

**MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE miR-145-5p UYGULAMASININ SMAD-3 VE SMAD-4
HEDEF GENLERİN İFADESİNE ETKİLERİNİN VALİDASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

AYNURA ALİYEVA

Eskişehir, 2019

**MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE miR-145-5p UYGULAMASININ SMAD-3 VE
SMAD-4 HEDEF GENLERİN İFADESİNE ETKİLERİNİN VALİDASYONU**

Aynura ALİYEVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emel ERGENE

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Mayıs, 2019

*Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1707F460 no.lu proje kapsamında
desteklenmiştir.*

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Aynura ALİYEVA'nın "Meme Kanseri Tedavisinde miR-145-5p Uygulamasının SMAD-3 ve SMAD-4 Hedef Genlerin İfadesine Etkilerinin Validasyonu" başlıklı tezi 09/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı)	:Doç.Dr. Emel ERGENE	
Üye	:Prof.Dr. Miriş DİKMEN	
Üye	:Doç.Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ	

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE miR-145-5p UYGULAMASININ SMAD-3 VE SMAD-4 HEDEF GENLERİN İFADESİNE ETKİLERİNİN VALİDASYONU

Aynura ALİYEVA

Biyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mayıs, 2019

Danışman: Doç. Dr. Emel ERGENE

Bu çalışmada, meme kanserinde baskılandığı Meta-analizle belirlenmiş olan, miR-145-5p tümör baskılayıcı miRNA özgül sentetik mimiği, meme kanserinde metastaz mekanizmasının önlenmesi veya geciktirilmesi amacıyla, transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. “Hi-Perfect Reagent Transfection Agent” yardımıyla hedef hücrenin içine in-vitro olarak transfekte edilmiştir (miRNA replacement therapy). Transfekte edilen miRNA’nın hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücre ölümünü kontrol eden TGF- β sinyal yolağında etkili SMAD-3 ve SMAD-4 gen ürünlerinin (mRNA) ekspresyonlarındaki değişiklik gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) analizi ile belirlenmiştir. Ardından, bu 2 adet hedef genin protein seviyesindeki değişiklikleri görmek için Western Blot analizi yapılmıştır. Ayrıca, uygulanan mimiğin hücrelerel metastaz üzerindeki etkisini göstermek amaçlı göç testi gerçekleştirilmiştir. Mimik uygulama sonrasında hücrelerde kontrole göre göçün durduğu görülmüştür. Aynı zamanda RT-qPCR analizinde mimik uygulanan hücrelerde kontrole göre SMAD-3 ve SMAD-4 gen ürünlerinin ekspresyonlarında azalma saptanmıştır. Son olarak, Western Blot analizinde SMAD-3 protein seviyesinin kontrole kıyasta mimik uygulanan hücrelerde %86 azaldığı, SMAD-4 proteininin ise %100 azaldığı elde edilen bant yoğunluğu analiziyle tespit edilmiştir. Bu da RT-qPCR analizinin sonuçlarını desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, miRNA Yerine Koyma (Replacement) Tedavi, miRNA, miR-145-5p, TGF- β , SMAD-3, SMAD-4, RT-qPCR, Western Blot, mimik transfeksiyonu, Göç testi.

ABSTRACT

VALIDATION OF THE EFFECTS OF miR-145-5p APPLICATION ON THE EXPRESSION OF SMAD-3 AND SMAD-4 TARGET GENES IN BREAST CANCER TREATMENT

Aynura ALIYEVA

Department of Biology

Anadolu University, Graduate School of Sciences, May, 2019

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Emel ERGENE

In this study, miR-145-5p tumor suppressor miRNA specific synthetic mimic, which was determined by Meta-analysis in breast cancer, was transfected to prevent or delay the metastasis mechanism in breast cancer. In-vitro transfected into the target cell by “Hi-Perfect Reagent Transfection Agent” (miRNA replacement therapy). The change in expression of SMAD-3 and SMAD-4 gene products (mRNA) in the TGF- β signaling pathway that control cell proliferation, differentiation and cell death of transfected miRNA was determined by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis. Western Blot analysis was then performed to see changes in the protein level of these target genes. In addition, migration test was performed to show the effect of mimic on cellular metastasis. After the mimic application, migration was stopped according to the control in the cells. Also in the RT-qPCR analysis, the expression of SMAD-3 and SMAD-4 gene products decreased compared to control in mimic transfected cells. Finally, in Western blot analysis, the SMAD-3 protein level was determined by the control band and the SMAD-4 protein was reduced by 86% and the SMAD-4 protein was reduced by 100%. This supports the results of the RT-qPCR analysis.

Keywords: Breast cancer, miRNA Replacement Therapy, miRNA, miR-145-5p, TGF- β , SMAD-3, SMAD-4, RT-qPCR, Western Blot, mimic transfection, Migration test.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini sabırla benimle paylaşan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Emel ERGENE' ye sonsuz teşekkür ederim.

Western Blot analizini yapabilmem için gerekli araç ve gereçleri temin eden değerli hocalarım Sayın Öğr. Gör. Erdoğan ÇAKIR'a, Sayın Prof. Dr. Miriş DİKMEN' e ve Sayın Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL' a çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında ve RT-qPCR analizinde kullanılan primer, prob dizilerini tasarlayan Emilia QOMİ EKENEL' e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, sonsuz destekleri ile bana güç veren değerli arkadaşlarım Reyhan VAROL' a, Emine ERDAĞ' a, Hande GÜNER' e, Murat KAYA' ya, Müslime YAVUZ' a çok teşekkür ederim.

Hayatımın boyunca sevgilerini her daim hissettiğim, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, çocukları olmaktan gurur duyduğum canım babam Rafig ALİYEV' e, canım annem Yamen ALİYEVA' ya, sevgili kardeşlerim Gülnara ALİYEVA' ya, Royal ALİYEV' e ve bu zahmetli süreç boyunca bana sabırla sevgiyle yardımcı olan, maddi manevi destek olan sevgili eşim Volkan AKTAŞ' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Aynura ALİYEVA

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

.....

(İmza)

Aynura ALİYEVA

09/05/2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanser Gelişimi ve Nedenleri.....	4
2.2. Kanser Hücrelerinin Çoğalma Özellikleri	6
2.3. Kanser Türleri.....	6
2.3.1. Meme kanseri.....	7
2.3.1.1. <i>Hormon reseptör pozitif meme kanseri</i>	8
2.3.1.2. <i>Üçlü negatif meme kanseri</i>	9
2.4. MikroRNA'lar	9
2.4.1. MikroRNA'ların keşfi ve yapısı	9
2.4.2. MikroRNA'ların biyogenezi	10
2.4.3. MikroRNA'lar ve kanserle ilişkisi	12
2.5. miRNA Yerine Koyma (Replacement) Tedavisi	14
2.5.1. miR-145-5p'nin meme kanseri ve metastazla ilişkisi	15

2.6. TGF- β SMAD Sinyal Yolağı.....	16
2.7. miRNA'lar ile TGF- β Sinyalinin, TGF- β ile miRNA Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	18
2.7.1. miR-145-5p ve TGF- β yolak aktivasyonu.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Gereçler.	22
3.2. Kullanılan Cihaz ve Aletler	22
3.3. Hücrelerin Kültüre Edilmesi.....	22
3.4. Transfeksiyon	23
3.4.1. Hsa-miR-145-5p mimik transfeksiyonu	23
3.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (Real time qPCR; RT qPCR)	25
3.5.1. Kullanılan ekipmanlar ve ticari kitler	25
3.5.2. RNA izolasyonu	25
3.5.3. Ters transkriptaz PCR.....	26
3.5.4. Liyofilize master mix, TaqMan® Prob, primerlerin sulandırılması. ...	27
3.5.5. Gerçek zamanlı kantitatif PCR reaksiyonu	28
3.6. Western Blot	31
3.6.1. Kullanılan ekipmanlar ve ticari kitler	31
3.6.2. Protein izolasyonu	31
3.6.3. Qubit protein miktar ölçümü	32
3.6.4. Gerekli solüsyonların hazırlanması	32
3.6.5. Proteinlerin jele yüklenmesi ve yürütülmesi.....	33
3.6.6. Yarı kuru sistem ile transfer (Blotlama)	34
3.6.7. Bloklama.....	34
3.6.8. Antikor muamelesi	34
3.6.9. Görüntüleme	35
3.7. Hücre Göçü Testi.....	36

4. BULGULAR.....	37
4.1. miRNA Mimik Transfeksiyonu	37
4.2. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR.....	44
4.3. Western Blot	46
5. TARTIŞMA SONUÇ	52
KAYNAKÇA.....	55
ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kadın memesinin anatomisi.....	8
Şekil 2.2. Üçlü negatif meme kanseri.....	9
Şekil 2.3. miRNA biyogenezi.....	12
Şekil 2.4. Onkogen ve tümör baskılayıcı olarak miRNA'ların etkileşi.....	14
Şekil 2.5. TGF- β SMAD sinyal yolağı.....	18
Şekil 2.6. miRNA biyogenezinin TGF- β sinyalleriyle düzenlenmesi ve TGF- β sinyal bileşenlerinin miRNA'lar tarafından düzenlenmesi.....	20
Şekil 3.1. RT-qPCR plaka profili.....	29
Şekil 3.2. RT-qPCR termal profili	30
Şekil 4.1. miR-145-5p mimik ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 1. gün inverted mikroskop.....	38
Şekil 4.2. miR-145-5p mimik ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 2. gün inverted mikroskop.....	39
Şekil 4.3. miR-145-5p mimik ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 3. gün inverted mikroskop.....	40
Şekil 4.4. miR-145-5p mimik ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 4. gün inverted mikroskop.....	41
Şekil 4.5. miR-145-5p mimik ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 5. gün inverted mikroskop.....	42

Şekil 4.6. miR-145-5p mimik ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 6. gün inverted mikroskop.....	43
Şekil 4.7. miR-145-5p transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD-3 gen ekspresyon seviyesindeki değişim	44
Şekil 4.8. miR-145-5p transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD-4 gen ekspresyon seviyesindeki değişim	45
Şekil 4.9. miR-145-5p transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD-3 gen ekspresyon seviyesindeki değişim.....	45
Şekil 4.10. miR-145-5p transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD-4 gen ekspresyon seviyesindeki değişim.....	46
Şekil 4.11. Kontrol ve miR-145-5p mimik uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde β -aktin, SMAD3 ve SMAD4 proteinlerinin Western Blot görüntüleri.....	47
Şekil 4.12. miR-145-5p mimik uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD-3 protein ifadesi (%)......	47
Şekil 4.13. miR-145-5p mimik uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD-4 proteinin ifadesi (%)......	48
Şekil 4.14. miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel parçası varlığında görüntüleri.....	49
Şekil 4.15. miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel kaldırıldıktan sonra 0. gün görüntüleri.....	49
Şekil 4.16. miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel kaldırıldıktan sonra 1. gün görüntüleri.....	50
Şekil 4.17. miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel kaldırıldıktan sonra 2. gün görüntüleri.....	50
Şekil 4.18. miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel kaldırıldıktan sonra 3. gün görüntüleri.....	51
Şekil 4.19. miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel kaldırıldıktan sonra 4. gün görüntüleri.....	51

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Transfeksiyon için kontrol gruplarının hazırlanması.....	24
Tablo 3.2. Hsa-miR-145-5p mimiğinin hazırlanması.....	24
Tablo 3.3. RT-qPCR reaksiyo tüplerinin hazırlanması.....	28
Tablo 3.4. RT-qPCR analiznde kullanılan primer ve prob dizileri.....	30
Tablo 3.5. Jele yüklenecek protein örneklerinin hesaplanması.....	33
Tablo 3.6. Jel kuyulatinin temsili görüntüsü.....	33
Tablo 3.7. Antikor dilisyonlarının hazırlanması.....	35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
miRNA	: Mikro RNA
mRNA	: Mesajcı RNA
cDNA	: Komplimenter DNA
RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TGF-β	: Transforme edici Büyüme Faktörü β
ER	: Östrojen Reseptörü
PR	: Progesteron Reseptörü
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
Co-SMAD	: Ortak SMAD
R-SMAD	: Reseptör SMAD
I-SMAD	: İnhibitör SMAD
TβRI	: Transforme edici Büyüme Faktörü β Reseptörü I
TβRII	: Transforme edici Büyüme Faktörü β Reseptörü II
μl	: Mikrolitre
μg	: mikrogram
μM	: Mikromolar
μm	: Mikrometre

1. GİRİŞ

Kanser hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu oluşan bir hastalıktır (Cooper ve Hausman, 2016). Hücrelerin anormal bir şekilde büyümesi, çoğalması ve vücudun diğer bölgelerine yayılmasını engelleyen kontrol mekanizmalarındaki anormallikler kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerindendir. Kanser hücrelerini tehlikeli yapan ise kontrolsüz hücre çoğalması ve diğer doku ve organlara yayılmasıdır (Klug vd., 2009).

Normal dokular, hücrenin büyümesi, bölünme döngüsüne geçişini ve ilerlemesini sağlayan büyümeyi teşvik edici sinyallerin üretimini ve salımını dikkatli bir şekilde kontrol eder, böylece hücre sayısının homeostazı, normal doku yapısı ve fonksiyonunun korunması sağlanır. Kanser hücreleri bu sinyalleri serbest bırakırlar. Sinyaller, büyük ölçüde hücre içi tirozin kinaz alanları içeren hücre yüzeyi reseptörlerini bağlayan büyüme faktörleri tarafından iletilirler. Hücre döngüsünün devam etmesini ve aynı zamanda hücre büyümesini düzenleyen, dallanmış hücre içi sinyal iletimi yoluyla sinyaller yaymaya devam eder. Genellikle de bu sinyaller hücre sağkalımı ve enerji metabolizması gibi diğer hücrenin biyolojik özelliklerini etkilerler (Hanahan ve Weinberg, 2011).

MikroRNA'lar (miRNA), bir veya daha fazla hedef mRNA'nın translasyonuna müdahale ederek, transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda yer alan ve çeşitli kanser türlerinde önemli rol oynayan küçük kodlamayan endojen RNA'lardır (Hosseinahli vd., 2018, Nugent, 2017 ve Geraldo, vd., 2012). miRNA'ların normal hayatta kalma ve gelişme için çoğunlukla gerekli olan yaklaşık %30 insan esansiyel genlerinin ekspresyonunu kontrol ettiği tespit edilmiştir (Zhang vd., 2019). Yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda olan küçük RNA'lar, degradasyon ya da translasyonu baskılamak için mRNA'ları hedefleyerek hayvanlarda ve bitkilerde önemli düzenleyici rol oynayabilirler. Yakın zamana kadar farkedilmemiş olmalarına rağmen, miRNA'lar çok hücreli organizmalarda daha bol miktarda gen düzenleyici molekül sınıfından birini içermektedir ve birçok protein kodlayan geni etkilemektedirler (Bartel, 2004). miRNA'lar hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi homeostatik süreçlerde önemli roller oynamaktadır. Yakın zamanda yapılan gen ekspresyon çalışmaları, kontrolsüz hücre bölünmesinin gerçekleştiği kanser hücrelerinde değişikliğe uğramış miRNA ekspresyonlarını göz önüne sermiştir. miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliklerine göre onkojen yada tümör baskılayıcı gibi

davranabilmektedirler (Saydam vd., 2011, Bhardwaj vd., 2010). Tümör baskılayıcı miRNA'ların fonksiyonu onkogenlerin ekspresyonunu kontrol etmektir. Tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonundaki azalma onkogenlerin ekspresyonunun artmasına neden olacaktır ki bu da kanser oluşumun başlıca sebeplerindendir. Onkogenik miRNA'lar ise tümör baskılayıcı miRNA'ların tam tersine tümör baskılayıcı genleri, apoptoz ve differensasyonu düzenleyen genleri inhibe ederek işlev yaparlar ve bu tür miRNA'lar tümör oluşumunu hızlandırırlar (Görür ve Tamer, 2011, Zhang vd., 2007).

Onkojenik miRNA'ların aşırı ekspresyonu, tümör baskılayıcı genleri veya kanser gelişiminde rol oynayan hücre farklılaşması ve apoptozu regüle eden genleri inhibe eder. Tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonu kanserli hücrelerde azalmıştır. Bu durum, hücre farklılaşmasını veya apoptozu kontrol eden onkojenlerin ters şekilde düzenlenmesi yoluyla tümör gelişiminin ilerlemesine yol açabilir (Shirafkan vd., 2018, Koturbash vd., 2011). miR-145, 2002'de onaylanmış bir miRNA homolojisi ile farede bulunmuştur (Lagos-Quintana vd., 2002). Diğer çalışmalar, miR-145'in kolorektal kanserde baskılandığını göstermiştir (Michael vd., 2003, Li vd., 2016). Bir başka çalışmada, miR-145'in, bir bisistronik küme oluşturan kromozom 5 (5q32-33) üzerinde bulunduğu söylenmiştir. Çeşitli dokularda son derece fazla eksprese edilen bu tümör baskılayıcı miRNA'nın çeşitli kanser dokularında baskılanmış olduğu açıklanmıştır (Iio vd., 2010, Xia vd., 2014). İlaveten, miR145 son zamanlarda plazma, serum, idrar gibi vücut sıvılarından izole edilen eksozomlarda veya mikro-zerreciklerde tespit edilmiştir (Xia vd., 2014, Yang vd., 2014). Bu nedenle miR-145'in, hücresel proliferasyonun düzenlenmesi, farklılaşma, apoptoz, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere bir dizi tümöröjenik fonksiyona katılabileceği gösterilmiştir (Cui vd., 2014).

Çeşitli kaynaklar, miRNA'ların transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinde ve korunmuş hücresel sinyalleşmelerde yer aldığını göstermiştir (Ichimura vd., 2011, Inui vd., 2010). Bu sinyalleme basamakları, transforme büyüme faktörü (TGF- β), Notch, Hedgehog ve mitojen aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) yollarını içerir (Hornstein ve Shomron, 2006, Ebert ve Sharp, 2012).

TGF- β ailesi, hücre büyümesi, farklılaşma, yapışma, göç ve ölüm gibi çoklu hücresel fonksiyonları düzenleyen çok işlevli bir sitokin ailesidir (Miyazawa, vd., 2002, Morikawa vd., 2016). TGF- β sinyalleşmesi gelişimde birçok düzenleyici role sahiptir ve bu sinyal yolundaki değişiklikler, kardiyovasküler hastalık ve kanser dahil olmak üzere

çeşitli hastalıkların patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (Meng vd., 2016, Chen ve Ten Dijke, 2016). Daha önceki çalışmalar, TGF- β sinyal yolunun miRNA yolunu aşağı akış (downstream) sinyal basamaklarının önemli bir bileşeni olarak göstermiştir (Butz vd., 2012, Janakiraman vd., 2018).

Diğer sinyal yollarına benzer şekilde, TGF- β sinyalleri trans-membran reseptörlerine ligand bağlanması ile aktive olur ve sinyal daha sonra hücre içi moleküller tarafından iletilir (Hata ve Chen, 2016, Xu vd., 2012). Bu bağlamda, SMAD proteinleri hedef genlerinin transkripsiyonunu kontrol etmek için TGF- β sinyalleşmesinin ana araçlarıdır. Buna ek olarak, birçok başka sinyal molekülünün hücrenin tipine ve fizyolojik özelliğine dayalı TGF- β kaynaklı hücre yanıtlarında ve patofizyolojik işlemlerde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (Zhang , 2017, Derynck vd., 2014).

Her ne kadar TGF- β /SMAD sinyal yolağı doğrusal ve nispeten basit gibi görünse de TGF- β sinyalinin işlevsel karmaşıklığı ve çok yönlülüğünün temel dayanaklarından biri çeşitli düzenleyici mekanizmalarının olmasıdır. Bu mekanizmalardan en önemlisi geri bildirim (feedback) düzenlemesidir (Hata ve Chen, 2016, Budi vd., 2017).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Gelişimi ve Nedenleri

Kanserin temel özelliklerinden biri klonalitedir. Tümörlerin klonal kökeni, tümör gelişmesine neden olan ilk öncül hücrenin, başlangıçta kanser hücresinin bütün özelliklerine sahip olduğu anlamına gelmez. Bunun aksine kanserin gelişmesi hücrenin birbirini izleyen değişiklikler sonucunda giderek malign şekle dönüştüğü, çok basamaklı bir süreçtir. Bunu gösteren özelliklerden birisi, çoğu kanser türünün ileri yaşlarda ortaya çıkmasıdır. Hücresel düzeyde kanserin gelişimi, mutasyonları içeren aşamalı bir süreç sonucunda proliferasyon, sağkalım, invazyon ve metastaz yetenekleri giderek artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıkar (Cooper ve Hausman, 2016). Son on yılda, kanser biyolojisinin kavramsal olarak anlaşılmasındaki gelişmeler, metabolizmanın yeniden programlanması ve immün yıkımın ortadan kaldırılmasının ek işaretler olarak kabul edildiğine dair son önerilere yol açmıştır (Sarkar vd., 2013).

Kanser; vücuttaki hücrelerin değişmesi sonucu gelişen, çevresel faktörlerden bağımsız, kontrol edilemeyen ve farklı zamanlarda metastaz yapabilecek şekilde çoğalan bir hastalıktır (Özdemir vd., 2018). Kansere neden olan maddeler, yani karsinojenler, deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarla ve insan topluluklarında kanserlerin rastlanma sıklığını irdeleyen epidemiyolojik çalışmalarla belirlenmiştir. Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir işlem olduğundan birçok değişik faktör kanserin ortaya çıkmasına neden olabilir (Cooper ve Hausman, 2016, Colditz vd., 2006). Kanser tedavi maliyeti, süresi ve yan etkileri nedeniyle en önemli sağlık sorunlarından biridir (Gürsu vd., 2012). Sigara içmek, enfeksiyon, radyasyona maruz kalmak gibi ortak risk faktörleri birçok kansere neden olabiliyor (Chan vd., 2014). Bu sebeple de kanserden korunmak önceliğimiz olmalıdır. Kansere sebep olan risk faktörleri üç gruba ayrılabilir:

1. Davranışsal Risk Faktörü

Fiziksel aktivitede yetersizlik, şişmanlık, dengesiz beslenme, alkol ve tütün kullanımı tüm kanserler için riskli davranışlardır. Bu risk faktörlerinin tüm kanserlerin yarısından fazlasına neden olduğu belirtilmektedir (Koç, 2014).

Alkol: tüm kanser vakalarının % 3,6'sının alkolle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durum tüketim sıklığına bağlı olarak nüfuslarda değişmektedir (Ratna ve Mandrekar, 2017). Örneğin, Kanada'da yapılan bir araştırmada sürekli alkol

tüketenlerde çeşitli kanser türleri (yemek borusu, mide, kolon, karaciğer, pankreas, akciğer, prostat) alkol tüketmeyenlere veya bazen alkol tüketenlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Nelson, 2013).

Diyet: Yağlı besinler ile aşırı beslenme, alkol kullanımı, menopoz sonrası kilo alımı meme kanseri riskini artırır. Meme kanseri, fazla kilolu veya obez kadınlarda menopoz sonrası dönemde daha yaygındır. Ancak premenopozal aşırı kilolu kadınlarda risk, olmayanlara göre daha düşüktür (Mahoney, 2018).

2. Biyolojik risk faktörü

Bu faktörler yaş, cinsiyet gibi fiziksel özelliklerdir. Fiziksel ve biyolojik özelliklerin kanser için risk faktörü olup olmadığı kanser tipine bağlıdır.

Cinsiyet: Bazı kanser türleri cinsiyetle ilişkilendirilebilir. Örneğin, prostat bezi sadece erkeklerde olduğu için erkeklerde prostat kanseri görülür. Hem erkek hem de kadınlarda meme kanseri görülebilir, ancak kadınlarda meme kanseri gelişme riski daha yüksektir (Özdemir vd., 2018). 2016 yılının istatistiklerine göre kadınlar arasında en sık görülen kanser meme kanseri iken erkeklerde bu oran çok düşüktür. Erkeklerde meme kanseri genellikle 60 yaşından sonra görülür. Ancak, erkeklerde geç teşhis edilir. Bu nedenle de hastalık ileri evrelere geçer ve tedavi zorlaşır (Yalaza, 2016).

