ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aylin ÖRS

MİR-105-5P'NİN APOPTOZ VE KÖK HÜCRE İLİŞKİLİ GENLERE ETKİSİNİN A549, MCF7 VE HELA HÜCRE HATLARINDA KARŞILAŞTIRILMASI.

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2022

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİR-105-5P'NİN APOPTOZ VE KÖK HÜCRE İLİŞKİLİ GENLERE ETKİSİNİN A549, MCF7 VE HELA HÜCRE HATLARINDA KARŞILAŞTIRILMASI.

Aylin ÖRS

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER
Yıl: 2022, Sayfa: 75
Jüri : Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER
: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
: Doç. Dr. Dilek GÖKTÜRK

MikroRNA'lar (miRNA), 20-30 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan endojen küçük RNA'ların sınıfını oluşturan RNA molekülleridir. Birçok kanserde onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak görev aldığı birçok araştırma ile kanıtlanmıştır. Bu miRNA'lar aynı zamanda hücre düzenlenmesi, gelişim, apoptosis ve metastaz gibi birçok biyolojik sürece katkıda bulunmaktadırlar. Bunun gibi birçok özellik daha miRNA'ların çalışılmasını ilginç hale getirmektedir. Daha önce birçok miRNA üzerinde çalışmalar yapılmış fakat miR-105 ailesinin üyelerinden olan miR-105-5p miRNA'sı ile ilgili çok fazla çalışma mevcut değildir. Bu araştırmanın amacı; miR-105-5p miRNA'sının akciğer (A549), meme (MCF7) ve rahim ağzı (HeLa) kanserleri üzerindeki etkisini incelemektir. Bu amaç doğrultusunda, transfeksiyon yöntemi kullanılarak miR-105-5p'nin knokdown ve over ekspresyon koşulları sağlanmıştır. Bu koşullar altındaki hücreler; proliferasyon deneyi kurularak artış hızları, koloniformasyon deneyi ile de koloni oluşturma özellikleri açısından gözlemlenmiştir. Ayrıca RT-PCR yapılarak miR-105-5p'nin bu kanserlerdeki apoptoz ve kök hücre ilişkili genlerine etkileri de incelenmiş ve bu genleri onkogen veya tümör baskılayıcı yönden etkilediği görülmüştür. Ayrıca ekspresyonu arttırılan miR-105-5p'nin her üç hücre hattında da hücrelerin artış hızını ve koloni oluşturma özelliklerini de bastırmıştır. Bu sonuçlardan hareketle miR-105-5p'nin hedefe yönelik tedavi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: MikroRNA, tümör baskılayıcı, apoptoz, kanser, transfeksiyon

ABSTRACT

MSc THESIS

COMPARISON OF THE EFFECT OF MIR-105-5P ON APOPTOSIS AND STEM CELL-RELATED GENES ON A549, MCF7 AND HELA CELL LINES.

Aylin ÖRS

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF NATURAL BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER
Year : 2022, Pages: 75
Jury : Assoc. Prof. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER
: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
: Assoc. Prof. Dr. Dilek GÖKTÜRK

MicroRNAs have got 20-30 nücleotid and they are RNA molecules that make up the class of non-protein-coding endogenous small RNAs. They have been proven by a lot of research they took charge as an oncogenic or tumor suppressor for a lot of cancer. These miRNAs also contribute to many biological processes such as cell regulation, development, apoptosis, and metastasis. Many such properties make the study on microRNAs interesting. Many miRNAs have been researched before, but there is not much research on miR-105-5p, which is a member of the miR-105 family. The purpose of this research; To examine the effect of miR-105-5p on lung (A549), breast (MCF7), and cervical (HeLa) cancers. For this purpose, the knockdown and over-expression conditions of miR-105-5p were provided by using the transfection method. Cells under these conditions; The growth rates were observed by establishing the proliferation experiment and the colony-formation characteristics were observed with the colony-formation experiment. In addition, the effects of miR-105-5p on apoptosis and stem cell-related genes in these cancers were also examined by RT-PCR and it was observed that these genes were affected as an oncogene or tumor suppressors. In addition, the increased expression of miR-105-5p suppressed the growth rate and colony formation properties of cells in all three cell lines. Based on these results, it is thought that miR-105-5p can be used as a targeted therapy.

Keywords: MicroRNA, tumor suppressor, apoptosis, cancer, transfection

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

MikroRNA'lar (miR), yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanırlar fakat proteine translasyonları gerçekleşmez (Saydam ve ark, 2011). Endojen küçük RNA'ların sınıfını oluştururlar ve yaklaşık 20-30 nükleotid uzunluğa sahiptirler. Bu protein kodlamayan RNA moleküllerinin sayısı yaklaşık olarak bini geçmektedir (Çelik ve ark, 2013; Zamore ve ark, 2005). Araştırmalar bu miRNA seviyelerinin normal koşulların dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimiyle bağlantılı olabileceğini göstermiştir (Wijnhoven ve ark, 2007). İlk mikroRNA, Lee ve arkadaşları tarafından 1993 keşfedilmesine rağmen mikroRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Lee ve arkadaşları, Caenorhabditis elegans'ı gen içeriği bakımından tararken bir genin hiçbir protein kodlamamasına rağmen 22 nükleotit uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini rapor etmişlerdir. Bu ilginç buluştan sonra diğer çalışmalarda da hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda bu küçük RNA molekülü keşfedilmiştir. Yapılan birçok araştırma ile bu RNA moleküllerinin hücre farklılaşması, metastaz, gelişim, hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptosis gibi birçok biyolojik süreçte önemli roller üstlendiği gösterilmiştir (Saydam ve ark, 2011). MiRNA'lar, hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine argonaute proteinleri yardımıyla bağlanarak mRNA yıkımına veya protein translasyonunun baskılanmasına neden olmaktadırlar (Gregory ve ark, 2005). Ayrıca miRNA'lar başka bir miRNA'ya dolaylı, doğrudan ya da küresel olarak üç farklı yoldan bağlanarak miRNA:miRNA etkileşimi oluştururlar (Hill ve ark, 2018). Bu etkileşimler aynı zamanda miRNA-mRNA düzenlemesine de farklı bir bakış açısı getirmektedirler (Lai ve ark, 2004). Bu bilgiler ışığında literatür taraması yapılmış ve miR-105 ailesinin üyelerinden olan miR-105-5p miRNA'sı ile ilgili çok fazla çalışmaya rastlanmamıştır. MiR-105-5p miRNA'sının A549, MCF7 ve HeLa hücre hatlarında onkogenik veya tümör baskılayıcı etkinliği merak edilmiş ve bu çalışmada bu hücre hatlarının proliferasyon hızı, koloni artış hızı gibi özelliklerine bakılmış ve kök hücre ve

apoptoz ilişkili genlerle etkileşimi incelenmiştir. Lipofektamin ile yapılan transfeksiyon deneylerinde miR-105-5p ekspresyonunun arttırıldığı ve inhibe olduğu koşullar sağlanmıştır. Daha sonra artış hızlarının incelendiği proliferasyon deneyinde hücreler belirli sayılarla 96'lık well platelere ekilmiş 0, 24, 48 ve 72 saat aralıklarında hücreler gözlemlenmiştir. Her üç hücre hattında da miR-105-5p ekspresyonlarının artmasının proliferasyonu ciddi anlamda baskıladığı görülmüştür. Öyle ki ekspresyonun inhibe edildiği koşulda ise bu kanser hücrelerinin artışında hızlanma meydana gelmiştir. Proliferasyondan sonra hücreler koloni oluşumlarını gözlemlemek amacıyla 6'lık well platelere ekilmiş, 2 hafta boyunca koloni oluşumları gözlemlenmiş ve sonrasında metilen blue ile boyanarak koloniler sayılmıştır. Beklendiği gibi her üç hücre hattında da koloni artışları, proliferasyon hızı ile paralel ilerlemiş ve miR-105-5p'nin ekspresyonunun arttığı koşulda, inhibe olduğu koşula oranla daha az koloni oluşumuna rastlanmıştır. Her iki deneyde de sonuçlar GraphPad Prism 9 programı ve excel programı yardımı ile hesaplanmış ve grafikleri oluşturulmuştur. Daha sonra bu koşullar altındaki hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA deneyleri yapılarak RT-PCR deneyi kurulmuştur. RT-PCR ile miR-105-5p'nin; EMT, apoptoz ve kök hücre ile ilişkili genlere etkisine bakılmış ve sonuçlar yine GraphPad Prism 9 ve excel programı ile grafik oluşturulmuştur. Çıkan sonuçlara göre; miR-105-5p varlığında meme kanserinde; P53 ve P21, rahim ağzı kanserinde hTERT tümör baskılayıcı özellik göstermiştir. Akciğer kanserinde ise P53, hTERT ve E-cadherin tümör baskılayıcı özellik göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre miR-105-5p; akciğer, meme ve rahim ağzı kanserlerinde tümör baskılayıcı özellik göstermekte ve hedefe yönelik terapotik ilaç arayışlarında umut ışığı olabilecek potansiyeldedir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, beni destekleyen, bilgi ve deneyimlerini bizlere en iyi ve doğru bir şekilde aktarmaya çalışan değerli hocalarım Doç. Dr. Yasemin SAYGIDEĞER ve Burcu SAYGIDEĞER DEMİR'e,

Çalışmam boyunca yardımlarını benden esirgemeyen ve beni her zaman motive eden çalışma arkadaşlarım Aycan, Yağız, Merve, Hamide, Eylem, Mehmet, Taoufik ve emeği geçen bütün Saygıdeğer Lab ekibine, bana her zaman sabırlı davranan ve motive eden Abhishek Kashyap'a,

Hayatımın her alanında bana yol gösteren, öğrenim hayatım ve tez aşamam sırasında bana sabır gösteren, ilgi ve desteklerini benden esirgemeyen annem İlkay, babam Basri, kardeşim Can ve ablam Gülşah ÖRS'e,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER VI
ŞEKİLLER DİZİNİ X
ÇİZELGELER DİZİNİ XII
SİMGELER VE KISALTMALAR XIV
1. GİRİŞ 1
1.1. MiRNA'ların Biyogenezi ve Hedefleme Mekanizması 3
1.2. Akciğer Kanseri ve MiRNA ilişkisi 6
1.3. Meme Kanseri ve MiRNA İlişkisi 9
1.4. Rahim Ağzı Kanseri ve MiRNA İlişkisi 12
1.5. Apoptoz ve Kök Hücre İlişkili Genlerin MiRNA ilişkisi 14
1.5.1. P53 14
1.5.2. P21 14
1.5.3. SOX2 15
1.5.4. HTERT (İnsan Telomeraz Ters Transkriptaz) 15
1.5.5. CD133 16
1.5.6. E-CADHERİN 18
1.5.7. SNAIL 18
1.6. MiR-105-5p 19
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 21
3. MATERYAL VE YÖNTEM 25
3.1. Materyal 25
3.1.1.Cihazlar 25
3.1.2.Hücre Hatları 26

3.2. Yöntem 26
3.2.1. Hücre Kültürü 26
3.2.1.1. Ortam hazırlama 26
3.2.1.2. Ortam değişimi 26
3.2.1.3. Hücre kaldırma ve split 27
3.2.1.4. Transfeksiyon 27
3.2.1.5. Proliferasyon 28
3.2.1.6. Koloni formasyon deneyi 28
3.2.2. PCR 29
3.2.2.1. RNA izolasyonu 29
3.2.2.2. RNA Ölçümü 30
3.2.2.3. cDNA sentezi 31
3.2.2.4. Real time PCR 31
3.2.3. Western Blotting 33
3.2.3.1. Protein izolasyonu 33
3.2.3.2. BCA 34
3.2.3.3. Proteinleri jelde yürütme 34
3.2.3.4. Transfer 35
3.2.3.5. Blotlama ve görüntüleme 36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 39
4.1. Bulgular 39
4.1.1. MiRNA Transfeksiyonu Yapılan Hücrelerdeki Proliferasyon Değişimlerinin Gözlemlenmesi 39
4.1.2. Koloniformasyon Sonucunda Hücrelerin Koloni Oluşturma Özelliklerinin İncelenmesi 41
4.1.3. RNA İzolasyonu Sonrasında Elde Edilen RNA Miktarları 43
4.1.4. PCR Bulguları 43
4.1.5. BCA (Bikinchoninic Asid Assay) Bulguları 48
4.1.6. Western Bulguları 50

4.2. Tartışma 51
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 57
5.1. Sonuçlar 57
5.2. Öneriler 58
KAYNAKLAR 59
ÖZGEÇMİŞ 75

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. MikroRNA'ların oluşumu ve fonksiyonu 4
Şekil 1.2. MiRNA hedefleme mekanizması 5
Şekil 1.3. Kanser metastazını regüle etmek için CD133'ün aracılık ettiği sinyal yolları 17
Şekil 1.4. hsamiR-105-5p kromozom lokasyonu 19
Şekil 1.5. hsamiR-105-5p gen sekans grafiği. 20
Şekil 3.1. Hücrelere transfeksiyon uygulaması. 28
Şekil 3.2. Thoma lamı ve mikroskop görüntüsü 29
Şekil 4.1. A549 hücrelerinin farklı koşullar altındaki artış hızları. 39
Şekil 4.2. MCF7 hücrelerinin farklı koşullar altındaki artış hızları. 40
Şekil 4.3. HeLa hücrelerinin farklı koşullar altındaki artış hızları. 40
Şekil 4.4. A549 koloniformasyon plate ve grafik görüntüleri 41
Şekil 4.5. MCF7 koloniformasyon plate ve grafik görüntüleri 42
Şekil 4.6. HeLa koloniformasyon plate ve grafik görüntüleri 42
Şekil 4.7. MiR105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde P53 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri. 44
Şekil 4.8. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde P21 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri. 44
Şekil 4.9. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde SOX2 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri. 45
Şekil 4.10. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde Htert geninin mRNA ekspresyon seviyeleri. 46
Şekil 4.11. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde CD133 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri. 46
Şekil 4.12. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde E-cadherin geninin mRNA ekspresyon seviyeleri. 47

Şekil 4.13. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde Snail geninin mRNA ekspresyon seviyeleri. 48
Şekil 4.14. A549 hücrelerinden elde edilen total proteinlerin standart grafiği ve R^2 değeri. 48
Şekil 4.15. MCF7 hücrelerinden elde edilen total proteinlerin standart grafiği ve R^2 değeri..... 49
Şekil 4.16. HeLa hücrelerinden elde edilen total proteinlerin standart grafiği ve R^2 değeri..... 50

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. MiR-105-5p'nin Akciğer, Meme ve Rahimağzı kanserlerinde doğrudan hedeflediği genler. 20
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve markaları 25
Çizelge 3.2. PCR tüpü örnek hazırlama 31
Çizelge 3.3. Kit miktarları 32
Çizelge 3.4. Çalıştırma sıcaklığı (40 döngü) 32
Çizelge 3.5. Kullanılan genlerin sekansları, katalog numaraları ve markaları 33
Çizelge 4.1. Transfeksiyonlu A549 hücrelerinin RNA miktarı ölçümleri. 43
Çizelge 4.2. Transfeksiyonlu MCF7 hücrelerinin RNA miktarı ölçümleri. 43
Çizelge 4.3. Transfeksiyonlu HeLa hücrelerinin RNA miktarı ölçümleri. 43
Çizelge 4.4. MiRNA ekspresyonu arttırılmış (mimic) ve azaltılmış (inhibitör) A549 hücrelerinden elde edilen protein miktarları 49
Çizelge 4.5. MiRNA ekspresyonu arttırılmış (mimic) ve azaltılmış (inhibitör) MCF7 hücrelerinden elde edilen protein miktarları 49
Çizelge 4.6. MiRNA ekspresyonu arttırılmış (mimic) ve azaltılmış (inhibitör) HeLa hücrelerinden elde edilen protein miktarları. 50

SİMGELER VE KISALTMALAR

RNA : Ribonükleik Asit
RNP : Ribonükleer partikül
RNAi : RNA interferaz
RISC : RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
UTR : Çevrilmemiş Bölge
ORF : Açık Okuma Çerçevesi
Expo 5 : Eksportin 5
Ago2 : Argonaute2
KHAK : Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK : Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
P21 : Protein 21
P57 : Protein 57
P53 : Protein 53
DNA : Deoksiribonükleik Asit
CAF : Tümörle İlişkili Fibroblastlar
CXCL12 : CXC Motifli Kemokin 12
SDF1 : Stromal Hücre Kaynaklı Faktör 1
PTEN : Fostotaz ve Tensin Homologu
EMT : Epitelyal-Mezankimal Geçiş
FOXM1 : Forkhead Box M1
Twist1 : Bükümle İlgili Protein 1
TME : Tümör Mikro Çevresi
PKD2 : Polisistin 2
MDR1 : Çoklu İlaç Direnci Proteini 1
MRP : Çoklu İlaç Direnci Proteini
ERCC1 : DNA Eksizyon Onarım Proteini 1

PEBP4	: Fosfatidiletanolamin Bağlayıcı Protein 4
RKIP	: Raf Kinaz İnhibitörü Proteini
PMC42	: İnsan Meme Karsinomu Hücre Dizisi
GLOBOCAN	: Küresel Kanser Gözlemevi
HPV	: İnsan Papilloma Virüsü
TP53	: Tümör Protein 53
RB1	: Retinoblastoma 1
MAPK:	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
mTOR	: Rapamisin Memeli Hedefi
TGFβ	: Transformasyon Büyüme Faktörü β
Smad7	: Dekapentaplejik Homolog 7
RAS	: Renin-Anjiyotensin Sistemi
Htert	: İnsan telomeraz Ters Transkriptaz
ITGB1	: Integrin Subunit Beta 1
PROM1 (CD133)	: Prominin-1
CSC	: Kanser Kök Hücreleri
SNAIL	: Çinko Parmak Proteini
DMEM	: Eagle'ın Minimal Temel Ortamı
FBS	: Fetal Bovin Serum
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
µl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
mA	: Miliamper
kDA	: Kilo Dalton
ROC	: Alıcı İşletim Karakteristik Eğrisi
CEA	: Karsinoembriyonik Antijenin
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reksiyonu
PANTHER	: Evrimsel İlişki Yoluyla Protein Analizi
GSEA	: Gen Kümesi Zenginleştirme Analizi

SUZ12 : Polycomb Baskıcı Kompleks 2 Alt Birimi

CHEK2 : Kontrol Noktası Kinaz 2

CDH1 : Kadherin 1

NBS1 : Nibrin Protein 1

RAD50 : Çift İplik Kırılma Onarıcı Protein

PALB2 : BRCA2 Ortağı ve Yerelleştiricisi

PIK3CA : Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Birimi Alfa

EGFR : Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

ALK : Anaplastik Lenfoma Kinaz

HER2 : İnsan Epiteryal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

MET : Mezankimal Epitelyal Geçiş

CPEB1 : Sitoplazmik poliadenilasyon elemanı bağlayıcı protein 1

KRAS : Kirsten Sıçan Sarkom Virüsü

BNIP2/3 : BCL2/Adenovirüs E1B 19 kDa Etkileşen Protein 2/3

BAK1 : BCL2 Öldürücü 1

BCL2L2/11 : BCL2 Benzeri 2/11

Bcl-2 : B Hücreli Lenfoma 2

BRIP1 : BRCA1 Etkileşimli Protein C-terminal Helikaz1

BARD1 : BRCA İlişkili Ring Alanı 1

BRCA1/2 : Meme Kanseri Geni 1/2

BRCC3 : BRCA1/2 İçeren Kompleks Alt Birim 3

1. GİRİŞ

MikroRNA'lar (miRNA'lar); endojen küçük RNA'ların sınıfını oluşturan, protein kodlamayan RNA molekülleridir (Çelik ve ark, 2013). Yaklaşık 20-30 nükleotid uzunluğunda olan tek iplikçikli miRNA sayısı, hâlihazırda 300'den fazla tanımlanmış insan genomu içerisinde bini geçmektedir (Zamore ve ark, 2005). Bu protein kodlamayan RNA molekülleri, kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA'lara bağlanıp translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesini gerçekleştirirler. MiRNA'lar bu yolağı kullanarak hücre farklılaşması, proliferasyonu ve apoptoz gibi homeostatik süreçlerde rol oynamaktadırlar (Saydam ve ark, 2011).

İnsan genomunda yer alan DNA'nın büyük bir bölümü RNA kodlamasına rağmen genomun çok küçük bir miktarı (yaklaşık olarak %1,5) fonksiyonel proteinlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar genomun geri kalan kısmının çok az önem içerdiği düşünülmekteydi. Fakat bu görüş, küçük RNA moleküllerinin keşfiyle ortadan kalkmış oldu. Araştırmacılar, bu grup içerisinde yer alan miRNA seviyelerinin normal koşulların dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimiyle bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir. Dolayısıyla bu konuda bir çalışma bilgisinin kanserin erken teşhisi ve tedavisi için önemli olabileceği çok açıktır (Wijnhoven ve ark, 2007). Pek çok kanserde bazı miRNA'lar ekspresyonu artırıldığında onkogenik özellik gösterir ve onkomir olarak adlandırılırlar. Bu onkomir miRNA'lar tümör baskılayıcı genleri ya da hücre farklılaşmasını kontrol eden genleri etkileyerek tümör oluşumuna sebep olabilirler. Bazı miRNA'lar ise tümör oluşumunu onkogenleri baskılayarak engellerler ve tümör supressör özellik gösterirler (Calin ve ark, 2006).

