



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ

**MikroRNA (miR-200c ve miR-141) İÇİN MEME KANSERİ
TEDAVİSİNDE KİTOZAN TEMELLİ TAŞIYICI SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

KÜBRA KABAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. JÜLİDE AKBUĞA

II. TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. EMİNE ŞALVA

2015-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Kübra KABAN
Tez Başlığı : MikroRNA (miR-200c ve miR-141) için meme kanseri tedavisinde kitozan temelli taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi
Sınav Yeri : Farmasötik Biyoteknoloji A.B.
Sınav Tarihi : 29/06/2015 10:30

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Jülide AKBUĞA

Yrd. Doç. Dr. Emine ŞALVA

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Levent KABASAKAL

Doç. Dr. Ali Demir SEZER

Yrd. Doç. Dr. Suna ÖZBAŞ TURAN

Kurumu

Marmara Üniversitesi

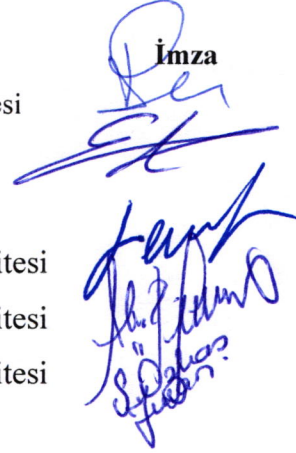
İnönü Üniversitesi

Marmara Üniversitesi

Marmara Üniversitesi

Marmara Üniversitesi

İmza



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06.07.2015 tarih ve 44 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Kübra KABAN

I.TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Jülide AKBUĞA' ya,

Çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, bu çalışmada maddi manevi desteğini esirgemeyen ve danışman olarak da çalışmanın oluşturulmasından deneysel aşamalarına kadar büyük emeği olan sevgili hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Emine ŞALVA' ya

Bölüme ilk geldiğim günden beri manevi olarak desteğini esirgemeyen ve pratik aşamada da bana öğrettiklerinden dolayı hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Suna ÖZBAŞ-TURAN' a

Ve bugünlere gelmem de en büyük pay sahipleri; Aileme ve Dostlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAĞ-C-YLP-120514-0137 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
4. GENEL BİLGİLER	11
4.1. Meme Kanserine İlişkin Bilgiler	11
4.2. Kanserde Gen Tedavisi	14
4.3. RNAi	15
4.3.1. miRNA'ya İlişkin Bilgiler	18
4.4. miRNA ve Kanser	21
4.5. Meme Kanserinde miRNA	23
4.5.1. Onkogenik miRNA'lar	26
4.5.2. Tümör Süpressör miRNA'lar	28
4.6. miR-200 Ailesi ve Kanserdeki Rolü	28
4.6.1. miR-200 Ailesinin Anjiyogenezdeki Rolü	31
4.6.2. miR-200 Ailesinin Epitelyum-Mezenkimal Geçiş (EMT) Üzerindeki Rolü	32
4.6.2.1.EMT (EPİTEL-MEZENKİMAL GEÇİŞ)	33
4.6.3. miR-200 Ailesinin Metastazdaki Rolü	40
4.6.3.1.miR-200 Ailesinin Sec23A yolağındaki rolü	41
4.7. miRNA Temelli Terapötik Stratejiler	42
4.8. Nükleik Asit Taşıyıcı Sistemler	44
4.8.1. Viral Taşıyıcı Sistemler	45
4.8.2. Viral Olmayan Taşıyıcı Sistemler	47
4.9. Kitozana İlişkin Bilgiler	49
4.9.1. miRNA ve Kitozan	52
5. GEREÇ ve YÖNTEM	53
5.1. Gereç	53
5.1.1. Kimyasal Sarf Malzemeleri	53
5.1.2. Kullanılan Cihazlar	54

5.1.3. miRNA Mimiklerinin Yapısı	55
5.1.4. Kullanılan Hücre Kültürleri	56
5.1.5. Besiyerleri ve Çözeltiler	57
5.2. Yöntem	62
5.2.1. miRNA Mimiklerinin Hazırlanması ve Kontrolü	62
5.2.1.1. miRNA Mimiklerinin Elektroforetik Kontrolü	62
5.2.1.2. miRNA Mimiklerinin Spektrofotometrik Kontrolü	63
5.2.2. Kitozan/miRNA Nanoplekslerin Hazırlanması ve Kontrolü	63
5.2.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi ile Kompleks Oluşumunun Görüntülenmesi	63
5.2.2.2. Komplekslerin TEM ile Görüntülenmesi	63
5.2.2.3. Komplekslerin Partikül Büyüklüğü Değerlerinin Ölçülmesi	64
5.2.2.4. Komplekslerin Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçülmesi	64
5.2.2.5. Kitozan/siRNA Komplekslerinin Seruma Karşı Stabilitésinin İncelenmesi	65
5.2.2.6. Kitozan/siRNA Komplekslerinin Dekompleksasyon Kontrolü	65
5.2.3. İn Vitro Transfeksiyon Çalışmaları	65
5.2.3.1. Hücre Kültürü Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi Çalışmaları	65
5.2.3.2. Normal Meme Hücre Hattı ve Meme Kanseri Hücre Hatlarında Sağlıklı Endojen miRNA Düzey Tayini	66
5.2.3.3. Transfeksiyon Öncesi Hücre Ekimi ve Transfeksiyon	67
5.2.3.4. Floresans İşaretli Mimik miRNA'ların Hücre İçindeki Transfeksiyonu Floresan Mikroskop ve Konfokal Mikroskop İle İncelenmesi	68
5.2.3.5. RT-PCR Yöntemi ile miRNA Doz Çalışmaları	68
1. RNA İzolasyonu	68
2. cDNA Sentezi	69
3. Relatif Kantitatif Real Time PCR Çalışması	69
4. miRNA Doz Çalışmaları	70
5.2.4. Protein Ekspresyonunun ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Çalışmalar	71
5.2.4.1. VEGF'in ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Çalışmalar	71
5.2.4.2. E-kaderin'in ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Çalışmalar	71
5.2.4.3. Tinagl1'in ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Çalışmalar	72

5.2.4.4. Igfbp-4'ün ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Çalışmalar	73
5.2.5. İnvazyon Yöntemi	73
5.2.6. Apoptoz Çalışması	74
5.2.7. Hücre Proliferasyon Çalışması	74
5.2.8. İstatistiksel Değerlendirmeler	75
6. BULGULAR	76
6.1. MikroRNA İle İlgili Çalışmalara İlişkin Bulgular	76
6.1.1. miRNA Mimikleri Hazırlanmasına İlişkin Bulgular	76
6.1.2. miRNA Mimiklerinin Kontrolüne İlişkin Bulgular	76
6.1.2.1. miRNA Mimiklerinin Elektroforetik Kontrolüne İlişkin Bulgular	76
6.1.2.2. miRNA Mimiklerinin Spektrofotometrik Kontrolüne İlişkin Bulgular	77
6.2. Kitozan/miRNA Nanoplekslerin Hazırlanması ve Kontrolüne İlişkin Bulgular	77
6.2.1. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Hazırlanması	77
6.2.2. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Kontrolüne İlişkin Bulgular	77
6.2.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi ile Kompleks Oluşumunun Görüntülenmesine İlişkin Bulgular	77
6.2.2.2. Komplekslerin TEM ile Görüntülenmesine İlişkin Bulgular	79
6.2.2.3. Komplekslerin Partikül Büyüklüğü Değerlerinin Ölçülmesine İlişkin Bulgular	79
6.2.2.4. Komplekslerin Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçülmesine İlişkin Bulgular	80
6.2.2.5. Kitozan/siRNA Komplekslerinin Seruma Karşı Stabilitésinine İlişkin Bulgular	83
6.2.2.6. Kitozan/siRNA Komplekslerinin Dekompleksasyon Kontrolüne İlişkin Bulgular	86
6.3. İn Vitro Transfeksiyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular	87
6.3.1. Sağlıklı ve Kanserli Hücrelerde Endojen miRNA Düzey Tayinine İlişkin Bulgular	87
6.3.3. Transfeksiyon Öncesi Hücre Ekimi ve Transfeksiyon	89
6.3.3. Transfeksiyon Kontrolüne İlişkin Bulgular	89
6.3.3.1. Floresans İşaretli Mimik miRNA'ların Hücre İçindeki Transfeksiyonu	

Floresan Mikroskop ve Konfokal Mikroskop İle İncelenmesine İlişkin Bulgular	89
6.3.5. RT-PCR Yöntemi ile miRNA Doz Çalışmalarına İlişkin Bulgular	95
6.3.5.1. RNA İzolasyonuna İlişkin Bulgular	95
6.3.5.2. cDNA Sentezi	95
6.3.5.3. Relatif Kantitatif Real Time PCR Çalışması	95
6.3.5.4. miRNA Doz Çalışmalarına İlişkin Bulgular	95
6.4. Protein Ekspresyonunun ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Bulgular	113
6.4.1. VEGF'in ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Bulgular	113
6.4.2. E-kaderin'in ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Bulgular	115
6.4.3. Tinagl1'in ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Bulgular	115
6.4.4. Igfbp-4'ün ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Bulgular	118
6.5. İnvazyon Yöntemine İlişkin Bulgular	118
6.6. Apoptoz Çalışmasına İlişkin Bulgular	122
6.7. Hücre Proliferasyon Çalışmasına İlişkin Bulgular	124
6.8. İstatistiksel Değerlendirmeler	125
7. TARTIŞMA ve SONUÇLAR	138
8. KAYNAKLAR	147
ÖZGEÇMİŞ	161

KISALTMALAR

AAV	Adeno–ortaklaşa virus
a/h	Ağırlık/hacim
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Extracellular matriks, (Ekstrasellüler matriks)
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
h/h	Hacim/hacim
HCl	Hidroklorik Asit
Igfbp4	İnsülin büyüme faktörü bağlanma proteini-4
MEGM	Mammary Epithelial Growth Medium (Memeli epitelyal büyüme medyumu)
miRNA	mikroRNA
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄	disodyum hidrojen fosfat
NaH ₂ PO ₄	Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
NH ₄ Ac	NH ₄ CH ₃ COO, (Amonyum asetat)
OD	Optik Densite
OD260	260 nm dalga boyundaki optik densite değeri
OD280	280 nm dalga boyundaki optik densite değeri
PBS	Phosphate Buffer Saline, (Fosfat sodyum klorür tamponu)
pDNA	Plazmid DNA
PEG	Polietilen glikol
PEI	Polietilenimin
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik ko-glikolik asit
PLL	Poli L-lizin

Pre-miRNA	Precursor miRNA
Pri-miRNA	Primer miRNA
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interference
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat, (Sodyum lauril sülfat)
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
TBE	Tris-Borik Asit EDTA
TE	Tris/EDTA
TEM	Transmission Electron Microscopy
Tinagl1	Tubulointerstitial nephritis antigene-like 1
Tris	Trizma® base, 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
Tris-HCl	Hidroklorik asit ile pH değeri ayarlanmış Tris çözeltisi
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
µg	Mikrogram
µg/ml	Mikrogram/mililitre
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 3.1.	Kanser gelişimindeki farklı aşamalarda miR-200 ailesinin fonksiyonunun şematik gösterimi.	7
Şekil 4.1.	miRNA, shRNA ve siRNA için Memeli Post-transkripsiyonel Gen Susturma Yolağı.	17
Şekil 4.2.	miRNA biyogenezi.	21
Şekil 4.3.	Epitelyum-mezenkimal geçiş (EMT)'nin anahtar regülatörleri olarak miR-200 ailesi üyeleri.	27
Şekil 4.4.	İki farklı kromozomda lokalize miR-200 ailesinin iki clusterı	30
Şekil 4.5.	Olgun miR-200 ailesi üyelerinin dizileri	30
Şekil 4.6.	Metastatik kaskadın her basamağına dahil olan miR-200 hedeflerinin temsili	31
Şekil 4.7.	EMT sırasında hücresele olaylar.	38
Şekil 4.8.	Major EMT transkripsiyon faktörlerinin Rolü ve Regülasyonu	39
Şekil 4.9.	Virüs infeksiyonunun prosesi	46
Şekil 4.10.	Kitozanın Yapısı	50
Şekil 6.1.	Sağlıklı ve Kanserli Hücre Hatlarında Endojen miR-141 Ekspresyon Profili	88
Şekil 6.2.	Sağlıklı ve Kanserli Hücre Hatlarında Endojen miR-200c Ekspresyon Profili	88
Şekil 6.3.	5µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların ve serbest miR-141'in transfeksiyonu sonrası MDA-MB-231 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili	96
Şekil 6.4.	5µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların ve serbest miR-200c'nin transfeksiyonu sonrası MDA-MB-231 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili	97
Şekil 6.5.	5µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların ve serbest miR-141'in transfeksiyonu sonrası MDA-MB-435 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili	98

Şekil 6.6.	5µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların ve serbest miR-200c'nin transfeksiyonu sonrası MDA-MB-435 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili	99
Şekil 6.7.	1-2,5µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-231 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili	102
Şekil 6.8.	1-2,5µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-231 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili	103
Şekil 6.9.	1-2,5µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-435 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili	104
Şekil 6.10.	1-2,5µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-435 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili	105
Şekil 6.11.	0,1 ve 0,2 µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-231 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili	108
Şekil 6.12.	0,1 ve 0,2µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-231 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profil	109
Şekil 6.13.	0,1, 0,15 ve 0,2µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-435 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili	110
Şekil 6.14.	0,5, 0,75 ve 0,8µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-435 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili	111
Şekil 6.15.	0,1-0,5-0,75-1µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MCF-7 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili	112
Şekil 6.16.	Tedavi öncesi ve sonrası arasında VEGF ekspresyonunun karşılaştırılması	114

Şekil 6.17.	Tümör hücrelerinde tedavi öncesi ve sonrası arasında E-kaderin ekspresyonunun karşılaştırılması	116
Şekil 6.18.	Tümör hücrelerinde tedavi öncesi ve sonrası arasında Tinagl1 ekspresyonunun karşılaştırılması	117
Şekil 6.19.	Tümör hücrelerinde tedavi öncesi ve sonrası arasında Igfbp-4 ekspresyonunun karşılaştırılması	119
Şekil 6.20.	Sağlıklı ve Kanser hücre hatlarında yapılan hücre proliferasyon çalışması	124

TABLULARIN LİSTESİ

Tablo 4.1.	Meme kanserinde kanser özelliklerine göre gruplandırılmış miRNA ekspresyonları	24
Tablo 6.1.	miRNA'ların spektrofotometrik ölçümüne ilişkin bulgular	77
Tablo 6.2.	15µg mikroRNA ile hazırlanan kompleks formülasyonlarına, serbest mikroRNA'lara ve kitozana ait boyut ve yüzey yükü ölçüm sonuçları.	80
Tablo 6.3.	Kitozan/miR-200c ve kitozan/miR141 komplekslerinin zeta potansiyeline ilişkin istatistiksel değerlendirmeler.	81
Tablo 6.4.	Kitozan/miR-200c ve kitozan/miR141 komplekslerinin Partikül boyutuna ilişkin istatistiksel değerlendirmeler.	82
Tablo 6.5.	Sağlıklı ve kanser hücre hatlarında endojen miRNA düzeyine ait istatistiksel bulgular	89
Tablo 6.6.	İnvazyon bulgularına ilişkin istatistiksel bulgular	122
Tablo 6.7.	MDA-MB-231 Hücre Hattında 5µg miR-141 1. Doz Çalışması	126
Tablo 6.8.	MDA-MB-231 Hücre Hattında 5µg miR-200c 1. Doz Çalışması	127
Tablo 6.9.	MDA-MB-435 Hücre Hattında 5µg miR-141 1. Doz Çalışması	128
Tablo 6.10.	MDA-MB-435 Hücre Hattında 5µg miR-200c 1. Doz Çalışması	129
Tablo 6.11.	MDA-MB-231 Hücre Hattında 2. Doz Çalışması	130
Tablo 6.12.	MDA-MB-435 Hücre Hattında 2. Doz Çalışması	131
Tablo 6.13.	MDA-MB-435 Hücre Hattında 2. Doz Çalışması	131
Tablo 6.14.	MDA-MB-435 Hücre Hattında 3. Doz Çalışması	132
Tablo 6.15.	MDA-MB-435 Hücre Hattında 3. Doz Çalışması	132
Tablo 6.16.	MDA-MB-231 Hücre Hattında 3. Doz Çalışması	133
Tablo 6.17.	MDA-MB-231 Hücre Hattında 3. Doz Çalışması	133
Tablo 6.18.	MCF-7 Hücre Hattında Doz Çalışması	134
Tablo 6.19.	VEGF ELISA bulgularına ait istatistiksel bulgular	135
Tablo 6.20.	E-kaderin ELISA bulgularına ait istatistiksel bulgular	135
Tablo 6.21.	Tinag11 ELISA bulgularına ait istatistiksel bulgular	136
Tablo 6.22.	Igfbp-4 ELISA bulgularına ait istatistiksel bulgular	136

Tablo 6.23. Hücre proliferasyon bulgularına ait istatistiksel bulgular

137

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 6.1.	Farklı miktardaki miRNA' ların Agaroz Jeldeki görünümü.	76
Resim 6.2	A-Kitozan/miR-141 (1/1-10/1) kompleksinin elektroforetik kontrolü.	
	B- Kitozan/miR-200c (1/1-10/1) kompleksinin elektroforetik kontrolü.	78
Resim 6.3.	Kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 (20/1-50/1) kompleksinin elektroforetik kontrolü.	78
Resim 6.4.	Kitozan/miRNA komplekslerinin TEM görüntüsü.	79
Resim 6.5.	Serum stabilite çalışması öncesinde miRNA' ların ve hazırlanan komplekslerin agaroz jel elektroforezinde elektroforetik kontrolü	83
Resim 6.6.	miR-141 ile hazırlanan komplekslerin serum stabilitesi	84
Resim 6.7.	miR-200c ile hazırlanan komplekslerin serum stabilitesi	84
Resim 6.8.	Serbest miR-200c'nin serum stabilitesi	85
Resim 6.9.	Serbest miR-141'in serum stabilitesi	85
Resim 6.10.	Serbest miRNA, kitozan/miRNA kompleksi ve kitozan/miRNA dekompleksini gösteren agaroz jel bulguları	86
Resim 6.11.	Transfeksiyon öncesi hücre hatlarından RNA izolasyonunun elektroforetik kontrolü	87
Resim 6.12.	Kitozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MCF-7 hücre hattına transfeksiyonundan sonraki 96. saat I. x20 büyütme II. x40 büyütme	90
Resim 6.13.	Kitozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattına transfeksiyonundan sonraki 96. saat I-II x4 büyütme III- x40 büyütme	91
Resim 6.14.	Kitozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MDA-MB-435 hücre hattına transfeksiyonundan sonraki 68. saat I-x4 büyütme II-x40 büyütme	92

Resim 6.15.	Kitozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MCF-7 Hücre hattına transfeksiyonunun Konfokal Mikroskop Görüntüleri 40X Büyütme	93
Resim 6.16.	Kitozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MDA-MB-231 Hücre hattına transfeksiyonunun Konfokal Mikroskop Görüntüleri 40X Büyütme	93
Resim 6.17.	K itozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MDA-MB-231 Hücre hattına transfeksiyonunun Konfokal Mikroskop Görüntüleri 20X Büyütme	94
Resim 6.18.	A-MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonu, B-MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrası invazyonu, C-MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miR-200c transfeksiyonu sonrası invazyonu. X10 büyütme	120
Resim 6.19.	A- MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonu, B- MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrası invazyonu, C- MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miR-200c transfeksiyonu sonrası invazyonu. X10 büyütme	121
Resim 6.20.	Apoptoz bulgularına ait resimler A-MCF-7-Kitozan/miR-200c B-MDA-MB-231-Kitozan/miR-200c C-MDA-MB-231-Kitozan/miR-141 D-MDA-MB-435-Kitozan/miR-200c E-MDA-MB-435-Kitozan/miR-141	123

MikroRNA (miR-200c ve miR-141) için Meme Kanseri Tedavisinde Kitozan-temelli Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

Öğrencinin Adı : Kübra KABAN

Danışmanı : Prof. Dr. Jülide AKBUĞA

2. Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Emine ŞALVA

Anabilim Dalı: Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: MikroRNA'lar (miRNA'lar) gen ekspresyonu üzerinde önemli regülatör etkiye sahip kısa, endojen ve kodlanmayan RNA molekülleridir. Son çalışmalar miRNA dereglasyonunun kanser gibi farklı hastalıklar ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle miRNA'lar kanserde önemli bir terapötik hedefdir. Ancak, miRNA'ların tedavide kullanımında önemli engeller; fizyolojik ortamda dayanıksız olmaları, hızlı klirens ve hücreler tarafından alımlarının zor olmasıdır. Bu nedenle hücrelere uygun bir taşıyıcı sistemle taşınmaları tedavi açısından önemlidir. Bu çalışmada amaç; normal meme hücresinden farklı olarak meme kanserinde ekspresyonu downregüle olan miR-200 ailesinden miR-200c ve miR-141'in ekspresyon özellikleri incelenerek, katyonik bir biyopolimer olan kitozanla hazırlanan kompleks formlarının MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-435 meme kanseri hücre hatlarında etkinliğini (EMT, protein ekspresyonu, invazyon, apoptoz ve hücre proliferasyonuna etki) ve meme kanseri tedavisinde kullanılabilirliğini in vitro olarak araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: miR-200c ve miR-141 mimikleri ve kitozan kompleksleri oluşturulup, in vitro karakterizasyonları (partikül boyutu, zeta potansiyeli, TEM çalışması, stabilite çalışmaları) yapıldı. Meme kanseri hücre hatlarında doz denemeleri ile her hücre ve her miRNA için uygun doz RT-PCR yöntemi kullanılarak belirlendi. Belirlenen uygun dozlarla kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 komplekslerinin kanser hücre hatlarına transfeksiyonu sonrası hücrelerdeki VEGF, E-kaderin, Tinag11, Igfb4 miktarları ELISA ile ölçüldü ve invazyon, apoptoz ve hücre proliferasyon testleri yapıldı.