Yaş: Yaşlılık, birçok bireysel kanser türü için en önemli nedenlerden biridir. Ulusal Kanser Gözetim Enstitüsünden elde edilen verilere göre, ortalama kanser yaşı 66'dır. Kanser vakalarının %25'i 65 ila 74 yaşları arasındaki kişilerde bulunmaktadır ([http-1](#)).

3. Genetik risk faktörü

Genetik risk faktörleri, nesilden gelen genlerle ilişkilidir. Genlerin bazı hastalıklara karşı yatkınlığını gösteren araştırmalar halen devam etmektedir. Normalde tümör gelişimini önleyen tümör baskılayıcı genlerdeki bir bozukluğun, kalıtsal olarak aktarılması ve sigara gibi bir karsinojenin ilave katkısı ile bireyler kansere yatkın bir hale gelebilmektedirler. Meme ve yumurtalık kanseri gibi bazı kanser türlerinde, kanserin kalıtsal geçişine ait bazı genler tespit edilmiştir (Yokuş ve Çakır, 2012).

Hormonlar: Kadınlarda östrojen hormonu meme kanseri riskini artırır. Östrojen hormonunun azalması tümörün büyümesini azaltır. Erken adet kanaması (12 yaşından önce), geç menopoz (55 yaşından sonra) ve doğum yapmak meme

kanseri riskini azaltır. Bununla birlikte, 35 yaşından sonra doğum yapmamak ya da ilk doğum yapmak meme kanseri riskini arttırmaktadır (Mahoney, 2008).

İmmünoşüpresyon: Herhangi bir organ naklinden sonra, nakil olan organa direnmek, organın reddetme işlemini azaltmak ve organizmanın immün mekanizmasının yabancı maddelere karşı etkisini azaltmak için immünoşüpresif tedavi kullanmak önemlidir (Carvalho, 2010). Daha önce organ transplantasyonu ve immünoşüpresif tedavi alan HIV'li kadınlarda rahim ağzı kanseri oranının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Silverberg, 2018).

Enfeksiyöz ajanlar: Virüsler, bakteriler ve parazitler dahil olmak üzere bazı enfeksiyöz ajanlar kansere neden olabilir veya kanser riskini artırabilir. Aynı zamanda bazı virüsler hücre büyümesini ve çoğalmasını düzenleyen sinyalleri bozabilir. Ek olarak, bazı enfeksiyonlar bağışıklık sistemini zayıflatır ve vücudun diğer kanserlerle daha az mücadele etmesine neden olur (<http-2>).

Radyasyon: İyonlaştırıcı radyasyon adı verilen, belirli dalga boylarında yayılan radyasyon, DNA'ya zarar veren ve kansere neden olan enerjiye sahiptir. Cep telefonlarından ve elektromanyetik alanlardan gelen düşük enerjilerin DNA'ya zarar vermediği ve kansere neden olmadığı bulunmuştur (<http-3>).

2.2. Kanser Hücrelerinin Çoğalma Özellikleri

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran başlıca özelliği kontrolsüz bir biçimde çoğalmasıdır. İn-vitro koşullarda kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki fark, normal hücrelerin çoğalmasının kontakt inhibisyonundan etkilenmesidir (Cooper ve Hausman, 2016). Hücre döngüsü kanserli hücrelerde mitozdan sonra G₁, S, G₂ (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde tekrarlanmaktadır. Normal hücreler büyüme faktörlerinin oranına ve komşu hücrelerle kontakt inhibisyonuna göre belirli bir seviyeye kadar çoğalır ve bölünme sinyali almadığı sürece hücre bekleme fazı olan G₀ da beklerler (Cabadak, 2008 ve Vermeulen vd., 2003).

2.3. Kanser Türleri

Günümüzde çok sayıda kanser türü bilinmektedir. Kanser patalojisinde en önemlisi iyi huylu ve kötü huylu lezyonları ayırt etmektir. Bu lezyonların ayırtedici bazı özellikleri bilinmektedir. Bunlar;

- a. Hızlı büyüme

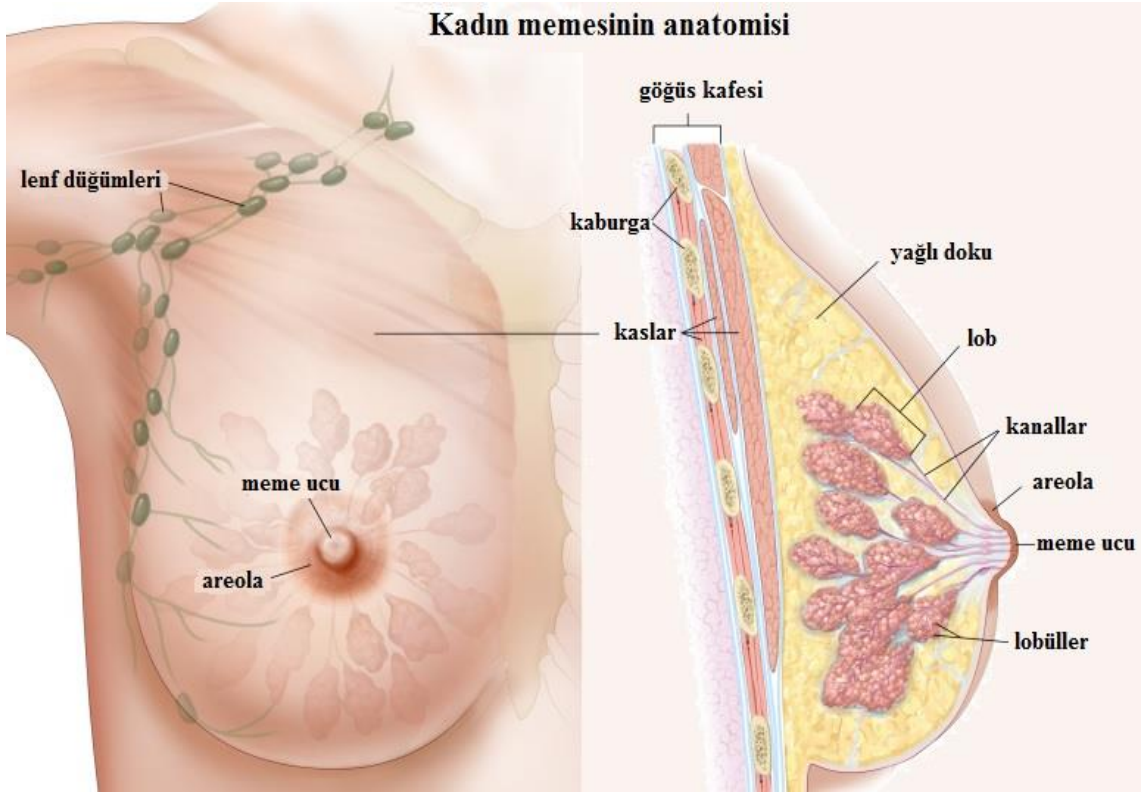
- b. Hücre döndüsünde artış
- c. İnvaziv büyüme
- d. Metastaz
- e. Kötü huylu lezyonlar için vasküler veya lenfatik kanal invazyonu

olarak sıralanabilir (İdikio, 2011).

İyi huylu lezyonlar komşu dokulara yayılmadan oldukları yerde kalır iken kötü huylu lezyonlar ise bunun tam tersine hem komşu dokulara hem de kan ya da lenfatik sistem yoluyla vücudun uzak bölgelerine yayılarak metastaz yapma özelliğine sahiptirler (Wan vd., 2013). Kanseri; göğüs, bağırsak, akciğer, üreme organları, kan ve cilt dahil olmak üzere vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkabilir. Örneğin, meme kanseri meme dokusunda başlar ve erken tanı konmadığında ve tedavi edilmediğinde, kanser hücreleri koltuk altındaki lenf nodlarına, lenf bezine, lenf düğümlerine, karaciğer ve kemik gibi vücudun diğer bölgelerine de metastaz yapabilir ve daha sonra bu bölgelerde tümörler oluşturabilir ([http-4](#)).

2.3.1. Meme kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında en fazla rastlanan kanser türüdür ve dünyadaki tüm kanser türleri arasında ikinci sıraya sahiptir (Ferlay vd., 2015). Meme kanseri, kötü huylu (malign) hücrelerin meme dokusunda oluştuğu, aynı zamanda çeşitli morfolojik ve moleküler özellikleri olan ve tedaviye yanıtı olan heterojen bir hastalıktır. Meme, loblardan (bölümlerden) ve kanallardan oluşur. Her memede lob adı verilen 15 ila 20 adet bölümü ve her lobun da lobül adı verilen daha küçük bölümleri vardır. Lobüller, süt yapabilen çok sayıda küçük ampülle biter. Loblar, lobüller ve ampüller, kanal adı verilen ince tüplerle bağlanır. Her memede, ayrıca kan damarları ve lenf damarları bulunur. Lenf damarları, lenf adı verilen neredeyse renksiz, sulu bir sıvıyı lenf nodları arasında taşır. Lenf bezleri, vücutta bulunan küçük, fasulye şeklinde yapılardır. Lenfleri filtreler ve enfeksiyon ve hastalıklarla savaşmaya yardımcı olan beyaz kan hücrelerini depolarlar. Lenf nodu grupları, göğsün yanında aksillada (kolun altında), köprücük kemiğinin üstünde ve göğüste bulunur (Şekil 2.1) (Kocakuşak vd., 2011).



Şekil 2.1. Kadın memesinin anatomisi. (kaynak: <http-5>).

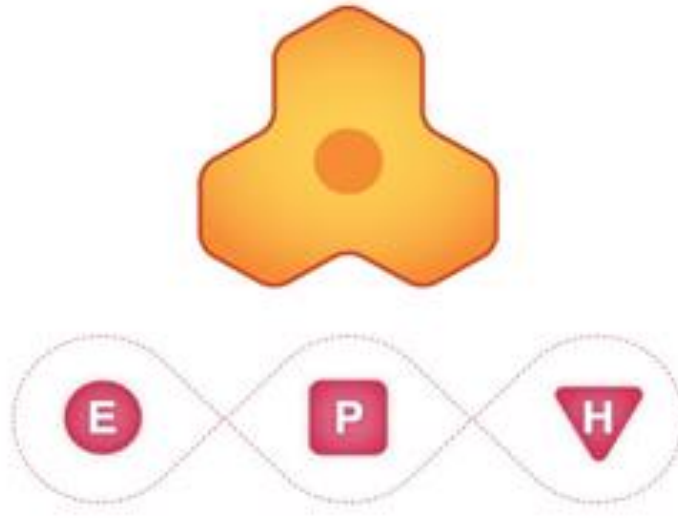
En sık görülen meme kanseri tipi, kanal hücrelerinde başlayan duktal karsinomdur. Loblarda veya lobüllerde başlayan kansere lobüler karsinom adı verilir ve diğer meme kanseri türlerinden daha sık görülür. Enflamatuvar meme kanseri, memenin sıcak, kırmızı ve şiş olduğu nadir görülen bir meme kanseri türüdür (Rakha vd., 2010).

2.3.1.1. Hormon reseptör pozitif meme kanseri

Meme kanserinin farklı moleküler alt tipleri arasında, östrojen reseptör pozitif (ER +) meme kanseri tüm meme kanserlerinin %75'ini oluşturur ve kanser hücrelerinin östrojen hormonuna cevap olarak büyüdüğü anlamına gelir (Zhang vd., 2014). ER pozitif meme kanseri, kanserli hücreler östrojenden büyüme sinyalleri aldığında teşhis edilir. Östrojen reseptörleri, meme hücrelerinde en sık görülen hormon reseptörü türüdür. Bu nedenle östrojen reseptörü pozitif (ER+) meme kanseri çok yaygındır (Horibata vd., 2018). ER + meme kanser tümörleri ER- tümörlerle kıyaslandığında, hormonal duyarlılıkta daha uzun sağkalım olduğu gözlemlenmiştir (Hoch, 1999). İlaveten; ER+ meme kanserlerinin %30'unda hormonal tedaviye direnç tespit edilir iken ER- meme kanserlerinin %5-15'inde hormonal duyarlılık gözlemlenmiştir (Jordan, 1988).

2.3.1.2. Üçlü negatif meme kanseri

Üçlü negatif meme kanseri, östrojen ve progesteron reseptörünün ekspresyonundan yoksun olan ve insan epidermal büyüme faktörü 2 reseptörü proteinini eksprese etmeyen bir meme kanseri türüdür (Sun vd., 2017). Yapılan mikrodizi analizleri, üçlü negatif meme kanserini (ER-, PR- ve HER2-negatif) klinik olarak heterojen bir malignite ve yüksek tümör nüksü ve genel sağkalım oranlarının kötü olması ile karakterize, en agresif meme kanseri alt tipi olarak tanımlamıştır (Arpino vd., 2015). Östrojen (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'yi eksprese etmeyen üçlü negatif meme kanseri, tüm meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturduğu tanımlanmıştır (Rakha vd., 2007). Yapılan laboratuvar ve gözlemsel çalışmalardan elde edilen veriler, üçlü negatif meme kanserinin genel sağkalımının düşük olduğu, yüksek oranda invazyon ve vücudun uzak dokularına metastaz yapabildiğini göstermiştir (Dent vd., 2007). Bazı faktörlerin üçlü negatif meme kanserine yakalanma riskini arttırdığı da yapılan çalışmalarca kanıtlanmıştır. Bu faktörlere, obezite, menapoz, diabet, hormon tedavisi dahildir (Sun vd., 2017, Saxena vd., 2010, Chen vd., 2016).



Şekil 2.2. Üçlü negatif meme kanseri (kaynak: <http-6>)

2.4. MikroRNA'lar

2.4.1. MikroRNA'ların keşfi ve yapısı

MikroRNA'lar (miRNA), genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan

ama proteine translasyonu gerçekleşmeyen küçük RNA molekülleridir. miRNA, fonksiyonel olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli küçük kodlamayan bir RNA türüdür. Pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler işlenerek, önce pre-miRNA adlı kısa sap-ilmik yapılarına, sonra da fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler. İnsan genomunda miRNA'ları kodlayan yüksek seviyede korunmuş yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir (Shenouda ve Alahari, 2009, Saydam, 2011). İnsan genomunda 1917 adet mikroRNA dizisi tespit edilmiştir ([http-7](http://7)).

miRNA'lar 1993 yılında ilk olarak Lee ve arkadaşları tarafından *C.elegans* solucan türünün araştırılması sırasında Victor Ambros'un laboratuvarında keşfedilmiştir (Lee vd., 1993). Terim olarak ise miRNA'lar 2001 yılında literatürde ilk defa kullanılmıştır (Ruvkun, 2001). Lee ve arkadaşları *C.elegans*'ın genetik yapısını araştırırken, *lin-4* olarak tanımladıkları bir genin, hiçbir protein kodlamamasına rağmen 22 nükleotide sahip bir çift fonksiyonel RNA transkribe ettiğini tespit etmişlerdir. *Lin-4* miRNA, *lin-14*'ün mRNA'sının 3' translasyona uğramayan bölgesine (UTR) bağlanarak translasyonu inhibe ettiğini göstermişler (Görür ve Tamer, 2011).

Reinhart ve arkadaşları 2000 yılında yine *C.elegans* türünde 22 nükleotit uzunluğunda, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir mikroRNA keşfetmişler ve *let-7* olarak tanımlamışlardır. miRNA *let-7* *C.elegans*'da *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* ve *daf-12*'nin mRNA translasyonunu baskıladığını söylemişlerdir (Reinhart vd., 2000). 2003 yılında bu miRNA'nın insanlar da dahil bazı türler arasında korunmuş olduğu bulunmuştur ki, bu da *let-7* nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir. Sonrasında *lin-4* ve *let-7*'ye benzeyen birçok fonksiyonel RNA molekülü bulunmuştur (Pasquinelli vd., 2000, Bartel, 2004).

2.4.2. MikroRNA'ların biyogenezi

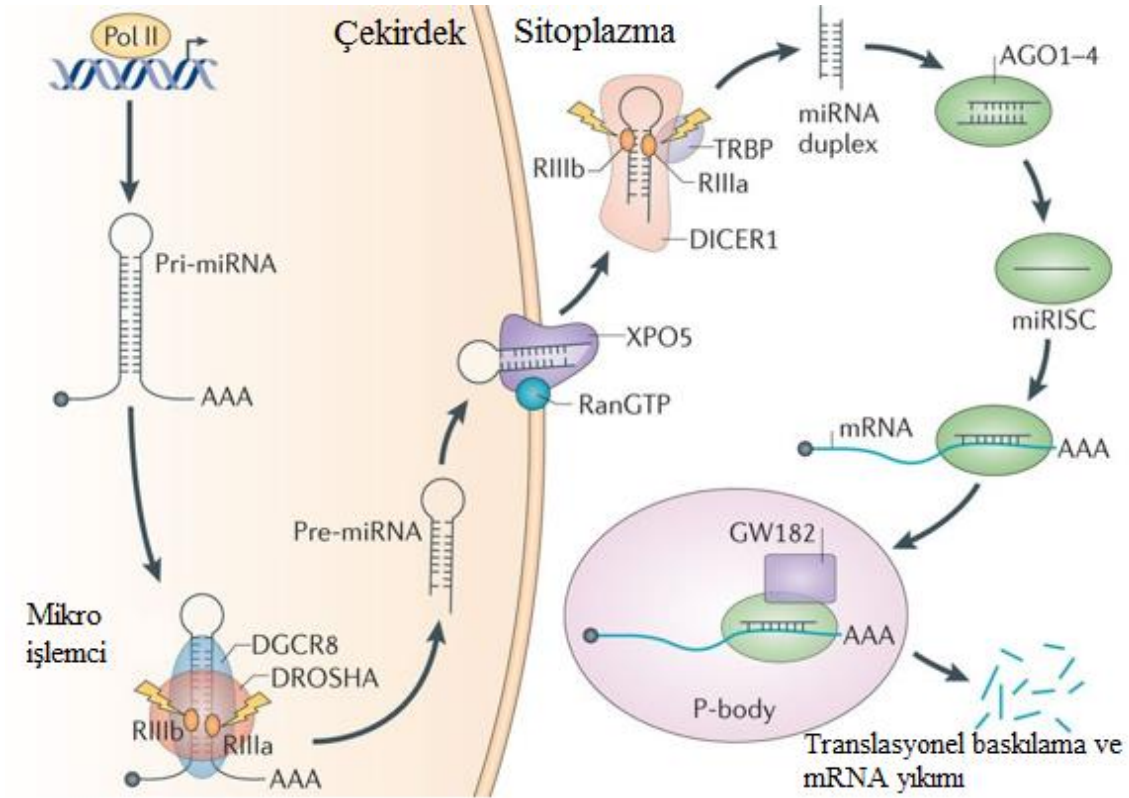
miRNA'ların keşfinden bu zamana kadar, çeşitli türlerde binlerce miRNA bulunmuştur (Kozomara ve Griffiths-Jones, 2011). Yaklaşık 22 nükleotit uzunluğa sahip olan miRNA, mRNA'yı hedefleyerek ona bağlanmasına ve mRNA'nın degradasyonuna ya da translasyonun bloke edilmesine aracılık eder (Filipowicz vd., 2008).

miRNA biyogenezi üç adımlık bir işlem sonucunda gerçekleşir. Birinci adımda bir miRNA geninden primer miRNA (pri-miRNA) sentezlenir. İkinci adımda pri-

miRNA'nın işlenmesiyle pekürsör miRNA (pre-miRNA) çekirdekte sentezlenir. Üçüncü işlem olan, pre-miRNA'dan olgun miRNA sitoplazma içerisinde oluşur (Kwak vd., 2010).

miRNA'lar, ilk olarak çekirdekte genomik DNA'dan RNA polimeraz II enzimi tarafından pri-miRNA şeklinde transkribe olurlar. Oluşan pri-miRNA *cap* ve *poli-A* kuyrupuna sahiptirler (Lee vd., 2004). Bundan sonra çekirdekte pri-miRNA, RNA polimeraz III enzim ailesinden olan DROSHA ve onun kofaktörü olan DGCR8 (insan DiGeorge sendromu kritik bölge 8) tarafından işlenerek, 60-70 nükleotit uzunluğunda olan pre-miRNA'ya keser (Lee vd., 2003). DGCR8 veya diğer ismiyle PASHA çift iplikli RNA bağlayan bir proteindir ve onun DROSHA enzimi ile oluşturduğu kompleks ise mikroişlemci kompleksidir (Gregory vd., 2004, Esquela-Kerscher ve Slack, 2006, Denli vd., 2004). Çekirdek bileşenleri olarak tanımlanan DROSHA ve DGCR8, hücredeki hemen hemen tüm miRNA'ların biyogenezi için gerekli olmakla birlikte, mikroişlemci aktivitesini in-vitro olarak rekombinant DROSHA ve DGCR8 proteinleri ile yeniden oluşturulabilir (Gregory vd., 2004, Han vd., 2004).

Çekirdekte oluşan pre-miRNA molekülü, nüklear taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve çekirdek proteini olan RAN-GTP'ye bağlı olarak sitoplazmaya taşınır (Lin S. ve Gregory, 2015, Lund vd., 2004). Sitoplazmaya taşınan ve hala sap ilmi halinde olan pre-miRNA, yine bir RNA polimeraz III enzim ailesinden olan DICER enzimi tarafından çift zincirli olgun miRNA dubleksine kesilir (Bernstein vd., 2001, Zhang vd., 2002). DICER RISC (RNA induced silencing complex) kompleksini de aktive eder (Zhang vd., 2002). DICER, çift zincirli miRNA dubleksine bağlanan işleme yanıt veren RNA-bağlayıcı protein (TRBP-transactivation-responsive RNA-binding protein) ile birleşir. TRBP ayrıca, miRNA ile indüklenen susturma kompleksine (miRISC) katılmak için DICER'i Argonaute proteinleri (AGO1, AGO2, AGO3 veya AGO4) ile fiziksel olarak da bağlar (Chendrimada vd., 2005). Ardından Argonaute'un etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir ve hedef mRNA'ya bağlanarak ya onun yıkımına (degradasyonuna) ya da translasyonel düzenlemesine neden olurlar (Mohammadi vd., 2016, Gregory vd., 2005). Anlatılan bütün mekanizma şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. miRNA biyogenezi. (kaynak: Lin ve Gregory, 2015'den alınarak düzenlenmiştir.)