MikroRNA'lar, onkogenezde oynadıkları önemli rol nedeniyle, gelecek vadeden tanısal ve prognostik biyomarkırlar olarak kabul edilmeye başlanmıştır. Belli miRNA'ların tümör dokusunda, serumda ve balgamda ekspresyon profillerinin saptanmasının bilgi sağlayıcı olduğu düşünülmektedir. MiRNA'ların

kanser dokularında, normal dokulara nazaran özellikle az miktarda olduğu belirlenmiştir. Bu durum karsinogenezde miRNA ifadesinin baskılandığına işaret etmektedir. Ayrıca farklı dokulardan kökenlenen birçok tümörün gelişimsel kökenleri ve farklılaşma dereceleri yalnızca miRNA ifade profillerinin belirlenmesi ile bilinebilmektedir. Bu sebeple miRNA'ların hücreleri daha farklılaşmış bir aşamaya götürdükleri düşünülebilir. MiRNA'lar mRNA profillerinin ayırt edemediği az farklılaşmış kanser tiplerini de sınıflandırabilirler (Lu ve ark, 2005, Rosenfeld ve ark, 2008). MiRNA'ların temel rolü, tek bir miRNA'nın birden fazla mRNA'yı post-transkripsiyonal bir şekilde hedefleyebilmesi ve böylece aynı anda yüzlerce genin ekspresyonunu etkileyebilmesidir (Dong ve ark, 2021). Ayrıca miRNA'lar, hücresel DNA algılama ve onarım mekanizmalarını da düzenleyerek bütünlüğün korunmasında önemli bir rol oynar. İlk olarak miRNA genleri sıklıkla frajil kromozomal bölgelerde bulunur, bu da miRNA bozulmasının genomik kararsızlığa yol açan ve dolayısıyla karsinojenezi başlatan erken olaylardan biri olabileceğini gösterir (Vincent ve ark, 2014). İkincisi miRNA'lar, p21 ve p27 gibi hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyerek bir sonraki aşamaya erken veya gecikmeli girişe neden olabilir. Bu, anormal genomik içeriklere, olgunlaşmamış kromozom ayrımına yol açar ve sonuç olarak genomik kararsızlığa ve kansere neden olur. Üçüncüsü, hasarlı DNA'ların tespiti ve onarımı dahil olmak üzere DNA hasar tepkileri, genomik stabiliteyi korumak için çok önemlidir (Zhang ve ark, 2016). Diğer bir önemli kapı bekçisi olan p53, hasarlı DNA'yı onarmak için hücre döngüsünü bloke etme veya onarım potansiyeli yoksa hücreleri apoptoza yönlendirme işlevi gören DNA hasar yanıtında bir sensör görevi görür. Birkaç miRNA, doğrudan hedefleme yoluyla p53 ifadesini modüle eder (Vincent ve ark, 2014). MiRNA'lar farklı stromal hücrelerini de düzenlerken etkilerini kanser hücreleri ile onlara çevreleyen stromal hücreler arasındaki etkileşimlerin düzenlenmesi üzerinde gösterebilir (Kuninty ve ark, 2016). Çok sayıda miRNA'nın anjiyogenezi düzenlediği de bildirilmiştir (Wang ve ark, 2018).

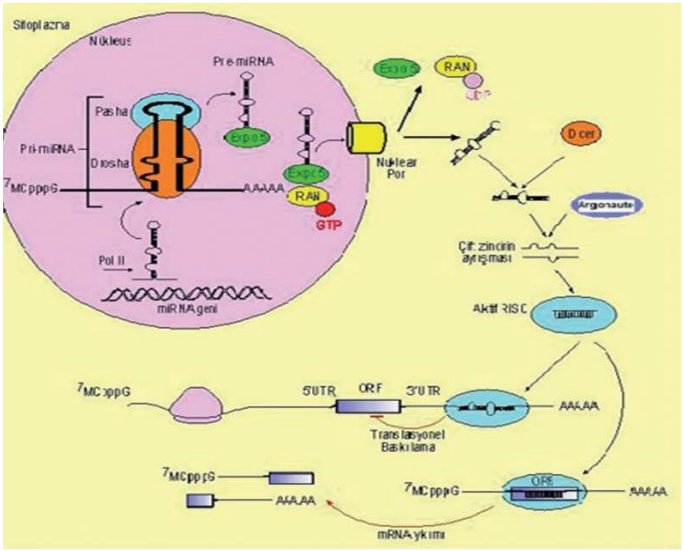
1.1. MiRNA'ların Biyogenezi ve Hedefleme Mekanizması

MiRNA'lar, üç aşamalı işlem sonucunda oluşurlar. Başlangıçta -80 nükleotid uzunluğunda olan bir RNA saç tokasının parçası olarak RNA polimeraz II enzimi aracılığıyla eksprese edilirler. Daha uzun bir ilk transkriptin parçasını oluştururlar ve primer miRNA (primiRNA) olarak adlandırılırlar (Lee ve ark, 2002). İkinci adımda 60-70 nükleotid prekürsör miRNA (pre-miRNA) ara ürününü vermek için bu RNA saç tokasının üst kısmının nükleer eksizyonu gerçekleşir. Nükleusta bulunan bir RNaz olan Drosha ve RNA bağlanma noktası bulunan bir protein DGCR8/Pasha'dan oluşan mikroişlemci komplekse bağlanır. Böylece nükleus içinde dönüşüm gerçekleşir (Bartel ve ark, 2004, Zeng ve ark, 2013). Üçüncü ve son adımda pre-miRNA'lar Exportin 5 adı verilen molekül aracılığıyla sitoplazmaya taşınırlar (Garzon ve ark, 2006). Olgun miRNA'lar sitoplazmada üretilmesine rağmen çalışmalar olgun miRNA'ların %75'inin hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunduğunu göstermektedir (Gagnon ve ark, 2014). Sonrasında, pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA:miRNA dubleksine çevrilir (Zhang ve ark, 2002). Son olarak, olgun miRNA bir ribonükleer partiküle (RNP) dahil edilir ve birlikte RNAi ile ilişkili gen susturma etkilerini yürütmek için miRISC oluşur (Schwarz ve ark, 2003). RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan argonaute'un etkisiyle bu iki iplikten daha kararlı olan 5' ucu seçilip komplekse dâhil edilir. Bu iplik kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılır. Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır, RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir.

Başka bir miRNA aracılığı ile miRNA düzenlenmesinin mekanizması miRNA:miRNA etkileşimi olarak adlandırılmıştır (Hill ve ark, 2018). Bu miRNA çiftleri arasındaki bağlanmanın, kılavuz miRNA ve yolcu miRNA çiftleri arasındakinden daha güçlü olduğu, hücre işlevselliği üzerinde geniş kapsamlı etkisi olduğu ve miRNA mRNA düzenlenmesine başka bir bakış açısı eklediği düşünülmektedir (Lai ve ark, 2004). Bu etkileşim doğrudan, dolaylı ve küresel

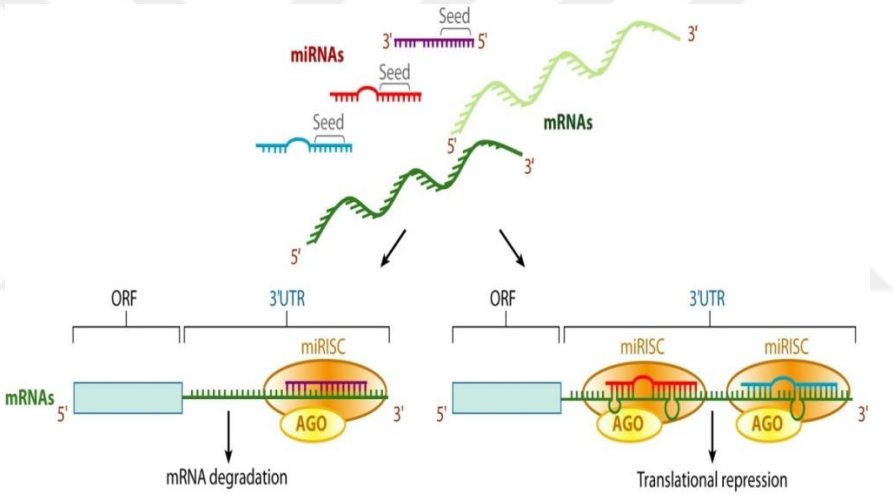
olmak üzere 3 şekilde gerçekleşmektedir. Doğrudan miRNA:miRNA etkileşimleri, bir miRNA diğerini tamamlayıcı bir şekilde bağladığında meydana gelir. Bu etkileşim ya sitoplazmada iki olgun miRNA arasında ya da çekirdekte bir olgun ve bir birincil miRNA (pri-miRNA) saç tokası arasında meydana gelir. Çekirdekteki etkileşimler, tipik olarak mikroişlemcinin bağlanmasını önler ve böylece pri-miRNA'nın olgunlaşmasını bloke ederek seviyelerini düşürür ve hedef mRNA'sının susturulmasını önler (Forrest ve ark, 2010). Dolaylı miRNA:miRNA etkileşimleri, sitoplazmadaki olgun miRNA'nın çekirdekteki pri-miRNA'yı transkripsiyonel düzenleyiciler aracılığıyla etkilemesidir. Bu düzenleyiciler, transkripsiyon faktörlerini, DNA metiltransferazları ve baskılayıcıları içerebilir (Hill ve ark, 2021). Son olarak küresel miRNA:miRNA etkileşimlerinde, bir miRNA birkaçının ifadesini veya tüm miRNA ifadesini modüle edebilmektedir (Borzi ve ark, 2017).

MikroRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olmaktadırlar (Gregory ve ark, 2005).



Şekil 1.1. MikroRNA'ların oluşumu ve fonksiyonu

MiRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye (UTR) veya hedef mRNA'nın ORF bölgesine bağlanır (Şekil 1.1). Bağlanma pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlıdır. 3' UTR bölgesine bağlanma kusurlu, tam olmayan, eksik komplementerliği ihtiva eder ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. ORF bölgesi içine bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği gösterir ve Ago2 tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır (Sun ve ark, 2010). Ayrıca miRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir (Pillai ve ark, 2005).



Sun W, et al. 2010.
Annu. Rev. Biomed. Eng. 12:1–27

Şekil 1.2. MiRNA hedefleme mekanizması

MiRNA-mRNA etkileşimi için miRNA'nın 5' ucundan ikinci nükleotitte başlayan 7 nükleotid tohum bölgesi gereklidir. MiRNA-mRNA hedeflemesi, ağırlıklı olarak, açık okuma çerçevesinin (ORF) 3' akış aşağısında bulunan hedef mRNA'nın 3′UTR'sinde meydana gelir. MiRNA-mRNA dupleksinin orta kısmında çıkıntılar veya uyumsuzluklar mevcut olabilir. Sol alttaki ovalde gösterildiği gibi,

miRNA ve mRNA arasındaki mükemmel uyum baz eşleşmesi, miRISC aracılı endonükleolitik bölüme ve dolayısıyla mRNA bozulması ile sonuçlanır. Sağ altta gösterilen hücrelerde tam tamamlayıcılığın olmamasına rağmen, baz eşleşmesi (özellikle miRNA'nın 13-16 nükleotidleri), translasyonel baskıya yol açan miRNA-mRNA etkileşimini stabilize etmede hala önemlidir. Sıklıkla, çoklu miRNA'lar (Şekil 1.2'de kırmızı ve mavi ile gösterilmiştir) aynı 3'UTR'yi hedefleyebilmektedir. Tersine, benzersiz bir miRNA, hücrelerde aynı 3'UTR üzerinde birden fazla bağlanma bölgesini hedefleyebilmektedir (Sun ve ark, 2010).

1.2. Akciğer Kanseri ve MiRNA ilişkisi

Akciğer kanseri, tüm dünyada kanser kaynaklı ölümlerin başlıca sebebidir. Genellikle EGFR, ALK, ROS1, BRAF, ERBB2 (HER2), MET, RET ve KRAS gibi mutasyonlara sahiptir (Kate ve ark, 2020). İki ana tipi vardır. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK). KHDAK'lar tüm akciğer kanserlerinin %80'ini oluştururlar ve adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük karsinom gibi alt bölümlere sahiptir (Gyoba ve ark, 2016). Cerrahi yöntemlerdeki yeniliklere, kemoterapi ve radyoterapideki gelişmelere rağmen, akciğer kanserinin sağkalım süresi %16'dır (Jemal ve ark, 2009). Bu nedenle, akciğer kanserinin genetik olarak gelişimini çözmek ve yeni tedavi hedefleri geliştirmek için hücresel moleküller üzerinde daha çok çalışılması gerekmektedir. Birikmiş kanıtlar, miRNA'ların sapkın bir şekilde ifade edildiğini ve KHDAK'ın tümörigenez ve tümör ilerlemesinde önemli roller aldığını göstermektedir. KHDAK hücrelerinin biyolojik davranışını etkileyen moleküler düzenleyici yol değişiklikleri birden fazladır ve bu moleküler ağlar en başta kötü huylu bir fenotip oluşturan bir dengesizliğe yol açabilir. Bu moleküler değişiklikler gen ifadesindeki değişiklikleri, kopya numarası değişikliklerini, farklı metilasyon kalıplarını ve kodlamayan RNA'ların ifadesindeki değişikleri içermektedir (Pikor ve ark, 2013). MiRNA'ların plazma gibi biyofluid ortamında saptırıldığı kanıtlanmıştır. Akciğer kanseri hücrelerinin gelişiminde, epitel-mezenkimal geçişte

ve tedaviye yanıtta önemli sinyal yollarını daha da etkileyen hedef genler veya moleküller üzerinde modüler işlevler uygularlar (Vescova Del ve ark, 2015). Miyofibroblastlardan ve fibroblastlardan oluşan CAF'lerin hücrelerdeki varlığı, gelişmiş tümör fenotiplerine, proliferasyona, anjiyogeneze ve invazyon ve metastaza yol açmaktadır. CAF'lerde miRNA salgılanmasının akciğer kanseri ilerlemesini desteklediği bildirilmiştir (Kunita ve ark, 2018). MiRNA'ların CAF'lerde fazla eksprese edildiği durumlarda, CAF'lerin tümör hücresi proliferasyonunu ve küre oluşumunu arttırmasını engelleyen CXCL12 ekspresyonu bastırılır. Bu da tümör hücresi apoptozisine yol açar (Zhang ve ark, 2015). CAF'lerde miRNA'ların eksprese edilmediği durumlarda ise yüksek seviyelerde olan SDF-1, akciğer kanseri hücre hattı olan A549 proliferasyonunu ve ilaca olan dirençlerini arttırmaktadır (Li ve ark, 2016). Yapılan başka bir çalışmada ise bazı miRNA'ların, akciğer kanserinde PTEN'i hedeflediği ve ardından aktive olan Akt yolunun anjiyogenezi desteklediği görülmüştür (Mao ve ark, 2015).

Epitelyal kanser hücrelerinin istila etmesini ve metastaz yapmasını sağlayan EMT'yi düzenleyen birkaç miRNA mevcuttur. Bazı miRNA'lar, KHDAK'da EMT'yi bastırmak için FOXM1'i, bazıları ise Twist1'i hedefler. Böylece KDHAK'da EMT ilişkili metastaz inhibe edilmiş olur. Böylelikle KHDAK'da düşük miRNA seviyeleri kötü prognoz taşır diyebiliriz (Ke ve ark, 2013, Yang ve ark, 2015). MiRNA ekspresyonları ayrıca akciğer adenokarsinomunun büyüme paternlerine müdahale etmektedir. Bazı miRNA'ların yüksek ekspresyon seviyelerinin tümördeki katı bileşenlerin varlığı ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu, buna karşın bazı miRNA'ların lepidik desenler veya müsinöz ile ilişkili olduğunu göstererek akciğer adenokarsinomları arasındaki histolojik büyüme modellerini analiz ettiği görülmüştür (Nadal ve ark, 2014). MiRNA'lar, primer akciğer tümörlerini diğer bölgelerdeki tümörlerden ayırt etmede kullanılmaktadır. Bazı miRNA'ların yüksek ekspresyonu primer akciğer tümörleri ile ilişkiliyken, bazı miRNA'larınki ise metastatik tümörlerle ilişkilidir (Barshack ve ark, 2010). Moleküler biyobelirteçler, akciğer kanseri taraması için

yardımcı bir araçtır. Bunların arasında, dolaşımdaki miRNA'lar, tanısal fayda için büyüleyici bir potansiyel göstermektedir. Bunun nedeni, kan, kolostrum, idrar ve plevral sıvı gibi vücut sıvılarından miRNA'ları tespit etmedeki fizibiliteye dayanmaktadır. İkinci avantaj, dolaşımdaki miRNA'ların, endojen RNazların etkileri olmaksızın vücut sıvısında çok kararlı olmasıdır. Üçüncüsü ise, dolaşan miRNA'lar, tümör heterojenitesi sorununun üstesinden gelerek farklı tümör bölümlerinden veya metastatik bölgelerin tüm patolojik sinyallerini toplamasıdır (Han ve ark, 2018). Şuanda, akciğer kanseri için bir teşhis aracı olarak çok sayıda miRNA kullanılmaktadır. Bunlar, akciğer kanseri olasılığını tespit etmek için bir 'set' veya 'kit' olarak entegre edilmektedir. Örneğin 'miR' testi birçok miRNA'nın imzasını ölçen serum bazlı bir testtir (Montani ve ark, 2015). Yüksek riskli akciğer kanseri hastalarında bu test sırasıyla %74,9, %77,8 ve %74.8 tanısal doğruluk, duyarlılık ve özgüllük sergilemektedir (Sozzi ve ark, 2014). Platin bazlı tedavi, hem KHAK hem de KHDAK tedavileri için en yaygın tedavidir. MiRNA'lar kemoterapi duyarlılığı veya direnci ile ilgilidir. MiRNA ekspresyonu, PKD2 seviyesini baskılar ve ardından çoklu antikanser ilaçlarının akışına aracılık eden P-glikoproteinin aşağı regülasyonuna yol açar. Sonuçta da miRNA ekspresyonu olan bir KHDAK hücre hattında sisplatin duyarlılığı artar (Yu ve ark, 2017). Bazı miRNA'lar; MDR1, MRP1, ERCC1 ve survivin gibi ilaç direnciyle alakalı birkaç proteini ve Bcl-2'yi baskılayarak ilaç akış mekanizmasını inhibe etmekte ve sisplatin duyarlılığını artırmaktadır (Wu ve ark, 2014). Aksine bazı miRNA'ların upregülasyonu ise artan MDR1, MRP1, ERCC1, survivin ve Bcl-2 ile ilişkilidir. Bu da ilaç akışını ve sisplatin direncini indüklemektedir (Li ve ark, 2016). Birkaç miRNA ise PEBP4 ve RKIP aracılı EMT'yi hedefleyerek sisplatin tedavisine direnç sağlamaktadırlar (Zhao ve ark, 2015). Akciğer kanseri radyoterapisinde bazı miRNA'lar, oksidatif yanıt genlerini baskılayarak ve DNA onarımını inhibe ederek radyoterapinin akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkisini arttırdığı gözlemlenmiştir (Cortez ve ark, 2014).

Birlikte ele alındığında miRNA'lar, kanser hücresel davranışlarını kontrol ederek ve çevredeki hücrelerle etkileşimlerini düzenleyerek TME'de rol oynar. Akciğer kanseri tanı ve tedavisinde kanser hücreleri ve mikroçevreleri arasındaki ilişkilerin araştırılması gereklidir.

1.3. Meme Kanseri ve MiRNA İlişkisi

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık gözlenen kanserlerden biridir. Solunum yolu ve akciğer kanserlerinden sonra, kadınlar arasında kanser ilişkili ölümlerin başında yer almaktadır (Siegel ve ark, 2015). Sıklıkla BRCA1/BRCA2 ve TP53 gibi mutasyonlara sahiptir. Bununla birlikte, meme kanseri vakalarının büyük çoğunluğu mutasyona uğramış yüksek penetrasyonlu bir genle değil, genel popülasyonda sıklıkla mutasyona uğrayan CHEK2, CDH1, NBS1, RAD50, BRIP1 ve PALB2 gibi düşük penetrasyonlu genlerle ilgilidir (Sheikh ve ark, 2015). Ayrıca PIK3CA mutasyonunun da yaygın olduğunu görülmüştür (Jiang ve ark, 2018). Meme kanseri tümörleri uygulanan tedaviye karşı direnç gösterebilmektedir. Direnç oluşumu ile birlikte, meme kanseri hastalarında tümör yalnızca primer bölge ile sınırlı kalmamakta ve farklı bölgelere metastaz yapabilmektedir (Weigelt ve ark, 2005). Hücre sinyal yolakları ile ilişkili genlerin ifadesi çeşitli mekanizmalar yoluyla yeniden düzenlenmektedir. MiRNA'lar, hedefindeki mRNA'ların 3'UTR bölgesine bağlanarak protein ürününe dönüşmesini engellemektedir. Protein kodlayan genlerin ifade kontrolünde rol oynayan miRNA genleri, normal meme dokusu ve meme kanseri hücreleri arasında ifade farklılıkları sergilemektedir. Bununla birlikte, bu farklılık meme kanser hücreleri ve kanser kök hücreleri arasında da gözlenmektedir (Yu ve ark, 2007). Meme kanseri kök hücrelerinde, hücre apoptozunu indükleyici ve hücre bölünmesini inhibe eden miRNA ifadelerinin azaldığı bilinmektedir (Shimono ve ark, 2015). Mevcut bulgular, diğer meme kanserli hastalar ile benzer tedavi yaklaşımları uygulanarak takip edilen bu hasta grubunda, farklı etkin tedavi yaklaşımlarının düzenlenlenmesine katkı oluşturarak hastaların yaşam süresinin ve kalitesinin

geliştirilmesine imkan sağlayacaktır. Ayrıca elde edilen bulgular; *BRCA* mutasyonu taşıyan meme kanserli hastalarda, kötü prognozun takibini sağlayabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi konusunda uluslararası ve ulusal literatüre katkı sağlar niteliktedir. MiRNA'lar, mRNA' nın 3' Untraslated Region (3'UTR) bölgesinde hedef transkripti ile baz eşleşmesi yaparak, bu transkriptlerin translasyonunu değişik mekanizmalar ile baskılar. MiRNA' lar bu şekilde görev yaparak gen düzenlenmesinin bir boyutunu oluşturmaktadır. Bu düzenlenmenin çeşitli mekanizmalarla bozulması hastalıklara sebep olmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda kanserde miRNA ekspresyon profilleri değerlendirilmiş olup, bazı miRNA'ların ekspresyonlarının azaldığı bazılarının ise arttığı belirlenmiştir (Zhang ve ark, 2006). Birçok kanser türünde bu çalışmaların tekrarlanması ve fonksiyonel analizler sonucu, ekspresyonu azalan miRNA' ların "tümör baskılayıcı" özellik gösterdiği ve genelde onkogenlerin transkriptlerini hedeflediği ve ekspresyonu artan miRNA' ların "onkogenik" özellik gösterdiği ve tümör baskılayıcı genlerin transkriptlerini hedeflediği sonucuna varılmıştır (Zhang ve ark, 2007). Günümüzde meme kanseri tanısında hastanın yaşı, aksiller lenf nodu tutulumu, tümör büyüklüğü, histolojik evre ve invazyon gibi histolojik özellikleri, lenfovasküler, hormon reseptör durumu ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü *(HER-2*) ifadesi gibi farklı risk kategorisindeki hastalarda farklı kombinasyonlar halinde görülebilen faktörler kullanılmasına rağmen, tümörün belirtilen klinik davranışlarına göre sınıflandırılmasında yeteri kadar güvenilir verilerin sağlanamaması, prognozun hastalığın daha erken evrede yapılabilmesinin gerekliliği ve aynı evredeki meme tümörlerinin uygulanan tedavi protokollerine farklı cevaplar vermesi, tedavi protokolünün belirlenmesinde tümörlerin moleküler düzeydeki sınıflandırmalarının gerekliliğini ortaya koymuştur (Schnitt, 2010). Farelerle yapılan bir çalışmada, meme döngüsünün farklı fazlarına bağlayan birkaç miRNA ailesi, geçici ifade kalıplarına dayanarak 7 gruba tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde, daha önce agresif bazal meme kanseri ile ilişkilendirilen birkaç miRNA, ergenlik ve gebelik sırasında, en yüksek fizyolojik duktal ve alveolar proliferasyon

periyotlarında yüksek oranda eksprese edilmiştir. Ayrıca, terminal olarak farklılaşmış fenotiple ilişkili miRNA'lar olgun epitel oranındaki bir artışla ilişkili olarak ergenlik ve gebelik boyunca yükselmektedir. Buna karşılık bazı miRNA'lar, laktasyon sonrası evrim sırasında zirveye ulaşmıştır. Fokal yapışma ile ilgili genler için zenginleştirilmiş ve tahmin edilen mRNA hedeflerinin ifadesinde karşılık gelen bir azalma ile, memenin yeniden şekillenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Avril-Sassen ve ark, 2009). Klasik mRNA profilleme çalışmaları, meme tümörlerini luminal A, luminal B, bazal benzeri, HER2-pozitif ve normal benzeri tümörler olarak 5 ana gruba ayırmaktadır (Perou ve ark, 2000). Yakın zamanlarda normal meme dokularında ve tümörlerde miRNA ekspresyonuna ilişkin benzer küresel çalışmalar, kanserin ilerlemesiyle ilgili miRNA'ları tanımlamaya ve meme tümörlerini daha fazla alt sınıflandırmaya çalışmıştır (Iorio ve ark, 2005). MiRNA ekspresyonlarının, meme kanseri hücre hatlarında normal meme dokusuna kıyasla ciddi bir şekilde bozulduğu ve azaldığı ve sadece PMC42 hattının normal bir miRNA profili sergilediği gözlemlenmiştir (Git ve ark, 2008). Meme tümörü biyolojisi ve tedavisinin anahtarı olan östrojen reseptörü (ER) ile miRNA ekspresyonu arasındaki ilişki kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Erken profilleme çalışmaları, ER-pozitif ve ER-negatif tümörler ile ilişkili çok sayıda miRNA tanımlamıştır (Mattie ve ark, 2006). Belirgin bir şekilde, miRNA'lar, meme kanseri de dâhil olmak üzere bir dizi kanserde genomik amplifikasyon/delesyon bölgelerinde istatistiksel olarak aşırı temsil edilmektedir (Calin ve ark, 2004). MiRNA'ların ve mRNA'ların birlikte düzenlenmesi meme tümörü dokularında gözlemlenmektedir ve bu lokuslarda ortak transkripsiyonel kontrol olduğu düşünülmektedir (Blenkiron ve ark, 2007). MiRNA transkripsiyonunun epigenetik regülasyonu, meme kanserinde primer meme tümörlerinde bilinen diğer tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu ile güçlü bir şekilde ilişkili olarak, birkaç miRNA promotörünü hipermetilasyonu ile tarif edilmiştir. Bu da normal olarak işlem yapan p53'ün varlığında bile transkripsiyonel susturma ile sonuçlanır (Lehmann ve ark, 2008).

