



**T.C.**

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEZ BAŞLIĞI**

**MİR-144 VE FOXO1 İLİŞKİSİNİN MEME KANSERİ  
HÜCRELERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRILMASI**

**ÖĞRENCİ ADI-SOYADI  
MERVE AYDIN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
FARMASÖTİK BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**SİVAS-2018**

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

**MİR-144 VE FOXO1 İLİŞKİSİNİN MEME KANSERİ  
HÜCRELERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRILMASI**

**MERVE AYDIN**

**YÜKSEK LİSAN TEZİ**

**FARMASÖTİK BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
DOÇ. DR. ÖZGE ÇEVİK**

**SİVAS-2018**

**“MiR-144 Ve FOXO1 İlişkisinin Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Araştırılması”** adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmasötik Biyokimya** Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Üye

Üye

Üye

Üye (Danışman)

ONAY

Bu tez çalışması, ..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyde AKIN POLAT  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

Çalışma sırasında bana destek olan aileme ve tüm arkadaşlarıma...

AF

## ÖZET

### MİR-144 VE FOXO1 İLİŞKİSİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRILMASI

Merve AYDIN

MS. Thesis

Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmöstatik Biyokimya Anabilim Dalı,

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2018

Danışman: Doç. Dr. Özge ÇEVİK

2018, 104 sayfa

Meme kanseri kadınlarda yaygın bir kanser türü olup metastaz özelliği yüksektir. Son yıllarda kanserde mikroRNAların rolleri ve yeni tedavi yaklaşımları öne çıkmaktadır. FOXO1 önemli bir transkripsiyon faktörü olup kanserle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu araştırmada meme kanseri üzerinde miR-144 ve FOXO1 arasındaki ilişki araştırılmıştır. İnsan meme kanseri hücreleri MDA-MB-231 ve MCF-7 kullanılmıştır. FOXO1 proteini için tasarlanan pFOXO1 plazmiti kullanılarak over ekspresyon yapılmış ve miR-144 düzeyleri Anti-mir-144 oligonükleotidi ile baskılanmıştır. Hücrelerde, MTT ile hücre proliferasyonları tespit edilmiş. Er $\alpha$ , Er $\beta$ , FOXO1, Bax, Bcl-2, Akt, Cylind D1 protein ve gen ekspresyon düzeyleri western blotlama ve qRT-PCR ile ölçülmüştür.

Sonuç olarak, Mir144 inhibisyonu hücrelerin proliferasyonda etkili olan genlerini aktive ederek anti-apoptotik mekanizmaları harekete geçirmektedir. Mir-144 inhibe edildiği zaman FOXO1 proteininin fosforillenmesi gerçekleşmektedir.

Meme kanseri tedavisinde hücrelerde mir-144 aktive edecek ajanlar geliştirilerek yeni terapötiklerin geliştirilmesi konusunda gelecekte önemli araştırmalar yapılmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Meme Kanseri, Foxo, MikroRNA, Apoptoz

**ABSTRACT**  
**MIR-144 AND FOXO1 RELATIONSHIP RESEARCH ON THE BREAST  
CANCER CELLS**

Merve AYDIN

M.Sc.

Department of Biochemistry

Supervisor: Doç. Dr. Özge Çevik,

2018, 104 pages

Breast cancer is a widespread cancer type among women with a high rate of metastasis. In recent years, roles of microRNA's over cancer and new treatment approaches have become prominent FOXO1 is an important transcription factor and it thought to have a relation with cancer. In this study, the relation of miR-144 and FOXO1 over cancer is reviewed. Human breast cancer cells of MDA-MB-231 and MCF-7 are used. Overexpression is made using pFOXO1 plasmid, designed for FOXO1 protein and miR-144 levels are suppressed with Anti-miR-144 oligonucleotide. In the cells, cell proliferations are reviewed with MTT and ER-, ER-, Foxo1, Bax, Bcl-2, Akt, Cyclin D1 protein and gene expression levels are measured with western blotting and qRT-PCR.

As a result, miR-144 inhibition activated the effective genes in proliferation and actuated anti-apoptotic mechanisms. When miR-144 inhibited, FOXO1 protein's phosphorylation occurs.

In breast cancer treatment, important studies need to be performed regarding the development of new therapeutics by developing agents to activate miR-144 the cells.

**Key Words:** Breast cancer, FOXO, MicroRNA, Apoptosis

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışma boyunca her türlü desteğini esirgmeden yolumu aydınlatan sayın danışman hocam Doç.Dr.Özge ÇEVİK' e,

Yüksek lisans hayatımda benimle birlikte yürüyen, çalışmamda bana yardımlarını esirgemeyen ekip arkadaşım Yeter ÇİLESİZ'e,

Her zaman yanı başımda olup beni destekleyen, Metehan ELBASAN ve Hilal ACIDERELİ' ye, ve sonsuz minnettar olduğum aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.



## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>İÇ KAPAK</b> .....	I
<b>ONAY</b> .....	III
<b>YÖNERGE</b> .....	IV
<b>İTHAF</b> .....	V
<b>ÖZET</b> .....	VI
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	VIII
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	IX
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	XII
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	XVI
<b>KISALTMALAR/SİMGELER</b> .....	XVII
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. KANSER .....	3
2.1.1 Kanserin Sebepleri .....	3
2.2.Hücre Döngüsü .....	5
2.3 Kanser Hücreleri .....	7
2.4 Kanserde İşlev Gösteren Genler .....	8
2.5. Meme Kanseri .....	8
2.5.1. Meme Anatomisi .....	9
2.5.2. Meme Kanserinin Çeşitleri .....	9
2.5.3. Meme Kanseri Tanı Uygulamaları .....	10
2.5.4.Epidemiyolojisi .....	12
2.5.5.Risk Faktörleri .....	14
2.5.6.Meme Kanserinde Hormonlar ve Faktörler .....	17

2.6. Östrojen .....	18
2.6.1 Östrojen Reseptörü.....	19
2.6.2. Östrojen Hormonu Etki Mekanizması .....	20
2.6.3 Östrojen Reseptörü Alfa (ER $\alpha$ ).....	20
2.6.4. Östrojen Reseptörü Beta (ER $\beta$ ).....	21
2.7. Meme Kanseri Hücre Hatları .....	21
2.7.1. MDA-MB-231 Hücre Hattı Özellikleri.....	21
2.7.2. MCF-7 Hücre Hattı Özellikleri .....	22
2.8. Mikro RNA.....	22
2.8.1. MikroRNA'ların Yapısı ve Keşfi.....	22
2.8.2. MiRNA'ların Organizasyonu.....	23
2.8.3. Mikro RNA'ların Biyogenezini .....	24
2.8.4. miRNA Etki Mekanizması.....	25
2.8.5 Mikro RNA Kansere İlişkisi .....	26
2.9. FoxO Transkripsiyon Faktörleri .....	29
2.9.1. FoxO Transkripsiyon Faktörleri ve PI3K/Akt Sinyal Yolu İlişkisi ...	30
2.9.2. FoxO Moleküllerini Kontrol Eden Mekanizmalar .....	31
2.9.3. FoxO Moleküllerinin Hücresel Süreçlerdeki Rollerini .....	32
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>33</b>
3.1. Kullanılan Maddeler .....	33
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	33
3.3. Hücre Kültürü.....	33
3.3.1. Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması .....	34
3.3.2. Hücre Sayımı.....	34
3.3.3. Hücrede MikroRNA İzolasyonu .....	35
3.3.4. FOXO1 – Anti-miRNA Transfeksiyonu.....	37
3.3.5. MTT Testi .....	37
3.4. Hücrelerde Gen Anlatımının Kantitatif Analizi (Real Time - PCR).....	38
3.4.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu .....	39
3.4.2. Hücrelerden cDNA Sentezi.....	40

3.4.3. Hücrelerde SYBR Green ile qRT-PCR .....	41
3.5. Hücrelerde Yapılan Western Blot Çalışmaları .....	42
3.6. İstatistiksel Analiz .....	44
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>45</b>
4.1. Anti-miR-144' ün Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi .....	45
4.2 Hücrelerde Foxo1 transfeksiyonu ile Foxo1 proteininin over ekspresyonu ..	46
4.3 Hücrelerde Anti-miR-144 oligonükleotid ile miR-144'ün baskılanması.....	47
4.4 Hücrelerde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Foxo1 proteini fosforilasyon düzeyleri .....	48
4.5 MCF-7 hücrelerinin Foxo1 – Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda western blot sonuçları .....	51
4.6 MDA-MB-231 hücrelerinin Foxo1 – Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda western blot sonuçları.....	56
4.7 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin p-FOXO1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda QPCR sonuçları.....	61
<b>5.TARTIŞMA</b> .....	<b>68</b>
<b>6.SONUÇ</b> .....	<b>73</b>
<b>7.KAYNAKLAR</b> .....	<b>74</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>86</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 Karsinogenezin oluşumu.....	5
Şekil 2. 2 Hücre siklusunun evreleri .....	6
Şekil 2. 3 Meme anatomisi ve meme doku görüntüsü .....	9
Şekil 2. 4 Elle meme muayenesi prosedürü .....	10
Şekil 2. 5 Momografide meme kitle görüntüsü.....	11
Şekil 2. 6 Meme kitle ultrason tanısı.....	12
Şekil 2. 7 Meme kitle MR görüntüsü .....	12
Şekil 2. 8 Steroid çekirdeği, kolesterol ve 17-β östradiolün yapısı.....	19
Şekil 2. 9 ESR α proteinin işlevsel bölgeleri .....	20
Şekil 2. 10 miRNA ların yapısı .....	23
Şekil 2. 11 Mikro RNA ların genomik organizasyonu .....	24
Şekil 2. 12 MiRNA'ların Biyogenez Aşamaları .....	25
Şekil 2. 13 miRNA etki mekanizması.....	26
Şekil 2. 14 miRNA ve kanser ile ilişkisi .....	27
Şekil 2. 15 FoxO1'in DNA üzerindeki yerleşimi.....	29
Şekil 2. 16 İnsülin/ Büyüme Faktörleri tarafından FOXO transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi.....	30
Şekil 2. 17 FoxO ailesi üyelerinin asetilasyonu ve fosforilasyon alanlarının gösterildiği çizim.....	31
Şekil 3. 1 Hücre sayımı yapılan Thoma Lamı.....	34
Şekil 3. 2 Thoma lamında sayım yapılan karelerin toplamı.....	35
Şekil 3. 3 MTT' den Formazan Oluşumu .....	37
Şekil 4. 1 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Anti-miR-144'ün doza bağlı hücre canlılığı grafiği .....	45
Şekil 4. 2 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Anti-miR-144 ün zamana bağlı hücre canlılığı grafiği .....	46
Şekil 4. 3 MDA-MB-231 hücrelerinin western blot Foxo1,GAPDH bantları.....	46
Şekil 4. 4 MCF-7 hücrelerinin western blot Foxo1,GAPDH bantları .....	47
Şekil 4. 5 MDA-MB-231 hücrelerinin western blot Foxo1/GAPDH grafiği .....	47

<b>Şekil 4. 6</b> MCF-7 hücrelerinin western blot Foxo1/GAPDH grafiği.....	47
<b>Şekil 4. 7</b> MCF-7 hücrelerinde Anti-miR-144 varlığında kontrole göre değişen MiR-144 seviyesi .....	48
<b>Şekil 4. 8</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Anti-miR-144 varlığında kontrole göre değişen MiR-144 seviyesi.....	48
<b>Şekil 4. 9</b> MCF-7 hücrelerinde Anti-miR-144 varlığında western blot Foxo1, p- Foxo1,GAPDH bantları .....	49
<b>Şekil 4. 10</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Anti-miR-144 varlığında western blot Foxo1,p-Foxo1 GAPDH bantları.....	49
<b>Şekil 4. 11</b> MCF-7 hücrelerinde p-Foxo1 ve Anti-mir-144 ko-transfeksiyonunda p- Foxo1/GAPDH grafiği.....	49
<b>Şekil 4. 12</b> MCF-7 hücrelerinde p-Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonu varlığında Foxo1/GAPDH grafiği.....	50
<b>Şekil 4. 13</b> MDA-MB-231 hücrelerinde p-Foxo1 ve Anti-miR-144 ko- transfeksiyonu varlığında p-Foxo1/GAPDH grafiği.....	50
<b>Şekil 4. 14</b> MDA-MB-231 hücrelerinde p-Foxo1 ve Anti-miR-144 ko- transfeksiyonunda .....	51
<b>Şekil 4. 15</b> MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER- $\alpha$ ve ER- $\beta$ western bantları .....	52
<b>Şekil 4. 16</b> MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER- $\alpha$ /GAPDH grafiği.....	52
<b>Şekil 4. 17</b> MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER- $\beta$ /GAPDH grafiği.....	53
<b>Şekil 4. 18</b> MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bax ve Bcl-2 western blot bantları.....	53
<b>Şekil 4. 19</b> MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bax/GAPDH grafiği.....	54
<b>Şekil 4. 20</b> MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bcl-2/GAPDH grafiği .....	54
<b>Şekil 4. 21</b> MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Akt ve Cylind1 western blot bantları .....	55
<b>Şekil 4. 22</b> MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda varlığında Akt/GAPDH grafiği.....	55

<b>Şekil 4. 23</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER- $\alpha$ ve ER- $\beta$ western blot bantları.....	56
<b>Şekil 4. 24</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER- $\alpha$ /GAPDH grafiği .....	57
<b>Şekil 4. 25</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER- $\beta$ /GAPDH grafiği .....	57
<b>Şekil 4. 26</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bax ve Bcl-2 western blot bantları .....	58
<b>Şekil 4. 27</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bax/GAPDH grafiği .....	58
<b>Şekil 4. 28</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bcl-2/GAPDH grafiği .....	59
<b>Şekil 4. 29</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Akt ve CyclinD1 western blot bantları .....	59
<b>Şekil 4. 30</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 kombinasyonu varlığında Akt/GAPDH grafiği.....	60
<b>Şekil 4. 31</b> MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda CyclinD1/GAPDH grafiği .....	60
<b>Şekil 4. 32</b> MCF-7 hücresinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Foxo1 gen ekspresyon düzeyi .....	61
<b>Şekil 4. 33</b> MDA-MB-231 hücresinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Foxo1 gen ekspresyon düzeyi .....	61
<b>Şekil 4. 34</b> MCF-7 hücresinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bax gen ekspresyon düzeyi .....	62
<b>Şekil 4. 35</b> MDA-MB-231 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Bax gen ekspresyon düzeyi .....	62
<b>Şekil 4. 36</b> MCF-7 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Bcl-2 gen ekspresyon düzeyi .....	63
<b>Şekil 4. 37</b> MDA-MB-231 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 kombinasyonunun Bcl-2 gen ekspresyon düzeyi.....	63
<b>Şekil 4. 38</b> MCF-7 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun ER- $\alpha$ gen ekspresyon düzeyi.....	64
<b>Şekil 4. 39</b> MDA-MB-231 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun ER- $\alpha$ gen ekspresyon düzeyi .....	64

<b>Şekil 4. 40</b> MCF-7 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER- $\beta$ gen ekspresyon düzeyi.....	65
<b>Şekil 4. 41</b> MDA-MB-231 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun ER- $\beta$ gen ekspresyon düzeyi .....	65
<b>Şekil 4. 42</b> MCF-7 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Akt gen ekspresyon düzeyi .....	66
<b>Şekil 4. 43</b> MDA-MB-231 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Akt gen ekspresyon düzeyi.....	66
<b>Şekil 4. 44</b> MCF-7 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun CyclinD1 gen ekspresyon düzeyi.....	67
<b>Şekil 4. 45</b> MDA-MB-231 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun CyclinD1 gen ekspresyon düzeyi .....	67

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 2. 1</b> Meme kanseri çeşitleri.....	9
<b>Tablo 2. 2</b> Türkiye kanser çeşitleri istatistik verileri .....	14
<b>Tablo 2. 3</b> Meme kanserinin kadınlarda yaşa bağlı görülme sıklığı.....	15
<b>Tablo 2. 4</b> İnsan malignant tümörlerindeki miRNA ekspresyon profilindeki değişiklikler.....	29
<b>Tablo 3. 1</b> Genlerin primer nükleotid dizisi ve uzunlukları.....	38
<b>Tablo 3. 2</b> cDNA sentezi reaksiyon içeriği.....	40
<b>Tablo 3. 3</b> RT-PCR reaksiyon içeriği .....	41
<b>Tablo 3. 4</b> SYBR Green ile qRT-PCR şartları.....	41
<b>Tablo 3. 5</b> SDS-poliakrilamid jelin yoğunluğuna göre hazırlanışı .....	43



## KISALTMALAR/SİMGELER

BRCA : Meme Kanser

BRCA1 : Meme Kanser Gen 1

BRCA2 : Meme Kanser Gen 2

DNA : Deoksiribonucleicacid

E1 : Östron

E2 : Östrodiol

E3 : Östriol

ER : Östrojen reseptörü

FOXO : Forkhead Bax Protein O

FSH : Folikül Stimüle Eden Hormon

pFOXO1: FOXO1 protein ekspresyon plazmidi

FOXO1: FOXO1 Protein

p-FOXO1: Fosforillenmiş FOXO1 Protein

Mir : Mikro RNA

PR : Progesteron Reseptörü

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Normal meme büyümesi ve gelişmesi hormonlar ve büyüme faktörüyle düzenlenir. Bu hormon ve faktörlerin etkileri moleküle özgü reseptörlerine bağlanmasıyla başlar. Normal meme hücrelerinde gelişimi sürdüren ve apoptoza götüren yollar denge halindedir [1]. Östrojen hormonu meme hücreleri kontrolünde çok etkili bir hormondur.

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen, metastaz özelliği bulunan bir kanser türüdür. Meme kanserlerinin %60-70'inde östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) sentezlenir. Östrojen reseptörleri gen transkripsiyon aktivasyonuna yol açarak hem östrojen bağımlı hem östrojen bağımsız mekanizmalar ile bazı genlerin gen ekspresyon düzenlenmesi yaparlar. Bu da hücre proliferasyonu ile sonuçlanır. ER $\alpha$  gen overekspresyonu meme kanserinin erken evrelerinde sıklıkla saptanır [2]. Meme kanserlerinin yaklaşık %70 kadarı östrojen reseptörü eksprese eder (ER pozitif); bu tümörler ER negatif olanlara göre daha yavaş çoğalma ve daha iyi diferansiye olma eğilimindedirler. Çalışmada kullanılan MCF-7 hücre hattı ER pozitif, MDA-MB-231 hücre hattı ise ER negatif hücre hatları olduklarından farklı tipteki meme kanser türlerini temsil etmektedir. Meme kanserinde; ölüm yollarının işleyişinin bozulması, p53 mutasyonları, Bcl-2 yolağındaki fonksiyon bozuklukları kanserli hücrelerin apoptozisten kaçmasına sebep olmaktadır [6,7].

İnsanlardaki transkripsiyon mekanizmasının %97'sini kodlanmayan RNA'lar oluşturur. Protein şeklinde ifade edilmeyen bu mikro RNA (miRNA) lar gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahiptir [2-4]. Bazı miRNA'ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen şeklinde işlevi olması, tümör ilerlemesi, yayılımı ve invazyonunda miRNA'ların düzenleyici role sahip olduğunu göstermektedir [3]. MikroRNA'lar gelişme, farklılaşma, ölüm ve metabolizma gibi farklı biyolojik süreçlerin kontrolünde rol alır [4]. Bazen mikroRNA'lar hedef genlerin ifadesini etkileyerek protein üretiminin düzenlenmesine katılırlar.

MiRNA'lar, hücredeki mRNA'nın yollardaki özelliğine göre onkogenik ya da tümör baskılayıcı özellik gösterebilir. İşlevleri bir onkogenin ifadesini

kontrol etmek olan mikroRNA'lar "tümör baskılayıcı miRNA'lar"(TS-mir) olarak adlandırılmaktadır. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ifadesinin azalışı, onkogenin ifadesinin artmasına ve tümörleşmeye neden olur. Bunun aksi olarak, "onko-mir" olarak adlandırılan bazı miRNA'ların kanserleşmeyi arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA'lar bir tümör süpresörün baskılanmasına sebep olur. MiRNA'lar, onkogen ve tümör baskılayıcı mRNA'ların ikisini birden hedef olarak görebilir. Bu sebeple, belirli bir miRNA'nın temel fonksiyonu ya TS-mir'in ya da onko-mir'in hücrel içeriğine bağlıdır [5].

FoxO transkripsiyon faktörleri, büyük bir protein ailesi olan "Forkhead" ailesinin üyelerindedir. FoxO alt ailesi (FOXO1, FOXO3, FOXO4 ve FOXO6) DNA hasar ve tamirine yanıt, apoptoz, metabolizmanın düzenlenmesi, hücre çoğalması, glikoz metabolizması, enerji homeostazi, stres toleransı ile ilgili hedef genleri düzenler [6,7]. FoxO'ların aktivitesi; fosforilasyon, asetilasyon ve übikütilasyon içeren posttranslasyonel modifikasyon mekanizmaları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir [8]. Hücre döngü inhibitörü olan p27, kip1 molekülünün uyarılmasını sağlayarak, hücre döngüsünün durmasına neden olabilir. Hücrel farklılaşma sürecinde FoxO ailesinin farklılaşmayı baskılayıcı ve destekleyici rolleri bulunmaktadır [9].

Bu çalışmada meme kanserinde moleküler etkileri az olarak bilinen FOXO1 ve kanser araştırmalarında yeni hedefler olan miRNAlardan miR-144'ün ilişkisi araştırılmış sinyal yolağının tespiti amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Hücreler bir araya gelerek dokuları, dokular bir araya gelir ve organları meydana getirirler. Organlar, dokular oluşurken hücreler belli düzen içindedir. Ortaklaşa bir araya gelen hücreler gerekli sinyali aldığı anda belirli bir hızda ve kontrol altında çoğalırlar. Diğer taraftan yıpranan hücreler de belli bir hızla yıkılmaktadırlar. Bu yapım ve yıkım olayları denge halindedir [10].

Kanser en temel şekilde hücrelerin kontrol edilemeyen bir hızla çoğalmaları demektir. Bu oluşum esnasında kanser hücresinin, diğer hücrelere göre yapısında ve işlevinde bazı farklılıklar meydana gelir; bazen hücre her zaman yaptığı işlevlerini yapamazken, bazen de yeni roller üstlenmeye başlar. Anormal şekilde çoğalmaya ve büyümeye başlayan bu hücreler buldukları yerdeki doku ve organları invaze edip ve bulunduğu bu organların görevlerini engelleyecektir. Kanserleşmenin ortaya çıkması için sadece kontrolsüz çoğalma yeterli değildir [11].

#### 2.1.1 Kanserin Sebepleri

Kansere sebep olan çeşitli faktörler vardır.

**İyonize Radyasyon:** Genellikle iyonize radyasyonun çeşitli tümörlere sebep olduğu bilinmektedir. Burada radyasyonun dozu önemlidir

**Ultraviyole ışınları:** Güneşten gelen zararlı ışınlar vücudumuz için tehlikelidir. Korunmasız ve aşırı derecede güneş ışığına maruz kalanlarda kanserler yoğun şekilde ortaya çıkmaktadır.

**Hava kirliliği:** Kirli havanın ve sigara içiminin akciğer kanseri görülmesinde %12' lik artışa sebep olduğu düşünülmektedir.

**Kimyasal karsinojenler:** Bazı meslek gruplarında çalışan insanların kömürün yanma ürünleri, naftilaminler, asbest, vinil klorür vb. maddelere maruz kalışının

kanser oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir. Örneğin boya sanayisinde çalışanlarda mesane kanserlerine, plastik sanayisinde çalışanlarda karaciğer kanserlerine rastlanmaktadır. Bunun yanı sıra kanser ilaçları, organ nakillerinden sonra kullanılan ilaçlar da kansere sebep olabilir.

**Beslenme faktörleri:** Sindirim sistemine bağlı kanserler beslenme alışkanlıklarına bağlıdır. Bu yüzden düşük yağ ve yüksek lif içeren beslenme stilleri önerilmektedir.

