



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pervin Elvan TOKGÜN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

MİTOKONDRIYAL miRNA'LARIN (mitomiR) MEME KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA ARAŞTIRILMASI

MAYIS 2018
DENİZLİ

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİTOKONDRİYAL miRNA'LARIN (mitomiR) MEME KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

Pervin Elvan TOKGÜN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. A.Gaye TOMATIR

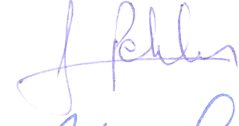
Denizli, 2018

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Pervin Elvan TOKGÜN tarafından Doç. Dr. A.Gaye TOMATIR yönetiminde hazırlanan “ **Mitokondriyal miRNA’ların (mitomiR) Meme Kanseri Hücre Hatlarında Araştırılması**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Saide Bekliin



Danışman:

Doç. Dr. A. Gaye TOMATIR



Üye:

Doç. Dr. Hüseyin ALTINTAŞ

Üye:

Prof. Dr. Hakan AKÇA

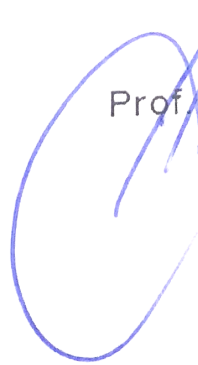


Üye:

Prof. Dr. İbrahim Acıkbasi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.11/05/2018 tarih ve .13/10.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Pervin Elvan TOKGÜN

İmza :



ÖZET

Mitokondriyal miRNA'ların (mitomiR) Meme Kanseri Hücre Hatlarında Araştırılması

Pervin Elvan TOKGÜN
Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji AD
Tez Yöneticisi: Doç.Dr.A.Gaye TOMATIR
Mayıs 2018, 86 Sayfa

Kadınlarda en sık görülen meme kanseri %5 genetik yatkınlıkla ilişkilidir ve otozomal dominant kalıtmıdır. Mitokondri; metabolizma, hücre ölümü ve inflamasyon gibi önemli hücresel olaylarda rol almaktadır. Bu hücresel olayların basamaklarında, küçük RNA'ların (sRNA), özellikle miRNA'ların önemli rol oynadıkları mRNA ve protein seviyelerini kontrol ettikleri bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar olgun miRNA'ların yanı sıra pre-miRNA'ların da mitokondride yer aldıklarını ve proteinlerin bölgeye özgü regülasyonlarını belirlemede mitokondrinin önemini vurgulamaktadır. Bu çalışmada meme kanseri hücre hatlarında, mitokondriyal miRNA'ların muhtemel rollerinin belirlenmesi amaçlandı. Araştırmada, MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarından 'Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)' yöntemi ile mitokondriyal fraksiyonlar hazırlandı. Bu fraksiyonlar RNase A ile yıkanarak sitozolik kontaminasyonun uzaklaştırılması sağlandı. Mitokondriyal DNA tarafından kodlanan genlerin ekspresyonlarının değerlendirildiği mtRNA örneklerinde ekspresyon değişimleri qRT-PCR ve yeni nesil dizileme yöntemleri ile teyit edildi. Küçük RNA dizileme analizi sonucu belirlediğimiz miRNA'ların fonksiyonlarını analiz etmek amacıyla web tabanlı DIANA biyoinformatik analiz programı kullanıldı ve anlamlı bulunan miRNA'ların hangi biyolojik süreç, moleküler işlev ve biyokimyasal yolda yer aldığını belirlemek için Gen Ontoloji (GO) ve Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) yolağı analizleri Fischer's exact testi metoduyla değerlendirildi. Mitokondriyal genom tarafından kodlanan miRNA'ların mitokondriyal genomdaki pozisyonları SerialCloner 2-6-1 programı kullanılarak belirlendi. Araştırmada, mitokondri ile ilişkili en sık belirlenen miRNA hsa-miR-6087-5p, hsa-miR-3960-3p, hsa-miR-7641-5p, hsa-miR-3648-3p, hsa-miR-4488-5p, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-4449-3p, hsa-miR-4484, let-7 ailesi üyeleri (let-7a,b,c,d,e,f,g,i), hsa-miR-1290-3p, hsa-miR-423-5p olmakla birlikte miR-221-3p, miR-92a-3p, hsa-miR-1246-5p, hsa-miR-1275-5p, hsa-miR-663a-5p, miR-25-3p, miR-23a-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-320a-3p'da mitokondri ile ilişkili bulundu. Analiz sonucuna göre; hsa-miR-4461, hsa-miR-4484 ve hsa-miR-4485'nin mitokondriyal genom tarafından sırasıyla ND4L, L-ORF ve 16S rRNA genleri ile homoloji gösteren ve mitokondriyal genomdaki pozisyonlarının (10689–10711) , (5747–5763) ve (2539–2554) olduğu belirlendi.

Tanımlı miRNA'ların yanısıra ilk kez mitokondriyal gen bölgeleri ile homoloji gösteren novel miRNA dizileri de saptandı. Mitokondride lokalize olan veya ilişkili olan miRNA'ların insan sağlığı ve hastalıklar üzerine etkilerinin ve biyolojik önemlerinin aydınlatılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Mitokondri, MACS, mitomiR, novel miRNA

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon (Proje No: 2014SBE011) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Searching for Mitochondrial miRNA's in Breast Cancer Cell Lines

Tokgun, Pervin Elvan

PhD.Thesis in Medical Biology

Supervisor: Assoc.Prof.Dr. A.Gaye ROMATIR (PhD.)

Mayıs 2018, 86 Pages

Breast cancer which is the most common cancer type among women have an autosomal dominant inheritance pattern, as well as 5% of them are being associated with genetic predisposition. The cellular processes are controlled at mRNA and proteins levels in mitochondria, where small RNAs (sRNAs) especially miRNAs play critical roles. The recent studies have led the understanding that mitochondria are one of the destinations of pre-miRNAs besides mature miRNAs. The newly destination of miRNAs suggest the role of mitochondria in following-up site specific regulations of proteins as well as the function of mitochondria. In this study we aimed to identify possible roles of mitochondrial miRNAs in breast cancer cell lines. Therefore, mitochondrial fractions were prepared from MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells by using 'Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)' methodology. Fractions were treated with RNase A in order to remove cytosolic contaminants. In mtRNA samples expression changes were evaluated both qRT-PCR and next generation sequencing. As a result of small RNA sequencing, in order to identify the functions of miRNAs, a web based tool was used. Gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were evaluated by Fisher's exact test method. Genomic positions of mitochondrial encoded miRNAs were detected by using SerialCloner 2-6-1 programme. hsa-miR-6087-5p, hsa-miR-3960-3p, hsa-miR-7641-5p, hsa-miR-3648-3p, hsa-miR-4488-5p, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-4449-3p, hsa-miR-4484, let-7 family members, hsa-miR-1290-3p and hsa-miR-423-5p was found to be most relevant with mitochondria as well as miR-221-3p, miR-92a-3p, hsa-miR-1246-5p, hsa-miR-1275-5p, hsa-miR-663a-5p, miR-25-3p, miR-23a-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-320a-3p. hsa-miR-4461, hsa-miR-4484 and hsa-miR-4485 aligned to mitochondrial genome at positions (10689–10711), (5747–5763) and (2539–2554) corresponding to ND4L, L-ORF and 16S rRNA genes respectively.

In this study besides known miRNAs, novel miRNAs which are shown to have homology with mitochondrial genes were also identified. Further studies are required for enlightening the biological importance and effects on human health of mitochondria-localized or related miRNAs.

Keywords: breast cancer, mitochondria, MACS, mitomiR, novel miRNA

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects
Coordination Unit through project numbers 2014SBE011**

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince tecrübelerinden yararlandığım başta tez danışman hocam Doç. Dr. A. GAYE TOMATIR olmak üzere,

Tez sürecinde gerçekleştirdiğimiz toplantılarda bilimsel ve deneysel katkılarını benden esirgemeyen değerli TİK komitesi üyelerine,

Tüm eğitim sürecimde bana kattıkları değerli bilgiler ve yorumlarla bilimsel alt yapımın gelişimine katkısı bulunan tüm hocalarıma,

En iyi şekilde eğitim almam için hayatlarını bana adayan, yol gösteren ve her koşulda yanımda olan canım anneme ve babama; kardeşime; birlikte hem bir hayatı hem de eğitim sürecini paylaştığım, bütün zorlukları birlikte aştığım ve bana her anlamda desteğini hissettiren canım eşime ve en güzel hediyemiz canım kızıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELEr VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Meme Kanseri.....	3
2.2. Meme Kanseri Evrelendirmesi.....	7
2.3. Meme Kanseri Tipleri.....	7
2.3.1. In situ.....	7
2.3.2. İnvaziv.....	8
2.4. Meme Kanselerinde Tedavi Hedefleri.....	8
2.5. Mitokondri.....	9
2.6 Meme Kanserinde Mitokondriyal disfonksiyon.....	12
2.7. Kodlamayan RNA'lar ve miRNA biyogenezi.....	13
2.8. Meme Kanseri ve miRNA ilişkisi.....	14
2.9. Mitokondriyal miRNA'lar (mitomiR).....	15
2.10. Mitokondrideki miRNA'lar ve Meme Kanseri.....	18
2.11. Hipotez ve Bilimsel Katkı.....	19
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Gereçler.....	20
3.2. Yöntemler.....	21
3.2.3 Hücrelerin Çözülmesi.....	22
3.3. Mitokondri İzolasyonu.....	23

3.4. RNase A muamelesi:	24
3.5. Total RNA izolasyonu	24
3.5.1 RNA Miktar ve Saflık Tayini	25
3.6. DNA İzolasyonu	25
3.6.1. DNA Miktar ve Saflık Tayini	26
3.7. Mitokondriyal RNA'nın cDNA'ya çevrimi	26
3.8. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (qRT-PCR)	26
3.9. Küçük RNA Dizileme (Small RNA sequencing)	27
3.10. Küçük RNA Dizileme Analizi	28
3.11. miRNA hedeflerinin Gen Ontoloji (GO) terimleri, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) yolak analizi ve Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) veritabanı analizi	29
4. BULGULAR	30
4.1. Mitokondriyal RNA'nın İzolasyon ve Analizi	30
4.2. Mitokondri ile İlişkili sRNA Kütüphanelerinin Analizi	33
4.3. Mitokondri ile İlişkili miRNA'ların Belirlenmesi	38
4.4. Novel miRNA'ların Belirlenmesi ve sRNA'ların Mitokondriyal Genom ile Eşleştirilmesi	41
4.5. mitomiR'lerin GO ve KEGG yolak analizleri ve STRING protein-protein etkileşim analizi	44
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ	58
7. KAYNAKLAR	59
8. ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1 İnsan mitokondri genleri.....	11
Şekil 2 İnsan hücresinde miRNA regülasyonu.....	14
Şekil 3 Hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü	22
Şekil 4 Magnetic activated cell sorting (MACS) metodu	24
Şekil 5 Illumina HT2500 Yeni Nesil Dizileme Cihazında miRNA Dizileme Çalışması Aşamaları	28
Şekil 6 Dizileme sonrası elde edilen verilerin işlenmesi ve biyoinformatik analiz aşamaları	29
Şekil 7 Dounce homojenizatör yardımıyla hücrelerin lizis edilmesi	30
Şekil 8 OXPHOS genlerinin ekspresyonlarının karşılaştırılması	31
Şekil 9 MCF-10A hücrelerinden izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda genomik kontaminasyonun qRT-PCR yöntemiyle RNA düzeyinde kontrolü.	31
Şekil 10 MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda genomik kontaminasyonun qRT-PCR yöntemiyle RNA düzeyinde kontrolü.	32
Şekil 11 MCF-7 hücrelerinden izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda genomik kontaminasyonun qRT-PCR yöntemiyle RNA düzeyinde kontrolü.	32
Şekil 12 Mitokondri ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının yeni nesil dizileme yöntemiyle analizi	33
Şekil 13 Yeni Nesil Dizileme için örneklerden kütüphane oluşturma ve hazırlanan kütüphanenin kalite kontrolü	34
Şekil 14 Örneklerdeki okuma uzunluğu dağılım grafiği.....	35
Şekil 15 Çalışmada kullanılan hücrelerdeki RNA içeriği.....	37
Şekil 16 Çalışmada kullanılan hücrelerdeki sRNA sınıflarının okuma yüzdeleri.....	38
Şekil 17 miRBase'de tanımlı miRNA'ların dağılımı.....	39
Şekil 18 Ekspresyonu artan ve azalan miRNA'ların ekspresyon grafiği	40
Şekil 19 SerialCloner 2-6-1 programı kullanılarak tanımlı miRNA (mitomiR) dizilerinin mitokondriyal genom ile eşleştirilmesi.....	41
Şekil 20 Novel miRNA dağılımı.....	42
Şekil 21 Novel miRNA'ların okuma sayısı grafiği.....	42
Şekil 22 Novel miRNA prekürsör dizilerin mitokondriyal genom ile eşleştirilmesi.....	43
Şekil 23 Belirlenen miRNA'ların GO analizi sonucu heat-map analizi	46
Şekil 24 Belirlenen miRNA'ların KEGG yolak analizi sonucu ortak olan yolların heat- map analizi	48
Şekil 25 hsa-miR-4461'in homoloji gösterdiği MT-ND4L geninin STRING v10.5 veritabanı kullanılarak protein-protein etkileşim analizi	49

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Meme Kanseri Evrelendirmesi.....	7
Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	20
Tablo 3. Çalışmada kullanılan kitler.....	20
Tablo 4. mRNA Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmasında kullanılan primer oligonükleotitler.....	21
Tablo 5. Illumina HT2500 cihazında dizileme sonrası elde edilen ham veri istatistikleri.....	34
Tablo 6. Cutadapt programı kullanılarak adaptör dizilerin kırılmasından sonra elde edilen işlenmiş veri istatistikleri.....	35
Tablo 7. 15 nükleotidden küçük dizelerin filtrelenmesi ile genom ile eşleştirilmek üzere elde edilen veri istatistikleri.....	35
Tablo 8. Metastatik meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerinin normal meme (MCF-10A) ve Metastatik olmayan (MCF-7) meme kanseri hücre hatları ile kıyaslandığında ekspresyon artışı saptanan miRNA'lar.....	39
Tablo 9. Normal meme hücre hattı ile kıyaslandığında meme kanseri hücre hatlarında ekspresyonu azalan miRNA'lar.....	40
Tablo 10. Novel miRNA dizilerinin kromozomal lokasyonları ve kodlandıkları genler.....	44
Tablo 11. mitomiR hedeflerinin GO Analizi (DIANA, biyolojik proseslere göre sınıflandırma).....	45
Tablo 12. mitomiR hedeflerinin GO Analizi (DIANA, hücresel komponentlere göre sınıflandırma).....	45
Tablo 13. mitomiR hedeflerinin GO Analizi (DIANA, moleküler fonksiyona göre sınıflandırma).....	45
Tablo 14. mitomiR hedefleri için KEGG Analizi.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGO	Argonat
ATM	ATM serin/tirozin kinaz
ATP	Adenozin trifosfat
ATP8	ATP sentaz membran subunit 8
BRCA1	Meme kanseri 1
BRCA2	Meme kanseri 2
CDH1	Kaderin 1
cDNA	Komplementer DNA
CHEK2	Kontrol noktası kinaz 2
D.C.I.S	Duktal karsinoma in situ
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Dinükleotidtrifosfat
E.T.Z	Elektron transport zinciri
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERBB2	erbB-2 reseptör protein tirozin kinaz 2
FBS	Fetal Dana Serumumu
GO	Gen ontoloji
HER2	İnsan epidermal büyüme faktör reseptör 2
HR	Hormon reseptörleri
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFR	İnsülin benzeri büyüme faktör 1 reseptörü
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L.C.I.S	Lobuler karsinoma in situ
lncRNA	Uzun kodlamayan RNA
LOH	Heterozigozite kaybı= <i>Loss of heterozygosity</i>
M.A.C.S	Magnetic Activated Cell Sorting
miRNA	mikroRNA
mitomiR	Mitokondriyal miRNA
MT-CO1	Mitokondriyal sitokrom c oksidaz 1
MT-TK	Mitokondriyal kodlanan tRNA lizin
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MT-OHR	Mitokondriyal kodlanan ağır zincir replikasyon orijini
MYC	Avian myelocytomatosis viral oncogene Homolog
ncRNA	Kodlamayan RNA
ND4L	NADH dehidrogenaz subunit 4L
ND5	NADH dehidrogenaz subunit 5
nt	Nükleotid
OXPHOS	Oksidatif fosforilasyon
piRNA	piwi etkileşimli RNA
pre-miRNA	Prekürsör miRNA
pri-miRNA	Primer miRNA
PTEN	Fosfataz ve Tensin homolog
qRT-PCR	Kantitatif Eş Zamanlı PZR

RNAi
ROS
rRNA
Siklin D1
snoRNA
snRNA
sRNA
srpRNA
STRING

T.C.A
TFAM
TIM
TOM
TP53
tRNA
VEGF
XPD

RNA interferans
Reaktif oksijen türleri
ribozomal RNA
CCND1
Küçük nükleolar RNA
Küçük nüklear RNA
Küçük RNA
Sinyal tanıma partikül RNA
Search Tool for the Retrieval of Interacting
Genes/Proteins
Trikarboksilik asit siklusu
Mitokondriyal transkripsiyon faktörü
İç membran translokonları
Dış membran translokonları
Tümör protein p53
Transfer RNA
Vasküler endotelial büyüme faktörü
ERCC Excision Repair 2



1.GİRİŞ:

Meme kanseri kadınlarda kanser nedenli ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla oldukça düşüktür. Heterojen ve kompleks bir genetik değişim saptanması meme kanseri etiyojisi ile ilişkilidir. Diğer pekçok kanser türünde olduğu gibi meme kanseri de ilk olarak tek bir hücreden orijinlenerek farklı karakterdeki farklı klonların gelişimi nedeniyle malignant hale dönüşmektedir. Meme kanseri hücre genomundaki somatik değişimler amplifikasyonlar, delesyonlar ve gen mutasyonlarıdır. Meme tümörlerinde bilinen onkogenleri içeren pekçok kromozom bölgesi amplifiye olmuştur. Amplifiye olduğu bilinen onkogenler; avian myelocytomatosis viral oncogene Homolog (MYC), erbB-2 reseptör protein tirozin kinaz 2 (ERBB2) ve Siklin D1 (CCND1) genleridir. Tümör protein p53 (TP53) ve kaderin 1 (CDH1) tümör baskılayıcı genlerinde mutasyon saptanmış olup ayrıca 1, 3p, 6q, 7q, 8p, 9p, 10q, 11, 13q, 16q, 17, 18q, 22q ve X kromozomlarında heterozigozite kaybı (*Loss of heterozygosity=LOH*) belirlenmiştir. Heterozigozite kayıpları tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile ilişkili olabilmektedir (Kreipe vd, 1993; Kallioniemi vd, 1994; Muleris vd, 1994).

Mitokondri, hücre çoğalması ve sağkalımını da kapsayan pekçok anahtar metabolik sürecin bütünleştirilmesi için kritik bir organeldir. Hücreler enerji çevrimi ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) aracılı adenzin trifosfat (ATP) üretimi, yağ asidi ve aminoasit metabolizası, hücresel redoks durumunun kontrolü, büyüme ve sağkalım için mitokondriyal metabolik yollara gereksinim duyarlar (Raimundo vd, 2012; Richter-Dennerlein vd, 2015). Mitokondri endosimbiyoz aracılığıyla bakteriyel atadan orijinlenmiştir ve sirküler genoma sahiptir. Kendi oluşumu ve fonksiyonu için ise büyük ölçüde nükleer deoksiribonükleik asit (DNA)'ya bağımlıdır. Mitokondriyal proteomun %99'u nüklear genom tarafından kodlanır ve prekürsör proteinler olarak sitoplazmada sentezlenerek mitokondriye taşınır (Schmidt vd, 2010). Bu sebeple mitokondri, fonksiyonel oksidatif fosforilasyon sistemi kurmak ve esansiyel metabolitleri oluşturmak için hem mitokondri hem de nüklear genom tarafından kodlanan proteinlere gereksinim duyar.

Kodlamayan genomun büyük kısmı yani total genomun %98'inden fazlası, ribozomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA), küçük nüklear RNA (snRNA), küçük nükleolar RNA (snoRNA), mikroRNA (miRNA) ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA) gibi kodlamayan RNA (ncRNA) türlerinden transkribe olmaktadır (Carninci vd, 2005). Son yayımlanan GENCODE sürüm v25'e göre insan genomunun 4000'den fazla miRNA içerdiği gösterilmiştir. Gün geçtikçe miRNA'ların mitokondriyal fonksiyonlar üzerinde rolleri olduğu destekleyen çalışmalar ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmalar pek çok kodlamayan RNA sınıfının mitokondri biyolojisini direkt ya da indirekt yolla etkileyebileceği üzerinde durmaktadır. Ayrıca, mitokondri ya da nükleus gibi subselüler bölümlerin miRNA'larla oldukça ilişkili oldukları oldukça açıktır; fakat mitokondride lokalize olan miRNA'ların mitokondriyal genomdan mı yoksa sadece nüklear genom tarafından mı kodlanıp daha sonra mitokondriye aktarıldığı açıklık kazanmamıştır. Nüklear ya da mitokondriyal yerleşimlerine istinaden mitomiR'lerin biyolojik ve patofizyolojik gereksinimleri tam olarak anlaşılmiş değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalara dayanarak mitokondride lokalize miRNA'ların mitokondriyal genomun post-transkripsiyonel düzenleyicilerinin önemli bir sınıfı olarak iş gördüğü öngörülebilir. Mitokondriyal DNA'nın mitomiR'ler için bir hedef, bir kaynak ya da her ikisi de olabileceği tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, mitokondrinin hem miRNA kaynağı hem de nüklear kodlanan ve mitokondride lokalize miRNA'lar için bir hedef olduğuna yönelik gelişmeler mevcuttur. 22 nt uzunluğundaki kanonikal miRNA'ların aksine mitomiR'lerin 17 ile 27 nt arasında olağandışı bir büyüklükleri olduğu ve onları diğer sitozolik miRNA'lardan ayrı kılan farklı termodinamik özelliklere (minimum katlanma enerjisi) sahip oldukları düşünülmektedir (Bandiera vd, 2011).

1.1. Amaç

Kodlamayan RNA'ların, özellikle miRNA'ların, genlerin ekspresyonunda önemli regülatörler olarak rol aldığı çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalar ile gösterilmesinin ardından (Chen vd, 2012; Çelik, 2013; Duarte vd, 2015), son 2-3 yılda miRNA'ların dışında diğer kodlamayan RNA sınıflarının da kanser ve benzeri hastalıkların gelişiminde rolleri araştırılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, kanserin oluşum sebeplerinden birinin mitokondrideki defektler olduğunu göz önüne alarak; mitokondride farklı ekspresyona sahip mitomiR'leri meme kanseri hücre hatlarında tanımlamayı ve hedef genlerini belirlemeyi amaçladık.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanser tipidir. Akciğer kanserinden sonra dünya da görülme sıklığı en yüksek olan kanser türüdür. Erkeklerde kadınlara oranla görülme sıklığı 1/100'dür.

2.1.1. Epidemiyoloji

Dünya çapında 184 ülkenin 140 tanesinde meme kanserinin kadınlar arasında en yaygın kanser ölüm nedeni olduğu belirlenmiştir ve günümüzde diğer kanserlerle kıyaslandığında her dört kadından birine tanı konması sebebiyle kadınlar arasında en sık tedavi edilebilen kanser türü olmuştur (Web1). Gelişmiş ülkelerde tüm ölümlerin %15.4'ünü oluşturması sebebiyle akciğer kanserinden sonra gelen en önemli kanser türüdür. Gelişmekte olan ülkelerde ise tüm ölümlerin %14.3'ünü oluşturmaktadır (Elgailli vd, 2010; Ly vd, 2011; American Cancer Society, 2011).

Ülkemizdeki son resmi rakamlara göre bir yıl içerisinde 96.200 erkek ve 67.200 kadına kanser teşhisi koyulduğu tahmin edilmektedir. Son 5 yılın verileri kanser sıklığında herhangi bir artış ya da azalmanın olmadığını göstermektedir. Ülkemizde 1 yıl içinde yaklaşık 17.000 kadına meme kanseri teşhisi koyulmuştur Kansere dayalı ölümler incelendiğinde 2015 yılı içerisinde meme kanserinden hayatını kaybeden kadın sayısının 3.853 olduğu belirlenmiştir (web2) (türkiye kanser istatistikleri, 2014).

2.1.2. Etiyoloji

Meme kanserinin etiyojisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte genetik faktörler, hormonlar, çevresel faktörler, vb. nin meme kanseri gelişiminde rol aldığı bilinmektedir.

2.1.2.1. Çevresel Faktörler

İyonize radyasyona maruziyet, medikal tanı ya da terapötik prosedürlerin meme kanseri gelişimi riskini arttırdığı gösterilmiştir (International agency for research on cancer, 2000).

Atom bombasından sağ kalan kişilerde yapılan bir çalışmada radyasyona maruz kalan kişilerde meme kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir. Meme kanseri riskinin radyasyona maruziyetten yaklaşık 8 yıl sonra ortaya çıktığı ve 35 yıldan fazla bir sürede artmaya devam ettiği ve çok düşük dozlara maruziyetin dahi artmış kanser riskine sebep olduğu gösterilmiştir (Preston vd, 2002; Travis vd, 2003; Moskowitz vd, 2014; Schaapvelt vd, 2015).

2.1.2.2. Sigara

Yapılan pek çok çalışmada, özellikle ilk gebelikten önce uzun süreli sigara kullanan tiryaki kadınlar arasında sigara kullanımının meme kanseri riskini oldukça arttırdığı gösterilmiştir. Amerika Kanser Topluluğu araştırmacıları yaptıkları araştırmalarda ilk gebeliğinden önce sigaraya başlayan kadınlarda içmeyenlere kıyasla %21 oranında artmış risk tespit etmişlerdir. Dolaylı sigara kullanımının menapoz öncesi meme kanseri riskini arttırabileceği de ileri sürülmüştür (Gaudet vd, 2013; Dossus vd, 2014; Macacu vd, 2015; White vd, 2017).

2.1.2.3. Alkol

Yapılan pek çok çalışmada her gün günde bir bardak alkol tüketen kadınlarda meme kanseri riskinin yaklaşık %7-%10 oranında arttığı gösterilmiştir. Günde 2-3 bardak alkol tüketiminin ise bu riski %20 oranında arttırdığı gözlenmiştir (Liu vd, 2015; Jayasekara vd, 2016). Alkol östrojen ve androjen seviyelerinde artışa neden olarak meme kanseri riskini arttırmaktadır (Singletary ve Gapstur, 2001). Bunun yanısıra, alkol kullanımının büyük ölçüde HR+ meme kanserleri için artmış risk ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Jung vd, 2016).

2.1.2.4. Beslenme

Bu zamana kadar pek çok çalışmada besin tüketimi (yağ, soya, et, meyve, sebze lifli besinler vb) ve meme kanseri arasındaki ilişki araştırılmıştır. İlk yıllardaki çalışmalar yağ alımı üzerinde dursalar da son zamanlarda yapılan meta analiz çalışması sonucuna göre aralarında hiçbir ilişki saptanamamıştır (Cao vd, 2016). Yine bir meta-analiz araştırmasında Asya popülasyonunda, Batı toplumu ile kıyaslandığında soya alımı ile meme kanseri riski arasında ters bir ilişki saptayarak bunun sebebini de Asyalı kadınların Batılılara göre muhtemelen daha erken yaşta soya ürünlerini tüketmeye başlamış olmalarına bağlamışlardır (Chen vd, 2014).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda yüksek miktarda sebze/meyve tüketiminin meme kanseri riskini azaltabileceği üzerinde durulmuştur (Jung vd, 2013; Farvid vd, 2016; Emaus vd, 2016). Bu bulgular düşük meme kanseri riski ile kanda yüksek miktarda karetenoid saptanması arasındaki ilişkinin gösterilmesiyle desteklenmiştir (Eliassen vd, 2015; Wang, 2015; Bakker vd, 2016).

2.1.2.5. Obezite

Menapoz sonrası meme kanseri riski kilolu kadınlarda yaklaşık 1.5 kat, obez kadınlarda ise 2 kat daha fazladır. Bu da postmenapozal kadınlarda yağ dokusunun östrojenin büyük kaynağı olmasından dolayı östrojen seviyesinin daha yüksek olmasının yanısıra yüksek insülin seviyesinin de görüldüğü diğer mekanizmalarla da ilişkilendirilmektedir (La Vecchia vd, 2011; Gunter vd, 2015; Picon vd, 2017).

Kilo alımının aynı zamanda menopoz sonrası meme kanseri riskini arttırdığı yapılan bir meta analiz araştırmasıyla gösterilmiştir. Bu araştırmaya göre erişkin dönemde alınan her 5 kilo %11 oranında meme kanseri riskini arttırmaktadır (Keum vd, 2015). Bununla birlikte bazı araştırmalar kilo kaybının azalmış risk ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte tutarlı sonuçlar elde edilememiştir (Eliassen vd, 2006; Teras vd, 2011; Emaus vd, 2014).

2.1.2.6. Menapoz sonrası hormonlar

Hormon terapisi ya da hormon replasman terapisinde östrojen ve progesterin ile kombine olarak kullanılan hormonlar meme kanseri riskini arttırmaktadır (Chlebowski vd, 2013; Manson vd, 2013). Östrojen ve progesterin terapisi ile ilişkilendirilen artmış riskin çoğunlukla mamografik yoğunluktaki artışa bağlı olabileceği düşünülmektedir

(Boyd vd, 2007). Ayrıca menapoz döneminde bu hormonları kullanan kadınlarda risk daha da fazladır (Beral vd, 2011; Chlebowski vd, 2013).

