



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**TELOMERAZ İNHİBİTÖRÜ BIBR1532’NİN MEME  
KANSERİ VE MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE  
MİKRORNA PROFİLİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

İrem YILDIRIM

Kök Hücre Anabilim Dalı

İzmir  
2024

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**TELOMERAZ İNHİBİTÖRÜ BIBR1532’NİN MEME  
KANSERİ VE MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE  
MİKRO RNA PROFİLİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

İrem YILDIRIM

Danışman(lar)  
Prof. Dr. Çığır BİRAY AVCI

Kök Hücre Anabilim Dalı  
Kök Hücre Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir  
2024

## Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

**Başkan** : Prof.Dr. ....

(Danışman)

**Üye** : Prof.Dr. ....

**Üye** : Prof.Dr. ....

**Üye** : Prof.Dr. ....

**Üye** : Prof.Dr. ....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: .....

## Önsöz

Bu yüksek lisans tezi içindeki bilim aşkı çok erken başlayan ve basit bilimsel deneyleri yaparken evi dağıtan 5 yaşındaki İrem'in eseridir. Yıllar içinde asla kaybetmediğim ve pes etmediğim hayalimin bazen zorlanarak bazen de eğlenerek gerçekleşmesini sağlamak benim için büyük zevkti ama en özeli bilime benim baktığım yerden bakabilen ve beni her anlamda destekleyen bir danışmana sahip olmaktı. Bu tezin her aşamasında daha fazlasını yapmak motivasyonuyla çalıştım ve daha fazlasını yapacağımı da biliyorum. Doktora tezinde görüşmek üzere...

İzmir, 26.07.2024

İrem YILDIRIM



## Özet

### **Telomeraz İnhibitörü BIBR1532'nin Meme Kanseri ve Meme Kanseri Kök Hücrelerinde MikroRNA Profili Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

Meme kanseri kadınlarda her yıl artan morbiditeye sahip, en sık görülen kanser türüdür. Kanser hastası kadınların üçte biri meme kanseri hastasıdır. Görülme sıklığı fazla olmasına karşın günümüzde meme kanserinin kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Bunun nedeni meme kanserinin heterojenliği ve tedaviye geliştirilen direnç mekanizmalarıdır. Meme kanseri kök hücreleri, meme kanseri tedavisinde radyoterapi ve kemoterapi direncinin temel sebeplerinden biridir. Meme kanseri kök hücreleri, metastaz ve göçle ilişkili proteinlerin yüksek ekspresyonuna sahip olduklarından meme kanseri hücrelerine göre daha metastatiktirler. Ek olarak, meme kanseri kök hücreleri, yüksek telomeraz aktivitesine sahiptirler. Telomeraz, hücre bölünmesi sırasında telomerleri koruyan bir enzimdir ve normal hücrelerde ekspresyonu görülmemektedir. Buna karşılık kanser ve kanser kök hücrelerinde yüksek ekspresyonu görülmektedir. Bu durum, kanser ve kanser kök hücrelerindeki aşırı replikatif özelliklerle doğrudan ilişkilidir. Meme kanseri ve meme kanseri kök hücrelerinde yapılan telomeraz inhibisyonunun bu hücrelerdeki tümörojenik davranışları baskıladığı bilinmektedir. BIBR1532, telomeraz inhibisyonu için rutin olarak kullanılan bir telomeraz inhibitörüdür. MikroRNA'lar, pek çok biyolojik süreçte onkojenik ya da tümör baskılayıcı rol oynayan 22 nükleotidlik endojen RNA'lardır ve hem meme kanserinde hem de meme kanseri kök hücrelerinde önemli süreçlerde rol almaktadırlar. Telomeraz, miRNA'ların biyogenezinin erken aşamasında mikroRNA'ların seviyesini düzenlemektedir. Bu durum, telomeraz inhibitörleri kullanarak kanser ve kanser kök hücrelerinde telomeraz inhibisyonu ve mikroRNA profilini değiştirmeyi aynı anda yapabileceğine olanak sağlanmaktadır. Literatürde BIBR1532 ajanı kullanılarak yapılan telomeraz inhibisyonunun mikroRNA profili üzerindeki etkisine yönelik sadece 1 çalışma bulunmaktadır. O çalışmada lösemi ile ilgilidir. Literatürdeki bu eksikliği kapatmak için bu çalışmada ile telomeraz inhibitörü BIBR1532 kullanarak meme kanseri ve meme kanseri kök hücrelerinde mikroRNA profili üzerindeki değişiklikleri tanımlamayı amaçladık.

Bu amaca ulaşmak için sağlıklı meme hücre hattı (MCF-10A), meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ve meme kanseri kök hücrelerini in vitro koşullarda kültüre ettik.

Ardından bu hücrelere BIBR1532 uygulayarak mikroRNA profilindeki değişiklikleri belirledik. MikroRNA profilindeki değişiklikleri belirlemek için mikroRNA izolasyonu, cDNA sentezi, Real Time qPCR analizleri gerçekleştirdik ve sonuçları istatistiksel olarak yorumladık.

Çalışmamız neticesinde, MCF-10A hücrelerinde BIBR1532, mikroRNA profili üzerinde anlamlı değişikliklere neden olmazken MCF-7 hücrelerinde BIBR1532'nin tümör baskılayıcı mikroRNA'ların ekspresyonunu arttırdığını buna karşılık onkojenik mikroRNA'ların ekspresyonunu ise baskıladığını belirledik. Meme kanseri kök hücrelerinde ise BIBR1532, tümör baskılayıcı mikroRNA'lar üzerinde etkili olmazken onkojenik mikroRNA'ların ekspresyonunu azaltmıştır.

Sonuç olarak çalışmamız, BIBR1532'nin meme kanseri ve meme kanseri kök hücrelerinde hem telomeraz hem de mikroRNA'ları hedefleyerek meme kanseri tedavisi için potansiyel bir ajan olduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler;** Meme Kanseri; Meme Kanseri Kök Hücre; mikroRNA; Telomeraz; BIBR1532

## **Abstract**

### **Investigation of the Effects of Telomerase Inhibitor BIBR1532 on MicroRNA Profile in Breast Cancer and Breast Cancer Stem Cells**

Breast cancer is the most common type of cancer in women, with morbidity increasing every year. One third of women with cancer are breast cancer patients. Despite its high incidence, there is currently no definitive treatment for breast cancer. The reason for this is the heterogeneity of breast cancer and the resistance mechanisms developed to treatment. Breast cancer stem cells are one of the main causes of resistance to radiotherapy and chemotherapy in breast cancer treatment. Breast cancer stem cells are more metastatic than breast cancer cells because they have high expression of metastasis and migration-related proteins. In addition, breast cancer stem cells have high telomerase activity. Telomerase is an enzyme that protects telomeres during cell division and its expression is not seen in normal cells. However, its high expression is observed in cancer and cancer stem cells. This is directly related to the excessive replicative feature in cancer and cancer stem cells. Telomerase inhibition in breast cancer and breast cancer stem cells is known to suppress tumourigenic behaviour in these cells. BIBR1532 is a telomerase inhibitor routinely used for telomerase inhibition. MicroRNAs are 22 nucleotide endogenous RNAs that play an oncogenic or tumour suppressor role in many biological processes and are involved in important processes in both breast cancer and breast cancer stem cells. Telomerase regulates the level of microRNAs at the early stage of miRNA biogenesis. This provides the opportunity to simultaneously inhibit telomerase and alter the microRNA profile in cancer and cancer stem cells using telomerase inhibitors. In the literature, there is only 1 study on the effect of telomerase inhibition using BIBR1532 agent on microRNA profile. That study is related to leukaemia. In order to fill this gap in the literature, we aimed to define the changes in microRNA profile in breast cancer and breast cancer stem cells using telomerase inhibitor BIBR1532.

To achieve this goal, we cultured healthy breast cell line (MCF-10A), breast cancer cell line (MCF-7) and breast cancer stem cells under in vitro conditions. We then applied BIBR1532 to these cells and determined the changes in microRNA profile. To determine the changes in microRNA profile, we performed microRNA isolation, cDNA synthesis, Real Time qPCR analyses and statistically interpreted the results.

As a result of our study, BIBR1532 did not cause significant changes in the microRNA profile in MCF-10A cells, while BIBR1532 increased the expression of tumour suppressor microRNAs in MCF-7 cells, whereas it suppressed the expression of oncogenic microRNAs. In breast cancer stem cells, BIBR1532 had no effect on tumour suppressor microRNAs but decreased the expression of oncogenic microRNAs.

In conclusion, our study suggests that BIBR1532 is a potential agent for breast cancer treatment by targeting both telomerase and microRNAs in breast cancer and breast cancer stem cells.

**Keywords;** Breast Cancer; Breast Cancer Stem Cells; MicroRNA; Telomerase; BIBR1532



## İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler .....	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini.....	X
Grafikler Dizini.....	XI
Kısaltma Listesi .....	XII
Giriş .....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu .....	1
1.3 Araştırmanın Hipotezi.....	2
1.4 Araştırmanın Varsayımı.....	2
1.5 Araştırmanın Sınırlılıkları.....	2
1.6 Araştırmanın Amacı.....	2
Genel Bilgiler.....	3
2.1 Kansere Genel Bakış.....	3
2.2 Meme Kanseri.....	3
2.3 Kök Hücreler.....	3
2.3.1 Kansere Kök Hücreleri.....	4
2.3.2 Meme Kanseri Kök Hücreleri.....	4
2.4 Telomeraz.....	4
2.4.1 Kanserde Telomeraz.....	5
2.4.2 Kansere Kök Hücrelerinde Telomeraz.....	5
2.5 Meme Kanseri ve Meme Kanseri Kök Hücrelerinde Telomeraz İnhibisyonu..	6
2.6 Telomeraz İnhibitörü BIBR1532.....	6
2.7 MikroRNA.....	7
2.7.1 Meme Kanseri ve Meme Kanseri Kök Hücrelerinde MikroRNA'lar.....	7
2.8 Telomeraz ve MikroRNA'lar.....	8
Gereç ve Yöntem.....	9
3.1 Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	9
3.2 Araştırma Tipi.....	9

3.3 Araştırma Evreni ve Örneklemi.....	9
3.4 Araştırmanın Bağımlı ve Bağımsız Değişkeni.....	9
3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	10
3.6 Hücrelerin Pasajlanması.....	10
3.7 Hücrelerin Dondurulması (Kriyoprecervasyon).....	11
3.8 Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi.....	12
3.9 Hücre Hatlarının Canlılığının Belirlenmesi.....	12
3.10 BIBR1532 Etken Maddesinin Uygulanması.....	13
3.11 miRNA İzolasyonu.....	14
3.12 miRNA'ların miktarlarının ve saflıklarının belirlenmesi.....	16
3.13 cDNA sentezi.....	16
3.14 miRNA PCR Array Analizi.....	17
3.15 İstatistiksel Analizler.....	18
Bulgular.....	21
4.1 MCF-10A, MCF-7 ve MKKH Hatlarının Çoğaltılması.....	21
4.2 Telomeraz İnhibitörü BIBR1532'nin MCF-10, MCF-7 ve MKKH'nde miRNA Profili Üzerine Etkisi.....	21
4.2.1 BIBR1532'nin MCF-10A Hücrelerinde miRNA Profili Üzerine Etkisi.....	23
4.2.2 BIBR1532'nin MCF-7 Hücrelerinde miRNA Profili Üzerine Etkisi.....	24
4.2.3 BIBR1532'nin MKKH'nde miRNA Profili Üzerine Etkisi.....	26
Tartışma.....	28
Sonuç ve Öneriler.....	39
Kaynaklar.....	41
Teşekkür.....	54
Özgeçmiş.....	55

## Tablolar Dizini

<b>Tablo 1:</b> Çalışmamızın deney grupları.....	9
<b>Tablo 2:</b> Ters Transkriptaz Reaksiyon İçeriği.....	17
<b>Tablo 3:</b> RT-qPCR Reaksiyonu ( 96 Kuyucuklu plak için).....	18
<b>Tablo 4:</b> miRNA'ların plaka içerisindeki yerleşimi.....	19
<b>Tablo 5:</b> Çalışmada kullanılan miRNA'ların meme kanseri ve MKKH'ndeki rolleri.....	20
<b>Tablo 6:</b> BIBR1532 uygulanan MCF-10A Hücrelerindeki miRNA Değişimi....	23
<b>Tablo 7:</b> BIBR1532 uygulanan MCF-7 Hücrelerindeki miRNA Değişimi.....	24
<b>Tablo 8:</b> BIBR1532 uygulanan MKKH'ndeki miRNA Değişimi.....	26

## Şekiller Dizini

Şekil 1: miRNA Biyogenezi.....	7
Şekil 2: Neubauer Lamı.....	13
Şekil 3: BIBR1532'nin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 4: BIBR1532 uygulanan MCF-10, MCF-7 ve MKKH'ndeki miRNA'ların Isı Haritası.....	22



## Grafikler Dizini

<b>Grafik 1:</b> BIBR1532 uygulanan MCF-7 Hücrelerinde miRNA Kat Regülasyonu Grafığı.....	25
<b>Grafik 2:</b> BIBR1532 uygulanan MKKH'nde miRNA Kat Regülasyonu Grafığı.....	27



## Kısaltma Listesi

$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
$\mu\text{l}$	: Mikrolitre
AGO	: Argonaute protein ailesi
ALDH	: Aldehid dehidrogenaz
ATP	: Adenozin trifosfat
BRCA	: Meme kanseri geni
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
cm	: Santimetre
$\text{CO}_2$	: Karbondioksit
CT	: Eşik döngüsü
Dicer	: RNase motifli helikaz
dk	: dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DGCGR8	: Di George kiritik sendromu bölgesi
DROSHA	: RNAase III enzim
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	: Epitel-mezenkimal-dönüşüm

EpCAM	: Epitel Hücre Yapışma Molekülü
ER	: Östrojen reseptörü
FBS	: Fötal sığır serumu
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
HGMA2	: Yüksek mobilite grubu AT-hook 2
hTERC	: İnsan telomeraz RNA bileşeni
hTERT	: İnsan Telomeraz Ters Transkriptaz
IC <sub>50</sub>	: İnhibitör Konsantrasyon Oranı
KKH	: Kanser kök hücreleri
LncRNA	: Uzun kodlamayan RNA
Log	: Logaritma
MCF-10A	: Epitelyal meme hücre hattı
MCF-7	: İnsan meme kanseri hücre hattı
MET	: Mezenkimal-epitelyal dönüşüm
miRNA	: MikroRNA
MKKH	: Meme kanser kök hücreleri
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Myc	: Myelositomatozis onkogeni
nm	: Nanometre

PBS	: Fosfat buffer saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PR	: Progesteron reseptörü
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu protein
RAS	: Sıçan sarkomu viral onkogen homologu
RISC	: İndüklenen susturma protein
RNA	: Ribonükleik asid
RPM	: Dakikada devir sayısı
RT-qPCR	: Gerçek zamanlı kantitatif PCR
sn	: saniye
SOX2	: SRY-Box Transkripsiyon Faktörü 2
TNBC	: Üçlü negatif meme kanseri
UTR	: Çevrilmeyen bölge
ZEB1	: Çinko parmaklı E-kutusu bağlayıcı kutusu 1
ZEB2	: Çinko parmaklı E-kutusu bağlayıcı kutusu 2

## Giriş

### 1.1. Araştırmanın Problemi

Meme kanseri, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir ve morbiditesi her yıl artmaktadır. Meme kanseri tedavisi için çeşitliliği fazla, çok sayıda çalışma yapılmış olmasına karşın halen net bir tedavisi bulunmamaktadır. Bu durumun en önemli nedenleri ise meme kanserinin heterojen doğası ve meme kanseri ile meme kanseri kök hücrelerinin direnç mekanizmalarıdır. Meme kanseri kök hücreleri (MKKH), meme kanserinde metastaz, tümör nüksü, anjiyogenez, vaskülojenik taklit ve terapötik direnç süreçlerini desteklemektedir. Bu nedenlerle meme kanseri tedavisinin tam olarak yapılamaması, hastalığın her yıl mortalitesi ve morbiditesinin artması büyük bir problemdir. Direnç mekanizmaları nedeniyle, meme kanseri tedavisinde geleneksel tedavilere yardımcı olabilecek yeni antikanser stratejilerin bulunması gerekmektedir. Telomeraz inhibisyonu ve mikroRNA'lar, meme kanseri tedavisi için önemli bir strateji olabilir.