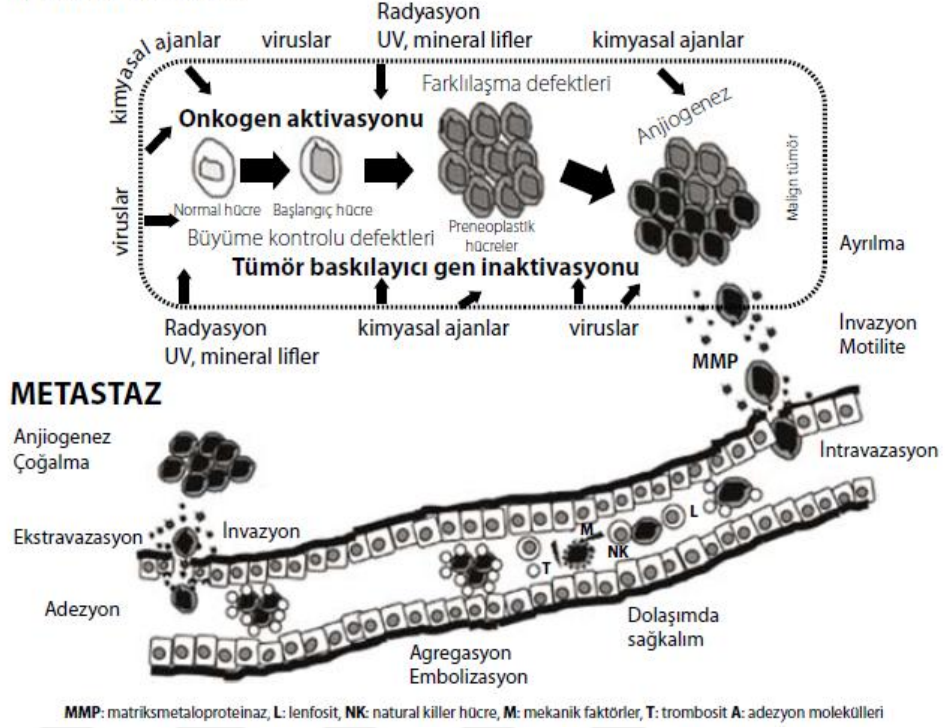
**Sigara:** Sigara ve akciğer kanseri yakından ilişkilidir.

**Alkol:** Yüksek miktarda alınan alkol; ağız, yutak ve yemek borusu kanserleri riskini arttırmaktadır.

**Virusler:** Yaşayan en küçük mikroorganizma olan virüsler canlılarda birçok hastalıklara yol açarlar. İnsanlarda belli başlı virüslerin kanserle alakalı olduğu düşünülmektedir.

**Genetik faktörler:** Kanser yalnızca genetik bir hastalık değildir. Genellikle çevresel faktörlerle birleşince etkisi görülür. Ancak çocuklarda görülen bir göz kanseri olan retinoblastomda ailevi geçiş görülmektedir. Kalın barsakta polipler ailevi hastalıktır [10].

## KARSİNOGENEZ

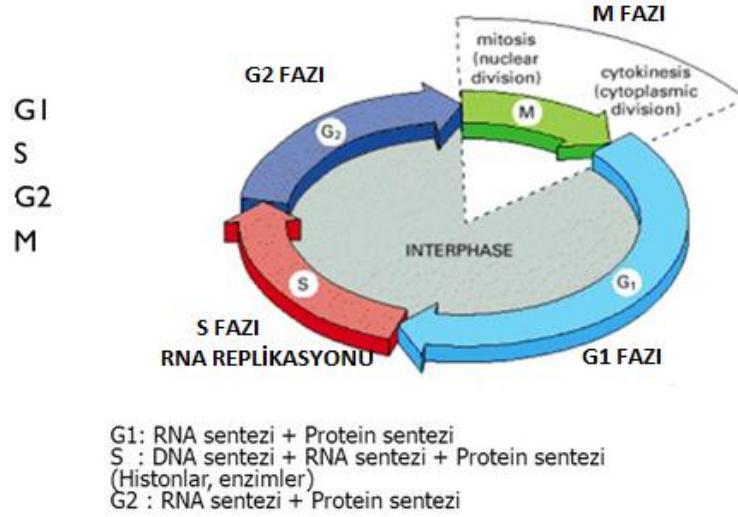


Şekil 2. 1 Karsinogenezin oluşumu [11]

Bu mutajenik etkenlerin büyük bir kısmı hücrenin mutasyonlara korunmasız olduğu hücre döngüsünde meydana gelir. Hücre döngüsü, DNA sentezinin gerçekleştiği S, mitozun olduğu M ve bu süreçler arasındaki duraklama evreleri G1 ve G2 olmak üzere, toplam 4 evrede gerçekleşir. Hücrelerin büyük kısmı G0 şeklinde isimlendirilen dinlenme evresindedir. Bu hücreler sinyal geldiğinde hücre döngüsüne gider.

## 2.2.Hücre Döngüsü

Hücre siklusu 4 evreden oluşur.



Şekil 2. 2 Hücre siklusunun evreleri [13]

- G0 evresinde (dinlenme fazı)**, hücreler genellikle özel bir fonksiyonu için programlıdır.
- G1 evresinde (interfaz)**, özel hücre işlevleri için gerekli proteinler ve RNA sentezlenir. G1 evresinde yüksek oranda RNA sentezi gerçekleşir. Bunun yanı sıra, DNA için gerekli enzimler üretilir [10].
- S evresinde (DNA sentezlenen faz)**; Hücredeki DNA miktarının iki katına çıktığı görülür.
- G2 evresinde**; DNA sentezi sonlanır, protein ve RNA sentezi devam eder.
- M evresinde**; RNA ve protein üretim hızı yavaşlar, kalıtım materyali oluşmakta olan iki yeni hücreye dağıtılır. Mitozisin ardından meydana gelen hücreler ya G0 veya G1 evresine geçerler [12].

### Hücre döngüsü kontrol mekanizmaları

Bölünme yeteneğine sahip hücreler belli kontrol noktalarından geçerler. Birincisi DNA sentezine girmeden ve ikincisi mitozisden hemen önce gelir. Normalde, bu evredeki hücreler, hücre döngüsünün sıradaki evresine girecek proteinleri sentezledikleri için biyokimyasal anlamda aktiftirler. Bu kontrol noktalarında, mevcutsa genetik hatalar onarılır. Hata düzeltilince bir sonraki evreye geçilir [13].

- a. Normal hücrelerin DNA dizilerindeki kusurları farkedenden mekanizmaları vardır. DNA hasarı sırasında hasarlı nükleotitleri normal moleküllerle değişen tamir mekanizmaları bulunur. Bu mekanizmalar ana hücredeki genetik materyalle, oluşan iki yeni hücredeki genetik materyalin benzer oluşunu sağlar.
- b. İlk kontrol noktası, S evresine girmeden önce gerçekleşir. DNA sentezi için, hücre dışı sinyaller ve mekanizma hatasız olsa dahi, hücre G1 evresinden çıkmadan önce DNA'nın hatasız olması gerekir. Bir sorun farkedilirse, hücreler ya hatayı düzeltir ya da ölüme götürürler. Bu kontrol noktasını p53 proteini yönetir.
- c. İkinci kontrol noktası, hücreler M evresinden öncedir. Hücre döngüsü baskılayıcıları, yeni oluşacak hücrelerin doğru genetik materyale sahip olana kadar duraklatır. DNA replikasyonunda hata oluşmuşsa, hücre bu kontrol noktasında durur ve hata onarımından sonra M evresine gider.
- d. Doğal hücrelerin küçük bir kısmı sınırsız miktarda çoğalan, ölümsüz hücrelerdir. Hücreler gelen sinyallerle, yenilenme ve olgunlaşma işlevleri için yeni hücreler oluşturma yeteneğindedir.
- e. Bazı normal hücreler belirli miktara ulaştığında hücre daha fazla bölünmez [10,12]

### 2.3 Kanser Hücreleri

Kanser hücreleri birtakım özelliklere sahiptir:

**Klonal orijin:** Bir tane anormal hücre kanserleşmek için yeterlidir. Fakat bazen kanserler birden fazla malignenden oluşur. Bu tümörler genlerdeki genetik hatalar sonucunda meydana gelirler.

**Ölümsüzlük:** Normal hücrelerin bölünme miktarı kısıtlıdır. Tümörler ise durmaksızın çoğalırlar. Ölümsüzlüğün işleyişlerinden biri kromozomun ucu olan telomerlerdir. Hücre bölünürken, normal hücrelerde telomerler zamanla kısalırlar. Ama kanser hücrelerinde ve kök hücrelerde telomerler yenilenirler (ölümsüz olur).

**Genetik dengesizlik:** Kanser hücreleri kontrol noktaları zamanla daha az denetlenen versiyonlar oluşturur. Bu versiyonların ayrıca farklı ortamda hayatta kalabilme özelliği de artar ve bu şekilde metastaz yapabilirler.



**Temas engeli ve substratuma yapışarak büyüme özelliğinin kaybı:** Normal hücreler, tutunduğu substratuma yapışamazlarsa bölünmezler. Hatta bölünebilmeleri için tüm büyüme faktörleri ve besin elemanları konulsa dahi bölünmezler. Fakat kanser hücreleri, substratuma tutunmaya gerek duymayarak bölünmeye devam ederler. Hücre kültüründe birden fazla tabaka olsa dahi bölünmeye devam ederler.

**Metastaz;** metastaz, hücre dışı matrikse yapışmaktan sorumlu hücresel proteinlerin kaybından, hücreler arası etkileşim bozukluğundan, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki sorunlardan kaynaklıdır[14].

## **2.4 Kanserde İşlev Gösteren Genler**

- Proto-onkogenler
- Antionkogenler; Tümör Süpressor genler

### **I. Protoonkogenler**

Hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve ölüm için aldıkları sinyalleri hücre yüzeyinden başlamak üzere çekirdeğe getiren sinyal iletimi sürecinde rol alan proteinlerin ifade edilmesinden görevli olan genlerdir.

### **II. Onkogen**

Protoonkogenlerin herhangi bir nedenle mutasyona uğramış haline onkogen denir. Onkogenler, kanser oluşturan genlerdir.

### **III. Antionkogen**

Antionkogenler ; Diğer adıyla Tümör baskılayıcı genler olarak da bilinir. Bu genler normalde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri kodlayan genlerdir [13].

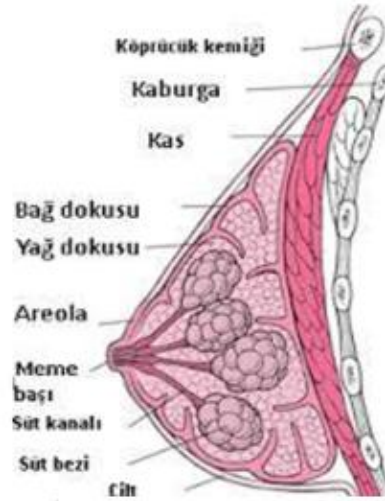
## **2.5. Meme Kanseri**

Kadınlarda en fazla görülme oranına sahip kanser çeşididir. Meme kanserinde genetik, çevre ve hormonlar etkilidir.

## 2.5.1. Meme Anatomisi

### Meme dokusu

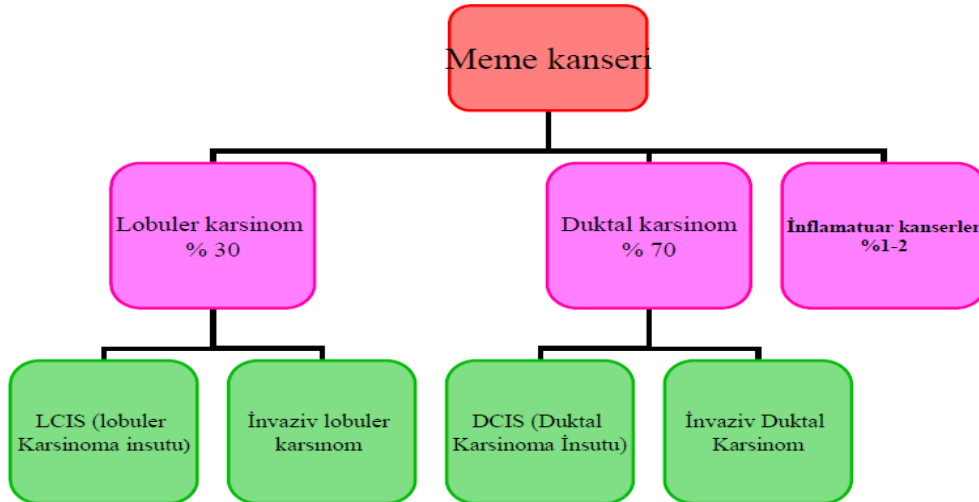
- \* Süt bezleri
- \* Süt kanalları
- \* Kas ve yağ dokusu
- \* Sınırlar
- \* Kan damarlarından



Şekil 2. 3 Meme anatomisi ve meme doku görüntüsü [17]

Meme dokusu süt bezlerinden, süt kanallarından, kaslardan ve yağ dokusundan son olarak da kan damarlarından meydana gelir. Meme kanseri çeşitleri meme dokusunun hangi bölgesindeyse ona göre isim almaktadır.

## 2.5.2. Meme Kanserinin Çeşitleri



Tablo 2. 1 Meme kanseri çeşitleri

Meme iki temel yapıdan oluştuğu için meme kanserinde iki çeşit mevcuttur:

- 1- Lobuler kanser
- 2- Duktal kanser

Görülme oranı en fazla meme kanser çeşidi duktal kanserdir ve bütün göğüs kanserlerinin %70 ini meydana getirir [17].

### 2.5.3. Meme Kanseri Tanı Uygulamaları

Meme kanserinin tanısında kullanılan bazı teknikler mevcuttur.

- Kendi kendine meme kontrolü
- Doktor kontrolü
- Ultrasonografi
- Mamografi
- MRI
- Biopsi

#### 2.5.3.1.Kendi Kendine Meme Muayenesi

Meme muayenesinin meme kanseri teşhisinde önemi büyüktür. Herkes kendi kendine meme kontrolü yapmalıdır. Memede oluşan kitleler genellikle kadınlar tarafından keşfedilmektedir. Tesadüf eseri farkedilen kitleler çoğunlukla büyük kitleler olmaktadır. [14]

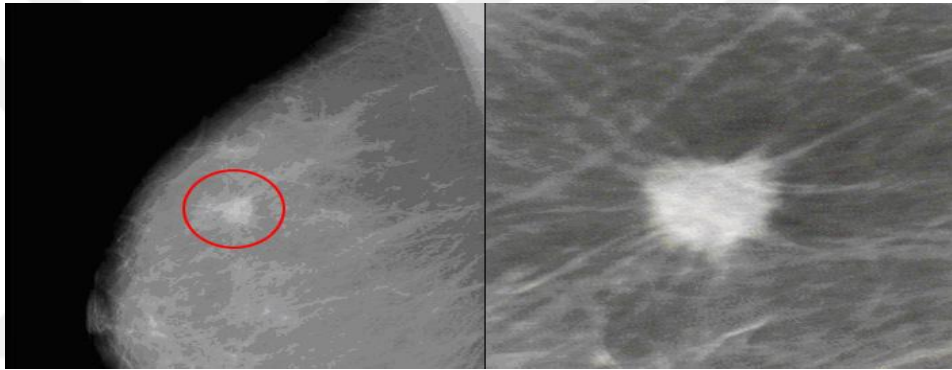


Şekil 2. 4 Elle meme muayenesi prosedürü [14]

### 2.5.3.2.Mammografi

Belirtilen sıklıklarda mammografi çekirmek her kadının dikkat etmesi gereken bir husustur.Meme kanseri erken evre de tanıya imkan sağlamaktadır.

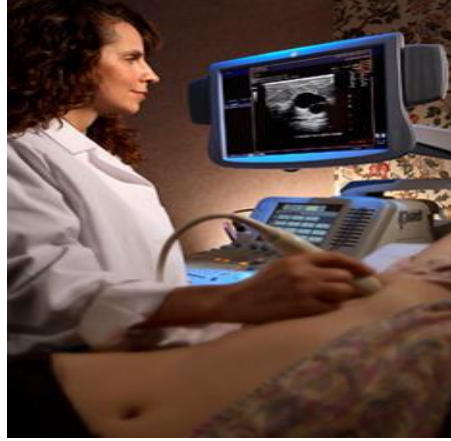
- 50-64 yaş arası var 3 yılda 1
- 50 yaş altı yok
- 64 yaş üstü yok (UK)
- 35-39 yaş arasında ilk mammografi
- 50 yaşına kadar 2 yılda 1
- 50 yaş sonrası her yıl (USA) [14]



Şekil 2. 5 Momografide meme kitle görüntüsü [15]

### 2.5.3.3.Ultrasonografi

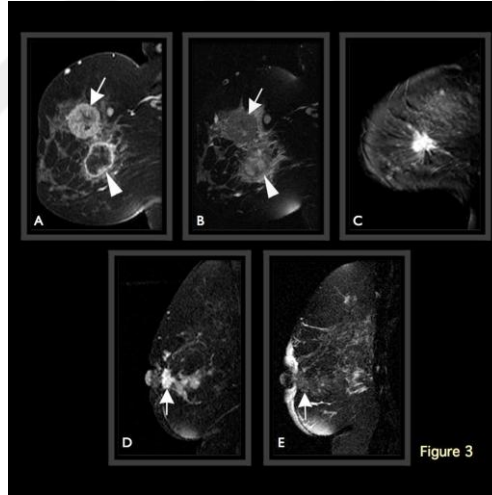
Ultrasonografi meme kanseri şüphesi artınca başvurulmuş bir teşhis yöntemidir. Mammografideki bulgulara göre birads kategorisi denilen bir sınıflandırma yapılır. BI-RADS, radyoloji uzmanlarının mammografi bulgularını yorumlarken kullandıkları bir sınıflandırmadır. Mammografide görülen bulgular, iyi veya kötü özelliklerine göre 0'dan 6'ya kadar bir kategoriye (sınıfa) dahil edilir. Bu hastalığın boyutunu evresini anlamak için gereklidir [21,22].



Şekil 2. 6 Meme kitle ultrason tanısı [20]

#### 2.5.3.4. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MR)

Bir tanı yöntemi de MR yöntemidir. Meme dokusundaki kitlenin ayrıntılı görüntülenmesini sağlar.



Şekil 2. 7 Meme kitle MR görüntüsü [25]

#### 2.5.4.Epidemiyolojisi

Bayanlarda görülme oranı en fazla olan kanser çeşididir.En sık ölüme sebep olan 5 kanser tipinde meme kanseri de bulunmaktadır.

Ölüme sebep olan ilk beş kanser türü;

- Akciğer kanseri (1,3 milyon ölüm/yıl)
- Mide kanseri (803 000 ölüm/yıl)
- Kolorektal kanseri (639 000 ölüm/yıl)

- Karaciğer kanseri (610 000 ölüm/yıl)

### **Meme kanseri görülme sıklığı verileri**

A.B.D.'de kadın kanserlerinin %31'i ,Türkiye'de kadın kanserlerinin %24-29'u meme kanseridir [22]. Amerikan Kanser Birliği verilerine göre 2011 yılı içerisinde 232.620 (2130 erkek, 230.480 kadın) yeni olgu ve 39.970 (450 erkek, 35.520 kadın) kansere bağlı ölüm bildirilmiştir. Türkiye'nin doğu bölgelerinde meme kanseri görülme sıklığı 20/100.000, batı bölgelerinde bu oran 50/100.000 olarak belirlenmiştir [23-24]. Meme kanserli hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı, gelişmiş ülkelerde %74 iken, diğer ülkelerde ise %54'tür. Meme kanseri vakaları coğrafi olarak farklı dağılım göstermektedir. KuzeyAmerika, Kuzey Avrupa, Avusturalya yüksek riskli bölgeleri oluşturmaktadır. Bu ülkelerde yaşayan kadınların %6'sında 72 yaş öncesinde kanser gelişmektedir. Az gelişmiş ülkelere meme kanseri gelişme riski, zengin, gelişmiş ülkelere oranla 1/3 daha azdır. Japonya gelişmiş ülke kategorisinde olmasına rağmen 2000 yılında hala düşük meme kanseri riskine sahip olması nedeni ile bu saptamanın dışında kalmaktadır [24].

### **Dünya Sağlık Örgütü Verileri (WHO Verileri)**

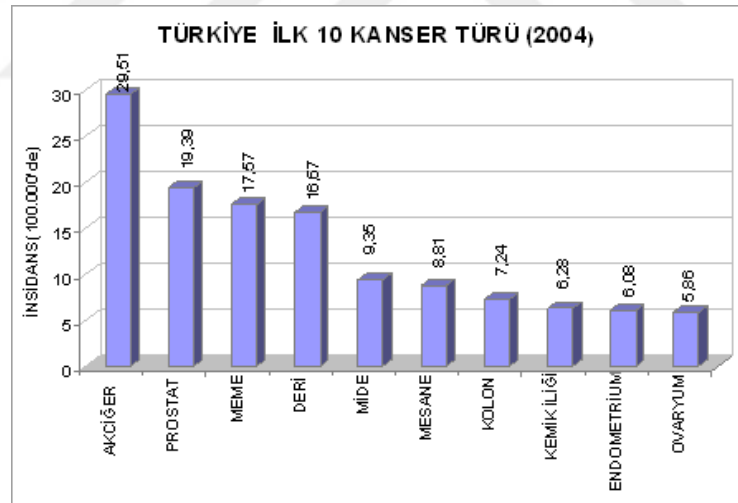
Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre meme kanseri, kadınlarda en sık görülen 5 kanser çeşidinden ilk sırada yer alan kanser türüdür. Erkeklerde ilk sırada ise akciğer kanseri gelmektedir.

<b>ERKEK</b>	<b>KADIN</b>
* Akciğer	* Meme
* Mide	* Akciğer
* Karaciğer	* Mide
* Kolorektal	* Kolorektal
* Ösefagus	* Servikal

Şekil 2.8. WHO kadın ve erkeklerde en sık görülen 5 kanser türü [19]

## Türkiye Kanser İstatistikleri

Türkiye kanser istatistiklerine göre ilk sırada akciğer kanseri yer alırken, meme kanseri ilk üç kanser türünde yer almaktadır.



Tablo 2. 2 Türkiye kanser çeşitleri istatistik verileri [20]

### 2.5.5.Risk Faktörleri

Risk faktörü bir hastalığın görülme sıklığını etkileyen faktörleridir.

- Değiştirilmeyen Risk Faktörleri
- Hayat Tarzıyla İlişkili Olan Faktörler

- Tartışılan Risk Faktörleri

### 2.5.5.1 Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

Risk faktörlerinden bir kısmı kalıtsaldır ve değiştirilemezdir. Fakat yaşayış biçimi veya çevresel faktörlere bağlı olarak bu tehlike azaltılabilir.

- Yaş
- Cinsiyet
- Soy
- Kalıtsal sebepler
- Irsilik
- Bireysel göğüs kanseri hikayesi
- Herhangi bir kanser geğmişi
- Adet düzeni
- Fiziksel özellikler
- Meme dokusuna radyoterapi [19,20]

#### Yaş

Kadınlarda görölme olasılığı %15'tir. Bu olasılık yaşa bağlı olarak değişmektedir.40 yaşını geğen kadınlarda risk yükselmektedir. Her 10 yılda bir risk artış göstermektedir.

Yaş	100.000 de insidans
0-39	1
40-44	126
50-54	228
60-64	348
70-74	450
80-84	477

**Tablo 2. 3** Meme kanserinin kadınlarda yaşa bağlı görölme sıklığı [16]



### **Kalıtsal Sebepler**

Göğüs kanserlerinde %4-8 oranında kalıtsal sebepler etkilidir [16]. Bazı genlerdeki mutasyon bazı sendromlara sebep olur. Başlıca genetik faktörler ;

- BRCA1 ve BRCA2
- ATM
- PTEN
- CHEK2
- MSH1 ve MLH2
- STK11/LKB1

### **Adet Düzeni**

Adet düzeni meme kanseriyle yakından ilişkilidir. Menstürasyon sıklığı, miktarı, ilk görülme yaşı v.s etkenler meme kanseri riskini etkiler.

- İlk adet yaşı: 12 yaş - 16 yaş 1.2 kat artış
- Menopoz yaşı: 55 yaş - 45-54 yaş 1.4 kat artış
- Erken menopoz 45 yaş Azalıyor

### **2.5.5.2. Yaşam Tarzıyla İlişkili Faktörler**

Çevresel faktörlerden etkilenen, yaşam kalitesiyle ilintili risk faktörleridir.

- Laktasyon
- Alkol
- Obezite
- Egzersiz ve fizik aktivite

### 2.5.5.3. Tartışmalı Risk Faktörleri

Son dönemlerde ortaya atılan, kansere sebep olduğu tartışmalı, henüz araştırılan faktörlerdir [35].

- Yağ oranı yüksek besinler
- Hormon mekanizması
- Tütün
- Çevre faktörleri
- Gece mesaisi

### 2.5.6.Meme Kanserinde Hormonlar ve Faktörler

Normal meme büyümesi ve gelişmesi birçok hormon ve çoğalma faktörünün kompleks etkileşimi ile düzenlenir. Gelişme ve büyümede, östrojenler, androjenler, progesteron, glikokortikoid, prolaktin, tiroid hormonu, insülin ve insülin benzeri büyüme (çoğalma) faktörleri (IGF-1 ve IGF-2), fibroblast büyüme (çoğalma) faktörleri (FGF) ve epidermal büyüme (çoğalma) faktörü (EGF) / transforme edici büyüme (çoğalma) faktörü alfa (TGF- $\alpha$ ) molekülleri rol oynar. Büyüme faktörlerinin ve hormonların etkileri, her bir moleküle spesifik reseptörlerine bağlanmasıyla başlar. EGF, normal meme hücrelerinin kültür ortamında yetiştirilmesinde büyüme (çoğalma) faktörü olarak dışarıdan destekleyici olarak verilmelidir. Bunun tam tersi olarak meme kanseri hücreleri kültürde EGF gereksinimi duymazlar. Sağlıklı meme hücrelerinde canlılığı sürdüren ve apoptozise yol açan yollar denge ve etkileşim halindedir [21,22].

