİŞ	114

SİMGELER VE KISALTMALAR

PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase

miRNA: mikroRNA

mRNA: mesajcı RNA

rRNA: ribozomal RNA

tRNA: transfer RNA

siRNA: small interfering RNA

piRNA: Piwi interacting RNA

***C. elegans*:** *Caenorhabditis elegans*

pri-miRNA: primer transkript

pre-miRNA: precursor miRNA

kDa: kilodalton

dsRNA: double-stranded RNA

RISC: RNA-induced silencing complex

Ago2: argonaute protein 2

ORF: open reading frame

hsa: homo sapiens

mmu: mus musculus

onkomir: onkogen miRNA

ER: östrojen reseptör

PR: progesteron reseptör

HER2/ErbB2: human epidermal growth factor receptor 2

Akt: serine/threonine specific protein kinase

NF-κB: Nuclear Factor kappa B

pTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten

TPM1: Tropomyosin1

ESR1: Östrojen reseptör geni olan ERα

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz

EMD: Epitel-mezenşim dönüşümü

ZFH: Zinc Finger Protein

TGF- β : Transforming growth factor- β
IMP-1: RNA Binding Protein
RKIP: Raf kinase inhibitory protein
MAPK: Mitogen-activated protein kinases
PDCD4: programmed cell death-4
PTEN: phosphatase and tensin homolog
RT-PCR: Real-time polymerase chain reaction
FBS: Fetal Bovine Serum
DMEM: Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium
DMEM-F12: Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium F 12
RTCA: Real-time cell analyzer
CI: Cell Index
cDNA: Complementary DNA
PBS: Phosphate Buffer Saline
ANOVA: Tek yönlü varyans analizi
*****: $p < 0.05$
*******: $p < 0.001$
%: Yüzde
C°: Santigrat Derece
 μ : Mikron
ml: Mililitre

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN MEME HÜCRELERİ MCF-7 VE MDA-MB-435'İN MİKORNA (miRNA) PROFİLLERİ

ŞERİFE BUKET BOZKURT
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA-2016

Meme kanseri, moleküler profil, biyolojik davranış ve klinik sonuçlar açısından farklı alttiplere sahiptir. Meme kanserinde miRNAların aşırı ekspresyonu onkogenezis, tümör supresör ve metastatik sürece dahil olabilmektedir. Bu çalışmada östrojen reseptör (ER) (+) minimal invaziv MCF-7 ve ER (-) invaziv MDA-MB-435 hücrelerinin miRNA profilleri karşılaştırmalı olarak analiz edildi.

İnsan meme kanseri hücre hatlarının kuantitative 84 adet miRNA ekspresyonları Fluidigm Microfluidic Dynamic Array ile incelendi. Meme kanseri hücrelerinden miRNA içeren total RNAlar 2, 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde elde edildi. cDNA ürünleri Fluidigm 96.96 Dynamic Array'e yüklendi.

Araştırma sonucunda farklı sayıda miRNA'nın farklı zamanlarda artış ve azalışları tespit edildi. Buna göre MDA-MB-435 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre, 4. saatte 45 miRNA artış 7 miRNA azalış, 6. saatte 39 miRNA artış 9 miRNA azalış, 12. saatte 30 miRNA artış 9 miRNA azalış, 24. saatte 31 miRNA artış 13 miRNA azalış, 48. Saatte 38 miRNA artış 10 miRNA azalış gösterdiği belirlendi.

Etkin olan miRNA'ların hedef genlerinin Wnt signaling ,PI3K-Akt signaling , mTOR signaling, MAPK signaling , p53 signaling pathways yollarında olabileceği düşünüldü. Elde edilen bu karşılaştırmalı sonuçlar farklı miRNA ekspresyonlarının meme kanseri biyopatolojik özellikleriyle ilgili olabileceğini ve bundan sonraki çalışmalar için temel oluşturabileceği düşünüldü.

Anahtar Sözcükler: miRNA, Fluidigm, MCF-7, MDA-MB-435.

SUMMARY

**REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE**

MICRORNA (miRNA) PROFILING of HUMAN BREAST MCF-7 and MDA-MB-435 CELLS

**ŞERİFE BUKET BOZKURT
Department of Medical Biochemistry**

PhD THESIS/KONYA-2016

Breast cancer consists of several different subtypes with different molecular profiles, biological behavior and clinical outcome. miRNA aberrant expression may be involved in oncogenesis, tumor suppression, metastatic process in breast cancer . The present study aimed to compare miRNA profile of oestrogen receptor + (ER+) minimal invasive MCF-7 (ER+) to (ER-) invasive MDA-MB-435 cells.

The quantitative 84 miRNA expressions of MCF-7 and MDA-MB-435 cell lines were investigated by Fluidigm Microfluidic Dynamic Array. Total RNAs including miRNAs were obtained from breast cancer cells at 2nd, 4th, 6th, 12th, 24th and 48th hours. We loaded the resulting cDNA product into the Fluidigm 96.96 Dynamic Array.

Our results demonstrated that different number of miRNA's were either up or down regulated in different time period. miRNA ekspressions were detected 45 miRNAs up versus 7 miRNAs down regulation at 4th hour; 39 miRNAs up versus 9 miRNAs down regulation at 6th hour; 30 miRNAs up versus 9 miRNAs down regulation at 12 th hour; 31 miRNAs up versus 13 miRNAs down regulation at 24 th hour, 38 miRNAs up versus 10 miRNAs down regulation at 48th hour in MDA-MB-435 versus MCF-7.

Effected miRNAs target genes were related with pathways such as Wnt signaling, PI3K-Akt signaling, mTOR signaling, MAPK signaling, p53 signaling pathways at 4th hour. The results of all these analyses provide a comprehensive view of the function of differential expression miRNAs related to breast cancer biopathologic features and can be base for the further studies.

Key Words: miRNA, Fluidigm, MCF-7, MDA-MB-435.

1. GİRİŞ

1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, gerek hastalığın erken teşhisini sağlayan bilimsel gelişmeler gerekse izlenen tedavilerdeki başarı oranlarına rağmen halen ülkemizdeki ve dünyadaki kadınlar arasında önde gelen kanser ilintili mortalite nedenleri arasında yer almaktadır (Zhang ve ark 2014).

Bu neoplazmanın etiyolojisinde hem genetik hem de çevresel faktörlerin etkin olduğu kompleks bir oluşum söz konusudur (Zhang ve ark 2014). Öyleki meme dokusu, glandular doku ve bu doku içerisindeki kanal ve loblar arasında yeralan stromal dokulardan oluşmaktadır (Zhang ve ark 2014).

Meme kanserini diğer kanser türlerinden ayıran özelliklere baktığımız zaman sahip olduğu farklı hücre tipleri ve bunların özellikleri, glandular ve myoepitel hücrelerin proliferasyon yetenekleri arasındaki değişkenlikler, hastalara uygulanan terapötik tedavi ve hastaların bu tedavilere verdiği farklı sonuçlar yeralmaktadır (Zhang ve ark 2014).

Meme kanseri hastaları, benzer diagnostik ve prognostik profil sergilemelerine rağmen farklı tedavi planlarına ve sonuçlarına sahiptirler (Zhang ve ark 2014). Bu hastalığın taksonomisi yapılırken sadece kanserin morfolojisi değil aynı zamanda moleküler sınıflandırması da gözönüne alınmış ve böylece daha etkili tedavi ve prognoz planı yapmaya imkan sağlanmıştır (Zhang ve ark 2014).

Meme kanseri moleküler subtiplerinin taksonomisi yapılırken o subtipte özgü gen ekspresyonları baz alındı. Bu sınıflandırmaya göre meme kanseri subtiplerinin belirlenmesinde aşağıdaki başlıklar etkili olmaktadır (Zhang ve ark 2014).

1. Luminal hücre ilintili biyobelirteçler, sitokeratinler;
2. Hormon reseptörleri, östrojen, progesteron ve androjen ;
3. Büyüme faktör reseptörleri, insan epidermal büyüme faktör reseptörleri;
4. Anti-apoptoz biyobelirteçler, Bcl-2 ve p53;

5. Hücre proliferasyon indikatörleri, Ki-67 ve *survivin*;
6. Hücre invazyon ilintili faktörler, matriks metalloproteinazlar ve integrinler;
7. Sinyal transdüksiyon yolak üyeleri, PI3K/AKT yolak üyeleri, *phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)* ve *AKT*;
8. Hücre döngüsü kontrol üyeleri, siklinler ve siklin bağımlı kinazlar;
9. Epitel-mezenşim dönüşümü indikatör ve düzenleyici faktörler, *cadherin* ve *zinc-finger transcription factors* Snail, Slug, Zeb1 ve Twist;
10. Metastatik kontrol faktörleri (Liu 2012, Zhang ve ark 2014).

Meme kanserini de içerisinde bulunduran kanser yelpazesinin herbir üyesinin patofizyolojisi beş önemli basamaktan oluşmaktadır. Bunlar başlangıç, oluşum, malignant forma dönüşüm, invazyon ve metastaz basamaklarıdır (Zhang ve ark 2007). Bu merdivenin ilk basamaklarında tanı konabilen kanser türlerinde hastalığın kontrol altına alınabilmesi ve tedavi olanakları söz konusu olmaktadır. Bu amaç doğrultusunda belirlenen yol haritalarında kanser oluşumunda ana karakterler olan onkogen ve tümör baskılayıcı genler arasındaki dengenin hangi karakter yönünde değişeceği hastalığın kaderini belirlemektedir. Ve bugün artık daha net olarak anlaşılmıştır ki bu iki ana karakter arasında dengenin hangi yöne doğru değişeceğinde etkili olan, aralarında mikroRNA (miRNA)'ların da olduğu çok önemli düzenleyiciler bulunmaktadır.

1.2. mikroRNA

mikroRNA'lar, protein kodlamayan fakat gen ifadesini düzenleyen, tek zincirli, yaklaşık 20-23 nükleotide sahip, endojen, küçük RNA molekülleridir (Petersen ve ark 2006, Anindo ve Yaqinuddin 2012, D'Ippolito ve Iorio 2013, Gorur ve ark 2013, Taylor ve ark 2013, Di Leva ve ark 2014, Kavitha ve ark 2014). Hedef mRNA sekanslarına bağlanarak gen ifadesini transkripsiyonel veya posttranskripsiyonel seviyede düzenlerler (Chen ve ark 2012, Kourea ve ark 2014).

İnsan genomunda yer alan DNA'nın büyük bir bölümü RNA kodlamasına rağmen bu RNA'nın oldukça az bir kısmı fonksiyonel proteinlere dönüşmektedir (Akkaya ve Dinçer 2013). Bu bilgi uzun yıllar boyunca genomun translasyona uğramayan kısmının işlevsiz gibi yorumlanmasına sebep oldu. Fakat yakın geçmişte keşfedilmiş olan küçük RNA molekülleri sayesinde genomun protein kodlamayan kısmının da fonksiyonel önemi olduğu açığa çıkarıldı (Saydam ve ark 2011). Böylece çok hücreli organizmalarda, genin transkripsiyonundan protein translasyonuna uzanan kusursuz süreçte sadece mesajcı RNA (mRNA), ribozomal RNA (rRNA) ve transfer RNA (tRNA) değil aynı zamanda kodlanmayan küçük düzenleyici RNAların da bulunduğu belirlendi. Bu tanımlama içerisinde yer alan *small interfering RNA* (siRNA), miRNA ve *Piwi interacting RNA* (piRNA) en çok bilinen kodlanmayan küçük RNA sınıflarını oluşturmaktadırlar (Großhans ve Filipowicz 2008, Patil ve ark 2014). siRNA ve miRNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, piRNA'lar ise gametogenezde görev alırlar (Du ve Zamore 2005, Chu ve Rana 2007, Rana 2007, Seydel ve Aksoy 2009). Bu sınıf içerisinde yer alan her 3 gruptaki kodlanmayan küçük RNA, hedef mRNA sekanslarına bağlanarak genellikle gen ifadesini baskılamaktadırlar (Finnegan ve Pasquinelli 2013).

Son yıllarda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla önemini her geçen gün artıran miRNA'lar ilk olarak 1993 yılında keşfedilmiş olup 'mikroRNA' terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (Iorio ve Croce 2012). İlk miRNA'nın keşfi, yuvarlak toprak solucanı *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)'ın larval gelişim sürecinde etkin olan 'lin-4' geninin bulunmasıyla oldu (Du ve Zamore 2005, Finnegan ve Pasquinelli 2013, Patil ve ark 2014). Araştırmacılar 'lin-4' geninin *C. elegans*'ın embriyonik gelişim sürecinde 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini fakat herhangi bir protein kodlamadığını tespit ettiler.

Devam eden araştırmalarla 2000 yılında aynı canlıda yine 22 nükleotid uzunluğunda 'let-7' ismini verdikleri farklı bir miRNA keşfedildi (Finnegan ve Pasquinelli 2013, Patil ve ark 2014). let-7'nin, *C. elegans*'da keşfinden kısa bir süre sonra aynı miRNA insanlarda, *Drosophila melanogaster* ve çeşitli bilateral hayvanlarda da tanımlandı (Winter ve Diederichs 2011). Takip eden yıllarda birçok

küçük RNA molekülü neredeyse bütün çok hücreli organizmalarda keşfedildi (Seydel ve Aksoy 2009, Iorio ve ark 2011, Saydam ve ark 2011).

miRNA'ların çoğu protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde bulunmakla birlikte genler arası bölgelerde veya eksonlarda da bulunabilirler (Finnegan ve Pasquinelli 2013, Patil ve ark 2014). Özellikle miRNA genlerinin büyük bir kısmının DNA üzerinde heterozigozitinin kaybolduğu bölgeler olan kırılgen kısımlar veya kanser ile ilgili gen bölgelerinde yer alması bu küçük düzenleyicilerin neoplazi patogeneğinde önemli rolleri olduğuna işaret etmektedir (Tong ve Nemunaitis 2008).

Yapılan araştırma sonuçları ile miRNA'ların gelişim, hücre döngüsü düzenlenmesi, farklılaşma, proliferasyon (çoğalma), apoptoz (hücre ölümü), sinyal yolları gibi birçok hücresel temel işlevin düzenlenmesinde etkili oldukları ve bununla birlikte hücrede miRNA seviyelerinin normal koşulların dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile ilintili olduğu gösterildi (Nilsen 2007, Brown ve ark 2008, Baffa ve ark 2009, Cheng ve ark 2009, Cho 2010, Satoh ve Tabunoki 2011, Iorio ve Croce 2012). Böylece bu küçük moleküllerin birçok biyolojik ve patolojik süreçte etkin rol aldığı belirlendi. miRNA'lar ve onların hedef mRNA'ları oldukça kompleks bir yapı içerisinde yer almaktadır (Voorhoeve 2010). Öyleki tek bir miRNA birçok farklı mRNA'ya bağlanarak hedef mRNA'ların gen ifadesini düzenleyebilirken, çeşitli farklı miRNA'lar da tek bir mRNA'nın gen ifadesinde etkin rol alabilmektedirler (Lee ve ark 2004).

Fonksiyonel çalışma sonuçları miRNA'ların, hedef genlerine göre tümör baskılayıcı veya onkomir olarak görev aldıklarını gösterdi (Zhang ve ark 2007, Baffa ve ark 2009, Babashah ve Soleimani 2011). Literatürde yer alan kanser patogeneindeki miRNA profil çalışmaları, bu konuda çalışan araştırmacılara daha ayrıntılı bilgiler sunmaktadır (Cummins ve Velculescu 2006, Garzon ve ark 2006, Cho 2010, Frampton ve ark 2012, Harquail ve ark 2012, Ahmada ve ark 2013, Kavitha ve ark 2014).

1.2.1. mikroRNA Biyogenezi

miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotidlik (Gregory ve Shiekhattar 2005) küçük boyutlarına rağmen üstlendikleri kritik görevler sayesinde hücre içerisindeki eşsiz RNA molekülleridir (Kavitha ve ark 2014). Posttranskripsiyonel seviyede düzenleyici olan bu moleküller, hücre çekirdeğinde başlayıp sitoplazmada tamamlanan ardışık bir seri basamak sonucunda sentezlenirler (Hwang ve Mendell 2006).

miRNAlar, genlerinin bulunduğu aranjmana göre 2 sınıfa ayrılırlar:(Wang ve Yang 2010)

1. İntergenik miRNAlar: miRNA kodlayan genler, protein kodlayan genlerin içerisinde yer alır,
2. İntragenik miRNAlar: miRNA kodlayan genler, protein kodlayan genlerin arasında yer alır. Bu grup kendi içerisinde 4 alt sınıfa ayrılır:
 - a. İntronik miRNAlar: miRNA kodlayan genler, konak protein kodlayan genlerin intron bölgelerinde bulunur.
 - b. Eksonik miRNAlar: miRNA kodlayan genler, konak protein kodlayan genlerin ekson bölgelerinde bulunur.
 - c. 3' UTR miRNAlar: miRNA kodlayan genler, konak protein kodlayan genlerin 3' UTR bölgelerinde bulunur.
 - d. 5' UTR miRNAlar: miRNA kodlayan genler, konak protein kodlayan genlerin 5' UTR bölgelerinde bulunur (Wang ve Yang 2010).

İnsan miRNA'larının çoğunluğu intergenik ve intronik miRNA'lardan oluşmaktadır (Wang ve Yang 2010). Sonuçta insan miRNA'ları ya kendilerine ait bir gen yapısı ve promotör tarafından uzun bir primer transkript (pri-miRNA) olarak 1kilobaz (kb)'dan daha büyük diziler halinde transkribe olurlar ya da konak olarak bulundukları mRNA intron bölgelerinden köken alıp o mRNA'nın promotörü tarafından sentez edilirler (Vaziri ve Rezaeieh 2012, Patil ve ark 2014).

Pri-miRNA olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenirler (Chu ve Rana 2007, Du ve Zamore 2007). Pri-miRNA, 500-3000 baz uzunluğunda 5' ucunda 'cap' ve 3' ucunda 'poli Adenin (A)' kuyruğuna sahip sap-

ilmik yapısındadır (Du ve Zamore 2007, Küçükhüseyin ve Öztürk 2013). Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha [çift zincirli RNA bağlama proteini olan DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8 (DGCR8-DiGeorge syndrome critical region gene 8)] tarafından her iki iplikli kesilerek yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda sap ilmik formundaki *precursor* miRNA (pre-miRNA)'ya dönüştürülür (Aigner 2011, Küçükhüseyin ve Öztürk 2013).

Nükleusta yeralan Drosha enzimi 160 kilodalton (kDa) ağırlığında bir endonükleaz olup, *double-stranded* RNA (dsRNA) bağlayıcı domain ve amino terminal domain olmak üzere iki domain içerir (Farazi ve ark 2011). Drosha endonükleazı ile çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha'nın oluşturduğu komplekse mikroişlemci kompleks adı verilir (Macias ve ark 2013).

Pre-miRNA molekülü bir nüklear taşıma reseptörü olan *exportin* 5 ve nüklear bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır (Bartel 2004). Sonrasında, pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ve bir çift zincir RNA bağlama proteini olan HIV-1 [transaktive edici cevap oluşturan RNA bağlanma proteini (TRBP-*transactivating response RNA binding protein*)] tarafından sap-ilmik formunun bittiği bölgelerden kesilerek 22 nükleotidlik matur miRNA ve yolcu miRNA'nın bulunduğu çift iplikli bir yapı haline dönüşür (O'Day ve Ashish 2010, Kavitha ve ark 2014).

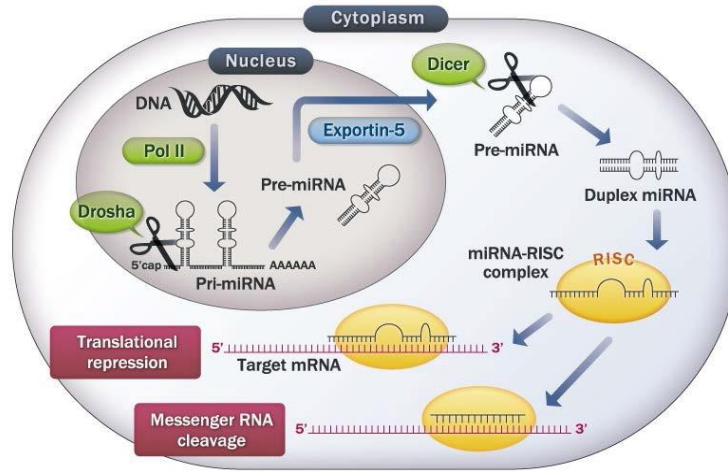
Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (*RNA-induced silencing complex*; RISC) oluşumunu başlatır (Zeng 2006). Matur miRNA, *argounate protein* 2 (Ago2) (RNaz) tarafından 5' ucu daha kararlı olan seçilip (kılavuz iplik olarak adlandırılıp) RISC kompleks içerisine dahil edilir (Görür ve Tamer 2011). Diğer iplik, yolcu iplik olarak adlandırılır ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir (Hwang ve Mendell 2006). Böylece RISC kompleks içerisinde Ago2, matur miRNA ve diğer proteinler yer alır.

miRNA'lar hedef mRNA'ları ile her canlı türünde yüksek oranda korunmuş 'tohum sekans' adı verilen 5' ucundaki 6-8 nükleotidlik bir bölge aracılığıyla etkileşir (Castilla-Llorente ve ark 2013). Matur miRNA, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, tohum sekans adı verilen 5' ucundaki bölgesiyle hedef

mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgesine (*untranslated region*, UTR) bağlanır (Du ve Zamore 2005, Thomson ve ark 2006, Seydel ve Aksoy 2009, Iorio ve ark 2011, Saydam ve ark 2011, Ebert ve Sharp 2012, Kavitha ve ark 2014).

Hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3' bölgesi ile miRNA'nın tohum dizisi (5' uç) arasındaki eşlenikliğin seviyesi miRNA'nın hedefini hangi seviyede ve nasıl baskılayacağını belirler (Hwang ve Mendell 2006, Harquail ve ark 2012). Öyleki miRNA kompleksinin hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanması kusurlu, tam olmayan, eksik bir komplementerlik ise protein oluşumu baskılanmaktadır (Harquail ve ark 2012). Bu durumda hedef genin mRNA seviyesi artarken, protein seviyesinin stabil kalması baskılamanın posttranskripsiyonel seviyede olduğunu gösterir (Gregory ve Shiekhattar 2005). Diğer bir durumda hedef bölge içerisine bağlanma kusursuz ise, tam komplementerliği gösterir ve RISC tarafından hedef mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır (Castañeda ve ark 2011). Ayrıca bu durumda hedef mRNA'nın 5' *cap* ve poli A yapılarının yok edilip mRNA yıkılımı tetiklenmektedir (Sayed ve Abdellatif 2011). Böylece kararlılığı azalan mRNA hücre içi enzimler tarafından parçalanır. Her iki durumda da sonuç protein ekspresyonunun azalmasıdır (Şekil 1.1.) (Pillai ve ark 2007, Chen ve ark 2012, Kavitha ve ark 2014).

miRNA'ların hedef mRNA üzerine bağlanma bölgeleri genellikle 3' UTR olmakla beraber 5' UTR bölgesi ve *open reading frame (ORF)* bölgesini hedef almaları da söz konusudur (He ve Hannon 2004). Ayrıca, mikroRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla mikroRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir (Tong ve Nemunaitis 2008, Tunali ve Tiryakioğlu 2010, Saydam ve ark 2011, Anindo ve Yaqinuddin 2012, Graves ve Zeng 2012, Yang ve ark 2012).



Şekil 1.1. mikroRNA Biyogenezi.

1.2.2. mikroRNA Terminoloji

miRNA terminolojisi oluşturulurken uluslararası olarak kabul edilen standart kurallar kullanıldı. MikroRNA'lar tipik olarak 'miR' öneki alırken, organizma orijini tanımlanırken insan için 'hsa' (*homo sapiens*) ve fare için 'mmu' (*mus musculus*) önekleri kullanıldı. Sadece let-7 ailesi üyeleri hem insan hem de fare genomunda bu kurala aykırı olarak isimlendirildi.

Mature sekanslarda sondaki 'R' harfi büyük 'miR', *precursor* hairpinler de ise sondaki 'R' harfi küçük 'mir' olarak isimlendirildi. Farklı canlı türlerinde bulunan fakat benzer işlevli protein sentezine sahip ortolog genler insanda 'hsa-miR-101' ve farede 'mmu-miR-101' olarak belirlendi.

Aynı canlıda farklı yapı ve işlevi olan proteinleri kodlayan paralog gen isimlendirmesinde mature mirnanın sonuna gelen son ekler hsa-miR-10a ve hsa-miR-10b gibi kullanıldı. Farklı hairpin lokasyonları da benzer miRNA'lar olmasına sebep olmaktadır. Bu durum isimlendirmede sayısal son eklerle 'hsa-miR-281-1' ve 'hsa-miR-281-2' gibi gösterildi (Ambros 2003, Griffiths-Jones ve ark 2006, Griffiths-Jones ve ark 2008, Mirnezami ve ark 2009).

1.3. mikroRNA ve Meme Kanseri

Kanser, çeşitli genetik mutasyonlar, aşırı gen ekspresyonları ve miRNA bozukluklarından kaynaklanabilen, hücrelerin anormal çoğalması ve kaybettikleri apoptoz fonksiyonları ile karakterize malign bir hastalıktır (Budd ve ark 2012).

Meme kanseri, dünyadaki kadınlar arasında en çok görülen bir kanser türüdür (Chang ve ark 2012). Tanı ve tedavide yeni gelişmelerin artmasına rağmen hala önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (Sevimli 2013, Zhang ve ark 2014).

Bu neoplazi etiyojisinde hem genetik hem de çevresel faktörleri bulunduran kompleks bir heterojeniteye sahiptir (Ahmad 2013). Normal hücrelerde miRNAlar hücresel büyüme, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi biyolojik işlevlerin düzenlenmesinde görev alırlar. miRNAların hücre döngüsü ilerlemesini engellemesi ve hücre bölünmesinde farklılaşma meydana getirmesi kanserin oluşumu ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (O'Day ve Ashish 2010).

miRNAların *C. elegans* da ilk keşifleriyle birlikte bu küçük düzenleyicilerin, hücresel proliferasyon ve apoptoz da etkin rol aldıkları belirlendi (O'Day ve Ashish 2010, Serpico ve ark 2014). miRNAlarla ilgili başlangıç çalışmalarının yerini daha global sonuçların almasıyla birlikte miRNA'lardan kaynaklanan düzensizliklerin aralarında kanserin de bulunduğu proliferatif hastalıklarla ilintili olduğu gösterildi (Sassen ve ark 2008, O'Day ve Ashish 2010). Ayrıca bazı miRNAların sıklıkla kanserle ilgili genomik lokasyonlarda bulunup amplifiye veya delesyona uğraması miRNAların kanserle olan bağlarını güçlendirdi (O'Day ve Ashish 2010, Farazi ve ark 2011).

İnsan kanser patogenezinin katılan miRNA ifadesindeki düzensizlikler arasında, kromozomal anomaliler (Calin ve ark 2002, Zhang ve ark 2006), DNA kopya sayısının amplifikasyonu veya delesyonu (Calin ve Croce 2006), genetik mutasyonlar, polimorfizm, epigenetik mekanizmalar (Lujambio ve ark 2008) ve miRNA biyogenez yolakındaki önemli düzenleyicilerin eksiklikleri bulunmaktadır (Cho 2010, Iorio ve Croce 2012).

Böylece araştırmacılar, miRNA'ların kanser gelişiminde etkili olabilecek 3 özelliği üzerinde yoğunlaştılar. Bunlardan ilkinde miRNA'ların hücre proliferasyon ve apoptozisini düzenlediği ve bu basamaklardaki herhangi bir aksamının aşırı hücre proliferasyonu ile karakterize kansere neden olabileceği belirlendi. İkinci özellik olarak da miRNA genlerinin çoğunluğunun insan kanserle ilişkili genlerin daha çok kırılgan bölgelerinde olduğu tespit edildi (Calin ve ark 2004, Lowery ve ark 2008, Castañeda ve ark 2011, Tang ve ark 2012). Hem genetik hem de epigenetik seviyedeki miRNA düzensizlikleri ya tek nükleotid polimorfizmi ile miRNA sekansı içerisinde ya da kendi sekansının hedef mRNA'ya bağlandığı bölgedeki aşırı DNA metilasyonu veya histon modifikasyonu ile olduğu belirlendi (Mulrane ve ark 2013). miRNA'ların kanserle olan bağlantısını destekleyen üçüncü nitelik olarak da tümör hücrelerinde miRNA ekspresyonlarının sağlıklı hücrelere oranla bozulmuş olduğu gösterildi (Lee ve Dutta 2009).

Buradaki ikinci nitelikten yola çıkarak miRNA'ların sıklıkla kromozomal bölgelerin kırılgan lokasyonlarında yer almalarının kalıcı miRNA ekspresyonları sonucunu oluşturduğu ve bu durum da miRNA'ların, neoplazi patogeneğinde önemli rolleri olduğunu düşündürdü (Mirnezami ve ark 2009, Chen ve ark 2012, Kourea ve ark 2014).

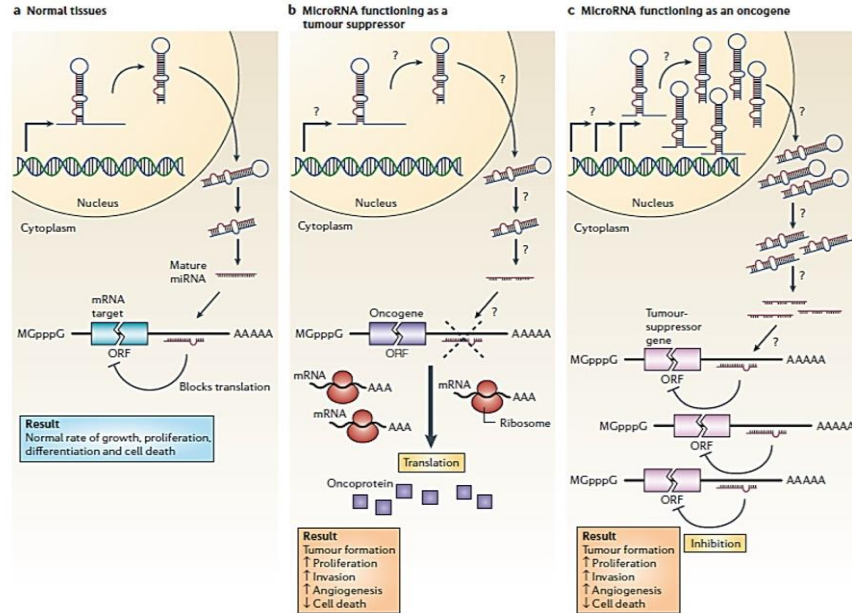
Birçok çalışmada miRNA'ların farklı kanser türlerine özgü hücrelerde ifade seviyelerindeki farklılıklar gösterildi. İlk çalışmalarda normal ve patolojik dokular arasındaki ekspresyon farklılıkları tespit edilerek kanser çeşidine uygun yol haritaları belirlendi (Tang ve ark 2012, Palanichamy ve Rao 2014).

miRNA'lar sahip oldukları 'tohum sekans' adı verilen 5' bölgelerindeki sekansları ile hedef mRNA'nın 3' bölgesindeki translasyona uğramayan bölgesine eşleniklik sağlayarak ya translasyonun baskılanmasına ya da hedef mRNA'nın yıkımına sebep olurlar (Sayed ve Abdellatif 2011). İnsan neoplazilerinde tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin ifadelerinin miRNA'lar tarafından kontrol edilmesiyle, miRNA'ların görev tanımlarına 'tümör baskılayıcı miRNA' ve 'onkogen miRNA (onkomir)' sıfatları eklendi (Hammond 2006, Cho 2007). Böylece miRNA'nın hedef geni bir onkogen ise miRNA, bu onkogene sekans eşlenikliği doğrultusunda bağlanarak onkogenin ifadesini baskılayıp 'tümör

baskılayıcı miRNA' ismini alırken; hedef geni tümör baskılayıcı bir gen olan miRNA, aynı şekilde bu gene bağlanıp genin ifadesini azaltarak 'onkomir' ismini almaktadır (Hwang ve Mendell 2006, Ahmad 2013).

Neoplazilerde onkomirlerin aşırı ekspresyonu sonucunda tümör baskılayıcı genlerin ve apoptozu kontrol eden genlerin baskılanması sonucunda kontrolsüz ve sınırsız hücre bölünmesi, anjiyogenezin uyarılması, invazyon ve metastaz gibi kanserin belirgin hücresel yollarının aktiflenmesine yol açmaktadır (Hanahan ve Weinberg , Yu ve ark 2007, Mirnezami ve ark 2009, Seydel ve Aksoy 2009).

Normal dokuda uygun miRNA transkripsiyonu, işlenmesi ve hedef mRNA'ya sekans eşlenikliğine göre bağlanması sonucunda ya protein translasyonunu bloklamakta ya da mRNA stabilizasyonunu değiştirebilmektedir. Böylece normal oranda hücresel büyüme, proliferasyon, farklılaşma ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (Şekil 1.2.) (a). Tümör baskılayıcı miRNA'nın azalması veya delesyonu sonucunda tümör hücresinde artan proliferasyon, invazyon, anjiyogenez ve azalan apoptozla birlikte gelişen tümör yapısı karşımıza çıkmaktadır (Şekil 1.2.) (b). Onkogenik rolü olan miRNAların amplifikasyon veya aşırı ekspresyonlarıyla da tümör yapısı gelişebilmektedir (Şekil 1.2.) (c).



Şekil 1.2. miRNAların hedef genlerine göre fonksiyonları (Esquela-Kerscher ve Slack 2006).

Yapılan araştırmalarda normal ve neoplastik meme dokusu arasında östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PR) ekspresyonu, tümör aşaması, vasküler invazyon ve proliferasyon indeksi gibi spesifik meme kanseri biyopatolojik özellikleriyle ilgili miRNA ekspresyon profillerinin değışkenlik gösterdiği belirlendi (Wang ve Wu 2007, Tang ve ark 2012).

Bu değışkenlikler sonucunda aktiflenen hücresel yolakların *human epidermal growth factor receptor 2* (ErbB2), *serine/threonine specific protein kinase* (Akt), *Nuclear Factor kappa B* (NF-κB), Myc, Ras, pTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*), p53, ve Rb gibi onkoproteinlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ifade düzeylerini etkilediği ortaya konuldu (Wang ve Wu 2007, Baffa ve ark 2009, Harquail ve ark 2012).

miRNA'lar pro-proliferatif ve anti-apoptotik aktiviteleriyle onkogenezi destekleyerek kanser hücrelerinde aşırı eksprese olurlar (Hwang ve Mendell 2006, Kent ve Mendell 2006). Aynı şekilde miRNA'lar anti-proliferatif ve pro-apoptotik aktiviteleriyle tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarını etkileyip kanser hücrelerinde daha az eksprese olmalarına neden olurlar (Hwang ve Mendell 2006, Kent ve Mendell 2006).

Elde edilen literatür bilgilerine göre normal ve neoplastik meme dokusu arasında büyük farklılık görölmekle birlikte özellikle neoplastik meme dokusunda hsa-miR-125b, hsa-miR-145'in azalan, hsa-miR-155 ve hsa-miR-21'in ise artan ifadeleri belirlendi (Cho 2007, Sayed ve Abdellatif 2011).

Meme kanseri ile ilintili miRNA'lar ve onların hedef yolaklarına baktığımız zaman, hsa-miR-21, meme kanserinde aşırı eksprese olarak kanser hücre yaşam sürecinin düzenlemek yoluyla hücrenin apoptotik kaspaz aktivitesini inhibe etmektedir (Chan ve ark 2005, Iorio ve ark 2005, Volinia ve ark 2006, Si ve ark 2007, Wang ve Wu 2007).

Hücre içerisinde mikofilament bağlayıp sitoskeleton regülasyonu ile anti-onkogenik fonksiyon gösteren *Tropomyosin1* (TPM1) ise potansiyel olarak hsa-

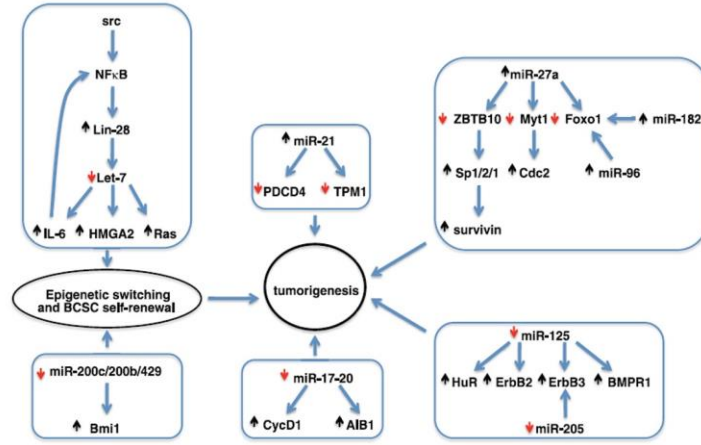
miR-21'in hedef genleri arasında yer almaktadır (Mahadev 2002, Wang ve Wu 2007, Zhu ve ark 2007, Sayed ve Abdellatif 2011).