2.1.2.7. Aile Geçmişi

Birinci derece akrabalarında meme kanseri öyküsü olan kadın ve erkekler bu hastalık için artmış risk taşımaktadırlar. Aile öyküsü olmayan bireylerle karşılaştırıldığında ailede etkilenmiş bir birey bulunması halinde yaklaşık risk 2 kat, birden fazla birey bulunması halinde ise 3-4 kat olarak görülmektedir. Ailedeki etkilenmiş bireş erken yaşta tanı almış ise ya da kanser her iki memede tanı almış ise risk daha da artmaktadır (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001)

Ailede yumurtalık kanseri geçmişinin olması da kadın ve erkekler de artmış meme kanseri riski ile ilişkilendirilmektedir.

2.1.2.8. Genetik Yatkınlık

Kanser, mutasyonlar ve gen ekspresyonlarındaki değişimlerle meydana gelen malignant transformasyon olarak adlandırılan kontrolsüz hücre büyümesi ile sonuçlanan bir süreçtir (Bertram, 2000). Meme kanseri karsinogenezinde pek çok düşük penetranslı genin ilişkisi olduğu ve meme kanseri gelişiminde kümülatif olarak nitelendirilebilen riskin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Meme kanserinin %5'i genetik yatkınlıkla ilişkilidir ve otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır. Meme kanseri 1 (BRCA1) ve Meme kanseri 2 (BRCA2) genlerindeki mutasyonlar oldukça yüksek oranda meme/over kanser riski ile ilişkilidir. Bu mutasyonları taşıyan kadınların %65-%85'i invaziv meme kanseri, %15-%65'i invaziv over kanseri gelişimi için yaşam boyu risk taşımaktadır (Chattarjee vd, 2006; Plak vd, 2009). BRCA1 ve BRCA2 dışındaki meme kanserine yatkınlık ile ilişkili diğer genler TP53, p53 tamir yolağındaki genler, Fosfataz ve Tensin homolog (PTEN) geni ve kontrol noktası kinaz 2 (*Checkpoint Kinase 2*=CHEK2) genidir. Meme kanseri olan hastalarda mutasyona uğramış diğer genler ATM serin/tirozin kinaz (ATM), ERCC Excision Repair 2 (XPD) ve İnsan epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER-2) genleridir (Aral ve Özer, 2007; Modica-Napolitano vd, 2007).

2.2. Meme Kanseri Evrelendirmesi

İnvaziv meme kanseri prognozu hastalığın evrelerinden oldukça etkilenmektedir. Kanser için 2 ana evreleme sistemi vardır. Tümörlerin sınıflandırması için tümör boyutu ve yayılımına (T), yakındaki lenf nodüllerine yayılımına (N) ve uzak metastaz varlığına/yokluğuna (M) dayalı bilgiler kullanılır (Edge, 2010). T, N, M kriterlerinin belirlenmesinin ardından 0, 1, 2, 3, 4 evreleri belirlenir. Evre 0 in situ (köken aldıkları meme kanalları ve bezlerine penetre olmamış anormal hücreler) olarak nitelendirilirken, Evre 1 invaziv kanserin erken evresi, Evre 4 ise son evre olarak tanımlanır. Klinikte en yaygın kullanılan sistem ise TNM sistemidir (Giuliano vd, 2017) (Tablo 1).

Tablo 1 Meme Kanseri Evrelendirmesi (Edge, 2010)

Evre	Primer Tümör	Nodül	Metastaz
1A	≤20mm	Yok	Yok
1B	≤20mm	Mikrometastaz (>0.2mm < 2mm)	Yok
IIA	≤20mm	N1	Yok
	>20mm ≤50mm	Yok	Yok
IIB	>20mm ≤50mm	N1	Yok
	>50mm	Yok	
IIIA	≤50mm	N2	Yok
	>50mm	N1 veya N2	
IIIB	Göğüs duvarı ya da cilde yayılım	N0-N2	Yok
IIIC	Herhangi büyüklükte	N3	Yok
IV	Herhangi büyüklükte	herhangi tutulum	belirgin

2.3. Meme Kanseri Tipleri

2.3.1. In situ

In situ meme kanserin 2 ana tipi bulunmaktadır: Duktal karsinoma in situ (DCIS) ve lobuler karsinoma in situ (LCIS). DCIS, in situ vakaların %83'ünü oluşturmakla birlikte, anormal hücrelerin meme kanallarını sınırlandıran normal epitel hücreler ile yer değiştirdiği durumu gösterir. LCIS ise in situ vakaların %13'ünü oluşturmakla birlikte, memenin bazı lobüllerinin çevresinde çoğalan anormal hücreler olarak adlandırılır.

2.3.2. İnvaziv

Meme kanserlerinin %80'i invazivdir. Köken aldıkları meme bezlerinin ya da kanallarının duvarlarını yıkarak çevreleyen meme dokusunda çoğalırlar. Meme kanseri tek bir hastalık olarak görülse de yaklaşık 21 tane histolojik alttipe ve en az 4 farklı moleküler alt tipi bulunmaktadır (Tamimi vd, 2012; Dieci vd, 2014). Gen ekspresyonu profilendirme teknikleri meme kanserinin moleküler alt tiplerinin daha iyi anlaşılabilmesine olanak sağlamıştır. Bu moleküler alt tipler hormon reseptörleri (HR+/HR-) varlığı/yokluğuna, HER2 seviyesine ve/veya HER2 geninin ekstra kopyasını içeren biyolojik belirteçlerin rutin olarak değerlendirilmesiyle tanımlanmıştır (Cheang, 2015). Meme kanserinin moleküler alt tipleri ve dağılımları aşağıdaki şekildedir.

- ✓ **Luminal A (HR+/HER2-):** %71 oranında gözlenmektedir. Bu kanserler yavaş çoğalırlar ve diğer alt tiplere göre daha az agresiftir. Anti-hormon tedavilere daha çok cevap verirler (Blows vd, 2010; Haque vd, 2012).
- ✓ **Luminal B (HR+/HER2+):** %12 oranında gözlenmektedir. Luminal A kanserler gibi Luminal B kanserler de ER+ ve/veya PR+'dır. Ki67 ya da HER2 belirteçleri yüksek pozitifdir. Luminal B kanserler ileri evredirler ve Luminal A kanserlere kıyasla düşük sağkalım gösterirler (Haque vd, 2012).
- ✓ **Üçlü Negatif (HR-/HER2-):** %12 oranında gözlenmektedir. Östrojen reseptör, progesteron reseptör ve HER2- oldukları için bu kanserler siyahi kadınlarda beyaz kadınlara göre 2 kat daha yaygındır. Aynı zamanda menapoza girmemiş ve BRCA1 gen mutasyonu taşıyan kadınlarda daha yaygın görülmektedir (Perou ve Borresen-Dale, 2011). Üçlü negatif meme kanserlerinin yaklaşık %75'i basal-benzeri alt tiptir. Bu kanserler diğer alt tiplere kıyasla daha kötü, kısa süreli prognoza sahip olmakla birlikte bu tümörler için hedef tedaviler şu anda mevcut değildir (Bianchini vd, 2016).
- ✓ **HER2-zenginleştirilmiş (HR-/HER2+):** %5 oranında gözlenmektedir. Bu kanserler diğer alt tiplere göre daha agresif yayılım gösterirler ve HR+ meme kanserlerine kıyasla kötü, kısa süreli prognoza sahiptir (Haque vd, 2012).

2.4. Meme Kanserlerinde Tedavi Hedefleri

Son yıllarda meme kanseri ile ilişkili önemli yolakların ve moleküler olayların belirlenmesi ile ilgili ciddi ilerlemeler kaydedilmeye başlanmıştır. Böylelikle yeni hedeflerin ve anti-kanser tedavilerin tanımlanmasına ışık tutulmaya başlanmıştır.

Tedavi hedefleri hücre çoğalması, sağkalımı, migrasyon, invazyon, apoptoz, hücre döngüsü düzenlemesi ve anjiogenez gibi kanser fenotipinden sorumlu anahtar moleküler olaylarla ilişki moleküllere yüksek spesifite göstermektedir. Meme kanserinin tedavisinde kullanılan trastuzumab ve lapanitib'in HER2'ye karşı (Ishida vd, 2009; Schilling vd, 2009; Michalaki vd, 2010) ve bevacizumab'ın da vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) karşı (Greil vd, 2009; Miles vd, 2010; Valachis vd, 2010; Valero vd, 2011) onaylanmış bir ajan olduğu bildirilmiştir. Bunların dışında epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) (Green vd, 2009; Baselga vd, 2010; Cristofanilli vd, 2010), kombine EGFR ve HER2 inhibitörleri (Blackwell vd, 2010; Scaltriti vd, 2010), VEGF/VEGFR inhibitörleri ve PI3K/AKT/mTOR (Chollet vd, 2006; Br nner-Kubath vd, 2010), RAS/MEK/ERK gibi önemli sinyal yolakları ile etkileşen ajanlar (Johnston vd, 2003; Lorusso vd, 2005; Sparano vd, 2009; Moreno-Aspitia vd, 2009; Baselga vd, 2009); Src inhibitörleri (Finn vd, 2009; Cortes vd, 2009; Chen vd, 2010; Hebbard vd, 2011), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)/IGF reseptörü (IGFR) inhibitörleri (Rowinsky vd, 2001; Rowe vd, 2008) gibi tirozin kinazlara karşı ajanlar; Poli ADP Riboz polimeraz inhibitörleri gibi apoptozu indükleyen ajanlar (Liang ve Tan, 2010); matriks metalloproteinaz inhibitörleri (Erllichman vd, 2001) gibi invazyon ve metastazi hedefleyen ajanları içeren pekçok hedef ajan da klinik öncesi ve klinik denemeler aşamasındadır.

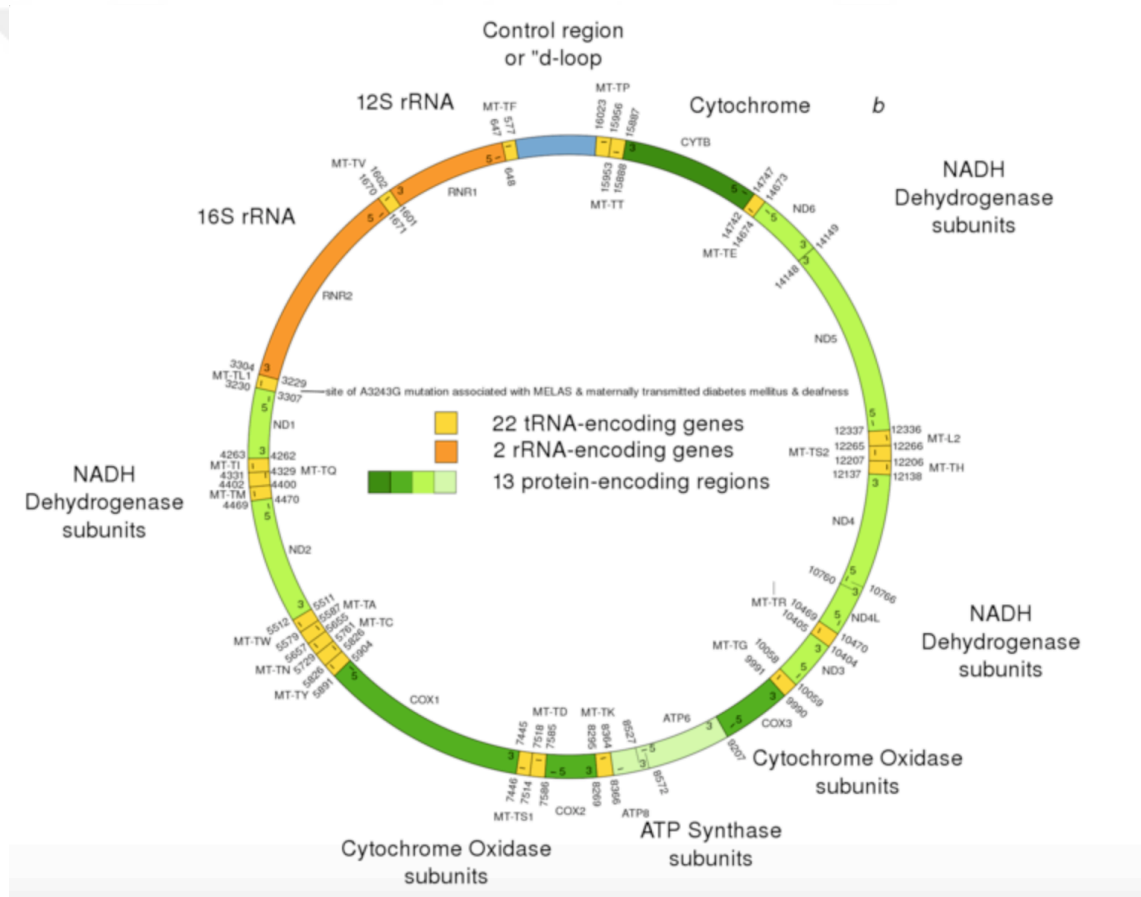
2.5. Mitokondri

Mitokondri yaklaşık 0.5–1 µm genişliğinde ve yaklaşık 7 µm uzunluğunda olan çift membranlı bir organeldir. Mitokondri dış membranı sitozolü iç membrandan ayırmaktadır ve sitozol ile bir arayüz oluşturmak ve mitokondrinin hücredeki hareketi için önemli olan sitoskelet elemanları ile etkileşiminden sorumludur. Bu hareketlilik hücre bölünmesi ve farklılaşması sürecinde mitokondri dağılımı için gereklidir. İç membran ara mebran boşluğunu matriksten ayırmaktadır ve krista adı verilen kıvrımlar yer almaktadır. Krista bu membranın yüzey alanının artmasını sağlamaktadır. Mitokondriyal matriks pekçok enzimi barındırmakla birlikte ribozom, matriks granülleri ve mitokondriyal DNA gibi moleküller ve diğer yapıları içermektedir. Mitokondri ATP üretiminin yanısıra metabolizma, apoptoz, hastalık ve yaşlanma gibi pekçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde önemli rol oynayan oldukça dinamik bir organeldir. Mitokondriyal fonksiyon hücre yaşam ve ölümü için bir anahtar olmakla birlikte mitokondriyal metabolizmanın deregülasyonu da pekçok hastalığın patogenezi için oldukça kritiktir (Kushnareva ve Newmeyer, 2010; Bienerova-Vasku vd, 2013).

Hücreler sadece kendi canlılık fonksiyonları için enerjiye gereksinim duymazlar, programlı hücre ölümü ya da apoptoz aracılığıyla ölümleri için de enerji gereksinimleri bulunmaktadır. Bu sebeple, mitokondri oksidatif ATP üretiminin yanısıra serbest yağ asitlerinin beta oksidasyonu, aminoasit metabolizması, serbest radikal türlerinin üretimi, Fe/S kümelerinin oluşumu ve taşınımı, demir metabolizması gibi başka fonksiyonlarda görev almakla birlikte kalsiyum homestazında da önemli rol oynamaktadır (Michel vd, 2012). Ayrıca oksidatif fosforilasyonun merkezidir. Hücresel enerjinin %95'i mitokondrideki oksidatif fosforilasyon ile sağlanır. Bu proses kompleks I-V olmak üzere 5 farklı protein kompleksini içermektedir. İç membrandaki solunum zinciri ya da elektron transport zinciri (ETZ), koenzim Q ve sitokrom c elektron transfer komponentleri ile ilişkilidir. Matrikste piruvat oksidasyonu, yağ asitlerinin beta oksidasyonu ve trikarboksilik asit siklusu (TCA) yolları iş görmektedir. Sitokrom c de dahil olmak üzere 91 polipeptid OXPHOS ile direkt olarak ilişkilidir. Bu proteinlerden bazıları nükleer bazıları ise mitokondriyal kodlanmaktadır (DiMauro, 2011). mtDNA'nın sınırlı kodlama kapasitesinden dolayı biyolojik fonksiyonları ve yapısal komponentler için nükleer genlere gereksinim duyar. Bunun yanısıra, nükleer kodlanmış genler mitokondriyal transkripsiyon, translasyon ve mtDNA replikasyonunu da düzenlerler. Bu sebeple nükleer ve mtDNA'nın iş birliği farklı fizyolojik ve hastalık durumlarına cevap olarak OXPHOS kapasitesinin düzenlenmesi açısından gereklidir (Zorzano vd, 2010; Peralta vd, 2012). Oksidatif fosforilasyon prosesi DNA, RNA seviyelerinde ve fosforilasyon ve asilatasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlarla kontrol edilir. Kompleks I-V aracılı yetersiz elektron transferi sonucu toksik reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi gerçekleşir ve kısmen enerji metabolizması kaybı nedeniyle hastalıklara neden olur. Metabolik-ilişkili hastalıklar buna örnek olarak verilebilir (Rolo ve Palmeira, 2006; Palmeira vd, 2007; Wu vd, 2010).

Memeli hücreleri 1000'den fazla mitokondri ve yaklaşık 10000 kopya mitokondriyal DNA (mtDNA) içermektedir. Mitokondri genomu 16,6 kb büyüklüğünde, intron içermeyen, sirküler ve çift zincirli bir yapıda olmakla birlikte 2 rRNA, 22 tRNA ve elektron transport sistemi ve kodlamayan RNA'lar için kodlanan 13 polipeptid olmak üzere toplamda 37 gen içerir (Şekil 1). Mitokondri genomu sadece 13 protein kodlayan gene sahip olmasına rağmen yaklaşık 1500 protein içermektedir. mtDNA'nın replikasyon ve transkripsiyonu D-loop olarak bilinen küçük kodlamayan bölgede başlar. Replikasyon, transkripsiyon ve translasyon ile ilişkili diğer tüm proteinler nükleer genler tarafından kodlanır ve özel transport sistemleriyle mitokondriye hedeflenirler (Boore, 1999; Bertram, 2000; Kim vd, 2009; Sripada vd, 2012; Bienervota-Vasku vd, 2013). Nükleer genom tarafından kodlanan mitokondriyal hedefli proteinler dış membran translokonları (TOM)/ iç membran translokonları (TIM) kompleksleri aracılığıyla pekçok

aksesuar protein yardımıyla taşınırlar. Bu taşınma hem presekans tanıma yolağı, taşıyıcı protein transport yolağı, redoks tarafından regüle edilen import yolağı, β -fırça yolağı hem de oksidatif katlanma yolağı tarafından gerçekleşir (Mesecke vd, 2005; Dudek vd, 2013). mtDNA transkripsiyon ve translasyon ve transkript işlenmesi olayları mitokondriyal genom ya da nükleer genom tarafından kodlanan kodlamayan RNA'lar tarafından regüle edilir (Tomasetti vd, 2014). Mitokondriyal RNA'lar polisitronik prekürsör transkriptler gibi her iki zincirden transkribe olmakla birlikte tRNA, rRNA ve mRNA'ları içeren kodlayan RNA'lar ile kodlamayan RNA'ların salınımına öncülük etmek için süreç geçirirler (Mercer vd, 2011). Benzer şekilde ilgili mekanizmalar hala aydınlatılmamış olmasına rağmen RNA taşınımı mitokondriyal fonksiyon için oldukça önemlidir.



Şekil 1 İnsan mitokondri genleri (web 3)

2.6 Meme Kanserinde Mitokondriyal disfonksiyon

mtDNA'nın ROS üretim bölgesine yakın konumlanması onu oksidatif hasara karşı korunmasız kılmaktadır ve sıklıkla kanser ile sonuçlanan artmış mtDNA mutasyon oranına neden olabilmektedir. Warburg 1930'lu yıllarda kanserin oksidatif fosforilasyondaki veya mitokondrideki bozukluklardan kaynaklandığını öne sürmüştü ve normal hücrelerle kanser hücreleri arasında glikoliz oranında belirgin bir fark olduğunu belirlemiştir. Bu bulgular "Warburg etkisi" olarak da bilinmektedir. Warburg hipotezine göre kanser, malignant gelişim ve tümör gelişimi tümör hücrelerinin glikoliz ile enerji oluşumu tarafından gerçekleştirilir. Normal hücreler ise enerji gereksinimini piruvatın oksidatif olarak parçalanmasıyla sağlar. Pirüvat glikolizin son ürünüdür ve mitokondride oksitlenir. Bu sebeple Warburg'a göre kanser hücresi oluşumu mitokondriyal respirasyonun azalması sonucudur (Jemal vd, 2007; Kim vd, 2009). mtDNA ile kodlanan protein alt birimlerindeki yapısal değişiklikler paylaşılmamış elektron transport fonksiyonuna neden olmaktadır ve bunun sonucunda ROS üretimi artmaktadır. Artan ROS üretimi oksidatif stresi arttırarak mitokondride oksidatif hasar ile sonuçlanmaktadır ve sonuç olarak karsinogenezis meydana gelmektedir (Wideroff vd, 2005). Kanser hücrelerindeki oksidatif fosforilasyon aktivitesi tümörün derecelendirilmesinde, prognozun belirlenmesinde ve terapötik stratejilerin planlanmasında biyomarker olarak görev almaktadır. ND6 genindeki mutasyonların tümör hücre metastazını regüle ettiğinin bulunması ile benzer mutasyonların meme kanserinde de ortaya çıkabileceğini ve prognostik marker olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Ishikawa vd, 2008).

Mitokondriyal genom da meme kanserine spesifik mutasyonlar açısından incelenmiş olup 204, 207 ve 16293. pozisyondaki mtDNA mutasyonlarının meme kanseri için belirteç olduğu belirtilmiş ve mtDNA D-loop mutasyonlarının bağımsız bir prognostik marker olduğu ileri sürülmüştür (Kim vd, 2009). mtDNA, nükleer DNA'ya göre yaklaşık 6-17 kez daha yüksek mutasyon oranına sahiptir. Bu durum mtDNA polimeraz etkinliğinin düşük olması ve DNA tamir sisteminin olmaması nedeniyle mutasyonların kalıcı olmasından kaynaklanmaktadır. Kontrol bölgesindeki en yaygın mutasyon tipi tek baz substitüsyondur. Transisyon transversiyondan yaklaşık 40 kez daha fazla görülmektedir. Küçük insersiyonlar ve delesyonlar 302-310 ve 16183-16194 arasındaki iki homopolimerik bölgede yaygın bulunmuştur. Uzunluk heteroplazmisi, homopolimerik bölgedeki tekrarlayan baz sayısındaki değişimle kendini göstermektedir ve nokta heteroplazmisinden daha yaygın bulunmuştur (Imanishi vd, 2011). mtDNA'daki mutasyonlar tüm kanser türlerinde belirlenmiştir. Özellikle D-loop

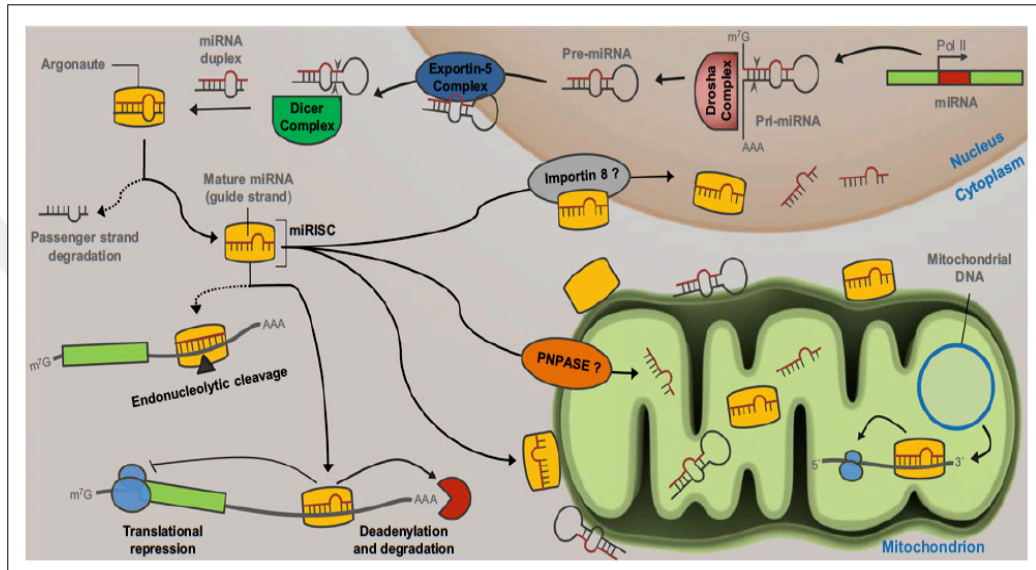
bölgesinin kanserlerde bir hot spot olduğu gösterilmiştir. D-loop mtDNA'nın kodlamayan bölgesi olup replikasyon ve transkripsiyon için gerekli olan cis-regülatör elementleri bulundurmaktadır. Bu sebeple bu bölgedeki mtDNA mutasyonlarının mitokondriyal genomun gen ekspresyonunu ve kopya sayısını etkileyebileceği düşünülebilir (Sripada vd, 2012). D-loop bölgesindeki somatik mutasyonlar meme kanseri, gastrik kanser, hepatoselüler karsinoma, over kanseri, kolorektal kanser ve melanomada belirlenmiştir. D-loop bölgesinde bulunan mutasyonlara ek olarak delesyonlar, nokta mutasyonları, insersiyonlar ve duplikasyonlar meme, over, troid, böbrek, karaciğer, akciğer, kolon, gastrik, beyin, mesane baş ve boyun, prostat kanserleri ile lösemide bulunmuştur (Sripada vd, 2012; Michel vd, 2012). Çeşitli malign ve benign tümörlerde mitokondriyal OXPHOS genlerinin rolünün ve neoplazm geliştirmedeki rollerinin araştırıldığı, 180 hastanın dahil edildiği bir çalışmada meme kanserinde malign hücrelerde ND6 ve ND4L bölgelerinde ilk kez mutasyon saptanmış olup, mitokondriyal hasarda malign hücrelerin rolü olduğu ve OXPHOS deregülasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Chintha vd, 2013).

2.7. Kodlamayan RNA'lar ve miRNA biyogenezi

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA), biyolojik reaksiyonların katalizlenmesinden hücresel savunmaya, gelişimsel süreçlerden hücresel cevaba kadar pek çok göreve sahiptir. Ayrıca ncRNA'lar transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen susturumu ve kromozomların yeniden modellenmesini de düzenlemektedirler. ncRNA'lar için en yaygın sınıflandırma uzunluklarına göre yapılmaktadır. ncRNA'ların büyük bir kısmı kısa düzenleyici RNA'lardan (miRNA, piRNA, tiRNA) oluşmaktadır ve bu ncRNA'lar RNA interferans (RNAi) mekanizması ile gen susturumunu sağlayan moleküllerdir (Akkaya ve Dinçer, 2013).

1000 nükleotid uzunluğundaki primer miRNA (pri-miRNA) mRNA gibi genomik DNA'dan RNA polimeraz II tarafından transkribe olur (Lee vd, 2002). Bununla birlikte miRNA'nın bazı alt dizileri de ayrıca RNA polimeraz III tarafından işlenir (Borchert vd, 2006). pri-miRNA daha sonra Drosha/Pasha kompleksi tarafından 70 nükleotidlik 5' fosfat ve 2 nükleotidlik 3' ucu içeren prekürsör miRNA'ya (pre-miRNA) dönüştürülür (Denli vd, 2004; Gregory vd, 2004). pre-miRNA'nın 2 nükleotidlik ucu Exportin-5 tarafından tanınır ve Ran-GTP bağımlı yol ile sitozole taşınır (Yi vd, 2003; Lund vd, 2004). Sitozolda pre-miRNA yaklaşık 20 nükleotidlik miRNA/miRNA* duplesi oluşturmak için Dicer tarafından kesilir. Çift iplikli miRNA Dicer, Argonat (AGO) ve RNA-bağlanma proteinleri olan TRBP ve PACT'dan oluşan miRISC kompleksine

bağlanır (Bernstein vd, 2001; Martinez vd, 2002; Kok vd, 2007). miRNA dupleksi tek iplikli olgun miRNA'yı (kılavuz dizi) oluşturmak için açılır (Nykanen vd, 2001), tamamlayıcı dizisi ise miRISC kompleksi tarafından degrade olur (Matranga vd, 2005; Leuschener vd, 2006). miRNA'nın kılavuz dizisi hedef mRNA'nın tamamlayıcı bölgesine bağlanır. Bu miRNA/mRNA kompleksi argonat protein ve 182 kDA glisin-triptofan protein tarafından tanınır (Şekil 2). Bu proteinler miRISC kompleksinde anahtar faktörler olarak rol alır ve translasyonun baskılanması ya da hedef mRNA'nın degradasyonu aşamalarını yönetir (Sripada vd, 2012).



Şekil 2 İnsan hücreinde miRNA regülasyonu (Borrallho vd, 2015)

2.8. Meme Kanseri ve miRNA ilişkisi

Meme kanserinde miRNA ekspresyon çalışmaları hastalık taksonomisi ve prognostik araç geliştirilmesi açısından miRNA'ların önemini ve potansiyel kullanım alanını ortaya koymuştur. Hücre döngüsü, proliferasyonu ve tümörigenezin miRNA'lar tarafından kontrol edildiği gösterilmiş ve hücre döngüsünü kontrol eden siklinler, siklin bağımlı kinazlar, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri retinoblastoma gibi proteinlerdeki artış veya anormal miRNA ekspresyonunun meme kanseri patogenezinde sık sık gözlemlendiği bildirilmiştir. Örneğin, Siklin E hücre siklusunu düzenleyen regülatör bir proteindir ve meme kanserinde %10 fazla ekspresyon artışı gözlenmektedir. miRNA'lar genlerin ekspresyonunu regüle ederek kanser hücre metabolizmasını kontrol etmede önemli regülatörler olarak görev yapmaktadırlar. Hücre metabolizmasında direkt olarak anahtar molekülleri (transporter ya da enzimler/kinazlar) hedeflerler ve pek çok onkogenik sinyal yollarını regüle ederler. Ayrıca transkripsiyon faktörleri ve p53, c-

myc, AMPK ve AKT sinyal yollarının onkogen ve tümör süpresörlerinin ekspresyon seviyelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Chen vd, 2012). miRNA'lar hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı özellik kazanabilirler. Çeşitli kanser vakalarında ekspresyonları artan miRNA'lar "onkogen miRNA" olarak adlandırılmaktadır. Onkomir olarak da tanımlanan bu miRNA'lar tümör baskılayıcı genleri ya da hücre farklılaşmasını kontrol eden genleri etkileyerek tümör gelişimine neden olabilir. Tümör baskılayıcı miRNA'lar ise onkogenleri baskılayarak tümör oluşumunu engelleyebilir (Chen vd, 2012; Çelik vd, 2013). Kanser ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda meme kanserinde, Burkitt's lenfomada, malign beyin tümörlerinde, tiroid kanserinde, akciğer kanserinde, prostat kanserinde, mesane kanserinde ve kolon kanserinde miRNA seviyelerinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir (Çelik vd, 2013).

miRNA ökaryotik hücrelerin normal işlevlerinde yer aldığı gibi birçok hastalık ile de ilişkili bulunmuştur. Kanser, nöroloji, viroloji gibi birçok alanda bu konuyla ilgili çalışmalar yapılmakta olup, tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır (Küçüküseyin ve Öztürk, 2013). vd (2004) meme kanseri olan insan ve farelerde mikroçip kullanarak miRNA ekspresyonunu profilemişler ve meme kanserinde normal dokuyla karşılaştırıldığında miRNA ekspresyon seviyesinde farklılık saptamışlardır. Jiang vd (2005) insanlarda yaygın olarak görülen ve 5 tanesi meme kanseri (MDA231, T47D, SKBR3, MDA361 ve MCF-7) olan toplam 32 adet hücre hattında 222 miRNA'yı araştırmışlardır. Meme ile prostat hücre hatlarının birlikte kümelenme eğiliminde olduğunu belirleyerek farklı dokularda benzer miRNA ekspresyon profilinin olduğunu göstermişlerdir. Shen vd (2009) ailesel meme kanseri öyküsü olan 42 hastanın DNA örneğini incelemiş ve 17 miRNA geninin tümör dokusunda yüksek veya düşük ekspresyon seviyesine sahip olduğunu göstererek bu miRNA'ların BRCA1/2, ATM, PTEN ve CHEK2 gibi meme kanserindeki önemli genleri regüle ettiğini bildirmişlerdir.