Bulgular: miR-200c ve miR-141'in kitozanla tam kompleks oluşumu sağlandı. Komplekslerin in vitro transfeksiyonu ile anjiyogenez, EMT ve invazyonun baskılandığı saptanmıştır.

Sonuçlar: Çalışmamızda miR-200c ve miR-141'in kitozan kompleksleri ile hücrelere stabil olarak taşındığı, hücreye internalize olarak kanser hücrelerinde bozulan miRNA regülasyonunun tedavi edilmesiyle kanser hücrelerinin invazivliğini azalttığı ve kitozan komplekslerinin miRNA için güvenilir ve etkin bir taşıyıcı sistem olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: miR-200c, miR-141, kitozan, meme kanseri, miRNA taşıyıcı sistem

The Development of Chitosan-based Delivery Systems for miRNA (miR-200c and miR-141) on Breast Cancer Treatment

Student's Name : Kübra KABAN

Supervisors :Prof. Dr. Jülide AKBUĞA

:Yrd. Doç. Dr. Emine ŞALVA

Department :Department of Pharmaceutical Biotechnology

1. ABSTRACT

Objective: MikroRNAs are small, endogenous and non-coding RNA molecules which regulate gene expression. Recent studies show that deregulation of miRNAs have been associated with different diseases including cancer. Therefore, miRNAs are important therapeutic target in cancer. However, major obstacles of usage miRNAs in therapy are stability, rapid clearance and internalization. For this reason, it is important in terms of therapy with appropriate carrier system to the cells. Aim of this study is to investigate efficacy (EMT, protein expression, invasion, apoptosis and cell proliferation) and usability in breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MDA-435) of polyplexes forms of chitosan and miR-200c and miR-141 mimics.

Material and Method: miR-200c and miR-141 mimics and chitosan complexes were prepared. In vitro characterisation of these complexes were done. By using RT-PCR method appropriate doses were determined for each miRNAs in breast cancer cell lines. Then, with these dosage have used to investigate VEGF, E-cadherin, Tinag11, Igfb4 protein levels by using ELISA assays and invasion, apoptosis and cell proliferation assays have done.

Result: Chitosan/miR-200c and Chitosan/miR-141 complexes were formed. Inhibition of angiogenesis, EMT and invasion by using in vitro transfection of these complexes have been detected.

Conclusion: Our studies show that chitosan/miR-200c and chitosan/miR-141 complexes were internalized stably to cancer cells, thus deregulated miRNA levels repaired. Invasiveness of cancer cells was reduced. Chitosan complexes were shown to be safe and efficient delivery system for miRNA.

Key Words: miR-200c, miR-141, chitosan, breast cancer, miRNA delivery system

3. GİRİŞ

Kanser dünyada gün geçtikçe daha sık görülen önemli bir sağlık problemidir. Kanser doğasının kompleks olması nedeniyle, yeni tedavi yaklaşımlarına karşın kanserden ölümler gelişmiş toplumlarda halen ikinci sırada yer almaktadır (Fenton ve Longo, 2011).

Meme kanseri; her yıl yaklaşık bir milyon yeni vaka ile kadınlarda kanserlerin görülme sıklığının ve aynı zamanda kadınlarda kanser ölümlerinin en sık nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır (Uhlmann ve ark., 2010).

Son zamanlarda mikroRNA' ların (miRNA) anormal ekspresyonunun meme kanseri dahil farklı insan kanserleri ile de ilişkili olduğu, hücre proliferasyonunda, farklılaşmasında ve apoptozunda önemli rollere sahip olduğu anlaşılmıştır. Yapılan çalışmalarda çeşitli miRNA' ların meme kanser hücrelerinin invaziv ve metastaz yapan fenotipinin regülasyonuna dahil olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda meme kanseri invazyonunu ve metastazını inhibe eden tümör baskılayıcı (supressor) miRNA' lar da bildirilmiştir (Uhlmann ve ark., 2010). Meme kanserinde önemli olan miRNA' ların etkinliği ve terapötik kullanımına ilişkin yayın sayısı ise sınırlıdır.

Gen ekspresyonunu kontrol eden yeni bir sınıf olan mikroRNA' lar (miRNA) endojen, kodlanmayan RNA' larıdır. İlk miRNA lin4 olup 1993' de bulunmuştur. Geçen süre içerisinde biyolojik proseslerdeki farklı rolleri nedeniyle çok yoğun olarak araştırılmıştır. Bunlar arasında kanserdeki rolleri, örneğin hücre çoğalması ve apoptozis gibi önemli hücrel değişikliklerine etkileri araştırılmıştır (Lee ve ark., 1993; Hwang ve Mendell, 2006; Jovanovic ve Hengartner, 2006). Buna ilave olarak miRNA' lar kanser gelişiminin değişik safhalarında etkiye sahiptirler. Kanser komplike genetik bir hastalık olarak, kodlanan ve kodlanmayan genlerdeki ekspresyon ve yapısal anormallikleri kapsar. Özellikle pek çok miRNA' nın ekspresyonunun kanserde downregüle olduğu görülmüştür (Shi ve Guo, 2009).

miRNA'lar küçük (yaklaşık 21-23 nükleotid uzunluğunda) kodlanmayan RNA'lar olup, mRNA'nın 3' untranslated bölgesinde (UTR) komplementer sekanslara mükemmel şekilde bağlanıp direkt mRNA'yı degrade ederek ya da kısmi olarak komplementer sekanslara bağlanıp translasyonel baskılamayı indükleyerek hedef genlerin post-transkripsiyonel gen ekspresyonunu düzenlerler. Herbir olgun miRNA birçok gen hedefini kontrol eder ve her bir mRNA birçok miRNA tarafından düzenlenir. İnsanlarda miRNA genlerinin %50'sinden fazlası, kanserle ilişkili genomik bölgelerde yada fragil, kırılğan bölgelerde lokalizedir, bu nedenle miRNA'lar kanserde yeni teşhis ve prognostik markerlar olarak tedavide yeni moleküler hedefleri oluşturmaktadır (Uchino ve ark., 2013).

miRNA'lar hücrede DNA'dan primer transkriptleri (pri-miRNA'lar) oluşturmak için RNA polimeraz II'den transkripte edilirler, pri-miRNA'lar 7-metilguanozin başlığına sahip olup poliadenillenmiştir. Pri-miRNA'lar RNaz III enzimi olan Drosha ve kofaktörü olan Pasha/DGCR8 tarafından nukleusda işlenir ve stem-loop (saç tokasına benzer) yapısında yaklaşık 60-70 nükleotidlik prekürsörler (pre-miRNA'lar) oluşur ve nukleus zarında yer alan RAN GTP-bağımlı transporter olan Exportin-5 aracılığıyla sitoplazmaya geçer. Sitoplazmada pre-miRNA'lar RNaz III enzimi olan Dicer enzimi ile işlenerek olgun miRNA'lar oluşur ve RNA ile indüklenen susturma kompleksine (RISC) bağlanırlar. miRNA/RISC kompleksi hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanır ve ekspresyonu downregüle eder (Broderick ve Zamore, 2011). Böylece miRNA'lar hücre büyümesi, proliferasyonu, hareketi ve canlılığı gibi birçok farklı hücresel prosesi modüle ederler. miRNA'lar sadece normal fizyolojik proseslerde değil, kardiyomiyopati ve kanser gibi pek çok hastalıkta da rol oynarlar (Chen ve ark., 2008; Esquela-Kerscher ve Slack, 2006). Pek çok hastalığın uygun olmayan miRNA ekspresyonu ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (Medina ve Slack, 2008; Petrocca ve Lieberman, 2009). miRNA'ların, promotor ve kodlanan bölgelerinde ki mutasyonları, tümör oluşumuna neden olur. Bazı hastalıklarda özel miRNA ekspresyonu kaybolur veya azalır. Özellikle kanserde pek çok miRNA ekspresyonu normalden daha düşük seviyededir (Esquela-Kerscher ve ark., 2008). Bu nedenle miRNA'lar pek çok hastalık için tedavide yeni hedefleri oluşturmaktadır.

Son yıllarda miR-200 ailesinin farklı solid tümörlerde potent tümör baskılayıcı rol oynadığı gösterilmiştir (Jurmeister, 2011). Beş üyeli miR-200 ailesi 2 klusterden oluşur; miR-200ab/429 klusteri; miR-200a, b ve miR-429' u kapsar, miR200c/141 klusteri; miR-200c ve miR-141' den oluşur (Korpal ve Kang, 2008; Hung ve ark., 2013).

Son araştırmalar miR-200'lerin pleiotropik etkide bir aile olarak tümörün başlaması, gelişmesi, malign metastaz ve kemorezistansı dahil, tümör gelişiminin bütün kademelerinde görev aldığını göstermiştir (Korpal ve Kang, 2008; Hung ve ark., 2013).

Son yıllardaki yayınlar daha çok miR-200 ailesi moleküllerinin epitelyal-mezenkimal dönüşümdeki (EMT) rolleri ve metastaz ile ilgilidir. Bilindiği gibi metastaz multi-kademeli bir proses olup epitelyal karsinomların çevre dokulara yayılması, sirkülasyonda canlılıkları ve koloni oluşturmaları ile ilgilidir (Ding ve ark., 2012; Korpal ve Kang, 2008).

Metastazda epitelyal karsinom, EMT değişimine uğrar, böylece hücrelerde adezyon azalır, hareket artar, e-kaderin azalır. miRNA-200 ailesinin ekspresyonunun azalması özellikle EMT'nin başlaması ve sürdürülmesinde etkilidir. edilmiştir (Ding ve ark., 2012). Tümörde EMT değişiminde miR-200'lerin promotor bölgelerinde bu değişimde rol oynayan ZEB1 ve ZEB2 transkripsiyon faktörleri için bağlanma yerleri bulunmaktadır. miR-200'ün yüksek miktarda ekspresyonu ZEB'lerin ekspresyonunu baskılamaktadır. miR-200'lerin ekspresyonunun değişmesi pek çok kanser tipinde EMT'ye ve hastalık gelişmesine neden olmaktadır (Dhayat ve ark., 2014).

miR-200'lerin EMT'ye olan etkileri yanında p53'ün tümör baskılayıcı fonksiyonuna da aracılık etmektedirler (Chang ve ark., 2011).

miR-200'lerin bir diğer önemli rolü kanser kök hücrelerinin kendilerini yenilemesini baskılamalarıdır, böylece tümörün baskılanmasında da görev aldıkları ortaya çıkmaktadır (Shimono ve ark., 2009).

Diğer taraftan VEGF sinyal yolları anahtar bileşenlerine, örneğin VEGF-A, FLT1, KDR ve ETS1 hedeflenen miR-200'ler anjiyogeneze katılırlar. Anjiyogeneze görevli bu proteinlerin ekspresyonunu regüle eden miR-200'ler bu şekilde tümör gelişimini engellerler (Choi ve ark., 2011).

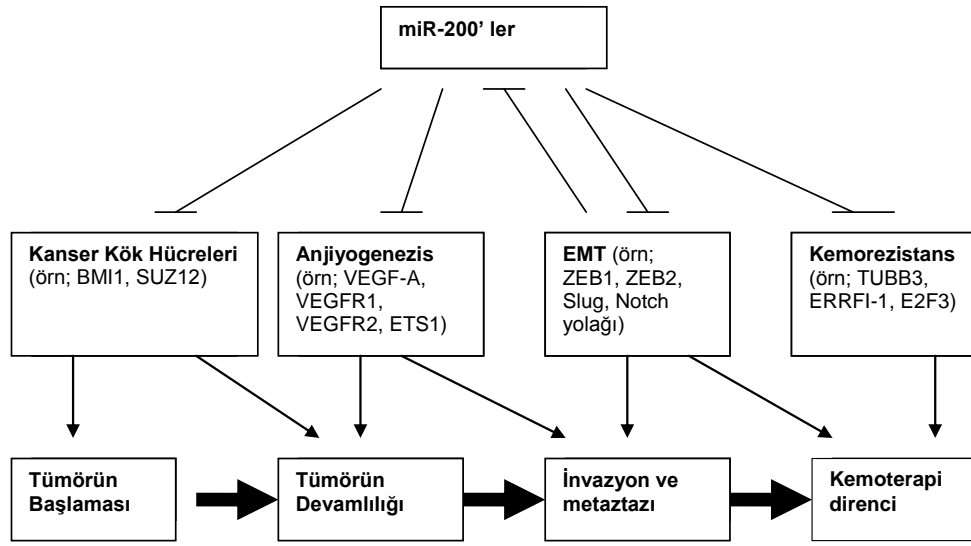
miR-200'lerin etkin olduğu bir diğer konu ise kanser hücrelerinin kemoterapötiklere rezistansıdır (Gramantieri ve ark., 2008)

Kısaca özetlersek miR-200'ler tümör gelişmesinin 4 kademesinde tümör baskılayıcı etkiye sahiptir. (Zhang ve ark., 2014b).

1. Tümörün başlatılması; miR-200'ler BMI1 ve SUZ12'yi hedefleyerek kanser kök hücrelerinin oluşmasını ve gelişmesini modüle eder.
2. Tümörün gelişmesi; miR200'ler anjiyogenezi regüle eder.
3. Malign metastaz; EMT'ye ve böylece kanser invazyon ve metastazını etkiler.
4. Kemorezistansa etkisi; TUB3, ERFFI-1, E2F3 ve EMT ile ilgili hedefleri etkileyen miR-200 ailesinin ekspresyonunun manipülasyonu, kemorezistansa sahip kanserlerin tedavisi için gelecek vaat eden moleküllerdir (Rui ve ark., 2010).

Yukarıdaki mekanizmalara ilave olarak miR-200'lerin tümör mikro çevresini etkileyerek tümörü baskıladıkları da gösterilmiştir (Schliekelman ve ark., 2011).

miR-200'lerin anormal ekspresyonu (çoğunlukla downregülasyonu) nispeten yüksek insidans gösteren hemen hemen tüm solid tümörlerde tespit edilmiştir. miR-200'ler meme kanserinde epitelyal mezankimal geçişin (epithelial mesenchymal transition; EMT) ve invazivliğin potent baskılayıcıları olarak gösterilmektedir, miR-200 ailesindeki regülasyonun bozulması meme kanseri gelişimine, ilerlemesine ve metastazına neden olmaktadır. Bütün bu özellikleri nedeniyle miR-200'ler kanser tedavisinde en ümit veren hedeflerden biri olmuştur. Değişik kimyasallarla miR-200'lerin ekspresyonu modüle edilmeye çalışılmıştır (Li ve ark., 2009).



Şkil 3.1. Kanser gelişimindeki farklı aşamalarda miR-200 ailesinin fonksiyonunun şematik gösterimi. Kanser kök hücrelerinin, anjiyogenezisin, EMT' nin ve kemorezistansın oluşumunda rol oynayan genlerin doğrudan hedeflenmesiyle, miR-200' ler tümör başlaması, tümör korunması, invazyonu/metastazi ve kemorezistansı da dahil kanserlerin ilerlemesinin tüm safhalarında önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Özellikle, EMT' de önemli roller oynayan miR-200' ler ve hedefleri arasında çoklu kendi kendini güçlendiren regulator looplar oluşturulur. Belli biyolojik prosesler malign ilerlemesinin sadece bir tek aşamasına katılır. Özellikle, kanser kök hücreleri, hem tümör başlamasında hem de tümör korunmasında sorumludur; angiogenezis hem tümör büyümesi hem de tümör metastazına katkı sağlayan bir prosestir; EMT prosesi kanser hücrelerine sadece yüksek invazif/metastatik özellikler kazandırmaz aynı zamanda da tümörlerin kemorezistansını kolaylaştırır (Zhang ve ark., 2014a).

miRNA' nın fonksiyonuna ve hastalıklı dokudaki veya kanser dokusundaki durumuna göre miRNA-temelli tedavilerde iki yaklaşım mevcuttur; 1) miRNA antagonistleri (locked nükleik asitler (LNA), antagomiR'ler ve antimiR'ler) kullanılarak tümörü indükleyen miRNA'ların (onkomiR) inhibisyonu ile fonksiyonun kazanılması, 2) fonksiyon kaybını tamir etmek için tümör baskılayıcı fonksiyonları olan miRNA'ların yeniden verilmesi ile miRNA replasman tedavisidir (mimic miRNA'lar). Kısaca, miRNA antagonistleri hastalıkta fonksiyon kazanan

miRNA' ları inhibe ederken, miRNA mimikleri fonksiyon kaybeden miRNA' ların normal olarak ekspresyonlarını sağlar (Aravalli, 2013).

miRNA tedavisi replacement (yerine koyma) ve inhibitor yaklaşımlara karşın in vivo uygulamada diğer nükleik asit-temelli terapötiklerin sorunlarını da taşımaktadır; bunlar stabilite, güvenilirlik ve bariyerleri geçerek uygun doku ve hücrelere etkili bir şekilde ulaşmasıdır. Stabilite sorununun kimyasal modifikasyonla çözümlenmesine karşın, hücreye penetrasyon sorunu devam etmektedir (Pereira ve ark., 2013). Diğer nükleik asitler gibi miRNA' ların da negatif yük taşımaları hidrofobik hücre membranından geçişlerini engellemektedir. Bu sorunun giderilmesi için uygun taşıyıcıların kullanılması gereklidir. Gen taşıyıcı sistem olarak; viral taşıyıcılar yüksek oranda transfeksiyon etkinliğine sahip olmalarına karşın potansiyel mutasyon, rekombinasyon ve onkojenik etkiler gibi ciddi problemler taşımaktadırlar. Alternatif olarak, çok daha güvenli, viral olmayan gen taşıyıcı sistemlere ilişkin çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Viral-olmayan sistemler ile gen taşınmasında strateji; katyonik lipitler, lipozomlar, polikasyonlar, dendrimerler vb. kullanılmasıdır.

Yukarıda kaydedildiği gibi miRNA moleküllerinde de siRNA ve diğer nükleik asit-temelli terapötiklerde olduğu gibi hücreye taşınma, geçiş ve stabilite gibi çeşitli problemler mevcuttur (Soifer ve ark., 2007). Çıplak ribonükleik asitler hızla nükleaz-bağımlı degradasyona uğrar ve bu nedenle biyolojik sıvılarda stabil değildirler. Bu durum RNAi temelli uygulamaların lokal uygulama ile sınırlı kalmasına neden olmaktadır. Ancak lokal uygulama sınırlı sayıda hedef dokuya yapılabilir, bütün hastalıklı hücrelerin ilaçla teması sağlanamaz.

Sistemik uygulama bu nedenle daha iyi bir uygulama şeklidir. Ancak serum nükleazları ile nükleik asitlerin degradasyonu dışında miRNA' lar hedefe ulaşmadan önce pek çok bariyeri aşmak zorundadırlar (endositoz, endozomal serbestleşme gibi). Bütün bu problemlere ilave olarak miRNA' nın sistematik uygulanması diğer oligonükleotid-temelli ilaçlara benzer yan etkiler, örneğin; agregasyon, kompleman

aktivasyon, karaciğer toksisitesi, TLR'lerin immun stimülasyonu gibi (Bader ve ark., 2011) ortaya çıkabilir.

miRNA ilaçları için de diğer nükleotid-temellilerde olduğu gibi benzer teknolojilerden ve taşıyıcılardan yararlanılmıştır. Diğer gen ilaçlarında kullanılan viral taşıyıcılar kullanılmıştır (Roth, 2006). Örneğin, küçük hücreli olmayan akciğer kanser modelinde Let-7 için Adenoviral (AV) veya Lentiviral (LV) vektörler ile taşıma çalışılmış ve Let-7'nin tümörü inhibe edici etkisi saptanmıştır (Esquela-Kerscher ve ark., 2008). Benzer şekilde miR-26a için AV ile taşıma çalışılmıştır (Kota ve ark., 2009).

Kanser tedavisinde miRNA'lar kanser için önemli moleküller olmakla beraber, tedavide kullanılmalarında eksojen miRNA'nın serum ve doku nükleazlarla degradasyon, dokulara taşınmama, hedef hücre tarafından alınmaması ve uygun gen ekspresyonu gibi ciddi sorunlar mevcuttur. miRNA ile gen tedavisinde ideal taşıyıcı sistem, 1)miRNA'yı etkin şekilde taşımalı ve hedef hücreye girmesini sağlamalı, 2)interselüler matriksteki nükleazlara karşı degradasyondan korumalı ve 3)toksik olmamalıdır (Zhang ve ark., 2013).

Eksojen miRNA uygulamasında tek dozla hedefin regülasyonu genellikle sağlanamayabilir. Yukarıda sayılan nedenlerle çok-dozlu miRNA replasmanı veya miRNA' da yapısal modifikasyon ya da formülün optimizasyonu gerekebilir. miRNA' nın yapısal modifikasyonu ise toksisitenin artması gibi değişik sorunları ortaya çıkarabilir.

miRNA' nın 20-30 gün yeterli miktarda salımı gereklidir, ayrıca miRNA replasman tedavisi etkili ve de güvenli olmalıdır. Bu nedenle uygun miRNA taşıyıcı sistem geliştirilmesi son derece önemlidir (Broderick ve Zamore, 2011).

miR-200 ile yapılan yayınların çoğu etki mekanizması ile ilgili olup taşıyıcı vektör olarak çoğunlukla lipofectamin® gibi ticari bir katyonik lipit kullanılmıştır.