Benzer şekilde diğ er bir tümör baskılayıcı gen olan *PTEN*, hsa-miR-19a ve hsa-miR-21 arasında etkileşimde bulunmaktadır (Wang ve Wu 2007). Öyleki tümör baskılayıcı *PTEN*'nin fonksiyonunun kaybı kontrolsüz hücre çoğalması ile sonuçlanırken; hsa-miR-21'in aşırı ekspresyonu tümör baskılayıcı *TPM1*'in azalan ekspresyonuna ve kanser hücrelerinde ilerleyen migrasyon ve invazyona sebep olmaktadır (Maehama 2007, Wang ve Wu 2007, Zhu ve ark 2007, Castañeda ve ark 2011).

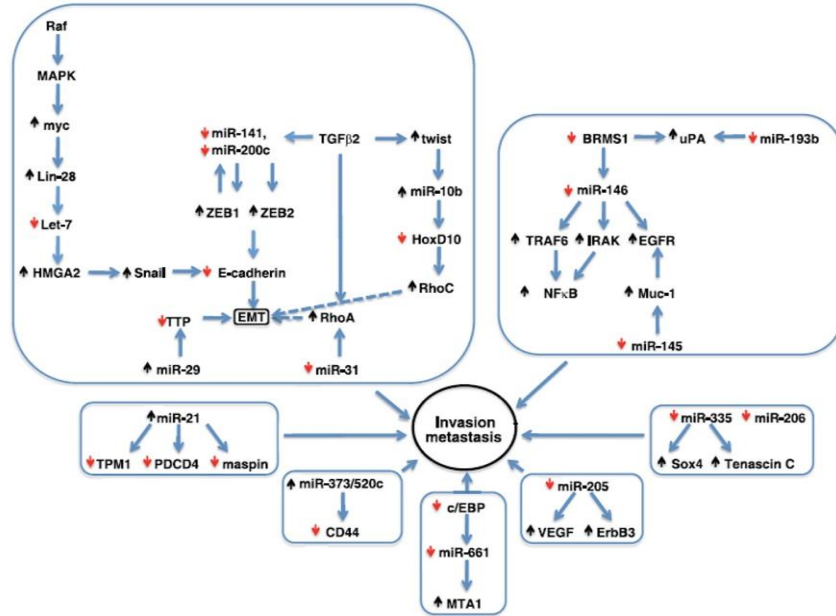
Diğ er bir miRNA hsa-miR-10b ekspresyonu, meme kanserinde hastanın klinik progresyonu ile korelasyon göstermektedir (Wang ve Wu 2007, D'Ippolito ve Iorio 2013). Onkomir olan hsa-miR-10b, transkripsiyon faktör *Twist* tarafından ind klenmekte ve pro-metastatik bir gen olan *RHOC* ekspresyonunun artması sonucu kanser hücresinin invazyon ve metastazını artırmaktadır (Wang ve Wu 2007, Baffa ve ark 2009).

Meme kanserinde tümör baskılayıcı let-7 ailesine ait miRNA ekspresyonları azalmaktadır (Iorio ve ark 2005, Wang ve Wu 2007). Tümör baskılayıcı let-7 ailesi hedef mRNA ekspresyonunu, *Ras* onkogeninin ekspresyonunu düzenleyerek yapmaktadır (Johnson ve ark 2005, Iorio ve ark 2011).

Böylece miRNAlar tümör baskılayıcı ve onkogenik özellikleriyle meme kanseri biyolojisini daha iyi anlamamıza ışık tutmaktadırlar (şekil 1.3., şekil 1.4.). Günümüzde bu moleküllerin tam etkin mekanizmalarının anlaşılması için yapılan efektif araştırmalarla bugüne kadar elde edilen sonuçlara g   kazandırılacaktır.



Şekil 1.3. Meme kanseri başlangıç ve ilerlemesinde rol alan miRNAlar ve olası hedef genleri(Sayed ve Abdellatif 2011).



Şekil 1.4. Meme kanseri invazyon ve metastazında rol alan miRNAlar ve hedef genleri (Sayed ve Abdellatif 2011).

1.4. Meme Kanseri Patogenezinde Etkin Tümör Baskılayıcı miRNA'lar

1.4.1. hsa-miR-206

Normal ve meme kanserli dokudaki hsa-miR-206 ekspresyon oranları kıyaslandığı zaman bu miRNA tümör baskılayıcı grubunda yer almaktadır. Çoğu meme kanseri tipinde östrojen reseptör ekspresyonu neoplazinin prognozu ve tedavisinin şekillenmesinde etkili bir belirleyicidir.

hsa-miR-206, östrojen reseptör geni olan *ERα (ESR1)*'i regüle ederek östrojen reseptör ekspresyonunu kontrol altında tutmaktadır. Meme kanserinde bu miRNA'nın hedeflediği *ESR1* mRNAsı aynı zamanda hsa-miR-18a, hsa-miR-18b, hsa-miR-193b ve hsa-miR-302c miRNAlarının da hedefleri arasında yer almaktadır.

hsa-miR-18a, hsa-miR-18b, hsa-miR-193b, hsa-miR-206 ve hsa-miR-302c hücre döngüsünü durdurarak östrojenin indüklediği proliferasyonu inhibe etmektedir. hsa-miR-206, hsa-miR-335 ve hsa-miR-126 güçlü bir şekilde metastatik meme kanseri hücrelerini parental hücrelere kıyasla proliferasyonlarını azaltmaktadırlar.

Bu mirnalardan hsa-miR-335'ün hedef genleri arasında meme kanseri hücre metastazında etkin olan *PTPRN2*, *MERTK*, *TNC* ve *SOX4* genleri bulunmaktadır (Lowery ve ark 2008, O'Day ve Ashish 2010, Küçükhüseyin ve Öztürk 2013).

1.4.2. hsa-miR-125

Meme kanserinin başlangıç aşamalarında bu aile içerisindeki benzer miRNAlardan olan hsa-miR-125a ve hsa-miR-125b düşük oranda eksprese edilmektedirler. hsa-miR-125, hücre büyümesini ve apoptozu, *HuR* (RNA-sabitleyici protein) mRNA'sını düzenleyerek baskılamaktadır. *ERBB2* geni, tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan epidermal büyüme faktör reseptör ailesinin bir üyesinin transkripsiyonunu sağlamaktadır. Bu reseptör, ligand bağlayan domain sahip olmayıp kendisi doğrudan büyüme faktörü bağlayamaz. Ancak bu ailenin ligandla bağlanabilen bir üyesiyle heterodimer oluşturarak ligand bağlama aktivitesi kazanırken aynı zamanda mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), fosfatidil inositol-3 kinaz gibi kinaz aracılı sinyal yollarının artmasına neden olur.

Meme kanserinde *HER2* geninin amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu söz konusudur. hsa-miR-125a ve hsa-miR-125b tümör baskılayıcı miRNAlar, *HER2*, *HER3* genlerinin ekspresyon seviyelerini, meme kanseri hücresinin büyümesini, hücre hareketliliğini ve invazyon kapasitelerini azaltmaktadırlar (Baffa ve ark 2009, O'Day ve Ashish 2010, Harquail ve ark 2012, Küçükhüseyin ve Öztürk 2013).

1.4.3. hsa-miR-200

Yapılan araştırma sonuçlarından elde edilen kanıtlar kanser hücrelerinde embriyonik programlama olarak tanımlanan ‘epitel-mezenşim dönüşümü (EMD)’ süreciyle, hücrelerin birbirlerinden ayrılması ve böylece kanser hücrelerinin mobilite ve yayılım kazandığını gösterdi.

Aşırı EMD malignant transformasyondan sorumlu tutulmaktadır. Kanser hücrelerinde EMD aktivasyonu aralarında, *SNAIL* ailesi ve *Zinc Finger Protein (ZFH)* ailesi transkripsiyonel faktör üyelerinin yer aldığı EMD tetikleyici düzenleyiciler tarafından sağlanmaktadır.

ZFH ailesinden biri olan *ZEB1* geni, aralarında meme kanserinin de bulunduğu birçok kanser türünde EMD aktivatörü olarak görev alarak metastazı düzenlemektedir.

hsa-miR-200 ailesi 5 adet üyeden oluşmaktadır. Doğrudan hedefleri arasında epitel hücre polaritesini düzenleyip *E-cadherini* azaltıp *vimentini* indükleyen *ZEB1* ve *ZEB2* genlerinin transkripsiyonel modülasyonu bulunmaktadır. Böylece bu iki gen tarafından tetiklenen EMD bu tümör baskılayıcı miRNA’lar tarafından engellenmektedir.

Araştırmalar hsa-miR-200 ailesi içerisinde yer alan 2 farklı genomik lokasyonda bulunan 5 adet miRNA’nın *Transforming growth factor-β (TGF-β)*’nin indüklediği EMD dönüşümünü baskıladığını göstermişlerdir. hsa-miR-200 ailesi üyelerinin agresif, metaplastik meme tümörlerinde tümörün progresyonu ve metastazında etkili birer belirteç oldukları düşünülmektedir (Baffa ve ark 2009, O’Day ve Ashish 2010, Harquail ve ark 2012).

1.4.4. let-7 Ailesi

let-7 ailesi 12 üyeden oluşmaktadır. Meme kanseri patogenezinde tümör baskılayıcı olarak görev almaktadırlar. *C. elegans*’ın gelişim sürecinde (embriyogenez) hücre tipinin belirlenmesinde temel görev alırken insan gelişiminde yüksek oranda epitel doku farklılaşmasında rol almaktadırlar.

Meme kanserinin başlangıç aşamalarında let-7 ekspresyonu düşük seviyelerde iken devam eden süreçte ekspresyon oranı hücrenin östrojen reseptör (ER)-pozitif, luminal olması gibi karakteristik özellikleriyle değişkenlik gösterir.

let-7'nin hedef genleri arasında proto-onkogen *Ras* ve onkofetal protein *HMGA2*, *RNA Binding Protein* (IMP-1) bulunmaktadır. Meme kanserinde let-7 seviyesindeki manipülasyonlar kanser hücrelerinin proliferasyon, metastaz yetenekleri ile *H-Ras* ve *HMGA2* onkogenik genlerinin cevaplarında etkindir.

Yapılan araştırma sonuçları ile let7'nin, meme kanserinde metastazdan sorumlu protein olan *Raf kinase inhibitory protein* (RKIP) , *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK), *G protein coupled receptor kinase-2* ve NF-κB sinyal kaskadını inhibe ettiği gösterilmiştir (Johnson ve ark 2005, O'Day ve Ashish 2010, Iorio ve ark 2011, Saydam ve ark 2011, Chen ve ark 2012).

1.5. Meme Kanseri Patogenezinde Etkin OnkomiRNA'lar

1.5.1. hsa-mir-21

Meme kanserinde ilk tanımlanan onkogenik miRNA'lardan birisi de hsa-miR-21'dir. hsa-miR-21 ekspresyonu meme tümörünün prognozu ve metastazı ile korelasyon göstermektedir.

In vitro çalışmalarda *knockdown* hsa-miR-21, MCF-7 hücrelerinde proliferasyonun azaldığı ve artan apoptoz gözlemlendi. Bu miRNA tarafından tümör baskılayıcı *PDCD4* (*programmed cell death-4*), *phosphatase and tensin homolog* (*PTEN*) genlerinin ekspresyonlarını inhibe edilmektedir.

Bulgular hsa-miR-21'in onkogenik bir miRNA olduğunu bunun yanı sıra sadece tümör gelişiminde değil aynı zamanda invazyon ve metastazda da etkin rol oynadığını gösterdi (Si ve ark 2007, Baffa ve ark 2009, O'Day ve Ashish 2010, Iorio ve ark 2011, Chen ve ark 2012).

1.5.2. hsa-miR-155

hsa-miR-155 aralarında meme kanserinin de bulunduğu birçok insan neoplazmasında aşırı ekspresyon göstermektedir. Son zamanlarda yapılan başka bir

çalışmada hsa-miR-155 normal fare meme bezi epitel (*NMuMG hücre*) hücrelerinde *TGF- β /Smad4* sinyal yolu üzerinden EMD dönüşümü ve invazyonunu düzenlemektedir.

hsa-miR-155, hücre adezyonu, hareketi, bağlantı yapısı ve stabilitesini düzenleyen *RhoA* geninin ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu miRNA meme kanserinde önemli bir belirteç olup yüksek ekspresyon seviyesi invaziv bir göstergedir (Baffa ve ark 2009, O'Day ve Ashish 2010, Chen ve ark 2012, Zeng ve ark 2014).

1.5.3. hsa-miR-10

Meme kanserinde hsa-miR-10 ailesi, hsa-miR-10a ve hsa-miR-10b olmak üzere 2 üyeden oluşmaktadır. Östrojen reseptör pozitif meme kanserinde hsa-miR-10a ekspresyon artışı belirlendi. hsa-miR-10b ekspresyonu *HOXD10* genini düzenleyerek kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz yeteneklerini etkilemektedir. hsa-miR-155 ekspresyonu birçok meme tümöründe yüksek bulunurken hsa-miR-10b sadece metastatik meme kanserinde yüksek oranda tespit edildi (Baffa ve ark 2009, O'Day ve Ashish 2010, Chen ve ark 2012, Yong ve ark 2012).

1.5.4. hsa-mir-17-92 Ailesi

hsa-miR-17-92 ailesi içerisinde yeralan 7 homolog miRNA (hsa-miR-17-3p, hsa-miR-17-5p hsa-miR-18a, hsa-miR-20, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b-1, hsa-miR-92a-1) yer almaktadır. Bu aile üyeleri meme kanseri hücrelerinin siklin D1 ekspresyonunu düzenleyerek proliferasyonlarını baskılamaktadırlar. Bu grup içerisinde yeralan miRNA'ların bazıları (hsa-miR-17-5p) onkogenik bazıları tümör baskılayıcı karakter taşıdıkları için bu aile üyeleri üzerinde daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Liu ve ark 2009, Castañeda ve ark 2011, Chen ve ark 2012).

1.6. Meme Kanseri ve Genel Tanı Parametreleri

Meme kanseri patofizyolojisinde, hücrenin sahip olduğu biyolojik belirteçler hastalığın teşhis, tedavi ve izleme döngülerinde klinisyenlere rehberlik etmektedir.

Özellikle kanser hücresinin sahip olduğu veya olmadığı hormon reseptör durumuna göre temel bir sınıflandırma yapılmıştır. Buna göre meme kanseri östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) ve HER2-*human EGF like reseptör* (HER2/ErbB2) reseptörlerden varolanlara göre pozitif gruplara ayrılırken her üç reseptörün de yokluğuna göre üçlü negatif olarak gruplandırılmaktadırlar.

Bu sınıflandırmaya göre ER (-) negatif hücreye sahip hastaların meme kanseri teşhisi konulduktan yaklaşık 5 yıl sonra tekrar etme oranı ER (+) pozitif hastalara göre daha yüksek olduğu belirlendi. Duktal karsinomalarda ER (-) negatif / PR (-) negatif fakat HER2 (+) pozitif kanserlerin ER (+) pozitif / PR (+) pozitif / Her2 (-) negatif kanserlere oranla nüks etme oranları daha yüksek olarak tespit edildi. Üçlü negatif sınıflandırmaya giren hastalarda ise beyine ve iç organlara metastazın reseptör pozitif gruba göre daha yüksek olduğu gösterildi. Ayrıca meme kanseri kendi içerisinde normal-benzeri, bazal, luminal A, luminal B, HER2 zenginleştirilmiş, claudin-düşük olarak altı moleküler alttıpe ayrıldı. Luminal A sınıfı içerisinde ER (+) / PR (+) ve HER2 (-); luminal B sınıfı içerisinde ER (+) / PR (+) ve HER2 (+); bazal grupta ER (-), PR (-), HER2 (-); HER2 zenginleştirilmiş grup içerisinde ER (-), PR (-), HER2 aşırı ekspresyonu olarak gruplar yer almaktadır. Luminal kanserler hormon sinyallerine bağlı olup alttıpler arasında en sık rastlanan grubu oluştururlar. Bazal ve claudin-low kanserler ise immünohistolojik alt tiplerinde daha çok üçlü negatif grupla örtüşmektedirler (Heneghan ve ark 2009, Wang ve ark 2011, Ahmad 2013, Graveel ve ark 2015).

Tüm bu belirteçler meme kanserinin kimliğinin belirlenmesinde bugüne kadar oldukça yol gösterici olmuştur. Elde edilen araştırma sonuçları bu alana hizmet edecek yeni biyobelirteçlerin varlığını göstermektedir. Bunlar arasında miRNA'lar son dönemde üstlendikleri roller sebebiyle en üst sıralarda yer almaktadırlar.

Birçok alandan araştırmacının ilgi odağı haline gelen miRNA'ların, fizyolojik ve patolojik işlevlerdeki fonksiyonlarının tam olarak anlaşılabilmesi ve böylece meme kanseri gibi spesifik hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanımlarının yaygınlaşabilmesi için bu moleküllerin hedeflerine nasıl bağlandıkları ve hedefin

gen ifadesini farklı seviyelerde nasıl düzenlediklerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

Özellikle insan kanser patogeneğinde önemli bir belirleyici olan miRNA ifadelerindeki düzensizliklerin altında yatan kompleks yolak mekanizmalarını anlamaya yönelik ve böylece şimdilik kanser ilerleyişi hakkında fakat gelecekte klinik uygulamalar için de yeralması amacıyla bunu inceleyen çalışmaların sayısı artmaktadır.

Biz de bu amaç doğrultusunda projemizde moleküler sınıflandırmada bazal benzeri, claudin düşük; histolojik boyama sonucuna göre sitokeratin 5 (-) negatif, sitokeratin 14 (-) negatif, sitokeratin 8-18 (-) negatif; hormon reseptör durumuna göre de östrojen reseptör (-) negatif, progesteron reseptör (-) negatif, epidermal büyüme faktör reseptör (-) negatif invaziv duktal karsinom MDA-MB-435 hücresi ile moleküler sınıflandırmada luminal grup, histolojik boyama sonucuna göre sitokeratin 5 (-) negatif, sitokeratin 14 (-) negatif, sitokeratin 8-18 (+) pozitif; hormon reseptör durumuna göre de östrojen reseptör (+) pozitif, progesteron reseptör (+) pozitif, epidermal büyüme faktör reseptör (+) MCF-7 meme kanseri hücrelerinin farklı saatlerdeki miRNA ekspresyon profillerini moleküler bir yöntem olan yüksek kapasiteli real-time *polymerase chain reaction* (PCR) yöntemiyle belirlemeyi, her iki hücre hattının saat bazlı olarak belirlenen miRNA ekspresyonlarını kıyaslamayı ve hem MCF-7 hücrelerinde hem de MDA-MB-435 hücrelerinin kendi içlerinde ekspresyonu artan ve azalan miRNAların hem de her iki hücre hattının miRNA ifadelerinin kıyaslanması neticesinde artan ve azalan miRNAların etkin oldukları yolak profillerini belirlemeyi hedefledik.

Bu amaçla;

MCF-7 ve MDA-MB-435 hücre serilerinin

- proliferasyonları kıyaslandı,
- invazyon kapasiteleri değerlendirildi,
- yüksek kapasiteli real-time PCR yöntemiyle miRNA ekspresyon profilleri belirlendi.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Meme Kanseri Hücre Hatları

Araştırmamızda moleküler sınıflandırmada luminal grup; histolojik boyama sonucuna göre sitokeratin 5 (-) negatif, sitokeratin 14 (-) negatif, sitokeratin 8-18 (+) pozitif; hormon reseptör durumuna göre de östrojen reseptör (+) pozitif, progesteron reseptör (+) pozitif, epidermal büyüme faktör reseptör (+) pozitif meme kanseri hücresi MCF-7 kullanıldı (Neve ve ark 2006, Wang ve ark 2010, Riaz ve ark 2013).

Aynı zamanda moleküler sınıflandırmada bazal benzeri, claudin düşük; histolojik boyama sonucuna göre sitokeratin 5 (-) negatif, sitokeratin 14 (-) negatif, sitokeratin 8-18 (-) negatif; hormon reseptör durumuna göre de östrojen reseptör (-) negatif, progesteron reseptör (-) negatif, epidermal büyüme faktör reseptör (-) negatif invaziv duktal karsinom (Burdall ve ark 2003, Campanella ve ark 2012) meme kanseri hücresi MDA-MB-435 deneylerde yer aldı (Najla ve ark 1997, Neve ve ark 2006, Wang ve ark 2010, Riaz ve ark 2013).

MCF-7 hücreleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD'dan Prof. Dr. Abdulkerim Bedir'den, MDA-MB-435 hücreleri ise Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre Araştırmaları Enstitüsü'nden Prof. Dr. Erdal Karaöz'den temin edildi.

Tez Projesi Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2013/198 sayılı karar numarası ile desteklendi.

2.2. Hücre Kültürü Koşulları

Hücre kültürü stoklarımızda yeralan MCF-7 hücreleri deneylerde kullanılmak üzere hava akışı olan steril kabin altında % 10 Fetal Bovine Serum¹ (FBS), 100 U/ml penisilin¹, 100 µg/ml streptomisin¹ , % 1 glutamin içeren Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium¹ (DMEM) ile çözülerek % 5 CO₂ içeren su bazlı etüv içerisinde inkübe edildi.

Benzer şekilde MDA-MB-435 hücreleri de hava akışı olan steril kabin altında % 10 Fetal Bovine Serum¹ (FBS), 100 U/ml penisilin¹, 100 µg/ml streptomisin¹, % 1 glutamax içeren Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium F 12 (DMEM-F12) ile çözülerek % 5 CO₂ içeren etüvde idame edildi.

Hücrelerin gūnaşırı mediaları değıştirilerek deneylerde kullanılacak sayıya ulaşmaları beklendi. Hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olup olmadıkları inverted-mikroskop ile kontrol edildi.

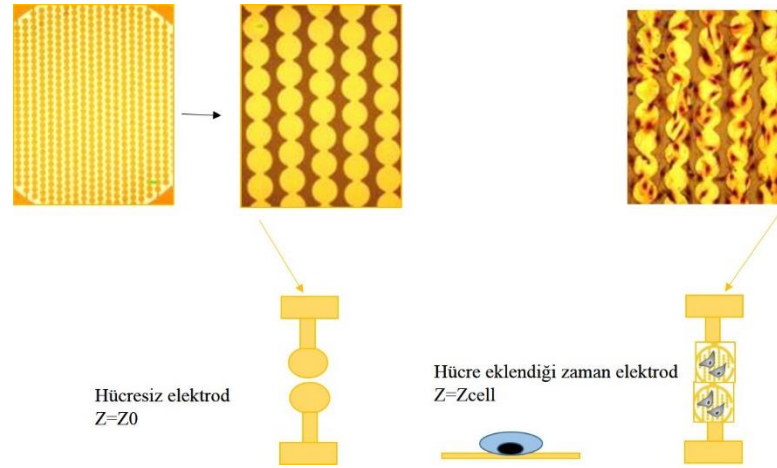
2.3. Hücre Proliferasyon Deneyleri

2.3.1. MCF-7 Hücre Proliferasyon Deneyi

Proliferasyon deneylerinde kullanılmak için uygun sayıya ulaşan MCF-7 hücreleri belirlenen plan doğrultusunda *xCELLigence* sistem ile izlendi. *xCELLigence* system, hücre proliferasyonlarını gerçek zamanlı ölçüm (*real-time cell analyzer*; *RTCA*) yaparak izleme imkanı sunmaktadır.

Sistem empedans ölçümü üzerine kurgulanmış olup istenen zaman aralıklarında (saniye, dakika, saat) hücre proliferasyonunun gözlemlenebilmesini sağlayan yeni bir sistemdir. Bileşenlerini *RTCA analizör*, *RTCA DP istasyon*, software programı içeren RTCA bilgisayar ve tek kullanımlık *E plate 16* olmak üzere dört temel parça oluşturmaktadır.

Bu bileşenlerden *RTCA DP istasyon*, hücre kültürü inkübatörü içerisinde bulunurken, *RTCA analizör* ve software içeren bilgisayar inkübatör dış ortamında bulunmaktadır. *E plate 16*, tek kullanımlık olmaları ve taban kaplamalarındaki altın hücre sensörleriyle klasik hücre kültürü deney kaplarından farklılık göstermektedir. Her bir kuyucukta bulunan elektrodlar sayesinde kuyucuk içerisindeki hücre miktarı ve ortamın fizyolojik değışikliklerinin hücre üzerindeki etkisi eş zamanlı olarak görüntülenebilmektedir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. xCelligence sistem elektrodlarla kaplı kuyucuk iç yüzey görüntüsü.

Deneylerde kullanılmak için idame edilen MCF-7 hücreleri, bir proteaz olan tripsin enzimi ile muamele edilerek hücrelerin birbirlerinden ve kabın tabanından ayrılmaları sağlandı. Bu işlemin ardından tripsin enziminin çalışması % 10 FBS içeren DMEM ile durdurularak elde edilen hücre-tripsin karışımı 2500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.

Tabanında hücre peleti bulunan tüpün üzerindeki *supernatant* uzaklaştırılarak tripsin enziminin ortamdan ayrılması sağlandı. Elde edilen hücre peleti % 10 FBS içeren DMEM içerisinde süspanse edilip neubauer lamında belirlenen alanlar sayılarak standart hücre sayısı bulma formülü uygulandı. Böylece elimizde bulunan hücre süspansiyonunun 1 ml'sindeki hücre sayısı belirlendi.

Elde edilen bu hücre sayısından hareketle % 10 FBS içeren DMEM içerisinde 5000, 10.000, 20.000 ve 40.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde deney grupları oluşturuldu. Herbir deney grubu 8 kuyucuk ($n=8$) olmak üzere *E-plate* 16, üzerindeki kuyucuklara içlerinde 5000, 10.000, 20.000 ve 40.000 hücre içerecek şekilde 100 μ L hücre süspansiyonu eklendi. Ardından *xCELLigence* sistem üzerinde oluşturulan programa göre hücrelerden her 15 dakikada otomatik ölçüm alınarak 150 saat boyunca proliferasyon paternleri izlendi.

E-plate 16 içerisindeki MCF-7 hücreleri izlemeyi takip eden günde %10 FBS içeren DMEM ile ortamları değiştirildi. Elektrodlarda belirlenen empedans değerleri 'hücre index' (*Cell Index; CI*) olarak kantitatif olarak elde edildi.

2.3.2. MDA-MB-435 Hücre Proliferasyon Deneyi

Kültür ortamında idame edilen MDA-MB-435 hücre serilerinin proliferasyon potansiyeli de gerçek zamanlı izleme imkanına sahip *xCELLigence* sistem ile değerlendirildi.

MDA-MB-435 hücreleri DMEM F-12 içerisinde süspanse edilerek 5000, 10.000, 20.000 ve 40.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde deney kuruldu. Her bir kuyucuk içerisine 100 µL hücre süspansiyonu (her bir deney grubu 8 kuyucuk, n=8) eklenen *E-plate* 16, cihaza yerleştirildikten sonra her 15 dakikada otomatik ölçüm alınarak 192 saat boyunca *xCELLigence* sistem ile MDA-MB-435 hücrelerinin proliferasyonları incelendi.

E-plate 16 içerisindeki MDA-MB-435 hücreleri izlemeyi takip eden günde %10 FBS içeren DMEM F-12 ile ortamları değiştirildi. Elektrodlarda belirlenen empedans değerlerine göre hücre indeksi (CI) belirlendi.

2.4. Hücre İnvazyon Deneyleri

2.4.1 *xCELLigence* Sistem ile Hücre İnvazyon Deneyleri

Hem MCF-7 hücresinin hem de MDA-MB-435 hücresinin invazyon potansiyelleri de gerçek zamanlı izleme olanağına sahip *xCELLigence* sistem ile karşılaştırıldı.

Proliferasyon deneylerinden farklı olarak *E plate* 16 yerine *CIM plate* 16 kullanıldı. *CIM Plate*'ler klasik invazyon deneylerinde kullanılan *Boyden chamber* mantığına göre hücrelerin invazyon kapasitelerinin sistem üzerinde oluşturdıkları empedans dirençlerinin ölçümüyle belirlenmesi üzerine tasarlanmıştır. *CIM plate* 16, *lower chamber* ve *upper chamber* olmak üzere iki parçadan oluşmaktadır (Şekil 2.2., Şekil 2.3.).

Deneye başlamadan önce hücreler 24 saat serum açlığına bırakıldı ve hücrelerin kültür kabından kaldırılma aşamasında tripsin enziminin hücre yüzey reseptörü olan integrinlere zarar verebileceği göz önünde bulundurularak enzimin hücrelere uygulanma süresi kısaltıldı.

İçerisinde serumsuz DMEM ile hazırlanmış 1:20 oranında matrijel bulunan *upper chamber*, 4 saat süreyle 37 °C % 5 CO₂ ihtiva eden etüvde uygun yoğunluğa ulaşması için bekletildi. Böylece deney gruplarının *upper chamber*larında matrijel eklenirken kontrol gruplarının *upper chamber*larına matrijel eklenmedi. Ardından hem deney grubunun hem de kontrol grubunun *lower chamber* kuyularına 160 µl % 10 FBS içeren DMEM ilave edilerek *upper chamber* ile 90 derecelik bir açıyla birleştirildi.

İnkübasyonun ardından içerisinde 20.000 hücre bulunan 100 µl'lik hücre süspansiyonları kuyulara eklendi. Deneyler her bir grupta 6 kuyu (n=6) içerecek şekilde ve kuyularda 20.000 hücre (20.000 hücre/kuyu) olacak şekilde planlandı.

Kapak

Üst Plate

Alt plate

Üst plate taban görüntüsü

25



Şekil 2.3. xCELLigence sistem ile invazyon çalışma prensibi.

2.4.2. HTS Transwell-96 Permeable Support Systems and Plates ile Hücre İnvazyon Deneyleri

MCF-7 ve MDA-MB-435 hücrelerinin invazyon potansiyelleri, *HTS Transwell-96 Permeable Support Systems* kullanılarak klasik bir yöntem olan *boyden chamber* ile de belirlendi.

Deneye başlamadan önce her iki hücre hattı da 24 saat serum açlığına bırakıldı. Sistem 96 kuyucuklu olup içerisinde hücre ve uygun kemoatraktantı eklemenize imkan veren insertler de bulundurmaktadır. Sistem, bu insertler sayesinde kuyucukları *upper chamber* ve *lower chamber* olarak ayırma olanağı sunmaktadır.

Gruplara eklenecek matrijel 24 saat öncesinden + 4 °C’de tutularak uygun akışkanlığa ulaşması sağlandı. Deneye başlarken 50 µl serumsuz DMEM insertlere eklendi. Deney grubu içerisindeki kuyucuklara 1:10 ve 1:20 oranında serumsuz DMEM ile hazırlanmış matrijel ilave edildi. Matrijelin istenen yoğunluğa ulaşması için 24 saat 37 °C’de etüvde bekletildi.

Kontrol grubu (matrijelsiz, n=8) ve deney grupları (1:10 ve 1:20 matrijel, n=8) içerisindeki kuyucuklara 50 µl hücre süspansiyonu (20.000 hücre/kuyu) ilave edildi. Herbir kuyu üzerine 100 µl serumsuz DMEM eklendi. *HTS Transwell Plate*’in *lower chamber* kısmına 150 µl % 10 FBS içeren DMEM eklenerek 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından platein *insert* ve *lower chamber* kısmındaki mediyalar aspire edilerek hücreler % 3.7 formaldehid ile fiksasyon edildi. Fiksasyon aşamasını takiben hücreler % 0.1 *crystal viole* ile boyanarak mikroskop altında sayıldı.

2.5. miRNA Analizleri

MDA-MB-435 ve MCF-7 hücreleri, hücre kültürü koşullarında kültüre edilerek deneyin 2, 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerinde miRNA içeren total RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen RNAların miktar ve saflık oranları belirlendikten sonra *Complementary DNA (cDNA)*'ları sentezlendi. Hedef miRNA primerler ve hücrelerden elde edilen cDNA'lar ile *fluidigm* cihazında yüksek kapasiteli *real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)* deneyleri yapıldı.

2.5.1. miRNA İçeren Total RNA İzolasyonu

MCF-7 ve MDA-MB-435 hücrelerinden miRNA içeren total RNA izolasyonu için *High Pure miRNA Isolation Kit* (Roche, 05 080 576 001) kullanıldı. Bu kit, *chaotropic* bir tuz olan *guanidine thiocyanate* varlığında seçici olarak RNA bağlama kapasitesine sahip glass-fiber yapılı *High Pure Filter Tube* sisteminden oluşmaktadır.

High Pure Filter Tube içerisindeki glass-fiber yapılı filtreye bağlanan RNA, bir seri hızlı yıkama basamakları sayesinde DNA, protein, tuz ve diğer hücresel bileşenlerden arındırılıp saf RNA elde edilmektedir.

miRNA içeren total RNA izolasyonu aşağıdaki basamaklar takip edilerek gerçekleştirildi.

1. Hücreler % 20 *Binding Buffer* ile *lysate* haline getirildi.
2. miRNA içeren total RNA *High Pure Filter Tube* ile izolasyonu yapıldı.
3. Filtrelere bağlanan RNA'nın yıkanmasıyla diğer hücresel bileşenlerden arındırıldı.
4. *High Pure Filter Tube* içerisindeki glass-fiber yapıdaki filtreye bağlanan RNA *Elution Buffer* ile elde edildi.

MCF-7 hücrelerinden miRNA içeren total RNA izolasyonu yapmak için 60 mm'lik hücre kültürü petripleri kullanıldı. Deney başlangıcında belirlenen hücre sayılarına göre 2, 4, 6, 12 ve 24. saat gruplar için cm^2 'ye 25.000 hücre (500.000

hücre/petri); 48. saat izolasyonu için de cm^2 'ye 15.000 hücre (300.000 hücre/petri) olacak şekilde deney kuruldu.

MDA-MB-435 hücrelerinden de miRNA içeren total RNA izolasyonu için 2, 4, 6 ve 12. saatler için cm^2 'ye 25.000 hücre (500.000 hücre/petri); 48. saat izolasyon için cm^2 'ye 12.500 hücre (250.000 hücre/petri) kullanıldı.

MCF-7 ve MDA-MB-435 hücreleri ile planlanan sayılar ve saatler için uygun hücre kültürü koşullarında deneyler kuruldu. Deney kurulmasını takip eden günde hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı oldukları *inverted* mikroskop aracılığıyla kontrol edildi.

İzolasyon için başlangıç saati belirlenip takip eden saatlerde 2, 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde RNA izolasyonları gerçekleştirildi. İzolasyonda hücrelerin üzerindeki DMEM ve DMEM-F12 mediaları aspire edildi. Hücreler 4 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS) ile yıkandıktan sonra 1.5 ml tripsin enzimi eklenip % 5 CO_2 içeren etüvde 5 dk bekletildi. İşlem sonunda hücrelerin birbirlerinden ve petri kabının tabanından ayrılmaları sağlandıktan sonra tripsin enziminin çalışması % 10 FBS içeren DMEM ile durduruldu. Hücre tripsin karışımı 15 ml'lik tüplere toplandıktan sonra 2500 rpm'de oda ısısında 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüpün tabanında oluşan hücre peleti üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peleti PBS ile iki kez yıkandı. Ardından hücre peleti 150 μl % 20 *Binding Buffer* ile berraklaşmaya kadar pipetaj yapıldı. Oluşan karışım 12.000 rpm oda ısısında 3 dk santrifüj edildi. Elde edilen hücre *lysates* miRNA içeren total RNA sentezi yapılınca kadar -80°C 'de saklandı.