2.9. Mitokondriyal miRNA'lar (mitomiR)

Mitokondri kendi genomunu barındıran bir organeldir. mtDNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu pek çok protein ile mitokondriyal ve nükleer genom tarafından eksprese edilip, kodlanan / kodlamayan RNA'lar tarafından regüle edilmektedir. Mitokondri genomu 13 protein kodlamasına rağmen 1500 kadar proteini barındırmaktadır. Bu sebeple, bu protein çoğu sitoplazmada sentezlenip mitokondriye taşınmaktadırlar. Tam tersi olarak, mitokondride fonksiyon gösteren pek çok kodlamayan RNA da mtDNA tarafından kodlanmaktadır (Entelis vd, 2001). Bununla

birlikte mitokondriye pekçok RNA türünün giriş çıkışı olduğu bilinmektedir. tRNA'lar, RNase MRP, RNase P ve 5S rRNA gibi mitokondride en çok bulunan RNA'lar nükleer olarak kodlanarak mitokondriye taşınmaktadır (Puranam ve Attardi, 2001; Alfonzo ve Soll vd, 2009). Mitokondri ayrıca miRNA, snRNA, piwi etkileşimli RNA (piRNA), sinyal tanıma partikül RNA (srpRNA) ve snoRNA gibi pekçok kodlamayan RNA'yı bünyesinde barındırmaktadır (Mercer vd, 2011; Sripada vd, 2012).

miRNA topluluğu ve komponentleri için mitokondriyal dış membran bir platform olarak görev almaktadır. Ayrıca mitokondriyal gen ekspresyonunu regüle etmek üzere miRNA'lar mitokondriyal matrikse de transloke olabilmektedir. Az sayıda miRNA dizisi mitokondriyal DNA dizisi ile komplementer oluşturabilir. pre-miRNA ve olgun miRNA mitokondri gibi pek çok subselüler lokasyonlara gidebilir. pre-miRNA, olgun miRNA ve RISC kompleksinin çekirdek komponenti olan Ago2/3 mitokondri ile ilişkilidir (Walsch vd, 2006; Debniak vd, 2006; Imanishi vd, 2011). Mitokondriyal miRNA biyogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte bununla ilgili birkaç hipotez bulunmaktadır. Nükleer genom tarafından kodlanan miRNA'ların yine nükleer genom tarafından kodlanan mitokondriyal proteinleri hedefleyerek sitoplazmadaki mRNA'ların translasyonunu baskıladığı ve spesifik mitokondriyal proteinlerin mitokondriye taşınımını etkilediği; nükleer genom tarafından kodlanan ve mitokondriye taşınan miRNA'nın mitokondri tarafından kodlanan proteinlerin translasyonunu düzenlediği; mitokondri genomu tarafından kodlanan miRNA'nın mitokondri genomu tarafından kodlanan proteinlerin translasyonunu düzenlediği olmak üzere 3 farklı yolla etki ettiği varsayılmaktadır (Wang, 2015). Bazı pre-miRNA dizilerinin mitokondride işlendiği ve mitokondriyal transkriptler üzerinde aynı anda aktive olan ya da genomik mRNA ile bir araya gelebilmek için sitozole gönderilen olgun miRNA'ları sentezleyebileceği düşünülmektedir (Imanishi vd, 2011).

RNAi içeriklerinin mitokondriye lokalize olduğunun ilk kanıtı insan Ago2'nin mitokondriyal tRNA^{met} ile etkileştiğinin gösterilmesi ile olmuştur (Dudek vd, 2013). Son zamanlarda Ago2 ve Ago3'ün mitokondriye beraber lokalize olduğunun gösterilmesiyle mitokondrinin RNAi aracılı gen susturulumu için özgün bir hücre içi niş potansiyeli taşıdığı düşüncesi ortaya konmuştur (Bian vd, 2010; Bandiera vd, 2011; Sripada vd, 2012). İkinci ipucu ise, fare karaciğer mitokondrilerinden küçük RNA'ların sistemik dizilenmesiyle birkaç miRNA'nın tesadüf olarak tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır. Çalışmanın yapıldığı zamanda bu bulgunun önemini anlamak, beklenmeyen bir bulgu olması ve sitozolik kontaminasyon sonucu ortaya çıkma ihtimalinden dolayı oldukça zor olmuştur. Yetişkin rat karaciğerinden izole edilen mitokondride 15 adet nükleer kodlanmış miRNA, fare karaciğer mitokondrisinde 20 miRNA, HeLa hücrelerinde mitokondride 13 miRNA mikroarray yöntemi ile tespit edilmiştir (Kren vd, 2009; Bian vd,

2010; Bandiera vd, 2011). Bu üç çalışmada mitokondriyal örneklerinin saflıkları ile ilgili önemli bir sorun ortaya çıkmasından dolayı miRNA'ların mitokondriyal lokalizasyonunun spesifikliğı hakkında soru işaretleri ortaya çıkmıştır. Sonraki süreçte yapılan çalışmalarda RNase A kullanımı gibi farklı deneysel yaklaşımlar kullanılarak daha saf mitokondriyal fraksiyonlar elde edilmesi mitokondriyal miRNA'lar hakkındaki bilgilerimizin artmasına vesile olmuştur (Barrey vd, 2011; Wang vd, 2017) . Barrey vd (2011) qRT-PCR yöntemiyle miRBase'den 742 miRNA taramışlar ve 243 miRNA'nın insan miyotüplerinden izole edilen mitokondriyal RNA örneklerinde belirgin şekilde eksprese olduğunu göstermişlerdir. İnsan miyoblastlarında in situ hibridizasyon yöntemine dayanarak, bu çalışma pre-miRNA'ların mitokondride de lokalize olabileceğini gösteren ilk ipucu olmuştur. Bununla beraber yeni nesil dizileme yöntemleri mitokondrideki küçük RNA'ların karakterizasyonunu sağlamışlardır. Mercer vd (2011) insan mitokondriyal transkriptomunu kapsamlı olarak araştırarak membranlar arası alanda 3 miRNA'nın, miR-146a, miR-103 ve miR-16, matrikse kıyasla oldukça yüksek ekspresyona sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca derin dizileme yöntemine dayanarak Spirada vd (2012) mitokondrinin yüzeyindeki küçük RNA'lar ile daha geniş çaptaki küçük kodlamayan RNA'ların arasındaki ilişkiyi sorgulamışlardır. Bu zamana kadar mitokondriyal proteinlerin çoğunun nüklear kodlandığı ve post-translasyonel olarak mitokondriye taşındığını gösteren pekçok bulgu nükleus ve mitokondri arasındaki ilginç ilişkiye dikkat çekmiştir. Coene vd (2005) insan hücrelerinde BRCA1 proteinlerinin nüklear, sitoplazmik ve mitokondriyal yerleşimini kanıtlamışlardır. Mitokondriyal BRCA1 proteinlerinin meme kanseri hücrelerinde antiproliferatif bir etkisinin olduğu düşünülmektedir (Weigl vd, 2013). Son olarak Bandiera vd (2011) "MitomiR" olarak adlandırılan nükleus ve mitokondride farklı ekspresyon profiline sahip geniş bir grup miRNA'nın varlığını keşfederek mitokondriyal miRNA'ların hem nüklear hem de mitokondriyal kodlanmış hedeflerinin olduğunu göstermişlerdir. Mitokondride tespit edilen miRNA'lar hücre tipine bağlı olarak değişkenlik gösterebilirler (Sripada vd 2012; Wang vd, 2017).

mitomiR'ler termodinamik özellikleri ve boyutları bakımından diğer miRNA'lardan farklılık göstermektedirler ve mitokondriyal fonksiyon ile ilişkili, neredeyse tamamı nüklear kodlanmış genlerin lokuslarında eksprese edilmektedirler. Sitolde bulunan miRNA'larla karşılaştırıldığında mitomiR'lerin nüklear kodlanan mitokondriyal genleri tercihen hedefleyemedikleri görülmektedir. Fakat çoğunun multiple mtDNA bölgelerine hedefleri RNA22, RegRNA, miRWalk ya da TargetScan gibi algoritmalar kullanılarak tahmin edilebilir (Latronico vd, 2012). Biyoinformatiğe dayalı analizlerden farklı algoritmaları kullanarak mitokondriyal genomun, ND6 hedef

transkriptleri gibi, çeşitli mitomiR'ler tarafından hedeflenebilecek dizileri taşıdığı belirlenmiştir (Barrey vd, 2011; Bandiera vd, 2011).

2.10. Mitokondrideki miRNA'lar ve Meme Kanseri

Mitokondriyal aktivitenin düzenlenmesinde son zamanlarda en heyecan verici gelişmelerden biri, miRNA'ların sadece nükleer genom tarafından kodlanan mitokondriyal proteinlerin translasyonunu düzenlemesi değil aynı zamanda organelin kendi bünyesinde tanımlanan miRNA'lardır. mitomiR'lerin hangi mekanizmayla mitokondriye taşındığı tam olarak bilinmemesine rağmen bazı translokazların mitokondriyal proteinlerin taşınımıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Kanser hücrelerinde mitokondrinin regülasyonunda miRNA karakterizasyonu yeni yeni ortaya konmaya çalışılmaktadır. miR-23b ve miR-210'un ROS üretimini etkilediği ve renal, meme ve kolorektal kanserlerde eksprese olduğu gösterilmiştir (Duarte vd, 2014). Meme kanseri için belirlenen tek miRNA miR-200a'dır. miR-200 ailesi miR-200a ve miR-200b olmak üzere iki kromozomal bölgeden transkribe olmaktadır. miR-200a'nın ekspresyonu mitokondriyal transkripsiyon faktörü (TFAM)'nün mRNA'sına doğrudan bağlanarak düzenlemektedir. Normal dokularla karşılaştırıldığında meme kanserinde TFAM seviyesi artarken miR-200a seviyesi azalmış olarak saptanmıştır (Yao vd, 2014). TFAM'ın mtDNA replikasyonu ve transkripsiyonunda beraber rol alması kanser hücrelerinde mitokondriyal genomun bütünlüğünün sağlanmasında bir anahtar olduğunu düşündürmektedir (Lee ve Wei, 2009).

mitomiR'lerin fonksiyonları genel olarak bilinmemekle birlikte, meme kanseri dahil kanser türlerindeki rolleri hakkında az da olsa bilgi bulunmaktadır. Barrey vd (2011) mitokondriyal RNA fraksiyonunda 243 miRNA tanımlamışlardır. Mitokondriyal genomun büyüklüğü ve sınırlı sayıda mitokondriyal kodlanmış mRNA göz önünde bulundurulursa, mitomiR'lerin hedeflerinin tanımlanması kolay gibi gözükmemektedir. Hedeflerinin keşfi mitokondriyal araştırmalarda özgün ve heyecan verici bir yol olmaktadır. mitomiR'lerin ekspresyon paternlerinin doku spesifik olabileceğini de göz önünde bulundurmak oldukça önemlidir (Duarte vd, 2014).

2.11. Hipotez ve Bilimsel Katkı

Daha önceki çalışmalar tarandığında, meme kanseri hücre hatlarında mitokondriyal miRNA'ların tanımlayan ve mikroRNA'ların meme kanseri hücre dizilerindeki rollerini gösteren benzer bir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle; meme kanserinde mtDNA mutasyonunun rolünün yanı sıra, hücre regülasyonun düzenlenmesinde görev alan miRNA'ların mitokondrideki ifadesi olan mitomiR'lerin ve mitokondrideki hedef genlerinin belirlenmesinin; literatüre oldukça önemli bir katkı ve birçok araştırma için öncü olacağı kanısındayız. Ayrıca Mitokondriyal mikroRNA'ların (mitomiR) meme kanseri hücre dizilerinde tanımlanmasının ardından hasta örneklerindeki analizler ile tanı aşamasına da yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Gereçler

Tablo 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka/Model
Mikroskop	Nikon TS100
Gerçek zamanlı PZR cihazı	Corbett 6000
Hücre sayım cihazı	Biorad
HT2500 Yeni Nesil Dizileme Cihazı	Illumina
NanoDrop 2000	Thermo
MACS Manyetik Stand	Miltenyi Biotec

Tablo 3 Çalışmada Kullanılan Kitler

Kit	Firma
Mitokondri İzolasyon Kiti	Miltenyi Biotech, Almanya
cDNA Revers Transkripsiyon kiti	ABM, Kanada
Kilogreen Master Mix	ABM, Kanada
SMARTer smRNA kit	Illumina, ABD

Tablo 4 mRNA Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmasında kullanılan primer oligonükleotitler

Oligonükleotit	Sekans (5`-3`)
ND4	F:5'-ACAAGCTCCATCTGCCTACGA-3' R:5'-GGCTGATTGAAGAGTATGCAATGA-3'
ND6	F:5'- TACCTCCATCGCTAACCCAC -3' R:5'- TTGATTGTTAGCGGTGTGGTC -3'
CYTB	F:5'-AACCGCCTTTTCATCAATCG-3' R:5'-AGCGGATGATTCAGCCATAATT-3'
HIST2H4	F:5'- AGCTGTCTATCGGGCTCCAG -3' R:5'- CCTTTGCCTAAGCCTTTTCC -3'

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

MCF-7: İnvaziv duktal karsinoma, non-metastatik, östrojen reseptör pozitif, Luminal A hücre hattı

Hücreler ısı ile inaktive edilmiş %5 Fetal Dana Serum (FBS, GIBCO, Amerika), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, GIBCO) ve %1 L-glutamin (GIBCO) ilave edilmiş DMEM besiyerinde (Sigma) %5 CO₂ içeren 37°C etüvde kültüre edilerek çoğaltıldı.

MDA-MB-231: İnvaziv duktal karsinoma, metastatik, östrojen reseptör negatif, Claudin-low, triple-negatif hücre hattı

Hücreler ısı ile inaktive edilmiş %5 FBS (GIBCO, Amerika), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, GIBCO) ve %1 L-glutamin (GIBCO) ilave edilmiş RPMI1640 besiyerinde (Sigma, Almanya) %5 CO₂ içeren 37°C etüvde kültüre edilerek çoğaltıldı.

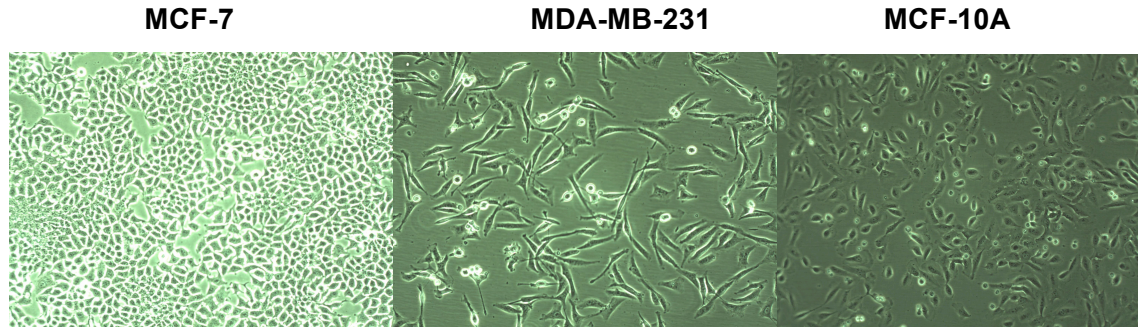
MCF-10A: İmmortal insan meme epitel hücre hattı. İnsan fibrokistik meme dokusundan türevlenmiştir.

Bu hücreler normal meme epitel hücreleri olarak tanımlanmışlardır ve proliferasyonları için ekzojen büyüme faktörleri gereklidir.

MCF-10A hücre hattı %1 Penisilin-Streptomisin, L-glutamin, 5% ısıyla inaktive edilmiş At FBS (GIBCO, Amerika) , 10ug/ml insülin (GIBCO, Amerika), 20ng/ml EGF (Miltenyi Biotec, Almanya), 0.5ug/ml hidrokortizon (Sigma, Almanya) içeren DMEM/F12 (Sigma,

Almanya) besi ortamında 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava ortamında inkübe edilmiştir.

Tez çalışmasının ana basamaklarında kullanılan MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü Şekil 3 ' de verilmiştir.



Şekil 3 Hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü

3.2.2. Hücrelerin Dondurulması:

Hücreleri dondurmak amacıyla %10 dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma) içeren besiyeri hazırlandı. MCF10A hücrelerinde dondurma medyumunu, diğer hücrelerden farklı olarak %70 besiyeri, %20 At FBS ve %10 DMSO olacak şekilde hazırlandı. Hücreler pasajlama işlemi için 15 ml' lik falkon içerisine alındı ve 1500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldıktan sonra falkon içerisine dondurma amacıyla hazırladığımız besiyeri eklenerek yavaş pipetaj ile homojenize edilerek özel cryotüplere aktarıldı ve -80°C'de saklandı.

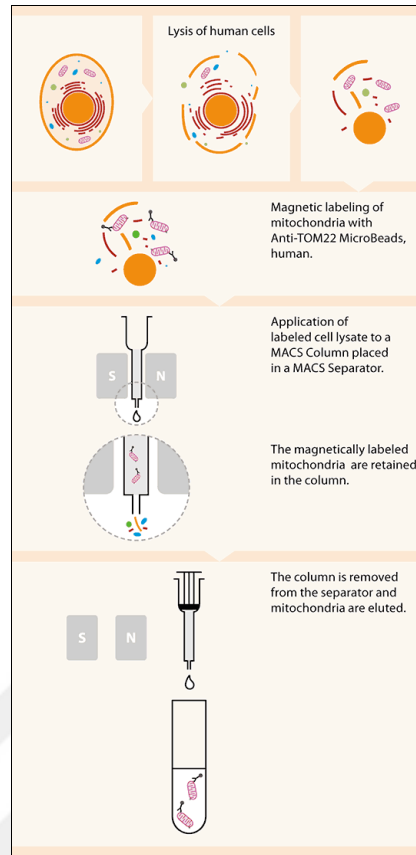
3.2.3 Hücrelerin Çözülmesi

-80°C' den alınan tüpler 50 ml'lik falkon tüpü içerisine konarak su banyosunda (37 °C) çözüldükten sonra hücreler 15 ml'lik falkon içerisine alındı ve üzerlerine 5 ml besiyeri eklendi. Ardından hücreler 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atılıp elde edilen pellet üzerine besiyeri eklenerek homojen hale getirildi ve toplam hacim 10ml olacak şekilde flasklara alınarak kültüre edildi.

3.3. Mitokondri İzolasyonu

Mitokondri izolasyonuna başlamak için 5×10^7 sayıda hücre petrilere hazırlandı ve bu hücreler proteaz inhibitörü içeren 1 mL mitokondri lizis solüsyonu ile dounce homojenizatör yardımıyla parçalandı. Mitokondri izolasyonu için 'Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) izolasyon kiti (Miltenyi Biotec, Almanya) kullanıldı. Yöntem, mitokondrinin anti-TOM22 kaplı mikro boncuklara bağlanarak ve manyetik alanda tutularak diğer yöntemlere göre daha saf ve yüksek miktarda mitokondri izolasyonuna olanak sağlamaktadır. Pek çok çalışmada bu yöntemin etkinliğinin diğer yöntemlere (differansiyel santrifüj ve ultrasantrifüj gibi) göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Çalışma protokolü aşağıda anlatıldığı şekildedir:

Hücreler dounce homojenizatör yardımıyla parçalandıktan sonra, 9 mL 1X lizat ayırma tamponu ve 50 µl anti-TOM22 kaplı boncuklarla muamele edilerek $+4^{\circ}$ de rotator kullanılarak 1 saat inkübe edildi. Lizat daha sonra yıkama işlemi için LS kolonlara (Miltenyi Biotec, Almanya) aktarıldı. Manyetik alanın yardımıyla mikroboncuklarla işaretlenmiş mitokondrilerin kolonda tutulumları sağlanırken, yıkama işlemleri ile hücresel atıkların uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işlemi 5 kez 3 mL 1X lizat ayırma tamponu ile tekrarlandıktan sonra kolon manyetik alandan ayrılarak yeni bir tüp üzerine yerleştirildi ve kolona 1,5 mL 1X lizat ayırma tamponu eklenerek manyetik olarak işaretlenmiş mitokondrilerin kolondan elüsyonu sağlandı (Şekil 4). Bu yöntem kullanılarak zengin mitokondriyal fraksiyonlar elde edilmesi sağlandı.



Şekil 4 Magnetic activated cell sorting (MACS) metodu

3.4. RNase A muamelesi:

Mitokondriyal fraksiyonlardaki genomik kontaminasyonu elemine etmek için RNase A muamelesi gerçekleştirildi. RNase A, bir endoribonukleaz olmakla birlikte sitozin ve urasil rezidülerinden tek iplikli RNA'yı degrade ederek iş görmektedir.

100 µl hacimdeki mitokondri lizatlarına 10 µl RNase A (10 mg/ml) (ABM, Kanada) ilave edilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. 13000xg'de 2 dk santrifüj yapılarak süpernatant atıldı ve pellet 2 kez mitokondri ayırma tamponu ile yıkandı ve RNase A'yı inaktive etmek için mitokondriyal pellet işlemin hemen ardından TRIZOL ile muamele edildi.

3.5. Total RNA izolasyonu

MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerden elde edilen mitokondri lizatlarından RNA izolasyonu TRIZOL (MRC) reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi.

Protokol aşağıdaki şekildedir:

1. TRIZOL ile muamele edilen mitokondriyal pellet vortekslendikten sonra 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
2. 200 µl kloroform eklenerek vorteks yapıldı ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi.
3. 12000 rpm de 15dk 4°C' de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası oluşan en üst fazda bulunan RNA toplandı ve 500 µl izopropanol içeren yeni tüpe alındı.
5. RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
6. 12000 rpm de 10 dk 4°C' de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü. Pelet üzerine %70 etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
8. RNA'nın degrade olmasını ve kırılmasını önlemek için düşük hızda (7500 rpm) 10 dk 4°C' de santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası %70 etanol uzaklaştırıldı ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA peleti kurumaya bırakıldı.
10. Pelet miktarına bağlı olarak 20-25 µl RNaz içermeyen su eklendi.
11. 60°C' de 10 dk bekletildi ve -80°C' de saklandı.

3.5.1 RNA Miktar ve Safılık Tayini

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları Nanodrop ND-2000c (Thermo) cihazında ölçüldü. 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans alındı. A260/A280 oranına göre RNA'nın saflığı belirlendi.

3.6. DNA İzolasyonu

1. TRIZOL'deki mitokondriyal fraksiyonların üst kısmına yer alan RNA fazı uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan fazların üzerine 300 µl %100 EtOH eklendi ve vortekslendi.
2. 15-30°C'de 2-3 dk inkübe edildi. 12000 rpm de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.
3. Fenol/Etanol içeren süpernatant atıldı.
4. DNA pelleti 1 mL 0.1M sodyum sitrat solüsyonu ile 2 kez yıkandı.
5. Örnekler yıkama solüsyonunda 15-30°C'de 30 dk inkübe edildi.
6. 12000 rpm de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.
7. Yıkama işleminden sonra DNA 1 mL %75 EtOH ile muamele edildi.

8. 15-30°C'de 20 dk inkübe edildi.
9. 12000 rpm de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı.
10. Pellet kurumaya bırakıldı.
11. Pellet 100 µl steril suda çözüldü.
12. 12000 rpm de 10 dk 4°C' de santrifüj edildi.
13. Süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak DNA örneği -80°C' de saklandı.

3.6.1. DNA Miktar ve Saflık Tayini

Mitokondriyal DNA'larının miktar ve saflık ölçümleri Nanodrop 2000 (Thermo) cihazında yapıldı. Konsantrasyon ve saflık miktarlarının tayini aşağıdaki formülasyon kullanılarak cihaz tarafından gerçekleştirildi.

Miktar tayini formülü;

$(260 \text{ nm DNA} - 260 \text{ nm ddH}_2\text{O}) \times \text{dilüsyon faktörü} \times \text{DNA sabiti}$

Saflık tayini formülü;

$(260 \text{ nm DNA} - 260 \text{ nm ddH}_2\text{O}) / (280 \text{ nm DNA} - 280 \text{ nm ddH}_2\text{O})$

3.7. Mitokondriyal RNA'nın cDNA'ya çevrimi

Örnekler ABM One Script Plus cDNA Sentez Kit kullanılarak komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürüldü. Kalıp olarak kullanılan mitokondriyal RNA 1 µl random primer, 1 µl dinükleotidtrifosfat (dNTP) karışımı ve RNaz içermeyen su ile 14,5 µl'ye tamamlanarak 65°C'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 1 dk bekletildi. Aynı bir tüpte 4 µl 5X RT Buffer, 1 µl Reverse Transkriptaz, 0,5 µl RNase OFF'dan oluşan 5,5 µl revers transkripsiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı thermal cycler cihazında (Sensequest) sırasıyla 25°C'de 10 dk, 50°C'de 50 dk ve 85°C'de 5 dk olacak şekilde reaksiyona tabi tutuldu. cDNA'ya dönüştürülen örnekler -20°C'de saklandı.

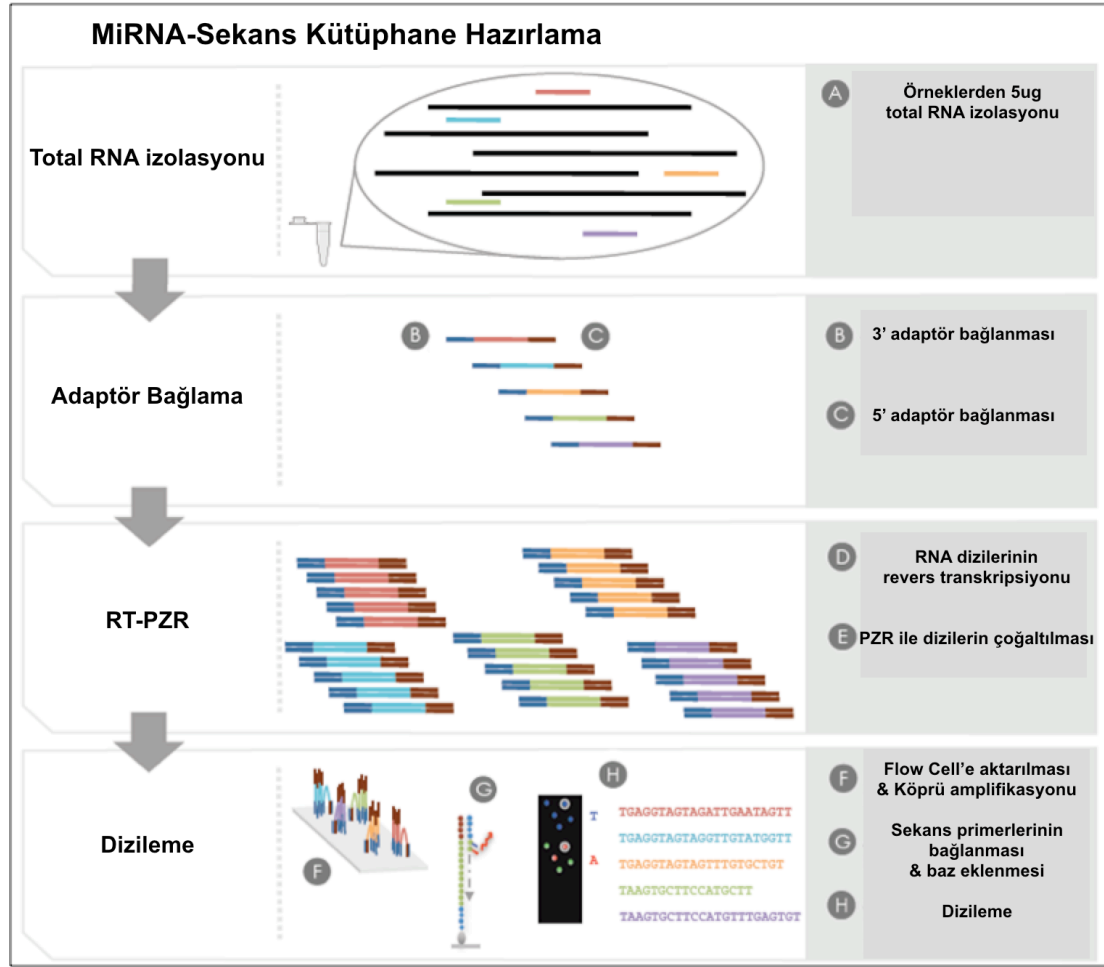
3.8. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (qRT-PCR)

Çalışmada hazırlanan hücrelerde mitokondriyal genlerin ekspresyon değişimleri Corbett Rotor-Gene 6000 cihazlarında analiz edildi. Çalışma kapsamında MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen mitokondriyal lizatlardan sitozolik RNA'ların uzaklaştırılmasının kontrolü için mitokondriyal kontrol genleri olarak ND4 ve

cytB genleri, sitozolik kontrol geni olarak ise HIST2H4 kullanılmıştır. Her cDNA örneği Kilogreen 2X (ABM, Kanada) master mix kullanılarak Corbett Rotor-Gene 6000 cihazında çoğaltıldı. Özetle, reaksiyon karışımı 2 µl cDNA örneği, 10 µl KiloGreen 2X master mix, 0.3 µM primerler ile totalde 20 µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon döngüsü her örnek için 3 tekrarlı olacak şekilde, 95°C'de 10 dk enzim aktivasyonu ve 40 döngü 95°C'de 15 sn denatürasyon ve 60°C'de 60 sn primer bağlanması ve uzaması basamaklarından oluşmaktadır.