Diğer taraftan, biyoyumlu, biyoparçalanır bir biyopolimer olan kitozanın değişik yayınlarla iyi bir DNA, siRNA ve antisens oligonükleotid taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir (Mao ve ark., 2001; Akbuğa ve ark., 2004; Şalva ve ark., 2012; Turan ve ark., 2010). Kitozanın bir diğer önemli özelliği immun yanıt oluşturma özeliğinin zayıf olması ve toksik olmaması ve de katyonik özelliğe sahip olup negatif yüklü miRNA ile kolaylıkla kompleks oluşturmasıdır. Kitozanın miRNA taşıyıcısı olarak kullanıldığı yayın sayısı yok denecek kadar azdır (Deng ve ark., 2014; Geng ve ark., 2013). Ayrıca miR-200' ün tedavide kullanımına ilişkin yayın sayısı da sınırlıdır.

Bu tez çerçevesinde; normal meme hücresinden farklı olarak meme kanserinde ekspresyonu downregüle olan miR-200 ailesinden miR-200c ve miR-141 çalışılmıştır. miRNA'lar ve kitozan ile kompleks oluşturulup, in vitro karakterizasyonu yapılmıştır. miR-200c ve miR-141'in MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435 meme kanseri hücre hatlarında ve MCF-10A sağlıklı meme hücresinde ekspresyon özellikleri incelenerek, hazırlanan formülasyonların bu hücreler üzerindeki in vitro etkinliği (EMT dönüşümü, protein ekspresyonu, invazyon, apoptoz ve hücre proliferasyonuna etki) ve meme kanseri tedavisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser ve Meme Kanserine İlişkin Bilgiler

Kanser dünyada gün geçtikçe daha sık görülen önemli bir sağlık problemidir. Kanser doğasının kompleks olması nedeniyle, yeni tedavi yaklaşımlarına karşın kanserden ölümler gelişmiş toplumlarda halen ikinci sırada yer almaktadır (Fenton ve Longo, 2011).

Meme kanseri dünyada kadın malignitesinin en yaygın formlarından biridir. GLOBOCAN 2012'ye göre tahmini olarak 1.67 milyon kadında 2012 yılında meme kanseri teşhis edilmiştir (Goh ve ark., 2015)

Aynı zamanda hastalık kontrol ve önleme merkezinden (Centre for Disease Control and Prevention) tekrar edilen istatistiklerde meme kanseri Amerika'da kadınlar arasında en yaygın kanser olarak bildirilmiştir (Kamangar ve ark., 2006). Meme kanseri erken aşamalarda saptanmazsa genellikle ölümcüldür (Jazbutyte, 2010). Meme kanserinin erken teşhisi ve tedavisi hastalığın genellikle iyi seyretmesini sağlar. Fakat, çoğunlukla kemorezistansın gelişmesi ve hastalığın metastatik ilerlemesi sebebiyle her yıl yaklaşık olarak 522 000 (kadında tüm kanser ölümlerinin %15' i) meme kanseri hastası ölmektedir. Meme kanseri heterojen bir hastalık olup heteronijitesine bağlı olarak ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizma halen anlaşılammıştır (Kamangar ve ark., 2010; Kaboli ve ark., 2015).

Meme kanseri halk sağlığında küresel bir sorundur, fakat, insan kanserlerinin fenotipleme ve ekspresyon profillenmesindeki güncel gelişmeler, birçok tümörün, özellikle meme kanserlerinin, teşhis ve biyolojik sınıflandırılmasını geniş ölçüde iyileştirilmiştir (Natarajan ve Venugopal, 2011).

Meme kanseri tedavisi dörde ayrılabilir: 1) Saf invazif olmayan karsinom (Lobuler karsinoma *in situ* [LCIS] ve duktal karsinoma *in situ* [DCIS] [evre 0]); 2)

Ameliyat edilebilir, lokal-bölgesel invazif karsinom (klinik evre I, evre II ve bazı evre IIIA tümörler); 3) Ameliyat uygulanamayan lokal-bölgesel invazif karsinom (klinik evre IIIB, evre IIIC ve bazı evre IIIA tümörler); 4) Metastatik veya rekürren karsinom (evre IV) (Aydiner ve Topuz, 2006).

Meme kanseri tedavisi; lokal hastalığın cerrahi, radyasyon tedavisi (RT) veya her ikisi kullanılarak; sistemik hastalığın ise sitotoksik kemoterapi, endokrin tedavisi, biyolojik terapi veya bunların kombinasyonlarıyla tedavi edilmesini içerir. Çeşitli lokal veya sistemik tedavilere gerek duyulması ve bunların seçimi bir takım prognostik ve prediktif faktörlere bağlıdır. Bunlar arasında tümör histolojisi, primer tümörün klinik ve patolojik özellikleri, aksiller nod durumu, tümörün hormon reseptörü içeriği, HER2/*neu* düzeyi, saptanabilir metastatik hastalık olması veya olmaması, hastanın komorbid hastalıkları, yaşı ve menopoz durumu yer alır (Aydiner ve Topuz, 2006).

Sistemik tedavide güçlü prognostik faktörler hasta yaşı, komorbidite, tümörün boyutu, tutulan aksiller lenf nodu sayısı ve olasılıkla HER2/*neu* ekspresyon düzeyidir. Bütün yeni tanı konan invazif meme kanserlerinde HER2/*neu* ekspresyonu düzeyinin belirlenmesi önerilmektedir. HER2/*neu* ekspresyonu düzeyi prognoza dair bilgi edinmek, antrasiklin bazlı adjuvan kemoterapinin siklofosamid, metotreksat ve 5-fluorourasil (CMF) kemoterapisine üstünlüğünü öngörmek ve trastuzumabın adjuvan/neoadjuvan kemoterapi olarak ve yineleyen veya metastatik meme kanseri tedavisi olarak yararlarını öngörmek için kullanılabilir (Aydiner ve Topuz, 2006).

Meme kanserinde geleneksel tedavi yaklaşımlarında, cerrahi tedavi, radyoterapi, kemoterapi ve hormon tedavisi yaygın olarak kullanılırken, monoklonal antikörlerle tedavi de yaygınlaşmıştır. Meme kanserinde metastaz mevcut değilse primer tümörün cerrahi yöntemle giderilmesi hastanın tamamen iyileşmesini sağlayabilir. Fakat, primer tümör metastazı olursa, geleneksel tedavi yöntemleri ile metastatik meme kanserini tedavi etmek çok güçtür (Pulaski ve Rosenberg, 1998).

Meme kanseri distal dokularda hem primer tümör büyümesi hem de metastatik yayılmayı desteklemek için intrinsik ve ekstrinsik tümör hücre proseslerini kullanan sistematik bir hastalıktır. Bu süreçlerde rol oynayan faktörlerin tanımlanması, hastalığı değerlendirme ve hastalık tekrarını önleme açısından önemlidir (Epstein, 2014).

Meme kanseri, mikroarray-temelli gen ekspresyon izleri tanımlanması kullanılarak farklı alttiplere ayrılır. Bu alttiplerin sınıflandırması, meme kanserinin ER (östrojen reseptörü), PR (progesteron reseptörü) ve HER2 reseptör durumlarına dayanmaktadır. Alttipler; Luminal A, Luminal B ve Bazal olarak isimlendirilmiştir. Luminal A; yüksek seviyede ER ve/veya PR eksprese ederken, HER2 negatiftir, Luminal B; ER, PR ve HER2 pozitifdir ve Bazal tümörler; ER, PR ve HER2 negatiftir (Natarajan ve Venugopal, 2011). Meme kanser alt tiplerinde mRNA gen ekspresyonu, fenotipi, prognozu ve farklı tedavilere hassasiyet açısından farklılık göstermektedir (Jazbytyte ve Thum, 2010). Bazı kanser tiplerine nispetle meme kanserinde, tümör DNA kopya sayısı, DNA dizi ve mutasyonları, gen ekspresyon ve protein profilleri, epigenetik ve miRNA'lar gibi çok geniş ve ulaşılabilir genomik bilgi mevcuttur (Natarajan ve Venugopal, 2011).

Kanser tedavisinde normal hücreleri etkilemeden kanser hücrelerini hedefleyen değişik stratejiler geliştirilmektedir. Gen tedavisi de mevcut tedavilere alternatif bir tedavidir. Kanser gen tedavisinde kullanılan antigen ve antisens moleküller ile yapılan prelinik ve klinik çalışmalarda başarılı sonuçlar alınmıştır. Son yıllarda RNA interferans teknolojisinin keşfedilmesi ile siRNA ve miRNA'lar ile meme kanser tedavisinde gen tedavisi çalışmaları yaygınlaşmıştır (Natarajan ve Venugopal, 2011).

Yakın geçmişte, kanser biyomarkerları olarak mikroRNA'ların (miRNA'lar) ortaya çıkışı meme kanserinin "moleküler izlerine" ekstra boyut eklemiştir (Iorio ve ark., 2005; Calin ve Croce, 2006; Wang, 2014)

4.2.Kanserde Gen Tedavisi

Meme kanseri tedavisi son yıllarda geliştirilmiştir ve hastalar için artan bir sağkalım oranına neden olmuştur. Meme kanseri için klinikte kullanılan tedaviler; ameliyat, radyoterapi ve onkogenik süreçleri hedefleyen ilaç tedavilerini içermektedir (Majeed ve ark., 2014). Fakat, son yıllarda gen tedavisi uygulanabilir tedavi seçeneği olarak ortaya çıkmıştır, ancak meme kanseri için onaylı gen tedavi ürünü halen yoktur (McCrudden ve McCarthy, 2014). Gen tedavisi yeni bir tedavi modelidir ve kanser hücre ölümüne veya tümörün büyümesinin yavaşlamasına neden olan yeni gen girişi veya var olan genin manipülasyonunu sağlamaktadır (Anaya-Ruiz ve Perez-Santos, 2015).

Gen tedavisinin temel amacı fonksiyonel genin fonksiyon kaybını onarmak veya hastalığı tedavi etmek amacıyla hücreye yerleştirilmesidir. Gen tedavisi hedeflenen hücrenin yapısına göre iki ana kategoriye sınıflandırılmaktadır; somatik gen tedavisi ve eşey hücrelerinde gen tedavisi (Ibraheem ve ark., 2014).

Hastanın somatik hücrelerine terapötik gen taşındığında bu gen sadece uygulanan nesilde etkisini gösterir ve kalıtımla aktarılmamaktadır. Gen tedavisine ilişkin Avrupa-çapında düzenleme yoktur. Uzmanlar dikkatli risk/fayda değerlendirmesinden sonra hayati-risk içeren hastalıklar için somatik-hücre gen tedavisi denemelerine izin verilmesi gerektiği uzmanlar tarafından tartışılmaktadır (Ibraheem ve ark., 2014).

Sperm veya zigot olarak germ hücrelerine fonksiyonel genin yerleştirilmesine bağlıdır. Gen tedavisinin bu tipi etik sebeplerden dolayı insanlarda uygulanmamaktadır. Fakat, Food and Drug Administration (FDA) Amerika'da eşey hücrelerinde gen tedavisinin kullanımına izin vermiştir (Ibraheem ve ark., 2014).

Bu stratejinin in vivo uygulanmasını sınırlayan ana problem büyük, hassas ve DNA gibi negatif yüklü moleküllerin nükleusa degrede olmadan taşınmasındaki zorluklardır. Gen tedavisinin başarısının temeli güvenli ve etkili taşıyıcı sistemler

oluşturmaya dayanmaktadır (Guo ve Huang, 2012). Gen taşıyıcı sistemlere ilişkin ayrıntılı bilgi 4.8.'de verilmiştir.

Gen tedavisinin farklı uygulamaları vardır; gen ekleme tedavisi, viral gen tedavisi, viral-olmayan gen tedavisi ve RNA interferans-temelli gene tedavisi (Anaya-Ruiz ve Perez-Santos, 2015).

4.3. RNA İnterferans (RNAi)

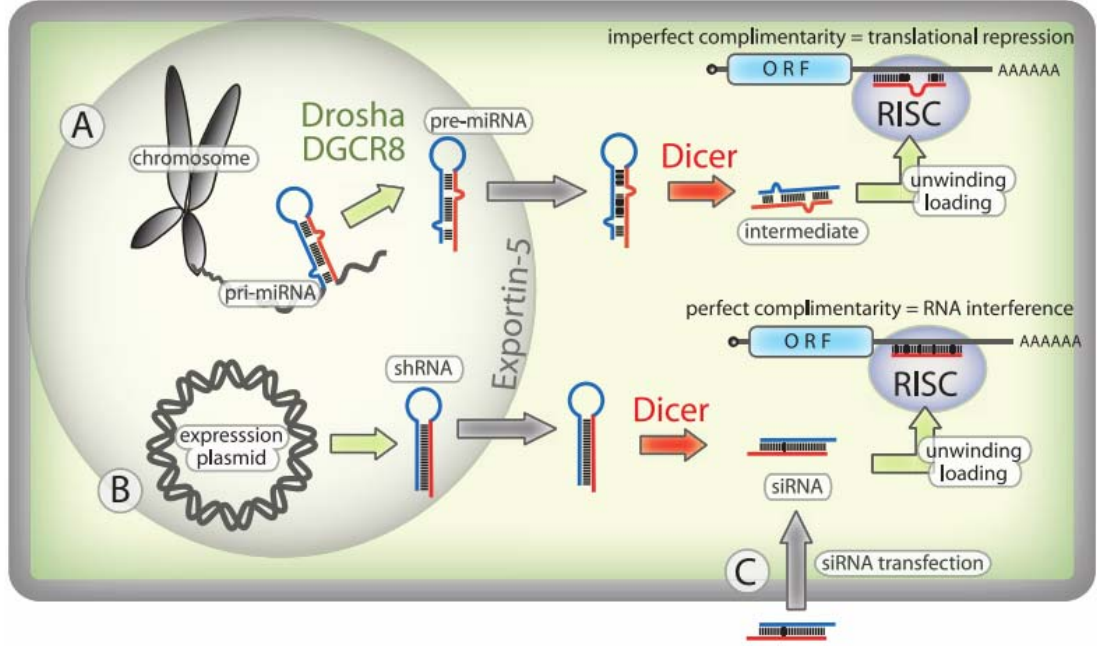
Biyoteknolojik ilaç geliştirilmesinde hedef, hücre, doku ve organlardır (Whittaker, 2003). İnsan genomunda çoğu genin tanımlanması; potansiyel yeni ilaç hedeflerinin birçoğunun öngörülmesini sağlamıştır. Fakat, ilaç tedavisinde bu genomik bilginin translasyonu halen karşılaşılan en önemli sorundur. Hastalarda olası terapötik cevabı oluşturmak için hedefi bilinen ilacın modülasyonu en önemli adımdır. Başlıca sınırlamalar, bir hastalığın patolojisine fonksiyonel olarak dahil olan gen ürünlerinin (hedef doğrulama) belirlenmesidir. Hem hedef doğrulama hem de terapötik strateji olarak mRNA hedeflenmesi aktif olarak ribozimler veya antisens uygulamaları kullanılarak sürdürülmektedir. RNA interferans (RNAi) teknolojisinin keşfedilmesiyle gen tedavisi çalışmaları yeni bir boyut kazanmıştır (Leung ve Whittaker, 2005).

RNAi ilk olarak 1980'lerin sonların bitki biyologları tarafından gözlenmiştir, ancak 1990'ların sonunda nematod *Caenorhabditis elegans*'da Andy Fire ve Craig Mello tarafından yapılan çalışma RNAi'nin evrimsel korunmuş gen-susturma mekanizması olduğunu gösterene kadar RNAi'nin moleküler mekanizmasındaki belirsizlik devam etmiştir. dsRNA injekte ederek sitoplazmik mRNA'nın etkin ve dizi-spesifik degradasyonunu izlenmiştir. dsRNA tarafından dizi-spesifik post-transkripsiyonel gen susturma birçok organizmada korunmuştur: bitkiler, *Neurospora*, *Drosophila*, *C. Elegans* ve memeliler. Bu proses virüslere karşı normal savunma ve değiştirilebilir genetik elementlerin mobilizasyonu ile ilgilidir (Leung ve Whittaker, 2005; Grünweller ve Hartmann, 2005; Ku ve Mcnamus, 2008).

I- RNAi mekanizması

RNA engellemesi veya RNA interferans birçok reaksiyonda komplementer mRNA hedeflerinin spesifik ve etkili degradasyonunu indükleyen endojen hücrel mekanizmadır (Grünner ve Hartmann, 2005). Küçük RNA moleküllerinin üç tipi shRNA, siRNA ve miRNA, RNAi teknolojisinde merkezi bir role sahiptir (Fujita ve ark., 2015). Bu kısa RNA'lar sitoplazmik ribonükleaz III proteini olan Dicer ve multiprotein kompleksi olan indüklenmiş-RNA susturma kompleksi (RISC) katılmasıyla mRNA'ların degradasyonuna (post-transkripsiyonel gen susturma) sebep olan biyokimyasal olaylar kaskadını tetiklemektedir. Endojen olarak üretilen miRNA'lar nükleusta büyük öncül (prekürsör) formlarda üretilir. Drosha enzimi primer miRNA transkriptlerinin pre-miRNA'lar (~70mer) haline işlenmesine aracılık eder. Pre-miRNA'lar daha sonra sitoplazmaya taşınır (Lee ve ark., 2003). Dicer; endojen miRNA-kaynaklı veya virüs replikasyonu kaynaklı çift-iplikli moleküllerin 3'dinükleotid overhang yapı taşıyan 19-25 baz çiftlik (bp) küçük RNA dupleksleri haline kesmekten sorumludur (Bernstein ve ark., 2001). Küçük interferans RNA (siRNA) dubleksinin RISC ile birleşmesi ATP-bağımlı helikaz tarafından dupleks yapı açılması sonrasında, 2 iplikçikten herhangi birinin bağımsız olarak mRNA'ları tanımasını sağlar (Kisielow ve ark., 2002). siRNA'lar Watson-Crick baz eşleşmesi kurallarına dayanarak tasarlandığı için, potansiyel olarak ilgilenilen herhangi geni susturabilir (Grünweller ve Hartmann, 2005).

RNAi, terapötik gen susturmasının gelişmesi için umut vaat etmektedir. Hedef seçimi ve RNAi taşınmasındaki son gelişmeler translasyonel medikal araştırmalar için dikkat çekici olmuştur (Fujita ve ark., 2015). RNAi mekanizması şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. miRNA, shRNA ve siRNA için Memeli Post-transkripsiyonel Gen Susturma Yolağı. (A) miRNA’lar primer miRNA transkriptleri olarak genemik bölgede transkripte edilir. Pri-miRNA’lar Drosha/DGCR8 tarafından precursor miRNA’lar (pre-miRNA) olarak işlenirler ve daha sonra Exportin-5 aracılığıyla sitoplazmaya taşınırlar. Pre-miRNA Dicer tarafından işlenir ve olgun miRNA RICS kompleksine yüklenir. (B) miRNA’nın aksine shRNA’lar eksojen kaynaklı DNA tarafından doğrudan pre-miRNA-benzeri moleküller halinde transkripte edilir ve bu nedenle Drosha/DGCR8 prosesine gerek yoktur. Daha sonra miRNA’lar gibi sitoplazmaya exportin-5 aracılığıyla taşınır. Sitoplazmada loop yapısı Dicer tarafından kesilir ve bir dizi RISC’e yüklenir. (C) Memelilerde, siRNA’lar yapay olarak sitoplazmaya transfekte edilir ve daha sonra RISC’e yüklenirler (Li ve ark., 2009).

Fakat, RNAi gibi nükleik asit-temelli tedavi stratejilerinin ana problemi etkin ve spesifik taşınmadır. Klinik öncesi RNAi çalışmalarında başlıca taşıma stratejileri olarak doğrudan lokal veya sistemik uygulama için “çıplak” ve peptit- veya kolesterol-konjugat siRNA’lar kullanılır veya efektör molekülleri spesifik hedef hücre veya dokuya taşımak için daha kompleks viral-olmayan nanopartiküller veya viral-temelli taşıyıcı sistemler kullanılır. Hücre kültüründe siRNA lipofektamin gibi lipofilik ajanlarla veya elektroporasyonla kolaylıkla taşınabilir. Fakat, bu

uygulamaların hayvan deneylerinde toksik yan etki oluşturmaları nedeniyle uygulanabilir değildir (Grünweller ve Hartmann, 2005).

4.3.1. MikroRNA'ya İlişkin Bilgiler

MikroRNA'lar, hücre döngüsü, hücre farklılaşması, gelişmesi, apoptozu ve regülasyonu gibi birçok biyolojik prosesde önemli rolleri olan gen ekspresyon modülatörlerinin yeni geliştirilen bir sınıfıdır. Bu küçük RNA moleküllerinin dereglasyonu, birçok çalışmada, kanser gibi hastalıkların başlaması ve ilerlemesi için temel belirleyici olarak tanımlanmıştır. Sadece miRNA'lar değil aynı zamanda miRNA prosesinden sorumlu enzimler de kanserde dereglene olabilmektedir. (Schooneveld ve ark., 2015)

MikroRNA'lar; tek zincirli, küçük ~ 22 nükleotidlik, kodlanmayan, hedef mRNA'ya baz eşleşmesi ile bağlanarak gen ifadesini post-transkripsiyonel olarak baskılayan endojen RNA'lardır (Lee, 2013; Gurtan ve ark., 2013; Bail ve ark., 2010). MikroRNA'lar mRNA'ların 3'-UTR'lerine spesifik olarak bağlanarak ve translasyonlarını inhibe ederek ökaryotik gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak regüle eder. miRNA'ların hedef mRNA'ların 5'-UTR gibi kodlanan bölgelerini de hedefleyerek gen ekspresyonunu modüle ettiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2014). İnsanda 600'ün üzerinde miRNA karakterize edilmiştir ve genin yaklaşık %3'ünü temsil eden insan genomu tarafından kodlanan 1000'den fazla miRNA olduğu öngörülmektedir (Bail ve ark., 2010).

miRNA'lar genellikle 3 genomik bölgede bulunur. Genomik lokalizasyonuna göre, miRNA'lar; kodlanmayan transkriptlerde lokalize ekzonik miRNA'lar, kodlanmayan transkriptlerde lokalize intronik miRNA'lar ve protein kodlayan transkriptlerde lokalize intronik miRNA'lar olarak sınıflandırılabilir (Iorio ve ark., 2011; Sotillo ve Thomas-Thikhonenko, 2011).

