ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Özge CAN

KOLOREKTAL KANSER İLİŞKİLİ miRNA'LARIN EKSPRESYONU ÜZERİNE ADAÇAYI *(Salvia officinalis)*, TERE (*Lepidium sativum*), ÇÖREK OTU *(Nigella sativa)* ve ISIRGAN OTU *(Urtica dioica)* BİTKİLERİNİN ETKİSİ.

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA-2019

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLOREKTAL KANSER İLİŞKİLİ miRNA'LARIN EKSPRESYONU ÜZERİNE ADAÇAYI *(Salvia officinalis),* TERE (*Lepidium sativum*), ÇÖREK OTU *(Nigella sativa)* ve ISIRGAN OTU *(Urtica dioica)* BİTKİLERİNİN ETKİSİ

Özge CAN

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 01/03/2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

……	……..	……
Prof. Dr.S. Seyhan TÜKEL	Prof. Dr. Ramazan BİLGİN	Prof. Dr. Lülüfer TAMER
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

……..	…….
Prof.Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ	Prof. Dr.Gül ÖZYILMAZ
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2014-2849

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

KOLOREKTAL KANSER İLİŞKİLİ miRNA'LARIN EKSPRESYONU ÜZERİNE ADAÇAYI *(Salvia officinalis),* TERE (*Lepidium sativum*), ÇÖREK OTU *(Nigella sativa)* ve ISIRGAN OTU *(Urtica dioica)* BİTKİLERİNİN ETKİSİ

Özge CAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Yıl : 2019, Sayfa: 101
Juri : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ
: Prof. Dr. Lülüfer TAMER

Bu çalışmada metastatik kolorektal kanser hücre hattı olan HCT 116, halk arasında kolorektal kanser hastalarını tedavi ettiği düşünülen adaçayı *(Salvia officinalis),* tere (*Lepidium sativum*), çörek otu *(Nigella sativa)* ve ısırgan otu *(Urtica dioica)* ekstraktları ile 3, 24, 48 saat sürelerince muamele edildi. Muamele işlemi sonucunda kolorektal kanserle ilişkisi olduğu kanıtlanmış olan süpresör özellikteki miR-145 ve onkojenik özellikteki miR-21, miR-31 ve miR-135a'nın ekspresyon düzeyleri belirlendi, ekstraktlarının tedavi edici olup olmadıkları araştırıldı. Adaçayı, çörek otu, ısırgan otu bitkilerinin belirli süre ve derişimlerde miR-21, miR-31 ve miR-135a'nın ekspresyonu azaltarak etkisi olduğu, tere bitkisinin ise bu üç miRNA ekspresyonuna etkisi olmadığı belirlendi. Adaçayı, ısırgan otu ve çörek otu bitkilerinin miR-145'e herhangi bir etkisi olmadığı bulundu.

Anahtar Kelimeler: miRNA**,** adaçayı, çörek otu, ısırgan otu, tere, kolorektal kanser

ABSTRACT

MSc-THESIS

EFFECTS OF THE SAGE *(Salvia officinalis),* STINGING NETTLE *(Urtica dioica),* CRESS *(Lepidium sativum)* and CUMIN *(Nigella sativa)* ON COLORECTAL CANCER RELATED miRNA EXPRESSIONS

Özge CAN

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervıser : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Year : 2019, Page: 101
Jury : Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
: Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ
: Prof. Dr. Lülüfer TAMER

In this study, a metastatic colorectal cancer cell HCT 116 was treated with the extracts of sage *(Salvia officinalis),* stinging nettle *(Urtica dioica),* cress *(Lepidium sativum)* and cumin *(Nigella sativa)* plant species which is popularly considered in the treatment of colorectal cancer patients for 3,24,48 h. After treatments, the expression levels of miR-145 which is known as a suppressor and miR-21, miR-31, miR-135a which are known as oncogenic were determined. *Salvia officinalis, Nigella sativa, Urtica dioica* extract were effective by reducing the amount of miR-21, miR-31 and miR-135a. On the contrary, it was determined that *Lepidium sativum* does not have any effects on these 3 miRs. In addition, it was determined that *Salvia officinalis, Nigella sativa, Urtica dioica* extracts do not have any effect on miR-145.

Key words: miRNA, *Salvia officinalis, Urtica dioica, Lepidium sativum, Nigella sativa*, Colorectal cancer

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Günümüzde en yaygın hastalıklardan biri olan kanseri tedavi etmek için çeşitli ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Son zamanlarda eski bir yöntem olmasına rağmen yeniden gündeme gelen bitkisel tedavi yöntemleri sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada halk arasında kanser tedavisinde etkin olduğu düşünülen ve ülkemizde yaygın olarak üretilen adaçayı, çörek otu, ısırgan otu ve tere bitki ekstraktları kullanılmıştır. Bu bitkilerin seçilmesindeki neden ülkemizde sıklıkla tüketilmeleri ve miRNA'lar üzerinde bu bitkilerle yapılmış çok az sayıda çalışmanın bulunmasıdır. Kolon kanseri hücre hattı HCT 116 ile çalışılmasının nedeni ise, metastatik bir hücre hattı olması, ayrıca bu kanser türünün dünyada ve Türkiye'de en yaygın kanser türünden bir tanesi olmasıdır.

Bu çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının, seçilen miRNA'ların (miR-21, miR-31, miR-135a, miR-145) ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırıldı. Çörek otu ekstraktının miR-21 üzerine baskılayıcı etki göstermediği, adaçayı ekstraktının miR-21 üzerine baskılayıcı etkisi olduğu ve bu etkinin derişimle doğru orantılı olarak arttığı bulundu. Isırgan otu ekstraktının miR-21'in ifadelenme düzeyinde anlamlı bir değişime neden olmadığı bulundu. Tere bitki ekstraktının miR-21 üzerine baskılayıcı etki göstermediği ve aksine yüksek konsantrasyonlarda (40 µl/ml) ve uzun süreli muamele edildiğinde ifade düzeyini 10 kat artırıcı etkisinin olduğu tespit edildi. Çörek otu ekstraktının miR-31 üzerine baskılayıcı etkisinin 24. saatte ve düşük konsantrasyonda olduğu belirlendi. Adaçayı ekstraktının miRNA-31 üzerine 3. saatte baskılayıcı etkisi olduğu tespit edildi. Isırgan otu ekstraktının miR-31 kanser hücreleri üzerinde sadece 24. saatte ve 20 µl/ml konsantrasyonda 172 kat baskılayıcı etkisi olduğu bulundu. Tere bitki ekstraktının miR-31 üzerine baskılayıcı etki göstermediği belirlendi. Çörek otu ekstraktının miR-135a üzerine ilk 3 saatte etkisi olmamasına rağmen sürenin artmasıyla baskılayıcı etkisinin olduğu bulundu. Adaçayı ekstraktının miR-135a üzerine bütün konsantrasyonlarda ve sürelerde baskılayıcı etkisi olduğu bulundu. Isırgan otu ekstraktının miR-

135a'nın ekspresyonu üzerine düşük derişimlerde bütün konsantrasyon ve saatlerde baskılayıcı etkisi olduğu bulundu. Tere bitki ekstraktının miR-135a üzerine baskılayıcı etki göstermediği ve aksine uzun süreli muamele edildiğinde ifade düzeyini artırıcı etkisinin olduğu bulundu. Çörek otu ekstraktının miR-145 üzerine düşük konsantrasyonlarda ifade düzeyini artırıcı etkisi olduğu, yüksek konsantrasyonda uzun süreli muamelelerde baskılayıcı etkisi olduğu bulundu. Adaçayı ekstraktının miR-145 üzerine baskılayıcı etki göstermediği bulundu. Isırgan otu ekstraktının miR-145 üzerine baskılayıcı etki göstermediği, miR-145'in ifadelenme düzeyinde fazla bir değişime neden olmadığı bulundu. Tere bitki ekstraktının miR-145 üzerine sadece 20 µl/ml konsantrasyonda ve 48. saatte baskılayıcı etki göstermediği bulundu.

Sonuç olarak Adaçayı ve çörek otu bitki ekstraktlarının seçmiş olduğumuz dört miRNA içinde baskılayıcı etki gösterdiği bulundu. Isırgan otu bitki ekstraktlarının miR-21, miR-31, ve miR-135a üzerine baskılayıcı etkisinin olduğu belirlendi. Isırgan otu bitkisinin miR-145 ifade düzeyinde ise herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi. Tere bitkisinin miR-21, miR-31 ve miR-135a ifadelenme düzeyinde herhangi bir derişim ya da sürede etkili olmadığı belirlendi. Bununla birlikte, tere bitkisinin miR-145 ifadelenme düzeyi üzerinde baskılayıcı ekkisi olduğu belirlendi.

TEŞEKKÜR

Doktora Tez çalışmam süresince her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen, görüş ve bilgi birikiminden yararlandığım çok değerli Danışmanlarım Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL'e ve Doç. Dr. Atıl BİŞGİN'e gösterdikleri sabır, anlayış ve iyi niyetlerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın hücre kültürü aşamasında laboratuvarlarını bana açan, bilgisiyle destek olan Doç.Dr. M.Bertan YILMAZ'a ve beni hiç tanımamasına rağmen hücreleri bana göndererek bu tezin başlamasına vesile olan Dr. Öğr. Üyesi Pınar OBAKAN'a teşekkürlerimi sunarım. Tez düzeltmeleri sırasında yardımalarından dolayı Prof. Dr. Lülüfer TAMER'e, çalışmalarım süresince her türlü yardımı sabrı anlayışı ve bilgi birikimiyle destek olan Mehmet ERKOÇ'a ve bu şüreç içerisinde yardımlarını ve gülen yüzünü esirgemeyen Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ ve Prof. Dr. Ramazan BİLGİN'e manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu süreç içerisinde yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen başta değerli hocam Doç. Dr. Deniz YILDIRIM ve arkadaşlarım Doç. Dr. Dilek ALAGÖZ, Araşt. Gör. Ali TOPRAK, Dr. Öğr. Üyesi Yakup AKKOÇ, İbrahim BOĞA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, anlayışı ve destekleri ile beni yalnız bırakmayan başta annem, kardeşlerim, eşim ve bu süreçte gülümsemesiyle bütün sıkıntılarımı unutturan bir tanecik oğlum Uygar'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER VI
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
1. GİRİŞ 1
1.1. miRNA'ların Keşfi 1
1.2. miRNA'ların Oluşumu 2
1.2.1. Genomun İçinde miRNA 3
1.2.2. miRNA Biyogenezi 5
1.2.2.1. İntergenik miRNA 6
1.2.2.2. İntronik miRNA 7
1.2.2.3. miRNA'nın Nükleustan Sitoplazmaya Taşınması 8
1.2.3. miRNA'nın Sitoplazmadaki Biyogenezi 8
1.2.3.1. Pre-miRNA'nın Tekli Ayrılma Mekanizması 9
1.2.3.2. Pre-miRNA'nın Çiftli Ayrılma Mekanizması 10
1.2.3.3. pre-miRNA'nın yapısı 11
1.2.4. RISC Birleştirme Düzeneği 12
1.2.4.1. *Drosophila melanogaster'*da RISC'in Yüklenmesi 13
1.2.4.2. İnsanlarda RISC'in Yüklenmesi 13
1.2.5. Hedef Tanıma 14
1.2.6. Baskılama 15
1.2.6.1. P-cisimciği 18
1.2.6.2. Nükleusta miRNA'nın Baskılanması 20

1.2.7. miRNA'nın Çalışma Modeli 21
1.3. miRNA ve Kanser 23
1.4. Tümör Supresör miRNA'lar 25
1.5. Onkogenik miRNA'lar 27
1.6. Kolorektal kanserde miRNA ekspresyonu 29
1.7. Bitkisel Ekstraklar 30
1.7.1. Adaçayı (*Salvia officinalis*) 31
1.7.2. Isırgan Otu *(Urtica dioica)* 32
1.7.3. Tere *(Lepidium sativum)* 33
1.7.4. Çörek otu *(Nigella sativa)* 33
1.8. Hücre Kültürü 34
1.8.1. Hücre Kültürü Besiyeri ve Çözeltiler 36
1.8.2. Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) 37
1.8.3. Fetal Bovine Serum 37
1.8.4. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS) 38
1.8.5.Tripsin 38
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 39
3. MATERYAL VE METOD 45
3.1. Materyal 45
3.1.1. Kimyasallar 45
3.1.2. Araç ve Gereçler 45
3.2. Metod 45
3.2.1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması 45
3.2.1.1. Isırgan otu ekstraksiyonu 46
3.2.1.2. Tere ekstraksiyonu 46
3.2.1.3. Adaçayı ekstraksiyonu 46
3.2.1.4. Çörek otu ekstraksiyonu 46
3.2.2. Hücre Pasajlanması 47

3.2.3. miRNA ve Toplam RNA Saflaştırması 49
3.2.3.1. Hücrelerin Homojenize Edilmesi 49
3.2.3.2. Fazların Ayrılması 49
3.2.3.3. RNA İzolasyonu 50
3.2.4. cDNA Eldesi 50
3.2.5. miRNA PCR Array 51
3.2.6. miRNA PCR Array Data Analizi 53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 55
4.1. Bulgular 55
4.2. Tartışma 71
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 77
5.1. Sonuçlar 77
5.2. Öneriler 78
KAYNAKLAR 79
ÖZGEÇMİŞ 93
EKLER 94

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Kolorektal kanserle ilişkili olan miRNA'lar 29
Çizelge 1.2. Metastazla ilişkili miRNA'lar..... 30
Çizelge 3.1. Ters Transkripsiyon reaksiyon bileşenleri..... 51
Çizelge 3.2. Olgun miRNA ların belirlenebilmesi için reaksiyon karışımı 52
Çizelge 3.3. Döngü durumu..... 52

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

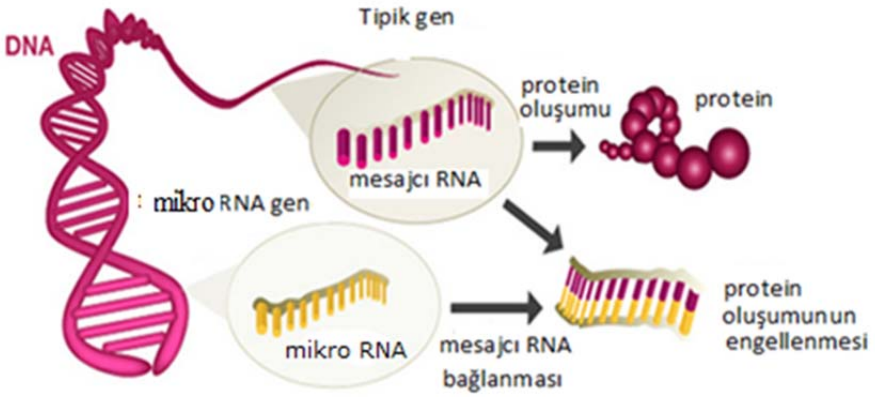
Şekil 1.1. miRNA'nın mRNA'ya bağlanarak protein oluşumunu engellemesi 1
Şekil 1.2. miRNA olgunlaşması ve fonksiyonu 3
Şekil 1.3. miRNA biyogenezinin nükleer bileşenleri 7
Şekil 1.4. miRNA biyogenezinin sitoplazmik bileşenleri 8
Şekil 1.5. miRNA ve mRNA'nın 3'UTR bölgesinin baz eşleşmesi 11
Şekil 1.6. pre-miRNA yapısı 12
Şekil 1.7. mRNA kesimi ile olan mekanizma 16
Şekil 1.8. mRNA'ya translasyonel müdahale 17
Şekil 1.9. P-cisimciği modeli 19
Şekil 1.10. miRNA'nın çalışma modeli 22
Şekil 3.1. Bitki ekstraktlarının HCT 116 hücre hattına 3 saatlik uygulamasının şematik gösterimi 47
Şekil 3.2. Adaçayı ve tere bitki ekstraktı uygulana HCT 116 hücre hattının 24 saat sonundaki görüntüsü 48
Şekil 3.3. Adaçayı bitki ekstraktı uygulanan HCT 116 hücre hattının 48 saat sonundaki görüntüsü 49
Şekil 3.4. miRNA izolasyonunun şematik gösterimi 54
Şekil 4.1. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki adaçayı ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-21'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 55
Şekil 4.2. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-21'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 56
Şekil 4.3. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki ısırgan otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-21'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 57

Şekil 4.4. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki tere ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-21'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 58
Şekil 4.5. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki adaçayı ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-31'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 59
Şekil 4.6. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-31'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 60
Şekil 4.7. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki ısırgan otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-31'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 61
Şekil 4.8. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki tere ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-31'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 62
Şekil 4.9. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki adaçayı ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-135a'nın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 63
Şekil 4.10. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-135a'nın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 64
Şekil 4.11. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki ısırgan otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-135a'nın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 65
Şekil 4.12. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki tere ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-135a'nın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 66

Şekil 4.13. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki adaçayı ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-145'in zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 67
Şekil 4.14. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-145'in zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 68
Şekil 4.15. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki ısırgan otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-145'in zamana karşı ekspresyon değişim grafiği 69
Şekil 4.16. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki tere ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-145'in zamana karşı ekspresyon değişim grafiği..... 70

1. GİRİŞ

MikroRNA (miRNA)'lar, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, küçük RNA molekülleridir (Saydam ve ark, 2011). Bu moleküllerin çeşitli biyolojik olaylarda ve patolojik durumlarda önemli düzenleyici roller aldığı gösterilmiştir. miRNA'ların hücresel gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve post transkripsiyonel (Şekil 1.1) seviyeden düzenlediği düşünülmektedir (Jackson, 2007). mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabileceği için miRNA'lar gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahiptir. miRNA'lar özellikle hücre tipinin belirlenmesi ve hücre farklılaşması olmak üzere pek çok fizyolojik olaylarda rol alır (Çelik ve ark, 2013).



Şekil 1.1. miRNA'nın mRNA'ya bağlanarak protein oluşumunu engellemesi

1.1. miRNA'ların Keşfi

İlk miRNA, Lee ve çalışma arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında keşfedilmiş olup, miRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (Ruvkun 2001). Lee ve arkadaşları 1993 yılında yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans*'ı gen içeriği bakımdan taramışlar, lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotit

uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini rapor etmişlerdir (Lee ve ark, 1993). 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları *C.elegans*'da 22 nükleotit uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir miRNA keşfetmişlerdir. Let-7'nin insanları da içine alan türler arasında da korunmuş olduğu keşfedilmiş olup bu durum let-7'nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir (Pasquinelli ve ark, 2000). Daha sonraki yıllarda let-4 ve let-7'ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiştir ve miRNA'lar olarak isimlendirilmiştir (Saydam ve ark, 2011; Lagos-Quintana ve ark, 2001).

1.2. miRNA'ların Oluşumu

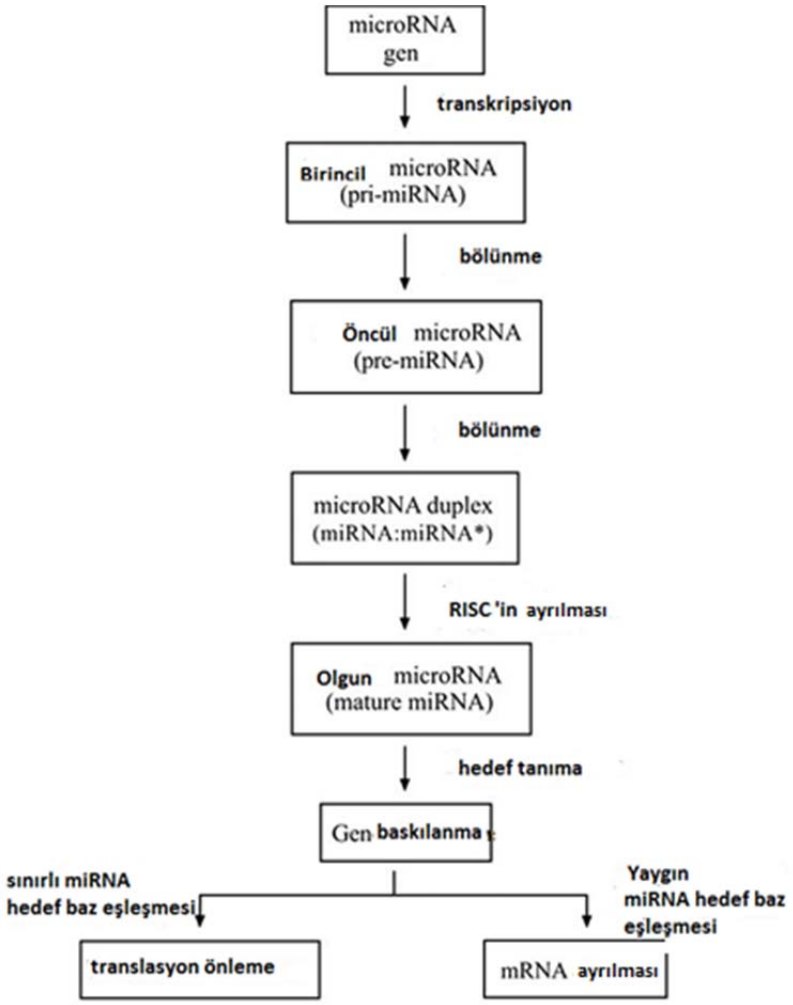
İnsan genomunun %1-5'i ve protein kodlayan genlerin %30'unun miRNA olduğu tahmin edilmektedir (Perron ve Provost, 2008; Lee ve ark, 1993). Bu güne kadar insan genomunda 1881 tane miRNA belirlenebilmiştir (http://miRBase.org). Şimdiye kadar miRNA moleküllerinin belirli hedefleri ve biyolojik fonksiyonları hakkında bilinenler çok az olmasına rağmen, belli ki miRNA çok farklı hücresel ve metabolik yolları kontrol eden gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Esau ve ark, 2006).

miRNA'lar küçük, evrimsel olarak korunmuş, tek zincirli, bağ yapmamış RNA molekülleridir ve hedefe bağlanarak mRNA'dan protein sentezlenmesini engellerler. Olgun miRNA'lar genellikle RNA indüklenmiş bölücü kompleks (RISC) in etkili olduğu birincil miRNA'dan 2 basamakta sentezlenir (Perron ve Provost 2008; Bartel, 2004).

Genel olarak miRNA fonksiyonları belirlenmesine rağmen miRNA biyogenezinin mekanizmalarının detayları ve gen kırpılması tam olarak belirlenememiştir. Bu yeni ve heyecan verici moleküler biyoloji hala araştırılmaya devam edilmekte ve tedavisi bulunamayan bazı hastalıkların tedavisi için umut vadetmektedir (MacFarlane ve Murphy, 2010). miRNA'ların biyolojik fonksiyonları tam olarak belirlenememiş olsa da ekspresyon profillerinin

belirlenmesi bu moleküllerin düzenlenmesi ve fonksiyonları hakkında bilgi vermektedir. Örneğin bazı çalışmalar spesifik tümörlerde miRNA ekspresyon profillerinin değiştiğini göstermektedir (Garzon ve ark, 2006).

1.2.1. Genomun İçinde miRNA



Şekil 1.2. miRNA olgunlaşması ve fonksiyonu (Ambros ve ark, 2003)

Küçük endojen RNA moleküllerinin taşıyıcı RNA (tRNA), ribozomal RNA (rRNA), küçük nükleolar RNA (snoRNA), küçük interferans RNA'sı (siRNA) ve miRNA gibi pek çok sınıfı vardır. Bunlardan siRNA ve miRNA biyokimyasal ve fonksiyonel olarak birbirine oldukça yakındır. Her ikisi de 18-24 nükleotid (nt) uzunluğunda olup RISC protein kompleksi aracılığı ile olgun dizilerine kesilirler (Ambros ve ark, 2003; Kim, 2005). Buna karşın miRNA'lar 60-70 nt uzunluğunda saç tokası yapısında RNA öncülerinin çift zincirli bölgesinden türetilirken, siRNA uzun çift zincirli RNA (dsRNA)'dan meydana gelir (Şekil 1.2.) (Bartel ve ark, 2004; Ambros ve ark, 2003; Kim, 2005).

miRNA öncülleri, genellikle genom içerisinde farklı bölgelerde kümelenmiş olarak bulunur. miRNA öncüllerinin ekzon bölgelerinde fazla bulunmadığı gözlemlenmiş olup, protein kodlayan genlerin intronları ve sıklıkla intergenik (genler arası) bölgelerde bulundukları gösterilmiştir. Önceki çalışmalarda bu bölgelerin işlevi tam olarak bilinmediğinden bu bölgelere atıl DNA bölgeleri denilmekteydi. miRNA'ların keşfi ile bu bölgelerin işlevsiz olmadığı da belirlenmiş oldu (Lagos-Quintana ve ark, 2001).

miRNA transkripsiyon birimleri ve düzenlenmeleri bulundukları gen lokusuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Intronik miRNA'lar konakçı gen ile transkribe edilirken intergenik miRNA'ların yaygın olarak kendi promotor bölgeleri vardır (Rodriguez ve ark, 2004). Genomik analizlerde birincil miRNA öncüllerinin uzun polisistronik transkriptlerinin mRNA ile benzer olduğu ve her ikisinin de 5've 3'uçlarında 7-metil-guanozin (m7G-cap) şapka ve poli-A kuyruğu olduğu gösterilmiştir (Altuvia ve ark, 2005; Yu ve ark, 2006).

İntergenik ve intragenik miRNA çiftleri Lee ve ark, tarafından 2004 yılında keşfedilmiştir (Lee ve ark. 2004). Bu çalışmada, miRNA'nın büyük çoğunluğunun RNA polimeraz II (RNA pol II) tarafından transkribe edildiğini göstermişlerdir. RNA Pol II DNA'dan RNA'ya transkripsiyondan sorumlu protein komplekslerinin katalitik bir bileşenidir. Bununla birlikte miRNA'lar RNA pol III aracılı transkripsiyon ile de oluşabilir. Araştırmalar miRNA gen kümesi olan C19MC'nin

Alu tekrarları serpiştirilmiş RNA pol III tarafından insan kromozom 19'un transkribe edilmesi ile olduğunu göstermektedir. Bu gözlem Borchert ve ark. 2006 tarafından yapılmış olup miRNA'nın pol III transkripsiyonunun düşünüldüğünden daha yaygın olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise Gu ve ark. 2009 yılında alu bağımlı RNA pol III mekanizması tarafından transkribe edilen 68 yeni miRNA bulmuşlardır.

miRNA'nın RNA pol II ve pol III tarafından sentezlenmesinde rol oynayan esas düzenleyici elementler, normal hücresel fonksiyonlar için esas olan gen ekspresyonunun kontrolünden sorumlu insan genomundaki lokuslarda kodlanır.

RNA pol II tarafından üretilen birincil miRNA transkriptleri protein kodlayan mRNA transkribine benzer şekilde düzenlendiği düşünülmektedir. miRNA ekspresyonunun, transkripsiyon faktörlerini etkileyen çeşitli endojen ve ekzojen uyaranlar tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. miRNA ekspresyonu, iki basamakta gerçekleşen miRNA biyogenezinin düzenlenmesinde de etkilidir. Örneğin, HnRNPA-1 SMAD1 ve SMAD5 gibi proteinlerin miRNA öncüllerinden etkilendiği ve düzenlenmelerinde olgun miRNA'nın etkili olduğu belirlenmiştir. Düzenleyici proteinler olgun miRNA'ya bağlanarak bozunmasına yol açar ve ekspresyonunu engelleyebilir. Örnek olarak Lin28 düzenleyici proteini, let7 miRNA'ya bağlanarak bozunmasına neden olur (Viswanathan ve Daley, 2010).

miRNA'ların yaklaşık olarak %10'u DNA metilasyonu sırasında kontrol edilir. Buna ek olarak bulgular miRNA düzenlenmesinin hipoksi, hormonal ve beslenme değişiklikleriyle de ilişkili olduğunu göstermektedir (Yu ve ark, 2008).