3.9. Küçük RNA Dizileme (Small RNA sequencing)

Çalışmada kullanılan hücrelerden elde edilen mitokondriyal RNA örneklerindeki miRNA profillerinin belirlenmesi için MACROGEN (Güney Kore) firmasından hizmet alımı yapılmıştır. Küçük RNA dizileme analizi, Illumina HT2500 platformu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 5). Küçük RNA dizileme için örneklerden izole edilen RNA'ların NanoDrop (Thermo, Amerika) ve Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Amerika) cihazları ile saflıkları ve kaliteleri kontrol edilmiştir. 50ng RNA örneklerinden SMARTer smRNA for Illumina Kit (CloneTech, Amerika) kullanılarak kütüphaneler hazırlanmıştır. Öncelikle RNA moleküllerine adaptör diziler bağlanıp T4 RNA Ligaz 2 ligasyon enzimi kullanılarak küçük RNA'lara öncelikle adenillenmiş tek iplikli DNA 3' adaptör, onu takiben 5' adaptör bağlanmıştır. Bu adaptörler ayrıca miRNA'lar için karakteristik olan 5' fosfat grubu içeren küçük RNA'ları yakalamak için tasarlanmıştır. Adaptör bağlanmış miRNA fragmentleri cDNA fragmentlerine dönüştürülerek cDNA dizi havuzunun amplifikasyonu için PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Amplifiye edilmiş cDNA fragmentlerinin büyüklükleri Bioanalyzer DNA High sensitivity chip kullanılarak kontrol edilmiştir. 175bp civarında görülen pik, adaptör bağlanmış olan miRNA kütüphanesinin tahmini boyutuna işaret etmektedir ve miRNA-türevli dizileri içeren kütüphanelerin boyutları yaklaşık 172-178 bp aralığındadır. cDNA fragmentleri Illumina platformunda "sequence by synthesis" metodu kullanılarak okuma uzunluğuna göre dizilenmiştir.



Şekil 5 Illumina HT2500 Yeni Nesil Dizileme Cihazında miRNA Dizileme Çalışması Aşamaları

3.10. Küçük RNA Dizileme Analizi

Biyoinformatik analiz için MACROGEN firmasından hizmet alımı yapılmıştır. Dizileme işleminden sonra ham dizi okumaları filtrelenmiş olup adaptör diziler ham dizi okumalarından CutAdapt programı kullanılarak kırılarak uzaklaştırılmıştır. Kırılan okumalar kümelenecek olup, bu kümeler dizi ve okuma uzunluğuyla %100 eşleşen okumaları içermektedir. Tanımlı ve novel miRNA'ları belirlemek için kümelenecek okumalar referans genom (hg19) ve miRBase v21'den elde edilen prekürsör miRNA'larla eşleştirilmiştir. Potansiyel hairpin yapıları tahmin etmek için miRDeep2 algoritması kullanılmıştır. Tanımlı miRNA'ları ve tRNA, snRNA, snoRNA vb. diğer RNA tiplerini sınıflandırmak için kümelenecek okumalar referans genom, miRBase v21 ve kodlanan RNA veritabanı olan Rfam v9.1 ile eşleştirilmiştir. Her miRNA için okuma

sayıları haritalanmış miRNA'lerden aktarılarak her miRNA'nı dağılımı raporlanmıştır (Şekil 6).



Şekil 6 Dizileme sonrası elde edilen verilerin işlenmesi ve biyoinformatik analiz aşamaları

3.11. miRNA hedeflerinin Gen Ontoloji (GO) terimleri, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) yolak analizi ve Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) veritabanı analizi

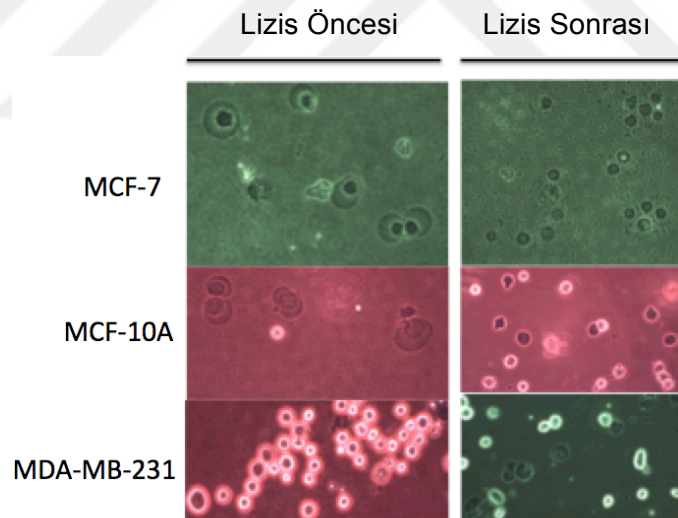
Küçük RNA dizileme analizi sonucu belirlediğimiz miRNA'ların fonksiyonlarını analiz etmek amacıyla web tabanlı DIANA biyoinformatik analiz programı (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=mirpath/index>) kullanılarak anlamlı bulunan miRNA'ların hangi biyolojik süreç, moleküler işlev ve biyokimyasal yolakta yer aldığını belirlemek için GO ve KEGG yolak analizleri gerçekleştirildi. DIANA, KEGG'a entegre olarak listelenmiş olan genlerin yolak analizini yapmaktadır. Aynı yolakta yer alan genler belirlenmekte ve bu yollar hem liste halinde hem de harita şeklinde sunulmaktadır. Bu yolak analizi ile miRNA'ların hedefi olan genlerin hangi yollarda görev aldığı ve hangi genlerle ilişkili olabileceği belirlenebilmektedir.

Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins database (STRING) versiyon 10.5 kullanılarak miRNA'lar ile homoloji gösteren gen bölgelerinin etkileştiği proteinler analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Mitokondriyal RNA'nın İzolasyon ve Analizi

Mitokondri ile ilişkili küçük RNA'ları belirlemek amacıyla MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinden pürifiye mitokondriyal fraksiyonları hazırlamak için 5×10^7 sayıda hücre çoğaltıldı. Flasklardan toplanan hücreler santrifüj ile çöktürüldükten sonra, pellet üzerine lizis solüsyonu ilave edilerek dounce homojenizatör yardımıyla hücreler parçalandı. En etkin düzeyde parçalanmanın sağlanması için her 10 vuruşta bir mikroskop altında parçalanmış olan hücre oranları belirlendi (Şekil 7).



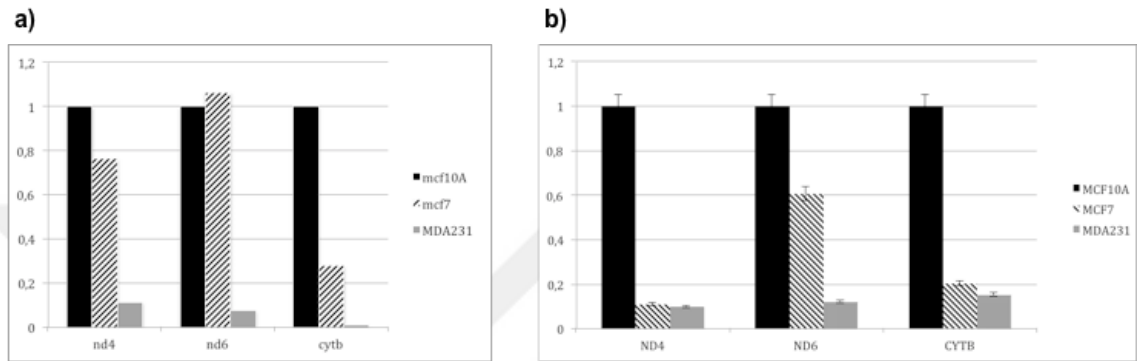
Şekil 7 Dounce homojenizatör yardımıyla hücrelerin lizis edilmesi

Hücrelerden izole edilen mitokondriyal fraksiyonlardan RNA izolasyonu yapıldı. RNA kalitesi "RNA Integrity Number (RIN)" değerleriyle belirlendi. Mitokondriyal RNA'nın mikrofluidik analizi pekçok pik gösterdi. Bu da mitokondriyal RNA örneklerinde pekçok küçük RNA'nın varlığını göstermektedir. Örneklerde 28S ve 18S piklerinin saptanmaması mitokondriyal RNA örnekleri için hem geleneksel bir RIN değeri belirlenmesinin geçerli olmayabileceğini hem de sitozolik kontaminasyonun büyük

ölçüde elemine edildiğini gösterdi. Aynı örneklerden eş zamanlı olarak DNA izolasyonu da yapılarak örnekler -20°C 'de saklandı.

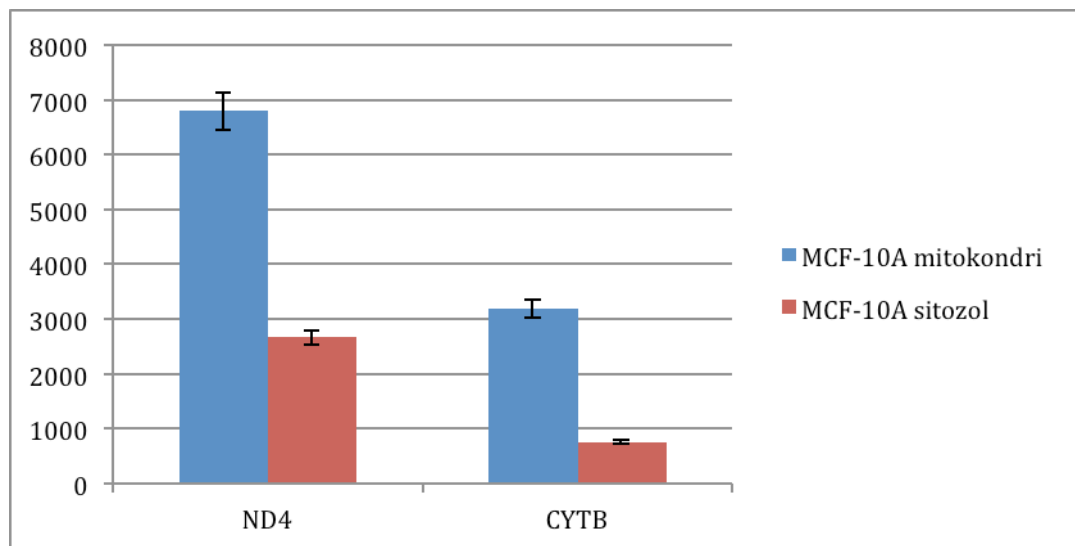
Çalışmada kullandığımız normal meme, metastatik (MDA-MB-231) ve metastatik olmayan (MCF-7) meme kanseri hücre hatlarında öncelikle OXPPOS genlerinin ekspresyonları karşılaştırıldı.

qRT-PCR sonuçları, normal meme hücreleriyle karşılaştırıldığında metastatik (MDA-MB-231) hücre hattında total RNA ve mtRNA örneklerinde OXPPOS genlerinin ekspresyonlarının düşük olduğunu gösterdi (Şekil 8 a,b).

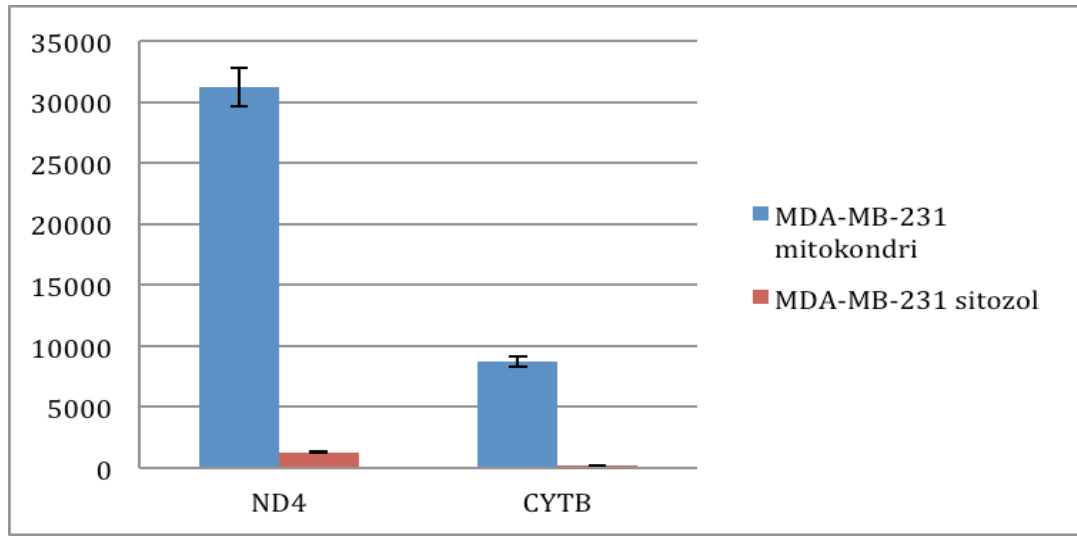


Şekil 8 OXPPOS genlerinin ekspresyonlarının karşılaştırılması **a)** Hücrelerden elde edilen mitokondriyal fraksiyonlardaki OXPPOS genlerinin ekspresyonlarının karşılaştırılması **b)** Hücrelerden elde edilen total RNA'larda OXPPOS genlerinin ekspresyonlarının karşılaştırılması

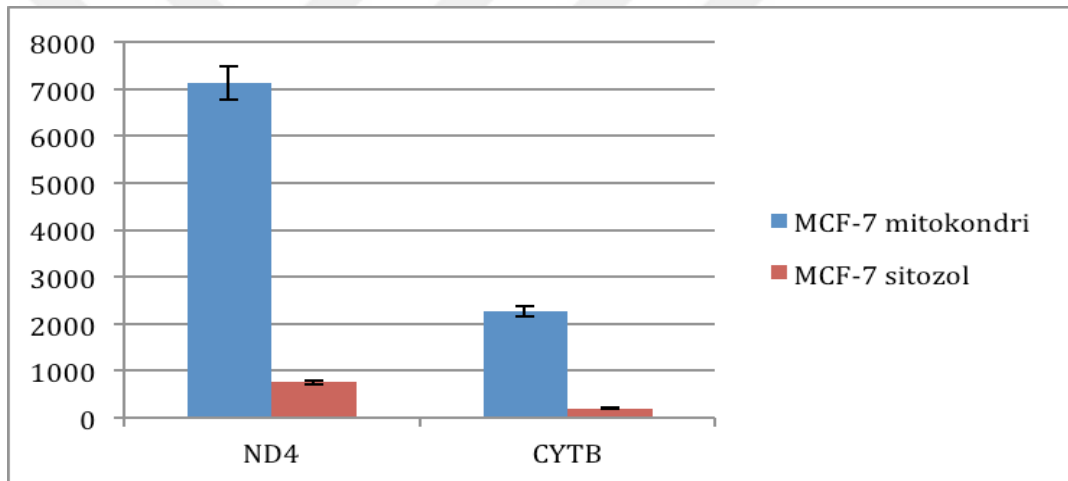
Çalışmada, ayrıca elde ettiğimiz mitokondriyal fraksiyondaki genomik kontaminasyon RNA düzeyinde qRT-PCR yöntemiyle değerlendirildi. Mitokondriyal/Nuklear RNA oranının hesaplanması için kalibratör olarak HIST2H4 geni kullanıldı. İzole ettiğimiz mitokondriyal fraksiyonun, mitokondriyal genler açısından oldukça zengin olduğu saptandı (Şekil 9,10,11).



Şekil 9 MCF-10A hücrelerinden izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda genomik kontaminasyonun qRT-PCR yöntemiyle RNA düzeyinde kontrolü.

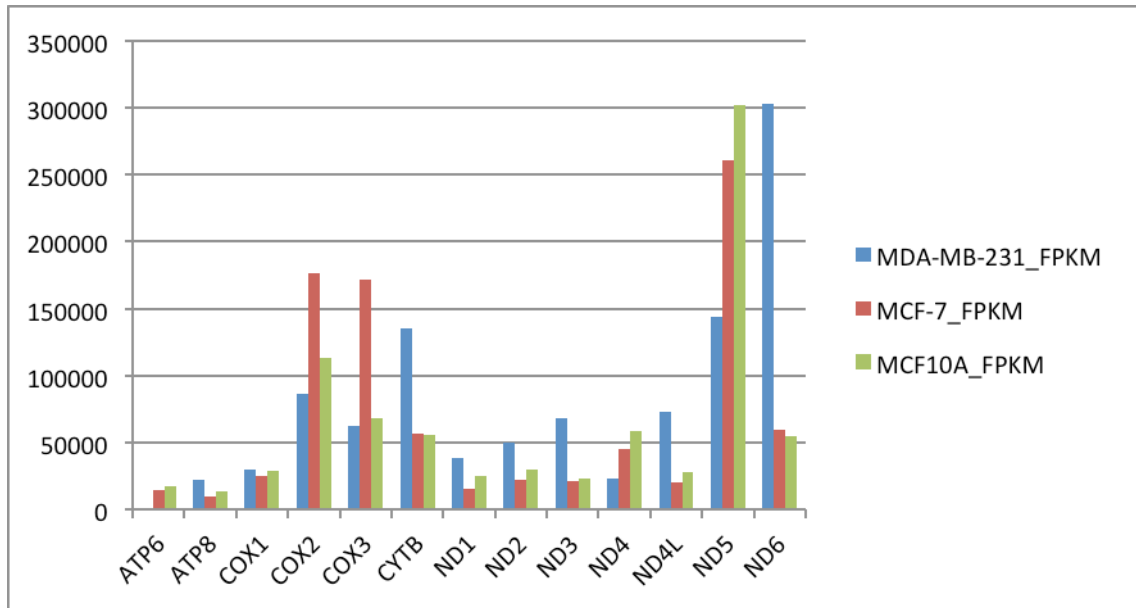


Şekil 10 MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda genomik kontaminasyonun qRT-PCR yöntemiyle RNA düzeyinde kontrolü.



Şekil 11 MCF-7 hücrelerinden izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda genomik kontaminasyonun qRT-PCR yöntemiyle RNA düzeyinde kontrolü.

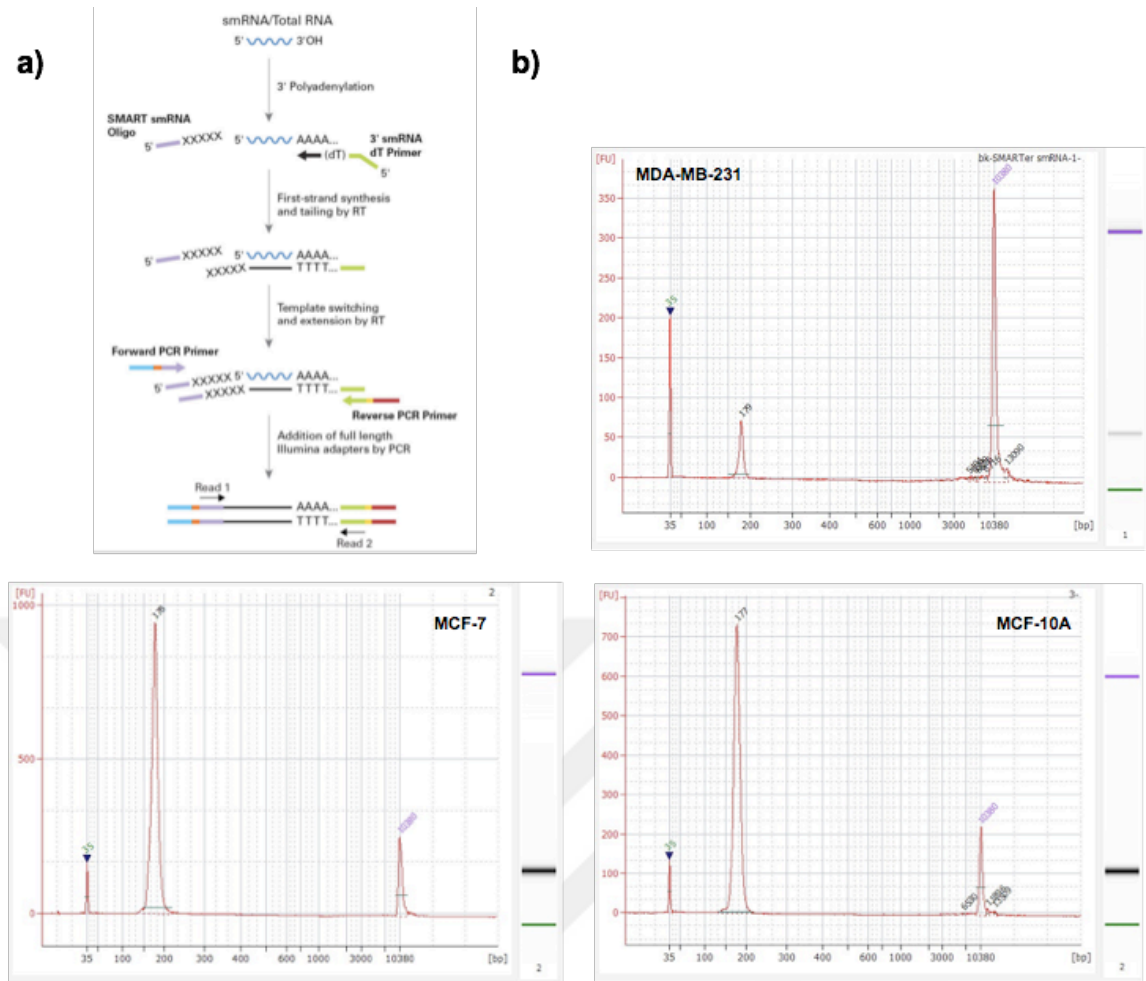
Mitokondriyal RNA örneklerinde, mitokondriyal genlerin ekspresyon düzeyleri ayrıca yeni nesil dizileme yöntemiyle elde edilen veriler ile de değerlendirildi (Şekil 12). Mitokondriyal genler açısından değerlendirildiğinde analiz edilen örneklerin oldukça pürifiye fraksiyonlar olduğu saptandı.



Şekil 12 Mitokondri ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının yeni nesil dizileme yöntemiyle analizi

4.2. Mitokondri ile ilişkili sRNA Kütüphanelerinin Analizi

Mitokondri ile ilişkili sRNA'lar (18–30 nukleotid (nt)) izole edildi, kütüphaneler oluşturuldu (Şekil 13a,b) ve Illumina HT2500 platformu kullanılarak dizilendi. Her örnek için toplam baz sayısı, okumalar, GC yüzdesi, Q20(%), Q30(%) hesaplandı. Dizileme sonucu MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinden sırasıyla mitokondri ile ilişkili 26377797, 34892493 ve 35790420 ham dizi okuması sağlandı (Tablo 5). Okumalar 5' adaptör dizisinden bir baz sonra başladı ve 51 bp sonra bitti. 24 bp uzunluktaki olgun miRNA'ların 3' adaptör dizileri 'Cutadapt' programı kullanılarak uzaklaştırıldı (Tablo 6). Adaptör dizisi içermeyen okumalar miRNA analizine dahil edilmedi. Çalışmada, 15 nukleotidden küçük dizilerin filtrelenmesiyle geriye kalan sırasıyla 1589950, 13832085 ve 13478879 uzunluğundaki okumalar (Tablo 7) genom (hg19) ile eşleştirildi.



Şekil 13 Yeni Nesil Dizileme için örneklerden kütüphane oluşturma ve hazırlanan kütüphanenin kalite kontrolü **a)** smARter smRNA kitinin (Cloneteck) kütüphane hazırlama protokolü **b)** Hücrelerden hazırlanan kütüphane boyutunun Agilent BioAnalyzer cihazında kontrolü.

Table 5 Illumina HT2500 cihazında dizileme sonrası elde edilen ham veri istatistikleri

Örnek	Total baz okuma	Total okuma	GC(%)	Q20(%)	Q30(%)
MDA-MB-231	1,345,267,647	26,377,797	43.03	84.74	79.81
MCF-7	1,779,517,143	34,892,493	39.42	86.16	81.82
MCF10A	1,825,311,420	35,790,420	41.62	81.39	73.22

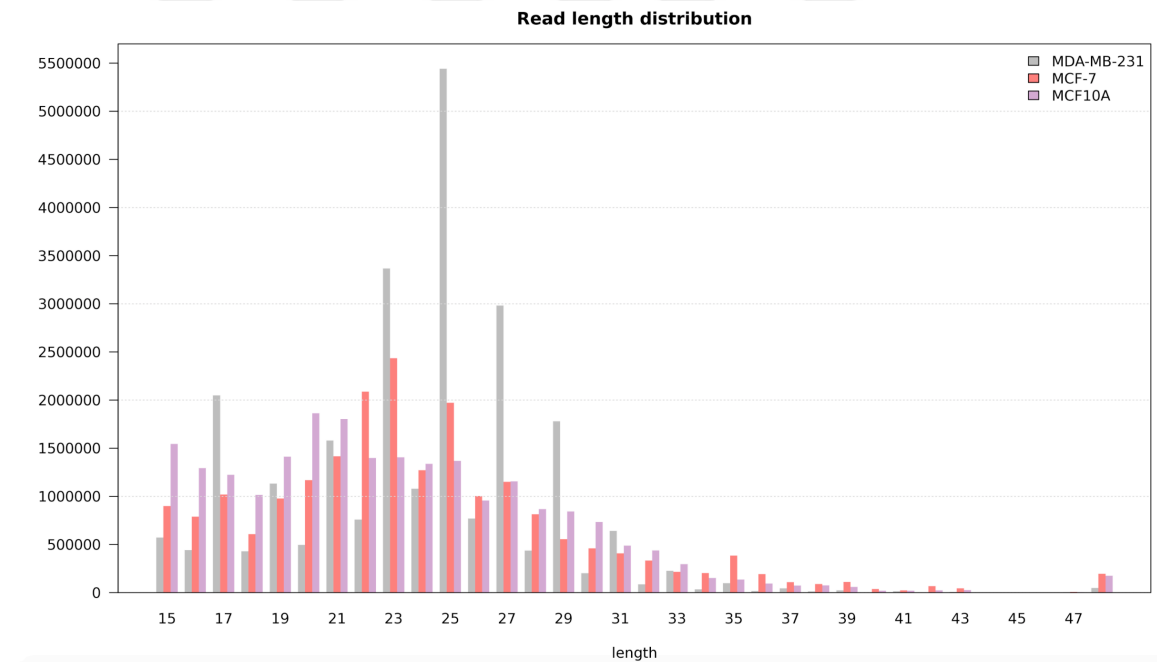
Tablo 6 Cutadapt programı kullanılarak adaptör dizilerin kırılmasından sonra elde edilen işlenmiş veri istatistikleri

Örnek	Total baz okuma	Total okuma	GC(%)	Q20(%)	Q30(%)
MDA-MB-231	12,245,859	1,589,950	68.76	97.03	93.51
MCF-7	127,445,994	13,832,085	78.66	97.42	94.33
MCF10A	139,255,461	13,478,879	78.53	91.16	79.16

Tablo 7 15 nükleotidden küçük dizelerin filtrelenmesi ile genom ile eşleştirilmek üzere elde edilen veri istatistikleri

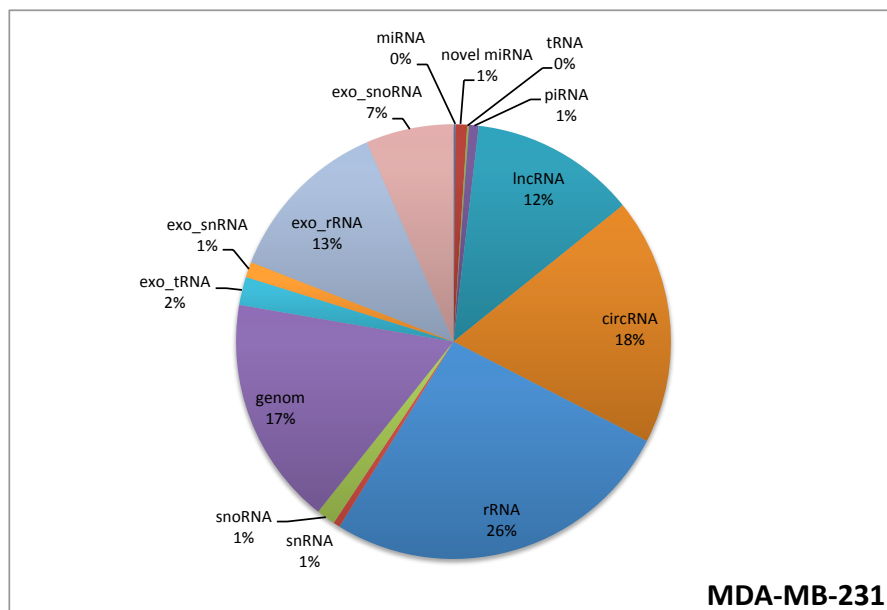
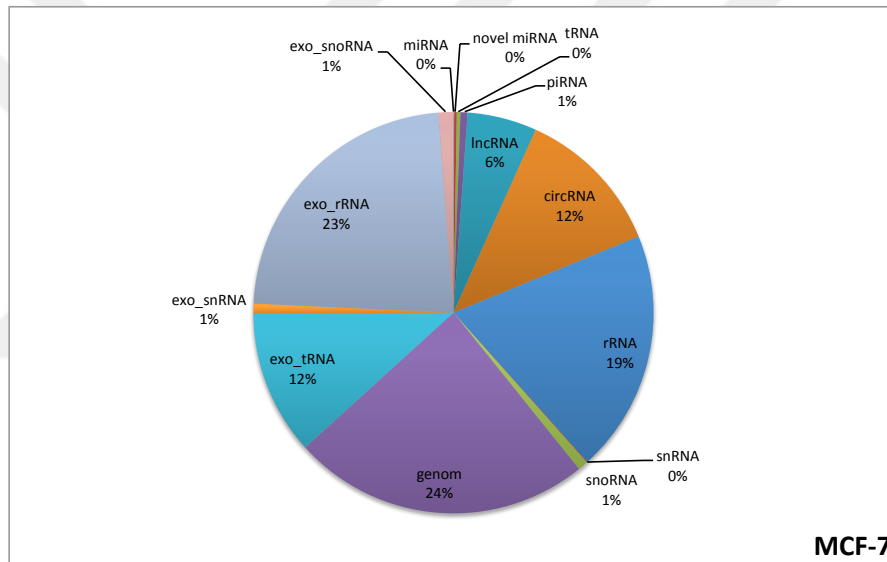
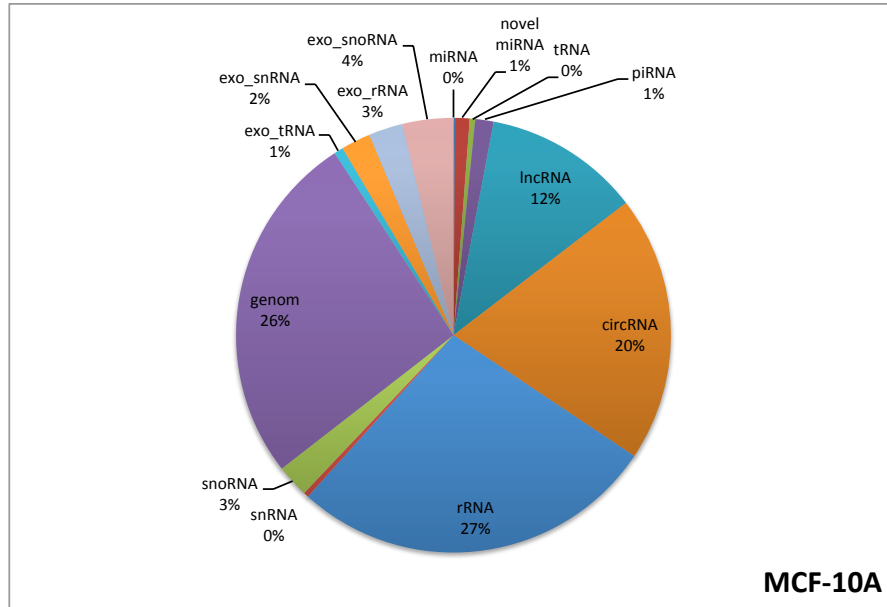
Örnek	Total baz okuma	Total okuma	GC(%)	Q20(%)	Q30(%)
MDA-MB-231	591,441,340	24,781,073	58.74	96.41	91.95
MCF-7	504,506,768	21,059,268	51.60	98.27	95.61
MCF10A	513,666,956	22,302,897	60.35	92.90	83.80

Sırasıyla 21–22, 30 ve 24 nt uzunluktaki miRNA, piRNA ve siRNA'ların da dahil olduğu küçük RNA (*smallRNA*=sRNA) populasyonunun uzunluk analizi gerçekleştirilerek kategorize edildi ve okuma uzunlukları dağılım grafiği Şekil 14'de verildi. Örneklerdeki en yüksek okuma oranınının 25 nt' de olması, miRNA ve piRNA'ya kıyasla sRNA'ların varlığının göstergesidir.