Telomeraz, kanser hücrelerinde yüksek aktiviteye sahip bir enzimdir ve kanserin ayırt edici bir özelliği olarak tanımlanmaktadır. Yüksek telomeraz aktivitesi gösteren kanser hücrelerinin tedavi duyarlılığı daha azdır ve metastaz yapma eğilimleri daha fazladır. Meme kanserinde görülen yüksek telomeraz aktivitesi de kanser agresifliği ile ilişkilidir. Meme kanseri gelişimindeki bir diğer faktör ise mikroRNA'lardır. Meme kanserinde mikroRNA (miRNA)'lar, düzensiz bir şekilde eksprese edilmektedir ve miRNA'lar, meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozunu, metastazını, ilaç direncini, epigenetik süreçlerini ve anjiyogenezini düzenlemektedir.

Meme kanserinin proliferasyon, invazyon, metastaz, tedavi direnci, nüks gibi pek çok biyolojik sürecinde birden fazla faktör rol almaktadır. Meme kanseri için etkili tedavi yöntemi bulmak için birden fazla faktörü hedefleyen tedavi stratejilerinin araştırılmasındaki eksiklik büyük bir problemdir.

### 1.2. Araştırmanın Sorusu

Meme kanserinin artan morbiditesi ve meme kanserinde gelişen direnç mekanizmaları göz önüne alınarak yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Telomeraz inhibisyonu ile hem meme kanseri hücrelerini hem de meme kanseri kök hücrelerinin mikroRNA'larını hedeflemek iyi bir strateji olabilir. Bu yüksek lisans tezinde

“Telomeraz inhibitörü BIBR1532’nin meme kanseri ve meme kanseri kök hücrelerinin mikroRNA profili üzerine nasıl bir etkisi olur?” sorusu sorulmuştur.

### **1.3. Araştırmanın Hipotezleri**

Yapılan literatür taraması ve sorulan araştırma sorusu üzerine bu yüksek lisans tezinin hipotezi “Telomeraz inhibitörü BIBR1532, meme kanseri ve meme kanseri kök hücrelerinde mikroRNA profilini değiştirir.” şeklindedir.

### **1.4. Araştırmanın Varsayımları**

Bu çalışmada in vitro koşullar altında telomeraz inhibitörü BIBR1532’nin meme kanseri ve MKKH’nde mikroRNA profili üzerinde etkileri olacağı varsayılmıştır.

### **1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları**

Bu yüksek lisans tezinde in vitro çalışmalar yapılmıştır. Bu nedenle bulunan bulguların in vivo çalışmalarla tutarlık gösterip göstermeyeceği bilinmemektedir.

### **1.6. Araştırmanın Amacı**

Bu yüksek lisans tezinin amacı, meme kanseri ve MKKH’nde telomeraz inhibitörü BIBR1532’nin mikroRNA profilini üzerine etkilerini tanımlamaktır. BIBR1532’nin meme kanseri ve MKKH’ndeki mikroRNA profili üzerine değişikliklerini kategorize etmek hedeflenmektedir. Meme kanseri ve MKKH’nde telomeraz aktivasyonunun ve mikroRNA’ların rolleri göz önüne alınarak telomeraz inhibisyonu ile mikroRNA profili üzerine etki yaratmayı hedeflemekteyiz.

## 2.Genel Bilgiler

### 2.1 KANSERE GENEL BAKIŞ

Kanser, metastaz yapma ve vücudun diğer bölgelerini istila etme yeteneğine sahip anormal hücre büyümesinin neden olduğu bir hastalıktır. Dünya çapında önemli bir halk sorunudur ve her yıl yaklaşık 10 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. 2024 yılı için sadece ABD'nde 2.001.140 yeni kanser vakası ve 611.720 kansere bağlı ölümün olacağı öngörülmektedir. Nüfusun yaşlanması, alkol ve tütün kullanımı, fiziksel hareketliliğin eksikliği, sağlıksız beslenme, artan çevre kirliliği, kanserojen faktörlere maruz kalınımın artması gibi nedenlerden dolayı kanserin görülme sıklığı ve kansere bağlı ölümler de her yıl artmaktadır (Chen et al., 2023; Kamal et al., 2022; Siegel, Giaquinto, & Jemal, 2024).

### 2.2 MEME KANSERİ

Meme kanseri, kadınlarda görülen tüm kanser vakalarının üçte birini oluşturur ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en önemli ikinci sebebi olarak tanımlanmaktadır. Kadınlardaki meme kanseri insidansı dünya çapında her yıl artmaktadır (Butti, Gunasekaran, Kumar, Banerjee, & Kundu, 2019; Siegel, Miller, Wagle, & Jemal, 2023). Türkiye'de de benzer durum görülmektedir. Türkiye'deki kadınlarda meme kanserine bağlı ölümlerin 2009-2019 yılları arasında yıllık %2,2 arttığı rapor edilmiştir (Teker & Ay, 2022). Aile geçmişinde meme kanseri hastalığının bulunması, *BRCA* genindeki mutasyonlar, geç menapoz, obezite, geç hamilelik ya da hiç hamile kalınmaması, östrojen hormonu, hormonal tedavi, sigara ve içki kullanımı, iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalmak kadınlarda meme kanseri gelişimi için risk faktörleri olarak tanımlanmaktadır (Obeagu & Obeagu, 2024).

### 2.3 KÖK HÜCRELER

Kök hücreler, kendini yenileyebilme ve farklı hücre soylarına farklılaşabilme yetenekleri olan özel hücrelerdir (Biehl & Russell, 2009). Kök hücreler, insan vücudundaki her hücre ve dokuya farklılaşabilmektedir. Kök hücreler hem embriyolarda hem de yetişkin hücrelerde bulunmaktadır. Orijinine göre embriyonik kök hücre, somatik (yetişkin) kök hücre ve indüklenmiş pluripotent kök hücre olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Kök hücrelerin temel özelliğinden biri olan farklılaşma yeteneği, kök hücrelerin kökenine ve türetilmesine bağlı olarak farklılık

göstermektedir. Farklılaşma potansiyelini baz alarak kök hücreler, unipotent, multipotent, oligopotent, totipotent ve pluripotent olmak üzere 5 gruba ayrılmaktadır (Kolios & Moodley, 2013).

### 2.3.1 KANSER KÖK HÜCRELERİ

Kanser kök hücreleri (KKH), metastaz, proliferasyon, invazyon, agresiflik, direnç ve nüks gibi birçok tümör davranışını yöneten küçük bir tümör hücresi popülasyonudur. KKH, kendini yenileme kapasitesine sahip herhangi bir tümörde bulunabilmektedir ve kendini yenileyen tek bir kök hücrenin kötü huylu dönüşümü bile kansere neden olabilmektedir (Ajmeera & Ajumeera, 2024; Barzaman et al., 2020). OCT3, OCT4, ALDH, nestin, NANOG ve SOX2 gibi transkripsiyon faktörleri ile CD44, EpCAM, CD34, CD24 ve CD133 gibi yüzey belirteçleri ile KKH karakterize edilmektedir. KKH, kök hücrelerin temel özelliklerinden olan kendini yenileme ve farklılaşma yeteneklerine ek olarak plastisite yeteneğine de sahiptir. Bu durum, KKH'nin epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve mezenkimal-epitelyal dönüşüm (MET) süreçlerinde etkin rol oynamasını sağlamaktadır (Zhou, Tan, Liu, & Guan, 2023).

### 2.3.2 MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİ

Meme kanseri kök hücreleri (MKKH), CD44+/CD24-, ALDH1, CD133+, gangliosid 2+ molekülerinin ifadesini göstermektedir (Butti et al., 2019). MKKH, meme kanserinde metastaz, tümör nüksü, anjiyogenez, vaskülojenik taklit ve terapötik direnç süreçlerini desteklemektedir. MKKH'nde hücre metastazı ve göçle ilgili proteinlerin ifadesi artarken yapışma proteinlerinin seviyesini önemli ölçüde azalır. Bu nedenle MKKH, meme kanseri hücrelerine göre daha metastatiktirler (Gallardo-Pérez, de Guevara, Marín-Hernández, Moreno-Sánchez, & Rodríguez-Enríquez, 2017). En önemlisi de MKKH, radyasyon ve kemoterapi direncinin ana nedenlerinden biridirler. Bu durum MKKH'nde görülen *aurora kinaz A (AURKA)* ve *forkhead box subclass M1 (FOXMI)* arasındaki pozitif feedback döngüsü, yüksek düzeydeki ALDH1 ekspresyonu, yüksek düzeydeki DNA hasarı onarım mekanizması ve azalan apoptoz mekanizmasından kaynaklanmaktadır (Butti et al., 2019; N. Yang et al., 2017; L. Zhang, Chen, Liu, & Chen, 2023).

## 2.4 TELOMERAZ

İnsan kromozomların uçlarında bulunan, kromozom stabilitesini sağlayan “ 5' - TTAGGG- 3' ” DNA dizilerine telomer denir. Telomerler, ökaryotik kromozomların

kuyruklarını stabilize ederek genetik kod kaybını korumaktadır ve canlı hücrelerin doğru şekilde çoğalma kapasitesini kontrol etmektedir (Doğan et al., 2019; Mustafa, 2024). Telomeraz, telomerleri koruyan, kromatin organizasyonu, DNA replikasyonu, apoptoz ve hücre proliferasyon kontrolü gibi pek çok biyolojik süreçte rol alan bir enzimdir (Doğan et al., 2019). İnsan telomerazı, katalitik alt birim (insan telomeraz ters transkriptaz, hTERT) ve telomer bölgelerindeki eksik nükleotidleri oluşturmaktan sorumlu sentetik alt birim (insan telomeraz RNA bileşeni, hTERC) olmak üzere 2 alt birimden oluşmaktadır. Ökaryotik hücrelerde, DNA replikasyonu sırasındaki normal primazlar ve polimerazlar DNA'nın tek ipliğindeki terminal nükleotidleri kodlayamamaktadır. Bu durum, DNA replikasyonunun her döngüsü sırasında kromozomların küçülmesine sebep olmaktadır. Telomeraz, telomerleri oluşturan kromozomların 3' ucundaki bağlantı birimlerini birbirine bağlayarak RNA'yı bir kopya şablonu olarak kullanmaktadır. (Mustafa, 2024).

#### **2.4.1 KANSERDE TELOMERAZ**

Normal insan hücrelerinin çoğunda telomeraz aktivitesi gözlenmemektedir. Hücrelerin telomerleri, replikatif yaşlanma sürecine gelene kadar her hücre bölünmesinde kısaltılmaktadır (Herbert, Wright, & Shay, 2001). Ancak kanser hücrelerinin %85'inde yüksek telomeraz aktivitesi görülmektedir ve bu durum kanserlerin ayırt edici bir özelliğidir. Kanser hücrelerinde görülen yüksek telomeraz aktivitesi, kanser hücrelerinin tedaviye duyarlılığını azaltmaktadır (González-Moles, Moya-González, García-Ferrera, Nieto-Casado, & Ramos-García, 2022; Judasz, Lisiak, Kopczyński, Taube, & Rubiś, 2022; Tian, Chen, & Liu, 2010). Telomeraz aktivasyonu, kanserin erken evrelerinde görülmektedir. Telomeraz, kanser hücrelerinde telomerleri kritik uzunluğun üzerinde tutarak kanser hücrelerinin apoptoza girmesini engellemektedir (Bernardes de Jesus & Blasco, 2013). Telomeraz aktivasyonu, kanser hücrelerine sınırsız çoğalma yeteneği kazandırmaktadır. Ek olarak, telomeraz aktivasyonu, kanser köklüğü ve EMT mekanizması ile ilişkilidir ve kanser hücrelerinin metastaz yapma eğilimlerine katkıda bulunmaktadır (Ellingsen, Mangsbo, Hovig, & Gaudernack, 2021).

#### **2.4.2 KANSER KÖK HÜCRELERİNDE TELOMERAZ**

hTERT'in aşırı aktivasyonu, KKH'ne ölümsüzlük ve replikatif özellik sağlamaktadır (Dogan & Biray Avcı, 2018). Normal yetişkin kök hücreler, yüksek hTERT

ekspresyonu ve aktivitesinin yanında uzun telomerlere sahiptirler. Ancak KKH, yüksek hTERT ekspresyonu ve aktivitesine rağmen kısa telomer uzunluklarına sahiptirler. Bu durum, KKH'nde yüksek hTERT aktivitesinin sadece telomer uzaması ile ilişkili olmadığını göstermektedir (El-Badawy et al., 2018). Telomeraz varlığı, KKH'nin oluşumu ve muhafaza edilmesi için gerekmektedir. Ek olarak, KKH'nde yüksek hTERT aktivitesi, proliferasyon, mobilizasyon ve EMT süreçlerinde rol oynamaktadır (Arndt & MacKenzie, 2016; El-Badawy et al., 2018; Lipinska et al., 2017).

## **2.5 MEME KANSERİ VE MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE TELOMERAZ İNHİBİSYONU**

Yapılan çalışmalarda telomeraz inhibisyonu, meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve hücre canlılığını baskımlarken meme kanseri hücrelerinin apoptoz ve yaşlanma oranlarını artırmaktadır. Telomeraz inhibisyonu yapılan meme kanseri hücrelerinde telomerlerin kısaldığı görülmektedir. Ek olarak, meme kanseri hücrelerindeki telomeraz inhibisyonu, meme kanseri hücrelerini doğal killer hücre tedavisine ve antikanser ajanlara karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Aboelela, Ashmawy, Shaarawy, El-Hefny, & Medhat, 2020; Armando et al., 2022; Cassar et al., 2017; Cerone, Londoño-Vallejo, & Autexier, 2006; Mazloumi, Rafat, Dizaji Asl, & Nozad Charoudeh, 2023; Rao et al., 2016). MKKH'ndeki telomeraz inhibisyonu, MKKH'nde küre oluşumunu, kendini yenilemeyi, hücre büyümesini, hücre canlılığını, invaziv potansiyelini ve göç hızını azaltırken bu hücrelerde apoptozu indüklemektedir. Telomeraz inhibisyonu sonrasında MKKH'nin G2/M fazında hücre döngüsünün durma oranı artmaktadır. Ayrıca telomeraz inhibisyonu, MKKH'nde EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Doğan et al., 2019; Joseph et al., 2010; Koziel & Herbert, 2015; Kusoglu, Goker Bagca, Ozates Ay, Gunduz, & Biray Avcı, 2020).

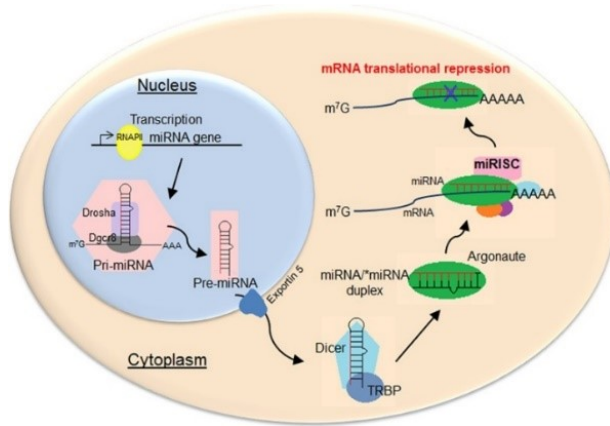
## **2.6 TELOMERAZ İNHİBİTÖRÜ BIBR1532**

BIBR1532, yaygın ve rutin olarak kullanılan, nükleosidik olmayan küçük moleküllü, oldukça spesifik bir telomeraz inhibitörüdür. Telomerazın TERT katalitik alt birimine bağlanmaktadır (Bryan et al., 2015). BIBR1532, telomerazın rekombinant hTERT tarafından yeniden oluşturulmasını engelleyerek doğrudan telomeraz çekirdek bileşenlerini hedef almaktadır. BIBR1532, şablon kopyalamada yer alan temel

katalitik adımları engellemektedir. Bunun yerine şablonun 5' ucuna uzatılmasından sonra DNA substratının uzamasını bozmaktadır (Pascolo et al., 2002).