2.4.3. MikroRNA'lar ve kanserle ilişkisi

Hücrelerin kanserleşme süreci, kontrolsüz bir şekilde çoğaldıklarında ve apoptoz fonksiyonlarını kaybettiklerinde gerçekleşmeye başlar. Birçok çalışma, miRNA'ların proliferasyon, farklılaşma, göç, apoptoz, metabolizma ve stres yanıtı gibi çok önemli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli anahtar moleküller olduğunu göstermiştir. (Hwang ve Mendell, 2006, Di Leva vd., 2014). miRNA'ların, hastalıkların patogenezi, özellikle kanserde son derece önemli düzenleyiciler olarak görev yaptıkları gösterilmiştir (Plank vd., 2013, Timoneda vd., 2014). miRNA'lar kanser çalışmasına yeni bir bakış açısı getirmiştir. Daha önce, miRNA genlerinin yaklaşık %50'sinin kanserle ilişkili genomik bölgelerde yer aldığı ve kanser gelişim yollarında merkezi noktaları oluşturduğu ortaya çıkmıştır ki bu da miRNA'ların insan kanserinin patogenezi, özellikle kanserde son derece önemli düzenleyiciler olarak görev yaptıkları gösterilmiştir (Plank vd., 2013, Timoneda vd., 2014). miRNA'ların düzensizliğinin sayısız kanser türünün başlangıcında, ilerlemesinde ve yayılmasında temel bir rol oynayabileceği hipotezi, öncelikle miR-15a ve miR-16-1'in olduğunu gösteren Calin ve arkadaşları tarafından yapılan kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalığında

doğrulanmıştır. Çalışmada 13q14 kromozomunda delesyon olduğu tespit edilmiştir. Bu da hastalıkta en sık görülen kromozomal anormalliktir ve bu bölgede bir tümör baskılayıcı genin bulunduğu varsayılmıştır. Croce ve arkadaşları, tümör baskılayıcı aktivitenin, delesyona uğramış bölgede lokalize olan ve KLL hastalarında sıklıkla silinen veya aşağı regüle edilen iki miRNA, miR-15a ve miR-16-1 tarafından sağlandığını göstermişlerdir (Calin vd., 2002, Tan vd., 2018). Daha sonraki çalışmalarında, bu araştırmacılar, miR-15a ve miR16-1 dahil olmak üzere 13 miRNA'dan oluşan spesifik bir ekspresyonun KLL hastalığının ilerlemesi ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (Calin vd., 2005). miRNA'ların yarısından fazlası, insan genomundaki kanserde sıklıkla çoğaltılan, silinen veya yeniden düzenlenen alanlarda bulunur. Bu durum miRNA anormalliklerinin kanser patogenezinde geniş bir rol oynadığını gösterir (Calin vd., 2004). Ayrıca, Burkitt lenfoması (Metzler vd., 2004), kolorektal kanser (Michael vd., 2003), akciğer kanseri (Takamizawa vd. 2004) ve diğer çeşitli kanser alt tiplerinde miRNA ekspresyonunun düzensizliği gözlemlenmiştir (Iorio vd., 2005).

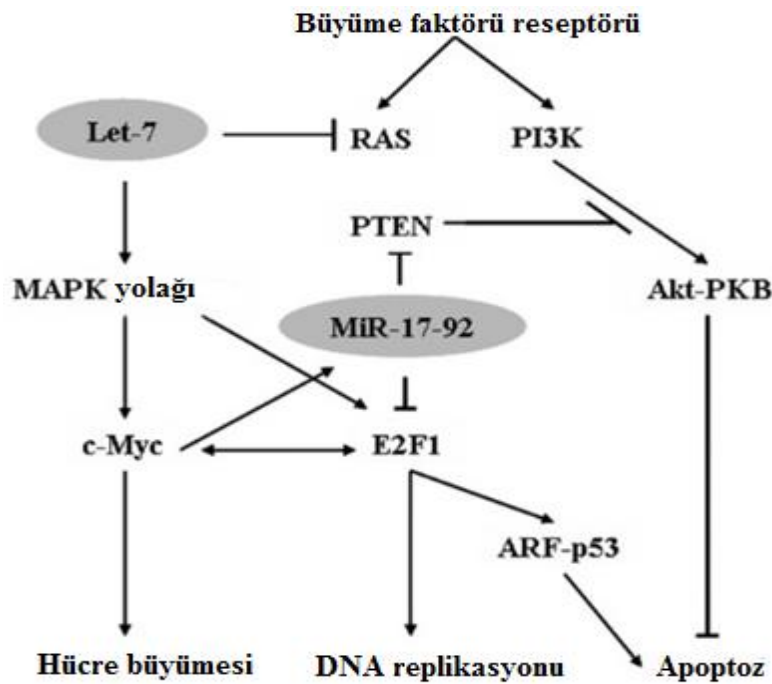
Kanserlerde aşırı eksprese edilen miRNA'ların genellikle hücre farklılaşmasını, apoptozu ve tümör baskılama genlerini kontrol eden genleri negatif yönde regüle ederek tümör gelişimini sağlayan "onkomir" olarak adlandırılan onkogen olduğu da kabul edilmiştir. Onkogen miRNA'lara miR-21 ve miR-17-92'yi örnek gösterilmiştir (Zhang vd., 2009, Osada ve Takahashi, 2011).

miR-21 meme, kolorektal, akciğer ve pankreas kanseri, glioblastoma, nöroblastom, lösemi ve lenfomada aşırı eksprese edildiği çalışmalarca kanıtlanmıştır. miR-21, in vitro kanser hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozunu, göçünü, invazyonunu etkiler ve tümör baskılayıcıyı hedefleyerek in vivo olarak kanser hastalarının hayatta kalması ile ilişkilendirilmiştir (Selcuklu vd., 2009). 3q31 kromozomunda bulunan miR-17-92 onkogen miRNA akciğer kanseri ve lenfomada aşırı eksprese edildiği görülmüştür (Zhang vd., 2009, Osada ve Takahashi, 2011). İlaveten, c-Myc, E2F1 ekspresyonunu modüle etmek ve tümör proteini p53 yolu ile c - Myc kaynaklı apoptozu inhibe etmek için miR-17-92'yi aktive ettiği ve düzenlediği tespit edilmiştir (Rinaldi vd., 2007) (şekil 2.4.).

Onkogenlerin aksine, kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Tümör baskılayıcı miRNA'lar, hücre farklılaşmasını, apoptozu kontrol eden onkogenleri inhibe eder ve böylece tümör

gelişimini önlerler. let-7 ve miR-34 ailesinin tümör baskılayıcı miRNA olduğu bilinmektedir (Tan vd., 2018).

let-7'nin ekspresyonu birçok kanser türünde azaldığı ve hücre sağkalımının kötüleştiği tespit edilmiştir (Boyerinas vd., 2010). Bunun yanı sıra, literatürde let-7'nin aşırı ekspresyonunun akciğer kanseri hücrelerinin in vitro büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (He vd., 2010). Yapılan bazı çalışmalar, let-7'nin azalmış ekspresyonunun, akciğer tümörlerinde pro-onkogen RAS'ın protein ekspresyonunu arttırdığını da ortaya koymuştur (Xia vd., 2010, He vd., 2010) (şekil 2.4).



Şekil 2.4. Onkogen ve tümör baskılayıcı olarak miRNA'ların etkileşimi (kaynak: Tan W. vd., 2018'den alınarak düzenlenmiştir)

2.5. miRNA Yerine Koyma (Replacement) Tedavisi

Kanser araştırmalarındaki son ilerlemeye rağmen, kanserin mortalite oranı hala artmaktadır ve bu da kliniklerde yeni terapiler açısından birçok zorluklara neden oluyor. MikroRNA'lar (miRNA) düzenleyici küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır ve hücre fizyolojisini ve hastalık gelişimini etkileyen çoklu molekülleri hedefleyerek gen ekspresyon seviyesini düzenlemede büyük bir rol oynadığı onaylanmıştır. Son zamanlarda, miRNA'lar kanser tedavisi için umut verici terapötik hedefler olarak tanıtılmışlardır. Hücreler içindeki tüm sinyal ağlarının düzenlenmesini sağlayan tümör baskılayıcı miRNA'ların düzenleyici potansiyeli, onları kanser terapilerini geliştirmek

için ilginç bir seçenek haline getirir. miRNA'ların düzensizliği tüm kanser türlerinin patogeneze katkıda bulunmaktadır. Özellikle, Let-7 ve miR-34 ailesinin üyeleri gibi tümör baskılayıcı miRNA'ların azalan ifadesi, tümör ilerlemesini, invazyon ve metastazını teşvik eder. Son birkaç yıllık geçmişe baktığımızda, miRNA replacement (yerine koyma) tedavisinin önemli ölçüde iyileşmeye tanık olmuştur. Bu yaklaşım, sentetik miRNA mimiklerini veya miRNA ekspresyon plazmidlerini kullanarak tümör hücrelerinde tümör baskılayıcı miRNA fonksiyonunu yenilemeyi amaçlar. Çeşitli miRNA yerine koyma terapilerinin şu anda klinik araştırmada olması, bu yaklaşımın kanseri tedavi etme potansiyelini göstermektedir (Hosseinahli vd., 2018, Zhang vd. 2019, Mollaei vd., 2019).

2.5.1. miR-145-5p'nin meme kanseri ve metastazla ilişkisi

MikroRNA'lar, temel biyolojik işlemlerin küçük, kodlamayan, endojen, evrensel RNA düzenleyicileridir. Kanserde miRNA profilinin düzensizliği, invazivlik ve metastazın aktivasyonu da dahil olmak üzere hastalık gelişim mekanizmalarıyla ilişkilendirilmiştir (Lin ve Gregory, 2015).

miR-145, hücrelerin göç, istila ve metastazı düzenleyen miRNA'ların temsilcisidir. Meme kanseri hücrelerinde, her ikisi de hücre invazyonuna bağlı olarak müsin-1 (MUC1) ve c-MYC mRNA'yı hedeflemektedir (Sachdeva ve Mo, 2010). miR-145 aşağı regülasyonu invaziv meme karsinomlarının yaklaşık %10'unda tespit edilir. miR-145'in üçlü negatif meme kanserinde ARF6 proteinini düzenleyerek invazyonunu düzenlediği de gösterilmiştir (Eades vd., 2015). Son çalışmalar, miR-145'in yukarı regülasyonunun, MDA-MB-231 hücrelerinde hücre hareketliliğini, birleşik yapışma molekülü A (JAMA-A) ve fasininin yanı sıra ROCK1 gibi birkaç hareketlilik ile ilgili proteinin ekspresyon üzerindeki etkisinin hedeflenmesi yoluyla önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Sachdeva ve Mo, 2010, Götte vd., 2010).

miR-145-5p ekspresyonu, meme kanseri dokularında aşağı regüle edilir ve SOX2 ekspresyonu ile negatif korelasyon gösterir. Azalan miR-145-5p ekspresyonu, daha fazla tümör büyüklüğü, distal metastaz, daha yüksek Ki67 ekspresyon seviyesi ve daha az sağkalım ile anlamlı şekilde ilişkilidir. Yapılan çalışmalar, miR-145-5p, SOX2'yi hedef alarak meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. miR-145-5p, SOX2'yi hedefleyerek meme kanseri hücrelerinin çoğalmasında baskılayıcı bir rol

oynamıştır ve miR-145-5p, meme kanserli hastalarda risk değerlendirmesi için varsayılan bir biyobelirteç olarak kabul edilmiştir (Tang vd., 2019).

Bazı çalışmalarda, miR-145'in baskılandığı meme kanserinde RTKN'e bağlı hücre proliferasyonu artmakta olduğu tespit edilmiştir. miR-145'in RTKN'yi doğrudan hedef alarak meme kanseri hücre büyümesini inhibe ettiği literatürdeki çalışmalar tarafından kanıtlanmıştır (Wang vd., 2009).

2.6. TGF- β SMAD Sinyal Yolağı

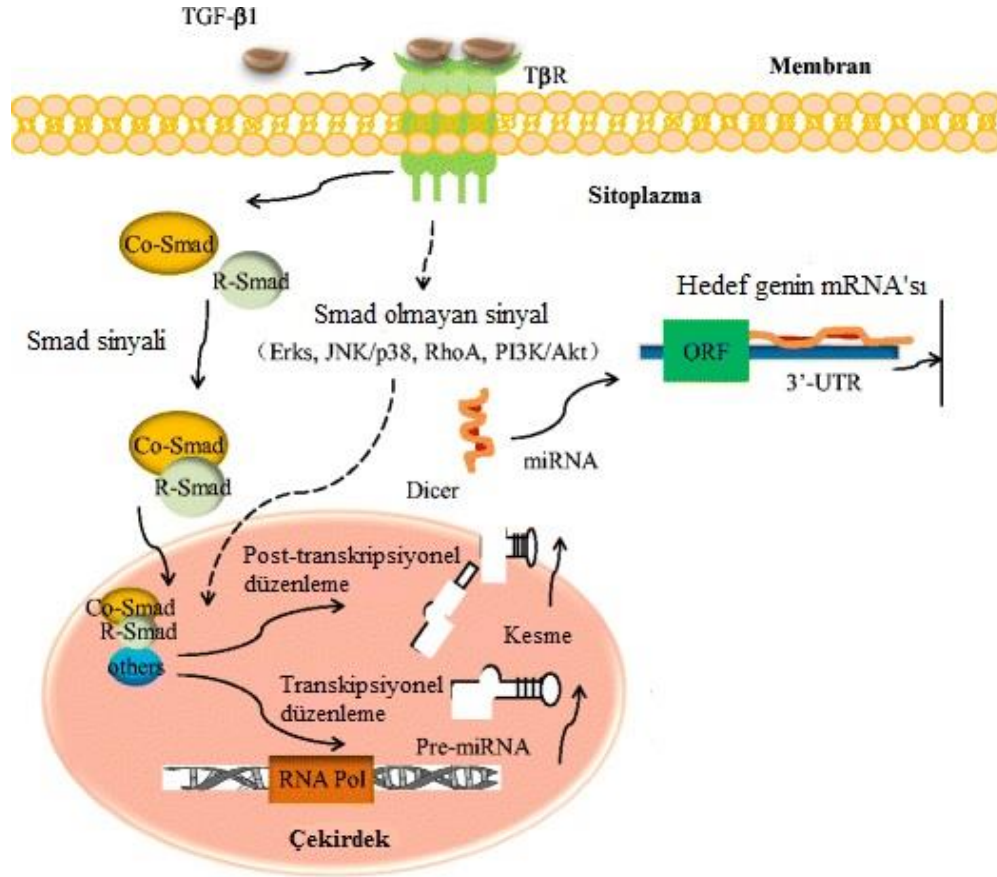
TGF- β ailesi üç TGF- β izoformu, aktivinleri, nodal, kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), büyüme ve farklılaşma faktörlerinden oluşur (Miyazawa vd., 2002, Morikawa vd., 2016). Bu üyeler, içeriğe bağlı ve hücre tipine özgü bir şekilde hücre büyümesi, farklılaşması, yapışma, göç ve ölüm gibi çoklu hücre fonksiyonlarını düzenlerler (Morikawa vd., 2016, David ve Massague, 2018, Massague, 2012).

TGF- β , yapısında bir disülfid köprüsü bulunan 25 kDa'luk bir homodimerdir. TGF- β hücrede inaktif pro-peptid şeklinde sentezlenir ve LTB- β (latent TGF- β -bağlayan proteinler) ile kompleks oluşturarak latent (inaktif) TGF- β formunda salgılanır (Vural P., 2010). Yolağın aktivasyonu TGF- β ligandının hücre membranında bulunan iki tip reseptöre bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu reseptörler, TGF- β tip I reseptörü (T β RI) ve TGF- β tip II reseptörü (T β RII) olarak tanımlanmıştır. Bu reseptörlerin serin treonin kinaz özelliği bulunmaktadır ve ligandın reseptöre bağlanması kinaz aktivasyonuna neden olmaktadır. Ligand reseptörlere bağlanması üzerine, spesifik tetramerik tip II ve tip I reseptör kompleksleri, aşağı akış sinyallerini iletmek için aktive edilir. Ligand önce hücre membranında bulunan TGF- β tip II reseptörüne bağlanarak kinaz aktivitesini sağlar ki, bu da ardından tip I reseptörünün Glisin Serin bölgesinden fosforillenmesine sebep olur. TGF- β tip I reseptörleri, reseptör tarafından düzenlenen Smad'ları (R-Smad'lar) fosforilleyerek aktive eder. SMAD'lar 3 gruba ayrılırlar: reseptör (R-SMAD) SMAD'lar (SMAD-1, SMAD-2, SMAD-3, SMAD-5 ve SMAD-8), ortak (co-SMAD) SMAD (SMAD-4), inhibitör (I-SMAD) SMAD'lar (SMAD-6 ve SMAD-7). Bu reseptör SMAD'lardan, SMAD-2 ve SMAD-3 TGF- β sinyal yolağında, SMAD-1, SMAD-5 ve SMAD-8 ise BMP sinyal yolağında işlev yapmaktadırlar. Tipik olarak, TGF- β izoformları ve aktivinleri, SMAD-2 ve SMAD-3'ün fosforilasyonunu tetiklerler (Suzuki H.İ., 2018, Shi Y. ve Massague J., 2003, Miyazawa, K. vd., 2002). R-SMAD'lar

ligand/reseptör etkileşimiyle aktive ederken, co-SMAD olan SMAD-4 ise bunun aksine R-SMAD'lar tarafından aktivlenir. I-SMAD'lar ise SMAD-reseptör veya SMAD-SMAD etkileşimlerini inhibe ederek TGF- β yolunun kontrolünde işlev yaparlar (Massague vd., 2005, Miyazawa ve Miyazono, 2017).

Daha sonra, R-Smad'lar ortak bir SMAD (co-SMAD) ile kompleks oluştururlar. SMAD-4, TGF- β ailesi sinyal yollarıyla paylaşılan memelilerdeki tek eş SMAD'dır. R-SMAD/co-SMAD kompleksleri çekirdeğe transloke olur ve çeşitli hedef genlerin transkripsiyonunu bir dizi transkripsiyon faktörü ve transkripsiyonel modülatör ile birlikte düzenlerler (David ve Massague, 2018, Massague, 2012,). Bu mekanizma Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

SMAD proteinlerinin yapısında N ve C-terminali olarak tanımlanan iki globüler bölge bulunmaktadır. N-terminali MH1 bölgesi, C-terminali ise MH2 bölgesine sahiptir. N-terminalindeki MH1 bölgesi, 5'-AGAC-3' nukleotid dizisini tanıyarak DNA'ya bağlanmayı sağlar. C-terminalindeki MH2 bölgesi ise SMAD-reseptör, SMAD-SMAD ve SMAD-transkripsiyon faktör etkileşimlerine aracılık eder (Massague J. vd.,2005, Vural P., 2010). MH2 bölgesinde aktif T β RI tarafından fosforile edilen Ser-X-Ser aminoasit dizisi bulunmaktadır. Ser-X-Ser motifin fosforilasyonundan sonra R-SMAD'lar SMAD-4'ün MH2 bölgesine bağlanırlar. R-SMAD/SMAD-4 kompleksi nukleoporinlerin aracılığı ile sitozolden nukleusa transloke olur. Nukleusta R-SMAD/SMAD4 kompleksi 300-400'e yakın genin promotör bölgesine bağlanarak transkripsiyonu düzenler (Vural P., 2010, Kang Y. vd., 2003, Xu L. ve Massague J., 2004).



Şekil 2.5. TGF- β SMAD sinyal yolağı (kaynak: Guo vd., 2016' dan alınarak düzenlenmiştir)

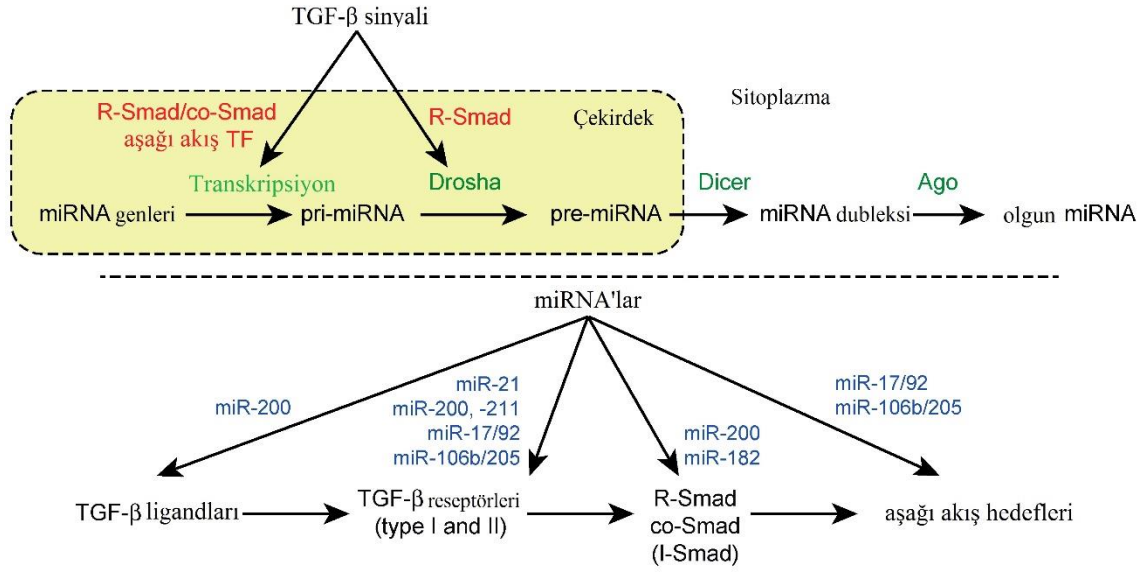
2.7. miRNA'lar ile TGF- β Sinyalinin, TGF- β ile miRNA Ekspresyonunun Düzenlenmesi

miRNA, ortalama olarak 22 nükleotidden oluşan ve kodlayıcı olmayan bir RNA türüdür (Hata ve Chen, 2016, Butz vd., 2012, Lui vd., 2015). miRNA'lar genellikle mRNA'ların 3'-UTR'sinde bulunan kısmen tamamlayıcı dizilerle birleşerek onları degradasyon ya da translasyonunu inhibe etmek için hedeflerler. Bu nedenle miRNA'lar fonksiyonlarını transkripsiyon sonrası seviyede uygularlar. %50 protein kodlayan genlerin miRNA'lar tarafından kontrol edilebildiği ve belirli bir miRNA'nın aynı anda onlarca mRNA'yı etkileyebileceği, bir mRNA'nın birden fazla miRNA tarafından hedeflenebileceği tahmin edilmektedir (Hata ve Chen, 2016, Lui vd., 2015.).

Bazı miRNA'lar, ligandları, reseptörleri, R-SMAD, co-SMAD, I-SMAD ve SMAD olmayan yol bileşenlerini ve TGF- β 'nın aşağı akış (downstream) hedeflerini hedefleyerek TGF- β sinyalinin modulatorleri oldukları deneysel olarak doğrulanmıştır (Guo vd., 2016, Janakiraman vd., 2018). Gerçekten de bu, çok çeşitli hücre tiplerinde sıklıkla gözlenen

durumdur (Hata ve Chen, 2016, Butz vd., 2012, Lui vd., 2015). TGF- β reseptörlerini, özellikle tip II reseptörünü hedef alan birçok miRNA, çeşitli kanser türlerinde tanımlanmıştır. miR-21, miR-17/92 kümesi, miR-106b, miR-211 ve miR-590 (Yu vd., 2012, Jiang vd., 2012), bu miRNA'lar onkogeniktirler. Bu miRNA'lar, farklı kanser hücreleri tiplerinde kemoterapötik ilaçlara, proliferasyon, invazyon ve hücre direncini teşvik ederler (Guo vd., 2016, Janakiraman vd., 2018). Buna karşılık TGF- β ; SMAD'ları, promotörleri içinde SBE'lere (SMAD Bağlayan Elemanlar), diğer transkripsiyon faktörleri ve ko-faktörleriyle birlikte, protein kodlayıcı genlerinkine benzer bir şekilde bağlayarak miRNA ekspresyonunu düzenleme yeteneğine sahiptir. TGF- β ve miRNA'lar arasındaki bu geri düzenleme (feedback) modu, TGF- β 'nın karmaşık patofizyolojik görevleri açısından önemli bir rol oynayan TGF- β sinyal düzenlemesi için başka bir rol eklemiştir. Örneğin, miR-21'in birkaç farklı hücrede TGF- β tarafından yukarı doğru regüle (upregule) edildiği bulunmuştur ve T β RII'yi hedefleyerek glioblastoma hücrelerinde TGF- β 'nın tümör baskılayıcı fonksiyonunu inhibe ettiği, TGF- β aracılı kanserle ilişkili fibroblast oluşumunu teşvik ettiği veya fare akciğerinde SMAD-7'yi hedefleyerek, sırasıyla negatif veya pozitif bir geri düzenleme döngüsü oluşturduğu saptanmıştır (Wang vd., 2017, Papagiannakopoulos vd., 2008).