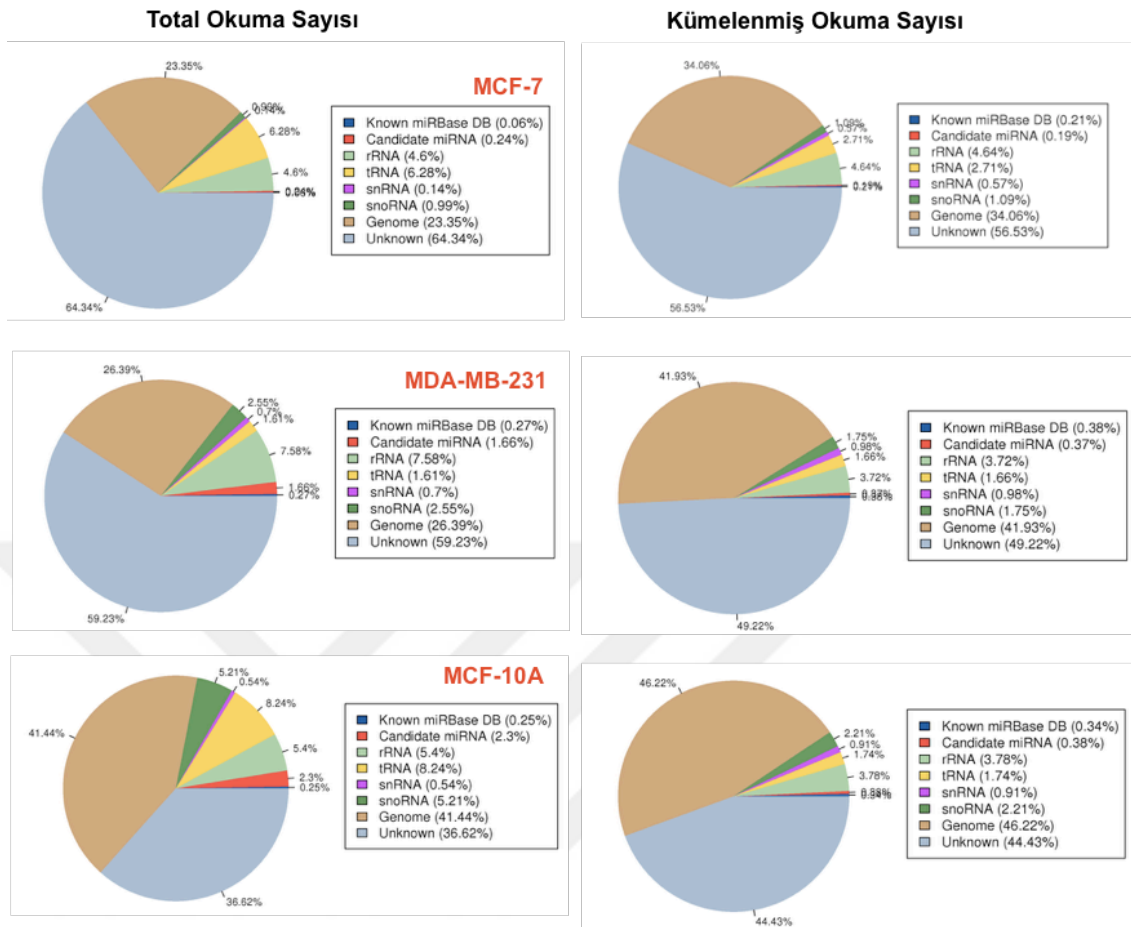


Şekil 14 Örneklerdeki okuma uzunluğu dağılım grafiği

Tanımlı ve novel miRNA'ların tayini için, kümelenmiş okumalar ayrı ayrı referans genom (hg19) ve prekürsör miRNA'lara eşleştirildi. Novel miRNA'lar miRDeep2 2.0.0.7, Bowtie 1.1.1 veritabanı kullanılarak RNAfold algoritmasına göre mature, star ve loop dizilerinden tahmin edildi. Okuma sınıflandırmalarında her örnek için okuma sayıları sırasıyla referans genom (hg19), miRBase v21 ve run blast ile eşleştirildi. Ayrıca miRNA'ları ve diğer RNA türlerini tanımlamada Rfam v9.1 veritabanı kullanıldı. RNA tipinin tanımlamasında; genom haritalama sonucu, miRDeep2 2.0.0.7, Bowtie 1.1.1 tarafından belirlenen tanımlı/novel miRNA ve Rfam v9.1 veritabanında dayalı blast sonuçları kullanıldı. miRDeep2 score -10 ila 10 arasında alındı. Örneklerdeki küçük RNA sınıfı tipleri Şekil 15 gösterildi. sRNA dizileri Genbank ve Rfam veritabanlarındaki RNA'lar ile eşleştirildiklerinde tRNA (MCF-7 %2.71, MCF-10A %1.74 ve MDA-MB-231 %1,66) ve rRNA (MCF-7 %4,64, MCF-10A %3,78 ve MDA-MB-231 %3,72) yanısıra sRNA'nın diğer kategorileri; snRNA (MCF-7 %0.57, MCF10A %0.91 ve MDA-MB-231 %0.98), piRNA (MCF-7 %0.01, MCF10A %1 ve MDA-MB-231 %1), snoRNA (MCF-7 %1.09, MCF10A %2.21 ve MDA-MB-231 %1.75) hücrelerde en sık yer alan sRNA sınıfları olarak saptandı (Şekil 16).



Şekil 15 Çalışmada kullanılan hücrelerdeki RNA içeriği

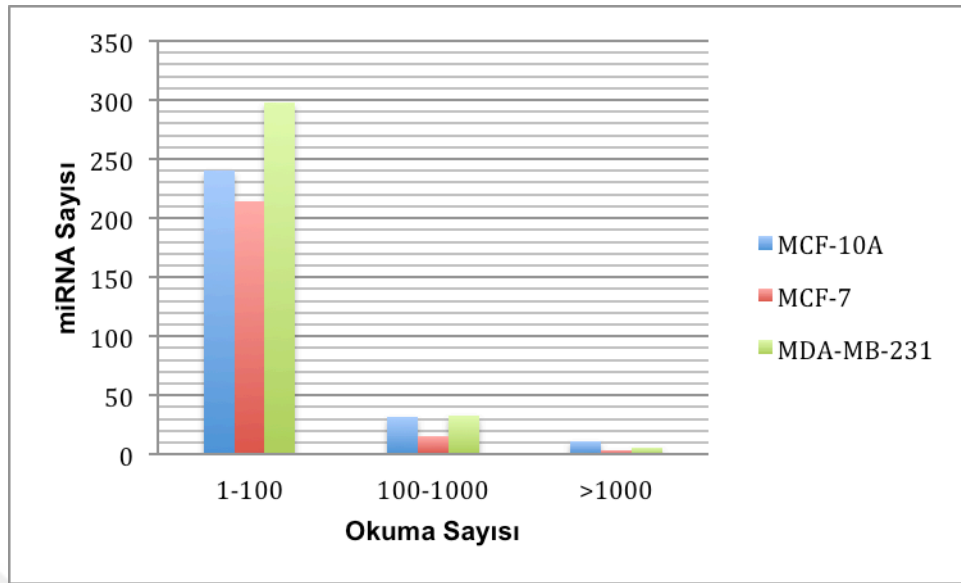


Şekil 16 Çalışmada kullanılan hücrelerdeki sRNA sınıflarının okuma yüzdeleri

4.3. Mitokondri ile İlişkili miRNA'ların Belirlenmesi

miRBase'de tanımlı miRNA'ların tahmini için öncelikle okuma kümeleri referans genom ve prekürsör miRNA'lar ile ayrı ayrı eşleştirildi. Örneklerdeki miRNA sıklık sayıları 1-12,384 arasında olarak belirlendi (Şekil 17). MCF-10A hücrelerinde biyoinformatik analiz sonucuna göre miRBase v21 veritabanı ile uyumlu 283 miRNA, MCF-7 hücrelerinde 234 miRNA, MDA-MB-231 hücrelerinde 220 miRNA saptandı. Okuma sayıları ekspresyon düzeyleri olarak kabul edilerek meme kanseri hücre hatlarında upregüle ve downregüle olan toplam 32 miRNA (Şekil 18) Tablo 8-9'da gösterildi. Örneklerde mitokondri ile ilişkili en sık belirlenen miRNA hsa-miR-6087-5p, hsa-miR-3960-3p, hsa-miR-7641-5p, hsa-miR-3648-3p, hsa-miR-4488-5p, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-4449-3p, hsa-miR-4484, let-7 ailesi üyeleri (let-7a,b,c,d,e,f,g,i), hsa-miR-1290-3p, hsa-miR-423-5p olmakla birlikte; miR-221-3p, miR-92a-3p, hsa-miR-

1246-5p, hsa-miR-1275-5p, hsa-miR-663a-5p, miR-25-3p, miR-23a-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-320a-3p de mitokondri ile ilişkili bulundu.



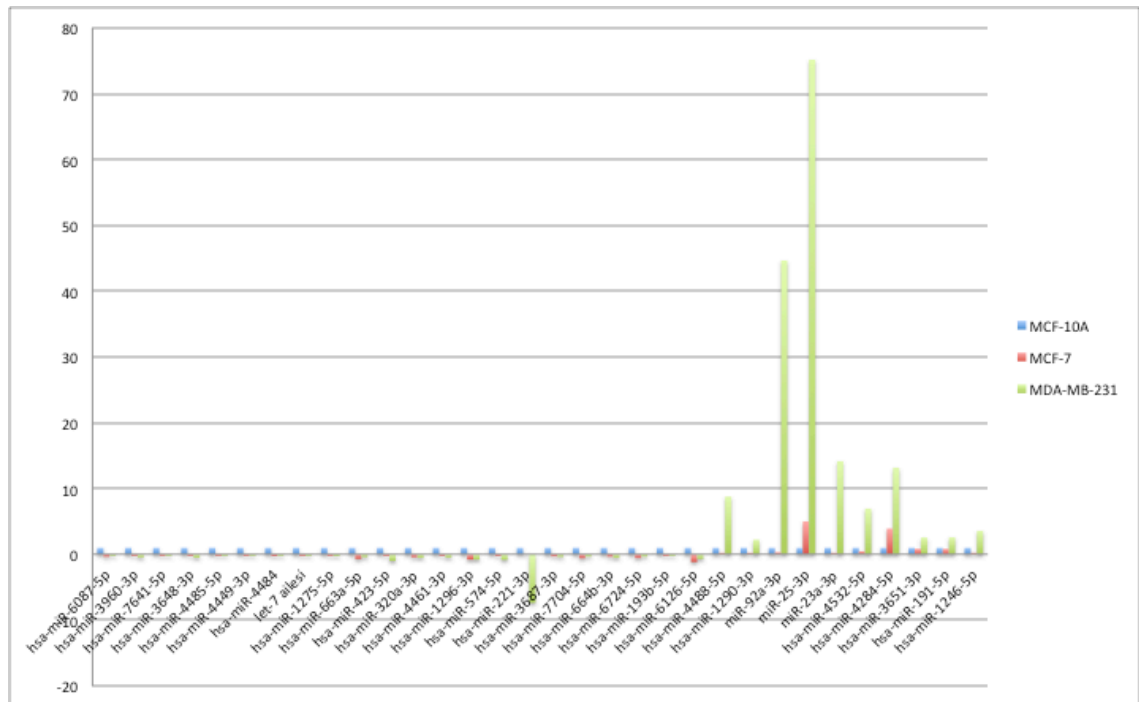
Şekil 17 miRBase'de tanımlı miRNA'ların dağılımı: Dizi okuma sayıları miRNA seviyeleri olarak gösterilmiştir.

Tablo 8 Metastatik meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerinin normal meme (MCF-10A) ve Metastatik olmayan (MCF-7) meme kanseri hücre hatları ile kıyaslandığında ekspresyon artışı saptanan miRNA'lar

miRBase ID	MCF-10A (okuma sayısı)	MDA-MB- 231 (okuma sayısı)	MCF-7 (okuma sayısı)	Mitokondriyal Kodlanma
hsa-miR-4488-5p	1409	12384	140	-
hsa-miR-1290-3p	381	852	2	-
miR-92a-3p	3	134	1	-
miR-25-3p	5	376	25	-
miR-23a-3p	18	255	2	-
hsa-miR-4532-5p	118	820	53	-
hsa-miR-4284-5p	13	171	51	-
hsa-miR-3651-3p	70	179	59	-
hsa-miR-191-5p	12	31	10	-
hsa-miR-1246-5p	156	558	3	-
hsa-miR-221-3p	16	118	-	-

Tablo 9. Normal meme hücre hattı ile kıyaslandığında meme kanseri hücre hatlarında ekspresyonu azalan miRNA'lar

miRBase ID	MCF-10A (okuma sayısı)	MCF-7 (okuma sayısı)	MDA-MB-231 (okuma sayısı)	Mitokondriyal Kodlanma
hsa-miR-6087-5p	11187	4175	1322	-
hsa-miR-3960-3p	5094	871	2438	-
hsa-miR-7641-5p	4851	232	408	-
hsa-miR-3648-3p	4620	1057	2405	-
hsa-miR-4485-5p	3118	668	156	+
hsa-miR-4449-3p	1709	234	154	-
hsa-miR-4484	1409	407	98	+
let-7 ailesi	1652	72	274	-
hsa-miR-1275-5p	86	7	25	-
hsa-miR-663a-5p	534	381	230	-
hsa-miR-423-5p	138	9	138	-
hsa-miR-320a-3p	138	62	76	-
hsa-miR-4461-3p	36	9	18	+
hsa-miR-574-5p	212	54	179	-
hsa-miR-3687-3p	636	202	256	-
hsa-miR-7704-5p	161	96	57	-
hsa-miR-664b-3p	102	37	56	-
hsa-miR-6724-5p	54	31	19	-
hsa-miR-193b-5p	48	9	5	-
hsa-miR-6126-5p	17	20	12	-



Şekil 18 Ekspresyonu artan ve azalan miRNA'ların ekspresyon grafiği

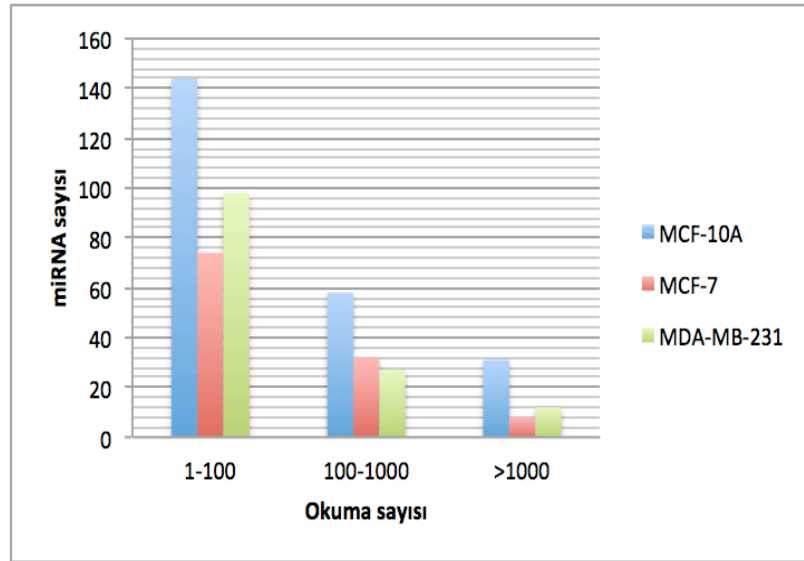
miRNA'lar arasında mitokondriyal kodlanan genleri hedefleyen miRNA varlığını saptayabilmek için SerialCloner 2-6-1 ve Mitowheel programları kullanılarak prekürsör diziler mitokondriyal genom ile eşleştirildi. hsa-miR-4461, hsa-miR-4484 ve hsa-miR-4485 dizilerinin mitokondriyal genom tarafından kodlanan sırasıyla NADH dehidrogenaz subunit 4L (ND4L), L-ORF (MT-OLR) ve 16S rRNA genleri ile homoloji gösterdiği ve mitokondriyal genomdaki pozisyonlarının (10689–10711), (5747–5763) ve (2539–2554) olduğu belirlendi (Şekil 19).



Şekil 19 SerialCloner 2-6-1 programı kullanılarak tanımlı miRNA (mitomiR) dizilerinin mitokondriyal genom ile eşleştirilmesi

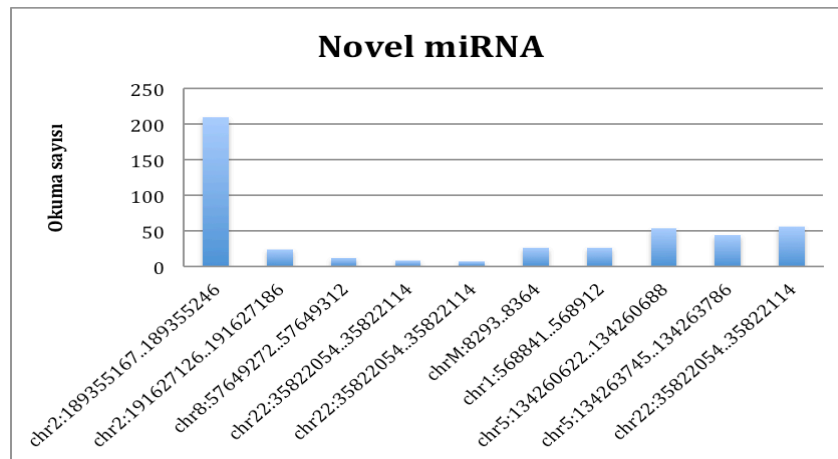
4.4. Novel miRNA'ların Belirlenmesi ve sRNA'ların Mitokondriyal Genom ile Eşleştirilmesi

Çalışmada tanımlı miRNA'ların yanısıra, olası novel miRNA okumaları da analiz edildi. Okuma dizilerinin sayıları miRNA seviyeleri olarak değerlendirildi. Örneklerdeki miRNA sıklık sayıları 1-8,945 arasında olarak belirlendi (Şekil 20).

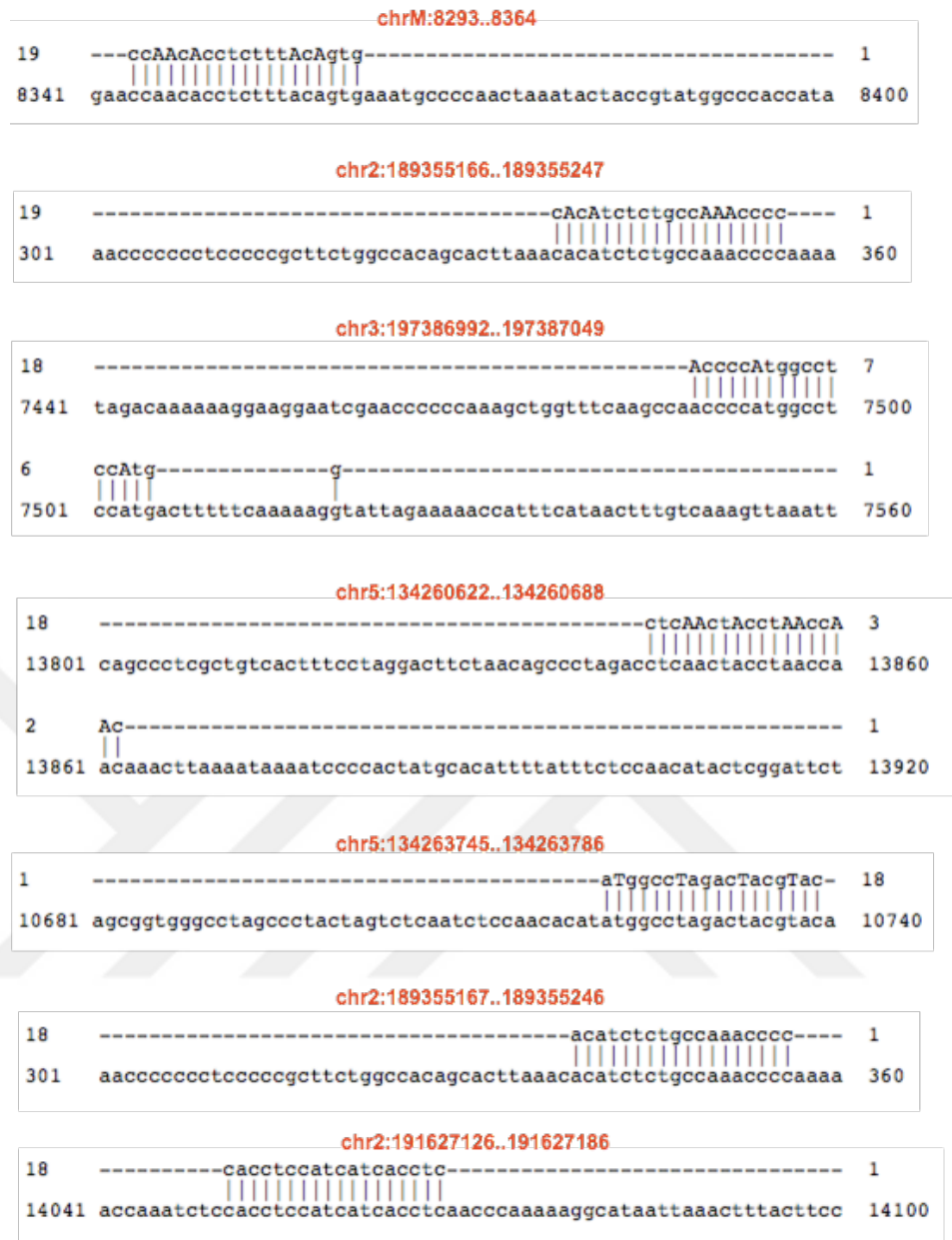


Şekil 20 Novel miRNA dağılımı: Dizi okuma sayıları miRNA seviyeleri olarak gösterilmiştir.

Novel miRNA'lar miRDeep2 aracılığıyla RNAfold algoritması kullanılarak mature, star ve loop dizilerinden analiz edildi. Randfold algoritması kullanılarak p değeri $p < 0.05$ olarak belirlenen istatistiksel olarak anlamlandırılmış analiz sonuçlarına göre, MCF-10A hücrelerinden 229 dizi, MCF-7 hücrelerinden 112 dizi ve MDA-MB-231 hücrelerinden 139 dizi saptandı. Bu miRNA'ların "seed" dizileri hg19 genom ile eşleştirilerek kromozomal lokalizyonları belirlendi. Aynı zamanda prekürsör dizilerinden SerialCloner 2-6-1 programı ve web tabanlı Mitowheel uygulaması kullanılarak 10 novel miRNA'nın 18 nt'lik prekürsör dizilerinin sırasıyla ATP sentaz membran subunit 8 (ATP8), Mitokondriyal kodlanan ağır zincir replikasyon orijini (MT-OHR), Mitokondriyal kodlanan tRNA lizin (MT-TK), mitokondriyal sitokrom c oksidaz 1 (MT-CO1), NADH dehidrogenaz subunit 5 (ND5) ve ND4L genleri ile homoloji gösterdiği saptandı (Şekil 21, 22) (Tablo 10).



Şekil 21 Novel miRNA'ların okuma sayısı grafiği



Şekil 22 Novel miRNA prekürsör dizilerin mitokondriyal genom ile eşleştirilmesi

Tablo 10 Novel miRNA dizilerinin kromozomal lokasyonları ve kodlandıkları genler

Kimlik	Lokalizasyon	İplik	Sıklık Sayısı	Dizi	Gen
10Am-0012	chr2:189355167..189355246	+	210	gggguuuggcag agaugu	locus MT-OHR
10Am-0013	chr2:191627126..191627186	+	24	gaggugaugaug gaggug	MTND5
10Am-0025	chr8:57649272..57649312	-	12	gagguugaagug agaggu	MTND5
10Am-0026	chr22:35822054..35822114	+	9	guagguggccug acuggc	MT-CO1
MCF7-m001	chr2:189355167..189355246	+	15	gggguuuggcag agaugu	locus MT-OHR
MCF7-m002	chr22:35822054..35822114	+	7	guagguggccug acuggc	MT-CO1
231-0001	chrM:8293..8364	-	27	cacuguaaagag guguugg	ATP8
231-0006	chr1:568841..568912	-	27	cacuguaaagag guguugg	MT-TK
231-0014	chr2:189355166..189355247	+	28	gggguuuggcag agaugug	locus MT-OHR
231-0032	chr5:134260622..134260688	+	54	guugguuaggua guugag	MTND5
231-0035	chr5:134263745..134263786	-	44	auggccuagacu acguac	MTND4L
231-0036	chr22:35822054..35822114	+	56	guagguggccug acuggc	MT-CO1

4.5. mitomiR'lerin GO ve KEGG yolak analizleri ve STRING protein-protein etkileşim analizi

miRNA'ların yolak analizi için DIANA veritabanında Fisher's exact test analiz metodu kullanılarak değerlendirme yapıldı. p değerleri dikkate alınarak miRNA kümelerinin hedeflerinin yüksek ilişkili oldukları yolaklar belirlendi (Şekil 23,24). Genlerle ilişkili yolaklar Tablo 11-14'de özetlenmiştir.

Çalışmamızda hsa-miR-4461'in mitokondriyal gen bölgesi MT-ND4L ile homoloji göstermesi sonucu STRING v10.5 veritabanı kullanılarak protein-protein etkileşim analizi gerçekleştirildi. Yapılan analiz sonucuna göre MT-ND4L'in 25 protein ile etkileşim gösterebileceği belirlendi (Şekil 25).