## 2.7 MİKRORNA

MikroRNA(miRNA)'lar, bölünme veya translasyonel baskı için mRNA'ları hedefleyerek önemli düzenleyici roller oynayabilen, ortalama 22 nükleotit uzunluğundaki endojen RNA'lardır ve birçok biyolojik süreçte rol almaktadırlar (Bartel, 2004). miRNA'lar, öncelikle RNA polimeraz II tarafından çekirdekte birincil pri-miRNA transkriptler olarak kopyalanmaktadır. Çekirdek içerisinde pri-miRNA, Drosha ve çift sarmallı RNA bağlayıcı alan (dsRBD) proteini DGCR8/Pasha kompleksi tarafından 70 ile 100 nükleotitlik öncül pre-miRNA içeren parçalara kesilmektedir. Exportinler tarafından sitoplazmaya taşınan pre-miRNA'lar, burada TRBP/Loquacious ile birlikte başka bir RNase III endonükleaz olan Dicer tarafından parçalanarak yaklaşık 21 nükleotitlik miRNA:miRNA dubleksini içeren 3' öncüllerine kesilmektedir. Helikaz tarafından miRNA:miRNA dubleksini, bir AGO proteini içeren RISC kompleksine dahil edilmektedir. Oluşan bu bileşik, hedef mRNA'nın 3'UTR'sini hedeflemektedir (Ho, Clark, & Le, 2022).



**Şekil 1:** miRNA biyogenezisi (Hajarnis, Lakhia, & Patel, 2015).

### 2.7.1 MEME KANSERİ ve MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE MİKRORNA'LAR

Diğer kanserlerde olduğu gibi, meme kanserinde de miRNA'lar, kanserin invazyon, metastaz, EMT, anjiyogenez, apoptoz gibi süreçlerinde rol oynamaktadır. Meme

kanserinde, miRNA'ların normal ekspresyonunun değişmesine sebep olan genetik ve epigenetik bazı olaylar gerçekleşmektedir. Meme kanserinde, DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların miRNA'ların ekspresyonunu değiştirdiği bilinmektedir. Bu durumlar, meme kanserinde anormal miRNA ekspresyonuna yol açmaktadır (Bertoli, Cava, & Castiglioni, 2015). miRNA'lar, MKKH'nde ve tümörjenik olmayan meme kanseri hücrelerinde farklı seviyelerde ifade edilmektedirler ve MKKH'nde apoptoz sinyal yolağı, Wnt sinyal yolağı, Notch sinyal yolağı, EMT ve kendini yenileme faktörü Bmi1'i etkilemektedir (Shimono, Mukohyama, Nakamura, & Minami, 2015). miRNA'lar, MKKH'nde tümör baskılayıcı ve onkojenik roller oynamaktadır (Vahidian et al., 2019).

## **2.8 TELOMERAZ VE MİKRORNA'LAR**

Telomerazın katalik alt birimi TERT, miRNA'ların biyogenezinin erken aşamasında miRNA seviyelerini ve miRNA gen promotörlerinin transkripsiyonel fonksiyonlarını düzenlemektedir (Lassmann et al., 2015). Kültüre edilmiş neonatal sıçan kardiyomiyositlerinde yapılan bir çalışmada, TERT inhibisyonunun çalışmada incelenen olgun miRNA-21, miRNA-29a ve miRNA-208a seviyelerini azalttığı bulunmuştur. Sonuç olarak, TERT inhibisyonunun olgun miRNA seviyeleri üzerinde dikkate değer bir etkisi bulunmaktadır (Drevytska et al., 2014). BIBR1532'ye maruz kalarak telomeraz inhibisyonu yapılan NB4 lösemi hücrelerinde miRNA'ların ifade seviyeleri, önemli ölçüde yukarı veya aşağı regüle ederek değişmiştir (Pourbagheri-Sigaroodi et al., 2019).

### 3.Gereç ve Yöntem

#### 3.1 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışmamıza Ağustos 2023 tarihinde Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalındaki laboratuvarlarda başlanmış, Temmuz 2024 tarihinde tez savunması planlanmıştır.

#### 3.2 Araştırmanın Tipi

Çalışmamız in vitro çalışmadır.

#### 3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmamızda sağlıklı meme kanseri hücre hattı (MCF-10A), meme kanseri hücre hattı (MCF-7), MKKH hattı kullanılmıştır ve 6 deney grubu bulunmaktadır. Deney grupları Tablo 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 1:** Çalışmamızın deney grupları

---

BIBR1532 uygulanmayan MCF-10A Hücre Hattı
BIBR1532 uygulanan MCF-10A Hücre Hattı
BIBR1532 uygulanmayan MCF-7 Hücre Hattı
BIBR1532 uygulanan MCF-7 Hücre Hattı
BIBR1532 uygulanmayan MKKH Hücre Hattı
BIBR1532 uygulanan MKKH Hücre Hattı

---

#### 3.4 Araştırmanın Bağımlı ve Bağımsız Değişkeni

BIBR1532 çalışmamızın bağımsız değişkeni, hücre hatlarındaki miRNA profilindeki değişim ise çalışmamızın bağımlı değişkeni olarak tanımlanmıştır.

### 3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları, hücrelerin biyolojik, fizyolojik, genetik ve metabolik süreçlerinin tanımlanabilmesi için hücreleri optimal koşullar altında büyütme ve çoğaltma için sıklıkla kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Bu tekniğin en önemli avantajı, hücrenin bulunduğu ortamdaki fizyolojik koşulları kontrol edebiliyor olmasıdır. Bu sayede tutarlı, tekrarlanabilir, güvenilirliği yüksek deney sonuçları elde edilmektedir.

Bu yüksek lisans tezinde normal meme hücreleri olarak MCF-10A hücre hattı, meme kanseri hücreleri olarak MCF-7 hücre hattı ve meme kanseri kök hücreleri kullanılmıştır. Hücre hatları, Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. MCF-10A hücreleri Mammary epithelial cell growth medium besiyerinde, MCF-7 hücreleri RPMI-1640 besiyerinde ve MKKH, "Human Breast Cancer Stem Cell Undifferentiated Media with Serum" besiyerinde kültüre edilmiştir. Tüm hücre hatları, 75 cm<sup>2</sup> filtre kapaklı kültür kapları içine ekilmiştir ve 37<sup>0</sup>C sıcaklık, %5 CO<sub>2</sub> , %95 nem oranı koşullarında inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin durumu düzenli olarak inverted mikroskop yardımı ile takip edilmiştir. Bütün hücre kültürü çalışmaları, steril laminal flow içerisinde sterilizasyon kurallarına dikkat edilerek yapılmıştır.

### 3.6 Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin uygun kültür koşulları altında sayısı arttığında flask yüzeyi ve besiyerindeki nutrientler yeterli gelmemektedir. Bu durumda hücre büyümesinin sağlıklı bir şekilde devam edebilmesi için pasajlama yapılması gerekmektedir.

- İlk olarak hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri, flask içerisinden çekilmiş ve hücreler serumsuz besiyeri ile yıkanmıştır.
- Yüzeye yapışan hücreleri kaldırmak için flask içerisine 1.5 ml tripsin-EDTA eklenmiş ve hücreler 5 dk boyunca inkübatör içerisinde bekletilmiştir.
- 5 dk sonunda hücreler, inverted mikroskop ile kontrol edilmiş ve hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı belirlenmiştir.

- Flask içerisindeki tüm hücreler kalktıktan sonra flask içerisine tripsin aktivitesini inhibe etmek için flaska eklenen tripsin-EDTA'nın 2 katı kadar, 3 ml, hücrelerin serumlu besiyeri ilave edilmiştir.
- Flask içerisindeki hücreler, 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınmış ve 5 dk 1200 RPM'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında, falkon tüp içerisindeki süpernatant dökülmüştür.
- Falkon tüp dibindeki pellet üzerine yeterli miktarda serumlu besiyeri eklenmiştir ve 2 tane 75 cm<sup>2</sup> flask içerisine bölüştürülmüştür.
- Flasklar üzerine etiketleme yapılmış ve inkübatöre konularak pasajlama işlemi tamamlanmıştır.

### **3.7 Hücrelerin Dondurulması (Kriyoprezervasyon)**

Deneyde kullanılmayacak fazla hücreler, yaşlanmalarının engellenmesi ve daha sonrasında tekrar kullanılmak üzere dondurulur.

- Yeterli konfluens yoğunluğuna ulaşan flaskların besiyerleri ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler serumsuz besiyeri ile yıkanmıştır.
- Hücreleri yüzeyden ayırmak için 1.5 ml tripsin-EDTA eklenmiş ve hücreler 5 dk boyunca inkübatör içerisinde bekletilmiştir.
- İnkübasyondan alınan hücrelere tripsin aktivitesini inhibe etmek için 3 ml serumlu besiyeri eklenmiştir.
- Hücreler, 15 ml'lik falkon tüpler içerisine alınmış ve 5 dk 1200 RPM'de santrifüj edilmiştir.
- Buz üzerinde 9:1 oranında FBS:DMSO karışımı hazırlanmıştır.
- Santrifüj sonrasında, süpernatant dökülmüş ve pellet üzerine FBS:DMSO karışımı eklenmiştir. Bu işlem buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.
- Hücreler hızlıca karyotüplere bölünmüş ve -86°C'ye kaldırılmıştır.

### 3.8 Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

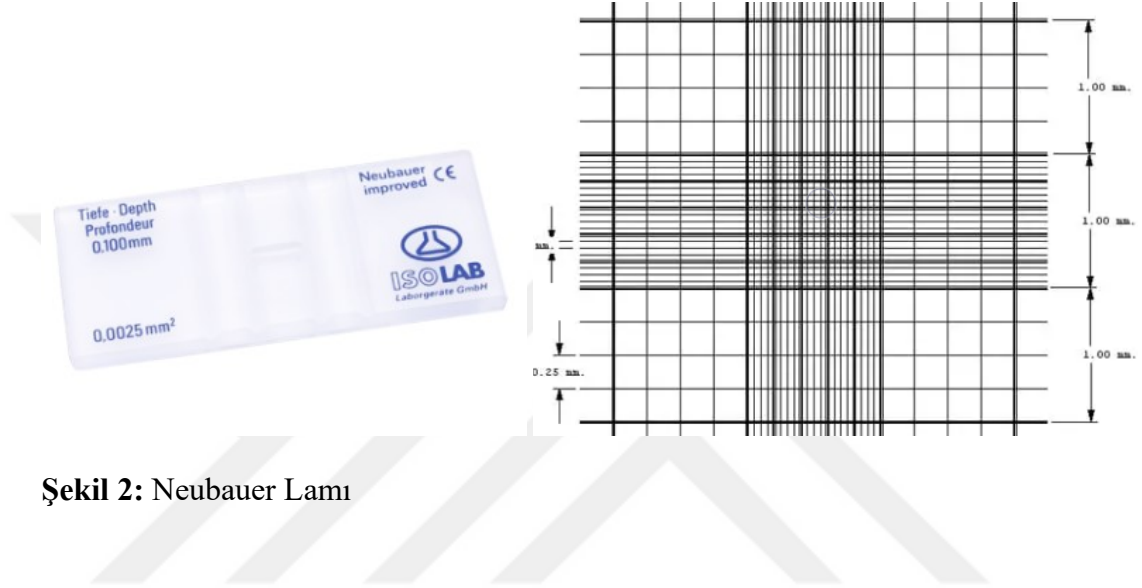
- -86°C'den alınan karyotüpler, oda sıcaklığına konulmuştur.
- DMSO, hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle çözülme işlemi hızlıca yapılmaktadır. DMSO etkisini azaltmak için karyotüp içerisine 1 ml hücrelerin serumsuz besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılarak hücreler çözülmüştür.
- Serumsuz besiyeri içerisinde bulunan hücreler, 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınmıştır ve 5 dk 1200 RPM'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernatant dökülmüş ve hücreler üzerine 10 ml serumsuz besiyeri eklenerek tekrar 5 dk 1200 RPM'de santrifüj edilmiştir. Bu adım, DMSO'yu etkili bir şekilde uzaklaştırmak için yapılmaktadır.
- İkinci santrifüj sonrasında süpernatant tekrar dökülmüştür ve pellet üzerine hücrelerin serumlu besiyeri eklenmiştir.
- Serumlu besiyeri ile birlikte hücreler 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara aktarılmıştır.
- Flasklar, 37<sup>0</sup>C sıcaklık, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem oranı koşullarındaki inkübatör içerisine konulmuştur.
- Hücrelerin inverted mikroskop ile takibi yapılmış ve besiyerinde renk değişimi gözlemlendiği zaman besiyeri değiştirilmiştir.

### 3.9 Hücre Hatlarının Canlılığının Belirlenmesi

Hücre hatlarının canlılığının belirlenmesi için Tripan mavisini kullanılmıştır. Tripan mavi boyası, canlı hücrelerin hücre zarından geçemezken ölü hücrelerin hücre zarında geçebilmektedir. Bu yüzden mikroskop altında ölü hücreler mavi renkte görülürken canlı hücreler ise beyaz görünmektedir.

- Flask yüzeyinde ayrılan ve santrifüjlenen hücre pelletine 1 ml serumlu besiyeri eklenmiştir.
- Bu hücre süspansiyonu içerisinden 50 µl alınmıştır ve 50 µl tripan mavisini boyası ile karıştırılmıştır. Uygulama esnasında pipetaj yapılmıştır.
- Hücre-boya karışımı Neubauer lamına aktarılmıştır.

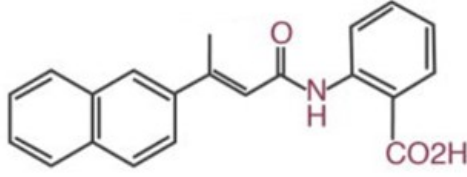
- Işık mikroskobu altında, Neubauer lamınının 4x4 karelerinden 4 tanesinde beyaz hücreler sayılmıştır.
- Sayılan 4 alandaki beyaz hücre sayısının ortalaması alınmış ve  $2 \times 10^4$  ile çarpılarak 1 ml'deki canlı hücre sayısı bulunmuştur.



**Şekil 2:** Neubauer Lamı

### 3.10 BIBR1532 Etken Maddesinin Uygulanması

BIBR1532 etken maddesi toz halinde temin edilmiştir. Kullanılıncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. BIBR1532, ilk olarak DMSO'de çözülmüş ve 20 mM ana stoklar hazırlanmıştır. BIBR1532'nin bu hücrelerdeki  $\text{IC}_{50}$  değerleri daha önceki çalışmalarda bulunmuştur. MCF-10A hücrelerinde 48 saat için BIBR1532  $\text{IC}_{50}$  değeri  $29.07 \mu\text{M}$ , MCF-7 hücrelerinde 48 saat için BIBR1532  $\text{IC}_{50}$  değeri  $34.59 \mu\text{M}$ , MKKH'nde 48 saat için BIBR1532  $\text{IC}_{50}$  değeri  $29.91 \mu\text{M}$  'dir (Doğan et al., 2019). Belirlenen dozlar, hücre gruplarına uygulanmıştır. BIBR1532'nin uygulanmadığı hücre hatları kontrol grubu olarak kullanılmıştır.



**Şekil 3:** BIBR1532'nin kimyasal yapısı (Bryan et al., 2015)

### 3.11 miRNA izolasyonu

BIBR1532'nin uygulandığı doz grubu hücreleri ve BIBR1532'nin uygulanmadığı kontrol hücrelerinde miRNeasy Kiti (Qiagen) ile miRNA izolasyonu yapılmıştır.

- Flask içerisindeki hücreler, önce serumsuz besiyeri ile yıkanmış sonrasında 1.5 ml tripsine 5 dk boyunca maruz bırakılmıştır.
- 3 ml hücrelerin serumlu besiyeri flask içerisine eklenmiş ve ardından hücreler 15 ml'lik falkon tüplere alınarak 1200 RPM'de 5 dk santrifüjlenmiştir.
- Süpernatant dökülmüş ve pellet üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent eklenmiştir.
- Gözle görünür hücre pelleti kalmayana kadar pipetaj yapılmıştır.
- Elde edilecek RNA kalitesini artırmak için hücrelerin patlatılıp homojenleştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle hücreler, "Qiashtredder" tüp içerisine alınıp 13000 RPM'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında Qiashtredder içerisindeki hücreler, oda sıcaklığında 5 dk boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından kolon atılmış ve 140 µl kloroform eklenmiş, 15 sn boyunca iyice çalkalanmıştır.
- 3 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiş hücreler, 4°C'de 13000 RPM'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında, örnekler 3 faza ayrılmıştır. En altta kırmızı organik faz, ortada beyaz ara katman, en üstte ise RNA içeren renksiz faz bulunmaktadır.