Şaşırtıcı bir şekilde, R-SMAD proteinleri, birincil miRNA (pri-miRNA)'ların kök bölgesi içindeki bir dizisine bağlanarak ve Drosha mikroişlemci kompleksinin bir RNA helikaz bileşeni olan p68 (DDX5) miRNA ekspresyonu üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Davis vd., 2010, Davis vd., 2008). Bu şekilde, R-SMAD'ların 44 tip miRNA'nın işlenmesini ve olgunlaşmasını teşvik ettiği tespit edilmiştir. Bu nedenle, TGF- β sinyalleri ve miRNA'lar farklı şekillerde birbirlerini hassas bir şekilde kontrol ederler (Şekil 2.6) (Yan vd., 2018).



Şekil 2.6. miRNA biyogenezinin TGF- β sinyalleriyle düzenlenmesi ve TGF- β sinyal bileşenlerinin miRNA'lar tarafından düzenlenmesi (kaynak: Suzuki H.İ., 2018'den alınarak düzenlenmiştir).

2.7.1. miR-145-5p ve TGF- β yolak aktivasyonu

miRNA'lar proliferasyon, göç ve apoptozun inhibisyonu dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri düzenlemek için önemlidirler (Kloosterman ve Plasterk, 2006). miR-145 kanserde geniş çapta çalışılmış ve mesane kanseri (Kou vd., 2014), kolorektal kanser (Qin vd., 2015) ve akciğer kanseri (Zhang ve Lin, 2015) ve meme kanseri (Ding vd., 2017) dahil olmak üzere çok çeşitli tümörlerde düşük seviyelerde eksprese edildiği gösterilmiş bir mikroRNA'dır.

SMAD'lar, hücre dışı sinyalleri TGF- β ligandlarından akış aşağı (downstream) gen transkripsiyonunu uyarmak üzere çekirdeğe aktaran hücre içi proteinlerdir. SMAD aracılı yolda, TGF- β bağlanması üzerine, tip II reseptörü kinazı, SMAD-2 ve SMAD-3 proteinlerinin fosforilasyonundan ve stimülasyonundan sorumlu olan tip I reseptörü kinazını uyarır. Fosforilasyon, SMAD-4 ile ilişkilerini ve daha sonra TGF- β 'ya yanıt veren genlerin ekspresyonunu düzenlemek için çekirdeğe translokasyona neden olur (Papageorgis, 2015, Mise vd., 2012). TGF- β 'ya yanıt olarak, SMAD-3 ayrıca MRTF'lerin ekspresyonunu ve nükleusa taşınmasını da tetikler ve MRTF'lerle işbirliği yaparak myo-broblast farklılaşmasını uyarmak için, özellikle SNAIL2 ekspresyonunu artırır. Sabit SMAD3 ekspresyonu, SRF-MRTF kompleks oluşumunu kısıtlar, bu nedenle myo-broblastlarda görüldüğü gibi α -düz kas aktin (α SMA) ekspresyonunu inhibe eder (Masszi vd., 2010). Ayrıca, miR-145 SMAD-3'ü doğrudan hedefleyerek SMAD-

3'ün 3'-UTR'sine bağlanarak bastırır. Nazofarengeal karsinom (NPC) hücrelerinde SMAD-3'ün baskılanması, miR-145 etkisine bağlı olarak hücre göçünü ve invazyonunu önler. Ayrıca, SMAD-3 ekspresyonu klinik örneklerinde miR-145 düzeyi ile ters ilişkilidir. İlginç olan ise, SMAD-3'ün miRNA olgunlaşma sürecini artırabildiği ve miR-145 biyosentezini indükleyebildiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Bununla birlikte, SMAD-3, NPC hücre hatlarında SMAD-3 baskılandığında miR-145 ifadesini azaltamamıştır. Dolayısıyla, miR-145 ve SMAD-3 arasındaki düzenleyici korelasyon, miR-145'den SMAD-3'e bir yol olabilir. Bu anlamda, araştırmalardan elde edilen sonuçlar miR-145'in, miR-145/SMAD-3 tarafından invaziv ve metastatik özelliklerini etkileyen bir tümör baskılayıcı olduğunu göstermektedir (Huang vd., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, üçlü negatif meme kanser hücre (MDA-MB-231) hattında baskılandığı biyoinformatik analiz (meta analiz)'lerle belirlenen (Emilia Qomi Ekenel, Doktora Tez Projesi, Proje No: 1505F424) miR-145-5p, bu hücrelere in vitro transfeksiyon yöntemiyle aktarılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Gereçler.

RPMI-1640 Medium (Thermo Fisher Scientific, cat.no:11875093), RPMI 1640 medium (BI, cat.no: 01-100-1A), hsa-miR-145-5p mimik (Qiagen. cat.no: MS00003528), pozitif kontrol siRNA(Qiagen, cat.no: 1027298), negatif kontrol siRNA (Qiagen, cat.no: 1027280), HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, cat.no: 301705), Penicilin-Streptomycin (Sigma, cat.no:P0781), Fetal Bovine Serum (Sigma, cat.no: F7524), Trypsin-EDTA solüsyonu (Sigma, cat.no: 59418C), PBS (Sigma, cat.no:P4417), PBS-EDTA (Sigma, cat.no: E6758), sıvı azot, 0.5 ml'lik nükleaz içermeyen PCR tüpleri (Thermo Fisher Scientific, cat.no: AM12250), 15ml'lik nükleaz içermeyen santrifüj tüpleri, 10 µl, 200 µl, 1000 µl nükleaz içermeyen pipet uçları, 24'lü plaka (ThermoFisher Scientific, cat.no: 142475),

3.2. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Yüksek devirli santrifüj, sterilizatör, otoklav, PH metre, steril kabin, ultrasonik su banyosu, inverted mikroskop (IX71 Olympus), 0.1-2 µl, 1-10 µl, 0.2-10 µl, 20-200 µl ve 100-1000 µl'lik otomatik pipetler (Ependorf), -20 ve -86 °C derin dondurucu, sıvı azot tankı, manyetik karıştırıcı. Hücre sayımı cihazı CEDEX® (Roche) ve ona uygun çok kanallı plakası, CO₂ inkübatörü (Hera).

3.3. Hücrelerin Kültüre Edilmesi

MDA-MB-231 hücre hattı ATCC hücre bankasından elde edilmiştir. hücre kültürüne uygun steril kabinde %20 FBS, %1 Pen.Strep ve %5 DMSO içeren RPMI-1640 besiyeri içerisinde stoklanmıştır. Sonrasında MDA-MB-231 hücreleri %10 FBS, %1 Pen.Strep, %1 Non-Esential Aminoacid varlığında RPMI-1640 besiyerinde 25 cm²'lik flaskta %5 CO₂ ortamında, %95 hava ve 37°C ısıya sahip inkübatörde kültüre edilmiştir. 25 cm²'lik flaskta büyüyen ve yoğunluğu %75 oranında olan hücrelerden eski besiyeri uzaklaştırılmıştır. 1.5 ml PBS solüsyonuyla muamelenin ardından PBS aspire edilmiştir.

1.5ml PBS-EDTA solüsyonu ile muamelenin ardından PBS-EDTA aspire edilmiş ve hücrelerin zeminden kalkması amacıyla 600 µl Trypsin-EDTA solüsyonu hücrelerin üzerine verilmiştir. 3 veya 4 dakika %5 CO₂, %95 hava ve 37⁰C ısıya sahip inkübatörde bekletmenin ardından kalkan hücrelerin üzerine enzimi inaktive etmek amaçlı 8 ml besiyeri verilmiştir. Daha sonra fasktan toplanan hücreli süspansiyon 15 ml’lik santrifüj tüpüne alınmış ve 5 dakika 1500 rpm’de yüksek devirli santrifüjde santrifüjlenmiştir. Süre sonunda santrifüjden alınan tüp steril kabine alınmış ve süspansiyon kısmı hücre pelletine kadar aspire edilmiştir. Hücre pelleti homojen hale gelene kadar pipetlenmiştir. Ardından hücreli süspansiyon önceden içerisine 10 ml besiyeri konulan 75 cm²’lik flaska aktarılmıştır. Bu şekilde en az 2 alt kültür (pasajlama) işlemi yapılmış ve hücreler sonraki deneyler için hazırlanmıştır.

3.4. Transfeksiyon

3.4.1. Hsa-miR-145-5p mimik transfeksiyonu

MDA-MB-231 hücreleri %10 FBS, %1 Pen.Strep içeren RPMI 1640 besiyerinde, %5 CO₂, %95 hava ve 37⁰C ısı ortamına sahip inkübatörde 75 cm²’lik flakta kültüre edilmiştir. Hücrelerin yoğunluğu %75 olacak şekilde mimik transfeksiyonu için hazırlanmıştır.

MDA-MB-231 hücrelerine ilk önce PBS, ardından PBS-EDTA ile muamele edilmiş, sonrasında Tripsin-EDTA enzim solüsyonu verilmiş ve hücrelerin flakın zemininden kalkması sağlanmıştır. Daha sonrasında hücrelerin üzerine besiyeri ilave edilerek hücreler 15 ml’lik santrifüj tüpüne toplanmış ve 5 dakika 1500 rpm’de santrifüjlenmiş, süspansiyon kısmı pellete kadar aspire edilmiş ve pellet homojenizasyonu sağlanana kadar pipetlenmiştir. Hücre sayımı için 10 µl hücreli süspansiyondan 10 µl tripan mavisi boyadan alınmış ve bir parafilm üzerinde karıştırıldıktan sonra, karışımdan 10 µl CEDEX plakasının kuyusuna verilmiş ve cihazda okuma gerçekleştirilmiştir. Üç ardışık okuma sonucunun ortalaması alınarak hesaplama yapılmış ve 24’lü plakanın her kuyusuna 500 µl %10 FBS, %1 Pen.Strep içeren besiyerinde 3x10⁴ hücre ekilmiştir. İşlemler sonrasında plaka %5 CO₂, %95 hava ve 37⁰C ısı ortamına sahip inkübatörde bekletilmiştir. Ardından, hücre ekimi ve mimik transfeksiyonu ardışık şekilde, hücreler plakanın tabanına yapışmadan yapılmıştır. Bu amaçla Hsa-miR-145-5p özgül sentetik mimiği “Hi-Perfect Reagent” transfeksiyon

ajanının 24'lü plaka için protokolüne uygun şekilde, hedef hücrenin içine in-vitro olarak transfeğe edilmiştir. Hücreler ekildikten sonra; 24'lü plakanın 2 kuyusu kontrol, 2 kuyusu pozitif kontrol siRNA, 2 kuyusu negatif kontrol siRNA, 2 kuyusu sadece HiPerfect reagent, diğer kuyular ise hsa-miR-145-5p mimik transfeğe olacak şekilde deney düzeneği oluşturulmuştur.

Yukarıda belirtilen kontrol gruplarını hazırlamak için 4 adet 0.5 ml'lik tüp Tablo 3.1'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.1. *Transfeksiyon için kontrol gruplarının hazırlanması*

Kontrol tüp	HiPerfect tüp	+ kontrol siRNA	- kontrol siRNA
Serumsuz ve antibiyotiksiz medium 200 µl	Serumsuz ve antibiyotiksiz medium 200 µl + 9 µl HiPerfect Reagent	Serumsuz ve antibiyotiksiz medium 300 µl + 0.9 µl siRNA + 13.5 µl HiPerfect Reagent	Serumsuz ve antibiyotiksiz medium 300 µl + 0.9 µl siRNA + 13.5 µl HiPerfect Reagent

Hsa-miR-145-5p mimik ise 15 ml'lik tüpte Tablo 3.2'deki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.2. *Hsa-miR-145-5p mimiğinin hazırlanması*

1700 µl (serumsuz antibiotiksiz medium) + 5.1 µl (miR-145-5p mimik) + 76.5 µl (HiPerfect reagent)
--

Hazırlanan tüpler vortekslenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında işaretli tüplerden kontrol grupları ve mimik uygun kuyulara her kuyuya 100 µl olacak şekilde damla damla verilmiştir. İşlem bittikten sonra plaka dairesel hareketler yapılarak mimik ve kontrol gruplarının kuyuların her tarafına yayılması sağlanmıştır ve CO₂ inkübatörüne bırakılmıştır. Hücreler hergün takip edilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (Real time qPCR; RT qPCR)

3.5.1. Kullanılan ekipmanlar ve ticari kitler

RNA izolasyon kiti (Qiagen, cat.no: 74104), cDNA sentez kiti (Qiagen, cat.no: 330401), SMAD-3 forward primer (IDT, cat.no:75921461), SMAD-4 forward primer (IDT, cat.no:75921459), β -aktin forward primer (IDT, cat.no:75921463), SMAD-3 reverse primer (IDT, cat.no:75921462), SMAD-4 reverse primer (IDT, cat.no:75921460), β -aktin reverse primer (IDT, cat.no:75921464), SMAD-3 TaqMan işaretli prob (IDT, cat.no:75921475), SMAD-4 TaqMan işaretli prob (IDT, cat.no:75921474), β -aktin TaqMan işaretli prob (IDT, cat.no:75921476), innuDRY qPCR masterMix (Analytikjena, cat.no: 845-AS-1900200), real-time PCR cihazı (Agilent Technologies, Stratagene Mx3005P), mini santrifüj (Spectrafuge 16M), nükleaz içermeyen PCR tüpleri (Thermo Fisher Scientific, cat.no: AM12230), nükleaz içermeyen pipet uçları, ayarlanabilir otomatik pipetler (Ependorf), steril kabin (Hera), NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, ND-1000 Spectrophotometer), nükleaz içermeyen su (Himedia, cat.no: ML064), 15 ml'lik tüpler, Trypsin-EDTA (Sigma, cat.no: 59418C), RPMI-1640 medium (Thermo Fisher Scientific, cat.no:11875093).

3.5.2. RNA izolasyonu

Hiçbir uygulama yapılmayan MDA-MB-231 hücrelerinden ve hsa-miR-145-5p sentetik mimik uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. hiçbir uygulama yapılmayan MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen RNA kontrol grubu olarak, mimik uygulanan hücrelerden elde edilen RNA ise deney grubu olarak karşılaştırılmıştır.

RNA izolasyonu kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir (Qiagen, cat.no: 74104).

- ✓ Öncelikle Trypsin-EDTA ile hücreler kaldırılmış ve besiyeri ile eklenerek hücreler 15ml santrifüj tüpünde toplanmış, ardından santrifüjlenerek hücre pelletinden süspansiyon kısmı tamamen uzaklaştırılmıştır.
- ✓ Hücre pelletinin üzerine 700 μ l Qiazol Liziz tamponu eklenmiş ve tamamen homojen olması amacıyla 1 dakika vortekslenerek, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

- ✓ Ardından 140 µl kloroform eklenerek, 15 dakika 8500 rpm'de +4°C sıcaklıkta santrifüjlenmiş ve ayrışan en üstteki RNA barındıran şeffaf sıvı yeni bir PCR tüpüne aktarılmıştır.
- ✓ Üzerine 520 µl %100 etanol eklenmiş ve pipetlenerek homojenizasyon sağlanmıştır.
- ✓ RNA'yı tutan kolonu 2 ml'lik tüpe yerleştirdikten sonra karışımın bir kısmı eklenerek 15 sn 8500 rpm'de santrifüjlenmiş ve dibe toplanan sıvı atılmış kalan karışım tekrar eklenerek santrifüjlenmiş, böylece RNA kolonlarda toplanmıştır.
- ✓ RNA içeren kolon yeni bir 2 ml'lik tüpe yerleştirilmiş ve 700 µl RWT tamponu eklenerek 15 sn 8500 rpm'de santrifüjlendikten sonra tüpün dibine toplanan sıvı atılmıştır.
- ✓ 500 µl RPE tamponu eklenerek 15 sn 8500 rpm'de santrifüjlendikten sonra tüpün dibine toplanan sıvı atılmıştır.
- ✓ Yine 500 µl RPE tamponu eklenerek 2 dk 8500 rpm'de santrifüjlendikten sonra alttaki 2 ml'lik tüp atılmış ve RNA'yı tutan kolon 1.5 ml'lik yeni tüpe aktarılmıştır.
- ✓ Ardından kolona 60 µl nükleaz içermeyen su eklenmiş ve 8500 rpm'de 1 dk santrifüjlenerek RNA kolondan tüpe aktarılmıştır.
- ✓ RNA miktarını belirlemek için NanoDrop spektrofotometre cihazında ölçüm yapılmıştır.
- ✓ Ters transkriptaz PCR'da kullanılasıya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.3. Ters transkriptaz PCR

Gerçek zamanlı PCR'da kullanılmak üzere, MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen RNA'dan cDNA sentezlemek amacıyla ters transkriptaz PCR işlemi yapılmıştır. Hem kontrol grubu olan RNA'dan, hem de deney grubu RNA'dan cDNA sentezlenmiştir. cDNA sentezi kit protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Protokole göre gereken RNA miktarı 25 ng-5µg arasında değişmekte ve ölçülen RNA miktarına göre hesaplama yapılmış ve aşağıdaki şekilde cDNA sentezlenmiştir.

- ✓ 0.2 µl'lik nükleaz içermeyen iki adet tüp deney ve kontrol grubu olarak işaretlenmiştir.

- ✓ Deney grubu için işaretlenen tüpe 6 µl GE2 tamponu, 2 µl nükleaz içermeyen su ve 6 µl RNA eklenmiştir.
- ✓ Kontrol grubu için 6 µl GE2 tamponundan, 8 µl de RNA eklenmiştir.
- ✓ Her iki grup cDNA tüpü 1000 g'de 1 dk santrifüjlenmiş, ardından 10dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- ✓ Ardından her iki tüpede ayrı ayrı 6 µl BC4 tamponu eklenerek, 1000 g'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- ✓ Tüpler PCR cihazına yerleştirilmiş ve 42°C'de 15 dk, 95°C'de 5 dk, ve 4°C'de sonsuz olarak termal profil oluşturulmuş ve PCR başlatılmıştır.
- ✓ İşlem bittikten sonra tüpler gerçek zamanlı kantitatif PCR'da kullanılacak zamana kadar -20°C'de saklanılmıştır.

3.5.4. Liyofilize master mix, TaqMan® Prob, primerlerin sulandırılması.

Sulandırma işlemi master mix, TaqMan® Prob, primerlerin protokollerine göre gerçekleştirilmiştir.

Master mix sulandırılması

- ✓ Liyofilize pellet şeklinde olan master mix tüpüne 1 ml sulandırma tamponu aktarılmış ve vortekslenerek pellet tamamen çözünmüş, 2X master mix hazırlanmıştır. Kullanılacak zamana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

TaqMan® Probların 100 µM ana stok hazırlamak için sulandırılması

- ✓ SMAD-3 geni için liyoflize pelletin üzerine 520 µl sulandırma tamponu eklenmiş ve vortekslenerek çözünmüştür.
- ✓ SMAD-4 geni için liyoflize pelletin üzerine 608 µl sulandırma tamponu eklenmiş ve vortekslenerek çözünmüştür.
- ✓ β-actin geni için liyoflize pelletin üzerine 151 µl sulandırma tamponu eklenmiş ve vortekslenerek çözünmüştür.
- ✓ Daha sonra herbir gen problemleri için 100 µM ana stoktan gereken miktarda 10 µM çalışma stoğu hazırlanmıştır. Hazırlanan 100 µM ve 10 µM stoklar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Forward ve reverse primerlerin 100 µM ana stok hazırlamak üzere sulandırılması

- ✓ SMAD-3 geni için forward primer liyoflize pelletinin üzerine 742 µl sulandırma tamponu eklenmiş ve vortekslenerek çözünmüştür. Aynı genin reverse primer liyoflize pelletinin üzerine 766µl sulandırma tamponu eklenmiş ve vortekslenerek çözünmüştür.
- ✓ SMAD-4 geni için forward primer liyoflize pelletinin üzerine 674 µl sulandırma tamponu eklenmiş ve vortekslenerek çözünmüştür. SMAD-4 genin reverse primer liyoflize pelletinin üzerine 841µl sulandırma tamponu eklenmiş ve vortekslenerek çözünmüştür.
- ✓ β-actin geninin forward primer liyoflize pelletinin üzerine 730 µl sulandırma tamponu eklenmiş ve vortekslenerek çözünmüştür. Aynı genin reverse primer liyoflize pelletinin üzerine 756µl sulandırma tamponu eklenmiş ve vortekslenerek çözünmüştür.
- ✓ Herbir gen primerleri için 100 µM ana stoktan gereken miktarda 10 µM çalışma stoğu hazırlanmıştır. Hazırlanan 100 µM ve 10 µM stoklar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.5.5. Gerçek zamanlı kantitatif PCR reaksiyonu

- ✓ Kullanılacak olan nükleaz içermeyen PCR tüpleri soğuk bloğa alınmıştır.
- ✓ PCR analizinde kullanılacak olan cDNA’yı 1/10 oranında dilüe etmek amacıyla, yeni bir tüpe 90 µl nükleaz içermeyen su ve 10 µl cDNA eklenmiştir.
- ✓ Her hedef gen (SMAD-3, SMAD-4) ve housekeeping gen (β-actin) için ayrı ayrı gerçek zamanlı PCR karışımı Tablo 3.3’de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. RT-qPCR reaksiyo tüplerinin hazırlanması

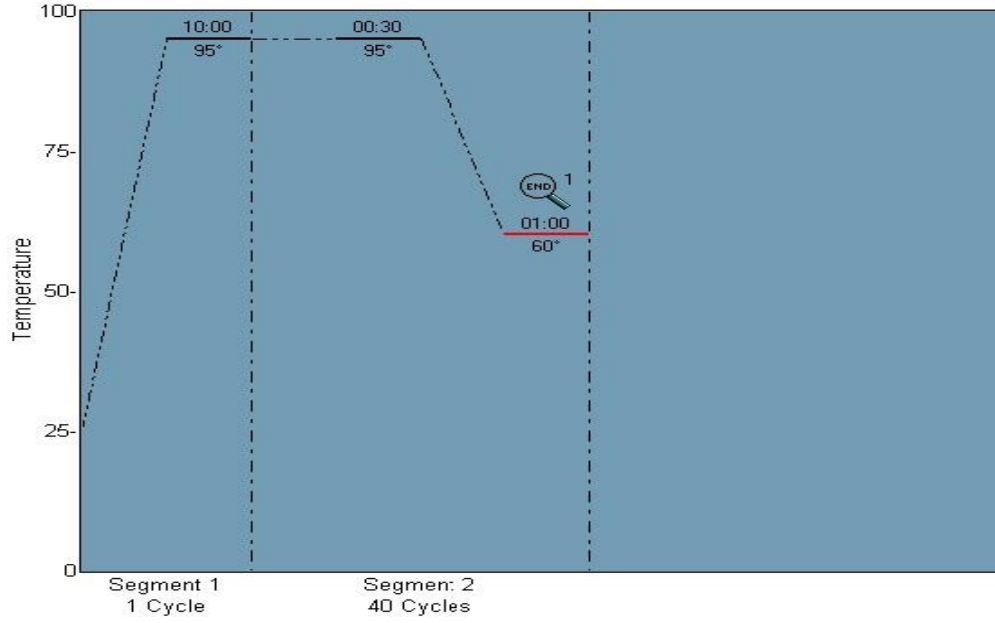
Karışım içeriği	Hacim(µl- final konsantrasyon)	x Örnek sayısı
Forward primer (10 µM)	2 µl - 1 µM	7
Reverse primer (10 µM)	2 µl – 1 µM	7
TaqMan prob (10 µM)	0.4 µl – 0.2 µM	7
Master mix (2x)	10 µl – 1x	7

- ✓ Her genin kontrol grubu için 3 örnek, deney grubu için 3 örnek ve 1 negatif kontrol olacak şekilde reaksiyon tüpleri hazırlanmıştır.

- ✓ Hazırlanan tüplere, her gen için gerçek zamanlı PCR karışımından 14.4 µl konulmuş, ardından 1/10 oranında dilüe edilen cDNA'dan 5.6 µl eklenmiş ve kısa sentrifüj yapılmıştır.
- ✓ Negatif kontrol tüplerine sadece gerçek zamanlı PCR karışımından 14.4 µl konulmuş, üzerine 5.6 µl nükleaz içermeyen su eklenmiştir.
- ✓ Toplam hacim 20 µl olmuştur.
- ✓ Hazırlanan örnekler cihaza yerleştirilmiştir.