MCF-7 ve MDA-MB-435 hücreleri deney gruplarından elde edilen 150 μl hücre *lysates* üzerine 312 μl *Binding Buffer* ve 200 μl *Binding Enhancer* eklenerek polipropilen tüp içinde karıştırıldı. Elde edilen karışım *high pure filter tube* içerisine aktarılıp 13.000 g'de 30-60 sn oda ısısında santrifüj edildi. Devamında *high pure filter tube* kombininde yeralan *collection tube* içerisindeki atık uzaklaştırılıp *high pure filter tube* yeni bir *collection tube* ile birleştirilip filtre içerisine 500 μl *wash buffer* eklendi. Bu işlem sonrasında *high pure filter tube* 13.000 g'de 30-60 sn oda ısısında santrifüj edilip bir önceki işlemde olduğu gibi yeni bir *collection tube* ilave edildi. İkinci yıkama işlemi için tekrar 300 μl *wash*

buffer eklenip aynı koşullarda santrifüj işlemi uygulandı. Bu yıkama işlemleri sayesinde filtrelere bağlanan miRNA içeren total RNA, DNA, protein, tuz gibi diğer hücresel bileşiklerden arındırılmış oldu. Yıkama işlemi sonrasında *high pure filter tube* bileşimindeki *collection tube* içerisindeki atık uzaklaştırılıp *high pure filter* ile yeniden kombinlendi. Sonrasında *high pure filter tube* 13.000 g'de 2 dk oda ısısında santrifüj edilip içerisindeki *buffer* atıkları tamamen uzaklaştırıldı. *High pure filter tube* yeni bir *collection tube* ile yenilenerek filtre içerisine 60 µl *RNase-DNase free water (elution buffer yerine)* eklenip 1 dk oda ısısında inkübe edildi. Ardından *high pure filter tube* 13.000 g'de 1 dk santrifüj edilerek miRNA içeren total RNA izolasyonları tamamlandı.

2.5.2. miRNA İçeren Total RNA Miktar ve Kalite Analizi

MCF-7 ve MDA-MB-435 hücrelerinden elde edilen miRNA içeren total RNA'ların miktar ve saflık oranları *Agilent Bioanalyzer* cihazı ile belirlendi.

2.5.3. Complementary DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen miRNA içeren total RNA'lardan *Complementary DNA (cDNA)* sentezi için *miScript II RT Kit* (Qiagen) kullanıldı. Bu işlem için Çizelge 2.1.'de bulunan bileşenleri içeren karışım 8'li strip tüpün tüm kuyularına 51 µl olarak transfer edildi. Buradan 8 kanallı pipet yardımıyla 3.5'er µl alınarak temiz bir 96 kuyuluk piko plakın tüm kuyularına pipetlendi. miRNA içeren total RNA örnekleri de her kuyuya 3.5'er µl olmak üzere pipetlenerek toplam reaksiyon hacmi 7 µl olacak şekilde hazırlandı. Piko plak film ile kaplanarak plate karıştırıcıda 2000 rpm'de 3 dk karıştırıldı. Ardından 2 sn vortekslenip 4-5 sn ara verilip tekrar 2 sn vortekslendi. Plak santrifüjde 1 dk santrifüj edildi. Piko plak, real-time PCR (ThermoScientific) cihazında 37 °C 60 dk, 95 °C 5dk, 4 °C ∞ programı ile çalıştırıldı. Bu aşamanın sonlanmasıyla cDNA sentezi tamamlandı.

Thermal cycle cihazında uygulanan program sonrasında piko plate, oda ısısına gelmesi için bekletilip sonrasında 1dk santrifüj edildi. Ardından platein her bir kuyucuğuna 28 µl *DNase-RNase* içermeyen su eklenerek (1:5 oranında) plate karıştırıcıda 2000 rpmde 3 dk karıştırıldı. Vorteks işlemi 2sn uygulanıp 4-5 sn ara

verilmesinden sonra yeniden 4-5 sn vortekslendi. Bu işlem basamakları sonrasında cDNAlar sulandırılmış oldu.

Çizelge 2.1. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon hacim.

5X miScript HiSpec Buffer	168µl
10X miScript Nucleics Mix	84 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	84 µl
DNase, RNase free water	84 µl
Toplam	420µl

2.5.4. cDNA örneklerinin Preamplifikasyon Basamağı

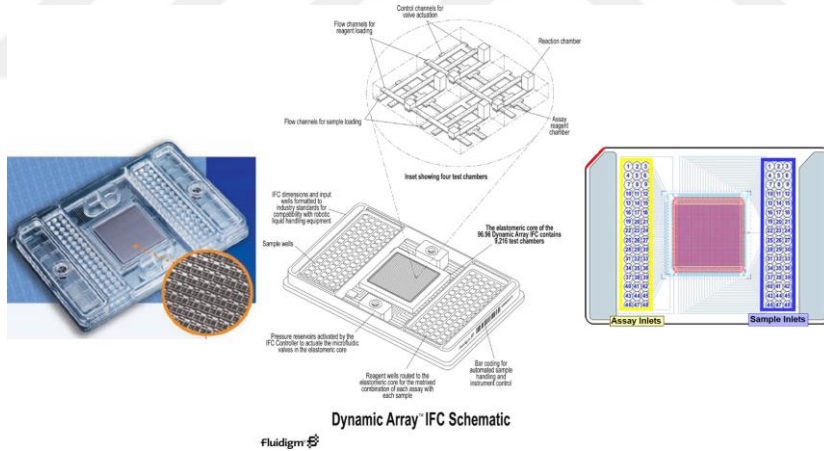
cDNA örneklerinin preamplifikasyon aşaması için Çizelge 2.2.'de bulunan bileşenleri içeren karışım hazırlandı. Hazırlanan preamplifikasyon karışımı 8'er µl olarak 96'lık piko plakın tüm kuyularına pipetlendi. Her kuyu üzerine bir önceki aşamada sulandırılmış olan cDNA örnekleri 2 µl eklenip reaksiyon final hacmi 10 µl olarak ayarlanıp plak üzeri film ile kaplandı. Piko plak, karıştırıcıda 2000 rpm'de 3dk karıştırılıp vortekslendi. Ardından piko plak, Real-time PCR cihazında 95 °C 15 dk (başlangıç denatürasyonu); 94 °C 30 sn, 60 °C 3dk (12 döngü); 4 °C ∞ programı ile işleme alındı. PCR programının sonunda preamplifikasyon ürünlerinin primer dimerlerinden arındırılması için *Exonuclease Kit* (New England Biolabs, #MO293L) kullanıldı. Piko plakın oda ısısına gelmesi için beklenip 1 dk santrifüj edildikten sonra içerisinde preamplifiye cDNA içeren her bir kuyu üzerine 1 µl *Exonuclease I* solusyonundan (52 µl *exonuclease I* + 78 µl *DNA suspension buffer*) eklendi. Ardından plate 2000 rpm'de 3dk santrifüj edilip vortekslendi. Örneklerle real-time PCR cihazında 37 °C 15 dk, 95 °C 5dk, 4 °C ∞ programı uygulandı. Program bitiminde plate oda sıcaklığına geldikten sonra santrifüj ve vorteksleme aşamalarına geçildi. Bu aşamaların da tamamlanmasının ardından örnekler 1:5 oranında *DNA suspension buffer* ile dilue edildi.

Çizelge 2.2. cDNA örneklerinin preamplifikasyon sentezinde kullanılan reaksiyon hacim.

5X miScript PreAmp Buffer	230 µl
HotStartTaq DNA Polymerase	92 µl
Primer Pool	230 µl
PreAMP Universal Primer	46 µl
DNase, RNase free water	322 µl
Toplam	920 µl

2.5.5. Yüksek Kapasiteli Real-time PCR Deneyleri

Yüksek kapasiteli real-time PCR deneyleri için *Fluidigm BioMark* Sistemi kullanıldı. Sistem *BioMark*, *IFC* cihazı ve *dynamic array* chiplerinden oluşmaktadır. Sistemde yer alan *dynamic array chip*'ler 96 örnek ve 96 primer için ayrı ayrı kuyulardan (Şekil 2.3.) oluşmaktadır.



Şekil 2.3. Fluidigm Dynamic Array Chip.

Araştırmamızda kullandığımız *dynamic array chip* içerisinde insan meme kanseri hücrelerine ait 84 spesifik miRNA primerleri (Çizelge 2.3., Çizelge 2.4., Çizelge 2.5.) , 6 adet hedef gen ekspresyonlarının normalizasyonunu yapmak için *adaya house keeping* gen primerleri ve chipin kendi kontrollerini yapmak için 6 adet kontrol primerleri olmak üzere 96 adet primer ile çalışıldı.

Fludigm BioMark sistemini diğer real-time PCR deneylerinden farklı kılan özel tasarım *dynamic array chip* sayesinde deney sırasında herhangi bir çapraz kontaminasyon oluşmadan çok sayıda örnek ve primer ile deneyler gerçekleştirildi. Böylece *dynamic array chipe* yüklenen her örnek için eş zamanlı olarak çalışılan 96 adet real-time PCR reaksiyonu ile yaklaşık 10.000 PCR reaksiyonları aynı anda yapıldı. Sistem bu ayrıcalığı sayesinde her tekerrür sonucunda oluşabilecek bireysel hataları en aza indirerek sonuçların daha güvenilir olmasını hedeflemektedir.

Çizelge 2.3. Yüksek Kapasiteli Real-Time PCR Deneyinde Meme Kanseri miRNA Primerleri.

Mature miRNA Sanger ID		
let-7a-5p	miR-29c-3p	miR-200a-3p
let-7b-5p	miR-31-5p	miR-200b-3p
let-7c-5p	miR-93-5p	miR-200c-3p
let-7d-5p	miR-96-5p	miR-202-3p
let-7e-5p	miR-98-5p	miR-203a
let-7f-5p	miR-100-5p	miR-204-5p
let-7g-5p	miR-107	miR-205-5p
let-7i-5p	miR-125b-5p	miR-206
hsa-miR-1	miR-125b-1-3p	miR-210-3p
miR-7-5p	miR-128-3p	miR-212-3p
miR-10a-5p	miR-129-5p	miR-214-3p
miR-10b-5p	miR-130a-3p	miR-222-3p
miR-15a-5p	miR-130b-3p	miR-223-3p
miR-15b-5p	miR-132-3p	miR-328-3p
miR-16-5p	miR-140-5p	miR-340-5p
miR-17-5p	miR-141-3p	miR-424-5p
miR-18a-5p	miR-145-5p	miR-429
miR-19a-3p	miR-148a-3p	miR-485-5p
miR-19b-3p	miR-152-3p	miR-489-3p
miR-20a-5p	miR-155-5p	miR-495-3p
miR-20b-5p	miR-181a-5p	miR-497-5p
miR-21-5p	miR-181b-5p	miR-548c-3p
miR-22-3p	miR-181c-5p	miR-607
miR-25-3p	miR-181d-5p	miR-613
miR-26a-5p	miR-182-5p	SNORD68
miR-26b-5p	miR-186-5p	SNORD72
miR-27a-3p	miR-193b-3p	SNORD95
miR-27b-3p	miR-195-5p	SNORD96A
miR-29a-3p	miR-199a-3p	RNU6-2
miR-29b-3p	miR-199a-5p	SNORD61

	Onkogen
	Onkogen-Metastaz-Promoting
	Onkogen-Metastaz-Suppressing
	Tümör Baskılayıcı
	Bilinmiyor

Çizelge 2.4. Yüksek Kapasiteli Real-Time PCR Deneyinde Meme Kanseri Tümör Baskılayıcı miRNA Primerleri ve Olası Hedef Genleri.

miRNA	Aile	Hedef Gen	Fonksiyon	Ref
hsa-let-7a-5p	Let-7	HRas HMGA LIN28 PEBP1 Caspase3 CyclinD1,D3 CDK4,6,8	Hücre farklılaşmasını destekler. Apoptozun indirgenmesi ve hücre döngüsünün inhibisyonu.	(Lianhong ve ark 2012)
hsa-let-7b-5p				
hsa-let-7c-5p				
hsa-let-7d-5p				
hsa-let-7e-5p				
hsa-let-7f-5p				
hsa-let-7g-5p				
hsa-let-7i-5p				
hsa-miR-98-5p				
hsa-miR-200a-3p	miR-200	BMI-1 ZEB-1 ZEB-2 TcF-8 TuBB3 SOX-2 Klf-4 TCF8/δEF1	TGF-β'nin indüklediği EMT dönüşümü ve epitel hücre farklılaşmasının inhibisyonu	(Hurteau ve ark 2007, Verghese ve ark 2008, Lianhong ve ark 2012)
hsa-miR-200b-3p				
hsa-miR-200c-3p				
hsa-miR-125b-5p		HER2 HER3		(Scott ve ark 2007, Verghese ve ark 2008)
hsa-miR-125b-1-3p				
hsa-miR-145-5p		ER-α RTKN IRS-1	ER sinyalinin ve hücre döngüsünde G0/G1'den S fazına inhibisyonu	(Arndt ve ark 2009, Spizzo ve ark 2010, Lianhong ve ark 2012, Zhang ve Ma 2012)
hsa-miR-206		ER-α	ER sinyalini engelleyerek hücre proliferasyonu inhibisyonu	(Verghese ve ark 2008, Zhou ve ark 2013)
hsa-miR-205-5p		HER3 VEGF-A PTEN E2F PKCΣ ZEB1 ZEB2	HER3-ilintili hücre proliferasyonu ve VEGF ekspresyonunun ve TGF-β indüklediği EMT dönüşümünün inhibisyonu	(Lianhong ve ark 2012)
hsa-miR-17-5p (hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik)		AIB1 ER-α E2F1 CCND1 (Cyclin D1)	Hücre döngüsü ilerleyişini ve AIB1 ER-α genleri inhibisyonu	(Hossain ve ark 2006, Verghese ve ark 2008)

Çizelge 2.4 (Devam). Yüksek Kapasiteli Real-Time PCR Deneyinde Meme Kanseri Tümör Baskılayıcı miRNA Primerleri ve Olası Hedef Genleri.

hsa-miR-128-3p		BMI-1 ABCC5	Meme kanseri kök hücrelerin kendilerini yenileme ve farklılaşmalarının baskılanması	(Lianhong ve ark 2012)
hsa-miR-203a		BIRC5 LASP1	Proliferasyonun azaltılması ve migrasyon inhibisyonu	(D'Ippolito ve Iorio 2013)
hsa-miR-148a-3p		DNMT3B		(Veeck ve Esteller 2010)
hsa-miR-204-5p				(Imam ve ark 2012)
hsa-miR-1		cMET TAGLN2		(Rhodes ve ark 2012)
hsa-miR-193b-3p		ESR1	Hücre siklus arrestini arttırdığı, östrojenle indüklenen proliferasyonu engeller	(Küçükhüseyin ve Öztürk 2013)
hsa-miR-141-3p				(Küçükhüseyin ve Öztürk 2013)
hsa-miR-429			miR-200 ailesi ile birlikte EMT dönüşümü	(Chen ve ark 2011, Küçükhüseyin ve Öztürk 2013)

Çizelge 2.4 (Devam). Yüksek Kapasiteli Real-Time PCR Deneyinde Meme Kanseri Tümör Baskılayıcı miRNA Primerleri ve Olası Hedef Genleri.

hsa-miR-26a-5p		HMGA1	Hücre proliferasyon, koloni formasyon ve migrasyon inhibisyonu, apoptoz indüksiyonu. Hedgehog pathway	(Gao ve ark 2013, Xi-Xue ve ark 2015)
hsa-miR-26b-5p		PTGS2	Hücre proliferasyonu inhibisyonu, Hedgehog pathway	(Jia ve ark 2013)
hsa-miR-214-3p				(Derfoul ve ark 2011)
hsa-miR-223-3p				(Gong ve ark 2013)
hsa-miR-129-5p				(Wang ve ark 2012)
hsa-miR-340				(Wu ve ark 2011)
hsa-miR-489				(Jiang ve ark 2014)
hsa-miR-548c-3p		ECHS1		(Yafei ve ark 2015)
hsa-miR-15a-5p				(Luo ve ark 2013)
hsa-miR-15b-5p				
hsa-miR-16-5p				(Rivas ve ark 2012)
hsa-miR-195-5p				(Chuankui ve ark 2015)
hsa-miR-497-5p				(Chuankui ve ark 2015)
hsa-miR-199a-3p				(He ve ark 2013)
hsa-miR-199a-5p				(Yi ve ark 2013)
hsa-miR-107				(Xiao-Yu ve ark 2014)

Çizelge 2.5. Yüksek Kapasiteli Real-Time PCR Deneyinde Meme Kanseri Onkogenik miRNA Primerleri ve Olası Hedef Genleri.

miRNA	Aile	Hedef Gen	Fonksiyon	Ref
hsa-miR-222-3p	miR 222/21	p27kip1 p57kip2 FOXO3 ERα	Hücre döngüsü ilerleyişi ve ER sinyali düzenlemesinin desteklemesi	(Lianhong ve ark 2012)
hsa-miR-27a-3p		ZBTB 10 Myt-1 FOXO1	Kanser hücre proliferasyon ve anjiyogenezin artırılması,hücre döngüsü G2-M noktasının regülasyonu,FOXO1 inhibisyonu	(Lianhong ve ark 2012)
hsa-miR-27b-3p		CYP1B1	Kanser hücrelerinin belirli antikanser ilaçlarına karşı cevaplarının düzenlenmesi	(Lianhong ve ark 2012)
hsa-miR-96-5p		FOXO 1	Hücre proliferasyonunun desteklenmesi	(Lianhong ve ark 2012)
hsa-miR-182-5p		FOXO 1	Hücre proliferasyonunun desteklenmesi	(Lianhong ve ark 2012)
hsa-miR-20b-5p		HIF-1α EGR1 PTEN BRCA1	anjiyogenez	(Zhang ve Ma 2012, Dongping ve ark 2013)
hsa-miR-20a-5p				(Li ve ark 2012)
hsa-miR-17-5p (hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik)	17-92 ailesi			(Chen ve ark 2012)
hsa-miR-18a-5p				
hsa-miR-19a-3p				
hsa-miR-19b-3p				
hsa-miR-10a-5p				(Hoppe ve ark 2013)
hsa-miR-181a-5p		Bim ATM	Anoiksi direncinin inhibisyonu, DNA kırıklarının tamiri	(D'Ippolito ve Iorio 2013)
hsa-miR-181b-5p				
hsa-miR-25-3p hsa-miR-93-5p		pRb ZBTB4	Hücre proliferasyonu indüklenmesi	(Calvano Filho ve ark 2014)

Çizelge 2.5 (Devam). Yüksek Kapasiteli Real-Time PCR Deneyinde Meme Kanseri Onkogenik miRNA Primerleri ve Olası Hedef Genleri.

hsa-miR-22-3p		ESR1, PTEN	Hücresel cevap, hormon reseptör durumu	(Tormo ve ark 2015)
hsa-miR-29a-3p		CDCD42, CDK6, ITGA11, ADAM12, ADEAMTS9	Hücresel cevapla EMT dönüşümü, epigenetik	(Le Quesne ve Caldas 2010, Melo ve Esteller 2011, Tormo ve ark 2015)
hsa-miR-29b-3p				
hsa-miR-29c-3p			EMT regülasyonu	(Rostas ve ark 2014)
hsa-miR-132-3p		MMP9, MECP2	EMT, epigenetik	(Tormo ve ark 2015)
hsa-miR-140-5p		HDAC4	Epigenetik	(Tormo ve ark 2015)
hsa-miR-152-3p		DNMT1	Epigenetik	(Tormo ve ark 2015)
hsa-miR-212-3p		MMP9, MECP2, PED	Hücresel cevap, Epigenetik, Hormon reseptör durumu	(Tormo ve ark 2015)
hsa-miR-210-3p		PLCXD1-phospholipase-C, HIPK2-kinase		(James ve ark 2014)
hsa-miR-485-5p		HPGD		(He ve ark 2014)
hsa-miR-607		cFLIP		(Rhodes ve ark 2012)
hsa-miR-613		LXR		(Rhodes ve ark 2012)
hsa-miR-100-5p		EMT dönüşümü		(Daya ve ark 2013)
hsa-miR-130a-3p		İlaç direnci		(Ouyang ve ark 2014)
hsa-miR-424-5p				(Li ve ark 2014, Tormo ve ark 2015)

Çizelge 2.5 (Devam). Yüksek Kapasiteli Real-Time PCR Deneyinde Meme Kanseri

Onkogenik miRNA Primerleri ve Olası Hedef Genleri.

Onkogenik Metastaz <i>Supressing</i>				
hsa-miR-31-5p		Fzd3, ITGA5, M-RIP, MMP16, RDX, RhoA	integrin alpha(5) (<i>ITGA5</i>), radixin (<i>RDX</i>) and RhoA gibi prometastatik genlerin supresyonu ile kanser metastazın inhibisyonu	(Valastyan ve ark 2010, Lianhong ve ark 2012)
hsa-miR-7-5p		EGFR, PAK1	Kanser ile ilgili EGFR–PI3K–AKT sinyali azaltmak	(Lianhong ve ark 2012)
Onkogenik Metastaz <i>Promoting</i>				
hsa-miR-10b-5p		HOXD10	Hücre invazyonunu RhoC–AKT sinyal yolakında HOXD10 hedef tarafından teşvik edilmesi	(Yu ve ark 2010, Lianhong ve ark 2012)
hsa-miR-155-5p		Caspase 3, SOCS 1, RHOA	Apoptoz azaltılması ve TGF- β indüklediği EMT dönüşümünü teşvik edilmesi	(Lianhong ve ark 2012)
hsa-miR-21-5p		Bcl-2, PTEN, TPM1, PDCD4, Maspin	Apoptoz azaltılması ve hücre proliferasyonunun artırılması	(Lianhong ve ark 2012)
Meme Kanseri ile İlgileri Bilinmeyen miRNAlar				
hsa-miR-495-3p				
hsa-miR-181c-5p				
hsa-miR-181d-5p				
hsa-miR-186-5p				
hsa-miR-328-3p				
hsa-miR-130b-3p				

2.5.5.1. Özel Tasarım *Dynamic Array* Hazırlanması

Bu aşamada 6 ayrı basamak bulunmaktadır;

1. *Dynamic Array Chip*'in *PRIME* edilmesi,
2. *Assay Plate*'inin hazırlanması,
3. Örneklerin hazırlanması,
4. *Dynamic Array*'e pipetlemelerin yapılması,
5. *IFC Controller* da *Dynamic Array*'in *Load* edilmesi,
6. *Dynamic Array*'in BioMark cihazında real-time PCR işleminin gerçekleştirilmesidir.

2.5.5.1.1. *Dynamic Array*'in *PRIME* edilmesi

Bir adet *Dynamic Array Chip*'e, kontrol sıvıları enjekte edildi ve *Dynamic Array IFC Controller* cihazında *PRIME* işlemine alındı.

2.5.5.1.2. *Assay Plate*'inin Hazırlanması

Yüksek kapasiteli real-time PCR deneyleri için kullanılan hedef miRNA primerleri Çizelge 2.6. içerisinde yeralan bileşenlerden oluşan karışım ile sulandırıldı ve *Dynamic Array* chiplere yüklemeye hazır hale getirildi.

Çizelge 2.6. miRNA primerleri sulandırmak için kullanılan bileşenler.

PCR Universal Primer	180µl
2X Assay Loading Reagent	360 µl
DNase, RNase free water	180 µl
Toplam	720µl

Hazırlanan primer karışımı, 96'lık assay plakının tüm kuyularına, 8 kanallı otomatik pipetler yardımı ile 6.0 µl olacak şekilde dağıtıldı. Ardından primer plak 4-5 saniye ara verilerek 3 kez vortekslendi ve sonrasında santrifüjde 2 dakika santrifüj edildi.

2.5.5.1.3. Örneklerin Hazırlanması

Örneklerin hazırlanması için Çizelge 2.7. içerisinde yer alan bileşenler kullanılarak örnekler *Dynamic Array chip*e yüklemeye hazır hale getirildi.

Çizelge 2.7. Örneklerin hazırlanması için kullanılan bileşenler.

qPCR Master Mix	360 µl
20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (EvaGreen)	36 µl
DNase, RNase free water	84 µl
Toplam	480µl

Hazırlanan karışım 96 kuyuluk piko plak'a her kuyuda 4.0 µl olacak şekilde dağıtıldı. Karışımın üzerine dilüe edilmiş olan preamplifiye cDNA örneklerinden 2.0 µl eklenerek final hacmi 6.0 µl olarak ayarlandı. Plak film ile kapatıldı ve 3000 rpm'de 3 dakika plak karıştırıcıda karıştırılıp ardından santrifüj edildi. Bu işlemin devamında hazırlanan miRNA primerler ve preamplifiye olmuş ekzonukleaz aşamalarından geçirilmiş cDNA örnekleri, *PRIME* işlemi tamamlanan *dynamic array chip*in örnek ve *assay* kuyularına pipetlendi ve *dynamic array chip*, *IFC controller* cihazına tekrar yüklenerek *LOAD* işlemine geçildi. Bu aşamanın tamamlanması ile cihazdan alınan *dynamic array chip Fluidigm Biomark* real-time-PCR cihazına yüklenerek aşağıdaki programa alındı.

50°C'de 2 dakika
70°C'de 30 dakika
25°C'de 10 dakika
95°C'de 10 dakika
94°C'de 15 saniye
55°C'de 30 saniye
70°C'de 30 saniye

} 24 döngü

60°C- 95°C Melting curve

2.6. İstatistiksel Yöntemler

Proliferasyon deneyinde MCF-7 ve MDA-MB-435 hücrelerinin, değişik hücre sayılarındaki proliferasyonlarında farklılık olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Yapılan değerlendirme sonucunda aynı hücre hattındaki farklı hücre sayıları arasındaki değişiklik Tukey HSD testi ile analiz edildi.

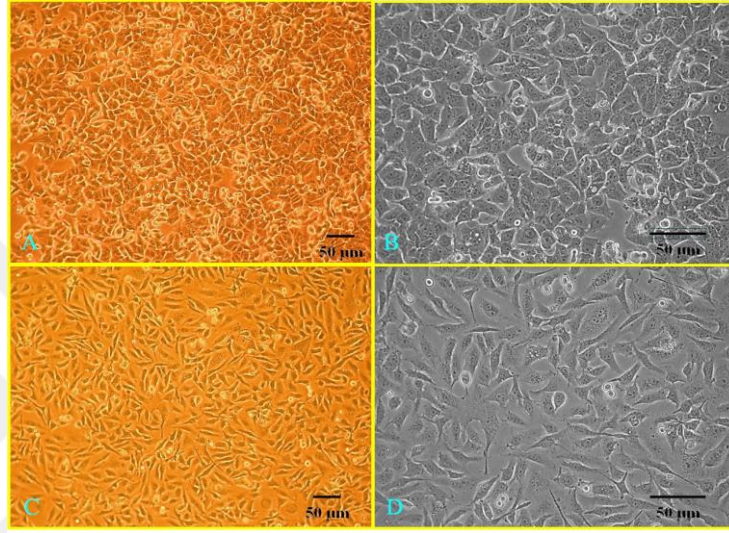
İnvazyon deneyinde, aynı hücre hattının kontrol grubu (matrijelsiz) na göre invazyon kapasitelerinin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılırken, iki hücre hattının birbirlerine olan invazyon oranlarının karşılaştırılmasında Tukey HSD istatistik yöntemi kullanıldı.

Her iki hücre hattının miRNA ekspresyonlarının quantitative PCR ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde karşılaştırmalı Ct yöntemi olan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Analiz istatistik yöntemi ve basic student t testleri kullanıldı (Livak ve Schmittgen 2001, Schmittgen ve Livak 2008). Deney sonuçlarının analizi *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) bilgisayar programı kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Hücrelerin Mikroskop Görüntüleri

MDA-MB-435 ve MCF-7 hücrelerinden miRNA içeren total RNA izolasyonları öncesinde hücrelerin resimleri inverted mikroskop ile çekildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. miRNA içeren total RNA İzolasyonu Yapılan Hücrelerin İnverted Mikroskop Görüntüleri.

A: MCF-7 hücreleri x 10

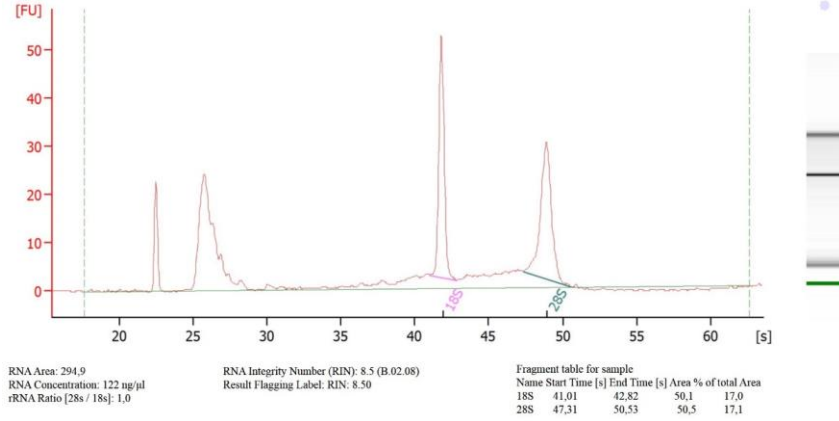
B: MCF-7 hücreleri x 20

C: MDA-MB-435 hücreleri x 10

D: MDA-MB-435 hücreleri x 20

3.2. miRNA İçeren Total RNA Miktar ve Analizi Sonucu

Her iki hücre hattından elde edilen miRNA içeren total RNA konsantrasyonları ve saflık oranları *Agilent Bioanalyzer* cihazı ile belirlendi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. miRNA içeren total RNA Konsantrasyon ve Safılık Oranı.

3.3. Proliferasyon Deney Sonuçları

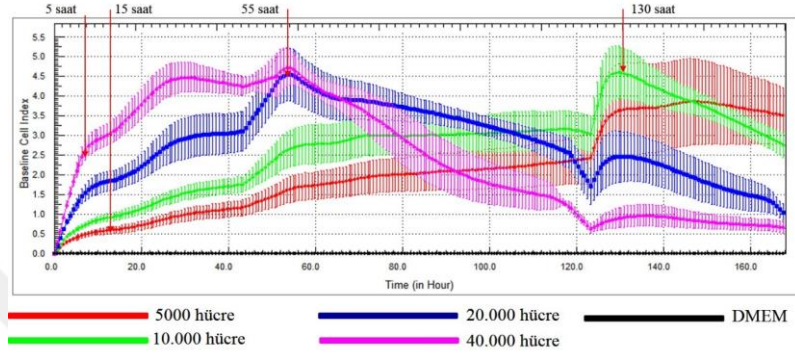
İnvaziv karakterli MDA-MB-435 ve minimal invaziv MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının proliferasyonları 5000, 10.000, 20.000, 40.000 hücre/kuyu olacak ve her grup 8 kuyu içerecek şekilde oluşturuldu. Eş zamanlı hücre ölçüm cihazı olan *xCELLigence* ile her 15 dakikada ölçüm alınarak hücrelerin proliferasyonları MCF-7 için 150 saat ve MDA-MB-435 içinse 196 saat boyunca izlendi.

Elde edilen sonuçlara göre; MCF-7 hücre indekslerinin, kuyucuklarda bulunan 5000, 10.000, 20.000 ve 40.000 hücre sayıları ile orantılı olarak istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 3.3.) .

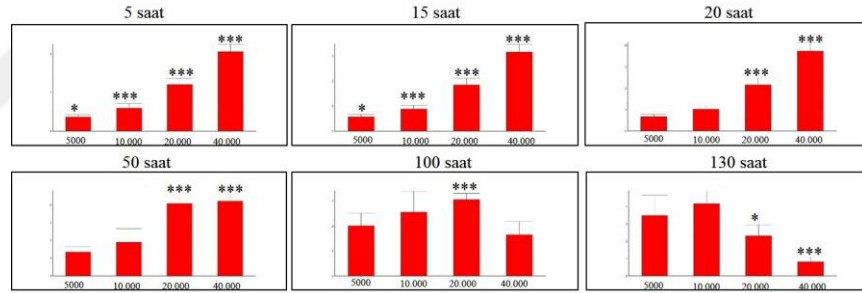
Her grupta bulunan hücre miktarlarının kuyulara hücre eklendikten sonra 25-30 saat arasında maksimum hücre miktarına ulaştığı belirlendi. Deney grupları olan 5000, 10.000, 20.000 ve 40.000 hücre/kuyucuk hücre indeks değerleri deney başlangıcından sırayla 0.5, 1, 3, 4 kat artış olarak tespit edildi.

Deneyin devamında 5000 ve 10.000 hücre/kuyucuk olan grupların hücre indeksleri minimum miktarları 15. saatte belirlenip maksimum değerlerine 130. saatte ulaştılar. 20.000 hücre/kuyucuk olan gruptaki hücreler minimum değerlerini 15. saatte gösterirken maksimum değerlerine 55. saatte vardılar. Bu grupların dışında 40.000 hücre/kuyucuk olan grup ilk 5 saat boyunca keskin bir artış gösterip 55. saatte plato değerine ulaştı.

Elde edilen cell indeks değerlerine göre yapılan değerlendirmeler sonucunda istatistiksel olarak 5000 ve 10.000 hücre/kuyucuk bulunan grupların proliferasyon için uygun sayı olduğu belirlenirken ($p<0.05$), 20.000 ve 40.000 hücre/kuyucuk bulunan grupların istatistiksel olarak proliferasyon için uygun hücre sayısı olmadığı belirlendi ($p>0.05$) (Şekil 3.4.).



Şekil 3.3. MCF-7 hücrelerinin xCELLigence sistem ile proliferasyon grafiği.



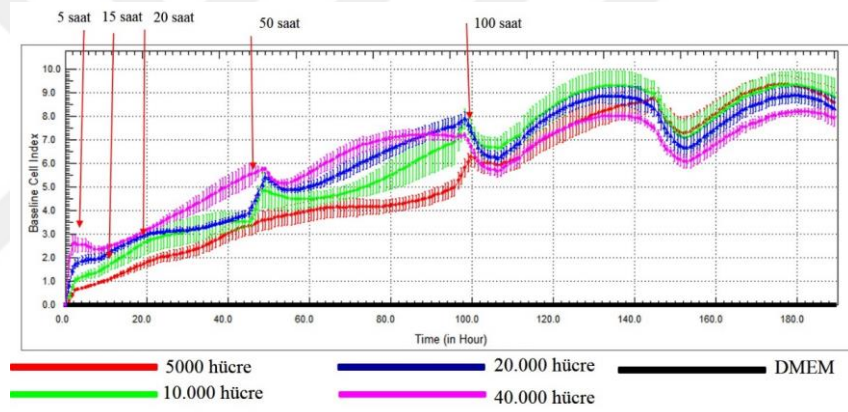
Şekil 3.4. MCF-7 hücrelerinin xCELLigence cell indeks değerleri, * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

MDA-MB-435 hücrelerinin cell indeks değerlerine göre yapılan değerlendirme sonucunda hücre indeksinin, kuyucuklarda bulunan 5000, 10.000, 20.000 ve 40.000 hücre sayıları ile orantılı olarak arttığını ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdi ($p<0.05$) (Şekil 3.5., Şekil 3.6.).

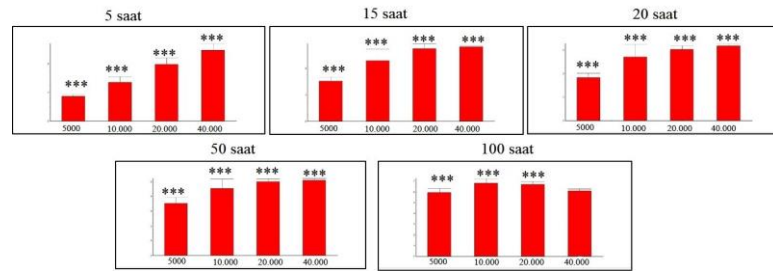
Her grupta bulunan hücre miktarlarının, kuyucuklara hücre eklendikten sonra 15-20 saat arasında maksimum miktara ulaştığı belirlendi. Deney grupları olan 5000, 10.000, 20.000 ve 40.000 hücre/kuyucuk gruplarının hücre indeks değerleri, deney başlangıcından itibaren sırayla 0.5, 1, 1.5, 2.5 kat artış olarak tespit edildi.

Deneyin devamında 5000 ve 10.000 hücre/kuyucuk olan grupların hücre indeksleri minimum miktarları 15. saatte belirlenirken maksimum değerlerine 100. saatte ulaşılar. 20.000 hücre/kuyucuk olan gruptaki hücreler minimum değeri 20. saatte maksimum değeri ise 100. saatte gösterdiler. Bu grupların aksine 40.000 hücre/kuyucuk olan grup ilk 5 saat boyunca keskin bir artış gösterip 50. saatte plato değerine ulaştı.

MCF-7 hücrelerinde olduğu gibi bu hücrelerde de 5000-10.000 hücre/kuyucuk gruplarının proliferasyon çalışmaları için uygun sayı olabileceği bununla birlikte 20.000 ve 40.000 hücre/kuyucuk gruplarının aynı çalışma için uygun sayı olamayacağı belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 3.5. MDA-MB-435 hücrelerinin xCELLigence sistem ile proliferasyon grafiği.