- RNA içeren renksiz faz, yeni bir tüp içerisine alınmış ve üzerine hacminin 1,5 katı kadar %100 etanol eklenmiştir. Pipetaj yapılarak homojenleştirme yapılmıştır.
- Örnek içerisinden 700 µl alınmış ve RNeasy Mini spin kolonlara aktarılmıştır.
- Oda sıcaklığında 13000 RPM’de 15 sn santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında elüsyon dökülmüş ve 700 µl’den fazla olan örnekler için, kalan miktar tekrardan RNeasy Mini spin kolonlara aktarılmış, santrifüj adımı tekrarlanmıştır.
- 2. Santrifüj sonrasında elüsyonlar atılmış ve toplama tüpüne yerleştirilen filtreli kolon içerisine 350 µl Tampon RWT eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 13000 RPM’de 15 sn santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında elüsyon atılmış ve toplama tüpüne yerleştirilen kolon içerisine 500 µl Tampon RPE tamponu eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 13000 RPM’de 15 sn santrifüj edilmiştir.
- Elüsyon atıldıktan sonra aynı toplama tüpünde yine 500 µl Tampon RPE tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında 13000 RPM’de 2 dk santrifüj edilerek yıkama yapılmıştır.
- Santrifüj sonrasında elüsyon atılmış ve kolon yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir.
- Elüsyon artığının ya da yıkama tamponunun uzaklaştırıldığından emin olmak için yeni toplama tüpü içerisine yerleştirilen kolon, 13000 RPM’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında kolon, 1,5 ml’lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu aşamada miRNA’nın elüsyonu için ependorf tüp içerisine 50 µl RNase içermeyen su eklenmiştir. Suyun doğrudan membran üzerine eklenmiş olmasına dikkat edilmiştir.
- Ependorf tüpü, santrifüj cihazına yerleştirilmiş ve 13000 RPM’de 2 dk santrifüjlenmiştir.

- Santrifüj sonrasında elde edilen elüsyon miRNA'ları içermektedir. Bu miRNA'lar  $-86^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

### **3.12 miRNA'ların miktarının ve saflığının belirlenmesi**

İzole edilen miRNA'ların miktarını ve saflığını belirlemek için 230/260 nm ve 260/280 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmüştür. Ölçümler için her bir hücre grubundan 1 µl alınmış ve Nanodrop (Thermo Scientific) cihazında ölçüm yapılmıştır. Sonuçlara bakılarak ideal RNA'lar belirlenmiştir. İdeal saflıktaki RNA, A230/A260 ve A260/A280 absorban oranının 1.9-2.1 olan RNA'lardır.

### **3.13 cDNA sentezi**

İzole edilmiş miRNA'lardan uygun miktar ve saflıkta olanlardan miScript II Reverse Transcription Kit (Qiagen) kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır.

- RNA örneği buz üzerinde, 10x miScript Nucleics karışımı, RNase-free su ve 5x miScript HiSpec tamponları ise oda sıcaklığında çözülmüştür.
- Toplam 20 µl hacimde olacak şekilde ters transkriptaz reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon içerisine konulan hacimler Tablo 2'de gösterilmiştir.
- Ters transkriptaz reaksiyon içerisine RNA kalıbı eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır.
- Pipetaj sonrasında buz üzerine alınan ters transkriptaz reaksiyonu ve kalıp RNA karışımı,  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dk boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından miScript ters transkriptaz enziminin inaktive edilmesi gerekmektedir. Bunun için karışım  $95^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk inkübe edilmiş ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 2: Ters Transkriptaz Reaksiyon İçeriği**

İçerik	Miktar (μl)
5x miScript “HiSpec” Tamponu	4
10x miScript “Nucleics” Karışımı	2
miScript Ters transkriptaz Karışımı	2
RNase-free su	değişir
Kalıp RNA	değişir
Toplam Hacim	20

### 3.14 miRNA PCR Array Analizi

Meme kanseri ve meme kanseri kök hücrelerinde onkojenik ya da tümör baskılayıcı rolleri bulunan 12 miRNA'nın analizi yapılmıştır. Elde edilen kalıp cDNA örnekleri, miScript miRNA PCR Array kiti (Qiagen) kullanılarak PCR array analizi gerçekleştirilmiştir.

- 10x miScript Universal Primer, RNase-free su, kalıp cDNA ve 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master karışımı oda sıcaklığında üzülmüştür.
- Tablo 3'te gösterilen miktarlarda RT-qPCR reaksiyonu hazırlanmıştır.
- Hazırlanan reaksiyon karışımı 96 kuyucuklu plaktaki her bir kuyucuğa eşit miktarda eklenmiştir.
- 96 kuyucuklu plak, Roche Light Cycler 480 cihazına konulmuş ve reaksiyon başlatılmıştır.

**Tablo 3:** RT-qPCR reaksiyonu (96 kuyucuklu plak için)

İçerik	Miktar (µl)
10x miScript Universal Primer	275
RNase-free su	1075
kalıp cDNA	25
2X QuantiTect SYBR Green PCR Master	1375
Toplam hacim	2750

### 3.15 İstatistiksel Analizler

Azalan veya artan miRNA'ların istatistiksel analizi, 3 biyolojik tekrardan sonra yapılmıştır. İstatistiksel analiz için, "miScript miRNA PCR Array Data Analysis" web yazılımı kullanılmıştır. Yazılıma RT-qPCR verilerinin Threshold cycle değerleri (CT) yüklenmiştir. Yazılım programı,  $\Delta\Delta CT$  metodunu kullanarak rölatif kantifikasyonu ve kaç kat değişim olduğunu hesaplamış, farklı formatlarda göstermiştir. " $\Delta Ct = (AVG CT_{miRTC} - 1.1) - (AVG CT_{PPC})$ " formülü, veri analizinde kullanılmıştır. *SNORD61* ve *RNU6-6P*, veri analizinde referans genler olarak kullanılmıştır.

**Tablo 4:** miRNA'ların plaka içerisindeki yerleşimi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-19a-3p
<b>B</b>	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-21-5p
<b>C</b>	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-221-5p	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-221-5p	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-221-5p	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-221-5p	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-221-5p	hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-221-5p
<b>D</b>	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-708-5p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-708-5p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-708-5p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-708-5p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-708-5p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-708-5p
<b>E</b>	hsa-miR-133a-3p	SNORD61	hsa-miR-133a-3p	SNORD61	hsa-miR-133a-3p	SNORD61	hsa-miR-133a-3p	SNORD61	hsa-miR-133a-3p	SNORD61	hsa-miR-133a-3p	SNORD61
<b>F</b>	hsa-miR-145-5p	RNU6-6p	hsa-miR-145-5p	RNU6-6p	hsa-miR-145-5p	RNU6-6p	hsa-miR-145-5p	RNU6-6p	hsa-miR-145-5p	RNU6-6p	hsa-miR-145-5p	RNU6-6p
<b>G</b>	hsa-miR-155-5p		hsa-miR-155-5p		hsa-miR-155-5p		hsa-miR-155-5p		hsa-miR-155-5p		hsa-miR-155-5p	
<b>H</b>	hsa-miR-17-5p		hsa-miR-17-5p		hsa-miR-17-5p		hsa-miR-17-5p		hsa-miR-17-5p		hsa-miR-17-5p	

■ MCF-7 KONTROL GRUBU HÜCRELERİ

■ MCF-10A KONTROL GRUBU HÜCRELERİ

■ MKKH KONTROL GRUBU HÜCRELERİ

■ MCF-7 DOZ GRUBU HÜCRELERİ

■ MCF-10A DOZ GRUBU HÜCRELERİ

■ MKKH DOZ GRUBU HÜCRELERİ

**Tablo 5:** Çalışmada kullanılan miRNA'ların meme kanseri ve MKKH'ndeki rolleri

---

hsa-let-7e-5p	Tümör baskılayıcı
hsa-miR-106a-5p	Hem onkojenik hem tümör baskılayıcı
hsa-miR-10a-5p	Tümör baskılayıcı
hsa-miR-126-5p	Tümör baskılayıcı
hsa-miR-133a-3p	Tümör baskılayıcı
hsa-miR-145-5p	Tümör baskılayıcı
hsa-miR-155-5p	Onkojenik
hsa-miR-17-5p	Tümör baskılayıcı
hsa-miR-19a-3p	Onkojenik
hsa-miR-21-5p	Onkojenik
hsa-miR-221-5p	Onkojenik
hsa-miR-708-5p	Tümör baskılayıcı

---

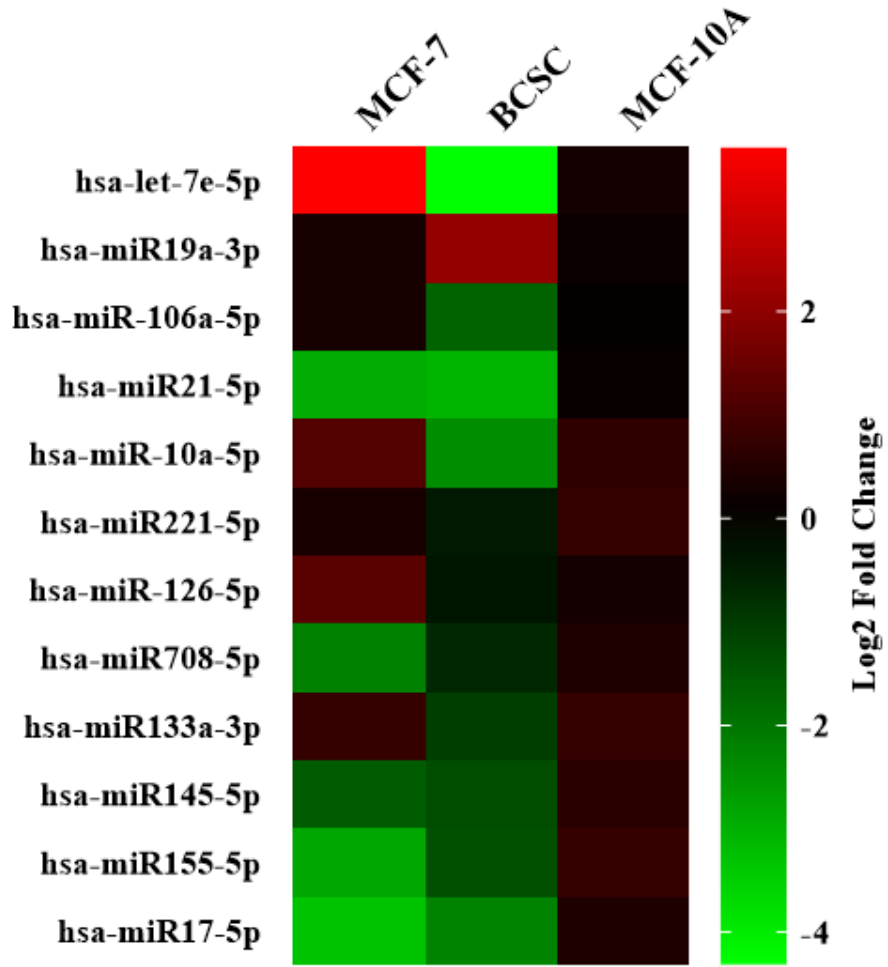
## **Bulgular**

### **4.1 MCF-10A, MCF-7 ve MKKH Hatlarının oğaltılması**

MCF-10A, MCF-7 ve MKKH hatları, 37<sup>0</sup>C sıcaklık, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem oranı koşullarındaki inkübatörde kontamine olmadan çoğaltılmıştır.

### **4.2 Telomeraz İnhibitörü BIBR1532'nin MCF-10A, MCF-7 ve MKKH'ndeki miRNA Profili Üzerine Etkisi**

Telomeraz inhibitörü BIBR1532, MCF-10A, MCF-7 ve MKKH'ne uygulanmıştır. Uygulama yapılırken BIBR1532'nin bu hücre hatlarındaki 48 saat için IC<sub>50</sub> dozları kullanılmıştır. MCF-10A hücrelerinde 48 saat için BIBR1532 IC<sub>50</sub> değeri 29.07 µM, MCF-7 hücrelerinde 48 saat için BIBR1532 IC<sub>50</sub> değeri 34.59 µM, MKKH'nde 48 saat için BIBR1532 IC<sub>50</sub> değeri 29.91 µM 'dir (Doğan et al., 2019).



Şekil 4: BIBR1532 uygulanan MCF-10A, MCF-7 ve MKKH'ndeki miRNA'ların Isı Haritası

#### 4.2.1 BIBR1532'nin MCF-10A Hücrelerindeki miRNA Profili Üzerine Etkisi

**Tablo 6:** BIBR1532 uygulanan MCF-10A Hücrelerindeki miRNA Değişimi

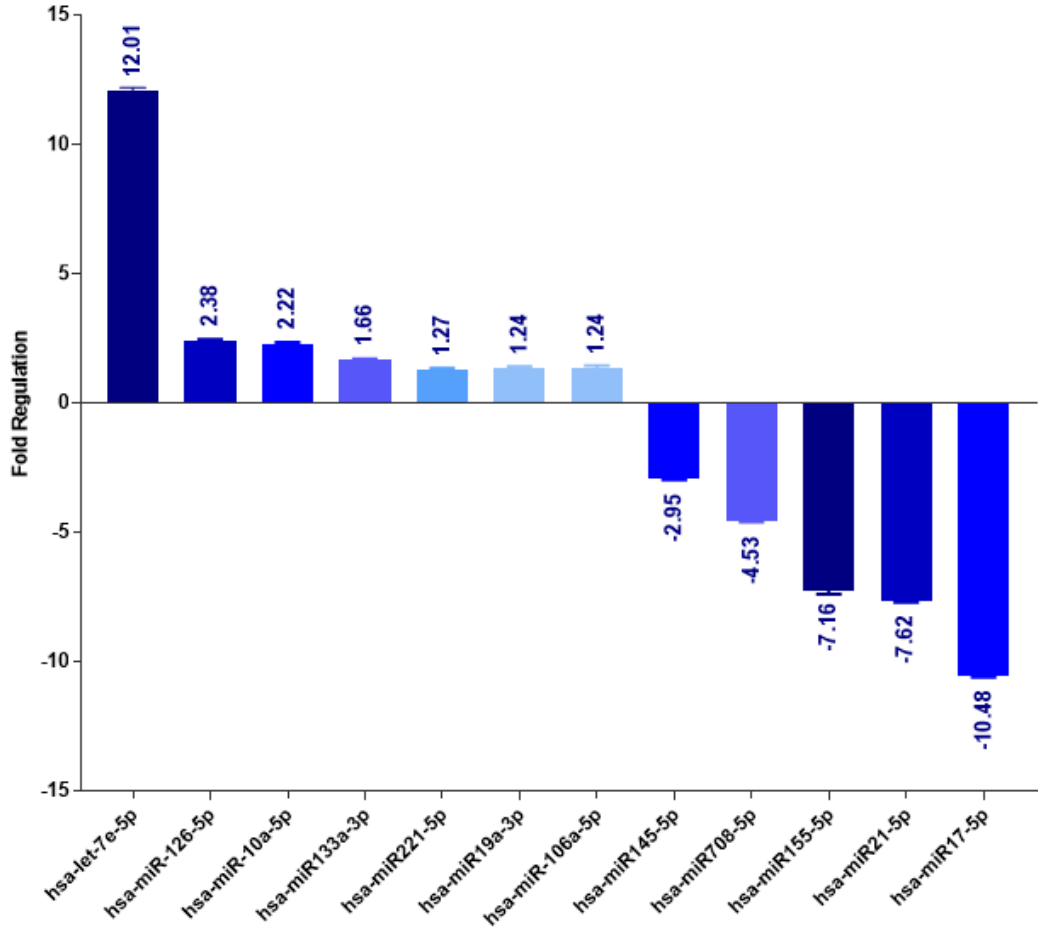
Position	Mature ID	Fold Change (comparing to control group)		Fold Regulation	p-value (comparing to control group)
		Group 1			
		Fold Change	Log2 Fold Change		
1	hsa-let-7e-5p	1,20	0,26	1,20	0,400000
2	hsa-miR19a-3p	1,10	0,14	1,10	0,083000
3	hsa-miR-106a-5p	1,05	0,07	1,05	0,080000
4	hsa-miR21-5p	1,08	0,11	1,08	0,090000
5	hsa-miR-10a-5p	1,59	0,67	1,59	0,077000
6	hsa-miR221-5p	1,66	0,73	1,66	0,070000
7	hsa-miR-126-5p	1,21	0,28	1,21	0,090000
8	hsa-miR708-5p	1,35	0,43	1,35	0,400000
9	hsa-miR133a-3p	1,65	0,72	1,65	0,400000
10	hsa-miR145-5p	1,47	0,56	1,47	0,200000
11	hsa-miR155-5p	1,66	0,73	1,66	0,091000
12	hsa-miR17-5p	1,33	0,41	1,33	0,100000

BIBR1532 uygulanan MCF-10A hücrelerinde, miRNA profili üzerinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi.