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Not in Use	Unknown	Unknown	Unknown	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Unknown
	NORM	NORM	NORM	FAM	NORM	NORM	NORM	FAM	FAM	FAM	FAM	NORM
B	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use
	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM
C	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Not in Use	Unknown	Unknown	Unknown	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Unknown
	smad3	smad3	smad3	FAM	smad3	smad3	smad3	FAM	FAM	FAM	FAM	smad3
D	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use
	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM
E	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Not in Use	Unknown	Unknown	Unknown	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Unknown
	smad4	smad4	smad4	FAM	smad4	smad4	smad4	FAM	FAM	FAM	FAM	smad4
F	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use
	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM
G	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use
	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM
H	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use	Not in Use
	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM

Şekil 3.1. RT-qPCR plaka profili (1,2,3'cü sütunun A satırı kontrol β -aktin, C satırı kontrol SMAD-3, E satırı kontrol SMAD-4 geni; 5,6,7'ci sütunun A satırı mimik β -aktin, C satırı mimik SMAD-3, E satırı mimik SMAD-4 geni; 12'ci sütunda ise negatif kontrol grubu analiz edilmiştir)



Şekil 3.2. RT-qPCR termal profili

- ✓ Önce plaka profili (şekil 3.1), ardından termal profil (şekil 3.2) oluşturulmuş ve gerçek zamanlı PCR analizi başlatılmıştır.

Tablo 3.4. RT-qPCR analizinde kullanılan primer ve prob dizileri.

Gen Sembolü	Sekanslar (5'-3')	Primer	Ürün uzunluğu (bp)
SMAD4	GGATCAAAATTGCTTCAGAAATTGG TGCTCAGACAGGCATCATTACTTGTTGG CCACCTTGTCTATGGCACATC	Forward Probe Reverse	149
SMAD3	CTTTGCAGTGGCTTGACAAG TGCCCTCCCCTACCATACTTGATGT AGTTCCAATTTTCTCCACCTC	Forward Probe Reverse	143
β -Actin* (konrol gen)	GAGCTACGAGCTGCCTGACG CATCACCATTGGCAATGAGCGGTTCC GTAGTTTCGTGGATGCCACAG	Forward Probe Reverse	190

3.6. Western Blot

3.6.1. Kullanılan ekipmanlar ve ticari kitleler

RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz, cat.no: sc-24948), Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, cat.no: Q33211), jel (BioRad, Mini-Protean TGX gels, cat.no: 456-8123), 0.2 µm PVDF membran (BioRad, cat.no: 170-4156), β-actin birincil antikor (Santa Cruz, cat.no: sc-47778), SMAD 3 birincil antikor (Cell Signaling Technology, cat.no: C67H9), SMAD4 birincil antikor (Cell Signaling Technology, cat.no: D3M6U), β-actin için ikincil antikor (Santa Cruz, cat.no: sc-2005), SMAD proteinleri için ikincil antikor (Cell Signaling Technology, cat.no: #7074), 20X Bolt™ MOPS SDS yürütme tamponu (Thermo Fisher Scientific, cat.no: B0001), 4X Bolt™ LDS protein yükleme tamponu (Thermo Fisher Scientific, cat.no: B0008), 10X Bolt™ Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific, cat.no: B0009), ultra saf su, E-PAGE™ SeeBlue™ Pre-stained Standard (Thermo Fisher Scientific, cat.no: LC5700), MagicMark™ XP Western Protein Standard (Thermo Fisher Scientific, cat.no: LC5602), Tris base, NaCl, Tween-20, Glisin, Metanol, BSA (VWR life science, cat.no: 0332), süt tozu (Fluka, cat.no: 70166), su banyosu (Sonorex Digital 10P), Qubit® 3.0 Fluorometer cihazı (Thermo Fisher Scientific), Trans-Blot® Turbo™ transfer cihazı (BioRad), LI-COR Odyssey® CLx (Thermo Fisher Scientific) görüntüleme cihazı, görüntüleme tamponu (Advansta, cat.no: K-12043-D10), soğutmalı mini santrifüj, skrapr, 500ml, 1000 ml'lik beherler, pens, 1-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl'lik ayarlanabilir otomatik pipetler (Eppendorf), 10 µl, 200 µl, 1000 µl'lik pipet uçları, 15 ml'lik santrifüj tüpleri, 1.5 ml, 2ml'lik PCR tüpleri (Sigma, cat.no: BR781301).

3.6.2. Protein izolasyonu

Total protein izolasyonu için liziz tamponu RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz, cat.no: sc-24948) kit protokolüne uygun hazırlanmış ve tüm aşamaların soğukta yapılmasına dikkat edilmiştir. 6'lı plakaya ekilen ve hiçbir tedavi uygulanmayan hücrelerden, aynı zamanda 24'lü plakada hsa-miR145-5p mimik transfeksiyonu yapılmış hücrelerden total protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Her iki plaka için protokolün önerdiği miktarlarda liziz tamponu hesaplanmış ve hazırlanmıştır. Liziz tamponu buzda tutulmuştur. Ardından plakalar CO₂ inkübatöründen alınmış, hücrelerin üzerindeki besiyeri plakalar ters çevrilerek uzaklaştırılmıştır. Önceden +4°C'de soğutulmuş PBS ile

3 defa 5'er dakika muamele edilmiştir. Yıkama sonrasında PBS uzaklaştırılmış ve 6'lı plakaya her kuyuya 150 µl, 24'lü plakaya ise her kuyuya 70 µl olacak şekilde liziz tamponu verilmiş, ardından plakalar 30 dakika buz (+4°C) üzerinde bekletilmiştir. 30 dakika bekleme süresinden sonra plakanın kuyularından skrapla hücreler kazıma yöntemiyle zeminden kaldırılmış ve önceden buzda bekletilmiş tüplere alınmış, pipetaj yapılarak pellet çözünmüştür. Ardından, soğutulan (+4°C) santrifüjde tüpler santrifüjlenmiş hücre pelleti ve proteinden oluşan süspansiyon kısmı ayrılmıştır. Protein olan süspansiyon kısım dikkatlice pellete dokunmadan alınmış ve yeni tüplere aktarılmıştır. Protein tüpleri kullanılacak zamana kadar -20°C'de tutulmuştur.

3.6.3. Qubit protein miktar ölçümü

Protein miktar ölçümü için kit (Thermo Fisher Scientific, cat.no: Q33211) protokolüne göre solüsyonlar hazırlanmış ve proteinlerin miktarı tespit edilmiştir.

3.6.4. Gerekli solüsyonların hazırlanması

- ✓ MOPS Bolt SDS yürütme tamponu: 20X ana stok 1X'e ultra saf su ile dilüe edilmiş ve 700 ml 1X çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

35 ml 20X ana stoktan alınmış ve üzerine 665 ml ultra saf su eklenmiştir.

- ✓ TBS 10X 1L ana stok

Tris Base	24g
NaCl	88g
Ultra saf su	1000ml

- ✓ TBS-T 1X 500ml ve %0.1 Tween-20, PH 7.4 olacak şekilde ayarlanmıştır.

50ml TBS 10X ana stoktan alınmış üzerine 450 ml ultra saf su ve 500 µl Tween-20 eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda homojen olasıya kadar karıştırılmıştır.

- ✓ Süt solüsyonu %5, 200ml

10g süt tozu hassas terazide tartılmış, üzerine 200ml TBS-T 1X solüsyonu eklenmiş ve homojen oluncaya kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. PH 7.4'e ayarlanmıştır.

- ✓ BSA %5, 10ml

0.5g BSA tartılmış üzerine 10ml TBS-T 1X ilave edilmiştir.

- ✓ Transfer tamponu 1X 50ml

25 mM Tris Base	0.15 g
-----------------	--------

190 mM Glisin 0.71 g
%20 metanol 10 ml

Hesaplanan miktarlar tartılmış üzerine 40 ml ultra saf su eklenmiş ve homejenizasyonu sağlanana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

3.6.5. Proteinlerin jele yüklenmesi ve yürütülmesi

Protein miktar ölçümü yapılmış ve her kuyuya 40 µg protein yüklenecek şekilde hesaplama yapılmıştır.

Tablo 3.5. Jele yüklenecek protein örneklerinin hesaplanması

	Protein	LDS (4X)	R.A (10X)	Ultra saf su
Protein A	10 µl	10 µl	4 µl	16 µl
Protein B	18 µl	15 µl	6 µl	21 µl

Protein A – hiçbir uygulama yapılmayan MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilmiş protein. Bu protein kontrol olarak kullanılmıştır.

Protein B – hsa-miR-145-5p mimik uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilmiş protein.

Yukardaki Tablo 3.5’deki şekilde hazırlanan proteinler 70⁰C’ye ayarlanan su banyosunda 15-20 dakika kaynatılmıştır. Süre sonunda protein tüpleri su banyosundan alınmış ve soğuması amacıyla buza bırakılmıştır. Bu sırada tüm kDa ağırlıklı proteinler için uygun hazır jel kaseti tanka yerleştirilmiş ve 700 ml 1X yürütme tamponuda eklenmiştir. Proteinlerin kuyudan jele geçmesine engel olacak kalıntılar uzaklaştırılmak amacıyla yürütme tamponuyla pipetaj yapılarak kuyular tek-tek yıkanmıştır. Ardından aşağıdaki tablodaki görünümde önce marker ardından proteinler 10 kuyucuklu jele Tablo 3.6’da belirtildiği gibi yüklenmiştir. Her kuyuya 20 µl hacminde yükleme yapılmıştır.

Tablo 3.6. Jel kuyulunun temsili görüntüsü

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Marker	Protein A	Protein B		Protein A	Protein B		Protein A	Protein B	

Yükleme işlemi bittikten sonra önce 30 dakika 100V'ta, sonra ise 140V'ta yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Yürütme işlemi bittikten sonra jel kaseti tanktan çıkarılmış ve cam kaset bir spatül yardımıyla açılmış, jel kasetten alınıp önceden hazırlanan transfer tamponunda transferin daha iyi gerçekleşmesi amacıyla 10 dakika bekletilmiştir.

3.6.6. Yarı kuru sistem ile transfer (Blotlama)

Transfer işlemi için öncelikle Trans-Blot Turbo (BioRad) cihazı açılmış jel ve membrandan oluşan sandviç yerleştirilicek olan haznesi alınmıştır. Ardından PVDF membran paketi açılmış, jel membranın üzerine arada hava baloncuğu kalmayacak şekilde yerleştirilmiş ve en son jelin üzerine sandviğin son parçası olan sünger ped eklenmiş, arada baloncuk kalmamasına dikkat edilmiştir. Hazırlanan sandviç cihazın çıkarılan haznesine yerleştirilmiş ve uygun programda 2.5 A, 25 V ve 3 dakikada transfer işlemi başlatılmıştır. Transfer bittikten sonra membran cihazdan alınmış ve 3 farklı antikor muamelesi olacağı için yukarıdaki tablodaki görünümde 3 kısıma kesilmiştir. Bunu yapmaktaki amaç stripleme işlemini yapmamaktır, çünkü bu protein kaybına neden olup yanlış sonuç almaya sebep olmaktadır.

3.6.7. Bloklama

3 parçaya ayrılan membranlar ayrı-ayrı kaplarda önceden hazırlanan TBS-T 1X tamponunda 1 kez 5 dakika yıkamanın ardından tampon uzaklaştırılmış ve membranın üzerine gelecek şekilde %5'lik süt solüsyonu eklenmiştir. Membranlara çalkalamalı tabloda oda sıcaklığında 75 dakika bloklama işlemi yapılmıştır. İşlemi yapmaktaki amaç sonraki antikor muamelesinde spesifik olmayan bağlanmaları engellemektir. Süre sonunda süt solüsyonu atılmış ve membranlar 3 kez 5'er dakika aralıklarla kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla yıkanmıştır.

3.6.8. Antikor muamelesi

Bloklama işleminin ardından membranlar Tablo 3.7'de belirtildiği üzere hazırlanan antikorlarla muamele edilmiştir.

Tablo 3.7. Antikor dilisyonlarının hazırlanması

	Birincil antikor (dilisyon-µl)	BSA %5 (µl)	İkincil antikor (dilisyon-µl)	Süt solüsyonu %5 (µl)
SMAD-3	(C67H9) rabbit monoclonal antibody 1:300, 3 ml 10 µl	2990 µl	(#7074) Anti-rabbit IgG, HRP-linked 1:700, 3 ml 4.28 µl	2995.72 µl
SMAD-4	(D3M6U) rabbit monoclonal antibody 1:300, 3 ml 10 µl	2990 µl	(#7074) Anti-rabbit IgG, HRP-linked 1:700, 3 ml 4.28 µl	2995.72 µl
β-aktin	(sc-47778) mouse monoclonal antibody 1:1000, 10 ml 10 µl	9990 µl (süt solüsyonu)	(sc-2005) Goat anti-mouse IgG, HRP-linked 1:1500, 10 ml 6.66 µl	9993.34 µl

Hazırlanan birincil antikor solüsyonları uygun olarak membranların üzerine aktarılmış ve +4°C’de 20 saat çalkalamalı tablada bekletilmiştir.

Süre sonunda birincil antikorlar membranlardan uzaklaştırılmış ve TBS-T 1X solüsyonuyla 3 defa 5’er dakika aralıklarla yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından TBS-T 1X solüsyonu uzaklaştırılmış ve hazırlanan ikincil antikorlar membranlara verilmiş, 1 saat oda sıcaklığında şeykırda çalkalanarak inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Süre bitiminde antikor solüsyonu membranlardan uzaklaştırılmış 3 defa 5’er dakika TBS-T 1X tamponuyla yıkama yapılmıştır.

3.6.9. Görüntüleme

Her membran için ayrı ayrı kit protolölüne göre görüntüleme solüsyonu hazırlanmış ve membranların üzerine verilerek 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Ardından membranlar tek tek LI-COR kemülünisans görüntüleme cihazına ters çevrilerek

yerleştirilmiş ve yüksek hassasiyette okuma yapılarak, elde edilen görüntüler kaydedilmiştir.

3.7. Hücre Göçü Testi

Bu test için plakaya hücre ekilmeden önce kuyuların bir kısmını kaplayacak şekilde steril ince uzun lamel parçaları yetleştirilmiş, daha sonra hücreler ekilmiştir. Ekim yapıldığı gün hücreler zemine yapışmadan önce 3.4.2’de belirtildiği gibi miR-145-5p mimik uygulaması yapılmıştır. 3 kuyuya mimik transfeksiyonu yapılmış, 3 kuyuya ise hiçbir uygulama yapılmayıp kontrol grubu olarak işaretlenmiştir. 24 saat sonra hücreler yapışmış ve lameller kaldırılmıştır. Lameller kaldırıldıktan sonra hücrelerin hem kontrol grubun hemde mimik uygulanmış kuyularda oluşan boşluğu kaplama hızları 4 gün boyunca gözlemlenmiş ve aynı saatte iverted mikroskopunda 4x objektifinde fotoğraflanmıştır.

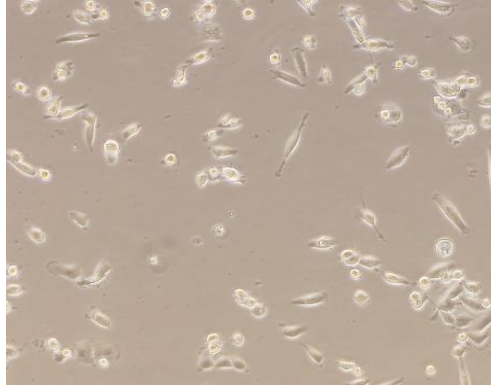
4. BULGULAR

4.1. miRNA Mimik Transfeksiyonu

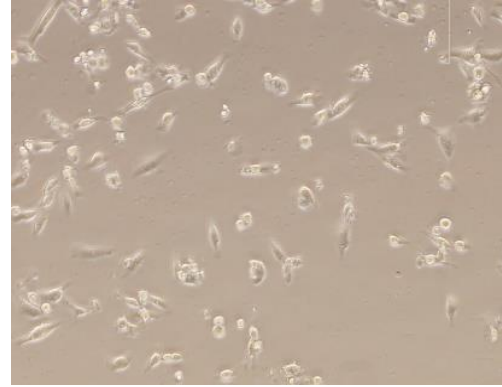
Birkaç deney sonrasında, hsa-145-5p sentetik mimiğinin MDA-MB-231 hücrelerine transfekte olabilmesi için 24'lü plakanın her kuyusuna 3×10^4 hücrenin ekilmiştir. Önceden başka bir projede yapılan optimizasyona göre transfeksiyon yapılmış ve her gün inverted mikroskopunda 10x objektifte hücreler fotoğraflanarak, 6 gün takip edilmiştir. Gözlemler sonucunda, beklenildiği gibi özgül sentetik mimik transfeksiyonunun gerçekleştiği 4'cü günden itibaren morfolojik olarak tespit edilmiştir.

- ✓ Kontrol grubu hücrelerine hiçbir uygulama yapılmamıştır. Bu grup hücreler uygun besiyerinde, serum ve antibiyotik varlığında belirlendiği sayıda kuyulara ekilmiş ve deney sonucunda kanserli hücrelere özgü bir şekilde çoğaldıkları tespit edilmiştir.
- ✓ Pozitif kontrol, mimik transfeksiyon analizi için hazırlanan deneylerin optimum şekilde çalıştığını tespit edebilmek için kullanılmıştır. Ticari olarak alınan bu pozitif kontrol, hücre ölümünü kontrol eden bir siRNA'dır. Bu kontrol grubunu deneyde kullanmakla hem transfeksiyon ajanı olan HiPerfect reagent, hem de deneyin başarılı olduğu tespit edilmiştir. Bu gruba uygulanan siRNA hücreye transfekte olduktan 3 gün sonra beklenildiği gibi hücre ölümüne sebep olmuştur. Kontrol grubuyla kıyaslandığında, özellikle 6'cı günde belirgin bir azalma ve ölüm tespit edilmiştir.
- ✓ Negatif kontrol, siRNA'nın transfeksiyonu, fenotip veya gen ekspresyonundaki değişikliklerin spesifik olmadığını belirlemek için kullanılmıştır. Bu kontrol grubunda beklenildiği gibi hücre sayısında azalma veya ölüm görülmemiştir.
- ✓ Transfeksiyon ajanı olan HiPerfect reagent tek başına hücrelere verilmiştir. Bu kontrol grubunu oluşturmaktaki amaç transfeksiyon ajanının hücreler üzerinde bir toksik etkisinin olmadığını göstermektir. Deney sonucunda beklenti doğrultusunda hücrelerde hiçbir etki olmamış ve çoğaldıkları gözlemlenmiştir.
- ✓ Hsa-145-5p sentetik mimik materyal metod kısmında da bahsedildiği gibi transfeksiyon ajanının aracılığıyla hücreye sokulmuştur. MDA-MB-231 hücre hattında baskılandığı bilinen bu miRNA, sentetik mimik transfeksiyonundan sonra ekspresyonunun artması ve hücrelerde ölüm beklenmektedir. Yapılan deney sonucunda beklentiler karşılanmış, mimik transfeksiyonundan sonra hücrelerin çoğalması durmuş ve ölüm gözlemlenmiştir.

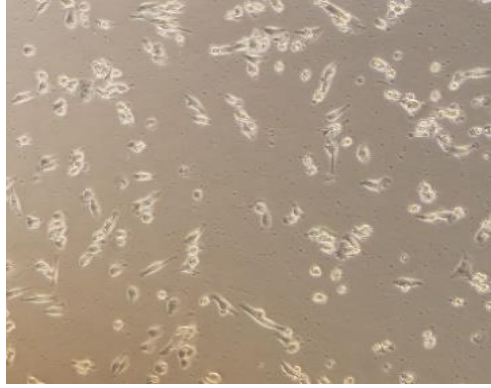
Bu kontrol grupları ve mimik transfeksiyonu yapılan hücrelerin görüntüleri Şekil 4.1-4.6'da gösterilmiştir.



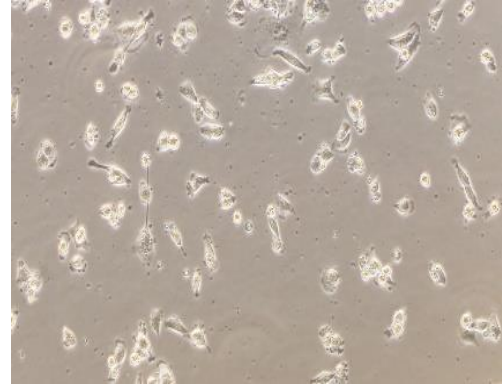
Kontrol



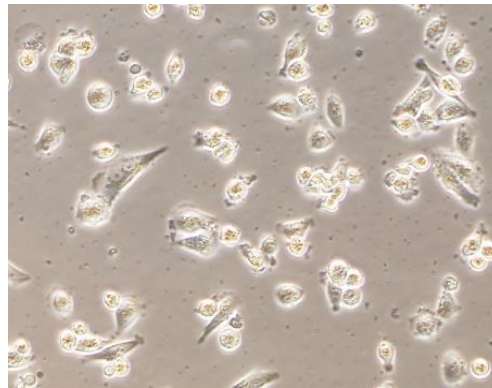
Pozitif kontrol siRNA



Negatif kontrol siRNA

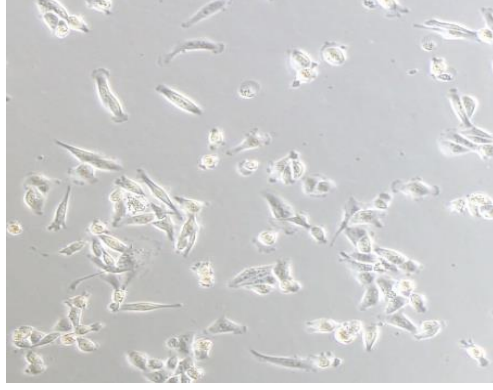


HiPerfect Kontrol



miR-145-5p mimik

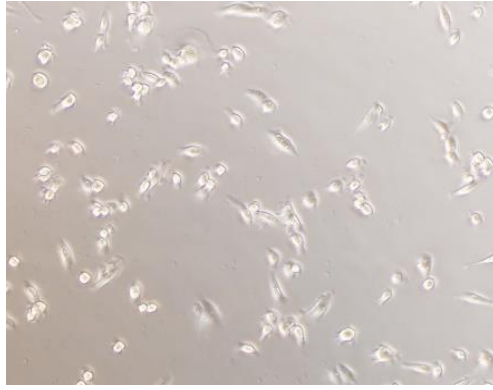
Şekil 4.1. *miR-145-5p mimik ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 1. gün inverted mikroskop (Olympos IX71)'da 100x büyütme*