MikroRNA'lar RNA polimeraz II tarafından büyük primer transkriptler (primiRNA'lar) olarak transkribe edilirler (Lee, 2013).

miRNA prosesi 2 faz içerir. Birincisi nükleusta yer alan RNaz III ailesinden Drosha tarafından yapılır. İkincisi de sitoplazma da RNaz ailesinden Dicer tarafından yapılır (Iorio ve ark., 2011) (Şekil 4.2.).

Primer miRNA'lar (pri-miRNA), ilk transkriptte edilen miRNA'dır (Zhang ve ark., 2013).

Drosha ribonükleazı, nükleer RNaz III ailesi enzimlerinin bir üyesidir ve dsRNA bağlama proteini ve regülatör bir alt ünite olan DGCR8/Pahsa (DiGeorge Syndrom Critical Region Gene 8) ile mikroşlemci enzim kompleksi olarak isimlendirilirler. Bu mikroşlemci kompleks, ikinci işleme adımı için tanıma dizisi olarak hizmet veren 3' sonlanma ucunda bir 2 nt overhang ile bir 3' hidroksil ve bir 5' fosfat içeren, yaklaşık 70nt uzunluğunda prekürsör miRNA (pre-miRNA)'ları üretir (Bail ve ark., 2010)

Genellikle pre-miRNA'lar, exportin-5 ve Ran-GTP tarafından sitoplazmaya taşınırlar. (Lund ve ark., 2004; Bail ve ark., 2010; Verghese ve ark., 2008).

Sitoplazmada pre-miRNA RNaz III ailesinden diğer bir endoribonükleaz olan Dicer tarafından ikinci defa kesilir. Dicer siRNA prosesinde de rol oynamasından dolayı Hannon ve Plasterck laboratuvarlar tarafından keşfedilen RNAi yollarında ortak bir basamağı oluşturur (Sotillo ve Thomas-Thikhonenko, 2011)

Dicer, pre-miRNA'yı kesmeden önce TRBP (transactivating response RNA binding protein) ile kompleks oluşturur (Chendrimada ve ark., 2005). Stem-loop yapısındaki pre-miRNA'nın loop yapısını keser ve aynı zamanda miRNA dubleks olarak da bilinen 22-25 nt uzun dsRNA'yı oluşturur. Bu dubleks yapı, fonksiyonel veya rehber miRNA iplikciği ve onun tamamlayıcısı, fonksiyonel olmayan veya yolcu iplikciği (miRNA*) içerir. Prensip olarak, her iki iplikcik de miRISC (miRNA Induced Silencing Complex) içine dahil olma yeteneğine sahiptir ve olgun miRNA haline gelir veya degrade olur (Schwarz ve ark., 2003; Khvorova ve ark., 2003).

miRNA yüklü RISC kompleksinin fonksiyonu için 4 Argonat proteininden (Ago1-4) birini belirgin olmayan şekilde tercih ederek çalıştırır; ancak sadece Ago2 endonükleaz aktiviteye sahiptir ve hedef mRNA'yı bölebilir (Sotillo ve Thomas-Thikhonenko, 2011).

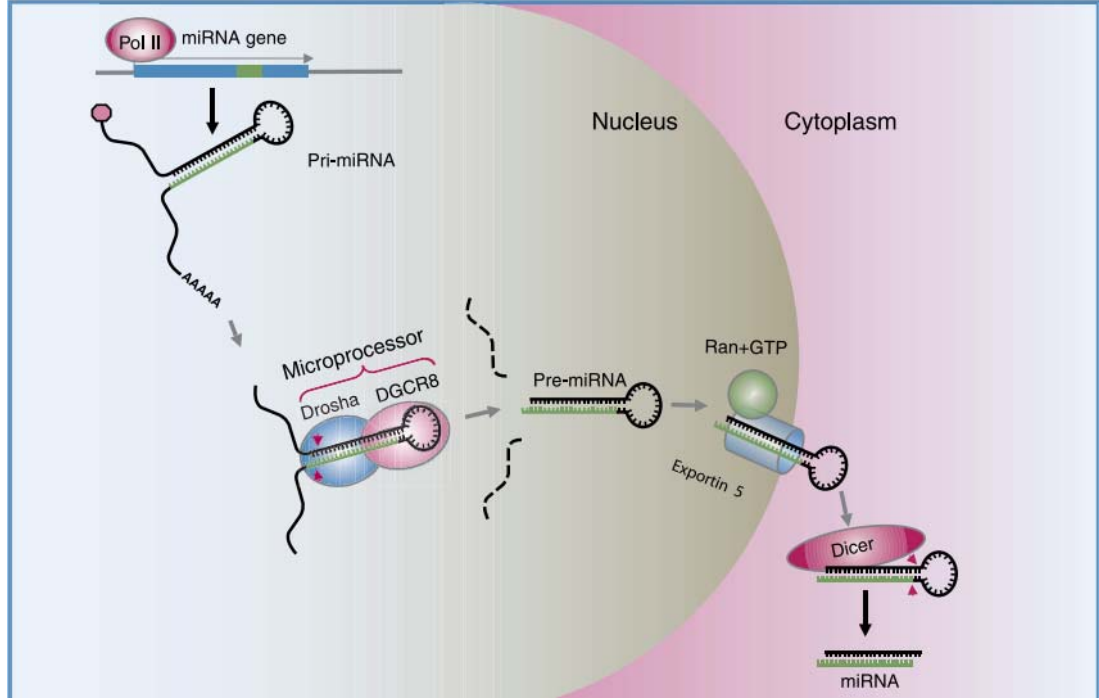
miRISC oluştuktan sonra, kendi hedef mRNA'sının 3'UTR (translate olmamış bölge)'sine bağlanır. Bu bağlanma çok sıklıkla miRNA 5'-terminalde lokalize 7-8 nt'lik bir bölge olan miRNA çekirdek dizisi boyunca oluşur. Genel anlamda, kusursuz bir mRNA/miRNA tamamlayıcılığı ve destabilize edici etkilere sahiptir (Sotillo ve Thomas-Thikhonenko, 2011).

Özellikle 3'-UTR, farklı miRNA'lar için çoklu miRNA bağlanma bölgeleri içerebilir ve tek bir miRNA pek çok hedefe bağlanabilir. Bu durum, miRNA-temelli tedaviler için birçok hedefin tek bir molekülle regüle edilebilmesinden dolayı önemli avantaj oluşturmaktadır (Soriana ve ark., 2013).

MiRNA aracılıklı mRNA susturulmasının en az üç bağımsız mekanizması açıklanmıştır. Bunlar; hedef parçalanması (target cleavage), translasyonel inhibisyonu ve mRNA oluşmasının engellenmesi (mRNA decoy)'dir (Sotillo ve Thomas-Thikhonenko, 2011).

miRNA ile gen ekspresyonunun regülasyonu ya mRNA'nın degradesyonu ya da mRNA'nın translasyonunun inhibisyonu ile yapılır. miRNA'lar; belirli miRNA ve hedef mRNA arasındaki tamamlayıcılık derecesine bağlı olarak translasyonu inhibe ederler (Hutvagner ve Zamore, 2002).

Tipik olarak, çekirdek dizi 2-7 nükleotit uzunluğundadır ve miRNA/mRNA eşlenmesi pozisyon 10 ve 11'e geldiğinde, Ago2 hedef mRNA'nın parçalanmasını katalize eder. (Hutvagner ve Zamore, 2002).



Şekil 4.2. miRNA biyogenezisi (Gregory ve Shiekhattar, 2005)

miRNA'ların fonksiyonunu göstermesi miRISC kompleksi ile etkileşmesi yoluyla olmaktadır. siRNA ve mRNA'nın siRISC tanınması gibi, mRNA'nın miRISC tanınması miRNA'nın mRNA ipliği ile çok iyi bir şekilde baz eşlenmesi yoluyla olabilir. Fakat, hedef mRNA'lara miRISC'lerin bağlanması çok iyi eşlenmeyi gerektirmez. Bu gelişigüzellik siRNA ile karşılaştırıldığında miRNA'nın benzersiz özelliği olmasına rağmen, miRISC ve siRISC fonksiyonlarının mekanizmasında önemli örtüşme olduğunu göstermektedir. miRISC kompleksi (mRNA'ya bağlanan) translasyonu baskılar veya indükler (stimüle etmesi nadir olarak görülse de) (Zhang ve ark., 2013).

Yaklaşık 10 yıldır, miRNA araştırmaları hızlı bir şekilde miRNA taramadan, terapötik geliştirme programlarına taşınmıştır. Bu hızlı ilerleme hastalık patolojisinde veya tedavisinde miRNA'ların önemini yansıtmaktadır (Iorio ve ark., 2011).

4.4. miRNA ve Kanser

miRNA'ların regülasyonunun bozulması kanser dahil birçok hastalıkla ilişkilidir. Yüksek-çıkıtlı miRNA profillemeye, meme kanseri gibi çeşitli kanserlerde

miRNA ekspresyonunun regülasyonunun bozulduğu yerde, farklı “miRNA izleri” ortaya çıkarmıştır. miRNA izlerinden çeşitli epitel kanserlerin tabakalaşmalarında ve karakterizasyonunda bolca yararlanılabilir (Goh ve ark., 2015).

Kanserlerin çoğunda, tümör süpressör olarak rol oynayan miRNA’ların ekspresyonu genellikle azalmıştır. Güncel yayınlarda insan tümör-kaynaklı hücreler ile karşılık gelen sağlıklı dokular karşılaştırıldığında tümör kaynaklı hücrelerde birkaç miRNA’nın düşük seviyelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (Gaur ve ark., 2007). Diğer bir çalışmada kanserde miRNA’nın ekspresyonunun kaybının tümör oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2007). Bu sonuçlar miRNA ekspresyonunun kaybının tümör oluşumunu artırdığını desteklemektedir (Natarajan ve Venugopal, 2011).

Kanser gelişmesi ve ilerlemesi ile miRNA’ların yukarıda bahsedilen ilişkileri göz önüne alındığında, bu küçük düzenleyici RNA’lar anti-kanser gen tedavisinin potansiyel hedefleridir. AntagomiR’lere dayalı antisens teknolojisi; tümör hücrelerinde istenmeyen miRNA ekspresyonunu azaltmak için önemli bir metod olarak kullanılmaktadır. AntagomiR’ler, spesifik miRNA’ları antagonize etmek için dizayn edilmiş oligonükleotidlerin yeni bir sınıfını temsil etmektedir. Antisens moleküller onkogenik miRNA’ların aktivitesini inhibe edebilirler ve bunlar, miRNA bağlanma bölgeleri içeren reporter gen üzerinde miRNA aktivitesini azaltabilirler (Natarajan ve Venugopal, 2011).

Tümör süpressör olarak görev yapan miRNA’lar aynı zamanda aşırı eksprese olduğu gibi; kanserde kaybolmuş da olabilir. Böylece yeni kanser tedavilerinde miRNA’nın hedeflenmesine karşı alternatif uygulama olarak; bu kayıp miRNA’ların ekspresyonunu tamir etmek için bir taşıyıcı sistemle birlikte miRNA’ların taşınması ve eş zamanlı olarak miRNA’nın hedefi olan genin ekspresyonunu baskılaması olacaktır (Natarajan ve Venugopal, 2011).

4.5. Meme Kanserinde mikroRNA

Bugüne kadar, miRNA profillemeye ile analizi yapılmış meme tümörlerinin her tipinde aynı doku orjinli normal doku ile karşılaştırıldığında önemli derecede farklı miRNA profilleri gösterilmiştir. miRNA profillemeye meme kanserinin tümör oluşumu ve ilerlemesinde miRNA'ların çeşitli rollerini belirlemek için kullanılmaktadır. Büyük-ölçekli miRNA profilleri birçok miRNA'nın meme kanseri hastalarının tümörlerinde deregüle edildiğini bildirilmiştir (Andorfer ve ark., 2011).

miRNA'ların anormal ekspresyonu meme kanseri dahil çeşitli insan kanserleri ile ilişkili olduğu ve hücre proliferasyonunda, farklılaşmasında ve apoptozunda önemli rollere sahip olduğu daha fazla belirgin hale gelmektedir. Çeşitli miRNA'ların meme kanseri hücrelerinin invaziv ve metastaz yapan fenotipinin regülasyonuna dahil olduğu gösterilmiştir. Oysaki meme kanseri invazyonunu ve metastazını inhibe eden tümör süpressör miRNA'lar da bildirilmiştir. Benzer olarak, çeşitli miRNA'ların hücre döngüsünün ilerlemesini modüle ederek hücre proliferasyonunu veya anahtar ara ürünleri hedefleyerek apoptozu regüle ettiği de bildirilmiştir (Uhlmann ve ark., 2010).

Meme kanserinde anormal ekspresyonun tanımlanmasına rağmen, miRNA ekspresyonlarında önemli farklılıklar vardır. Meme kanserlerinde bulunan intrinsik heterojenite dikkate alındığında, miRNA profillerindeki değişkenlik HER2, ER veya PR durumu, tümör durumu, vasküler invazyon veya proliferasyon indeksleri gibi klinikopatolojik değişkenlerden ortaya çıkabilir (Andorfer ve ark., 2011).

miRNA'ların onkogenezi modüle edebileceğini destekleyen birkaç çalışmada miRNA'ların meme kanserinde deregüle edildiği gösterilmiştir. Meme kanserinde, miR-21 ve miR-155 up regüle edilirken, miR-200'ler, miR-10b, miR-125b ve miR-145 downregülasyonu, bu miRNA'ların ya tümör süpressör ya da onkogen olarak önemli bir rol oynayabileceğini desteklemektedir. Aynı zamanda, proonkogenik/prometastatik miRNA'ların upregülasyonu ve/veya antionkogenik/antimetastatik miRNA'ların downregülasyonu ile tümör meteastazi

teşvik edilebilir. miR-7, miR-128a, miR-210 ve miR-51-3p'nin meme kanseri ilerlemesine dahil olmaktadır. miR-373 ve miR-520c'nin upregülasyonu, CD44 ekspresyonunu inhibe ederek metastazın sürmesini sağlamaktadır. miR-21'in antionkogenik fonksiyonda önemli rol oynayan tropomiyosin 1'i hedeflemektedir (Natarajan ve Venugopal, 2011). Goh ve arkadaşları kanserin özelliklerine dayalı meme kanserine dahil olan miRNA'ları derlemiş ve listelemişlerdir (Tablo 4.1.) (Goh ve ark., 2015).

Tablo 4.1. Farklı meme kanserlerinde kanser özelliklerine göre gruplandırılmış miRNA ekspresyonları (Goh ve ark., 2015).

Özellikler	Upregüle miRNA'lar	Downregüle miRNA'lar
Proliferatif Sinyali Destekleyen miRNA'lar	miR-21 miR-146a miR-146b-5p miR-27 miR-106b miR-155 miR-210 miR-301 miR-375 miR-378	miR-7 miR-17-5p miR-101 miR-125a miR-125b miR-126 miR-193b miR-203 miR-205 miR-206 miR-214 miR-22 miR-30 miR-302c miR-451 miR-96 miR-26b miR-107 miR-195-5p miR-30a miR-24 miR-100
Büyüme Süpressörlerden Kaçınma	-	miR-451
Hücre Ölümüne Direnç	miR-155 miR-128 miR-191/425	miR-147 miR-1226 miR-26a miR-26b miR-451 miR-34a miR-99a miR-195

İnvazyon ve Metastazi Aktifleştirme	miR-10b miR-21 miR-29b miR-103 miR-107 miR-200c miR-210 miR-301 miR-495 miR-661 miR-9 miR-301a miR-374a miR-182 miR-96 miR-221 miR-222	Let-7g miR-9 miR-124 miR-1258 miR-145 miR-183 miR-214 miR-200c miR-22 miR-203 miR-335 miR-339-5p miR-31 miR-34 miR-340 miR-520b miR-720 miR-34c
Anjiyogenezi indüklenme	miR-301 miR-9 miR-155	miR-126
Replikatif immortalite	-	miR-22 miR-127
Hüresel aktivitenin deregülasyonu	miR-378 miR-155/miR-143	miR-200a
İmmün cevapları önleme	miR-155 miR-10b	miR-148 miR-150 miR-152 miR-155 miR-19a-3p miR-92a

Meme kanseri-bağlantılı miRNA'lar onkogen ve tümör süpressör miRNA'lar olarak ayrılabilir. Kanserin çeşitli durumlarında onkomiR'lerin overeksprese veya upregüle edildiği ve tsmiR'lerin ise downregüle edildiği bulunmuştur. Meme kanserini tedavi etmek için, miRNA'ların onkogen veya tümör süpressör rollerini ve meme kanseri gelişmesi ve ilerlemesini nasıl etkilediklerini anlamamız gerekmektedir. TsmiR'lerin overekspresyonu anti-kanser terapötik etkiler sağlarken, onkomiR'lerin bloklanması ve downregülasyonu meme kanseri tedavisinde önemli bir rol oynayabilir (Kaboli ve ark., 2015).

4.5.1. Onkogenik MiRNA'lar

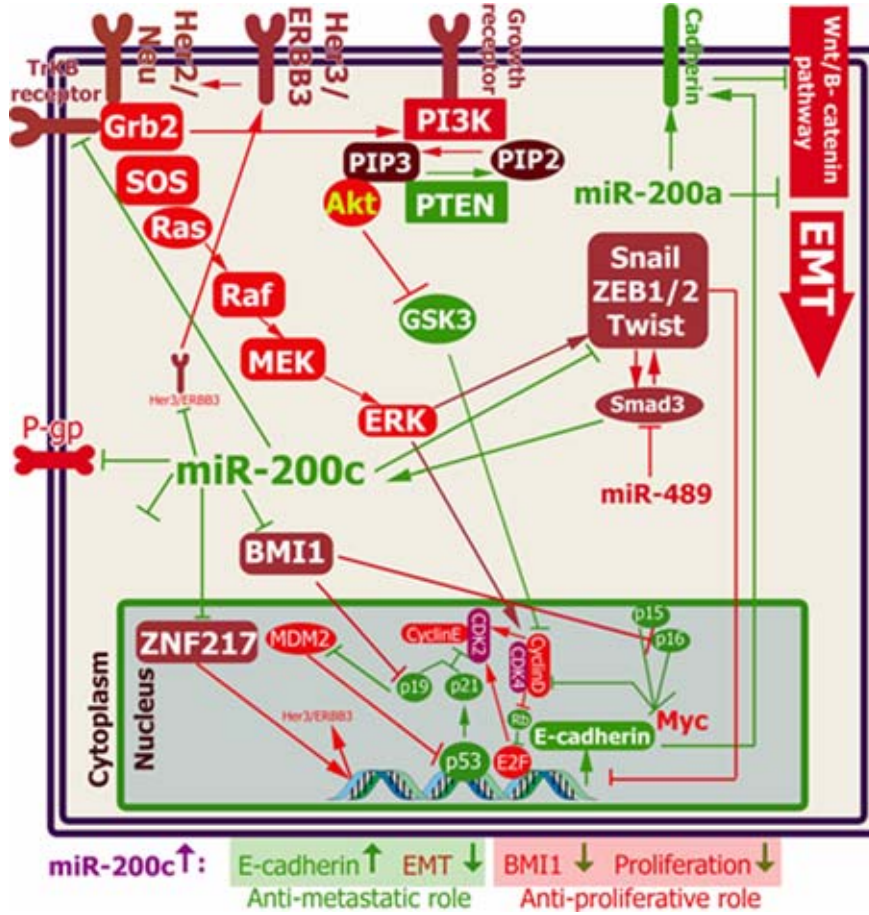
Tümörlerde ekspresyonu artan miRNA'lar onkogenler olarak nitelendirilebilir. "OnkomiR'ler" olarak isimlendirilen bu onkogen miRNA'lar genellikle hücre farklılaşması veya apoptozu kontrol eden genleri ve/veya tümör süpressör genleri negatif olarak inhibe ederek tümör gelişimini yürütürler. Birçok miRNA'nın farklı kanserlerde önemli derecede over-eksprese edildiği bulunmuştur (Zhang ve ark., 2007).

Meme kanserinde, onkomiR'ler kanser hücrelerinin metastazını ve proliferasyonunu çoğunlukla etkilerler ve çok az onkomiR'in anjiyogenez ve apoptoza dahil olduğu bilinmektedir (Kaboli ve ark., 2015).

Yaklaşık olarak kanserle ilişkili ölümlerin %90'una metastaz neden olmaktadır; böylece, metastazı inhibe etmek için etkili bir yol bulmak her yıl bildirilen ölümlerin sayısında önemli bir azalmaya önderlik edebilir. Güncel anti-kanser ilaçları (örn; bevacizumab) metastaza karşı daha az etkilidir. Birçok miRNA'nın meme kanserinin metastazını yürüttüğü bulunmuştur, örneğin; miR-301a, miR-103/107, miR-21, miR-9, miR-181b-1, miR-17/92, miR-489, miR-495, miR-520c ve miR-373. Bu miRNA'ların ekspresyonunu azaltmak için bir terapötik strateji bulmak meme kanseri tedavisi için etkili bir yaklaşıma yol açar (Kaboli ve ark., 2015).

Meme kanser hücreleri EMT sistemini kullanabilir ve bazı miRNA'lar metastazı teşvik etmek için EMT'yi etkileyebilir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), β -catenin ve E-kaderin hücre migrasyonunu kontrol eden proteinlerdir. Bir onkomiR olarak miR-489 EMT aktive etmek için Vimentin ve N-kaderin ekspresyonunu artırdığı kadar E-kaderin ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur. miR-489 aynı zamanda Smad3'ü inhibe eder ve indirekt olarak miR-200c seviyesini etkiler. Smad3 inhibisyonu, miR-489; ZEB1 ve ZEB2 aktivasyonu yoluyla meme tümör metastazına yardım eder. miR-489 ve miR-200c zıt fonksiyonlara sahiptir ve tersine olarak migrasyonun hücreyel yolağını modüle eder.