Meme kanserinin kontrolünde ve aktivitesinde rol oynayan karmaşık bir miRNA ağı vardır. Çelişkili modelleri çözmek ve meme tümörlerinde önemli mekanizmaların hangileri olduğunu ayırt etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

1.4. Rahim Ağzı Kanseri ve MiRNA İlişkisi

Rahim ağzı kanseri; meme, kolorektal ve akciğer kanserinden sonra dünya genelinde en sık görülen dördüncü, kadınlar arasında ise en yaygın görülen kanser türüdür. Servikal kanser olarak da adlandırılan rahim ağzı kanserinden dolayı gerçekleşen ölümlerin sayısı, GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünya çapında yaklaşık 342.000'dir. Ayrıca yaklaşık 604.000 yeni rahim ağzı kanseri vakası olduğu tahmin edilmektedir (Sung ve ark, 2020). KEAP1/NRF2, PIK3CA ve E542K/E545K mutasyonlarına sahiptir. En yaygın mutasyonları P53 ve pRB1 (Retinablastoma Protein 1)'dir. (Jiang ve ark, 2018). HPV-negatif rahim ağzı kanseri hücreleri normal rahim ağzı dokuları ile karşılaştırıldığında, insan papilloma virüsü (HPV) ile entegre rahim ağzı kanseri hücrelerinde birden fazla miRNA'nın ekspresyonu değiştirdiği gözlemlenmektedir (Wang ve ark, 2009). Ek olarak normal serviks ile karşılaştırıldığında ise, servikal karsinomlarda değiştirilmiş miRNA ekspresyon profilleri de bildirilmiştir (Lee ve ark, 2008). İlk rahim ağzı kanseri miRNA çalışması, 2007 yılında kanserli dokularda tanımlanmıştır. O zamandan beri birçok çalışma miRNA'ların hücre proliferasyonu, apoptoz, göç ve istilayı etkileyerek rahim ağzı kanserinin ilerlemesini bildirmiştir (Gomez ve ark, 2013). Rahim ağzı kanserlerinin çoğuna E6 ve E7 viral kodlu, onkoprotein yoluyla servikal skuamöz epitel hücrelerinin normal proliferasyonunu ve farklılaşmasını bozan yüksek riskli HPV ile enfeksiyonu neden olmaktadır. E6/E7 proteinleri tümör oluşumuna, hücresel tümör baskılayıcı proteinler, TP53 ve RB1 ile etkileşim aracılık etmektedir (Shai ve ark, 2007). Yanlış düzenlenmiş konakçı proteinlerin yanı sıra, E6 ve E7 onkoproteinleri ayrıca miRNA'lar gibi konakçı kodlamayan transkriptlerle de etkileşime

girmektedir (Wang ve ark, 2014). MiRNA profillerinin yakın tarihli bir meta-analizi, servikal neoplazi vakalarında ve normal servikal epitel örneklerinde yapılmıştır. Yapılan analizlerde, servikal neoplazinin farklı evreleri arasında 42 yukarı yönde, 21 aşağı yönde regüle edilen miRNA'lar tanımlanmıştır. Bu miRNA'ların, kanserin ayırt edici özelliklerine katkıda bulunan p53, ErbB, MAPK, mTOR, Notch, TGFβ ve Wnt yollarını değişime uğrattığı görülmüştür (He ve ark, 2016).

Rahim ağzı kanserindeki en klinik problem tümörlerin radyoterapiye yanıt vermemesidir. Bu konuda yapılan çalışmalar, servikal kanser radyorezistansından sorumlu mekanizmaların hala net olarak bilinemediğini göstermiştir. Mevcut veriler bazı miRNA'ların spesifik imzasının rahim ağzı kanseri hücrelerinin radyo-direncini destekleyebileceğini göstermektedir (Zhang ve ark, 2013). Önceki çalışmalardan miRNA'ların birçok fonksiyonel genin düzenleyicileri olduğu bilinmektedir. MiRNA'lar, fokal adezyon yolunu hedefleyerek kanser hücresi göçünü ve istilasını engelleyebildiği, tümör büyümesini bozabildiği ve AKT-mTOR sinyal yolunu düzenleyerek sisplatine karşı kemo-duyarlılığı artırabildiği ve aşağı regülasyonu yoluyla ilerlemeyi baskılayabildiği görülmektedir (Yamamoto ve ark, 2013, Li ve ark, 2012). Xiaoxia Hu ve ark. bazı miRNA'ların rahim ağzı kanseri gelişimi ve metastazında önemli düzenleyici roller oynayabileceğini ve potansiyel olarak hastaların sağkalımının prognostik göstergeleri olarak hizmet ettiğini bildirmişlerdir (Hu ve ark, 2010). Bulgular göstermektedir ki, bazı miRNA'ların yüksek ekspresyonu, Smad7'yi hedefleyerek rahim ağzı kanseri gelişimine katkıda bulunmaktadır. Aksine bu miRNA'lar inhibe edildiğinde rahim ağzı kanseri hücrelerinin çoğalması ve canlılığı bastırılmaktadır (Zhou ve ark, 2016).

1.5. Apoptoz ve Kök Hücre İlişkili Genlerin MiRNA ilişkisi

1.5.1. P53

Tümör baskılayıcı p53, genomun koruyucusu olarak bilinir ve normal hücre büyümesini koruyan bir transkripsiyon faktörüdür (Chen ve ark, 2010). P53 geni 17. kromozomun kısa kolunda (p) yerleşmiştir (17p13.1) ve 53 kDa ağırılığında 393 aminoasitlik bir çekirdek fosfoproteini kodlamaktadır (Yukishige ve ark, 2011). P53 fonksiyonunun bozulması sıklıkla kanserin başlamasına veya ilerlemesine yol açmaktadır. İnsan kanserlerinin yaklaşık yarısı, p53 geninde DNA mutasyonları barındırır ve tümörlerin %80'inden fazlasının, DNA mutasyonlarına ek olarak farklı mekanizmalar yoluyla p53 fonksiyon kaybına sahip olduğu tahmin edilmektedir (Vousden ve ark, 2009). P53'ün yaygın bir polimorfizmi, 72. kodonda gerçekleşmektedir. Bu polimorfizmin ya bir prolin ya da bir arjinin bölgesi içeren değişmiş bir proteinle sonuçlanmaktadır (Pietsch ve ark, 2006). Bu transkripsiyonel düzenleyicinin işlevinin ortadan kaldırılması, daha agresif bir meme ve akciğer kanseri fenotipine, nüks ve ölümlerin %50 oranında artmasıyla sonuçlanmaktadır (Elledge ve ark, 1998). HPV-pozitif kanser hücrelerinde ise E6 onko-proteinine bağlı p53 bozulma yolu aktiftir. Bu bozulma yolu kanser hücrelerinin büyümesi ile sonuçlanmaktadır (Hengstermann ve ark, 2001). Serviks kanserli hastalarda yapılmış bir çalışmanın sonucunda 72. kodon arjinin homozigotluğu kanser için bir risk faktörü olarak belirtilmiştir (Zebhe ve ark, 2001). Son çalışmalar bazı miRNA'ların, sıklıkla tümörlerde yüksek ekspresyon sergileyerek p53'ün negatif düzenleyicileri olduğunu rapor etmişlerdir (Feng ve ark, 2011). Bu miRNA'lar, p53 mRNA'sının 3'-UTR'sine bağlanarak p53 seviyesini ve işlevini inhibe etmektedir (Le ve ark, 2009).

1.5.2. P21

P21, proto-onkogen RAS tarafından kodlanmaktadır. Apoptoz, DNA hasar yanıtı ve aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi gibi çeşitli hücresel programları düzenleyen ve p53 tarafından transkripsiyonel olarak yukarı regüle

edilen sikline bağımlı kinazların bir inhibitörüdür (Romanov ve ark, 2016). P21, sitoplazma veya çekirdekteki lokalizasyonuna bağlı olarak onkogenik veya tümör baskılayıcı olabilmektedir (Huang ve ark, 2014). P53'te olduğu gibi p21'de meme, akciğer ve rahim ağzı kanserleri dahil olmak üzere birçok kanserde mutasyona uğrar ve aşağı regüle edilmesi kötü prognoz ile ilişkilidir (Marchetti ve ark, 1996, Elledge ve ark, 1998). P53 kodon 72 ve p21 kodon 31'deki polimorfizmlerin, serviks kanserinin gelişimiyle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Jiang ve ark, 2010). Bazı miRNA'ların, p21'e 3'UTR yoluyla bağlandığı ve p21 ekspresyonunu aşağı regüle ettiği gözlemlenmiştir (Jung ve ark, 2010).

1.5.3. SOX2

SOX2, embriyonik gelişimin düzenlenmesi için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür. SOX2 ekspresyonunun düzensizliği, çoğalma, göç etme, istila etme ve metastaz yapma kapasitesi gibi kanser hücresi özelliklerini olumlu yönde etkilemektedir. Kanser kök hücrelerinde fazla ifade edilmekte onkogenik özellik gösterebilmektedir (Novak ve ark, 2020). SOX2, küçük hücreli akciğer kanserlerinin %41'inde ve bazal hücre benzeri meme karsinomlarının %43'ünde aşırı eksprese edilmektedir (Güre ve ark, 2000). Aynı şekilde servikal kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen SOX2, hücre proliferasyonunu, klonojenik ve tümörijenik özelliğini arttırmaktadır. Bu da tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Leiphrakpam ve ark, 2017). Translasyonel düzeyde birkaç çalışma miR-145, miR-126 ve miR-9 gibi miRNA'ların SOX2'yi inhibe edebileceğini, rolünü ve aşağı akış olaylarını etkileyebileceğini bildirmiştir (Liu ve ark, 2013; Xu ve ark, 2009; Otsubo ve ark, 2011; Jeon ve ark, 2011).

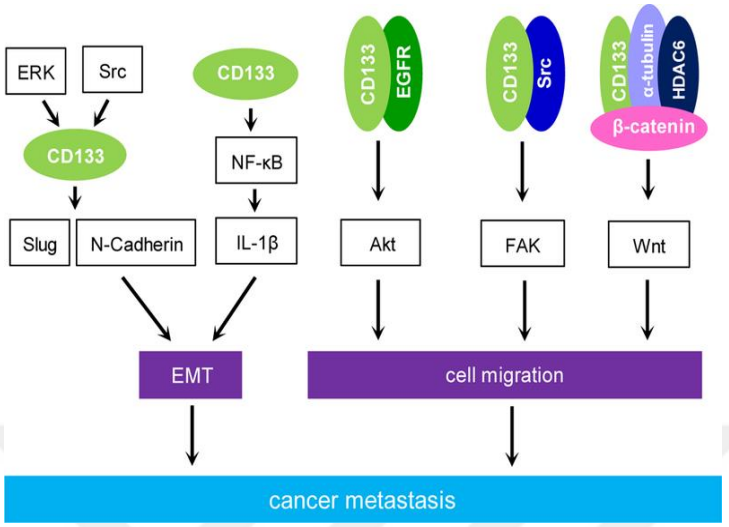
1.5.4. HTERT (İnsan Telomeraz Ters Transkriptaz)

hTERT, telomer uzunluğunu korumak ve arttırmak için telomerik DNA'yı sentezleyen ve hücrenin ölmesini engelleyen insan telomerazının önemli bileşenlerindendir (Li ve ark, 2017). İnsan kanserlerinde onkogen veya tümör

baskılayıcı rollerde bulunabilmektedir. hTERT indüksiyonu; telomeraz aktivasyonu ile telomerleri stabilize ederek malign dönüşüme katkıda bulunur. β-katenin ile etkileşime girerek kanser hücrelerinde EMT'yi ve kök hücre benzeri özellikleri destekler (Liu ve ark, 2013). Ayrıca hücre proliferasyonunu arttırırken, anjiyogenez ve metastazı hızlandırır ve kanser hücrelerinin büyümesini teşvik eder (Saha ve ark, 2017). Marchetti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hTERT'nin yüksek ekspresyonunun akciğer, rahim ağzı ve meme kanseri gibi katı tümörlerde kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise miR-138'in rahim ağzı kanserinde tümör baskılayıcı olarak hareket edebileceği ve hTERT'yi hedefleyerek in vitro ve in vivo olarak tümör büyümesini inhibe edebileği görülmüştür (Zhou ve ark, 2016). Ancak altında yatan mekanizma hala belirsizdir. hTERT'in telomer uzatma işlevinden bağımsız olarak yukarıda bahsedilen onkojenik özelliklerinden dolayı hTERT'i hedeflemek, EMT ve CSC'leri inhibe edip kanserin ilerlemesini engellemek için tedavi yöntemi olabilmektedir.

1.5.5. CD133

CD133, PROM1 tarafından kodlanan glikosile edilmiş bir transmembran proteinidir. Kanserin başlaması, gelişmesi ve metastazına ek olarak, kemoterapi ilaçları ve radyasyon dahil olmak üzere terapötik direnci de arttırırlar (Lee ve ark, 2017). Ayrıca $CD133^{+}$ hücrelerinin kendini yenileme, çoğalma ve farklı hücre tiplerine farklılaşma yetenekleri göz önüne alındığında kanser kanser kök hücreleri (CSC) oldukları söylenebilir (Hemmati ve ark, 2003).



Şekil 1.3. Kanser metastazını regüle etmek için CD133'ün aracılık ettiği sinyal yolları

Yapılan çalışmalar, CD133-pozitif CSC benzeri hücre popülasyonunun akciğer kanserinde kendi kendini yenileyebildiğini ve sınırsız sayıda nontümorijenik hücre üretebildiğini, fakat CD133-negatif kanser hücrelerinin bu potansiyelden yoksun olduğunu gözlemlemiştir (Eroma ve ark, 2008). Bu da yüksek CD133 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde rahim ağzı kanserinde CD133'ün, CSC'nin proliferasyonunu kolaylaştırdığı, biyobelirteç olarak hizmet ettiği ve tümör büyümesini başlattığı bildirilmiştir (Javed ve ark, 2018). Meme kanserinde giderek artan CD133'ün rolü ilk olarak, invaziv duktal karsinomda yüksek PROM1 ekspresyonunun tümör boyutu ve lenf nodu metastazı gibi olumsuz klinik-patolojik faktörlerle pozitif korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur (Liu ve ark, 2009). Bazı miRNA'ların CD133 üzerinde belirli inhibitör etkileri vardır ve bu da kanserin başlamasını ve ilerlemesini durdurmaktadır (Li ve ark, 2017, Zhao ve ark, 2017).

1.5.6. E-CADHERİN

E-cadherin, tümör baskılayıcı bir proteindir ve EMT ile bağlantılı olarak silinmesi veya deregülasyonu, cadherin-cathenin kompleksinin bozulması nedeniyle tümörün infiltratif ve metastatik yeteneği ile ilişkilidir. Bunun sonucunda ise hücre yapışması kaybı ve hücre hareketliliğinde artış meydana gelmektedir (Na ve ark, 2020, Christofori ve ark, 1999). Agresif bir meme kanseri paterni, özellikle lenfovasküler invazyon ve aksiller lenf düğümlerinde metastaz ile ilişkilidir (Hunt ve ark, 1997). Akciğer ve rahim kanserlerinde de baskılanmış E-cadherin'in metastaz başlangıcı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Shu ve ark, 2019, Peng ve ark, 2015). Çoğu miRNA'lar yukarı regüle edildiğinde metastaz hızlandırıcı olarak hareket ederken, aşağı regüle edildiğinde metastaz baskılayıcı olarak işlev görmektedirler (Ma ve ark, 2008). Aynı şekilde fazla eksprese edilen bir miRNA E-cadherin salgısını azaltmakta ve metastazı hızlandırmaktadır (Tan ve ark, 2010).

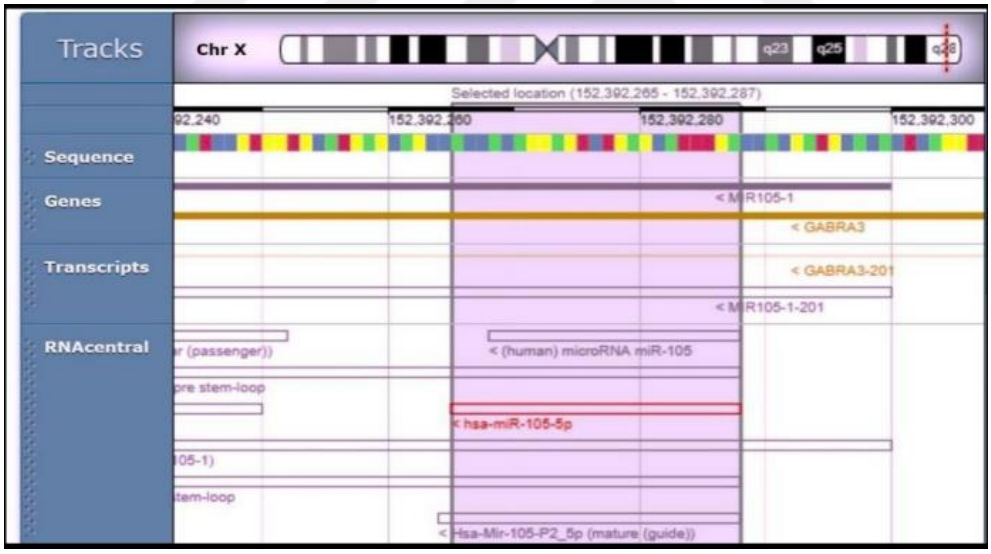
1.5.7. SNAIL

SNAIL ailesine ait olan üç omurgalı üyesi bulunmaktadır. Bunlara SNAIL (SNAIL1), SLUG (SNAIL2) ve SMUC (SNAIL3) adı verilmiştir. Tüm aile üyeleri çinko parmak tipinin transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır (Nieto ve ark, 2002). SNAIL; metabolik bir yeniden programlama, tümör hücrelerine kanser kök hücre benzeri özellikler kazandırma, ilaç direnci, tümör nüksetmesi ve metastaz hızlandırma gibi süreçlerde rol oynamaktadır (Wang ve ark, 2013). Ayrıca E-cadherin ekspresyonunu baskılayarak EMT'yi indükler (Cano ve ark, 2000). Bu sebeplerden dolayı akciğer, meme ve rahim ağzı gibi kanserlerde SNAIL'in inhibe edilmesi kanserin başlamasının ve istilasının tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olabilir (Hung ve ark, 2009, Mani ve ark, 2008, Zhao ve ark, 2013). MiRNA'lar SNAIL seviyesini, SNAIL ise aynı zamanda miRNA ekspresyon seviyelerini düzenleyebilir. Aralarındaki etkileşim, tümör büyümesi ve metastazının düzenlenmesinde önemli bir olaydır (Skryzpek ve ark, 2020). Ayrıca kanserde SNAIL'e bağlı EMT'nin de P53 ve bazı miRNA'lar tarafından

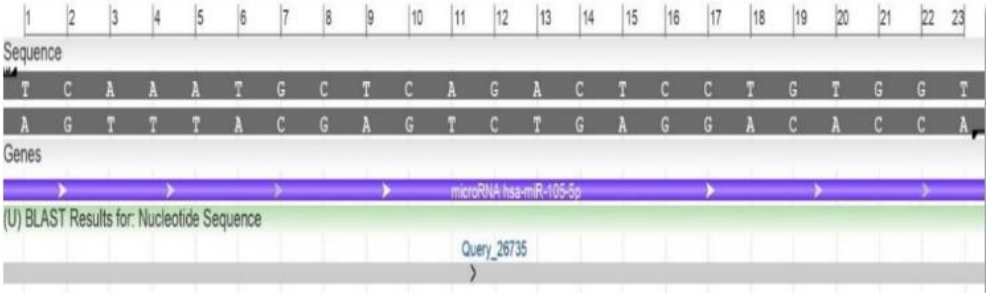
düzenlendiği gösterilmiştir. P53 fonksiyonunun yokluğunda miRNA seviyelerindeki düşüşün sonucu olarak SNAIL'e bağlı EMT, meme ve akciğer karsinomu hücrelerinde etkilidir (Kim ve ark, 2011).