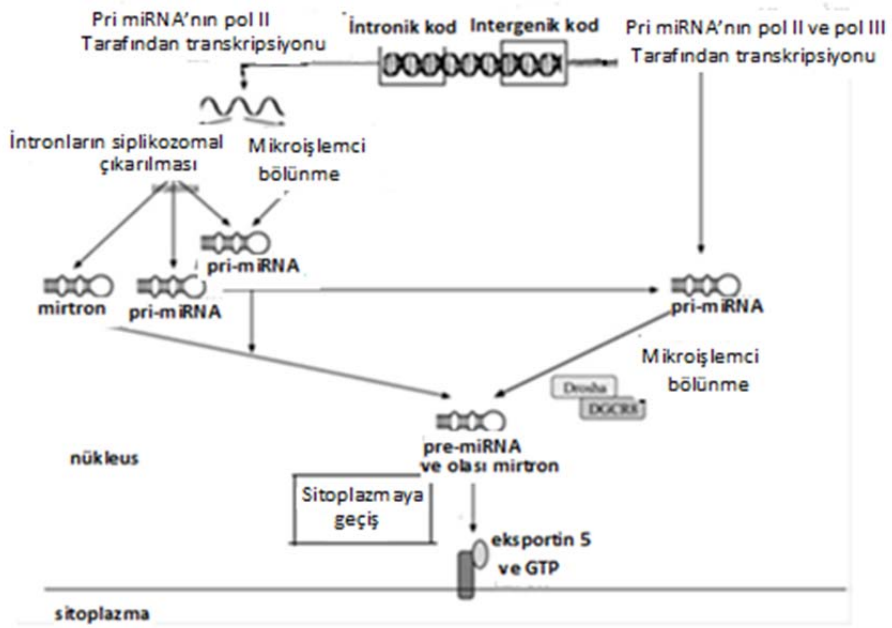
1.2.2. miRNA Biyogenezi

İnsanda miRNA biyogenezi 2 basamaklı bir süreçtir. Ribonükleaz III endonükleaz Drosha Dicer'ın etkin olduğu bu süreç, nükleus ve sitoplazmada geçekleşen kesimlerden meydana gelir (Denli ve ark, 2004). miRNA geni birincil RNA'ya (pri-miRNA) ve ardından da öncül RNA'ya (pre-miRNA) dönüştürülür. Ardından dupleks miRNA ve son olarak da olgun miRNA oluşumu gerçekleşir.

miRNA'nın kökeni ve büyüklüğü, son halini aldığı nükleer yolun nasıl şekil alacağını belirler. Bu aşamada miRNA'nın kökenlendiği bölgenin intergenik ya da proteine kodlayan bölgede yer alan intronik bir bölge olması önem arz etmektedir. (Bartel, 2004).

1.2.2.1. İntergenik miRNA

İntergenik miRNA'lar, RNA pol II veya pol III aracılı oluşan transkript ürünleridirler (Şekil 1.3) (Lee ve ark,2004). Sadece bu pri-miRNA'lar uygun kök uzunluğuna ve büyük uygun uç düğümüne sahiptir ve 5'3'tek zincirli RNA ürünü etkili bir süreç sonucunda fonksiyonel miRNA'nın üzerine aktarılır. Olgunlaşma süreci pri-miRNA'nın nükleusta gerçekleşen kesilmesi ile protein kompleks olarak bilinen mikroişlemci tarafından başlatılır. Bu mikroişlemci RNaz III endonükleaz Drosha ve çift zincirli RNA bağlayıcı DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 (DGCR8) proteinini içerir. Güncel çalışmalar Drosha ve DGRC8 arasındaki karşılıklı düzenlenmenin miRNA biyogenezinin anlaşılması için çok önemli olduğunu ortaya koymuştur (Lee ve ark, 2003). Bu düzenlenmede DGRC8 Drosha'yı sabitleyerek protein-protein etkileşimini ve Drosha'nın protein seviyesini kontrol eder. Buna karşın Drosha'nın mikroişlemcide bulunması, transkript sırasında 5'uç'da bulunan translasyonu yapılamayan 88 nt'lik uç DGCR8'in negatif düzenlenmesine neden olur. Ek mikroişlemci ile ilişkili proteinler, belirli öncü miRNA'ların işlenmesi için gereklidir. Protein faktörü hnRNAPA1 gerektiren mir-18a'lar bu duruma örnek olarak gösterilebilir. Son zamanlarda büyük bir çoğunluk tarafından önerilen modelde DGCR8'in pri-miRNA'yı ssRNA- dsRNA bağlantı yerinden tanıdığı ve 11 baz çifti olduğu yerden kesen Drosha'ya direkt bağlandığı bildirilmektedir. Bu pre-miRNA'nın Drosha'nın kestiği olgun miRNA tarafından belirlenen bir sonu vardır (Han ve ark , 2006; Lee ve ark, 2003).



Şekil 1.3. miRNA biyogenezinin nükleer bileşenleri (Lee ve ark, 2003)

1.2.2.2. İntronik miRNA

miRNA'nın içinde bulunduğu protein kodlayan genin intronu RNA pol II tarafından trankribe edilir (Rodriguez ve ark, 2004). Son zamanlarda edinilen bulgular eş zamanlı ya da bağımsız olarak meydana gelen 2 olası miRNA eksizyon sürecini desteklemektedir. pre-miRNA'nın sitoplazmaya transferinin ise serbest taşınma ya da pri-miRNA benzeri şekilde olup olmadığı hala çalışılmaktadır. Buna ek olarak nükleer yol hipotezi intron içeren miRNA'nın dallarından, 50-200 nt'lik saç tokası formasyonu bulunan küçük dalların atılmasıyla mümkün olabilir.

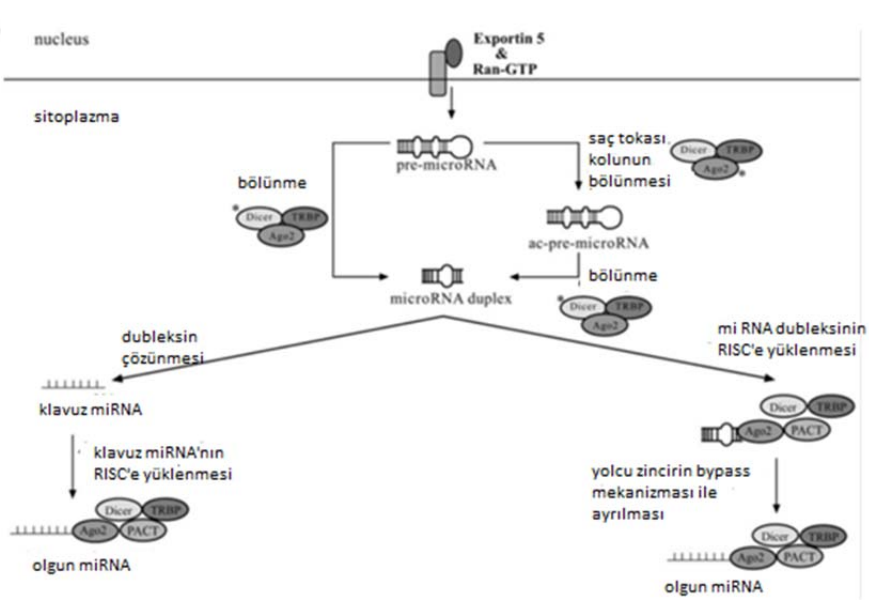
Son zamanlarda bazı intronlar "mitron" olarak adlandırılmaya başlanmıştır (Berezikov ve ark, 2007). Mitronlar omurgasızlarda ve memelilerde keşfedilmiş olup omurgasızlarda miRNA'nın olgunlaşması sırasında sitoplazmaya taşınırken süreç kesintiye uğramadan başka bir yola geçerler. Bununla birlikte, memelilerdeki mitronların miRNA'nın olgunlaşma sürecindeki işlevinin omurgasızlardaki gibi olup olmadığı henüz netleşmemiştir. Pre-miRNA'daki birleştirici taraf işaretlenir

ve mikroişlemcide birleştirici kompleksin bağlanmasına izin verir. Olgun miRNA bağlanması devam ederken pre-miRNA salınır. Sonuç olarak bu işlenme süreci, intergenik pre-miRNA sürecine alternatif bir süreçtir (Ruby ve ark, 2007; MacFarlane ve Murphy, 2010).

1.2.2.3. miRNA'nın Nükleustan Sitoplazmaya Taşınması

Pre-miRNA'yı izleyen süreçler sitoplazmada gerçekleşir. Pre-miRNA nükleer bozunmaları önleyen ve sitoplazmaya girişleri sağlayan nükleositoplazmik transfer faktörü olan eksportin 5 ve RanGTP ile kompleks oluşturur. Bu eksportin 5/ RanGTP kompleksi nükleer taşıma yolu, bazı kurbağa türlerinin olgunlaşmamış dişi gametinde ve *Drosophila melanogaster* da mitronların sitoplazmaya transferini sağlamaktadır. Fakat memelilerde bu mekanizmanın olup olmadığı netlik kazanmamıştır (Lund ve Dahlberg, 2006; Berezikov ve ark, 2007).

1.2.3. miRNA'nın Sitoplazmadaki Biyogenezi



Şekil 1.4. miRNA biyogenezinin sitoplazmik bileşenleri (Zhang ve ark,2002)

miRNA olgunlaşmasının sitozolik birleşenleri maya tomurcukları hariç bugüne kadar araştırılan bütün ökaryotlarda bulanan RNaz III endonükleaz Dicer etrafında döner (Şekil 1.4). İnsanlarda siRNA ve miRNA yolunun her ikisinde fonksiyon gösteren Dicer tekli izoformu bulunmaktadır. Buna karşılık *Drosophila melanogaster'ın* siRNA ve miRNA yolağındaki Dicer izoformunu ayırır. İnsanlardaki siRNA ve miRNA ilişkisi henüz bilinmemektedir. Dicer, sitoplazma içerisine yerleşmiş ve/veya N-terminalden oluşan, ATPaz/helikaz bölgesi DUF283, PAZ ve terminalde yerleşmiş 2 RNAaz III endonükleaz bölgeleri bulunan çoklu bölgelerden oluşan bir proteindir. PAZ, RNaz III endonükleaz ve çift zincirli RNA bağlayıcı bölge (double- strand RNA binding domain (dsRBD)) bölgeleri bağlayıcı ve kesici dsRNA içerir. Bununla birlikte, ATPaz/helikaz ve DUF283 bölgelerinin fonksiyonları bilinmemektedir. Dicer'ın karakteristik olarak dsRNA'dan ayrılmak için ATP gerektirmeyen bir mekanizması vardır. Fakat ATP'nin enzimsel işlemler için gerekli olduğu önerilmiştir (Zhang ve ark,2002).

1.2.3.1. Pre-miRNA'nın Tekli Ayrılma Mekanizması

Önerilen modellerden birinde pre-miRNA'nın sitoplazmada yer değiştirmesidir ve insan bağışıklık yetmezliği virüsünün (HIV, *Human immunodeficiency virus*) transaktivitesinden sorumlu RNA bağlayıcı protein (TRBP) ve protein kinaz R-aktivite proteini (PACT) Dicer için oluşan öncül miRNA komplekse dahil olur (Haase ve ark, 2005). Bu kompleks RISC-yükleme kompleksine çekirdek oluşturur (Diederichs ve Haber, 2007). Dicer'daki PAZ bölgesi pre-miRNA 2 nükleotid uzunluğundaki 3' bağlanma yerini tanır ve bağlanmayı başlatır. Dicer'daki PAZ ve RNaz III bölgeleri arasındaki mesafe bir cetvel gibi pre-miRNA'daki bölünmenin başlayacağı yeri tam olarak belirler. Dicer'ın intermoleküler dimerizasyonu sırasında RNaz III bölgesindeki 2 katalitik alanın kesilmesi ile tek sarmallı bir yapı oluşturulur. Aynı zamanda Drosha tarafından da pre-miRNA'nın kesilmesi ile tek bir işleme merkezi meydana

getirilir. Bu ürünün sonucunda 3' bağlanma ucunda çift zincirli miRNA dupleksi oluşur (Zhang ve ark, 2002).

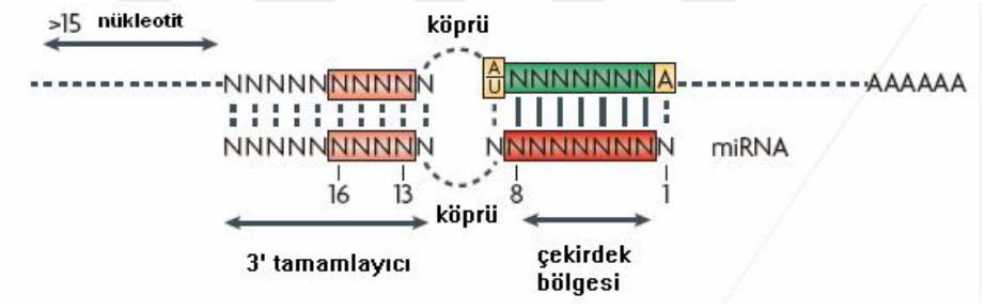
Cifuentes ve ark, (2010) tarafından önerilen en son model, aynı zamanda ökaryotlarda translasyon başlatıcı faktör olan 2C2 (elF2C2) olarak da bilinen arganut 2 (Ago2) proteinin etrafında merkezlenir. Ago2 bir piwi etki alanı ve endonükleaz etkinliğine sahip bir PAZ etki alanı içerir. Endonükleaz aktivitesine sahip bu modelde pre-miRNA sürecinde ago2 bağımlı fakat Dicer'dan bağımsız bir model tanımlanmaktadır. Ago2 ve pre-miRNA'nın bağlandığı endonükleazın bu bağlanma yeri üzerinde işlem tamamlandıktan sonra çözülmelere neden olan 5' ucunda toka şeklinde 10 nükleotid uzunluğunda yolcu bir iplik vardır.

1.2.3.2. Pre-miRNA'nın Çiftli Ayrılma Mekanizması

Tekli ayrılmalara ek olarak ago2 bağımlı pre-miRNA süreci Diedrich ve Haber tarafından (2007) önerilmiştir. Bu öneride Dicer, TRBP ve ago2 protein kompleksinde tanımlanır ve pre-miRNA aracılığıyla Dicer ve/veya ago2'deki PAZ bölgesine bağlanır. Ago2 kesen öncül miRNA veya ac-pre-miRNA olarak adlandırılır. Saç tokası yapısındaki 3' ucunda 11-12 nükleotidik pre-miRNA tekli zincirine kesilerek çift zincirli miRNA dupleksini oluşturmak için Dicer'ın substratını oluşturur. Dicer'ın TRBP'nin PACT ve ago2'nin etkileşiminde olduklarını kanıtlayan deliller bulunmasına rağmen bütün proteinler içerisinde kompleks oluşturan bir grup henüz tanımlanamamıştır. miRNA biyogenezinin boyunca aktif proteinlerin ayrışması ve yeniden birleşmesi komplekstеki miRNA yolunda proteinlerin nerede aktif olduklarının belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Literatürde TRBP'nin ago2 ve Dicerla olan ilişkisinin miRNA yolağında önemli bir rol oynadığına dair fikir birliği vardır (Gregory ve ark, 2005; Chendrimada ve ark, 2005; Haase ve ark, 2005). Bununla birlikte gerçek rolleri tartışılmaktadır. Haase ve ark. (2005) ve Chendrimadave ve ark. (2005)'de yaptıkları iki çalışmada birbirleriyle çelişkiye düşmektedir. Hasse ve ark. pre-miRNA'daki Dicer'ın kesilmesi için TRBP'nin önemli bir rol oynadığını önermişlerdir. Buna karşılık Chendrimada ve ark. ise TRBP'nin sadece miRNA'nın RISC'le birleştirilmesi için

önemli olduğunu bildirmektedirler. Bunlara ek olarak bağımsız çalışmalar TRBP'nin Dicer proteinini direkt protein-protein etkileşimi sırasında düzenlediğini önermişlerdir.

İlginç olarak TRBP'nin protein kinaz R (PKR) yolağındaki interferon aracılı uyarılan dsRNA ve PKR yolağını aktive eden protein (PACT) ile ilişkili olduğu bulunmuştur. PKR yolağındaki aktivasyonu hücre büyümesini engelleyen ve proapoptotik aktiviteye aracılık eden uyarılmış interferon ürünlerinin genel protein sentezini aktivite etmektedir. Sonuç olarak TRBP ve PACT fonksiyonları miRNA fonksiyonel yolağında bileşenleri kontrol eden PKR fosforilasyon düzenlenmesi ve PKR yolağındaki sitoplazmik pre-miRNA aktivasyonunu önlemektedir.

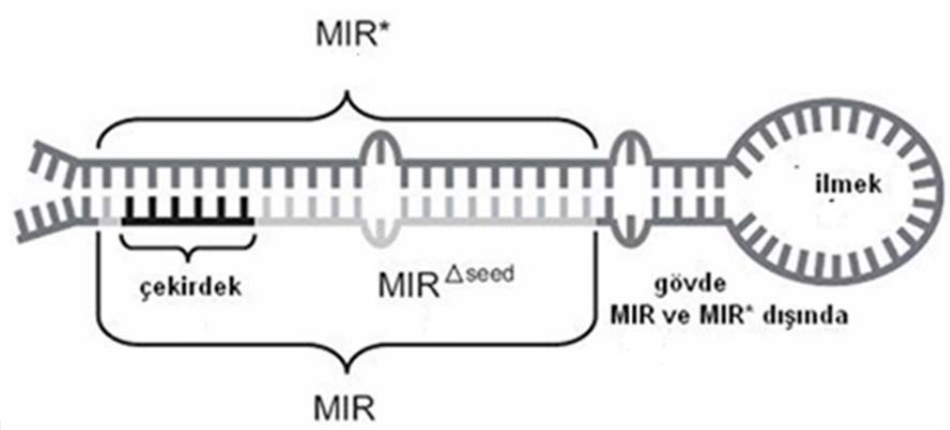


Şekil 1.5. miRNA ve mRNA'nın 3'UTR bölgesinin baz eşleşmesi (Diedrich ve Haber, 2007)

1.2.3.3. pre-miRNA'nın yapısı

Pre-miRNA farklı görevleri olan birimlerden oluşur. Bu birimler:

1. Çekirdek Bölgesi
2. Çekirdeğin dışında kalan olgun miRNA bölgesi($MIR^{\Delta seed}$)
3. Olgun miRNA ile baz eşleşmesi oluşturan gövde bölgesi (MIR*)
4. Olgun miRNA (MIR) ve MIR* kapsamayan gövde bölgesi
5. İlmek bölgesi (Şekil 1.6)



Şekil 1.6. pre-miRNA yapısı (Mendell, 2005)

Çekirdek bölgesi miRNA'nın 5' ucundaki 2-8 nükleotidleri arasındaki bölgedir. Bu bölge mRNA'yı tanıyarak baz eşleşmesi oluşturan bölge olduğu için ayrı bir öneme sahiptir (Di Leva ve ark, 2006; Mendell ve ark, 2005; Saunders ve ark, 2007).

1.2.4. RISC Birleştirme Düzeneği

Çift zincirli miRNA genellikle; dupleks molekül içeren bir tamamlayıcı iplik ve yolcu miRNA iplikten (aynı zamanda rehber iplik olarak da bilinen) meydana gelir ve genel olarak miRNA:miRNA* olarak simgelenir. miRNA yolcu ipliği, miRNA:miRNA* şeklinde ifadelenen tamamlayıcı miRNA ipliğini içeren duplekse kısa süreli olarak aktarılır. Bununla birlikte bazı miRNA dupleksleri mükemmele yakındır. Sonuçta miRNA dupleksi çözünür ve tek zincirli olgun miRNA hedef miRNA'yı bölebilmesi için RISC protein kompleksiyle birleşerek yol gösterir. RISC kesilmesi ve aktivasyonları miRNA dupleksinde yolcu iplik ile kılavuz arasında mükemmele yakın uyumu olan *Drosophila melanogaster* ile çalışılmıştır. Bu çalışmada *Drosophila melanogaster'*daki RISC birleşme modelinde tamamlayıcı tekli zincirin ago2'ye yönelmesine izin vermeyen

dupleksin çözünmesinin ATP'den bağımsız olduğu bir model önermişlerdir (Matranga ve ark, 2005; Rand ve ark, 2005).

1.2.4.1. *Drosophila melanogaster*'da RISC'in Yüklenmesi

Drosophila melanogaster modelindeki RISC yüklenmesinde miRNA:miRNA* dupleksindeki yolcu iplik, 5' uçlu zincir miRNA'nın termodinamik sabitliliğine bağlı olarak seçilir. Nadiren bazı örneklerde tamamlayıcı miRNA'nın miRNA:miRNA* dupleksindeki her iki zincirde de yer aldığı gösterilmiştir. miRNA dupleksinin çözünmesi ve bozunması RISC'in fonksiyonu olarak tek iplikli tamamlayıcı miRNA'da ve ago2 bölünmesi ile yolcu ipliğin serbest bırakıldığı siRNA'da da aynı olduğu bulunmuştur (Maniataki ve Mourelatos, 2005). Yolcu ipliğin bölünmesinden önce RISC yüklemesinin olup olmadığı netleşmemiştir. Matranga 2005'de önerdiği model de RNA çiftinin (siRNA ve miRNA) yolcu ipliği oluşturulduktan sonra kılavuz ipliğe bırakarak RISC üzerindeki ago2'ye bağlanır ve bu şekilde yüklenir. Tek iplikli tamamlayıcı miRNA'nın ago2'ye bağlanması RISC aktivasyonunun sonucudur.

1.2.4.2. İnsanlarda RISC'in Yüklenmesi

İnsanlarda, 4 arganut protein etrafında, protein birleşim merkezine dayalı olan 8 sınıflı RISC kompleksi vardır (Macrae ve ark, 2008). Genomik analizler arganut proteininin başlangıç proteininden geliştiğini göstermektedir (Anantharaman ve ark, 2002). Ago2 mRNA'daki bölünmeyi katalizleyebilen bölücü aktivitesi olan bir proteindir. Bununla birlikte 4 ago proteini de miRNA ile ilişkilidir ve gen bölünmesinde fonksiyon gösterir. Spesifik ago proteininin bölünme mekanizması ile ilişkili olup olmadığı net değildir. RISC yükleme kompleksinin çekirdek bileşenleri Dicer ago2 PACT ve TRBP'dir (Macrae ve ark, 2008). miRNA'ya bağlanan RISC, ribonükleoprotein kompleks içeren miRNA tarafından dizayn edilmiştir.

İnsanlardaki miRNA RISC birleşme mekanizması henüz anlaşılmamıştır. Hipotezler genellikle *Drosophila melanogaster* modelinden köken almaktadır. Dupleks çözülmenin mekanizması bilinmemektedir. Bununla birlikte sürecin insanlarda ATP'den bağımsız olduğuna dair kanıtlar vardır (Meister ve ark, 2005). Dupleksin çözünmesinde pek çok hipotez mevcuttur: Dicer yolcu ipliği keser ve tamamlayıcı tek iplikli miRNA'yı ago2 proteini yakalayabilsin diye serbest bırakır. Bu modele alternatif olarak ago2 miRNA kılavuzunu tutarak yüklü bir duplekste yolcu ipliği ayırır. Aynı zamanda belirlenemeyen bir helikaz tarafından miRNA'nın RISC ile birleşmesi sırasında üç boyutlu yapıdaki değişmelerle dupleksin çözünmesi başlar.

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda RNA helikaz ve DHX9 NDHIII'ün insanlardaki miRNA yolağında RISC aktivasyonları ile ilişkili olan RNA dupleks çözünmesinden sorumlu olabileceği önerilmiştir. RNA HelikazA (RHA) helikaz aktivitesi, ssRNA, dsRNA ve dsDNA bağlama yeteneği olan DEAH box proteinidir (Robb ve Rana, 2007). RHA'nın 3' ucu ile RNA:RNA* dupleksini çözme yeteneği vardır fakat RHA'nın etkisi tam bilinmemekte olup ilgili proteinlerin RHA etkileşimine bağımlı olduğuna inanılmaktadır. RHA'nın diğer ago2 ve TRBP ile ilişkisi ise RNA:RNA* dupleksinin çözünmesi için üç boyutlu yapıdaki değişiklerle gerçekleşir. Ek olarak helikaz'ın Moloney lösemi virüsü 10 homolog (MOV 10) ago2 RISC kompleksi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Fakat MOV10'un RNA dupleks yapısının çözünmesiyle ilişkili olup olmadığı belirlenememiştir. Yoda ve ark. Yaptığı çalışmada (2010) Dicer kesilmesi ve RISC birleşmesinin birbirinden bağımsız olduğu ve ATP'ye bağımlı bir mekanizma olduğunu önermişlerdir. Bu bulguları onaylanabilmesi için daha çok çalışmanın yapılması gerekmektedir (Meister ve ark, 2005).

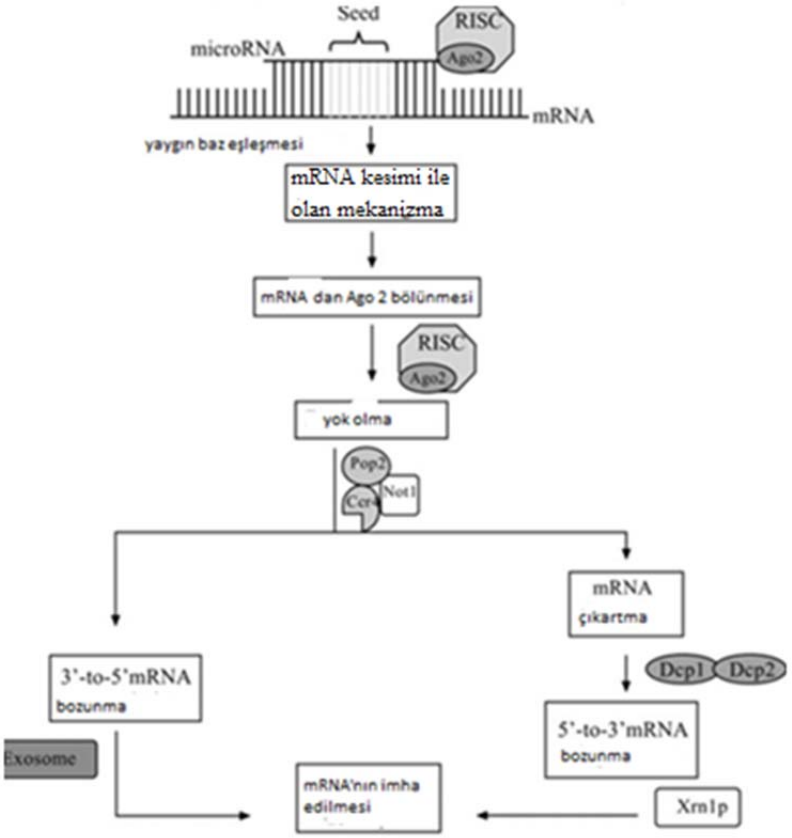
1.2.5. Hedef Tanıma

Hedef mRNA RISC bağlama aktivitesi Watson–Crick'in baz eşleşmesine göre klavuz iplik ve hedefteki 3'UTR arasında gerçekleşir (Wightman ve Ruvkun,

1993; Lee ve ark, 1993). Hedef tanıması kılavuz miRNA ve çekirdek arasındaki baz eşleşmesine dayanmaktadır. Ago2 endonükleaz baz eşleşmesini mükemmele yakın bir şekilde böler (Yekta ve ark, 2004). Hayvanlarda miRNA genellikle kök ile %100 eşleşir fakat karakteristik çıkıntıları ile tam eşleşemeyen RNA hibritleri sonucu oluşan tam miRNA ile eşleşemez. Kök ile bağlanması miRNA özelliğine ve aktivitesine katkı yaparak etkileşimdeki termal kararlılık için önemlidir (Doench ve Sharp, 2004; Saxena ve ark, 2003). Guanin (G) ve Urasil'in (U) çekirdekte temel eşleşmesi başlangıçta miRNA fonksiyonuna zarar verici olduğu düşünülse de, miRNA:miRNA* etkileşimi G, U eşleşmesiyle de oluşabilir fakat bu miRNA'nın özgünlük ve etkinliğini etkiler. Yapılan son araştırmalar bu durumun bütün miRNA'lar için geçerli olamadığını göstermiştir. Memelilerde miR196 hedef HoxB8'in çekirdek merkezinde U5 de yanlış G,U eşleşmesi olmasına rağmen mükemmel eşleştiğini ve bununla birlikte HOXB8'i düzenlenmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir (Brennecke ve ark, 2005; Doench Sharp, 2004).