Östrojen hormonu kontrolündeki meme kanseri hücreleri kendi büyüme faktörlerini sentezler ve salgırlar. Stromal dokular IGF-1 ve IGF-2 gibi büyüme (çoğalma) faktörlerini salgılayarak, meme kanseri hücrelerini uyarırlar. Potansiyel otokrin/parakrin çoğalma faktörleri; EGF, TGF-  $\alpha$ , IGF-2, trombosit türevli büyüme (çoğalma) faktörü ve fibroblast büyüme (çoğalma) faktörünü içerir [23].

ER negatif meme kanseri hücreleri TGF- $\beta$  'ya duyarlıdır. Meme kanserinin kötü huylu olma potansiyeli; tümörler tarafından üretilen, çoğalmayı aktive edici ve çoğalma inhibe edici sinyaller arasındaki dengeye bağlıdır [25]. Tümördeki

epitelyal ve/veya stromal hücreler; katepsinler, stromelysinler, gelatinazlar, ya da ürokinaz plasminojen aktivatör gibi proteazlar salgırlar. Bunlar tümörün invaziv ve metastatik olmasında rol oynayabilirler [25,26].

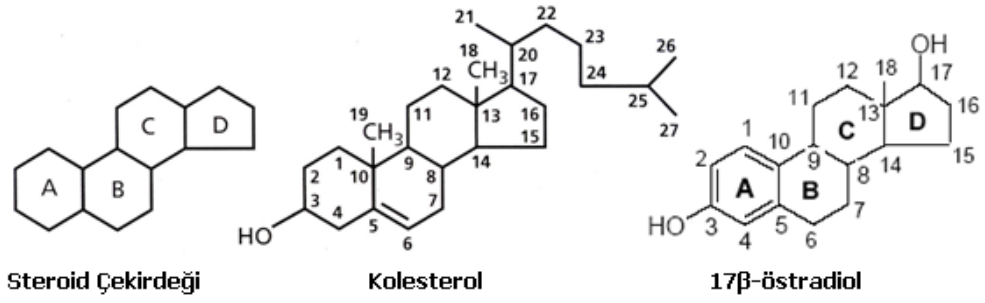
Çalışmalarda kullanılan MCF-7 hücre hattı ER pozitif, MDA-MB-231 hücre hattı ise ER negatif hücre hatları olduklarından farklı tipteki meme kanserlerini temsil etmektedir. Meme kanserinde; ölüm yolaklarının işleyişinin bozulması, p53 mutasyonları, Bcl-2 yolağındaki fonksiyon bozuklukları kanserli hücrelerin apoptozisten kaçmasına sebep olmaktadır [27].

Meme kanseri tedavisinde, kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi apoptotik mekanizmaları tetiklese de spesifik ölüm yolaklarının aktive edilmesi toksisiteyi azaltarak tedaviyi daha etkili kılacaktır [25].

Östrojen ve progesteron hormonları meme kanseri gelişiminde rol alan önemli faktörlerdendir. Meme kanserlerinin yaklaşık olarak % 70'i ESR1 geni tarafından kodlanan Östrojen  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) reseptörü ve progesteron reseptörünün gereğinden az ekprese edilmesiyle ayrıca, ESR2 geni tarafından kodlanan Östrojen  $\beta$  (ER $\beta$ ) reseptörünün duyarsızlaşması sonucu oluşmaktadır. Ayrıca, ER $\alpha$  ve PR gen ifadesi epigenetik mekanizmalar tarafından promotör bölgesinin aşırı metillenmesi sonucu azalır [22].

## 2.6. Östrojen

Tüm östrojenler aromatik bir A halkasına, C-3 pozisyonunda fenolik bir hidroksil grubuna ve C-13 pozisyonunda ise bir metil grubuna sahiptir. Östradiol (E2) C-17 pozisyonunda bir hidroksil grubuna sahipken (Şekil 2.8), östron (E1) bu pozisyonda bir keto grubuna sahiptir. E1 ve E2 kanda en fazla bulunan östrojenlerdir. E2'nin biyolojik olarak en aktif olduğu bölge meme dokusudur [27].



**Şekil 2. 8** Steroid çekirdeği, kolesterol ve 17-β östradiolün yapısı [27]

Östrojenler ve progesteron hücrel aktivitelere ilgili reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Östrojenin östrojen reseptörüne (ER) bağlanmasının ne kadar etkili şekilde gerçekleştiği ER'nin ortamdaki konsantrasyonu ile belirlenebilir. E2, ER'ye affinitesi en fazla olan östrojendir. Kansere hücrelerinde olan östrojen reseptörü miktarı, doğal bir hücrede olan östrojen reseptörü miktarından kayda değer seviyede yüksektir [28].

### 2.6.1 Östrojen Reseptörü

Östrojen nükleer transkripsiyon faktörleri olarak işleyen özgü reseptörleri aracılığıyla meme hücrelerine bağlanarak etki eder. İki tür östrojen reseptörü bulunmaktadır; ER $\alpha$  ve ER $\beta$ . ER $\alpha$  ilk izole edilen östrojen reseptörüdür ve özellikle meme, uterus ve overlerde ifade edilir. ER $\beta$  ise daha yaygın olarak eksprese edilir, aynı zamanda meme kanseri ile ilişkisi net değildir [29]. Meme kanserlerinin yaklaşık %71 kadarı östrojen reseptörü ifade eder (ER pozitif); bu tümörler ER negatif olanlara göre daha yavaş çoğalma ve daha iyi diferansiyasyon eğilimindedirler. Bu yüzden antiöstrojen tedavinin adjuvan kullanımı tekrarı önlemede, metastaz varlığında ise sağkalımı uzatmada etkilidir [30].

Östrojen Reseptörü *alfa* (ER $\alpha$ ) kromozom 6q bulunan, hormon bağımlı meme karsinogenezinde en önemli büyüme faktörü reseptörüdür. Östrojen, DNA hasarına neden olarak tümör başlatıcı olarak davranır. Östrojen reseptörleri gen transkripsiyon aktivasyonuna yol açarak hem östrojen bağımlı hem östrojen bağımsız mekanizmalar ile gen ekspresyon düzenlenmesi yaparlar. Bu da hücre proliferasyonu ile sonuçlanır. ER $\alpha$  gen overekspresyonu meme kanserinin erken evrelerinde sıklıkla saptanır [31]. Bu yüzden östrojen meme kanseri ile en çok ilişkili hormondur.

## 2.6.2. Östrojen Hormonu Etki Mekanizması

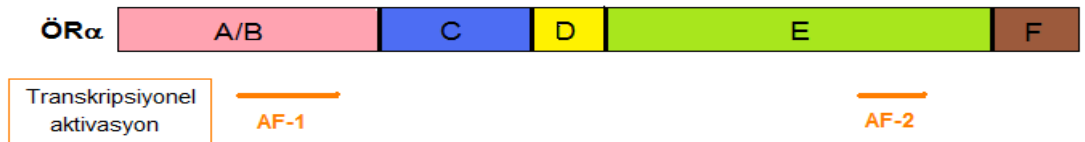
Hormonların işlevlerinin etkili olabilmesi için spesifik reseptörlerine bağlanmaları gerekir. Östrojenler mekanizmalarını, transkripsiyonel faktörler ile gösterirler [36-38].

Östrojen reseptörleri hücre içi reseptörlerin bir üyesidir ve  $17\beta$ - östradiol hormonuyla aktifleşirler [32,33]. Östrojen, çekirdekteki reseptör proteinine bağlanarak dokuya has fizyolojik cevapları tetikler [40].  $ER\alpha$  ve  $ER\beta$  şeklinde iki çeşidi bulunur. İki proteininin de DNA bağlanma bölgesi benzerliğine karşın, molekülün totaldeki amino asit benzerlik oranı azdır. Örnek olarak ligand bağlanma bölgesinde %56'lık bir benzerlik vardır. Sonuç olarak farklı ligandlar iki reseptör proteinine farklı bağlanma afinitesi gösterir [42-44].

Kanda bulunan östrojen hormonu hücre içine zardan hızlı difüzyon yoluyla giriş yapar, spesifik reseptörüne bağlanarak dimer oluşumunu sağlar. Arkasından protein sentezi ve hormonun hücresel cevabına sebep olan mRNA sentezi gerçekleştirilir. Östrojen reseptörlerinin yarılanma ömrü 3-5 saat olur. Yaklaşık olarak 5 saatte bağlanma kapasiteleri azalış gösterir. Bu yüzden östrojen, etkisini aralıksız gösterebilmesi için devamlılığı gerekir [39,40].

## 2.6.3 Östrojen Reseptörü Alfa ( $ER\alpha$ )

$ER\alpha$  'yı 1958'de Elwood Jensen tanımlamıştır. 1985 yılında ilk kez rahimden klonlandığı güne kadar östrojen reseptörleri oositte ve granuloza hücrelerinde tanımlanmıştır.  $ER\alpha$  595 amino asitten oluşmuştur ve 66 kilodalton ağırlığındadır [44].



Şekil 2. 9 ESR  $\alpha$  proteinin işlevsel bölgeleri [40]

AF-1: aktivasyon işlevi 1, AF-2: aktivasyon işlevi 2

- A ve B kısımları çekirdek reseptör ailesinde değişken bir bölgedir. Sahip olduğu AF-1 yoluyla bir genin ekspresyonunu hücreye özgü şekilde düzenlenler [46].
- C Bölgesi; ER $\alpha$  proteininin DNA'ya bağlanma bölgesidir
- D Bölgesi; DNA bağlanma bölgesini ligand bağlanma bölgesi arasındaki 40-50 amino asit içeren bölgedir.
- E Bölgesi; Ligand bağlanma bölgesini ve AF-2'yi içerir. Ayrıca dimerizasyon ve reseptör proteinin çekirdek yerleşiminden de sorumludur.
- F bölgesi; Karboksil uçtaki F bölgesi, ER $\alpha$  proteininin gen aktivasyon kapasitesine katkı sağlar. [47,48].

#### **2.6.4. Östrojen Reseptörü Beta (ER $\beta$ )**

ER $\beta$  (Östrojen Reseptörü Beta) yumurtalık, merkezi sinir sistemi, akciğer, prostat, kolon ve bağışıklık sisteminde ifade edilir [50]. ER $\beta$ , nükleer reseptör ailesinin bir grubu ve 530 aminoasitten oluşan proteindir [51]. Heterodimerik yapısı sebebiyle östrojen sinyalizasyonunda daha fazla dominant özelliği olan bir düzenleyicidir. ER beta, meme glandlarında duktus oluşumunda görev almaz fakat heterodimerizasyon sonrası transaktivasyon fonksiyonunu engel olarak ER alfanın aktivitesini önlemektedir. Bundan dolayı antiproliferatif bir gen olduğu belirtilmektedir [52].

### **2.7. Meme Kanseri Hücre Hatları**

#### **2.7.1. MDA-MB-231 Hücre Hattı Özellikleri**

MDA-MB-231 hücreleri 51 yaşındaki meme adenokarsinomaya sahip bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir [53,54]. Anormal bir karyotipe sahip olan hücre hattı anöploid yapıdadır. Karyotip analizinde kromozom sayılarının triploide yakın değerlerde [55] olduğu gözlenmiş, az miktarda normal ve az sayıda kromozoma sahiptir. N8 ve N15 kromozomları mevcut değildir. Bu kromozomlar sitogenetik analizlerde markır olarak kullanılmaktadır. Karyotip analizleri, hücre populasyonunun kromozom sayısı ve yapısı bakımından homojen olmadığını göstermiştir [56]. Meme kanseri hücrelerinin belli özelliklerini modelleyen bu hücre hattı, invaziv kanseri *in vitro* koşullarda çalışılmak için

oldukça uygun bir modeldir. ER negatif olan MDA-MB-231 hücreleri normal meme hücrelerinin gösterdiği özelliklerini kaybetmiştir [57,58]. MDA-MB-231 hücrelerinde meydana gelen bu değişimler, tümör ilerlemesi, metastaz oluşumu ve programlı hücre ölümüne direnç kazanmasıyla ilgilidir [59].

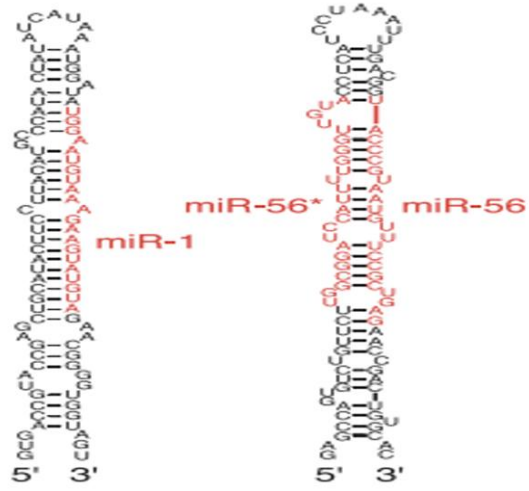
### **2.7.2. MCF-7 Hücre Hattı Özellikleri**

MCF-7 hücreleri, 63 yaşındaki 4.seviye duktal karsinomalı bir kadından 1970 yılında elde edilmiştir. Bu tarihten itibaren, östrojen reseptörü pozitif (ER+) MCF-7 hücre hattıyla yaklaşık 12.000 çalışma yapılmıştır. Epitelyal yapıdadır ve çoğalma faktörü bağlanma proteinlerini üretir [61-63]. MCF-7 hücrelerinin hücre analizlerinde; kromozom sayılarındaki normal olmayan bir artış ve azalış görülür [26]. Yanlış eşleşmiş bazların tamirinde görevli olan onarım proteinleri MCF-7 hücrelerinde mutasyona uğradığından, hücreler antikanser ilaçlarına karşı direnç geliştirir[65]. Özetleyecek olursak DNA onarım genlerindeki mutasyonlar veya tamir proteinlerinin az ya da aşırı ifadesi, direnç gelişiminde bir etkidir [60]. Meme kanseri ve diğer kanserlerin oluşumunda, hücre döngüsü kontrol noktalarından siklin D1'de oluşan mutasyonlar MCF-7 hücrelerinde de vardır [62]

## **2.8. Mikro RNA**

### **2.8.1. MikroRNA'ların Yapısı ve Keşfi**

İnsanlarda transkripsiyonların %97'sini kodlanmayan RNA'lar oluşturur. Protein olarak non-coding RNA'ları oluşturan genler ise ncRNA olarak adlandırılır [64,65]. RNA, başka RNA'ların özel olarak tanınmasında işe yarayan bir moleküldür. Evrimsel olarak belli durumlarda, ncRNA'ları proteinlerden daha avantajlı olabilirler [67,68]. İki adet küçük RNA tipi vardır: MiRNA'lar ve siRNA'lardır.miRNA ve siRNA'lar biyokimyasal olarak ayırt edilemezler. MikroRNA'lar genomda intron veya ekzon bölgelerindeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat ekspre edilmeyen RNA molekülleridir [70].



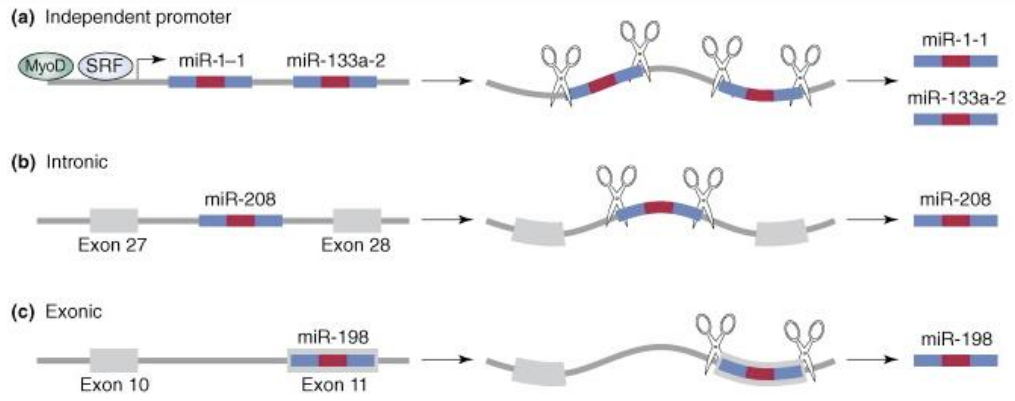
Şekil 2. 10 miRNA ların yapısı [71]

DNA tarafından transkripsiyonu yapılan fakat protein ekspresyonu olmayan genler miRNA'yı kodlar. Hedef gen miRNA'ya düşük spesifiklikle bağlanır, Bu şekilde mRNA yıkımına sebep olabileceği için gen ifade edilmesinin kontrolünde kilit rolleri vardır [72,73]. Bazı miRNA'ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör progresyonu, metastazı miRNA'ların düzenleyici olduğunu gösterir [74-76].

### 2.8.2. MiRNA'ların Organizasyonu

miRNA'ların bulunduğu bölgeler, onların gen ekspresyonlarını ve işlevlerini etkiler. MikroRNA'lar kromozomlar üstünde tek ya da kümeli halde bulunurlar. Sadece Y kromozomu üstündeki miRNA'lar belirlenememiştir. miRNA'lar çoğunlukla küme şeklinde yerleşir [77]. miRNA'lar intergenik ve intronik olarak - sınıflandırılırlar [79,80].





Şekil 2. 11 Mikro RNA ların genomik organizasyonu [75]

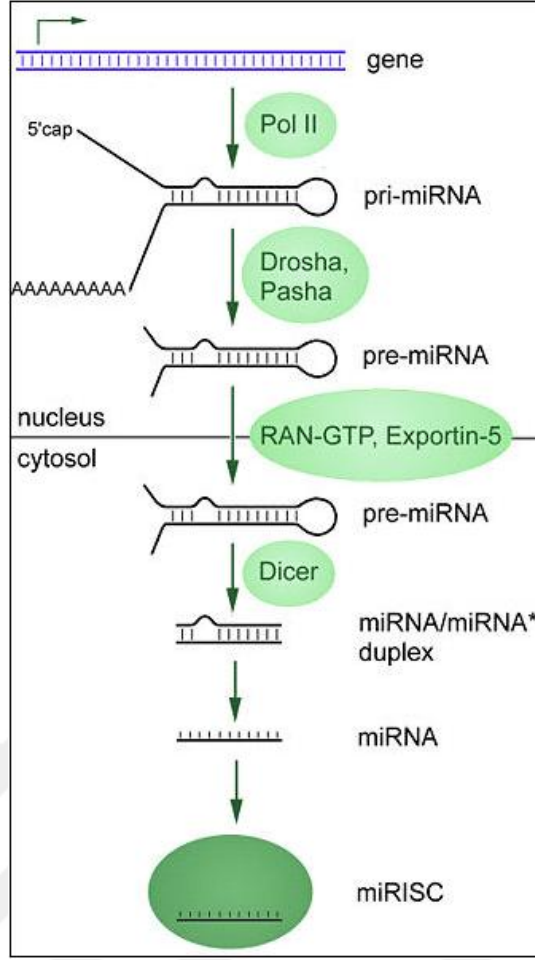
### 2.8.3. Mikro RNA'ların Biyogenezi

MiRNA'lar birbirini takip eden üç adımlı işlemle oluşmaktadır. Birinci adımda mikroRNA genleriyle primer miRNA transkripsiyonu olur. İkinci adımda primer miRNA'lar, pre-miRNA'lara çekirdekte dönüşür. Son adımda olgun miRNA'lar sitoplazma da oluşur [80,81].

MiRNA'lar, pri-miRNA olarak RNA-polimeraz II enzimiyle genomik DNA'dan meydana gelir. Primer miRNA cap ve poli A kuyruğuna sahiptir. Çekirdekte primer mikroRNA, RNAaz III enzim ailesinden “Drosha” ile kofaktörü “Pasha” tarafından premiRNA'a dönüşür [41]. Drosha ve Pasha mikro işlemci kompleksi oluşturur [82,83].

Exportin 5 prekürsör miRNA'yı sitoplazmaya taşır. Sonra, premiRNA'lar sitoplazmanın içinde “Dicer” adında bir enzimle kesilir. 18-25 nükleotidlik çift zincirli miRNA'ya dönüştürülür [83,84,85]. Dicer, eş zamanlı RISC oluşumunu tetikler.

Dicer, pre-miRNA'nin sap-ilmliğini keser. Bu iplik, kılavuz ipliği şeklinde isimlendirilirken diğeri ise yolcu iplik şeklinde isimlendirilir. MiRNA'lar, RISC'e bağlandıktan sonra, mRNA'yı yıkarlar veya protein ifadesini baskırlarlar [86,87,88].

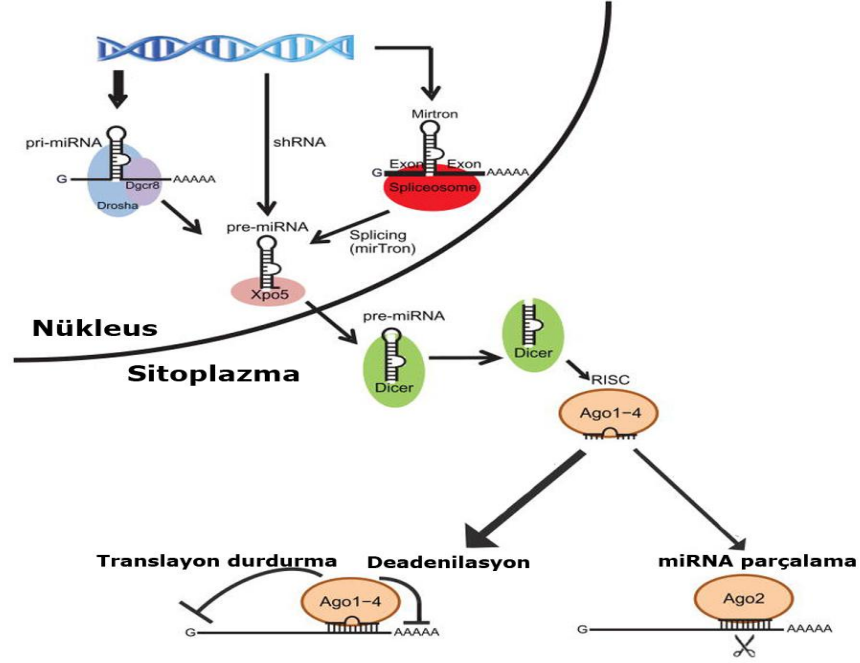


Şekil 2. 12 MiRNA'ların Biyogenez Aşamaları [85]

#### 2.8.4. miRNA Etki Mekanizması

MiRNA'lar birden fazla geni kontrol edebilirler

- Hedef mRNAların 3' untranslated region (UTR) bölgelerine inkomplet hibridizasyon
- mRNA degradasyonu
- Protein sentezinin inhibisyonu
- Hedef mRNA'nın deadenilasyonu [89]



Şekil 2. 13 miRNA etki mekanizması [86]

MikroRNA'lar hedef genlerin ifadesini azaltırlar. Böylece protein sentezinin düzenlenmesinde rol oynarlar. MiRNA'lar kendilerine komplementer hedef genleri tanırlar. MikroRNA'lar, RISC'le kompleks oluştururlar. Baz çiftleşme özelliğiyle mRNA'ya bağlanarak protein translasyonunu inhibe eder ve mRNA'yı yıkar [90].

MiRNA, hedef mRNA'daki 3' ucu UTR bölgesine bağlanır. 3 ucu UTR bölgesine bağlanması, eksik komplementerliği getirir ve translasyonun inhibisyonuyla sonuçlanmaktadır [91,92].