Meme kanserinde, birkaç çalışma miR489 seviyesi arttığında miR-200c seviyesinin azaldığını göstermiştir. (Şekil3). Böylece miR-489/miR-200c bağlantısı EMT'yi kontrol ve baskılamak için etkili bir hedef olabilir (Kaboli ve ark., 2015).



Şekil 4.3. Epitelyum-mezenkimal geçiş (EMT)'nin anahtar regülatörleri olarak miR-200 ailesi üyeleri. miR-200c E-kaderin ekspresyonunu aktive etmek için ZEB (Zing finger E-box binding homeobox)'leri inhibe etmektedir; bu nedenle, epitelyum hücre bağlantıları kuvvetlendirilmiştir. B hücre-spesifik Moloney murin lösemi virüs entegrasyon bölgesi 1 (BMI1; hüresel proliferasyon ve ölümsüzlük) ve zinc finger protein 217 (ZNF217; HER3/HER3 aktivatörü) gibi proteinlerin inhibisyonu hücre döngüsünün durmasına öncülük eder. MiR-200c hücre proliferasyonu gibi metastaz ve EMT'yi de inhibe eder. Diğer yandan, miR-200c downregülasyonu permeabilite glikoprotein seviyelerinin artmasıyla ilaç direncine de sebep olabilir (P-gp; ATP bağlanma kaseti [ABC] taşıyıcı). TrkB: tirozin reseptör kinaz B (Kaboli ve ark., 2015).

4.5.2. Tümör Süpressör MiRNA'lar

Onkogenezde bazı miRNA'ların ekspresyonu kanser hücrelerinde azalır. Bu miRNA'lar tümör süpressör olarak nitelendirilir. Tümör süpressör miRNA'lar genellikle hücre farklılaşmasını ve apoptozu kontrol eden onkogen ve/veya genleri negatif olarak inhibe ederek tümör gelişmesini önlemektedir. Bugüne kadar bir çok miRNA tümör süpressör gen olarak nitelendirilmiştir (Zhang ve ark., 2007).

Farklı tsmiR'ler meme kanser baskılanması için farklı mekanizmalara sahiptir (Kaboli ve ark., 2015).

Yapılan birçok çalışma bulguları miRNA'ların insan kanserlerinin patogenezinde önemli roller oynadığını desteklemektedir. Bazı miRNA'lar hücre farklılaşması ve apoptozu kontrol ederek kanser gelişmesine katılabilirken, bazıları onkogenleri ve/veya tümör süpressörleri hedefleyerek kansere dahil olabilir. miRNA'ların fonksiyonunu anlamak kanserin moleküler temelini ve kanser teşhis ve kanser tedavisi için yeni biyomarkerların anlaşılmasını sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2007).

Meme kanserinde deregüle olan miRNA'ların fonksiyonlarının birkaçı çalışılmış olmasına rağmen, tanısal belirteçler veya terapötik ajanlar olarak kullanılması için halen çalışılması gerekmektedir.

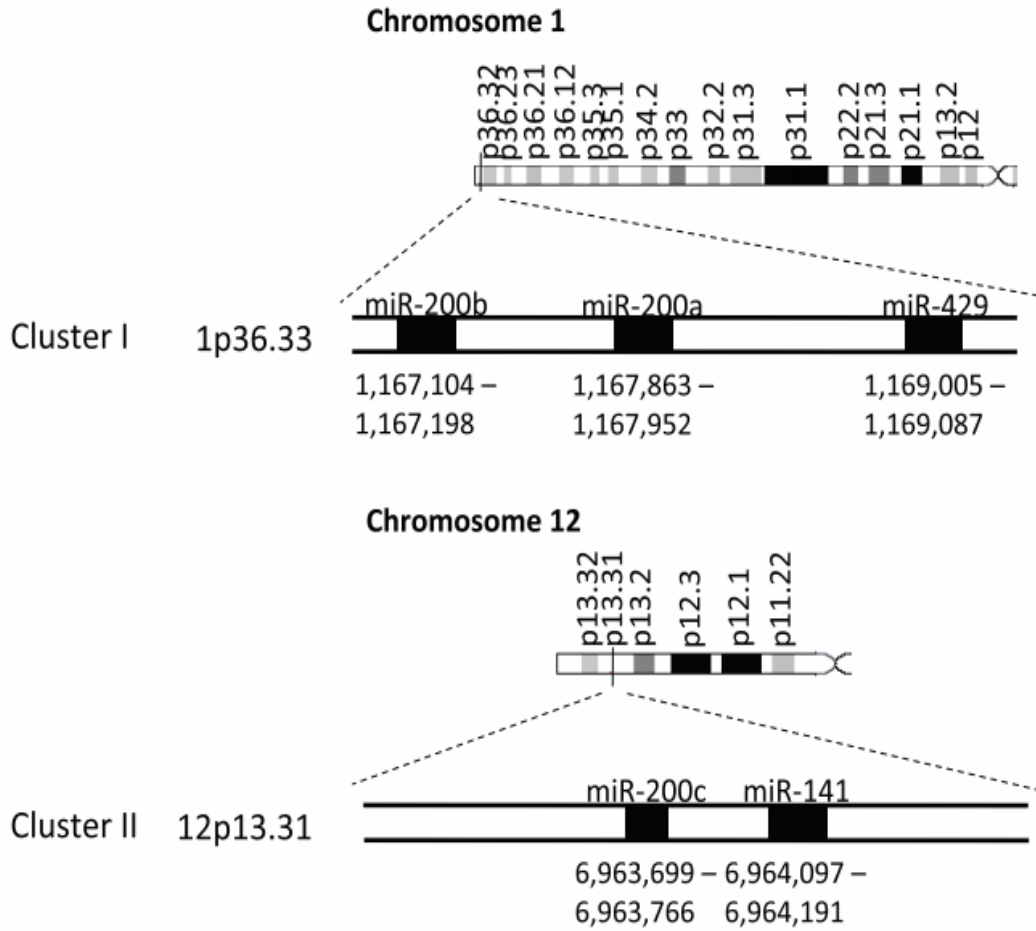
4.6. Kanserde MiR-200 Ailesinin Rolü

Son zamanlarda, miRNA'ların bir ailesi olan miR-200 ailesinin, solid tümörlerin birçok tipinde tümör baskılayıcı olarak potent rol oynadığı gösterilmiştir (Xia ve ark., 2010; Zidar ve ark., 2011; Bendoraite ve ark., 2010; Lee ve ark., 2011; Valladares-Ayerbes ve ark., 2012; Baron ve ark., 2012).

Bilindiği gibi, miRNA biyolojisinde hedef genin 3' çevrilmeyen bölgeler (UTR) içerisinde miRNA'nın bağlanma yerine komplemente diziler açısından,

çekirdek diziler; gen ekspresyonu üzerinde miRNA' nın düzenleyici etkilerinde önemli bir rol oynamaktadır. Teorik olarak bir miRNA ailesinin üyeleri yüksek derecede korunumlu çekirdek dizileri içerir ve miRNA' lar aynı çekirdek diziler ile aynı öngörülen hedef gen profillerini paylaşabilir. miR-200 ailesi için sadece bir nükleotid farkına sahip olan iki tip çekirdek dizi karakterize edilmiştir (Feng ve ark., 2014).

MiR-200 ailesi, farklı kromozomlarda lokalize iki cluster içerisinde kodlanan 5 üye içermektedir. miR-200b-a-429 clusterı (miR-200b clusterı) chr1p36 üzerinde ve miR-200c-141 clusterı chr12p13 üzerinde kodlanmaktadır. Beş üye çekirdek dizilerine (bir memeli miRNA'sının 5' sonlanma ucunda yaklaşık 6-8 nükleotid uzunluğunda) göre 2 gruba ayrılabilir. miR-200a ve miR-141 (AACACUG) bir grup içerir ve miR-200b/c ve 429 (AAUACUG) diğer grubu içerir ve çekirdek dizilerinin benzerliğinden dolayı, benzer hedef genleri paylaşabilirler (Zhang ve ark., 2014) (Şekil 4.4. ve 4.5.).

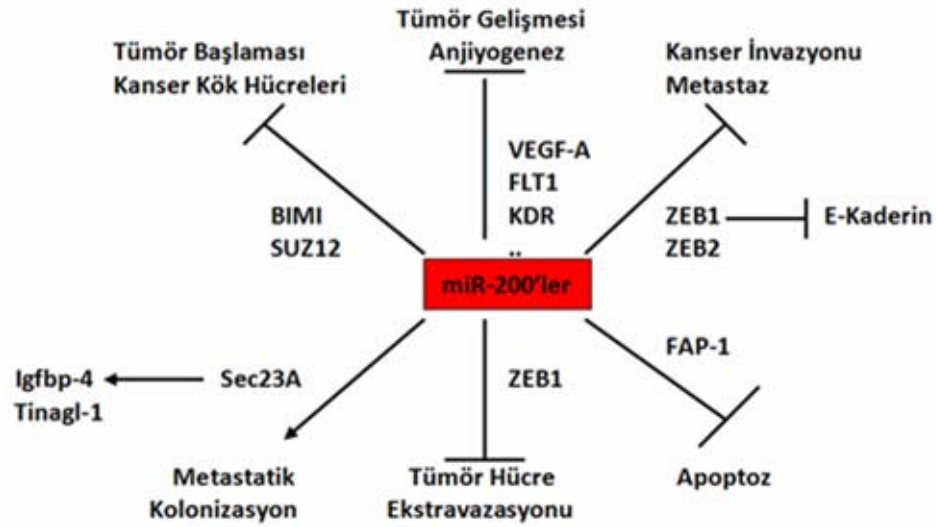


Şekil 4.4. İki farklı kromozomda lokalize miR-200 ailesinin iki clusterı (Humphries ve Yang, 2015).

		Seed Sequence
Functional Group I	miR-200b	UAAU <u>ACUG</u> CCUGGUAAGAUGA
	miR-200c	UAAU <u>ACUG</u> CCGGGUAAGAUGGA
	miR-429	UAAU <u>ACUG</u> UCUGGUA AA ACCGU
Functional Group II	miR-141	UAA <u>ACUG</u> UCUGGUA AA GAUGG
	miR-200a	UAA <u>ACUG</u> UCUGGUAACGAUGU

Şekil 4.5. Olgun miR-200 ailesi üyelerinin dizileri (Humphries ve Yang, 2015).

miR-200'lerin kanser kök hücrelerinin kendini-yenilemesini baskılamasında önemli rol oynamakta ve böylece tümör oluşumu başlangıcına katılmaktadır. miR-200'ler, VEGF-A, FLT-1/VEGFR1, KDR/VEGFR2 ve ETS1 gibi VEGF sinyal yolağının anahtar komponentlerini hedefleyerek tümörlerin gelişmesine olanak sağlayan anjiyogenez ağına da dahil olurlar. miR-200'ler aynı zamanda kanserlerin invazyon ve metastazını modüle eden EMT' nin merkezi, negatif regülatörü olarak tanımlanırlar. Ayrıca, kanser hücrelerinin kemoterapötiklere direncinde de miR-200'lerin etkili olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2014) (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Metastatik kaskadın her basamağına dahil olan miR-200 hedeflerinin temsili

Yukarıda açıklandığı gibi miR-200'ler tümörün başlaması, ilerlemesi, beslenmesi, tümör metastazı ve kemorezistansını da içeren hemen hemen tüm aşamalara katılmaktadır. Böylece, miR-200'ler malignansilerde kritik ve pleiotropik roller oynayarak kanser tedavisi için hedef oluşturmaktadır. Bu nedenle, miR-200'lerin restorasyonu kansere karşı umut verici bir terapötik uygulama olarak görev yapabilir (Zhang ve ark., 2014).

Bununla birlikte, son zamanlardaki birkaç çalışmada meme kanserinde miR-200'lerin metastazı artırıcı etkisi gösterilmiştir. Metastazın karmaşık kaskadlarının ilk adımında kanser hücre invazyonunu miR-200'lerin baskılanmasına rağmen, miR-

200'lerin uzak organlarda yayılmış kanser hücrelerinin kolonizasyonunu artırması miR-200'lerin tedavide kullanılmadan önce dikkatli değerlendirme yapılması gerektiğini göstermektedir (Zhang ve ark., 2014).

4.6.1. miR-200 Ailesinin Anjiyogenezdeki Rolü

Güncel çalışmalarda, endotel ve kanser hücre modelleri üzerinde miR-200 ailesi üyelerinin anjiyogenez düzenleyici ağında birçok proteinin ekspresyonunu regüle ettiği tespit edilmiştir. Chan ve arkadaşları Hif-1 α stabilizasyonu veya hipoksi ortamında indüklenen pro-anjiyogenik etkilerin insan dermal mikrovasküler endotel hücrelerinde miR-200b ekspresyonunun baskılanmasının aracılık ettiğini saptamışlardır. Diğer bir çalışmada miR-200b'nin anjiyogenezi teşvik eden anahtar transkripsiyon faktörü ETS1'i hedefleyerek hipoksinin pro-anjiyogenik etkilerini engellediği bildirilmiştir. miR-200b'nin HMEC (insan mikrovasküler endotel hücreleri) ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücreleri) hücrelerinin her ikisinde de KDR/VEGFR2'nin ekspresyonunu inhibe ettiği ve doğrudan hedeflediği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2014).

Ayrıca, VEGFA ve FLT1/VEGFR1 gibi VEGF sinyal yolağının diğer anahtar komponentleri de miR-200b'nin hedefi olarak karakterize edilmiştir. miR-200b veya miR-200c'nin ektopik ekspresyonu HMEC'ler ve HUVEC'lerin her ikisinin de tüp-formasyon yeteneğini azalttığı gösterilmiştir. VEGF-A ve KDR/VEGFR2'nin diğer fizyolojik ve patolojik modellerde de miR-200'lerin hedefi olduğu gösterilmiştir. Örneğin; kutanöz yara anjiyogenezi ve diyabetik retinopati (Zhang ve ark., 2014).

VEGF sinyal ağında miR-200'lerin potent düzenleyici gücüne rağmen tümör anjiyogenezinde miR-200'lerin fonksiyonel etkileri hala eksiktir.

4.6.2. miR-200 Ailesinin Epitelyum-Mezenkimal Geçiş (EMT) Üzerindeki Rolü

Epitel-Mezenkimal geçiş (EMT), E-kaderin'in downregülasyonu ve ardı ardına gelen hücre-hücre adhezyonunun kaybı yoluyla mezenkimal fenotipe yol açan

süreçtir. EMT meme kanserini de içine alan birçok kanser tipinde epitel tümör hücrelerinin hızlı yayılabilirliği, diseminasyonu ve metastazına katkı sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2014).

Kodlanan gen ekspresyonunda değişmelerle ilişkili DNA kopya sayısında değişmeler, mutasyonlar, epigenetik değişimler ve değişmiş transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel kontrol gibi mekanizmaların pek çoğu yoluyla kanserde miRNA ekspresyonu deregüle olabilir. Her miRNA'nın ondan fazla hatta yüzden fazla protein seviyesinde modüle edilen mRNA hedefi olmasından dolayı karsinoma hücrelerinde EMT ve MET sırasında miRNA etki ağını tamamıyla açıklayan büyük-ölçekli profillemeye çalışmaları ve proteomik analizler gerekli olacaktır. miRNA'ların çok sayıda hedefi olmalarına rağmen, endojen regülatör moleküller olarak miRNA'lar, büyük olasılıkla spesifik hücresel programları modüle etmek için evrim geçirmiştir (Zhang ve ark., 2014).

Dolayısıyla, miRNA'lar metastatik kaskadın birçok adımını etkileyen birden fazla pro-metastatik hedefleri baskılayabilen bir terapötik seçenek sunabilir.

miR-200 ailesinin (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 ve miR-429) epitel fenotipi yürüten transkripsiyon faktörleri olan ZEB1 ve ZEB2 (Zinc finger E-box binding homeobox) ekspresyonunu baskıladığı daha önceki yayınlarda bildirilmiştir. miR-200 ailesi üyeleri epitel mezenkimal geçiş durumunu kademeli bir şekilde en fazla regüle eden miRNA'lardır (D'Amato ve ark., 2013). Aynı zamanda miR-200b, -200c, -141 ve -429'un düzensiz ekspresyonunun, metastaz anahtarı olan Mezenkimal-Epitel geçişten de sorumlu olduğu bildirilmiştir (Yeh ve ark., 2014). EMT sırasında hücreler, hücre-hücre adhezyon molekülü E-kaderini downregüle eder ve miR-200 ailesinin E-kaderin transkripsiyonel repressörlerini inhibe ettiği ve böylece E-kaderin'in upregülasyonunu ve EMT'nin inhibisyonunu indüklediği gösterilmiştir. Böylece miR-200 ailesi migrasyonu baskılamaktadır (Gravgaard ve ark., 2012).

4.6.2.1.EMT (EPİTEL-MEZENKİMAL GEÇİŞ)

Hareket yeteneği olan mezenkimal hücelere epitel hücrelerin transdiferensiasyonu epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) olarak bilinen bir süreçtir (Lamouille ve ark., 2014).

Başlangıçta “epitelin mezenkimale dönüşümü” olarak tanımlanan bu farklılaşma süreci artık yaygın olarak epitel-mezenkimal geçiş (EMT) olarak bilinmektedir. Mezenkimal-epitel geçiş (MET) revers proses olarak tanımlanmıştır. Epitel hücrelerin mezenkimal hücelere geçiş yeteneği ve tersi, kısmen ya da tamamen epitel fenotipin doğal plastisitesini gösterir (Lamouille ve ark., 2014).

Dokuya ve sinyal içeriğine bağlı olarak, epitel hücreler bazı özelliklerini kaybedebilir veya bazı epitel ve mezenkimal özellikleri gösterebilir; bu durum kısmi EMT olarak düşünülebilir (Lamouille ve ark., 2014).

EMT; normal olarak epitelin bazal yüzeyi üzerinden bazal membranla etkileşimde olan polarize epitel hücrelerin çoklu biyokimyasal değişikliğe uğramasına olanak sağlayan ve böylece mezenkimal hücre fenotipini etkinleştiren biyolojik bir süreçtir (Kalluri ve Weinberg, 2009).

EMT sırasında; gen ekspresyonunun yeniden programlanması ve de non-transkripsiyonel değişimler başlatılır ve sinyal yolları tarafından ekstraselüler uyarılara yanıt kontrol edilir. Epitel hücreler bağlantılarını ve apikal-basal polaritesini kaybeder, hücre iskeletini yeniden düzenler, hücre şeklini tanımlayan sinyal programları değişikliğe uğrar ve gen ekspresyonu yeniden programlanır. Mezenkimal hücre fenotipinin etkinleşmesi, tek tek hücrelerin motilitesini artırır ve invaziv bir fenotipin gelişmesini ve apoptoza karşı yüksek bir direnç kazanmasını sağlar ve de ECM komponentlerinin üretimi artar. EMT; gelişmede, yara iyileşmesinde ve kök hücre davranışlarında gereklidir, pluripotansiyi ve kanser kök hücre davranışını indükler ve yara iyileşmesinde, fibroziste ve kanser ilerlemesinde yeniden aktive edilir. EMT ve MET aynı zamanda embriyonik kök hücre farklılaşmasını da regüle eder (Kalluri ve Weinberg, 2009; Lamouille ve ark., 2014).

Hücre farklılaşmasında ve davranışındaki değişmeye transkripsiyon faktörleri tarafından aracılık edilir. Bu transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonları transkripsiyonel, translasyonel ve post-transkripsiyonel seviyelerde regüle edilir (Lamouille ve ark., 2014).

a) Organ Gelişiminde ve Hastalıkta EMT

Epital-mezenkimal geçişin hastalıklarda önemi bilinmektedir. Epitel, çeşitli fonksiyonları ile tek hücre tabakaları olarak veya çoklu tabakalı dokular olarak bulunur. Epitel hücreler apikal-bazal polarite gösterirler, aderent özelliklidirler, özelleşmiş intraselüler bağlantıları üzerinden birbirleri ile etkileşirler ve fizyolojilerini tanımlamaya yardım eden membran tabanı üzerine yerleşmişlerdir. Epitel permeabilite bariyeri olarak fonksiyon gösterir. Epitel hücrelerin mezenkimal hücrelere dönüşümü, organizma gelişmesi sırasında veya patolojik olarak oluşmaktadır. Ancak aynı zamanda hücre tipine, doku içeriğine ve EMT programını aktive eden sinyallere bağlı olarak doğal bir esnekliğe sahiptir ve bazı değişiklikler gösterir (Kalluri ve Weinberg, 2009; Thiery ve ark., 2009; Huang ve ark., 2012)

EMT, fizyolojik doku durumuna bağlı olarak üç farklı alt tipe ayrılmıştır.

- Tip 1 EMT, embriyogenezis ve organ gelişiminde meydana gelir.
- Tip 2 EMT, doku rejenerasyonu ve fibroziste önemlidir.
- Tip 3 EMT, kanser ilerlemesi ve kanser kök hücre özellikleri ile ilişkilidir (Lamouille ve ark., 2014)

Ayrıca, epitel fenotipin esnekliği hücrelerin çoklu EMT ve MET geçişine olanak sağlar. Tüm doku içeriklerinde EMT' deki anahtar olaylar;

1. hücre-hücre bağlantılarının kaybı, çözünmesi,
2. apikal-bazal polaritenin kaybı ve
3. ön-arka polaritenin kazanımıdır (Thiery ve ark., 2009).