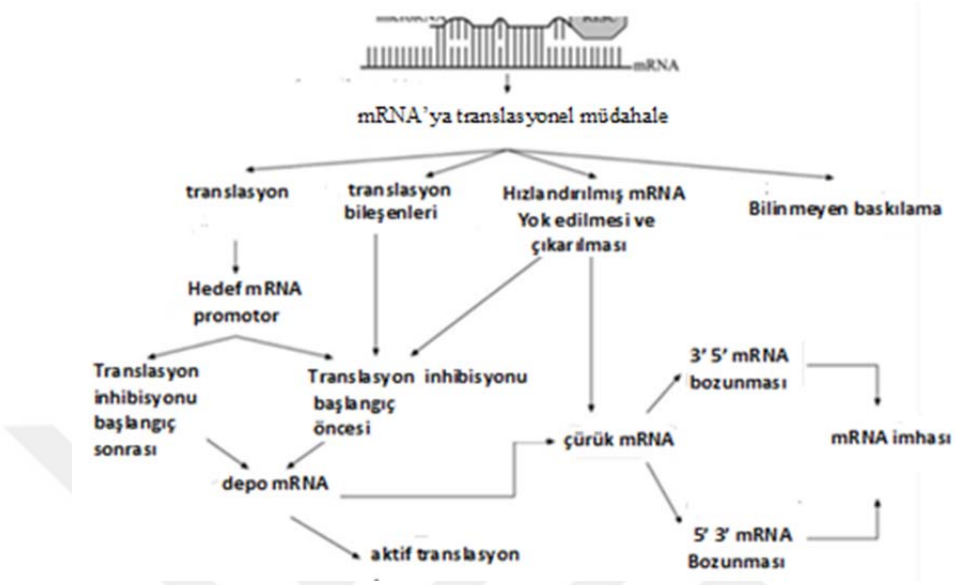
1.2.6. Baskılama

Yaygın olarak miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlandığı ve ekspresyonunu negatif düzenlediği kabul edilir. Tek bir miRNA kılavuzu çeşitli mRNA hedefi ile düzenlenir. Bulgular 2 tane baskılama mekanizmasını desteklemektedir. Bu mekanizmalar doğrultusunda miRNA'lar mRNA'ları keser ya da translasyonlarına müdahale eder (Coller ve Parker, 2005).



Şekil 1.7**.** mRNA kesimi ile olan mekanizma (Valencia-Sanchez ve ark, 2006)

Hedef bölge ve miRNA baz eşleşmesi olduğunda mRNA kesimi ago 2 tarafından katalizlenmektedir. Kesim işlemi iki farklı prosesle gerçekleşir. Her ikisi de mRNA'daki poli-A kuyruğunun yok edilmesiyle başlar. Sonraki yıkılma 3'-5' endonükleaz aktivitesi ile çoklu protein kompleks olan ekzom tarafından gerçekleştirilir. Alternatif olarak miRNA ekzoribonükleaz Xrn1p tarafından 5'-3' tarafında bozunan Dcp1 ve Dcp 2 enzimlerinin çıkartılması ile gerçekleştirebilir (Şekil 1.7) (Valencia-Sanchez ve ark, 2006).



Şekil 1.8. mRNA'ya translasyonel müdahale (Bagga ve ark, 2005)

mRNA dupleksindeki çıkıntılarının yarattığı iyi olmayan baz eşleşmesi ago2 aktivitesi ile bölünür. Hedef mRNA'daki translasyonun baskılanmasında arganut proteini etkili değildir. miRNA translasyonunun inhibisyonunun belirgin bir modeli yoktur. Fakat çeşitli yollarla oluşturulabileceği açıktır. Translasyon; başlama, uzama ve sonlanma olarak birden fazla protein faktörü koordinasyonu gerektiren üç aşamadan oluşur (Richter ve Isono, 1977). Memeli hücrelerinde yapılan deneysel çalışmalar ile sağlanan bulgular translasyondaki miRNA inhibisyonunun başlangıç ve uzama evrelerinin her ikisinde de olduğunu desteklemektedir. Bununla birlikte seçim mekanizması netleşmemiştir. Yapılan çalışmalarda promotorun transkriptte hedef mRNA'yı belirlemek için kullanıldığı önerilmiştir. Translasyon, bileşenlerinin ayrılmasıyla dolaylı olarak düzenlenir. Örneğin miRNA ve hedef miRNA translasyon düzeyinden uzaklaştırılarak p-cisimciği olarak da bilinen sitoplazmik odak noktaları içine tek başına bırakılır. Buna ek olarak miRNA hedef miRNA'nın yok edilmesini hızlandırır ve kesilme aktivitesini bağımsız olarak çıkartır. Dolayısıyla translasyon başlangıç verimini ve transkript kararlılığını etkiler. Daha sonraki etkiler mRNA kesimi ile olan

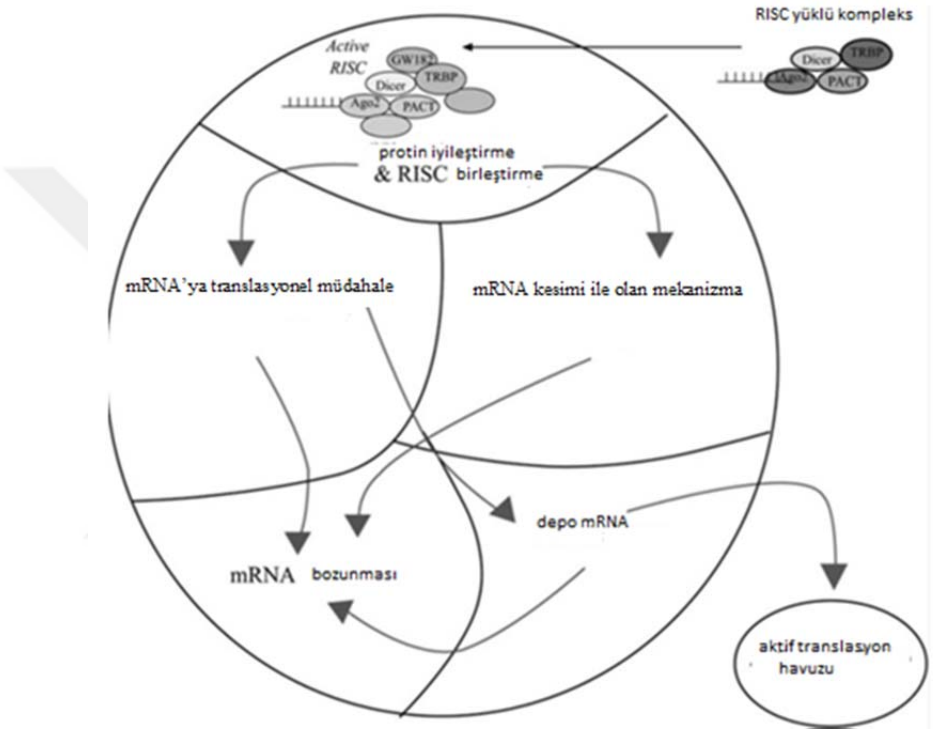
mekanizma ve mRNA translasyonel müdahale gibi aynı ekzon ve Xrn1p enzimatik bozunma aracılığıyla hedef mRNA'nın çürümesine yol açar. Araştırmacılar bölücü bağımsız RNA bozunmasındaki çözümlenememiş sorunlar için bilinmeyen alternatif mRNA çürüme yolaklarının olduğunu önermişlerdir (Şekil 1.8.) (Wu ve ark, 2007; Bagga ve ark, 2005).

1.2.6.1. P-cisimciği

P-cisimciği insan hücrelerinden maya hücrelerine kadar yaygın bir etki alanı bulunan dinamik küçük küresel sitoplazmik proteinlerdir (Cougot ve ark, 2004). P- cisimciği'nin fonksiyonu ve yapısı hakkında yürütülen çalışmaların büyük bir çoğunluğu mayalar üzerinde yapılmıştır. Yapıları insanlardakine benzer olmasına rağmen memelilerde fonksiyonel çeşitlilikle ilişkilendirilen spesifik proteinleri vardır. Hücrelerde stres granüllerine benzer sitoplazmik alanları bulunmaktadır. Ekzonlarda çoklu veziküller gibi bazı protein bileşenleri içerir. Bununla birlikte Dcp1, 4E-T, GE-1/hedls,p54/RCK ve Xrn1 gibi işaretleyici proteinleri vardır (Kedersha ve ark, 2005). Bu küçük sitoplazmik alanları sınıflandırabilmek için fonksiyon, bulundukları yer, büyüklük, içerdikleri proteinler gibi çeşitli özellikleri kullanılır. Bu durum kısmen yapılarındaki dinamik doğadan kaynaklanmaktadır. P-cisimciği, glukoz seviyesi, ozmotik basınç ve hücre yenilenmesininde içinde bulunduğu çeşitli hücresel faktörlerden etkilenir (Teixeira ve ark, 2005). Benzer olarak sıcaklık, enfeksiyon, ultraviole ışık gibi çevresel faktörlerden de etkilenirler (Kedersha ve ark, 1999).

Kollektif çalışmalar p-cisimciği'nin mRNA'nın tersinir işlevini önlediğini, miRNA kesimi içeren çeşitli mekanizmalara aracılık ettiğini ve mRNA'yı bozduğunu göstermektedir (Chan ve Slack, 2006). miRNA kesilmesi ve p-cisimciği ilişkisine yönelik ileriki araştırmalar RISC'i etkileyen protein ago 1-4 ün yolcu ve kılavuz ipliğinin miRNA dupleksi ile p-cisimciği'nin içinde yer aldığını göstermektedir. P-cisimciği ve miRNA fonksiyonları birbiri için çok önemlidir (Şekil 1.9.) (Jakymiw ve ark, 2006). Yapılan araştırmadaki bulgular açık bir

şekilde p-cisimciği'nin GW182 boşaltılması ile miRNA fonksiyonlarını önemli ölçüde harap ettiğinden ötürü p-cisimciği'nin miRNA için çok önemli olduğunu göstermektedir. Tersine mikroişlemci kompleksin çıkarılması p-cisimciği oluşumunu inhibe eder.



Şekil 1.9. P-cisimciği modeli (Pauley ve ark, 2006)

RISC birleşmesi ve aktivasyonu, GW182'nin miRNA çiftlerinin ve ago2 proteininin p-cisimciği içerisinde yerleşmesini sağlar. GW182 lokalizasyonu ve protein ilişkisi RISC'in önemli bir bileşeni olduğu, mRNA kesimi ile olan mekanizma ve mRNA'ya translasyonel müdahale'ye dahil olarak fonksiyonel rol aldığını önermişlerdir. Bu model hipotezinde bölünmeyi etkileyen protein bölücü mRNA kesimi ile olan mekanizma ve mRNA'ya translasyonel müdahale'de RISC iyileştirmesi için p-cisimciği içinde özel kısımlar olduğunu önermektedir (Pauley ve ark, 2006).

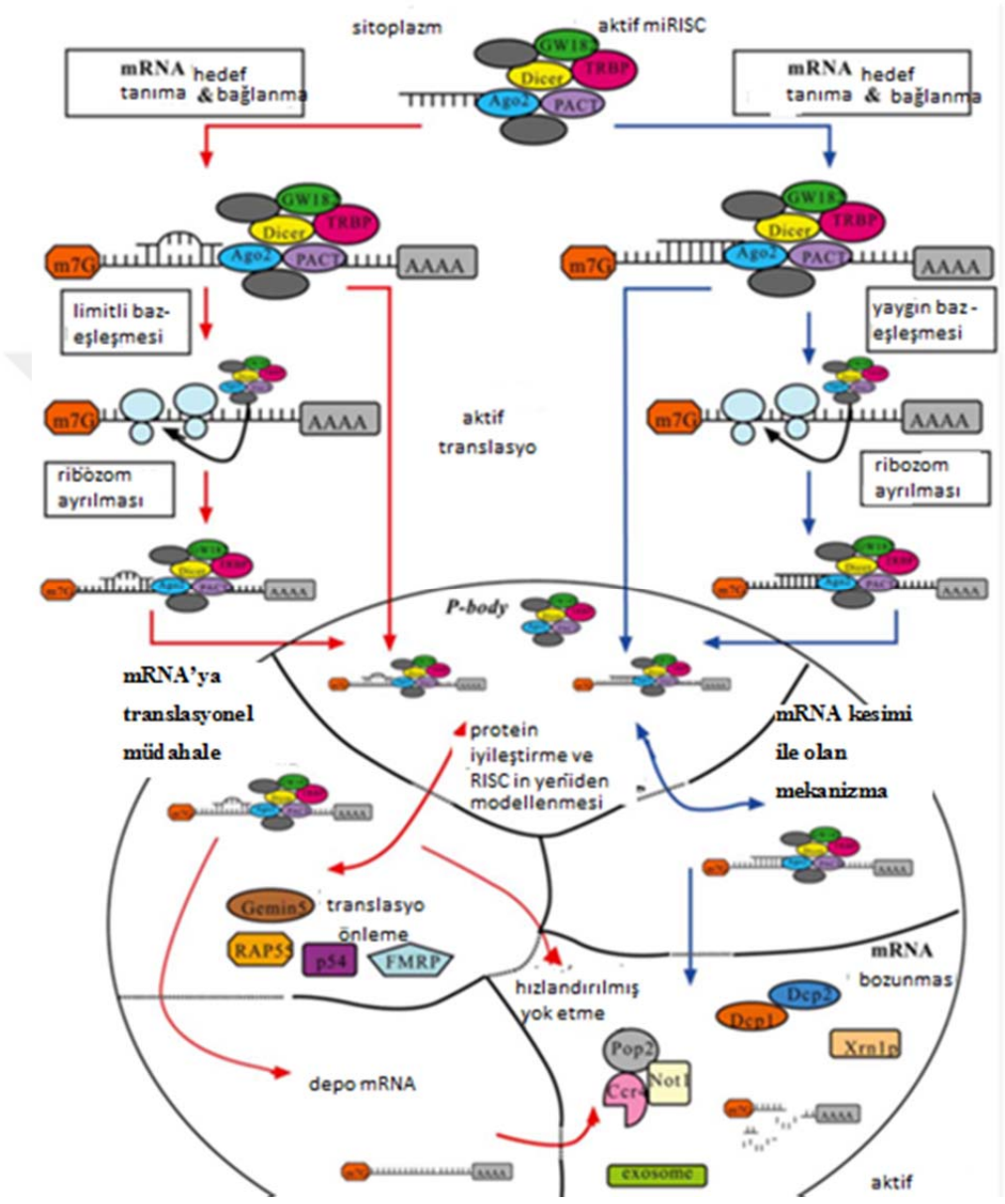
miRNA bölünmesi miRNA bozunmasından sorumlu özel p-cisimciği kısımlarında direk olarak bölücü tarafından oluştuğu düşünülmektedir. P-cisimciği içinde yok etme enzimi olan Ccr not1 Pop2, Dcp1, Dcp2 ve nükleaz Xrn1p gibi mRNA bozunma sürecini sağlayan enzimler içerir (Parker ve Sheth, 2007) .

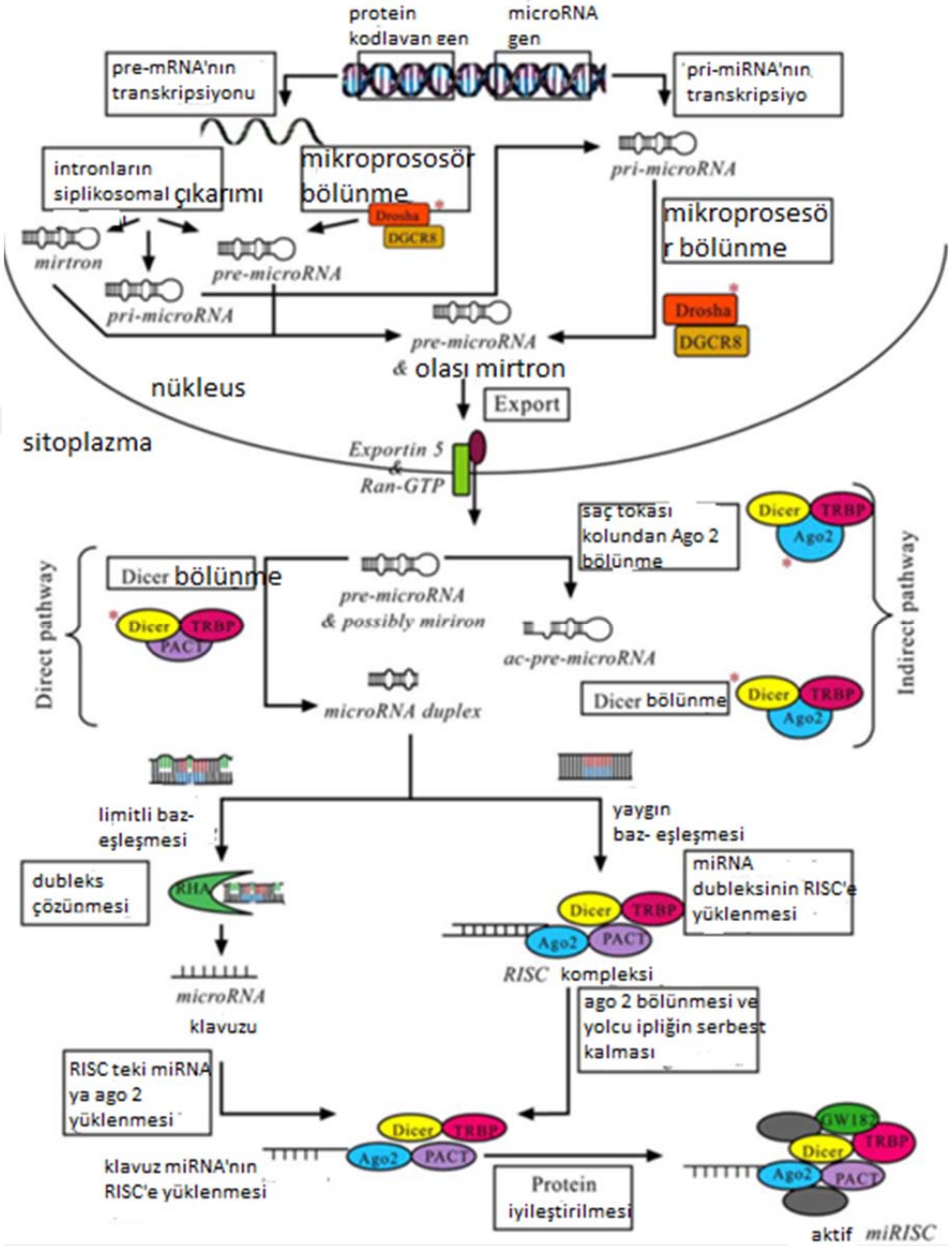
P-cisimciği'nin translasyonunu kontrol eden enzim ve faktörler; özellikle p54, FMRP, Gemin5 ve RAP55, miRNA aracılığıyla translasyonu baskılama ve mRNA depolara yönlendirmesi için gerekmektedir (Jakymiw ve ark, 2007; Chu ve Rana, 2006). Depolama kompartmanları enzimleri bozulmadan izole edilmelidir ve eğer traskript bozulur veya aktif translasyon sitoplamzaya geri dönerse diye mRNA durumunu yönetebilmek için bir mekanizma ihtiyaç duyar (Bhattacharyya ve ark, 2006). Öte yandan, poliribozom tarafından aktif olarak çevirilen mRNA'lar, çevirim başlatma ve/veya uzamasını önlemek için, sitoplazmadaki miRNA indüklenmiş bölücü kompleks (miRISC) tarafından hedeflenir. Bu mRNA'lar daha sonra depolanmak veya bozunmak için yönlendirilebilir. miRNA'nın mRNA'ya aktif olarak çevrilmesinin önlenmesi ile miRNA ve arganut proteinlerinin sitoplazma içerisinde neden bulunduğu açıklanabilir.

1.2.6.2. Nükleusta miRNA'nın Baskılanması

Bugüne kadar yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu miRNA'nın transkripsiyonu sonrası, miRNA kesiminin sitoplazma ve p-cisimciğinde olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte son zamanlarda insan hücrelerindeki nükleusta miRNA ve arganut proteini keşfedilmiş ve mRNA'da gen ifadelenmesini baskıladığını göstermişlerdir (Jakymiw ve ark, 2006). miRISC'in nükleaz içine toplanabilir olması önemlidir. *Caenorhabditis* ile yapılan çalışmalarda arganut proteini NRDE3'ün belirlenmesi nükleustaki siRNA için önemlidir (Guang ve ark, 2008). İnsanda da buna benzer aynı fonksiyonda bir transfer edici protein olduğu düşünülmektedir.

1.2.7. miRNA'nın Çalışma Modeli





Şekil 1.10**.** miRNA'nın çalışma modeli (Mac Farlane ve Murphy, 2010)

Genomdaki miRNA'nın harekete geçirilmesi pre-miRNA'nın veya polisistronik birincil miRNA transkriptinden herhangi birinin transkripti ile oluşur.

Spliceosome denilen kesim enzimleri tarafından mRNA'dan miRNA'nın ayrılması miRNA öncül molekülleri, mirten, pri-miRNA veya pre-miRNA'nın üçünden birinin serbest bırakılmasıyla olur. Pri-miRNA ssRNA- dsRNA birleşme yerinden 11nt'lik bir kısmın bölündüğü mikrosüreç kompleks tarafından pre-miRNA'dan oluşur. Pre-miRNA eksportin 5/ran GTP yolağında sitoplazmaya transfer edilir. Pre-miRNA sitoplazmada 2 alternatif yolla miRNA çiftine olgunlaştırılır. Direkt yol TRBP ve PACT ile ilişkisi olan Dicer tarafından bölünmesi ile gerçekleşir. Buna karşılık dolaylı yol ise Dicer ago2 ve TRBP kompleksini içeren 2 basamaklı bölünme sürecidir. Buna ek olarak ago2 proteininin bölünmesi Dicer için substrat gibi davranan ac-pre-miRNA'yı üretir. miRNA çifti Dicer, TRBP ve PACT içeren RISC yükleyen kompleks ile ago2 ye yüklenir. Eğer miRNA çifti ago2 ile büyük ölçüde baz eşleşmesi yaparsa kararlı olan 5'ucundan bölünmeye başlar yolcu ipliği oluşturur. Ago2 ile bağlı kılavuz ipliğe ayrılmayı ve bozunmayı tetikler.

Aktif miRISC, mRNA kesimi ile olan mekanizma ve mRNA'ya translasyonel müdahale'yi baskılamak için düzenleyici protein içeren hedef kılavuzun olduğu p-cisimciği'nin iyileştirme yerine transfer edilmek veya direkt olarak mRNA'ya translasyon edilmek için bekler.

1.3. miRNA ve Kanser

Hücreler anormal olarak çoğaldıklarında ve apoptoz fonksiyonlarını kaybettiklerinde genellikle kanserleşirler. miRNA'ların hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte etkili anahtar moleküller oldukları bugün bilinmektedir. Kanserleşme sürecine miRNA'ların katkıda bulunduğunun ilk kanıtı, Calin ve arkadaşlarının 2001 yılında Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarda yaptıkları moleküler çalışmayla ortaya konulmuştur. KLL batı toplumlarında en sık görülen yetişkin lösemi formudur. KLL hastalarının yaklaşık

%50'sinde 13q14 bölgesi bozunmaya uğramaktadır. Detaylı bozunma analizleri sonucunda bu bölgede yalnızca miR-15-a ve miR-16-1 genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Daha sonra KLL hastalarının %68'inde bu miRNA'ların ekspresyonlarının azaldığı ya da olmadığı ortaya konmuştur (Saydam ve ark, 2011; Calin ve ark, 2001).

Kanser ve normal doku arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, miRNA'ların kanser patogenezindeki rollerini güçlendirmiştir. Calin ve arkadaşları, 245 insan ve fare miRNA probu içeren miRNA mikroarray çalışmasıyla miR-15-a ve miR-16-1'in ekspresyon düzeylerinin KLL hastalarında belirgin şekilde azaldığını rapor etmişlerdir. miRNA ekspresyon profilinin, KLL hastalarının klinik ve biyolojik davranışıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Saydam ve ark, 2011; Calin ve ark, 2001). Calin ve arkadaşları, 2004 yılında yayınladıkları diğer bir çalışmada, insan miRNA genlerinin kanser ile ilişkisini araştırmak için, 186 adet miRNA geninin DNA üzerindeki pozisyonunu haritalandırmışlardır (Wijnhoven ve ark, 2007). Bu genlerin kromozomal pozisyonlarını, daha önceden rapor edilen belirli kanser türlerinin gelişimi ile ilişkili olduğu bilinen genetik değişiklikler ile karşılaştırmışlardır. miRNA genlerinin çoğunlukla, heterozigotenin kaybolduğu bölgeler olan kırılgan kısımlara yerleşik olduğunu göstermişlerdir. Bu kırılgan kısımlar amplifikasyonun minimal olduğu bölgeler veya genel kromozomal kırılma noktası bölgeleridir. Bu moleküler lezyonlar sonucu oluşan genetik hasar sipesifik kanserlere neden olmaktadır (Saydam ve ark, 2011; Wijnhoven ve ark, 2007).

2003 yılında Michael M.Z. ve arkadaşları, ilk olarak insanlardaki tümörlerde (kolonik ve rektal adenom karsinomlar) normal dokular ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyeleri değişmiş olan miRNA'ları rapor etmişlerdir (Michael ve ark, 2003). Daha sonraki yıllarda değişikliğe uğramış miRNA seviyeleri meme kanserinde (Quesne ve Caldas, 2010), Burkitt's lenfomada (Metzler ve ark, 2004), tiroid kanserinde (He ve ark, 2005), beyin kanserinde (Chan ve ark, 2005), akciğer kanserinde (Hayashita ve ark, 2005),

prostat kanserinde (Sevli ve ark, 2010) ve hepatosellüler karsinomda (Murakami ve ark, 2006) keşfedilmiştir.

miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki özelliğine göre onkogenik veya tümörsüpresör özellik kazanabilir. Normal dokularda, miRNA'ların bazılarının protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu miRNA'lar "tümör supresör miRNA'lar" (TS-mir) olarak ifade edilmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur. Bunun tersi olarak, "onko-mir" olarak ifade edilen bazı miRNA'ların kanserin gelişimini arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA'lar bir tümör supresörün baskılanmasını sağlarlar. miRNA'lar, onkogen ve tümör supresör mRNA'ların her ikisini de potansiyel hedef olarak görebilir. Bu yüzden, belirli bir miRNA'nın gerçek fonksiyonu ya TS-miR'in veya onko-miR'in hücresel içeriğine bağlıdır (Cowland ve ark, 2007).

1.4. Tümör Supresör miRNA'lar

miRNA'ların kanserleşme sürecine etkisi ilk olarak 2001 yılında miR-15a ve miR16-1'in keşfedilmesi ile rapor edilmiş olup (Calin ve ark, 2001), bu miRNA'ların etki mekanizması ise 2005 yılında Cimmino ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışma ile ortaya konmuştur (Cimmino ve ark, 2005). Bu iki miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hücrelerinde, anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteini olan Bcl-2'nin üretimi ile ters ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle Cimmino ve arkadaşları miR-15a ve miR16-1'in tümör supresör aktiviteye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Bu iki miRNA'nın düşük seviyelerinin (tümör supresör fonksiyon kaybı) yüksek seviyede Bcl-2 proteini ile ilişkili olduğu dolayısıyla anormal hücre büyümesini gerçekleştirdiği yüksek seviyelerinin (normal tümör supresör aktivite) ise apoptoz ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Normal seviyelerinin kontrolsüz hücre

büyümesini engellediği rapor edilen miR-15a ve miR16-1'in böylelikle tümör supresör aktiviteleri belirlenmiştir (Cimmino ve ark, 2005).

Tümör supresör özellik gösteren diğer bir miRNA, let-7 ailesinin üyeleridir (let-7b, let-7c, let-7d, let-7f ve let-7g). Akciğer kanserli hastaların akciğer dokusu, normal akciğer dokusu ile karşılaştırıldığında çoğunlukla düşük let-7 seviyeleri gözlenmiştir. Bir akciğer kanseri hücre kültürü modelindeki let-7 seviyeleri, normal hastaların akciğer dokusundaki let-7 seviyelerinden daha yukarılara çıkarıldığı zaman, kanser hücrelerinin büyümesinin önemli derece düştüğünü rapor edilmiştir (Hayashita ve ark, 2005).

Johnson ve arkadaşları, 2005 yılında let-7'nin insanlarda bulunan önemli bir onkogen olan RAS proteininin aktivitesini kontrol ettiğini bulmuşlardır (Johnson ve ark, 2005). Yapılan bu çalışmada, düşük seviyelerde let-7 ihtiva eden akciğer tümör dokuları, önemli derecede artmış RAS protein seviyelerine sahiptir. RAS onkogeninin mRNA dizisi, let-7'nin bu mRNA'ya bağlanmasını ve dolayısıyla proteine translasyonunu engellemesini sağlayan bölgeleri içermektedir. Let-7'nin düşük seviyeleri, RAS geninin kontrolsüz bir şekilde fonksiyon göstermesine imkan tanımaktadır (Johnson ve ark, 2005). Sonuç olarak let-7 ailesinin üyelerinin, RAS onkogenin mRNA'sını hedefleyen bir tümör supresör fonksiyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Son yapılan çalışmalarda, let-7 miRNA ailesinin üyelerinin çok iyi tanımlanmış onkogenler olan HMGA2 (Lee ve Dutta, 2007) ve c-Myc (Sampson ve ark, 2007)'nin mRNA'larını da inhibe ettikleri rapor edilmiştir.