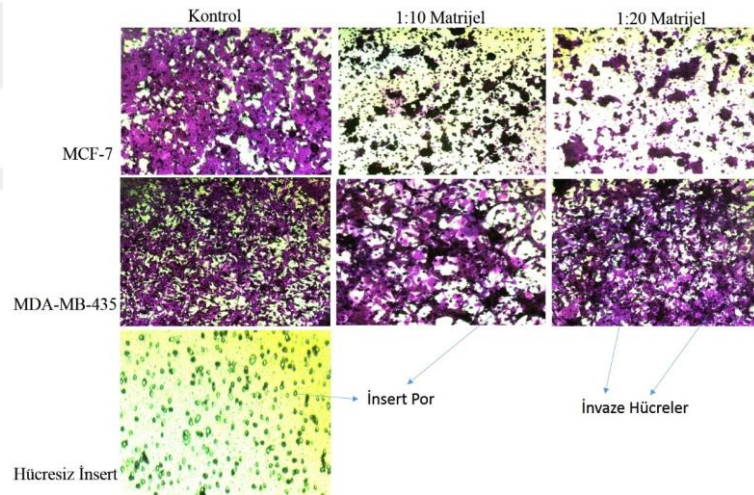
Şekil 3.6. MDA-MB-435 hücreleri xCELLigence cell indeks değerleri, $*p<0.05$ *** $p<0.001$.

3.4. İnvazyon Deney Sonuçları

3.4.1. HTS Transwell-96 Permeable Support Systems and Plates ile hücre invazyon deney sonuçları

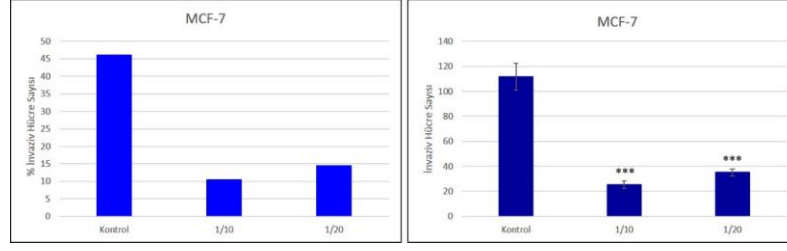
MCF-7 ve MDA-MB-435 hücrelerinin invazyon kapasiteleri farklı matrijel kalınlıkları kullanılarak geleneksel bir invazyon deneyi olan *boyden chamber* kullanılarak yapıldı.

Deney sonucunda MCF-7 hücrelerinde hem 1:10 hem de 1:20 kalınlıktaki matrijel içeren gruptaki invaziv hücre sayılarının, matrijel içermeyen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az olduğu belirlendi ($p<0.001$) (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. MCF-7 ve MDA-MB-435 hücrelerinin HTS Transwell Sistem ile invazyon sonuçları.

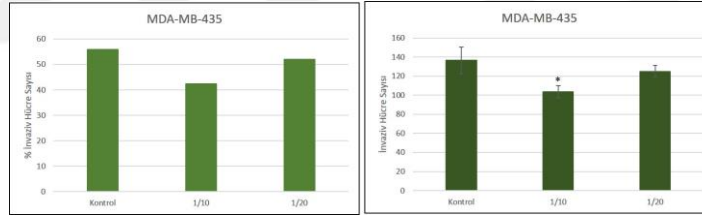
MCF-7 hücrelerinde her iki gruptaki invaze olan hücrelerin sayısı kontrol grubunun altında olmakla birlikte, bu oranın 1:10 grubunda yaklaşık 4 kat, 1:20 grubunda ise yaklaşık 3 kat daha az olduğu istatistiksel olarak belirlendi ($p<0.05$) (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. MCF-7 hücrelerinin farklı matrijel kalınlıklarındaki % invazyon ve invaziv hücre sayıları.

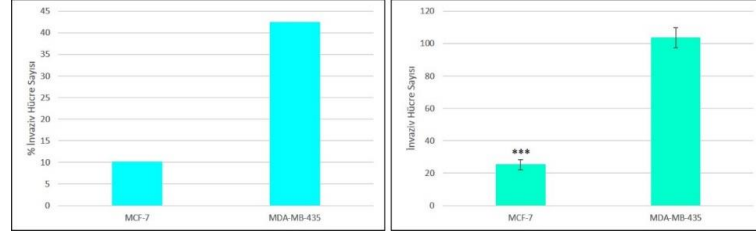
MDA-MB-435 hücrelerinden elde edilen invaziv hücre sonuçları da 1:10 matrijel kalınlığı bulunan gruptaki invaziv hücre sayısının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az olduğu ($p < 0.001$), 1:20 grubunda ise invaziv hücre sayısının kontrol grubuna göre daha yakın sayıda olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

MDA-MB-435 hücrelerinin invaziv hücre sayılarının kontrol grubuna göre kıyaslamasında ise bu oranın 1:10 kalınlıktaki matrijel grubunda 0.8 kat, 1:20 grubunda 0.91 kat olduğu tespit edildi (Şekil 3.9.).

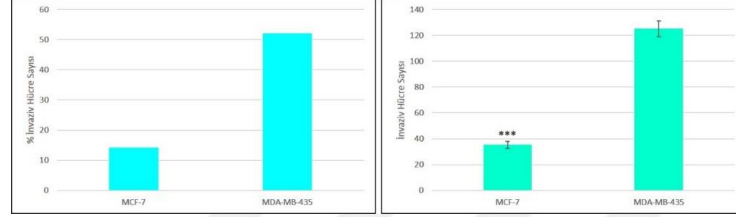


Şekil 3.9. MDA-MB-435 hücrelerinin farklı matrijel kalınlıklarındaki % invazyon ve invaziv hücre sayıları.

MCF-7 ve MDA-MB-435 hücrelerinin invazyon kapasitelerinin hem 1:10 hem de 1:20 matrijel kalınlıklarında kıyaslamaları sonucunda MDA-MB-435 hücrelerinin invazyonlarının MCF-7 hücrelerinden yaklaşık 3.5 kat daha fazla olduğu istatistiksel olarak belirlendi ($p < 0.001$) (Şekil 3.10., Şekil 3.11.).



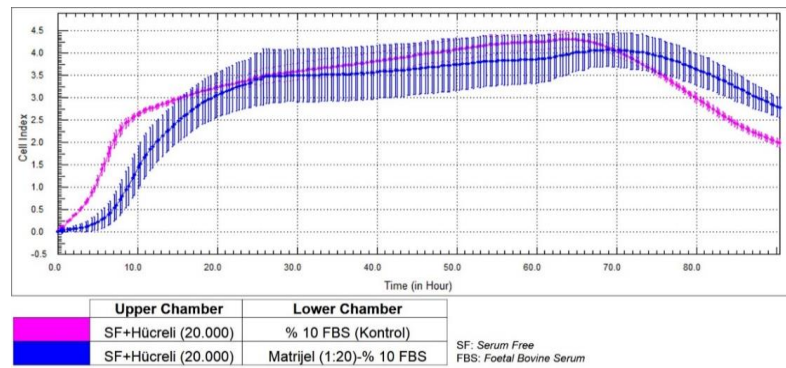
Şekil 3.10. MCF-7 ve MDA-MB-435 hücrelerinin 1:10 matrijelde % invazyon ve invaziv hücre oranları.



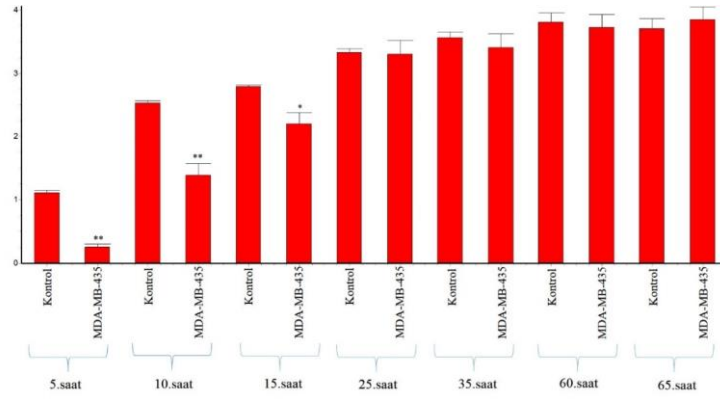
Şekil 3.11. MCF-7 ve MDA-MB-435 hücrelerinin 1:20 matrijelde % invazyon ve invaziv hücre oranları.

3.4.2. xCelligence Sistem ile Hücre İnvazyon Deney Sonuçları

Geleneksel yöntem ile yaptığımız invazyon deneyi sonucunda hücreler için uygun matrijel kalınlığı 1:20 olarak belirlendi. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı ile yapmış olduğumuz deney sonucunda MDA-MB-435 hücrelerinin sisteme eklenmelerinden sonra 5.saatten itibaren invazyonunu artırmaya başlayıp 25. saatte matrijel içermeyen kontrol grubuyla hemen hemen aynı hücre sayısına ulaştığı ve devam eden deney boyunca kontrol grubu ile aynı pateni koruduğu istatistiksel olarak belirlendi (Şekil 3.12., Şekil 3.13.).

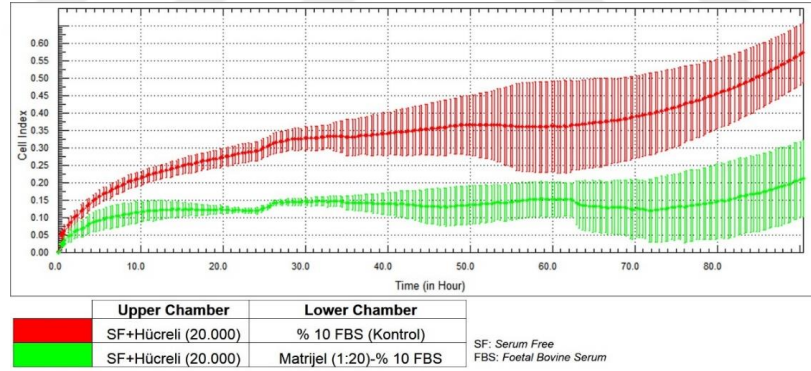


Şekil 3.12. MDA-MB-435 hücrelerinin 1:20 matrijelde xCELLigence ile invazyonları.

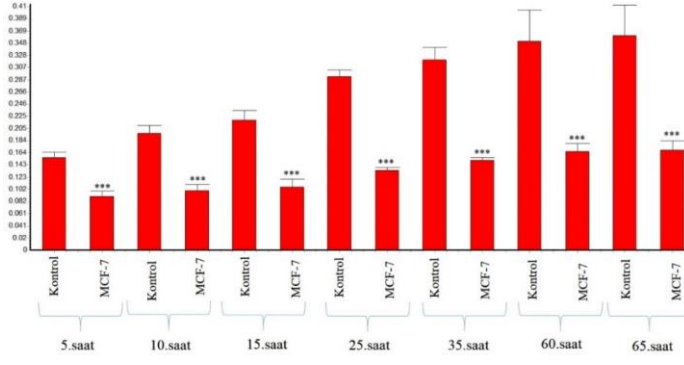


Şekil 3.13. MDA-MB-435 hücrelerinin farklı saatlerde *xCELLigence* ile invazyon oranları, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

MCF-7 hücrelerinin ise sisteme eklendikten sonra 5. saatte başlayan invazyon aktiviteleri ulaşabileceği en yüksek değere 28. saatte ulaşip matrijelsiz kontrol grubunun oldukça altında bir hücre sayısı ile grafik izlediği istatistiksel olarak tespit edildi (Şekil 3.14., Şekil 3.15.).

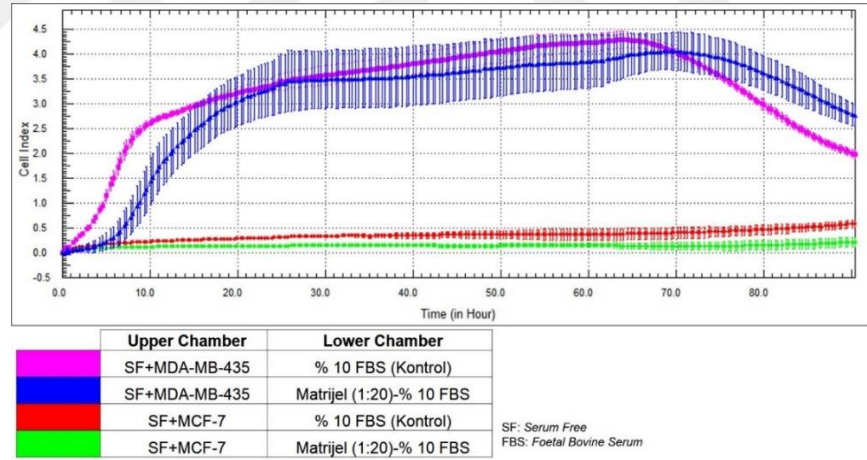


Şekil 3.14. MCF-7 hücrelerinin 1:20 matrijelde *xCELLigence* ile invazyonları.

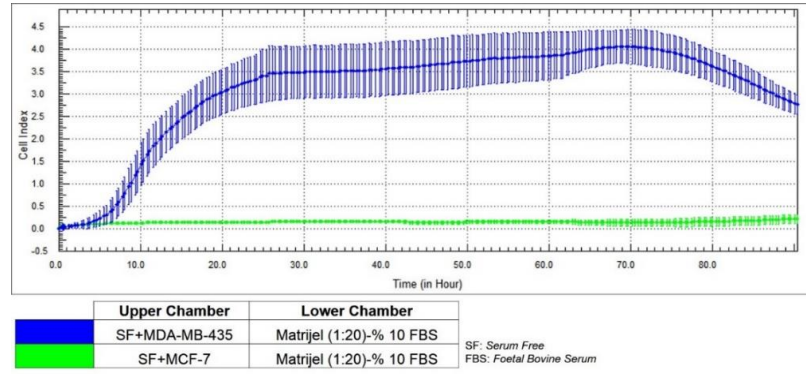


Şekil 3.15. MCF-7 hücrelerinin farklı saatlerde xCELLigence ile invazyon oranları, ***p<0.001.

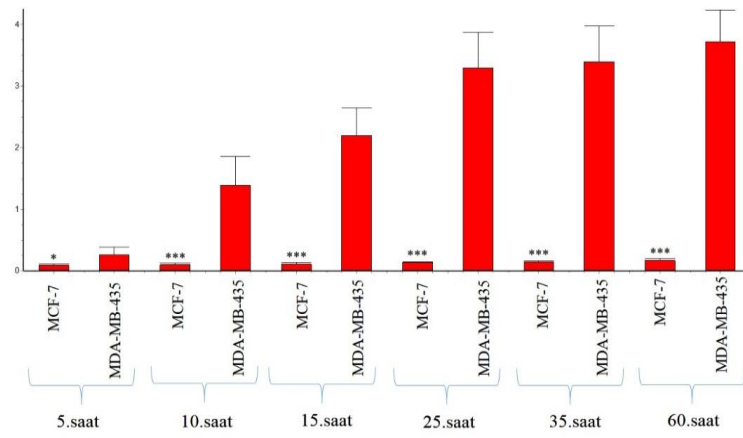
Her iki hücre hattının invaziv hücre sayılarının karşılaştırılması sonucunda da geleneksel *boyden chamber* yöntem ile elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerinden yaklaşık 3 kat daha yüksek invazyon kapasitesine sahip olduğu istatistiksel olarak belirlendi (p<0.001) (Şekil 3.16., Şekil 3.17., Şekil 3.18.).



Şekil 3.16. MDA-MB-435 ve MCF-7 hücrelerinin invazyon kapasitelerinin xCELLigence ile karşılaştırılması.



Şekil 3.17. MDA-MB-435 ve MCF-7 hücrelerinin matrijelli grupların invazyon kapasitelerinin *xCELLigence* ile karşılaştırılması.



Şekil 3.18. MDA-MB-435 ve MCF-7 hücrelerinin farklı saatlerde *xCELLigence* ile invazyon oranları, * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

3.5. Meme Kanseri Hücrelerinde Yüksek Kapasiteli Real-time PCR Deney Sonuçları

3.5.1. MCF-7 Hücrelerinin miRNA Ekspresyon Profilleri

MCF-7 hücrelerinin 2, 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerinde izole edilen total RNAlarının miRNA ekspresyonları yüksek kapasiteli real-time PCR cihazı ile çalışıldı.

Deney kapsamında her bir örnek için 84 adet meme kanserine spesifik miRNA primerleri test edildi. Elde edilen sonuçlar ile 4. saatte; 3 adet miRNA ekspresyonunun değişkenlik gösterdiği bunların 2 tanesinin onkogenik miRNA (hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-7-5p) ve 1 tanesinin de tümör baskılayıcı miRNA (hsa-miR-199a-5p) olduğu belirlendi. Elde edilen verilerle bu miRNAların hsa-miR-18a-

5p'nin (-2,0166; p<0,0001), hsa-miR-7-5p'nin (-2,1263; p<0,001), hsa-miR-199a-5p'nin (-2,1064; p<0,044) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat azaldıkları belirlendi (Çizelge 3.1.), (Şekil 3.19., Şekil 3.20.).

Diğer deney grubu olan 6. saatte 26 adet miRNA ekspresyon farklılığı belirlenip bunlardan 15 tanesinin onkogenik, 10 tanesinin tümör baskılayıcı ve 1 tanesinin de meme kanseri ile olan bağlantısının bilinmediği miRNA yer almaktadır. Bu saatte tespit edilen bütün miRNAların azalan ifadelerine karşın 1 adet tümör baskılayıcı miRNA'nın artan ekspresyonu belirlendi. Onkogenik miRNAlardan olan hsa-miR-140-5p'nin (-2,2683; p<0,0005), hsa-miR-18a-5p'nin (-2,6988; p<0,00003), hsa-miR-19a-3p'nin (-2,3267; p<0,00009), hsa-miR-19b-3p'nin (-2,312; p<0,00003), hsa-miR-20b-5p'nin (-2,0214; p<0,000004), hsa-miR-21-5p'nin (-2,0563; p<0,0008), hsa-miR-22-3p'nin (-2,0802; p<0,0003), hsa-miR-27b-3p'nin (-2,1164; p<0,000003), hsa-miR-29a-3p'nin (-2,2273; p<0,0001), hsa-miR-29b-3p'nin (-2,7499; p<0,000008), hsa-miR-29c-3p'nin (-2,2051; p<0,00014), hsa-miR-424-5p'nin (-2,9691; p<0,00008), hsa-miR-429'nin (-2,088; p<0,0000007), hsa-miR-7-5p'nin (-2,0257; p<0,0001), hsa-miR-96-5p'nin (-3,3386; p<0,0001) ve tümör baskılayıcı miRNAlardan hsa-miR-141-3p'nin (-2,4255; p<0,000009), hsa-miR-148a-3p'nin (-2,2903; p<0,0002), hsa-miR-152-3p'nin (-2,0381; p<0,0006), hsa-miR-15a-5p'nin (-2,1542; p<0,00001), hsa-miR-16-5p'nin (-2,4966; p<0,001), hsa-miR-17-5p'nin (-2,199; p<0,001), hsa-miR-199a-5p'nin (-2,1674; p<0,002), hsa-miR-195-5p'nin (-2,1842; p<0,0001), hsa-miR-200a-3p'nin (-2,3433; p<0,00001) ve meme kanseri ile fonksiyonu net olarak bilinmeyen hsa-miR-186-5p'nin (-2,2683; p<0,00002) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat azalırken tümör baskılayıcı miRNAlardan hsa-miR-204-5p'nin (6,8711; p<0,05) 2. saatteki ekspresyonuna göre en az 2 kat artış gösterdiği belirlendi. Bu hücre hattında en fazla miRNA gen ifadesi çeşitliliğinin 6. saatte olduğu anlaşıldı (Çizelge 3.1.), (Şekil 3.19., Şekil 3.20.).

Deney sonuçlarından 12. saatinde ise 5 adet miRNA farklı seviyelerde ekspresyon gösterip bunların 2 tanesi onkogenik miRNA (hsa-miR-100-5p, hsa-miR-485-5p) olup artış yönünde 3 tanesi tümör baskılayıcı miRNA olup 2 tanesinin artış (let-7f-5p, hsa-miR-214-3p), 1 tanesinin azalış (hsa-miR-199a-5p) yönünde patern izlediği tespit edildi. Böylece hsa-miR-100-5p'nin (2,0112; p<0,004), hsa-

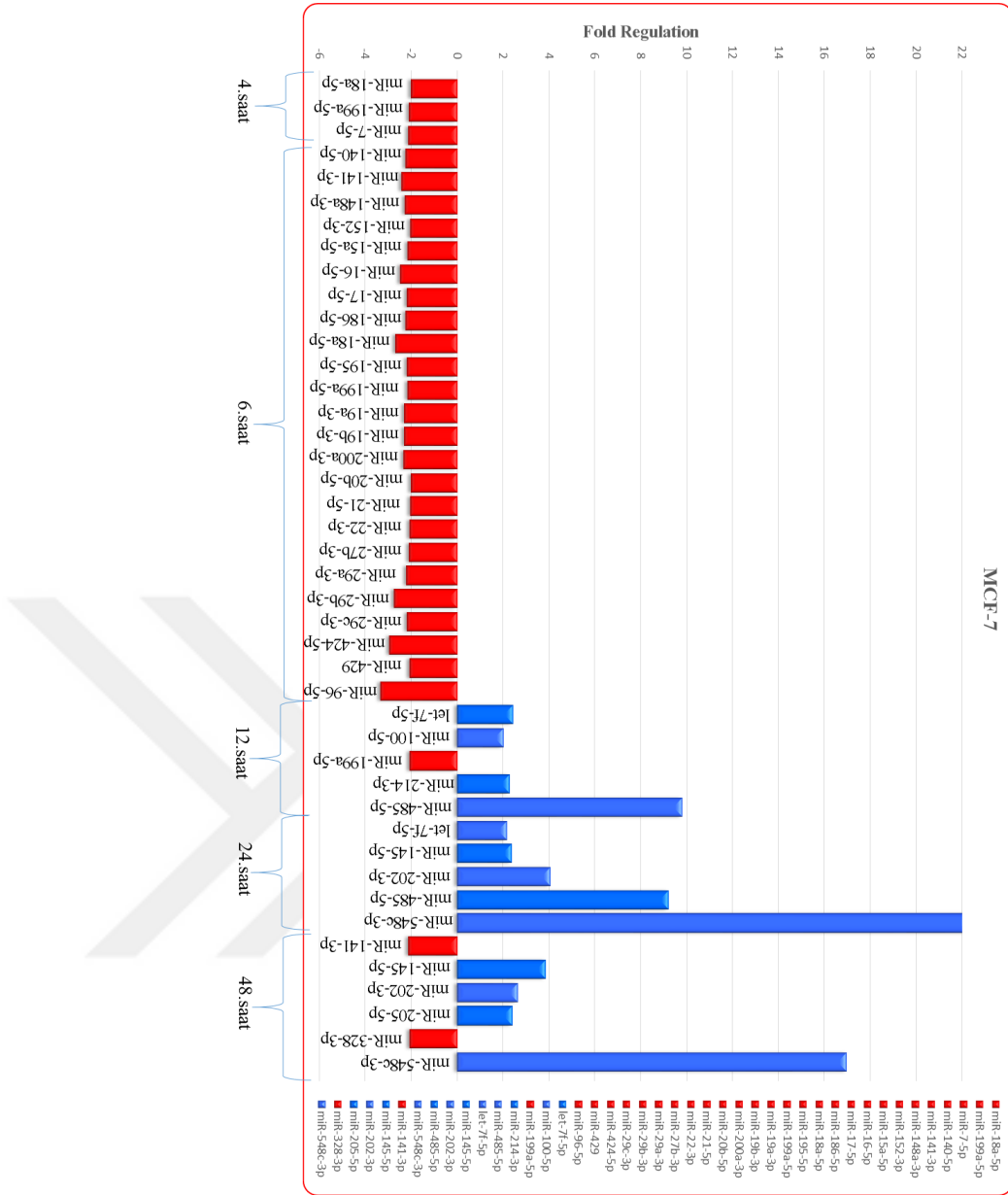
miR-485-5p'nin (9,7816; $p<0,001$), let-7f-5p (2,4085; $p<0,001$), , hsa-miR-214-3p'nin (2,2777; $p<0,003$) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat arttıkları ve hsa-miR-199a-5p'nin (-2,0691; $p<0,002$) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat azaldıkları tespit edildi (Çizelge 3.1), (Şekil 3.19., Şekil 3.20.).

Araştırmanın 24. saatinde 1 tanesi onkogenik (hsa-miR-485-5p) ve 4 tanesi tümör baskılayıcı (let-7f-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-202-3p, hsa-miR-548c-3p) olmak üzere 5 adet miRNA farklı düzeyde ekspresyon gösterdi. Böylece hsa-miR-485-5p'nin (9,1982; $p<0,002$), let-7f-5p (2,1502; $p<0,001$), hsa-miR-145-5p'nin (2,3723; $p<0,0009$), hsa-miR-202-3p'nin (4,0369; $p<0,001$), hsa-miR-548c-3p'nin (22,2458; $p<0,007$) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat arttıkları belirlendi (Çizelge 3.1.), (Şekil 3.19., Şekil 3.20.).

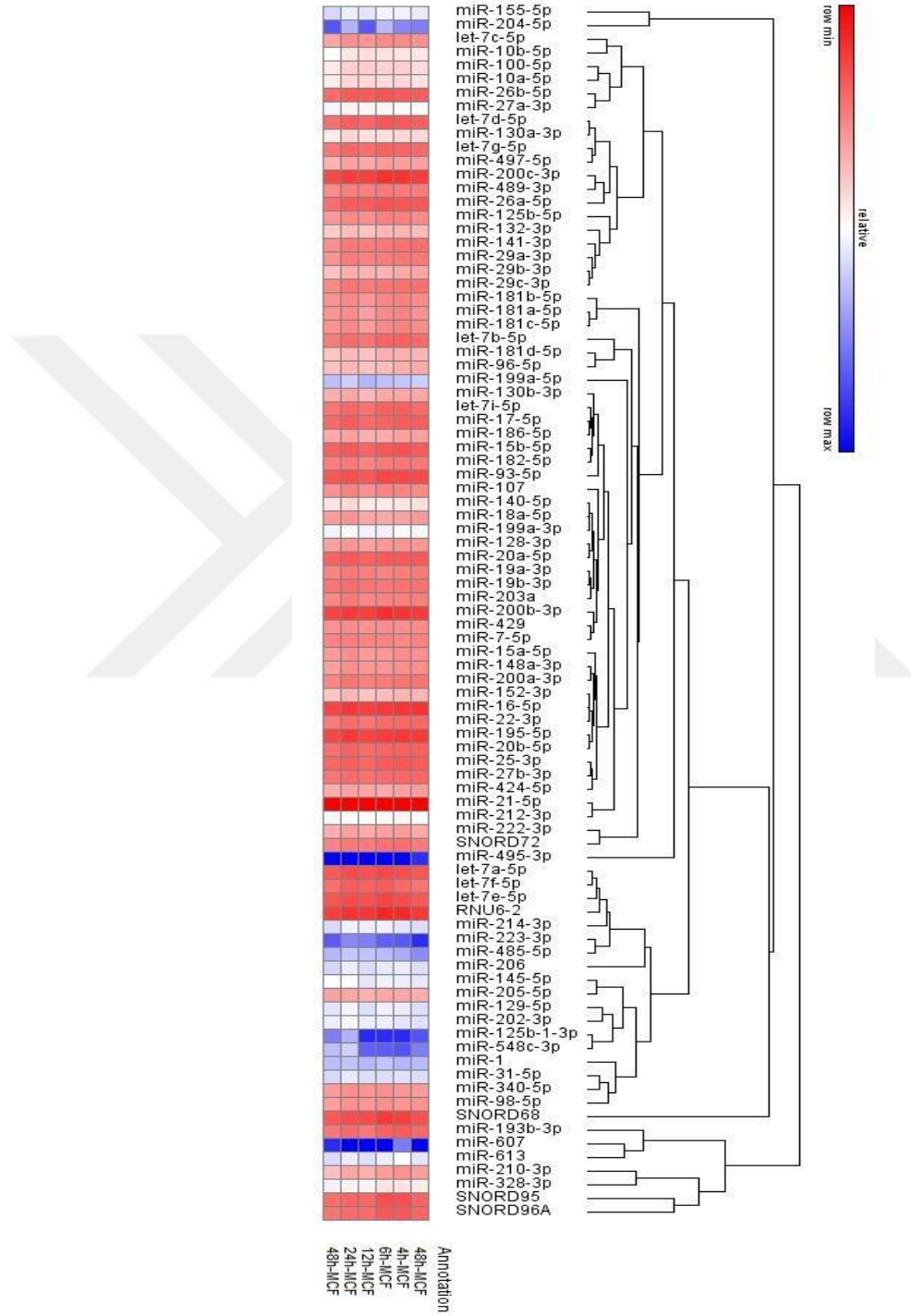
Sonuçların 48. saatinde ise 5 tanesi tümör baskılayıcı (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-202-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-141-3p) 1 tanesi meme kanseri ile olan bağlantısı net olmayan (hsa-miR-328-3p) toplam 6 adet miRNA farklı seviyelerde sonuç verdi. Bunlardan tümör baskılayıcı olanların 4 tanesi artış yönünde 1 tanesi azalış yönünde sonuç verdi. Elde edilen sonuçlara göre hsa-miR-145-5p'nin (3,8476; $p<0,01$), hsa-miR-202-3p'nin (2,6273; $p<0,03$), hsa-miR-205-5p'nin (2,3936; $p<0,001$), hsa-miR-548c-3p'nin (16,9868; $p<0,01$) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat arttıkları tespit edilirken 48. saatte hsa-miR-141-3p'nin (-2,1475; $p<0,00001$), hsa-miR-328-3p'nin (-2,0824; $p<0,00003$) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat azaldığı sonucu elde edildi (Çizelge 3.1.), (Şekil 3.19., Şekil 3.20.).

Çizelge 3.1. MCF-7 hücrelerinde farklı saatlerde ekspresyonu belirlenen tümör baskılayıcı ve onkogenik miRNAlar.

4. Saat	Tümör Baskılayıcı	Bilinmiyor	6. Saat	Tümör Baskılayıcı	Bilinmiyor	12. Saat	Tümör Baskılayıcı	Bilinmiyor	24. Saat	Tümör Baskılayıcı	Bilinmiyor	48. Saat	Tümör Baskılayıcı	Bilinmiyor
Onkogenik			Onkogenik			Onkogenik			Onkogenik			Onkogenik		
miR-18a-5p	miR-199a-5p		miR-140-5p	miR-148a-3p	miR-186-5p	miR-485-5p	miR-199a-5p		miR-485-5p	let-7f-5p		miR-145-5p		miR-328-3p
miR-7-5p			miR-18a-5p	miR-152-3p		miR-100-5p	let-7f-5p		let-7f-5p	miR-145-5p		miR-202-3p		
			miR-19a-3p	miR-15a-5p			miR-214-3p		miR-214-3p	miR-548c-3p		miR-205-5p		
			miR-19b-3p	miR-16-5p								miR-548c-3p		
			miR-20b-5p	miR-17-5p								miR-141-3p		
			miR-21-5p	miR-195-5p										
			miR-22-3p	miR-199a-5p										
			miR-27b-3p	miR-200a-3p										
			miR-29a-3p	miR-141-3p										
			miR-29b-3p	hsa-miR-204-5p										
			miR-429											
			miR-7-5p											
			miR-96-5p											
			miR-424-5p											
			miR-29-c											



Şekil 3.19. MCF-7 hücrelerinin 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerdeki 2. saate göre artış ve azalış *fold regulation* oranları.



Şekil 3.20. MCF-7 hücrelerinin *heat map* analiz sonuçları.

3.5.2. MDA-MB-435 Hücrelerinin miRNA Profili

MDA-MB-435 hücrelerinden farklı zamanlarda (2, 4, 6, 12, 24 ve 48. saat) elde edilen miRNA içeren total RNAları da MCF-7 hücrelerinden elde edilen RNAlar ile eş zamanlı olarak yüksek kapasiteli real-time PCR cihazı ile çalışıldı.

Aynı deney seti içerisinde her örnek için 84 adet meme kanserine özel primerlerin gen ifade düzeyleri belirlendi. Bu bulgulara göre 4. saatte; 5 adet miRNA'nın farklı düzeylerde ekspresyon sergileyip tümör baskılayıcı grup içerisinde yerel olarak artan *fold regulation*ları tespit edildi. Buna göre; hsa-miR-141-3p'nin (4,6191; $p<0,0002$), hsa-miR-200c-3p'nin (2,0502; $p<0,0001$), hsa-miR-203a'nın (13,7375; $p<0,02$), hsa-miR-205-5p'nin (21,2947; $p<0,002$), hsa-miR-489-3p'nin (2,327; $p<0,03$) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat arttığı belirlendi (Çizelge 3.2., Şekil 3.21., Şekil 3.22.).

Deneyin devam eden saatlerinden 6. saatte 2. saatteki miRNA ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmedi (Çizelge 3.2.).

Araştırmanın 12. saatinde ise 6 adet miRNA farklı düzeyde ekspresyon gösterip tümör baskılayıcı grup içerisinde yer alan bu miRNAların 3 tanesinin artan 3 tanesinin azalan *fold regulation*ları elde edildi. Bu miRNAların ise let-7d-5p'nin (-2,162; $p<0,00005$), let-7g-5p'nin (-2,2805; $p<0,001$), let-7i-5p'nin (-2,4365; $p<0,0005$) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat azalırken; hsa-miR-141-3p'nin (4,0221; $p<0,01$), hsa-miR-203a'nın (15,6604; $p<0,004$), hsa-miR-205-5p'nin (21,2564; $p<0,004$) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat arttığı belirlendi (Çizelge 3.2., Şekil 3.21., Şekil 3.22.).

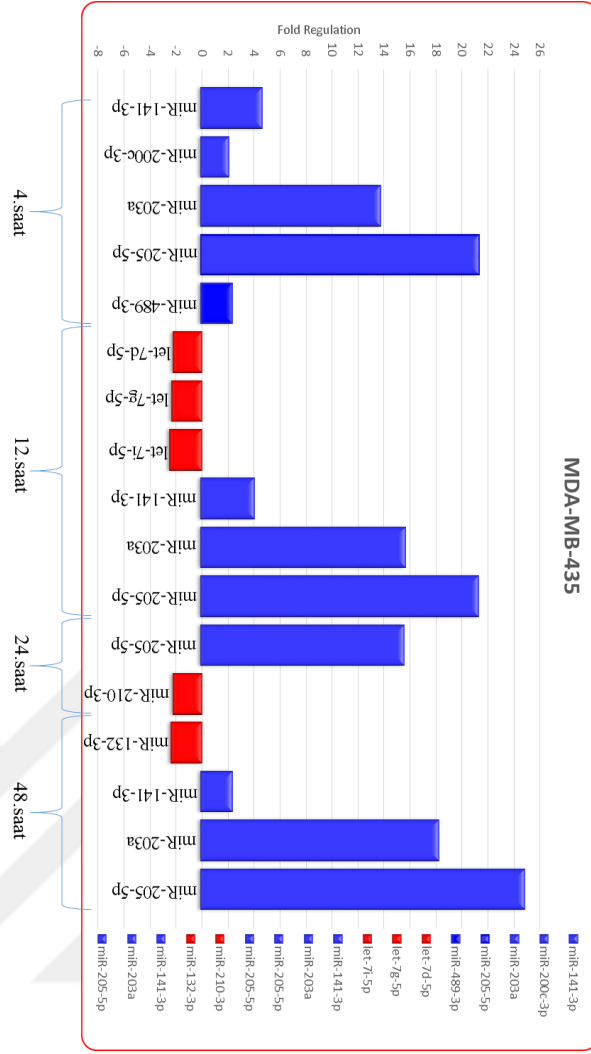
24. saatte 2 adet farklı miRNA belirlenip bunlardan onkogenik hedef olanın artan (tümör baskılayıcı miRNA, hsa-miR-205-5p) ve tümör baskılayıcı hedefi (onkomir, hsa-miR-210-3p) olanın ise azalan ekspresyonları belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre hsa-miR-205-5p'nin (15,516; $p<0,027$) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat arttığı; hsa-miR-210-3p'nin (-2,1716; $p<0,04$) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat azaldığı tespit edildi (Çizelge 3.2., Şekil 3.21., Şekil 3.22.).