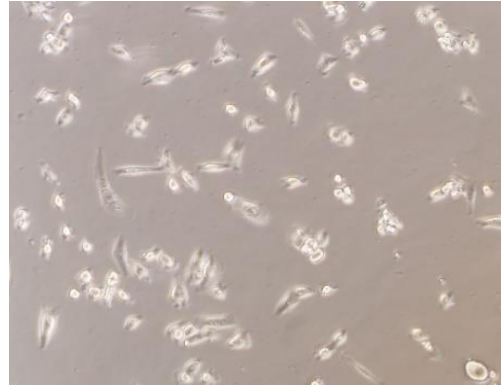
Kontrol



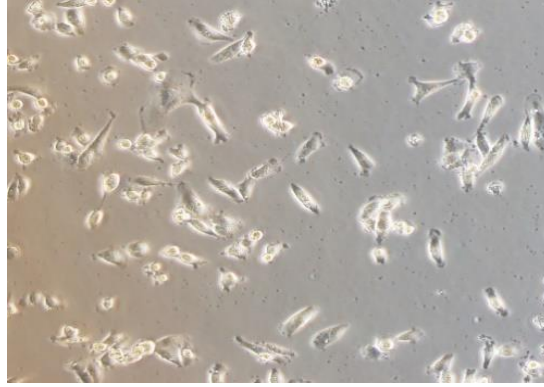
Pozitif kontrol siRNA



Negatif kontrol siRNA

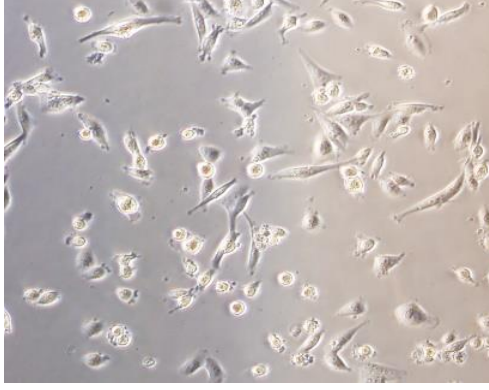


HiPerfect Kontrol

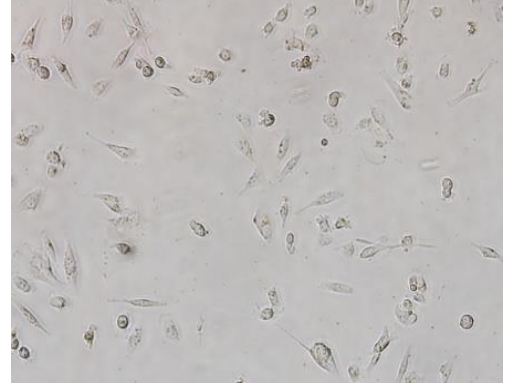


miR-145-5p mimik

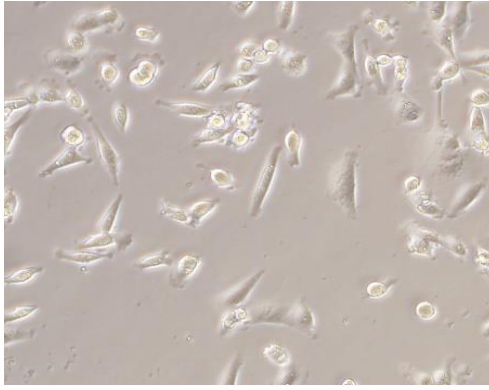
Şekil 4.2. *miR-145-5p mimik ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 2. gün inverted mikroskop (Olympos IX71)'da 100x büyütme*



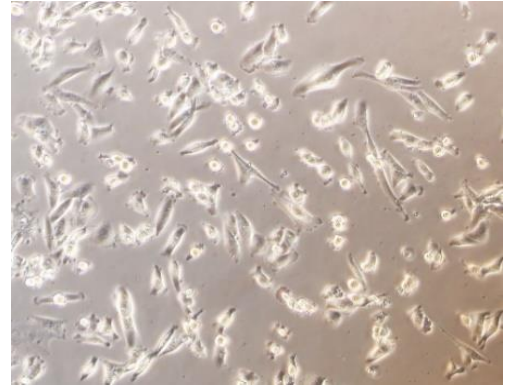
Kontrol



Pozitif kontrol siRNA



Negatif kontrol siRNA

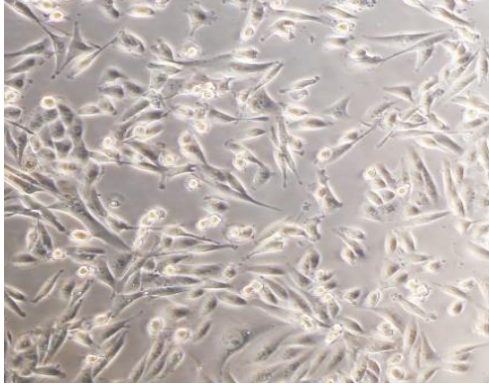


HiPerfect Kontrol

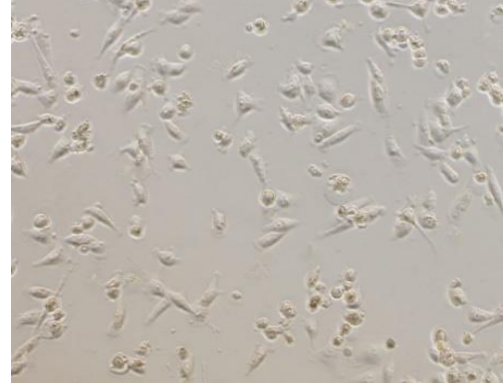


miR-145-5p mimik

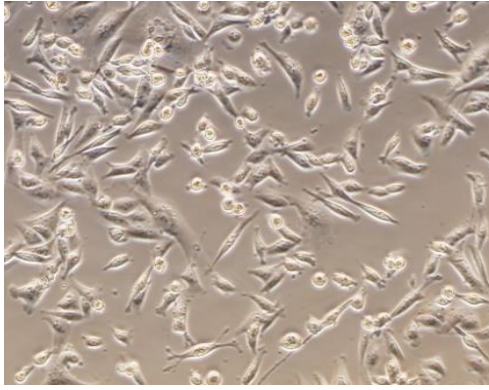
Şekil 4.3. *miR-145-5p mimik ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 3. gün inverted mikroskop (Olympos IX71)'da 100x büyütme*



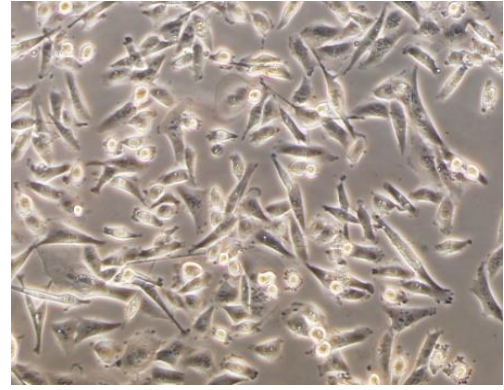
Kontrol



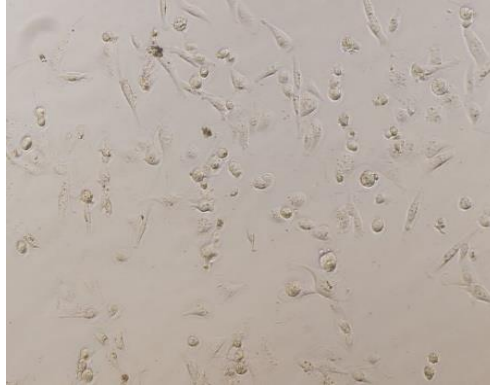
Pozitif kontrol siRNA



Negatif kontrol siRNA

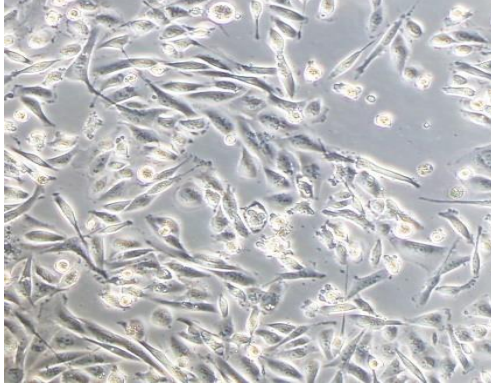


HiPerfect Kontrol



miR-145-5p mimik

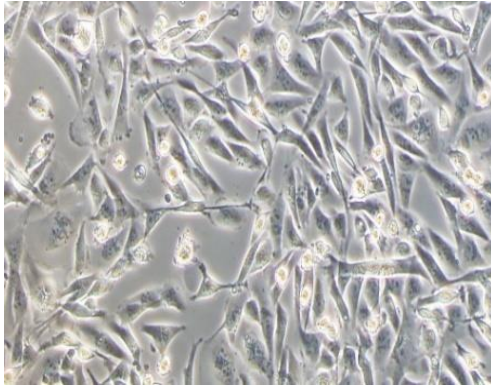
Şekil 4.4. *miR-145-5p mimik ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 4. gün inverted mikroskop (Olympus IX71)'da 100x büyütme*



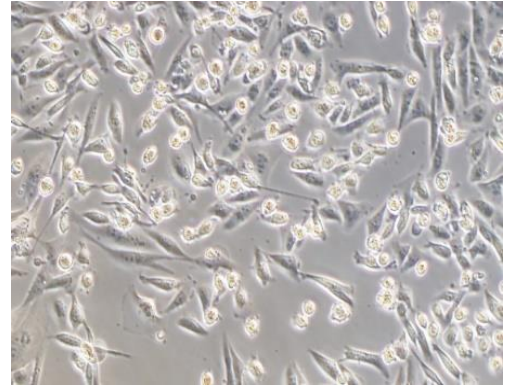
Kontrol



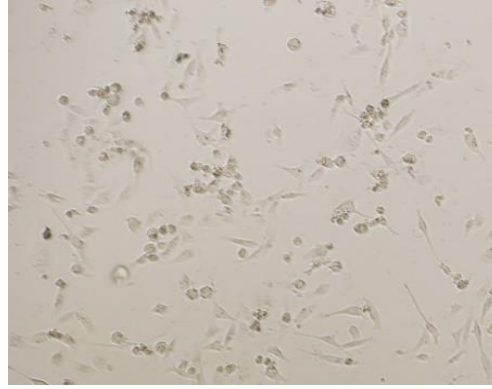
Pozitif kontrol siRNA



Negatif kontrol siRNA

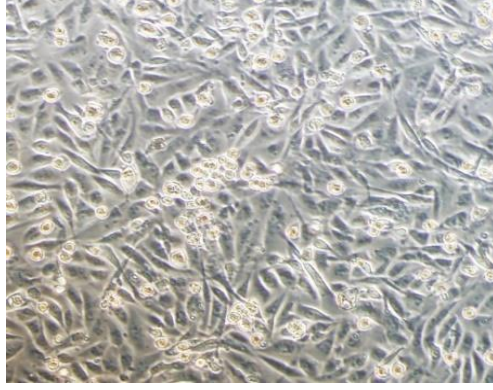


HiPerfect Kontrol

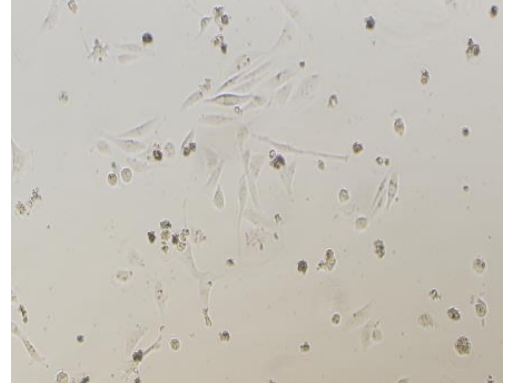


miR-145-5p mimik

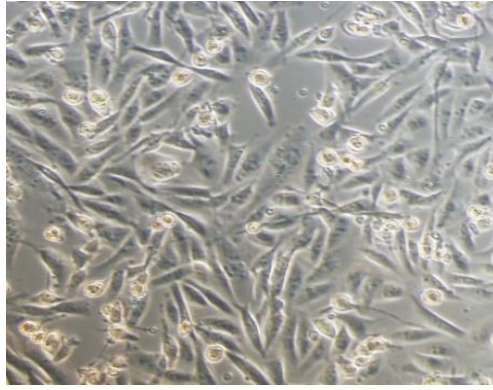
Şekil 4.5. *miR-145-5p mimik ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 5. gün inverted mikroskop (Olympos IX71)'da 100x büyütme*



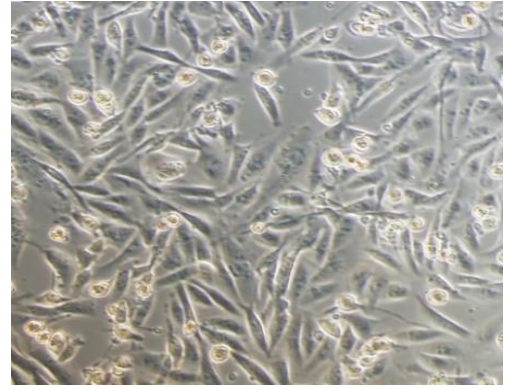
Kontrol



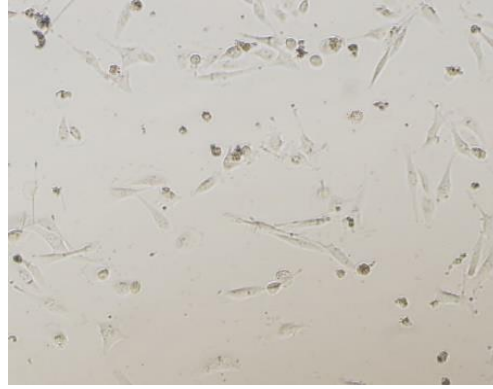
Pozitif kontrol siRNA



Negatif kontrol siRNA



HiPerfect Kontrol



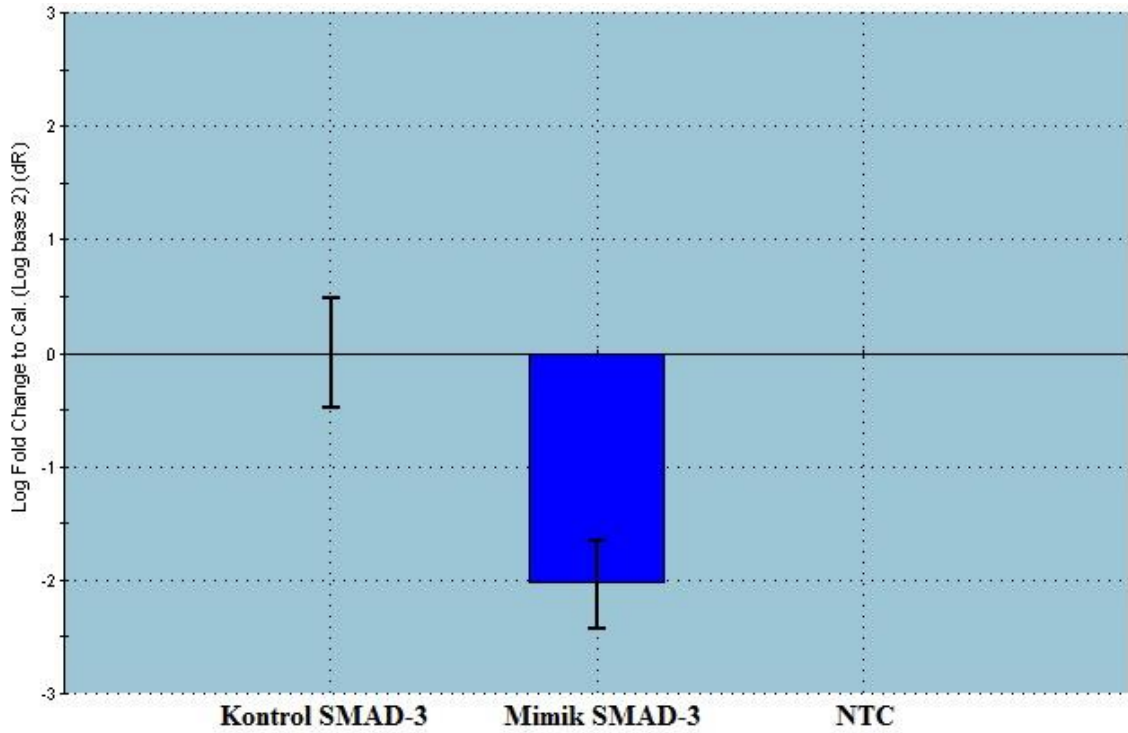
miR-145-5p mimik

Şekil 4.6. *miR-145-5p mimik ile transfeke edilen MDA-MB-231 hücrelerinde transfeksiyon başarısının morfolojik gözlemlenmesi. 6. gün inverted mikroskop (Olympos IX71)'da 100x büyütme*

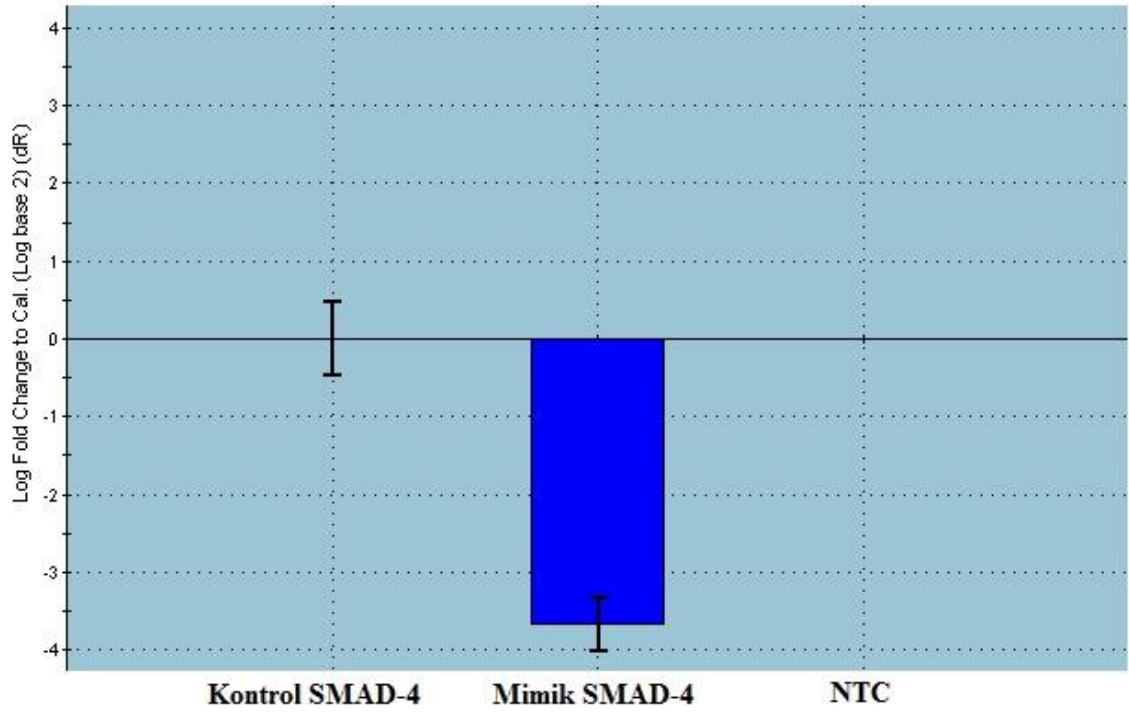
4.2. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR

Meme kanserinde baskılanmış olduğu literatürden bilinen miR-145-5p'nin özgül sentetik mimiğinin MDA-MB-231 hücrelerine geri kazandırılması sonucunda, TGF- β sinyal yolağında rolü olan SMAD-3 ve SMAD-4 hedef genlerinin ekspresyonundaki değişim gerçek zamanlı PCR analiziyle (RT qPCR) belirlenmiştir. Analizde kontrol grubu (mimik transfeksiyonu yapılmamış) hücrelerden elde edilen RNA ve mimik uygulaması yapılmış meme kanserli hücrelerden izole edilmiş RNA kullanılarak SMAD-3 ve SMAD-4 genlerinin ekspresyon seviyeleri mukayese edilmiştir.

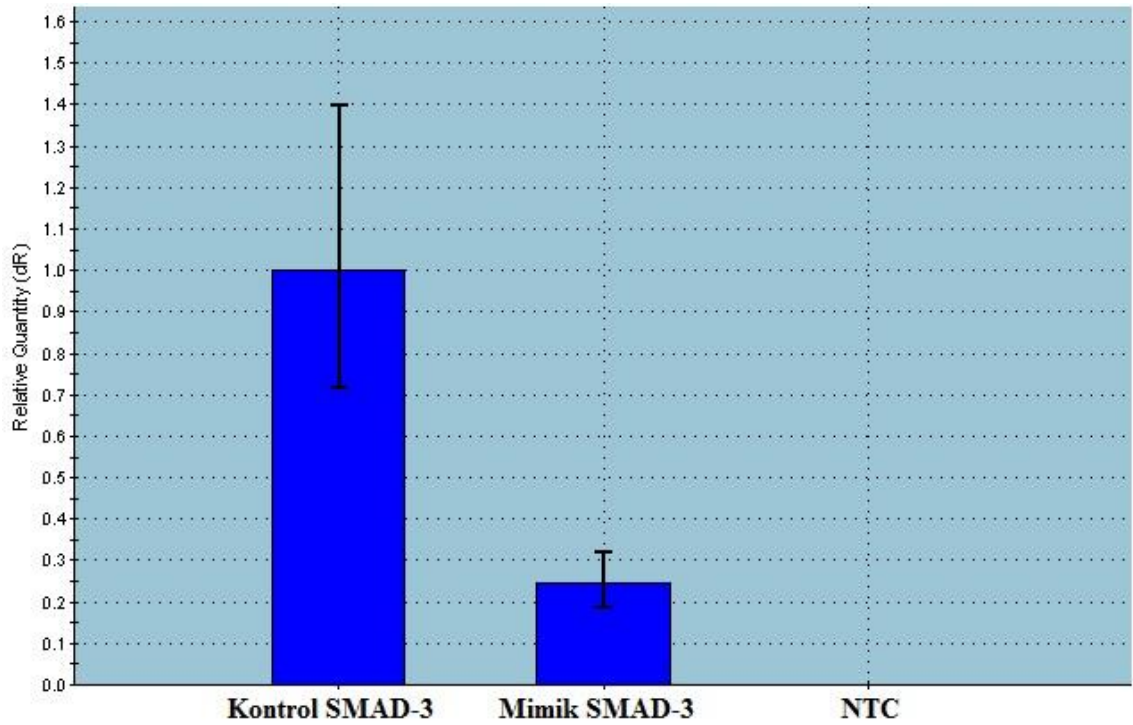
Analizin sonucunda kontrol grubunda SMAD3 ve SMAD4 gen ekspresyon seviyesi yüksek iken, mimik uygulanan hücrelerde ise bahsi geçen genlerin ekspresyon seviyelerinin düştüğü görülmüştür. Mimik uygulanan grupta kontrol grubuna göre SMAD3 geninin ekspresyon seviyesinde 2 kat, SMAD4 geninin ekspresyonunda ise 3,6 kat düşüş tespit edilmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.7- 4.10'da grafik olarak sunulmuştur.