Üç adet izoformu bulunan miR-29 (miR-29a, miR-29b, miR-29c), tümör supresör karakter sergileyen miRNA'lar arasındadır. İzoformu bulunan miR-29 ailesinin üyelerinin kronik lenfosit lösemi (KLL) (Calin ve ark, 2004), akciğer kanseri (Lin ve ark, 2010), invaziv meme kanseri (Iorio ve ark., 2005), akut miyeleoid lösemi (AML) (Garzon ve ark, 2008) ve kolanjiyokarsinom (Mott ve ark, 2007) hücrelerini baskılayıcı olarak aktivite gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur.

Araştırmacılar miR-143'ün birçok histolojik tümör türünde, anormal büyümeyi baskıladığını rapor etmişlerdir. B-hücreli kanserler (Bruchova ve ark, 2008), meme, serviks (Lui ve ark, 2007), kolorektal (Slaby ve ark, 2008), mesane (Lin ve ark, 2009) ve hipofiz tümörlerinde (Amaral ve ark, 2009), miR-143'ün tümör süpresör olarak görev yaptığı rapor edilmiştir. Serviks kanserinde miR-143'ün hücre yenilenmesini baskıladığı, kolorektal kanser hücrelerinde ise KRAS genini (viral onkogen) ve KRAS geninin aşağı sinyal yolunu doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir.

1.5. Onkogenik miRNA'lar

Tümör supresör miRNA'ların tersine, onkogenik miRNA'lar çoğunlukla kanser türlerinde kontrolsüz büyümeyi arttırıcı ve/veya anti-apoptotik yönde fonksiyon göstermektedirler. İlk olarak keşfedilen onkogenik miRNA'lardan bir tanesi, protein kodlamayan gen olan BIC (B cell integration cluster ; B hücre entegrasyon kümeleri) ile beraber eksprese edilen miR-155'tir. Onkogenik miRNA'lardan miR-155'in hedef mRNA'sı tam olarak belirlenememiş olmakla birlikte, ekspresyonunun tavukta lösemi ve lenfoma oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (Tam ve ark, 1997). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, miR-155'in B hücreli lenfoma (Eis ve ark, 2005), meme (Iorio ve ark, 2005), pankreas (Gironella ve ark, 2007), akciğer (Lin ve ark, 2010) ve Hodgink's lenfoma (Kluiver ve ark, 2005) gibi kanserlerde yüksek ekspresyon sergilediği gösterilmiştir.

Bir onkogen gibi fonksiyon gösterdiği tespit edilen diğer bir miRNA ise miR-21'dir. Bu miR-21'in Akut Miyeloid Lösemi (AML), KLL ve glioblastoma (Ciafre ve ark, 2005) gibi hematolojik malign'lerde ve katı tümörlerde, pankreas, prostat, mide, kolon, akciğer, meme (Volinia ve ark, 2006) ve karaciğer kanseri (Meng ve ark, 2007) gibi birçok kanser türünde yüksek seviyede ekspresyonu olduğu bildirilmiştir. miR-21, transkripsiyonel olarak Stat 3 geni tarafından IL-6 sinyal yolağında aktif duruma geçmektedir (Loffler ve ark, 2007). İnvazyon ve metastaz olaylarında miR-21 çok iyi karakterize edilmiştir. Ayrıca miR- 21, hücre

hareketini ve invazyonu, tümör süpresör bir protein olan PTEN'in mRNA'sını hedefleyerek teşvik etmektedir. PTEN, birkaç MMP (Matriks Metalloproteaz)'nin ekspresyonunu engelleyerek dolayısıyla hücre invazyonunu azaltarak tümör supresör bir etki göstermektedir (Meng ve ark, 2007).

İnsan genomunda kromozomun 13q31.3'ünde miR-17-92 gen kümesi yerleşiktir ve altı adet miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR- 20a, miR-19b-1, miR-92-1) kodlamaktadır. Bu miR-17-92 gen kümesi, onkogenik olduğu gösterilen ilk miRNA'yı kodlayan bir bölgedir. c-Myc onkogeninin fazla ekspresyonunun gerçekleştiği transgenik farelerde miR17-19 gen kümesinin yüksek seviyede ekspresyon neden olarak B hücreli lenfomanın gelişimini artırdığı belirlenmiştir (He ve ark, 2005). Bu gen kümesinin, akciğer gelişiminde, bağışıklık ve hematopoeitik sistemlerin düzenlenmesinde anahtar rol oynayan bir bölge olmasına bağlı olarak, miR-17-92 gen kümesinin üyelerinin çok çeşitli katı tümörlerde, hematolojik malignensilerde, meme, kolon, akciğer, pankreas, prostat, mide ve lenfomaları da içine alan kanser türlerinde yüksek seviyede ekspresyonu gerçekleşmektedir (Mendell, 2008). Ekspresyon sonucu oluşan miRNA'lar, proliferasyonu teşvik ederek, apoptoz inhibisyonunu sağlayarak ve tümör anjiyogenezi tetikleyerek kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır. miR-17-92 gen kümesinin kanser gelişimine katkısının iki mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunlardan bir tanesi birkaç lenfoma ve kanser türünde görülen 13q31 lokusunun amplifikasyonu, diğer mekanizma ise miR-17-92 gen kümesinden kodlanan pri-miRNA'nın transkripsiyonel aktivasyonudur. Onkogenik transkripsiyon faktörü olan c-Myc, miR-17-92 gen kümesinin yukarı bölgesine bağlanarak bu genin ekspresyonunu aktive etmektedir (O'Donnell ve ark, 2005). Ayrıca E2F ailesinin üyelerinin (E2F 1,2 ve 3) de miR-17-92 gen kümesini aktive ettiği gösterilmiştir. E2F 1,2 ve 3 bu gen kümesinin aktivasyonunu sağlamakla birlikte, bu kümedeki miR-17 ve miR-20a tarafından gerçekleşen baskılamanın hedefi durumundadır. Bununla birlikte, aktivasyon ve baskılama seviyeleri,

miRNA ve E2F ailesi üyelerinin bireysel çiftleri arasındaki değişkenliğe bağlıdır (Lee ve ark, 2009).

1.6. Kolorektal kanserde miRNA ekspresyonu

Kolorektal kanserdeki miRNA ekspresyonu ilk olarak Michael M.Z. ve arkadaşları tarafından 2002 yılında miR-143 ve miR-145 deki bozuklukların araştırılmasıyla başlamıştır (Michael ve ark, 2003). O tarihten bu yana kolorektal kanserle ilişkili pek çok miRNA belirlenmiş ve bunların bir kısmı Çizelge.1.1. de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Kolorektal kanserle ilişkili olan miRNA'lar (Alemdar, 2016)

Onkojenik miRNA'lar	Tümör supresör miRNA'lar
miR-15b	**miR-1**
miR-17-5 p	**miR-9-1**
miR-19a	**miR-30c**
miR-20	**miR-30a-3 p**
miR-21	**miR-30a-5 p**
miR-29a	**miR-34a**
miR-31	**miR-34b**
miR-92	**miR-34c**
miR-96	**miR-126**
miR-133b	**miR-129**
miR-135b	**miR-133a**
miR-148a	**miR-133b**
miR-181b	**miR-137**
miR-182	**miR-139**
miR-183	**miR-143**
miR-191	**miR-145**
miR-200b	**miR-195**
miR-200c	**miR-342**
miR-212	**miR-422a**
miR-135a	**miR-422b**
	let-7a-1

Çizelge 1.1. de gösterilen miRNA'lar içerisinden bazılarının tümör hücrelerini istila etme kapasitesi ve metastazla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Örneğin miR-145'in kolorektal kanserlerde onkogenik bir etki yarattığını belirlemişlerdir. Metastazla ilişkili olan miRNA'lar Çizelge1.2. de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Metastazla ilişkili miRNA'lar (Alemdar, 2016)

Yükselten	Azaltan
miR-7	**miR-34b**
miR-21	**miR-34c**
miR-31	**miR-99b**
miR-196a	**miR-125**
miR-133a	**miR-145**
miR-143	
miR-148a	
miR-378	

1.7. Bitkisel Ekstraklar

İnsanlar uzun yıllardır, bitkisel ilaçlara, sağlıklı olmak ve sağlıklı yaşamaya doğal yollardan ulaşmak amacıyla merak duymuşlardır. Bu amaçla en çok ve en yaygın olarak kullanılan bitkiler nane, adaçayı, kekik ve ısırgan otudur. Bu bitkiler doğrudan değil ekstraktlar halinde kullanılmaktadır. Dünyanın dikkati alternatif doğal ilaçlar olarak etkili yeni yöntemler bulmaya ve bitkisel ekstraktları kullanmaya odaklanmış durumdadır. Bitkisel ekstraktlar, alkoloidleri, glikozidleri, yağ asitlerini, vitaminleri ve çeşitli reçineleri içermektedir. Örneğin kafein sinir sistemini etkileyen, çay ve kahvede bulunan bir alkoloiddir. Bilinen diğer medikal alkoloidler ise kinin, kodein, morfin ve nikotindir. Salisin, söğüt ağacı kabuklarından elde edilen bir glikoziddir. Yağ asitleri ise her bitkiye göre değişir ve bitkilerde en çok bulunan yağ asitleri stearik, linoleik ve linolenik asitlerdir. Bazı bitkilerse kanser tedavisinde kullanılan bazı bileşikleri doğal yapılarında

bulundurmaktadırlar. Fakat bitkilerin bu bileşikleri kendileri için kullanmadıkları halde yapılarında neden bulundurdukları henüz bilinmemektedir.

Bitkisel ekstraktların özellikleri, bitkinin nerede, hangi tür toprakta ve hangi mevsimde yetiştiğine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu nedenle bitkisel ekstraktlar ne amaçla kullanılacaksa farmakolojik özellikleri, saflığı ve zehirlilik derecesi gibi özelliklerinin çok iyi belirlenmesi gerekir.

Günümüzde bitkisel ekstraktları kullanmak, bitkinin tamamını kullanmaktan daha güvenli, etkili ve kolaydır. Bu ekstrakları elde etmek için çözücü ekstraksiyonu, buhar distilasyonu, soxhlet ekstraksiyonu ve süper kritik CO_2 ekstraksiyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden herhangi biriyle elde edilen ekstraktlar, antiseptik, antioksidatif ve antimikrobiyal özellikler taşıyor olup hem kozmetik hem de tedavi amaçlı kullanılabilir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, nane, kuşburnu, papatya, adaçayı, kekik ve ısırgan otu ekstraktları, bu yöntemlerin hepsi ile elde edilmiş ve en yüksek verim soxhlet ekstraksiyonu yöntemiyle sağlanmıştır.

Bitkisel ekstraktlar hazırlanırken bitkinin yaprakları, kökü ve tohumu gibi çeşitli bölgeleri kullanılır ve bu ekstraktların özellikleri birbirinden farklıdır. Bitki tohumlarından elde edilen ekstraktların yağ asidi içerikleri yaprak ve kökten elde edilen ekstraktlara göre daha fazladır (Karakaş, 2003).

1.7.1. Adaçayı (*Salvia officinalis*)

Adaçayı'nın kökeni Akdeniz ve çevresi, özellikle Batı Anadolu ve Yunanistan olarak kabul edilmektedir. Ülkemiz'de güney sahillerinde 1300-1500 m'de yetişmektedir. Batı Anadolu ve Güney Anadolu başta olmak üzere, ülkemizin her yerinde çeşitleri görülmektedir (İlisulu, 1992; Kenar, 2009).

Adaçayı genel olarak 1 m büyüyen ve 30 cm yayılabilen bir bitkidir. Saçak köklü, sert saplıdır. Yaprakları oval, tüylü ve sert kaplıdır. Yaprak uzunluğu 10 cm kadar çıkar. Salkım şeklinde veya bir eksen üzerinde 4-6 kadar çiçek küme halinde

veya başak şeklinde oluşur. Çiçek rengi açık viyole az olarakta beyazdır. 2-3 mm büyüklükte yuvarlak meyveleri vardır (İlisulu, 1992; Kenar, 2009).

Adaçayı dünya genelinde gıdalarda aroma ve baharat olarak kullanılan bir bitkidir. Pek çok bitki arasında en iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Chipault ve ark, 1952; Djarmati ve ark, 1991; Pizzale ve ark, 2002; Kenar, 2009).

Adaçayı *Labiatae* familyasındandır. Bu yüzden karnosol, karnosik asit, rosmanol, rosmadial ve rosmarinik asit gibi antioksidan maddeleri içerirler. (Gerhardt ve ark, 1983; Brieskorn ve ark, 1969; Kenar, 2009). Adaçayının esas antioksidan etkisinin karnosik asit, karnosol ve rosmarinik asitten ileri geldiği araştırıcılar tarafından bildirilmektedir (Cuvelier ve ark, 1996; Kenar, 2009).

1.7.2. Isırgan Otu *(Urtica dioica)*

Isırgan otu, saplarında birbirinin karşısına gelecek şekilde yaprak dizilimine sahip, saplarında ve yapraklarının alt kısmında yakıcı tüyler bulunan, koyu yeşil renkte bir bitkidir (Calderone ve ark, 2001; Karakaş, 2003). Yapraklarının boyu 10 cm'yi bulurken bitki boyu 100 cm'yi aşabilmektedir. En çok Haziran – Eylül ayları arasında yetişen bu bitki, bahçelerde, ormanlarda, bataklık kenarlarında ve çok su bulunan bölgelerde bol miktarda bulunur. Isırgan otu yapısında 20'ye yakın kimyasal madde bulundurmaktadır. Bunların bazıları, yağ asitleri, lektinler, steroller, aminler, asitler ve poliholozitlerdir. Bu kimyasal maddeler bitkinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarında ayrılmış olarak bulunurlar.

Isırgan otunun yapısında bulunan kimyasal maddeler, ısırgan otunun antiseptik, bakterisid, kan dolaşımı ajanı, diüretik, hemostatik ve kas hareketi düzenleyici olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Karakaş, 2003). Bitkinin özellikle köklerinde bulunan histamin diüretik olup prostat büyümesini önleyici özelliktedir.

Isırgan otuna dokunulduğunda ciltte beyaz renkte kabarmalar meydana gelir. Bunun nedeni bitkinin saplarında ve yaprak altlarında bulunan tüylerin

dokunmayla kırılması ve içindeki formik asidin ciltle temasa geçmesidir. Bu etkiyi ve meydana gelen kaşıntıyı gidermek için asidi nötralize edici bir baz kullanılmalıdır. Günlük hayatta kolaylıkla bulunabilecek olan kabartma tozu ya da soda bu amaç için kullanılabilir (Karakaş, 2003).

Isırgan otu içerdiği maddeler ve bu maddelerin özelliklerinden dolayı kozmetik sektöründe ve tıpta fitoterapik uygulamalarda kullanılmaktadır. Isırgan otunun kolay bulunur ve maliyetinin düşük olması bu tür uygulamaları daha da yaygınlaştırmaktadır.

Isırgan otunun içerdiği kimyasal maddeler ısırgan otunun tıpta yaygın bir kullanım alanına sahip olmasını sağlamıştır. İçerdiği maddelerden biri olan β - sitosterol kanser olmayan prostat büyümesine karşı kullanılan bir maddedir.

Isırgan otunun en yaygın kullanıldığı alan romatizmal hastalıklardır. Bunların dışında ısırgan otu şeker hastalığında, sivilce, sedef ve egzama gibi deri hastalıklarında, kızamık ve çiçek hastalıklarında ve yüksek tansiyona karşı kullanılmaktadır.

1.7.3. Tere *(Lepidium sativum)*

Cruciferae (Brassicaceae) ailesinden, dik gövdesi 20-50 cm boylarında, bir yıllık otsu bitkidir. Salata bitkisi olarak dünyanın pek çok yerinde kültürü yapılır (Davis, 1965-1985; İşbilir, 2008). İdrar söktürücü, bronş temizleyici, kan şekerini düşürücü, hazmı kolaylaştırıcı etkileri vardır. Suyu saç dökülmesini ve kepeklenmeyi önler Ayrıca bitkinin özsuyu ve tohumları halk hekimliğinde hipertiroidi tedavisinde kullanılır (Zeybek ve ark, 2002; İşbilir, 2008).

1.7.4. Çörek otu *(Nigella sativa)*

Çörek otu, *Ranunculacea* familyasına bağlı bir bitki türüdür. Eski zamanlardan bu yana bütün dünyada hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Çörek otu bitki çeşitliliği açısından zengin bir bitki türü olup, ülkemizde siyah kimyon, siyah tohum ya da bereket tanesi olarak bilinmektedir. Yetiştiği bölgede

iklime bağlı olarak içeriğindeki maddeler farklılık gösterebilmektedir. Çörek otu tohumlarının yapısında, %0.4-0.45 uçucu yağ, %32-40 sabit yağ, %16-19.9 protein , %5.5 aminoasitler, saponinler, alkoloidler, lifler, tanenler, %33.9 karbohidratlar, %1.79-3.44 mineral madde bulunmaktadır. Bunun yanı sıra; tiamin, askorbik asit, niasin, pridoksin ve folik asit içermektedir. Doymamış yağ asitlerinden linoleik asit, oleik asit, eikosadienoik asit, araşidonik asit ve linolenik asit bulunurken, doymuş yağ asitlerinden ise palmitik asit, miristik asit ve stearik asit bulunmaktadır. Uçucu yağların yapısında ise karvakrol, nigellon, p-cymene, d-limonen, α ve β-pinen bulunur. Bunun dışında farmakolojik olarak aktif bileşenlerden başlıca ditimokinon, timokinon, timol ve timohidrokinon bulunur (Randhawa ve Al-Ghamdı, 2002; Gül, 2016).

Çörek otu; hoş kokulu yağlar, vitaminler ve enzim gibi maddeleri içerisinde barındırmaktadır. Bundan dolayı insan ve hayvan sağlığına faydalı olabileceği belirtilmiştir. Genel olarak bağışıklık sistemini enfeksiyöz ve alerjik hastalıklara karşı güçlendirdiği için vücutta oluşabilecek kronik hastalıklara karşı korur. Bitki ekstraktlarının vücuttaki faydalarının en önemli nedeni içerdiği %58 oranındaki Omega 3 ve Omega 8 dir. Çörek otu yağı hem insan sağlığı hem de hayvan sağlığı için önemli bir besin kaynağıdır (Gül, 2016).

1.8. Hücre Kültürü

Hücrelerin kontrollü şartlar altında çoğaltılması sürecidir. Pratikte hücre kültürü terimi, çok hücreli ökaryotlardan özellikle hayvan hücresi kaynaklı hücrelerin kültürlenmesi için kullanılmaktadır. Hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar günümüzde popüler araştırma konularında önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Örneğin, kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkilerini ya da bir hücre veya dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla hücre kültürleri yapılabilmektedir. Hücre kültüründe belirli bir hücre hattından çoğaltılan hücrelerde çeşitli çalışmalar

yapılarak canlı ortamında (*in vivo*) yapılamayan denemeler yapılabilir ve burdan yola çıkılarak sonuçlara ulaşılabilir.

Hücre kültürü çalışmalarının gelişimi ve yöntemleri, organ ve doku kültürü çalışmalarıyla yakından ilişkilidir ve onlarla benzer nitelikler taşımaktadır. Doku ve hücre kültürü çalışmaları yüz yılı aşkın bir süredir yapılmaktadır. Hayvansal hücre kültürü teknikleri 1900'lerin ortalarında laboratuvarda rutin olarak uygulanmaya başlanmış fakat asıl doku kaynaklarından ayrılan sürdürülebilir yaşayan hücre hatları kavramı 19. yüzyılda ortaya konmuştur. 19. yüzyılda İngiliz fizyolog Sydney Ringer sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum klorür içeren tuz çözeltilerinin, vücut dışında yaşayan bir hayvan kalbinin atışını sürdürebilmesi için uygun olduğunu deneysel olarak göstermiştir. 1885'de Wilhelm Roux bir tavuk embriyosu nöral plağının bir kısmını ayırmış ve ılık bir tuzlu su çözeltisinde dokuyu birkaç gün yaşatarak doku kültürünün temellerini de atmıştır. Ross Granville Harrison , 1907 ve 1910 yıllarında yaptığı deneyleri doku kültürünün metodolojisini de belirleyerek yayımlamıştır.

1913'te Carrel aseptik koşullar altında düzenli olarak beslenmeleriyle hücrelerin kültür ortamında uzun süre hayatta kalıp çoğalabildiklerini göstermiştir. Earle ve arkadaşları ise, 1948'de L hücre hattından saflaştırdıkları hücrelerin kültüre alındıklarında koloniler oluşturduklarını göstemişlerdir. Hücre kültürü teknikleri 1940 ve 50'lerde viroloji araştırmalarıda desteklemek amacıyla önemli ölçüde geliştirilmiştir. Gey ve arkadaşları 1952 yılında günümüzde oldukça bilinen HeLa hücre hattını, bir insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin sürekli serisi şeklinde gözlemlemişlerdir. Martin ve Evans ise 1986'da fareden pluripotent embryonik kök hücrelerini saflaştırarak kültürünü yapmışlardır. 1998'de Thomson ve Gearhart ile yardımcıları ise, insan embryonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlardır. Hücre kültüründe virüslerin gelişmesi saflaştırılmış virüs aşılarının hazırlanıp üretilmesine olanak sağlamıştır. Örneğin, Polio aşısı hücre kültürü teknikleri kullanılarak yapılan ilk ürünlerden biridir. Bu aşı, maymun böbreği hücre kültüründe virüsü yetiştirmek için bir yöntem bulan ve bundan dolayı Nobel Ödülü

alan John Franklin Enders Thomas Huckle Weller ve Frederick Chapman Robbins'in araştırmalarıyla mümkün kılınmıştır.

Hücreler kandan kolayca elde edilebilir; ancak sadece beyaz kan hücreleri kültürde üreme yeteneğine sahiplerdir. Tek çekirdekli hücreler, hücredışı maddeyi bozan kollajenaz, tripsin ya da pronaz gibi enzimatik sindirim yapan enzimler tarafından yumuşak dokulardan salınabilirler. Farklı olarak, doku parçaları büyüme ortamına (*besiyeri*) konulabilir ve hücreler bu şekilde "*kültüre edilmiş*" olur. Hücreler, "*birincil kültür*" olarak adlandırılan yöntemle doğrudan kültüre edilebilmektedir. Tümörlerden kaynaklanan bazı istisnalar hariç, çoğu birincil hücre kültürünün sınırlı yaşam süresi vardır. Çoğalan hücrelerin önemli bir miktarı (özellikle kanser kökenli olmayanlar), kültürün ilerleyen zamanlarında yaşlanma ve bölünmenin durması gibi süreçlere girer; bu hücreyi canlılıktan alıkoyar. Belirlenmiş ya da ölümsüzleştirilmiş bir hücre hattı, rasgele bir mutasyonla ya da telomeraz geninin yapay ifadesi gibi bilinçli değişimlerle süresiz çoğalma yeteneğine kavuşabilir.

1.8.1. Hücre Kültürü Besiyeri ve Çözeltiler

Hücre kültürü besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikroçevreyi sağlayan besleyici çözeltileridir. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini desteklerler. Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için uygun pH, sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki iyonlarla gerekli ozmolarite ve pH'ı da sağlarlar.

Besiyeri ihtiyacı hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir. Hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına göre hücrenin besiyeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir.

Hücrelerin canlılıklarının devamı ve çoğalmaları için aminoasitler, karbohidratlar, lipidler, vitaminler, iyonlar ve proteinlerin ortamda bulunması şarttır. Standart bir besiyerinde yukarıdaki bileşenlerin sağlanması için iki temel çözelti uygulanır. Bunlar Dulbecco's Modified Eagle Media ve Fetal Bovine Serumdur.

1.8.2. Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)

Hücre kültürlerinde olması gereken temel aminoasit kombinasyonu ilk defa Eagle tarafından 1955'de tanımlanmıştır. Kendi ismini taşıyan Minimum Eagle's Medium (MEM) isimli besiyeri bazı modifikasyonlarla bugüne kadar gelmiştir. Dulbecco tarafından modifiye edilen MEM solusyonu bugün somatik hücre kültürlerinde en sık kullanılan besiyeri bileşenidir. DMEM hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukoza, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir. Ancak tek başına hücre gelişimi için yeterli değildir.

1.8.3. Fetal Bovine Serum

Fetal Bovine Serum hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan ve içeriği tam olarak tanımlanmamış zengin bir protein çözeltisidir. Bu protein çözeltisinin içinde hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinleri bulunur. Hücre çeşidine ve uygulamalara göre besiyerindeki serum oranı değişebilir. Standart bir somatik hücre kültüründe serum oranı %10'dur.

Serum üretimi pahalı ve zahmetli bir süreçtir. Sığır embriyolarının kanlarının toplanmasıyla hazırlanan serumların üretiminde bir standart yoktur. Farklı hayvanlardan elde edilen serumlar birbirlerinden farklılık gösterirler. Bu da deneylerin sonuçlarını etkilemektedir. Bu dezavantajlarından dolayı bazı laboratuvarlar serumsuz besiyerlerini kullanmaktadırlar. Serum kullanılmayan bir

besiyerinin çeşitli büyüme ve tutunma faktörleriyle desteklenmesi gerekir, bu da çalışmaya göre serumdan daha pahalı olabilir.

1.8.4. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS)

Hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solusyonudur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler. Ayrıca pHı tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar.

1.8.5.Tripsin

Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan temel enzimdir. Tripsin, bir serin proteaz tipi enzimdir, lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptidleri hidroliz eder.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Conforti F. ve ark., 2008; Güney İtalya'dan elde edilen 16 tane bitkiyi *in vitro* koşullarda kanser hücrelerinde (meme kanserinde MCF-7, prostat kanserinde LNCaP, amelanotik melanoma C32 ve renal adenokarsinom ACHN) sulforodamin B (SRB) kullanarak antiproliferatif özelliklerini değerlendirmişlerdir. 48 saatlik inkübasyondan sonra en yüksek antiproliferatif bitki ekstraktlarını C32 ve ACHN de etkili olan *Cynara cardunculus ssp.* ve *Cardunculus* olarak sırasıyla 21 ve 18 mg/mL olarak belirlemişlerdir. *Cichorium intybus* (hindiba) melonama üzerinde belirgin bir aktivite göstermesine rağmen *Mentha aguatica* (su nanesi) meme kanserinde seçici antiproliferatif aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Bu türlerde yüksek miktarda fenolik bileşikler içerdiğini belirlemişlerdir. Bütün bitkilerdeki hidroksi alkol ekstraklarının akut toksisitesini microtox akut toksisite testiyle incelemişlerdir.

Guo Y. ve ark., 2008; Bu çalışmada ilk defa miRNA mikroarray tekniği kullanılarak kriyopreserve özafagus kanser dokularındaki miRNA ekspresyonu araştırılmıştır. Bu çalışmadaki mikroarray analizlerinde normal dokuya bitişik özafagus kanserine yol açan 7 tane miRNA belirlenmiştir. Bu sonuçlar özafagus kanserinin tanısında ve etkilerinin araştırılmasında düşük maliyetli ve uygulanması kolay olan PCR yöntemiyle teşhisinde miRNA ekspresyonu çalışmalarının önemini göstermektedir.

Way T. ve ark., 2009; Bu çalışmada 5 farklı türdeki çayın kateşin seviyelerini ve çay yapraklarındaki kafein miktarlarını karşılaştırmışlardır. Bu türler *Camellia japonica*, *Camellia tenuifolia, Camellia oleifero*, iki iştah açıcı *Camellias* ve *Camellia sinensi*'dir. *Camellia sinensis*'in kateşin içeriğini diğer türlere göre daha az bulmuşlardır. Buna ek olarak çay yapraklarındaki su ekstraksiyonu ile insan meme kanserindeki MCF-7 hücrelerinin antiproliferatif ve apoptotik etkilerini araştırmışlardır. *Camellia sinensis*'in su ekstraktının MTT deneylerinde diğer beş tür arasında en aktif olduğunu bulmuşlardır. *Camellia*

sinensis'in majör biyoaktivitesi'nin (-) epigallocatechin-3 gallate ve (-) epigallocatechiden geldiğini ve diğer türlerde bulunmadığını belirlemişlerdir.