### 2.8.5 Mikro RNA Kanser ilişkisi

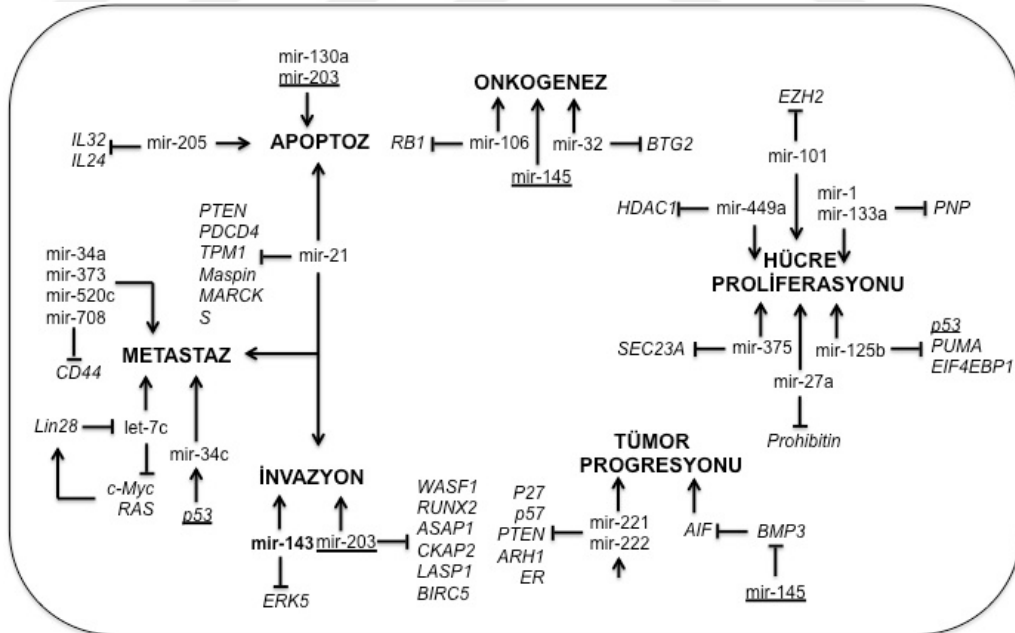
Hücrelerin normal dışı çoğalmaları ve apoptoz fonksiyonlarını kaybetmeleri genellikle kanserleştiğinin belirtisidir. MiRNA'lar hücre çoğalmasının ve apoptozun etkili molekülleridir [92]. Kanser oluşumunda miRNA regülasyon bozukluğunun rolü büyüktür. MikroRNA'lar ve kanser arasındaki ilk ilişki 2002 yılında Calin ve ark tarafından keşfedilmiştir [93].

Calin ve arkadaşları, 2004 yılında yayımladıkları diğer bir raporda, insan mikroRNA genlerinin kanserle ilişkisini araştırmışlardır. 185 tane mikroRNA geninin DNA üstündeki lokasyonu haritalanmıştır [94]. MikroRNA genlerinin

genellikle, heterozigotluğun olmadığı bölgelerde mevcut olduğu belirlenmiştir. Bu bölgeler kopluyamanın az olduğu bölgelerdir [46].

2003 yılında Michael ve arkadaşlarının çalışmasında, insanlarda oluşan katı tümörlerde, normal dokulara kıyasla ifadenme seviyeleri değişmiş olan mikroRNA'lar mevcuttur [46]. Zamanla mikroRNA'daki bu değişiklik meme kanserinde [45], lenfomada [48], beyin tümörlerinde [49], tiroid kanserinde [50], akciğer kanserinde [51], prostat kanserinde [52] farkedilmiştir.

Mikro RNA'lar, bazı özelliklerine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı özellik kazanabilir. İşlevleri bir onkogen ifadesinin kontrolü olan bu mikroRNA'lar "tümör baskılayıcı" olarak ifade edilir. Bu yüzden tümör süpressör mikroRNA'ların ifadesinin azalması onkogen ifadesini artırır ve tümörleştirir. Aksi durumda onkomir şeklinde adlandırılan mikroRNA'lar ise kanserin gelişimini arttırır. Bu miRNA'lar bir tümör baskılayıcının inhibisyonunu sağlar. MiRNA'lar, onkogen veya tümör baskılayıcı mRNA'ları hedefleyebilir. Sonuç olarak, miRNA'nın gerçek işlevi tümör süpressör miRNA ya da onkogen miRNA içeriğine bağlıdır [45].



Şekil 2.14 miRNA ve kanser ilişkisi [92]

Onkogen olarak işlevlenen mikroRNA miktarındaki artış tümör oluşumuyla sonuçlanır [62,63]. Özet olarak yanlış doku ve zamanda mikroRNA ifadesindeki

artış, miRNA ve tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu inhibe eder. Bu şartlar kanserleşmeye sebep olur [64].

#### **2.8.5.1. Tümör Baskılayıcı MiRNA'lar**

MiRNA'ların kanserleşmeye katkısı ilk olarak 2002 yılındaki bir çalışmada miR-15 ve miR16'nın keşfi ile ortaya çıkmaktadır [17]. MiRNA'ların çalışma prensibi ise 2005 yılında Cimmino ve arkadaşlarının yayımladıkları raporla ortaya çıkmaktadır [96-98]. Bu 2 mikroRNA'nın ifade düzeyleri lenfositik lösemi hücrelerinde, anti apoptotik Bcl-2'nin üretimi ile ters ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Bu mikroRNA'ların seviyelerinin düşmesi anormal hücre büyümesine sebep olmaktadır. Seviyelerinin yükselmesi ise apoptozla alakalı olduğunu göstermektedir [55]. Normal seviyelerinin kontrol dışı hücre proliferasyonunu engellediği keşfedilmiştir [54,55].

#### **2.8.5.2. Onkogenik mikroRNA'lar**

Onkogenik mikroRNA'lar genellikle kanser çeşitlerinde kontrol dışı bölünmeyi arttıran yani anti-apoptotik işlev göstermektedirler [100]. Örneğin miR-155'in ifadesinin tavukta lösemi ve lenfoma oluşmasına neden olduğu görülmüştür. Çalışma sonuçlarına göre, miR-155'in meme , pankreas, akciğer ve lenfoma gibi kanser türlerinde miktarı fazladır [101-103].

Bir onkogen olan miRNA ise miR-21'dir. MiR-21'in glioblastoma gibi hematolojik tümörlerde miktarı yüksektir. Ayrıca pankreas, prostat, mide, kolon, ve karaciğer kanseri gibi kanser çeşitlerinde fazla miktarda ekspresyon gözlenmektedir []. Şu aralar, kolorektal kanserlerde miR-21'in, PDCD4'ü baskıladığı, böylece invazyon ve metastaza sebep olduğu belirlenmektedir [59,60].

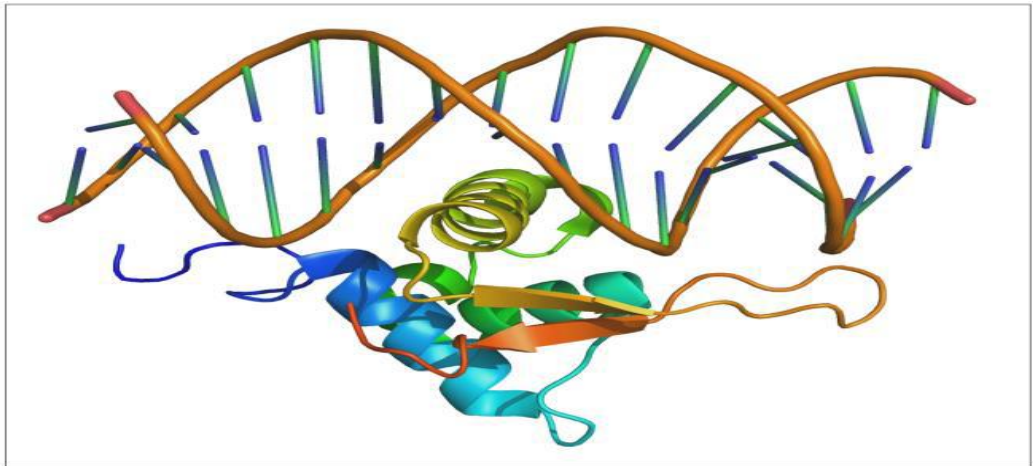
Doku/Tümör Tipi	Artmış Ekspresyon	Azalmış Ekspresyon
Meme	miR21,miR29b2	miR125b,miR145,miR10b,miR155,miR17-5p,miR27b
Ovaryum	miR141,miR200(a-c),miR221	Let-7f,miR140,miR145,miR199a, miR424
Endometrium	miR103,miR107,miR185,miR205,miR210,miR449	miR99b,miR152,miR193,miR204,miR221,let-7i,miR181(a-c)
Glioblastoma	miR221,miR21	miR181(a-c)
Lenfoma	miR155,miR17-92clusteri,miR10a	mir15a
Kolorektal	miR20a,miR24-1,miR29b-2,miR31	miR143,miR145,let-7
Tiroid	miR221,miR222,miR146,miR181b,miR197,miR346	
Hepatoselüler	miR18,miR224	miR199a,miR195,miR200a, miR-125
Testiküler	miR372,miR373,miR221,miR376a, miR301	
Pankreatik	miR21,miR24-2,miR100, miR103-1,miR107,miR125b1	miR375
Prostat	let7d,miR195,miR203	miR128a
Gastrik	miR-223,miR21,miR-1032	miR-218-2
Akciğer	miR17-92clusteri,miR17-5p	let-7 ailesi

**Tablo 2. 4** İnsan malignan tümörlerindeki miRNA ekspresyon profilindeki değişiklikler [62]

## 2.9. FoxO Transkripsiyon Faktörleri

FoxO transkripsiyon faktörleri, büyük bir protein ailesi olan “Forkhead” ailesinin üyelerindedir. Aile bu ismi, *Drosophila*'daki bu genin mutasyonu sonucunda oluşan çatal benzeri ektopik baş yapısı oluşumundan dolayı almıştır [66]. FoxO proteinleri nükleusta görev yapan transkripsiyon faktörleridir ve monomer olarak aynı türdeki hedef DNA sekanslarına bağlanırlar [67].

FoxO ailesi diğer üyelere göre, DNA bağlanma bölgesinde bazı farklılıklar gösterdiği için İngilizce’de “diğeri, öteki” anlamına gelen “other” kelimesinin ilk harfi kullanılarak adlandırılmıştır. FoxO proteinlerinin bir diğer ayırt edici özelliği ise, oldukça korunmuş Akt fosforilasyon bölgelerinin bulunmasıdır [67,68].

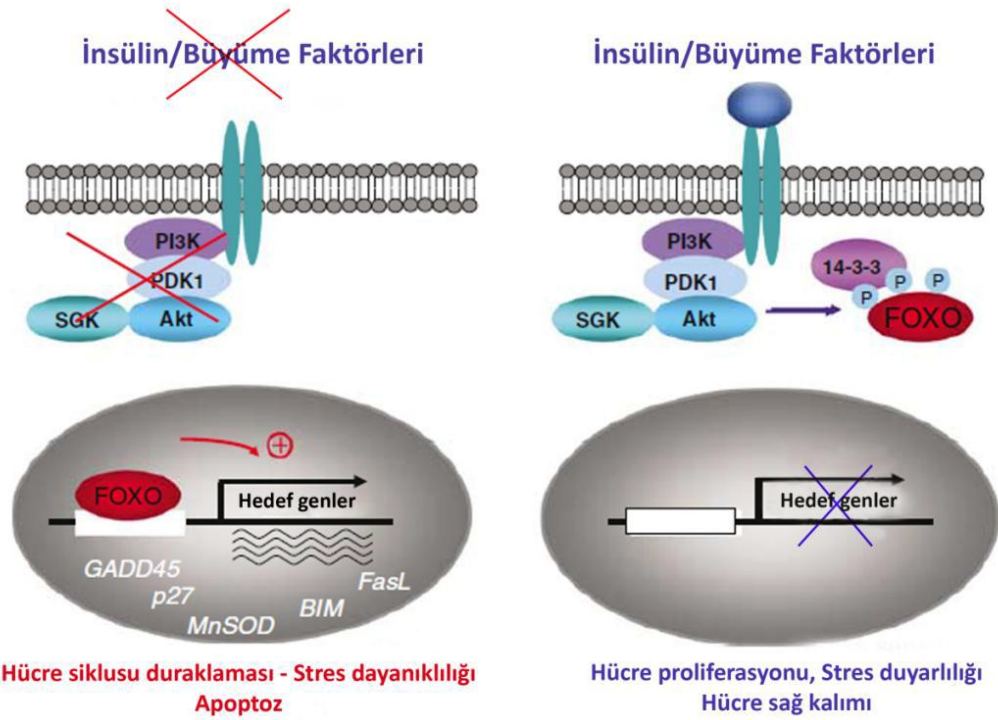


**Şekil 2. 15** FoxO1’in DNA üzerindeki yerleşimi [68]

FoxO özellikle yağ, beyin, kalp, karaciğer, akciğer, over, pankreas, prostat, iskelet kası, dalak, timus ve testis gibi memeli dokularında eksprese edilir [68]. FoxO alt ailesi (FOXO1, FOXO3, FOXO4 ve FOXO6) DNA hasar ve tamirine yanıt, apoptoz, metabolizmasının düzenlenmesi, hücre çoğalması, stres toleransı ile ilgili hedef genleri düzenler [69,70].

### 2.9.1.FoxO Transkripsiyon Faktörleri ve PI3K/Akt Sinyal Yolağı İlişkisi

FoxO ailesini FOX ailesinden ayırt eden önemli bir özelliği, insülin- PI3K/Akt sinyal yolağı tarafından düzenlenmeleridir [67]. FoxO proteinleri, insülin/büyüme faktörleri stimülasyonu ile Akt tarafından doğrudan fosforillenirler ve sonucunda inhibe edilirler [70]. FoxO proteinleri, transkripsiyonel gen aktivasyonu görevlerini nükleusta gerçekleştirebilen moleküllerdir. Önemli olarak Akt, FoxO proteinlerine 14-3-3 şaperon proteinlerini bağlayarak fosforile eder ve FoxO proteinlerinin nükleustan sitoplazmaya taşınmasına ve inaktivasyonuna neden olur. Bunun sonucunda FoxO hedefindeki ve kontrolündeki gen ekspresyonları gerçekleşmez. PI3K/Akt yolağı inaktifken, Foxo proteinleri nükleusa yerleşirler ve transkripsiyonel aktivasyonlarını başlatabilirler [69,70].



Şekil 2. 16 İnsülin/ Büyüme Faktörleri tarafından FOXO transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi [70]

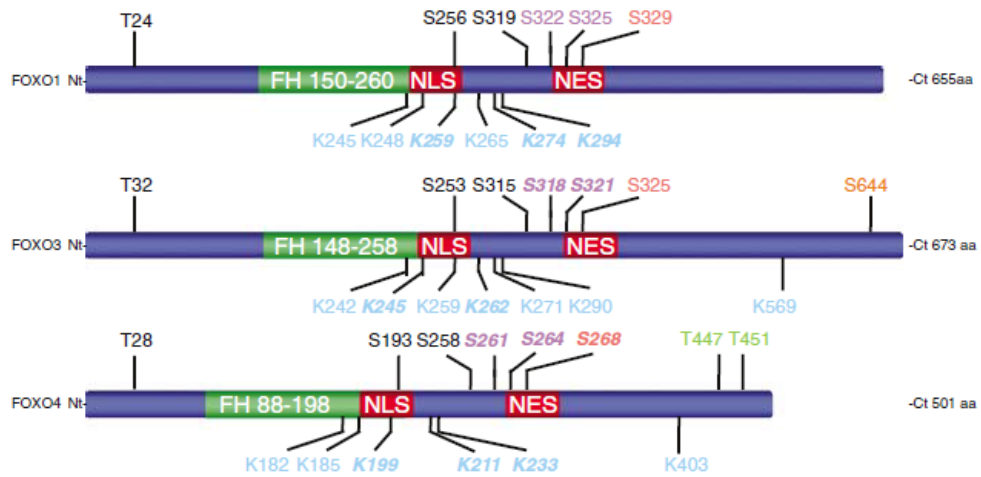


## 2.9.2.FoxO Moleküllerini Kontrol Eden Mekanizmalar

FoxO'ların aktivitesi; fosforilasyon, asetilasyon ve übikütilasyon içeren posttranslasyonel modifikasyon mekanizmaları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir [70].

### 2.9.2.1 Fosforilasyon mekanizması

FoxO transkripsiyon faktörleri, pek çok farklı molekül ile farklı bölgelerinden fosforile olabilmektedirler (Şekil 2.17).



Şekil 2. 17 FoxO ailesi üyelerinin asetilasyonu ve fosforilasyon alanlarının gösterildiği çizim [69].

Akt alanları (siyah); serum ve glukokortikoid indüklenebilir kinaz (SGK, (siyah)); IκB kinaz β (IKKb, (turuncu)); Jun N-terminal kinaz (JNK, (yeşil)); çift özgün tirozin fosforillenmiş ve düzenlenmiş kinaz (DYRK, (kırmızı)); kazein kinaz 1 (CK1, (mor)); asetilasyon alanları (mavi); FH, Forkhead domain; NLS, nükleer lokalizasyon sinyalleri; NES, nükleer export sekansı.

FoxO1, treonin 24, serin 256 ve Ser319; FoxO3, Thr32, Ser253 ve Ser315; FoxO4, Thr28, Ser193 ve Ser258 olmak üzere Akt tarafından üç bölgeden fosforillenirler [71].



### **2.9.2.2. Asetilasyon mekanizması**

FoxO transkripsiyon faktörlerinin bir diğer regülasyon mekanizması olan asetilasyon, FoxO moleküllerinin nükleusta iken koaktivatör ya da korepresör komplekslerine bağlanmasıyla gerçekleşir [62]. FoxO molekülleri, transkripsiyonel koaktivatör CBP (CREB- bağlayıcı protein)'e ya da p300'e bağlanır ve böylece bu transkripsiyonel düzenleyiciler ve temel transkripsiyonel sistem arasındaki ilişki sağlanır [63-65]. Böylece asetilasyon yoluyla FoxO transkripsiyon faktörleri düzenlenmiş olur.

### **2.9.2.3. Ubikitinasyon mekanizması**

FoxO proteinlerinin düzenlenmeleri geri dönüşümlü şekilde kontrol edilmesine rağmen, yıkımları geri dönüşümsüz bir şekilde gerçekleşir. FoxO proteinlerinin yıkımı, ubiquitin- proteazom sistemleri tarafından gerçekleştirilir [71].

Akt aktivitesi, FoxO1 ve FoxO3 proteinlerinin ubiquitin aracılı degradasyonu için gereklidir [72, 73]. Üç adet Akt fosforilasyon alanlarının arasında Ser256 fosforilasyonu, FoxO1 ubiquitinasyonunu tetikleyen temel olaydır [73].

### **2.9.3. FoxO Moleküllerinin Hücresel Süreçlerdeki Rollerini**

FoxO transkripsiyon faktörlerinin; apoptoz düzenlenmesi, hücre döngüsünün duraklaması, oksidatif strese direnç, DNA onarımı, enerji dengesi ve hücre farklılaşması şeklinde farklı süreçlerde rolleri vardır [74,75,76]. FoxO, FasL ve TRAIL gibi ölüm sitokinlerinin transkripsiyonunu ve apoptoz öncesi Bcl2 ailesinden olan "Bim" molekülünü aktive ederek apoptozu başlatabilir [77,78]. Hücre siklus inhibitörü olan p27kip1 molekülünün uyarılmasını sağlayarak, hücre siklusunun durmasına neden olabilir [79]. Hücresel farklılaşma sürecinde FoxO ailesinde farklı izoformlar bulunur. Bu izoformlar hücre türüne bağlı olarak, farklılaşma inhibe edici ve destekleyici fonksiyonları bulunmaktadır [81].

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Maddeler

MDA-MB231 hücre hattı	ATCC (HTB-26)
MCF7 hücre hattı	ATCC (HTB-22)
Anti-MiR144	Life Technologies
DMEM	Sigma
DMSO	Sigma
FBS	Gibco
%25 Trypsin-EDTA (1X)	Gibco
Penicilin-Streptomycin (10.000 units)	Sigma
DPBS	Sigma
MTT Testi Vybrant	Invitrogen
Kemilüminesans Reaktif	Santa Cruz
Primer antikorlar	Santa Cruz
Sekonder antikorlar	Santa Cruz
BSA	Capricorn

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Laminar Kabin	Bilser Biosafety Cabinet
CO <sub>2</sub> İnkübatör	Nüve EC 160
ELISA	Biotek
qPCR	Applied Biosystems Step One Plus
Western Blot	Bio-Rad ( Semi-Dry Transfer Cell)
Western Blot Görüntüleme Sistemi	Syngene G:Box
Mikroskop	Zeiss Axio Vert A.1

#### 3.3. Hücre Kültürü

Çalışmalarda meme kanseri hücre hatları olan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücresi kullanılmıştır. Çalışmaların temelinde miR144 ve FOXO1 arasındaki ilişkinin meme kanseri hücrelerine etkisi incelenmiştir.

### 3.3.1. Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 25cm<sup>2</sup>' lik flasklara ekilmiştir. Hücre kültürü ortamı olarak % 10 FBS, Penicilin-Streptomycin (100 ünite), L-Glutamine ve NaHCO<sub>3</sub> içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 37 °C' de, % 95 nem ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılıp çoğaltılmışlardır. Hücrelerin büyüdüğünde farklı ortama geçirmek için pasajlanmıştır. Pasajlamada, önce DMEM medyum çekilip FBS' i ortamdan uzaklaştırmak için DPBS ile yıkandı. Sonra hücreleri flasktan kaldırmak için Tripsin-EDTA çözeltisi ekleyip CO<sub>2</sub> etüvünde yaklaşık 1 dakika tutulmuştur. Tripsin-EDTA' nın aktivitesini durdurmak için FBS içeren medyum konulmuştur. Hücreler falkon tüpe toplanıp oda sıcaklığında 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atılıp çöken pellet medyunda süspande edilip yapılacak işleme göre hücre kültür platelerine ekim yapılmıştır.

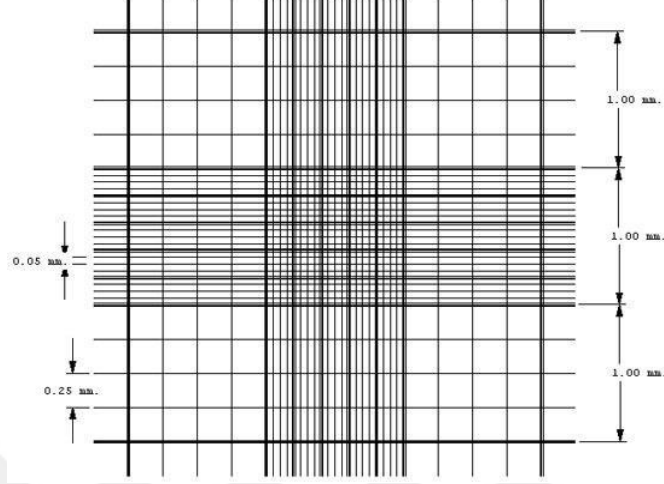
### 3.3.2. Hücre Sayımı

Yapılan çalışmalarda 96 kuyucuk, 12 kuyucuk, 6 kuyucuk plate ler kullanılmıştır. Plate lere ekim yapılmadan önce her kuyucuğa belli sayıda hücre ekebilmek için hücreyi pasajlandıktan sonra Tripan Mavisi ile boyayıp Thoma Lamında (Iso Lab) hücre sayımı yapılmıştır.



Şekil 3. 1 Hücre sayımı yapılan Thoma Lamı

Thoma lamı yönteminin esası, mikroskop altında  $0.1 \text{ mm}^3$  hacimde sayım yapılarak hesaplama yardımıyla numunenin bir mL' sinde bulunan hücre sayısını belirlemektir.



Şekil 3. 2 Thoma lamında sayım yapılan karelerin toplamı

Bu işlem için Thoma lamı üzerinde bulunan sayım bölgelerinden faydalanılır. Sayım bölgesinin toplam alanı  $1 \text{ mm}^2$  dir. Lamel yapıştirıldığında sayım bölgesinin yüksekliği de  $0.1 \text{ mm}$ ' dir. Sayım işlemini kolaylaştırmak amacıyla her bir sayım bölgesi de kendi içerisinde karelere bölünmüştür.

Sayım için;  $10 \mu\text{L}$  hücre süspansiyonu,  $15 \mu\text{L}$  PBS,  $25 \mu\text{L}$  Tripan Mavisi karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra Thoma Lamına  $10 \mu\text{L}$  yüklenerek ışık mikroskobunda sayım yapılır. Böylece ölmüş hücreler metilen mavisikle boyanmakta, canlılar ise boyanmamaktadır. Sadece boyalı olmayan hücreler sayılır ve böylece canlı hücre sayımı gerçekleştirilmektedir. Thoma Lamındaki 16 kareli olan 4 bölgede ayrı ayrı sayım yapılarak bu 4 bölgenin ortalaması alınır. Seyrelme faktörü de dikkate alınarak mL başına düşen hücre sayısı hesaplanarak her bir kuyucuğa ekilecek olan hücre miktarı belirlenmiştir.

### 3.3.3. Hücrede MikroRNA İzolasyonu

Hücrelerden miR-144 izolasyonu Mikro Total RNA İzolasyon Kiti (mirVana MiRNA Isolation Kit Life Tech AM1560) kullanılarak prosedüre göre yapılmıştır. Hazır primerler kullanılarak Mir-144 (Origene HP300157) düzeyleri ölçülmüş, Mir-191 (Origene HP300203) kontrol gen olarak kullanılmıştır.