EMT ve MET, gelişmede ve kanserde “köklülük” ile yakından ilişkilidir. Blastositin iç kütledeki pluripotent embriyonik kök hücreler (ES) epitel özelliklere sahiptir. Gastrulasyonda, pluripotent epitel epiblast hücreler EMT yoluyla öncü mezoderm formuna dönüşür. Böylece, EMT pluripotent hücrelerden üç germ tabakanın oluşmasında; başlangıçtaki farklılaşma olayını sağlar. Erken farklılaşmada EMT'nin önemini açıklamak üzere, EMT' nin; kültürde ES hücrelerinde veya epiblast hücre kolonilerinde, mezenkimal fenotiple epitel kaderin (E-cadherin), vimentin ve nöral kaderin (N-cadherin) ekspresyonunun kaybına neden olduğu görülmüştür (Lamouille ve ark., 2014).

b) Hücre Bağlantılarının ve Polaritenin Tekrar Oluşturulması

Epitel hücre-hücre bağlantılarından özelleşmiş hücre yüzey protein kompleksleri, epitel bütünlük için gereklidir. EMT başlangıcında hücreler arası bağlantılar (Desmosom, Tight junction, Gap junction ve Adherent junction (vertebrata hücreleri için)) çözündürülür ve bağlantı proteinleri yeniden lokalize olur ve/veya degrade olur. EMT sırasında *tight junction*ların çözülmesi klaudin ve okludin ekspresyonunun düşmesi ile ve hücre-hücre kontaktlarından zonula occludens 1' in difüzyonu ile beraber olur (Lamouille ve ark., 2014).

Adherent junctionların destabilizasyonu sırasında plasma membranından E-kaderin ayrılır ve degrade olur. EMT başlaması desmosomların da ayrılmasına sebep olur ve Konneksin seviyesindeki düşme nedeniyle gap junctionların bütünlüğü tehlikeye girer. EMT ilerlemesi sırasında, epitel bağlantıların kaybını dengede tutan proteinlerin ekspresyonu transkripsiyonel olarak baskılanır. Bazal membran ile temasta olan epitel hücreler, apikal-bazal polarite gösterirler. Apikal-bazal polarite; hücre junction yapısı ile bütünleştirilmiş polarite kompleksleri tarafından organize edilmektedir (Kalluri ve Weinberg, 2009; Thiery ve ark., 2009; Huang ve ark., 2012; Lamouille ve ark., 2014)

Omurgalı hücrelerinde,

- PAR -partitioning-defective kompleksleri (PAR6, PAR3 ve a tip protein kinaz C (aPKC) içerir.)
- CRB -Crumbs kompleksleri
- PALS1 -Lin-7 1 ile ilişkili protein
- PATJ -PALS1 ilişkili tight-junction proteini

Apikal olarak tight-junctionlarda lokalizedir ve apikal kompartman olarak tanımlanır.

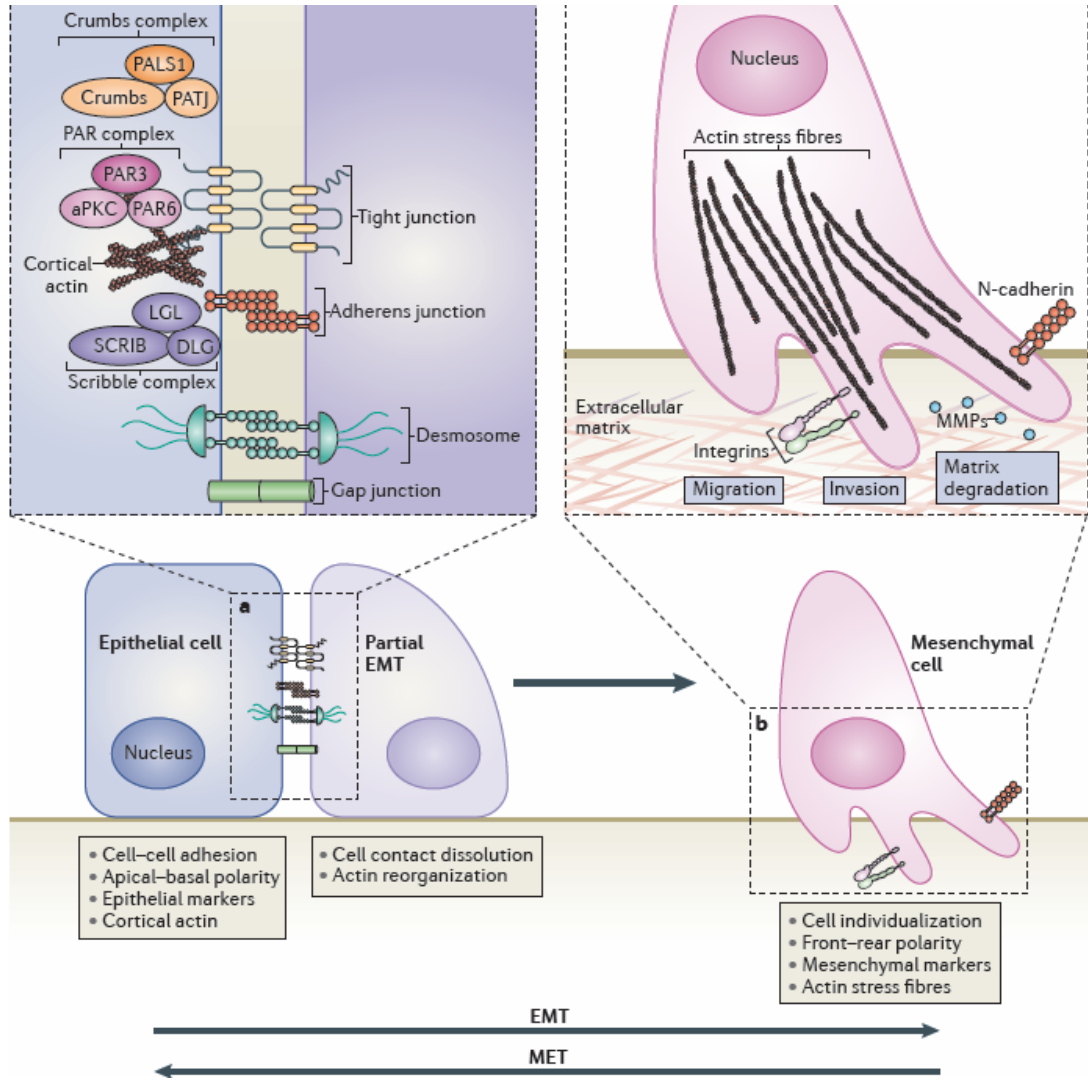
- SCRIB -Scribble kompleksleri
- DLG -Discs large
- LGL -Lethal giant larvae

Basolateral kompartman olarak tanımlanır (Lamouille ve ark., 2014).

Sonuç olarak; EMT sırasında, epitel bağlantılarının çözünmesi apikal-basal polaritenin kaybına neden olur. Bu ilişkiyi desteklemek için, tümör hücrelerinde E-kaderin' in düşük ekspresyonu, lateral plazma membranı ile SCRIB etkileşimini engeller ve SCRIB veya E-kaderin ekspresyonunun azalması adhezyonu azaltır ve hücre motilitesini artırır. EMT başladıktan sonra, polarite kompleks proteinlerinin (CRB3 ve LGL2 gibi) ekspresyonu baskılanır (Lamouille ve ark., 2014).

c) Hücre İskeleti Değişimleri ve Motilite

EMT geçiren hücrelerin kortikal aktin hücre iskeleti yapıları dinamik hücre uzamasına ve yönsel motiliteye olanak sağlayan yeniden bir organizasyon geçirir. Yeni aktince zengin membran çıkıntıları hücre hareketine olanak sağlar ve hücre iskeletinin duysal uzantıları olarak rol oynar. Bu çıkıntılar tabaka benzeri membran çıkıntıları içerir ve lamellipodia olarak isimlendirilir ve lamellipodianın uçlarındaki başak benzeri çıkıntılar da filopodia olarak isimlendirilir. Aktince zengin uzantılar, matriks metalloproteinazlar (MMPs) eksprese ederek, ekstraselüler matriks degradasyonunda proteolitik fonksiyon gösterirler ve böylece hücre invazyonuna olanak sağlarlar. Sonuç olarak, EMT, hücre kontraktilitesini artırması ve aktin stres fiber oluşumu ile karakterize edilmiştir (Hay, 1995; Lamouille ve ark., 2014).



Şekil 4.7. EMT sırasında hücresel olaylar. A. EMT'nin ilk basamağı epitel hücre-hücre bağlantılarının (tight junctions, adherens junctions, desmosomes and gap junctions) ayrılması ve Crumbs, PAR ve SCRIB polarite komplekslerinin parçalanmasıyla hücre polaritesinin kaybıdır. Mezenkimal genlerin aktivasyonu ile birlikte epitel genlerin ekspresyonu baskılanır. B. Epitel aktin yapıları yeniden organize edilir ve hücreler lamellipodia, filopodia ve invadopodia oluşturarak ve ekstraselüler matriksi (ECM) dereden eden matriks metalloproteinaz (MMPs) eksprese ederek hareketlilik ve invazif kapasite elde eder. Mezenkimal-epitel geçiş (MET) süreci EMT geçirmiş hücrelere epitel duruma dönmek için olanak sağlamaktadır. aPKC, atipl protein kinaz C; DLG, discs large; LGL, lethal giant larvae; N-kaderin, nöral kaderin; PALS1, Lin-7 ilişkili protein 1; PATJ, PALS1 ilişkili tight-junction protein. (Lamouille ve ark., 2014)

d. EMT'de Görevli Transkripsiyon Faktörleri

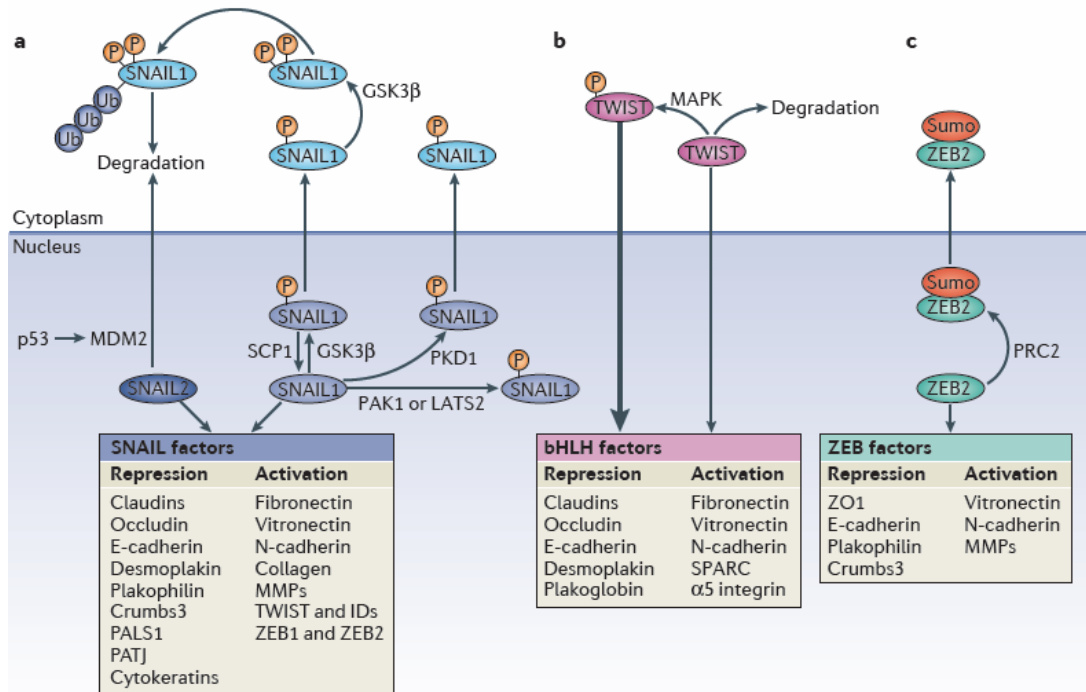
Epitel fenotipin baskılanmasına ve mezenkimal fenotipin aktivasyonuna katkıda bulunan gen ekspresyonundaki değişimler **master regülatörleri** kapsar (Şekil4.8).

-SNAIL

-TWIST

-ZEB (Zing finger E-box binding)

Bu faktörlerin ekspresyonları EMT'de erken safhada aktive edilir ve bunlar böylece gelişimde, fibroziste ve kanserde merkezi rollere sahiptirler. Bu transkripsiyon faktörleri belirgin ekspresyon profillerine sahiptir. EMT'ye katkısı hücre ve doku tipine ve sinyal yollarına bağlıdır. Bunlar genellikle birbirlerinin ekspresyonlarını kontrol ederler ve hedef genlerde fonksiyonel olarak birlikte çalışırlar. EMT transkripsiyon programı olarak tanımlanır ve EMT ilerlemesini yürütürler. Epitel genlerin baskılanmasını ve mezenkimal genlerin indüklenmesini koordine ederler. Ve genellikle aynı transkripsiyon faktörleri beraber baskılanır ve aktive olurlar (Lamouille ve ark., 2014) .



Şekil 4.8. Major EMT transkripsiyon faktörlerinin Rolü ve Regülasyonu (Lamouille ve ark., 2014)

e) EMT' nin miRNA-bağımlı Kontrolü

Kodlanmayan miRNA' lar, mRNA'lara seçici olarak bağlanır, böylece mRNA translasyonu inhibe olur veya degradasyonuna öncülük etmiş olur. Aynı zamanda epitel fenotipi ve EMT'yi de regüle eder. Bunlardan bazıları EMT master transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu kontrol eder. Örneğin; miR-29b ve miR-30a SNAIL1 ekspresyonunu baskılar ve bu yüzden artan miR-29b ekspresyonu EMT'yi tersine çevirebilir ve hücre invazyonunu azaltır (Lamouille ve ark., 2014).

miR-1 ve miR-200b'de SNAIL2 ekspresyonunu baskılayabilir ve SNAIL2 miR-1 ve miR-200b ekspresyonunu baskılar. (Double-negatif feedback mekanizma) Benzer bir feedback döngüsü miR-34 ve SNAIL1, ve miR-203 ve SNAIL1 arasında da meydana gelir (Lamouille ve ark., 2014).

miR-200 ailesinin üyeleri ZEB1 ve ZEB2 mRNA'larının translasyonu baskılar ve çift-negatif feed back ile ZEB ve miR-200 ekspresyonunu (miR-200 ekspresyonunu ZEB proteininin baskılaması ve ZEB ekspresyonunu miR-200'in baskılaması ile) kontrol eder (Kim ve ark., 2011).

EMT sırasında, azalmış miR-200 ekspresyonu ZEB1 ve ZEB2 seviyesinde ve EMT ilerlemesinde artışa sebep olur (Lamouille ve ark., 2014).

4.6.3. miR-200 Ailesinin Metastazdaki Rolü

Metastazın komplike kaskadlarının ilk adımı olan epitel-mezenkimal geçiş regülasyonunda ve E-kaderin ekspresyonunda miR-200'lerin rolü iyi anlaşılmış olmasına rağmen metastatik kolonizasyon üzerindeki etkileri tartışmalıdır. Korpall ve arkadaşları miR-200'lerin E-kaderin ve epitelyum-mezenkimal geçiş regülasyonu ötesinde prometastatik rollerini araştırmak için klinik ve deneysel modeller kullanarak, miR-200 ailesinin upregülasyonu meme kanseri metastazı ve nüksü ile ilişkili olduğunu ve fare modellerinde metastatik kolonizasyonu oluşturduğu bildirmiştir (Korpall ve ark., 2012).

4.6.3.1. miR-200 Ailesinin Sec23A Yolağındaki Rolü

Ökaryotik hücrelerde, salgılanmış proteinler ve plazma membranına ve internal organellere hedeflendirilen proteinler endoplazmik retikulumda sentezlenir ve salgı yolları üzerinden sınıflandırılır. ER'den golgi trafiğine gönderilmiş proteinler COPII(protein kaplama kompleksi II)-kaplı veziküllerde paketlenir. COPII en az beş proteinden (1 GTPaz; SarI ve 2 sitosolik protein kompleksi; Sec23/24 ve Sec13/31) oluşmaktadır. Sar1'in GTP-bağlı formu ER membranına bağlanır ve COPII kaplama yapısını tamamlamak için Sec13-Sec31 heterotetramerlerden oluşan dış kaplamaya yardım eden "prebudding complex"i oluşturmak için Sec23-Sec24 heterodimere yardım eder (Tao ve ark., 2012).

COPII kompleksi vesikül içindeki kargoyu yakalar ve ER'den vesiküllerin tomurcuklanmasına aracılık eder. Kargo tanıma Sec24 altünitesi aracılığıyla olur. Sec23 ve Sar1 de kargo alt ünitelerini tanımada rol oynar. Sec23 Sar1 GTPazını aktive eden GTPaz aktive edici proteindir (Tao ve ark., 2012)..

Memeli hücreleri COPII proteinlerini birden fazla paralog olarak eksprese ederler. Sec23, Sec23A ve Sec23B olarak iki paralog içerir. Sec23A COPII veziküllerinin toplanması ve taşınmasında önemli rol oynamaktadır (Tao ve ark., 2012)..

Szczyrba ve arkadaşları Sec23A geninin 3'UTR'si miR-200c için potansiyel hedefi olduğunu ve prostat kanserinde ektopik olarak eksprese edildiğinde Sec23A protein ekspresyonunu downregüle ettiğini bildirmiştir. Sec23A overekspresyonu hücre büyümesini azaltır, ancak apoptozu indüklemeyebilir ve Sec23A'nın inhibisyonuna bağlı olarak hücre proliferasyonunu indükler (Szczyrba ve ark., 2011; Korpál ve ark., 2012).

Sec23A geninin 3'UTR'sinde miR-200c'nin potansiyel bağlanma bölgesi hesaplamalı analizlerle belirlenmiştir (Szczyrba ve ark., 2011).

miR-200'ler metastazı baskılayan proteinler olan Igfbp4 ve Tinagl1'in sekresyonuna aracılık eden Sec23A'yı doğrudan hedefleyerek metastatik kolonizasyonu yürütür (Korpall ve ark., 2012).

4.7. Meme Kanseri için miRNA-temelli Terapötik Stratejiler

Nükleik asit-temelli terapötik stratejiler (kimyasal olarak modifiye nükleik asitler) miRNA'ların normal aktivitesini restore etmek için kullanılır. Nükleik asit temelli stratejiler 2 ana kategoriye sınıflandırılır: (1) miRNA replacement tedavisi ve (2) anti-miRNA tedavisi. Anti-miRNA tedavisi; etki mekanizması ve çekirdek dizisine bağlı olarak iki alt gruba ayrılır: antagomiR'ler ve miRNA süngerleri (Kaboli ve ark., 2015).

a) miRNA replacement tedavisi: miRNA mimikleri

miRNA yerine koyma tedavisi kanserde bazı hayvan modellerinde yürütülmektedir, ancak bu strateji meme kanser hücrelerinde henüz yapılmamıştır. Bir yerine koyma stratejisi bozulmuş tümör baskılayıcıları yerine koymak için ve meme kanserini tedavi etmek için araç geliştirmeye ümit verici bir yöntemdir (Kaboli ve ark., 2015).

Let-7 insanda ilk keşfedilen miRNA'dır ve normal meme hücrelerinde normal olarak eksprese edilir ve Let-7'nin downregülasyonu meme kanser hücrelerinin kendini yenilemesi ve metastazında kritik rol oynamaktadır. Let-7'nin azalmış seviyesi kendini-yenileyen meme kanser hücrelerinde bildirilmiştir ve bu azalma hücrel proliferasyonu azaltmak için lentiviral Let-7 miRNA tarafından yer değiştirebilir. Kanser hücreleri kemoterapi veya radyoterapiden sonra belirlenememesine rağmen, kanser hücre popülasyonunun kendini yenilemesi; kanser hücrelerinin küçük ve belirlenemeyen toplanmasından meydana gelir. Bu nedenle, hedeflendirilmiş bir tedavi olarak kombinasyonel tedavi, kanser hücrelerinin etkili yok olması için önemlidir (Kaboli ve ark., 2015).

Meme kanserinde, BRCA1, miR-145 ve miR-205 tsmiR'lerini upregüle eder, bu nedenle, BRCA1'in kaybı bu miRNA'ların azalmasına neden olur. Bu durumda, miR-145 ve miR-205 mimiklerinin kullanımı proteinin inaktivitesi devam etse bile BRCA1'in fonksiyonel rolünü restore edebilir. Ayrıca, tsmiR'lerin downregülasyonu miRNA yerine koyma tedavisi yoluyla restore edilebilir (Kaboli ve ark., 2015).

b) Anti-miRNA tedavisi

Overeksprese olmuş onkomiR'leri inhibe etmek için üç yol vardır: (1) genetik knockout, (2) antisense oligonükleotidler (antagomiR'ler) ve (3) miRNA süngerleri. LNA oligonükleotidler anti-miRNA nükleik asitleri sentezlemek için kullanılabilen kimyasal olarak modifiye anti-sense moleküllerdir. AntagomiR'ler ve miRNA süngerleri dizi ve mekanizma olarak farklıdır ancak ikisi de miRNA susturucularıdır (Kaboli ve ark., 2015).

I- miRNA antagonistleri (antagomiR'ler)

AntagomiR'ler onkomiR'lere bağlanarak ve bloklayarak miRNA-ilişkili yolları etkileyen miRNA antagonistleridir. Bu nükleik asit antagonistleri onkomiR'leri inhibe etmek için bilinen yollardan biridir ve böylece kanseri tedavi etmek için etkili bir yol olabilirler (Kaboli ve ark., 2015).

Anti-sense oligonükleotidler kullanılarak inhibe olabildiği miR-21, meme kanserinde overeksprese olduğu iyi bilinen onkomiR'dir. miR-21 kanser hücre sinyalini artıran birçok yolağı (örn; B-hücre lenfoma-2 protein (Bcl2) regülasyonu yoluyla PTEN'i bloklayarak ve apoptozu inhibe ederek PI3K yolak aktivasyonu) regüle eden onkomiR'dir. AntagomiR-21'in hücresel proliferasyonun azalması ve apoptozun aktivasyonu yoluyla meme kanseri hücrelerini etkileyebildiği gösterilmiştir (Kaboli ve ark., 2015).