#### 4.2.2 BIBR1532'nin MCF-7 Hücrelerindeki miRNA Profili Üzerine Etkisi

**Tablo 7:** BIBR1532 uygulanan MCF-7 Hücrelerindeki miRNA Değişimi

Position	Mature ID	Fold Change (comparing to control group)		Fold Regulation	p-value (comparing to control group)
		Fold Change	Log2 Fold Change		
1	hsa-let-7e-5p	<b>12.01</b>	3,59	<b>12.01</b>	<b>0.015020</b>
2	hsa-miR19a-3p	1.24	0,31	1.24	<b>&lt;0.001</b>
3	hsa-miR-106a-5p	1.24	0,31	1.24	<b>&lt;0.001</b>
4	hsa-miR21-5p	<b>0.13</b>	-2,94	<b>-7.62</b>	<b>0.009574</b>
5	hsa-miR-10a-5p	<b>0.22</b>	1,15	<b>2.22</b>	<b>&lt;0.001</b>
6	hsa-miR221-5p	1.27	0,34	1.27	<b>&lt;0.001</b>
7	hsa-miR-126-5p	<b>2.38</b>	1,25	<b>2.38</b>	<b>&lt;0.001</b>
8	hsa-miR708-5p	<b>0.22</b>	-2,18	<b>-4.53</b>	<b>&lt;0.001</b>
9	hsa-miR133a-3p	1.66	0,73	1.66	<b>&lt;0.001</b>
10	hsa-miR145-5p	<b>0.34</b>	-1,56	<b>-2.95</b>	<b>&lt;0.001</b>
11	hsa-miR155-5p	<b>0.14</b>	-2,84	<b>-7.16</b>	<b>&lt;0.001</b>
12	hsa-miR17-5p	<b>0.10</b>	-3,32	<b>-10.48</b>	<b>&lt;0.001</b>



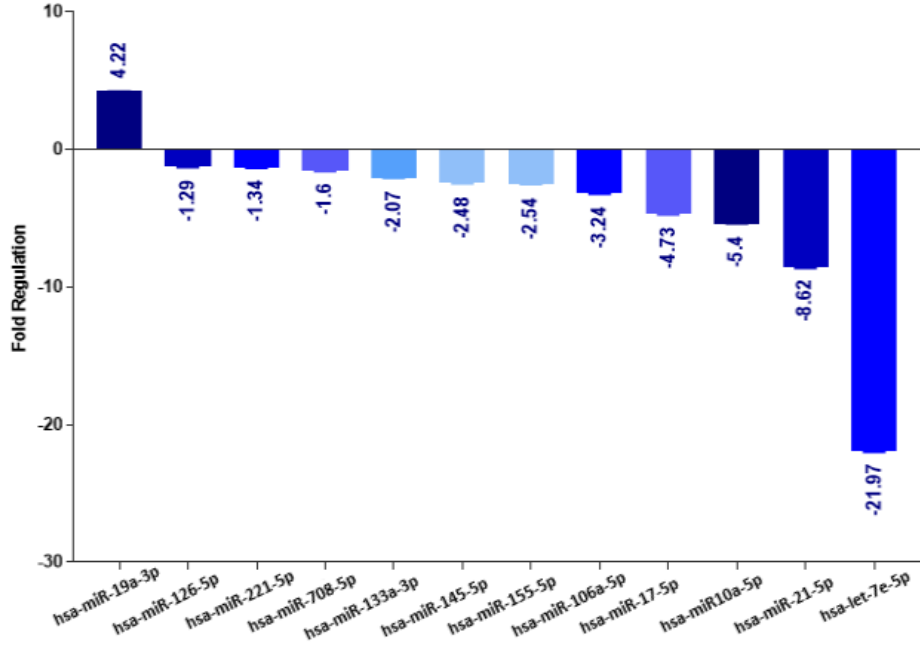
**Grafik 1:** BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücrelerinde miRNA Kat Regülasyonu Grafiği

BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücrelerinde, let-7e-5p ekspresyonu 12.01 kat, miR-10a-5p ekspresyonu 2.22 kat, miR-133a-3p ekspresyonu 1.66 kat, miR-126-5p ekspresyonu 2.38 kat artmıştır. Buna karşılık bu hücrelerde miR-21-5p ekspresyonu 7.62 kat, miR-155-5p ekspresyonu 7.16 kat azalmıştır.

### 4.2.3 BIBR1532'nin MKKH'ndeki miRNA Profili Üzerine Etkisi

**Tablo 8:** BIBR1532 uygulanan MKKH'ndeki miRNA Değişimi

Position	Mature ID	Fold Change (comparing to control group)		Fold Regulation	p-value (comparing to control group)
		Group 1			
		Fold Change	Log2 Fold Change		
1	hsa-let-7e-5p	0.05	-4,32	-21.97	0.001938
2	hsa-miR19a-3p	4.22	2,08	4.22	0.042392
3	hsa-miR-106a-5p	0.31	-1,69	-3.24	0.032257
4	hsa-miR21-5p	0.12	-3,06	-8.62	0.006015
5	hsa-miR-10a-5p	0.19	-2,40	-5.40	0.068266
6	hsa-miR221-5p	0.74	-0,43	-1.34	0.422488
7	hsa-miR-126-5p	0.78	-0,36	-1.29	0.008957
8	hsa-miR708-5p	0.62	-0,69	-1.60	0.903972
9	hsa-miR133a-3p	0.48	-1,06	-2.07	0.212123
10	hsa-miR145-5p	0.40	-1,32	-2.48	0.034303
11	hsa-miR155-5p	0.39	-1,36	-2.54	0.067429
12	hsa-miR17-5p	0.21	-2,25	-4.73	0.069711



**Grafik 2:** BIBR1532 uygulanan MKKH'nde miRNA Kat Regülasyonu Grafiği

BIBR1532 uygulanan MKKH'nde miR-21-5p ekspresyonu 8.62 kat, miR-221-5p ekspresyonu 1.34 kat ve miR-155-5p ekspresyonu 2.54 kat azalmıştır.

## Tartışma

Kanserin hücresele seviyedeki gelişimi, DNA'daki somatik mutasyon birikimini takiben gerçekleşen metabolizma sırasında üretilen serbest radikaller gibi endojen süreçler veya radyasyon, kimyasal karsinojenler gibi eksojen süreçler sonunda oluşan genetik hasardan kaynaklanmaktadır. Normal şartlarda hücre, bu hasarı tamir etmek için çeşitli mekanizmaları kullanmaktadır ancak meydana gelen çeşitli hatalar sonucunda bu hasar tamir edilememekte ve genomda kalıcı değişikliğe sebep olmaktadır. Hücre genetiğinde meydana gelen bu hasar, hücrelerin proliferasyon, apoptoz, hücre yaşlanması, hücre bölünmesi gibi süreçlerinin anormal bir şekilde gerçekleşmesine sebep olmaktadır (Bertram, 2001). Genomik olarak kararsız olan bu hücrelerde yüksek oranda hücre büyümesi, sınırsız replikatif potansiyeli, apoptozdan kaçınma mekanizması, invazyon ve metastaz yeteneği görülmektedir. Bu hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalması kansere neden olmaktadır (Hanahan & Weinberg, 2000).

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir. Çoğunlukla lobüllerde görülmesine rağmen memenin herhangi bir yerinde meydana gelen anormal hücre büyümesi meme kanserine neden olabilmektedir. Meme kanserlerinin büyük çoğunluğu invazivdir ve komşu dokulara metastaz yapmaktadırlar (Winters, Martin, Murphy, & Shokar, 2017). Özellikle meme kanserinin orta ve geç evrelerde metastaz yapma eğilimi daha yüksektir (He et al., 2020). Meme kanseri moleküler özellikleri baz alınarak HER2 ile zenginleştirilmiş alt tip, Luminal A, Luminal B ve bazal benzeri alt tip olmak üzere 4 alt tipe ayrılmaktadır (Johnson, Conant, & Soo, 2021). Luminal alt tipler (Luminal A ve Luminal B), en sık görülen alt tip olup meme kanseri vakalarının %60-70 kadarını oluşturmaktadır. Progesteron reseptörü (PR) ve östrojen reseptörü (ER) ekspresyonu görülmektedir (Johnson et al., 2021). HER2 ile zenginleştirilmiş alt tip, meme kanseri hastalarının %10-20 kadarında görülmektedir. Bu alt tipte, hem RNA hem de protein düzeyinde HER2 ve proliferasyon ile ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu görülmektedir. Genom boyunca en yüksek sayıda mutasyon gösteren alt tiptir (Johnson et al., 2021; Prat et al., 2015). Bazal benzeri alt tip, meme kanseri vakalarının %15'ini oluşturmaktadır. Çoğu zaman tanı anında büyüktür ve yüksek uzak nüks oranına sahiptir. Bazal benzeri alt tip, ER ile PR

ekspresyonu göstermemektedir. Buna karşılık proliferasyonla ilişkili genlerin ve cildin bazal tabakası tarafından ifade edilen keratinlerin yüksek ifadesi ile karakterize edilmektedir. Bazal benzeri alt tip, üçlü negatif meme kanserleri (TNBC) arasında baskındır ve tüm TNBC'lerin %70-80'ini oluşturmaktadır (Johnson et al., 2021; Prat et al., 2015; P. Tang & Tse, 2016).

Meme kanserinin her bireyde değişen morfolojik ve moleküler özelliklerinden dolayı aşırı heterojen ve karmaşık olması, tedaviye yanıtı zorlaştırmaktadır. Yapılan çalışmalar, aynı tip meme kanseri hastalarının bile tedaviye yanıtlarının farklı olduğunu rapor etmiştir (Luque-Bolivar, Pérez-Mora, Villegas, & Rondón-Lagos, 2020). Başlangıçta meme kanseri hastaları, tedaviye yanıt veriyor olsa da sonrasında genetik, epigenetik ve moleküler faktörlerin etkisiyle tedavi direnci geliştirmektedirler (Y. Tang, Wang, Kiani, & Wang, 2016). MKKH, tedavi direncinin ana sebeplerinden biridir. Kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeline sahip MKKH, kemoterapi ve radyoterapiye karşı duyarsız hücrelerdir ve az sayıdaki MKKH bile tümör oluşumunu başlatabilmektedir (L. Zhang et al., 2023). MKKH, sadece meme kök hücrelerinin ya da progenitörlerin kendini yenileme yeteneklerini aşırı aktive eden mutasyonlarla değil, aynı zamanda tedavi sırasında meydana gelen mikro çevresel bileşenlerin, kanser hücrelerini indükleyerek farklılaşması sonucunda da oluşabilmektedir (Bai, Ni, Beretov, Graham, & Li, 2018).

Kanser hücrelerini öldürebilen geleneksel tedavi yöntemleri, KKH üzerinde etkili olmamaktadır ve bu hücreler kendini yenilemeye devam etmektedir (Bai et al., 2018). KKH'nin plastisite yeteneği, epitelyal ve mezenkimal hücreler arasında esnek fenotipik dönüşüme neden olmaktadır. Bu durum, KKH'nin sadece epitelyal ya da sadece mezenkimal odaklı terapi ile tedavi edilmesini zorlaştırmaktadır (Zhou et al., 2023). Kemoterapi, mitotik bölünmeyi engelleyerek ve DNA hasarı oluşturarak yüksek proliferatif hızına sahip kanser hücrelerini öldürmektedir fakat KKH, düşük proliferatif hızına sahiptir ve kemoterapiden daha az etkilenmektedir. Ayrıca, KKH, yüksek oranda B-hücreli lenfoma, ATP taşıyıcı ailesi, ALDH1 ekspresyonuna, daha yavaş hücre bölünmesine, daha yüksek DNA hasar yanıtı oranına ve apoptoza direnç

mekanizmasına sahiptirler. Bu özellikleri ile kemoterapötik ajanları, hücre içinde daha kolay bir şekilde inaktive etmektedirler (Barbato, Bocchetti, Di Biase, & Regad, 2019).

Kanser hücrelerinin ve KKH'lerinin önemli bir özelliği de yüksek telomeraz aktivitesine sahip olmalarıdır. Meme karsinomlarının %90'ından fazlasında yüksek telomeraz aktivasyonu görülmekle birlikte meme kanseri hücrelerinin telomer uzunluğu, normal hücrelerdeki telomerlere göre daha kısadır (Herbert et al., 2001).

Meme kanserindeki yüksek telomeraz aktivitesi, tümör agresifliği ile pozitif bir korelasyon göstermektedir ve literatürde meme kanseri hastalarında görülen yüksek hTERT mRNA seviyesinin kanserin agresifliği ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Bièche et al., 2000; Clark, Osborne, Levitt, Wu, & Kim, 1997; Hoos et al., 1998; Roos et al., 1998). hTERT'in kanonik olmayan işlevleri, meme kanseri hücrelerinin otofaji, EMT, hücre döngüsü, apoptoz, yaşlılık, migrasyon süreçlerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (R. Yang et al., 2023).

Kısa telomer uzunluğu, kanser hücrelerinin hızlı bölünme oranı, telomeraz enziminin somatik hücrelerde zayıf şekilde eksprese edilmesi, kanser hücrelerinin %85'inin telomeraz eksprese ederek telomer uzunluğunu koruması, meme kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanserin tedavisinde telomeraz inhibisyonu yöntemini kullanmanın spesifik olarak tümörleri hedeflemek için kullanılabilir bir tedavi seçeneği olduğunu düşündürmektedir (Jaiswal & Yadava, 2020; Mustafa, 2024).

Meme kanserinde ve MKKH'nde görülen yüksek telomeraz aktivitesi çeşitli yollarla inhibe edilmiş ve bu durumun meme kanseri ve MKKH'nin tümörojenik davranışlarını baskıladığı rapor edilmiştir (Aboelela et al., 2020; Armando et al., 2022; Cassar et al., 2017; Cerone et al., 2006; Doğan et al., 2019; Joseph et al., 2010; Koziel & Herbert, 2015; Kusoglu et al., 2020; Mazloumi et al., 2023; Rao et al., 2016).

Çalışmamızda kullanılan telomeraz inhibitörü BIBR1532, telomerazın TERT alt birimine bağlanmakta ve rutin olarak kullanılmaktadır (Bryan et al., 2015). Shi ve ark. yaptığı çalışmada MCF-7 hücrelerinde BIBR1532'nin 48. Saat için IC<sub>50</sub> değeri 10.4 µM bulunmuştur ancak çalışmada MKKH için BIBR1532'nin herhangi bir IC<sub>50</sub> değeri yoktur (Y. Shi et al., 2015). Doğan ve ark. yaptığı çalışmada MCF-10A hücrelerinde 48 saat için BIBR1532 IC<sub>50</sub> değeri 29.07 µM, MCF-7 hücrelerinde 48 saat için BIBR1532 IC<sub>50</sub> değeri 34.59 µM, MKKH'nde 48 saat için BIBR1532 IC<sub>50</sub> değeri 29.91 µM olarak bulunmuş ve bu değerler çalışmamızda kullanılmıştır (Doğan et al., 2019). Literatüre göz attığımızda BIBR1532'nin MCF-7 ve MKKH'nde apoptozu indüklediği ve bu hücrelerde hücre döngüsünün G2/M fazında durmasını artırdığı bildirilmiştir. Ancak BIBR1532, MCF-10 hücrelerinde apoptoz ve hücre döngüsü üzerine anlamlı bir değişikliğe neden olmamaktadır (Doğan et al., 2019). MCF-7 hücrelerinde BIBR1532'nin paklitaksel ile kombinasyonunun ise bu hücrelerde hücre döngüsünü S fazında durdurduğu rapor edilmiştir (Y. Shi et al., 2015). BIBR1532, MKKH'nde küre oluşumunu ve migrasyonu azaltmakta, EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Kusoglu et al., 2020).