- 1) Protokolde olan solüsyonlar uygun şekilde hazırlandı.
- 2) 6 well plateteki hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra 300 uL Lyzis tamponu eklendi.
- 3) Soğuk zincir kırılmadan hücreler ependorfa alınıp, pipetej yapıldı
- 4) Hücrelerin üzerine 1:10 hacimde homojenate Additive eklendi ve vortekslendi.
- 5) 10 dk. buz içine konuldu.
- 6) Üzerine Acid-fenol: kloroform eşit hacimlerde konuldu.
- 7) 1 dk. vortekslenip iyice karıştıktan sonra 5dk. 10,000xg de 25 °C de santrifüjlendi.
- 8) Üstteki sıvı faz yeni bir ependorfa alındı.
- 9) Bu faz üzerine 1:3 oranında %100 etanol konuldu ve vortekslendi.
- 10) Alınan örnek filtreye yüklendi.
- 11) 15 sn. 10,000xg de santrifüj edildi. Alttaki tüpte kalan kısmın üzerine 2:3 hacimde % 100 etanol konulup pipetaj yapıldı. Tekrar yeni bir filtreye yüklendi. (Not:küçük RNA'lar bu kısımda mevcut)
- 12) 15 sn. 10,000xg de santrifüj edildi alt kısım döküldü.
- 13) Filtre üzerine sırasıyla 700uL yıkama tamponu- konulup 15 sn. 10,000xg de santrifüj edilip yıkandı.
- 14) Filtrenin üzerine tekrar 500uL yıkama tamponu-2 konulup aynı şekilde yıkandı.
- 15) Yeni bir ependorfa filtredeki RNA 100 uL Elüsyon tamponu konularak 1 dk. inkübe edildi ve 30 sn.12,000xg de santrifüj edildi.
- 16) Nanodropta ölçüm alındı.

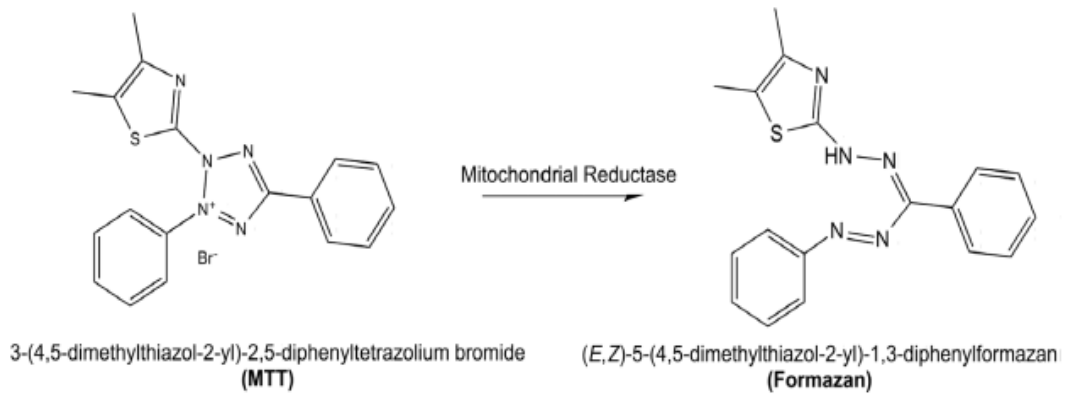
17) RNA'lar -20°C'de saklandı.

### 3.3.4. FOXO1 – Anti-miRNA Transfeksiyonu

Foxo1 ekspresyon plazmiti (pFOXO1) kullanılarak Foxo1 proteininin ekspresyonu sağlanmıştır. MiR-144 baskılanması için Anti-miR-144 oligonükleotid (Invitrogen) kullanılmıştır. Transfeksiyonda plazmid ve oligonükleotid birlikte ko-transfeksiyon yapılmıştır. Bunun için 12 kuyucuk plate MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ekilmiştir. Hücreler belirli bir sayıya ulaşıp playetlere yapıştıktan sonra 1ug DNA konsantrasyonu baz alınarak transfeksiyon reaksiyonu kurulmuştur. Transfeksiyonda plazmid ve oligonükleotid özel bir transfeksiyon reaktifi içerisindeki lipozomla (Lipofectamine 2000) kaplanarak hücre içine girişleri sağlanmıştır. Bunun için kullanılan ticari kitin protokolüne göre yapılmıştır. Transfeksiyonun gerçekleştiği 8-12 saat sonra mikroskopta hücreler kontrol edildi ve 24-48 saat inkübe edilmiştir.

### 3.3.5. MTT Testi

MTT testi (3-[4, 5-dimetiltiyazol-2-yil]-2, 5-difenil tetrazolyum bromür) hücrenin metabolik aktivitesini değerlendirmek için kullanılan bir kolorimetrik bir analiz yöntemidir. Hücreler, suda çözünen MTT' yi çözünür olmayan mor formazana dönüştürürler. Formazan daha sonra çözünür hale getirilir ve konsantrasyonu optik yoğunluk ile belirlenir.



Şekil 3. 3 MTT' den Formazan Oluşumu

Hücre canlılığının saptanması için MTT yöntemi kullanılmıştır. MCF7 ve MDA-MB-231 hücreleri 96 kuyucuk plate' e ekilmiştir. Hücreler plate yapışıp yaklaşık % 60 oranına gelince kuyu başına 0.1 µg DNA olacak şekilde transfeksiyonu yapılmıştır. Transfeksiyondan yaklaşık 12 saat sonra Anti-miR-144 ün 0.1 nM-100nM arasındaki değişen konsantrasyonlarda olacak şekilde uygulanmıştır. Uygulamadan 48 saat sonra 12 mM' lık MTT çözeltisinde 10 µL eklenip 4 saat 37°C'de % 5'lik CO<sub>2</sub> olan etüv içinde inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonra oluşan mor renkli formazan kristallerini çözmek için 0.01 M HCl ile çözülen SDS' ten 100 µL eklenip 37°C' de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonra oluşan mor rengin absorbansı 570 nm' de ELISA plaka okuyucu ile ölçülmüştür.

Deney sonunda uygulanacak kombinasyon için Anti-miR-144'in 20 nM doz tespit edilmiştir.

### 3.4. Hücrelerde Gen Anlatımının Kantitatif Analizi (Real Time - PCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile bir hücredeki genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilmektedir. Bu yöntem ile hücreden izole edilen genlere ait haberci RNA' ların (mRNA) seviyesini analiz etmeyi sağlar ve kantitatif bir inceleme yapmaya imkan verir. Burada yapılan qRT-PCR analizlerinde "SYBR green" metodu kullanılmıştır. Bu metotta polimeraz zincir reaksiyonu sırasında meydana gelen yeni DNA parçalarına bağlanan SYBR green boyası ışımaya yapar ve bu ışımaya qRT-PCR cihazı tarafından algılanıp ölçülür. RT-PCR analizlerinde SYBR green metoduyla analiz edilecek genlere (AKT, FOXO1, BAX, CYLIND1, ERα, ERβ, BCL-2, GAPDH) ait primerlerin dizileri literatürde önceden dizayn edildikleri biçimde sentez ettirilmiştir. Genler ve primerler Ensembl Gen Bankasından kontrol edilmiştir.

**Tablo 3. 1** Genlerin primer nükleotid dizisi ve uzunlukları

Gen	Primer	Primer Nükleotid Dizisi	Uzunluk
FOXO1	F	5'-TTATGACCGAACAGGATGATCTTG- 3'	102 bp
	R	5'-TGTTGGTGATGAGAGAAGGTTGAG-3'	

ER $\alpha$	F	5'-AGATCTTCGACATGCTGCTGGCTA -3'	170 bp
	R	5'-AGACTTCAGGGTGCTGGACAGAAA-3'	
ER $\beta$	F	5'-TGGGCACCTTTCTCCTTTAGTGGT -3'	90 bp
	R	5'-TCTTGCTTCACACCAGGGACTCTT -3'	
BAX	F	5'-GCCCTTTTGCTTCAGGGTTT-3'	82 bp
	R	5'-TCC AAT GTC CAG CCC ATG AT-3'	
BCL2	F	5'-GACAGAAGATCATGCCGTCC-3'	91 bp
	R	5'-GGTACCAATGGCACTTCAAG-3'	
AKT	F	5'-GGCCAGGTCATCACCATTG-3'	69 bp
	R	5'-GGATGTCCACGTCACACTTCA-3'	
CYLİND1	F	5'-ATGTTTCGTGGCCTCTAAGATA-3'	70 bp
	R	5'-CAGGTTCCACTTGAGCTTGTC-3'	
GAPDH	F	5'-AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3'	72 bp
	R	5'-CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3'	

### 3.4.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu

Hücrelerden total RNA izolasyonu PureLink RNA Mini Kit kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

- 1) 6 kuyucuklu plate de büyüyüp işlem gören hücreleri toplarken üzerine 500  $\mu$ l Lysis Buffer ve 5  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanol konuldu.
- 2) Örnekler +4°C' de 12,000x g' de 2 dakika santrifüj edildi.
- 3) Her bir örneğe 1:1 olacak şekilde (500  $\mu$ L) %70 etanol eklenip lizat homojenize edildi.
- 4) Bu aşamadan sonra oda sıcaklığında çalışıldı.
- 5) Lizat 2-3 kez pipetaj yapılarak kitin içindeki kartuşa konuldu ve 30 s 25°C' de 12,000xg' de santrifüj yapıldı.



- 6) Santrifüj sonrasında membranı yıkamak için 700 µl Yıkama Tamponu I konuldu, 1 dakika 12,000x g' de santrifüj yapıldı.
- 7) Santrifüj sonrası tüpün altında toplanan sıvı atılıp yeni toplama tüpü takıldı.
- 8) 500 µl Yıkama Tamponu II konulup 1 dakika 12,000x g' de santrifüj yapıldı.
- 9) 8. adım tekrar edildi.
- 10) Kartuşun tamamen kuruması yıkama tamponlarından kurtulması için kapakları açık 2 dakika 12,000x g' de santrifüj yapıldı.
- 11) Yıkama ve kurutma işlemlerinden sonra kolonların altına kit içerisinde çıkan eppendorf takılıp kolon üzerine 50 µl RNase-free su eklendi, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- 12) Kartuş 2 dakika 12,000x g' de santrifüj edilip eppendorfa toplanan RNA' lar buz üzerine alınıp -20°C' de saklandı.

### 3.4.2. Hücrelerden cDNA Sentezi

Hazırlanmış mRNA örneklerinde ilk olarak Nanodrop yardımıyla RNA miktarı tespit edildi. Applied BiosystemsKit ile prosedüre uygun olarak cDNA eldesi ticari kit prosedürüne uygun olarak yapıldı.

**Tablo 3. 2** cDNA sentezi reaksiyon içeriği

Total RNA	1 µg
2X Rt Buffer	10 µL
20X Enzyme Mix	1 µL
RNA Örneği	Max 9 µL
Nukleaz-Free H <sub>2</sub> O	(9-RNA hacmi) µL
Toplam Hacim	20 µL

PCR reaksiyonu için 60 dk 37 °C, 5 dk 95 °C olmak üzere inkübe edildi. Bitiminde hemen buza konularak cDNA örnekleri -20 °C de saklandı. cDNA örneklerinin bir kısmı dilüe edilerek qRT-PCR için hazırlandı.

### 3.4.3. Hücrelerde SYBR Green ile qRT-RCR

qRT-PCR ile gen ekspresyon deneyleri Applied Biosystems SYBR Green Master Mix kit kullanılarak prosedüre uygun olarak yapıldı.

2X SYBR GreenMaster Mix içeriği: 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), iTaq DNA polimeraz, 50 U/ml, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I, 20 nM fluoresan ve sabitleyici

**Tablo 3. 3** RT-PCR reaksiyon içeriği

SYBR Green Master Mix	10 µL
Forward Primer	1µL
Reverse Primer	1µL
cDNA	Max 8µL
Steril su	8-(cDNA hacmi) µL
Toplam hacim	20 µL

Örnekler özel mikro plaka kuyucuklarına yüklenerek ağızları sıkıca kapatıldı. Real Time-PCR cihazına Step One Plus' a yerleştirildi ve gerekli yazılımlar kullanılarak reaksiyon başlatıldı.

Hesaplamalar yapılırken referans gen, GAPDH geni kullanıldı. qRT-PCR'nın bütün aşamalarında pozitif kontrol olarak miktarı ve CT değeri bilinmekte olan cDNA ve negatif kontrol olarak ise distile su kullanıldı. Nükleik asitlerin amplifikasyonları qRT-PCR cihazı kullanılarak tabloda gösterilen döngülerin sıcaklık ve zamanlarına göre gerçekleştirildi.

**Tablo 3. 4** SYBR Green ile qRT-PCR şartları

1.Döngü	2.Döngü 50X			3.Döngü	4.Döngü	5.Döngü
94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	94 °C	55 °C	55 °C
5 dk	30 s	30s	30s	1dk	1 dk	10 s

Applied Biosystems Step One Plus kullanılarak yapıldı.

Amplifikasyon ürünleri optimizasyon aşamasında % 2 lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Elde edilen ürünlerin uzunluğu markır ile kontrol edildikten sonra qRT-PCR deneylerine devam edildi.

Mikro RNA 144'ün 3' ve 5' sekansları incelenmiştir ve 3' ucu inhibe edilmiştir.

3' mature microRNA      hsa-miR-144-3p      52-UACAGUAUAGAUGAUGUACU-71

5' mature microRNA      hsa-miR-144-5p      15-GGAUAUCAUCAUAUACUGUAAG-36

### 3.5. Hücrelerde Yapılan Western Blot Çalışmaları

Hücreler toplandıktan sonra patlatma tamponu kullanılarak buz içerisinde bekletildi ve patlamaları sağlandı. 12.000xg de +4 °C de santrifüj edilerek üst faz ile Western Blot çalışmaları yapıldı.

Hazırlanan çözeltiler:

4X Yığınlama jeli çözeltisi: 0.5 M Tris, % 0.4 SDS, pH: 6.8

4X Ayırma jeli çözeltisi: 1.5 M Tris, % 0.4 SDS, pH : 8.8

% 30 Akrlamit-bis çözeltisi

% 10 Amonyum Persülfat çözeltisi (APS)

% 10 SDS çözeltisi

TEMED

2X Örnek yükleme tamponu: % 4 SDS, % 20 gliserol, %10 β-merkaptolanol, % 0.004 bromfenol mavisi ve 0.125 M TrisHCl, (pH 6.8)

Elektroforez yürütme çözeltisi: 5 mM Tris, 38.4 mM Glisin, % 1 SDS

Transfer çözeltisi: 5 mM Tris, 38.4 mM Glisin, % 15 Metanol

Bloklama çözeltisi: % 3 yağsız süt tozu

TBST: 20 mM Tris, 154 mM NaCl, % 0.1'lik Tween 20

Primer antikor (1:500): (GAPDH (sc-25778), Bax (sc-7480), Bcl-2 (sc-492), Akt (sc-1618), CylinD1 (sc-753),Foxo1 (sc-11350), Era (sc-542), Erβ (sc-6822))

Sekonder antikor (1:1000): (HRP konjugatlı sc-2030, sc-2020)

Kemilüminesans Reaktif: Santa Cruz

Görüntüleme Sistemi: Syngene G:Box

**Tablo 3. 5** SDS-poliakrilamid jelin yoğunluğuna göre hazırlanışı

MADDE	% 4'lük Yığınlama Jeli	% 12'lik Ayırma Jeli
4X Yığınlama Çözeltisi	1.2 ml	-
4X Ayırma Çözeltisi	-	2.5 ml
% 30Akrilamid-bis	0.65 ml	4 ml
% 10'lük SDS	50 µL	100 µL
APS	25 µL	50 µL
Temed	5 µL	10µL
Distile su	3 ml	3.4 ml

Jeller hazırlanıp camlar arasında polimerleşmesi sağlandıktan sonra tanka yerleştirilir. İçerdikleri protein miktarları tespit edilen örnekler, 1:1 oranında hazırlanan örnek yükleme tamponu ile 5 dakika 95 °C kaynatıldı. Her kuyucuğa 25 µg/mL oranında protein içeren numuneler yüklendi. Bir kuyuya 5 µl standart (Intron, 24052) yüklendi. Elektroforezde numuneler ilk önce 100V 1 saat yürütüldü. Elektroforez sonrasında jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için yarı kuru sistemle immunoblotting yapıldı. PVDF membran %100 metanol ile ıslatılmış blotlama kağıdının üzerine yerleştirildi. Membran üzerine jel dikkatlice yerleştirilerek blotlama işlemi 300 mA de 1 saat gerçekleştirildi. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra membran 2 saat süre ile oda ısısında % 3' lik yağsız süt tozu ile blokladı. 2 saat sonra primer antikor ile +4 °C'de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübeye bırakıldı. İnkübasyon ardından TBST ile 3 kez 10 dk yıkandı. Membran, sekonder antikorda 25 °C'de shaker üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBST ile 3 kez 10 dakika yıkandı. Ardından kemilüminesans substrat içeren çözelti ile (SantaCruzImmunoCruz™ Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048) ile 1 dakika karanlıkta inkübe edildi. Görüntüleme sistemi ile elde edilen bandlar dansitometrik analiz yapılarak değerlendirildi. GAPDH örneklerdeki değişiklikleri elimine edebilmek için

dansitometrik analiz ve hesaplamalar referans protein olarak kullanıldı. Bandların dansitometrik analizi İmageJ (NIH, USA) programında yapıldı.

### **3.6. İstatistiksel Analiz**

Bu tez çalışmasında İstatistiksel analiz yönteminin seçimi ve uygunluğunun tespitinde normal dağılımlar araştırılmış ve SPSS 15.00 analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkın karşılaştırılması için OneWayAnova ve post-hoc test olarak Tukey testi kullanılmış, gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar ise student T testleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

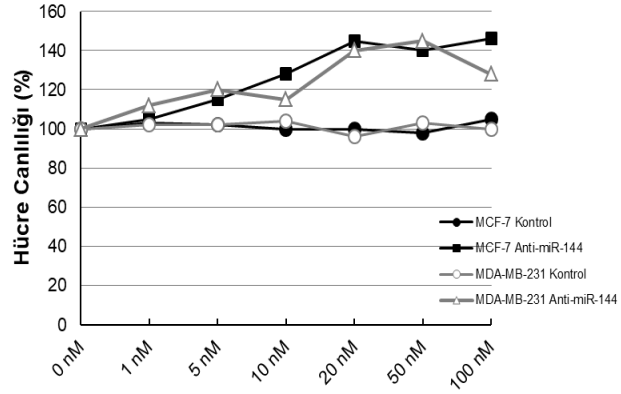


#### 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında meme kanseri hücre hatları olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine ait sonuçlar aşağıda yer almaktadır.

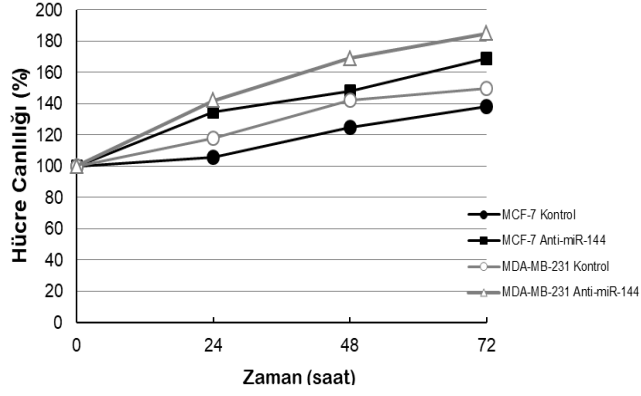
##### 4.1. Anti-miR-144' ün Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Meme kanser hücreleri MCF-7 ve MDA-MB-231 Anti-miR-144 ün (0-100nM) değişen derişimlerdeki dozlarında 48 saat inkübasyona bırakıldı.



Şekil 4 1 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Anti-miR-144'ün doza bağlı hücre canlılığı grafiği

48 saat sonunda MTT Testi uygulanarak hücre canlılığı kontrole göre kıyaslandığında optimum 20 nM derişimde hücre canlılığını arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Anti-miR-144 hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. Anti-miR-144 20 nM derişimde uygulanarak farklı sürelerde (0-72h) inkübasyona bırakılmıştır.

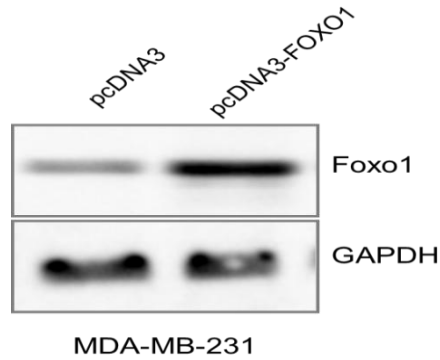


**Şekil 4.2** MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Anti-miR-144 ün zamana bağlı hücre canlılığı grafiği

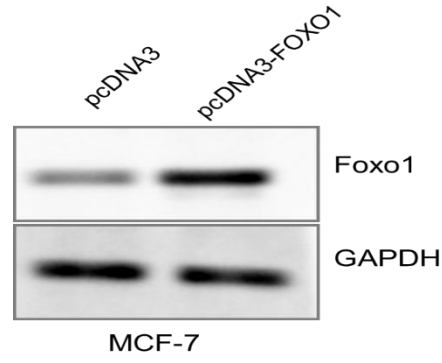
Hücreler optimum 48 saat inkübasyona bırakılınca canlılıklarının %50 oranında zamana bağlı olarak artış yaptığı görülmektedir. (Şekil 4.2)

#### 4.2 Hücrelerde Foxo1 transfeksiyonu ile Foxo1 proteininin over ekspresyonu

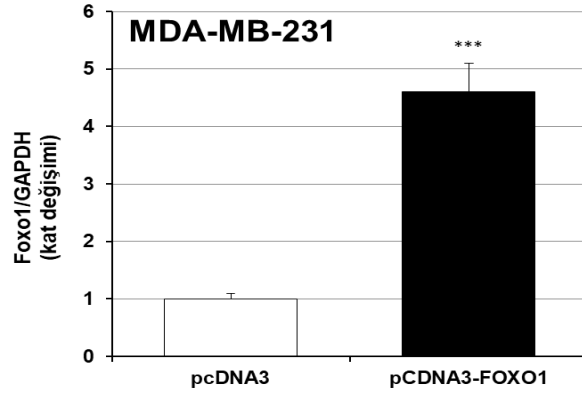
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine pFOXO1 ekspresyon vektörü ile transfeksiyon yapılmıştır. Hücrelerde Foxo1 proteininde kontrol vektörü pcDNA3 'e göre anlamlı (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) bir artış saptanmıştır.



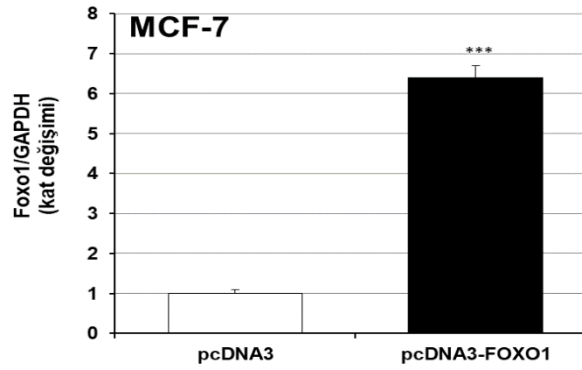
**Şekil 4.3** MDA-MB-231 hücrelerinin western blot Foxo1, GAPDH bantları



Şekil 4. 4 MCF-7 hüresinin western blot Foxo1,GAPDH bantları



Şekil 4.5 MDA-MB-231 hüresinin western blot Foxo1/GAPDH grafiği (\*\*\*)  $p < 0.001$  kontrole göre)

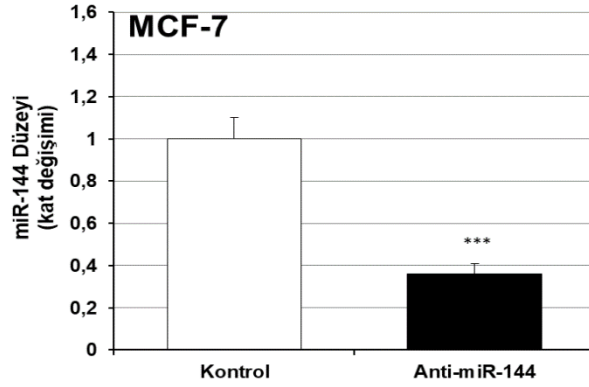


Şekil 4.6 MCF-7 hüresinin western blot Foxo1/GAPDH grafiği (\*\*\*)  $p < 0.001$  kontrole göre)

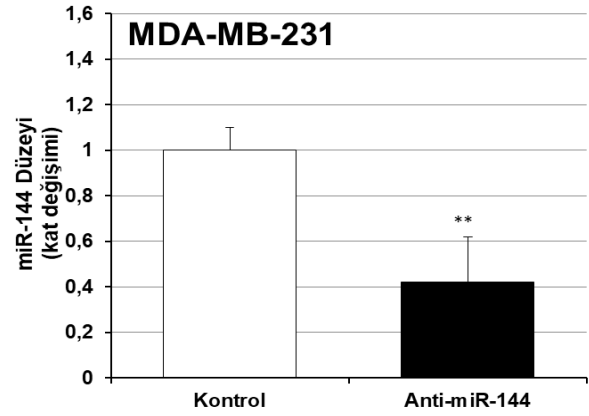
### 4.3 Hücrelerde Anti-miR-144 oligonükleotid ile MiR-144'ün baskılanması

Anti-mir-144 oligonükleotidi MiR-144 ün komplementeri bir bileşik olup, ekspresyonunu inhibe eder.