AntagomiR'lerin klinik kullanımı antagomiR tedavisinin etkililiği sağlamak için antagonistlerin dokuya taşınmasının gúçlüđüne bağlı olabilir(Kaboli ve ark., 2015).

II- miRNA süngerleri

Sünger RNA'lar ilgilenilen miRNA'ya bağlanma bölgesi içerir. miRNA süngerleri transgenik hücrelerden oluşmaktadır ve aynı aileden tüm miRNA'ları bloklar. Süngerler belli miRNA'nın çekidek dizisine bağlanır. miRNA süngerleri çoklu bağlanma dizilerine (genellikle 4-16) sahiptir. miR-9 hücre migrasyonunu ve metastazı yürüten onkomiR'dir. miR-9 aktivitesinin %50'den daha fazlasının miR-9 süngerleri tarafından baskılandığı gösterilmiştir. Aynı zamanda miR-21 süngerleri MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanser hücre hatlarında başarılı bir şekilde kullanılmıştır ve miR-9 süngerlerinin 4T1 metastatik meme kanser hücre hattında yaklaşık %50 metastatik aktiviteyi azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuç anti-miRNA'ların farklı hücre hatlarında etili olabileceğini göstermiştir, ancak etki ve yan etkiler önemini sürdürmektedir. Birkaç çekirdek dizi içeren RNA süngerleri mRNA'ya ilaveten diğer kodlanmayan RNA'lara bağlanabilir. Bu nedenle, miRNA tedavisinin güvenliğinin diğer metabolik yolların etkilenmemesini sağlamak için tamamiyle açıklanması gerekmektedir (Kaboli ve ark., 2015).

Gen tedavisi kanser ve genetik hastalıklar gibi tedavisi olmayan birçok ciddi hastalığın tedavi edebilecek yeni teknik sağlamaktadır. Bu stratejinin in vivo uygulanmasını sınırlayan ana problem büyük, hassas ve DNA gibi negatif yüklü moleküllerin nükleusa değrede olmadan taşınmasındaki zorluklardır. Gen tedavisinin başarısının temeli güvenli ve etkili taşıyıcı sistemler oluşurmaya dayanmaktadır (İbraheem ve ark., 2014).

4.8.Nükleik Asit Taşıyıcı Sistemler

Gen tedavisi; ya bozulmuş genleri sağlıklı bir genle yer değiştirerek ya da eksik genleri tamamlayarak düzelten, çeşitli hastalıkları tedavi etmek için yakın zamanda

kullanılan bir tekniktir. Cift-zincirli DNA, tek-zincirli DNA, plazmid DNA, anti-sense oligonükleotidler gibi farklı tipte genetik materyaller gen tedavisinde kullanılmaktadır. Gen tedavisinin başarısı terapötik genin hedeflenen hücreye herhangi bir biyodegradasyon olmadan girişinin sağlanmasına bağlıdır. Fakat biyolojik medyumdaki nükleazlara DNA'nın hassasiyeti, DNA makromolekülünün büyük hidrofilik polianyonik yapısı; hücre zarından pasif bir şekilde geçişini engeller.

Bu nedenle, taşıyıcı sistem veya vektörler hedeflenen hücrede terapötik geni taşıyan, nükleazlar tarafından degradasyonundan koruyan ve hücre içinde transkribe olduğunu garanti eden özelliklerde olmalıdır.

İdeal vektör birkaç kriteri karşılamalıdır:

- Kuvvetli bir immün cevap oluşturmamalıdır.
- Her boyutta nükleik asitleri taşıma kapasitesine sahip olmalıdır.
- Taşıdığı genetik kargonun sürekli ve düzenli ekspresyonunu sağlamalıdır.
- Vektör, geni sadece belli tip hücrelere taşınmalıdır.
- Hem bölünebilen hem de bölünemeyen hücreleri enfekte edebilmelidir.
- Hazırlanması kolay, ucuz ve ticari olarak yüksek konsantrasyonlarda ulaşılabilir olmalıdır.
- Ya epizomal pozisyonda devam etmeli ya da genomun spesifik bir bölgesine rastgele olmayacak şekilde integre olmalıdır.

Gen taşıyıcı sistemler iki tip olarak sınıflandırılırlar. Bunlar; viral taşıyıcı sistemler ve viral-olmayan taşıyıcı sistemlerdir.

4.8.1. Viral Taşıyıcı Sistemler

Bir virüs konak hücre nükleusuna penetre olabilen ve kendi genetik materyalini eksprese etmek için hücresel mekanizmayı kullanarak replike edebilen, daha sonra replike olan genetik materyalini diğer hücrelere yayabilme kabiliyetindedir.

Terapötik genleri hücre nükleusuna taşımak ve virüs yaşam döngüsünü kullanmak için farklı virüsler kullanılmaktadır. Taşıyıcı vektörler olarak en çok kullanılan virüsler; retrovirüsler (RV), adenovirüsler (AV), adeno-associated virüsler (AAV) ve herpes virüsler (HSV)'dir.

Virüs geninin patojenik kısmı çıkarılır ve terapötik genle değiştirilir. Aynı zamanda, hücreye infekte olmasını sağlayan virüsün patojenik-olmayan yapıları (zar proteinler, füzojenik proteinler, vs.) muhafaza edilir.

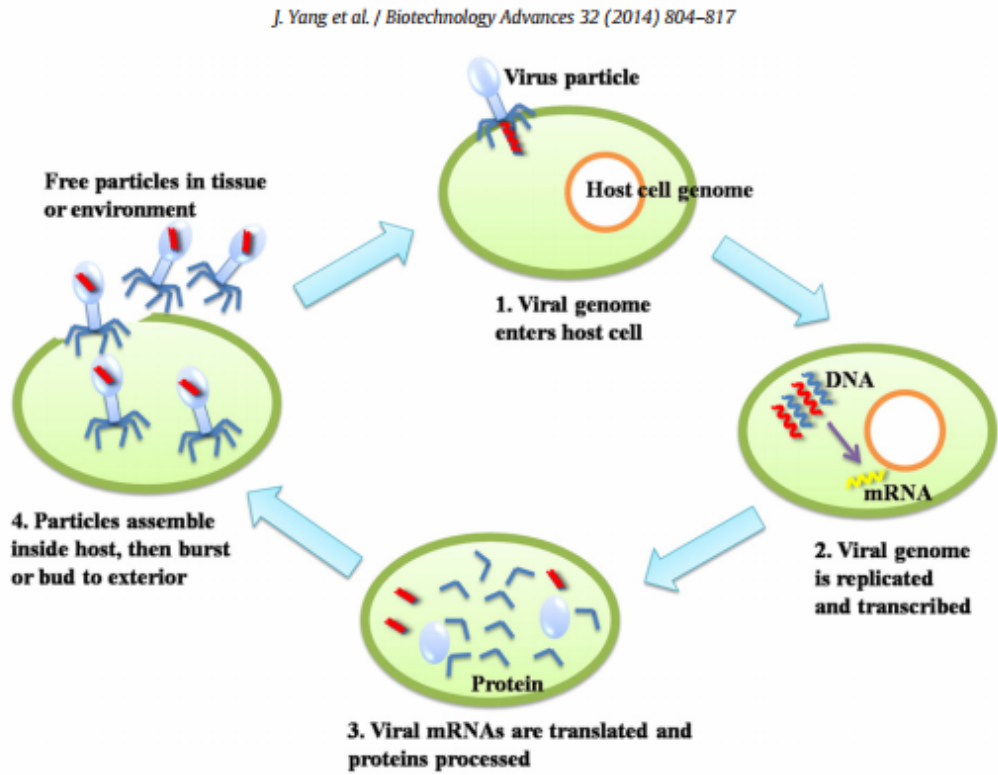


Fig. 1. The process of virus infection.

Şekil 4.9. Virüs infeksiyonunun prosesi. (Yang ve ark., 2014)..

Sonuç olarak terapötik geni taşıyan patojenik-olmayan virüs, viral vektör olarak isimlendirilir. Bugüne kadar, viral vektörler dezavantajlarına rağmen in vivo yüksek transfeksiyon etkinlikleri nedeniyle gen transferi için en sık kullanılan vektörlerdir (Ibraheem ve ark., 2014).

Viral taşıyıcı sistemler göreceli olarak hem in vitro hem de in vivo'da yüksek transfeksiyon etkinliği göstermişlerdir. Değişik klinik araştırmalar yapılmış, ancak Pensilvanya Üniversitesinde bir çalışma, karaciğere terapötik DNA iletimi için Adenovirüs vektörü kullanılarak virüs tedavisinde 18 yaşındaki bir katılımcının ölümü ile sonuçlanmış ve gen tedavisinde önemli bir gerilemeye sebep olmuştur. Bu olay virüs tedavisinden büyük inflamasyon riskini ortaya çıkarmıştır (Yang ve ark., 2014).

Klinik güvenlik sorununun dışında, viral taşıyıcı sistemler; küçük taşıma kapasitesi, uzun süreli transgen ekspresyonunun olmaması, tekrarlayan uygulamalara direnç, büyük ölçüde farmasötik kalitede üretim zorluğu ve kalite kontrolü gibi bazı diğer kritik problemler göstermiştir. Bu da viral vektörlerin kullanımının yeniden gözden geçirilmesine yol açtı ve viral taşıyıcı için toksisite sorunlarının üstesinden gelebileceğinden dolayı viral-olmayan taşıyıcılar üzerindeki araştırmayı hızlandırmıştır (Yang ve ark., 2014).

Dezavantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Viral vektörler ölümcül olabilen akut immun cevaba neden (cevabı uyaran) olabilir.
- Büyük miktarda viral vektör üretimi çok zor ve oldukça pahalıdır.
- Sınırlı gen boyutu virüsler tarafından iletilebilir (Ibraheem ve ark., 2014).

Güvenli ve etkin bir şekilde hedef hücrelere terapötik genleri taşıyabilmek için, viral-olmayan taşıyıcıların (Delivery carriers) rasyonel tasarımı özellikle önemlidir.

4.8.2. Viral-Olmayan Taşıyıcı Sistemler

Viral-olmayan gen tedavisi özellikle güvenlikle ilgili olarak, viral gen tedavisindeki birçok sınırlamaları giderme potansiyeline sahiptir. Örneğin, sentetik "taşıyıcılar" viral vektörlerden daha düşük immünojenisiteye sahip olma eğilimindedir. Viral-olmayan vektörler aynı zamanda daha büyük genetik materyal taşıma potansiyeline sahiptirler ve sentezi viral vektörlerden daha kolaydır (Yin ve ark., 2014)

Transgenlerin iletimi için viral-olmayan uygulamalar iki gruba ayrılabilir:

- 1- Fiziksel uygulamalar: Genin nükleusa penetrasyonu için hücre membranını zayıflatan fiziksel bir zorlamaya bağlıdır. İğne injeksiyon, elektroporasyon, gen tabancası, ultrason ve hidrodinamik iletim fiziksel uygulama yollarıdır.
- 2- Kimyasal vektörler: Bunlar polimer ve DNA arasında etkileşim olduğunda polipleks olarak, lipit ile DNA arasında etkileşim olduğunda lipoplex olarak isimlendirilen bir polimer oluşturmak için, poli katyonik türevleri ve DNA'nın anyonik fosfatı arasında, elektronik etkileşim ile veya DNA içeren mikro- ve nanopartikül oluşturan biyobozunur küresel yapıların içinde DNA'nın enkapsulasyonu yada DNA'nın adsorpsiyonu ile hazırlanabilir (Ibraheem ve ark., 2014).

I- Fiziksel metodlar

Fiziksek gen iletim sistemlerinin ilkesi; hücreye difüzyonla DNA geçişine izin veren geçici yaralanma veya defektlere sebep olarak hedef hücrenin membranında geçici olarak zayıf noktalar oluşturmak için mekanik, ultrasonik, elektrik, hidrodinamik veya lazer-temelli enerji kullanmaya dayanmaktadır (Ibraheem ve ark., 2014).

I- Kimyasal Vektörler

Kimyasal vektörler viral vektörlerin dezavantajlarının üstesinden gelmek için umut verici alternatifler olarak önerilmektedirler. Bu vektörlerin hücre nükleusuna gen transferini artıran üç amacı vardır. Bunlar:

- (i) DNA-negatif yüklerini maskeler,
- (ii) DNA molekülünü daha küçük hale getirmek için sıkıştırır ve
- (iii) nükleik asitleri intraselüler nükleazlar tarafından degradasyonundan korur.

Bu hedefler, ya anyonik DNA ve polikasyonlar arasındaki elektrostatik etkileşimle ya da biyobozunur polimerlerle enkapsulasyonuyla veya adsorpsiyonuyla DNA'nın paketlenmesi yoluyla elde edilebilir (Ibraheem ve ark., 2014).

i-DNA ve polikatyonlar arasında Elektrostatik Etkileşim

Bu tip gen taşıyıcı sistemler anyonik DNA ve katyonik lipit veya polimer arasında sırasıyla lipopleks ve polipleks olarak bilinen bir pozitif kompleks oluşumuna yol açan elektrostatik atraksiyonu kullanılırlar (Ibraheem ve ark., 2014).

ii-Lipopleksler

Katyonik bir lipit; bir hidrofobik ankor (iki alifatik zincir (doymuş/doymamış) veya bir kolestrol türevi, bir hidrofilik pozitif yüklü baş ve bir aralayıcı (bağlayıcı) olmak üzere üç kısımdan oluşur. Bağlayıcı ankoru baş kısmına bağlar ve lipitlerin biyobozunabilirliğinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Anyonik DNA ile pozitif yüklü lipopleks oluşturmak için kondense olur. Felgner ve arkadaşları tarafından üretilmiş N[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N, trimethylammonium chloride (DOTMA), gen transferi için kullanılmış ilk doğal-olmayan lipiddir. İn vivo lipopleks kullanımını engelleyen en önemli sorun zayıf etkinliğinin yanında lipopleks pozitif yükünden kaynaklanan sitotoksitedir (Ibraheem ve ark., 2014).

ii-Polipleksler

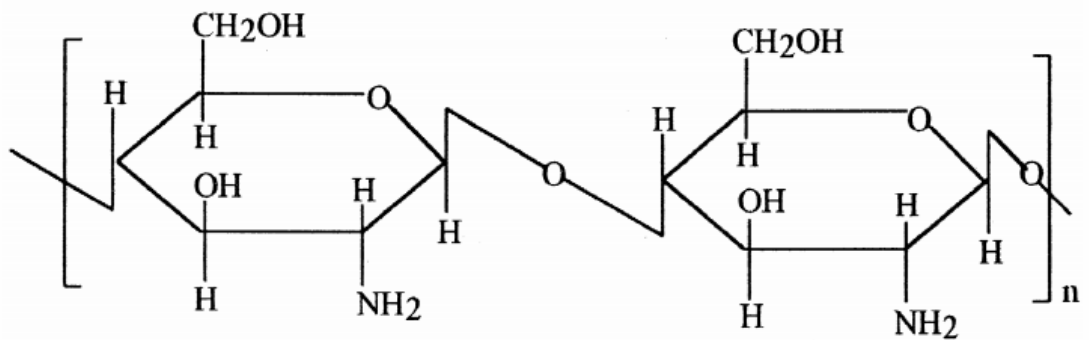
Bir katyonik polimer (fizyolojik pH'da) elektrostatik etkileşim yoluyla kendiliğinden bağ oluşturmasıyla "polipleks" olarak isimlendirilen nano-boyutta bir kompleks içerisinde anyonik bir nükleik asidi kondense etmek için kullanılır. Polipleksler, hücrel internalizasyonu kolaylaştıran DNA moleküllerini nispeten küçük boyuta sıkıştırabilir ve böylece transfeksiyon etkinliği artar. Poli-l-lizin (PLL) in vivo gen transferi için kullanılan ilk polimerlerden biri olarak kabul edilmektedir (Ibraheem ve ark., 2014).

4.9. Kitozana İlişkin Bilgiler

Gen taşınmasında, yüksek etkinlik ve düşük toksisite ile hedef hücrelere terapötik genin taşınması oldukça zordur (Mao ve ark., 2000).

Kitozan, viral olmayan vektör olarak, biyoyumluluğu, biyodegrede olabirliği, düşük toksisite ve immünojenitesinden dolayı dikkat çekmektedir. Kitozan biyomakromoleküllerin ve düşük moleküler ağırlığındaki ilaçların uygulanması için ilaç taşıyıcı sistemlerin dizaynında çok kullanılan polisakkaritlerden biridir (Mao ve ark., 2000).

Kitozan glukozamin ve N-asetil-glukozamin içeren doğal polisakkaritlerin bir çeşididir. Kitozan doğada en çok bulunan ikinci polisakkarit olan kitinin deasetilasyonu ile üretilir. Genellikle, kitozan tekrarlanan glukosidik rezidülerde pozitif yük veren bir primer amino grubuna sahiptir. Kitozanın primer amino grubu oldukça aktiftir ve çeşitli gruplar için kitozanı biyöretim için ideal bir polimer yapan reaktif bölgeler sağlayabilir. Kitozanın fizikokimyasal özellikleri deasetilasyonun derecesi ve moleküler ağırlığı tarafından direkt olarak etkilenir. Kitozan, suda ve nötral pH' da çözünmez, ancak primer amino grup düşük pH' da protonlandığında, suda çözünür katyonik polielektrolit haline gelir. Aynı zamanda kitozanın çözünürlüğü deasetilasyon derecesine bağlıdır ve düşük deasetilasyon çözünürlüğü ve viskoziteyi artırılabilir. Deasetilasyondan ayrı olarak, moleküler ağırlığı da çözünürlüğü ve diğer özellikleri önemli derecede etkileyen önemli bir parametredir. Kitozan solüsyonunun vizkositesi kitozan konsantrasyonunun artmasıyla artar (Kumar, 2000).



Şekil 4.10. Kitozanın Yapısı (Kumar, 2000)

siRNA iletiminde enzimatik degradasyondan korumak için kitozan düşünülmeden önce formülasyon optimizasyonu gerekmektedir. Aynı zamanda siRNA'nın DNA'dan yapı ve büyüklük olarak oldukça farklı olmasından dolayı oluşan siRNA

kompleksinin fiziksel ve biyolojik özelliklerine ilişkin farklı formülasyon parametrelerinin etkisi tamamiyle karakterize edilmelidir (Mao ve ark., 2000).

Kitozanın molekül ağırlığı kitozan/siRNA nanopartikülünün in vitro gen susturması ve fizikokimyasal özelliklerini (büyüklük, zeta potansiyeli, morfolojisi ve kompleks stabilitesi) etkilediği gösterilmiştir. Nanopartikül stabilitesi ekstraselüler siRNA korunması için gereklidir, ancak, RISC gibi intraselüler komponentlerle etkileşimi yoluyla RNA-aracılıklı gen susturmaya izin vermek için ayrılma gereklidir. İstenilen molekül ağırlığında kitozan ile siRNA biyolojik fonksiyonu için siRNA'nın korunması ve salımı arasındaki uygun denge elde edilmesi gerekmektedir (Ibraheem ve ark., 2014).

Kitozan/siRNA kompleksinin partikül boyutu kitozan molekülüne bağlıdır. Katar ve arkadaşları kitozan nanopartiküllerinin partikül boyutunu düşük molekül ağırlıklı kitozan (110kDa) kullandıklarında yüksek molekül ağırlıklı kitozana (270kDa) göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir (Kumar, 2000).

Aynı zamanda kitozanın konsantrasyonu da kompleks özelliklerini etkilemektedir (Kumar, 2000).

Kitozan asidik ortamlarda çözündüğünde DD değeri pozitif yük yoğunluğunu belirler. Yüksek DD daha iyi siRNA bağlanma kapasitesi sağlayan artmış pozitif yüke yol açmaktadır. Yüksek dereceli deasetilasyon (%80 üzerinde) etkin siRNA-aracılıklı inhibisyonda önemli bir faktör olarak tanımlanmıştır. Düşük DD ile kitozan siRNA ile düşük yük etkileşimine sahiptir, partiküller instabildir ve H1299 insan akciğer kanserinde düşük inhibisyon gözlenmiştir (Kumar, 2000).

N/P oranı; kitozan amino gruplarının (N) RNA'nın fosfat gruplarına (P) oranı olarak tanımlanmaktadır. Howard ve arkadaşları kitozan ve siRNA arasında nanopartikül oluşumu düşük N/P oranında artan boyut ile N/P oranını bağlı olduğunu belirtmişlerdir (Kumar, 2000).

Kitozan/siRNA nanopartikülleri aynı zamanda kitozanın tuz formu ile de etkilenmektedir. Kitozan hidroklorürden (C1213, C1113) daha yüksek molekül ağırlığına sahip kitozan glutamat (G213, G113) siRNA ile kitozan hidroklorürden daha küçük boyutta kompleksler üretilir. Kitozan glutamat ile daha yüksek siRNA yükleme etkinliği ve transfeksiyon sonrası gen susturma etkisinin de daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Kumar, 2000).