1.6. MiR-105-5p

MiR-105 ailesinin üyelerinden olan hsa-miR-105-5p, 22 nükleotid uzunluğundadır ve Homosapiens'te referans genomunda bulunur. 6 veritabanı (GeneCards, TarBase, miRBase, LncBase, RefSeq ve ENA) verilerine göre; X kromozomunun p11.3-q22.3 kolunda yer almaktadır. GABRA3(gamaaminobütirik asit (GABA) A reseptör alfa 3 alt birimi) geninin intron 1 bölgesi içerisindedir. Başlama lokasyonu 152,394,458 ve bitiş lokasyonu 152,394,480'dir. Kromozom sekansı; ACCACAGGAGTCTGAGCATTTGA'dır. (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. hsamiR-105-5p kromozom lokasyonu (Kırmızı: Timin=T, Mavi: Sitozin=C, Sarı: Guanin=G, Yeşil: Adenin=A).



Şekil 1.5. hsamiR-105-5p gen sekans grafiği.

Çizelge 1.1. MiR-105-5p'nin Akciğer, Meme ve Rahimağzı kanserlerinde doğrudan hedeflediği genler (Veriler miRBase veritabanından alınmıştır).

MiR-105-5P Hedef Genleri	
A549	EGFR, ALK, KRAS, PTEN, BNIP2, BNIP3, BAK1, BCL2L11, BCL2L2
MCF7	TP53, BRIP1, PIK3CA, BARD1, BRCC3
HeLa	TP53, PIK3CA, TGFβ1, MAPK, MAPK14

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Lu J ve ark, kanser teşhisinde miRNA profillerinin önemini göstermek için, boncuk tabanlı profil oluşturma yöntemi geliştirmişlerdir. Çoklu insan kanserleri de dahil olmak üzere 334 numunenin 217 memeli MiRNA'larını, iki flüoresan boyanın değişken karışımları ile emprenye edilmiş karboksilatlı 5 mikron polistiren boncuklarla birleştirmişler ve PCR ile amplifiye etmişlerdir. Boncukları daha sonra miRNA kimliğini ve ekspresyonunu ölçebilmek için akış sitometresi kullanılarak analiz etmişler bunun sonucunda ise miRNA'ların çoğunun (217 miRNA arasından 129'u) tümörlü dokularda normal dokulara kıyasla daha düşük ekspresyon sevilerine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca miRNA'lar tümörleri tek bir soy içinde bölümlere ayırmıştır. Bu deneyler, tek bir geliimsel soy içinde bile, dönüşüm mekanizmalarını yansıtan farklı miRNA ekspresyon kalıplarının gözlemlenebileceğini ve ayrıca miRNA ekspresyon kalıplarının insan kanserlerinin gelişim tarihini kodladığı fikrini desteklemektedir.

Dong X ve ark, bazı miRNA'ların KHDAK için bir biyobelirteç olduğunu kanıtlamak amacıyla mikroarraylar kullanarak miRNA'ları profillemişlerdir. 154 primer KHDAK hastasından ve 146 sağlıklı donörden diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA'ları, RNA izolasyonuna tabi tutup kantitatif PCR (qPCR) ile doğrulamışlardır. Bu analizler, KHDAK hastaları ve sağlıklı donörler arasında 40 farklı miRNA'nın seçildiğini ortaya koymuştur. Hastaların plazma miRNA düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. ROC analizleri, miRNA'ların hastaları sağlıklı donörlerden ayırabileceğini ve olumlu tanısal verimliliklere sahip olduğunu görtermiştir. Çalışmalar, erken evre KHDAK hastalarının tanısı için CEA'nın birleştirilebileceğini göstermiştir. MiRNA'lar, CEA ile birlikte erken evre KHDAK için tanı gücünü sırasıyla 0.880, 0.877 ve 0.888'e yükseltebilir. Birlikte ele alındığında, miRNA'ların plazmada özel olarak bulunduğunu ve KHDAK'nin erken aşamasında dolaşıma dökülebileceğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak,

miRNA ekspresyonlarının tümör oluşumunu hızlandırdı ve plazmadaki miRNA'ların KHDAK hastalarının erken teşhisi için yeni biyobelirteçler olarak işlev görebilecekleri bulunmuştur.

Donnem T ve ark, KHDAK'da anjiyogenez ile ilgili önemli ölçüde değiştirilmiş miRNA'ları tanımlamayı amaçlamışlar ve 335 KHDAK hastasından oluşan geniş bir kohorttan, hastalığa özgü sağkalımı (DSS) kısa olan 10 hasta, uzun DSS'si olan 10 hasta ve 10 normal kontrolden alınan parafine gömülü numuneler analiz etmişlerdir. MiRNA'lar, mikrodizi hibridizasyonu ile ölçülmüş ve seçilen miRNA'ları, real time qPCR ile doğrulamışlardır. Anjiyogenez dahil olmak üzere farklı yolların etkileri, PANTHER'den türetilen GSEA ile değerlendirilmiştir. 128 miRNA, önemli ölçüde yukarı veya aşağı regüle edilmiştir. Yol analizi, anjiyogenez ile ilgili miRNA'ların KHDAK'a dahil olduğunu göstermiştir. Dizi hibridizasyonu ve qPCR doğrulama verileri arasında güçlü ve anlamlı korelasyonlar bulunmaktadır. Önemli ölçüde değiştirilmiş anjiyogenez ile ilgili yüksek ilgi çeken miRNA'ların, toplam kohortta fibroblast büyüme faktörü ile önemli ölçüde ilişkili olduğu ve nodal metastazlı alt grupta daha da belirgin olduğunu bulmuşlardır. Birkaç anjiyogenez ile ilişkili miRNA'nın, KHDAK'da önemli ölçüde değiştiğini öne sürmüş ancak doğrulayamamışlardır.

Zhang J ve ark, yaptıkları araştırmada miR-105-5p seviyesinin, glioma dokularında normal beyin dokularından tutarlı bir şekilde düşük olduğunu ve miR-105-5p seviyelerinin, tümör derecesi ile negatif korelasyon gösterip SUZ12'yi hedeflediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca miR-105-5p'nin glioma hücrelerinde hücre çoğalmasını engelleyerek tümör baskılayıcı gen görevini üstlendiklerini de göstermişlerdir.

Git A ve ark, meme kanseri hücre hatlarını ve normal meme dokusunu kıyaslamış ve meme kanseri hücrelerinde miRNA ekspresyonunun ciddi şekilde bozulduğunu ve azaldığını göstermişlerdir.

Pardini B ve ark, servikal kanserde düzensiz olan miRNA'ların kapsamlı bir değerlendirmesini yapmışlardır. Yapılan çalışmada, aşırı eksprese edilen

miRNA'ların servikal karsinogenez ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Yaygın olarak deregüle edilen miRNA'ların ise, erken teşhis ve hastalığın ilerlemesi için ve ayrıca serviks kanseri hastalarında tedavi için etkili tanısal biyobelirteçler olarak hizmet edebileceğini göstermişlerdir.

Jia Y ve ark yaptığı bir çalışmada, miR-301'in, meme kanseri ilerlemesinde CPEB1 proteini aracılığıyla SIRT1/SOX2 yolunu düzenlediğini göstermişlerdir. Sonuçlar, SIRT1 ve SOX2'nin meme kanseri dokularında yüksek oranda eksprese edildiğini ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlar, miR-301 ekspresyonunun artmasının CPEB1 eksperesyonunu azalttığını ancak SIRT1 ve SOX2 ekspresyonunun arttığını, buna karşın miR-301 ekspresyonunun inhibe edilmesi durumunda tümörlerde zıt eğilimlere yol açtığını göstermişlerdir. CPEB1'in düşük ekspresyonunun, meme kanseri hücrelerinde istila, göç ve proliferasyon yeteneğini arttırmak, hücre döngüsü ilerlemesini teşvik etmek ve apoptozu inhibe etmek için SIRT1/SOX2 yolunu aktive ettiği ve in vivo meme kanseri hücrelerinin tümörijenitesini teşvik ettiği sonucuna varmışlardır. Bu bulgular miR-301'in meme kanseri ilerlemesini arttıran onkomiR görevi görebileceğini ileri sürmüştür. Kümülatif olarak, bu çalışmanın ana bulguları miR-301'in CPEB1 ekspresyonunu inhibe ettiğini ve bunun da meme kanseri ilerlemesini arttırmak için SIRT1/SOX2'yi yukarı regüle ettiğini göstermiştir.

Chhabra R, epidermal büyüme faktörünün (EGF), SOX2'yi indükleyerek rahim ağzı kanserinde CSC oluşumunu teşvik ettiğini, bazı miRNA'larında SOX2'yi inhibe ederek EGF yolunu etkisiz hale getirdiğini ve böylelikle CSC popülasyonunu azalttığını yaptığı bir çalışmada göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve markaları

Western Blotting cihazları	Bio-Rad Vertical Powerpac Basic Power Supply, (Cat. No: 1645050) (USA) iBright™ CL1500 Imaging System (Cat. No: A44114)
Quantus Floumeter (RNA miktarı ölçüm cihazı)	Promega (TM396) (USA)
Termal ısıl döngüleyici (Thermal cycler)	Applied Biosystems (Model no:9902) (Singapur)
Mikroplaka okuyucu	Biochrom (Seri no:134560) (USA)
Isıtıcı	VWR (Seri No: 060111007) (USA)
Buz cihazı	IMS-50 (H01330) (EU)
Spin	Isolab (MCZ000433) (Almanya)
+4 dolabı	Uğur (USS 374 DTKLY) (Türkiye)
-80 dolabı	New Brunswick (Eppendorf) (U410 HEF) (UK)
Deepfreez (-20)	BOSCH (GSD1140NE) (Almanya)
pH metre	Az® 86555 (Tayvan)
Mikropipetler	Eppendorf (Almanya), Thermo Scientific (USA)
Hassas terazi	NECKLİFE, FLY-2004 (FA2004) (Çin)
Manyetik karıştırıcı	Thermomac (Model No:TM12) (Japonya)
Mikroskop	Olympus (CKX53) (Tokyo)
Vorteks	IKA (Seri No:0003340000) (Almanya)
Hücre kabini	Tezsan (Seri No:0624-1102) (Türkiye)
Deney tüpleri	Eppendorf (Almanya)
Su banyosu	Thermo (WB15 (Seri No:201910103443)) (USA)
İnkübatör	RWD (D180) (Çin)
Santrifüj	Beckman (Allegra), 21R Centrifuge (USA) (Cat no:367571) (Almanya)
Real time PCR	Thermal cycler(Applied Biosystem, Seri no:7500) (USA)
Non-Steril inkübatör (Etüv)	Nüve (EN 500)

3.1.2. Hücre Hatları

İnsan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KDAK) hücre dizileri A549, Gaziantep Üniversitesi'nden alınmıştır. ATCC verilerine göre, Ras mutasyonu mevcuttur ve kromozom numarası mod 66 (%24), mod 64 (%22)'dür. 58 yaşında beyaz bir erkekten alınmıştır. Meme kanseri hücre dizileri olan MCF7, Prof. Dr. M.Bertan Yılmaz tarafından temin edilmiştir. Sıklıkla BRCA1 ve BRCA2 mutasyonuna sahip olan MCF7 hücre hattının kromozom numarası mod 82'dir ve 69 yaşındaki beyaz bir kadından alınmıştır. Rahim ağzı kanseri hücre dizisi HeLa ise Yozgat Üniversitesi'nden temin edilmiştir. P53 ve pRB mutasyonuna rastlanmaktadır ve kromozom numarası mod 82'dir. İlk olarak 1951 yılında 31 yaşındaki Afrikalı bir kadından alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Ortam hazırlama

500 ml saf DMEM (Gibco™, Cat no: 41966) içerisine %0,1 antibiyotik (HyClone™, Cat no: SV30079.01) ve %10 FBS (Fetal Bovine Serum) (HyClone™, Cat no: SV30160.03) eklenerek pipetajlama yöntemiyle homojen olarak dağılması sağlanır. Hazırlanan stok çözelti daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de saklanır.

3.2.1.2. Ortam değişimi

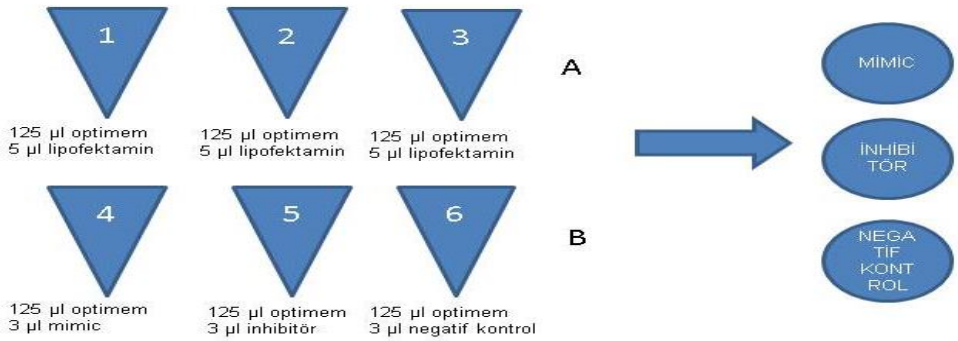
Kültüre alınan hücreler mikroskop altında incelenir ve eski ortam serolojik pipet yardımıyla çekilip PBS (Phosphate buffered saline) (HyClone™, Cat no: SH30256.02) ile yıkanır. Daha sonra önceden hazırlanan DMEM stok çözeltisinden, hücrenin içerisinde bulunduğu plate büyüklüğüne oranla bir miktar eklenerek 37°C ve 0,5 C_2O içeren inkübatöre kaldırılır.

3.2.1.3. Hücre kaldırma ve split

Plate içerisine yapışmış halde bulunan kanser hücrelerini kaldırmak için öncelikle eski ortamı çekilip PBS ile yıkanır. İçerisine tripsin (Gibco™, Cat no: 25200072) eklenip hücre bağlantılarının kesilmesi için bir süre inkübasyon içerisinde bekletilir. Mikroskop altında incelenen hücrelere eklenen tripsinin 4 katı kadar DMEM eklenir. Yapılacak deney planına göre hücreler farklı plateler içerisine bölünür.

3.2.1.4. Transfeksiyon

Transfeksiyon aşamasında Lipofectamin 3000 kiti (Invitrogen™, Cat no: 2341049) kullanılmıştır. Deneye başlamadan önce kit içerisinde bulunan miR-105-5p primerleri (hsa-miR-105 mimic, Ambion™, Cat no: 4464066/hsa-miR-105 inhibitör, Ambion™, Cat no: 4464084/hsa-miR-105 negatif kontrol, Ambion™, Cat no: AM17010) 5 nmole göre sulandırılır. (Kullanılan mimic ve inhibitör sekansları: 5'-UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU-3'). Transfeksiyondan 24 saat sonra diğer deneylerin yapılabilmesi için hücrelere split yapılmıştır. Daha sonra split yapılan hücreler mikroskopta gözlemlenir ve eğer %70-90 yoğunluğa ulaştıysa deneye başlanır. Öncelikle 6 adet 1,5 ml'lik ependorf tüpleri etiketlenir. Daha sonra ilk üç tüpe 125 µl Optimem® 1x Reduced Serum Medium (Gibco™, Cat no: 31985) ve 5 µl lipofektamin eklenip 1 kere pipetaj yapılır. Diğer 3 tüpe ayrı ayrı 125 µl optimem eklenip 4.tüpe için 3 µl mimic, 5.tüpe 3 µl inhibitör ve 6.tüpe 3 µl negatif kontrol eklenir. 1.grup ve 2.grup kendi aralarında birleştirilerek 10-15 dakika inkübasyon için bekletilirler. Daha sonra içerisinde kanser hücresi bulunan 3 cm'lik platelere aktarılırlar (Şekil 3.1). Plateler 37°C ve 0,5 C_2O içeren inkübatör içerisinde bekletilir.



Şekil 3.1. Hücrelere transfeksiyon uygulaması. (Tüplere mimic, miR-105-5p'nin ekspresyonunu arttırmak amacıyla, inhibitör ise ekspresyonunu azaltmak amacıyla eklenmiştir.)

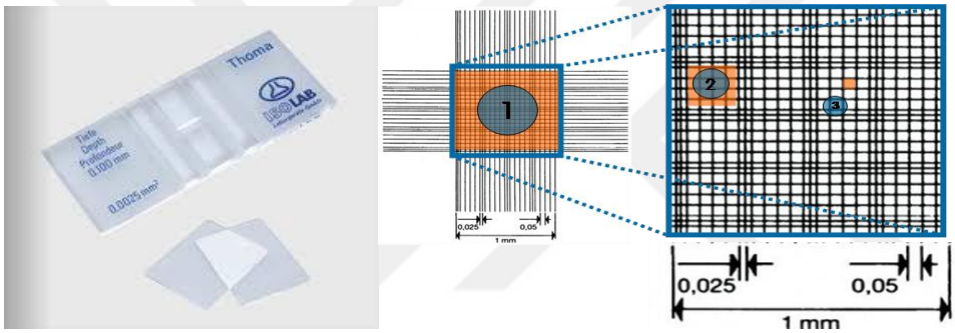
3.2.1.5. Proliferasyon

Plate içerisine yapışmış halde bulunan hücrelere kaldırma işlemi uygulanır. Hücre süspansiyonundan thoma lamının her iki kısmına 10 µl eklenip mikroskop altında sayımı yapılır. Proliferasyon için 96'lık well plate içerisine ekilecek hücrelerin kuyucuk başına düşmesi istenen hücre sayısı baz alınarak hesaplamaları yapılır ve hücre süspansiyonundan ne kadar alınacağı bulunur. Her bir kuyucuğa 300 hücre düşecek şekilde hazırlanan hücre süspansiyonu well plate kuyucuklarına 4'lü tekrarlar halinde paylaştırılır. Daha sonra hücrelerin artış oranlarına bakmak için 0 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonraki durumları gözlemlenir. Okutma işleminin yapılabilmesi için hücrelerin eski ortamı çekilip 50µl izopropanol (Merck, Cat no: 67-63-0) ile 15 dakika bekletilen hücrelerin, mikroplaka okuyucusu ile 570 nm'de absorbans değerleri ölçülür ve excel programına kaydedilir. Daha sonra GraphPad Prism 9 programı ile grafik değerleri oluşturulur.

3.2.1.6. Koloni formasyon deneyi

Öncelikle split yapılan hücrelere kaldırma işlemi uygulanır ve her bir kuyucuğa düşmesini istediğimiz hücre sayısına ulaşabilmek için thoma lamı ile hücre sayımı yapılır. Thoma lamının her iki kısmına 10 µl hücre süspansiyonu

eklenip mikroskop altında sayımı yapılır. 1.gruba 300 hücre düşürebilmek amacıyla A549 için; 700 µl, MCF7 için; 100 µl ve HeLa için; 30 µl hücre süspansiyonu eklenir. 2.gruba ise 500 hücre düşürebilmek amacıyla A549 için; 1,200 µl, MCF7 için; 300 µl ve HeLa için; 60 µl hücre süspansiyonu eklenir. Eklenen hücre süspansiyonu miktarı thoma lamı ile sayılan 1 mm içerisinde bulunan hücrelerin ortalamalarının 10^4 ile çarpılmasıyla elde edilir. Ayrıca her hücrenin çoğalma hızları farklı olmasından dolayı değişik miktarlar çıkabilmektedir. Daha sonra bu miktarlar her bir kuyucuk için 3 ml olacak şekilde DMEM kullanılarak tamamlanır. Hazırlanan mix 6'lık well plate içerisine aktarılır.



Şekil 3.2. Thoma lamı ve mikroskop görüntüsü

2 hafta boyunca 37°C ve 0,5 C_2O içeren inkübatörde bekletilir. Bu süre içerisinde ortam değişimleri yapılır ve koloni oluşturma özelliğine bakılır. 2 haftanın sonunda hücreler metilen blue (Merck, Cat no: 61-73-4) ile boyanır ve fotoğraflanır.

3.2.2. PCR

3.2.2.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu, Trizol Direct Zol™ RNA minipres plus (ZYMO Research Cat no: TR118) kiti kullanılmıştır.

Homojenizasyon aşaması; 10'luk platelere split yapılan hücreler istenen yoğunluğa ulaştığında platedeki eski ortam çekilir ve hücreler PBS ile yıkanır. 1 ml trizol eklenen hücreler hücre kazıyıcı yardımıyla kazıyarak parçalanır ve elde edilen hücre lizatı nükleaz free eppendorf tüpe alınır. Nükleoprotein komplekslerinin tam olarak ayrışması için homojenleştirilmiş örnek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir. Ardından +4°C'de 10 dakika 12.000 RCF'de santrifüjlenir. Elde edilen süpernatant yeni bir tüpe alınır.

Faz ayrımı aşaması; Süpernatanta 60 µl kloroform (Riedel-de haën, Cat no: 24216) eklenir. 15 saniye vortekslendikten sonra 2-3 dakika inkübe edilir. Tüp +4°C'de 15 dakika 12.000 RCF'de santrifüjlenir. Santrifüjden sonra oluşan 3 faz içerisinden en üstteki RNA fazı ayrı bir tüpe alınır.

RNA çöktürme basamağı; Alınan RNA fazına 150 µl izopropanol eklenip 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. +4°C'de 10 dk 12.000 RCF'de santrifüjlenir.

RNA yıkama basamağı; Süpernatant atılıp pelete 300 µl ethanol eklenip vortekslenir. 7,500 RCF'de +4°C'de 5 dk santrifüjlenir. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanır. Ethanol uzaklaştırılır.

RNA resüspansiyonu basamağı; RNA, 30-40 µl nükleaz free su ile birkaç kez pipetajlanarak çözünür. RNA daha sonra kullanılmak için -80'e kaldırılır.

3.2.2.2. RNA Ölçümü

Ölçüm için öncelikle her tüp başına 200 µl olacak şekilde mix hazırlanır. Mix içerisine QuanFluor RNA sample kit (Promega™, Cat no: E3311) içerisinde bulunan RNA Dye, total hacim/400, TE Buffer ise total hacim/20 olacak şekilde seyreltililerek eklenir. Daha sonra her tüp hacmi 200 µl'ye tamamlanana kadar nükleaz free su eklenir. Bir önceki aşamada izolasyonu yapılan RNA'lar ölçüme alınmadan önce 1'e 5 oranında distile su ile seyreltilir. Ölçüm tüplerine mix ve 1 µl RNA eklenerek ölçüm yapılır. Çıkan sonuçlar 5 ile çarpılır.