Tablo 11. mitomiR hedeflerinin GO Analizi (DIANA, biyolojik proseslere göre sınıflandırma)

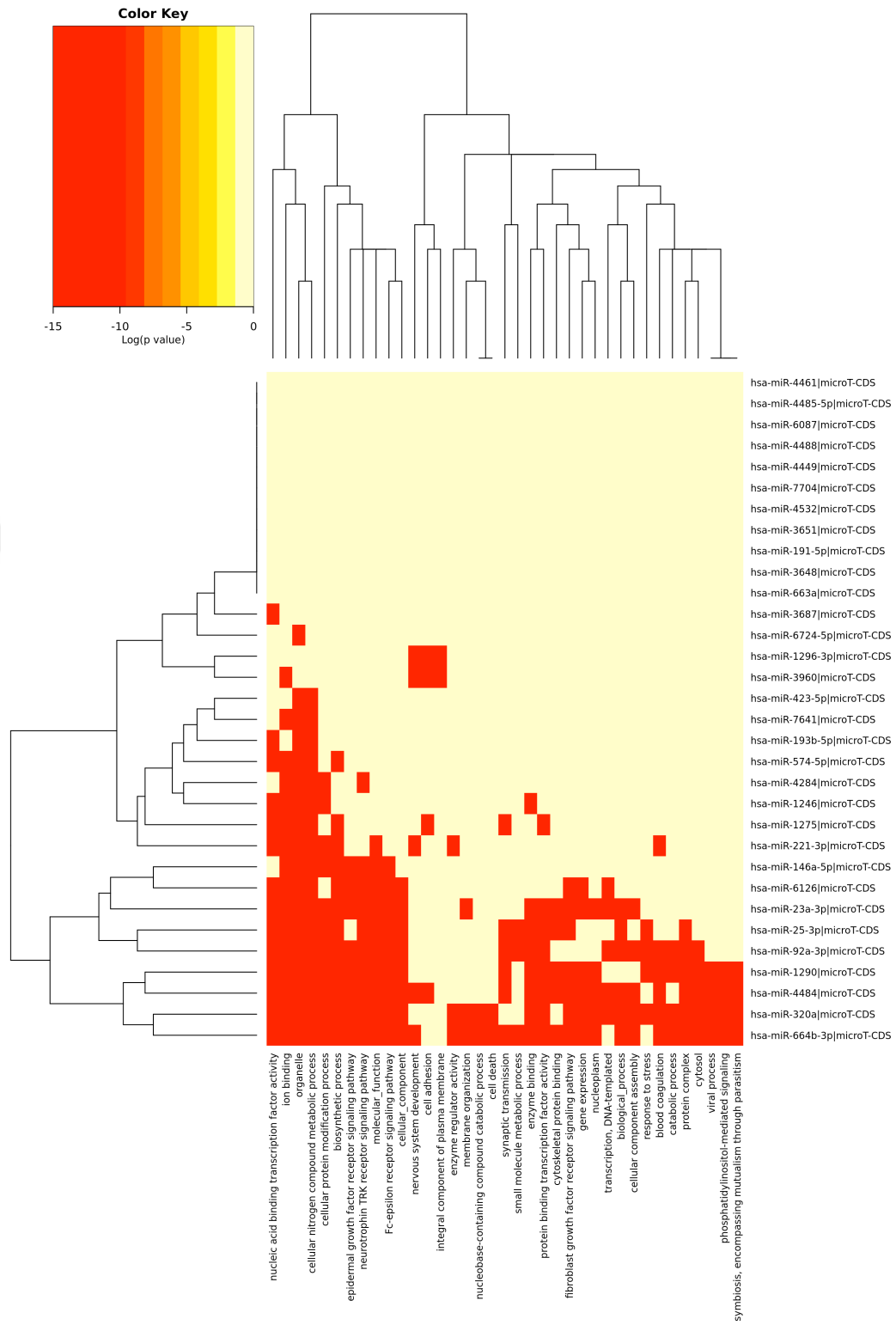
miRNA	p Değeri	Gen	GO Terimi
miR-4484, miR-4449, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	<1e-325	102 Nötrofin TRK reseptör sinyali yolu (GO:0048011)	
miR-4484, miR-4485, miR-4449, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	<1e-325	719 Hücrel protein modifikasyon süreci (GO:0006464)	
miR-4484, miR-4449, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	<1e-325	1289 Biyosentetik proses (GO:0009058)	
miR-4484, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	<1e-325	1635 Hücrel nitrojen içeriği metabolik süreci (GO:0034641)	
miR-4284, miR-664b, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	1,33E-09	59 Fc-epsilon reseptör sinyali yolu (GO:0038095)	
miR-4484, miR-664b, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	3,11E-09	145 Gen ekspresyonu (GO:0010467)	
miR-4484, miR-3960, miR-221, miR-1275, miR-1296	2,70E-08	396 Transkripsiyon (GO:0006351)	
miR-4484, miR-3960, miR-221, miR-1275, miR-1296	6,98E-07	44 Homofilik hücre adezyonu (GO:0007156)	
miR-4484, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	8,66E-05	34 Sinir sistemi gelişimi (GO:0007399)	
miR-4484, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	3,26E-04	77 EGFR sinyali yolu (GO:0007173)	
miR-4484, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	2,21E-03	3169 Biyolojik prosesler (GO:0008150)	
miR-4484, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	8,62E-01	335 Küçük molekül metabolik proses (GO:0044281)	
miR-4484, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	2,32E+01	79 Hücre adezyonu (GO:0007155)	
miR-4484, miR-3687, miR-664b, miR-1290, miR-320a	2,42E+01	43 Fosforilinositol aracılı sinyali (GO:0048015)	
miR-664b, miR-1290, miR-92a, miR-320a	2,57E+01	384 Katabolik proses (GO:0009056)	
miR-4484, miR-6126, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a	5,26E+01	64 FGFR sinyali yolu (GO:0008543)	
miR-4484, miR-664b, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-1275	9,95E+01	103 Sinaptik iletim (GO:0007268)	
miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-320a	0,001023	285 Strese yanıt (GO:0006950)	
miR-4484, miR-664b, miR-92a, miR-23a, miR-320a	0,005848	270 Hücrel komponent topluluğu (GO:0022607)	
miR-664b, 320a	0,042848	134 Hücre ölümü (GO:0008219)	

Tablo 12. mitomiR hedeflerinin GO Analizi (DIANA, hücrel komponentlere göre sınıflandırma)

miRNA	p Değeri	Gen	GO Terimi
miR-4484, miR-664b, miR-6126, miR-4284, miR-423, miR-221, miR-92a, miR-1246, miR-1275, miR-23a, miR-320a, miR-146a	<1e-325	3851 Hücrel komponent (GO:0005575)	
miR-4484, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	<1e-325	3396 Organel (GO:0043226)	
miR-4484, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	3,17E-04	768 Protein kompleksi (GO:0043234)	
miR-4484, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	1,34E+01	256 Nükleoplazm (GO:0005654)	
miR-4484, miR-664b, miR-4284, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	8,82E+01	564 Sitozol (GO:0005829)	

Tablo 13. mitomiR hedeflerinin GO Analizi (DIANA, moleküler fonksiyona göre)

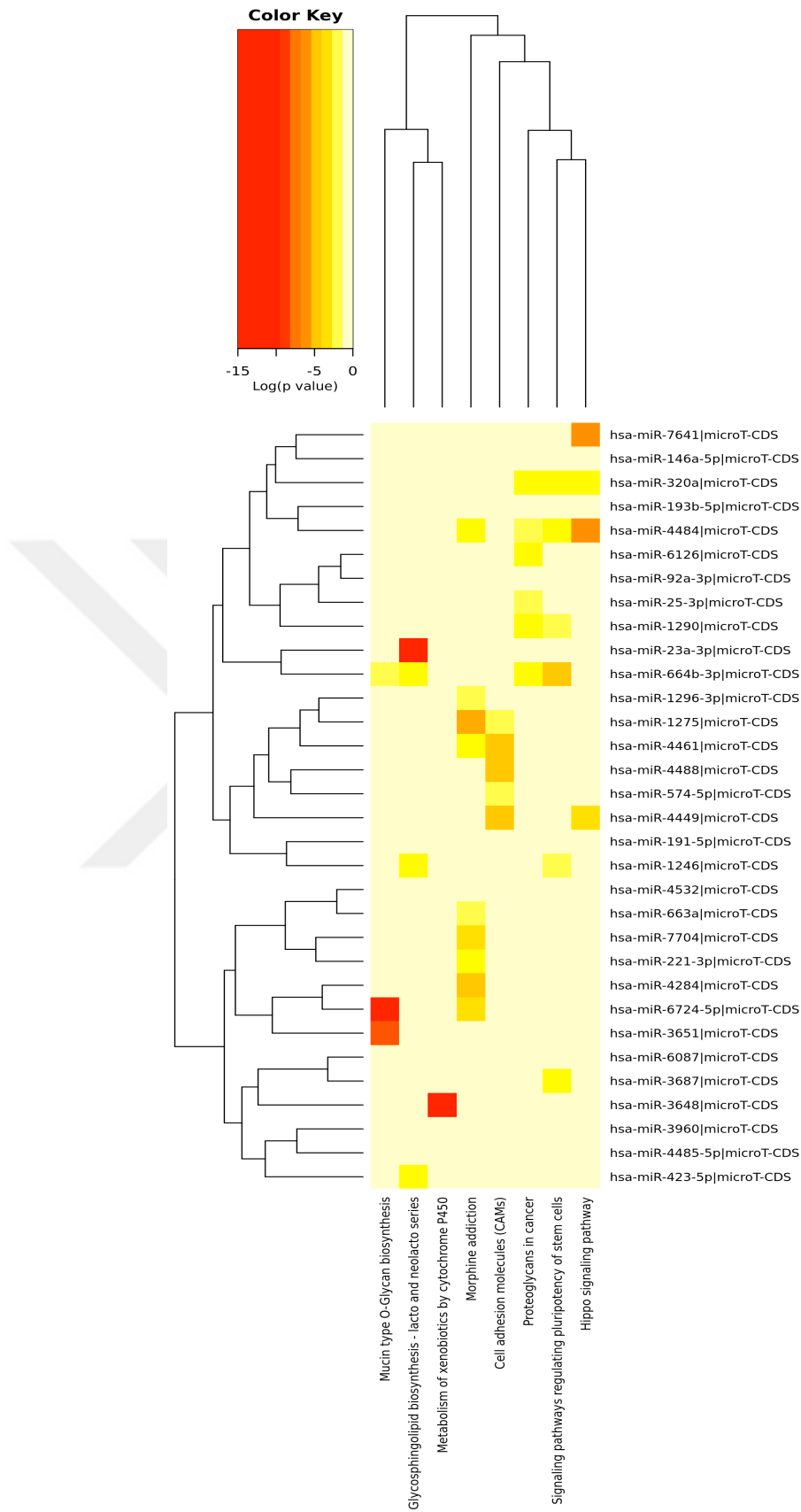
miRNA	p Değeri	Gen	GO Terimi
miR-4484, miR-3687, miR-574, miR-664b, miR-193, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	<1e-325	4099 Moleküler Fonksiyon (GO:0003674)	
miR-4484, miR-574, miR-664b, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	<1e-325	400 Nükleik asit bağlayıcı TF aktivitesi (GO:0001071)	
miR-4484, miR-574, miR-664b, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	<1e-325	2043 İyon bağlama (GO:0043167)	
miR-4484, miR-574, miR-664b, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	8,63E-08	160 Protein bağlayıcı TF aktivitesi (GO:0000988)	
miR-4484, miR-574, miR-664b, miR-6126, miR-4284, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-23a, miR-320a, miR-146a	0,001643	173 Sitoskeletal Protein Bağlama (GO:0008092)	



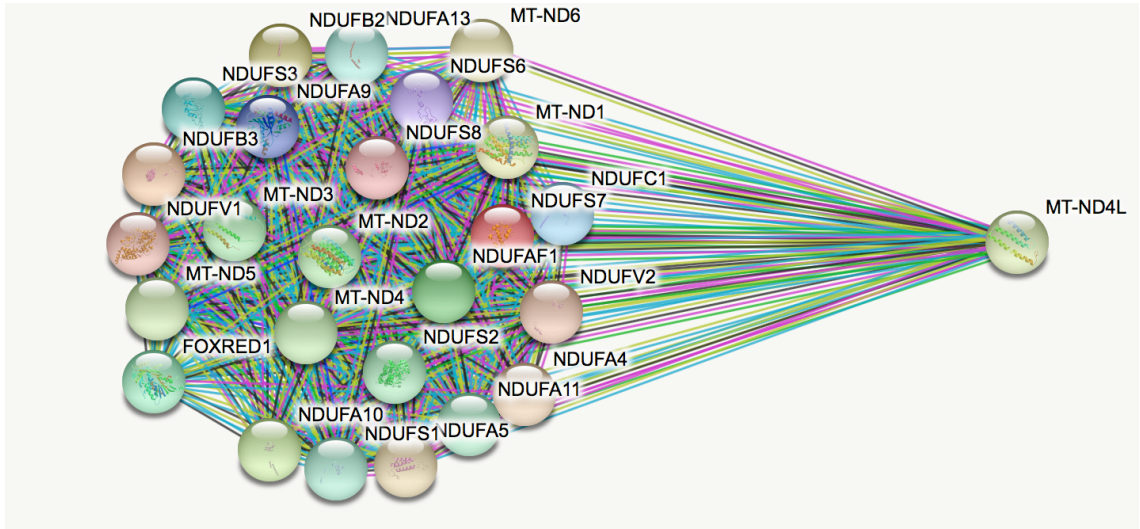
Şekil 23 Belirlenen miRNA'ların GO analizi sonucu heat-map analizi (DIANA veritabanı)

Tablo 14. mitomiR hedeflerinin KEGG yolak analizi

miRNA	p Değeri	Gen	Yolak
miR-4484, miR-664b, miR-1275, miR-1290, miR-23a, miR-320a, miR-146a, miR-1296, miR-92a, miR-574, miR-25, miR-221, miR-1246, miR-193b, miR-191, miR-4461, miR-7641, miR-6724, miR-6126, miR-4449, miR-4284, miR-7704, miR-423	1,02E+02	75	hsa04390: Hippo Sinyal Yoluğu
miR-1290, miR-320a, miR-193b, miR-25, miR-92a, miR-23a, miR-1275, miR-664b, miR-423, miR-574, miR-146, miR-4484, miR-6126, miR-4284, miR-7641, miR-1296, miR-4488, miR-7704, miR-4449, miR-4485, miR-4461	5,42E+02	99	hsa05205: Proteoglikanlar
miR-664b, miR-3651, miR-6724, miR-4284, miR-320a, miR-4484, miR-1290, miR-146a, miR-23a, miR-574, miR-6126, miR-664b, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-1246, miR-574, miR-23a, miR-320a, miR-6126, miR-423	5,67E+06	13	hsa00512: Musin tip O-Glikan biyosentezi
miR-4461, miR-146a, miR-191, miR-1275, miR-4284, miR-4484, miR-193b, miR-7641, miR-3651, miR-6724	6,28E+06	57	hsa04919: Tiroid hormon sinyali yoluğu
miR-4484, miR-25, miR-23a, miR-320a, miR-221, miR-92a, miR-664b, miR-1290, miR-4485, miR-423	0,000115	70	hsa04088: FoxO sinyali yoluğu
miR-574, miR-7641, miR-6126, miR-4284, miR-1246, miR-1275, miR-146a, miR-4488, miR-193b	0,000143	37	hsa04350: TGF-beta sinyali yoluğu
miR-1290, miR-664b, miR-6126, miR-146a, miR-1275, miR-4484, miR-23a, miR-574, miR-4449, miR-4284, miR-221, miR-92a, miR-1246, miR-25, miR-320a, miR-6087, miR-193b, miR-191	0,000778	34	hsa04150: mTOR sinyali yoluğu
miR-1290, miR-320a, miR-574, miR-1275, miR-92a, miR-23a, miR-25, miR-6087, miR-1246, miR-4484, miR-146a	0,003682	54	hsa04071: Sfingolipid sinyali yoluğu
miR-92a, miR-146a, miR-1275, miR-6126, miR-423, miR-4484, miR-221, miR-1246, miR-193b	0,004333	12	hsa00601: Glikosfingolipid biyosentezi
miR-221, miR-23a, miR-574, miR-1290, miR-1246, miR-6126, miR-4284, miR-23a, miR-23a	0,004333	74	hsa04022: cGMP-PKG sinyali yoluğu
miR-664b, miR-4449, miR-1275, miR-1290, miR-4484, miR-7641, miR-193b, miR-4461, miR-4488, miR-663a	0,00461	94	hsa04014: Ras sinyali yoluğu
miR-423, miR-664b, miR-1290, miR-23a, miR-574, miR-1246, miR-320a, miR-221, miR-4484, miR-6126, miR-1275	0,01148	18	hsa00250: alanin, aspartat, glutamat metabolizması
miR-146a, miR-4284, miR-6724, miR-4484, miR-25, miR-92a, miR-6126, miR-4284, miR-574, miR-7704, miR-1296	0,01148	48	hsa05231: Kolin metabolizması
miR-23a, miR-664b, miR-6126, miR-25, miR-1290, miR-320a, miR-4484, miR-423, miR-7641, miR-221, miR-146a	0,021761	135	hsa04151: PI3K-Akt sinyali yoluğu
miR-1246, miR-92a, miR-4284, miR-1275, miR-574, miR-193b, miR-92a, miR-423, miR-6087, miR-4461	0,022032	62	hsa04910: insulin sinyali yoluğu
miR-4484, miR-1290, miR-664b, miR-23a, miR-25, miR-92a, miR-1246, miR-320a, miR-423, miR-1275, miR-6126, miR-193b	0,02826	84	hsa04024: cAMP sinyali yoluğu
miR-664b, miR-4484, miR-320a, miR-7704, miR-1296, miR-6724, miR-4284, miR-574, miR-6087, miR-221	0,033136	84	hsa04015: RAP1 sinyali yoluğu
miR-1246, miR-25, miR-1290, miR-92a, miR-1246, miR-23a, miR-4284, miR-6724, miR-574, miR-146a, miR-320a			
miR-1275, miR-4532, miR-423, miR-663a, miR-1296, miR-221, miR-4484, miR-6126, miR-7704, miR-4461			
miR-25, miR-1290, miR-320a, miR-23a, miR-664b, miR-92a, miR-4484, miR-221, miR-146a, miR-6126, miR-1246			
miR-4484, miR-1275, miR-6126, miR-423, miR-6087, miR-7641, miR-4488, miR-574, miR-4449, miR-663a			



Şekil 24 Belirlenen miRNA'ların KEGG yolak analizi sonucu ortak olan yolakların heatmap analizi (DIANA veritabanı)



Şekil 25 hsa-miR-4461'in homoloji gösterdiği MT-ND4L geninin STRING v10.5 veritabanı kullanılarak protein-protein etkilişim analizi

5. TARTIŞMA

mitomiR'lerin genomik pozisyonlarının ve farklı yapısal özelliklerinin mitokondriye girişlerini etkilediği yönünde çeşitli görüşler bulunmaktadır (Bandiera vd, 2011). Nükleer kodlanmış tRNA ve rRNA'ların mitokondriye taşınımı daha önceden yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Smirnov vd, 2011; Schneider, 2011). Bu da küçük kodlamayan RNA'ların mitokondriye nasıl taşındığı hakkında akıllarda soru işareti bırakmıştır. Bu çalışmada derin dizileme analizi yaparak meme kanseri hücrelerinde mitokondriyal miRNA'ları tanımlayarak miRNA-mitokondri ilişkisini ve hedeflerini araştırdık. Barrey vd (2011) yaptıkları çalışmada %6 ile %27 arasındaki insan miRNA panelleri insan mitokondrisinde belirgin şekilde keşfedilebileceğini göstermişlerdir. Bunun yanısıra mitokondrinin önemli rol oynadığı biyolojik proseslerde işlev gösteren miRNA'ların yanısıra mitomiR olarak da tanımlanan pek çok miRNA'nın tanımlanmasını da sağlayan araştırmacılar arasında yer almışlardır. Bunlardan miR-122, miR-805, miR-609 gibi 20 miRNA fare karaciğer mitokondrisinde (Bian vd, 2010); 20'den fazla miRNA insan miyotüplerinden izole edilen mitokondrilerde (Barrey vd, 2011); miR-1973, miR-1275, miR-494 gibi 13 miRNA Hela hücrelerinin mitokondrisinde (Bandiera vd, 2011) saptanmıştır. Bu araştırmada, meme kanseri hücrelerinden izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda miRNA'ların varlığı belirlendi ve tanımlanmış olan miRNA hedeflerinin mitokondrinin anahtar rol oynadığı hücreyel yolakları düzenleyebileceği gösterildi.

Mitokondri izolasyon yöntemlerinin çoğu temel olarak fizikokimyasal özelliklere dayanmaktadır (Fernández-Vizarra vd, 2002). İzole edilen fraksiyonun kalitesi, yoğunluğu ve saflığı oldukça önemlidir. Önceki çalışmalarda farklı izolasyon methodları ile karşılaştırıldığında MACS izolasyon methodunun ultrasantrifüje eşdeğer saflıkta ve yoğunlukta mitokondri izolasyonuna olanak sağladığı gösterildiğinden dolayı (Hornig-Do vd, 2009) çalışmamızda bu method tercih edildi. Mitokondriyal fraksiyonların eldesinde en sık karşılaşılan sorun sitozolik kontaminasyon varlığıdır. Dış membran protein antikorunu anti-TOM22 ile konjuge edilmiş süpermanyetik boncuklar kullanılarak mitokondri izolasyonuna olanak sağlayan bir method kullanılması ve izole edilen

mitokondriyal fraksiyonların RNase A ile yıkanması çalışmada kullanılan örneklerde sitozolik kontaminasyonun büyük ölçüde uzaklaştırılmasına olanak sağladı.

Warburg tümör hücrelerinde artmış aerobik glikolizin bu hücrelerdeki bozulmuş olan solunum kapasiteleri ile ilişkili olabileceğini hipotez olarak sunmuştur. Kanseler, hücrelerdeki azalmış solunum ile yani dolayısıyla mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkilendirilseler de bu defektler OXPHOS'u bir bütün olarak kapsamamaktadır. Yapılan bazı çalışmalar en agresif meme kanseri hücrelerinde en geniş düzeyde OXPHOS defekti olduğunu, mitokondriyal hasarda malign hücrelerin rolü olduğu ve OXPHOS deregölasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Chintha vd, 2013). Çalışmada kullandığımız normal meme, metastatik (MDA-MB-231) ve metastatik olmayan (MCF-7) meme kanseri hücre hatlarında öncelikle OXPHOS genlerinin ekspresyonları mRNA düzeyinde qRT-PCR ve yeni nesil dizileme yöntemleri ile teyit edildi.

mitomiR'lerin keşfi ile bunların nukleustan mitokondriye taşınmaları altında yatan moleküler mekanizmaların da keşfedilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Pek çok farklı türde yapılan çalışmalar nükleer kodlanmış RNA'ların mitokondriye taşınmasının birkaç aktarım yolu ile olabileceği ve çoğunun ATP bağımlı olarak gerçekleşebileceğini göstermiştir. Bununla birlikte mitokondriyal RNA taşınımının moleküler mekanizmaları çoğunlukla türlere spesifik bir değişkenlik gösterebilmektedir (Bandiera vd, 2013). Olgun miRNA'ların yanısıra pre-miRNA'ların da mitokondri de bulunduğu gösterilmiş olup bu bulgular mitokondriyal miRNA biyosentezi olasılığını arttırmaktadır (Sripada vd, 2012). Bazı pre-RNA dizilerinin mitokondride işlenerek mitokondriyal transkriptler üzerinde etki gösterdiği ya da genomik türevli mRNA'larla etkileşmek üzere sitozole taşınan olgun miRNA'ları oluşturduğu düşünülmektedir. Bu sebeple mitokondriyal işlenmiş miRNA'ların mitokondriyal fonksiyonlarla ilişkili gen ekspresyonunun bazı transkripsiyon sonrası regölasyonuna katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. (Bienertova-Vasku vd, 2013). Bu çalışmada MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında sRNA'lar, özellikle miRNA'lar, yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak tanımlanarak mitokondri ile ilişkileri saptandı. Bu amaçla, tanımlı ve novel miRNA hedeflerinin mitokondrinin anahtar rol oynadığı kritik hücresel yolları düzenleyebilecekleri düşüncesinden yola çıkarak mtRNA örneklerinin küçük RNA dizilenmesi sonucu yapılan biyoinformatik analizler ile örneklerdeki tanımlı ve tanımlı olmayan muhtemel miRNA dizileri analiz edildi. Her bir hücreden hazırlanmış olan mtRNA'lardan oluşturulan kütüphanelerin analizi sonucu mitokondriyal genom tarafından kodlanan 3 adet miRNA (hsa-miR-4461, hsa-miR-4484 ve hsa-miR-4485) belirlendi. Serial Cloner 2-6-1 programı kullanılarak bu 3 adet miRNA'nın dizisi mitokondriyal genom ile eşleştirildiğinde sırasıyla ND4L, L-ORF ve 16S rRNA genleri ile homoloji gösterdiği saptandı. Mitokondriyal fonksiyon ve miRNA aktiviteleri arasında

dinamik bir ilişki olduğu bilinmektedir. Çeşitli dokular ve hücrelerden izole edilen mitokondrilerde miRNA'ların varlığının yanısıra önemli proteinler olan AGO ve Dicer'in da varlığının da gösterilmesi (Bandiera vd, 2011; Das vd, 2014; Wang vd, 2015) mitokondri de aktif bir RNAi mekanizmasının olabileceğini düşündürmektedir. Meme kanseri hücre hatlarında mitokondriyal genler ile homoloji gösterdiğini saptadığımız miRNA'lar ile ilgili olarak yapılan diğer araştırmalara göre; 16S rRNA'yı hedefleyen kromozom 11p15.4'de lokalize olan hsa-miR-4485'in olası hedeflerinin tümör oluşumunun pek çok basamağını içine aldığı belirlenmiştir. Sripada vd (2012) bu hedeflerin ilişkili olduğu yolların tümör baskılama, metabolik yeniden programlama, kanser hücrelerinin migrasyonu ve hücre siklus kontrolü ile ilişkili olduğunu biyoinformatik programlar vasıtasıyla belirleyerek, hsa-miR-4485'in glikolizi *downregüle* edebileceği ve meme kanseri hücrelerinin kolonojenik potansiyelini azaltabileceğini göstermişlerdir. hsa-miR-4484 kromozom 10q26.2'de lokalizedir ve hücrede apoptozun indüklenmesi ile ilişkili MRP3 K12/DLK ile etkileşerek AATF'yi regüle ettiği gösterilmiştir. PI3K/AKT gibi sağ kalım ve proliferatif yolların hipoaktivasyonu mitokondriyi de etkileyen kanser başlangıcına neden olur. PI3K aynı zamanda miR-4484'e spesifik bir hedef olarak rol oynamaktadır (Tamaddon vd, 2016). hsa-miR-4461 kromozom 5q31.1'de lokalizedir ve muhtemel hedeflerinden biri nükleofosmin 1 (NPM1) genidir. NPM1 hematopoetik kök hücrelerde oksidatif strese karşı koruyucu bir rol oynayabilir. Yüksek NPM1 ekspresyonuna sahip pek çok kanser hücresi UV ya da hipoksi indüklü apoptoza daha dayanıklıdır (Li vd, 2004). Bunun gibi anti-apoptotik fonksiyonlar NPM1'in p53'ün mitokondriye lokalizasyonunu engelleme kabiliyeti ile ilişkilendirilmiştir (Dhar ve St Clair, 2009).

Bu çalışma mitokondriyal genom ile homoloji gösteren mitomiR'lerin (hsa-miR-4484, hsa-miR-4485 ve hsa-miR-4461) dışında nüklear genom tarafından kodlanan fakat mitokondri fonksiyonu ile ilişkilendirilen miRNA'lar da belirlenmiştir. Daha önceden yapılan çalışmalara göre mitokondri ile ilişkili olan ve meme kanseri hücrelerinde ekspresyon değişimi saptadığımız miRNA'lardan hsa-miR-6087 Xq22.3'de lokalize olup eksosomal bir miRNA'dır (Reza vd, 2016). hsa-miR-7641 ribozomal proteinlerin regülatörüdür ve mitokondriyal proteinleri hedef almaktadır (Reza vd, 2017). hsa-miR-4488 11q12.22de lokalizedir ve *TGFB2-OT1* lncRNA'ya bağlanarak CERS1 ve NAT8L gibi otofaji ile ilişkili hedeflerin ekspresyonunu regüle etmektedir (Huang vd, 2015). hsa-miR-574-5p 4p14'de lokalizedir ve miyotüplerden izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda bulunmuştur. hsa-miR-7704 2q31.1'de lokalizedir ve eksozomal bir miRNA'dır (Reza vd, 2016). hsa-miR-664b onkogenik bir miRNA olarak iş görür ve FOXO4 genini hedeflemektedir. FOXO transkripsiyon faktörleri mitokondriyal antioksidan enzimleri aktive ederek mitokondriyi korumaktadırlar ve

mitofajiyi indükleyerek hasarlı mitokondrinin yeniden şekillenmesine yardımcı olurlar (Kim ve Koh, 2017). hsa-miR-3651 kromozom 9q22.31'de lokalizedir ve HEK293 ile HeLa hücrelerinin mitokondrilerinde tanımlanmıştır (Sripada vd, 2012). hsa-miR-193b kromozom 16p13.12'de lokalize olup oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkilendirilmiştir (Zhang vd, 2014). hsa-miR-4284 7q11.23'de lokalizedir ve mitokondriyal orijinli olan nadir miRNA'lardandır. Ana hedef geni olan TRAF4 pro-onkogenik TGF beta indüklü SMAD ve SMAD olmayan sinyali düzenleyen ana komponenttir (Tamaddon vd, 2016). hsa-miR-25 kromozom 7q22.1'de lokalizedir ve intraselüler kalsiyum homeostazını düzenler. Apoptozda ve tümörigenezde önemli rol oynayan mitokondriyal kalsiyum ünipoortu miR-25'in hedefidir (Marchi vd, 2013). hsa-miR-3960 kromozom 9q34.11'de lokalizedir ve eksozomal bir miRNA'dır. *TGFB2-OT1* lncRNA'ya bağlanarak CERS1 ve NAT8L gibi otofaji ile ilişkili hedeflerin ekspresyonunu regüle etmektedir (Huang vd, 2015; Reza vd, 2016). hsa-miR-423 kromozom 17q11.2'de lokalizedir ve HEK293 ile HeLa hücrelerinin mitokondrilerinde tanımlanmıştır (Sripada vd, 2012). hsa-miR-221 kromozom Xp11.3'de lokalize olup p27 ve p57'yi hedef alarak hücre siklus progresyonunu ve hücre çoğalmasını regüle ederler. Aynı zamanda hücre membran potansiyeline etki ederek apoptozun başlamasında önemli rol oynarlar (Zhang vd, 2010). hsa-miR-92a kromozom 13q31.3'de lokalizedir ve Bim'i hedefleyerek apoptozu düzenler (Niu vd, 2012). hsa-miR-1246 kromozom 2q36.1'de lokalizedir ve HELA hücrelerinden izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda tanımlanmıştır (Bandiera vd, 2011). hsa-miR-1275 kromozom 6p21.31'de lokalizedir ve mitokondri ile ilişkili bulunmuştur (Bandiera vd, 2011). hsa-miR-663a kromozom 20p11.1'de lokalizedir ve epigenetik olarak regüle edilmektedir. Kompleks I-V ile ilişkili solunum zinciri altünitelerini regüle ederek mitokondriyal fonksiyonu düzenler (Carden vd, 2017). hsa-miR-23a kromozom 19p13.12'de lokalizedir ve olası hedefleri nükleer kodlanmış mitokondriyal kompleks I altüniteleridir (Prajapati vd, 2014). hsa-miR-320a kromozom 8p21.3'de lokalizedir ve VDAC1 ekspresyonunu downregüle ederek mitofajiyi teşvik eder (Li vd, 2015). hsa-miR-146a kromozom 5q33.3'de lokalizedir ve mitomiR olarak tanımlanmış olmakla birlikte hücre yaşlanması süresinde eksprese olduğu belirlenmiştir (Rippo vd, 2014). (Bu mitomiR'lerin her birinin mitokondri ile olan ilişkileri hem elde ettiğimiz fraksiyonunun mitokondri bakımından zengin olduğunu bir kez daha göz önüne sermiş olup hem de bu mitomiR'lerin meme kanseri ile ilişkilerinin açıklanabilmesi açısından yol gösterici oldukça zengin verileri barındırması bakımından önem arz etmektedir. Bu araştırmada da, tartışılan araştırmalardaki mitomiR'ler saptandı. Bu sonuçlar elde edilen fraksiyonun mitokondri bakımından zenginliği ve meme kanseri ile ilişkilerinin açıklanabilmesi bakımından yol göstericiydi.