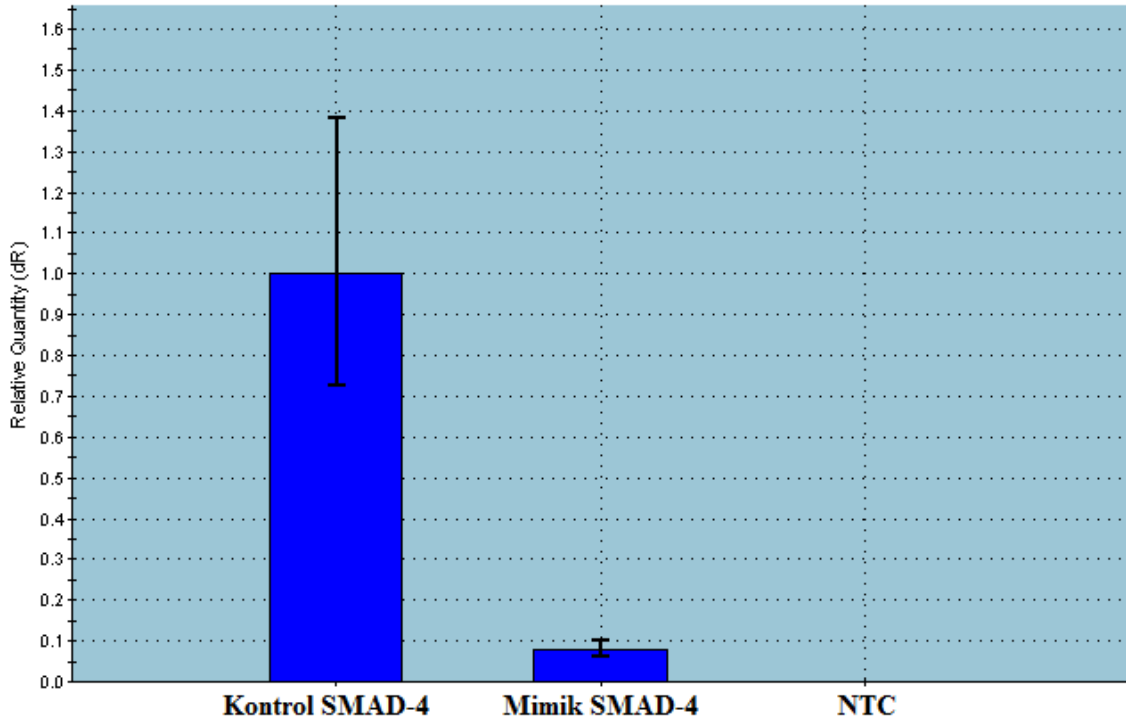
Şekil 4.7. miR-145-5p transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD3 gen ekspresyon seviyesindeki değişim (MxPro programında analiz yapılmıştır)



Şekil 4.8. *miR-145-5p transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD4 gen ekspresyon seviyesindeki değişim (MxPro programında analiz yapılmıştır)*



Şekil 4.9. *miR-145-5p transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD3 gen ekspresyon seviyesindeki değişim (MxPro programında analiz yapılmıştır)*



Şekil 4.10. *miR-145-5p transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD4 gen ekspresyon seviyesindeki değişim (MxPro programında analiz yapılmıştır)*

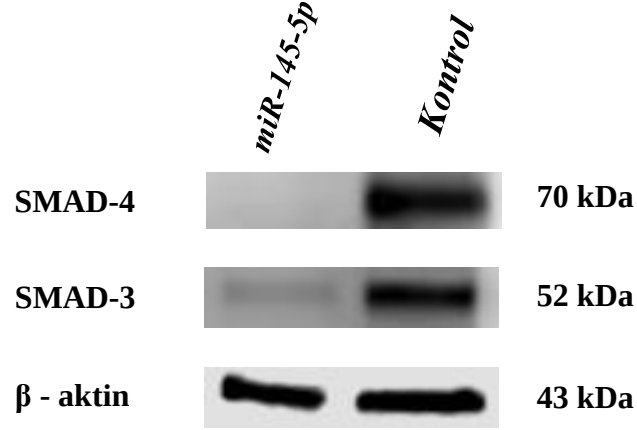
4.3. Western Blot

Çalışmanın materyal ve metot kısmında belirtildiği protokole göre analiz yapılmıştır. Mimik uygulanmış (hsa-miR-145-5p mimik uygulanan) ve hiçbir uygulama yapılmayan MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen total protein grupları jele yüklenmiş, yürütülmüş ve 0.2µm PVDF membranlara transferi gerçekleştirilmiştir. Ardından bu membranlarda her iki grup total protein içerisinde β -actin, SMAD-3 ve SMAD-4 proteinleri uygun antikorlarla muamele edilerek tespit edilmiştir.

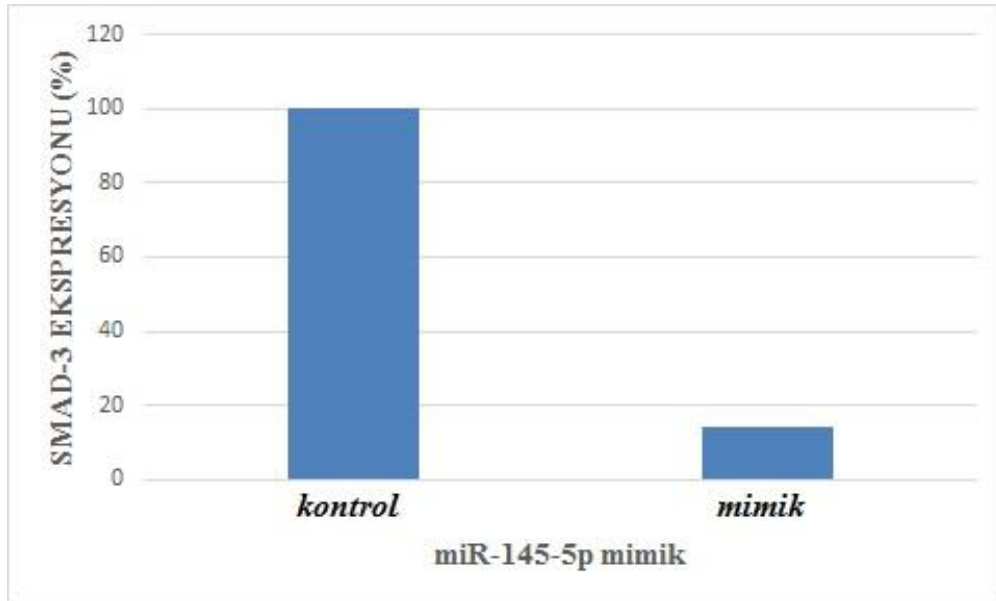
Kontrol grubu olarak belirttiğimiz, hiçbir uygulama yapılmayan MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen total protein içerisinde β -actin, SMAD-3 ve SMAD-4 proteinleri uygun antikor bağlanmasıyla bant görüntüleri elde edilmiştir.

Hsa-miR-145-5p mimik uygulaması yapılan MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen total protein içerisinde β -actin proteinin uygun antikor muamelesi sonucunda bant görüntüleri elde edilmiştir. SMAD-3 proteininin ise bant görüntüleri kontrole göre daha silik bir görüntüsü elde edilmiştir. SMAD-4 proteinleri ise uygun antikor muamelesi sonrasında bant görüntüleri elde edilememiştir. Deneyin bütün bant görüntüleri Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

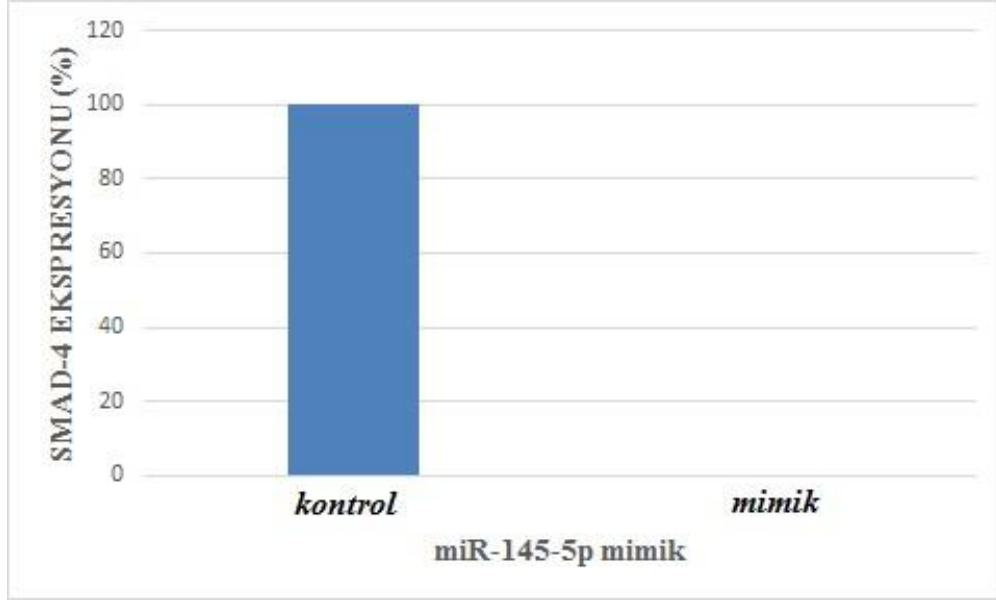
Elde edilen bant yoğunluğuna göre, SMAD-3 yoğunlukları ile β -aktin yoğunlukları Image Studio™ Lite programında oranlanarak ve kontrol ile kıyaslanarak elde edilen dansitometrik analiz sonucunda, miR-145-5p SMAD-3 ifadesini %86 oranında azaltırken, SMAD-4 ifadesini %100 oranında oranında azalttığı görülmüştür. Bu oranlar grafik olarak Şekil 4.12 ve 4.13'te sunulmuştur.



Şekil 4.11. Kontrol ve miR-145-5p mimik uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde β -aktin, SMAD3 ve SMAD4 proteinlerinin Western Blot görüntüleri



Şekil 4.12. miR-145-5p mimik uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD-3 proteinin ifadesi (%)



Şekil 4.13. *miR-145-5p mimik uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde SMAD-4 proteinin ifadesi (%)*

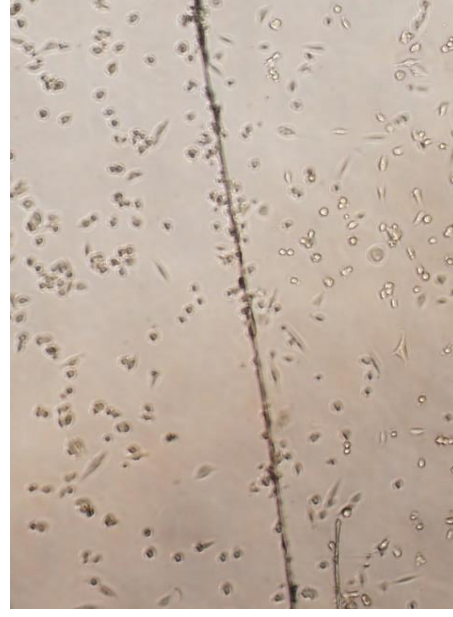
4.4. Hücre Göçü Testi

Fonsiyonel göç testinde mimik transfeksiyonu yapılarak uyarılmış hücrelerle, kontrol grubu yani hiçbir tedavi uygulanmayan hücreler mukayese edilmiştir. Çalışmanın materyal ve metod kısmındada bahsedildiği gibi lamel kaldırıldıktan sonra hücreler 5 gün boyunca takip edilmiş ve fotoğrafları çekilmiş, oluşan boşluğu hücrelerin kaplaması kıyaslanmıştır. Deney sonucunda kontrol grubu hücreler kanserli hücrelere özgü bir şekilde çoğalmaya devam ederek boşluk olan alana göç etmiş ve tamamen kaplamışlardır. Hsa-miR-145-5p sentetik mimik uygulanan hücrelerdeyse kontrole nazaran çok çok az göç görülmüştür. Bu da uygulamanın başarılı olduğunu kanıtlamış, mimik transfeksiyonunun hücre göçünü ve çoğalmasını engellediği tespit edilmiştir.

Kontrol ve miR-145-5p mimik uygulanmış hücrelerin lamel varlığında 24 saat sonra yapışmış, inverted mikroskopunda 4x objektifinde görüntüleri alınmıştır. Ardından hücreler lameller kaldırıldıktan sonra 4 gün boyunca inverted mikroskopunda 4x objektifinde fotoğrafları çekilmiştir.



Kontrol



miR-145-5p mimik

Şekil 4.14. *miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel parçası varlığında görüntüleri (ilk 24 saat sonrasında, 40x büyütme)*



Kontrol



miR-145-5p mimik

Şekil 4.15. *miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel kaldırıldıktan sonra 0. gün görüntüleri (40X büyütme)*



Kontrol



miR-145-5p mimik

Şekil 4.16. miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel kaldırıldıktan sonra 1. gün görüntüleri (40X büyütme)

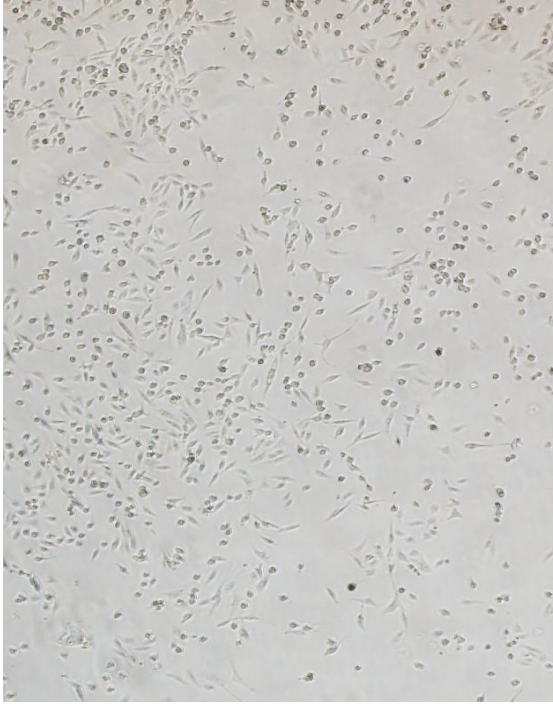


Kontrol



miR-145-5p mimik

Şekil 4.17. miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel kaldırıldıktan sonra 2. gün görüntüleri (40X büyütme)

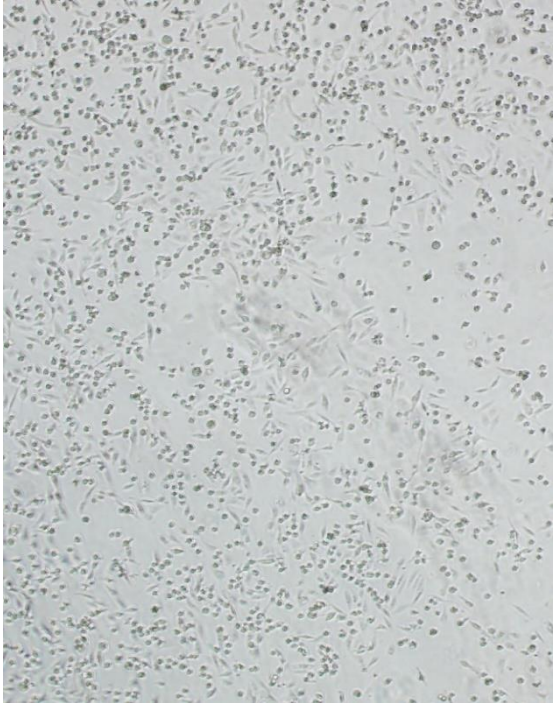


Kontrol



miR-145-5p mimik

Şekil 4.18. *miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel kaldırıldıktan sonra 3. gün görüntüleri (40X büyütme)*



Kontrol



miR-145-5p mimik

Şekil 4.19. *miR-145-5p mimik uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinin lamel kaldırıldıktan sonra 4. gün görüntüleri (40X büyütme)*

5. TARTIŞMA SONUÇ

Meme kanseri, kadınlar arasında kansere bağlı olan ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir (Gündüz vd., 2016). Bu kanser türü, çeşitli morfolojik görünüşleri, moleküler özellikleri, davranışlarıyla tedaviye yanıt veren heterojen bir hastalıktır (Rakha vd., 2010). Bu sebeple de meme kanseri için tedavilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Günümüzde çeşitli tedavi yöntemleri literatürde yerini almaktadır. Bunlardan biride miRNA tedavi yöntemidir. miRNA'lar gen ekspresyon düzenleyicileridir. Onkogenlerin aşırı ekspresyonu veya tümör baskılayıcı genlerin düşük ekspresyonu sonunda kanser oluşumuna yol açacağından (Lin ve Gregory, 2015), miRNA ekspresyonu ve kanser birbiriyle bağlantılı olabileceği araştırmacıları düşündürmüş ve araştırmalar sonucunda bazı miRNA'ların onkogenler ve tümör baskılayıcılar olarak işlev görebileceğini ve hücresel proliferasyon ve apoptozu düzenleyebildiği tespit edilmiştir (Hwang ve Mendell, 2006). miRNA'lar aynı zamanda bazı sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde de aktif rol almaktadır. Bu yollardan biri kanser hücrelerinde inaktif durumda olan, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını kontrol eden TGF- β sinyal yolağıdır. Çok sayıda miRNA çalışılmıştır. Bunlardan biriyse miR-145'dir.

Araştırmalar sonucunda, miR-145'in kanser hücre invazyonunda, göç ve metastazında önemli fonksiyonlar gösteren farklı genlerin ekspresyonunu düzenlediğini tespit edilmiştir (Zeinali vd., 2019). Çalışmalar miR-145'in, meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü engelleyerek meme kanserinde tümör baskılayıcı bir mikro RNA olarak işlev görebildiğini göstermektedir (Ding vd., 2017).

Bu tez çalışmasında, miR-145'in, başlıca fonksiyonu proliferasyonu baskılamak ve farklılaşmayı kontrol etmek olan TGF- β sinyal yolağının (Vural, 2010) aktivasyonuna etkisi araştırılmıştır. Meme kanserinde baskılandığı literatürde birçok çalışmada tespit edilen miR-145-5p özgül sentetik mimiği materyal ve metod kısmında da bahsedildiği üzere MDA-MB-231 hücrelerine transfeksiyonu sonucunda metastazın baskılanması, TGF- β sinyal yolağında rolü olan SMAD-3 ve SMAD-4 hedef gen ekspresyon seviyelerinin gerçek zamanlı qPCR analizi ile ve aynı hedef genlerin protein seviyesinde validasyonu Western Blot analizi ile araştırılmıştır.

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen bulgulara göre, miR-145-5p mimik uygulamasında hücreler 6 gün boyunca takip edilmiş ve ilk günlerde hücrelerde belirgin bir etki söz konusu değilken, 3'cü günden itibaren kontrolsüz bir şekilde çoğalan MDA-MB-231 hücreleri kontrol grubuyla kıyasta mimik transfeksiyonu yapılan grupta

proliferasyonun durduğu ve hücrelerde ölümün gerçekleştiği görülmüştür. Buradan miR-145'in meme kanseri üzerinde etkili olduğu ve bahsi geçen kanserli hücrenin proliferasyon yeteneğini engelleyebileceği sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda hücrelere göç testide uygulanmış ve mimik transfeksiyonu uygulanan grupta hücre göçü görülmemiştir. Bu ise miR-145'in invazyonu ve hücre migrasyonunu da engellediği kanıtlanmıştır. Elde edilen bu veriler sayesinde miR-145'in meme kanserinde inaktif durumda olan TGF- β /SMAD sinyal yolağının aktivasyonunu sağladığını söylemek mümkündür. Aktivasyon sayesinde TGF β 'nın etkisi ile p21 ve p15 proteinlerinin sentezi aktive olur ve hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli olan sikline bağımlı kinazlar (CDK) inhibe edilir (Pardali vd., 2000 ve Millet vd., 2009). TGF- β /SMAD yolun etkisi ile TIEG-1 (TGF β -inducible-early-response gene) geni indüklenir (Vural, 2010). Programlı hücre ölümünü indükleyen ve proliferasyonu baskılayan TIEG-1 bir transkripsiyon faktörüdür (Tachibana vd., 1997). miR-145-5p mimik transfeksiyonu yapılarak bu yolağın aktif hale geldiğini ve bu sayede TIEG-1 geninin indüklenerek hücreleri apoptoza götürdüğü de düşünülebilir.

Bu çalışmada uygulanan bir başka analiz ise gerçek zamanlı qPCR analizidir. Gerçek zamanlı qPCR özgüllüğü ve tekrarlanabilir olması nedeniyle moleküler tanıda yaygın şekilde kullanılan bir yöntemdir (Ly, Zhang vd., 2017). Çalışmada bu yöntemle MDA-MB-231 hücrelerine miR-145-5p mimik uygulamasının TGF- β sinyal yolağında rolü olan SMAD-3 ve SMAD-4 hedef genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi araştırılmıştır. Hem miR-145-5p uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde hem de kontrol olarak kullanılan tedavi uygulanmayan MDA-MB-231 hücrelerinde bahsi geçen genlerin ekspresyonlarına bakılmıştır. Analiz sonucunda mimik uygulanarak tedavi edilen hücrelerde SMAD-3 ve SMAD-4 mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre düştüğü tespit edilmiştir. Literatürdeki bazı çalışmalarda SMAD-3'ün miR-145 tarafından doğrudan hedeflendiği belirtilmiştir (Li vd., 2015). Elde edilen bulgular doğrultusunda, meme kanserinde miR-145'in bahsi geçen hedef gen mRNA'larını doğrudan hedeflediği veya TGF- β ligandın reseptöre bağlanmasını sağlayarak yolak aktivasyonunu gerçekleştirmesiyle SMAD-3 ve SMAD-4 genlerinin negatif feedback yoluyla mRNA ekspresyonunu azalttığı söylenebilir.

Gerçek zamanlı qPCR analizinden sonra test edilen genlerin protein seviyesindeki değişiklikleri kontrol amaçlı Western Blot analizi yapılmıştır. Analizde, TGF- β /SMAD sinyal yolağında işlev gören R-SMAD ailesinden (reseptör SMAD) olan SMAD-3 ve co-

SMAD (comon SMAD) olarak isimlendirilen SMAD-4 proteinlerinin miktarına bakılmıştır. Bunun için hiçbir uygulama yapılmayan ve miR-145-5p mimik uygulanan MDA-MB-231 hücrelerden materyal ve yöntem kısmında bahsedildiği üzere toplam protein izolasyonu yapılmıştır. Mimik uygulaması yapılan hücrelerden protein izolasyonu, transfeksiyonun gerçekleştiğinin görüldüğü gün, yani 4. gün yapılmıştır. Yapılan birkaç deney sonrasında hiçbir uygulama yapılmayan MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen toplam protein içerisinde uygun antikör muamelesi neticesinde SMAD-3 ve SMAD-4 proteinlerinin varlığı bant görüntülerinin elde edilmesiyle ispatlanmıştır. Bulunan sonuçlar meme kanserli bu hücrelerde TGF- β /SMAD sinyal yolağının inaktif olduğunu gösteriyor. Yolak aktivasyonu ligandın reseptöre bağlanması ve tip II reseptörün tip I reseptörü fosforillemesiyle gerçekleşir (Cooper vd., 2016). Fosforillenen tip I reseptörü de SMAD3 proteinini fosforiller ve p-SMAD-3 SMAD-4 proteini ile kompleks oluşturup çekirdeğe geçerek transkripsiyonun düzenlenmesinde görev alırlar (Suzuki, 2018). Bu daha önce anlattığımız gerçek zamanlı qPCR analizinde de kontrol grubunda SMAD-3 ve SMAD-4 gen ürününün (mRNA) ekspresyon seviyesinin yüksek olmasıyla kanıtlanmıştır. Mimik uygulanan hücrelerde ise kontrol olan β -aktin protein bandı görüntülenmiş, SMAD-3 protein bandı ise kontrole göre daha silik görüntülenmiştir ama SMAD-4 protein bantları görüntülenememiştir. Bu sonuca göre mimik uygulaması yolak aktivasyonuna neden olmuş ve SMAD-3 proteini fosforillendiği için ve SMAD-4 ile birlikte çekirdeğe transloke olduğu için (Suzuki, 2018) görüntü elde edilemediğini söylemek mümkün.