3.2.2.3. cDNA sentezi

Hesaplama: Ölçüm sonucunda 1 µl içerisinde bulunan RNA miktarları baz alınarak ng hesabı yapılır ve kaç µl RNA alınacağına karar verilir.

Ependorf tüp içerisinde RNA + nükleaz free su + PCR mixi = 20 µl olmalıdır.

PCR mixi hazırlama: Ayrı bir ependorfta mix hazırlanır. Kit (Abm OneScript®, Cat no: G236) içerisinde bulunan Random, dNTP ve RTaz her örnek için 1 µl, 5x buffer 4 µl ve RTaz inhibitör 0,25 µl eklenir. (Toplamda 7,25 µl)

PCR mixi miktarı total hacimden (20 µl) çıkarılır. 20 µl – 7,25 µl = 12,75 µl

Hesaplama basamağında izole edilen RNA miktarından 12,75 µl çıkarılır ve nükleaz free su miktarı bulunur.

PCR tüplerine nükleaz free su, PCR mixi ve RNA eklenip pipetajlama yapılır.

Tüpler PCR cihazına yüklenir. (10 dakika 25°C, 60 dakika 50°C ve 5 dakika 85°C toplamda 1 saat 15 dakika)

3.2.2.4. Real time PCR

Çizelge 3.2. PCR tüpü örnek hazırlama

GENLER	ÖRNEKLER	ETİKETLEME
1)18S	A)NEGATİF KONTROL	A1-A2-A3-A4-A5-A6-A7-A8
2)P21	B)MİMİC	B1-B2-B3-B4-B5-B6-B7-B8
3)SNAIL	C)İNHİBİTÖR	C1-C2-C3-C4-C5-C6-C7-C8
4)SOX2		
5)P53		
6)CD133		
7)HTERT		
8)E-CADHERİN		

Çizelge 3.3**.** Kit miktarları

PCR RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon Cat no: A324402)	**1X**	**3,5X**
Primer F	0,5 µl	1,75 µl
Primer R	0,5 µl	1,75 µl
H_2O	9,2 µl	18,7 µl
Cdna	1 µl	3,5 µl
SYBR mix	10 µl	35 µl

8 gen x 3 örnek x 3 tekrar = 72 kuyucuk

Örnekler, genler ve kit PCR tüplerine eklendikten sonra her bir tüp 96'lık well plate içerisindeki kuyucuklara aktarılır. cDNA'lar eklenmeden önce 5 ng'a göre seyreltme yapılır.

Çizelge 3.4. Çalıştırma sıcaklığı (40 döngü)

95° C	10 dk
95° C	15 sn
60° C	30 sn
95° C	30 sn

Çizelge 3.5. Kullanılan genlerin sekansları, katalog numaraları ve markaları

GENLER	SEKANSLAR	KAT NO VE MARKA
18S	forward: 5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3'	Cat no: 200420126 Sentebiolab
	rewerse: 5'-ACGCTGAGCCAGTCAGTGTA-3'	Cat no: 200420127 Sentebiolab
P21	forward: 5'-CCCGTGAGCGATGGAACT-3'	Cat no: HO00038602 Macrogen
	rewerse: 5'-CGAGGCACAAGGGTACAAGA-3'	Cat no: HO00038602 Macrogen
Snail	forward: 5'-GCGATGCCCAGTCTAGAAA-3'	Cat no: OG190114247 Macrogen
	rewerse: 5'-GGTAATGTGTGGGTCCGAATA-3'	Cat no: OG190114247 Macrogen
SOX2	forward: 5'-GGAGAGTAAGAAACAGCATG-3'	Cat no: 191221128 Sentebiolab
	rewerse: 5'-GTGGATGGGATTGGTGTTCT-3'	Cat no: 191221129 Sentebiolab
P53	forward: 5'-AGGGATGTTTGGGAGATGTAAG-3'	Macrogen
	rewerse: 5'-CCTGGTTAGTACGGTGAAGTC-3'	Macrogen
CD133	forward: 5'-CACTACCAAGGACAAGGCGT-3'	Cat no: 191221122 Sentebiolab
	rewerse: 5'-TCCTTGATCGCTGTTGCCAT-3'	Cat no: 191221123 Sentebiolab
hTERT	forward: 5'-CCCATTTCATCAGCAAGTTTGG-3'	Cat no: HO00038602 Macrogen
	rewerse: 5'-CTTGGCTTTCAGGATGGAGTAG-3'	Cat no: HO00038602 Macrogen
E-cadherin	forward: 5'-GTCATTGAGCCTGGCAATTTAG-3'	Cat no: OG190114247 Macrogen
	rewerse: 5'-GTTGAGACTCCTCCATTCCTTC-3'	Cat no: OG190114247 Macrogen

3.2.3. Western Blotting

3.2.3.1. Protein izolasyonu

Protein izolasyonu yapılacak 6 cm'lik plate içerisinde bulunan hücrelerin eski ortamı çekilerek soğuk 1x non-streril PBS (Thermo Scientific Cat no: 28348) ile yıkanır. Daha sonra 150 µl Ripa buffer (Thermo Scientific, Cat no: 89901) ve 1,5 µl proteaz inhibitör kokteyl (Thermo Scientific, Cat no: 78441) karıştırılarak hücrelere verilir. Hücreler hücre kazıyıcısı yardımıyla kazınıp elde edilen hücre lizatı buz üzerinde 30 dakika inkübe edilir. Tüp +4°C'de maksimum devirde 20

dakika santrifüjlenir. Sonrasında içerisinde protein bulunan süpernatant ayrı bir ependorf tüpe alınır ve protein 1/5 oranında dilüe edilir. Kalan protein üzerine 150 µl 5x lamelli buffer eklenip proteinlerin denatüre olması için ısıtılır. Proteinler -20'de saklanır.

3.2.3.2. BCA

Proteinlerin konsantrasyonları karşılaştırabilmemiz için bildiğimiz ve seri dilüsyon yöntemiyle dilüe edilmiş albümin proteini kullanılır (2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml ve 0 µg/ml). Farklı standartlarda olan 8 ayrı albümin proteini ve transfekte hücrelerden elde edilen proteinler 96'lık well plateye 10 µl ve 2 örnek olacak şekilde yüklenir. Her bir kuyucuğa 100 µl working buffer eklenir (Thermo Scientific, Reagent A Cat no: 23228, Reagent B Cat no: 1859078) ve plate 37 °C'de 30-40 dakika etüvde bekletilerek inkübe edilir. İnkübasyonun ardından mikroplaka okuyucu ile 562 nm'de MTT uygulanır.

3.2.3.3. Proteinleri jelde yürütme

Çözelti hazırlama:

Amonyum persülfat (APS): 100 mg APS (Amonyum Persülfat) (Sigma Aldrich, Cat no: 101887601) tartılarak 1 ml distile suda çözünür. Taze hazırlanır.

Akrilamit stok çözeltisi: 30 g Akrilamit (Merck, Cat no: S6360030) ve 1 g Bisakrilamit (Amresco Cat no: 2296B032) tartılarak 100 ml'ye tamamlanır. Çözelti +4 derecede saklanır.

Tris tampon çözelti: Konsantrasyon jeli için %0,2 SDS (Sodyum dodesil sülfat) (J.T. Baker, Cat no: 151213) içeren 0,25 M Tris (pH: 6,8) (Thermo Scientific, Cat no: 77861) ve ayırma jeli için %0,2 SDS içeren 0,75 M Tris (pH: 8,8) hazırlanarak +4 derecede saklanır.

Buffer hazırlama:

Transfer buffer: 9.085 g Tris-baz (Sigma Aldrich, Cat no: 1003318131), 42.79 g glisin (Biorad, Cat no: BL2110001) tartılarak %20 metanol (3 L için 600 ml metanol) içerisinde çözdürülür. Daha sonra %0,1 (3 g) SDS eklenir. Çözelti 2 L saf su ile tamamlanır ve konsantre HCl (Biorad, Cat no:?) ile pH: 8,3'e ayarlanır. Çözelti 3 L'ye saf su ile tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

Running buffer: 9,085 g Tris-baz, 42,79 g glisin ve %0,1 (3 g) SDS tartılarak 2 L saf suda çözdürülür. Konsantre HCl ile pH: 8,3'e ayarlanır. Çözelti 3 L'ye saf su ile tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

Jel hazırlama:

Alt jel (%10-12): 32 µl APS (%10), 4.1 ml H2O, 3.3 ml akrilamit stok çözeltisi, 2.5 ml tris-HCl (1.5 M pH: 8.8), 100 µl %10 SDS ve 10 µl TEMED karıştırılır.

Üst jel (%4): 6.1 ml H2O, 1.3 ml akrilamit stok çözeltisi, 2.5 ml tris-HCl (0.5 M pH: 6.8), 100 µl %10 SDS, 10 µl TEMED ve 100 µl APS (%10) karıştırılır.

Protein yükleme ve jelde yürütme

Alt jel kasetin arasına mikropipet yardımıyla dökülür ve üzerine bir miktar izopropanol eklenir. Polimerleşme için 5-10 dakika beklenir. Polimerleşmeden sonra izopropanol çekilip atılır. Daha sonra üst jelde dökülür ve tarak yerleştirilir. Üst jelin de polimerleşmesi için beklenir. Kaset + ve – kutupları göz önünde bulundurularak tanka yerleştirilir. Tank running buffer ile doldurulur. Tarak kasetten çıkarılır. Protein markeri 10 µl yüklenir. Protein izolasyonu sırasında elde edilen proteinler konsantrasyonlarına göre (50µg) hesaplanıp yüklemesi yapılır. Güç kaynağıyla tank arasındaki bağlantı sağlandıktan sonra güç kaynağı 120 volt 40 dakikaya ayarlanıp yürütme başlatılır.

3.2.3.4. Transfer

Yürütme bittikten sonra kaset arasından el değmeden jel çıkarılır ve üst jel uzaklaştırılır. PVDF membran jelin boyutuna göre kesilir üzerine jel yerleştirilip

bir kap içerisinde metanol ile 2-3 dakika bekletilir. Metanol uzaklaştırılır. Membrana bir miktar transfer buffer eklenip 10-20 dakika karıştırıcıda çalkalanarak yıkama işlemi yapılır. Geniş bir kaba transfer buffer eklenir ve kaset aparatları, süngerler ve 2 filtre kağıdı bu buffer ile ıslatılır. Transfer buffer içerisinde kırmızı aparatın üzerine ıslatılan sünger üzerine filtre kağıdı onun da üzerine PVDF membran ve jel yerleştirilir. Jelin üzerine filtre kağıdı ve sünger, süngerin üzerine de en son siyah aparat yerleştirilerek sandviç modeli tamamlanır. Hava kabarcıklarını yok etmek için hafifçe rolling yapılır. Sandviç modeli membran kırmızı tarafa jel ise siyah tarafa yakın olacak şekilde tanka yerleştirilir. Tank maximum noktaya kadar transfer buffer ile doldurulur ve güç kaynağı ile tank arasındaki bağlantı yapılır. Güç kaynağı 400 mA ve 50 dakika protokolüne göre ayarlanıp transfer başlatılır.

3.2.3.5. Blotlama ve görüntüleme

Blotlama

%5'lik süt tozu (Serva, Cat no: 42590) solüsyonu hazırlanır (her bir antikor için 10 ml). Jel transfer aşamasında PVDF membrana transfer olur. Membran protein ağırlığının bandına göre enine kesilir. Kesilen 2 membran ayrı küçük kaplara alınıp üzerilerine membranı geçecek şekilde running buffer eklenip 5 dakika karıştırıcıda çalkalanması sağlanır. 5 dakikanın sonunda running buffer uzaklaştırılır. Membranlara 10'ar ml süt tozu eklenip karıştırıcıda 1 saat karışması sağlanır. Ardından süt tozu solüsyonu boşaltılıp 3 kez 5 dakika running buffer ile çalkalanır.

Primer antikor solüsyonu hazırlama

1. 10 ml süt tozuna 5 µl B aktin primer (43 kDa) (Cell signalling- 3700S) antikoru eklenir.
2. 10 ml süt tozuna 10 µl Snail (slug) (30 kDa) (Cell signaling- C19G7) primer antikoru eklenir.

35 kDa üstüne 2.solüsyon eklenir. 35 kDa altında kalan membrana 1.solüsyon eklenir. Membranlar 1 saat karıştırıcıda karıştırılır. Ardından 3 kez 5 dakika running buffer ile yıkanır.

Sekonder antikor solüsyonu hazırlama

1. 10 ml süt tozuna 5 µl B aktin Mouse HRP sekonder antikoru eklenir.
2. 10 ml süt tozuna 5 µl Snail (Slug) Rabbit HRP sekonder antikoru eklenir.

35 kDa üzerine 2.solüsyon eklenir. 35 kDa altında kalan membrana 1.solüsyon eklenir.

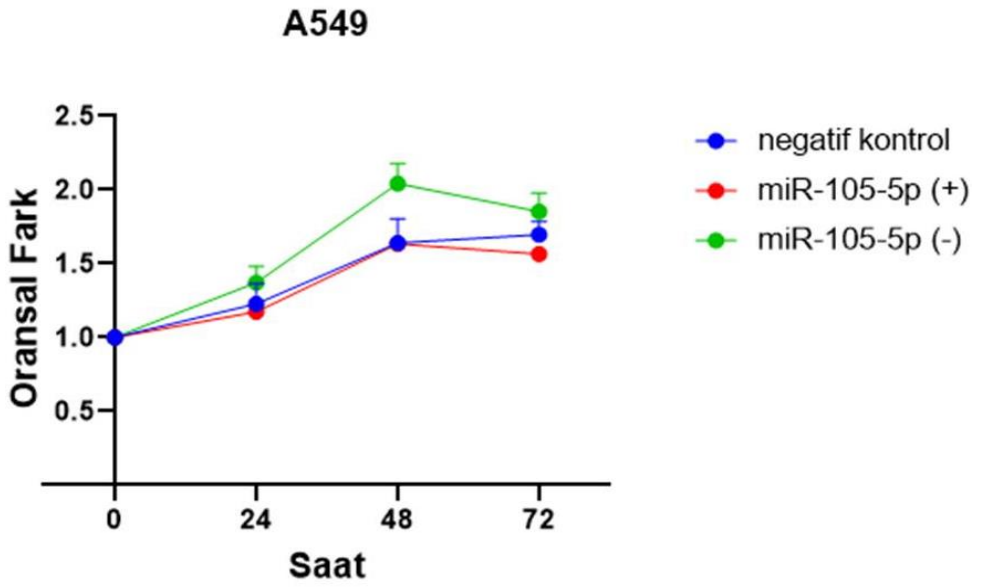
Membranlar 1 saat karıştırıcıda karıştırılır. Ardından 3 kez 5 dakika running buffer ile yıkanır. Membran boyutuna göre şeffaf dosya kesilir ve cımbız yardımıyla seffaf dosya içerisine alınır. Membrana TBM solüsyonu eklenir 15-30 dakika karanlık ortamda bekletilip su ile yıkanır. Bantlar görünür hale gelir. Membranlar running buffer içerisinde +4°C'de saklanır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

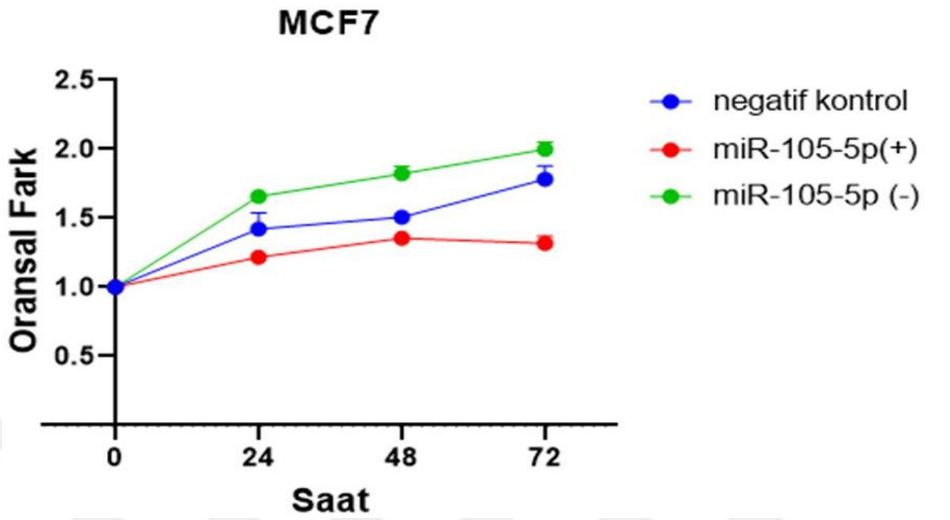
4.1. Bulgular

4.1.1. MiRNA Transfeksiyonu Yapılan Hücrelerdeki Proliferasyon Değişimlerinin Gözlemlenmesi

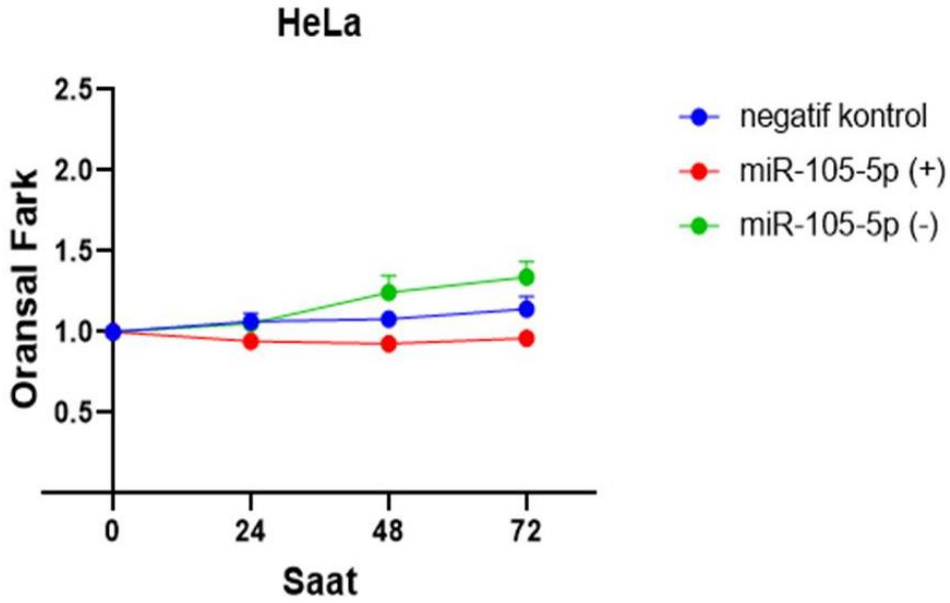
Araştırmanın bu aşamasında miR-105-5p'nin onkogenik veya tümör baskılayıcı özelliklerine bakılmak amacıyla farklı koşullar altında hücre artış hızlarına bakılmış ve miR-105-5p, her üç hücre hattında da proliferasyonu baskılayarak tümör baskılayıcı olarak görev almıştır. MiR-105-5p ekspresyonu indüklendiğinde (mimic) kanserli hücrelerin artış hızı azalmakta, susturulduğunda (inhibitör) ise anlamlı olarak artmaktadır (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).



Şekil 4.1. A549 hücrelerinin farklı koşullar altındaki artış hızları.



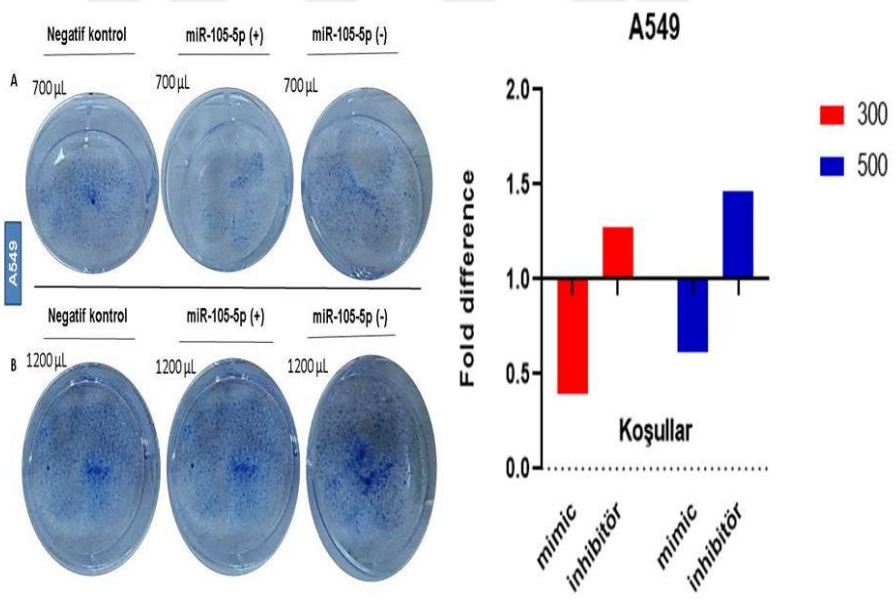
Şekil 4.2. MCF7 hücrelerinin farklı koşullar altındaki artış hızları.



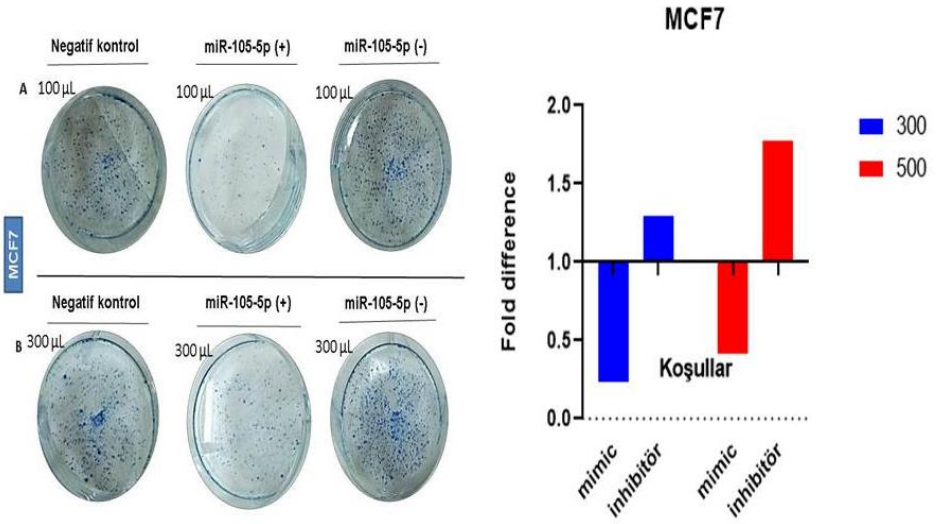
Şekil 4.3. HeLa hücrelerinin farklı koşullar altındaki artış hızları.