Calin ve ark. 2002 yılında kronik lenfositik lösemide kritik bir bölge olan 13q14 bölgesindeki miR-15 ve miR-16'nın silinmesinin kanserle ilişkili olduklarını keşfetmeleri, kanser araştırmalarında miRNA'ları hedef alan çalışmaların önünü açmıştır (Calin et al., 2002). O zamanda beri yapılan çalışmalar neticesinde miRNA'ların kanserde onkojenik ya da tümör baskılayıcı rol oynadığı bulunmuştur. Kanser hücreleri, düzensiz miRNA ekspresyonu göstermektedir ve miRNA'lar, kanser hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozunu, metastazını, ilaç direncini, epigenetik süreçlerini ve anjiyogenezini düzenlemektedir (Acunzo, Romano, Wernicke, & Croce, 2015; Kisseljov, 2014; Nana-Sinkam & Croce, 2014).

Kanser gelişimine katkıda bulunan, onkomiR olarak adlandırılan belirli miRNA'lar bulunmaktadır. miR-9, kanser hücrelerinde anjiyogenez sürecini desteklerken miR-155 ve miR-375 kanser hücrelerinin proliferasyonunu desteklemektedir. miR-373, miR-182, miR-10b ve miR-520c, kanser hücrelerinde invazyon mekanizmaları üzerinde onkojenik roller oynamaktadır. miR-10b, *twist-related protein 1 (TWIST1)* hedef geni vasıtasıyla meme kanseri invazyonunu desteklemektedir. miR-22, miR-

181a, miR-221 ve miR-222, kanser hücrelerinin EMT mekanizmasını destekleyici onkomiR'lerdir (Sidorova et al., 2023).

Tümör baskılayıcı miRNA'lar, kanser süreçlerini ve davranışlarını inhibe eden miRNA'lardır. En önemli tümör baskılayıcı miRNA'lar, let-7 ailesidir. Let-7 ailesi, kanserde hücre göçünü ve istilayı inhibe etmektedir. Meme kanserinde, let-7 ailesinin, H-RAS ve HGMA2 aktivitesini baskılamaktadır. miR-200 ailesi de kanserde, önemli bir tümör baskılayıcı miRNA ailesidir. ZEB1 ve ZEB2 genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek, kanserde EMT sürecini baskılamaktadır. Kanseri hücrelerinde ekspresyonu azaldığını bilinen miR-145, kanserde anjiyogenez ve tümör büyümesini inhibe etmektedir (Sidorova et al., 2023)

Meme kanserinde ve MKKH'nde de miRNA'ların tümör baskılayıcı ya da onkojenik önemli rolleri bulunmaktadır. Bu hücrelerde tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunu artırmak ve onkojenik miRNA'ların ekspresyonunu azaltmak için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız telomeraz inhibitörü BIBR1532'nin NB4 lösemi hücrelerinde miRNA profilini önemli ölçüde değiştirdiği rapor edilmiştir. Bu miRNA'lar arasında let-7, miR-125a-5p, miR-21, miR-125b, miR-127-5p, miR-9, miR-10b, miR-150, miR-146b, miR-146a, miR-183, miR-184, miR-23b, miR-203, miR-218, miR-222, miR-29b gibi önemli miRNA'lar bulunmaktadır (Pourbagheri-Sigaroodi et al., 2019). Bu çalışma BIBR1532'nin miRNA ile ilişkisinin olduğu tek literatür çalışmasıdır. BIBR1532'nin meme kanseri hücrelerinde ve MKKH'nde miRNA profili üzerine etkileri bilinmemektedir. Bu durum çalışmamızın özgün değerini artıran çok önemli bir unsurdur.

Çalışmamızda BIBR1532 uygulanan MCF-10A hücrelerinde miRNA profili üzerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Çalışmamızda BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücrelerinde tümör baskılayıcı rol oynayan let-7e-5p, miR-10a-5p ve miR-126-5p ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur. Bu hücrelerde let-7e-5p ekspresyonu 12.01 kat, miR-10a-5p ekspresyonu 2.22 kat, miR-126-5p ekspresyonu 2.38 kat artmıştır. Buna karşılık BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücrelerinde onkojenik rol oynayan miR-21-5p ve miR-155-5p ekspresyonlarının ise

azaldığı bulunmuştur. Bu hücrelerde miR-21-5p ekspresyonu 7.62 kat, miR-155-5p ekspresyonu 7.16 kat azalmıştır.

Çalışmamızda BIBR1532 uygulanan MKKH'nde BIBR1532'nin tümör baskılayıcı miRNA'lar üzerine etkisi gözlemlenmezken onkojenik miRNA'lar miR-21-5p, miR-221-5p ve miR-155-5p ekspresyonlarını azalttığı bulunmuştur. Bu hücrelerde miR-21-5p ekspresyonu 8.62 kat, miR-221-5p ekspresyonu 1.32 kat, miR-155-5p ekspresyonu 2.54 kat azalmıştır.

Let-7 ailesi, kanserde tümör baskılayıcı rol oynayan önemli bir miRNA ailesidir. 12 üyeden oluşan Let-7 ailesinin kanserde azalan ekspresyonu, kanserin yüksek agresifliği ile ilişkilidir (Su, Chen, Johansson, & Kuo, 2012). Çalışmamızda kullandığımız MCF-7 hücre hattı, hormon reseptörleri ekspresyonu gösteren bir hücre hattıdır. Tüm Let-7 ailesi üyesi olan miRNA'lar, ER- $\alpha$  pozitif meme kanseri dokularında aşağı regüle olma eğilimindedirler. ER ekspresyonu ile Let-7 ailesi miRNA'larının ekspresyonu arasında ters bir korelasyon bulunmaktadır (Y. Zhao et al., 2011). Let-7 üyeleri, KKH'nin koloni oluşturma, farklılaşma ve rejeneratif özellikleri baskılamaktadır (Ma, Shen, Wicha, & Luo, 2021). Let-7 üyeleri, RAS ve HMGA2'yi hedefleyerek meme kanseri hücrelerinin kendini yenileme ve tümör oluşturma yeteneklerini önemli ölçüde baskılamaktadır (Thammaiah & Jayaram, 2016). Let-7e-5p, Let-7 ailesinin 12 üyesinden biridir. Let-7e-5p, ekspresyonu, meme kanseri hastalarında tümör evresi arttıkça korele ve anlamlı bir şekilde azalmaktadır. Bu durum meme kanseri hastalarında, tümör evresini belirlemek için let-7e-5p'nin güvenilir bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir (Oztemur et al., 2015). Let-7e-5p, meme kanserinde sadece belirteç görevi görmemektedir. Doksorubisine dirençli MCF-7 hücrelerinde, let-7e-5p ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı bilinmektedir ve meme kanserindeki direnç mekanizmasında etkili olabileceği düşünülmektedir (Lv et al., 2014). Let-7e-5p'nin azalan ekspresyonu, MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsünün ilerlemesini desteklemektedir. Bu hücrelerde let-7e-5p'nin hedef genlerinden biri hücre döngüsünde önemli rolü olan *Siklin D*'dir. *Siklin D* ve let-7e-5p ekspresyonları arasında negatif bir korelasyon bulunmaktadır. Artan let-7e-5p ekspresyonu, MCF-7 hücrelerinde *Siklin D* seviyesini azaltarak hücre döngüsü durmasını indüklemektedir (Mitra, Das, Huynh, & Jones, 2011).

Çalışmamız sonucunda BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücrelerinde let-7e-5p ekspresyonu 12.01 kat arttığı bulunmuştur. Literatür bilgilerini göz önüne aldığımızda meme kanserinde tümör baskılayıcı rol oynayan let-7e-5p'nin MCF-7 hücrelerinde BIBR1532 uygulanması ile ekspresyonunun artması meme kanserinin tümörojenik davranışları baskılamak ve direnç mekanizmasının üstesinde gelmek için iyi bir yöntem olabileceğini düşündürmektedir.

miR-10a, meme kanserinde tümör baskılayıcı rol oynamaktadır. Ke ve ark. yaptığı çalışmada MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde miR-10a ekspresyonunun azaldığını bulmuşlardır. miR-10a'nın bu hücre hatlarında PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağını hedefleyerek migrasyon ve proliferasyon süreçlerini inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediğini belirlemişlerdir (Ke & Lou, 2017). Zhang ve ark. yaptığı çalışmada miR-10a-5p'nin MCF-7 hücre hattında aşağı regüle edildiğini ve bu hücrelerde proliferasyonu inhibe ettiğini desteklemişlerdir. Çalışmalarında S-equol kullanarak MCF-7 hücrelerinde miR-10a-5p ekspresyonunu artırmışlardır. Artan miR-10a-5p ekspresyonu MCF-7 hücrelerinde PI3K p110a ekspresyonunu ve Akt proteininin aktivasyonunu inhibe ederek apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonunun artırarak apoptozu indüklemiştir (J. Zhang et al., 2019).  $\beta$ -SDG ile ekspresyonu artırılan miR-10a-5p, MCF-7 hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağını baskılayarak apoptozu indüklemiştir (Xu et al., 2018). Khan ve ark. insan örnekleri ile yaptıkları çalışmada da miR-10a ekspresyonunun meme kanserinde azaldığını bulmuşlardır. İnsan örneklerinde yapılan çalışmanın devamında meme kanserinde tümör baskılayıcı rolleri olan *RAR $\beta$*  ve *THRA* genleri ile miR-10a ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür (Khan et al., 2015). Tamoksifen ile tedavi edilen ER+ erken evre meme kanseri hastalarında azalan miR-10a ve miR-126 ekspresyonu, hastalığın nüksüz geçen süresi ile anlamlı bir şekilde koreledir. Bu durum meme kanserinde nüks için belirteç olarak kullanılma potansiyellerini göstermektedir (Hoppe et al., 2013).

Çalışmamızda BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücre hattında miR-10a-5p ekspresyonunun 2.22 kat arttığı bulunmuştur. Tümör baskılayıcı olan miR-10a-5p'nin MCF-7 hücrelerinde BIBR1532 uygulanmasından sonra artışı ajanımızın meme

kanseri tedavisinde tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunu artırmak için etkili olduğunu desteklemektedir.

miR-126, meme kanseri hastalarında ve meme kanseri hücre hatlarında aşağı regüle edilmektedir (C. Z. Wang, Yuan, & Li, 2015). TNBC dokularında azalan miR-126-5p ekspresyonunun tümör boyutu ile ilişkilidir (Paszek et al., 2017). Artan miR-126 ekspresyonu, meme kanseri hücrelerinde invazyonu önemli ölçüde inhibe etmekte ve metastaz sürecinde rol oynayan ADAM9 proteinin seviyesini düşürmektedir (C. Z. Wang et al., 2015). Alhasan'ın MCF-7 hücrelerinde yaptığı çalışma, artan miR-126 ekspresyonunun bu hücrelerde proliferasyonu azalttığını ve hücre döngüsü durmasını tetiklediğini rapor etmiştir (Alhasan, 2019). miR-126-5p ekspresyonunun MCF-7 hücrelerinde migrasyonu azalttığı da rapor edilmiştir (Miao, Lu, Fan, & Sun, 2020).

Çalışmamızda BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücrelerinde miR-126-5p ekspresyonunun 2.38 kat arttığı bulunmuştur. Meme kanserinde tümör baskılayıcı rol oynayan miR-126-5p ekspresyonunun artması, BIBR1532'nin meme kanseri tedavisindeki potansiyel rolünü düşündürmektedir.

miR-133a-3p, meme kanseri hücrelerinde normal hücelere göre aşağı regüle edilmektedir. Agresif meme kanseri hücrelerinde de agresif olmayan ya da daha az agresif olan meme kanseri hücrelerine göre daha az ifade edilmektedir. miR-133a-3p ifadesinin susturulması meme kanseri metastazını, proliferasyonunu ve köklülüğünü teşvik etmektedir (W. Shi et al., 2019). Garcíá-Magallanes ve ark., meme kanseri olan ve olmayan kadın hastalardan alınan serum örneklerinde miR-133a-3p ekspresyonunu incelemiştir. Meme kanseri hastalarında ER veya PR varlığında ve HER2 yokluğunda miR-133a-3p ekspresyonu anlamlı bir şekilde azalmıştır. Meme kanseri teşhisi alan hastaların %80'inde ER veya PR pozitif, %70'inde ise HER2 negatif olması miR-133a-3p ekspresyonunun meme kanserindeki önemini göstermektedir (Garcíá-Magallanes et al., 2020). Meme kanseri hücrelerinde puerarinin ile birlikte miR-133a-3p tedavisi uygulandığında meme kanseri hücrelerinin hücre canlılığı azalırken bu hücrelerdeki apoptoz artmıştır. Bu etki sadece miR-133a-3p mimikleri verildiği meme kanseri hücrelerinde de görülmüştür ancak puerarinin ile birlikte

verilen miR-133a-3p mimikleri daha etkili olmuştur (Z. Li, Xu, Ren, Xu, & Chen, 2019).

Çalışmamızda BIBR1532 kullanılan MCF-7 hücre hattında tümör baskılayıcı rol oynayan miR-133a-3p ekspresyonu 1.66 kat artmıştır. Çalışmamızda telomeraz inhibitörü BIBR1532'nin MCF-7 hücrelerinde önemli rolleri bulunan 4 tümör baskılayıcı miRNA (let-7e-5p, miR-10a-5p, miR-126-5p ve miR-133a-3p) ekspresyonunu artırması umut vericidir.

miR-21-5p, tüm kanserlerde bilinen onkojenik bir miRNA'dır. miR-21-5p, tüm meme kanseri alt tiplerinde en sık ekspresyonu gözlemlenen miRNA'dır (Sökilde et al., 2019). miR-21-5p, meme kanseri hastalarında, dokularında ve dirençli meme kanseri hücrelerinde yukarı regüle edilmektedir. (Liu et al., 2021; Saffari, Momeni, Ramezani, Ansari, & Moghbelinejad, 2023; Tao, Wu, & Zhang, 2019; Y. Zhang et al., 2022). Plazma eksozomal miR-21-5p, meme kanseri hastalarında anlamlı bir şekilde artmaktadır ve sağlıklı bireyler ile meme kanseri hastalarını etkili bir şekilde ayırt edebilmektedir (Liu et al., 2021). miR-21-5p'in aşırı ekspresyonu, radyasyona dirençli meme kanseri hücrelerinin hayatta kalma oranını artırırken apoptoz oranlarını azaltmaktadır (Saffari et al., 2023). miR-21-5p'nin meme kanserindeki onkojenik rolünden ötürü çeşitli ajanlar ve moleküller ile susturulması ile meme kanserindeki rolüne ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan biri Wang ve ark. Long non-coding RNA CASC7 kullanarak MCF-7 hücrelerinde miR-21-5p'nin susturulmasıdır. Meme kanserinde tümör baskılayıcı rol oynayan LncRNA CASC7, miR-21-5p ekspresyonunu aşağı regüle ederek malign davranışların baskılanmasına yardımcı olmaktadır (G. Wang, Duan, Liu, & Wei, 2021). miR-21-5p'nin susturulması ile paklitaksel dirençli meme kanseri hücrelerinde direnç hafifletilmekte ve in vivo olarak tümör büyümesi inhibe edilmektedir (Tao et al., 2019). miR-21-5p inhibitörü ve reversin verilen meme kanseri hücrelerinde apoptoz artarken hücre proliferasyonu ve migrasyonu baskılanmaktadır (Y. Zhang et al., 2022). Meme kanseri hücrelerine anti-miR-21-5p verildiğinde ise bu hücrelerde glikoz alımı, laktat üretimi ve ATP seviyeleri önemli ölçüde artmaktadır (N. Li et al., 2022).

miR-21-5p, MKKH'nde de onkojenik rol oynayarak bu hücrelerin köklülük özelliklerini desteklemektedir. miR-21-5p'nin aşırı ekspresyonu, MKKH'nde OCT3 ve OCT4 ekspresyonunu arttırmaktadır. Ek olarak, MKKH'nde miR-21-5p ifadesi nedeniyle artan SNAI1 ve N-cadherin ekspresyonları nedeniyle EMT desteklenmektedir (Babadag, Altundag-Erdogan, Akkaya-Ulum, & Çelebi-Saltik, 2024).