Fix L.N. ve ark., 2010; Bu çalışmada ilk defa insan meme kanserindeki MCF-7 hücrelerinin miRNA ekspresyon profili ve yeşil çayın MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi rapor edilmiştir. İnsanda pek çok miRNA belirlenmesine rağmen sadece küçük bir oranda miRNA, MCF-7 hücrelerinde ifade edilmektedir. Küçük konsantrasyonlardaki polifenol-60 tedavisinde, MCF-7 hücrelerinde miRNA ekspresyon profilinde belirgin değişimler gözlemlemişlerdir. 10 mg/mL polifenol-60 ile 48 saatlik tedaviden sonra 23 faklı miRNA da değişim olduğu belirlenmiştir. Bu miRNA'ların miR-21 ve miR-27'nin yeşil çayla muamele edildikten sonra azaldıklarını bulmuşlardır.

Prasanna R. ve ark., 2011; *Cassia auriculate* (CALE) etanolik yaprak ekstraktlarının insanlarda meme kanseri (MCF-7) ve larinks kanseri (Hep-2) hücrelerinin her ikisinde de doza bağımlı anti kanser etkisini incelemişlerdir. *Cassia auriculata* ekstraktı ve *Curcumin* kombine edildiğinde sinerjik etkiyle çok daha yüksek konsantrasyonda aktivitesinde artış olduğunu not etmişlerdir. Buna ek olarak MCF-7 ve Hep-2 hücreleri antiapoptotik Bcl-2 proteininin fazla ifadelenmesiyle azaldığını gözlemlemişlerdir.

Engel N. ve ark., 2011; *Hunteria umbellata* (HUL), *Cola lepidata* (CCL), *Persea americano* (PAL) yaprakları, *Persea americano* kökleri (RPA) ve *Plukenetia conophora* (PCL) gibi Nijeryanın geleneksel tedavi edici bitkileri kanser ve kanserle ilgili hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada Engel ve ark. meme ve osteokarsinom hücrelerinde bitki ekstraktları'nın proliferatif ve apoptotik etkilerini bilimsel olarak değerlendirmişlerdir ve kimyasal parmak izi olan olası LC-MS bileşiklerini belirlemişlerdir. Sağlıklı dokulardaki negatif etkinin elimine edilmesi için 5 farklı tür bitkinin metanolik ekstraklarının kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkilerini *in vitro* koşullarda akım sitometri ile ölçmüşlerdir. Non-tümorogenik kontrol MCF-7'yi ve birincil izole edilen osteoblast'ı (POB) seçmişlerdir. Çalışma sonucunda RPA'nın 5 tane

ekstraktının meme kanser hücrelerinde pozitif östrojen reseptör ajan olarak kullanıldığını göstermişlerdir. Proliferatif safha %18'e düştüğünde hücre proliferasyonunun belirgin bir şekilde arttığını göstermişlerdir (RPA konsantrasyonu 10 mg/ mL olduğunda). PCL, CCL, HUL, PAL, ve MCF-7 hücreleri proliferatif etkisinde belirgin bir inhibisyon olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlarla bitki ekstraktlarını medikal olarak kullanılabileceğini ve hücrelerde proliferatif aktivite gösterebileceğini belirlemişlerdir. RPA ekstraktları östrojen benzeri aktivite gösteren kimyasal bileşiklerle birleştirilerek potansiyel anti kanser ajanı olarak özellikle meme kanserinde kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

Hafeez B.B. ve ark., 2013 insan prostat kanseri (PCa) inhibisyonu için Plumbagin (PL)'den elde edilen 1,4 naftakinon kullanarak fare modeli üzerinde çalışılmış ve bu kanser türünün fareler üzerindeki büyümesi ve metastazı araştırılmıştır. Bu çalışmada insan PCa PC-3M- lusiferazı fare prostatına enjekte etmişlerdir. Hücre transferinden 3 gün sonra fareyi PL ile 8 gün boyunca tedavi etmişlerdir (2mg/kg vücut ağırlığı başına haftada 5 gün). Büyüyen ve metastaz yapan PC-3M-lusiferaz hücrelerini biyolüminesans görüntüleme ile haftalık olarak takip etmişlerdir. PL tedavisi belirgin bir şekilde büyüyen ortotopik kenograft tümörü inhibe etmiştir. Sonuçlarda karaciğer metastazının belirgin bir şekilde inhibe edildiğini fakat akciğer ve nodüllerindeki metastazın belirgin bir inhibisyonun görülmediğini belirlemişlerdir. PL tedavisi uygulanan hiçbir farede karaciğerde PCa metastazı gözlememişlerdir. Bununla birlikte kontrol farelerinde lenf nodüllerinde, akciğerde ve karaciğerde büyük bir metastaz olduğunu gözlemlemişlerdir.

Koutsaki M. ve Spandiddos D. A., 2014; Bu çalışmada miR-200 ailesinin patolojik EMT ile kuvvetle ilişkili olduğu ve metastatik supresör rol oynadığı belirlenmiştir. miRNA'nın normal over, kanserli over'i birbirinden ayırt etme özelliği kemoterapinin neden olduğu klinik tabloyu öngörmek için kullanılabileceği belirlenmiştir. miRNA kaynaklı tedavilerin kanser tedavilerini tamamlayıcı özellik sağlayacağı düşünülmüştür.

Kara M. ve ark., 2015; Bu çalışmada 54 kolorektal kanser (CRC) teşhisli hasta ile sağlıklı kolon dokularına sahip 42 kişiyi incelemişlerdir. Ekspresyon için toplam RNA'yı formalinde sabitlenmiş parafinde bloklanan (FFPE) dokularından ekstrakte etmişler ve cDNA'yı elde etmişlerdir. Bütün ekspresyon analizleri 96 örneklik akışkan mikroakışkan hareketli dizilim cihazını kullanarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak *ADAMTS1, FHIT, RUNX1, RUNX3 ve WWOX* genlerinin CRC dokularında normal dokulara göre değiştiğini belirlemişlerdir. miR-378a-3p, miR-155-5p, miR-193b-3p, miR-96-5p, miR-17-5p, miR-27a-3p, miR-133b, miR-203a, miR-205-5p, miR-34c-5p, miR-130a-3p, miR-301a-3p, miR-132-3p, miR-222-3p, miR-34a-5p, miR-21-5p, miR-29a-3p and miR-29b-3p CRC dokularında belirli bir şekilde gen baskılamasını kaldırdığını bulmuşlardır.

Li J. ve ark., 2016; Bu çalışmada miR-433'ün kolorektal kanserle ilişkisini araştırmışlardır. miR-433'ü metastatik kolon kanseri 1 (MACC1) kolon kanserli hücrelerden PCR ve Western blotting yöntemi kullanılarak ayırmışlardır. Apoptozu incelemek için akım sitometri ve MTT ölçümleri kullanılarak kolorektal kanser hücrelerini görünür hale getirmişlerdir. Western blot yöntemi ile MACC1 üzerindeki miR-433 düzenleyici mekanizmasına bakmışlardır. Hücre hatlarında ve kolorektal kanser dokularında miR-433 ekspresyonunun azaldığını göstererek kanserli hücrelerin azaldığını kanıtlamışlardır. Bütün bu veriler doğrultusunda miR-433'ün kolorektal kanser hücrelerinde önemli bir rol oynadığını kanıtlamışlardır.

Bansode R.R. ve ark., 2016; Pro antisiyonidinler bitki kaynaklarında bulunan oligomerik flavonoidlerdir. Elma, kimyon, üzüm kabuğu ve kakao çekirdeği gibi bitkilerde çok miktarda bulunmasıyla birlikte yeşil çay, siyah çay, yerfıstığı, siyah kuş üzümü ve yaban mersininde az miktarlarda bulunmaktadır. Bu bileşiklerin sağlığa yararları son zamanlarda araştırılmaya başlanmıştır. Pro antisiyonidinlerin iltahaplar, obezite, diabet, ve insülin gibi çeşitli metabolik rahatsızlıklara pozitif etkileri olduğu yeni keşfedilmeye başlanmıştır. Diğer bir çalışma alanı ise yaygın şekilde ilgilenililen miRNA kaynaklı kanser tedavi

terapileridir. Bu çalışmada Pro antisiyonidinler hakkında bu güne kadar elde edilmiş bilgileri ve miRNA ekspresyonuna etkilerini özetlenmiştir.

Ye J. ve ark., 2017; Çalışmalarında kolorektal kanser (CRC) hücreleri ve sağlıklı kolorektal hücreleri karşılaştırılarak miR-141'in CRC hücrelerinde daha az düzenlendiği belirlemişlerdir. miR-141'in CRC hücrelerinin hücre yenilenmesini ve hücrelerin yaşamını sürdürebilmesini inhibe edebileceğini düşünmüşler ve bunun ilaç yapımında kullanılabileceğini önermişlerdir. Buna ek olarak bu çalışmada D2 döngüsünü belirlemişler ve bunun miR-141 hedef geni olduğunu bu sayede miR-141'in potansiyel tedavi ajanı olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

McCubrey J.A. ve ark., 2017; Bu çalışmada doğal ürünlerin yaşlanmayı geciktirici etkilerini araştırmışlardır. Bu besinlerin miRNA'nın düzenlenme basamağına etkisi olduğu düşünülerek bu çalışmada doğal besinlerden özellikle resveratrol (RES)(şarabın içerisinde bulunan antioksidan bir madde), zerdeçal (curcuma (CUR)), berberin'e (berberine(BBR)) odaklanmışlardır. RES'i üzümün dış yüzeyinden ve diğer meyvelerden elde etmişlerdir. RES'in sirtuins ve SIRT1 moleküllerini aktive ederek insan ömrünü uzattığı düşünülmektedir. CUR'u zerdeçal kökünden izole etmişlerdir. CUR pek çok hastalıkta özelliklede iltahaplı hastalıklarda tedavi edici olarak kullanılmaktadır. CUR ve modifiye çeşitlerinin kanser kök hücreleri üzerinde anti kanser etkili olduğu belirtmişlerdir. BBR de çeşitli bitki çeşitlerinden izole edilmiş ve yetişkin diabeti gibi çeşitli hastalıklarda tedavi edici olarak kullanmışlardır.

Pastrello C. ve ark., 2017; Bu çalışmada karnabahar bitkisinin miRNA'sını nitrogenomik çalışmalarla insan genomuna aktarmak için değişik dozda örnekler kullanılmış ve günlük brokoli tüketim miktarıyla kandaki miRNA arasında belirgin bir pozitif ilişki olduğunu bulmuşlardır. Aynı zamanda karnabaharın *in vitro* koşullarda insan gen ve protein ekspresyonunu düzenlediği ve bu miRNA'ların diğer karnabahar türleriyle birlikte kullanıldığında kanserin önlenmesi mekanizmasında önemli olacağını bulmuşlardır.

Kim H.ve ark., 2017; Bu çalışmada mango meyvesinin anti iltahabik etkisi altında yatan mekanizmayı araştırmışlardır. Polifenolik bileşikler olan gallik asit ve galotanin'in (tannik asit) *in vitro* ve *in vivo* koşullarda miR-126/PI3K/AKT/mTOR'ın etkilerini araştırmışlardır. Polifenolik bileşikleri mangodan ekstrakte etmişlerdir. Farelere polifenolik bileşiklerin bulunduğu ya da kontrol içeceklerini vermişlerdir. Aynı zamanda iki haftalık tedavi süresince 3 kere %3'lük dekstran sodyum sülfat vermişlerdir. Mango ekstraktları (10 mg GAE/L) NF-κB, p-NF-κB, PI3K (p85β), HIF-1α, p70S6K1, ve RPS6, LPS-treated CCD-18Co hücreleri proteinlerin ekspresyonunu baskıladığını ve LPS miR-126 ekspresyonunu azaltığını göstermişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Bu çalışmada, analitik saflıkta kimyasallar kullanıldı. Ekstraksiyon aşamasında metanol, dimetil sülfoksit (DMSO), hekzan kullanıldı. Hücre kültürü aşamasında Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), tripsin, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) kullanıldı. RNA eldesinde QIAzol, kloroform, isopropanol, SYBR Green PCR master mix; miScript Universal Primer , miScript Primer Assay kullanıldı.

3.1.2. Araç ve Gereçler

Bu çalışmada manyetik karıştırıcı, soxhlet cihazı, su banyosu, inkübatör, santrifüj, vortex ve QIAGEN ROTOR GENE Q marka RT-PCR cihazları kullanım talimatlarına göre kullanıldı.

3.2. Metod

Çalışmamızda Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen ve halk arasında kanser tedavisi için etkili olduğu düşünülen adaçayı, tere, çörek otu, ısırgan otu bitki özütlerinin HCT 116 üzerine etkisi araştırıldı. Bu bitkilerin seçilmesindeki asıl neden, ülkemizde sıklıkla tüketilmesi ve miRNA üzerinde bu bitkilerle yapılmış çok az çalışmanın bulunmasıdır. Kolon kanseri hücre hattı HCT 116 ile çalışılmasının nedeni ise, metastatik bir hücre hattı olması, dünyada ve Türkiye'de bu kanser türünün en yaygın kanser türleri arasında olmasıdır.

3.2.1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Bu çalışmada, bitki ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılan yöntemler seçilirken kanserle ilişkili olduğu öngörülen bitki ekstraksiyon çalışmaları

incelendi ve bu bilgiler doğrultusunda çalışmaya en uygun yöntemler ön çalışmalar yapılarak belirlendi.

3.2.1.1. Isırgan otu ekstraksiyonu

Çalışmamızda ısırgan otunun yaprak kısımları kullanıldı. 300 ml metanol içerisine 500 gram ısırgan otu yaprakları eklendi. Ultrasonik banyoda ağzı kapalı cam erlen içinde 1 saat inkübe edildi. İnkbüasyon sonunda sıvı kısım alındı ve tekrar 10 ml metanol eklenerek 45 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Sıvı kısım alınarak 5 ml metanol eklendi ve 15 dakika ultrasonik banyoda tutularak toplanan bütün sıvı kısımlar birleştirildi. Ekstraktın metanolü vakumlu evoperatör ile uzaklaştırıldı (Akdeniz, 2010).

3.2.1.2. Tere ekstraksiyonu

Çalışmamamızda tere bitkisinin tohum kısımları kullanıldı. Bir gram tere tohumu ev tipi el öğütücüsünde toz haline getirildikten sonra 99,87 ml deiyonize su ve 0,13 ml DMSO karışımı içerisinde 90 dakika bekletildi. Daha sonra tere tohumları temiz bir süzgeç ile süzüldü (Mahassni ve ark, 2013).

3.2.1.3. Adaçayı ekstraksiyonu

Çalışmamızda adaçayı bitkisinin yaprak kısımları kullanıldı. Yaprak büyüklüğü 2-4 mm olan adaçayı yapraklarından 4 gram alınarak 96 ml deiyonize su içine eklendi. 80 ^{o}C' deki su banyosunda 100 dakika bekletildikten sonra süzüldü (Torun ve ark, 2008).

3.2.1.4. Çörek otu ekstraksiyonu

Çalışmamızda çörek otu bitkisinin tohum kısımları kullanıldı. 50 gram çörek otu 400 ml hekzan içerisinde 24 saat bekletildikten sonra süzüldü ve kurutuldu. Kurutulan çörek otu soxhlet cihazında metanol ile ekstrakte edildi. Ekstraktın metanolü vakumlu evoperatör ile uçuruldu (Periasamy ve ark, 2016).

3.2.2. Hücre Pasajlanması

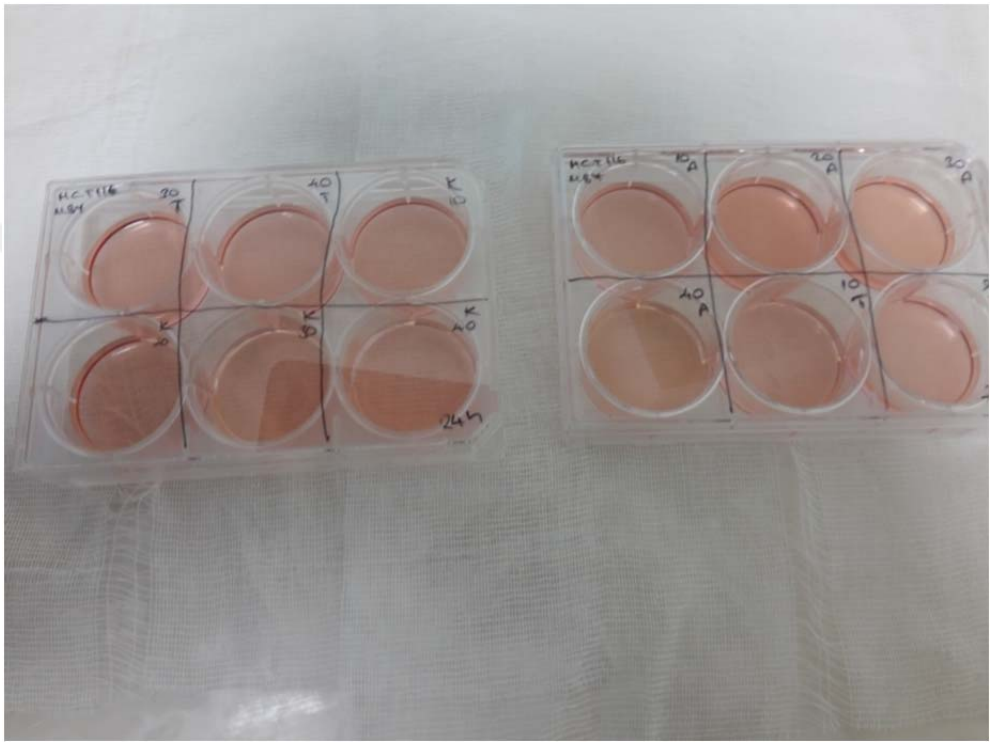
HCT 116 kolorektal kanser hücreleri, boyutu T-25 olan hücre kültür petrilerinde canlı olarak sağlandı. Hücreler 35 ^{o}C deki inkübatörde 2 gün bekletilerek petri yüzeyinin tamamını kaplayacak hale getirildi. 2 günün sonunda petri üzerindeki besi yeri uzaklaştırıldı. Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 5 mL tripsin eklenerek inkübatörde 2 dakika bekletildi. Bu süreç sonunda petriye yapışık olan hücrelerin yüzeyden sökülmesi sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücreler falkon tüpünün içine alınarak 5 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı atılarak üzerine 2-3 mL Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) eklendi. Pipetleme işlemi yapılarak tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Daha sonra 400.000 hücre olacak şekilde flasklara ekimi yapılarak bitki ekstraktlarıyla muamele işlemine hazır hale getirildi.

Her bitki örneğinden derişimi 10, 20, 30 ve 40 µl/ml olacak şekilde 3, 24 ve 48 saat muamele edilerek RNA izolasyonuna hazır hale getirildi. Bitki ekstraktlarıyla muamele işlemi sırasında her derişim ve saat için ayrı ayrı flasklara hücre ekimi yapılarak bitki ekstraksiyonu uygulandı. Kontrol adını verdiğimiz ve içerisine bitki ekstraktı koymadığımız bir grup oluşturuldu (Şekil 3.1.). Bu grup da 3, 24 ,48 saatler için ayrı ayrı hazırlandı.

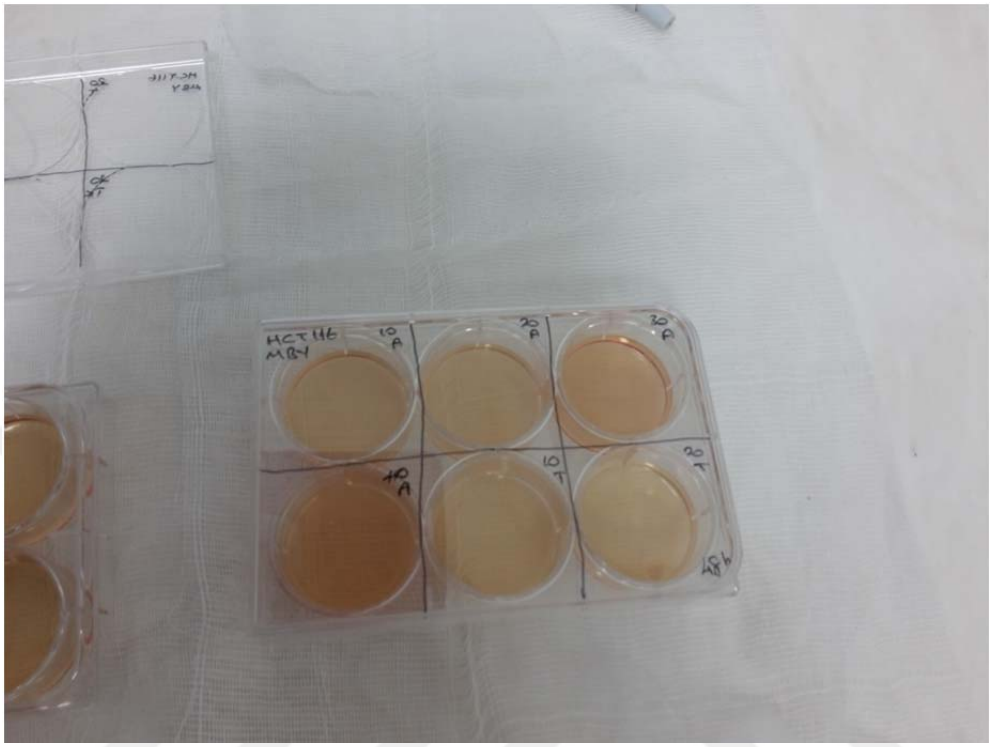


Şekil 3.1. Bitki ekstraktlarının HCT 116 hücre hattına 3 saatlik uygulamasının şematik gösterimi

Şekil 3.1. deki gibi bitki ekstraktları uygulandıktan sonra hücreler mikroskopla incelendi ve renklerinde de gözle görülür bir değişimin olduğu belirlendi (Şekil 3.2., Şekil 3.3.). Bitki Ekstraktı



Şekil 3.2. Adaçayı ve tere bitki ekstraktı uygulana HCT 116 hücre hattının 24 saat sonundaki görüntüsü



Şekil 3.3. Adaçayı bitki ekstraktı uygulanan HCT 116 hücre hattının 48 saat sonundaki görüntüsü

3.2.3. miRNA ve Toplam RNA Saflaştırması

3.2.3.1. Hücrelerin Homojenize Edilmesi

1) Hücre örnekleri 4500xg devirde 5 dakika santrifüj edildi.
2) Üzerlerindeki süpernatant atıldı.
3) Altta kalan katı kısım üzerine 600 µl QIAzol eklendi.

3.2.3.2. Fazların Ayrılması

1) Pipetleme işlemi yapılarak homojenize edilen hücreler 5 dakika oda koşullarında bekletildi.
2) Her 600 µl QIAzol için 0,2 ml kloroform eklendi.
3) 15 saniye boyunca yavaşça elde çalkalandı.
4) 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

5) 12000 xg devirde 4 ^{0}C'de 15 dakika santrifüj edildi.
6) Üstte kalan pembe kısım atıldı. Altta kalan berrak kısım içerisinde RNA olan kısım olup RNA izolasyon işlemine başlandı.

3.2.3.3. RNA İzolasyonu

1) Altta kalan sıvı miktarı kadar 100% lük izopropanol eklenerek 10 dakika oda koşullarında bekletildi.
2) 12000 xg devirde 4 ^{0}C'de 10 dakika santrifüj edildi.
3) Supernatant kısmı ayırdıktan sonra altta kalan RNA her 600 µl QIAzol için 1 ml 75 % lik etanol ile yıkandı
4) Örneklere vorteks işlemi uygulandıktan sonra 75000 xg devirde 4 ^{0}C'de 5 dakika santrifüj edildi.
5) RNA içeren örnekler 5-10 dakika vakumdan geçirildi.
6) RNA örnekleri RNaz içermeyen su ile yıkandı.

3.2.4. cDNA Eldesi

cDNA eldesi miScript II RT kiti kullanılarak gerçekleştirildi

1) 10 x miScript nükleik karışımı ve 5x miScript HiSpec Tamponu veya 5x miScript HiFlex tamponu oda sıcaklığına getirildi (15-25^0 C). Her karışım tüplere yavaşça vurularak karıştırıldı. Tüpün kenarındaki sıvı artıklarını toplamak için santrifüj edildi ve buzun üzerine alındı.
2) Ters transkript ana karışımı buz üzerinde Çizelge 3.1. deki gibi hazırlandı.

Çizelge 3.1. Ters Transkripsiyon reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Örnek Başına Hacim
5x miScript HiSpec Tamponu veya 5x miScript HiFlex tamponu	4 µl
10 x miScript nükleik karışımı	2 µl
RNaz içermeyen su	7 µl
miScript ters transkripsiyon karışımı	2 µl
Kalıp RNA	5 µl
Toplam hacim	20 µl

3) 3)Ana karışımı içeren bütün tüplere kalıp RNA eklendi santrifüj edildi ve buz üzerine alındı.
4) 37 ^{0}C de 60 dakika inkübe edildi.
5) Miscript ters transkripsiyon karışımını inaktive etmek için 95^0 C de 5 dakika inkübe edildi ve buz üzerine alındı ve PCR işlemlerine başlandı.

3.2.5. miRNA PCR Array

miRNA PCR array yöntemi için miRNA PCR kiti (Qiagen, miScript PCR Starter Kit Hilden, Almanya) kullanıldı. Kit içeriğinde ters transkripsiyon ve gerçek zamanlı PCR için gerekli kimyasallar (ters transkripsiyon karışımı, gerekli tamponlar, SYBR Green PCR master karışımı ve RNaz-free su), normalizasyon için PCR kontrolleri ve örnek primerler mevcuttu.

1) Reaksiyon karışımı Çizelge 3.2. ‘ye göre hazırlandı.

Çizelge 3.2. Olgun miRNA ların belirlenebilmesi için reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacim (96 oyuk)
2x Quanti Tect SYBR Green PCR ana karışımı	12.5 µl
10 x miScript Universal Primer	2.5 µl
10 x miScript Primer assay	2.5 µl
RNaz içermeyen su	2.5 µl
cDNA Kalıbı	5 µl
Toplam Hacim	25 µl

2) PCR karışımına Kalıp cDNA eklendi.
3) Dikkatlice PCR oyuklu tabakaların üzeri filmle kaplandı.
4) Oda sıcaklığında (15-25^0 C) 1000g devirde 1 dakika santrifüj edildi.
5) Çizelge 3.3.'deki termal program kullanıldı.

Çizelge 3.3. Döngü durumu

Basamak	Zaman	Sıcaklık	Eklenen Bileşenler
Başlangıç aktivite basamağı	15 dakika	95^0 C	DNA polimeraz
3- basamak döngü			
Denatürasyon	15 s	94^0 C	
Bağlanma	30 s	55^0 C	
Uzama	30 s	70^0 C	Floresan data verilerinin toplanması
Döngü Sayısı	40 Döngü		Döngü sayısı cDNA Kalıp miktarına bağımlı

6) Pelletler PCR cihazına yerleştirildi ve döngü programı başlatıldı.

3.2.6. miRNA PCR Array Data Analizi

Gerçek zamanlı PCR çalışması sonrası QIAGEN veri analiz sitesinden yararlanılarak elde edilen C_T değerleri aracılığıyla $\Delta\Delta C_T$ metodu ile relatif miktar belirleme yapıldı ve ekspresyon düzeyleri hesaplandı. Veriler SPSS 21 paket programıyla analiz edildi. $P< 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak belirlendi. miRNA'ların ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (hedef gen-referans gen) yöntemi kullanılarak hesaplandı (Livak KJ ve ark. 2001).

Yöntemin formülü;

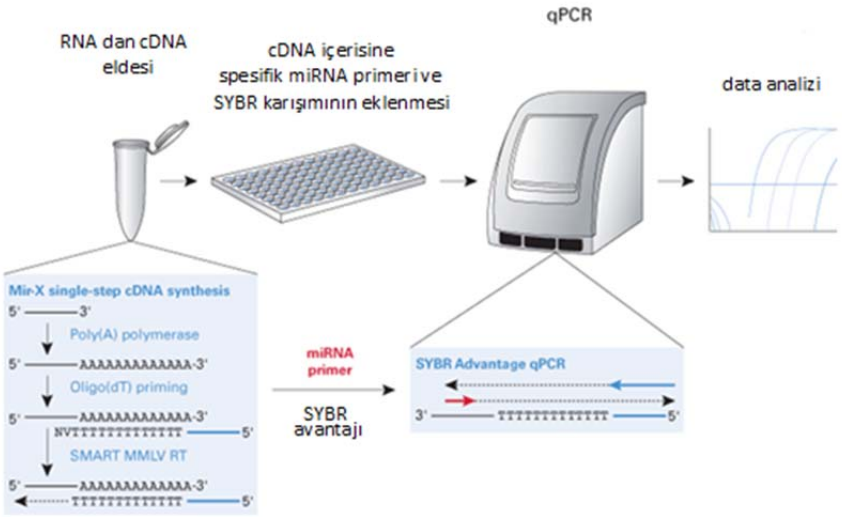
ΔCT = CT(hedef) – CT(referans)

$\Delta\Delta CT$= [CT(hedef) – CT(referans)]hücre hattı – [CT(hedef) – CT(referans)]kontrol

$2^{-\Delta\Delta CT}$ = Ürün miktarı oranı

(ΔCT değeri hedef ve referans genler için belirlenen döngü sayısı farkını ifade etmektedir).