4.1.2. Koloniformasyon Sonucunda Hücrelerin Koloni Oluşturma Özelliklerinin İncelenmesi

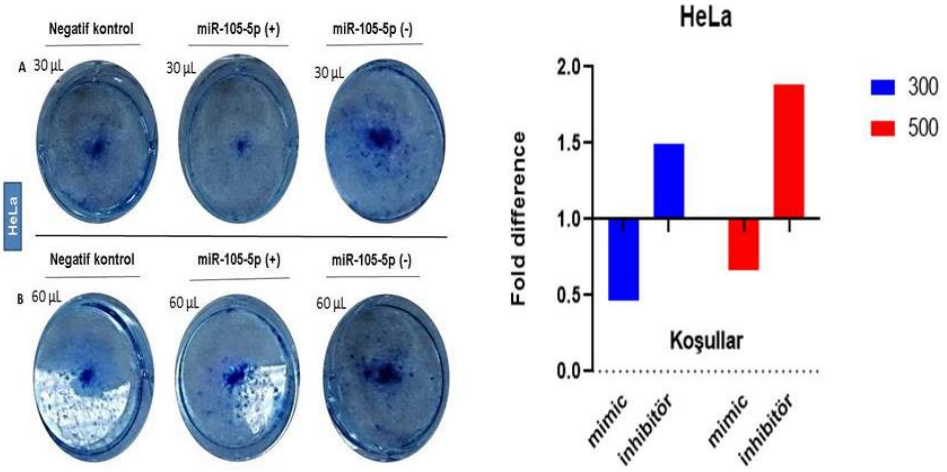
Ekspresyonu arttırılan ve inhibe edilen miR-105-5p'nin, MCF7, A549 ve HeLa hücrelerinin koloni oluşturma özelliklerine olan etkilerine bakmak amacıyla koloniformasyon düzeneği kurulmuştur. Oluşan kolonileri ve GraphPad 9 programı ile çizilen grafikten yola çıkılarak, deney sonucunun diğer bulgular ile paralel olduğu görülmüştür. MiR-105-5p ekspresyonu arttırıldığında her üç hücre hattında da hücrelerin çoğalma hızı ile doğru orantılı olarak koloni oluşumunun baskılandığı görülmüştür. MiR-105-5p'nin ekspresyonu azaltığında, eksprese edilmesine kıyasla her üç hücre hattında da koloni oluşumunun arttığı görülmüştür (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).



Şekil 4.4. A549 koloniformasyon plate ve grafik görüntüleri (Başlangıçta A grubuna 300 hücre (700 µL), B grubuna 500 hücre (1200 µL) eklenmiştir).



Şekil 4.5. MCF7 koloniformasyon plate ve grafik görüntüleri (Başlangıçta A grubuna 300 hücre (100 µL), B grubuna 500 hücre (300 µL) eklenmiştir).



Şekil 4.6. HeLa koloniformasyon plate ve grafik görüntüleri (Başlangıçta A grubuna 300 hücre (30 µL), B grubuna 500 hücre (60 µL) eklenmiştir).

4.1.3. RNA İzolasyonu Sonrasında Elde Edilen RNA Miktarları

Çizelge 4.1. Transfeksiyonlu A549 hücrelerinin RNA miktarı ölçümleri.

KOŞULLAR	ÖLÇÜM SONUÇLARI
A549 negatif kontrol	178 ng/µl
A549 mimic	142 ng/µl
A549 inhibitör	165 ng/µl

Çizelge 4.2. Transfeksiyonlu MCF7 hücrelerinin RNA miktarı ölçümleri.

KOŞULLAR	ÖLÇÜM SONUÇLARI
MCF7 negatif kontrol	212 ng/µl
MCF7 mimic	342 ng/µl
MCF7 inhibitör	47,2 ng/µl

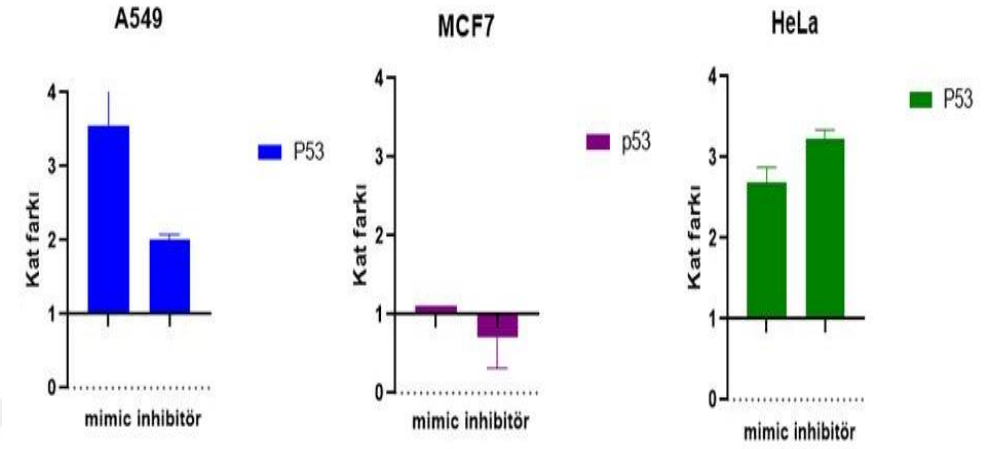
Çizelge 4.3. Transfeksiyonlu HeLa hücrelerinin RNA miktarı ölçümleri.

KOŞULLAR	ÖLÇÜM SONUÇLARI
HeLa negatif kontrol	441 ng/µl
HeLa mimic	453 ng/µl
HeLa inhibitör	531 ng/µl

4.1.4. PCR Bulguları

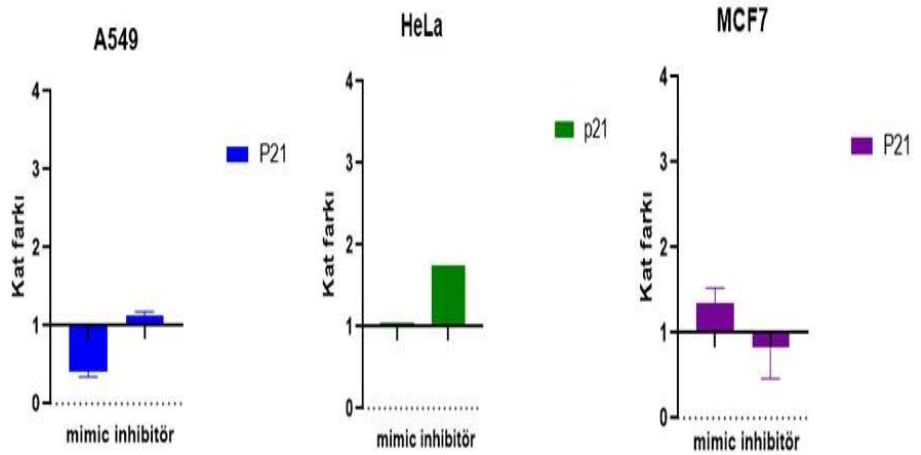
MiR-105-5p ekspresyonunun arttırıldığı ve azaltıldığı hücrelere, RT-PCR yapılarak apoptoz ile ilişkili genlerle ilişkisine bakılmıştır.

A549 ve MCF7 hücre hatlarında P53 geni mimic koşulunda eksprese edilmiş ve inhibitör koşulunda baskılanmıştır. Fakat HeLa hücre hattında az bir farkla da olsa inhibitör koşulunda daha fazla eksprese edilmiştir (Şekil 4.7).



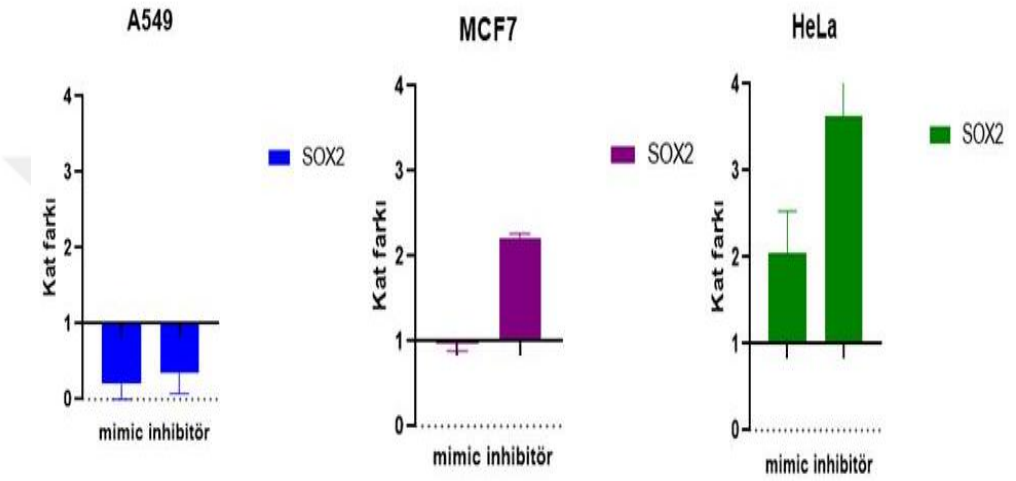
Şekil 4.7. MiR105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde P53 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri.

P21 geni ise, mimic koşullu A549 ve HeLa hücre hatlarında inhibe edilirken, inhibitör koşulunda eksprese edilmiştir. Bu durum MCF7 hücre hattında tam tersi bir şekilde gerçekleşmiştir. P21, MCF7 hücre hattında mimic koşulunda yukarı yönde inhibitör koşulunda aşağı yönde regüle olmuştur (Şekil 4.8).



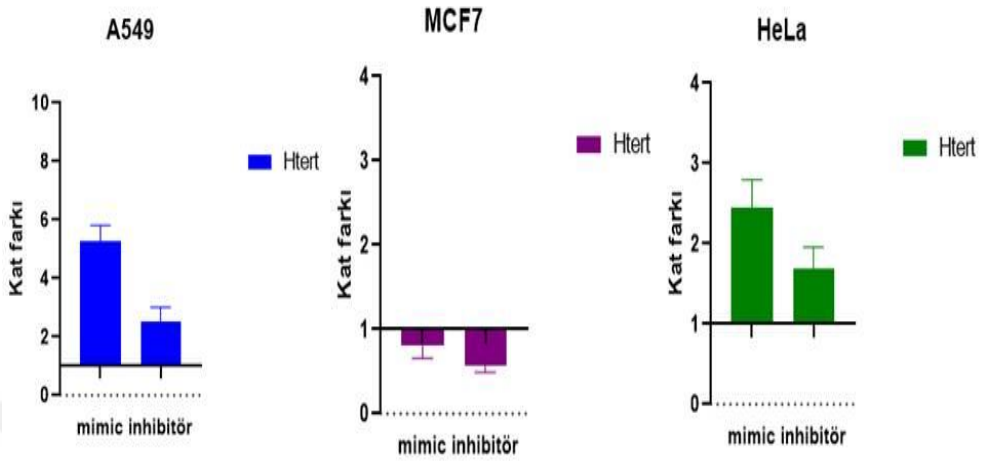
Şekil 4.8. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde P21 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri.

SOX2 geni, miR-105-5p ekspresyonunun arttığı ve azaldığı A549 hücre hattında herhangi bir değişiklik göstermemiştir. Fakat MCF7 hücresinde mimic koşulunda aşağı yönde, inhibitör koşulunda ise yukarı yönde regüle olmuştur. HeLa hücrelerinde ise mimic koşulunda, inhibitör koşuluna oranla daha az eksprese edilmiştir (Şekil 4.9).



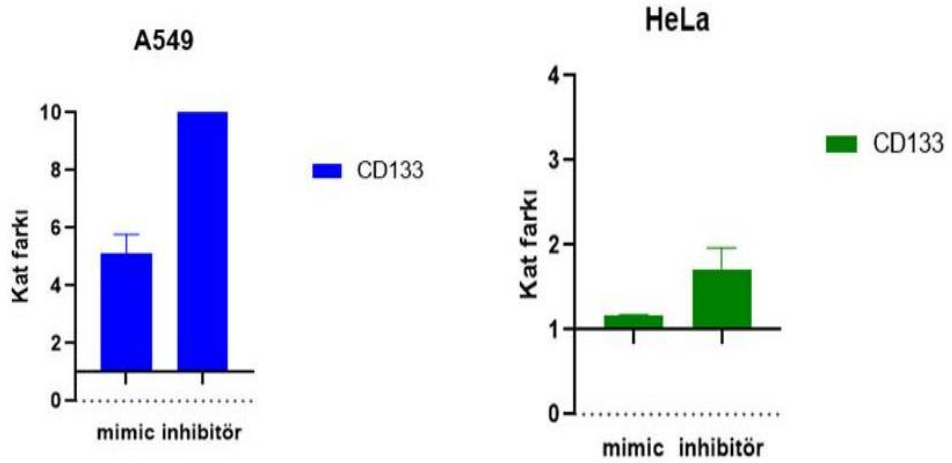
Şekil 4.9. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde SOX2 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri.

MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan A549 ve HeLa hücre hatlarında, Htert geni fazla miktarda eksprese edilirken, ekspresyonun inhibe edildiği koşulda baskılanmıştır. Bu durum miR-105-5p'nin farklı koşullar sağladığı MCF7 hücre hattında bir değişiklik göstermemiştir (Şekil 4.10).



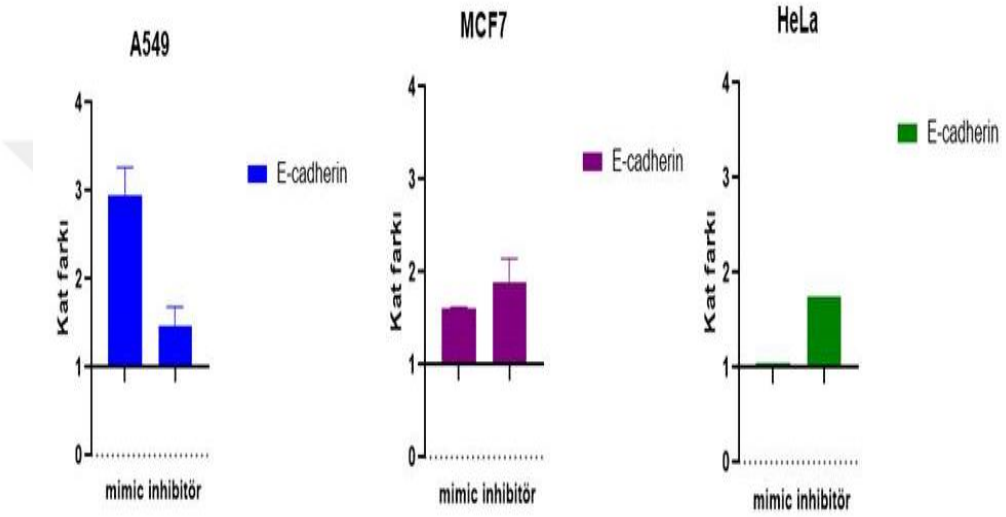
Şekil 4.10. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde Htert geninin mRNA ekspresyon seviyeleri.

CD133 geninde sadece A549 ve HeLa hücre hatları incelenmiş ve her iki hücre hattında da miR-105-5p'nin ekspresyonunun arttığı koşullarda CD133 geninin baskılandığı görülmüştür. Ekspresyonun azaldığı durumlarda ise tam tersi olarak CD133 geni fazla eksprese olmuştur (Şekil 4.11).



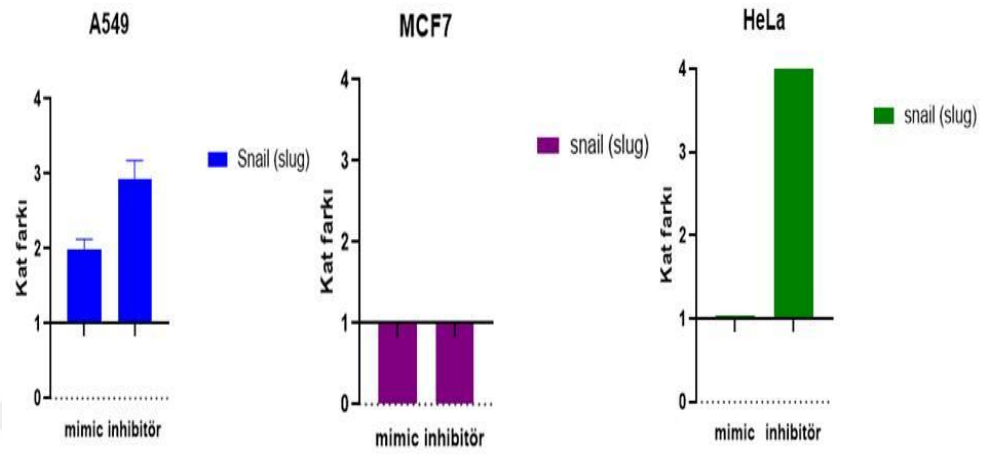
Şekil 4.11. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde CD133 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri.

MCF7 ve HeLa hücre hatlarının inhibitör koşulunda E-cadherin geninin ekspresyonu artarken mimic koşulunda baskılanmıştır. Fakat A549 hücre hattında miR-105-5p ekspresyonuyla birlikte E-cadherin ekspresyonu da artmış ve doğru orantılı olarak miR-105-5p'nin inhibe edildiği durumda E-cadherin de inhibe edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde E-cadherin geninin mRNA ekspresyon seviyeleri.

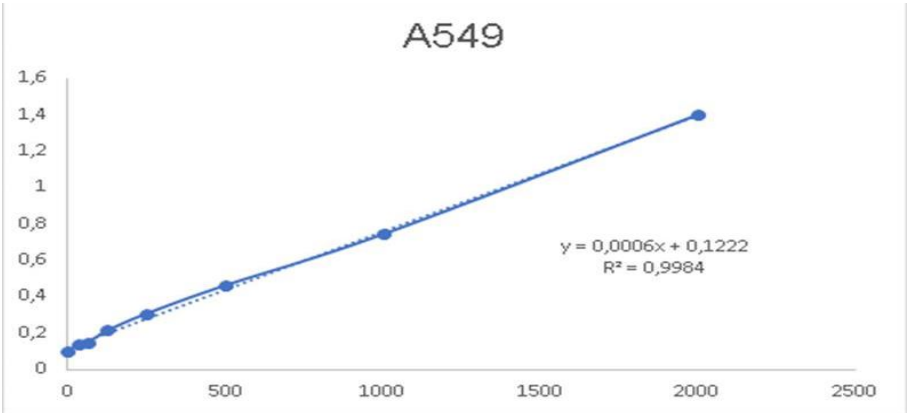
A549 ve HeLa hücrelerinde mimic koşulunda ekspresyonu azalan Snail (slug) geninin inhibitör koşulunda ekspresyonu artmıştır. MCF7 hücre hattında ise her iki koşul altında da bir değişiklik göstermemiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. MiR-105-5p ekspresyonu arttırılan ve azaltılan hücrelerde Snail geninin mRNA ekspresyon seviyeleri.

4.1.5. BCA (Bikinchoninic Asid Assay) Bulguları

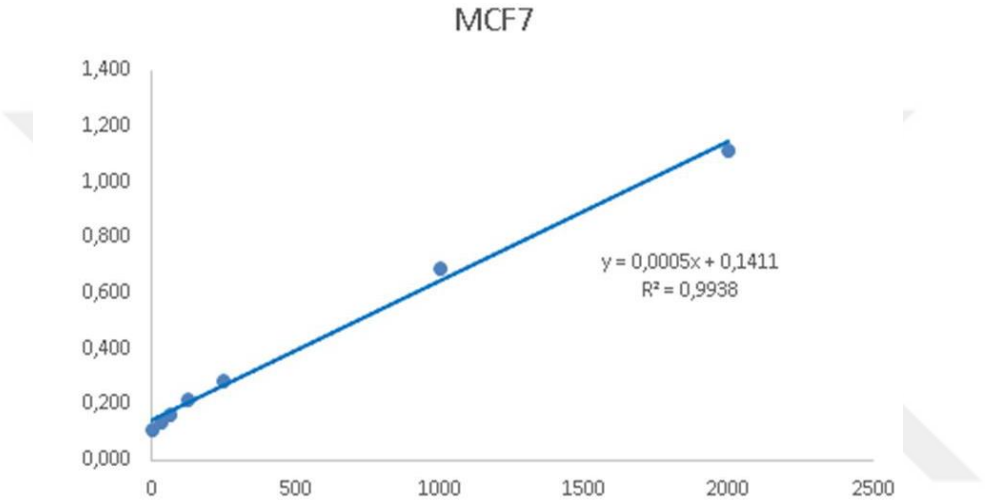
Galapagos programı ile 562 nm dalga boyunda protein miktarlarının kantitatif ölçümünden elde edilen veriler Excel'de düzenlenerek, mimic ve inhibitör koşullarındaki hücrelerde total protein miktarlarını gösteren doğrusal standart grafiği oluşturuldu ve R^2 değeri hesaplandı (Şekil.14-15-16).



Şekil 4.14. A549 hücrelerinden elde edilen total proteinlerin standart grafiği ve R^2 değeri.

Çizelge 4.4. MiRNA ekspresyonu arttırılmış (mimic) ve azaltılmış (inhibitör) A549 hücrelerinden elde edilen protein miktarları

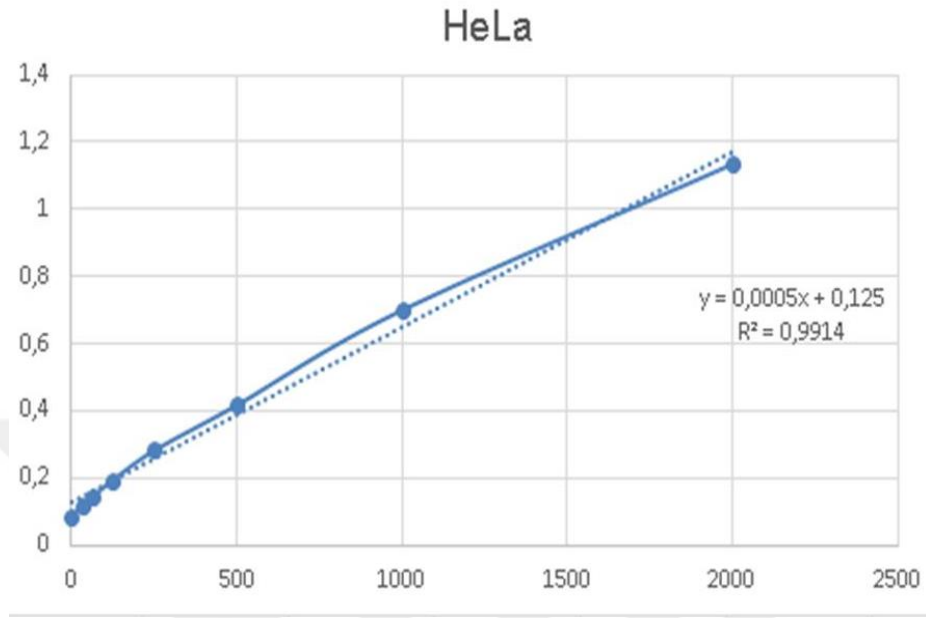
Negatif kontrol	1980 µg/ml
Mimic	1515 µg/ml
İnhibitör	1985 µg/ml



Şekil 4.15. MCF7 hücrelerinden elde edilen total proteinlerin standart grafiği ve R^2 değeri.