Yapılan değerlendirmeler sonucunda 48. saatte 4 adet miRNA farklı düzeylerde ekspresyon gösterip onkomir (hsa-miR-132-3p, hsa-miR-205-5p) olanların 1 tanesinin artan 1 tanesinin azalan ekspresyonu elde edilirken, tümör baskılayıcı miRNA (hsa-miR-141-3p, hsa-miR-203a)'ların 2. saatteki ekspresyonlarına göre artan sonuçları elde edildi. Böylece hsa-miR-132-3p'nin (-2,3129; $p<0,005$) 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat azalırken; hsa-miR-205-5p'nin (24,7936; $p<0,0003$), hsa-miR-141-3p (2,302; $p<0,02$), hsa-miR-203a'nin (18,2111; $p<0,000001$)'nin 2. saatteki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat arttığı belirlendi (Çizelge 3.2., Şekil 3.21., Şekil 3.22.).

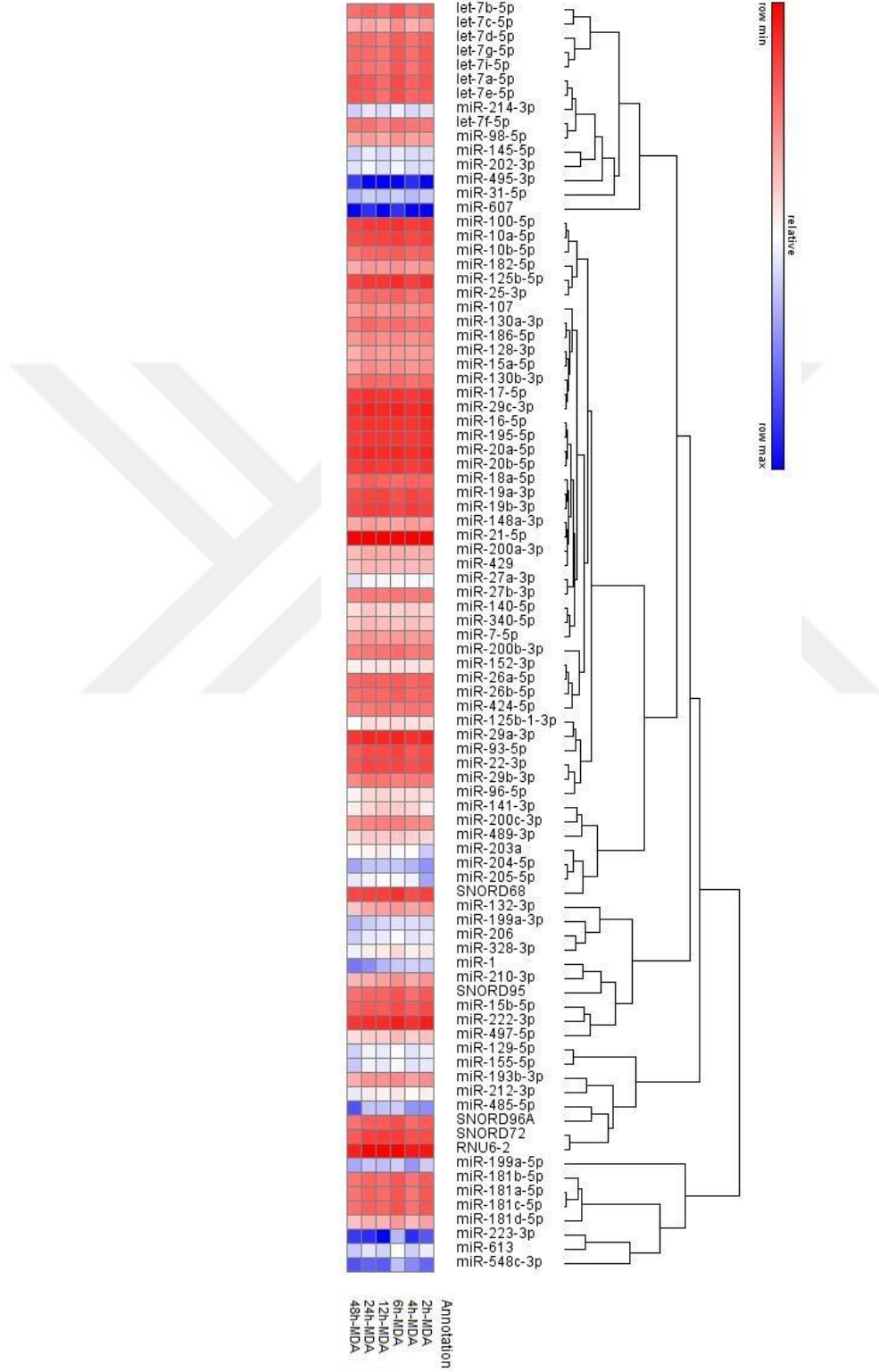


Çizelge 3.2. MDA-MB-435 hücrelerinde farklı saatlerde ekspresyonu belirlenen tümör baskılayıcı ve onkogenik miRNAlar.

4. Saat			6. Saat			12. Saat			24. Saat			48. Saat		
Onkogenik	Tümör Baskılayıcı	Bilinmiyor	Onkogenik	Tümör Baskılayıcı	Bilinmiyor	Onkogenik	Tümör Baskılayıcı	Bilinmiyor	Onkogenik	Tümör Baskılayıcı	Bilinmiyor	Onkogenik	Tümör Baskılayıcı	Bilinmiyor
	miR-200c-3p					let-7d-5p			miR-210-3p	miR-205-5p		miR-132-3p	miR-141-3p	
	miR-203a					let-7g-5p								
	miR-205-5p	↑				let-7i-5p						miR-205-5p	miR-203-3a	
	miR-141-3p					miR-203a								
	miR-489-3p					miR-205-5p	↑							
						miR-141-3p								



Şekil 3.21. MDA-MB-435 hücrelerinin 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerdeki 2. saate göre artış ve azalış *fold regulation* oranları.



Şekil 3.22. MDA-MB-435 hücrelerinin *heat map* analiz sonuçları.

3.5.3. MDA-MB-435 ve MCF-7 Hücrelerinin Karşılaştırmalı miRNA Profilleri

Deneyin 2. saatinde, MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre miRNA ekspresyonlarının kıyaslanması sonucunda 31 adet miRNA (15 onkogenik+10 tümör baskılayıcı+6 bilinmiyor) en az 2 kat artış, 9 adet miRNA (2 onkogenik+ 7 tümör baskılayıcı) en az 2 kat olmak üzere azalış göstererek toplamda 40 adet miRNA göreceli farklı ekspresyon gösterdi (Şekil 3.23., Çizelge 3.3.).



Çizelge 3.3. MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 2.saat miRNA *fold regulation* en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miRNA	FoldRegulation	P Değeri
	Artış	
miR-100-5p	632,8001	0,000001
miR-10b-5p	241,4156	0,00034
miR-130a-3p	92,2315	0,000778
miR-125b-5p	40,0342	0,000015
miR-130b-3p	15,4179	0,001112
miR-181a-5p	12,0146	0,002337
miR-18a-5p	10,1468	0,000001
miR-181c-5p	10,8402	0,002049
miR-19a-3p	8,7402	0,001175
miR-181b-5p	8,4839	0,000704
miR-19b-3p	8,0442	0,001342
miR-29b-3p	7,3929	0,000024
miR-17-5p	6,9171	0,000147
miR-132-3p	6,4512	0,000063
miR-1	5,5923	0,008296
miR-129-5p	4,8301	0,001296
miR-22-3p	4,8029	0,000052
miR-186-5p	4,4935	0,000001
miR-206	4,1579	0,002833
miR-181d-5p	3,8589	0,001094
miR-212-3p	3,7825	0,000031
miR-214-3p	3,0386	0,000607
miR-140-5p	2,9564	0,034116
let-7g-5p	2,7364	0,000651
miR-199a-5p	2,7236	0,013392
miR-210-3p	2,6177	0,02548
miR-15b-5p	2,5517	0,000196
miR-328-3p	2,4979	0,022896
miR-155-5p	2,4758	0,001402
let-7i-5p	2,4633	0,00078
let-7b-5p	2,2269	0,000222

Çizelge 3.3 (Devam). MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 2.saat miRNA *fold regulation* en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

	Azalış	
miR-203a	-331,0291	0,000079
miR-489-3p	-15,3447	0,000023
miR-200c-3p	-11,0111	0,00042
miR-200b-3p	-5,6567	0,000774
miR-200a-3p	-5,0447	0,000002
miR-96-5p	-3,461	0,001156
miR-193b-3p	-2,5496	0,002692
miR-340-5p	-2,5013	0,016046
miR-152-3p	-2,124	0,000641
SNORD61	1	0,00001

Her iki hücre hattının 4. saat miRNA ekspresyon sonuçlarına bakıldığı zaman 47 adet miRNA'nın (24 onkogenik+ 15 tümör baskılayıcı+ 8 bilinmeyen) istatistiksel olarak anlamlı en azı 2 kat olmak üzere artış gösterdiği ($p < 0.05$), 7 adet miRNA'nın (tümör baskılayıcı) istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat olmak üzere azalış gösterdiği belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 3.23., Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 4.saat miRNA *fold regulation* en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miRNA	Fold Regulation	P Değeri
Artış		
miR-100-5p	1032,1942	0,003596
miR-10a-5p	912,0328	0,002802
miR-10b-5p	536,6068	0,002267
miR-222-3p	223,4991	0,000765
miR-130a-3p	181,8987	0,000036
miR-29a-3p	65,388	0,003471
miR-29c-3p	53,8324	0,001857
miR-125b-5p	50,2736	0,000248
miR-18a-5p	45,4602	0,009245

Çizelge 3.4 (Devam). MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 4.saat miRNA *fold regulation* en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miR-19a-3p	43,2286	0,034015
miR-204-5p	39,8911	0,028008
miR-19b-3p	35,8508	0,029604
miR-130b-3p	30,9788	0,000088
miR-29b-3p	29,7498	0,012499
miR-424-5p	25,0852	0,010959
miR-1	18,8754	0,005689
miR-20a-5p	18,1858	0,006415
miR-20b-5p	17,3541	0,002549
miR-17-5p	15,7237	0,002111
miR-140-5p	13,5342	0,030292
miR-22-3p	10,6551	0,001717
miR-186-5p	9,5399	0,004206
miR-181a-5p	8,3805	0,000006
miR-181b-5p	8,0602	0,000148
miR-181c-5p	8,5648	0,000008
miR-132-3p	8,9812	0,001024
miR-212-3p	5,3734	0,002646
miR-129-5p	5,1621	0,007561
miR-206	4,8897	0,022325
miR-195-5p	4,2957	0,011191
miR-328-3p	4,2807	0,02356
miR-16-5p	4,2415	0,014492
miR-181d-5p	3,9348	0,001871
miR-21-5p	3,6906	0,04268
miR-15a-5p	3,6788	0,015439
miR-155-5p	3,6305	0,03001
miR-128-3p	3,6096	0,02052
miR-148a-3p	3,4795	0,039194
miR-107	2,7379	0,018647
miR-26a-5p	2,5663	0,041403
miR-93-5p	2,4554	0,003217
let-7i-5p	2,3326	0,01943

Çizelge 3.4 (Devam). MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 4.saat miRNA fold regulation en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

let-7g-5p	3,2567	0,029636
let-7b-5p	2,2354	0,004903
miR-210-3p	2,1421	0,000212
Azalış		
miR-203a	-14,4217	0,000913
miR-205-5p	-7,7324	0,000225
miR-141-3p	-6,4123	0,00003
miR-200c-3p	-4,7074	0,000187
miR-489-3p	-4,2285	0,00063
miR-193b-3p	-2,8774	0,000053
miR-200b-3p	-2,8609	0,000722
SNORD61	1	0,00001

Deneyin 6. saatinde izole edilen RNAların kıyaslanması sonucunda MDA-MB-435 hücrelerinde 38 adet miRNA'nın (20 onkogenik+ 12 tümör baskılayıcı+ 6 bilinmeyen) MCF-7 hücrelerindeki ekspresyonlarına göre istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat olmak üzere artış gösterirken ($p < 0.05$), 9 adet miRNA'nın (tümör baskılayıcı) istatistiksel olarak en az 2 kat olmak üzere anlamlı azalış olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 3.23., Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 6.saat miRNA fold regulation en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miRNA	Fold Regulation	P Değeri
Artış		
miR-10a-5p	533,0718	0,000176
miR-100-5p	515,8601	0,000253
miR-10b-5p	209,7599	0,000169
miR-130a-3p	103,0014	0,000001
miR-29a-3p	39,6693	0,000002

Çizelge 3.5 (Devam). MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 6.saat miRNA fold regulation en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miR-125b-5p	33,8266	0,000204
miR-29c-3p	31,543	0,000065
miR-130b-3p	17,1728	0,000011
miR-18a-5p	14,3961	0,00504
miR-181b-5p	12,8474	0,000018
miR-181c-5p	12,3787	0,000041
miR-19a-3p	10,4507	0,003065
miR-424-5p	9,8736	0,00356
miR-19b-3p	9,6323	0,00181
miR-181b-5p	9,2927	0,000004
miR-20a-5p	9,1567	0,000683
miR-17-5p	8,9068	0,000115
miR-20b-5p	8,3594	0,000187
miR-22-3p	6,718	0,000001
miR-132-3p	6,0492	0,000071
miR-186-5p	5,6727	0,000143
miR-140-5p	5,1554	0,003016
miR-485-5p	4,7019	0,015917
miR-212-3p	4,3703	0,000003
miR-181d-5p	4,2925	0,000207
miR-204-5p	4,2021	0,028065
miR-199a-5p	4,1698	0,00009
miR-129-5p	3,8487	0,001093
miR-328-3p	3,4258	0,000007
miR-1	3,1916	0,036054
miR-155-5p	3,0841	0,000821
miR-202-3p	2,9874	0,021322
miR-210-3p	2,9544	0,005511
let-7b-5p	2,7171	0,000106
miR-15a-5p	2,4928	0,002221
miR-15b-5p	2,4934	0,000001
let-7g-5p	2,4741	0,00001
let-7i-5p	2,264	0,001085

Çizelge 3.5 (Devam). MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 6.saat miRNA fold regulation en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miR-214-3p	2,2382	0,004071
	Azalış	
miR-203a	-48,4287	0,00002
miR-205-5p	-15,5232	0,000011
miR-141-3p	-11,5167	0,000004
miR-200c-3p	-8,9187	0,000001
miR-489-3p	-7,9195	0,000072
miR-200b-3p	-5,3891	0,000002
miR-340-5p	-3,2285	0,004374
miR-429	-2,3718	0,000652
miR-193b-3p	-2,0945	0,019045
SNORD61	1	0,00001

Devam eden deney gruplarında 12. saatte MDA-MB-435 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre 30 adet miRNA (17 onkogenik+ 7 tümör baskılayıcı+ 6 bilinmeyen) istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat olmak üzere artış gösterirken ($p<0.05$), 9 adet miRNA (tümör baskılayıcı) istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat azalış gösterdi ($p<0.05$) (Şekil 3.23., Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.6. MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 12.saat miRNA fold regulation en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miRNA	Fold Regulation	P Değeri
	Artış	
miR-10a-5p	350,335	0,000002
miR-100-5p	315,2428	0,000012
miR-130a-3p	87,6607	0,000249
miR-29a-3p	32,9408	0,000004
miR-29c-3p	28,5446	0,000004
miR-130b-3p	23,4944	0,000003
miR-29b-3p	15,8566	0,001189

Çizelge 3.6 (Devam). MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 12.saat miRNA fold regulation en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miR-19a-3p	12,12	0,000002
miR-19b-3p	11,2243	0,000005
miR-181a-5p	10,3211	0,000071
miR-181c-5p	9,7907	0,000091
miR-17-5p	9,5266	0,000001
miR-22-3p	7,4849	0,000001
miR-181b-5p	6,4358	0,000232
miR-186-5p	5,0986	0,000001
miR-140-5p	4,4322	0,000002
miR-199a-5p	3,7369	0,000037
miR-206	3,6786	0,000196
miR-212-3p	3,6491	0,000552
miR-129-5p	3,5843	0,000486
miR-181d-5p	3,0444	0,000017
miR-210-3p	2,8902	0,000126
miR-328-3p	2,7526	0,000149
miR-485-5p	2,6437	0,004588
miR-155-5p	2,6406	0,00392
miR-1	2,5559	0,001958
miR-93-5p	2,1897	0,000014
miR-15a-5p	2,0828	0,009696
miR-16-5p	2,009	0,000791
miR-195-5p	2,0059	0,000035
Azalış		
miR-141-3p	-9,1755	0,000239
miR-200c-3p	-7,1881	0,000003
miR-200b-3p	-5,137	0,000001
miR-200a-3p	-3,2156	0,000414
let-7f-5p	-2,728	0,00021
miR-340-5p	-2,7034	0,000055
miR-429	-2,2533	0,000533
let-7e-5p	-2,2095	0,000991

Çizelge 3.6 (Devam). MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 12.saat miRNA *fold regulation* en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miR-497-5p	-2,1346	0,000453
SNORD61	1	0,00001

Yapılan analizler sonucunda MDA-MB-435 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre 24. saatte 30 adet miRNA (18 onkogenik+ 9 tümör baskılayıcı+ 3 bilinmeyen) istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat olmak üzere artış gösterirken, 13 adet miRNA (12 tümör baskılayıcı+ onkogenik) istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat olmak üzere azalış gösterdi ($p < 0.05$) (Şekil 3.23., Çizelge 3.7.).

Deneyin 48. saatinde ise 38 adet miRNA (23 onkogenik+ 10 tümör baskılayıcı+ 5 bilinmeyen) istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat olmak üzere artış gösterirken 10 adet miRNA (9 tümör baskılayıcı+ 1 onkogenik) istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat olmak üzere azalış gösterdi ($p < 0.05$) (Şekil 3.23., Çizelge 3.8.).

Çizelge 3.7. MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 24.saat miRNA *fold regulation* en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miRNA	Fold Regulation	P Değeri
	Artış	
miR-100-5p	431,0174	0,000005
miR-10a-5p	398,748	0,000574
miR-10b-5p	218,2667	0,000289
miR-130a-3p	105,118	0,000112
miR-29a-3p	38,9215	0,000002
miR-125b-5p	35,0542	0,000233
miR-130b-3p	18,6558	0,000455
miR-18a-5p	12,9823	0,01023
miR-19a-3p	11,8025	0,02361
miR-19b-3p	10,0954	0,016404

Çizelge 3.7 (Devam). MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 24.saat miRNA *fold regulation* en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miR-20a-5p	8,7082	0,000386
miR-424-5p	8,0728	0,007489
miR-20b-5p	8,0121	0,0006
miR-17-5p	7,9624	0,000829
miR-181b-5p	6,5087	0,000003
miR-204-5p	5,4967	0,00997
miR-186-5p	5,3075	0,004478
miR-132-3p	4,7578	0,000063
miR-212-3p	4,7413	0,00014
miR-140-5p	4,494	0,004775
miR-181d-5p	3,2975	0,000017
miR-155-5p	3,1864	0,00004
miR-485-5p	2,8158	0,004088
miR-129-5p	2,5433	0,000034
miR-328-3p	2,5395	0,000018
miR-206	2,372	0,004411
miR-15a-5p	2,2306	0,003429
let-7b-5p	2,2259	0,000144
miR-128-3p	2,0511	0,009948
miR-199a-5p	2,0357	0,004735
miR-613	2,0023	0,001958
Azalış		
miR-203a	-36,9936	0,000588
miR-205-5p	-16,0899	0,000023
miR-141-3p	-15,7784	0,000043
miR-200c-3p	-8,6533	0,000005
miR-489-3p	-7,5407	0,000058
miR-200b-3p	-5,7026	0,000033
miR-200a-3p	-3,6119	0,000686
miR-193b-3p	-2,2602	0,000025
miR-429	-2,2106	0,006812
miR-497-5p	-2,1745	0,000073
miR-152-3p	-2,1494	0,020003

Çizelge 3.7 (Devam). MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 24.saat miRNA *fold regulation* en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miR-340-5p	-2,1152	0,011643
miR-199a-3p	-2,0917	0,004788
SNORD61	1	0,00001

Çizelge 3.8. MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 48.saat miRNA *fold regulation* en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miRNA	Fold Regulation	P Değeri
	Artış	
miR-100-5p	656,7581	0,000008
miR-10a-5p	521,4667	0,000052
miR-125b-1-3p	484,522	0,011749
miR-130a-3p	126,634	0,000415
miR-222-3p	124,9927	0,000001
miR-204-5p	117,5918	0,001091
miR-29a-3p	42,5941	0,000052
miR-29c-3p	38,829	0,000443
miR-125b-5p	34,9781	0,001059
miR-29b-3p	16,7575	0,000762
miR-130b-3p	13,9522	0,000387
miR-424-5p	10,1001	0,000037
miR-19a-3p	9,8682	0,001933
miR-18a-5p	9,6861	0,022051
miR-19b-3p	8,625	0,00387
miR-20b-5p	8,3822	0,000991
miR-20a-5p	7,5578	0,001253
miR-17-5p	6,6561	0,002581
miR-181a-5p	6,2876	0,000013
miR-181c-5p	6,1546	0,000031
miR-22-3p	5,9641	0,000023
miR-181b-5p	5,2678	0,000009
miR-186-5p	4,321	0,000156

Çizelge 3.8 (Devam). MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 48.saat miRNA *fold regulation* en az 2 kat artış-azalış ve p değerleri < 0.05.

miR-140-5p	4,073	0,0067
miR-328-3p	4,0259	0,001558
miR-210-3p	3,6257	0,000889
miR-132-3p	3,2111	0,020914
miR-181d-5p	3,1477	0,001104
miR-155-5p	2,9234	0,009895
let-7g-5p	2,9079	0,015873
miR-199a-5p	2,8289	0,000788
let-7b-5p	2,754	0,00069
miR-212-3p	2,5173	0,002624
miR-613	2,511	0,016044
let-7i-5p	2,4165	0,002309
miR-27a-3p	2,201	0,00817
let-7a-5p	2,19	0,018733
let-7d-5p	2,0146	0,027528
Azalış		
miR-203a	-19,9592	0,000776
miR-205-5p	-18,7199	0,000081
miR-141-3p	-10,2506	0,000001
miR-200c-3p	-6,9321	0,00067
miR-489-3p	-6,5686	0,000037
miR-200b-3p	-4,5983	0,000632
miR-200a-3p	-2,7406	0,006886
miR-429	-2,3637	0,000088
miR-199a-3p	-2,2448	0,007184
miR-182-5p	-2,0882	0,000703
SNORD61	1	0,00001

3.5.4. Karşılaştırmalarda Sürekli Artış Azalış Gösteren miRNAlar

MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre farklı zamanlardaki miRNA ekspresyonları sonucunda bazı miRNAların sürekli olarak artış ve azalış gösterdikleri sonucuna varıldı.

Bunlardan hsa-miR-100-5p, 2. saatte 632 kat, 4. saatte 1032 kat, 6. saatte 515 kat, 12. saatte 315 kat, 24. saatte 431 kat ve 48. saatte 656 kat artışı ile istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* gösterdiği belirlendi ($p<0.001$) (Çizelge 3.9.).

hsa-miR-10a-5p, 4. saatte 912 kat, 6. saatte 533 kat, 12. saatte 350 kat, 24. saatte 398 kat ve 48. saatte 521 kat artış ile istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* gösterdiği tespit edildi ($p<0.001$) (Çizelge 3.9.).

hsa-miR-10b-5p, 2. saatte 241 kat, 4. saatte 536 kat, 6. saatte 209 kat, 24. saatte 218 kat artış ile istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* gösterdiği belirlendi ($p<0.001$) (Çizelge 3.9.).

hsa-miR-130a-3p, 2. saatte 92 kat, 4. saatte 181 kat, 6. saatte 103 kat, 12. saatte 87 kat, 24. saatte 105 kat ve 48. saatte 126 kat artış ile istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* gösterdiği belirlendi ($p<0.001$) (Çizelge 3.9.).

hsa-miR-130b-3p, 2. saatte 15 kat, 4. saatte 30 kat, 6. saatte 17 kat, 12. saatte 23 kat, 24. saatte 18 kat ve 48. saatte 13 kat artış ile istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* gösterdiği belirlendi ($p<0.001$) (Çizelge 3.9.).

hsa-miR-29a-3p, 4. saatte 65 kat, 6. saatte 39 kat, 12. saatte 32 kat, 24. saatte 38 kat ve 48. saatte 42 kat artış ile istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* gösterdiği belirlendi ($p<0.001$) (Çizelge 3.9.).

hsa-miR-19a-3p, 4. saatte 43 kat, 6. saatte 10 kat, 12. saatte 12 kat, 24. saatte 11 kat artış ile istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* gösterdiği belirlendi ($p<0.001$) (Çizelge 3.9.).

hsa-miR-19b-3p, 4. saatte 35 kat, 12. saatte 11 kat, 24. saatte 10 kat artış ile istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* sonucu elde edildi ($p<0.001$) (Çizelge 3.9.).

Bunların yanısıra hsa-miR-203a, 2. saatte -331 kat, 4. saatte -14 kat, 6. saatte -48 kat, 24. saatte -36 kat, 48. saatte -19 kat azalış ile istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* sonucu belirlendi ($p<0.001$) (Çizelge 3.9.).

hsa-miR-205-5p, 6. saatte -15 kat, 24. saatte -16 kat, 48. saatte -18 kat azalış ile istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* değerleri elde edildi ($p<0.001$) (Çizelge 3.9.).

hsa-miR-141-3p, 6. saatte -11 kat, 12. saatte -9 kat, 24. saatte -15 kat, 48. saatte -15 kat azalış ile istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* elde edildi ($p<0.001$) (Çizelge 3.9.).

Çizelge 3.9. Kıyaslamalarda devamlı artış veya azalış gösteren miRNAlar.

	Fold Regulation					
	2. saat	4. saat	6. saat	12. saat	24. saat	48. saat
miR-10b-5p	632,8001	1032,1942	515,8601	315,2428	431,0174	656,7581
miR-10a-5p		912,0328	533,0718	350,335	398,748	521,4667
miR-10b-3p	241,4156	536,6068	209,7599		218,2667	
miR-130a-3p	92,2315	181,8987	103,0014	87,6607	105,118	126,634
miR-130b-3p	15,4179	30,9788	17,1728	23,4944	18,6558	13,9522
miR-29a-3p		65,388	39,6693	32,9408	38,9215	42,5941
miR-19a-5p		43,2286	10,4507	12,12	11,8025	
miR-19b-5p		35,8508		11,2243	10,0954	
miR-203a	-331,0291	-14,4217	-48,4287		-36,9936	-19,9592
miR-205-5p			-15,5232		-16,0899	-18,7199
miR-141-3p			-11,5167	-9,1755	-15,7784	-10,2506

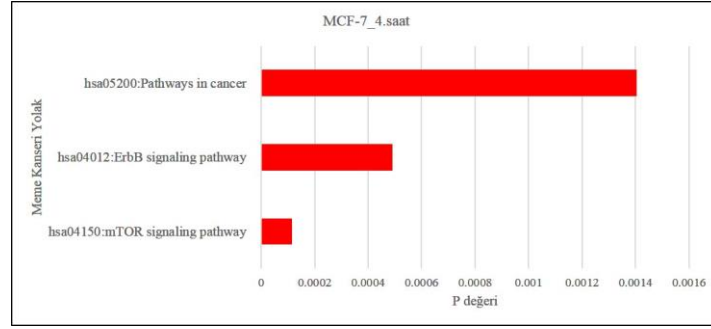
Onkogenik miRNA Tümör Baskılayıcı miRNA Bilinmeyen

3.6. MCF-7 ve MDA-MB-435 Hücrelerinin miRNAlarının Yolak Analizi

3.6.1. MCF-7 Hücrelerinin miRNAlarının Yolak Analizi

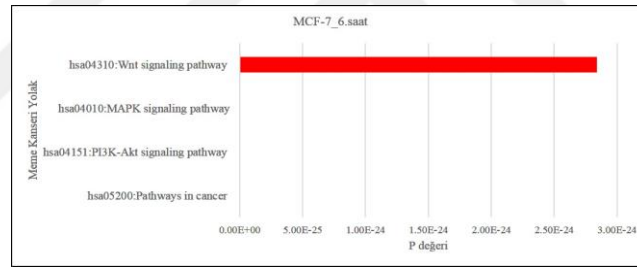
MCF-7 hücrelerinin 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerinde elde edilen miRNA ekspresyonlarının 2.saatindeki ekspresyonlarına göre en az 2 kat artış-azalış gösteren miRNAların yer aldığı yolaklar analiz programı olan *DIANA-mirPath* (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>) kullanılarak belirlendi.

Buna göre 4. saatte, *mTOR signaling pathway* (hsa04150), *ErbB signaling pathway* (hsa04012), *Pathways in cancer* (hsa05200) yolakları elde edildi (Şekil 3.24.).



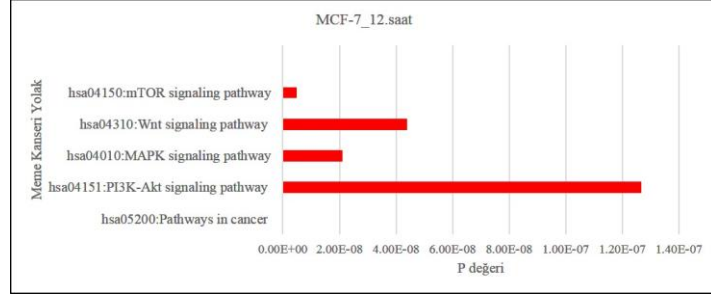
Şekil 3.24. MCF-7, 4. saat miRNalarının etkin olduğu yolaklar.

6. saat analiz sonuçları doğrultusunda 4. saatte belirlenen *ErbB signaling pathway* (hsa04012), *Pathways in cancer* (hsa05200) yolaklarına *PI3K-Akt signaling pathway* (hsa04151), *MAPK signaling pathway* (hsa04010), *Wnt signaling pathway* (hsa04310) yolakları eklendi (Şekil 3.25.).



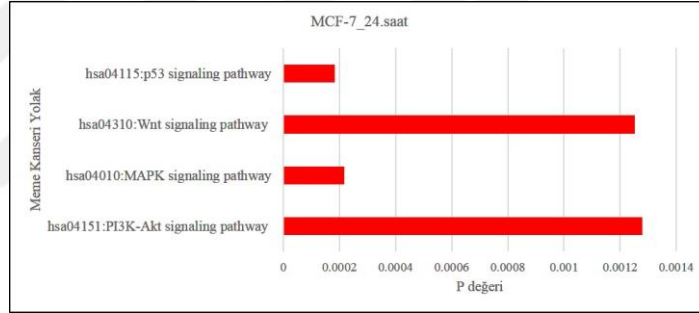
Şekil 3.25. MCF-7, 6. saat miRNalarının etkin olduğu yolaklar.

12. saatte 6. saatte tespit edilen *PI3K-Akt signaling pathway* (hsa04151), *MAPK signaling pathway* (hsa04010), *Pathways in cancer* (hsa05200) yolaklarına *mTOR signaling pathway* (hsa04150), *Wnt signaling pathway* (hsa04310) katıldı (Şekil 3.26.).



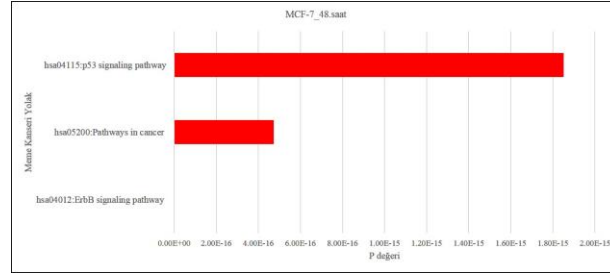
Şekil 3.26. MCF-7, 12. saat miRNAlarının etkin olduğu yollar.

24. saatte, 12. saatte etkinliği görülen PI3K-Akt *signaling pathway* (hsa04151), MAPK *signaling pathway* (hsa04010), Wnt *signaling pathway* (hsa04310) yollarına p53 *signaling pathway* (hsa04115) ilave oldu (Şekil 3.27.).



Şekil 3.27. MCF-7, 24. saat miRNAlarının etkin olduğu yollar.

48. saatteki miRNA ekspresyonlarının 24. saatte belirlenen *Pathways in cancer* (hsa05200), p53 *signaling pathway* (hsa04115) yollarının yanısıra ErbB *signaling pathway* (hsa04012) içerisindeki genlerin düzenlenmesinde etkili olabilecekleri tespit edildi (Şekil 3.28.).



Şekil 3.28. MCF-7, 48. saat miRNAlarının etkin olduğu yollar.

3.6.2. MCF-7’de Sürekli Ekspresyon Gösteren miRNAların Etkin Olduğu Yollar

MCF-7 hücrelerinde hsa-miR-548c-3p miRNA, 2. saatteki ifade düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak 24. saatte 22 kat ve 48. saatte 16 kat artış *fold regulation* gösterdi ($p < 0.05$).

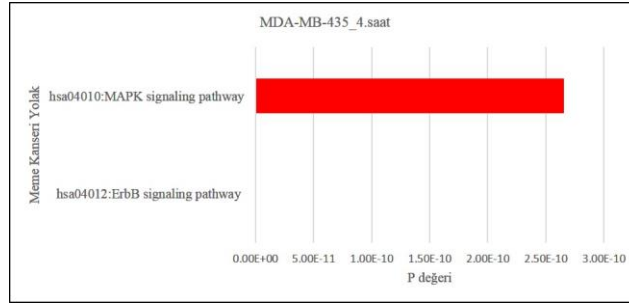
Bu miRNA'nın *DIANA-mirPath* kullanılarak yapılan analizinde meme kanseri ile ilgili *Pathways in cancer* (hsa05200), *ErbB signaling pathway* (hsa04012), *p53 signaling pathway* (hsa04115), *PI3K-Akt signaling pathway* (hsa04151), *Wnt signaling pathway* (hsa04310), *HIF-1 signaling pathway* (hsa04066) yollarındaki gen ekspresyonlarında etkili olabileceği görüldü.

Diğer bir miRNA hsa-miR-485-5p'nin aynı hücre hattında 2. saatteki gen ifadesine göre 12. saatte 9 kat ve 24. saatte 9 kat artış istatistiksel olarak anlamlı *fold regulation* sonucu elde edildi ($p < 0.05$). Yapılan yolk analizinde *p53 signaling pathway* (hsa04115), *Adipocytokine signaling pathway* (hsa04920)'lerde yeralan hedef genlerinin ekspresyonlarında etkin olabileceği belirlendi.

3.6.3. MDA-MB-435 Hücrelerinin miRNAlarının Yolk Analizi

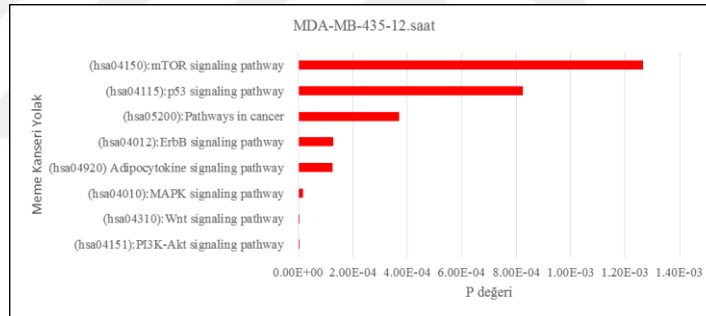
MDA-MB-435 hücrelerinin 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerindeki miRNA ekspresyonlarının 2. saatteki miRNA ekspresyonlarına göre yapılan kıyaslamaları sonucunda istatistiksel olarak en az 2 kat artış-azalış gösteren miRNAların etkin oldukları yolk analizleri *DIANA-mirPath* ([http:// diana.imis.athena-innovation.gr](http://diana.imis.athena-innovation.gr)) kullanılarak gerçekleştirildi.

Yapılan analizler sonucunda 4. saatte ErbB *signaling pathway* (hsa04012), MAPK *signaling pathway* (hsa04010) (Şekil 3.29.).



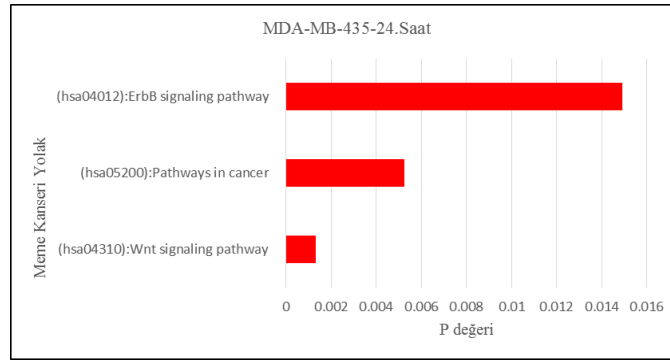
Şekil 3.29. MDA-MB-435, 4. saat miRNalarının etkin olduğu yollar.