Şekil 4.7 MCF-7 hücresinde Anti-miR-144 varlığında kontrole göre değişen MiR-144 seviyesi (\*\*\*)  $p < 0.001$ )

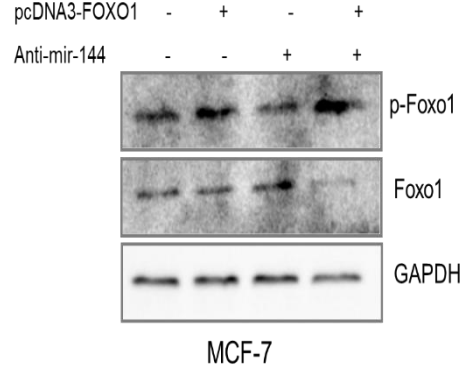


Şekil 4.8 MDA-MB-231 hücresinde Anti-miR-144 varlığında kontrole göre değişen MiR-144 seviyesi (\*\*  $p < 0.01$ )

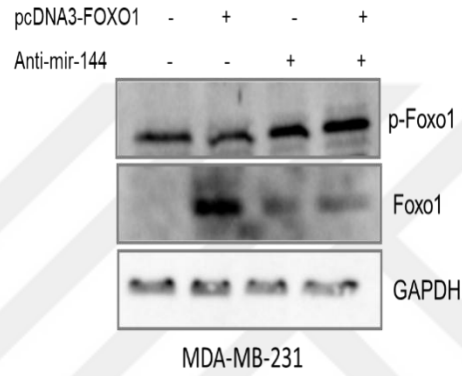
Hücelere Anti-miR-144 uygulandığında MiR-144 seviyesinde anlamlı bir azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).

#### 4.4 Hücrelerde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Foxo1 proteini fosforilasyon düzeyleri

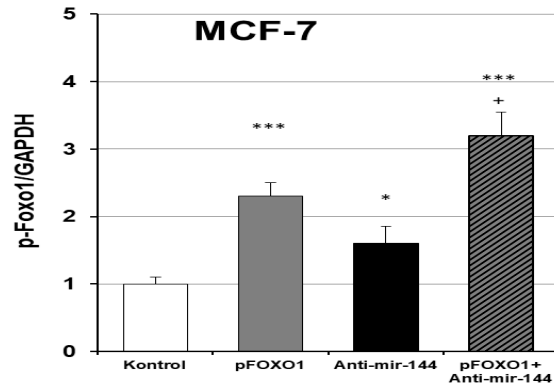
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine Foxo1 ve Anti-miR-144 kombinasyonu uygulandığında Foxo1 proteininde fosforillenme yoluyla değişiklikler olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.9 MCF-7 hücrelerinde Anti-miR-144 varlığında western blot Foxo1, p-Foxo1,GAPDH bantları

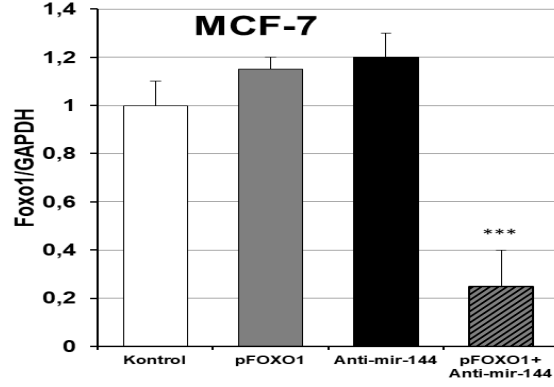


Şekil 4 .10 MDA-MB-231 hücrelerinde Anti-miR-144 varlığında western blot Foxo1,p-Foxo1 GAPDH bantları



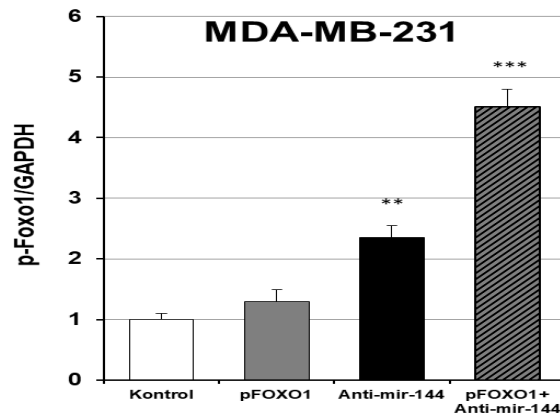
Şekil 4 .11 MCF-7 hücrelerinde p-Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda p-Foxo1/GAPDH grafiği ( + <0.05 pFOXO1'e göre kıyaslama; \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 kontrole göre )

MCF-7 hücrelerinde fosforillenmiş FOXO1 düzeyleri (p-Foxo1), Anti-mir-144 ile control grubuna göre artmıştır (\* $p < 0.05$ ). FOXO1 overekspresyon yapılan grupta da aynı artış gözlenmiştir (\*\* $p < 0.001$ ). Hem Anti-miR-144 hem de pFOXO1 uygulanan grupta ise gözle görülür bir artış meydana gelmiştir (\*\* $p < 0.001$ )



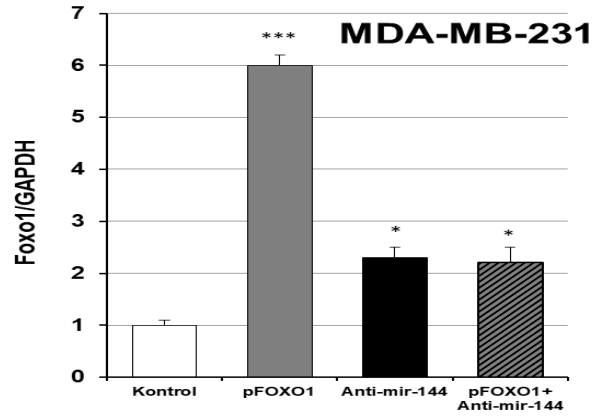
**Şekil 4 .12** MCF-7 hücresinde p-Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonu varlığında Foxo1/GAPDH grafiği (\*\* $p < 0.001$  kontrole göre)

Şekil 4.12 de görüldüğü gibi FOXO1 protein ekspresyon düzeyleri pFOXO1 ve Anti-miR-144 gruplarında kontrole göre değişiklik göstermezken, ko-transfeksiyon yapılan grupta kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (\*\* $p < 0.001$ ).



**Şekil 4 .13** MDA-MB-231 hücresinde p-Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonu varlığında p-Foxo1/GAPDH grafiği (\*\* $p < 0.01$  , \*\*\* $p < 0.001$  kontrole göre )

MDA-MB-231 hücrelerinde FOXO1 fosforilasyon (p-FOXO1) düzeyleri pfoxo1 grubunda kontrole göre değişmezken Anti-miR-144 grubunda kontrole göre anlamlı bir şekilde artmıştır (\*\* $p < 0.01$ ). Anti-mir-144 ve pFOXO1 ko-transfeksiyon yapılan grupta ise kontrole göre yüksek düzeyde artış gözlenmiştir (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ).

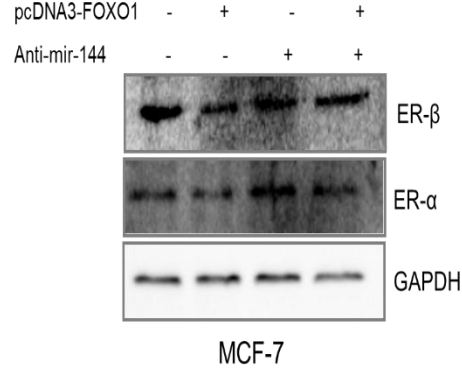


Şekil 4 .14 MDA-MB-231 hücresinde p-Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Foxo1/GAPDH grafiği (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  kontrole göre )

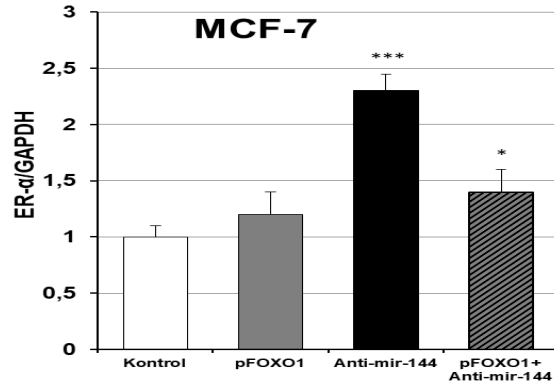
MDA-MB-231 hücrelerinde FOXO1 protein ekspresyon düzeyleri p-FOXO1 grubunda artarken. Anti-miR-144 ve ko-transfeksiyon grubunda anlamlı bir şekilde azalmıştır (\*  $p < 0.05$ ).

#### 4.5 MCF-7 hücresinin Foxo1 – Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda western blot sonuçları

Meme kanser hücresi, MCF Anti-miR-144 (20 nM), FOXO1 ve bu iki bileşiğin ko-transfeksiyonuyla 24 saat inkübe edildi. BCL-2 BAX, AKT, CYLİND1, ESR- $\alpha$ , ESR- $\beta$  protein ekspresyon farklılıkları ölçüldü.

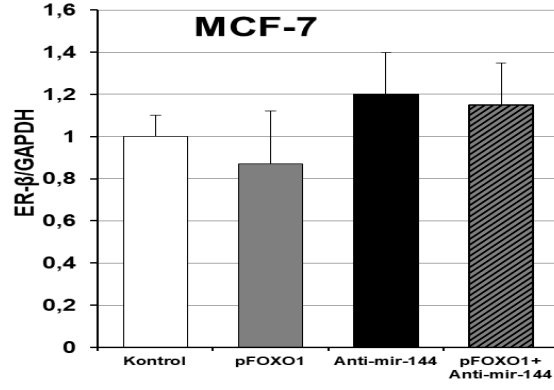


**Şekil 4. 15** MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER- $\alpha$  ve ER- $\beta$  western bantları



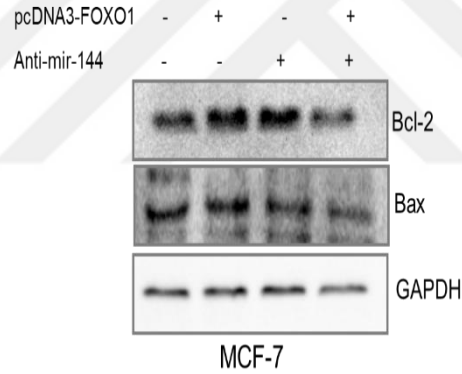
**Şekil 4. 16** MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER- $\alpha$ /GAPDH grafiği (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )

MCF-7 hücrelerinde Şekil 4.16 da görüldüğü gibi Anti-miR-144 varlığında kontrole göre ER $\alpha$  protein ekspresyonunda anlamlı (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) bir artış gözlenmiştir. Foxo1 ve Anti-mir-144 ko-transfeksiyonunda ise kontrole göre anlamlı (\*  $p < 0.05$ ) bir artış, fakat yalnızca Anti-mir-144 uygulamasına göre azalış meydana gelmiştir.

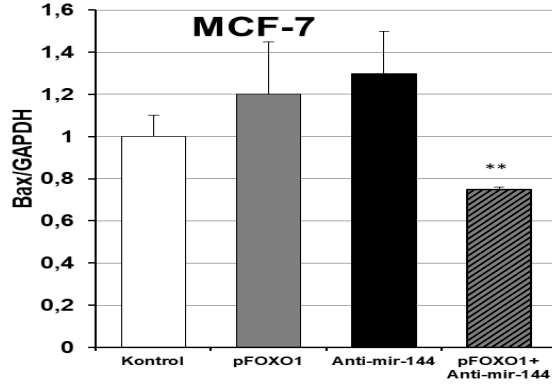


Şekil 4 .17 MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER- β/GAPDH grafiği

Şekil 4.17 e bakacak olursak MCF-7 hücrelerine Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER- β protein seviyesinde kontrole göre bir artış gözlenmiştir fakat anlamlı bulunmamıştır. Diğer gruplarda kontrole göre anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir

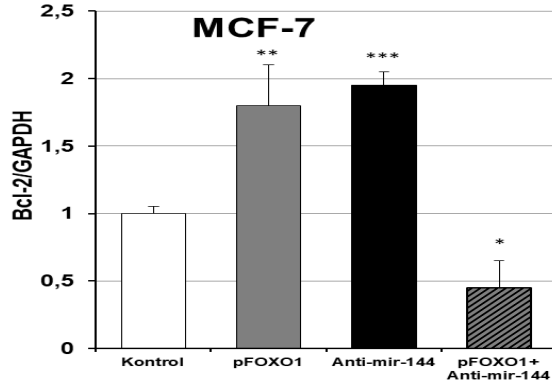


Şekil 4. 18 MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bax ve Bcl-2 western blot bantları



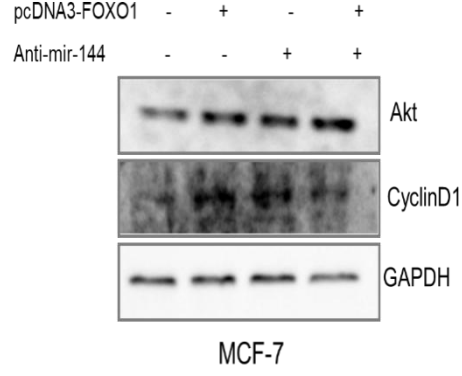
Şekil 4.19 MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bax/GAPDH grafiği (\*\* p<0.01)

FOXO1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonu uygulandığında, Bax protein düzeyinde kontrole kıyasla anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (\*\*p<0.01). Bax bir apoptoz proteinidir, hücrenin apoptoza girmediğini göstermiştir. Diğer gruplarda artış vardır ama anlamlı bulunmamıştır.

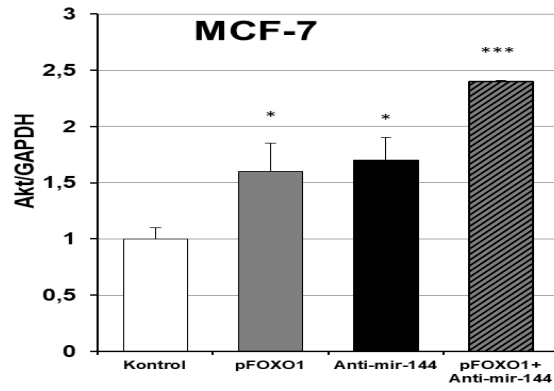


Şekil 4.20 MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bcl-2/GAPDH grafiği (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001)

MCF-7 hüresine tek başına Anti-miR-144 uygulandığında Bcl-2 seviyesi kontrole göre anlamlı bir şekilde artmıştır. Ko-transfeksiyon uygulandığında ise azalma meydana gelmiştir (\*p<0.05).



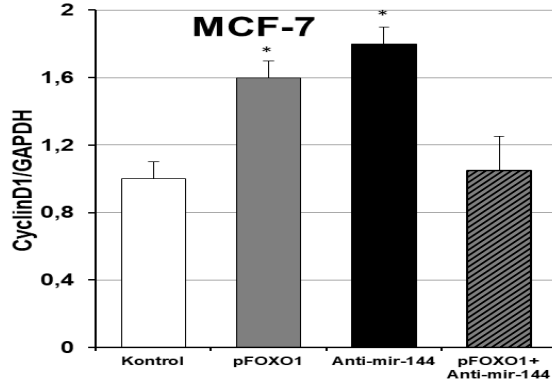
**Şekil 4. 21** MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Akt ve Cylind1 western blot bantları



**Şekil 4 .22** MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda varlığında Akt/GAPDH grafiği (\* p<0.05, \*\*\* p<0.001)

MCF-7 hücrelerinde Şekil 4.22 de görüldüğü gibi tek başlarına FOXO1 ve Anti-miR-144 uygulandığında kontrol grubuna göre Akt protein ekspresyon düzeyleri anlamlı bir şekilde artmıştır (\*p<0.05). Ko-transfeksiyonda da Akt protein ekspresyon düzeyi anlamlı (\*\*\*) p<0.001) bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

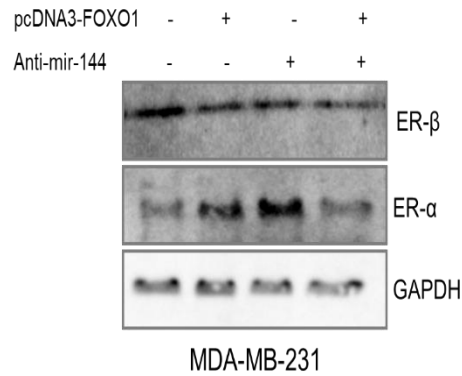




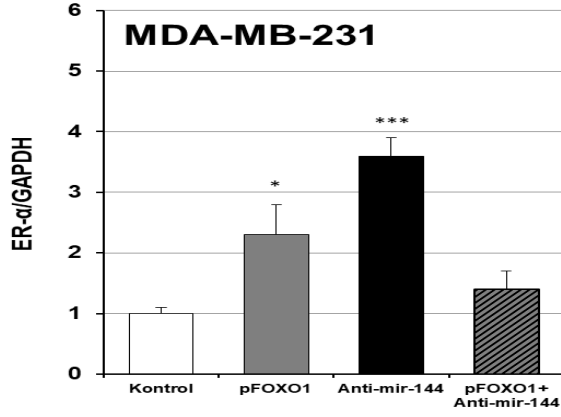
**Şekil 4.23** MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Cyclin D1/GAPDH grafiği (\*p< 0.05)

MCF-7 hücrelerine şekil 4.23'te görüldüğü gibi tek başına pFoxo1 ve Anti-miR-144 uygulandığında ve Anti-mir-144 grubunda kontrole göre CyclinD1 proteinini ekspresyonunda anlamlı (\*p<0.05) bir artış olurken , ko-transfeksiyonu yapılan grupta ise anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

#### 4.6 MDA-MB-231 hücrelerinin Foxo1 – Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda western blot sonuçları

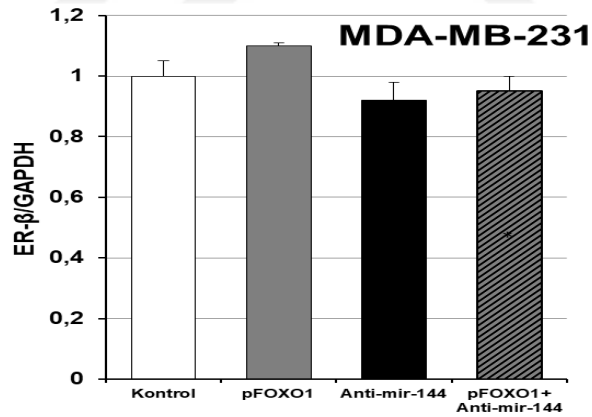


**Şekil 4 .23** MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER-α ve ER-β western blot bantları



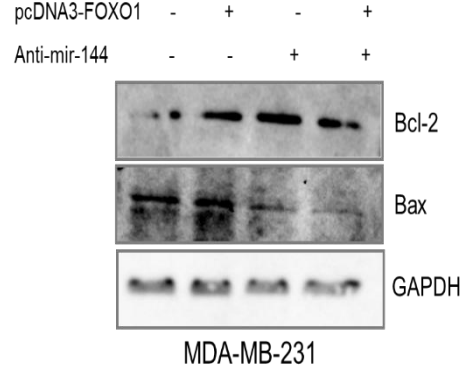
Şekil 4.24 MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER-α/GAPDH grafiği (\*\*\*) p<0.001)

MDA-MB-231 hücrelerine pFOXO1 ve Anti-miR-144 tek başına transfekte edildiğinde ER- α protein miktarında kontrole göre anlamlı (\*\*\*) p<0.001) bir artış olmuştur. Anti-miR-144 ve Foxo1 ko-transfekte edildiğinde ise azalma meydana gelmiştir fakat anlamlı bulunmamıştır.

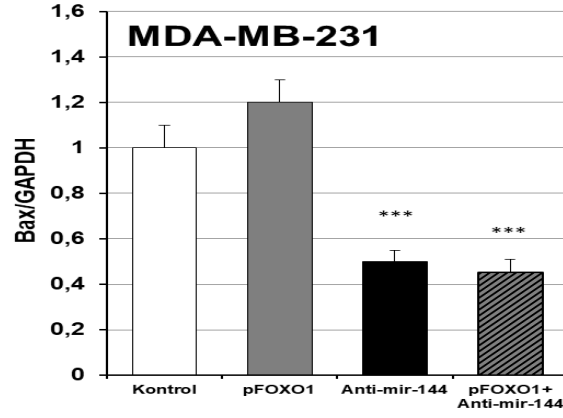


Şekil 4.25 MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER-β/GAPDH grafiği

MDA-MB-231 hücrelerinde Şekil 4.26'da görüldüğü gibi Anti-miR-144, Foxo1 ve ikisinin ko-transfeksiyonunda ER-β proteini seviyesinde anlamlı bir değişim elde edilmemiştir.

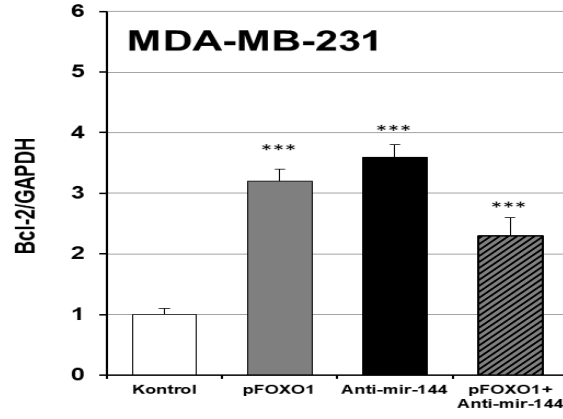


Şekil 4 .26 MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bax ve Bcl-2 western blot bantları



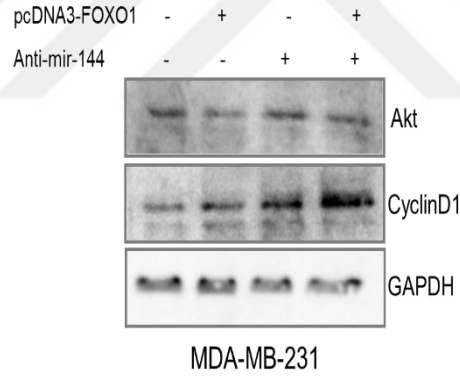
Şekil 4 .27 MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bax/GAPDH grafiği (\*\*\*) p<0.001)

Şekil 4.28'de görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücrelerine Anti-miR-144 tek başına transfekte edildiğinde Bax protein seviyesinde kontrole göre anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (\*\*\*)p<0.001). pFoxo1 tek başına transfekte edildiğinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. pFOXO1 ve Anti-mir-144 ko-transfekte edildiğinde bax protein ekspresyon seviyesinde anlamlı (\*\*\*) p<0.001) bir azalma görülmektedir.

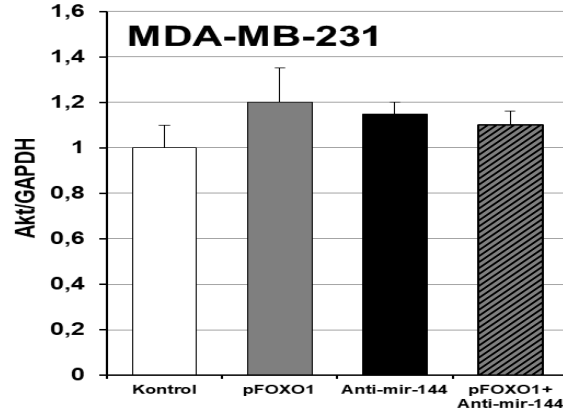


Şekil 4. 28 MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bcl-2/GAPDH grafiği (\*\*\*) p<0.001)

Bax ve Bcl-2 birbirine zıt yollarda yer alan proteinlerdir. Hücrede birinin ekspresyonu artarken diğerinin azalır. Şekil 4.29'da görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücresine Anti-mir-144 ve Foxo1 ko-transfeksiyonunda Bcl-2 protein ekspresyonunda kontrole göre anlamlı (\*\*\*) p<0.001) bir artış olmuştur.