Çizelge 4.5. MiRNA ekspresyonu arttırılmış (mimic) ve azaltılmış (inhibitör) MCF7 hücrelerinden elde edilen protein miktarları

Negatif kontrol	11,337 µg/ml
Mimic	11,027 µg/ml
İnhibitör	11,977 µg/ml



Şekil 4.16. HeLa hücrelerinden elde edilen total proteinlerin standart grafiği ve R^2 değeri.

Çizelge 4.6. MiRNA ekspresyonu arttırılmış (mimic) ve azaltılmış (inhibitör) HeLa hücrelerinden elde edilen protein miktarları.

Negatif kontrol	6740 µg/ml
Mimic	3490 µg/ml
İnhibitör	9020 µg/ml

4.1.6. Western Bulguları

Protein izolasyonunda elde edilen proteinler ile western deneyi kurulmuş fakat sonuç alınamamıştır. Bunun nedeninin kullanılan antikordan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmanın planları doğrultusunda yeni bir antikor ile deneme yapabilmek için gerekli zaman ve maddi destek sağlanamadığından western blotting deneyi tekrarlanamamıştır.

4.2. Tartışma

Günümüzde en çok ölüme neden olan kanser hastalığında miRNA'ların, gerek hücre farklılaşması ve proliferasyonda, gerek apoptozda, gerekse metastazda önemli roller üstlendiği kanıtlanmıştır. Pek çok miRNA'nın kanserde onkogenik ve tümör supressör gen olarak görev aldığı bilinmektedir (Calin ve ark, 2006). Araştırmamızda, miR-105-5p miRNA'sının A549, MCF7 ve HeLa hücre hatlarındaki apoptoz ve kök hücre ilişkili genlerin mRNA ekspresyonlarına etkisine bakılmıştır. Ayrıca ekspresyonu artan ve azalan miR-105-5p'nin hücrelerde gerçekleşen koloni oluşturma ve apoptoz olaylarına etkisi de incelenmiştir.

MiR-105-5p ekspresyonunun arttırılması durumunda akciğer, meme ve rahim ağzı kanserlerinin hücre proliferasyonunda anlamlı bir baskılanma gerçekleşmiştir. Bu durum miR-105-5p ekspresyonunun baskılanması koşulunda ise tam tersi bir etki göstermiş ve kanserli hücreler artmıştır. Sonuçlar bize miR-105-5p'nin bu kanserlerde tümör supressör olarak görev aldığını ve hedefe yönelik tedavi arayışlarında özel bir role sahip olabileceğini göstermektedir. Her ne kadar Pardini B ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar, bazı miRNA'ların fazla eksprese edilmesinin servikal karsinogenezle bağlantılı olduğunu, inhibe edilmesinin ise tedavi seçeneği olduğunu göstermiş olsa da bu durum miR-105-5p'yi kapsamamaktadır. Bulgular kısmında şekil 4.3'da gösterildiği gibi ekspresyonu artan miR-105-5p HeLa hücrelerinin proliferasyonunda baskılanmaya sebep olmaktadır. Bu durum A549 ve MCF7 hücrelerinde de aynı şekilde gerçekleşmiştir (bkz; Şekil 4.1, Şekil 4.2). MiRNA'ların kanser dokularında, normal dokulara nazaran özellikle az miktarda bulunduğu ve karsinogenezde miRNA'nın baskılandığına dair çalışmalar (Lu J ve ark, 2005, Rosenfeld ve ark, 2005), bizim bulduğumuz bulgular ile paralel ilerlemiştir.

Proliferasyonu baskılayan miR-105-5p'nin aynı etkiyi koloni oluşturma özelliklerinde de gösterip göstermeyeceğini anlayabilmek amacıyla kurulan koloniformasyon deneyinden de benzer sonuçlar alınmıştır. Tahmin edildiği gibi her üç hücre hattında da miR-105-5p'nin varlığı kanserli hücrelerin koloni

oluşturma özelliğini baskılamıştır. Yine miR-105-5p ekspresyonu azaltıldığında ters orantılı bir şekilde hücrelerin koloni oluşturma özelliğinde kontrol grubuna oranla belirgin bir artış gözlemlenmiştir.

Diziye özgü bir transkripsiyon faktörü olan P53, genomik hasar karşısında hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesindeki kritik rolü nedeniyle genomun koruyucusu olarak adlandırılmaktadır. En çok çalışılan tümör baskılayıcıdır ve insan kanserlerinin neredeyse %50'sinde P53 mutasyonu vurgulanır (Chen F ve ark, 2010, Vousden ve ark, 2011). P53 geni, A549 ve MCF7 hücrelerinde miR-105-5p ekspresyonundan sonra artış göstermiştir ve bu durum tümör supressör olarak görev alan P53 için anlamlı bir artıştır. MiR-105-5p, hücre döngüsü durmasını, apoptozu ve yaşlanmayı teşvik eder. MiR-105-5p'ye bağlı olarak P53, in vitro bir şekilde genotoksik stres sonrasında indüklenmiştir. Başka bir yaklaşımla miRNA'ların yakınında DNA dizisinde P53 bağlayıcı elementlerin aranması, miR-105-5p'yi P53 ile düzenleme için iyi bir aday olarak tanımlamıştır. Bazı çalışmalar (Feng ve ark, 2011; Le ve ark, 2009) bazı miRNA'ların tümörde yüksek ekspresyon sergileyerek P53'ün 3'UTR'sine bağlandığını ve P53 seviyesini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Fakat miR-105-5p için aynı durum söz konusu değildir. Öte yandan E6 onko-proteinine bağlı P53 bozulma yolunun aktif olduğu servikal kanserde (Hengstermann ve ark, 2001), zaten mutasyona uğramış P53 miR-105-5p ekspresyonu ile birlikte inhibe olmuş tümör baskılayıcı özelliği gösterememiştir. MiR-105-5p'nin inhibe olması ise mutasyonlu P53'ü arttırmıştır ve P53 servikal kanserde onkogen görevini üstlenmiştir. Başka bir bakış açısıyla bakıldığında miR-105-5p ekspresyonu veya inhibisyonu HeLa hücrelerinde zaten mutasyona uğrayıp onkogen görevi alan P53'e bir etki göstermemiştir diyebiliriz. Yani normalde genomu korumakla görevli P53 geninin miR-105-5p ile birlikte aktive olup kanser hücrelerini apoptoza götürmesi beklenirken bu durum rahim ağzı kanseri hücrelerinde gerçekleşmemiştir.

P53 geni ile birlikte işbirliği yapan ve çekirdekteki lokalizasyonuna göre tümör baskılayıcı veya onkogen görevi görebilen P21 geninin aşağı regüle olması

P53 geni gibi kötü prognozla ilişkili olabilmektedir (Huang ve ark, 2014; Marchetti ve ark, 1996; Elledge ve ark, 1998). Bu çalışmada da miR-105-5p ekspresyonunun arttırıldığı durumda P21, akciğer ve rahim ağzı kanserlerinde aşağı regüle olmuştur. MiR-105-5p ekspresyonunun inhibe edildiği durumda yukarı regüle olarak onkogen olarak görev görmüştür. MiR-105-5p'nin diğer bazı miRNA'lar gibi P21 genine 3'UTR yoluyla bağlandığı ve P21'i aşağı regüle ettiği sonucu literatürdeki başka bir çalışma ile uyum içerisinde ilerlemiştir (Jung ve ark, 2010). Ayrıca P53 kodon 72 ve P21 kodon 31'de polimorfizmler oluştuğunda her iki geninde serviks kanserinde onkogen görevi üstlenmesi (Jiang ve ark, 2010), iki genin uyum içerisinde çalıştığını bir kez daha kanıtlamaktadır. P53 ile düzenlenen P21, MCF7 hücrelerinde miR-105-5p ve P53'ün ekspresyonunun fazla olduğu koşulda yukarı regüle edilmiş ve tümör supressör görevini almıştır. Bunun sebebinin, akciğer ve rahim ağzı kanserlerinde Ras proto-onkogeni tarafından kodlanan P21'in mutasyona uğramış olması ve miR-105-5p mikroRNA'sının bu durumu değiştirmemesi olarak yorumlanabilmektedir. Fakat meme kanserinde miR-105-5p varlığında durum değişmiş ve P21, hücre döngüsünü düzenleme rolünü başarı ile üstlenmiştir.

Daha önceki çalışmalarında gösterdiği gibi (Novak ve ark, 2020, Jia ve ark, 2021, Chhabra ve ark, 2018), SOX2 doğrudan ya da dolaylı olarak tümör oluşumuna katkıda bulunmakta ve metastaz, göç, proliferasyon gibi kanser hücresi özelliklerini olumlu yönde etkilemektedir. Ayrıca kanser kök oluşumunu teşvik etmektedir. Bu bilgiler ışığında yaptığımız RT-PCR sonucunda aldığımız sonuçlar önceki bulgular ile benzerdir. Onkogen görevi gören SOX2 geni miR-105-5p ekspresyonunun azaldığı koşullarda MCF7 ve HeLa hücre hatlarında yüksek derecede artmış ve kanser hücrelerinin azaldığı mimic koşulunda ise anlamlı ölçüde baskılanmıştır. Fakat aynı sonucu almak istediğimiz A549 hücre hattında beklenenin aksine her iki koşulda da SOX2 ekspresyonları aşağı yönde regüle olarak miR-105-5p'nin ekspresyonu veya inhibisyonu bu gen üzerinde herhangi bir etki yaratmamıştır.

HTERT indüksiyonu, telomerleri stabilize ederek malign dönüşüme katkıda bulunduğu, göç, metastaz, anjiyogenez ve proliferasyon gibi süreçlerde rol oynadığı, böylelikle kanser hücresi büyümesini desteklediği belirtilmiştir (Liu ve ark, 2013; Saha ve ark, 2017). Akciğer, meme ve rahim ağzı kanserleri de dahil olmak üzere bir çok kanserde kötü prognoz ile ilişkisi belirtilen hTERT'i, belirtilen diğer birçok özelliğinden dolayı hedeflemek anlamlı bir tedavi seçeneği olmaktadır. Ayrıca bazı miRNA'ların hTERT'i hedefleyerek in vivo ve in vitro anlamda tümör büyümesini baskıladığı görülmüştür (Zhou ve ark, 2016). Yapılan bu çalışmada da A549 ve HeLa hücre hatlarında miR-105-5p varlığı hTERT'i hedefleyerek hücre proliferasyonunu durdurmuştur. Mimic koşulunda inhibitör koşuluna oranla daha fazla eksprese olan hTERT, miR-105-5p/hTERT ağının akciğer ve rahim ağzı kanserlerinde tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü gözler önüne sermektedir. Fakat bu durum meme kanseri hücre hattı olan MCF7 için geçerli olmamıştır. HTERT, MCF7 hücre hattının her iki koşulunda da aşağı yönde regüle olmuştur. Yani miR-105-5p meme kanserinde hTERT geninde herhangi bir etki göstermemiştir.

CD133-pozitif olan hücrelerin kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma özelliklerine bakılarak kanser kök hücresi olduğu söylenebilmektedir. Diğer kanser kök hücreleri gibi CD133'de metastaz ve proliferasyon gibi olaylarda görev almaktadır. Bunlara ek olarak kemoterapi ilaçları ve radyasyon gibi terapötik direnci arttırmakla görevlidirler (Hemmati ve ark, 2003). Hücrelerde onkogen görevi üstlenerek kötü prognozla ilişkilidirler. Akt, FAK, Wnt gibi sinyal yollarını kullanarak hücre göçüne sebep olurlar. Ayrıca NF-kB, IL-1β gibi sinyal yollarını kullanarak ve slug ve N-cadherin ile bağlantı kurarak EMT'yi indüklerler (Şekil 1.3). HeLa ve A549 hücre hatlarında yapılan RT-PCR'da CD133 geni inhibitör koşulunda fazla eksprese olurken mimic koşulunda inhibe olmuş ve bu kanserlerde onkogen olarak görev aldığı kanıtlanmıştır. Bu sonuçtan hareketle onkogen olarak görev alan CD133'ün, A549 ve HeLa hücre hatlarında miR-105-5p ekspresyonunun arttığı mimic koşulunda baskılanmış olması kullanılan

miRNA'nın kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü ve kök hücre benzeri özellik gösteren genleri baskılayarak sonsuz bölünmeyi durdurabileceği düşüncesine varabiliriz.

Metastaz ile ilişkili ve tümör baskılayıcı genlerden biri olan E-cadherin yokluğunda, hücre yapışma kaybı ve hareketliliğinde artış meydana geldiği bilgisi literatürde mevcuttur (Na ve ark, 2020, Christofori ve ark, 1999). A549 hücrelerinde miR-105-5p varlığında E-cadherin salgısı artmıştır ve bu da E-cadherinin miR ile birlikte aktive olup tümör baskılayıcı gen özelliğini göstermesiyle açıklanabilir. MCF7 ve HeLa hücre hattında ise miR-105-5p inhibisyonunda E-cadherin artarak onkogen görevini üstlenmiştir. Bu sonuçlar meme ve rahim ağzı kanserlerinde miR-105-5p'nin yokluğunda, E-cadherinin mutasyona uğradığı sonucunu düşündürtmektedir.

MiR-105-5p varlığında A549 ve HeLa'da Snail geni baskılanmaktadır. MiR-105-5p ekspresyonunun arttığı koşullarda hücrelerin apoptoza gittiği daha önce de tartışılmıştır ve bu durumda kanserde onkogen görevi gören (Wang ve ark, 2013) Snail geninin baskılanması bizim için tutarlı ve anlamlı bir sonuç olmuştur. MiR-105-5p inhibe olduğunda ise Snail üretimi ile birlikte kanserli hücreler de artmaktadır. Bu durum Snail geninin miR-105-5p yokluğunda onkogen olarak görev aldığını göstermektedir. Bu sonuçlar, akciğer ve rahim ağzı kanserlerinde Snail'in baskılanması kanserin başlamasının ve istilasının tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olduğu düşüncesi ile uyumlu olduğunu göstermektedir (Hung ve ark, 2009; Mani ve ark, 2008; Zhao ve ark, 2013). MCF7 hücrelerinin Snail geninde ise miR-105-5p herhangi bir etki göstermemiştir.

Literatüre göre, Snail'in E-cadherin inhibisyonunu baskılayarak EMT'yi indüklediği (Cano ve ark, 2000), ayrıca kanserde Snail genine bağlı EMT'nin P53 ve bazı miRNA'lar tarafından düzenlendiği (Kim ve ark, 2011) buna bağlı olarak A549 hücrelerinin apoptoza gittiği bilgisi ile bu çalışma sonuçları paralellik göstermektedir. Onkogen olan Snail'in miR-105-5p varlığına bağlı olarak azalması

ve bu azalışın E-cadherin'i ve P53'ü arttırması bizlere, Snail/E-cadherin/P53/miR-105-5p ağının düzenli ilerleyişinin akciğer karsinomunu azalttığını göstermektedir.

MiRBase ve WikiData veri tabanlarından alınan bilgilere göre miR-105-5p, akciğer kanserinde mutasyona uğrayan EGFR, ALK ve KRAS (Kate ve ark, 2020) genlerini doğrudan hedefleyerek etkilemektedir. Ayrıca Bcl-2 ile ilişkili; BNIP2/3, BAK1 ve BCL2L2/11 genlerini de doğrudan hedefleyerek Bcl-2 sinyal yolunu dolaylı olarak etkilemektedir. Wu ve arkadaşlarının 2014'de yaptığı çalışmada elde ettiği verilere göre; Bcl-2'nin baskılanması ilaç akış mekanizmasını inhibe etmekte ve akciğer kanserinde kemoterapide kullanılan bir ilaç olan sisplatin duyarlılığını arttırmaktadır. MiR-105-5p'nin dolaylı olarak Bcl-2'yi etkilemesinden yola çıkılarak ilaç akış mekanizmasına ve sisplatin duyarlılığına olan etkisinin araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Aynı şekilde meme kanserinde sıklıkla mutasyona uğrayan TP53, BRIP1 (Sheikh ve ark, 2015) ve PIK3CA (Jiang ve ark, 2018) genlerini doğrudan hedefleyerek etkilemektedir. Öte yandan meme kanseri geni olan BRCA1/2 genleri ile ilişkili BRCC3 ve BARD1'i doğrudan hedeflemekte ve BRCA1/2 genlerini dolaylı yoldan etkilemektedir. Ayrıca BRCC3 geni de P53 ile bağlantılı olduğundan dolayı miR-105-5p P53'ü dolaylı yoldanda etkiliyor diyebiliriz. Meme kanserinde olduğu gibi rahim ağzı kanserinde de mutasyona uğrayan P53 ve PIK3CA (Jiang ve ark, 2018), miR-105-5p'nin hedef genleri arasında yer almakta ve etkilenmektedir. He ve arkadaşlarının 2016'da yaptığı çalışmaya paralel olarak miR-105-5p; kanserin ayırt edici özelliklerine katkıda bulunan TGFβ1, MAPK1 ve MAPK14'ü doğrudan hedefleyerek bu yollarda değişikliğe sebep olmaktadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Araştırmamızda, farklı ekspresyonlarda olan miR-105-5p'nin meme, akciğer ve rahim ağzı kanserlerine ve bu kanserlerde eksprese edilen apoptoz ve kök hücre ilişkili genlerin üzerindeki etkisini inceleyebilmek amacıyla; hücre kültürü, proliferasyon, koloniformasyon, RNA izolasyonu, RT-PCR, protein izolasyonu/BCA ve western blotting analizleri yapılmıştır. Çıkan sonuçlar Powerpoint, Excel ve GraphPad Prism 9 programları kullanılarak belgelenmiştir.

Çalışmada elde edilen bulgulara göre, her üç hücre hattında da miR-105-5p'nin ekspresyonunun artması proliferasyonu ve hücrelerin koloni oluşturma özelliklerini baskılamış, ekspresyonunun azalması bu özellikleri arttırmıştır. Bu sebeple miR-105-5p bu hücre hatlarında tümör supressör olarak görev alıp tedavi seçeneği olarak kullanılabilmektedir. MiR-105-5p; kök hücre ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyonunu, bu genlerde miR-105-5p ekspresyonunu etkileyebilmektedir. Akciğer kanserinde miR-105-5p yokluğunda; P21, CD133 ve Snail onkogen olarak görev alırken; miR-105-5p varlığında; P53, hTERT ve E-cadherin tümör baskılayıcı olarak görev almıştır. SOX2 geninde ise herhangi bir etki göstermemiştir. Meme kanserinde; miR105-5p yokluğunda SOX2 ve E-cadherin onkogen görevini üstlenmiş, varlığında ise P53 ve P21 genleri tümör baskılayıcı gen görevini üstlenmiştir. Snail ve hTERT genlerinde miR-105-5p bir etki göstermemiştir. Rahim ağzı kanseri hücrelerinde ise; miR-105-5p eksprese olduğunda hTERT tümör baskılayıcı etki gösterirken, miR-105-5p inhibe olduğunda P53, P21, SOX2, CD133, E-cadherin ve Snail genleri onkogen etki göstermiştir.

5.2. Öneriler

- MiRNA'ların mRNA'yı hedefleme mekanizmasının daha derin bir şekilde araştırılıp biyoinformatik analizlerle doğrulanması gerekmektedir.
- İn vivo deneyler ile bulunan bulgular desteklenilmesi gerektiği düşünülmektedir.
- Western blotting deneyleri tekrarlanılmalı ve miRNA'larda kanser kök hücre ilişkili sinyal yolakları araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

Avril-Sassen S, Goldstein LD, Stingl J, Blenkiron C, Le Quesne J, Spiteri I, Karagavriilidou K, Watson CJ, Tavaré S, Miska EA, Caldas C. 2009. Characterisation of microRNA expression in post-natal mouse mammary gland development. BMC Genomics. 10.1186/1471-2164-10-548.

Barshack I, Lithwick-Yanai G, Afek A, Rosenblatt K, Tabibian-Keissar H, Zepeniuk M, Cohen L, Dan H, Zion O, Strenov Y. 2010. MicroRNA expression differentiates between primary lung tumors and metastases to the lung. Pathology. 10.1016/j.prp.2010.03.005.

Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell Press. 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.

Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavaré S, Caldas C, Miska EA. 2007. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. Genome Biol. 10.1186/gb-2007-8-10-r214.

Borzi, C, Calzolari, L, Centonze, G, Milione, M, Sozzi, G. and Fortunato, O. 2017. Mir-660-p53-mir-486 Network: a new key regulatory pathway in lung tumorigenesis. Int. J. Mol. Sci. 10.3390/ijms18010222.

Calin GA, Croce CM. 2006. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer. 10.1038/nrc1997.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci U S A. 10.1073/pnas.0307323101.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. Nat Cell Biol. 10.1038/35000025.

Chen F, Wang W, Deiry W. 2010. Current strategies to target p53 in cancer. Biochemical Pharmacology. 10.1016/j.bcp.2010.04.031.

Chhabra R. 2018. Let-7i-5p, miR-181a-2-3p and EGF/PI3K/SOX2 axis coordinate to maintain cancer stem cell population in cervical cancer. Sci Rep. 10.1038/s41598-018-26292-w.

Christofori G, Semb H. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. Trends Biochem Sci. 10.1016/s0968-0004(98)01343-7.

Cortez M.A, Valdecanas D, Zhang X, Zhan Y, Bhardwaj V, Calin G.A, Komaki R, Giri D.K, Quini C.C, Wolfe T, 2014. Therapeutic delivery of miR-200c enhances radiosensitivity in lung cancer. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. 10.1038/mt.2014.79.

Çelik A, Koşar A, Özçelik N. 2013. MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 20(3):121-127.

Del Vescovo V, Denti MA. 2015. MicroRNA and lung cancer. Adv Exp Med Biol. 10.1007/978-3-319-23730-5_9.