12. saatte 4. saatte belirlenen ErbB *signaling pathway* (hsa04012) ve MAPK *signaling pathway* (hsa04010) yollarına PI3K-Akt *signaling pathway* (hsa04151), Wnt *signaling pathway* (hsa04310), Adipocytokine *signaling pathway* (hsa04920), Pathways in cancer (hsa05200), p53 *signaling pathway* (hsa04115), mTOR *signaling pathway* (hsa04150) eklendi (Şekil 3.30.).



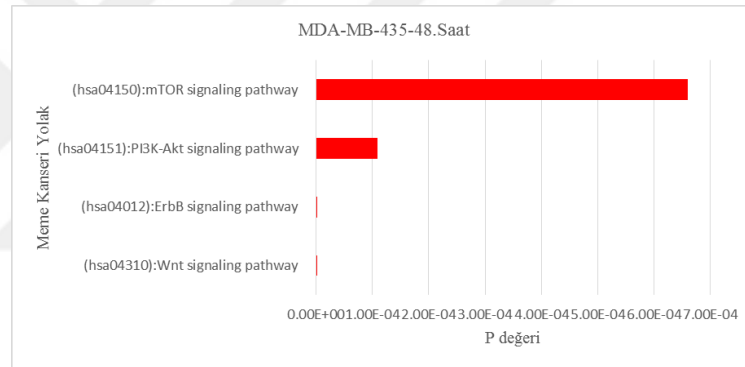
Şekil 3.30. MDA-MB-435, 12. saat miRNalarının etkin olduğu yollar.

24. saatte etkinliğin Wnt *signaling pathway* (hsa04310), Pathways in cancer (hsa05200), ErbB *signaling pathway* (hsa04012) yolları ile devam ettiği görüldü (Şekil 3.31.).



Şekil 3.31. MDA-MB-435, 24. saat miRNAlarının etkin olduğu yollar.

48. saatte 24. saatte aktif olan Wnt *signaling pathway* (hsa04310), ErbB *signaling pathway* (hsa04012) yolak aktivitelerine PI3K-Akt *signaling pathway* (hsa04151), mTOR *signaling pathway* (hsa04150) mekanizmalarının da katıldığını elde ettik (Şekil 3.32.).



Şekil 3.32. MDA-MB-435, 48. saat miRNAlarının etkin olduğu yollar.

3.6.4. MDA-MB-435’de Sürekli Ekspresyon Gösteren miRNAların Etkin Olduğu Yollar

MDA-MB-435 hücrelerinde hsa-miR-203-a, 2. saatteki ifade düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak 4. saatte 13 kat, 12. saatte 15 kat ve 48. saatte 18 kat artış gösterdi ($p < 0.05$).

Bu miRNA yapılan analiz sonucunda MAPK *signaling pathway* (hsa04010), Wnt *signaling pathway* (hsa04310) yollarında bulunup hedef aldığı gen ifadelerinin düzenlenmesinde rol alabileceği belirlendi.

Aynı hücre hattında bir diğer miRNA hsa-miR-205-5p, 2. saatteki ifade düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı olarak 4. saatte 21 kat, 12. saatte 21 kat, 24. saatte 15 kat ve 48. saatte 24 kat artış gösterdiği tespit edildi ($p<0.05$).

MDA-MB-435 hücrelerinde farklı saatlerde ifade düzeyleri değişkenlik gösteren bu miRNA'nın yapılan analiz sonucunda *Wnt signaling pathway* (hsa04310), *Pathways in cancer* (hsa05200), *ErbB signaling pathway* (hsa04012) yollarındaki gen ifadelerini düzenleyebileceği görüldü.

3.6.5. MDA-MB-435 ve MCF-7 Hücrelerinin Karşılaştırmalı miRNAlarının Yolak Analizi

MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre 2. saatteki miRNA ekspresyonlarının kıyaslanması sonucunda en az 10 kat artış ve azalış gösteren miRNAların *DIANA-mirPath* programı kullanılarak analizleri yapıldı. Buna göre; *Hedgehog signaling pathway* (hsa04340), *Cell cycle* (hsa04110), *Pathways in cancer* (hsa05200) yollarında yer alan hedef genlerin bu saatte aktiflenen miRNAlar tarafından regüle edilebileceği düşünülmektedir.

Deneyin 4. saatinde en az 10 kat artış ve azalış gösteren miRNAların yolak analizleri belirlendi. Böylece deneyin 2. saatinde belirlenen *Hedgehog signaling pathway* (hsa04340), *Cell cycle* (hsa04110), *Pathways in cancer* (hsa05200) yollarına *PI3K-Akt signaling pathway* (hsa04151), *MAPK signaling pathway* (hsa04010), *ErbB signaling pathway* (hsa04012) yolları dahil oldu.

MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerinin miRNA ekspresyonlarının 6. saatinde ise (en az 10 kat artış ve azalış gösteren miRNAlar) 4. saatte aktiflenen yollara *NF-kappa B signaling pathway* (hsa04064), *ErbB signaling pathway* (hsa04012), *GnRH signaling pathway* (hsa04912) yollarının destek olduğunu belirledik.

12. saatle birlikte en az 10 kat artış ve azalış gösteren miRNAların 6. saattekilere *p53 signaling pathway* (hsa04115) ile dinamikliğini gösterdi.

24. saatte en az 10 kat azalış ve artış gösteren miRNAların analiz programına eklenmesiyle 12. saatteki yollara ek olarak *Wnt signaling pathway*

(hsa04310), *TGF-beta signaling pathway* (hsa04350), *HIF-1 signaling pathway* (hsa04066), *mTOR signaling pathway* (hsa04150), *Regulation of actin cytoskeleton* (hsa04810) yolaklarının devreye girdiğini belirledik.

48. saatte en az 10 kat artış ve azalış gösteren miRNAların aktif olduğu yolaklarda ise 24. saat sonuçlarına *Notch signaling pathway* (hsa04330), *Adherens junction* (hsa04520), *VEGF signaling pathway* (hsa04370), *Jak-STAT signaling pathway* (hsa04630) ile devreye girdiğini tespit ettik.

3.6.6. MDA-MB-435 Hücrelerinin MCF-7 Hücrelerine Göre Sürekli Ekspresyon Gösteren miRNAların Etkin Olduğu Yolaklar

MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre farklı zaman dilimlerinde devamlı en az 10 kat artış azalış gösteren miRNA yolak analiz programında *p53 signaling pathway* (hsa04115), *mTOR signaling pathway* (hsa04150), *GnRH signaling pathway* (hsa04912), *ErbB signaling pathway* (hsa04012), *PI3K-Akt signaling pathway* (hsa04151) yolaklarında etkin rol alabilecekleri belirlendi.

4. TARTIŞMA

Posttranskripsiyonel seviyede düzenleme, önemli bir gen ekspresyon kontrol noktasıdır. Bugün insan genomunda yeralan yüzlerce gen ifadesi, küçük fonksiyonel RNA molekülleri olan miRNA'lar tarafından yakın takipe alınmaktadır.

Yakın geçmişte *C. elegans*'ın larval gelişim döneminin incelenmesi sürecinde keşfedilen ve sonrasında aralarında meme kanserinin de bulunduğu birçok kanserin oluşum, ilerleme, metastaz, invazyon aşamalarının başlangıç ve sürekliliğinde de rol alan miRNA'ların aktivitelerinin tam anlamıyla belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle kanser patogenezinde rol alan miRNA ifadelerindeki düzensizliklerin altında yatan kompleks yolak mekanizmalarının anlaşılması önemlidir.

Bizde bu amaçla bazal benzeri, invaziv karakterli MDA-MB-435 ve luminal karakterli daha az invaziv MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyon kapasitelerini *xCELLigence real-time cell analyzer* ile karşılaştırarak, miRNA içeren total RNA izolasyonu deneyleri için hücrelerin *doubling time*, uygun hücre sayısı ve zamanlarını belirledik. Devamında her iki hücre hattının invazyon deneylerine uygun matrijel oranı manuel bir invazyon yöntemi olan *HTS Transwell Sistem* ile belirlendi. Hücrelere uygunluğuna karar verilen matrijel oranı ile her iki hücre hattının invazyon potansiyelleri de *xCELLigence real-time cell analyzer* ile karşılaştırılıp MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerinden yaklaşık 4 kat daha fazla invazyon kapasitesine sahip olduğu tespit edildi.

Araştırmanın bir sonraki aşaması olarak her iki hücre hattından farklı zaman dilimlerindeki (2, 4, 6, 12, 24, 48. saat) miRNA içeren total RNA'ları izole edildi. Elde edilen total RNA'lar ile bir seri basamak takip edilerek hedeflemiş olduğumuz meme kanserine özel tümör baskılayıcı, onkogenik ve meme kanserindeki fonksiyonu henüz net olmayan miRNA gen ifade düzeyleri yüksek kapasiteli real-time PCR ile belirlendi. Hedeflenen miRNA'ların ekspresyon sonuçlarına göre bu miRNA'ların meme kanserinin başlangıç, ilerleme, invazyon, metastaz, anjiyogenez aşamalarındaki dahil oldukları yollar biyoinformatik software ile analiz edildi.

Her iki hücre hattının proliferasyon kapasitelerinin *xCELLigence real-time cell analyzer* cihazı ile her 15 dakikada ölçüm alınarak hücrelerin proliferasyonları

MCF-7 için 150 saat ve MDA-MB-435 içinse 196 saat boyunca izlendi. Yapılan analiz sonucunda MCF-7 hücrelerinin *doubling time* 30 saat olarak ve farklı sayılarda (5000, 10.000, 20.000, 40.000 hücre/kuyucuk, n=8) hücre içeren deney gruplarının proliferasyonlarının takibi neticesinde de hücre miktarlarının kuyulara hücre eklendikten 25-30 saat arasında maksimum hücre miktarlarına ulaştığı ve hücre indeks değerlerinin de her grup için 0.5, 1, 3, 4 kat artış olarak sonuçlara yansıtıldığı görüldü.

Proliferasyon deneyi sonucunda elde edilen cell indeks değerlerine göre yapılan analiz ile MCF-7 hücrelerinin 2, 4, 6, 12 ve 24. saat miRNA içeren total RNA izolasyon deney grupları için cm²'ye 25.000 hücre (500.000 hücre/petri); 48. saat izolasyonu için de cm²'ye 15.000 hücre (300.000 hücre/petri) olacak şekilde deneyin kurulması kararlaştırıldı.

Benzer şekilde MDA-MB-435 hücrelerinin *doubling time* 22 saat olarak belirlendi. Yine bu hücre hattında da 5000, 10.000, 20.000, 40.000 hücre/kuyucuk (n=8) olacak şekilde kurulan proliferasyon deneyi sonucunda hücre miktarlarının, kuyucuklara hücre eklendikten sonra 15-20 saat arasında maksimum miktara ulaşp hücre indeks değerleri de her grup için sırayla 0.5, 1, 1.5, 2.5 kat artış olarak tespit edildi.

Proliferasyon sonuçlarından elde edilen her grubun cell indeksleri doğrultusunda MDA-MB-435 hücrelerinden de miRNA içeren total RNA izolasyonu için 2, 4, 6 ve 12. saatler için cm²'ye 25.000 hücre (500.000 hücre/petri); 48. saat izolasyon için ise cm²'ye 12.500 hücre (250.000 hücre/petri) olacak şekilde deney grupları oluşturuldu.

Yapılan proliferasyon deneyleri sonucunda her iki hücre hattının uzun süreli proliferasyon deneyleri için 5000 ve 10.000 hücre/kuyucuk sayısının hücrenin fizyolojik takibi açısından daha uygun hücre sayısı olduğu anlaşıldı (p<0.05).

İnvaziv karakterli MDA-MB-435 ve daha az invaziv MCF-7 hücrelerinin invazyon potansiyelleri de özel tasarım *CIM-plate* kullanılarak *xCELLigence real-time cell analyzer* cihazı ile her 15 dakikada ölçüm alınarak 80 saat boyunca izlendi.

Deney öncesinde hücreler için uygun matrijel kalınlığı olan 1:20 oranı (matrijel: DMEM / DMEM F 12) *HTS Transwell-96 Permeable Support Systems and Plates* ile yapılan deney sonucunda belirlendi. Hem MDA-MB-435 hem de MCF-7 ile *xCELLigence real-time cell analyzer* cihazında gerçekleştirilen invazyon deneyinde 1:20 oranında matrijel ve 20.000 hücre/kuyucuk (n=6) olacak şekilde gruplar oluşturuldu.

Her iki hücrenin invazyon aktivitelerine bakıldığı zaman MCF-7 hücrelerinin sisteme eklendikten sonra 5. saatte başlayan invazyonlarının ulaşabileceği en yüksek değere 28. saatte ulaşp matrijelsiz kontrol grubunun oldukça altında bir hücre sayısı ile grafik izlediği görüldü ($p<0.05$). Bunun yanı sıra MDA-MB-435 hücrelerinin sisteme eklendikten sonra 5. saat itibarıyla invazyonunu artırmaya başlayıp 25. saatte matrijel içermeyen kontrol grubuyla hemen hemen aynı hücre sayısına ulaştığı ve devam eden deney boyunca kontrol grubu ile aynı paterni koruduğu elde edilen cell indeks değerleri ile belirlendi ($p<0.05$).

Aynı deney grupları içerisinde yeralan matrijel içermeyen kontrol gruplarının cell indeks değerlerine göre ve matrijel içeren her iki hücre hattının birbirlerine göre yapılan değerlendirmeleri sonucunda MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre dramatik düzeyde (yaklaşık 4 kat) daha invaziv olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Hem proliferasyon hem de invazyon deneyleri sonucunda iki hücre hattının saat bazlı miRNA profillerini belirlemek için 2, 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerdeki total RNA izolasyonlarını gerçekleştirmeyi hedefledik.

Meme kanseri birçok faktörü içerisinde bulunduran kompleks mekanizmalar sonucunda gelişen heterojen bir hastalıktır. Günümüze kadar bu hastalığın teşhisinden tedavisine kadar birçok farklı mekanizmalar ortaya konulmasıyla tedavi planları geliştirilmiştir. Elde edilen başarı oranlarına rağmen halen hastalarda farklı yanıtların ve tedavi resistanslarının gelişmesinin önüne geçilememiştir.

miRNAların gen ekspresyonunun regülatörleri olarak görev yaptıklarının keşfedilmesiyle birlikte meme kanseri için de güçlü bir terapötik hedef ve ayrıcalıklı

bir diagnostik ve prognostik belirteç olması gündeme gelmiştir. miRNAların meme kanserinin proliferasyon, invazyon ve metastaz aşamalarını düzenlediği bilinmektedir. Bugün klinikte hastaların tedavisi meme kanserinin hangi aşamasında tanı almasına göre şekillenmektedir. Ayrıca her kanser türünde olduğu gibi meme kanserinde de başlangıç aşamalarının erken teşhis edilmesi oldukça önemlidir. Bütün bu detaylar gözönüne alındığında miRNAların üstlenmiş oldukları roller daha fazla önem taşımaktadır.

Meme kanserinin erken dönemde teşhis edilmesi, hastaya daha etkili tedavi ve yaşam süresinin uzatılması seçeneğini sunmaktadır. Bu araştırmada MCF-7 ve MDA-MB-435 meme kanseri hücrelerinden deneyin başlangıcından itibaren 2, 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde izole edilen miRNA içeren total RNAlar ile meme kanseri proliferasyon, hücre döngüsü düzenlenmesi, invazyon, metastaz ve meme kanserindeki rolleri net olarak bilinmeyen toplam 84 adet meme kanserine özel miRNA primerlerinin gen ekspresyon profilleri yüksek kapasiteli real time PCR ile çalışılarak belirlendi.

Luminal orijinli meme kanseri hücresi olan MCF-7'nin 4, 6, 12, 24 ve 48. saat miRNA ekspresyon sonuçlarını yine aynı hücrenin 2. saatteki miRNA ekspresyon sonuçlarını kontrol grubu kabul ederek değerlendirdik. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda bütün saatlerin 2. saatteki ekspresyonuna göre kıyaslanmasıyla 45 miRNA'nın farklı ekspresyon gösterdiği belirlendi ($p<0.05$).

Aynı hücre hattında 4. saatte, 2 onkogenik 1 tümör baskılayıcı miRNA olmak üzere 3 adet miRNA'nın farklı düzeyde ekspresyon sonucu elde edildi. Bu miRNAların hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı olanların bu saatteki ekspresyonlarının en az 2 kat olmak üzere azalış gösterdiği belirlendi ($p<0.05$).

Devam eden sürelerde MCF-7 hücrelerinde 6. saatte, 15 onkogenik, 10 tümör baskılayıcı ve 1 bilinmeyen olarak 26 adet miRNA farklı düzeyde gen ekspresyonu gösterdi. Bunlardan tümör baskılayıcı olanlardan bir miRNA hariç hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı ve meme kanseri ile bağlantısı bilinmeyen miRNA ekspresyonları en az 2 kat olmak üzere azalış yönünde *fold regulation* değerleri sergiledi ($p<0.05$). Bu hücre hattı için en fazla miRNA ekspresyon çeşitliliği bu saatte belirlendi.

Araştırmanın 12. saatinde, 2 onkogenik, 3 tümör baskılayıcı (tümör baskılayıcılardan bir tanesinin azalan diğer miRNAların artan ekspresyonları) olmak üzere 5 miRNA ($p<0.05$), 24. saatte 1 onkogenik, 4 tümör baskılayıcı olarak (hepsinin artan ekspresyonları) 5 miRNA ($p<0.05$) ve 48. saatte 5 tümör baskılayıcı ve 1 meme kanseri ilgisi bilinmeyen olmak üzere (4 tümör baskılayıcının artan, 1 tümör baskılayıcı ve meme kanseri ilgisi bilinmeyen azalan ekspresyonları) 6 adet miRNA en az 2 kat (artış-azalış) olarak farklı düzeyde *fold regulation* data ile ekspresyon gösterdi ($p<0.05$).

Araştırmada yeralan bazal orijinli meme kanseri hücresi MDA-MB-435'in de 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerdeki miRNA ekspresyonları aynı hücrenin 2. saatteki miRNA ekspresyon sonuçları kontrol kabul edilerek değerlendirildi. Sonuçlar, bu hücre hattında bütün saatlerin 2. saatteki miRNA ekspresyonlarına göre kıyaslanması sonucunda 17 adet miRNA'nın farklı düzeyde ekspresyon gösterdiğini ortaya koydu ($p<0.05$).

MDA-MB-435 hücrelerinde saat bazlı olarak yapılan değerlendirmeler; 4. saatte 5 adet tümör baskılayıcı miRNA'nın 2. saatteki ekspresyonlarına göre en az 2 kat olmak üzere azalan *fold regulation* ($p<0.05$), 6. saatte anlamlı ekspresyon olmadığını, 12. saatte en az 2 kat artış ve azalış olmak üzere 3'ü azalan 3'ü artan ekspresyon gösteren toplam 6 tümör baskılayıcı miRNA ($p<0.05$), 24. saatte toplamda 2 adet miRNA (1 adet tümör baskılayıcı, 1 adet onkogenik) en az 2 kat (azalış-artış) olmak üzere değişik ekspresyon gösterdiğini ortaya çıkardı. Bu iki miRNA'dan onkogenik olanın azalan ve tümör baskılayıcı olanın ise artan ekspresyon sonuçları elde edildi ($p<0.05$). Araştırmanın devamındaki sonuçlar 48. saatte onkogenik olanlardan 1'nin azalan 1'nin artan ve 2 adet tümör baskılayıcının ise artan ekspresyon göstererek toplamda 4 adet farklı düzeyde miRNA gen ifade düzeyine işaret etti ($p<0.05$).

Elde edilen sonuçlara baktığımız zaman, MCF-7 hücrelerinin saat artışıyla birlikte gelişen besin azlığı, pH değişikliği, hipoksi gibi değişen çevre koşullarına karşı daha fazla onkogenik miRNA ekspresyonu gösterdiğini bununla birlikte tümör baskılayıcı miRNAların da değişen saatlerde artış ve azalışlarla değişik seviyelerde ortaya çıktıklarını gördük.

MDA-MB-435 hücreleri ise, saat artışıyla birlikte gelişen fiziksel koşulların getirisine daha az çeşitlilikte miRNA ekspresyonu ile cevap verdi. Özellikle de bu hücre hattının miRNA ekspresyonlarına baktığımız zaman onkogenik olanların daha seyrek düzeyde ekspresyon gösterdiğini söyleyebiliriz. Elde edilen bu veriler bize invaziv karakterli MDA-MB-435 hücrelerinin daha az invaziv MCF-7 hücrelerine göre değişen fiziksel koşullara karşı daha dirençli olabileceğini göstermiştir.

Meme kanseri tedavilerinde elde edilen başarının ölçüsü kanserin hangi aşamasında tespit edilebildiği ile yakından bağlantılıdır. Oluşum aşamalarında tespit edilebilen vakalarda ileriye dönük sonuçlar alabilmek daha olasıdır. Özellikle de kanserin kontrol altında tutulabilmesinde hastalığın invazyon ve metastaz sürecine başlatmamış olması önemlidir. Bu sebepten birçok araştırmacı invazyon ve metastaz döngüsündeki fizyolojiyi ayrıntılı olarak anlamak için deneyler yapmaktadırlar.

Biz de araştırmamızı invaziv karakterli ve daha az invaziv iki hücre hattındaki hedef miRNAların, meme kanserindeki rollerini daha iyi anlama yönünde planladık. Bu bakış açısıyla iki hücre hattının miRNA ekspresyonlarını kıyasladık.

İnvaziv karakterli MDA-MB-435 hücrelerinin her saatteki miRNA gen ifade düzeylerini daha az invaziv karakterli MCF-7 hücrelerinin her saatindeki miRNA gen ifade düzeyleri ile kıyasladık. Bu kıyaslama sonucunda 2. saatte, MDA-MB-435 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre 31 adet miRNA (15 onkogenik+10 tümör baskılayıcı+6 bilinmiyor) en az 2 kat artış, 9 adet miRNA (2 onkogenik+ 7 tümör baskılayıcı) en az 2 kat olmak üzere azalış göstererek toplamda 40 adet miRNA önemli derecede farklı ekspresyon gösterdi ($p<0.05$).

Bu durum 4. saatte, MDA-MB-435 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre 47 adet miRNA'nın (24 onkogenik+ 15 tümör baskılayıcı+ 8 bilinmeyen) en az 2 kat olmak üzere artışı ile ($p<0.05$), 7 adet miRNA'nın (tümör baskılayıcı) ise az 2 kat olmak üzere azalışı olarak belirlendi ($p<0.05$).

Devamındaki sonuçlardan 6. saatte, MDA-MB-435 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre 38 adet miRNA'nın (20 onkogenik+ 12 tümör baskılayıcı+ 6 bilinmeyen) MCF-7 hücrelerindeki ekspresyonlarına göre en az 2 kat olmak üzere

artış ($p<0.05$) ve 9 adet miRNA'nın (tümör baskılayıcı) da en az 2 kat olmak üzere azalış olarak elde edildi ($p<0.05$).

Daha uzun süreli takiplerden olan 12. saatte, MDA-MB-435 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre 30 adet miRNA (17 onkogenik+ 7 tümör baskılayıcı+ 6 bilinmeyen) en az 2 kat olmak üzere artış gösterirken ($p<0.05$), 9 adet miRNA (tümör baskılayıcı) en az 2 kat olmak üzere azalış sergiledi ($p<0.05$).

Yapılan değerlendirmeler ile 24. saatte, MDA-MB-435 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre 30 adet miRNA (18 onkogenik+ 9 tümör baskılayıcı+ 3 bilinmeyen) en az 2 kat olmak üzere artış gösterirken, 13 adet miRNA (12 tümör baskılayıcı+ onkogenik) en az 2 kat olmak üzere azalış gösterdi.

Deneyin son izolasyon saati olan 48. saatte ise, MDA-MB-435 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre 38 adet miRNA (23 onkogenik+ 10 tümör baskılayıcı+ 5 bilinmeyen) en az 2 kat olmak üzere artış gösterirken 10 adet miRNA (9 tümör baskılayıcı+ 1 onkogenik) en az 2 kat olmak üzere azalış gösterdi ($p<0.05$).

Her iki hücre hattının saat bazlı karşılaştırmaları sonucunda bazı miRNAların dramatik düzeyde değişen (artış-azalış) *fold regulation* değerleri ile sürekli gen ifade düzeylerinin aktif olduğu belirlendi.

Bu miRNAlardan, hsa-miR-100-5p'nin, 2. saatte 632 kat, 4. saatte 1032 kat, 6. saatte 515 kat, 12. saatte 315 kat, 24. saatte 431 kat ve 48. saatte 656 kat artışı ile *fold regulation* gösterdiği belirlendi ($p<0.001$). Bu miRNA'nın invaziv karakterli meme kanseri hücre hattında daha az invaziv meme kanseri hücre hattına göre dramatik düzeyde artış sergileyen sonucumuz, Daya ve ark (2013)'lerinin invaziv (MDA-MB-231, HS578T, BT549, SUM159), daha az invaziv (BT474, MDA-MB-468, T47D, ZR-75-1, MCF7, SK-BR3) ve immortal meme epitel hücrelerinin (MCF10A, MCF12A) miRNA-mRNA hedef bağlanma ekspresyonlarını mikroyarray yöntemiyle sistematik olarak analizleri sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Daya ve ark (2013), invaziv meme kanseri hücrelerinin miRNA ekspresyon sonuçlarını daha az invaziv ve normal meme kanseri hücrelerinin miRNA ekspresyon sonuçlarına göre değerlendirmeleriyle aralarında miR-100'ünde olduğu 4 miRNA'nın (miR-146a, miR-138, miR-125b1) artan ve 7 miRNA'nın (miR-200c,

miR-205, miR-203, miR-141, miR-34a, miR-183, miR-375) azalan ekspresyonları sonucunu elde ettiler (Daya ve ark 2013).

Bizim sonuçlarımızda hsa-miR-100-5p'nin 2. saatte belirlenen 632 kat artış (*fold regulation*) 4. saatte 1032 kat artış ile en yüksek ekspresyonu bu saatte ortaya koyarken, 6. saatte 515 kat ile 2. saatteki ifade düzeyine yakın seyrederken 12. saatte 315 kat devamında 24. saatte 431 kat, 48. saatte 656 kat ile yeniden artan ekspresyon ortaya koymaktadır.

Başka bir çalışmada meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan 2 kemoterapötik ajana (Adriamycin ve docetaxel) karşı dirençli iki MCF-7 hücresinin miRNA ekspresyon profilini önce mikroarray sonrasında real-time PCR ile yapılan doğrulama çalışmaları sonucunda 183 miRNA'nın farklı düzeyde ekspresyon gösterdiğini bununla birlikte aralarında miR-100'ünde bulunduğu 5 miRNA'nın (miR-100, miR-29a, miR-196a, miR-222, miR-30a) ise her iki ilaca da dirençli MCF-7 hücrelerinde ilaç direncini düzenleyen genlerin fonksiyonunda sürekli azalıp artarak düzenleyici rol alabileceklerini gösterdi (Zhong ve ark 2013).

Gerson ve ark (2012) MDA-MB-435 ve MCF10CA1a hücrelerinin 2 transfektantında integrin $\beta 4$ ekspresyonu üzerinde, aralarında miR-99ab/100 ailesinin de olduğu 2 aile üyelerinin etkisini incelediler. Diğer araştırma sonuçlarından farklı olarak miR-100'ün azalan ekspresyonunun integrin $\beta 4$ ekspresyonunu artırdığını buldular. Buldukları sonucun literatürde yeralan diğer meme kanseri çalışma sonuçları ile çeliştiğini vurguladılar (Gerson ve ark 2012).

miRNAların hem normal hem de malignant kök hücrelerin kendilerini yenileme ve farklılaşmasında rol alan genlerin önemli düzenleyicileri oldukları bilinmektedir. Başka bir araştırma sonucu miR-100'ün, kanser kök hücrelerinin kendi kendilerini yenileme sürecinde aktif rol aldıklarını gösterdi. Öyleki miR-100'ün meme kanseri kök hücrelerinin kendi kendilerini yenileme özelliğini düzenleyebilecek yetenekte olduğunu ve meme kanseri hücre proliferasyonunu SMARCA5, SMARCD1, BMPR2 hedef genleri üzerinden *Wnt/ β catenin pathway* aracılığıyla inhibe edebileceğini belirlediler. Yaptıkları klinik çalışmalarla miR-100 ekspresyon seviyesinin meme kanseri türü ve hastanın yaşam süresi ile yakından ilgili olabileceğini öne sürdüler. Artan miR-100 seviyesinin meme kanseri kök

hücre üretimini azalttığını belirttiler (Deng ve ark 2014). Deng ve ark (2014)'nın elde etmiş olduğu sonuçlar bizim bu miRNA ile ilgili saat bazlı değişen ekspresyon sonuçlarımızın klinik amaçlı kullanım için nedenli önem arz ettiğini ortaya koydu. Öyle ki miR-100 ekspresyonunun 2. saatte başlayan ekspresyon artışı ve özellikle 4. saatte diğer saatlere göre ulaştığı en yüksek gen ifade düzeyi göz önüne alınarak bu saatte yapılabilecek meme kanseri kök hücresinin kendi kendini yenileme özelliğinin engellenmesine yönelik etkin tedaviler olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca miR-100 ekspresyon sonuçlarının, literatürde ilk defa saat bazlı ekspresyon sonuçları olması bakımından önem taşımaktadır. Zhou ve ark (2010) taxol-dirençli 435TR1, 435TRP ve taxol-duyarlı MDA-MB-435 hücrelerinin miRNA ekspresyonlarını mikroarray ile kıyaslamaları sonucunda taxol dirençli hücrelerde taxol duyarlı hücelere göre önemli seviyede artan miR-100 ekspresyonu sonucunu elde ettiler (Zhou ve ark 2010).

Literatürde yeralan başka bir çalışmada miR-100'ün meme kanseri hücrelerinde azalan ekspresyonunun onkogen *insülin-like growth factor* (IGF)'in artan proliferasyon ve survivalini desteklediğini ve bu durumun miR-100'ün *IGF/mTOR* yolakının potansiyel bir düzenleyicisi olabileceği sonucunu ortaya koydu (Gebeshuber ve Martinez 2013). Farklı bir çalışmada miR-100'ün meme kanserinde epitel-mezenşim dönüşümünü indüklediğini fakat tümörigenez, invazyon ve metastazı inhibe ettiği sonucunu buldu. Böylece aralarında miRNAların da olduğu epitel mezenşim dönüşümü düzenleyicilerin hepsinin eşit etkiye sahip olmayıp bazılarının tümör ilerleyişi, invazyon ve metastazı desteklerken bazılarının bu özellikleri sergileyen genlerin aktivasyonlarını inhibe ettiklerini belirttiler (Chen ve ark 2014).

miR-99 ailesinin bir üyesi olan miR-100'ün karsinogenezde hem tümör promotor hem de tümör baskılayıcı olarak görev yapabileceği düşünülmektedir. Özellikle de miR-100'ün çeşitli kanserlerde bozulmuş ve aşırı ekspresyonu olması kanser tedavilerinde yeni bir hedef ve kanserin diağnoz ve prognostik için yeni bir moleküler belirteç olabileceği sonucu belirlendi (Chu ve ark 2015).

Saat artışıyla birlikte ifade düzeyi artan yönde değişkenlik gösteren miRNAlardan birisi de özellikle meme kanserinde epitel mezenşim dönüşümünde

rol alan miR-10 ailesinin iki üyesidir. Bunlardan hsa-miR-10a-5p'nin, 4. saatte 912 kat, 6. saatte 533 kat, 12. saatte 350 kat, 24. saatte 398 kat ve 48. saatte 521 kat artış ile *fold regulation* gösterdiği tespit edildi ($p<0.001$). Varolan bir araştırma sonucunda postmenopozal ER (+) erken aşama tamoksifen ile tedavi edilen meme kanserli hastaların primer tümörleri microRNA Screen ile taranarak 1105 miRNA analiz edildi. Sonuçlardan 12'si artan 8'i azalan olmak üzere 20 miRNA'nın farklı düzeyde ekspresyon gösterdiği elde edildi. Yüksek ekspresyon gösteren bu miRNAlardan miR-126 ve miR-10a'nın bu hasta gruplarında erken dönemde kanserin tekrar etme olasılığının takibinde kullanılabileceğini belirledi (Hoppe ve ark 2013). Ayrıca miR-10 ailesi üyelerinin meme kanserinde bozulmuş ve özellikle de miR-10a'nın meme kanseri oluşum kromozom bölgelerinde yerleşim gösterdiği bildirilmektedir (Lund 2010).

Meme kanserinin de aralarında olduğu birçok kanser ilintili ölümlerin ana nedenleri arasında metastatik yayılım bulunmaktadır. Uygulanan birçok tedavi bu prosesi kontrol altında tutmayı amaçlasa da bu yayılımın hedef organlara ulaşmasına engel olamamaktadır. Son dönemlerde yapılan birçok araştırma sonucu aralarında miR-10b'nin bulunduğu bir grup miRNA'nın bu metastatik döngüde aktif rol aldığını ortaya koydu (Li 2010). Bizim de araştırma sonuçlarımızda miR-10 ailesinin bir diğer üyesi hsa-miR-10b-5p de deneyin 2. saatinde 241 kat, 4. saatinde 536 kat, 6. saatinde 209 kat, 24. saatinde 218 kat artış ile *fold regulation* gösterdiği belirlendi ($p<0.001$).

İnsan meme epitel hücrelerinin metastatik meme hücreleriyle yapılan kıyaslamalarında metastatik hücrelerde (MDA-MB-231, SUM1315) yaklaşık 50 kat daha yüksek miR-10b ekspresyonu gösterirken metastatik olmayan meme kanseri hücrelerinin (MCF-7, SUM159, SUM149) miR-10b ekspresyonlarının normal meme epitel hücrelerinden daha düşük olduğu belirlendi (Ma ve ark 2007, Edmonds ve ark 2009).

Literatürde yeralan bu araştırma sonucu bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermesi bakımından önemlidir. Başka bir çalışmada 35 vakadan meme kanseri ve adjacent normal meme kanseri dokusu alınarak bu iki doku arasındaki 5 miRNA'nın (miR-145, miR-21, miR-10b, miR-125a, miR-206) ekspresyon

farklılıkları steem-loop RT-PCR ile değerlendirilmiş. Araştırma sonuçları miR-145, miR-125a ve miR-206'nın meme kanseri dokusunda adjacent normal meme kanseri dokusuna göre daha düşük oranda ekspresyon gösterdiğini miR-21 ve miR-10b'nin ise meme kanserli dokuda normal meme dokusuna göre önemli derecede yüksek ekspresyon sergilediğini gösterdi (Min ve ark 2014). Primer tümörün orijin aldığı dokudan uzak hedef dokuya metastazı kanser vakalarında istenilmeyen tablolardan birisidir. Heterojen bir hastalık olan meme kanseri bu karmaşıklığı içerisine metastaz ve invazyon proseslerini de eklemesiyle tedavisini de zorlaştırmaktadır. Yapılan birçok çalışma sonucu miR-10b'yi meme kanseri metastaz ve invazyon takibinde ayrıcalıklı bir hale getirmektedir. Başka bir çalışmada meme kanserli hastaların serumlarındaki miR-10b, miR-34a, miR-125b ve miR-155 ekspresyonları ile hastaların kemoterapötik cevaplarında sirkülasyondaki miR-125b ekspresyonlarını RT-PCR ile kıyaslamaları ile miR-10b, miR-155 seviyelerinin meme kanserinin erken aşamalarında (seviye 2) ve geç aşamalarında (seviye 3) sağlıklı bireylerdeki seviyelerinden oldukça yüksek olduğunu ve sirkülasyondaki miR-125b ekspresyonunun meme kanseri kemoterapötik resistans ile ilişkili olduğu belirtildi (Wang ve ark 2012). Böylece miRNA temelli terapötik tedaviler ile yeni anti-kanser stratejilerin geliştirilmesi mümkün gözükmemektedir.