Mitokondrinin, apoptoz regülasyonunda önemli bir organel olması ve mitokondriyal seramidin bu proseste görev almasından dolayı sfingolipid metabolizmasının da mitokondride mi gerçekleştiği ya da sfingolipidlerin bu organelde mi lokalize olduğunun belirlenmesi oldukça önemlidir; Sfingolipidler hücre membranlarının yaygın komponentleridir ve intra- ve ekstraselüler sinyal yollarında önemli rol oynamaktadırlar (Siskind, 2005). Kısa ve uzun açıl-zincir seramidlerinin mitokondriyal dış membranda büyük protein geçirgen kanallar oluşturduğu gösterilmiştir ve bu kanallar endojen seramidler tarafından oluşturulmuş ise apoptoz sürecinde proapoptotik proteinlerin salınımını gerçekleştirebilmektedirler (Siskind ve Colombini, 2000). Bir serin/treonin kinaz olan mTOR'un mRNA translasyon mekanizması ile enerji tüketimini ve TFAM, mitokondriyal ribozomal proteinler, kompleks I-V elemanları gibi nükleer kodlanan mitokondri ile ilişkili proteinlerin sentezini indükleyerek mitokondriyal enerji üretimini koordine edip mitokondriyal fonksiyonları düzenlediği, otofajiyi inhibe ettiği gösterilmiştir (Ganley vd, 2009; Morita vd, 2013). Ayrıca, Birçok araştırmada miRNA'ların mitokondride eksprese oldukları ve mitokondriyal enerji metabolizmasını, apoptoz ve biyogenezini regüle ettiğini gösterilmiştir; miRNA'ların mitokondriyal metabolizmayı etkiledikleri, beyin spesifik miRNA olan miR-338'in COXIV ekspresyonunu regüle ederek mitokondriyal fonksiyonu etkileyerek mitokondriyal oksijen tüketimi, mitokondriyal metabolik aktiviteyi ve ATP üretimini azalttığı (Aschrafi vd, 2008); miR-23a ve 23b'nin glutaminazı hedefleyerek glutaminaz ekspresyonunu direkt olarak baskıladığını (Gao vd, 2009); miR-15a'nın bir mitokondriyal iç membran taşıyıcı protein ailesi üyesi olan endogenous uncoupling-protein 2 (UCP-2)'nin ekspresyonunu inhibe ederek insülin biyosentezini düzenlediği (Bordone vd, 2006); miR-696'nın peroksizom proliferatör-aktive reseptör gamma ko-aktivatör 1-alfa (PGC-1 α)'yı hedef alarak mitokondriyal biyogenezini ve yağ asidi oksidasyon kapasitesini düzenlediği (Aoi vd, 2010); miR-1291, miR-138, miR-150, miR-199a-3p ve miR-532-5p'nin glukoz taşıyıcıları gibi bazı anahtar glikolitik enzimlerin ekspresyonunu etkilediği (Macheda vd, 2005); miR-29a, miR-29b ve miR-124'ün pankreatik beta hücrelerinde glikoliz sürecinde mitokondri tarafından salınan monokarboksilat taşıyıcılarından MCT1 ekspresyonunu regüle ettiği (Pullen vd, 2011); miR-143, miR-126 ve miR-24'ün ApoL6'yı hedefleyerek mitokondriyal lipid metabolizmasını regüle ettiği (Ye vd, 2013); miR-133 ve miR-107'nin pantotenat kinaz enzimini upregüle ederek (Wilfred vd, 2007), miR-308-3p'nin ise PGC-1 β -ERR- γ transkripsiyonel yolağı hedefleyerek TCA döngüsünü etkilediği (Eichner vd, 2010) çalışmalarla gösterilmiştir. Mitokondri ROS'un temel kaynağıdır ve ROS'un pek çok organda lipid peroksidasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Kwiecien vd, 2014). ROS kanser başlangıcına eşlik edebileceği gibi, hücresel proliferasyon, sağkalım,

anjyogenez, metastaz, EMT'yi regüle eden önemli sinyal yollarının aktivasyonunda ve devamlılığında ikincil haberci olarak görev alır. ROS TGF- β ile beraber SMAD'lar, MAPK'ler ve NF- κ B'nin dahil olduğu downstream sinyal transdüksiyonun düzenlenmesinde görev aldığından dolayı tümörigenez sürecinde TGF- β 'nin etkilerine aracılık edebileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda TGF- β hem ROS üretimini arttırarak hem de antioksidatif sistem aktivitesini azaltarak ROS seviyelerini düzenler (Tochhawng vd, 2013) Hipoksi durumunda upregüle olan pek çok hücrede miR-210'un mitokondriyal respirasyonu ve ilişkili downstream fonksiyonları baskıladığı (Chan vd, 2009; Favaro vd, 2010); miR-17/92 kümelerinin ROS üretimini arttırarak DNA hasarına neden olduğu (Ebi vd, 2009) çalışmalarla gösterilmiştir. Mitokondrinin ETZ'nin 5 bileşeninin dahil olduğu oksidatif fosforilasyon aracılığıyla ATP üretimindeki rolü iyi bilinmektedir. miR-181c, miR-1, miR-338 ve miR-210'un pek çok proteini hedef alarak ETZ'yi regüle ettiği (Aschrafi vd, 2008; Li vd, 2012; Das vd, 2012; Barman vd, 2014) gösterilmiştir. Mitokondri biyogenezinde önem arz eden fisyon-füzyon mekanizmaları tarafından başarısız mitokondriyal tamir prosesi mitofajiyi aktive eder ve kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok hastalık bu dinamik mitokondriyal davranış ile ilişkilidir. Ayrıca, mitokondriyal dinamikler apoptoz, otofaji ve kontraktıl disfonksiyonda önemli rol oynamaktadırlar. miRNA'lar ve bu mitokondriyal dinamikler arasındaki ilişkilerin araştırıldığı çalışmalarda, miR-15a ve miR-16-1'nin Bcl-2 ve Mcl1'i regüle ederek mitokondriyal membran potansiyelini bozup sitozole sitokrom c salınımını sağlayarak mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu (Gao vd, 2010); kalpte eksprese olan miR-30 ailesi üyelerinin p53 ve Drp-1 aracılığıyla apoptoz ve mitokondri parçalanmasını regüle ettiği (Li vd, 2010); miR-27b'nin miyosit farklılaşması sürecinde Foxj3'ü downregüle ederek mitokondriyal biyogenezini etkileyebileceği (Shen vd, 2016); miR-101, miR-204 ve miR-30a'nın otofaji ile ilişkili proteinleri hedefleyerek otofajiyi düzenlediği (Zhu vd, 2009; Frankel vd, 2011; Xiao vd, 2011); miR-761'in mitokondriyal fisyon faktör (MFF)'yi downregüle ederek mitokondriyal fisyonu baskıladığını (Long vd, 2013) gösterilmiştir.

Bu çalışmada belirlenen mitokondriyal miRNA'lar ile yaptığımız GO ve KEGG yolak analizleri sonucu bize hedefledikleri genlerin hangi yollar üzerinde hangi genleri hedef alarak etki gösterebileceği hakkında ışık tutmuştur. miRNA hedeflerinin GO kategorilerinden p değeri $p < 0.05$ olanlar analiz edilmiştir. Buna göre; transkripsiyon regülasyonu (GO:0006351), gen ekspresyonunun regülasyonu (GO:0010467), strese yanıt (GO:0006950), Hücre ölümü (GO:0008219), biyosentetik proses (GO:0009058), biyolojik prosesler (GO:0008150) gibi GO terimleri oldukça anlamlı bulundu. miRNA'ların düzenleyici yollardaki rollerini analiz etmek için gerçekleştirilen KEGG analizine göre Hippo sinyal yolağı (hsa04390), proteoglikanlar (hsa0525), tiroid hormon

sinyal yolağı (hsa04919), FoxO sinyal yolağı (hsa04068), TGF- β sinyal yolağı (hsa04350), mTOR sinyal yolağı (hsa04150), glikosfingolipid biyosentezi (hsa00601), alanin-aspartat-glutamat metabolizması (hsa00250), kolin metabolizması (hsa05231), PI3K-AKT sinyal yolağı (hsa04151), insülin sinyal yolağı (hsa04910) ile ilişkili genlerin hedefler olabileceğini belirledik. miRNA kümelerinden yaptığımız KEGG yolak analiz sonucuna göre yüksek ilişki saptanan Hippo sinyal yolağı, hücre proliferasyonu ve apoptozu düzenleyerek doku gelişimi ve rejenerasyonunu kontrol etmektedir (Pan, 2010; Halder ve Johnson vd, 2011; Yu ve Guan 2013) ve son yıllarda memeli hücrelerinde mitokondriyal fonksiyon ile arasında ilişki olduğu, Opa1 ve Mnf2 gibi genlerin transkripsiyonel olarak upregülasyonunu sağlayarak mitokondriyal füzyon ve bölünme oranlarını arttırdığı saptanmıştır (Nagaraj vd, 2012; Ohsawa vd, 2012; Sing vd, 2014; Watt vd, 2017).

Ayrıca çalışmada küçük RNA dizileme analizi ile hücrelerden hazırlanan mitokondriyal fraksiyonlarda pek çok sRNA popülasyonunun dağılımı belirlendi. Mitokondri ile ilişkili RNA'ların dizilenmesi tRNA, snRNA ve snoRNA gibi çeşitli sRNA popülasyonlarının da varlığını doğrular niteliktedir. Bu popülasyonların ilişkilerinin saptanması hem mitokondrinin bu sRNA'ların biyogenezlerindeki rollerini hem de mitokondriyal fonksiyonların düzenlenmesindeki rollerinin açıklanmasına yardımcı olabilecektir. snRNA ve snoRNA'lar sitoplazmadan sub-nükleer bölgelere taşınmaktadırlar ve snoRNA'lar miRNA'ya benzer şekilde işlenmekte olup ribozomal biyogenez rolü dışında miRNA'ya benzer fonksiyon göstermektedirler (Matera vd, 2007). snoRNA'ların mitokondri ile ilişkisi, mitokondriyal ribozom topluluğu, RNA modifikasyonları ve miRNA benzeri fonksiyonlardaki rolleri açısından daha ayrıntılı şekilde ele alınmalıdır. srpRNA'lar ile ilişkisi de ayrıca mitokondrinin mitokondriyal hedef proteinlerin translasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu bulgular daha sonra snRNA, snoRNA ve srpRNA'nın mitokondri ile ilişkili olabileceğini gösteren, mitokondriyal transkriptomu açıklayan bir çalışmada ayrıntılı şekilde ele alınmıştır (Mercer vd, 2011). Bu çalışmada meme kanseri hücre hatlarında miRNA'ların yanısıra snRNA ve snoRNA'ların varlığını göstermekle birlikte ayrıca piRNA'ları da mitokondriyal fraksiyonlarda gösterildi. piRNA'lar genellikle germline hücrelerde eksprese olmalarına rağmen farklı somatik hücrelerde de piRNA'ların varlığı gösterilmeye başlanmıştır (Yan vd, 2011).

miRNA'ların mRNA degradasyonu ve translasyonu üzerindeki rolleri oldukça anlaşılmıştır. miRNA'ların gen regülasyonunda önemli rolleri olduğunun gösterilmesinin ardından; mitokondri, eksozomlar ve p cisimcikleri gibi subselüler bölümlerin de miRNA'lar ile ilişkileri ile ilgili araştırmalar (Leung, 2015) dikkat çekicidir. Mitokondrideki miRNA'ların varlığı, mitokondriyal genom tarafından kodlanmış

transkriptlerin regülasyonunda rolleri olduğunu göstermektedir. Mitokondride miR-181c'nin varlığı ve ventriküler kardiyak hücrelerinde mitokondriyal genom tarafından kodlanan transkriptlerde farklı olarak regüle edildiği gösterilmiştir (Das vd, 2014). Bu da mitokondriyal miRNA'ların hücre tipine özgü olabileceği ve intraselüler içerikler tarafından regüle edilebileceğini göstermektedir. Kardiyak-spesifik mitomiR'lerin keşfi, memeye spesifik olarak da tanımlanabilecek olası mitomiR'lerin varlığı ile ilgili bir ışık olmuştur ve rollerinin belirlenebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. miRNA'ların mitokondriyal transport mekanizmalarının da aydınlatılmasıyla hücrel hemostazın regülasyonunda miRNA'ların önemi de ortaya konulabilecektir.

Bu çalışmada; veri tabanında tanımlanmış miRNA'ların yanısıra, tanımlanmamış potansiyel miRNA dizilerinin analizi sonucu mitokondri genomunda 8293-8364 nolu bölge ile homoloji gösteren 1 adet dizi saptandı. Ayrıca 1., 2., 3., 5. ve 8. kromozomdan kodlanan, L-ORF, MT-TK (TRNK), ND5, ND4L gen bölgeleriyle homoloji sağlanan yeni novel miRNA dizileri de belirlendi. Bu da bize tanımlı miRNA'ların yanısıra novel miRNA dizilerinin de olası mitomiR'ler olabileceği ve meme kanseri ile ilişkilendirilebileceği hususunda bir öngörü sağladı. Bu miRNA'lar mitokondriyal genomdan ya da nüklear genomdan kodlanmış olabilirler. Daha ileri çalışmalarla potansiyel miRNA dizileri üzerine yoğunlaşılması ve yeni mitomiR'lerin tanımlanması önemli katkılar sağlayabilir.

6. SONUÇ

Meme kanseri hücrelerinde mitomiR'leri tanımlamayı amaçladığımız çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar; meme kanseri hücre dizisi örneklerinde hem mitokondriyal hem de nüklear genom ile homoloji gösteren miRNA'ların bulunması; mitomiR'lerin mitokondriyal genom tarafından da kodlanabileceği kanısını uyandırmaktadır. Bu miRNA'ların meme kanseri hücrelerinde fonksiyonunun araştırılması, meme kanseri progresyonu üzerine olası etkilerini belirleyebilmek açısından oldukça önemli olacaktır. Bu bakımdan, meme kanserinde mitokondriyal miRNA'lar ile ilgili çalışmamızdan elde edilen bulguların yeni araştırmalara önemli katkı sağlayacağı ve öncülük edeceği kanısındayız. Çalışmamızda;

1. Mitokondriyal genler ile homoloji gösteren 3 miRNA (hsa-miR-4484, hsa-miR-4485, hsa-miR,4461) belirlendi.
2. mitomiR'lerin önemli hücresel yollarla (GO ve KEGG) ilişkisi görüldü.
3. Mitokondri, miRBase'de tanımlı olan miRNA'ların yanısıra novel miRNA dizileri de varlığı saptandı.
4. Mitokondri genomu ile homoloji gösteren 10 novel miRNA dizisi gözlemlendi.
5. Mitokondride, miRNA'ların yanısıra piRNA, snRNA, snoRNA vb. diğer küçük RNA türleri de belirlendi.

Sonuç olarak; çalışmamızda, meme kanseri hücre dizisi mitokondriyal miRNA'ların ve diğer küçük RNA türlerinin varlığının belirlenmesi açısından önemli bulgulara ulaşıldı. Ayrıca, yola analizleriyle mitokondriyal ve nüklear kodlanan miRNA'ların mitokondri fonksiyonu üzerine etkileri bulunan önemli yollar ile ilişkili genleri hedef aldıklarının belirlenmesi ile sonrasında yapılabilecek ileri çalışmalar için ön veri sağlandı. İleriki çalışmalarda, tanımlı miRNA'ların yanısıra novel miRNA'ların potansiyel hedefleri belirlenerek ilişkilendirilebilecekleri yolların da analiz edilmesi ile literatüre önemli katkılar sağlanabilecektir. Mitokondride lokalize olan veya ilişkili olan miRNA'ların insan sağlığı ve hastalıklar üzerine etkilerinin ve biyolojik önemlerinin aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmalar tanı, tedavi ve klinik hedeflerin belirlenebilmesi açısından da büyük önem taşımaktadır.

7. KAYNAKLAR

Aral C, Özer A. Mitochondrial DNA and cancer. *Marmara Medical Journal* 2007; 20(2):127-136.

Akkaya ZY, Dinçer P. Tedavi yaklaşımlarında yeni bir dönem: kodlamayan RNA'lar ve hastalıklar. *Marmara Medical Journal* 2013; 26: 5-10.

Alfonzo JD, Soll D. Mitochondrial tRNA import—the challenge to understand has just begun. *Biol Chem* 2009; 390(8):717–722.

American Cancer Society Global Cancer Facts&Figures. Second Edition. *American Cancer Society* 2011;55-56.

Bakker MF, Peeters PH, Klaasen VM, Bueno-de-Mesquita HB, Jansen EH, Ros MM, Travier N, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Rinaldi S, Romieu I, Brennan P, Boutron-Ruault MC1, Perquier F1, Cadeau C1, Boeing H, Aleksandrova K, Kaaks R, Kühn T, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Vineis P, Krogh V, Panico S, Masala G, Tumino R, Weiderpass E, Skeie G, Lund E, Quirós JR, Ardanaz E, Navarro C, Amiano P, Sánchez MJ, Buckland G, Ericson U, Sonestedt E, Johansson M, Sund M, Travis RC, Key TJ, Khaw KT, Wareham N, Riboli E, van Gils CH. Plasma carotenoids, vitamin C, tocopherols, and retinol and the risk of breast cancer in the european prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *Am J Clin Nutr* 2016; 103:454-464.

Bandiera S, Ruberg S, Girard M, Cagnard N, Hanein S, Chretien D, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. Nuclear outsourcing of rna interference components to human mitochondria. *Plos One* 2011; 6(6):E20746.

Bandiera S., Matégot R., Girard M., Demongeot J., Henrion-Caude A. MitomiRs delineating the intracellular localization of microRNAs at mitochondria. *Free Radic. Biol. Med* 2013; 64:12–19.

Barrey E, Saint-Auret G, Bonnamy B, Damas D, Boyer O, Gidrol X. pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *Plos One* 2011; 6:E20220.

Baselga J, Gomez P, Awada A. The addition of cetuximab to cisplatin increases overall response rate (ORR) and progression-free survival (PFS) in metastatic triple-negative breast cancer (TNBC): results of a randomized phase II study (BALI-1). *Ann Oncol* 2010; 21

Baselga J, Roche H, Costa F, Segalla Gm, Pinczowski H, Ciruelos EM, Filho SC, Gómez P, Eylli BV. SOLTI-0701: a multinational double-blind, randomized phase 2b

study evaluating the efficacy and safety of sorafenib compared to placebo when administered in combination with capecitabine in patients with locally advanced or metastatic breast cancer (BC). **Cancer Res** 2009; 69:497s.

Beral V, Reeves G, Bull D, Green J. Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. **J Natl Cancer Inst** 2011; 103: 296-305.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature** 2001; 409:363–366.

Bertram JS. The molecular biology of the cancer. **Mol Aspects Med** 2000; 21(6):167-223.

Bian Z, Li LM, Tang R, Hou DX, Chen X, Zhang CY, Zen K. Identification of mouse liver mitochondria-associated miRNAs and their potential biological functions. **Cell Res** 2010; 20(9):1076–1078.

Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Rev Clin Oncol** 2016; 13:674-690.

Bienvovota-Vasku J, Sana J, Slaby O. The role of miRNAs in mitochondria in cancer. **Cancer Letters** 2013; 336:1-7.

Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, Rugo H, Sledge G, Koehler M, et al. Randomized study of lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. **J Clin Oncol**. 2010; 28:1124–1130.

Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, Heikkilä P, Heikkinen T, Nevanlinna H, Akslen LA, Bégin LR, Foulkes WD, Couch FJ, Wang X, Cafourek V, Olson JE, Baglietto L, Giles GG, Severi G, McLean CA, Southey MC, Rakha E, Green AR, Ellis IO, Sherman ME, Lissowska J, Anderson WF, Cox A, Cross SS, Reed MW, Provenzano E, Dawson SJ, Dunning AM, Humphreys M, Easton DF, García-Closas M, Caldas C, Pharoah PD, Huntsman D. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **Plos Med** 2010; 7: E1000279.

Boore JL. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Res** 1999; 27(8):1767-1780.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nat. Struct. Mol. Biol** 2006; 13:1097–1101.

Borrhalho PM, Rodrigues CMP, Clifford JS. *MicroRNA: Basic Science, Advances In Experimental Medicine And Biology*. Eds: Santulli G. **Springer International Publishing** Switzerland 2015, 887.

Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, Jong RA, Hislop G, Chiarelli A, Minkin S, Yaffe MJ. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. **N Engl J Med** 2007; 356:227-236.

Brüner-Kubath C, Shabbir W, Saferding V, Wagner R, Singer CF, Valent P, Berger W, Marian B, Zielinski CC, Grusch M, Grunt TW. The PI3 Kinase/mTOR blocker NVP-BE235 overrides resistance against irreversible ErBB inhibitors in breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 129:387-400.

Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest ARR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. **Science** 2005; 309: 1559 – 1563.

Cao Y, Hou L, Wang W. Dietary total fat and fatty acids intake, serum fatty acids and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. **Int J Cancer** 2016; 138:1894-1904.

Carden T, Singh B, Mooga V, Bajpai P, Singh KK. Epigenetic modification of miR-663 controls mitochondria-to-nucleus retrograde signaling and tumor progression. **J Biol Chem** 2017;292(50):20694-20706.

Chintha R, Kaipa PR, Sekhar N, Hasan Q. Mitochondria and tumors: a new perspective. **Indian J Cancer** 2013; 50(3):206-213.

Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. **Oncogene** 2006; 25(34):4663-4674.

Cheang MC, Martin M, Nielsen TO, Prat A, Voduc D, Rodriguez-Lescure A, Ruiz A, Chia S, Shepherd L, Ruiz-Borrego M, Calvo L, Alba E, Carrasco E, Caballero R, Tu D, Pritchard KI, Levine MN, Bramwell VH, Parker J, Bernard PS, Ellis MJ, Perou CM, Di Leo A, Carey LA. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. **Oncologist** 2015; 20:474-482.

Chen B, Li H, Zeng X, Yang P, Liu X, Zhao X, Liang S. Roles of miRNA on cancer cell metabolism. **J Transl Med** 2012; 10:228.

Chen M, Rao Y, Zheng Y, Wei S, Li Y, Guo T, Yin P. Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: A meta-analysis of epidemiological studies. **Plos One** 2014; 9: E89288.

Chen Y, Alvarez EA, Azzam D, Wander SA, Guggisberg N, Jordà M, Hennesy BT, Slingerland JM. Combined SRC And ER blockade impairs human breast cancer proliferation *in Vitro* and *in Vivo*. **Breast Cancer Res Treat.** 2011; 128:69-78.

Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL, Cauley JA, Aragaki AK, Stefanick ML, Lane DS, Johnson KC, Wactawski-Wende J, Chen C, Qi L, Yasmeen S, Newcomb PA, Prentice RL. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the women's health initiative observational study. **J Natl Cancer Inst** 2013; 105:526-535.

Chollet P, Abrial C, Tacca O, Mouret-Reynier MA, Leheurteur M, Durando X, Curé H. Mammalian target of Rapamycin inhibitors in combination with Letrozole in breast cancer. **Clin Breast Cancer** 2006; 7:336–338.

Coene ED, Hollinshead MS, Waeytens AA, Schelfhout VR, Eechaute WP, Shaw MK, Van Oostveldt PM, Vaux DJ. Phosphorylated BRCA1 is predominantly located in the nucleus and mitochondria. **Mol Biol Cell** 2005; 16(2):997-1010.

Collaborative Group On Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. **Lancet** 2001; 358:1389-1399.

Cortes J, Specht J, Gradishar W, Strauss L, Rybichi A, Wu X, Vahdat L, Paz-Ares L, Somlo G. Dasatinib plus capecitabine for advanced breast cancer: safety and efficacy data from phase 1 study Ca180-004. **Cancer Res** 2009;69:676s-7.

Cristofanilli M1, Valero V, Mangalik A, Royce M, Rabinowitz I, Arena FP, Kroener JF, Curcio E, Watkins C, Bacus S, Cora EM, Anderson E, Magill PJ. Phase II, randomized trial to compare anastrozole combined with gefitinib or placebo in postmenopausal women with hormone receptor-positive metastatic breast cancer. **Clin Cancer Res** 2010; 16:1904-1914.

Çelik AD, Koşar AP, Özçelik N. mikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. **S.D.Ü. Tıp Fak. Derg** 2013; 20(3):121-127.

Das S, Bedja D, Campbell N, Dunkerly B, Chenna V, Maitra A, Steenbergen C. miR-181c regulates the mitochondrial genome, bioenergetics, and propensity for heart failure *in vivo*. **Plos One** 2014; 9(5): E96820.

Debniak T, Scott RJ, Huzarski T, Byrski T, Masojć B, van de Wetering T, Serrano-Fernandez P, Górski B, Cybulski C, Gronwald J, Debniak B, Maleszka R, Kładny J, Bieniek A, Nagay L, Haus O, Grzybowska E, Wandzel P, Niepsuj S, Narod SA, Lubinski J. XPD common variants and their association with melanoma and breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat.** 2006; 98:209-215.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. **Nature** 2004; 432:231-235.

Dhar SK, St Clair DK. Nucleophosmin blocks mitochondrial localization of p53 and apoptosis. **J. Biol. Chem.** 2009; 284:16409- 16418.

Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. **Oncologist.** 2014; 19:805-813.

Dimauro S. A history of mitochondrial diseases. **J. Inherit. Metab. Dis.** 2011; 34:261-276.

Dossus L, Boutron-Ruault MC, Kaaks R, Gram IT, Vilier A, Fervers B, Manjer J, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Chang-Claude J, Boeing H, Steffen A, Trichopoulou A, Lagiou P, Sarantopoulou M, Palli D, Berrino F, Tumino R, Vineis P, Mattiello A, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Bakker MF, Peeters PH, Weiderpass E, Bjerkaas E, Braaten T, Menéndez V, Agudo A, Sanchez MJ, Amiano P, Tormo MJ, Barricarte A, Butt S, Khaw KT, Wareham N, Key TJ, Travis RC, Rinaldi S, McCormack V, Romieu I, Cox DG, Norat T, Riboli E, Clavel-Chapelon F. Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: Results from the epic cohort. **Int J Cancer** 2014; 134:1871-1888.

Duarte FV, Palmeira CM, Rolo AP. The role of microRNAs in mitochondria: Small players acting wide. **Genes** 2014; 5:865-886.

Duarte FV, Palmeira CM, Rolo AP. The emerging role of mitomiRs in the pathophysiology of human disease. **Adv Exp Med Biol** 2015; 888:123-54.

Dudek J, Rehling P, Van Der Laan M. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833(2):274-285.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FG, Trotti A. AJCC Cancer Staging Manual. New York: **Springer** 2010.

Elgaili ME, Abuidris DO, Rahman M, Michalek AM, Mohammed SI. Breast cancer burden in central Sudan. *Int J Womens Health* 2010; 9(2):77-82.

Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *Jama* 2006; 296:193-201.

Eliassen AH, Liao X, Rosner B, Tamimi RM, Tworoger SS, Hankinson SE. Plasma carotenoids and risk of breast cancer over 20 y of follow-up. *Am J Clin Nutr* 2015; 101:1197-1205.

Emaus MJ, Peeters PH, Bakker MF, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Romieu I, Ferrari P, Dossus L, Boutron-Ruault MC, Baglietto L, Fortner RT, Kaaks R, Boeing H, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Masala G, Pala V, Panico S, Tumino R, Polidoro S, Skeie G, Lund E, Weiderpass E, Quirós JR, Travier N, Sánchez MJ22, Chirlaque MD, Ardanaz E, Dorronsoro M, Winkvist A, Wennberg M, Bueno-de-Mesquita HB, Khaw KT, Travis RC, Key TJ, Aune D, Gunter M, Riboli E, van Gils CH. Vegetable and fruit consumption and the risk of hormone receptor-defined breast cancer in the epic cohort. *Am J Clin Nutr* 2016; 103:168-177.