Sonuç olarak; MDA-MB-231 hücrelerinde baskılanmış durumda olan tümör supressör miR-145-5p'nin özgül sentetik mimiğinin bahsi geçen hücreye geri kazandırılmasıyla, hücrelerin invazyon, göç, proliferasyon gibi özelliklerini kaybettikleri görülmüştür. Bu anlamda, miR-145-5p'nin üçlü negatif meme kanseri tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Arpino G., Milano M., De Placido S., (2015). Features of aggressive breast cancer. *Breast*, 24:594–600.
- Bartel D.P., (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116(2):281-97.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J., (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409:363-366.
- Bhardwaj A., Singh S., Singh A.P., (2010). MicroRNA-based Cancer Therapeutics: Big Hope from Small RNAs. *Molecular Cell Pharmacol*, 2(5):213-219.
- Boyerinas B., Park S.M., Hau A., Murmann A.E., Peter M.E., (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine Related Cancer* 17: F19-F36.
- Budi E.H., Duan D, Derynck R., (2017). Transforming growth factor-beta receptors and Smads: regulatory complexity and functional versatility. *Trends Cell Biology*, 27: 658–672.
- Butz H., Racz K., Hunyady L., Patocs A., (2012). Crosstalk between TGF-beta signaling and the microRNA machinery. *Trends in Pharmacological Science*, 33: 382–393.
- Cabadak H. (2008). “Hücre Siklusu ve Kanser,” *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9 (3), 51–61.
- Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M., (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy Science of the USA*, 99:15524-15529.
- Calin G.A., Ferracin M., Cimmino A., Di Leva G., Shimizu M., Wojcik S.E., Iorio M.V., Visone R., Sever N.I., Fabbri M., Iuliano R., Palumbo T., Pichiorri F., Roldo C., Garzon R., Sevignani C., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C.G., Kipps T.J., Negrini M., Croce C.M., (2005). A microRNA signature associated

- with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal Medicine*, 353: 1793–1801.
- Calin G.A., Sevignani C., Dumitru C.D., Hyslop T., Noch E., Yendamuri S., Shimizu M., Rattan S., Bullrich F., Negrini M., Croce C.M., (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy Science of the USA*, 101: 2999–3004
- Carvalho L.K. da C.A.A. (2010). Cardiovascular risk factors in pediatric patients after one year of renal transplant, *Acta Paul Enferm*, 23, 114–118.
- Chan M., Chestnov O. (2014), WHO. Global Status Report on Noncommunicable Diseases, World Health Organization, 176.
- Chen L., Cook L.S., Tang M.T., Porter P.L., Hill D.A., Wiggins C.L., Li C.I., (2016). Body mass index and risk of luminal, HER2-overexpressing, and triple negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 157:545–554.
- Chen W. ve Ten Dijke P., (2016). Immunoregulation by members of the TGF β superfamily. *Nature Reviews Immunology*, 16, 723–740.
- Chendrimada T.P., Gregory R.I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R., (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436:740–744.
- Colditz G.A., Sellers T.A. ve Trapido E. (2006). Epidemiology — identifying the causes and preventability of cancer?, *Nature Reviews Cancer* volume 6, 75–83.
- Cooper G.M., Hausman R.E. (2016). *Hücre: Moleküler Yaklaşım*, İzmir Tıp Kitabevi, yedinci baskı.
- Cui S.Y., Wang R., Chen L.B., (2014). MicroRNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathway., *J. Cell. Mol. Med.* 18 (10) 1913–1926.
- David C.J., Massague J., (2018). Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(7): 419-435.

- Davis B.N., Hilyard A.C., Lagna G., Hata A., (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*, 454: 56–61.
- Davis B.N., Hilyard A.C., Nguyen P.H., Lagna G., Hata A., (2010). Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Molecular Cell*, 39: 373–384.
- Denli A.M, Tops B.B., Plasterk R.H., Ketting R.F., Hannon G.J., (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432:231–235.
- Dent R., Trudeau M., Pritchard K.I., Hanna W.M., Kahn H.K., Sawka C.A., Lickley L.A., Rawlinson E., Sun P., Narod S.A., (2007). Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research.*, 13:4429–4434.
- Derynck R., Muthusamy B.P., Saeteurn K.Y., (2014). Signaling pathway cooperation in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Current Opinion in Cell Biology*, 31: 56–66.
- Di Leva G., Garofalo M., Croce C.M., (2014). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology*, 9: 287-314.
- Ding Y., Zhang C., Zhang J., Zhang N., Li T., Fang J., Zhang,Y., Zuo F., Tao Z., Tang S., Zhu W., Chen H., Sun X., (2017). miR-145 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by directly or indirectly regulating TGF- β 1 expression, *International Journal of Oncology* 50: 1701-1710.
- Eades G., Wolfson B., Zhang Y., Li Q., Yao Y., Zhou Q., (2015). lincRNA-RoR and miR-145 Regulate Invasion in Triple-Negative Breast Cancer via Targeting ARF6. *Molecular Cancer Research*, 13:330–338.
- Ebert M.S. ve Sharp P.A., (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149, 515–524.
- Esquela-Kerscher A., Slack F.J., (2006). Oncomirs- microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 6:259-269.
- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F., (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources,

- methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136: E359–E386.
- Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N., (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*. 9:102–114.
- Geraldo M.V., Yamashita A.S., Kimura E.T., (2012). MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF- β by repressing SMAD4 in thyroid cancer. *Oncogene*, 31(15):1910-22.
- Gillespie E.F., Sorbero M.E., Hanauer D.A., Sabel M.S., Herrmann E.J., Weiser L.J., Jagielski C.H., Griggs J.J., (2010). Obesity and angiolymphatic invasion in primary breast cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 17:752–759.
- Görür A., Tamer L., (2011). MikroRNA'ların Terapötik Kullanımı. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(2).
- Götte M., Mohr C., Koo C-Y., Stock C., Vaske A.K., Viola M., Ibrahim S.A., Peddibhotla S., Teng Y.H., Low J.Y., Ebnet K., Kiesel L., Yip G.W., (2010). miR-145-dependent targeting of Junctional Adhesion Molecule A and modulation of fascin expression are associated with reduced breast cancer cell motility and invasiveness. *Oncogene*, 29:6569–6580.
- Gregory R.I., Chendrimada T.P., Cooch N., Shiekhattar R., (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123:631-640.
- Gregory R.I., Yan K.P., Amuthan G., Chendrimada T., Doratotaj B., Cooch N., Shiekhattar R., (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432:235–240.
- Guo1 L., Zhang Y., Zhang L., Huang F., Li J., Wang S., (2016). MicroRNAs, TGF- β signaling, and the inflammatory microenvironment in cancer. *Tumor Biology*, 37:115–125.

- Gündüz UR, Gunaldi M, Isiksacan N, Gündüz S, Okuturlar Y and Kocoglu H: A new marker for breast cancer diagnosis, human epididymis protein 4: A preliminary study. *Mol Clin Oncol* 5: 355-360, 2016.
- Gürsu, R.U., Kesmezacar Ö., Karaçetin D., Mermut Ö., Ökten B., Güner Ş.İ. (2012). İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Birimi: Yeni Kurulan Bir Ünitenin 18 Aylık Sonuçları, *İstanbul Tıp Dergisi*, 13–18.
- Han J., Lee Y., Yeom K.H., Kim Y.K., Jin H., Kim V.N., (2004). The Drosha–DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Development*, 18:3016–3027.
- Hanahan D. ve Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 646-74.
- Hata A. ve Chen Y-G., (2016). TGF-beta signaling from receptors to Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8.
- He X.Y., Chen J.X., Ou-Yang X., Zhang Z., Peng H.M., (2010). Construction of let-7a expression plasmid and its inhibitory effect on k-Ras protein in A549 lung cancer cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 30: 2427-2431.
- Hoch R.V., Thompson D.A., Baker R.J., Weigel R.J. 1999. GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 84:122–128.
- Hornstein E. ve Shomron N., (2006). Canalization of development by microRNAs. *Nature Genetics*, 38, S20–S24.
- Horibata S., Rice E. J., Mukai C., Marks B.A., Sams K., Zheng H., Anguish L.J., Coonrod S.A., Danko C.G., (2018). ER-positive breast cancer cells are poised for RET-mediated endocrine resistance. *PLoS One*; 13(4): e0194023.
- Hosseinali N., Aghapour M., Duijf P.H.G., Baradaran B., (2018). Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review. *Journal of Cellular Physiology*, 233(8):5574-5588.
- Huang H., Sun P., Lei Z., Li M., Wang Y., Zhang H.-T., Liu J., (2015). miR-145 inhibits invasion and metastasis by directly targeting Smad3 in nasopharyngeal cancer, *Tumor Biology*. 36 (6):4123–4131.

- Hwang HW and Mendell JT: MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British Journal of Cancer* 94: 776-780, 2006.
- Hwang H-W. ve Mendell J.T., (2006). MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British Journal of Cancer*, 94: 776–780.
- Xia H., Yamada S., Aoyama M., Sato F., Masaki A., Ge Y., Ri M., Ishida T., Ueda R., Utsunomiya A., (2014). Prognostic impact of microRNA-145 down-regulation in adult Tcell leukemia/lymphoma. *Hum. Pathol.* 45 (6):1192–1198.
- Xia X.M., Jin W.Y., Shi R.Z., Zhang Y.F., Chen J., (2010). Clinical significance and the correlation of expression between let-7 and K-ras in non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*, 1: 1045-1047.
- Xu L., Massague J., (2004). Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 209-19.
- Xu P., Liu J., Derynck R., (2012). Post-translational regulation of TGF-beta receptor and Smad signaling. *FEBS Letters*, 586: 1871–1884.
- Ichimura A., Ruike Y., Terasawa K., Tsujimoto G., (2011). miRNAs and regulation of cell signaling. *FEBS Journal*, 278, 1610–1618.
- Iio A., Nakagawa Y., Hirata I., Naoe T., Akao Y., (2010). Identification of non-coding RNAs embracing microRNA-143/145 cluster, *Molecular Cancer*, 9 (1) 136.
- Inui M., Martello G., Piccolo S., (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 252–263.
- Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Menard S., Palazzo J.P., Rosenberg A., Musiani P., Volinia S., Nenci I., Calin G.A., Querzoli P., Negrini M., Croce C.M., (2005) .MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*, 65: 7065–7070.
- Idikio H.A. (2011). Human Cancer Classification: A Systems Biology- Based Model Integrating Morphology, Cancer Stem Cells, Proteomics, and Genomics, *Journal of Cancer*, 2:107-115.

- Janakiraman H., House R.P., Gangaraju V.K., Diehl J.A., Howe P.H., Palanisamy V., (2018). The long (lncRNA) and short (miRNA) of It: TGF β -mediated control of RNA-binding proteins and noncoding RNAs. *Molecular Cancer Research*, 16, 567–579
- Jiang X., Xiang G., Wang Y., Zhang L., Yang X., Cao L., Peng H., Xue P., Chen D., (2012). MicroRNA-590-5p regulates proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma cells by targeting TGF- β RII. *Molecular Cells*, 33, 545–551.
- Jordan V.C., Wolf M.F., Mirecki D.M., Whitford D.A., Welshons W.V. (1988). Hormone receptor assays: clinical usefulness in the management of carcinoma of the breast. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 26:97–152.
- Kang Y., Chen C.R., Massague J., (2003). A self-enabling TGF-beta response coupled to stress signaling: Smad engages stres response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Molecular Cell*, 11: 915-26.
- Kloosterman W.P. ve Plasterk R.H., (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 11: 441-450.
- Koç Ş. (2014). Kolorektal Kanser Risk Danışmanlığının Riskli Bireylerin Birincil ve İkincil Koruma Davranışlarını Geliştirmeye Etkisi, İstanbul üniversitesi doktora tezi.
- Koturbash I., Zemp F.J., Pogribny I., Kovalchuk O., (2011). Small molecules with big effects: the role of the microRNAome in cancer and carcinogenesis, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 722 (2):94–105.
- Kou B., Gao Y., Du C., Shi Q., Xu S., Wang C.Q., Wang X., He D., Guo P., (2014). miR-145 inhibits invasion of bladder cancer cells by targeting PAK1. *Urol Oncol* 32: 846-854.
- Kocakuşak A., Şahin M., Yaşar M.A., Güler N., Görmüş C., Aydın S., Özer E., Pamak S., (2011). Erken Evre Meme Kanserinde Sentinel Lenf Nodu Biyopsisi Sonuçları. *Medical Bulletin of Haseki*; 49(2): 69-72

- Kozomara A., Griffiths-Jones S., (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 39: D152–D157.
- Kwak P.B., Iwasaki S., Tomari Y., (2010). The microRNA pathway and cancer. *Cancer Science*, 101: 2309-2315.
- Qin J., Wang F., Jiang H., Xu J., Jiang Y., Wang Z., (2015). MicroRNA-145 suppresses cell migration and invasion by targeting paxillin in human colorectal cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 1328-1340.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T., (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* ,294:853–858
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A., Meyer J., Lendeckel W., Tuschl T., (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse, *Current. Biology*. 12 (9):735–739.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V., (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843–854.
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V.N., (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425:415-419.
- Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K., Lee S., Baek S.H., Kim V.N., (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*. 23:4051– 4060.
- Li S., Wu X., Xu Y., Wu S., Li Z., Chen R., Huang N., Zhu Z., Xu X., (2016). miR-145 suppresses colorectal cancer cell migration and invasion by targeting an ETS-related gene, *Oncol. Rep.* 36 (4):1917–1926.
- Li Y.P., Wei X.C., Li P.C., Chen C.W., Wang X.H., Jiao1 Q., Wang D.M., Wei F.Y., Zhang J.Z., Wei L., (2015). The Role of miRNAs in Cartilage Homeostasis, *Current Genomics*; 16, 393-404.
- Lin S. ve Gregory R.I., (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer* 15: 321-333.

- Lui P.Y., Jin D.Y., Stevenson N.J., (2015). MicroRNA: master controllers of intracellular signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Science*, 72: 3531–3542.
- Lund E., Guttinger S., Calado A., Dahlberg J.E., Kutay U., (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303:95-98.
- Lv. Z, Zhang M., Zhang H. ve Lu X., (2017). Utility of Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction in Detecting *Mycobacterium tuberculosis*, *BioMed Research International*, Article ID 1058579, 5 pages.
- Mahoney M.C., Bevers T., Linos E., Willett W.C. (2008). Opportunities and strategies for breast cancer prevention through risk reduction, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58(6):347-71.
- Massague J, Seoane J, Wotton D., (2005). Smad transcription factors. *Genes Development*, 19: 2783-810.
- Massague J., (2012). TGF β signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 616–630.
- Masszi A., Speight P., Charbonney E., Lodyga M., Nakano H., Szász K., Kapus A., (2010). Fate-determining mechanisms in epithelial–myofibroblast transition: major inhibitory role for Smad3, *Journal of Cell Biology*. 188(3): 383–399.
- Meng X.M., Nikolic-Paterson D.J., Lan H.Y., (2016). TGF- β : The master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 12, 325–338.
- Michael M.Z., O'Connor S.M., van Holst Pellekaan N.G., Young G.P., James R.J., (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia, *Molecular Cancer Research*, 1 (12) 882–891.
- Millet C. ve Zhang Y.E., (2009). Roles of Smad3 in TGF- β Signaling During Carcinogenesis, *National Institutes of Health*; 17(4): 281–293.
- Mise N., Savai R., Yu H., Schwarz J., Kaminski N., Eickelberg O., (2012). Zyxin is a transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad3 target gene that regulates lung cancer cell motility via integrin $\alpha 5\beta 1$, *Journal of Biological Chemistry*, 287 (37) 31393–31405.

- Miyazawa K., Miyazono K., (2017). Regulation of TGF- β family signaling by inhibitory Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 9.
- Miyazawa K., Shinozaki M., Hara T., Furuya T., Miyazono K., (2002). Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling. *Genes Cells*, 7, 1191–1204.
- Mohammadi A., Mansooriab B., Baradarana B., (2016). The role of microRNAs in colorectal cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84:705-713.
- Mollaei H., Safaralizadeh R., Rostami Z., (2019). MicroRNA replacement therapy in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 234(8):12369-12384.
- Morikawa M., Derynck R., Miyazono K., (2016). TGF- β and the TGF- β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 8(5): a021873.
- Nelson D.E., Jarman D.W., Rehm J., Greenfield T.K., Rey G., Kerr W.C., Miller P., Shield K.D., Ye Y., Naimi T.S., (2013). Alcohol-Attributable Cancer Deaths and Years of Potential Life Lost in the United States, *American Journal of Public Health*, 103(4): 641–648.
- Nugent M., (2017). MicroRNAs and Fracture Healing. *Calcified Tissue International*, 101(4); 355–361.
- Osada H. ve Takahashi T., (2011). let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. *Cancer Science*, 102: 9-17.
- Özdemir A., Kaplan Serin E., Savaş M. (2018). Cancer Risk Factors And Prevention in Turkey, *International Journal of Health Services Research and Policy*, 143-150.
- Papageorgis P., (2015). TGF β signaling in tumor initiation, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis, *Journal of Oncology*.
- Papagiannakopoulos T., Shapiro A., Kosik K.S., (2008). MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Research*, 68: 8164–8172.
- Pardali K., Kurisaki A., Moren A., ten Dijke P, Kardassis D, Moustakis A., (2000). Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21 (Waf1/Cip1) regulation by

- transforming growth factor-beta. *The Journal of Biological Chemistry*; 275: 29244-56.
- Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F., Martindale M.Q., Kuroda M.I., Maller B., Hayward D.C., Ball E.E., Degnan B., Müller P., Spring J., Srinivasan A., Fishman M., Finnerty J., Corbo J., Levine M., Leahy P., Davidson E., Ruvkun G., (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808):86–89.
- Pierobon M., Frankenfeld C.L., (2013). Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: A systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 137:307–314.
- Plank M., Maltby S., Mattes J., Foster P.S., (2013). Targeting translational control as a novel way to treat inflammatory disease: the emerging role of MicroRNAs. *Clinical Experimental Allergy*, 43: 981-999.
- Rakha E.A., Elsayed M.E., Green A.R., Lee A.H., Robertson J.F., Ellis I.O. (2007). Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 109:25–32.
- Rakha E.A., Reis-Filho J.S., Baehner F., Dabbs D., Decker T., Eusebi T., Fox S.B., Ichihara S., Jacquemier J., Lakhani S.R., Palacios J., Richardson A.L., Schnitt S.J., Schmitt F.C., Tan p., Tse G.M., Badve S., Ellis I.O. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade, *BioMed Central*, 12:207.
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, et al: Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer Res* 12: 207, 2010.
- Ratna A. ve Mandrekar P. (2017). Alcohol and Cancer: Mechanisms and Therapies, *Biomolecules* 7(3): 61.
- Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.R., Ruvkun G., (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.

- Rinaldi A., Poretti G., Kwee I., Zucca E., Catapano C.V., Tibiletti M.G., Bertoni F., (2007). Concomitant MYC and microRNA cluster miR-17-92 (C13orf25) amplification in human mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 48: 410-412.
- Ruvkun G., (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, 294: 797–799.
- Sachdeva M., Mo Y-Y., (2010). MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Research*, 70:378–387.
- Saxena T., Lee E., Henderson K.D., Clarke C.A., West D., Marshall S.F., Deapen D., Bernstein L., Ursin G., (2010). Menopausal hormone therapy and subsequent risk of specific invasive breast cancer subtypes in the California Teachers Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Preview*. 19:2366–2378.
- Sarkar S., Horn G., Moulton K., Oza A., Byler S., Kokolus S. ve Longacre M. (2013). Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview, *International Journal of Molecular Sciences*, 21087-21113.
- Saydam F., Değirmenci İ., Güneş H.V., (2011). MikroRNA’lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*, 38(1): 113-120.
- Selcuklu S.D., Donoghue M.T., Spillane C., (2009). miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochemical Society Transactions*, 37: 918-925, 2009.
- Shenouda S.K., Alahari S.K., (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*. 28:369–378.
- Shi Y., Massague J., (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113: 685-700.
- Shirafkan N., Mansoori B., Mohammadi A., Shomali N., Ghasbi M., Baradaran B., (2018). MicroRNAs as novel biomarkers for colorectal cancer: new outlooks. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 97:1319–1330.
- Silverberg M.J., Leyden W.A., Chi A., Gregorich S., Huchko M.J., Kulasingam S., Kuppermann M., Seto A., Smith-McCune K.K., Sawaya G.F. (2018). Human Immunodeficiency Virus (HIV)- and Non-HIV-Associated Immunosuppression and Risk of Cervical Neoplasia, *Obstet Gynecol*, 131, 47–55.

- Sun H., Zou J., Chen L., Zu X., Wen G., Zhong J. (2017). Triple-negative breast cancer and its association with obesity. *Molecular and Clinical Oncology*, 7(6): 935–942.
- Suzuki H.İ., (2018). MicroRNA Control of TGF- β Signaling, *International Journal of Molecular Science*, 19, 1901
- Tachibana I., Imoto M., Adjei P.N., Gores G.J., Subramaniam M., Spelberg T.C., Urrutia R., (1997). Overexpression of the TGF β -regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *Journal Clin Invest*; 99: 2365-74.
- Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., Harano T., Yatabe Y., Nagino M., Nimura Y., Mitsudomi T., Takahashi T., (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research*, 64: 3753–3756.
- Tan W., Liu B., Qu S., Liang G., Luow., Gong C., (2018). MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. *Oncology Letters* 15: 2735-2742.
- Tang W., Zhang X., Tan W., Gao J., Pan L., Ye X., Chen L., Zheng W., (2019). miR-145-5p Suppresses Breast Cancer Progression by Inhibiting SOX2. *Journal of Surgical Research*, 236; 278-287.
- Timoneda O., Núñez-Hernández F., Balcells I., Muñoz M., Castelló A., Vera G., Pérez L.J., Egea R., Mir G., Córdoba S., Rosell R., Segalés J., Tomàs A., Sánchez A., Núñez J.I., (2014). The role of viral and host microRNAs in the Aujeszky's disease virus during the infection process. *PLOS One* 9: 86965.
- Vermeulen K., Berneman Z.N., Van Bockstaele D.R. (2003). Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation* 36, 165-75.
- Vural P., (2010). Transforming Growth Factor- β "nın Kanserde Baskılayıcı Rolü, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*; 8(1): 35-42.
- Wan L., Pantel K., Kang Y. (2013). Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic, *Nature Medicine* volume 19, 1450–1464.
- Wang H., Nie L., Wu L., Liu Q., Guo X., (2017). NR2F2 inhibits Smad7 expression and promotes TGF-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition of CRC via

- transactivation of miR-21. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 485: 181–188.
- Wang S., Bian C., Yang Z., Bo Y., Li J., Zeng L., Zhou H., Zhao R.C., (2009). miR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN. *International Journal Of Oncology*, 34: 1461-1466.
- Yalaza M., İnan A. ve Bozer M. (2016). Male Breast Cancer, *The Journal of Breast Health*, 12(1): 1–8.
- Yan X., Xiong X., Chen Y-G., (2018). Feedback regulation of TGF- β signaling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(1), 37–50
- Yan X., XiongX., Chen Y-G., (2018). Feedback regulation of TGF- β signaling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50, 37–50.
- Yang J., Zhang J.-y., Chen J., Xu Y., Song N.-h., Yin C.-j., (2014). Prognostic role of microRNA-221 in various human malignant neoplasms: a meta-analysis of 20 related studies, *PLOS One* 9 (1) e87606.
- Yokuş B. ve Çakır D.Ü. (2012). Kanser Biyokimyası, *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*: 1(2): 7-18.
- Yu. Y., Kanwar S.S., Patel B.B., Oh P.S., Nautiyal J., Sarkar F.H., Majumdar, A.P., (2012). MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor β receptor 2 (TGF β R2) in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 33, 68–76.
- Zeinali, T., Mansooria, B., Mohammadi, A., Baradaran, B., (2019). Regulatory mechanisms of miR-145 expression and the importance of its function in cancer metastasis, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 109: 195-207
- Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A., (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1): 1-12.
- Zhang H., Kolb F.A., Brondani V., Billy E., Filipowicz W., (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *The EMBO Journal*, 21:5875-5885.

- Zhang L., Liao Y., Tang L., (2019). MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38:53.
- Zhang M.H., Man H.T., Zhao X.D., Dong N., Ma S.L. (2014). Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials. *Biomedical Reports*, 2(1): 41–52.
- Zhang Y. ve Lin Q., (2015) MicroRNA-145 inhibits migration and invasion by down-regulating FSCN1 in lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8: 8794-8802.
- Zhang Y.E., (2017). Non-Smad signaling pathways of the TGF-beta family. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 9.
- Zhang Z.W., An Y., Teng C.B., (2009). The roles of miR-17-92 cluster in mammal development and tumorigenesis. *Yi Chuan*, 31:1094-1100.
- http-1:** <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/age> (Son Erişim Tarihi 09.05.2019).
- http-2:** <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents> (Son Erişim Tarihi 09.05.2019).
- http-3:** <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/radiation> (Son Erişim Tarihi 09.05.2019).
- http-4:** <https://www.verywellhealth.com/what-does-malignant-and-benign-mean-514240> (Son Erişim Tarihi 09.05.2019).
- http-5:** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65969/#CDR0000062955_125 (Son Erişim Tarihi 09.05.2019).
- http-6:** <https://www.nationalbreastcancer.org/triple-negative-breast-cancer> (Son Erişim Tarihi 09.05.2019).
- http-7:** http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa (Son Erişim Tarihi 09.05.2019).