Araştırma sonuçlarında ekspresyon devamlılığı ile karşımıza çıkan bir diğer miRNA da hsa-miR-130a-3p'dir. Bu miRNA, mitojen aktive protein kinaz (MAPK) sinyal yolunun düzenleyicilerinden olan önemli bir onkomirdir. Özellikle de vasküler endotel hücre proliferasyonu ve anjiyogenezi desteklemektedir (Boll ve ark 2013, Ouyang ve ark 2014). Bu miRNA bizim araştırma sonucumuzda 2. saatte 92 kat, 4. saatte 181 kat, 6. saatte 103 kat, 12. saatte 87 kat, 24. saatte 105 kat ve 48. saatte 126 kat artış ile *fold regulation* gösterdi ($p < 0.001$). Ouyang ve ark (2014) üçlü negatif meme kanseri ve normal meme dokusunun miRNA profillerini mikroRNA array ile değerlendirdiler. Array sonuçlarına göre önemli farklılık buldukları miRNAların (miR-155-5p, miR-21-3p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-183-5p) artan ve (miR-10b-5p, miR-451a, miR-125b-5p, miR-31-5p, miR-195-5p, miR-130a-3p) azalan ekspresyonlarını elde ettiler. Sonrasında önemli ekspresyon farklılıklarını RT-PCR ile doğrulayarak meme kanseri ile ilişkili olarak için aralarında miR-130a-3p'nin de aday miRNAlar elde ettiler. Ayrıca MDA-MB-

231 hücreleri yapmış oldukları *in vitro* deneylerde miR-130a-3p'nin önemli derecede artan ekspresyonunu elde ederek özellikle de ilaç direncinde (doksorubusin) miRNA ifadelerindeki düzensizliklerin etkin rol alabileceğini belirttiler (Ouyang ve ark 2014).

Başka bir araştırma grubu sisplatin dirençli over kanseri hücrelerinde miR-130a-3p'nin ilaç direncindeki etkisini real-time PCR ile çalışmaları sonucunda bu miRNA'nın sisplatin dirençli over kanseri hücrelerinde parental over kanseri hücrelerine göre artan gen ifade düzeyini belirlediler. Yaptıkları çalışmalar sonucunda over kanserinde miR-130a-3p'nin olası hedefinin PTEN geni olabileceğini belirlediler (Yang ve ark 2012).

Anjiyogenez bağımlı bir hastalık olan kanserin tümör anjiyogenez mekanizmasının anlaşılabilmesi tedavi stratejileri için önemlidir. *Human umbilical vein ECs* (HUVECs) endotel hücreleri ile miR-130a'nın tümör anjiyogenezinde GAX ve HOXA5 genlerinin regülasyonunda etkinliğini incelediler. Elde ettikleri sonuçlar miR-130a'nın, mitojen, proanjiojenik ve proinflamatuvar faktörlerin cevabından sorumlu GAX ve HOXA5 genlerinin önemli bir düzenleyicisi olduğu, her iki genin ekspresyonlarını azaltarak etki ettiğini gösterdiler (Chen ve Gorski 2008).

Zaman değişimiyle birlikte anlamlı derecede ekspresyon farklılığı belirlediğimiz diğer miRNA olan hsa-miR-130b-3p'nin ise 2. saatte 15 kat, 4. saatte 30 kat, 6. saatte 17 kat, 12. saatte 23 kat, 24. saatte 18 kat ve 48. saatte 13 kat artış ile *fold regulation* değeri elde edildi ($p < 0.001$). miR-130 ailesi miR-130a ve miR-130b olmak üzere 2 üyeden oluşmaktadır. Aralarında akciğer kanseri, hepatoselüler karsinoma, mide kanseri gibi birçok kanser türünde bozulmuş fonksiyonu rapor edilmiştir. Bu miRNA, over kanserinde proliferasyon, diferansiyasyon ve anjiyogeneze vermiş olduğu destekle onkomir olarak görev yapmaktadır (Zong ve ark 2014). Literatürde meme kanserinde bu miRNA'nın hedeflediği gen ve fonksiyonu hakkında gerekli bilgiye ulaşılamamıştır. Bizim araştırmamızda, invaziv karakterli meme kanserinde daha az invaziv karakterli meme kanseri hücresine göre özellikle 4. saatte diğer saatlere göre daha da fazla olan ifade düzeyiyle sonuçlara yansdı. Elde ettiğimiz sonuçların literatüre bu miRNA'nın meme kanseri ile olan

bağlantısını saat bazlı olarak ve gen ifade düzeyi olarak gösteren yeni bir veri sunması bakımından önem arz etmektedir. Zong ve ark. (2014) miR-130b'nin epitel over kanseri hücrelerinde ilaç direnci (paklitaksel, sisplatin)'ndeki rolünü hücre canlılığı testi, real-time PCR ile hedef gen ekspresyonu ve protein sentezini *western-blotting* testi ile inceleyerek bu miRNA'nın over kanserinde ilaç direnci mekanizmasına katılabileceği sonucunu elde ettiler (Zong ve ark 2014).

Meme kanserinde hedeflediği tümör baskılayıcı geni negatif yönde düzenleyerek onkomir sınıfında yeralan hsa-miR-29a-3p, deneyimizin 4. saatinde 65 kat, 6. saatinde 39 kat, 12. saatinde 32 kat, 24. saatinde 38 kat ve 48. saatinde 42 kat artış ile *fold regulation* gösterdi ($p < 0.001$). miR-29 ailesi miR-29a, miR-29b ve miR-29c olmak üzere 3 üyeden oluşmaktadır. Bu aile üyelerinin kanser biyolojisinin hücre fonksiyonundaki önemini ortaya koyan çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Yapılan çalışmalarda miR-29 ailesi üyelerinin farklı kanserlerde anormal ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. miR-29 hedef genleri arasında transkripsiyon faktörleri (*c-Myc*, *hedgehog* sinyal, *enhancer-binding protein-a* CEBPA, NF-KB), metiltransferaz ve kanser gelişiminde etkin olan hücre döngüsü kontrol mekanizmaları (*cell cycle regulator factor*, CDK6), hücre yaşlanması, farklılaşma, apoptoz, ekstraselüler matriks genleri (kolajen, laminin-1, MMP-2, fibrilin, elastin) düzenlemesiyle metastaz, invazyon genleri bulunmaktadır (Gebeshuber ve ark 2009, Jiang ve ark 2014).

Bununla birlikte miR-29 ailesinin immün hücre proliferasyon ve T hücrelerinden sitokin üretimi özellikle IFN- γ olmak üzere interferonların indüklediği tümör cevabında immünmodulator olabilecekleri biliniyor (Schmitt ve ark 2013, Wang ve ark 2013). Kanser mekanizmasındaki miRNA bozukluklarına kromozomal anomaliler, delesyon, amplifikasyon veya sekans mutasyonlarının yer aldığı genetik durumlar veya miRNA ekspresyonunun metilasyon bağımlı susturulması, miRNA biyogenezinde oluşan anomalilerle karşımıza çıkan epigenetik değişikliklerden kaynaklanabilmektedir (Malumbres 2013).

Sandhu ve ark (2013) DNA hipermetilasyonundan sorumlu DNMT3b geninin posttranskripsiyonel regülasyonunda miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-26a'nın rolünü aralarında 36 luminal A-benzeri, 13 luminal B-benzeri, HER2-

zenginleştirilmiş 16 bazal-benzeri 70 primer meme kanseri ve 18 normal meme dokusunda incelemişler. Bu miRNAlardan özellikle miR-29c'nin bazal-benzeri grupta normal meme dokusuna göre anlamlı derecede azalmış ekspresyon gösterdiğini tespit ettiler (Sandhu ve ark 2014). Bu araştırma sonucunun bizim sonucumuzdan farklı olmasının araştırmacıların deneylerinde tek hücreden total RNA izolasyonu yerine heterojen meme dokusundan RNA izolasyonu yaparak miRNA ekspresyonlarına bakmış olmalarından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Literatürde yeralan kapsamlı bir diğer çalışmada araştırmacılar miR-29a'nın ekspresyon seviyesini metastatik RasXT hücrelerini epitelyal EpRas hücreleri ile karşılaştırdılar. Meme kanserinde epitel-mezenşim dönüşümünde etkin olan tristetraprolin ekspresyonunun miR-29a tarafından baskılanarak hücreleri metastaza yönlendirdiklerini ortaya koydular. Bu durumun Ras sinyal yolu ile ilgili olduğunu belirttiler. Ayrıca aynı çalışmada 20 invaziv duktal karsinomali ve 4 benign meme dokusu (kontrol)'nda kıyaslamaları sonucunda miR-29a'nın anlamlı derecede artan ekspresyonunu elde ettiler (Gebeshuber ve ark 2009). Özellikle miR-29a'nın meme kanserinde epitel hücrelerin mezenşimal hücrelere dönüşümünü destekleyerek metastaza katkı sağladığı bilinmektedir (Jiang ve ark 2014). Elde ettikleri sonuçların bizim sonuçlarımızda olduğu gibi miR-29a'nın artan ekspresyonu yönünde olarak bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Meme kanserli hastaların doku ve serumlarındaki miRNA ekspresyonlarını sağlıklı hücrelerin doku ve serumlarındaki miRNA ekspresyonlarına göre kıyaslamaları amacıyla yapılan başka bir araştırmada aralarında miR-29a'nın olduğu 7 miRNA'nın dramatik düzeyde artan ekspresyonu elde edildi. Bu sonuçların meme kanseri dokusunda ve serumunda paralel sonuç vermesi ile de anlamlı ekspresyon veren bu 7 miRNA'nın meme kanseri takibinde aday belirteçler olabileceğini öne sürdüler (Wu ve ark 2012). Başka bir araştırmada Zhou ve ark (2010) yılında miRNA array kullanarak taxol-resistant ve taxol-sensitive parental hücrelerin miRNA ekspresyonlarını kıyasladılar. Çalışmada MDA-MB-435, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MCF7, SKBr3, BT474 meme kanseri hücreleri ve 435TR1, 435TRP taksol-dirençli hücrelerin gen ifade düzeylerini karşılaştırdılar. Özellikle taxol-resistant hücre (435TR1, 435TRP)'lerde taksol-sensitive hücre (MDA-MB-435)'lerine göre miR-100, miR-125b, miR-106b, miR-221, miR-222'in artan miR-16, miR-27a, miR-

29a/b, miR-146a/b'nin azalan ekspresyonunu elde ettiler (Zhou ve ark 2010). Pogriigny ve ark (2010) meme kanserinde hücrelerin sergilemiş olduğu ilaç direnci ile metastatik hücrelerin apoptoz karşı gösterdikleri direnç ve artan invazyonları arasında benzerlik olduğunu MCF-7, sisplatin dirençli MCF-7 (MCF-7/CDDP) hücrelerinde değerlendirerek miR-29a, miR-29b ve miR-132'nin sisplatin dirençli MCF-7 hücrelerinde artan ekspresyonlarını tespit ettiler. Bu miRNAların artan ifade düzeylerinin sisplatin dirençli hücrelerde DNA metiltransferaz sentezi ile ters orantılı olduğunu bildirmişlerdir (Pogribny ve ark 2010). Araştırma sonuçlarının ortak kanısı miR-29a'nın, meme kanserinin klinik tanı, tedavi aşamaları için özellikle de ileri seviyelerde metastaz takibi için ayrıcalıklı bir parametre olabileceği yönündedir. Wu ve ark (2013)'nın farklı tip meme kanserlerinde miR-29a'nın aşırı ekspresyonunun meme kanseri hücrelerini G0/G1 fazında tutarak büyüme hızlarını önemli derecede yavaşlattığını hatta miR-29a *knockdown* olan normal meme hücrelerinin S fazında kalarak büyümelerini sürdürdüklerini ve böylece miR-29a'nın meme kanseri hücrelerinin büyümesinin inhibisyonunda önemli rol aldıklarını gösterdiler (Wu ve ark 2013). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada miR-29a'nın meme kanserinde Adriamycin ve docetaxel gibi ilaçlara karşı gelişen dirençte etkin rol alabileceğini gösterdiler (Zhong ve ark 2013).

mikroRNA ailelerinden 17-92 kümesi, aralarında onkogenik ve tümör baskılayıcı miRNAları da bulunduran 7 homolog üyeden oluşmaktadır. Bu ailenin üyeleri aralarında meme, prostat, akciğer kanserinin bulunduğu hastalıklarda aşırı ekspresyon göstermektedir (Liu ve ark 2009). MDA-MB-435 hücrelerinin miRNA ekspresyonlarını MCF-7 hücrelerinin miRNA ekspresyonlarına göre saat bazlı kıyaslamamız sonucunda miR-17-92 ailesinin üyeleri olan ve meme kanserinde onkogenik miRNA sınıfında yer alan hsa-miR-19a-3p ve hsa-miR-19b-3p'nin deneyin bütün saatlerinde artan ifade düzeyleri elde edildi. Buna göre hsa-miR-19a-3p, 4. saatte 43 kat, 6. saatte 10 kat, 12. saatte 12 kat, 24. saatte 11 kat artış ile *fold regulation* gösterirken ($p<0.001$), hsa-miR-19b-3p ise 4. saatte 35 kat, 12. saatte 11 kat, 24. saatte 10 kat artış ile *fold regulation* ile sonuçlara yansdı ($p<0.001$).

Liu ve ark (2009) yaptıkları araştırma ile *Rho-associated kinase* (ROCK)'ın normalde hücre morfolojisi, adezyon ve hareketinde ana düzenleyici olduğu ve meme kanserinde ise artan ekspresyonu ile hücreleri invazyon ve migrasyona

yönlendirdiği özellikle aktivasyonunun sitoskeletal aktin-miyozin kasılması ve c-Myc yolakı tarafından modüle edildiğini gösterdiler. Ayrıca araştırmacılar miR-17-92 ailesinin ROCK/c-Myc yolak üzerindeki etkisini, meme kanseri hareket ve büyümesi üzerinden SUM1315, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri ile belirlediler. Sonuç olarak aralarında miR-19a ve miR-19b'nin de bulunduğu miR-17-92 ailesi üyelerinin ekspresyonlarını 2 ila 6 kat artış olarak tespit ettiler (Liu ve ark 2009). Başka bir çalışmada meme kanseri anjiyogenez ve metastazında rol alan doku faktör genlerinin regülasyonunda miR-19'un protein seviyesi daha az invaziv MCF-7, T47D, ZR-75-1 tespit edilirken ve invaziv MDA-MB-231, BT-20 meme kanseri hücrelerinde bu protein seviyesinin oldukça yüksek olduğu *western-blot* analizi ile belirlendi. Elde ettikleri sonuçlardan miR-19'un meme kanseri anjiyogenez ve invazyonunda etkin rol alabileceği sonucuna vardılar (Zhang ve ark 2011). Literatürde yeralan çalışma sonuçları doğrultusunda miR-17-92 ailesinin bir üyesi olan miR-19'un bu aile içerisinde meme kanserinin de aralarında olduğu çeşitli kanserlerde onkogenik aktivitesi ile ön plana çıktığını görüyoruz. Tespit edilen kanıtlar, miR-19'un bu aktivitesini özellikle tümör baskılayıcı PTEN genini inaktif halde tutarak ve Akt-mTOR yolakını aktif hale getirerek sağladığına işaret etmektedir (Olive ve ark 2009). Ouchida ve ark (2012) miR-19a'nın hedef genlerini MCF-7 kanseri hücrelerinde *quantitative proteomic strategy* ile analiz ederek meme kanserinin büyümesinden sorumlu IMPDH1 ve NPEPL1 genlerinin bu miRNA'nın hedefleri arasında bulunduğunu gösterdiler (Ouchida ve ark 2012). Bu miRNA üzerine yapılan çalışmalarda özellikle meme kanserinde artan ekspresyonları karşımıza çıkıyor. Bu çalışmalardan bir tanesi de Anfossi ve ark (2013)'nın 113 meme kanseri hastasının serum örneklerinde miR-21, miR-10b ve miR-19a'nın ekspresyon seviyelerini RT-PCR ile analiz ederek bu miRNAların değişen seviyelerini klinopatolojik faktörlere göre değerlendirilmesiyle elde edildi. Hastaların serumlarında elde edilen yüksek miR-19a seviyesinin inflamatuvar meme kanseri hastaları için klinik takibe yönelik bir parametre olabileceği yönünde sonuç elde edildi (Anfossi ve ark 2014). Bizim sonuçlarımızda literatürde bu miRNA ve meme kanseri ile ilgili yapılan çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde edildiğini gösterdi.

Epitel-mezenşim dönüşümü non-metastatik hücrelerin hücre içi adezyonlarının azalması, artan migrasyon kapasiteleri, kök hücre özellikleri, anoikis direnci ve kemoterapi rezistansı ile karakterize metastatik döngünün önemli bir parçasıdır (Taube ve ark 2013). Bu sürecin önemli düzenleyicilerinden olan hsa-miR-203a, araştırmamızın 2. saatinde -331 kat, 4. saatinde -14 kat, 6. saatinde -48 kat, 24. saatinde -36 kat, 48. saatinde -19 kat *fold regulation* ile azalış olarak sonuçlara yansıdı ($p<0.001$). Bizim sonuçlarımızın kıyaslamasında invaziv karakterli MDA-MB-435 hücrelerinin miR-203a ekspresyonu MCF-7 hücrelerinin ekspresyonları ile kıyaslanması sonucunda saat bazlı azalışlar elde edildi.

Taube ve ark (2013)'lerinin araştırmalarında luminal karakterli (MCF-7, T47) hücrelerindeki miR-203a ifadesinin claudin-düşük hücreler (MDA-MB-231, SUM159 ve Hs578T) hücrelerine göre daha yüksek olduğunu gösterdiler (Taube ve ark 2013). Bu çalışmanın sonuçları bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermesi bakımından önemlidir.

Başka bir çalışmada hem miR-200c'nin hem de miR-203'ün meme kanserinde Bmi1 (meme kanseri hücrelerinin kendi kendilerini yenilemesini sağlayan gen) geninin temel hedef aldıkları gösterildi. Özellikle son bulgular çeşitli kanserlerde azalmış miR-203 ekspresyonunun kanser hücre proliferasyon, invazyon ve ilaç direnci ile bağlantılı olduğunu kanıtladı. Deney sonucunda 5-flurourasil-dirençli MCF-7 hücrelerinde kanser hücrelerine kendi kendini yenileme özelliği kazandıran Bmi1 geninin yüksek ekspresyonu belirlendi. Ayrıca Bmi1 geni, miR-200c ve miR-203 ekspresyonları arasında ters bir orantı olduğu belirlendi (Yin ve ark 2013).

Zhang ve ark.'ları miR-203 seviyesini RT-PCR ile belirleyerek primer meme tümörlerinde ve bazı metastatik olmayan tümörlerde yüksek bulurlarken metastatik meme kanseri hücre hatlarında (BT549, Hs578T, MDA-MB-231) dramatik düzeyde azalan ekspresyonlarını belirlediler. Metastatik meme kanseri hücre hatlarındaki bu miR-203 ekspresyonunun hücre döngüsü, apoptoz, invazyon, metastaz fonksiyonları ile bağlantılı olabileceği belirlendi (Zhang ve ark 2011).

Literatürde yeralan başka bir çalışmada tümör baskılayıcı ailenin bir üyesi olan ING1 proteinin ifade düzeyinin aralarında miR-203'ünde bulunduğu

miRNAlar tarafından regüle edildiğini U2OS (osteosarkom) ve MDA-MB-231 (meme kanseri hücre hattı)'de ortaya koymuşlardır. Elde ettikleri sonuçlarla miR-203'ün tümör baskılayıcı özelliği sayesinde meme kanseri hücre proliferasyonunu azalttığını ortaya koydular (Chen ve ark 2013). Araştırma ekibinin elde etmiş olduğu bu sonuçlar bizim daha invaziv karakterli meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-435'de MCF-7 hücrelerine göre miR-203 gen ifade düzeyinin saat bazlı olarak azalmasıyla ortaklık göstermesi bakımından önemlidir.

Benzer sonuçlara sahip başka bir çalışmada üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-468, MDA-MB-231) yapılan real-time PCR gen ekspresyonu ve protein düzey çalışmaları sonucunda miR-203'ün bu hücre hatlarında önemli derecede proliferasyonlarını azalttığını ve meme kanserinin tedavisinde hedef terapötik ajan olabileceğini belirlediler (Wang ve ark 2012).

Yapmış olduğumuz RT-PCR sonuçlarına göre meme kanserinde tümör baskılayıcı miRNA sınıfında yeralan hsa-miR-205-5p'nin gen ekspresyonunun MDA-MB-435 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre 6. saatte -15 kat, 24. saatte -16 kat, 48. saatte -18 kat azalış ile *fold regulation* gösterdiği belirlendi ($p<0.001$).

Wang ve ark (2013)'ları MCF-7, MCF10A meme kanseri hücreleri ve meme kanseri dokusu ile sağlıklı meme dokusundaki miR-205 ifade düzeyini RT-PCR ve protein düzeyinde çalışmışlardır. Araştırma sonuçları hem meme kanseri hücrelerinde hem de meme kanserli dokularda bu miRNA'nın azalmış ekspresyonunu gösterdi. Bu miRNA'nın meme kanserinde tümör baskılayıcı olduğu ve hedef genleri arasında HER3 olduğunu belirlediler (Wang ve ark 2013).

miR-205, meme kanserinde hücrenin proliferasyon, migrasyon ve invazyon süreçlerinin inhibisyonunda tümör baskılayıcı olarak görev alır. Birçok kanser türünde üstlendiği farklı görevler ile karşımıza çıkan miR-205, klinik terapötik uygulamalar için aday bir miRNA'dır. Özellikle meme kanserinde birçok çalışmada azalan ifade düzeyi ile karşımıza çıkmaktadır.

Bunlardan Baffa ve ark (2009)'larının yapmış olduğu çalışmada aralarında meme kanserinin de olduğu bir grup primer tümördeki özellikle lenf nodu metastazındaki miRNAların ekspresyon seviyelerini RT-PCR ile incelediler. Bu

analiz sonucunda miR-200 ailesi üyeleri (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429) ve miR-205'in meme kanserinde özellikle epitel-mezenşim dönüşümünde azalan ifade seviyelerini buldular (Baffa ve ark 2009).

Son dönemde yapılan birçok çalışmanın sonucu miR-205'in meme kanserinde üstlenmiş olduğu kritik göreve dikkat çekmektedir. miR-205'in HER reseptör ailesi tarafından proliferatif yollardaki tümör baskılayıcı özelliği Iorio ve ark (2009)'ları tarafından gen ekspresyonu ve protein düzeylerinde çalışılarak tedaviye yönelik aday belirteç olabileceği üzerinde durulmuştur (Iorio ve ark 2009).

Hem normal fizyolojide hem de bazı kanserlerde aşırı ekspresyon miktarı ile karşımıza çıkan miR-205, kanser patofizyolojisinde hücre survival, apoptoz, anjiyogenez ve metastaz aşamalarında aktif rol almaktadır. Özellikle meme kanserinde tümör baskılayıcı olarak kanser hücre proliferasyon, metastaz ve invazyonunu baskılamaktadır. Tüm bu kritik aşamalardaki rolleri sebebiyle aralarında meme kanserinin de olduğu birçok kanserde terapötik bir ajan olma özelliğini bünyesinde bulundurmaktadır.

İnvaziv meme kanserlerinde aynı miR-200 ailesi gibi epitel-mezenşim dönüşümünde Zeb1 ve Zeb2 genlerini hedef alarak tümör baskılayıcı rol üstlenen miR-205'in azalan ekspresyon seviyesi Baffa ve ark (2009)'larının çalışmalarıyla da ortaya konuldu (Baffa ve ark 2009).

Iorio ve ark (2009)'ları da meme kanserinde miR-205 ekspresyon seviyesinin normal meme dokusundaki seviyeye oranla daha düşük olduğunu ve bu miRNA'nın ErbB-3 ve HER-3 tirozin protein kinaz reseptörlerinin gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu olabileceğini yaptıkları çalışmalarla gösterdiler (Iorio ve ark 2009).

Başka bir araştırmada ise Wang ve ark (2013)'larının çalışmaları da miR-205'in meme kanserinde azalan ekspresyonu karşısında HER-3 ekspresyonunun artan şeklinde ters ilişki halinde olduklarını gösterdi. Bu durumun ise PI3K/Akt hücre yolakındaki Akt aktivasyonunu bozarak meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu bozabileceği sonucunu buldular (Wang ve ark 2013).

Meme kanserinde tümör baskılayıcı karakterizasyonu ile ön plana çıkan miR-200 ailesi içerisinde yeralan hsa-miR-141-3p, bizim çalışmamızın 6. saatinde -11 kat, 12. saatinde -9 kat, 24. saatinde -15 kat, 48. saatinde -15 kat azalış ile *fold regulation* gösterdi ($p<0.001$).

Literatürde yeralan Abedi ve ark (2015)'lerinin invaziv karakterli MDA-MB-231 ve normal karakterli MCF-10A meme kanseri hücrelerinde aralarında miR-141'inde bulunduğu bir grup miRNA ekspresyonunu real-time PCR ile analiz ettiler. Araştırma sonuçları MDA-MB-231 hücrelerinde miR-141 ekspresyonunun MCF-10A hücrelerine göre oldukça azalmış olduğunu bununla birlikte miR-141'in hedef genleri arasında yeralan β *catenin* geni olan CTNNB1 ekspresyonunun ise artmış olduğunu belirlediler (Abedi ve ark 2015).

Yakın geçmişte yapılan başka bir çalışmada miR-200a ve miR-141'in meme kanserinde invazyon, hücre canlılığı, apoptoz aşamalarında kritik düzenleyiciler olup ekspresyon seviyelerinin azaldığı belirlendi (Uhlmann ve ark 2010).

miR-141'in meme kanserindeki ekspresyon seviyesi ile ilgili bu çalışma sonuçları bizim sonuçlarımızla uyumluluk göstermesi bakımından önemlidir.

Araştırma sonucumuzda invaziv karakterli MDA-MB-435 hücrelerinin miRNA ekspresyonlarının daha az invaziv karakterli MCF-7 hücrelerinin miRNA ekspresyonları ile kıyaslanması sonucunda 2. saatte miR-130b-3p, miR-181c-5p, miR-129-5p, miR-186-5p, miR-181d-5p, miR-328-3p anlamlı derecede artan ekspresyonları ile sonuçlara yansıdı. Devamında 4. saatte miR-130b-3p, miR-186-5p, miR-181c-5p, miR-129-5p, miR-328-3p, miR-181d-5p, miR-328-3p, miR-181d-5p artış ile, 6. saatte miR-130b-3p, miR-181c-5p, miR-186-5p, miR-181d-5p, miR-129-5p, miR-328-3p artan yönde *fold regulation* ile, 12. saatte miR-130b-3p, miR-181c-5p, miR-186-5p, miR-129-5p, miR-181d-5p, miR-328-3p artış ile, 24. saatte miR-130b-3p, miR-186-5p, miR-181d-5p olarak anlamlı artan ekspresyon miktarları ile ve 48. saatte miR-130b-3p, miR-181c-5p, miR-186-5p, miR-328-3p, miR-181d-5p olarak artan gen ifade düzeyleri ile sonuçlara yansıdı. Elde edilen bu miRNA sonuçları ile ilgili literatürde meme kanserindeki etkin rollerine ilişkin araştırma sonuçlarına ulaşamadık. Araştırma sonuçlarımızın bu mikroRNAların

meme kanserindeki ekspresyon seviyelerine ilişkin yeni sonuçlar olması bakımından önem taşımaktadır.

Her iki hücre hattında saat ilerleyişiyle birlikte artan ve azalan *fold regulation* gösteren miRNAların olası hedef genlerinin olabileceği metabolik yollar *DIANA-mirPath* ([http:// diana.imis.athena-innovation.gr](http://diana.imis.athena-innovation.gr)) programı kullanılarak analiz edildi.

Analiz sonucunda MCF-7 hücrelerinde 4. saatte gen ifade düzeyleri 2. saatteki ifade düzeylerine göre anlamlı derecede artış ve azalış gösteren miRNAların *mTOR signaling pathway* (hsa04150), *ErbB signaling pathway* (hsa04012), *Pathways in cancer* (hsa05200) yolları içerisindeki hedef genlerini düzenleyebileceği sonucu elde edildi. Araştırmanın devamında 6. saatte ekspresyon seviyeleri ile ön plana çıkan miRNAlar *PI3K-Akt signaling pathway* (hsa04151), *MAPK signaling pathway* (hsa04010), *Wnt signaling pathway* (hsa04310) yolları, 12. saatte *mTOR signaling pathway* (hsa04150), *Wnt signaling pathway* (hsa04310), 24. saatte *p53 signaling pathway* (hsa04115) ve 48. saatte *ErbB signaling pathway* (hsa04012) eklendiği sonuçları elde edildi.

MDA-MB-435 hücrelerinin de deneyin her saatindeki önemli derecede artan ve azalan miRNAların muhtemel hedef genlerinin yeraldığı yolk analizleri de yapıldı. Sonuçlar 4. saatteki artan ve azalan oranda ekspresyon gösteren miRNAların *ErbB signaling pathway* (hsa04012), *MAPK signaling pathway* (hsa04010) yollarında, 12. saatte *PI3K-Akt signaling pathway* (hsa04151), *Wnt signaling pathway* (hsa04310), *Adipocytokine signaling pathway* (hsa04920), *Pathways in cancer* (hsa05200), *p53 signaling pathway* (hsa04115), *mTOR signaling pathway* (hsa04150), 24. saatte *Wnt signaling pathway* (hsa04310), *Pathways in cancer* (hsa05200), *ErbB signaling pathway* (hsa04012) ve 48. saatte *PI3K-Akt signaling pathway* (hsa04151), *mTOR signaling pathway* (hsa04150) yollarındaki hedef genlerin aktivitelerini düzenleyebileceğini düşünmekteyiz.

Meme kanserinin ilerlemiş aşamalarını sergilemiş olduğu invaziv karakterle örnekleyen MDA-MB-435 hücrelerinin, meme kanserinin metastazdan önceki aşamalarını örnekleyen MCF-7 hücrelerine göre deneyin her saatinde önemli derecede farklı ekspresyon gösteren (en az 10 kat artış-azalış) miRNAların ifade

düzeylerini etkileyebilecekleri genlerin yeraldığı yollar aynı software kullanılarak tespit edildi. Sonuçlara göre MDA-MB-435 hücrelerinde deneyin 2. saatinde MCF-7 hücrelerine göre farklı derecede ifade düzeyi gösteren miRNAların Hedgehog signaling pathway (hsa04340), Cell cycle (hsa04110), Pathways in cancer (hsa05200), 4. saatte 2. saatte belirlenen yollara PI3K-Akt *signaling pathway* (hsa04151), MAPK *signaling pathway* (hsa04010), ErbB *signaling pathway* (hsa04012) yolları eklendi. Devamında 6. saatte 4. saatte belirlenen yollara NF-kappa B signaling pathway (hsa04064), ErbB signaling pathway (hsa04012), GnRH *signaling pathway* (hsa04912) ile, 12. saatte ise 6. saatte aktiflenen yollara p53 signaling pathway (hsa04115) ile, daha uzun deney gruplarından olan 24. saatte Wnt *signaling pathway* (hsa04310), TGF-beta signaling pathway (hsa04350), HIF-1 *signaling pathway* (hsa04066), mTOR signaling pathway (hsa04150), Regulation of actin cytoskeleton (hsa04810) ve 48. saatte ise Notch signaling pathway (hsa04330), Adherens junction (hsa04520), VEGF signaling pathway (hsa04370), Jak-STAT signaling pathway (hsa04630) ile devreye girdiği belirlendi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, moleküler sınıflandırmada luminal grup, ER (+) pozitif, PR (+) pozitif, ErbB2 (+) pozitif MCF-7 meme kanseri hücresi ile moleküler sınıflandırmada bazal benzeri, ER (-) negatif, PR (-) negatif, ErbB2 (-) negatif invaziv karakterli MDA-MB-435 meme kanseri hücresinin 2 (kontrol), 4, 6, 12, 24 ve 48. saatlerdeki meme kanserine spesifik 84 adet miRNA ekspresyon profilleri yüksek kapasiteli real-time PCR yöntemiyle belirlendi.

Elde edilen verilerden,

- MCF-7 hücrelerinde, 4. saatte 3 adet miRNA (2 onkogenik, 1 tümör baskılayıcı); 6. saatte 26 adet miRNA (15 onkogenik, 10 tümör baskılayıcı, 1 meme kanseri ile olan bağlantısı bilinmeyen); 12. saatte 5 adet miRNA (2 onkogenik, 3 tümör baskılayıcı); 24. saatte 5 adet miRNA (1 onkogenik, 4 tümör baskılayıcı); 48. saatte 6 adet miRNA (5 tümör baskılayıcı, 1 meme kanseri ile olan bağlantısı bilinmeyen) farklı düzeyde ekspresyon gösterdiği saptandı ($p<0.05$).

- MDA-MB-435 hücrelerinde, 4. saatte 5 adet miRNA (tümör baskılayıcı); 12. saatte 6 adet miRNA (tümör baskılayıcı); 24. saatte 2 adet (1 tümör baskılayıcı, 1 onkogenik); 48. saatte 4 adet miRNA (2 tümör baskılayıcı, 2 onkogenik) değişik düzeylerde anlamlı gen ifade düzeyleri elde edildi ($p<0.05$).

Belirlenen sonuçlar invaziv karakterli olan MDA-MB-435 hücrelerinin daha az invaziv karakterli MCF-7 hücrelerine göre ilerleyen deney saatlerinde besin azlığı, pH değişikliği, hipoksi gibi değişen çevre koşullarına karşı daha dirençli olabileceğini gösterdi.

MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre miRNA ekspresyonlarının kıyaslanması sonucunda,

- İkinci saatte 31 adet miRNA (15 onkogenik+10 tümör baskılayıcı+6 bilinmiyor) en az 2 kat artış, 9 adet miRNA (2 onkogenik+ 7 tümör baskılayıcı) en az 2 kat olmak üzere azalış göstererek toplamda 40 adet miRNA göreceli farklı ekspresyon gösterdiği ($p<0.05$),

- Dördüncü saatte 47 adet miRNA'nın (24 onkogenik+ 15 tümör baskılayıcı+ 8 bilinmeyen) en az 2 kat artış, 7 adet miRNA'nın (tümör baskılayıcı) en az 2 kat olmak üzere azalış sergileyerek 54 adet miRNA ifadesi ($p<0.05$),

- Altıncı saatte 38 adet miRNA'nın (20 onkogenik+ 12 tümör baskılayıcı+ 6 bilinmeyen) en az 2 kat artış, 9 adet miRNA'nın (tümör baskılayıcı) en az 2 kat azalış ortaya koyarak 47 adet miRNA farklı düzeylerde ön plana çıktığı ($p<0.05$),

- Onikinci saatte 30 adet miRNA (17 onkogenik+ 7 tümör baskılayıcı+ 6 bilinmeyen) en az 2 kat artış, 9 adet miRNA (tümör baskılayıcı) en az 2 kat azalış olmak üzere 39 adet miRNA ($p<0.05$),

- Yirmidördüncü saatte 30 adet miRNA (18 onkogenik+ 9 tümör baskılayıcı+ 3 bilinmeyen) en az 2 kat artış gösterirken, 13 adet miRNA (12 tümör baskılayıcı+ onkogenik) en az 2 kat azalış olarak toplamda 43 miRNA gen ifade düzeyi ($p<0.05$),

- Kırksekizinci saatte ise 38 adet miRNA (23 onkogenik+ 10 tümör baskılayıcı+ 5 bilinmeyen) en az 2 kat artış, 10 adet miRNA (9 tümör baskılayıcı+ 1 onkogenik) en az 2 kat azalış olmak üzere 48 miRNA farklı düzeylerde gen ekspresyonu gösterdiği belirlendi ($p<0.05$).

MDA-MB-435 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine göre saat bazlı olarak dramatik artış sergileyen miRNAların dahil oldukları yolak analizleri sonucunda bu miRNA'ların,

- Meme kanserinin başlangıcında etkin olduğu bilinen *Hedgehog signaling pathway* ve *Cell cycle* yolaklarındaki hedef genlerini deneyin 2. saatinde etkileyebilecekleri,
- Benzer şekilde miRNAların bu etkinliklerini deneyin 4. saatinde 2. saatte belirlenen yollara PI3K-Akt *signaling pathway* ve MAPK *signaling pathway* eklenmesiyle bu iki zaman dilimindeki miRNAların tümör başlangıcında rol alan kanser kök hücre ve aşırı hücre proliferasyonu ile karakteristik meme kanseri başlangıcında etkili olabilecekleri,

- Meme kanseri ilerlemesinde devreye giren anti-apoptotik ve hücre döngüsü kontrol noktalarındaki bozukluklarla seyreden NF-kappa B sinyal yolakda yeralan hedef genlerin deneyin 6. saatindeki önemli derecede ifade düzeyi bulan miRNA'lar tarafından düzenlenebileceği, 12. saatte ise p53 sinyal yolakı ile etkinliğin devam ettiği,
- Meme kanseri invazyon ve metastaz süreçlerinde organezde normal bir proses iken metastaz döngüsünde kritik bir aşama olan epitel hücrelerin mezenşim hücrelere (EMT) dönüşümü karşımıza çıkmaktadır. Deneyin 24 ve 48. saat sonuçlarında EMT dönüşümün düzenleyici yollarından Wnt signaling pathway, Notch sinyal yolakı, TGF-beta sinyal yolakı ve hücrenin hipoksik koşullara uyumunu sağlayan yollardan olan HIF-1 sinyal yolakı, kanser anjiyogenezinde rol alan VEGF sinyal yolakında yeralan hedef genlerin ifade düzeylerinin RT-PCR sonucunda belirlemiş olduğumuz miRNA'lar tarafından posttranskripsiyonel seviyede regüle edilebileceği gösterildi.