Emaus MJ, van Gils CH, Bakker MF, Bisschop CN, Monninkhof EM, Bueno-de-Mesquita HB, Travier N, Berentzen TL, Overvad K, Tjønneland A, Romieu I, Rinaldi S, Chajes V, Gunter MJ, Clavel-Chapelon F, Fagherazzi G, Mesrine S, Chang-Claude J, Kaaks R, Boeing H, Aleksandrova K, Trichopoulou A, Naska A, Orfanos P, Palli D, Agnoli C, Tumino R, Vineis P, Mattiello A, Braaten T, Borch KB, Lund E, Menéndez V, Sánchez MJ, Navarro C, Barricarte A, Amiano P, Sund M, Andersson A, Borgquist S, Olsson A, Khaw KT, Wareham N, Travis RC, Riboli E, Peeters PH, May AM. Weight change in middle adulthood and breast cancer risk in the epic-panacea study. *Int J Cancer* 2014; 135:2887-2899.

Entelis NS, Kolesnikova OA, Martin RP, Tarassov IA. RNA delivery into mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 49(1-2):199-215.

Erlichman C, Adjei AA, Alberts SR, Sloan JA, Goldberg RM, Pitot HC, Rubin J, Atherton PJ, Klee GG, Humphrey R. Phase I study of the matrix metalloproteinase inhibitor, BAY 12-9566. *Ann Oncol* 2001; 12:389-395.

Farvid MS, Chen WY, Michels KB, Cho E, Willett WC, Eliassen AH. Fruit and vegetable consumption in adolescence and early adulthood and risk of breast cancer: population based cohort study. *Bmj* 2016; 353: i2343.

Fernández-Vizarra E, López-Pérez MJ, Enriquez JA. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* 2002; 26(4):292-297.

Finn RS, Bengala C, Ibrahim N, Strauss LC, Fairchild J, Sy O, Roche E, Sparano J, Goldstein LJ. Phase II trial of dasatinib in triple-negative breast cancer: results of study Ca 180059. *Cancer Res* 2009; 69:237s.

Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. **J Biol Chem** 2009; 284:12297-305.

Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Diver WR, Hannan LM, Thun MJ. Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. **J Natl Cancer Inst** 2013; 105:515-525.

Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, Weaver DL, Winchester DJ, Hortobagyi GN. Breast cancer— major changes in the american joint committee on cancer eighth edition cancer staging manual. **Ca Cancer J Clin**. 2017; 67:290-303.

Green MD, Francis PA, GebSKI V, Harvey V, Karapetis C, Chan A, Snyder R, Fong A, Basser R, Forbes JF, Gefitinib treatment in hormone-resistant and hormone receptor-negative advanced breast cancer. **Ann Oncol** 2009; 20(11):1813-1817.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature** 2004; 432:235–240.

Greil R, Moik M, Reitsamer R, Ressler S, Stoll M, Namberger K, Menzel C, Mlineritsch B. Neoadjuvant Bevacizumab, Docetaxel and Capecitabine combination therapy for Her2/Neu-Negative invasive breast cancer: efficacy and safety in a phase II pilot study. **Eur J Surg Oncol** 2009; 35: 1048–1054.

Gunter MJ, Wang T, Cushman M, Xue X, Wassertheil-Smoller S, Strickler HD, Rohan TE, Manson JE, McTiernan A, Kaplan RC, Scherer PE, Chlebowski RT, Snetselaar L, Wang D, Ho GY. Circulating adipokines and inflammatory markers and postmenopausal breast cancer risk. **J Natl Cancer Inst** 2015; 107(9): djv169

Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. **Development** 2011; 138(1):9-22.

Haque R, Ahmed SA, Inzhakova G, Shi J, Avila C, Polikoff J, Bernstein L, Enger SM, Press MF. Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2012; 21:1848-1855.

Hebbard L, Cecena G, Golas J, Sawada J, Ellies LG, Charbono A, Williams R, Jimenez RE, Wankell M, Arndt KT, DeJoy SQ, Rollins RA, Diesl V, Follettie M, Chen L, Rosfjord E, Cardiff RD, Komatsu M, Boschelli F, Oshima RG. Control of mammary tumor differentiation by SKI-606 (Bosutinib) **Oncogene** 2011; 30:301–312.

Hornig-Do HT, Günther G, Bust M, Lehnartz P, Bosio A, Wiesner RJ. Isolation of functional pure mitochondria by superparamagnetic microbeads. **Anal Biochem** 2009; 389(1):1-5.

Huang SY, Lu W, Ge D, Meng N, Li Y, Su L, Zhang SL, Zhang Y, Zhao BX, Miao JY. A new microRNA signal pathway regulated by long noncoding RNA TGFB2-OT1 in autophagy and inflammation of vascular endothelial cells. **Autophagy** 2015; 11(12): 2172–2183.

Imanishi H, Hattori K, Wada R, Ishikawa K, Fukuda S, Takenaga K, Nakada K, Hayashi JI. Mitochondrial DNA mutations regulate metastasis of human breast cancer cells. **Plos One** 2011; 6(8):E23401.

Ishida T, Kiba T, Takeda M, Matsuyama K, Teramukai S, Ishiwata R, Masuda N, Takatsuka Y, Noguchi S, Ishioka C, Fukushima M, Ohuchi N. Phase II study of capecitabine and trastuzumab combination chemotherapy in patients with Her2 overexpressing metastatic breast cancers resistant to both anthracyclines and taxanes. **Cancer Chemother Pharmacol** 2009; 64:361–369.

Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. **Science** 2008; 320(5876):661-664.

Jayasekara H, MacInnis RJ, Hodge AM, Room R, Milne RL, Hopper JL, Giles GG, English DR. Is breast cancer risk associated with alcohol intake before first full-term pregnancy? **Cancer Causes Control**. 2016; 27: 1167-1174.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. **Ca Cancer J Clin** 2007; 57:43-66.

Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-Time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. **Nucleic Acids Res**. 2005; 33(17):5394–5403.

Johnston Sr, Hickish T, Ellis P, Houston S, Kelland L, Dowsett M, Salter J, Michielis B, Perez-Ruixo JJ, Palmer P, Howes A. Phase II study of the efficacy and tolerability of two dosing regimens of the farnesyl transferase inhibitor, R115777, in advanced breast cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21:2492–2499.

Jung S, Spiegelman D, Baglietto L, Bernstein L, Boggs DA, van den Brandt PA, Buring JE, Cerhan JR, Gaudet MM, Giles GG, Goodman G, Hakansson N, Hankinson SE, Helzlsouer K, Horn-Ross PL, Inoue M, Krogh V, Lof M, McCullough ML, Miller AB, Neuhauser ML, Palmer JR, Park Y, Robien K, Rohan TE, Scarmo S, Schairer C, Schouten LJ, Shikany JM, Sieri S, Tsugane S, Visvanathan K, Weiderpass E, Willett WC, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Zhang SM, Zhang X, Ziegler RG, Smith-Warner SA. Fruit and vegetable intake and risk of breast cancer by hormone receptor status. **J Natl Cancer Inst** 2013; 105:219-236.

Jung S, Wang M, Anderson K, Baglietto L, Bergkvist L, Bernstein L, van den Brandt PA, Brinton L, Buring JE, Eliassen AH, Falk R, Gapstur SM, Giles GG, Goodman G, Hoffman-Bolton J, Horn-Ross PL, Inoue M, Kolonel LN, Krogh V, Lof M, Maas P, Miller AB, Neuhauser ML, Park Y, Robien K, Rohan TE, Scarmo S, Schouten LJ, Sieri S, Stevens VL, Tsugane S, Visvanathan K, Wilkens LR, Wolk A, Weiderpass E, Willett WC, Zeleniuch-Jacquotte A, Zhang SM, Zhang X, Ziegler RG, Smith-Warner SA. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies. **Int J Epidemiol** 2016; 45: 916-928.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, Waldman FM. Detection and mapping of amplified dna sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. **Proc Natl Acad Sci** 1994; 91:2156-2160.

Keum N, Greenwood DC, Lee DH, Kim R, Aune D, Ju W, Hu FB, Giovannucci EL. Adult Weight Gain And Adiposity-Related Cancers: A Dose-Response Meta-Analysis Of Prospective Observational Studies. **J Natl Cancer Inst** 2015; 107(2)

Kim HH, Kim T, Kim E, Park JK, Park SJ, Joo H, Kim HJ. The Mitochondrial Warburg Effect: A Cancer Enigma. **Interdisciplinary Bio Central**. Review 2009; 1(2):7.1-7.7

Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2009; 10:126–139.

Kim S, Koh H. Role of FOXO transcription factors in crosstalk between mitochondria and the nucleus. **J Bioenerg Biomembr.** 2017; 49(4):335-341.

Kok KH, Ng MH, Ching YP, Jin DY. Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. **J. Biol. Chem** 2007; 282:17649–17657.

Kreipe H, Feist H, Fischer L, Felgner J, Heidorn K, Mettler L, Parwaresch R. Amplification of c-Myc but not of C-ErbB-2 is associated with high proliferative capacity in breast cancer. **Cancer Res** 1993; 53:1956-1961.

Kren BT, Wong PY, Sarver A, Zhang X, Zeng Y, Steer CJ. MicroRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. **RNA Biol** 2009;6:65–72.

Kushnareva Y, Newmeyer DD. Bioenergetics and cell death. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 2010; 1201:50–57.

Kwiecien S, Jasnos K, Magierowski M, Sliwowski Z, Pajdo R, Brzozowski B, Mach T, Wojcik D, Brzozowski T. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. **J Physiol Pharmacol** 2014; 65(5):613-622.

Küçük hüseyin Ö, Öztürk O. miRNA'lar ve meme kanserindeki etkileri. **Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi** 2013; 3(5):13-24.

La Vecchia C, Giordano SH, Hortobagyi GN, Chabner B. Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. **Oncologist** 2011; 16:726-729.

Latronico MV, Condorelli G. The might of miRNA in mitochondria. **Circ. Res** 2012; 110:1540-1542.

Lee Y, Jeon K, Lee Jt, Kim S, Kim VN. microRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. **Embo J** 2002; 21:4663–4670.

Lee HC, Wei YH. Mitochondrial DNA instability and metabolic shift in human cancers. **Int. J. Mol. Sci** 2009; 10:674–701.

Leung AKL. The Whereabouts of miRNA Actions: Cytoplasm and Beyond. **Trends Cell Biol** 2015; 25(10): 601–610.

Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, Martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during risc assembly in human cells. **Embo Rep** 2006; 7:314–320.

Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC, Pang Q. Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. **J. Biol. Chem** 2004; 279:41275–41279.

Li P, Jiao J, Gao G et al: Control of mitochondrial activity by miRNAs. **Journal Of Cellular Biochemistry** 2012; 113:1104-1110.

Li Q, Zhang L, Wan H, Liu M, Li X, Tang H. CREB1-driven expression of miR-320a promotes mitophagy by down-regulating VDAC1 expression during serum starvation in cervical cancer cells. **Oncotarget** 2015; 6(33):34924-34940.

Liang H, Tan AR. Iniparib A Parp1 inhibitor for the potential treatment of cancer, including triple-negative breast cancer. **IDrugs** 2010; 13:646-656.

Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. **Proc. Natl Acad Sci** 2004; 101:9740-9744.

Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. **Women's Health** 2015; 11:65-77.

Lorusso P, Krishnamurthi S, Rinehart JR, Nabell L, Croghan G, Verterasian M, Sadis SS, Menon SS, Leopold J, Meyer MB. A Phase 1-2 clinical study of a second generation oral MEK inhibitor, PD 0325901 in patients with advanced cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23: 3011.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science** 2004; 303:95-98.

Ly M, Antoine M, André F, Callard P, Bernaudin JF, Diallo DA. Breast cancer in sub-saharan african women. **Bull Cancer** 2011; 98(7):798-805.

Macacu A, Autier P, Boniol M, Boyle P. Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat.** 2015; 154:213-224.

Manson JE, Chlebowski RT, Stefanick ML, Aragaki AK, Rossouw JE, Prentice RL, Anderson G, Howard BV, Thomson CA, LaCroix AZ, Wactawski-Wende J, Jackson RD, Limacher M, Margolis KL, Wassertheil-Smoller S, Beresford SA, Cauley JA, Eaton CB, Gass M, Hsia J, Johnson KC, Kooperberg C, Kuller LH, Lewis CE, Liu S, Martin LW, Ockene JK, O'Sullivan MJ, Powell LH, Simon MS, Van Horn L, Vitolins MZ, Wallace RB. Menopausal hormone therapy and health outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the women's health initiative randomized trials. **Jama** 2013; 310:1353-1368.

Marchi S, Lupini L, Patergnani S, Rimessi A, Missiroli S, Bonora M, Bononi A, Corrà F, Giorgi C, De Marchi E, Poletti F, Gafà R, Lanza G, Negrini M, Rizzuto R, Pinton P. Downregulation of the Mitochondrial Calcium Uniporter by Cancer-Related miR-25. **Curr Biol** 2013; 23(1): 58-63.

Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell** 2002; 110:563-574.

Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: Lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2007; 8:209-220.

Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into ago2-containing RNAi enzyme complexes. **Cell** 2005; 123: 607-620.

Mercer TR, Neph S, Dinger ME, Crawford J, Smith MA, Shearwood AM, Haugen E, Bracken CP, Rackham O, Stamatoyannopoulos JA, Filipovska A, Mattick JS. The human mitochondrial transcriptome. *Cell* 2011; 146 (4):645–658.

Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 2005; 121:1059-1069.

Michalaki V, Fotiou S, Gennatas S, Gennatas C. Trastuzumab plus capecitabine and docetaxel as first-line therapy for Her2-positive metastatic breast cancer: Phase II results. *Anticancer Res* 2010; 30:3051–3054.

Michel S, Wanet A, De Pauw A, Rommelaere G, Arnould T, Renard P. Crosstalk between mitochondrial (dys)function and mitochondrial abundance. *J. Cell. Physiol* 2012; 227:2297–2310.

Miles DW, Chan A, Dirix LY, Cortés J, Pivot X, Tomczak P, Delozier T, Sohn JH, Provencher L, Puglisi F, Harbeck N, Steger GG, Schneeweiss A, Wardley AM, Chlistalla A, Romieu G. Phase III study of Bevacizumab plus Docetaxel compared with placebo plus Docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:3239–3247.

Modica-Napolitano JS, Kulawiec M, Singh KK. Mitochondria and human cancer. *Curr Mol Med* 2007; 7(1):121-131.

Moldovan L, Moldovan NI. “Oxygen free radicals and redox biology of organelles,” *Histochemistry and Cell Biology* 2004; 122(4):395–412.

Moreno-Aspitia A, Morton RF, Hillman DW, Lingle WL, Rowland KM Jr, Wiesenfeld M, Flynn PJ, Fitch TR, Perez EA. Phase II trial of sorafenib in patients with metastatic breast cancer previously exposed to anthracyclines or taxanes: north central cancer treatment group and mayo clinic trial N0336. *J Clin Oncol* 2009; 27:11–15.

Morita M, Gravel SP, Chénard V, Sikström K, Zheng L, Alain T, Gandin V, Avizonis D, Arguello M, Zakaria C, McLaughlan S, Nouet Y, Pause A, Pollak M, Gottlieb E, Larsson O, St-Pierre J, Topisirovic I, Sonenberg N. mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab* 2013; 18:698-711.

Moskowitz CS, Chou JF, Wolden SL, Bernstein JL, Malhotra J, Friedman DN, Mubdi NZ, Leisenring WM, Stovall M, Hammond S, Smith SA, Henderson TO, Boice JD, Hudson MM, Diller LR, Bhatia S, Kenney LB, Neglia JP, Begg CB, Robison LL, Oeffinger KC. Breast cancer after chest radiation therapy for childhood cancer. *J Clin Oncol* 2014; 32:2217-2223.

Muleris M, Almeida A, Gerbault-Seureau M, Malfroy B, Dutrillaux B. Detection of DNA amplification in 17 primary breast carcinomas with homogeneously staining regions by a modified comparative genomic hybridization technique. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10:160-170.

Nagaraj R, Gururaja-Rao S, Jones KT, Slattery M, Negre N, Braas D, Christofk H, White KP, Mann R, Banerjee U. Control of mitochondrial structure and function by the Yorkie/YAP oncogenic pathway. *Genes Dev* 2012; 26(18):2027-2037.

Niu H, Wang K, Zhang A, Yang S, Song Z, Wang W, Qian C, Li X, Zhu Y, Wang Y. miR-92a is a critical regulator of the apoptosis pathway in glioblastoma with inverse expression of BCL2L1. **Oncol Rep** 2012; 28(5):1771-1777.

Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. **Cell** 2001; 107:309–321.

Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in *Drosophila*. **Nature** 2012; 490(7421):547-551.

Palmeira, CM, Rolo AP, Berthiaume J, Bjork JA, Wallace KB. Hyperglycemia decreases mitochondrial function: the regulatory role of mitochondrial biogenesis. **Toxicol. Appl. Pharmacol** 2007; 225:214–220.

Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. **Dev Cell**. 2010; 19(4):491-505

Peralta S, Wang X, Moraes CT. Mitochondrial transcription: lessons from mouse models. **Bba-Gene Regul. Mech** 2012; 1819: 961–969.

Perou CM, Borresen-Dale AL. Systems biology and genomics of breast cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2011; 3(2): A003293.

Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Friedman ER, Singerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: mechanistic insights and strategies for intervention. **Ca Cancer J Clin** 2017; 67(5):378-397.

Plak K, Czarnecka AM, Krawczyk T, Golik P, Bartnik E. Breast Cancer As A Mitochondrial Disorder. **Oncol Rep** 2009; 21(4):845-851.

Prajapati P, Sripada L, Singh K, Bhatelia K, Singh R, Singh R. TNF- α regulates miRNA targeting mitochondrial complex-I and induces cell death in dopaminergic cells. **Biochim Biophys Acta**. 2015; 1852(3):451-461.

Preston DI, Mattsson A, Holmberg E, Shore R, Hildreth NG, Boice JD, Jr. Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts. **Radiat Res** 2002;158: 220-235.

Puranam RS, Attardi G. The RNase P associated with Hela cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. **Mol Cell Biol** 2001; 21(2):548–561.

Raimundo N, Song L, Shutt TE, McKay SE, Cotney J, Guan MX, Gilliland TC, Hohuan D, Santos-Sacchi J, Shadel GS. Mitochondrial stress engages E2F1 apoptotic signaling to cause deafness. **Cell** 2012; 148:716 – 726.

Reza AMMT, Choi YJ, Yasuda HJ, Kim JH. Human adipose mesenchymal stem cell-derived exosomal-miRNAs are critical factors for inducing anti-proliferation signalling to A2780 and SKOV-3 ovarian cancer cells. **Sci Rep** 2016; 6: 38498.

Reza AMMT, Choi YJ, Yuan YG, Das J, Yasuda HJ, Kim JH. MicroRNA-7641 is a regulator of ribosomal proteins and a promising targeting factor to improve the efficacy of cancer therapy. **Sci Rep** 2017; 7: 8365.

Richter-Dennerlein R, Dennerlein S, Rehling P. Integrating mitochondrial translation into the cellular context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16:586 – 592.

Rippo MR, Olivieri F, Monsurrò V, Prattichizzo F, Albertini MC, Procopio AD. MitomiRs in human inflamm-aging: a hypothesis involving miR-181a, miR-34a and miR-146a. *Exp Gerontol*. 2014; 56:154-63.

Rolo, AP, Palmeira, CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 2006; 212:167–178.

Rowe DL, Ozbay T, Bender LM, Nahta R. Nordihydroguaiaretic Acid, A Cytotoxic Insulin-Like Growth Factor-I Receptor/Her2 Inhibitor In Trastuzumab-Resistant Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 2008; 7:1900–1908.

Rowinsky Ek, Youssoufian H, Tonra JR, Solomon P, Burtrum D, Ludwig DL. IMC-A12, A Human IGG1 monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor. *Clin Cancer Res* 2007;13:5549s–55.

Scaltriti M, Chandarlapaty S, Prudkin L, Aura C, Jimenez J, Angelini PD, Sánchez G, Guzman M, Parra JL, Ellis C, Gagnon R, Koehler M, Gomez H, Geyer C, Cameron D, Arribas J, Rosen N, Baselga J. Clinical benefit of lapatinib-based therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast tumors coexpressing the truncated p95Her2 receptor. *Clin Cancer Res*. 2010; 16:2688–2695.

Schaapveld M, Aleman BM, van Eggermond AM, Janus CP, Krol AD, van der Maazen RW, Roesink J, Raemaekers JM, de Boer JP, Zijlstra JM, van Imhoff GW, Petersen EJ, Poortmans PM, Beijert M, Lybeert ML, Mulder I, Visser O, Louwman MW, Krul IM, Lugtenburg PJ, van Leeuwen FE. Second cancer risk up to 40 years after treatment for hodgkin's lymphoma. *Nejm* 2015; 373:2499-2511.

Schilling G, Bruweleit M, Harbeck N, Thomssen C, Becker K, Hoffmann R, Villena C, Schütte M, Hossfeld DK, Bokemeyer C, de Wit M. Phase II trial of vinorelbine and trastuzumab in patients with Her2-positive metastatic breast cancer. A prospective, open label, non-controlled, multicenter phase II trial (to investigate efficacy and safety of this combination chemotherapy). *Invest New Drugs* 2009; 27:166–172.

Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:655 – 667.

Schneider A. Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation. *Annual Review of Biochemistry* 2011; 80:1033–1053.

Shen J, Ambrosone CB, Zhao H. Novel genetic variants in microRNA genes and familial breast cancer. *Int J Cancer* 2009; 1;124(5):1178-1182.

Sing A, Tsatskis Y, Fabian L, Hester I, Rosenfeld R, Serricchio M, Yau N, Bietenhader M, Shanbhag R, Jurisicova A, Brill JA, McQuibban GA, McNeill H. The atypical cadherin fat directly regulates mitochondrial function and metabolic state. *Cel*. 2014; 158(6):1293-1308.

Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *Jama*. 2001; 286:2143-2151.

Siskind LJ, Colombini M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. *J. Biol. Chem* 2000; 275:38640-38644.

Siskind LJ. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembranes*, 2005; 37:143-153.

Smirnov A, Entelis N, Martin RP, Tarassov I. Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein Mrp-L18. *Genes & Development* 2011; 25, 1289–1305.

Sparano JAb, Moulder S, Kazi A, Coppola D, Negassa A, Vahdat L, Li T, Pellegrino C, Fineberg S, Munster P, Malafa M, Lee D, Hoschander S, Hopkins U, Hershman D, Wright JJ, Kleer C, Merajver S, Sebti SM. Phase II trial of tipifarnib plus neoadjuvant doxorubicin-cyclophosphamide in patients with clinical stage IIb-IIIc breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15:2942–2948.

Sripada L, Tomar D, Singh R. Mitochondria: one of the destinations of miRNAs. *Mitochondrion* 2012; 12:593-599.

Sripada L, Tomar D, Prajapati P, Singh R, Singh AK. Systematic analysis of small RNAs associated with human mitochondria by deep sequencing: detailed analysis of mitochondrial associated miRNA. *Plos One* 2012; 7(9):E44873.

Tamimi RM, Colditz GA, Hazra A, Baer HJ, Hankinson SE, Rosner B, Marotti J, Connolly JL, Schnitt SJ, Collins LC. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 131:159-167.

Tamaddon G, Geramizadeh B, Karimi MH, Mowla SJ, Abroun S. miR-4284 and miR-4484 as Putative Biomarkers for Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Iran J Med Sci* 2016; 41(4): 334–339.

Teras LR, Goodman M, Patel AV, Diver WR, Flanders WD, Feigelson HS. Weight loss and postmenopausal breast cancer in a prospective cohort of overweight and obese us women. *Cancer Causes Control* 2011; 22:573-579.

Tochhawng L, Deng S, Pervaiz S, Yap CT. Redox regulation of cancer cell migration and invasion. *Mitochondrion*, 2013; 13(3):246–253.

Tomasetti M, Neuzil J, Dong L. microRNAs as regulators of mitochondrial function: Role in cancer suppression. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840(4):1441–1453.

Travis LB, Hill DA, Dores GM, Gospodarowicz M, van Leeuwen FE, Holowaty E, Glimelius B, Andersson M, Wiklund T, Lynch CF, Van't Veer MB, Glimelius I, Storm H, Pukkala E, Stovall M, Curtis R, Boice JD Jr, Gilbert E. Breast cancer following radiotherapy and chemotherapy among young women with hodgkin disease. *Jama* 2003; 290:465-475.

Valachis A, Polyzos NP, Patsopoulos NA, Georgoulas V, Mavroudis D, Mauri D. Bevacizumab in metastatic breast cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 122:1–7.

Valero V, Forbes J, Pegram MD, Pienkowski T, Eiermann W, von Minckwitz G, Roche H, Martin M, Crown J, Mackey JR, Fumoleau P, Rolski J, Mrcic-Krmpotic Z, Jagiello-Gruszfeld A, Riva A, Buyse M, Taupin H, Sauter G, Press MF, Slamon DJ. Multicenter phase III randomized trial comparing docetaxel and trastuzumab with docetaxel, carboplatin, and trastuzumab as first-line chemotherapy for patients with her2-gene-

amplified metastatic breast cancer (BCIRG 007 study): Two highly active therapeutic regimens. **J Clin Oncol** 2011; 29:149–156.

Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, Roach KC, Mandell J, Lee MK, Ciernikova S, Foretova L, Soucek P, King MC. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cancer. **Jama** 2006; 295:1379-1388.

Wang Y, Gapstur SM, Gaudet MM, Furtado JD, Campos H, Mccullough ML. Plasma carotenoids and breast cancer risk in the cancer prevention study II nutrition cohort. **Cancer Causes Control** 2015; 26(9):1233-1244.

Wang WX. Role of mitochondria in regulating microRNA activity and its relevance to the central nervous system. **Neural Regen Res**. 2015; 10(7):1026–1028.

Wang X, Song C, Zhou X, Han X, Li J, Wang Z, Shang H, Liu Y, Cao, H. Mitochondria Associated MicroRNA Expression Profiling of Heart Failure. **BioMed Research International**, 2017; 4042509.

Watt KL, Harvey KF, Gregorevic P. Regulation of tissue growth by the mammalian hippo signaling pathway. **Frontiers in Physiology** 2017; 8:942.

Web_1 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin Dm, Forman D, Bray, F. Globocan 2012 V1.0, Cancer Incidence And Mortality Worldwide: Iarc Cancerbase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency For Research On Cancer; 2013. Erişim Adresi: <http://globocan.iarc.fr>, (Son güncelleme tarihi : 2018, Erişim Tarihi:16.01.2018).

Web_2 Türkiye Kanser İstatistikleri, 2014. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü İnternet sitesi <http://kanser.gov.tr/index.php/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi/2107-2014-yılı-türkiye-kanser-istatistikleri> (Erişim Tarihi:16.01.2018)

Web_3 Ganfyd internet sitesi http://www.ganfyd.org/index.php?title=File:Human_Mitochondrial_DNA_en.svg (Son güncelleme tarihi : 17 Aralık 2017, Erişim Tarihi:16.01.2018)

Weigl S, Paradiso A, Tommasi S. Mitochondria and familial predisposition to breast cancer. **Current Genomics** 2013; 14:195-203.

White AJ, D’aloesio AA, Nichols HB, Deroo LA, Sandler DP. Breast cancer and exposure to tobacco smoke during potential windows of susceptibility. **Cancer Causes Control** 2017; 28:667-675.

Wideroff L, Vadaparampil ST, Greene MH, Taplin S, Olson L, Freedman A. Hereditary breast/ovarian and colorectal cancer genetics knowledge in a national sample of US physicians. **J Med Genet** 2005; 42:749-755.

Woischnik M, Moraes CT. Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome. **Genome Res** 2002; 12(6):885–893.

Wu, YT, Wu SB, Lee, WY, Wei YH. Mitochondrial respiratory dysfunction-elicited oxidative stress and posttranslational protein modification in mitochondrial diseases. **Ann. N. Y. Acad. Sci** 2010; 1201:147–156.

Yan Z, Hu HY, Jiang X, Maierhofer V, Neb E, He L, Hu Y, Hu H, Li N, Chen W, Khaitovich P. Widespread expression of piRNA-like molecules in somatic tissues. **Nucleic Acids Research** 2011; 39:6596–6607.

Yao J, Zhou E, Wang Y, Xu F, Zhang D, Zhong D. MicroRNA-200a inhibits cell proliferation by targeting mitochondrial transcription factor A in breast cancer. **DNA Cell Biol** 2014; 33:291–300.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev** 2003; 17:3011–3016.

Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations. **Genes Dev** 2013; 27(4):355-371.

Zhang CZ, Zhang JX, Zhang AL, Shi ZD, Han L, Jia ZF, Yang WD, Wang GX, Jiang T, You YP, Pu PY, Cheng JQ. miR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. **Mol Cancer** 2010; 9: 229.

Zhang R, Zhang Q, Niu J, Lu K, Xie B, Cui D, Xu S. Screening of microRNAs associated with Alzheimer's disease using oxidative stress cell model and different strains of senescence accelerated mice. **J Neurol Sci.** 2014; 338(1-2):57-64.

Zorzano A, Hernán *

-

dez-Alvarez MI, Palacín M, Mingrone G. Alterations in the mitochondrial regulatory pathways constituted by the nuclear co-factors PGC-1alpha or PGC-1beta and Mitofusin 2 in skeletal muscle in type 2 diabetes. **Biochim. Biophys. Acta** 2010; 1797:1028–1033.

8. ÖZGEÇMİŞ

Pervin Elvan TOKGÜN 1982 yılında İzmir'in Bornova ilçesinde doğdu. İlkokulu Hakimiyet-i Milliye okulunda, ortaokulu İnönü Lisesi'nde, lise eğitimini ise Yaşar Neng Koleji'nde tamamladı. 2000 yılında eğitime başladığı Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümünü 2004 yılında tamamladı. Üniversite eğitiminin ardından 2004 yılında Celal Bayar Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD'da yüksek lisans eğitimine başladı ve 50/D kadrosunda asistanlık görevini üstlendi. 2011 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD'da doktora eğitimine başladı ve 2014 yılında 9 ay süreyle Barselona-İSPANYA'da kanser araştırma çalışmalarında görev aldı. 2015 yılında Pamukkale Üniversitesine doktora eğitimini tamamlamak üzere geri döndü. Evli ve bir çocuk annesidir.