Dong X, Chang M, Song X, Ding S, Xie L, Song X. 2021. Plasma miR-1247-5p, miR-301b-3p and miR-105-5p as potential biomarkers for early diagnosis of non-small cell lung cancer. Thorac Cancer. 10.1111/1759-7714.13800

Dong X, Chang M, Song X, Ding S, Xie L, Song X. 2021. Plasma miR-1247-5p, miR-301b-3p and miR-105-5p as potential biomarkers for early diagnosis of non-small cell lung cancer. Thorac Cancer. 10.1111/1759-7714.13800.

Donnem T, Fenton C.G, Lonvik K, Berg T, Eklo K, Andersen S, Stenvold H, Al-Shibli K, Al-Saad S, Bremnes R.M. 2012. MicroRNA signatures in tumor tissue related to angiogenesis in non-small cell lung cancer. PLoS ONE. 10.1371/journal.pone.0029671.

Elledge RM, Allred DC. 1998. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 10.1023/a:1006163101948.

Elledge RM, Allred DC. 1998. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 10.1023/a:1006163101948.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell Death Differ. 10.1038/sj.cdd.4402283.

Feng Z, Zhang C, Wu R, Hu W. 2011. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. J Mol Cell Biol. 10.1093/jmcb/mjq040.

Forrest, A. R, Kanamori-Katayama, M, Tomaru, Y, Lassmann, T, Ninomiya, N, Takahashi, Y, De Hoon, M. J, Kubosaki, A, Kaiho, A, Suzuki, M. 2010. Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. Leukemia. 10.1038/leu.2009.246

Gagnon KT, Li L, Chu Y, Janowski BA, Corey DR. 2014. RNAi factors are present and active in human cell nuclei. Cell Press. 10.1016/j.celrep.2013.12.013.

Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. 2006. MicroRNA expression and function in cancer. Trends Mol Med. 12(12):580-7.

Git A, Spiteri I, Blenkiron C, Dunning MJ, Pole JC, Chin SF, Wang Y, Smith J, Livesey FJ, Caldas C. 2008. PMC42, a breast progenitor cancer cell line, has normal-like mRNA and microRNA transcriptomes. Breast Cancer Res. 10.1186/bcr2109.

Git A, Spiteri I, Blenkiron C, Dunning MJ, Pole JC, Chin SF, Wang Y, Smith J, Livesey FJ, Caldas C. PMC42, a breast progenitor cancer cell line, has normal-like mRNA and microRNA transcriptomes. Breast Cancer Res. 10.1186/bcr2109.

Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Gariglio P. 2013. Deregulation of the miRNAs expression in cervical cancer: human papillomavirus implications. Biomed Res Int. 10.1155/2013/407052.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. Cell. 10.1016/j.cell.2005.10.022.

Güre AO, Stockert E, Scanlan MJ, Keresztes RS, Jäger D, Altorki NK, Old LJ, Chen YT. 2000 Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 10.1073/pnas.97.8.4198.

Gyoba J, Shan S, Roa W, Bedard E.L. 2016. Diagnosing Lung Cancers through Examination of Micro-RNA Biomarkers in Blood, Plasma, Serum and Sputum: A Review and Summary of Current Literature. Int. J. Mol. Sci. 10.3390/ijms17040494.

Han Y, Li H. 2018. MiRNAs as biomarkers and for the early detection of non-small cell lung cancer (NSCLC). J. Thorac. Dis. 10.21037/jtd.2018.05.32.

He Y, Lin J, Ding Y, Liu G, Luo Y, Huang M. 2016. A systematic study on dysregulated microRNAs in cervical cancer development. Int J Cancer. 10.1002/ijc.29618.

Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. 2003. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 10.1073/pnas.2036535100.

Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. 2001. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 10.1073/pnas.98.3.1218.

Hill M, Tran N. 2021. MiRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. Dis Model Mech. 10.1242/dmm.047662.

Hill, M. and Tran, N. 2018. MicroRNAs regulating microRNAs in cancer. Trends Cancer. 10.1016/j.trecan.2018.05.002.

Hu X, Schwarz JK, Lewis JS Jr, Huettner PC, Rader JS, Deasy JO, Grigsby PW, Wang X. 2010. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. Cancer Res. 10.1158/0008-5472.CAN-09-3289.

Huang Y, Wang W, Chen Y, Huang Y, Zhang J, He S, Tan Y, Qiang F, Li A, Røe O.D. 2014. The opposite prognostic significance of nuclear and cytoplasmic p21 expression in resectable gastric cancer patients. J. Gastroenterol. 10.1007/s00535-013-0900-4.

Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ. 2009. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. Thorax. 10.1136/thx.2009.115691.

Hunt NC, Douglas-Jones AG, Jasani B, Morgan JM, Pignatelli M. 1997. Loss of E-cadherin expression associated with lymph node metastases in small breast carcinomas. Virchows Arch. 10.1007/BF01092751.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res. 10.1158/0008-5472.CAN-05-1783.

Javed S, Sharma BK, Sood S, Sharma S, Bagga R, Bhattacharyya S, Rayat CS, Dhaliwal L, Srinivasan R. 2018. Significance of CD133 positive cells in four novel HPV-16 positive cervical cancer-derived cell lines and biopsies of invasive cervical cancer. BMC Cancer. 10.1186/s12885-018-4237-5.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. 2009. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin. 10.3322/caac.20006.

Jeon HM, Sohn YW, Oh SY, Kim SH, Beck S, Kim S. 2011. ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9*-mediated suppression of SOX2. Cancer Res. 10.1158/0008-5472.CAN-10-3340.

Jia Y, Zhao J, Yang J, Shao J, Cai Z. 2021. MiR-301 regulates the SIRT1/SOX2 pathway via CPEB1 in the breast cancer progression. Mol Ther Oncolytics. 10.1016/j.omto.2021.03.007.

Jiang P, Liu J, Li W, Zeng X, Tang J. 2010. Role of p53 and p21 polymorphisms in the risk of cervical cancer among Chinese women. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 10.1093/abbs/gmq069.

Jiang W, He T, Liu S, Zheng Y, Xiang L, Pei X, Wang Z, Yang H. 2018. The PIK3CA E542K and E545K mutations promote glycolysis and proliferation via induction of the β-catenin/SIRT3 signaling pathway in cervical cancer. J Hematol Oncol. 10.1186/s13045-018-0674-5.

Jung YS, Chen X, Qiun Y. 2010 Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. Cellular Signalling. doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.013.

Kate Y, Syed MP, Doshi A, Patil S, Kumar D. 2020. Atrial Mass Versus Thrombus. Balkan Med J. 10.4274/balkanmedj.galenos.2019.2019.11.79.

Ke Y, Zhao W, Xiong J, Cao R. 2013. MiR-149 Inhibits Non-Small-Cell Lung Cancer Cells EMT by Targeting FOXM1. Biochem. Res. Int. 10.1155/2013/506731.

Kim NH, Kim HS, Li XY, Lee I, Choi HS, Kang SE, Cha SY, Ryu JK, Yoon D, Fearon ER, Rowe RG, Lee S, Maher CA, Weiss SJ, Yook JI. A. 2011. p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. J Cell Biol. 10.1083/jcb.201103097.

Kuninty P.R, Schnittert J, Storm G, Prakash J. 2016. MicroRNA Targeting to Modulate Tumor Microenvironment. Front Oncol. 10.3389/fonc.2016.00003.

Kunita A, Morita S, Irisa T.U, Goto A, Niki T, Takai D, Nakajima J, Fukayama M. 2018. MicroRNA-21 in cancer-associated fibroblasts supports lung adenocarcinoma progression. Sci. Rep. 10.1038/s41598-018-27128-3.

Lai, E. C, Wiel, C. and Rubin, G. M. 2004. Complementary miRNA pairs suggest a regulatory role for miRNA:miRNA duplexes. RNA. 171-175. 10.1261/rna.5191904

Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, Xie H, Zhou B, Korzh V, Lodish HF, Lim B. 2009. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. Genes. 10.1101/gad.1767609.

Lee J, Park M, Ko Y, Kim B, Kim O, Hyun H, Kim D, Sohn H, Moon YL, Lim W. 2017. Ectopic overexpression of CD133 in HNSCC makes it resistant to commonly used chemotherapeutics. Tumour Biol. 10.1177/1010428317695534.

Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, Hwang SY, Kim WY, Kim TJ, Lee JH, Kim BG, Bae DS. 2008. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. Clin Cancer Res. 10.1158/1078-0432.CCR-07-1231.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. EMBO J. 10.1093/emboj/cdf476.

Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Müller M, Römermann D, Länger F, Kreipe H. 2008. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. J Pathol. 10.1002/path.2251.

Leiphrakpam P.D, Brattain M.G. Black, Wang J. 2017. TGFβ and IGF1R signaling activates protein kinase A through differential regulation of ezrin phosphorylation in colon cancer cells. JBC. 10.1074/jbc.RA117.001299

Li B, Xu WW, Han L, Chan KT, Tsao SW, Lee NPY, Law S, Xu LY, Li EM, Chan KW, Qin YR, Guan XY, He QY, Cheung ALM. 2017. MicroRNA-377 suppresses initiation and progression of esophageal cancer by inhibiting CD133 and VEGF. Oncogene. 10.1038/onc.2017.29.

Li J, Guan J, Long X, Wang Y, Xiang X. 2016. Mir-1-mediated paracrine effect of cancer-associated fibroblasts on lung cancer cell proliferation and chemoresistance. Oncol. Rep. 10.3892/or.2016.4714.

Li J, Ping Z, Ning H. 2012. MiR-218 impairs tumor growth and increases chemo-sensitivity to cisplatin in cervical cancer. Int J Mol Sci. 10.3390/ijms131216053.

Li J. Zhang N. Zhang R. Sun L. Yu W. Guo W. 2017. CDC5L Promotes hTERT Expression and Colorectal Tumor Growth. Cell. Physiol. Biochem. 10.1159/000475916.

Li J.H, Luo N, Zhong M.Z, Xiao Z.Q, Wang J.X, Yao X.Y, Peng Y, Cao J. 2016. Inhibition of microRNA-196a might reverse cisplatin resistance of A549/DDP non-small-cell lung cancer cell line. Tumour Biol. 10.1007/s13277-015-4017-7.

Liu K, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, Liu F, Que J, Lan X. 2013. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. Cellular Signalling. 10.1016/j.cellsig.2013.02.013.

Liu Q, Li JG, Zheng XY, Jin F, Dong HT. 2009. Expression of CD133, PAX2, ESA, and GPR30 in invasive ductal breast carcinomas. Chin Med J (Engl). 122(22):2763-9. PMID: 19951611.

Liu Z, Li Q, Li K, Chen L, Li W, Hou M, Liu T, Yang J, Lindvall C, Björkholm M, Jia J, Xu D. 2013. Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. Oncogene. 10.1038/onc.2012.441.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature. 10.1038/nature03702.

Ma L, Weinberg RA. 2008. Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. Trends Genet. 10.1016/j.tig.2008.06.004.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell. 10.1016/j.cell.2008.03.027.

Mao G, Liu Y, Fang X, Liu Y, Fang L, Lin L, Liu X, Wang N. 2015. Tumor-derived microRNA-494 promotes angiogenesis in non-small cell lung cancer. Angiogenesis. 10.1007/s10456-015-9474-5.

Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Bertacca G, Chella A, Merlo G, Angeletti C.A, Dalla Palma P, 1996. p21 RNA and protein expression in non-small cell lung carcinomas: Evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation. Oncogene. 12(6):1319-24. PMID: 8649834.

Marchetti A, Pellegrini C, Buttitta F, Falleni M, Romagnoli S, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, Angeletti CA, Roncalli M, Coggi G, Bosari S. 2002. Prediction of survival in stage I lung carcinoma patients by telomerase function evaluation. Lab Invest. 10.1097/01.lab.0000017165.26718.60.

Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, Fedele V, Ginzinger D, Getts R, Haqq C. 2006. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. Mol Cancer. 10.1186/1476-4598-5-24.

Montani F, Marzi M.J, Dezi F, Dama E, Carletti R.M, Bonizzi G, Bertolotti R, Bellomi M, Rampinelli C, Maisonneuve P. 2015. MiR-Test: A blood test for lung cancer early detection. J. Natl. Cancer Inst. 10.1093/jnci/djv063.

Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM. 2020. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. Proc Natl Acad Sci U S A. 10.1073/pnas.1918167117.

Nadal E, Zhong J, Lin J, Reddy R.M, Ramnath N, Orringer M.B, Chang A.C, Beer D.G, Chen G.A. 2014. MicroRNA Cluster at 14q32 Drives Aggressive Lung Adenocarcinoma. Clin. Cancer Res. 10.1158/1078-0432.CCR-13-3348.

Nieto MA. 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. Nat Rev Mol Cell Biol. 10.1038/nrm757.

Novak D, Hüser L, Elton JJ, Umansky V, Altevogt P, Utikal J. 2020. SOX2 in development and cancer biology. Semin Cancer Biol. 10.1016/j.semcancer.2019.08.007.

Otsubo T, Akiyama Y, Hashimoto Y, Shimada S, Goto K, Yuasa Y. 2011. MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and contributes to gastric carcinogenesis. PLoS One. 10.1371/journal.pone.0016617

Pardini B, De Maria D, Francavilla A, Di Gaetano C, Ronco G, Naccarati A. 2018. MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: a systematic review. BMC Cancer. 10.1186/s12885-018-4590-4.

Peng J, Qi S, Wang P, Li W, Song L, Liu C, Li F. 2015. Meta-analysis of downregulated E-cadherin as a poor prognostic biomarker for cervical cancer. Future Oncology. 10.2217/fon.15.332.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. 2000 Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 10.1038/35021093.

Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. 2006. Polymorphisms in the p53 pathway. Oncogene. 10.1038/sj.onc.1209367.

Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL. 2013. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. Elsevier Open Access. 10.1016/j.lungcan.2013.07.025.

Pillai RS. 2005. MicroRNA function: multiple mechanisms fora tiny RNA. RNA. 10.1261/rna.2248605.

Romanov VS, Rudolph KL. 2016. p21 shapes cancer evolution. Nat Cell Biol. 10.1038/ncb3382.

Rosenfeld N, Aharonov R, MeiriE, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M. 2008. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. Nat Biotech nol. 26(4):462-9.

Saha D, Singh A, Hussain T, Srivastava V, Sengupta S, Kar A, Dhapola P, Dhople V, Ummanni R, Chowdhury S. 2017. Epigenetic suppression of human telomerase (hTERT) is mediated by the metastasis suppressor NME2 in a G-quadruplex-dependent fashion. J Biol Chem. 10.1074/jbc.M117.792077.

Saydam F, Değirmenci İ, Güneş H. 2011. MikroRNA'lar ve kanser. Dicle Tıp Dergisi. 10.5798/diclemedj.0921.2012.04.0184

Schnitt SJ. 2010. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. Mod Pathol. 10.1038/modpathol.2010.33.

Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell. 10.1016/s0092-8674(03)00759-1.

Shai A, Brake T, Somoza C, Lambert PF. 2007. The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. Cancer Res. 10.1158/0008-5472.CAN-06-3344.

Sheikh A, Hussain SA, Ghori Q, Naeem N, Fazil A, Giri S, Sathian B, Mainali P, Al Tamimi DM. 2015. The spectrum of genetic mutations in breast cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 10.7314/apjcp.2015.16.6.2177.

Shimono Y, Mukohyama J, Nakamura S, Minami H. 2015. MicroRNA regulation of human breast cancer stem cells. J Clin Med. 10.3390/jcm5010002.

Shu J, Wang L, Han F, Chen Y, Wang S, Luo F. 2019. BTBD7 Downregulates E-Cadherin and Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer. Biomed Res Int. 10.1155/2019/5937635.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2015. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin. 10.3322/caac.21254.

Skryzpek K, Majka M. 2020. Interplay among SNAIL Transcription Factor, MicroRNAs, Long Non-Coding RNAs, and Circular RNAs in the Regulation of Tumor Growth and Metastasis. Cancers. 10.3390/cancers12010209.

Sozzi G, Boeri M, Rossi M, Verri C, Suatoni P, Bravi F, Roz L, Conte D, Grassi M, Sverzellati N. 2014. Clinical utility of a plasma-based miRNA signature classifier within computed tomography lung cancer screening: A correlative MILD trial study. J. Clin. Oncol. 10.1200/JCO.2013.50.4357.

Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S. 2010. MicroRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. Annu Rev Biomed Eng. 10.1146/annurev-bioeng-070909-105314.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 10.3322/caac.21660.

Tan HX, Wang Q, Chen LZ, Huang XH, Chen JS, Fu XH, Cao LQ, Chen XL, Li W, Zhang LJ. 2010. MicroRNA-9 reduces cell invasion and E-cadherin secretion in SK-Hep-1 cell. Med Oncol. 10.1007/s12032-009-9264-2.

Vincent K, Pichler M, Lee G.W, Ling H. 2014. MicroRNAs, genomic instability and cancer. Int. J. Mol. Sci. 10.3390/ijms150814475.

Vincent K, Pichler M, Lee G.W, Ling H. 2014. MicroRNAs, genomic instability and cancer. International Journal of Molecular Sciences. 10.3390/ijms150814475.

Vousden KH, Prives C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. Cell. 10.1016/j.cell.2009.04.037.

Wang X, Wang HK, Li Y, Hafner M, Banerjee NS, Tang S, Briskin D, Meyers C, Chow LT, Xie X, Tuschl T, Zheng ZM. 2014. MicroRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. Proc Natl Acad Sci U S A. 10.1073/pnas.1401430111.

Wang X, Wang HK, McCoy JP, Banerjee NS, Rader JS, Broker TR, Meyers C, Chow LT, Zheng ZM. 2009. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. RNA. 10.1261/rna.1442309.

Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. 2013. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. Curr Cancer Drug Targets. 10.2174/15680096113136660102

Wang Y, Wang L, Chen C, Chu X. 2018. New insights into the regulatory role of microRNA in tumor angiogenesis and clinical implications. Mol Cancer. 10.1186/s12943-018-0766-4.

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. 2005. Breast cancer metastasis: Markers and models. Nat Rev Cancer. 10.1038/nrc1670.

Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI. 2007. MicroRNAs and cancer. Br J Surg. 10.1002/bjs.5673.

Wu Y, Guo L, Liu J, Liu R, Liu M, Chen J. 2014. The reversing and molecular mechanisms of miR-503 on the drug-resistance to cisplatin in A549/DDP cells. 2014. Zhongguo Fei Ai Za Zhi. 10.3779/j.issn.1009-3419.2014.01.01.

Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. 2009. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. CellPress. 10.1016/j.cell.2009.02.038

Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, Itesako T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Seki N. 2013. Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting focal adhesion pathways in cervical squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 10.3892/ijo.2013.1851.

Yang L, Yang J, Li J, Shen X, Le Y, Zhou C, Wang S, Zhang S, Xu D, Gong Z. 2015. MircoRNA-33a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis and could be a prognostic marker in non-small cell lung cancer. Sci. Rep. 10.1038/srep13677.

Yu F, Yao H, Zhu P. 2007. Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. Cell. 10.1016/j.cell.2007.10.054.

Yu S, Qin X, Chen T, Zhou L, Xu X, Feng J. 2017. MicroRNA-106b-5p regulates cisplatin chemosensitivity by targeting polycystic kidney disease-2 in non-small-cell lung cancer. Anti-Cancer Drugs. 10.1097/CAD.0000000000000524.

Yukishige Y, Teruhiko Y, Kenshi H. 2011. P53 Gene Mutations in Gastric Cancer Metastases And in Gastric Cancer Cell Lines Derived from Metastases. Canser Research. 1;51(21):5800

Zamore PD, Haley B. 2005. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. Science. 2;309(5740):1519-24. 10.1126/science.1111444.

Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M. 2001. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. Cancer Res. PMID: 11212257

Zeng Y, Cullen BR. 2013. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. RNA.10.1261/rna.2780503.

Zhang B, Chen J, Ren Z, Chen Y, Li J, Miao X, Song Y, Zhao T, Li Y, Shi Y, Ren D, Liu J. 2013. A specific miRNA signature promotes radioresistance of human cervical cancer cells. Cancer Cell Int. 10.1186/1475-2867-13-118.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. 2007. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol. 10.1016/j.ydbio.2006.08.028.

Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. 2002. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. The Embo Journal. 21:5875- 5885.

Zhang J, Liu J, Liu Y, Wu W, Li X, Wu Y, Chen H, Zhang K, Gu L. 2015. MiR-101 represses lung cancer by inhibiting interaction of fibroblasts and cancer cells by down-regulating CXCL12. Biomed. Pharmacother. 10.1016/j.biopha.2015.08.013.

Zhang J, Wu W, Xu S. 2017. MicroRNA-105 inhibits human glioma cell malignancy by directly targeting SUZ12. Tumour Biol. 1010428317705766.

Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G. 2006. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 10.1073/pnas.0508889103.

Zhang R, Liu C, Niu Y, Jing Y, Zhang H, Wang J, Yang J, Zen K, Zhang J, Zhang C.Y. 2016. MicroRNA-128-3p regulates mitomycin C-induced DNA damage response in lung cancer cells through repressing SPTAN1. Oncotarget. 10.18632/oncotarget.12300.

Zhao C, Ma ZG, Mou SL, Yang YX, Zhang YH, Yao WC. 2017. Targeting effect of microRNA on CD133 and its impact analysis on proliferation and invasion of glioma cells. Genet Mol Res. 10.4238/gmr16019281.

Zhao W, Zhou Y, Xu H, Cheng Y, Kong B. 2013. Snail family proteins in cervical squamous carcinoma: Expression and significance. Clinical and Investigative Medicine. 10.25011/cim.v36i4.19956.

Zhao Z, Zhang L, Yao Q, Tao Z. 2015. MiR-15b regulates cisplatin resistance and metastasis by targeting PEBP4 in human lung adenocarcinoma cells. Cancer Gene Ther. 10.1038/cgt.2014.73.

Zhou JY, Zheng SR, Liu J, Shi R, Yu HL, Wei M. 2016. MiR-519d facilitates the progression and metastasis of cervical cancer through direct targeting Smad7. Cancer Cell Int. 10.1186/s12935-016-0298-1.

Zhou N, Fei D, Zong S, Zhang M, Yue Y. 2016. MicroRNA-138 inhibits proliferation, migration and invasion through targeting hTERT in cervical cancer. Oncology Letters. 10.3892/ol.2016.5038.

ÖZGEÇMİŞ

Aylin ÖRS, ilk öğretimini Hayriye Kemal Kusun İlköğretim Okulu'nda, ortaöğretimini ise Enver Kurttepeli Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2015-2016 öğretim yılında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Lisans eğitimine başladı. 2020 yılında lisans eğitimi bittikten sonra 2020-2021 öğretim yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.