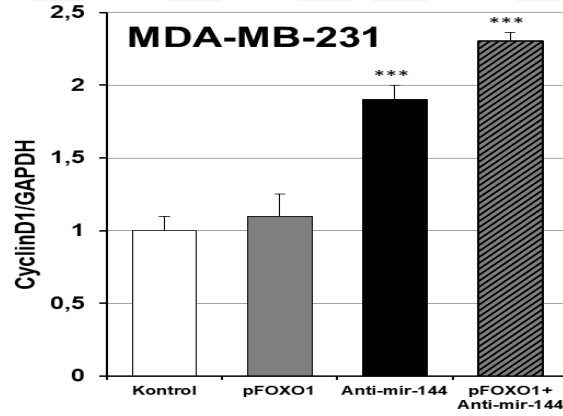


Şekil 4 .29 MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Akt ve CyclinD1 western blot bantları



Şekil 4 .30 MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 kombinasyonu varlığında Akt/GAPDH grafiği

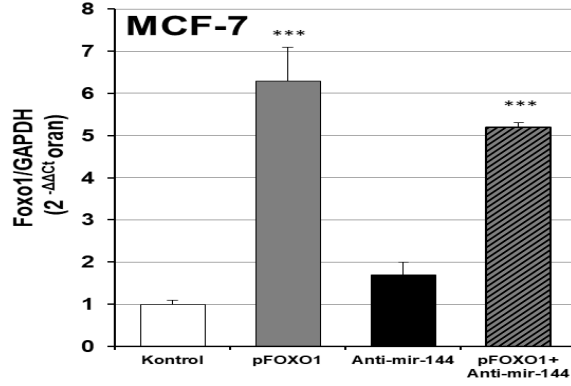
Şekil 4.31’de görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan Foxo1, Anti-miR-144 ve ko-transfeksiyonu Akt ekspresyon seviyesinde kontrole göre anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır.



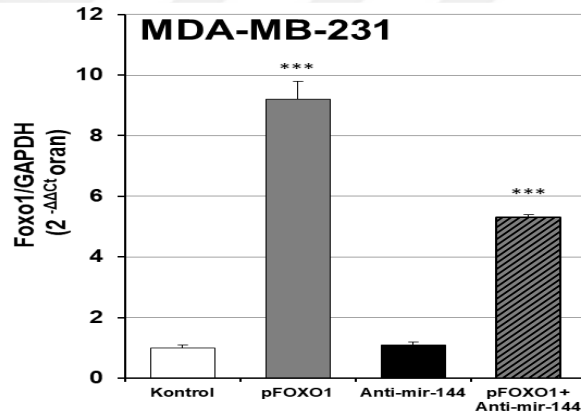
Şekil 4 .31 MDA-MB-231 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda CyclinD1/GAPDH grafiği

Şekil 4.32 de görüldüğü gibi Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda CyclinD1 protein seviyesinde kontrole göre anlamlı (\*\*\*)  $p < 0.001$  bir artış olmuştur.pFOXO1 tek başına CyclinD1 protein ekspresyonu üzerinde etkili değildir.Anti-miR-144 tek başına transfekte edildiğinde cyclinD1 protein ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı (\*\*\*) $p < 0.001$  bir şekilde artmıştır.

#### 4.7 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücresinin p-FOXO1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda QPCR sonuçları

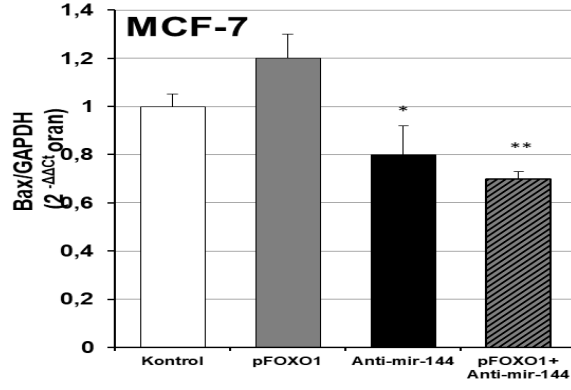


Şekil 4 .32 MCF-7 hücresinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Foxo1 gen ekspresyon düzeyi (\*\*\*) p<0.001)



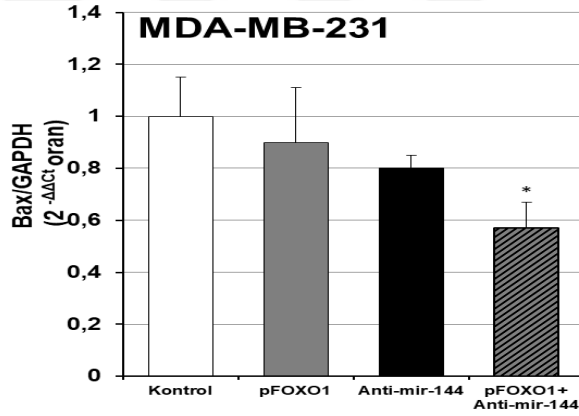
Şekil 4. 33 MDA-MB-231 hücresinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Foxo1 gen ekspresyon düzeyi (\*\*\*) p<0.001)

Şekil 4.33 ve şekil 4.34'te görüldüğü gibi hücrelerde pFOXO1 transfeksiyonu ile FOXO1 gen düzeyleri kontrole göre anlamlı bir şekilde artmıştır (\*\*\*) p<0.001). Anti-miR-144 tek başına transfekte edildiğinde anlamlı bir değişim olmamıştır. pFOXO1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonu FOXO1 gen düzeyleri kontrole göre anlamlı bir şekilde arttırmıştır (\*\*\*) p<0.001).



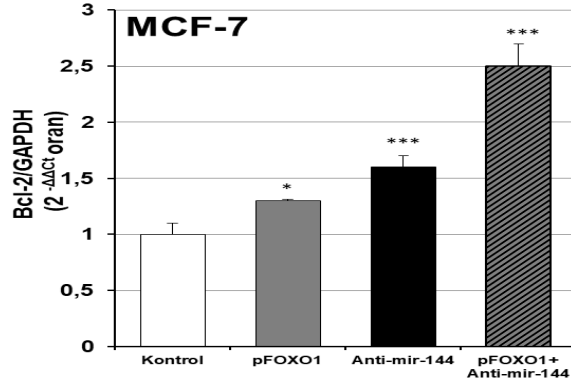
**Şekil 4. 34** MCF-7 hücrelerinde Foxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda Bax gen ekspresyon düzeyi (\*\* p<0.01, \* p<0.05)

**Şekil 4.35'**te görüldüğü gibi MCF-7 hücrelerinde Bax gen ekspresyonu pFOXO1 grubunda kontrole göre değişmemiştir. Anti-miR-144 grubunda kontrole göre anlamlı bir azalma olmuştur (\* p<0.05). Ko-transfeksiyonda ise kontrole göre Bax gen ekspresyon düzeyi azalmıştır.



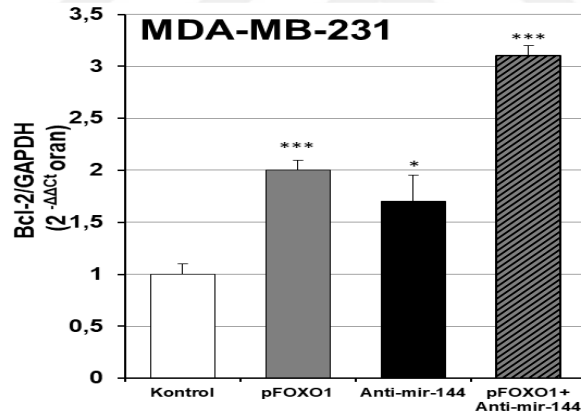
**Şekil 4 .35** MDA-MB-231 hücrelerinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Bax gen ekspresyon düzeyi, (\* p<0.05)

Şekil 4.36'da görüldüğü gibi MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda apoptotik protein olan Bax gen ekspresyon düzeyinde kontrole göre azalma meydana gelmiştir (\* p<0.05). pFOXO1 ve Anti-miR-144 tek başlarına transfekte edildiğinde kontrole göre anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.



Şekil 4 .36 MCF-7 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Bcl-2 gen ekspresyon düzeyi (\*\*\*) p<0.001, \* p<0.05)

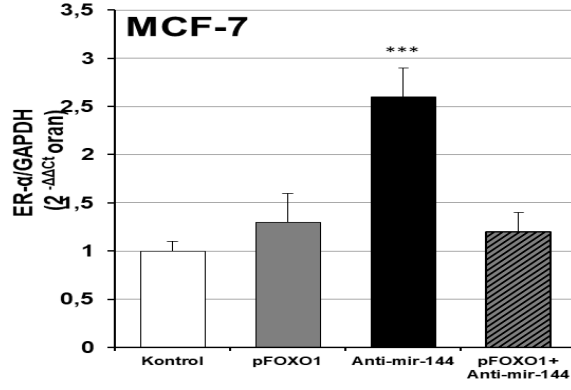
Şekil 4.37’de görüldüğü gibi MCF-7 hücrelerinde pFOXO1 ve Anti-miR-144 tek başlarına transfekte edildiğinde Bcl-2 gen ekspresyon düzeyinleri kontrole göre artmıştır (\*\*\*) p<0.001, \*p<0.05).Anti-miR-144 ve pFOXO1 ko-transfekte edildiğinde ise Bcl-2 gen ekspresyon düzeyi kontrole göre anlamlı bir şekilde artmıştır.



Şekil 4 .37 MDA-MB-231 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 kombinasyonunun Bcl-2 gen ekspresyon düzeyi (\*\*\*) p<0.001, \* p<0.05)

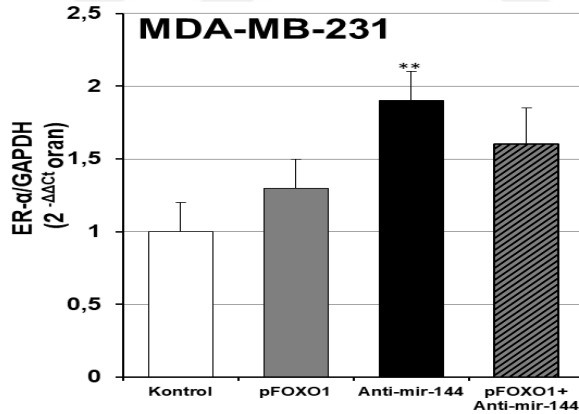
Şekil 4.38’te görüldüğü gibi MCF-7 ve MDA-MB-231 hücresinde anti apoptotik protein olan Bcl-2’ nin gen ekspresyon seviyesi, pFoxo1 ve Anti-miR-144 tek başına transfekte edildiğinde kontrole göre artmıştır.Aynı zamanda p-Foxo1 ve Anti-mir-144 ko-transfeksiyonunda kontrol grubuna göre Bcl-2 gen ekspresyon düzeyinin anlamlı bir şekilde yükseldiği görülmüştür (\*\*\*) p<0.001).





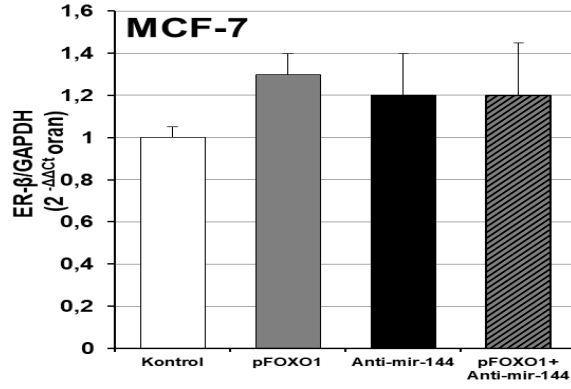
Şekil 4. 38 MCF-7 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun ER-α gen ekspresyon düzeyi (\*\*\*) p<0.001)

Şekil 4.39’da görüldüğü gibi MCF-7 hücresinde pFOXO1 tek başına transfekte edildiğinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. Anti-miR-144 tek başına transfekte edildiğinde kontrole göre ER-α gen ekspresyon düzeyinleri anlamlı bir şekilde artmıştır (\*\*\*) p<0.001). Anti-miR-144 ve pFOXO1 ko-transfekte edildiğinde kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

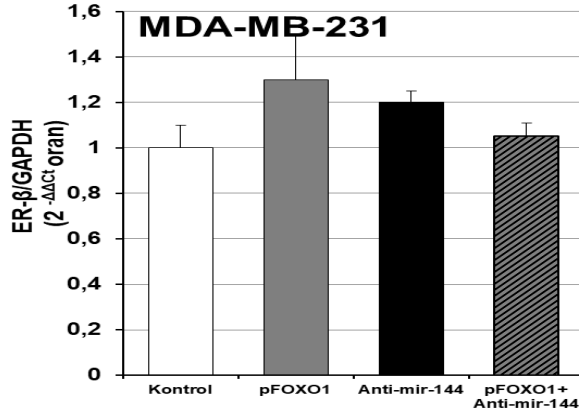


Şekil 4. 39 MDA-MB-231 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun ER-α gen ekspresyon düzeyi (\*\* p<0.01)

Şekil 4.40’ta görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücresinde tek başına Anti-mir-144 transfekte edildiğinde ER-α gen ekspresyon düzeyinde kontrole göre anlamlı bir artış görülmüştür. pFOXO1 tek başına ve Anti-miR-144 ile ko-transfeksiyon yapıldığında ise ER-α gen düzeyinde kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

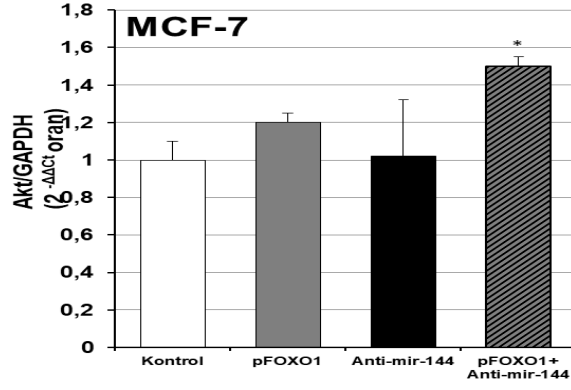


Şekil 4 .40 MCF-7 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunda ER-β gen ekspresyon düzeyi



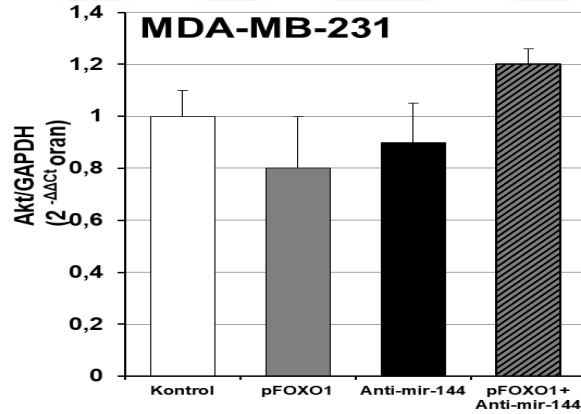
Şekil 4 .41 MDA-MB-231 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun ER-β gen ekspresyon düzeyi

MDA-MB-231 hücrelerinde p-Foxo1, Anti-mir-144 ve bu ko-transfeksiyon yapılan gruplarda ER-β gen ekspresyon düzeyinde kontrole göre anlamlı bir değişiklik olmamıştır.



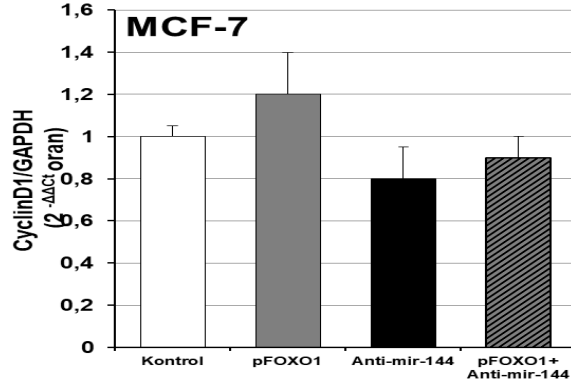
Şekil 4. 42 MCF-7 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Akt gen ekspresyon düzeyi (\* p<0.05)

Şekil 4.43'te görüldüğü gibi MCF-7 hücresinde tek başına pFOXO1 ve Anti-miR-144 transfeksiyonunda Akt gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Anti-miR-144 ve pFOXO1 ko-transfeksiyon yapılan grupta kontrole göre Akt gen ekspresyon düzeyleri anlamlı şekilde artmıştır (\* p<0.05).



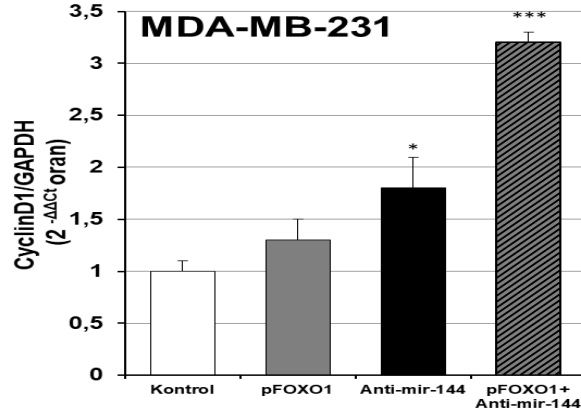
Şekil 4. 43 MDA-MB-231 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun Akt gen ekspresyon düzeyi

MCF-7 hücresinde pFoxo1, Anti-miR-144 ve ko-transfeksiyon grubunda Akt gen düzeyinde kontrole göre anlamlı bir artış olmamaktadır.



Şekil 4 .44 MCF-7 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun CyclinD1 gen ekspresyon düzeyi

Şekil 4.45'te görüldüğü gibi MCF-7 hücrelerinde pFOXO1, Anti-miR-144 ve ko-transfeksiyon grubunda kontrole göre CyclinD1 gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişim olmamıştır.



Şekil 4. 45 MDA-MB-241 hücresinde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyonunun CyclinD1 gen ekspresyon düzeyi (\* p<0.05, \*\*\* p<0.001)

Şekil 4.46'da görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücresinde tek başına Anti-miR-144 transfekte edildiğinde CyclinD1 gen düzeyi kontrole göre anlamlı (\* p<0.05) bir şekilde artmıştır. Aynı şekilde pFoxo1 ve Anti-miR-144 ko-transfeksiyon yapıldığında CyclinD1 gen ekspresyon düzeyi kontrole göre anlamlı bir şekilde artış göstermiştir (\*\*\* p<0.001).

## 5.TARTIŞMA

Hücrelerde anormal çoğalma görüldüğünde ve apoptoz işlevlerini kaybettiklerinde çoğunlukla kanserleşme görülür. MikroRNA'lar genom üzerinde protein kodlayan intron bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, RNA molekülleridir [62,63].

MikroRNA'ların hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerde etkili olduğu ve çeşitli hastalıklarda önemli belirteç olarak da kullanılabileceği bilinmektedir. Kanser gibi proliferatif hastalıkların oluşumunda miRNA düzenlemesinin etkisi olacağı düşünülmektedir. MiRNA'lar ve kanser arasındaki ilk ilişki Calin ve ark (2002) tarafından ileri sürülmüştür. Calin ve arkadaşları, 2004 yılında yayınladıkları bir çalışmada, insan miRNA genlerinin kanser ile ilişkisini araştırmak için, 186 adet miRNA geninin DNA üzerindeki pozisyonunu haritalandırmışlardır [105]. Bu genlerin kromozomal pozisyonları, daha önceden rapor edilen belirli kanser türlerinin gelişimi ile ilişkili olduğu bilinen genetik değişiklikler ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaları yeni ve farklı araştırmalar takip etmiştir. Daha sonra 2003 yılında Michael ve arkadaşları, ilk olarak insanlardaki katı tümörlerde (kolonik ve rektal adenom karsinomlar) normal dokular ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyeleri değişmiş olan miRNA'ları rapor etmişlerdir [46]. Daha sonraki yıllarda değişikliğe uğramış miRNA seviyeleri meme kanserinde, Burkitt's lenfomada, malign beyin tümörlerinde, tiroid kanserinde, akciğer kanserinde, prostat kanserinde ve hepatosellüler karsinomda keşfedilmiştir. MiRNA'lar işlevlerine göre tümör süpresör ya da onjenik olarak tanımlanmaktadırlar.

2004 yılında Liu ve ark. meme kanseri olan insan ve farelerde, mikroçip teknoloji kullanarak miRNA gen ekspresyonlarını profilemişler ve meme kanserinde, normal dokuyla karşılaştırıldığında, anormal miRNA ekspresyonunu varlığını bildirmişlerdir [106,107]. Buna karşılık Jiang et al. [33] ise insanlarda yaygın olarak görülen ve beşi meme kanseri (MDA231, T47D, SKBR3, MDA 361, and MCF-7) olmak üzere 32 kanser hücre-hattındaki 222 miRNA'ları incelenmiş ve meme ile prostat kanser hücre hatlarının birlikte kümelenmeye eğiliminde olmasının farklı dokularda benzer miRNA ekspresyon profilinin olduğunu bildirilmiştir. Shen et al. [34] genetik varyasyonlar için ailesel meme CA hikayesi

olan 42 hastanın DNA örneği incelenmiş ve 17 miRNA geninin meme tümör dokusunda yüksek veya düşük ekspresyon seviyelerini göstererek BRCA1/2, ATM, PTEN, and CHEK2 gibi meme kanserindeki önemli genleri regüle ettiği bildirilmiştir [32].

Yapılan tüm çalışmalar göstermektedir ki hücre döngüsü, proliferasyon ve tümörigenez miRNAlar tarafından kontrol edilmektedir. Bununla birlikte hücre döngüsünü kontrol eden siklinler, siklin CDK'lar, ve inhibitörleri, retinablastoma (Rb) gibi proteinlerdeki artışın miRNA ekspresyonundaki farklılığına bağlı olarak kanserlerin patogenezinde oldukça sık rastlanmaktadır.

MicroRNA-144 (miR-144), karaciğer, akciğer, meme ve prostat kanserlerinde tümör oluşumu ve gelişimi sürecine katılan oldukça progresiv olan bir miRNA'dır [109-110]. Fakat insan kanserlerinde yapılan araştırmalarda tümör baskılayıcı veya onkogen bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin boğazda Nazofarenks kanserinde miR-144 ekspresyonu anormal şekilde artarken [111], mide kanserinde tümör baskılayıcı olarak işlev görür [112]. Meme kanserinde ise arttığı miR-144'ün biyolojik özellikleri ve hedefleri iyi anlaşılmamıştır.