Bundan sonraki aşamada,

- İki hücre hattı arasında dramatik düzeyde farklı ekspresyon sergileyen hsa-miR-100-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-141-3p miRNA'ların hedef yollar içerisindeki olası genlerinin de ifade düzeylerini RT-PCR ile doğrulayıp elde edilen sonuçların protein düzeyinde de desteklenmesi hedeflenmektedir.

Araştırma sonucunda saat bazlı olarak elde etmiş olduğumuz meme kanserine yönelik miRNA gen ekspresyon düzeyleri hücre içerisinde gen ifade düzeyinin dinamik bir süreç olup sirkadiyenliğini göstermesi bakımından önemlidir.

Özellikle bundan sonraki çalışmalarda hedef yollar içerisinde etkinliği belirlenmek istenen gen için yapılacak RNA izolasyonu doğru saatte yapmanın hedefe yönelik daha nitelikli sonuçlar almak ve yapılan daha ileri deneylerle hedef

miRNAların klinisyenler için de hem tanıya hem de tedavi takibine yönelik aday parametre olması bakımından önemlidir.



6. KAYNAKLAR

- Abedi N, Mohammadi-Yeganeh S, Koochaki A, Karami F, Paryan M, 2015. miR-141 as potential suppressor of β -catenin in breast cancer. *Tumor Biology*, 36, 12, 9895-901.
- Ahmad A, 2013. Pathways to breast cancer recurrence. *ISRN oncology*, 2013, 290568.
- Ahmada J, Hasnainb SE, Siddiquia MA, Ahamedd M, Musarrata J, Al-Khedhairya AA, 2013. MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: A new paradigm. *Indian Journal of Medical Research*, 137, 680-94.
- Aigner A, 2011. MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs. *Journal of molecular medicine*, 89, 5, 445-57.
- Akkaya ZY, Dinçer P, 2013. Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem Kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. *Marmara Medical journal*, 26, 5-10.
- Ambros V, 2003. A uniform system for microRNA annotation. *Rna*, 9, 3, 277-9.
- Anfossi S, Giordano A, Gao H, Cohen EN, Tin S, Wu Q, Garza RJ, Debeb BG, Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN, Calin GA, Ueno NT, Woodward WA, Reuben JM, 2014. High Serum miR-19a Levels Are Associated with Inflammatory Breast Cancer and Are Predictive of Favorable Clinical Outcome in Patients with Metastatic HER2+ Inflammatory Breast Cancer. *PloS one*, 9(1), e83113.
- Anindo MI, Yaqinuddin A, 2012. Insights into the potential use of microRNAs as biomarker in cancer. *International journal of surgery*, 10, 9, 443-9.
- Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, Lai A, Druker R, Eisbacher M, Zhang C, Tran N, Fan H, Retzlaff K, Bittner A, Raponi M, 2009. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC cancer*, 9, 374.
- Babashah S, Soleimani M, 2011. The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. *European journal of cancer*, 47, 8, 1127-37.
- Baffa R, Fassan M, Volinia S, O'Hara B, Liu CG, Palazzo JP, Gardiman M, Rugge M, Gomella LG, Croce CM, Rosenberg A, 2009. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *The Journal of pathology*, 219, 2, 214-21.
- Bartel PD, 2004. MicroRNAs Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell death and differentiation*, 2, 281-97.
- Boll K, Reiche K, Kasack K, Mörbt N, Kretzschmar AK, Tomm JM, Verhaegh G, Schalken J, von Bergen M, Horn F, Hackermüller J, 2013. MiR-130a, miR-203 and miR-205 jointly repress key oncogenic pathways and are downregulated in prostate carcinoma. *Oncogene*, 32, 277-85.
- Brown JW, Marshall DF, Echeverria M, 2008. Intronic noncoding RNAs and splicing. *Trends in plant science*, 13, 7, 335-42.
- Budd WT, Weaverb DE, Andersonb J, Zehnerc ZE, 2012. microRNA Dysregulation in Prostate Cancer Network Analysis Reveals Preferential Regulation of Highly Connected Nodes. *Chemistry & Biodiversity*, 9, 5, 857-67.
- Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MRJ, Speirs V, 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Research*, 5, 2, 89.

- Calin GA, Croce CM, 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews. Cancer*, 6, 11, 857-66.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM, 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 24, 15524-9.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 9, 2999-3004.
- Calvano Filho CM, Calvano-Mendes DC, Carvalho KC, Maciel GA, Ricci MD, Torres AP, Filassi JR, Baracat EC, 2014. Triple-negative and luminal A breast tumors: differential expression of miR-18a-5p, miR-17-5p, and miR-20a-5p. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35, 8, 7733-41.
- Campanella NC, Demartini MS, Torres C, Almeida ET, Gouvêa CMCP, 2012. The cytotoxic and growth inhibitory effects of palladium(II) complexes on MDA-MB-435 cells. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1, 159-63.
- Castañeda CA, Teresa M, Ortuño A, Vara JAF, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos E, 2011. Implication of miRNA in the diagnosis and treatment of breast cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* 11, 8.
- Castilla-Llorente V, Nicastro G, Ramos A, 2013. Terminal loop-mediated regulation of miRNA biogenesis: selectivity and mechanisms. *Biochemical Society transactions*, 41, 4, 861-5.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS, 2005. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. *Cancer research*, 65, 6029-33.
- Chang HT, Li SC, Ho MR, Pan HW, Ger LP, Hu LY, Yu SY, Li WH, Tsai KT, 2012. Comprehensive analysis of microRNAs in breast cancer. *BioMed Genomics*, 13.
- Chen D, Sun Y, Yuan Y, Han Z, Zhang P, Zhang J, You MJ, Teruya-Feldstein J, Wang M, Gupta S, Hung MC, Liang H, Ma L, 2014. miR-100 induces epithelial-mesenchymal transition but suppresses tumorigenesis, migration and invasion. *PLoS genetics*, 10, 2, e1004177.
- Chen J, Tran UM, Rajarajacholan U, Thalappilly S, Riabowol K, 2013. ING1b-inducible microRNA203 inhibits cell proliferation. *British journal of cancer*, 108, 5, 1143-8.
- Chen J, Wang L, Matyunina LV, Hill CG, McDonald JF, 2011. Overexpression of miR-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition (MET) in metastatic ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology*, 121, 1, 200-5.
- Chen PS, Su JL, Hung MC, 2012. Dysregulation of MicroRNAs in cancer. *Journal of Biomedical Science* 19, 90.
- Chen Y, Gorski DH, 2008. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood*, 111, 3, 1217-26.
- Cheng C, Fu X, Alves P, Gerstein M, 2009. mRNA expression profiles show differential regulatory effects of microRNAs between estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer. *Genome biology*, 10, 9, R90.

- Cho WC, 2007. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Molecular cancer*, 6, 60.
- Cho WC, 2010. MicroRNAs in cancer - from research to therapy. *Biochimica et biophysica acta*, 1805, 2, 209-17.
- Chu CY, Rana TM, 2007. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *Journal of cellular physiology*, 213, 2, 412-9.
- Chu Q, Ru-Yi H, Zhao-Xia W, 2015. Potential role of miR-100 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Tumor Biol.*, 36, 1403-9.
- Chuankui W, Qifeng L, Xiaoguo S, Dengfeng L, Hongming S, Xiaoyu L, Jialu S, Kaiyao H, Lin F, 2015. microRNA-497 induces cell apoptosis by negatively regulating Bcl-2 protein expression at the posttranscriptional level in human breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8, 7, 7729-39.
- Cummins JM, Velculescu VE, 2006. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene*, 25, 46, 6220-7.
- D'Ippolito E, Iorio MV, 2013. MicroRNAs and triple negative breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 14, 11, 22202-20.
- Daya L, James M, Wilson NH, Jimei L, Lirong P, Shuang H, LesleyAnn H, Huidong S, 2013. A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells. *Journal of Translational Medicine*, 11, 57.
- Daya L, James MW, Nikki H, Jimei L, Lirong P, Shuang H, LesleyAnn H, Huidong S, 2013. A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells.
- Deng L, Shang L, Bai S, Chen J, He X, Martin-Trevino R, Chen S, Li XY, Meng X, Yu B, Wang X, Liu Y, McDermott SP, Ariazi AE, Ginestier C, Ibarra I, Ke J, Luther T, Clouthier SG, Xu L, Shan G, Song E, Yao H, Hannon GJ, Weiss SJ, Wicha MS, Liu S, 2014. MicroRNA100 inhibits self-renewal of breast cancer stem-like cells and breast tumor development. *Cancer research*, 74, 22, 6648-60.
- Derfoul A, Juan AH, Difilippantonio MJ, Palanisamy N, Ried T, Sartorelli V, 2011. Decreased microRNA-214 levels in breast cancer cells coincides with increased cell proliferation, invasion and accumulation of the Polycomb Ezh2 methyltransferase. *Carcinogenesis*, 32, 11, 1607-14.
- Di Leva G, Garofalo M, Croce CM, 2014. MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*, 9, 287-314.
- Dongping L, Yaroslav I, Anna K, Levon MK, Roderick TB, Bo W, Olga K, 2013. Crucial Role for Early Growth Response-1 in the Transcriptional Regulation of miR-20b in Breast Cancer.
- Du T, Zamore PD, 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 132, 21, 4645-52.
- Du T, Zamore PD, 2007. Beginning to understand microRNA function. *Cell research*, 17, 8, 661-3.
- Ebert MS, Sharp PA, 2012. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149, 3, 515-24.

- Edmonds MD, Hurst DR, Vaidya KS, Stafford LJ, Chen D, Welch DR, 2009. Breast cancer metastasis suppressor 1 coordinately regulates metastasis-associated microRNA expression. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 125, 8, 1778-85.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ, 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6, 4, 259-69.
- Farazi TA, Spitzer JJ, Morozov P, Tuschl T, 2011. miRNAs in human cancer. *The Journal of pathology*, 223, 2, 102-15.
- Finnegan EF, Pasquinelli AE, 2013. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48, 1, 51-68.
- Frampton AE, Krell J, Pellegrino L, Roca-Alonso L, Jiao LR, Stebbing J, Castellano L, Jacob J, 2012. Integrated analysis of miRNA and mRNA profiles enables target acquisition in human cancers. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12, 3, 323-30.
- Gao J, Li L, Wu M, Liu M, Xie X, Guo J, Tang H, Xie X, 2013. MiR-26a inhibits proliferation and migration of breast cancer through repression of MCL-1. *PloS one*, 8, 6, e65138.
- Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM, 2006. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in molecular medicine*, 12, 12, 580-7.
- Gebeshuber CA, Martinez J, 2013. Mir-100 suppresses IGF2 and inhibits breast tumorigenesis by interfering with proliferation and survival signaling. *Oncogene*, 32, 3306-10.
- Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J, 2009. miR-29a suppresses tristetruprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO reports*, 10, 4, 400-5.
- Gerson KD, Maddula VSRK, Seligmann BE, Shearstone JR, Khan A, Mercurio AM, 2012. Effects of 4 integrin expression on microRNA patterns in breast cancer. *Biology Open*, 1, 7, 658-66.
- Gong B, Hu H, Chen J, Cao S, Yu J, Xue J, Chen F, Cai Y, He H, Zhang L, 2013. Caprin-1 is a novel microRNA-223 target for regulating the proliferation and invasion of human breast cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 67, 7, 629-36.
- Gorur A, Balci Fidanci S, Dogruer Unal N, Ayaz L, Akbayir S, Yildirim Yaroglu H, Dirlik M, Serin MS, Tamer L, 2013. Determination of plasma microRNA for early detection of gastric cancer. *Molecular biology reports*, 40, 3, 2091-6.
- Görür A, Tamer L, 2011. mikroRNAların Terapötik Kullanımı. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4, 2, 1-7.
- Graveel CR, Calderone HM, Westerhuis JJ, Winn ME, Sempere LF, 2015. Critical analysis of the potential for microRNA biomarkers in breast cancer management. *Breast cancer*, 7, 59-79.
- Graves P, Zeng Y, 2012. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 10, 5, 239-45.
- Gregory RI, Shiekhattar R, 2005. MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Cancer research*, 65, 9, 3509-12.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ, 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, 34, Database issue, D140-4.

- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ, 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*, 36, Database issue, D154-8.
- Großhans H, Filipowicz W, 2008. *Molecular Biology: The expanding world of small RNAs*. *Nature*, 451, 414-16.
- Hammond SM, 2006. MicroRNAs as oncogenes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16, 1, 4-9.
- Hanahan D, Weinberg RA, 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57–70.
- Harquail J, Benzina S, Robichaud GA, 2012. MicroRNAs and breast cancer malignancy: an overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 11, 6, 269-80.
- He J, Jing Y, Li W, Qian X, Xu Q, Li FS, Liu LZ, Jiang BH, Jiang Y, 2013. Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis. *PloS one*, 8, 2, e56647.
- He L, Hannon GJ, 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics*, 5, 7, 522-31.
- He N, Zheng H, Li P, Zhao Y, Zhang W, Song F, Chen K, 2014. miR-485-5p binding site SNP rs8752 in HPGD gene is associated with breast cancer risk. *PloS one*, 9, 7, e102093.
- Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Kerin MJ, 2009. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. *Journal of oncology*, 2009, 950201.
- Hoppe R, Achinger-Kawecka J, Winter S, Fritz P, Lo WY, Schroth W, Brauch H, 2013. Increased expression of miR-126 and miR-10a predict prolonged relapse-free time of primary oestrogen receptor-positive breast cancer following tamoxifen treatment. *European journal of cancer*, 49, 17, 3598-608.
- Hossain A, Kuo MT, Saunders GF, 2006. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Molecular and cellular biology*, 26, 21, 8191-201.
- Hurteau GJ, Carlson JA, Spivack SD, Brock GJ, 2007. Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer research*, 67, 17, 7972-6.
- Hwang HW, Mendell JT, 2006. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British journal of cancer*, 94, 6, 776-80.
- Imam JS, Plyler JR, Bansal H, Prajapati S, Bansal S, Rebeles J, Chen HI, Chang YF, Panneerdoss S, Zoghi B, Buddavarapu KC, Broaddus R, Hornsby P, Tomlinson G, Dome J, Vadlamudi RK, Pertsemlidis A, Chen Y, Rao MK, 2012. Genomic loss of tumor suppressor miRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization. *PloS one*, 7, 12, e52397.
- Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Braccioli L, Tagliabue E, 2011. Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. *The Breast*, 20, S63-S70.
- Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Di Leva G, Merlo A, Triulzi T, Menard S, Croce CM, Tagliabue E, 2009. microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer research*, 69, 6, 2195-200.
- Iorio MV, Croce CM, 2012. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine*, 4, 3, 143-59.

- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM, 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*, 65, 16, 7065-70.
- James NF, Mineko T, Maddalena F, Mami K, Gabriela P, Adriana Z, Maurizio G, Marco B, Monica L, Anna T, Gregory J G, Enrico G, 2014. MicroRNA networks regulated by all-trans retinoic acid and. *Oncotarget*, 6, 15, 13176-200.
- Jia L, Xiangjie K, Junfeng Z, Qifeng L, Xiaoyu L, Lin F, 2013. MiRNA-26b inhibits proliferation by targeting PTGS2 in breast cancer. *Cancer Cell International*, 13, 7.
- Jiang H, Zhang G, Wu JH, Jiang CP, 2014. Diverse roles of miR-29 in cancer (review). *Oncology reports*, 31, 4, 1509-16.
- Jiang L, He D, Yang D, Chen Z, Pan Q, Mao A, Cai Y, Li X, Xing H, Shi M, Chen Y, Bruce IC, Wang T, Jin L, Qi X, Hua D, Jin J, Ma X, 2014. MiR-489 regulates chemoresistance in breast cancer via epithelial mesenchymal transition pathway. *FEBS letters*, 588, 11, 2009-15.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ, 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120, 5, 635-47.
- Kavitha N, Vijayarathna S, Jothy SL, Oon CE, Chen Y, Kanwar JR, Sasidharan S, 2014. MicroRNAs: Biogenesis, Roles for Carcinogenesis and as Potential Biomarkers for Cancer Diagnosis and Prognosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 18, 7489-97.
- Kent OA, Mendell JT, 2006. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*, 25, 46, 6188-96.
- Kourea HP, Zolota V, Scopa CD, 2014. Targeted Pathways in Breast Cancer Molecular and Protein Markers. *Current Molecular Pharmacology*, 7, 4-21.
- Küçüküseyin Ö, Öztürk O, 2013. miRNAlar ve Meme Kanserindeki Etkileri. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi* 3, 5, 13-24.
- Le Quesne J, Caldas C, 2010. Micro-RNAs and breast cancer. *Molecular oncology*, 4, 3, 230-41.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN, 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23, 4051-60.
- Lee YS, Dutta A, 2009. MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*, 4, 199-227.
- Li J-Y, Zhang Y, Zhang W-H, Jia S, Kang Y, Zhu X-Y, 2012. Differential Distribution of miR-20a and miR-20b may Underly Metastatic Heterogeneity of Breast Cancers. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, 5, 1901-6.
- Li M, 2010. Role of miR-10b in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research* 12, 210.
- Li Y, Li W, Ying Z, Tian H, Zhu X, Li J, Li M, 2014. Metastatic heterogeneity of breast cancer cells is associated with expression of a heterogeneous TGFbeta-activating miR424-503 gene cluster. *Cancer research*, 74, 21, 6107-18.
- Lianhong L, Bowen X, Hanna T, Fangpei X, Zhong Z, Gary GX, 2012. Regulation of breast cancer tumorigenesis and metastasis by miRNAs. *Expert Review of Proteomics* 9, 6.

- Liu H, 2012. MicroRNAs in breast cancer initiation and progression. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 69, 21, 3587-99.
- Liu S, Goldstein RH, Scepansky EM, Rosenblatt M, 2009. Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone. Cancer research, 69, 22, 8742-51.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25, 4, 402-8.
- Lowery AJ, Miller N, McNeill RE, Kerin MJ, 2008. MicroRNAs as prognostic indicators and therapeutic targets: potential effect on breast cancer management. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 14, 2, 360-5.
- Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M, 2008. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 36, 13556-61.
- Lund AH, 2010. miR-10 in development and cancer. Cell death and differentiation, 17, 2, 209-14.
- Luo Q, Li X, Li J, Kong X, Zhang J, Chen L, Huang Y, Fang L, 2013. MiR-15a is underexpressed and inhibits the cell cycle by targeting CCNE1 in breast cancer. International journal of oncology, 43, 4, 1212-8.
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA, 2007. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer Nature, 449(7163), 682-8.
- Macias S, Cordiner RA, Caceres JF, 2013. Cellular functions of the microprocessor. Biochemical Society transactions, 41, 4, 838-43.
- Maehama T, 2007. PTEN Its Deregulation and Tumorigenesis Biological and Pharmaceutical Bulletin, 30, 9, 1624-27.
- Mahadev K, 2002. Suppression of the Transformed Phenotype of Breast Cancer by Tropomyosin-1. Experimental Cell Research, 279, 1, 40-51.
- Malumbres M, 2013. miRNAs and cancer: an epigenetics view. Molecular aspects of medicine, 34, 4, 863-74.
- Melo SA, Esteller M, 2011. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. FEBS letters, 585, 13, 2087-99.
- Min W, Wang B, Li J, Han J, Zhao Y, Su W, Dai Z, Wang X, Ma Q, 2014. The expression and significance of five types of miRNAs in breast cancer. Medical science monitor basic research, 20, 97-104.
- Mirnezami AH, Pickard K, Zhang L, Primrose JN, Packham G, 2009. MicroRNAs: key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets. European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology, 35, 4, 339-47.
- Mulrane L, McGee SF, Gallagher WM, O'Connor DP, 2013. miRNA dysregulation in breast cancer. Cancer research, 73, 22, 6554-62.
- Najla G, Abdul G, Ann F. C, Kenneth K. C, 1997. Inhibition of Proliferation of Estrogen Receptor–Negative MDA-MB-435 and Positive MCF-7 Human Breast Cancer Cells by Palm Oil Tocotrienols and Tamoxifen, Alone and in Combination. Journal of Nutrition, 127, 544-48.

- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW, 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell*, 10, 6, 515-27.
- Nilsen TW, 2007. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends in genetics : TIG*, 23, 5, 243-9.
- O'Day E, Ashish L, 2010. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12, 201, 1-10.
- Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li QJ, Lowe SW, Hannon GJ, He L, 2009. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes & development*, 23, 24, 2839-49.
- Ouchida M, Kanzaki H, Ito S, Hanafusa H, Jitsumori Y, Tamaru S, Shimizu K, 2012. Novel Direct Targets of miR-19a Identified in Breast Cancer Cells by a Quantitative Proteomic Approach. *PloS one*, 7, 8, e44095.
- Ouyang M, Li Y, Ye S, Ma J, Lu L, Lv W, Chang G, Li X, Li Q, Wang S, Wang W, 2014. MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer. *PloS one*, 9, 5, e96228.
- Palanichamy JK, Rao DS, 2014. miRNA dysregulation in cancer: towards a mechanistic understanding. *Frontiers in genetics*, 5, 54.
- Patil VS, Zhou R, Rana TM, 2014. Gene regulation by non-coding RNAs. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49, 1, 16-32.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA, 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular cell*, 21, 4, 533-42.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W, 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in cell biology*, 17, 3, 118-26.
- Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpyleva SI, Kovalchuk O, 2010. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 127, 8, 1785-94.
- Rana TM, 2007. Illuminating the silence understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 23-36.
- Rhodes LV, Nitschke AM, Segar HC, Martin EC, Driver JL, Elliott S, Nam SY, Li M, Nephew KP, Burow ME, Collins-Burow BM, 2012. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A alters microRNA expression profiles in apoptosis-resistant breast cancer cells. *Oncology reports*, 27, 1, 10-6.
- Riaz M, van Jaarsveld MT, Hollestelle A, Prager-van der Smissen WJ, Heine AA, Boersma AW, Liu J, Helmijr J, Ozturk B, Smid M, Wiemer EA, Foekens JA, Martens JW, 2013. miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. *Breast cancer research : BCR*, 15, 2, R33.
- Rivas MA, Venturutti L, Huang YW, Schillaci R, Huang TH, Elizalde PV, 2012. Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progesterin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. *Breast cancer research : BCR*, 14, 3, R77.

- Rostas JW, 3rd, Pruitt HC, Metge BJ, Mitra A, Bailey SK, Bae S, Singh KP, Devine DJ, Dyess DL, Richards WO, Tucker JA, Shevde LA, Samant RS, 2014. microRNA-29 negatively regulates EMT regulator N-myc interactor in breast cancer. *Molecular cancer*, 13, 200.
- Sandhu R, Rivenbark AG, Mackler RM, Livasy CA, Coleman WB, 2014. Dysregulation of microRNA expression drives aberrant DNA hypermethylation in basal-like breast cancer. *International journal of oncology*, 44, 2, 563-72.
- Sassen S, Miska EA, Caldas C, 2008. MicroRNA: implications for cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 452, 1, 1-10.
- Satoh J, Tabunoki H, 2011. Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData mining*, 4, 17.
- Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV, 2011. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*, 38, 1, 113-20.
- Sayed D, Abdellatif M, 2011. MicroRNAs in development and disease. *Physiological reviews*, 91, 3, 827-87.
- Schmitt MJ, Margue C, Behrmann I, Kreis S, 2013. MiRNA-29: A microRNA Family with Tumor-Suppressing and Immune-Modulating Properties. *Current Molecular Medicine*, 13, 572-85.
- Schmittgen TD, Livak KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 6, 1101-8.
- Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC, 2007. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *The Journal of biological chemistry*, 282, 2, 1479-86.
- Serpico D, Molino L, Di Cosimo S, 2014. microRNAs in breast cancer development and treatment. *Cancer treatment reviews*, 40, 5, 595-604.
- Sevimli T, 2013. Protein expression changes in breast cancer and their importance. *Dicle Medical Journal / Dicle Tıp Dergisi*, 40, 1, 161-8.
- Seydel GŞ, Aksoy K, 2009. Onkogen ve Tümör Supressör Gen Olan miR-NA'ların Özellikleri ve Kullanım Alanları.pdf. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 18, 1, 1-12.
- Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY, 2007. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 26, 19, 2799-803.
- Spizzo R, Nicoloso MS, Lupini L, Lu Y, Fogarty J, Rossi S, Zagatti B, Fabbri M, Veronese A, Liu X, Davuluri R, Croce CM, Mills G, Negrini M, Calin GA, 2010. miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells. *Cell death and differentiation*, 17, 2, 246-54.
- Tang J, Ahmad A, Sarkar FH, 2012. The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis. *International journal of molecular sciences*, 13, 10, 13414-37.
- Taube JH, Malouf GG, Lu E, Sphyris N, Vijay V, Ramachandran PP, Ueno KR, Gaur S, Nicoloso MS, Rossi S, Herschkowitz JI, Rosen JM, Issa JP, Calin GA, Chang JT, Mani SA, 2013. Epigenetic silencing of microRNA-203 is required for EMT and cancer stem cell properties. *Scientific reports*, 3, 2687.
- Taylor MA, Sossey-Alaoui K, Thompson CL, Danielpour D, Schiemann WP, 2013. TGF-beta upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. *The Journal of clinical investigation*, 123, 1, 150-63.

- Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM, 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes & development*, 20, 16, 2202-7.
- Tong AW, Nemunaitis J, 2008. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer gene therapy*, 15, 6, 341-55.
- Tormo E, Pineda B, Serna E, Guijarro A, Ribas G, Fores J, Chirivella E, Climent J, Lluch A, Eroles P, 2015. MicroRNA Profile in Response to Doxorubicin Treatment in Breast Cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 116, 9, 2061-73.
- Tunalı NE, Tiryakioğlu NO, 2010. Kanserde MikroRNA'ların Rolü. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*.
- Uhlmann S, Zhang JD, Schwäger A, Mannsperger H, Riazalhosseini Y, Burmester S, Ward A, Korf U, Wiemann S, Sahin Ö, 2010. miR-200bc/429 cluster targets PLC γ 1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer. *Oncogene*, 29, 30, 4297-306.
- Valastyan S, Chang A, Benaich N, Reinhardt F, Weinberg RA, 2010. Concurrent suppression of integrin α 5, radixin, and RhoA phenocopies the effects of miR-31 on metastasis. *Cancer research*, 70, 12, 5147-54.
- Vaziri PA, Rezaeieh KAF, 2012. Ökaryot Hücrelerde Korunmuş Mikro RNA'lar ve Hedef Transkripsyonların Faliyetleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 5, 2, 96-8.
- Veeck J, Esteller M, 2010. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15, 1, 5-17.
- Verghese ET, Hanby AM, Speirs V, Hughes TA, 2008. Small is beautiful: microRNAs and breast cancer-where are we now? *The Journal of pathology*, 215, 3, 214-21.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM, 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 7, 2257-61.
- Voorhoeve PM, 2010. MicroRNAs Oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1805, 1, 72-86.
- Wang C, Zheng X, Shen C, Shi Y, 2012. MicroRNA-203 suppresses cell proliferation and migration by targeting BIRC5 and LASP1 in human triple-negative breast cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 31, 58.
- Wang H, Tan G, Dong L, Cheng L, Li K, Wang Z, Luo H, 2012. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. *PloS one*, 7, 4, e34210.
- Wang Q-Y, Tang J, Zhou C-X, Zhao Q, 2012. The down-regulation of miR-129 in breast cancer and its effect on breast cancer migration and motility. *Acta Physiologica Sinica*, 64, 4, 403-11.
- Wang SY, Shamliyan T, Virnig BA, Kane R, 2011. Tumor characteristics as predictors of local recurrence after treatment of ductal carcinoma in situ: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*, 127, 1, 1-14.
- Wang V, Wu W, 2007. MicroRNA A New Player in Breast Cancer Development. *Journal of Cancer Molecules*, 3, 5, 133-38.

- Wang X, Osada T, Wang Y, Yu L, Sakakura K, Katayama A, McCarthy JB, Brufsky A, Chivukula M, Khoury T, Hsu DS, Barry WT, Lyerly HK, Clay TM, Ferrone S, 2010. CSPG4 protein as a new target for the antibody-based immunotherapy of triple-negative breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 102, 19, 1496-512.
- Wang Y, Zhang X, Li H, Yu J, Ren X, 2013. The role of miRNA-29 family in cancer. *European journal of cell biology*, 92, 3, 123-8.
- Wang Z, Liao H, Deng Z, Yang P, Du N, Zhanng Y, Ren H, 2013. miRNA-205 affects infiltration and metastasis of breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 441, 1, 139-43.
- Wang Z, Liao H, Deng Z, Yang P, Du N, Zhanng Y, Ren H, 2013. miRNA-205 affects infiltration and metastasis of breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 441, 1, 139-43.
- Wang Z, Yang B, 2010. Detection, Profiling, and Quantification of miRNA Expression. In: *MicroRNA Expression Detection Methods* Eds: Springer Berlin Heidelberg, p. 3-64.
- Winter J, Diederichs S, 2011. MicroRNA Biogenesis and Cancer. In: *MicroRNA and Cancer* Eds: Wu W: Humana Press, p. 3-22.
- Wu Q, Wang C, Lu Z, Guo L, Ge Q, 2012. Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 413, 13-14, 1058-65.
- Wu Z, Huang X, Huang X, Zou Q, Guo Y, 2013. The inhibitory role of Mir-29 in growth of breast cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 32, 98.
- Wu ZS, Wu Q, Wang CQ, Wang XN, Huang J, Zhao JJ, Mao SS, Zhang GH, Xu XC, Zhang N, 2011. miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met. *Cancer*, 117, 13, 2842-52.
- Xi-Xue Z, Qing-Zhong Y, Dong-Po M, Di-Wen S, Qing-Ao B, Guo-Zheng P, Guo-Qiang L, Tao C, Peng-Peng D, Fa-Ping Y, Long H, Ming-Xin W, Jian Z, 2015. MicroRNA-26a inhibits proliferation by targeting high mobility group AT-hook 1 in breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8, 1, 368-73.
- Xiao-Yu L, Qi-Feng L, Chuan-Kui W, Deng-Feng L, Jia L, Lin F, 2014. MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7, 1, 32-40.
- Yafei S, Min Q, Yanyan W, Lu H, 2015. MiR-548-3p functions as an anti-oncogenic regulator in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 75, 111-6.
- Yang H, Zhang H, Zhu L, Wang J, Zhang C, Li D, 2012. Pathway analysis of cancer-associated microRNA targets. *International journal of oncology*, 41, 6, 2213-26.
- Yang L, Li N, Wang H, Jia X, Wang X, Luo J, 2012. Altered microRNA expression in cisplatin-resistant ovarian cancer cells and upregulation of miR-130a associated with MDR1/P-glycoprotein-mediated drug resistance. *Oncology reports*, 28, 2, 592-600.
- Yi H, Liang B, Jia J, Liang N, Xu H, Ju G, Ma S, Liu X, 2013. Differential roles of miR-199a-5p in radiation-induced autophagy in breast cancer cells. *FEBS letters*, 587, 5, 436-43.
- Yin J, Zheng G, Jia X, Zhang Z, Zhang W, Song Y, Xiong Y, He Z, 2013. A Bmi1-miRNAs cross-talk modulates chemotherapy response to 5-fluorouracil in breast cancer cells. *PloS one*, 8, 9, e73268.

- Yong L, Jing Z, Pei-Ying Z, Yu Z, San-Yuan S, Shi-Ying Y, Qing-Song X, 2012. MicroRNA-10b targets E-cadherin and modulates. *Medical Science Monitor*, 18, 8, 299-308.
- Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E, 2007. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 131, 6, 1109-23.
- Yu Z, Willmarth NE, Zhou J, Katiyar S, Wang M, Liu Y, McCue PA, Quong AA, Lisanti MP, Pestell RG, 2010. microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 18, 8231-6.
- Zeng H, Fang C, Nam S, Cai Q, Long X, 2014. The clinicopathological significance of microRNA-155 in breast cancer: a meta-analysis. *BioMed research international*, 2014, 724209.
- Zeng Y, 2006. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*, 25, 46, 6156-62.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA, 2007. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*, 302, 1, 1-12.
- Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G, 2006. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 24, 9136-41.
- Zhang MH, Man HT, Zhao XD, Dong N, Ma SL, 2014. Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Biomedical reports*, 2, 1, 41-52.
- Zhang X, Yu H, Lou JR, Zheng J, Zhu H, Popescu NI, Lupu F, Lind SE, Ding WQ, 2011. MicroRNA-19 (miR-19) regulates tissue factor expression in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 286, 2, 1429-35.
- Zhang Z, Zhang B, Li W, Fu L, Fu L, Zhu Z, Dong JT, 2011. Epigenetic Silencing of miR-203 Upregulates SNAI2 and Contributes to the Invasiveness of Malignant Breast Cancer Cells. *Genes & cancer*, 2, 8, 782-91.
- Zhang ZJ, Ma SL, 2012. miRNAs in breast cancer tumorigenesis (Review). *Oncology reports*, 27, 4, 903-10.
- Zhong S, Li W, Chen Z, Xu J, Zhao J, 2013. MiR-222 and miR-29a contribute to the drug-resistance of breast cancer cells. *Gene*, 531, 1, 8-14.
- Zhou J, Tian Y, Li J, Lu B, Sun M, Zou Y, Kong R, Luo Y, Shi Y, Wang K, Ji G, 2013. miR-206 is down-regulated in breast cancer and inhibits cell proliferation through the up-regulation of cyclinD2. *Biochemical and biophysical research communications*, 433, 2, 207-12.
- Zhou M, Liu Z, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Xi Y, Xiong W, Li G, Lu J, Fodstad O, Riker AI, Tan M, 2010. MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *The Journal of biological chemistry*, 285, 28, 21496-507.
- Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY, 2007. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *The Journal of biological chemistry*, 282, 19, 14328-36.
- Zong C, Wang J, Shi TM, 2014. MicroRNA 130b enhances drug resistance in human ovarian cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35, 12, 12151-6.



7. EKLER

EK-A Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2013/09

Toplantı Tarihi : 18.06.2013

Karar Sayısı 2013/198 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ali ÜNLÜ'nün, "İnsan Meme Hücreleri MCF-7 ve MDA-MB-435'in mikroRNA (miRNA) Profilleri" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 09.06.2013 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr. Ali ÜNLÜ'nün, "İnsan Meme Hücreleri MCF-7 ve MDA-MB-435'in mikroRNA (miRNA) Profilleri" adlı araştırmanın kabulüne, BAP desteği alındıktan sonra protokolün dosyaya ilave edilmek üzere Etik Kurul sekretaryasına teslim edilmesine oy birliği ile karar verildi.

ASLI GIBİDİR
18/06/2013

Mahmut KESİK
Sekretarya

8. ÖZGEÇMİŞ

Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2006 yılında mezun oldum. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde başlamış olduğum ikinci danışmanımın Dişhekimliği Fakültesi'nden olan '*Porphyromonas gingivalis* Lipopolisakkaritinin İnsan Gingival Fibroblastları Üzerine Etkisi' başlıklı yüksek lisans tezimi 2009 yılında tamamladım. Devamında 2010 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'da doktora programına başladım. Gazi Hastanesi Tıp Fakültesi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi olmak üzere 2000 yılından bu yana Biyolog olarak görev yapmaktayım. Halen çalışmakta olduğum Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Araştırma Merkezi'nde 2007 yılından bu yana bir tanesi Almanya ortaklı Tübitak BMBF projesi olmak üzere, birinde yardımcı araştırmacı diğerlerinde bursiyer olarak olmak üzere toplam dört adet Tübitak SBAG projelerinde deney uygulayıcısı olarak görev aldım. Halen Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Araştırma Merkezi'nde Biyolog olarak görev yapmaktayım.