Çalışmamızda BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücrelerinde miR-21-5p ekspresyonunun 7.62 kat, BIBR1532 uygulanan MKKH'nde ise 8.62 kat azaldığı bulunmuştur. Hem MCF-7 hücrelerinde hem de MKKH'nde BIBR1532'nin onkojenik miRNA miR-21-5p ifadesini azaltmasının önemli bir sonuç olduğunu düşünmekteyiz.

miR-155-5p de miR-21-5p gibi meme kanserinde onkojenik davranan bir miRNA'dır. Meme kanserinde yukarı regüle edilen miR-155-5p, olumsuz prognostik özelliklerle ilişkilidir. Yüksek miR-155-5p seviyesine sahip meme kanseri hastaları, bazal benzeri alt tipler ya da HER2 ile zenginleştirilmiş alt tipler, düşük miR-155-5p seviyesine sahip meme kanseri hastaları ise Luminal A ve Luminal B alt tiplerle karakterize edilmektedir (Pasculli et al., 2020). miR-155-5p, meme kanseri hücrelerinde invazyon ve hücre canlılığını artırırken paklitaksel kaynaklı apoptoz direncini de indüklemektedir (Y. Li et al., 2021). Ancak paklitaksel direncine sahip MCF-7 hücrelerinde NT21PM kullanılarak miR-155-5p'nin aşağı regüle edildiği ve bunun hücreleri paklitaksele duyarlı hale getirdiği rapor edilmiştir (Y. Wang et al., 2018). TNBC hücrelerinde ise miR-155-5p, bufalin kaynaklı apoptozu azaltmakta ve hücrelerin proliferasyonunu desteklemektedir (Q. Wang et al., 2016).

Abtin ve ark. oleuropein kullanarak meme kanserinde hem miR-21 hem de miR-155 ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmışlardır (Abtin et al., 2018). Çalışmamızda kullandığımız BIBR1532 ajanı da MCF-7 hücrelerinde aynı anda hem miR-21 hem de miR-155 ekspresyonu azaltmıştır. BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücrelerinde miR-21-5p ekspresyonu 7.62 kat, miR-155-5p ekspresyonu ise 7.16 kat azalmıştır. Bizim çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde bu iki onkojenik miRNA'ların ekspresyonunun

azalmasına ek olarak 4 tümör baskılayıcı miRNA ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.

miR-155-5p ekspresyonu, kök benzeri özelliklerle yakından ilişkilidir ve kanser kök hücresi oluşumunu destekleyebilmektedir. miR-155-5p'nin aşırı ekspresyonu, MKKH'nde de görülmektedir. Yüksek miR-155-5p ekspresyonu meme kanseri hücrelerinin köklülüğünü CYLD ve Sharp-1'e bağlanarak desteklemektedir. miR-155-5p'nin susturulması meme hücrelerinin kök benzeri özelliklerini baskılamaktadır (Han, 2023; Zuo et al., 2018).

Çalışmamızda BIBR1532 uygulanan MKKH'nde miR-155-5p ekspresyonunun 2.54 kat azaldığı bulunmuştur. miR-155-5p ekspresyonunun hem BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücrelerinde hem de BIBR1532 uygulanan MKKH'nde azalması önemli ve dikkat çekici bir bulgudur.

miR-221-5p, meme kanseri hücrelerinde ve kanser ile ilişkili fibroblastlarda (CAF) yukarı regüle edilmektedir (Niu, Zhang, & Ma, 2019; L. Zhao et al., 2012). Meme kanseri hastalarında yüksek miR-221-5p ekspresyonu, kötü prognoz ve uzak lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilmiştir. miR-221-5p'nin meme kanseri hücrelerinde susturulması ise proliferasyon, invazyon ve migrasyon süreçlerini baskılamaktadır (Niu et al., 2019). MKKH'nde yukarı regüle edilen miR-221-5p, bu hücrelerde mammosfer sayısını ve önemli kök hücre belirteçleri Nanog, OCT3, OCT4 ekspresyonunu artırmaktadır (Roscigno et al., 2016). Li ve ark. hem in vitro hem de in vivo yaptıkları deneylerde miR-221'in artan ifadesi ve PTEN yıkımının MCF-7 hücrelerinde CD44 + / CD24 - MKKH'in oranını zenginleştirdiğini, mammosfer oluşturma yeteneğini ve ALDH1 ekspresyonunun önemli ölçüde artırdığını bildirmişlerdir (B. Li et al., 2017).

Çalışmamızda BIBR1532 uygulanan MKKH'nde miR-221-5p ifadesi 1.34 kat azaldığı bulunmuştur.

## Sonuç ve Öneriler

Bu yüksek lisans tezinde MCF-10A, MCF-7 ve MKKH hatları kullanarak telomeraz inhibitörü BIBR1532'nin bu hücrelerdeki miRNA profili üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için 12 miRNA'dan oluşan plaklar hazırlanmıştır. Belirlenen hücelere BIBR1532 uygulaması yapılmış ve ekspresyon çalışmaları ile BIBR1532'nin miRNA profili üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

MCF-10A hücrelerinde BIBR1532, mikroRNA profili üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Bunun sebebi şu şekilde açıklanabilir: MCF-10 hücre hattı, sağlıklı meme hücreleridir. Sağlıklı hücrelerde telomeraz aktivitesi yok denecek kadar azdır. BIBR1532 ise nükleosidik olmayan küçük molekülü bir telomeraz inhibitörüdür. Bu nedenle bu hücrelerde etkinliğinin olmaması şaşırtıcı değildir ve literatür çalışmalarıyla uyumaktadır.

MCF-7 hücre hattı, hormon reseptörleri ekspresyonu gösteren meme kanseri hücreleridir. BIBR1532 uyguladığımız MCF-7 hücrelerinde 4 tümör baskılayıcı miRNA'nın ekspresyonunun arttığını, 2 onkojenik miRNA'nın ekspresyonunun azaldığını belirledik.

MKKH'nde ise BIBR1532 uygulanması, bu hücrelerde tümör baskılayıcı miRNA'ları etkilemezken 3 onkojenik miRNA'nın ekspresyonunu azaltmıştır.

Onkojenik miRNA'lar miR-21-5p ve miR-155-5p'nin hem MCF-7 hem de MKKH'nde ekspresyonları azalmıştır. Bu durum, BIBR1532'nin hem meme kanseri hem de MKKH'nde onkojenik miRNA'ları baskılamak için kullanılabileceğini gösterdiği için çok değerlidir.

Bu bulguları göz önünde bulundurarak “Telomeraz inhibitörü BIBR1532, meme kanseri ve meme kanseri kök hücrelerinde mikroRNA profilini değiştirir.” hipotezimin

desteklendiği görülmektedir. Bulgular ve tartışma kısmında BIBR15322'nin meme kanseri ve MKKH'ndeki miRNA değişiminin nasıl olduğu da detaylıca anlatılmıştır.

Ayrıca, BIBR1532'nin MCF-7 hücrelerinde hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik miRNA ekspresyonu üzerinde anlamlı değişiklikler yapması, sadece BIBR1532 kullanarak meme kanserinde hem telomeraz inhibisyonu hem onkojenik miRNA inhibisyonu hem de tümör baskılayıcı miRNA ekspresyonunun artırılmasının aynı anda yapılabileceğini göstermektedir. Bu durumun gelecekte meme kanseri tedavisi ile ilgili yapılacak çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak bu yüksek lisans tezi ile telomeraz inhibitörü BIBR1532'nin meme kanseri ve meme kanseri kök hücrelerinde miRNA profili üzerine etkilerini belirleyerek literatürdeki eksikliği kapattığımızı ve bu alandaki çalışmalara öncülük edeceğimizi dşnmekteyiz.

## Kaynaklar

- Aboeela, S., Ashmawy, A., Shaarawy, S., El-Hefny, M., & Medhat, A. (2020). Telomerase as a possible candidate targeting therapy in different breast cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.8.2243>
- Abtin, M., Alivand, M. R., Khaniani, M. S., Bastami, M., Zaeifzadeh, M., & Derakhshan, S. M. (2018). Simultaneous downregulation of miR-21 and miR-155 through oleuropein for breast cancer prevention and therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.26754>
- Acunzo, M., Romano, G., Wernicke, D., & Croce, C. M. (2015). MicroRNA and cancer - A brief overview. *Advances in Biological Regulation*. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.09.013>
- Ajmeera, D., & Ajumeera, R. (2024). Drug repurposing: A novel strategy to target cancer stem cells and therapeutic resistance. *Genes and Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.12.013>
- Alhasan, L. (2019). MiR-126 modulates angiogenesis in breast cancer by targeting VEGF-A mRNA. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.1.193>
- Armando, R., Cabrera, M., Vilarullo, R., Chinestrada, P., Maggio, J., Paderta, C., ... Gómez, D. M. (2022). In vitro characterization and rational analog design of a novel inhibitor of telomerase assembly in MDA MB 231 breast cancer cell line. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8403>
- Arndt, G. M., & MacKenzie, K. L. (2016). New prospects for targeting telomerase beyond the telomere. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.55>
- Babadag, S., Altundag-Erdogan, Ö., Akkaya-Ulum, Y. Z., & Çelebi-Saltik, B. (2024). The role of telocytes and miR-21-5p in tumorigenicity and metastasis of breast cancer stem cells. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09352-5>

- Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P., & Li, Y. (2018). Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance. *Cancer Treatment Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.07.004>
- Barbato, L., Bocchetti, M., Di Biase, A., & Regad, T. (2019). Cancer stem cells and targeting strategies. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells8080926>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., ... Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>
- Bernardes de Jesus, B., & Blasco, M. A. (2013). Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.007>
- Bertoli, G., Cava, C., & Castiglioni, I. (2015). Micrnas: New biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. <https://doi.org/10.7150/thno.11543>
- Bertram, J. S. (2001). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 167–223. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299700000078?via%3Dihub#aep-section-id15>
- Bièche, I., Noguès, C., Paradis, V., Olivi, M., Bedossa, P., Lidereau, R., & Vidaud, M. (2000). Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clinical Cancer Research*.
- Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to Stem Cell Therapy. *Journal of Cardiovascular Nursing*. <https://doi.org/10.1097/JCN.0b013e318197a6a5>
- Bryan, C., Rice, C., Hoffman, H., Harkisheimer, M., Sweeney, M., & Skordalakes, E. (2015). Structural basis of telomerase inhibition by the highly specific BIBR1532. *Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.08.006>

- Butti, R., Gunasekaran, V. P., Kumar, T. V. S., Banerjee, P., & Kundu, G. C. (2019). Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.001>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., ... Croce, C. M. (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*. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Cassar, L., Nicholls, C., Pinto, A. R., Chen, R., Wang, L., Li, H., & Liu, J. P. (2017). TGF-beta receptor mediated telomerase inhibition, telomere shortening and breast cancer cell senescence. *Protein and Cell*. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0322-1>
- Cerone, M. A., Londoño-Vallejo, J. A., & Autexier, C. (2006). Telomerase inhibition enhances the response to anticancer drug treatment in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0033>
- Chen, S., Cao, Z., Prettnner, K., Kuhn, M., Yang, J., Jiao, L., ... Wang, C. (2023). Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories from 2020 to 2050. *JAMA Oncology*. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2022.7826>
- Clark, G. M., Osborne, C. K., Levitt, D., Wu, F., & Kim, N. W. (1997). Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. <https://doi.org/10.1093/jnci/89.24.1874>
- Dogan, F., & Biray Avci, C. (2018). Correlation between telomerase and mTOR pathway in cancer stem cells. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.072>
- Doğan, F., Özateş, N. P., Bağca, B. G., Abbaszadeh, Z., Söğütü, F., Gasımlı, R., ... Biray Avci, Ç. (2019). Investigation of the effect of telomerase inhibitor BIBR1532 on breast cancer and breast cancer stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.27089>

- Drevytska, T. I., Nagibin, V. S., Gurianova, V. L., Kedlyan, V. R., Moibenko, A. A., & Dosenko, V. E. (2014). Silencing of TERT decreases levels of miR-1, miR-21, miR-29a and miR-208a in cardiomyocytes. *Cell Biochemistry and Function*. <https://doi.org/10.1002/cbf.3051>
- El-Badawy, A., Ghoneim, N. I., Nasr, M. A., Elkhenany, H., Ahmed, T. A., Ahmed, S. M., & El-Badri, N. (2018). Telomerase reverse transcriptase coordinates with the epithelial-to-mesenchymal transition through a feedback loop to define properties of breast cancer stem cells. *Biology Open*. <https://doi.org/10.1242/bio.034181>
- Ellingsen, E. B., Mangsbo, S. M., Hovig, E., & Gaudernack, G. (2021). Telomerase as a Target for Therapeutic Cancer Vaccines and Considerations for Optimizing Their Clinical Potential. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.682492>
- Gallardo-Pérez, J. C., de Guevara, A. A. L., Marín-Hernández, A., Moreno-Sánchez, R., & Rodríguez-Enríquez, S. (2017). HPI/AMF inhibition halts the development of the aggressive phenotype of breast cancer stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.06.015>
- García-Magallanes, N., Beltran-Ontiveros, S. A., Leal-León, E. A., Luque-Ortega, F., Romero-Quintana, J. G., Osuna-Ramirez, I., ... Arámbula-Meraz, E. (2020). Underexpression of circulating miR-145-5p and miR-133a-3p are associated with breast cancer and immunohistochemical markers. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. [https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_1111\\_19](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_1111_19)
- González-Moles, M. Á., Moya-González, E., García-Ferrera, A., Nieto-Casado, P., & Ramos-García, P. (2022). Prognostic and Clinicopathological Significance of Telomerase Reverse Transcriptase Upregulation in Oral Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers14153673>
- Hajarnis, S., Lakhia, R., & Patel, V. (2015). MicroRNAs and Polycystic Kidney Disease. In *Polycystic Kidney Disease*. <https://doi.org/10.15586/codon.pkd.2015.ch13>
- Han, J. (2023). 49P MiR-155 promotes breast cancer progression by upregulating cancer stemness. *ESMO Open*. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2023.101859>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 50–70. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- He, Z., Chen, Z., Tan, M., Elingarami, S., Liu, Y., Li, T., ... Li, W. (2020). A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues. *Cell Proliferation*. <https://doi.org/10.1111/cpr.12822>
- Herbert, B. S., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2001). Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Research*. <https://doi.org/10.1186/bcr288>
- Ho, P. T. B., Clark, I. M., & Le, L. T. T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms23137167>
- Hoos, A., Hepp, H. H., Kaul, S., Ahlert, T., Bastert, G., & Wallwiener, D. (1998). Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *International Journal of Cancer*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980220\)79:1<8::AID-IJC2>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980220)79:1<8::AID-IJC2>3.0.CO;2-5)
- Hoppe, R., Achinger-Kawecka, J., Winter, S., Fritz, P., Lo, W. Y., 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*. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.07.145>
- Jaiswal, R. K., & Yadava, P. K. (2020). Assessment of telomerase as drug target in breast cancer. *Journal of Biosciences*. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00045-2>
- Johnson, K. S., Conant, E. F., & Soo, M. S. (2021). Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists. *Journal of Breast Imaging*. <https://doi.org/10.1093/jbi/wbaa110>
- Joseph, I., Tressler, R., Bassett, E., Harley, C., Buseman, C. M., Pattamatta, P., ... Go, N. F. (2010). The telomerase inhibitor imetelstat depletes cancer stem cells in breast and pancreatic cancer cell lines. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0233>