Elde edilen analiz sonuçları (fold change, fold regulation ve p değeri EK-1 de verilmiştir.

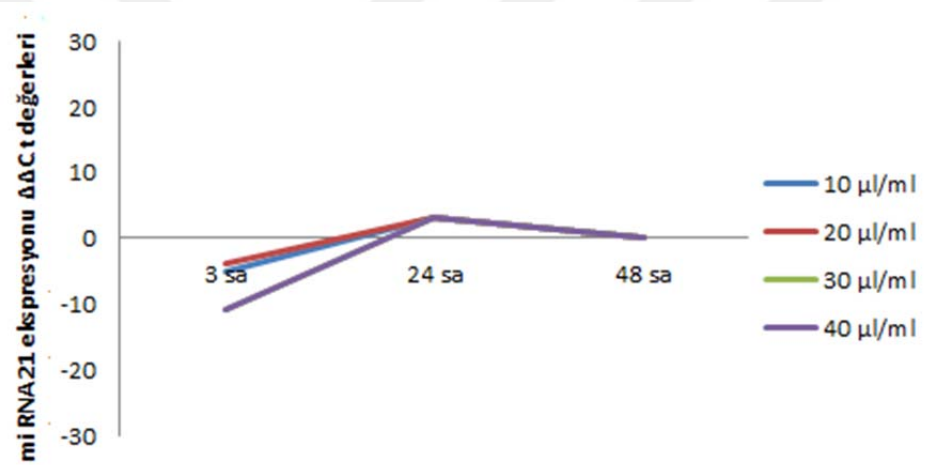


Şekil 3.4. miRNA izolasyonunun şematik gösterimi

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

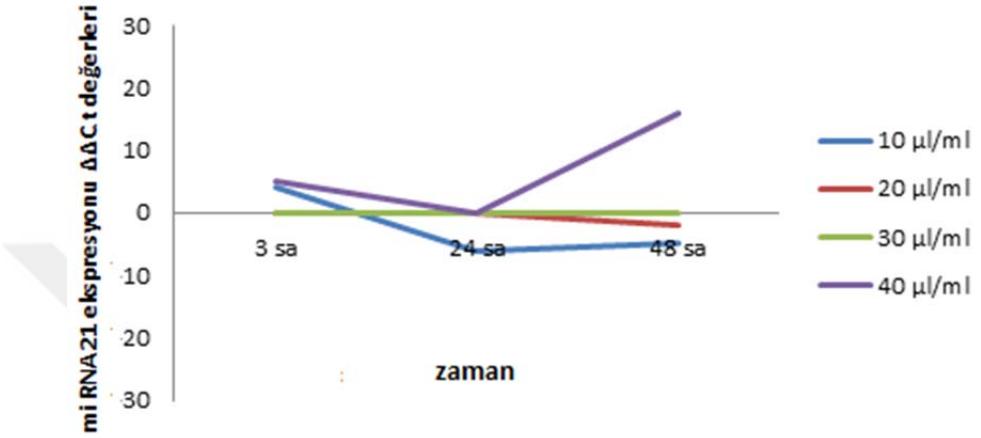
Gerçek zamanlı PCR çalışması sonrası elde edilen CT değerleri QIAGEN istatistiksel programı kullanılarak ekspresyon değişim değerlerine dönüştürüldükten sonra (ΔΔCT) bulunan bu ekspresyon değişimlerinin inkübasyon zamanına göre değişimi her miRNA ve bitki ekstraktı derişimi için ayrı ayrı grafiksel olarak verildi



Şekil 4.1. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki adaçayı ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-21'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

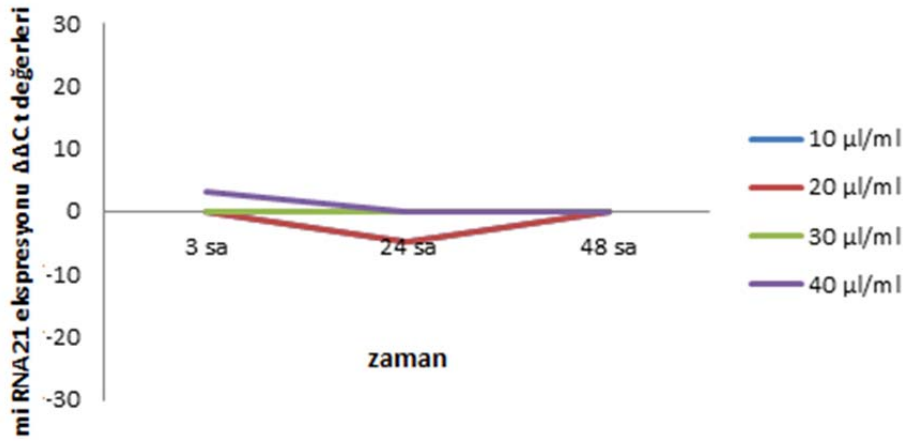
miR-21, HCT 116 kolorektal kanser hücrelerinde artışa neden olacağından, uygulanan bitki ekstraktlarının bu miRNA'nın ekspresyon düzeyini azaltması beklenir. HCT 116'nın farklı derişimlerdeki adaçayı bitki ekstraktları ile muamelesi sonucunda oluşturulan şekil 4.1. incelendiğinde, 3. saatte miR-21'in ifade düzeyinin 10, 20, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyondaki adaçayı bitki ekstraktı ile etkilendiği ve sırasıyla -5, -4, -11, -11 kat değiştiği görüldü ($P>0.05$). 24. Saatte yapılan ölçümlerde yine aynı derişimlerde ekspresyonun arttığı ve bütün

derişimlerde ifade düzeyinin +3 kat değiştiği ancak 48. saatteki derişimlerin miRNA-21'in ifade düzeyinde herhangi bir kat değişimine neden olmadığı belirlendi (P>0.05) (Şekil 4.1).



Şekil 4.2. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-21'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

HCT 116'nın farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.2. incelendiğinde, 3. saatte miR-21'in ifade düzeyinin sadece düşük (10 µl/ml) ve yüksek (40 µl/ml) konsantrasyondaki çörek otu bitki ekstraktı ile etkilendiği ve +4 kat değiştiği görüldü (P>0.05). 24. Saatte yapılan ölçümlerde yine aynı derişimlerde ekspresyonun azaldığı ancak 48 saatte 10 µl/ml için stabil seyrederken, 40 µl/ml ile muamele edilmiş kolorektal kanser hücre kültüründe miRNA'nın 16 kat upregüle olduğu görüldü (P>0.05).



Şekil 4.3. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki ısırgan otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-21'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

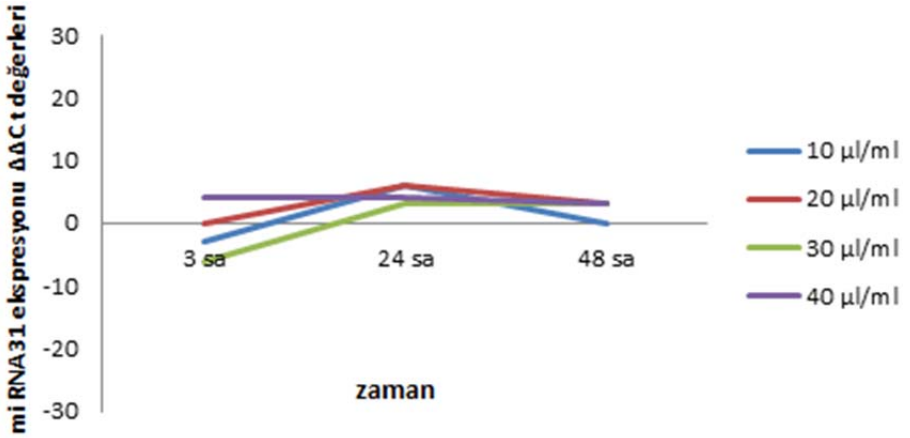
HCT 116'nın farklı derişimlerdeki ısırgan otu ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre, 3. saatte miR-21'in ifade düzeyinin 10, 20, 30 µl/ml bir değişim olmadığı ve yüksek (40 µl/ml) konsantrasyondaki ısırgan otu bitki ekstraktı ile etkilendiği ve +3 kat değiştiği görüldü ($P>0.05$). 24. saatte yapılan ölçümlerde 30, 40 µl/ml konsantrasyonda miRNA-21'in ifade düzeyinde bir değişim olmadığı, ancak 10 ve 20 µl/ml konsantrasyonda miR-21'in -5 kat değiştiği belirlendi ($P>0.05$). 48. saatte miR-21'in ifade düzeyinde artma ya da azalma tespit edilmedi (Şekil 4.3).



Şekil 4.4. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki tere ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-21'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

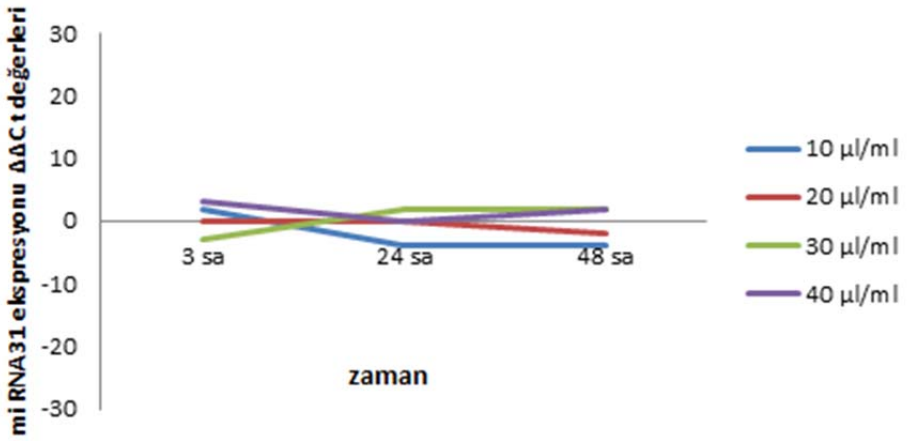
HCT 116'nın farklı derişimlerdeki tere bitki ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.4. incelendiğinde 3. saatte miR-21'in ifade düzeyinin her dört konsantrasyondaki tere bitki ekstraktı ile etkilendiği ve -0.4 kat değiştiği görüldü ($P>0.05$). 24. Saatte yapılan ölçümlerde 20, 30, 40 µl/ml konsantrasyonda miR-21'in ifade düzeyinde bir değişim olmadığı yanlızca 10 µl/ml derişimde +3 kat değiştiği görüldü ($P>0.05$). 48. saatte 30, 40 µl/ml için stabil seyrederken 20 µl/ml için muamele edilmiş kolorektal kanser hücre kültüründe miktarının çoğalmasına engel olamadığı ve miRNA'nın 10 kat upregüle olduğu bulundu ($P>0.05$). 10 µl/ml konsantrasyonda ise miR-21'in ifade düzeyinde değişim olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$).

HCT 116 hücre hattının bitki ekstraktlarıyla muamelesi sonucunda izole edilen miR-31'in ekspresyon değerlerinin zamana karşı grafikleri incelenmiş ve şekil 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8 grafikleri oluşturulmuştur.



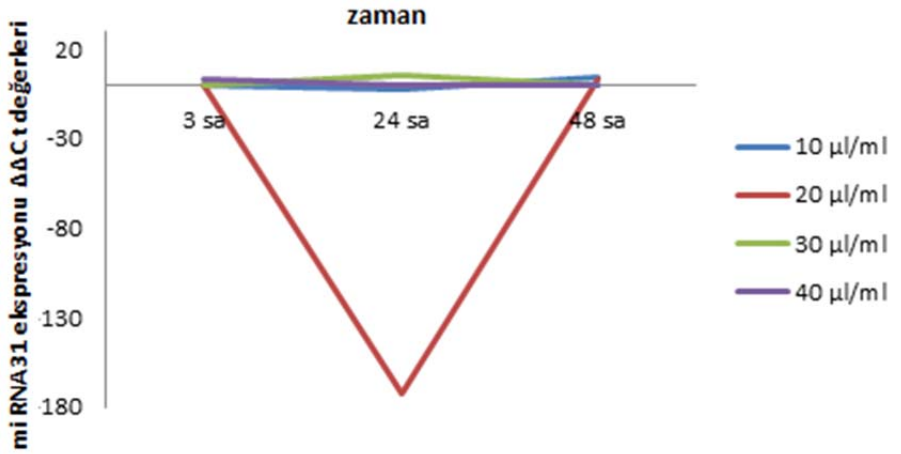
Şekil 4.5. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki adaçayı ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-31'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

miR-31, onkogenik özellikte olması nedeniyle, HCT 116 kolorektal kanser hücrelerinde artışa neden olacağı düşünüldüğünden, bu çalışmada uygulanan bitki ekstraklarının bu miRNA'nın ekspresyon düzeylerini azaltması yönünde bir etki göstereceği öngörülmekteydi. HCT 116'nın farklı derişimlerdeki adaçayı bitki ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.5. incelendiğinde 3. saatte miR-31'in ifade düzeyinin 10, 30, ve 40 µl/ml konsantrasyonda -3, -6 ve +4 kat değişim olduğu belirlendi ($P>0.05$). 20 µl/ml konsantrasyonda ise miR-31 ifade düzeyinde bir değişim olmadığı tespit edildi. 24. Saatte yapılan ölçümlerde 10, 20, 30, 40 µl/ml konsantrasyonda miR-31'in ifade düzeyinde sırasıyla +6, +6, +3, +4 kat değişim olduğu belirlendi. 48. saatte sadece 10 µl/ml de miR-31'in ifade düzeyinde herhangi bir değişim olmadığı belirlenirken, diğer üç konsantrasyonda miR-31'in ifade düzeyinin +3 kat artığı bulundu ($P>0.05$).



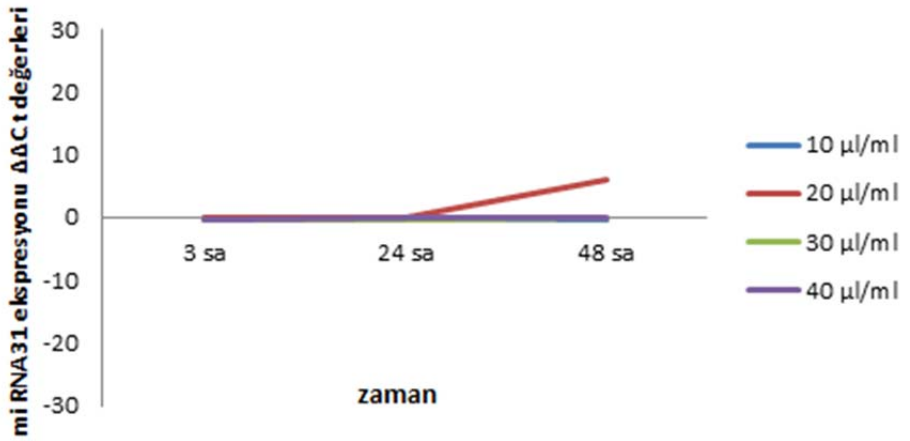
Şekil 4.6. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-31'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

HCT 116'nın farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.6. incelendiğinde 3. saatte miR-31'in ifade düzeyinin 10, 30, ve 40 µl/ml konsantrasyonda +2, -3 ve +3 kat değişim olduğu, 20 µl/ml konsantrasyonda miR-31'in ifade düzeyinde bir değişim olmadığı belirlendi (P>0.05). 24. saatte yapılan ölçümlerde 10, 30 µl/ml konsantrasyonda miR-31'in ifade düzeyinde sırasıyla -4, +2 kat değiştiği (P>0.05), 20 µl/ml için stabil seyrederken, 40 µl/ml için muamele edilmiş kolorektal kanser hücre kültüründe farklılık olmadığı tespit edildi. 48. saatte miR-31'in ifade düzeyinin 10, 20, 30, ve 40 µl/ml konsantrasyonda -4, -2 ve +2 ve +2 kat değişim olduğu belirlendi (P>0.05).



Şekil 4.7. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki ısırgan otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-31'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

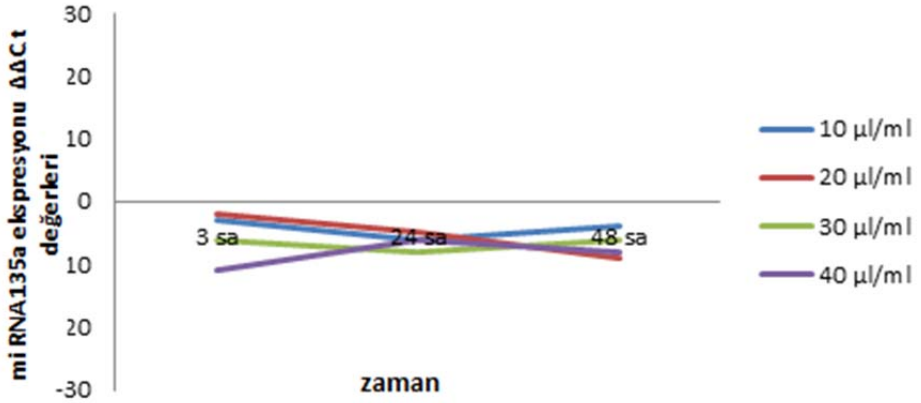
HCT 116'nın farklı derişimlerdeki ısırgan otu ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.7. incelendiğinde 3. saatte miR-31'in ifade düzeyinin 10, 20 30 µl/ml konsantrasyonda değişmediği, 40 µl/ml konsantrasyonda ise miR-31'in ifade düzeyinde 3 kat arttığı bulundu. 24. saatte yapılan ölçümlerde 10, 20, 30 µl/ml konsantrasyonda miRNA-31'in ifade düzeyinde sırasıyla -2, -172, +5 kat değişim olduğu belirlenirken ($P>0.05$), 40 µl/ml ile muamele edilmiş kolorektal kanser hücre kültüründe herhangi bir artma ya da azalmaya neden olmadığı bulundu. 48. saatte miR-31'in ifade düzeyinin 10, 20, µl/ml konsantrasyonda 4, 3 kat arttığı ($P>0.05$), 30 µl/ml konsantrasyonda ise bir değişiklik olmadığı tespit edildi. 40 µl/ml için muamele edilmiş kolorektal kanser hücre kültüründe bir değişime neden olmadığı belirlendi.



Şekil 4.8. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki tere ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-31'ın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

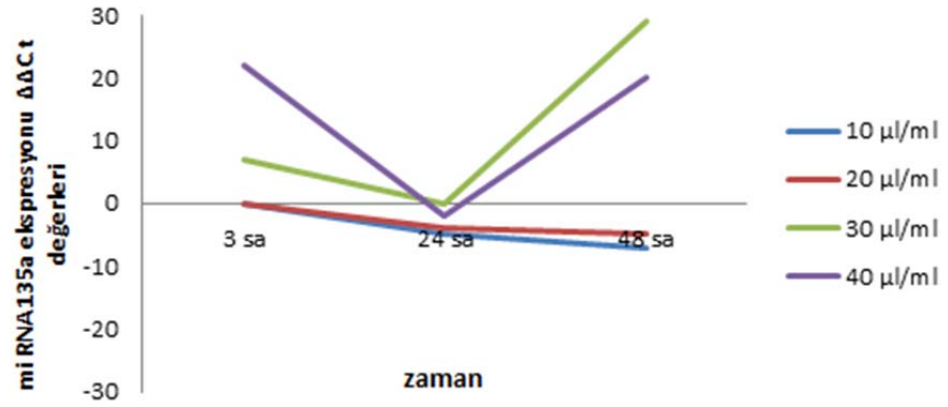
HCT 116'nın farklı derişimlerdeki tere bitkisi ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.8. incelendiğinde 3. saatteki tüm konsantrasyonlarda miR-31'in ifade düzeyinin değişmediği belirlendi. Aynı şekilde, 24. saatte yapılan ölçümlerde 10, 20, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonlarda stabil seyrederek miR-31'in ifade düzeyinde bir değişim olmadığı bulundu. 48. saatte miR-31'in ifade düzeyinde, 10, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonları ile muamele sonrası bir farklılık gözlenmezken, 20 µl/ml konsantrasyonda miR-31'in ifade düzeyinde +6 katlık bir değişim olduğu belirlendi ($P>0.05$).

HCT 116 hücre hattının bitki ekstraktlarıyla muamelesi sonucunda izole edilen miR-135a'nın ekspresyon değerlerinin zamana karşı grafikleri incelenmiş ve şekil 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12 grafikleri oluşturulmuştur.



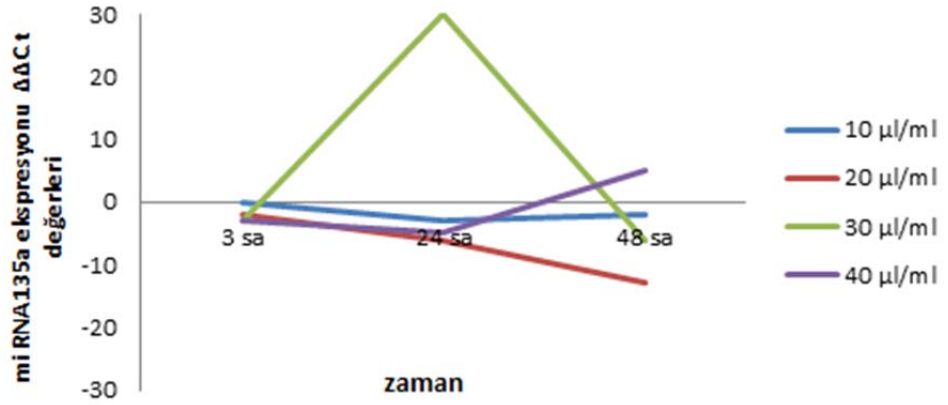
Şekil 4.9. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki adaçayı ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-135a'nın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

miR-135a, HCT 116 kolorektal kanser hücrelerinde artışa neden olacağından, uygulanan bitki ekstraklarının bu miRNA' nın ekspresyon düzeylerini azaltması beklenmektedir. HCT 116'nın farklı derişimlerdeki adaçayı ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.9. incelendiğinde 3. saatte miR-135a'nın ifade düzeyinin 10, 20 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonda sırasıyla -3, -2, -6 ve -11 kat değişime neden olduğu belirlendi ($P>0.05$). 24. saatte yapılan ölçümlerde 10, 20, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonda miRNA-135a'nın ifade düzeyinde sırasıyla -6, -5, -8 ve -6 kat değişim olduğu gözlenirken, 48. saatte miR-31'in ifade düzeyinin 10, 20, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonda sırasıyla -4, -9, -6 ve -8 kat değişim olduğu bulundu ($P>0.05$).



Şekil 4.10. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-135a'nın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

HCT 116'nın farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.10. incelendiğinde 3. saatte miR-135a'nın ifade düzeyinde 10, 20 µl/ml konsantrasyonları ile muamele sonrası değişim olmadığı belirlenirken, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonlarının sırasıyla +7, +22 kat değişime neden olduğu bulundu($P>0.05$). 24. saatte yapılan ölçümlerde 10, 20, ve 40 µl/ml konsantrasyonda miR-135a'nın ifade düzeyinde sırasıyla -5, -4 ve -2 kat değişim olduğu ($P>0.05$), 30 µl/ml konsantrasyonda ise miR-135a'nın ifade düzeyinde herhangi bir değişim olmadığı belirlendi. 48. saatte ise, miR-135a'nın ifade düzeyinin 10, 20, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonda sırasıyla -5, +29, +20 ve -2 kat değişim olduğu tespit edildi ($P>0.05$).



Şekil 4.11. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki ısırgan otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-135a'nın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

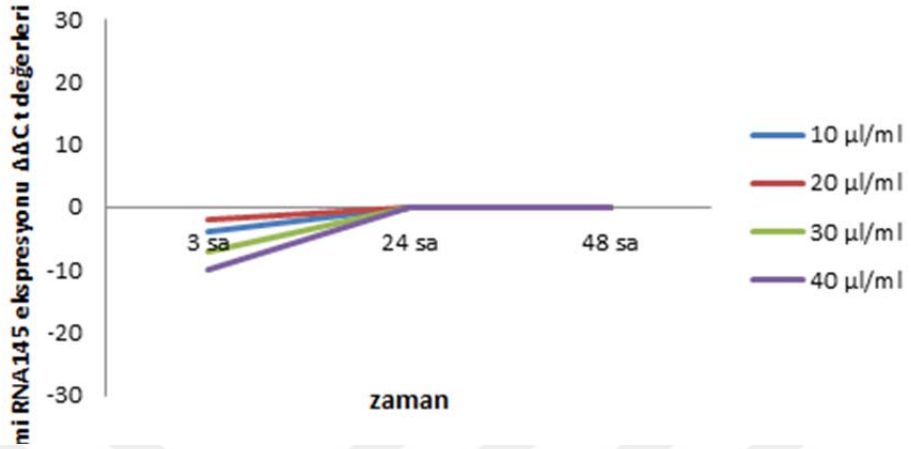
HCT 116'nın farklı derişimlerdeki ısırgan otu ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.11. incelendiğinde 3. saatteki miR-135a'nın ifade düzeyini, 20, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonların sırasıyla -2, -3, -3 kat azalttığı bulundu (P>0.05). 10 µl/ml konsantrasyonda ise miR-135a'nın ifadelenme düzeyinde herhangi bir değişim belirlenirken, 24. saatte yapılan ölçümlerde ise, 10, 20, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonda miRNA-135a'nın ifade düzeyinde sırasıyla -3, -6, +30 ve -5 kat değişim olduğu belirlendi(P>0.05). 48. saatte miR-135a'nın ifade düzeyinin 10, 20, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonda sırasıyla -2, -13, -6 ve +5 kat değişim olduğu tespit edildi(P>0.05).



Şekil 4.12. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki tere ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-135a'nın zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

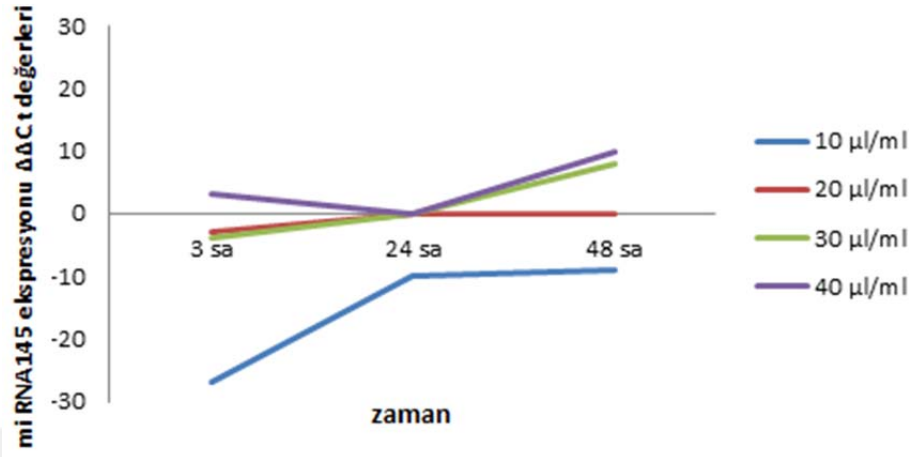
HCT 116'nın farklı derişimlerdeki tere bitkisi ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.12. incelendiğinde, 3. ve 24. saatteki tüm konsantrasyonlar ile yapılan muamele sonucu, miRNA-135a'nın ifade düzeyinin değişmediği belirlendi. Bununla birlikte 48. saatteki 10, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonlarındaki, miR-135a'nın ifade düzeyinde bir değişim gözlenmezken, 20 µl/ml konsantrasyonda miR-135a'nın ifade düzeyinde 5 kat artma olduğu bulundu ($P>0.05$).

HCT 116 hücre hattının bitki ekstraktlarıyla muamelesi sonucunda izole edilen miR-145'in ekspresyon değerlerinin zamana karşı grafikleri incelenmiş ve şekil 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16 grafikleri oluşturulmuştur.