Over kanseri hücrelerinde miR-144 ekspresyonunun MMP-2 ve MMP-9 'u down regüle ettiği, hücre migrasyon ve invazyonunu engelleyerek kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü gösterilmiş, bu mekanizmanın RUNX1 proteini ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [113]. Multiple miyeloma kanser hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada MiR-144-3p düzeylerinin artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunun azaldığı ve koloni oluşumunun inhibe edildiği tespit edilmiş ve epitelyal geçiş faktörü olan c-MET'in baskılanarak PI3K/AKT sinyal yolağını down regüle ettiği bildirilmiştir [114]. Mesane kanseri hastaları ile yapılan bir çalışmada miR-144 düzeylerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Bunu çalışma içerisinde mesane kanser hücre hatlarında miR-144 düzeyleri arttırıldığı zaman hücre proliferasyonunu baskıladı ve bunu EZH2 proteini ile gerçekleştirerek Wnt/B-catenin sinyal yolağını bloke ettiği bulunmuştur [115]. Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada ise akciğer kanserinde miR-144 overekspresyon yapılan hücrelerde epitelyal geçiş markırlarından olan Snail ve Vimentin protein ekspresyon düzeylerinin azaldığı, E-cadherin düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir [118]. Bu çalışmaların tam tersi bulgularında elde edildiği bir çalışmada, Pre-eklemsi hastalarından elde edilen trofoblast hücrelerinde miR-144 düzeyleri

arttırıldığı zaman PTEN düzeylerinin arttığı ve buna bağlı olarak kaspaz-3 ve Bcl-2 düzeylerinin azalarak hücrelerin proliferasyonlarının yükseldiği görülmüştür [117]. Benzer bir araştırmada tiroid kanserinde miR-144 düzeylerinin artması ile kanserde Malignant tümörlerin arttığı ve bunu E2F8 proteinin kontrol ettiği bildirilmiştir [116]. SkBr3 meme kanseri ve HepG2 hepatoselüler kanserde yapılan bir araştırmada ise miR-144 düzeylerinin estrogen reseptörleri üzerinde etkili olduğu ve G proteinleri aracılığı ile PI3K-Akt/ERK1/2 sinyal yolağını harekete geçirdiği bildirilmiştir [124]. Meme kanseri hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada MDA-MB-231 ve SKBR3 hücre hatlarında overeksprezyon yapılan miR-144 düzeylerinin radyasyon rezistansını arttırdığı ve kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneklerinin yükseldiği tespit edilmiştir. Meme kanseri için miR-144'ün bir biyobelirteç olacağı, tedavi için yeni hedef moleküllerin geliştirilmesi gerektiği ifade edilmiştir [119]. Meme kanseri ile yapılan bir başka çalışmada ise meme kanseri olan hastalarda miR-144 düzeylerinin düştüğü gösterilmiştir. Buna istinaden MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde miR-144 ekspresyon düzeyleri arttırıldığı zaman bir transkripsiyon faktörü olan ZEB1 ve ZEB2 düzeylerinin azaldığı, migrasyonun kontrol altına alındığı bildirilmiştir [120]. Yapılan bir başka çalışmada meme kanseri hücrelerinde miR144 düzeylerinin arttırılması ile hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon ve hücre siklusunu durduğu, apoptotik hücre ölümünü tetiklediği bildirilmiştir. MiR-144'ün bu etkisin meme kanserinde CEP55 ile negatif bir korelasyon gösterdiği ifade edilmiştir [121]. Bu bilgiler ışığında miR-144'ün meme kanserindeki rolü tam olarak netlik kazanmamıştır. Bu tez çalışmasında biz meme kanserinde miR-144 düzeylerindeki değişikliğin etki ettiği bazı proteinler ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmada yer alan diğer önemli molekül ise FoxO transkripsiyon faktörleri üyelerinden biri olan FOXO1dir. Foxo transkripsiyon faktörleri, büyük bir protein ailesi olan “Forkhead” ailesinin üyelerindendir. Foxo özellikle yağ, beyin, kalp, karaciğer, akciğer, over, pankreas, prostat, iskelet kası, dalak, timus ve testis gibi memeli dokularında eksprese edilir [68]. FoxO alt ailesi (FOXO1, FOXO3, FOXO4 ve FOXO6) hücrede bir çok mekanizmada yer almakla birlikte özellikle DNA hasar ve tamirine yanıt, apoptoz, metabolizmanın düzenlenmesi, hücre çoğalması, stres toleransı ile ilgili hedef genleri düzenledikleri bildirilmiştir [69]. Foxo ailesi üyelerinden bazılarında meydana gelen değişiklik örneğin

ekspresyonundaki azalmanın hücre döngüsünün kontrolünün ve apoptozun bozulmasına, dolayısı ile tümör oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir [31]. Myatt ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, PCR ve Northern blot yöntemi ile normal endometriyum ve endometriyal kanserlerdeki FoxO1 etmişler ve bunun onkogenezin bir parçası olduğunu savunmuşlardır [18]. Goto ve arkadaşları da immünohistokimyasal yöntemle endometriyal adenokarsinomlarda normal endometriyuma göre FoxO1 ekspresyonunda azalma saptamışlardır [19]. Diğer bir çalışmada meme tümörlerinde normal meme dokusuna göre FoxO1 ekspresyonunda azalma olduğu ve FoxO1 ekspresyonunun artması ile hücrelerde proliferasyonun azaldığı ileri sürülmüştür [13]. Dong ve arkadaşları yaptıkları çalışmada prostat adenokarsinomlarında normal prostat dokusuna göre FoxO1'in regülasyonunun azaldığını ve bu nedenle FoxO1'in prostat için tümör baskılayıcı özelliklere sahip olduğunu öne sürmüşlerdir [10]. Yapılan bir araştırmada RHK'de FoxO1 ekspresyonunu fare ve insan RHK olgularında FoxO'ların renal tümör oluşumunda negatif feedback özelliklerine sahip olduğu ve FoxO sinyalinin renal kanser gelişimini engellediği belirtilmektedir [22].

FoxO transkripsiyon faktörleriyle MiRNA'lar arasında son yıllarda literatürde çok fazla araştırma yapıldığı görülmektedir. Yapılan araştırmalar içerisinde miR-144 ve FOXO1 ilişkisini gösteren bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu tez çalışmasında miR-144 ve Foxo1 arasındaki ilişki meme kanseri hücrelerinde irdelenmiş ve ilgili sinyal yolları ile mekanizması tespit edilmiştir. Literatür ve bulgularımız Foxo1'in meme kanseri hücre büyümesi ve metastasının düzenlenmesinde miRNA'lar ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Daha önce meme kanseri hücrelerinde yapılan bir araştırmada Mir-9 ekspresyonundaki artışa bağlı olarak gerçekleşen hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonundaki azalmanın Foxo1 ekspresyonunun baskılanmasıyla ortaya çıktığı tespit edilmiştir [123]. Miyoblast hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada ise miR-16 ekspresyonu arttırıldığı zaman hücre proliferasyonunun azaldığı, apoptozda Bcl-2 ve Foxo1 ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir [122]. Daha yakından incelemek istersek şu sonuçlardan bahsedilebilir. MikroRNA-144-3p (miR-144-3p), birçok kanser türünün gelişiminde rol oynayan bir RNA'dır. Fakat miR-144-3p ucu baskılandığında kanser hücreleri çoğalma ve koloni oluşumu artmaktadır. Bu artış sonucu hücre G0/G1 fazında hücre döngüsü kontrol noktalarına takılmadan anti-apoptotik mekanizmalara yönelmiştir.



Sonuç olarak, meme kanseri hücrelerinde miR-144 baskılandığı zaman FOXO1 fosforilasyonunda artış gerçekleşmekte ve hücrede anti-apoptotik mekanizmalar devreye girmektedir. Bu araştırmada elde edilen sonuçların meme kanseri tedavisi için miR-144 düzeylerini arttırıcı yeni terapötik ajanların gelecekte geliştirilmesi konusunda önemli katkılar sağlayacağını düşünüyoruz.



## 6.SONUÇ

Bu tez çalışmasında insan meme kanser hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231 üzerinde miR-144 ve FOXO1 ko-transfeksiyonunun etkisi araştırılmıştır.Hücrelerde Anti-miR-144 oligonükleotidi yardımıyla miR-144 inhibe edildiğinde hücre proliferasyonu artış göstermiş ve anti-apoptotik yollar aktif rol almıştır.Mir-144'ün baskılanması, FOXO1 gibi önemli bir apoptotik ajanın fosforillenmesine ve kanser hücrelerinin proliferasyonunun artmasına neden olmuştur.

Kanser araştırmalarında miR-144 düzeylerini arttıracak gen terapiler uygulanırsa FOXO1 proeini kontrol altına alınarak yeni tedavisel yaklaşımlar geliştirilebilir.

## 7.KAYNAKLAR

- [1] Enmark E & Gustafsson JA (1999). Oestrogen receptors—an overview. *Journal of internal medicine*, 246(2): 133-138.
- [2] Gray GA, Sharif I, Webb DJ, Seckl JR. Oestrogen and the cardiovascular system: the good, the bad and the puzzling. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(3):152-6. Review
- [3] Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, ... & Gustafsson JA (2006). International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological reviews*, 58(4): 773-781.
- [4] Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B & Rosselli M (2001). Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. *Hypertension*, 37(2): 640-644.
- [5] Klinge CM (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic acids research*, 29(14): 2905-2919.
- [6] Klinge CM (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors *Steroids*, 65(5): 227-251.
- [7] Zhang J, Zhang K, Bi M, Jiao X, Zhang D & Dong Q (2014). Circulating microRNA expressions in colorectal cancer as predictors of response to chemotherapy. *Anti-cancer drugs*, 25(3): 346-352.
- [8] Mazurek S, Boschek CB & Eigenbrodt E (1997). The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 29(4): 315-330.
- [9] Khozin S, Blumenthal GM, Jiang X, He K, Boyd K, Murgo A, ... & Pazdur R (2014). US Food and Drug Administration approval summary: erlotinib for the first-line treatment of metastatic non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 19 deletions or exon 21 (L858R) substitution mutations. *The oncologist*, 19(7): 774-779.
- [10] Aslan FE & Gürkan A (2007). Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. *Meme Sağlığı Dergisi*, 3, 63-68.
- [11] Darendeliler E & Ağaoğlu FY (2003). Meme kanserinin epidemiyolojisi ve etyolojisi. *İçinde: Meme Kanseri (Ed: Topuz E, Aydın A, Dinçer M) İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri*, 13-33.
- [12] Lowitz BB & Casciato DA (2013). *Medical oncology & principles of cancer biology*.

- [13] Özmen V (2013). Türkiye'de Meme Kanseri. *Turkiye Klinikleri Journal of General Surgery Special Topics*, 6(2): 1-6.
- [14] Başaran G & Çabuk D (2008). Meme kanserinde adjuvan sistemik tedavi ilkeleri. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Oncology Special Topics*, 1(1): 23-46.
- [15] Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, Fujitsuka N, Nakamura N & Inui A (2013). Cancer cachexia pathophysiology and translational aspect of herbal medicine. *Japanese journal of clinical oncology*, 43(7): 695-705.
- [16] Ho A & Dowdy SF (2002). Regulation of G 1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Current opinion in genetics & development*, 12(1): 47-52.
- [17] Airley RE & Mobasher A (2007). Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy*, 53(4): 233-256.
- [18] Kelsey JL, Fischer DB, Holford TR, LiVolsi VA, Mostow ED, Goldenberg IS, & White C (1981). Exogenous Estrogens and Other Factors In the Epidemiology of Breast Cancer 2 3. *Journal of the National Cancer Institute*, 67(2): 327-333.
- [19] Maruyama T, Sachi Y, Furuke K, Kitaoka Y, Kanzaki H, Yoshimura Y & Yodoi J (1999). Induction of Thioredoxin, a Redox-Active Protein, by Ovarian Steroid Hormones during Growth and Differentiation of Endometrial Stromal Cells in Vitro This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research, Japan. *Endocrinology*, 140(1): 365-372.
- [20] Gruber CJ, Wieser F, Gruber IML, Ferlitsch K, Gruber DM & Huber JC (2002). Current concepts in aesthetic endocrinology. *Gynecological endocrinology*, 16(6): 431-441.
- [21] Sundarajan C, Liao WX, Roy AC & Ng SC (1999). Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. *Molecular human reproduction*, 5(9): 797-802.
- [22] Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi YL, Girard L, Gandhi J & Minna JD (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PloS one*, 4(7): e6146.
- [23] Bakar Y, Berdici B, Şahin N ve Pala ÖO. (2014). Meme Kanseri ile İlişkili Lenfödem ve Tedavisi. *Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health*, 10(1).

- [24] Ozkan A, Malak AT, Gurkan A & Turgay AS (2011). Do Turkish nursing and midwifery students teach breast self-examination to their relatives. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(1): 111-5.
- [25] Murray PA, Barrett-Lee P, Travers M, Luqmani Y, Powles T & Coombes RC (1993). The prognostic significance of transforming growth factors in human breast cancer. *British journal of cancer*, 67(6): 1408-1412.
- [26] Nieves-Neira W & Pommier Y (1999). Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: Multifactorial relationships with topoisomerase  $\alpha$ , protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. *International journal of cancer*, 82(3): 396-404.
- [27] Schwarz VA, Hornung R, Fedier A, Fehr MK, Walt H, Haller U & Fink D (2002). Photodynamic therapy of DNA mismatch repair-deficient and-proficient tumour cells. *British journal of cancer*, 86(7): 1130-1135.
- [28] Rait AS, Pirollo KF, Rait V, Krygier JE, Xiang L & Chang EH (2001). Inhibitory effects of the combination of HER-2 antisense oligonucleotide and chemotherapeutic agents used for the treatment of human breast cancer. *Cancer gene therapy*, 8(10): 728.
- [29] Kim VN (2005). Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 19(1).
- [30] Chen W, Cai F, Zhang B, Barekati Z & Zhong XY. (2013). The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. *Tumor Biology*, 34(1): 455-462.
- [31] Shenouda SK & Alahari SK (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(3-4): 369.
- [32] Ambros V (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006): 350-355.
- [33] Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2): 281-297.
- [34] Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S & Calin GA (2009). MicroRNAs—the micro steering wheel of tumour metastases. *Nature Reviews Cancer*, 9(4): 293-302.

- [35] Calin GA & Croce CM (2006). Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. In *Seminars in oncology* (Vol. 33, No. 2, pp. 167-173). WB Saunders.
- [36] Enmark E & Gustafsson JA (1999). Oestrogen receptors—an overview. *Journal of internal medicine*, 246(2): 133-138.
- [37] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Ruvkun G (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772): 901-906.
- [38] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, ... & Spring J (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808): 86-89.
- [39] Eichelser C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K & Schwarzenbach H (2013). Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clinical chemistry*, 59(10): 1489-1496
- [40] Karagün BŞ, Antmen B, Şaşmaz İ & Kılınç Y (2014). Mikro RNA and Cancer. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, 12(1): 45-56.
- [41] Kwak PB, Iwasaki S & Tomari Y (2010). The microRNA pathway and cancer. *Cancer science*, 101(11): 2309-2315.
- [42] Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE & Kutay U (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654): 95-98.
- [43] Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N & Shiekhattar R (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4): 631-640.
- [44] Shenouda SK & Alahari SK (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(3-4): 369.
- [45] Lee RC, Feinbaum RL & Ambros V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5): 843-854.
- [46] Chen Y, Fu LL, Wen X, Liu B, Huang J, Wang JH & Wei YQ (2014). Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy. *Apoptosis*, 19(8): 1177-1189.
- [47] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N & Zamore PD (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2): 199-208.

- [48] Avraham R & Yarden Y (2012). Regulation of signalling by microRNAs.
- [49] Mendell JT & Olson EN (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*, 148(6): 1172-1187.
- [50] He L & Hannon GJ (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7): 522-531.
- [51] Wahid F, Khan T, & Kim YY (2014). MicroRNA and diseases: therapeutic potential as new generation of drugs. *Biochimie*, 104, 12-26.
- [52] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, ... & Rassenti L (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24): 15524-15529.
- [53] Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, ... & Prueitt RL (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7): 2257-2261.
- [54] Carolina LO, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, De Castro IN, & Alonso FJ (2000). Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. *Biochemical Journal*, 348(2): 257-261.
- [55] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, ... & Rassenti L (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39): 13944-13949.
- [56] Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, ... & Van den Berg A (2005). BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *The Journal of pathology*, 207(2): 243-249.
- [57] Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, ... & Chaix A (2007). Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(41): 16170-16175.
- [58] Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, ... & Farace MG (2005). Extensive modulation of a set of microRNAs in primary

glioblastoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(4): 1351-1358.

[59] Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F ... & Prueitt RL (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 103(7): 2257-2261.

[60] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST & Patel T (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133(2): 647-658.

[61] Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermüller J, Kretzschmar AK, ... & Cvijic H (2007). Interleukin-6-dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*, 110(4): 1330-1333.

[62] Xing Z, Li D, Yang L, Xi Y & Su X (2014). MicroRNAs and anticancer drugs. *Acta Biochim Biophys Sin*, 46(3): 233-239.

[63] Zhang B, Pan X, Cobb G P & Anderson TA (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*, 302(1): 1-12.

[64] Esquela-Kerscher A & Slack FJ (2006). Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4): 259-269.

[65] Yin C, Qie S & Sang N (2012). Carbon source metabolism and its regulation in cancer cells. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 22(1):1

[66] Verano-Braga T, Schwab M, Sylvester M, Passos-Silva DG, Peluso AA, Etelvino GM... & Roepstorff P (2012). Time-resolved quantitative phosphoproteomics: new insights into angiotensin (1–7) signaling networks in human endothelial cells. *Journal of proteome research*, 11(6): 3370-3381.

[67] Huang H & Tindall DJ (2007). Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci*, 120(15): 2479-2487.

[68] Maiese K, Chong ZZ, Shang YC & Hou J (2008). Clever cancer strategies with FoxO transcription factors. *Cell Cycle*, 7(24): 3829-3839.

[69] Van der Horst A & Burgering BM (2007). Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(6): 440-450.



- [70] Weigel D, Jürgens G, Küttner F, Seifert E, Jäckle H (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell*, 57(4): 645-658.
- [71] Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T & Bhattacharya SS (2003). Fox's in development and disease. *TRENDS in Genetics*, 19(6): 339-344
- [72] Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA & White MF (2008). Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell metabolism*, 8(1): 65-76.
- [73] Tran H, Brunet A, Grenier, JM, Datta SR, Fornace AJ, DiStefano PS ... & Greenberg ME (2002). DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*, 296(5567): 530-534.
- [74] Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K & Motoyama N (2002). FOXO forkhead transcription factors induce G2-M checkpoint in response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30): 26729-26732.
- [75] Kitamura YI, Kitamura T, Kruse JP, Raum JC, Stein R, Gu W & Accili D (2005). FoxO1 protects against pancreatic  $\beta$  cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell metabolism*, 2(3): 153-163.
- [76] Frescas D, Valenti L & Accili D (2005). Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenic genes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21): 20589-20595.
- [77] Nakae J, Kitamura T, Silver DL & Accili D (2001). The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *Journal of Clinical Investigation*, 108(9): 1359.
- [78] Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, ... & Unterman TG (2000). Regulation of Glucose-6-phosphatase Gene Expression by Protein Kinase B $\alpha$  and the Forkhead Transcription Factor Fkhr Evidence For Insulin Response Unit-Dependent And-Independent Effects Of Insulin On Promoter Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46): 36324-36333.
- [79] Bakker WJ, Blázquez-Domingo M, Kolbus A, Besooyen J, Steinlein P, Beug H, ... & Dijk TB (2004). FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *The Journal of cell biology*, 164(2): 175-184.

- [80] Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, Arden KC & Accili D (2003). The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Developmental cell*, 4(1): 119-129.
- [81] Gilley J, Coffey PJ & Ham J (2003). FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *The Journal of cell biology*, 162(4): 613-622.
- [82] Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NB, Lammers WJ, Koenderman L & Coffey PJ (2002). FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal. *The Journal of cell biology*, 156(3): 531-542.
- [83] Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, ... & Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *cell*, 96(6), 857-868.
- [84] Aoki M, Jiang H & Vogt PK (2004). Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(37): 13613-13617.
- [85] Plas DR & Thompson CB (2003). Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14): 12361-12366.
- [86] Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K & Fukamizu A (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20): 11285-11290.
- [87] Yu Z, Baserga R, Chen L, Wang C, Lisanti MP & Pestell RG (2010). microRNA, cell cycle, and human breast cancer. *The American journal of pathology*, 176(3): 1058-1064.
- [88] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C & Parkin DM (2010). GLOBOCAN 2008, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2.
- [89] Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG & Cohen P (1999). Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24): 17179-17183.

- [90] Girgin C, Tarhan H, Hekimgil M, Sezer A, & Gürel G (2001). P53 mutations and other prognostic factors of renal cell carcinoma. *Urologia internationalis*, 66(2): 78-83.
- [91] Zhou L, Yin B, Liu Y, Hong Y, Zhang C & Fan J (2012). Mechanism and function of decreased FOXO1 in renal cell carcinoma. *Journal of surgical oncology*, 105(8): 841-847.
- [92] Obsil T & Obsilova V (2008). Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene*, 27(16): 2263-2275.
- [93] Sheikh MS & Fornace AJ (2000). Role of p53 family members in apoptosis. *Journal of cellular physiology*, 182(2): 171-181.
- [94] Carson DA & Lois A (1995). Cancer progression and p53. *The Lancet*, 346(8981): 1009-1011.
- [95] Zhang C, Zhang Z, Castle J, Sun S, Johnson J, Krainer AR & Zhang MQ (2008). Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2. *Genes & development*, 22(18): 2550-2563.
- [96] Yeo GW, Coufal NG, Liang TY, Peng GE, Fu XD & Gage FH (2009). An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nature structural & molecular biology*, 16(2): 130-137.
- [97] Ponthier JL, Schluepen C, Chen W, Lersch RA, Gee SL, Hou VC, ... & Conboy JG (2006). Fox-2 splicing factor binds to a conserved intron motif to promote inclusion of protein 4.1 R alternative exon 16. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18): 12468-12474.
- [98] Kuroyanagi H (2009). Fox-1 family of RNA-binding proteins. *Cellular and molecular life sciences*, 66(24): 3895.
- [99] Jin Y, Suzuki H, Maegawa S, Endo H, Sugano S, Hashimoto K ... & Inoue K (2003). A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *The EMBO journal*, 22(4): 905-912.
- [100] Zhou K, Liu M & Cao Y (2017). New Insight into microRNA Functions in Cancer: Oncogene–microRNA–Tumor Suppressor Gene Network. *Frontiers in molecular biosciences*, 4, 46.
- [101] Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2): 281-297.
- [102] Baylin SB, ve Jones PA (2016). Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(9): a019505.

- [103] Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH ... & Arking DE (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular cell*, 26(5): 745-752.
- [104] Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W & Nikitin AY (2007). MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer research*, 67(18): 8433-8438.
- [105] Hayes J, Peruzzi PP & Lawler S (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in molecular medicine*, 20(8): 460-469.
- [106] Hoffman B & Liebermann DA (2008). Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene*, 27(50): 6462.
- [107] Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, Liu Q, Jiang K & Yang GH (2010). MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clinica chimica acta*, 411(11-12): 846-852.
- [108] Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S & Mo YY (2008). MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell research*, 18(3): 350
- [109] Wang W, Peng B, Wang D, Ma X, Jiang D, Zhao J & Yu, L (2011). Human tumor microRNA signatures derived from large-scale oligonucleotide microarray datasets. *International journal of cancer*, 129(7): 1624-1634.
- [110] Pan Y, Zhang J, Fu H & Shen L (2016). miR-144 functions as a tumor suppressor in breast cancer through inhibiting ZEB1/2-mediated epithelial mesenchymal transition process. *OncoTargets and therapy*, 9, 6247.
- [111] Zhang LY, Ho-Fun Lee V, Wong MG, Kwong DLW, Zhu YH, Dong SS ... & Fu L (2012). MicroRNA-144 promotes cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through repression of PTEN. *Carcinogenesis*, 34(2): 454-463.
- [112] Ren K, Liu QQ, An ZF, Zhang, DP & Chen XH (2017). MiR-144 functions as tumor suppressor by targeting PIM1 in gastric cancer. *European review for medical and pharmacological sciences*, 21(13): 3028-3037.

- [113] Han S, Zhu J & Zhang Y (2018). miR-144 Potentially Suppresses Proliferation and Migration of Ovarian Cancer Cells by Targeting RUNX1. *Medical science monitor basic research*, 24, 40.
- [114] Zhao Y, Xie Z, Lin J & Liu P (2017). MiR-144-3p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma by targeting c-Met. *American journal of translational research*, 9(5): 2437.
- [115] Xiao J, Tao T, Yin Y, Zhao L, Yang L & Hu L (2017). miR-144 may regulate the proliferation, migration and invasion of trophoblastic cells through targeting PTEN in preeclampsia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 341-353.
- [116] Sun J, Shi R, Zhao S, Li X, Lu S, Bu H, ... & Su C (2017). E2F8, a direct target of miR-144, promotes papillary thyroid cancer progression via regulating cell cycle. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36(1): 40.
- [117] Guo Y, Ying L, Tian Y, Yang P, Zhu Y, Wang Z, ... & Lin, J (2013). miR-144 downregulation increases bladder cancer cell proliferation by targeting EZH2 and regulating Wnt signaling. *The FEBS journal*, 280(18): 4531-4538.
- [118] Pan HL, Wen ZS, Huang YC, Cheng X, Wang GZ, Zhou YC, ... & Zhou GB (2015). Down-regulation of microRNA-144 in air pollution-related lung cancer. *Scientific reports*, 5, 14331.
- [119] Yu L, Yang Y, Hou J, Zhai C, Song Y, Zhang Z, ... & Jia X (2015). MicroRNA-144 affects radiotherapy sensitivity by promoting proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. *Oncology reports*, 34(4):1845-1852.
- [120] Pan Y, Zhang J, Fu H, & Shen L (2016). miR-144 functions as a tumor suppressor in breast cancer through inhibiting ZEB1/2-mediated epithelial mesenchymal transition process. *OncoTargets and therapy*, 9, 6247.
- [121] Yin Y1, Cai J2, Meng F1, Sui C1, Jiang Y1. MiR-144 suppresses proliferation, invasion, and migration of breast cancer cells through inhibiting CEP55. *Cancer Biol Ther*. 2018 Apr 3;19(4):306-315.
- [122] Jia X, Ouyang H, Abdalla BA, Xu H, Nie Q & Zhang X (2017). miR-16 controls myoblast proliferation and apoptosis through directly suppressing Bcl2 and FOXO1 activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(6): 674-684.
- [123] Liu DZ, Chang B, Li XD, Zhang QH & Zou YH (2017). MicroRNA-9 promotes the proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells via

down-regulating FOXO1. *Clinical and Translational Oncology*, 19(9): 1133-1140.

[124] Vivacqua A, De Marco P, Santolla MF, Cirillo F, Pellegrino M, Panno ML, ... & Maggiolini M (2015). Estrogenic gper signaling regulates mir144 expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts (cafs). *Oncotarget*, 6(18): 1657



## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Merve AYDIN
Doğum Yeri ve Tarihi	Niğde/Merkez 1994
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Keykubat Mah. Işıl Sok. No:22/6 Melikgazi KAYSERİ
E-posta Adresi	merveaydin_mbg@hotmail.com

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sema Yazar Anadolu Lisesi, 2012
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2016
Yüksek Lisans	C.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2018
Ünvan	Öğrenci

### İş Tecrübesi

Milli Eğitim Bakanlığı -

Cumhuriyet Üniversitesi -