- Judasz, E., Lisiak, N., Kopczyński, P., Taube, M., & Rubiś, B. (2022). The Role of Telomerase in Breast Cancer's Response to Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms232112844>
- Kamal, N., Ilowefah, M. A., Hilles, A. R., Anua, N. A., Awini, T., Alshwyeh, H. A., ... Mediani, A. (2022). Genesis and Mechanism of Some Cancer Types and an Overview on the Role of Diet and Nutrition in Cancer Prevention. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules27061794>
- Ke, K., & Lou, T. (2017). MicroRNA-10a suppresses breast cancer progression via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6930>
- Khan, S., Wall, D., Curran, C., Newell, J., Kerin, M. J., & Dwyer, R. M. (2015). MicroRNA-10a is reduced in breast cancer and regulated in part through retinoic acid. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1374-y>
- Kisseljov, F. L. (2014). MicroRNAs and cancer. *Molecular Biology*, 48(2), 197–206. <https://doi.org/10.1134/S0026893314020083>
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. <https://doi.org/10.1159/000345615>
- Kozziel, J. E., & Herbert, B. S. (2015). The telomerase inhibitor imetelstat alone, and in combination with trastuzumab, decreases the cancer stem cell population and self-renewal of HER2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3270-1>
- Kusoglu, A., Goker Bagca, B., Ozates Ay, N. P., Gunduz, C., & Biray Avci, C. (2020). Telomerase inhibition regulates EMT mechanism in breast cancer stem cells. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145001>
- Lassmann, T., Maida, Y., Tomaru, Y., Yasukawa, M., Ando, Y., Kojima, M., ... Masutomi, K. (2015). Telomerase reverse transcriptase regulates microRNAs. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms16011192>

- Li, B., Lu, Y., Yu, L., Han, X., Wang, H., Mao, J., ... Song, B. (2017). miR-221/222 promote cancer stem-like cell properties and tumor growth of breast cancer via targeting PTEN and sustained Akt/NF- $\kappa$ B/COX-2 activation. *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.08.014>
- Li, N., Wang, X., Sun, J., Liu, Y., Han, A., Lin, Z., & Yang, Y. (2022). miR-21-5p/Tiam1-mediated glycolysis reprogramming drives breast cancer progression via enhancing PFKL stabilization. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgac039>
- Li, Y., Zhang, L., Dong, Z., Xu, H., Yan, L., Wang, W., ... Chen, C. (2021). MicroRNA-155-5p promotes tumor progression and contributes to paclitaxel resistance via TP53INP1 in human breast cancer. *Pathology Research and Practice*. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153405>
- Li, Z., Xu, W., Ren, X., Xu, J., & Chen, J. (2019). Puerarin promotes DUSP1 expression by regulating miR-133a-3p in breast cancer. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9682>
- Lipinska, N., Romaniuk, A., Paszel-Jaworska, A., Toton, E., Kopczynski, P., & Rubis, B. (2017). Telomerase and drug resistance in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2573-2>
- Liu, M., Mo, F., Song, X., He, Y., Yuan, Y., Yan, J., ... Zhang, S. (2021). Exosomal hsa-miR-21-5p is a biomarker for breast cancer diagnosis. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.12147>
- Luque-Bolivar, A., Pérez-Mora, E., Villegas, V. E., & Rondón-Lagos, M. (2020). Resistance and overcoming resistance in breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S270799>
- Lv, J., Xia, K., Xu, P., Sun, E., Ma, J., Gao, S., ... Xie, H. (2014). miRNA expression patterns in chemoresistant breast cancer tissues. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.09.011>
- Ma, Y., Shen, N., Wicha, M. S., & Luo, M. (2021). The roles of the let-7 family of micrnas in the regulation of cancer stemness. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells10092415>

- Mazloumi, Z., Rafat, A., Dizaji Asl, K., & Nozad Charoudeh, H. (2023). A combination of telomerase inhibition and NK cell therapy increased breast cancer cell line apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.11.090>
- Miao, Y., Lu, J., Fan, B., & Sun, L. (2020). MicroRNA-126-5p Inhibits the Migration of Breast Cancer Cells by Directly Targeting CNOT7. *Technology in Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1177/1533033820977545>
- Mitra, D., Das, P. M., Huynh, F. C., & Jones, F. E. (2011). Jumonji/ARID1 B (JARID1B) protein promotes breast tumor cell cycle progression through epigenetic repression of MicroRNA let-7e. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.304865>
- Mustafa, Y. F. (2024). Phytomedicine Plus Nutraceutical-based telomerase inhibitors : Renewed hope for cancer therapy. *Phytomedicine Plus*, 4(2), 100537. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2024.100537>
- Nana-Sinkam, S. P., & Croce, C. M. (2014). MicroRNA regulation of tumorigenesis, cancer progression and interpatient heterogeneity: Towards clinical use. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0445-8>
- Niu, X. Y., Zhang, Z. Q., & Ma, P. L. (2019). MiRNA-221-5p promotes breast cancer progression by regulating E-cadherin expression. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201908\\_18738](https://doi.org/10.26355/eurrev_201908_18738)
- Obeagu, E. I., & Obeagu, G. U. (2024). Breast cancer A review of risk factors and diagnosis. *Medicine (Baltimore)*, 103(3). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000036905>
- Oztemur, Y., Bekmez, T., Aydos, A., Yulug, I. G., Bozkurt, B., & Dedeoglu, B. G. (2015). A ranking-based meta-analysis reveals let-7 family as a meta-signature for grade classification in breast cancer. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126837>
- Pascolo, E., Wenz, C., Lingner, J., Huel, N., Priepke, H., Kauffmann, I., ... Schnapp, A. (2002). Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201266200>

- Pasculli, B., Barbano, R., Fontana, A., Biagini, T., Di Viesti, M. P., Rendina, M., ... Parrella, P. (2020). Hsa-miR-155-5p Up-Regulation in Breast Cancer and Its Relevance for Treatment With Poly[ADP-Ribose] Polymerase 1 (PARP-1) Inhibitors. *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01415>
- Paszek, S., Gabło, N., Barnaś, E., Szybka, M., Morawiec, J., Kołacinska, A., & Zawlik, I. (2017). Dysregulation of microRNAs in triple-negative breast cancer. *Ginekologia Polska*. <https://doi.org/10.5603/GP.a2017.0097>
- Pourbagheri-Sigaroodi, A., Bashash, D., Safaroghli-Azar, A., Farshi-Paraasghari, M., Momeny, M., Mansoor, F. N., & Ghaffari, S. H. (2019). Contributory role of microRNAs in anti-cancer effects of small molecule inhibitor of telomerase (BIBR1532) on acute promyelocytic leukemia cell line. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.01.018>
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., ... Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.008>
- Rao, Y., Xiong, W., Liu, H., Jia, C., Zhang, H., Cui, Z., ... Cui, J. (2016). Inhibition of telomerase activity by dominant-negative hTERT retards the growth of breast cancer cells. *Breast Cancer*. <https://doi.org/10.1007/s12282-014-0553-z>
- Roos, G., Nilsson, P., Cajander, S., Nielsen, N. H., Arnerlöv, C., & Landberg, G. (1998). Telomerase activity in relation to p53 status and clinico-pathological parameters in breast cancer. *International Journal of Cancer*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980821\)79:4<343::AID-IJC6>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980821)79:4<343::AID-IJC6>3.0.CO;2-V)
- Roscigno, G., Quintavalle, C., Donnarumma, E., Puoti, I., Diaz-Lagares, A., Iaboni, M., ... Condorelli, G. (2016). MiR-221 promotes stemness of breast cancer cells by targeting DNMT3b. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5979>
- Saffari, F., Momeni, A., Ramezani, M., Ansari, Y., & Moghbelinejad, S. (2023). Metformin Caused Radiosensitivity of Breast Cancer Cells through the Expression Modulation of miR-21-5p/SESNIaxis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 24(11), 3715–3727.

<https://doi.org/10.31557/APJCP.2023.24.11.3715>

- Shi, W., Tang, T., Li, X., Deng, S., Li, R., Wang, Y., ... Pan, Y. (2019). Methylation-mediated silencing of miR-133a-3p promotes breast cancer cell migration and stemness via miR-133a-3p/MAML1/DNMT3A positive feedback loop. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1400-z>
- Shi, Y., Sun, L., Chen, G., Zheng, D., Li, L., & Wei, W. (2015). A combination of the telomerase inhibitor, BIBR1532, and paclitaxel synergistically inhibit cell proliferation in breast cancer cell lines. *Targeted Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s11523-015-0364-y>
- Shimono, Y., Mukohyama, J., Nakamura, S. I., & Minami, H. (2015). MicroRNA regulation of human breast cancer stem cells. *Journal of Clinical Medicine*. <https://doi.org/10.3390/jcm5010002>
- Sidorova, E. A., Zhernov, Y. V., Antsupova, M. A., Khadzhieva, K. R., Izmailova, A. A., Kraskevich, D. A., ... Mitrokhin, O. V. (2023). The Role of Different Types of microRNA in the Pathogenesis of Breast and Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms24031980>
- Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(1), 12–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21820>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Søkilde, R., Persson, H., Ehinger, A., Pirona, A. C., Fernö, M., Hegardt, C., ... Rovira, C. (2019). Refinement of breast cancer molecular classification by miRNA expression profiles. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5887-7>
- Su, J.-L., Chen, P.-S., Johansson, G., & Kuo, M.-L. (2012). Function and Regulation of Let-7 Family microRNAs. *MicroRNA E*. <https://doi.org/10.2174/2211536611201010034>
- Tang, P., & Tse, G. M. (2016). Immunohistochemical surrogates for molecular classification of breast carcinoma: A 2015 update. In *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.5858/arpa.2015-0133-RA>

- Tang, Y., Wang, Y., Kiani, M. F., & Wang, B. (2016). Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.05.012>
- Tao, L., Wu, Y. Q., & Zhang, S. P. (2019). MiR-21-5p enhances the progression and paclitaxel resistance in drug-resistant breast cancer cell lines by targeting PDCD4. *Neoplasma*. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2018\\_181207N930](https://doi.org/10.4149/neo_2018_181207N930)
- Teker, A. G., & Ay, N. P. (2022). Has the cancer-related death trend been changing in Turkey? An evaluation of the period between 2009 and 2019. *Cancer Epidemiology*. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2022.102228>
- Thammaiah, C. K., & Jayaram, S. (2016). Role of let-7 family microRNA in breast cancer. *Non-Coding RNA Research*. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2016.10.003>
- Tian, X., Chen, B., & Liu, X. (2010). Telomere and telomerase as targets for cancer therapy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8633-9>
- Vahidian, F., Mohammadi, H., Ali-Hasanzadeh, M., Derakhshani, A., Mostaan, M., Hemmatzadeh, M., & Baradaran, B. (2019). MicroRNAs and breast cancer stem cells: Potential role in breast cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.27246>
- Wang, C. Z., Yuan, P., & Li, Y. (2015). miR-126 regulated breast cancer cell invasion by targeting ADAM9. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*.
- Wang, G., Duan, P., Liu, F., & Wei, Z. (2021). Long non-coding RNA CASC7 suppresses malignant behaviors of breast cancer by regulating miR-21-5p/FASLG axis. *Bioengineered*. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2010372>
- Wang, Q., Li, C., Zhu, Z., Teng, Y., Che, X., Wang, Y., ... Qu, X. (2016). MiR-155-5p antagonizes the apoptotic effect of bufalin in triple-negative breast cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000296>
- Wang, Y., Yan, L., Zhang, L., Xu, H., Chen, T., Li, Y., ... Yang, Q. (2018). NT21MP negatively regulates paclitaxel-resistant cells by targeting miR-155-3p and miR-155-5p via the CXCR4 pathway in breast cancer. *International Journal of*

*Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4477>

- Winters, S., Martin, C., Murphy, D., & Shokar, N. K. (2017). Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>
- Xu, H., Li, Y., Han, B., Li, Z., Wang, B., Jiang, P., ... Ye, X. (2018). Anti-breast-Cancer Activity Exerted by  $\beta$ -Sitosterol- d -glucoside from Sweet Potato via Upregulation of MicroRNA-10a and via the PI3K-Akt Signaling Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03305>
- Yang, N., Wang, C., Wang, Z., Zona, S., Lin, S. X., Wang, X., ... Liu, Q. (2017). FOXM1 recruits nuclear Aurora kinase A to participate in a positive feedback loop essential for the self-renewal of breast cancer stem cells. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.490>
- Yang, R., Han, Y., Guan, X., Hong, Y., Meng, J., Ding, S., ... Yi, W. (2023). Regulation and clinical potential of telomerase reverse transcriptase (TERT/hTERT) in breast cancer. *Cell Communication and Signaling*. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01244-8>
- Zhang, J., Ren, L., Yu, M., Liu, X., Ma, W., Huang, L., ... Ye, X. (2019). S-equal inhibits proliferation and promotes apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via regulating miR-10a-5p and PI3K/AKT pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108064>
- Zhang, L., Chen, W., Liu, S., & Chen, C. (2023). Targeting Breast Cancer Stem Cells. *International Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.7150/ijbs.76187>
- Zhang, Y., Wang, Y., Xue, J., Liang, W., Zhang, Z., Yang, X., ... Chen, P. (2022). Co-treatment with miR-21-5p inhibitor and Aurora kinase inhibitor reversine suppresses breast cancer progression by targeting sprouty RTK signaling antagonist 2. *Bioengineered*. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2009410>
- Zhao, L., Sun, Y., Hou, Y., Peng, Q., Wang, L., Luo, H., ... Liu, M. (2012). MiRNA expression analysis of cancer-associated fibroblasts and normal fibroblasts in breast cancer. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.005>

Zhao, Y., Deng, C., Wang, J., Xiao, J., Gatalica, Z., Recker, R. R., & Xiao, G. G. (2011). Let-7 family miRNAs regulate estrogen receptor alpha signaling in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0972-2>

Zhou, H., Tan, L., Liu, B., & Guan, X. Y. (2023). Cancer stem cells: Recent insights and therapies. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115441>

Zuo, J., Yu, Y., Zhu, M., Jing, W., Yu, M., Chai, H., ... Tu, J. (2018). Inhibition of miR-155, a therapeutic target for breast cancer, prevented in cancer stem cell formation. *Cancer Biomarkers*. <https://doi.org/10.3233/CBM-170642>



## Teşekkür

En başta bir Türk Kadını olarak hayallerimi gerçekleştirilmeme olanak sağlayan cumhuriyetimizin kurucusu, başöğretmenimiz **Mustafa Kemal ATATÜRK'e**

Tez sürecim boyunca beni destekleyen, motive eden, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, kendime rol model aldığım sevgili danışmanım **Prof. Dr. Çığır BİRAY AVCI'ya**

Tez çalışmam boyunca bana destek veren, derdimi dinleyen, stres yapma yetiştir diyen sevgili ekip arkadaşlarım **Dok. Öğr. Maryam SABOUR TAKANLOU ve Dok. Öğr. Leila SABOUR TAKANLOU'ya,**

Yüksek lisans macerasına beraber başladığımız, gelecek kaygılarımızı paylaştığımız, bazen gülmeye bazen ağladığımız yüksek lisans yoldaşlarım **Yük. Lis. Öğr. Belce Su ŞANLITÜRK ve Yük. Lis. Öğr. Seyfi Anıl KANBUR'a**

Tez sürecim boyunca bilgisayar işlerime yardım eden, stresimi alan, derdimi dinleyen, motive eden canım arkadaşım, oğlan çocu'm **Muhammet KARAKAYA'ya**

Lisans döneminde başlayan arkadaşlığımızın dosta dönüştüğü, iyi kötü her anımda yanımda olan, fikir alışverişi yapmaktan ve tartışmaktan asla bıkmayacağım, bana her anlamda çok şey katan ve artık arkadaşım değil kız kardeşlerim olan sevgili dostlarım **Gülizar Nur KARAHAN, Hacer Seha SOLAK ve Melisa TÜRE'ye**

Sevgimi asla kelimelere dökemeyeceğim, her koşulda ne yaparsam yapayım yanımda olacaklarına güvendiğim **kardeşim Mustafa Ata YILDIRIM ve annem Kadriye ŞENGÜL'e**

Sonsuz teşekkürlerimle.....

İrem YILDIRIM

İzmir, 26.07.2024

## Özgeçmiş

2017 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik (İngilizce) bölümünde lisans eğitimime başladım. Haziran 2022 tarihinde lisans eğitimimi tamamladım. Eylül 2022 tarihinde Ege Üniversitesi Kök Hücre Anabilim Dalı'nda Tezli Yüksek Lisans Programı'na başladım.