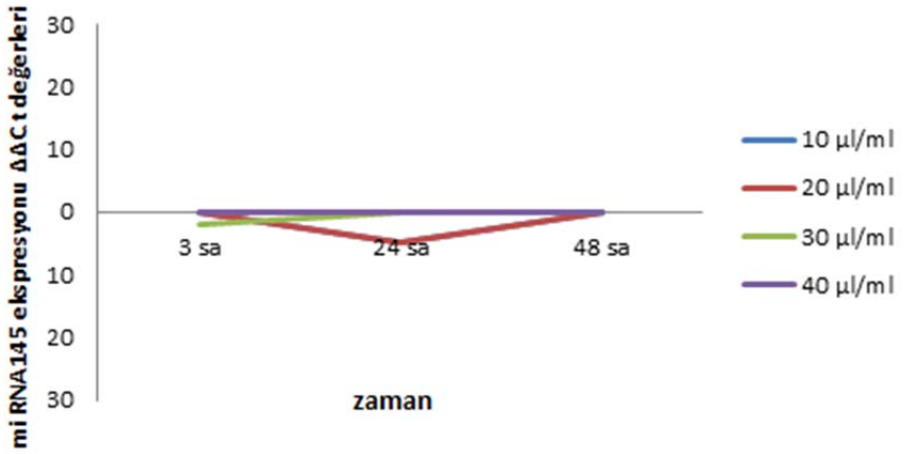
Şekil 4.13. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki adaçayı ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-145'in zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

HCT 116'nın farklı derişimlerdeki adaçayı bitki ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.13. incelendiğinde 3. saatte miR-145'in ifade düzeyinde 10, 20, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonların sırasıyla -4, -2, -6 ve -11 kat değişime neden olduğu belirlendi ($P>0.05$). Ancak 24. ve 48. saatte 10, 20, 30, 40 µl/ml muamele edilmiş kolorektal kanser hücre kültüründe bir farklılık olmadığı tespit edildi.



Şekil 4.14. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-145'in zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

HCT 116'nın farklı derişimlerdeki çörek otu ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.14. incelendiğinde 3. saatte miR-145'in ifade düzeyinin 10, 20, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonda sırasıyla -27, -3, -4, ve +3 kat değiştiği, fakat 24. saatte yapılan ölçümlerde 20, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonda miR-145'in ifade düzeyinde bir değişim olmadığı belirlendi. Bununla birlikte, 24 saatteki 10 µl/ml konsantrasyonda ise miR-145'in ifade düzeyinde -10 katlık değişime neden olduğu tespit edildi ($P>0.05$). 48. saatte sadece 20 µl/ml konsantrasyondaki çörek otu bitki ekstraktı ile etkilenmediği belirlenmiş olup, miR-145'in ifade düzeyinde 10, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonda sırasıyla -9, +8 ve +10 kat değişim olduğu bulundu ($P>0.05$).



Şekil 4.15. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki ısırgan otu ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-145'in zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

HCT 116'nın ısırgan otu ekstraktlarının farklı derişimlerdeki muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre oluşturulan şekil 4.15. incelendiğinde, 3. saatte yalnızca 30 µl/ml konsantrasyonda miRNA-145'in ifadelenme düzeyinde 2 kat azalma olduğu bulunurken ($P>0.05$), diğer tüm konsantrasyolarda miR-145'in ifade düzeyinde herhangi bir değişim olmadığı belirlendi. 24. saatte 10 ve 40 µl/ml konsantrasyonda miRNA-145'in ifadelenme düzeyi stabil seyrederken, 30 µl/ml konsantrasyonda herhangi bir değişim olmadığı belirlenmiştir. 20 µl/ml konsantrasyonda ise miR-145'in ifadelenme düzeyinde -5 kat değişim olduğu belirlendi ($P>0.05$).



Şekil 4.16. HCT 116 hücre hattının farklı derişimlerdeki tere ekstraktları ile muamele edildikten sonra elde edilen miR-145'in zamana karşı ekspresyon değişim grafiği

Şekil 4.16. incelendiğinde, HCT 116'nın farklı derişimlerdeki tere bitkisi ekstraktları ile muamelesi sonucunda elde edilen bulgulara göre, 3. ve 24. saatte miRNA-145'in ifade düzeyinin bütün konsantrasyonda herhangi bir değişime neden olmadığı belirlendi. 48. saatteki uygulama sonrası ise, miRNA-145'in ifade düzeyinde 10, 30 ve 40 µl/ml konsantrasyonda bir değişim gözlenmezken, 20 µl/ml konsantrasyonda miR-145'in ifade düzeyinde +5 kat değişim olduğu belirlendi ($P>0.05$).

4.2. Tartışma

Hücreler anormal olarak çoğaldıklarında ve apoptoz fonksiyonlarını kaybettiklerinde genellikle kanserleşirler. Günümüzde en yaygın hastalıklardan biri olan kanseri tedavi etmek için çeşitli ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu yolda önemli adımlar atılmış olsa da hala kesin bir çözüme ulaşılamamıştır. Son zamanlarda eski bir yöntem olmasına rağmen yeniden gündeme gelen bitkisel tedavi yöntemleri sıklıkla kullanılmaya başlanılmıştır (Way ve ark, 2009). Bu çalışmada, ülkemizde yaygın olarak üretilen ve halk arasında kanser tedavisine iyi geldiği düşünülen adaçayı, çörek otu, ısırgan otu ve tere bitkileri kullanılmıştır. Bu bitkilerin seçilmesindeki ana nedeni, bu bitkilerin miRNA üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çok az çalışmanın bulunmasının yanısıra ülkemizde sıklıkla tüketilmesidir. Kolon kanserinin dünyada ve Türkiye'de en yaygın kanser türünden bir tanesi olması ve metastatik bir hücre hattı olması nedeniyle, bu çalışmada, kolon kanseri hücre hattı HCT 116 ile çalışıldı.

Çalışmada dört adet miRNA kullanıldı. Bu miRNA'lar miR-21, miR-31, miR-135a ve miR-145dir. Her bitkinin bu dört miRNA'nın ekspresyonu üzerindeki etkileri kontrol örnek ile karşılaştırılarak belirlendi

miR-21 onkojenik bir miRNA olduğu için kanser hücreleri üzerinde proliferatif etkileri olduğu gösterilmiş olup bu çalışmada dört farklı bitki ekstraktlarının miR-21 üzerine olan etkileri araştırıldı. Çörek otu ekstraktının miR-21 üzerine baskılayıcı etki göstermediği ve aksine 40 µl/ml konsantrasyonda ve uzun süre muamele edildiğinde ifade düzeyini artırıcı etkisinin olduğu tespit edildi. Çörek otunun halk arasında düşünüldüğünün aksine HCT 116 hücre hattını azaltmadığı aksine yüksek miktarlarda kullanıldığında kanserli hücrelerin artışına neden olduğu belirlendi. Adaçayı ekstraktının miR-21 üzerine sadece 3. saatte baskılayıcı etkisi olduğu ve bu etkinin derişimle doğru orantılı olarak artığı tespit edildi. 24. saat muamele edildiğinde ifade düzeyini 3 kat artırıcı etkisi olduğu tespit edildi. Adaçayının yüksek miktarlarda ve düşük sürelerde kullanılması halinde HCT 116 hücre hattına miR-21 mekanizması üzerinden etkili olarak kanserli

hücreleri azaltığı belirlendi. Ayrıca, uzun süreli kullanımlarda HCT 116 hücre miktarındaki artışın devam ettiği belirlendi. Isırgan otu ekstraktının miR-21 üzerine baskılayıcı etki göstermediği miR-21'in ifadelenme düzeyinde fazla bir değişime neden olmadığı tespit edildi. Halk arasında bilinenin aksine ısırgan otu ekstraktlarının HCT 116 hücre hattına miR-21 mekanizması üzerinden etkili olamadığı belirlendi. Tere bitki ekstraktının miR-21 üzerine baskılayıcı etki göstermediği ve aksine yüksek konsantrasyonlarda (40 µl/ml) ve uzun süreli muamele edildiğinde ifade düzeyini 10 kat artırıcı etkisinin olduğu tespit edildi. Bu ekstraktında miR-21 mekanizması üzerinden HCT 116 hücre miktarının artışını durduramadığı belirlendi. D.F. Pedro ve ark, (2016) da yapmış oldukları çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak adaçayının DNA hasarlarını, hücre üremesini önlediği ve kanser tedavisinde etkili olduğunu kanıtlamışlardır.

Yapılan çalışmalarda miR-31'in onkojenik bir miRNA olması nedeniyle kanser hücreleri üzerinde proliferatif etkileri olduğu gösterilmiş olup tez çalışmamızda da farklı bitki ekstraktlarının miR-31 üzerine olan etkileri araştırılmış; çörek otu ekstraktının miR-31 üzerine 10 µl/ml derişimlerde ve 24. saatden başlayan muamelelerde 4 kat baskılayıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Çörek otu ekstraktının uzun sürelerde kullanıldığında miR-31 mekanizması üzerinden halk arasında da kullanıldığı gibi HCT 116 hücre miktarını azalttığı belirlendi. O.A. Kensara ve ark, (2016) da yaptıkları çalışmada çörek otu bitkisinin etkin maddesi olan 5-florourasil'i (5-FU) yaklaşık 230 mg büyüklüğündeki farelere 15 mg/kg dozlarla 15 hafta boyunca uygulamışlardır. Bunun sonucunda kolorektal kanser erken evrelerinde hücre büyümesinde ve kemoterapinin oluşturduğu yan etkileri azaltmada etkili olduğunu belirlemişlerdir. R. Agbaria ve ark, (2015) yaptıkları çalışmada ise çörek otu tohumlarından elde edilen metanolik ekstraktları farklı sıcaklıklarda 2 saat boyunca 10 µl miktarlarda L428 hücre hatlarına muamele etmişler ve kanser önleyici olduğunu belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da çörek otu bitki ekstraktlarının en iyi etki ettiği derişimlerin 10 ve 20 µl/ml olduğu ve bizim çalışmamızda aynı derişimlerde 3. saatte miRNA üzerinde etkili olmadığı

fakat 24. saati geçen sürelerde miRNA'ya çörek otu bitki ekstraktının daha etkili olduğu belirlenmiştir. Adaçayı ekstraktının miR-31 üzerine sadece 10 ve 30 µl/ml konsantrasyonlarda 3. saatte baskılayıcı etkisi olduğu tespit edildi. Uzun süreli muamele edildiğinde ifade düzeyini artırıcı etkisi olduğu tespit edildi. Adaçayı ekstraktının halk arasında kullanıldığı gibi HCT 116 hücre miktarına miR-31 mekanizmasi üzerinden kısa sürelerde etkili olduğu belirlenmiştir.

Isırgan otu ekstraktının miR-31 kanser hücreleri üzerinde sadece 24. saatte ve 20 µl/ml konsantrasyonda 172 kat baskılayıcı etkisi olduğu tespit edildi. Bu konsantrasyon ve sürede çok etkilli bir şekilde miR-31 mekanizması üzerinden HCT 116 hücrelerini azalttığı belirlendi. Tere bitki ekstraktının miR-31 üzerine baskılayıcı etki göstermediği ve aksine uzun süreli muamele edildiğinde ifade düzeyini artırıcı etkisinin olduğu tespit edildi. Bu tespitle birlikte halk arasında kolon kanserine iyi geldiği düşünülen tere bitkisinin HCT 116 hücre hattının miktar artışını engelleyemediği belirlendi.

Yapılan çalışmalarda miR-135a'nın onkojenik bir miRNA olduğu ve kanser hücreleri üzerinde proliferatif etkileri olduğu gösterilmiş olup yapılan bu çalışmada, farklı bitki ekstraktlarının miR-135a üzerine olan etkileri araştırıldı. Çörek otu ekstraktının miRNA-135a üzerine 10 ve 20 µl/ml derişimlerde ve ilk 3 saat de etkisi olmamasına rağmen, sürenin artmasıyla 5 ve 7 kat baskılayıcı etkisinin olduğu tespit edildi. Uzun süreli kullanımlarda çörek otu ekstraktlarının HCT 116 hücrelerini miR-135a mekanizması üzerinden etkili olarak azaltığı belirlendi. Adaçayı ekstraktının miR-135a üzerine bütün konsantrasyonlarda ve sürelerde baskılayıcı etkisi olduğu tespit edilmiş olmakla birlikte en çok etkinin 40 µl/ml derişimde ve 3. saatde 11 kat baskılayıcı etkisi olduğu belirlendi. Adaçayı ekstraktlarının halk arasında düşünüldüğü gibi HCT 116 hücrelerine etkili olduğu ve miR-135a mekanizması üzerinden azalttığı belirlendi. Isırgan otu ekstraktının miR-135a üzerine düşük derişimlerde (10 ve 20 µl/ml) ve 3,24 ve 48 saatlerde baskılayıcı etkisi olduğu tespit edildi. 30 µl/ml konsantrasyonda 24. saatte ifade düzeyini 30 kat kadar artırıcı etkisi olduğu tespit edildi. Isırgan otu

ekstraktlarınında aynı adaçayında olduğu gibi, HCT 116 hücrelerine etkili olduğu belirlendi. A.Mohammadi ve ark, (2016) yaptıkları çalışmada ısırgan otunun dikolorometan ekstraktlarının HCT 116 hücre hattını yok ettiğini öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamız da Tere bitki ekstraktının miR-135a üzerine baskılayıcı etki göstermediği ve aksine uzun süreli muamele edildiğinde ifade düzeyini artırıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir,

Yapılan çalışmalarda miR-145'in tümör supresör miRNA olduğu ve kanser hücreleri üzerinde anti proliferatif etkileri olduğu gösterilmiş olup tez çalışmamızda da farklı bitki ekstraktlarının miR-145 üzerine olan etkileri incelendi. Çörek otu ekstraktının miR-145 üzerine düşük konsantrasyonlarda (10, 20 µl/ml) ifade düzeyini artırıcı etkisi olduğu tespit edilirken, yüksek konsantrasyonda (30, 40 µl/ml) uzun süreli muamelelerde baskılayıcı etkisi olduğu tespit edildi. Adaçayı ekstraktının miRNA-145 üzerine baskılayıcı etki göstermediği ve aksine düşük konsantrasyonlarda ve kısa süreli muamele edildiğinde ifade düzeyini artırıcı etkisinin olduğu tespit edildi. Halk arasında düşünülenin aksine adaçayı bitkisinin miR-145 mekanizması üzerinden HCT 116 hücre hatlarına etkili olmadığı belirlendi. Isırgn otu ekstraktının miR-145 üzerine baskılayıcı etki göstermediği miR-145'in ifadelenme düzeyinde fazla bir değişime neden olmadığı tespit edildi. Adaçayında olduğu gibi ısırgan otu ekstraktlarıda halk arasında düşünülenin aksi bir etki yaptığı ve HCT 116 hücrelerini azaltmadığı belirlendi. Tere bitki ekstraktının miR-145 üzerine sadece 20 µl/ml konsantrasyonda ve 48. saatte baskılayıcı etki göstermediği tespit edildi. S.H.Mahassi ve ark, (2013) yaptıkları çalışmada, tere bitkisinin farklı konsantrasyonlarını (25%, 50%, ve 75%) meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 kültürlerinde 24 saat boyunca uygulamışlar ve 25%, 50% derişimlerde kanserli hücrelerin öldüğünü belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmadan farklı olarak miR-21, 31 ve 135a üzerinde etkili olmadığı sadece miR-145 üzerinde 48 saat uygulama sonucunda kanserli hücre miktarını azalttığı belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışma istatistiksel olarak incelenmiştir. miRNA ekspresyon düzeylerindeki değişim kontrol grup ile karşılaştırıldığında 4 miRNA'da da $p>0,05$ olduğundan ötürü istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bütün bu bulgular ışığında bu tez çalışması, kolorektal kanser ilişkili miRNA'ları ve bölgesel bitki ekstraktlarının bu miRNA'ların ifade düzeylerine olan etkilerinin incelenmesi nedeniyle literatürde bir ilk olup, gerek özgünlüğü gerekse de kolorektal kanserin tedavisine kadar gidebilecek çalışmalar için öncülük etmesi nedeniyle büyük bir önem arz etmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Adaçayı bitkisinin miR-21 üzerine olan etkisinin 3. saatte ifade düzeyini azaltıcı yönde iken 24. ve 48. saatlerde etkinin kaybolarak tekrar normal seviyelere geldiği görüldü miR-31'e olan etkisinin ise zamana ve doza bağımlı olarak çok değişken miktarlarda olduğu tespit edildi. Bu bitki ekstraktının miR-135a üzerine olan etkisinin ise en belirgin şekilde yüksek konsantrasyonda ve erken dönemde olduğu, azalan dozlarla ise bu ifade düzeyindeki baskılayıcı etkisinin de azaldığı tespit edildi. miR-145 için de miR-135a benzer şekilde yüksek konsantrasyonda ve akut dönemde etkisinin olduğu bulundu. Dolayısı ile hem onkogenik miRNA'lar üzerine hem de tumor supresör olan miR-145 üzerine azaltıcı etkisi belirlendi.
2. Çörek otu bitkisinin miR-21'in ifade düzeyi üzerine olan etkisinin sadece düşük konsantrasyonda (10 µl/ml), 24. ve 48. saatte etkili olduğu belirlendi. Çörek otu bitkisinin miRNA-31'e olan etkisinin ise zamana ve doza bağımlı olarak değişken olduğu görüldü. Çörek otu bitkisinin miR-135a üzerindeki en iyi etkisinin derişimle ters orantılı olduğu ve süreyle doğru orantılı olduğu belirlendi. Çörek otu bitkisi miR-145 üzerinde düşük iki derişimde beklenilen etkiyi yaratmazken 30 ve 40 µl/ml derişimde önemli derecede artırdığı belirlendi. Bu bitkinin en iyi etki süresinin 48. saatte olduğu belirlendi.
3. Isırgan otu bitkisinin miR-21 üzerine olan etkisinin ise en belirgin şekilde 20 µl/ml ve 24. saatte olduğu belirlendi. Aynı şekilde, miR-31 için de ısırgan otunun en iyi etkisinin 24. saatte ve 20 µl/ml derişimde olduğu bulundu. Isırgan otunun miR-135a'ya etkisinin ise zamana ve doza bağımlı olarak değişken olduğu görüldü. Isırgan otu bitkisinin miR-145 ifade düzeyinde ise herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi.

4. Tere bitkisinin miR-21, miR-31 ve miR-135a ifadelenme düzeyinde herhangi bir derişim ya da sürede etkili olmadığı belirlendi. Bununla birlikte, tere bitkisinin miR-145 ifadelenme düzeyi üzerinde 20 µl/ml derişimde ve 48. saatte olduğu etkili olduğu tespit edildi.

5.2. Öneriler

1. Kolorektal kanserle ilişkili başka miRNA'lar üzerinde seçtiğimiz bitki ekstraktları kullanılarak elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırılabilir.
2. Başka kanser türleri ile ilişkili miRNA'lar seçilerek kullandığımız bitki türlerinin etkileri araştırılabilir.
3. Kullandığımız bu bitkilerin kolorektal kanser hattı HCT 116 üzerinde etkileri daha kapsamlı araştırılarak ilaç dizaynı için kullanılabilir.
4. Kullanılan bitki ekstraktlarının moleküler içerikleri belirlenerek muhtemel etkisi olanlarla daha kontrollü (Ör. Derişim kontrolü) deneyler yapılabilir.
5. Hücre sayımı ve miRNA yolakları çalışılabilir

KAYNAKLAR

Agbaria, R., Gabarin, A., Dahan, A., 2015. Ben-Shabat, S., Anticancer activity of *Nigella sativa (black seed)* and its relationship with the thermal processing and quinone composition of the seed. Drug. Des. Devel ther, 18(9), 3119-24.

Akdeniz, G., 2010. *Urtica dioica (Isırgan Otu)* Bitkisinin Türkiyedeki Etnobotanik Önemine Dair Bölgesel Antioksidan Kapasitesi, Toplam Fenolik İçeriği Ve Moleküler Düzeydeki Farklılıklarının Tespiti. Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.

Alemdar, A., 2016. Olea Europaea Yaprağı, *Rubus Frutikokus* ve *Nigella Cv.* Özütlerinin Kolon Kanseri Hücre Hatlarında MikroRNA Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.

Altuvia, Y.; Landgraf, P.; Lithwick, G.; ve ark, 2005,. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. Nucleic Acids Res., 33, 2697-2706.

Amaral, F.C., Torres, N., Saggioro F., ve ark, 2009. MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. J Clin Endocrinol Metab, 94, 320-323.

Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., 2003. Uniform system for microRNA annotation. Rna, 9, 277-279.

Anantharaman, V., Koonin, E. V., Aravind, L., 2002. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. Nucleic Acids Res., 30, 1427-1464.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., 2005. Pasquinelli, A. E. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. Cell, 122, 553-563.

Bansode R. R., Khatiwada J.R., Losso J. N., 2016. Targeting MicroRNA in Cancer Using Plant-Based Proanthocyanidins. Diseases, 28;4(2).

Bartel, D. P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 116, 281-297.

Berezikov, E., Chung, W. J., Willis, J., Cuppen, E., Lai, E. C., 2007. Mammalian mirtron genes. Mol. Cell, 28, 328-336.

Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., Filipowicz, W., 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. Cell, 125, 1111-1124.

Borchert, G. M., Lanier, W., Davidson, B. L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat. Struct. Mol. Biol., 13, 1097-1101.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., Cohen, S. M., 2005. Principles of microRNA-target recognition. PLoS Biol., 3, e85.

Brıeskorn, C.H., Domlıng, H.J., 1969. Carnosolsäure, Der Wichtige Antioxidativ Wirksame Inhaltsstoff des Rosmarin-und Salbeiblattes. Z Lebensm Unters Forsch, 141,10–16.

Bruchova, H., Merkerova, M., Prchal, J.T., 2008. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. Haematologica, 93, 1009-1016.

Calderone, V., Nencioni, G., Nieri, P., Morelli, I., Martinotti, E., 2001. Cardiovascular Effects of *Urtica dioica* L. Roots Extracts: *In vitro* and *In vivo* Pharmacological Studies, Universita di Pisa, Italy.

Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., ve ark, 2001. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci, USA, 99, 15524-15529.

Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., ve ark, 2004. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med, 353, 1793–801.

Chan, J.A,. Krichevsky, A. M., Kosik, K.S., 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res, 65, 6029–6033.

Chan, S.P., Slack, F. J., 2006. microRNA-Mediated Silencing Inside PBodies. RNA Biol., 3, 97-100.

Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., Shiekhattar, R., 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature, 436, 740-744.

Chıpault, J.R., Mızuno, G.R., Hawkıns, J.M., Lundberg, W.O., 1952.The Antioxidant Properties of Natural Spices, Food Research, 17,46–55.

Chu, C. Y., Rana, T. M., 2006. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. PLoS Biol., 4, e210.

Ciafre, S.A., Galardi, S., Mangiola, A., ve ark, 2005. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. Biochem Biophys Res Commun, 334, 1351–1358.

Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D. W., ve ark, 2010. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. Science, 328, 1694-1698.

Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., ve ark, 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci, USA ,102, 13944–13949.

Coller, J., Parker, R., 2005. General translational repression by activators of mRNA decapping. Cell, 122, 875-886.

Conforti, F., Ioele, G., ve ark, 2008. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. Food and Chemical Toxicology, 46, 3325-3332.

Cougot, N., Babajko, S., Seraphin, B., 2004. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. J. Cell Biol., 165, 31-40.

Cowland, J.B., Hother, C., Gronbaek, K., 2007. MicroRNAs and cancer. APMIS, 115, 1090–1106.

Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C., 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of *sage* and *rosemary* Journal of the American Oil Chemists', 73(5), 645- 652.

Çelik, D., Koşar, P., Özçelik, N., 2013. MikroRNA'lar ve Kanser İle İlişkisi. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, Isparta, 20 (3).

Davıs, P.H., (1965-1985) Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh , (v:1-4).

Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., Hannon, G. J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature, 432, 231-235.

Di Leva, G., Calin, G.A., Croce, M. C., 2006. MicroRNAs: Fundamentel Facts and involvement in human diseases. Birth Defects Research, 78, 180-189.

Diederichs, S., Haber, D. A., 2007. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. Cell, 131, 1097-1108.

Djarmatı, Z., Jankov, R.M., Schwırtlıch, E., Djulınac, B., Djordjevıc, A., 1991. High Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Sage by Supercritical CO2 Extraction, Journal of American Oil Chemistry Society, 68, 731–4.

Doench, J. G., Sharp, P. A., 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. Genes Dev., 18, 504-511.

Eis, P.S., Tam, W., Sun, L., ve ark, 2005. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. Proc Natl Acad Sci, USA, 10, 3627–3632.

Engel, N., Oppermann, C., ve ark, 2011. Proliferative effects of five traditional Nigerian medicinal plant extracts on human breast and bone cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology, 137, 1003-1010.

Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., ve ark, 2006. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. Cell Metab., 3, 87-98.

Fix, L., Shah, M., ve ark, 2010. MicroRNA Expression Profile of MCF-7 Human Breast Cancer Cells and the Effect of Green Tea Polyphenon-60. Cancer Genomics & Proteomics ,7, 261-278.

Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., 2006. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 5078-5083.

Garzon, R., Volinia, S., Liu C.G., ve ark, 2008. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. Blood,111, 3183–3189.

Gerhardt, U., Schroter, A., 1983. Rosmarinic Acid–An Antioxidant Occurring Naturally in Herbs, Fleischwirtschaft, 63, 1628–30.

Gironella, M., Seux, M., Xie, M.J., ve ark,2007. Tumor protein 53- induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR- 155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 16170–16175.

Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., Shiekhattar, R., 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. Cell, 123, 631-640.

Gu, T. J., Yi, X., Zhao, X. W., Zhao, Y., Yin, J. Q., 2009. Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. BMC Genomics, 10, 563.

Guang, S., Bochner, A. F., Pavelec, D. M., Burkhart, K. B., Harding, S., Lachowiec, J., Kennedy, S., 2008. An Argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus. Science, 321, 537-541.

Guo, Y., Chen, Z., Zhang, L., ve ark, 2008. Distinctive MicroRNA profiles relating to patient survival in esophageal Squamous cell carcinoma. Cancer Res, 68, 26-33.

Gül, H., 2016. Bazı Kaba Yemlere Çörek Otu, Kekik Otu Ve Yağları ilavesinin İn Vitro Organik Madde Sindirimi Ve Metan Üretimi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi.

Haase, A. D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A., Filipowicz, W., 2005. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. EMBO Rep., 6, 961-967.

Hafeez, B.B., Zhong, W., Fischer, J.W., ve ark, 2013. Plumbagin, a medicinal plant (Plumbago zeylanica) derived 1,4- naphthoquinone, inhibits growth and metastasis of human prostate cancer PC-3M-luciferase cells in an orthotopic xenograft mouse model. Moleculer Oncology, 7, 428-439.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Nam, J. W., Heo, I., ve ark, 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell, 125, 887-901.

Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., ve ark, 2005. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. Cancer Res, 65, 9628–9632.

He, H., Jazdzewski, K., Li, W., ve ark, 2005. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci, USA, 102, 19075–19080.

He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., ve ark, 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature, 435, 828–833.

Ilısulu, K., 1992. İlaç ve Baharat Bitkileri .Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Ders Kitabı. Ankara, S. 16-23.

Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., ve ark, 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res, 65, 7065–7070.

Işbilir, Ş.S., 2008. Yaprakları Salata-Baharat Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. Doktora Tezi.

Jackson, R.J., 2007. Standart N. How do microRNAs regulate gene expression. Sci STKE. 1:367.

Jakymiw, A., Ikeda, K., Fritzler, M. J., Reeves, W. H., Satoh, M., Chan, E. K., 2006. Autoimmune targeting of key components of RNA interference. Arthritis Res. Ther., 8, R87.

Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J. C., Fritzler, M. J., Chan, E. K., 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. Nat. Cell Biol., 7, 1267-1274.

Jakymiw, A., Pauley, K. M., Li, S., Ikeda, K., Lian, S., Eystathioy, T., Satoh, M., Fritzler, M. J., Chan, E. K., 2007. The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. J. Cell Sci., 120, 1317-1323.

Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., ve ark, 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell, 120, 635– 647.

Kara, M., Yumrutas, Ö., Ozcan, Ö., ve ark. 2015. Differential expressions of cancer-associated genes and their regulatory miRNAs in colorectal carcinoma. Gene, 567, 81–86.

Karakaş, S.,2003. Isırgan otu toprak altı ve toprak üstü kısımlarından ısırgan otu ekstraktının eldesi ve özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi.

Kedersha, N. Gupta, L., Li, M., Miller, I.; Anderson, P., 1999. RNAbinding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. J. Cell Biol., 147, 1431-1442.

Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke- Andersen, J., 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. J. Cell Biol., 169, 871-884.

Kenar, M., 2009. Aromatik Bitkilerden Elde Edilen Doğal Antioksidanların Balık Filetosu Üzerindeki Duyusal, Kimyasal Ve Mikrobiyolojik Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi.

Kensara, O.A., El-Shemi, A.G., Mohamed, A.M., Refaat, B., Idris, S., Ahmad, J., 2016. Thymoquinone subdues tumor growth and potentiates the chemopreventive effect of 5-fluorouracil on the early stages of colorectal carcinogenesis in rats. Drug. Des. Devel ther, 11(10), 2239-53.

Kim, V. N., 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 6, 376-385.

Kluiver, J., Poppema, S., de Jong, D., ve ark, 2005. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. J Pathol, 207, 243– 249.

Koutsaki M., Spandidos D.A., 2014. Epithelial-mesenchymal transition-associated miRNAs in ovarian carcinoma, with highlight on the miR-200 family: prognostic value and prospective role in ovarian cancer therapeutics. Cancer Lett, 351(2):173-81.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science, 294, 853-858.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The C. elegans hetero- chronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 75, 843–854.

Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., 2004. Carthew, R. W. Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. Cell, 117, 69-81.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., ve ark, 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature, 425, 415-419.

Lee, Y.S., Dutta A., 2007. The tumor suppressor microRNA let-7 re- presses the HMGA2 oncogene. Genes Dev, 21, 1025–1030.

Lee, Y.S., Dutta A., 2009. MicroRNAs in cancer. Annu Rev Pathol, 4, 199-227.

Li, J., Mao, X., Wang, X., 2016. miR-433 reduces cell viability and promotes cell apoptosis by regulating MACC1 in colorectal cancer. Genes Dev, 13(1), 81–88.

Lin, P.Y., Yu, S.L., Yang, P.C. 2010. MicroRNA in lung cancer. Brit J Cancer, 103, 1144-1148.

Lin, T., Dong, W., Huang, J., ve ark, 2009. MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer. J Urol, 181, 1372-1380.

Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods ,**25:** 402-408.

Loffler, D., Brocke-Heidrich, K., Pfeifer, G., ve ark, 2007. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. Blood, 110, 1330–1333.

Lui, W.O., Pourmand, N., Patterson, B.K, Fire, A., 2007. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. Cancer Res, 67, 6031-6043.

Lund, E., Dahlberg, J. E., 2006. Substrate Selectivity of Exportin 5 and Dicer in the Biogenesis of MicroRNAs. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 71, 59-66.

MacFarlane L., Murphy P.R., 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Current Genomics, 11, 537-561

Macrae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., 2008. Doudna, J. A. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 105(2), 512-7.

Mahassni, S.H., Al-Reemi, R.M., 2013. Apoptosis and necrosis of human breast cancer cells by an aqueous extract of garden cress (*Lepidium sativum*) seeds. Saudi J. Biol, 20(2),131-9.

Maniataki, E., Mourelatos, Z. 2005. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. Genes Dev., 19, 2979-2990.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., Zamore, P. D., 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. Cell, 123, 607- 620.

McCubrey J. A., Abrams S. L., Lertpiriyapong K. 2017. Effects of berberine, curcumin, resveratrol alone and in combination with chemotherapeutic drugs and signal transduction inhibitors on cancer cells-Power of nutraceuticals. Adv Biol Regul., 67:190-211.

Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P. Y., Urlaub, H., Luhrmann, R., 2005. Tuschl, T. Identification of novel argonauteassociated proteins. Curr. Biol., 15, 2149-2155.

Mendell, J. T., 2005. MicroRNAs: Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. Cell Cycle, 4, 1179 -1184.

Mendell, J. T.,2008. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. Cell, 133, 217–222.

Meng, F., Henson, R.H., Wehbe-Janek, H., ve ark, 2007. MicroRNA- 21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology, 133, 647–658.

Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., ve ark,2004. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. Genes Chromosomes Cancer, 39, 167–169.

Michael, M.Z., O'Connor, S.M., van Holst Pellekaan, N.G., ve ark, 2003. Reduced accumulation of specific mi- croRNAs in colorectal neoplasia. Mol Cancer Res, 1, 882–891.

Mohammadi, A., Mansoori, B., Aghapour, M., Baradaran, P.C., Shajari, N., Davudian, S., Salehi, S., Baradaran, B., 2016. The Herbal Medicine Utrica Dioica Inhibits Proliferation of Colorectal Cancer Cell Line by Inducing Apoptosis and Arrest at the G2/M Phase. J. gastraintest cancer, 47(2),187-95.

Mott, J.L., Kobayashi, S., Bronk, S.F., ve ark,2007. Mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. Oncogene, 26, 6133–140.

Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., ve ark, 2006. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. Oncogene, 25, 2537–2545.

O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., ve ark, 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature , 435, 839–843.

Parker, R., Sheth, U., 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. Mol. Cell, 25, 635-646.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., ve ark, 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature, 408 (6808), 86–89.

Pastrello,C., Tsay, M., McQuaid, R. Ve ark. 2017. Retraction: Circulating plant miRNAs can regulate human gene expression in vitro. Sci Rep. 7, 46826.

Pauley, K. M., Eystathioy, T., Jakymiw, A., Hamel, J. C., Fritzler, M. J., Chan, E. K., 2006. Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis. EMBO Rep., 7, 904-910.

Periasamy, V. S., Athinarayanan, J., Alshatwi, A. A., 2016. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of Nigella sativa L. essential oil on human breast cancer cells. Ultrasonics Sonochemistry, 31, 449–455.

Perron, M. P., Provost, P., 2008. Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. Front, Biosci., 13, 2537-2547.

Pızzale, L., Bortolomeazzı, R., Vıchı, S., Uberegga, E., Conte, L. S., 2002. Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* and *S. fructicosa*) and Oregano (Origanum onites and O. intercedens) Extracts Related to Their Phenolic Compound Content. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82,1645–165.

Prasanna, R., Chandramoorthy, H.C., ve ark, 2011. In vitro evaluation of anticancer effect of *Cassia auriculata* leaf extract and curcumin through induction of apoptosis in human breast and larynx cancer cell lines. Biomedicine & Preventive Nutrition, 1, 153-160.

Quesne, J. L., Caldas, C., 2010. Micro RNAs and breast cancer. Moleculer Oncology, 4, 230-241.

Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., Wang, X.,2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. Cell, 123, 621-629.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., ve ark, 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature, 403, 901–906.

Randhawa, M.A., Al-Ghamdı, M.S., 2002. A review of the pharmaco-therapeutic effectes of Nigella sativa. Pakistan J Med Res., 41(2), 77-83.

Richter, D., Isono, K., 1977. The mechanism of protein synthesisinitiation, elongation and termination in translation of genetic messeges. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 76, 83-125.

Robb, G. B., Rana, T. M. 2007. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. Mol. Cell, 26, 523-537.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., Bradley, A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res., 14, 1902-1910.

Ruby, J. G., Jan, C. H., Bartel, D. P., 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. Nature, 448, 83-86.

Ruvkun, G., 2001. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. Science, 294, 797–799.

Sampson, V.B., Rong , N.H., Han, J., ve ark, 2007. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC induced growth in Burkitt lymphoma cells. Cancer Res, 67, 9762–9770.

Saunders, M. A., Liang, H., Li, W., 2007. Human polymorphism at microRNAs and microRNAs target sites. PNAS, 104, 3300-3305.

Saxena, S., Jonsson, Z. O., Dutta, A., 2003. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. J. Biol. Chem., 278, 44312-44319.

Saydam, F., Değirmenci, İ., Güneş, H. V., 2011. MikroRNA'lar ve kanser. Dicle Tıp Dergisi, 38 (1), 113-120.

Sevli, S., Uzumcu, A., Solak, M., ve ark, 2010. The function microR- NAs, small potent molecules in human prostate cancer. Prostate Cancer, 13, 208-217.

Slaby, O., Svoboda, M., Fabian, P., ve ark, 2008. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. Oncology, 72, 397-402.

Tam, W., Ben-Yehuda, D., Hayward, W.S., 1997. A novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. Mol Cell Biol, 17, 1490–1502.

Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A., Brengues, M., Parker, R., 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. RNA, 11, 371-382.

Torun, M., Dinçer, C., Sahin, H., 2008. Adaçayı *(Salvia fruticosa)* Üretiminde Ekstraksiyon Kosullarının Belirlenmesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi. Erzurum.

Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J., Parker, R., 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes Dev., 20, 515-524.

Viswanathan, S. R., Daley, G. Q., 2010. Lin28: A microRNA regülatör with a macro role. Cell, 140, 445-449.

Volinia, S., Calin, G., Liu, C.G., ve ark, 2006.A microRNA expression signature in human solid tumors defines cancer targets. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 103, 2257–2261.

Way, T., Lin, H., ve ark, 2009. Beneficial effects of different tea flowers against human breast cancer MCF-7 cells. Food Chemistry, 114, 1231-1236.

Wightman, B. H. I., Ruvkun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediated temporal pattern formation in C. elegans. Cell, 75, 855-862.

Wijnhoven, B.P., Michael, M.Z., Watson, D.I., 2007. MicroRNAs and cancer. Br J Surg., 94, 23–30.

Wu, W., Sun, M., Zou, G. M., Chen, J., 2007. MicroRNA and cancer: Current status and prospective. Int. J. Cancer, 120, 953-960.

Ye J., Wang Z., Zhao J., ve ark. 2017. MicroRNA-141 inhibits tumor growth and minimizes therapy resistance in colorectal cancer. Mol Med. Rep., 15(3),1037-1042

Yekta, S., Shih, I. H., Bartel, D. P., 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. Science, 304, 594-596.

Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., Tomari, Y., 2010. ATP-dependent human RISC assembly pathways. Nat. Struct. Mol. Biol., 17, 17-23.

Yu, J., Wang, F., Yang, G. H., Wang, F. L., Ma, Y. N., Du, Z. W., Zhang, J. W., 2006. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. Biochem. Biophys. Res. Commun., 349, 59-68.

Yu, Z., Wang, C., Wang, M., Li, Z., Casimiro, M. C., ve ark, 2008. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. J. Cell Biol., 182, 509-517.

Zeybek, U., Zeybek, N., 2002. Farmasötik Botanik (3. baskı), Ege Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, No:3, İzmir.

Zhang, H., Kolb, F. A., Brondani, V., Billy, E., Filipowicz, W., 2002. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. EMBO J., 21, 5875-5885.

Zhou, Y., Liu, J.Q., Zhou, Z.H., Lv, X.T., Chen, Y.Q., Sun, L.Q., Chen, F.X., 2016. Enhancement of CD3AK cell proliferation and killing ability by α-Thujone. Immunopharmacol, 30, 57-61.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kayseri de tamamladı. Lise öğrenimini Adana'da tamamladıktan sonra 2002 yılında İzmir Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde üniversite eğitimine başladı ve 2007 yılında mezun oldu. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2012 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümünde doktora eğitimine başladı.

EKLER

EK-1

Kontrol grubuna karşı HCT 116 hücre hattındaki miRNA'ların ekspresyon düzeyleri

miRNA	Fold Regulation	Fold Change	**p-value**
miR-21 10 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-5,2295	0,1912	0,521292
miR-145 10 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-4,0278	0,2483	0,214993
miR-135 10 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-2,8679	0,3487	0,472654
miR-31 10 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-2,7195	0,3677	0,314597
miR-21 20 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-3,9632	0,2523	0,250218
miR-145 20 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-2,2658	0,4414	0,42176
miR-135 20 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-2,1886	0,4569	0,429338
miR-31 20 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-1,9363	0,5164	0,492587
miR-21 30 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-11,5248	0,0868	0,125632
miR-145 30 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-6,6346	0,1507	0,081583
miR-135 30 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-6,3643	0,1571	0,128364
miR-31 30 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-5,7491	0,1739	0,178249
miR-21 40 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-11,2096	0,0892	0,486672
miR-145 40 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-9,7136	0,1029	0,411838
miR-135 40 µl/ml Adaçayı (3 saat)	-11,0809	0,0902	0,327354
miR-31 40 µl/ml Adaçayı (3 saat)	3,6978	3,6978	0,997918
miR-21 10 µl/ml Adaçayı (24 saat)	3,1456	3,1456	0,287355
miR-145 10 µl/ml Adaçayı (24saat)	-1,7532	0,5704	0,539659
miR-135 10 µl/ml Adaçayı (24 saat)	-6,021	0,1661	0,178659
miR-31 10 µl/ml Adaçayı (24 saat)	5,5661	5,5661	0,202178
miR-21 20 µl/ml Adaçayı (24 saat)	3,1023	3,1023	0,578695
miR-145 20 µl/ml Adaçayı (24 saat)	-1,4142	0,7071	0.697832
miR-135 20 µl/ml Adaçayı (24 saat)	-5,1694	0,1934	0,588364
miR-31 20 µl/ml Adaçayı (24 saat)	3,5967	3,5967	0,997997
miR-21 30 µl/ml Adaçayı (24 saat)	2,6268	2,6268	0,215983
miR-145 30 µl/ml Adaçayı (24 saat)	-1,9053	0,5249	0,511254
miR-135 30 µl/ml Adaçayı (24 saat)	-8,0556	0,1241	0,568247
miR-31 30 µl/ml Adaçayı (24 saat)	2,7447	2,7447	0,868742
miR-21 40 µl/ml Adaçayı (24 saat)	2,9554	2,9554	0,905927

miR-145 40 µl/ml Adaçayı (24 saat)	-1,6358	0,6113	0,558049
miR-135 40 µl/ml Adaçayı (24 saat)	-5,9794	0,1672	0,235548
miR-31 40 µl/ml Adaçayı (24 saat)	3,3792	3,3792	0,975583
miR-21 10 µl/ml Adaçayı (48 saat)	1,5298	1,5298	0,653824
miR-145 10 µl/ml Adaçayı (48 saat)	-1,4845	0,6736	0,629741
miR-135 10 µl/ml Adaçayı (48 saat)	-3,7321	0,2679	0,788569
miR-31 10 µl/ml Adaçayı (48 saat)	1,8234	1,8234	0,248567
miR-21 20 µl/ml Adaçayı (48 saat)	1,8575	1,8575	0,597121
miR-145 20 µl/ml Adaçayı (48 saat)	-1,6702	0,5987	0,536911
miR-135 20 µl/ml Adaçayı (48 saat)	-8,6338	0,1158	0,528697
miR-31 20 µl/ml Adaçayı (48 saat)	3,2868	3,2868	0,869777
miR-21 30 µl/ml Adaçayı (48 saat)	1,0234	1,0234	0,237401
miR-145 30 µl/ml Adaçayı (48 saat)	-1,879	0,5322	0,40662
miR-135 30 µl/ml Adaçayı (48 saat)	-6,2767	0,1593	0,355682
miR-31 30 µl/ml Adaçayı (48 saat)	3,2191	3,2191	0,23515
miR-21 40 µl/ml Adaçayı (48 saat)	1,2426	1,2426	0,287532
miR-145 40 µl/ml Adaçayı (48 saat)	-1,3104	0,7631	0,578793
miR-135 40 µl/ml Adaçayı (48 saat)	-8,4561	0,1183	0,110298
miR-31 40 µl/ml Adaçayı (48 saat)	3,4742	3,4742	0,596312
miR-21 10 µl/ml Çörek otu (3 saat)	3,5636	3,5636	0,985853
miR-14510 µl/ml Çörek otu (3 saat)	-26,9087	0,7631	0,866842
miR-135 10 µl/ml Çörek otu (3saat)	1,1408	1,1408	0,301524
miR-31 10 µl/ml Çörek otu (3 saat)	2,1685	2,1685	0,212883
miR-21 20 µl/ml Çörek otu (3 saat)	-1,5227	0,6567	0,154237
miR-145 20 µl/ml Çörek otu (3saat)	-2,5315	0,395	0,975743
miR-135 20 µl/ml Çörek otu (3saat)	-1,9453	0,5141	0,495361
miR-31 20 µl/ml Çörek otu (3 saat)	-1,9498	0,5129	0,510333
miR-21 30 µl/ml Çörek otu (3 saat)	-1,0546	0,9482	0,876394
miR-145 30 µl/mlÇörek otu (3saat)	-4,2575	0,2349	0,288664
miR-135 30 µl/ml Çörek otu (3saat)	7,21	7,21	0,125863
miR-31 30 µl/ml Çörek otu (3 saat)	-2,8945	0,3455	0,325386
miR-21 40 µl/ml Çörek otu(3 saat)	5,11	5,11	0,998354
miR-145 40 µl/ml Çörek otu (3saat)	2,6574	2,6574	0,354692
miR-135 40 µl/ml Çörek otu (3saat)	21,5719	21,5719	0,211389
miR-31 40 µl/ml Çörek otu (3 saat)	2,9214	2,9214	0,899547

miR-21 10 µl/ml Çörek otu (24saat)	-6,0909	0,1642	0,788596
miR-145 10µl/mlÇörek otu(24 saat)	-10,4107	0,0961	0,055741
miR-135 10 µl/ml Çörek otu (24saat)	-5,2416	0,1908	0,278654
miR-31 10 µl/ml Çörek otu (24 saat)	-4,122	0,2426	0,355682
miR-21 20 µl/ml Çörek otu (24 saat)	-1,7983	0,5561	0,288536
miR-145 20 µl/ml Çörek otu (24saat)	-1,9453	0,5141	0,202149
miR-135 20 µl/ml Çörek otu(24 saat)	-4	0,25	0,985529
miR-31 20 µl/ml Çörek otu (24 saat)	-1,0093	0,9908	0,812392
miR-21 30 µl/ml Çörek otu (24 saat)	-1,2283	0,8141	0,771598
miR-145 30 µl/ml Çörek otu (24saat)	-1,1567	0,8645	0,490588
miR-135 30 µl/ml Çörek otu (24saat)	-1,4948	0,669	0,61243
miR-31 30 µl/ml Çörek otu (24 saat)	2,1835	2,1835	0,865652
miR-21 40 µl/ml Çörek otu (24 saat)	1,0093	1,0093	0,998553
miR-145 40 µl/ml Çörek otu (24saat)	-1,2924	0,7738	0,774197
miR-135 40 µl/ml Çörek otu (24saat)	-2,1287	0,4698	0,432246
miR-31 40 µl/mlÇörek otu (24 saat)	1,5333	1,5333	0,339114
miR-21 10 µl/ml Çörek otu (48 saat)	-4,6161	0,2166	0,814665
miR-145 10 µl/ml Çörek otu (48saat)	-8,515	0,1174	0,158237
miR-135 10 µl/ml Çörek otu (48saat)	-7,4643	0,134	0,523946
miR-31 10 µl/ml Çörek otu (48 saat)	-3,8727	0,2582	0,212356
miR-21 20 µl/ml Çörek otu (48 saat)	-2,2449	0,4454	0,411276
miR-145 20 µl/ml Çörek otu (48saat)	-1,9053	0,5249	0,468415
miR-135 20 µl/ml Çörek otu (48saat)	-4,5631	0,2192	0,586324
miR-31 20 µl/ml Çörek otu (48 saat)	-2,0326	0,492	0,473556
miR-21 30 µl/ml Çörek otu(48 saat)	1,7818	1,7818	0,591283
miR-145 30 µl/ml Çörek otu (48saat)	7,6211	7,6211	0,988864
miR-135 30 µl/ml Çörek otu (48saat)	28,5859	28,5859	0,258645
miR-31 30 µl/ml Çörek otu (48 saat)	2,308	2,308	0,232149
miR-21 40 µl/ml Çörek otu (48 saat)	16,4879	16,4879	0,865472
miR-145 40 µl/ml Çörek otu (48saat)	10,4107	10,4107	0,965823
miR-135 40 µl/ml Çörek otu(48 saat)	19,5622	19,5622	0,944681
miR-31 40 µl/ml Çörek otu (48 saat)	2,3729	2,3729	0,258364
miR-21 10 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	1,1837	1,1837	0,04358
miR-145 10 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	-1,6133	0,6199	0,609741
miR-135 10 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	-1,2746	0,7846	0,748215

miR-31 10 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	-1,0305	0,9704	0,818964
miR-21 20 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	1,6283	1,6283	0,213287
miR-145 20 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	-1,5911	0,6285	0,597346
miR-135 20 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	-2,362	0,4234	0,402176
miR-31 20 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	1,162	1,162	0,129782
miR-21 30 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	1,674	1,674	0,335744
miR-145 30 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	-2,1585	0,4633	0,412556
miR-135 30 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	-3,2043	0,3121	0,288641
miR-31 30 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	1,9543	1,9543	0,948715
miR-21 40 µl/ml Isırgan otu(3 saat)	3,6385	3,6385	0,689742
miR-145 40 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	-1,1567	0,8645	0,713559
miR-135 40 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	-3,1167	0,3209	0,286413
miR-31 40 µl/ml Isırgan otu (3 saat)	2,9417	2,9417	0,202567
miR-21 10 µl/ml Isırgan otu (24 saat)	-1,3819	0,7236	0,712647
miR-145 10 µl/ml Isırganotu (24saat)	-4,8568	0,2059	0,408321
miR-135 10 µl/ml Isırganotu (24saat)	-3,3636	0,2973	0,958634
miR-31 10 µl/ml Isırgan otu (24 saat)	-2,3511	0,4253	0,128654
miR-21 20 µl/ml Isırgan otu (24 saat)	-1,632	0,6127	0,574436
miR-145 20 µl/ml Isırganotu (24saat)	-5,063	0,1975	0,056826
miR-135 20 µl/ml Isırganotu(24 saat)	-6,1475	0,1627	0,285694
miR-31 20 µl/ml Isırganotu (24 saat)	-171,6509	0,0058	0,568418
miR-21 30 µl/ml Isırgan otu (24 saat)	36,5889	36,5889	0,386942
miR-145 30 µl/ml Isırganotu (24saat)	-1,0281	0,9727	0,918337
miR-135 30 µl/ml Isırganotu (24saat)	29,8571	29,8571	0,258934
miR-31 30 µl/ml Isırgan otu (24 saat)	4,7789	4,7789	0,969058
miR-21 40 µl/ml Isırgan otu (24 saat)	-1,0401	0,9615	0,871154
miR-145 40 µl/ml Isırganotu (24saat)	-1,8277	0,5471	0,498634
miR-135 40 µl/ml Isırganotu (24saat)	-4,4383	0,2253	0,878864
miR-31 40 µl/ml Isırgan otu (24 saat)	1,0918	1,0918	0,881996
miR-21 10 µl/ml Isırgan otu (48 saat)	1,8446	1,8446	0,209973
miR-145 10 µl/ml Isırganotu (48saat)	-1,4743	0,6783	0,62779
miR-135 10 µl/ml Isırganotu (48saat)	-2,4116	0,4147	0,398919
miR-31 10 µl/ml Isırgan otu (48 saat)	3,1748	3,1748	0,21288
miR-21 20 µl/ml Isırgan otu (48 saat)	1,651	1,651	0,361279
miR-145 20 µl/ml Isırganotu (48saat)	-1,0644	0,9395	0,599912

miR-135 20 µl/ml Isırganotu (48saat)	-13,1775	0,0759	0,965823
miR-31 20 µl/ml Isırgan otu (48 saat)	3,1748	3,1748	0,172446
miR-21 30 µl/ml Isırgan otu(48 saat)	1,2864	1,2864	0,288956
miR-145 30 µl/ml Isırganotu (48saat)	-1,5263	0,6552	0,649312
miR-135 30 µl/ml Isırganotu (48saat)	-6,6807	0,1497	0,315691
miR-31 30 µl/ml Isırgan otu (48 saat)	1,5874	1,5874	0,880973
miR-21 40 µl/ml Isırgan otu (48 saat)	3,8727	3,8727	0,85594
miR-145 40 µl/ml Isırganotu (48saat)	-1,454	0,6878	0,269845
miR-135 40 µl/ml Isırganotu(48 saat)	5,2054	5,2054	0,497284
miR-31 40 µl/ml Isırgan otu (48 saat)	1,9679	1,9679	0,288964
miR-21 10 µl/ml Tere (3 saat)	-2,8979	0,3451	0,288697
miR-145 10 µl/ml Tere (3 saat)	-2,9845	0,3351	0,997585
miR-135 10 µl/ml Tere (3 saat)	1,5157	1,5157	0,704413
miR-31 10 µl/ml Tere (3 saat)	-4,1989	0,2382	0,567999
miR-21 20 µl/ml Tere (3 saat)	-2,4538	0,4075	0,969523
miR-145 20 µl/ml Tere (3 saat)	-2,1398	0,4673	0,512238
miR-135 20 µl/mlTere (3 saat)	-1,014	0,9862	0,817199
miR-31 20 µl/ml Tere (3 saat)	-1,7411	0,5743	0,255877
miR-21 30 µl/ml Tere (3 saat)	-2,7992	0,3572	0,975963
miR-145 30 µl/ml Tere (3 saat)	-1,8758	0,5331	0,551711
miR-135 30 µl/ml Tere (3 saat)	-1,0943	0,9138	0,681131
miR-31 30 µl/ml Tere (3 saat)	-2,362	0,4234	0,418219
miR-21 40 µl/ml Tere(3 saat)	-3,3288	0,3004	0,286359
miR-145 40 µl/ml Tere(3 saat)	-1,7261	0,5793	0,698873
miR-135 40 µl/ml Tere (3 saat)	-1,4641	0,683	0,619299
miR-31 40 µl/ml Tere (3 saat)	-2,2191	0,4506	0,202358
miR-21 10 µl/ml Tere (24 saat)	2,783	2,783	0,837669
miR-145 10 µl/ml Tere (24 saat)	-1,3226	0,7561	0,908817
miR-135 10 µl/ml Tere (24 saat)	-1,5404	0,6492	0,53124
miR-31 10 µl/ml Tere (24 saat)	1,6974	1,6974	0,864905
miR-21 20 µl/ml Tere (24 saat)	1,5547	1,5547	0,435618
miR-145 20 µl/ml Tere (24 saat)	1,3165	1,3165	0,571816
miR-135 20 µl/ml Tere(24 saat)	-1,7331	0,577	0,865784
miR-31 20 µl/ml Tere (24 saat)	1,341	1,341	0,502893
miR-21 30 µl/ml Tere (24 saat)	1,0046	1,0046	0,976618

miR-145 30 µl/ml Tere (24 saat)	-1,6396	0,6099	0,733982
miR-135 30 µl/ml Tere (24 saat)	-2,6087	0,3833	0,593814
miR-31 30 µl/ml Tere (24 saat)	-1,7859	0,5599	0,719683
miR-21 40 µl/ml Tere (24 saat)	1,0187	1,0187	0,566472
miR-145 40 µl/ml Tere (24 saat)	-1,2426	0,8048	0,37702
miR-135 40 µl/ml Tere (24 saat)	-1,4373	0,6958	0,703449
miR-31 40 µl/ml Tere (24 saat)	-1,3629	0,7337	0,436652
miR-21 10 µl/ml Tere (48 saat)	-5,3641	0,1864	0,997625
miR-145 10 µl/ml Tere (48 saat)	1,2541	1,2541	0,202115
miR-135 10 µl/ml Tere (48 saat)	-1,3692	0,7304	0,095841
miR-31 10 µl/ml Tere (48 saat)	-2,0279	0,4931	0,242659
miR-21 20 µl/ml Tere (48 saat)	10,459	10,459	0,712647
miR-145 20 µl/ml Tere (48 saat)	4,9132	4,9132	0,492587
miR-135 20 µl/ml Tere (48 saat)	5,1575	5,1575	0,578793
miR-31 20 µl/ml Tere (48 saat)	6,021	6,021	0,110298
miR-21 30 µl/ml Tere(48 saat)	-1,2599	0,7937	0,711593
miR-145 30 µl/ml Tere (48 saat)	1,9274	1,9274	0,345068
miR-135 30 µl/ml Tere (48 saat)	-1,6857	0,5932	0,534786
miR-31 30 µl/ml Tere (48 saat)	1,1487	1,1487	0,598847
miR-21 40 µl/ml Tere (48 saat)	-1,2599	0,7937	0,521292
miR-145 40 µl/ml Tere (48 saat)	1,9274	1,9274	0,214993
miR-135 40 µl/ml Tere(48 saat)	-1,6857	0,5932	0,472654
miR-31 40 µl/ml Tere (48 saat)	1,1487	1,1487	0,314597