Kitozan, düşük toksisitede, biyoyumlu ve biyoparçalanabilen özellikte bir biyopolimerdir (Mao ve ark., 2000)

4.9.1. Kitozan ve miRNA

Kitozanın miRNA taşıyıcısı olarak kullanıldığı çok az sayıda yayın mevcuttur. Kitozanla yapılan çalışmada (Chen ve ark., 2014), operasyon sonrası Achilles tendon iyileşmesindeki problemlerin çözümü için kitozan araştırılmış kitozanın miR-296 ekspresyonunu belirgin oranda artırdığı saptanmıştır. Diğer bir çalışmada akciğer kanseri teşhis ve görüntülenmesinde kitozan/miR-155 moleküler beakon kombinasyonu kullanılmıştır (Zhu ve ark., 2014). Deng ve arkadaşları üçlü negatif meme kanserinde, doksarubisin ve miR-34a içeren hyalunorik asit-kitozan nanopartiküllerini kullanmışlar, anti-tümör tedavide olumlu sonuç alındığını rapor etmişlerdir (Deng ve ark., 2014).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. GEREÇ

5.1.1. Kimyasal Sarf Malzemesi

Amonyum molibdat	Sigma (ABD)
Asetik asit	E. Merck (Almanya)
Borik asit	Sigma (ABD)
Bromfenol mavisi	Sigma (ABD)
Dimetil sülfoksit	Sigma (ABD)
DMEM	Biological Industries (İsrail)
EDTA	Sigma (ABD)
Etanol (absolü)	Riedel de Haen (Almanya)
Etidyum bromür	Sigma (ABD)
Fenol	Sigma (ABD)
Featal bovin serum	Biological Industries (İsrail)
Formaldehit	E. Merck (Almanya)
Glasiyal asetik asit	E. Merck (Almanya)
Gliserol	Fluka (Almanya)
Hidrojen florür	Sigma (ABD)
Hidroklorik asit	E. Merck (Almanya)
Kitozan	Sigma (ABD)
Kloroform	E. Merck (Almanya)
Metanol	E. Merck (Almanya)
Sodyum hidroksit	J. T. Baker (ABD)
Sodyum klorür	Sigma (ABD)
Tripan mavisi	E. Merck (Almanya)
Tripsin 1:250	Sigma (ABD)
Trizma base	Roche (Almanya)

5.1.2. Kullanılan Cihazlar

PCR cihazı	Applied Biosystems
RT-PCR cihazı	Applied Biosystems
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik (Türkiye)
Derin Dondurucu (-80)	Nuar (ABD)
Distile Su Cihazı	GFL (Almanya)
Elektroforez Güç Kaynağı	EC-Techne (İngiltere)
Etüv	Heraeus (Almanya)
Etüv	Memmert (Almanya)
Fluoresan Mikroskop	Olympus BX50 (Japonya) Olympus
Dijital fotoğraf makinesi	(Japonya)
Hassas Terazı	Shimadzu (Japonya)
Horizontal Karıştırıcı	Velp Scientifica (İtalya)
Isıtıcı Tabla	Ika-Werk (Almanya)
İnvert Mikroskop	Olympus BH40 (Japonya)
Jel Analiz Sistemi	Kodak 1D Dijital Science (ABD)
JVC Spot Junior Kamera Sistemi	JVC (Japonya)
Karbondioksitli Etüv	Sanyo (Japonya)
Konfokal Mikroskop	Zeiss
Laminar Akışlı Doku Kültürü Kabini	Holten-Safe 2000 (Danimarka)
StepOne Plus 7500 fast PCR cihazı	Applied Biosystems®
Manyetik Karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)
Mekanik Karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)
Mikropipet seti	Gilson (Fransa)
Mikrosantrifüj	Hettich (Almanya)
Mili-Q Su Sistemi	Milipore (ABD)
Otoklav	Kermanlar (Türkiye)
Partikül Ölçüm Cihazı	Malvern HSA 3000 (İngiltere) WTW
pH metre	(Almanya)
Santrifüj	Hettich (Almanya)
Soğutmalı Santrifüj	Eppendorf
Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec-1601 (Japonya)

Transmission Elektron Mikroskobu	Jeol (Japonya)
Terazi	Sartorius (Almanya)
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat (Fransa)
Vertikal Karıştırıcı	Velp Scientifica (İtalya)
Yatay Jel Elektroforez Cihazı	Atto (Japonya)
Yüzey Yüku Ölçüm Cihazı	Malvern HSA 3000 (İngiltere)

5.1.3. miRNA Mimiklerinin Yapısı

Tez çalışmamızda;

Hsa-miR-200c-3p (Dharmacon), UAAUACUGCCGGGUAAGAUGGA (50 nM)

Hsa-miR-141-3p (Dharmacon), UAACACUGUCUGGUAAGAUGG (50 nM)

Cel-miR-67 (Dharmacon), UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA (5 nM)

Dy547 işaretli Cel-miR-67 (Dharmacon), UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA (20 nM)

dizilişe sahip olan 22/23-mer'lik miRNA'lar kullanılmıştır. miRNA'lar A4 formunda (2'-hidroksil, bağlanmış ve tuzu giderilmiş çift sarmal) sentezlenmiştir. Liyofilize miRNA'lar, 1XsiRNA tamponu ile son konsantrasyonu sırasıyla 50 nM, 5 nM ve 20 nM olacak şekilde çözündürülmüştür.

In vitro çalışmada, farklı memeli hücreleri tarafından endojen ekspresyonu downregüle edilen miR-200c ve miR-141 miRNA'larının ekspresyonunu normal seviyeye getirmek için miR-200c ve miR-141 mimikleri ile hazırlanmış olan formülasyonlar hücrelere verilmiştir. Transfeksiyon çalışmalarında negatif kontrol olarak cel-miR-67 ile hazırlanmış formülasyonlar hücrelere verilmiştir. MikroRNA mimik transfeksiyon kontrolü için Dy547 işaretli cel-miR-67 ile hazırlanmış formülasyonlar hücrelere verilerek floresan ve konfokal mikroskobunda görüntü alınmıştır.

5.1.4. Kullanılan Hücre Kùltürleri

MCF-10A

MCF-7 (insan meme adenokarsinomu hücre kùltürü):

C.M.McGrath tarafından 69 yaşında 0 Rh+ kan grubuna sahip Orta Asyalı bir kadından plevral efüzyon ile elde edilmiş yüzeye tutunan, epitelyal süt bezi adenokarsinomudur. Östrojen reseptörü pozitif hücrelerdir. MCF-7 hücrelerinin büyümeleri TNF- α tarafından inhibe edilir. MCF-7 hücreleri sitoplazmik östrojen aracılığıyla östradiölü prosesleme de dahil diferansiye olmuş meme epitel hücrelerinin çeşitli özelliklerini taşımaktadır (218).

MDA-MB-231:

MDA-MB-231 insan adenokarsinom modeli olarak kullanılmaktadır.

MDA-MB-435:

MDA-MB-435 60 insan tümör hücre dizisinin NCI-DTP panelinin bir üyesidir, metastatik insan meme kanserinin bir modeli olarak kullanılmaktadır. Bu hücre dizisi M.D.Anderson'da 31 yaşında meme kanserli bir kadından pleural effüzyondan türevlendirilmiştir (30). Gen ekspresyon analizleri ile tam olarak karakterize edilmiştir. MDA-MB-435 hücrelerinin gen ekspresyon paternleri meme tümör hücre dizilerinden ziyade melanoma hücre dizilerine benzemektedir (63).

L929:

Fare fibroblast hücre hattıdır.

5.1.5. Besiyerleri ve Çözeltiler

5.1.5.1. Besiyerleri

- **Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)**

- i) **4 X DMEM Çözeltisi (-)**

DMEM besiyeri 250 ml steril bidistile su içerisinde çözündürüldü ve 0.22 µm'lik filtreden süzülerek sterilize edildi.

- ii) **Sodyum Bikarbonat Çözeltisi (%10)**

100 g sodyum bikarbonat 1 litre steril bidistile su içerisinde çözündürüldü ve 0.22 µm'lik filtreden süzülerek sterilize edildi.

- iii) **1 X DMEM Çözeltisi**

100 mL serum, 250 mL 4X DMEM (-) çözeltisi, 100 IU/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin ve 5 µg/mL amfoterisin üzerine 20 mL %10 (a/h) sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek pH'sı 7.4'e ayarlandı. Çözelti hacmi steril bidistile su ile 1 litreye tamamlandı. Hücre kültürü çalışmalarında doğrudan bu çözelti kullanıldı.

- **MEGM™ Mammary Epithelial Cell Growth Medium Bullet kit**

5.1.7.2. Çözeltiler

- **Elektroforez Yürütme Çözeltisi (x10)**

6.055 g Tris (50 mM), 82 g Glisin (384 mM) ddH₂O'da çözüldü. ddH₂O ile 200 ml'ye tamamlandı.

- **Elektroforez Yükleme Tamponu (x 6)**

% 0.25 Bromfenol Mavisi

% 0.25 Ksilen Siyanol

% 30 Gliserol

Hazırlanan elektroforez yükleme tamponu, küçük hacimlere bölünerek +4°C’ de muhafaza edildi. Jel elektroforezi çalışmaları esnasında elektroforez yükleme tamponu, örnekler ile 1:5 oranında karıştırılarak kullanıldı.

- **Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi (0.5 M, pH 8.0)**

186.1 g EDTA 800 mL bidistile suda çözüldürüldü. Pellet halinde NaOH eklenerek çözeltinin pH’sı 8’e ayarlandı ve hacmi 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda 121°C’de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edildi. (EDTA mol ağırlığı = 372.2)

- **EDTA Çözeltisi (%5 (a/h))**

5 g EDTA tartılıp 80 mL distile su içerisinde çözüldürüldü, hacmi 100 mL’ye tamamlandı. Çözeltinin pH’sı NaOH ile 7.2’ye ayarlandı. Otoklavda 121°C’de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edildi.

- **Etidyum Bromür (10 mg/ml)**

0.1 g etidyum bromür 10 mL distile su içerisinde çözüldürülerek hazırlandı.

- **Fenol- Kloroform – İzoamil Alkol (25 / 24 /1)**

Kristal halde fenol, 65°C’de eritildikten sonra, oksidasyonu önlemek için son konsantrasyonu % 0.1 (a/h) olacak şekilde 8-hidroksikinolin eklendi. Fenol, kloroform – izoamil alkol ile karıştırılmadan önce Tris-HCl tamponu ile doyuruldu. Bunun için fenol üzerine eşit hacimde 0.5 M Tris-HCl tamponu (pH 8.0) eklendi ve kuvvetlice karıştırıldı. Fenol ve tamponun iki faz halinde ayrılması için emülsiyon +4°C’de 60 dakika bekletildi. Üstte oluşan Tris-HCl fazı uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0.1 M Tris-HCl tamponu ile fenolün pH değeri 7.8’den büyük olana kadar tekrarlandı. Tris-HCl tamponu ile doyurulan fenol eşit hacimde kloroform – izoamil alkol (24/1) ile karıştırıldı ve üzerine yaklaşık 0.1 hacim 0.1 M Tris-HCl tamponu eklendikten sonra +4°C’de saklandı (215).

- **Fizyolojik Fosfat Tamponu (PBS pH 7.4)**

2.38 g Na_2HPO_4 , 0.190 g KH_2PO_4 ve 8 g NaCl tartılarak 800 mL bidistile suda çözündürüldü, 1000 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin pH'sı ölçüldü, asidik ise Na_2HPO_4 ; bazik ise KH_2PO_4 eklenerek pH 7.4'e ayarlandı.

- **Glukoz Çözeltisi (0.5 M)**

9.01 g glukoz bidistile su içerisinde çözündürülerek 100 mL'ye tamamlandı. (Glukoz mol ağırlığı = 180.2)

- **5 N Hidroklorik asit (HCl) Çözeltisi**

41.44 mL % 37 (a/h) 'lik HCl alınıp 100 mL'ye tamamlandı.

- **Kitozan Çözeltisi (% 1 (a/h))**

Çözeltilerin hazırlanmasında molekül ağırlığı 70 kDa olan düşük (L) moleküler ağırlıklı kitozan kullanıldı. 1 g kitozan tartılıp 100 mL Tris-asetat tamponu (pH 5.0) içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan kitozan çözeltileri kompleks hazırlanmasında kullanıldı.

- **Lizis Tamponu**

25 mM Tris- PO_4 tamponu (pH 7.8)

2 mM EDTA

2 mM DTT

% 10 Gliserol

% 1 Triton® X-100

Lizis tamponu, 0.22 μm por çapına sahip filtre kullanılarak sterilize edildi ve +4°C'de muhafaza edildi.

- **RIPA Tamponu**

10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, %1 NP-40, PMSF, %25 gliserol, 0.2 mM EDTA içeren tampon hazırlandı.

- **siRNA Tamponu**

60 mM KCl, 6 mM HEPES-KOH, 0.2 mM MgCl₂, RNaz içermeyen su içerisinde çözündürülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı ve pH'sı 7.5'a ayarlandı.

- **Sodyum Fosfat Tamponu (0.2 M, pH 7.5)**

10.74 g Na₂HPO₄ 150 mL bidistile su içerisinde konsantrasyonu 0.2 M olacak şekilde çözündürüldü. (Na₂HPO₄ mol ağırlığı = 358.14) 1.56 g NaH₂PO₄ 50 mL bidistile su içerisinde konsantrasyonu 0.2 M olacak şekilde çözündürüldü. (NaH₂PO₄ mol ağırlığı = 156.01) Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan 0.2 M Na₂HPO₄ çözeltisinin pH değeri yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan 0.2 M NaH₂PO₄ çözeltisi ile 7.5'e ayarlandı.

- **Tripan Mavisi Çözeltisi (% 0.4 (a/h))**

0.4 g Tripan mavisi tartılıp PBS içerisinde çözündürülür, hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

- **Tripsin Çözeltisi (% 0.25 (a/h))**

2.5 g Tripsin 1 litre steril PBS (pH 7.4) içerisinde çözündürüldü. 0.22 µm'lik filtreden süzülerek sterilize edildi. Hazırlanan bu çözelti -20°C'de saklandı.

- **Tripsin – EDTA Çözeltisi (% 0.05 (a/h) : % 0.05 (a/h))**

10 mL % 5 (a/h) EDTA çözeltisinin üzerine 200 mL % 0.25 tripsin çözeltisi eklendi, steril PBS pH 7.4 ile hacmi 1 litreye tamamlandı.

- **5 X Tris – Borik Asit – EDTA (TBE) Çözeltisi**

54 g Tris ve 27.5 g borik asit 800 mL bidistile su içerisinde çözündürüldü. Çözelti üzerine 20 mL 0.5 M EDTA çözeltisi (pH 8.0) eklendi. Çözeltinin hacmi bidistile su ile 1 litreye tamamlandı. Elektroferez tamponu olarak veya agaroz jellerin hazırlanmasında 1/5 oranında seyreltikten sonra kullanıldı.

- **Tris-HCl Tamponu (1 M, pH 8.0)**

121.1 g Tris, 800 mL bidistile su içerisinde çözüldürüldü. 5 N HCl çözültisi ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan Tris-HCl tampon çözültisi otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edildi. (Tris mol ağırlığı = 121.1)

5.2. YÖNTEM

5.2.1. miRNA Mimiklerinin Hazırlanması ve Kontrolü

Tez çalışmasında hsa-miR-200c ve hsa-miR-141 mimikleri kullanılmıştır (Dharmacon, USA). Liyofilize miRNA'ların son konsantrasyonu 50nmol olacak şekilde 1XsiRNA tamponu ile resüpsansiyonu yapıldı. miRNA pelletinin tüpün dibinde toplanması için kısa süreli santrifüj yapıldı. Her bir mikroRNA pelletini dilüe etmek için, 0,5/1µg/µl ve totalde son konsantrasyon 50nmol olacak şekilde 1XsiRNA tamponu eklendi. Kabarcıkların oluşmasından kaçınarak 3-5 defa pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika orbital karıştırıcıda karışması sağlandı. Karışım sonunda solüsyonun tüpün dibinde toplanmasını sağlamak için kısa santrifüj edildi. UV spektrofotometrede (260nm) miRNA konsantrasyonları kontrol edildi ve elektroforetik olarak kontrolü yapıldı. Resüspanse edilen miRNA'lar küçük hacimlerde alikotlandı ve -20°C'de saklandı.

miR-200 mimiklerine ilişkin bilgiler 5.1.3.'de ayrıntılı şekilde verilmiştir.

5.2.1.1.miRNA Mimiklerinin Elektroforetik Kontrolü

Çalışmada kullanılan sentetik siRNA'lar agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Bu amaçla agaroz %2 (a/h) olacak şekilde, 1xTAE içerisinde (RNaz ve DNaz içermeyen su ile hazırlanan TAE) kaynatılarak çözündürüldü. Çözeltinin sıcaklığı 55-60°C'ye indiğinde 0.05 µg/ml final konsantrasyonda nükleik asid boyama solüsyonu (RedSafe™, Intron Biotech.) eklendi ve yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel donduktan sonra 1x TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. miRNA örnekleri 5:1 oranında 6xyükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 200 V / 80 mA sabit elektrik akımı altında 30 dakikada tamamlandı. miRNA bandı UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotoğrafı çekildi.

5.2.1.2. miRNA Mimiklerinin Spektrofotometrik Kontrolü

Bu çalışmada miRNA'ların spektrofotometrede maksimum absorbanans gösterdikleri 260 ve 280 nm dalga boylarında miRNA'ların absorbanansları ölçüldü ve miRNA miktarları ve saflıkları belirlendi.

5.2.2.Kitozan/miRNA Nanoplekslerin Hazırlanması ve Kontrolü

Kitozan, 40 mM Tris-asetat/asetik asit çözeltisinde (pH 5,0) çözündürülerek son konsantrasyonu %1 (a/h) olacak şekilde çözeltisi hazırlandı. miRNA ve kitozan çözeltileri basitçe karıştırılarak ve vorteksenerek kitozan/miRNA kompleksleri hazırlandı. % 1'lik konsantrasyonda 70 kDa düşük molekül ağırlığına sahip kitozan (10mg/ml) ile siRNA (0,5µg/µl) belli oranlarda karıştırılarak ağırlıkça (+/-) 10/1, 20/1, 30/1, 40/1 ve 50/1 oranlarında kompleksler hazırlandı. Kompleks oluşumu için oda sıcaklığında 1 saat beklendi. Kompleks hazırlanması süresince, miRNA'ların hacmi sabit tutuldu ve kitozan solüsyonunun hacmi teorik yük oranını (+/-) (aminin fosfat gruplarına molar oranı) ayarlamak için değiştirildi. Her bir kompleks 3 seri halinde hazırlandı.

5.2.2.1.Agaroz Jel Elektrofrez ile Kompleks Oluşumunun Görüntülenmesi

Hazırlanan kompleksler % 2'lik (a/h) konsantrasyonda hazırlanmış olan agaroz jelinde elektrofrez yöntemiyle incelendi. Kompleks oluşumu için 1 saat beklendikten sonra %2'lik jelle uygulandı. Elektrofrez işlemi 200V/80mA sabit akım altında 30 dakikada tamamlandı. miRNA, nükleik asid boyama solüsyonu ile boyanarak UV ışığı altında gözlemlendi. Oluşan jel resmi dijital kamera ile görüntülendi ve kompleks oluşumu incelendi.

5.2.2.2. Komplekslerin TEM ile Görüntülenmesi

Hazırlanan kitozan/miRNA kompleksi, Jeol (Japonya) marka transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülendi. Transmisyon elektron mikroskobu

(TEM) ile inceleme yapmak için, temiz mikroskop lamı kloroform içerisinde hazırlanan % 0.25'lik Polivinil formal (Vinylec K) çözeltisine batırılıp çıkarıldı ev oda sıcaklığında 5 dakika kurutularak lam üzerinde ince bir Vinylec K film oluşması sağlandı. Filmin kolayca çıkması için filmin kenarları bir bistüri ile çizildikten sonra %1'lik HF içerisinde batırılıp çıkarıldı. Hemen ardından kaplı lam 30-40°'lik açıyla geniş bir kap içindeki saf suya batırılarak filmin yüzmesi sağlandı. 100, 200 ve 300 mesh boyutlarındaki bakır (Cu^{+2}) gridler kullanıldı. Kaplanacak gridler filmin üzerine kondu ve üzerinde grid bulunan gridler temiz bir lam kullanılarak dikkatli bir şekilde alt üst edildi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Polimer ile kaplanmış gridlerin üzerine, 10-20 μl hacimde incelenecek olan kompleks formülasyonunun pH 7.4 PBS tamponu içerisinde hazırlanan süspansiyonu damlatıldı. Kompleks formülasyonunun yüzeye absorbe olması için oda temperaturünde yaklaşık olarak 10 dakika bekleme süresi sonunda süspansiyonun fazlası filtre kağıdı ile dikkatlice alındı ve grid üzerine bir damla %1'lik (a/h) amonyum molibdat çözeltisi damlatıldı. 2 dakika sonra gridler üzerindeki amonyum molibdat çözeltisi filtre kağıdı ile alındı ve gridler 4°C'da kurumaya bırakıldı. Hazırlanan gridlerin TEM incelemeleri x30-50.000 büyütme aralığında artan voltaj koşullarında gerçekleştirildi.

5.2.2.3. Komplekslerin Partikül Büyüklüğü Değerlerinin Ölçülmesi

Komplekslerin partikül büyüklükleri, Malvern cihazına entegre partikül ölçer birimiyle, pH 7.4 PBS tamponu içerisinde ölçüldü. Her biri on ayrı ölçüm değeri veren üç ayrı örnekte ölçüm yapıldı. Komplekslerinin yanısıra serbest miRNA'nın da partikül büyüklüğü ölçümleri yapıldı.

5.2.2.4. Komplekslerin Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçülmesi

Komplekslerin zeta-potansiyel değerleri elektroforetik mobilitelerini ölçen zeta ölçer (Malvern Instruments, UK) cihazında ölçüldü. Sonuçlar Malvern PCS versiyon 4.41 yazılımında hesaplandı. Ölçüm cam küvetlerde, 25°C' de ve PBS pH 7.4 tamponunda yapıldı. Her biri on ayrı ölçüm değeri veren üç ayrı örnekte

ölçüm yapıldı. Komplekslerin yanısıra serbest miRNA'nın da zeta-potansiyel değeri ölçüldü.

5.2.2.5.Kitozan/siRNA Komplekslerinin Seruma Karşı Stabilitesinin İncelenmesi

Çıplak miRNA, kitozan/miRNA kompleksi üzerine %10 fetal bovine serum eklenerek 37°C'de inkübe edildi ve daha sonra 150 mM NaCl çözeltisi eklendi. Belli zaman aralıklarında örnekler alındı ve elektroforetik olarak değerlendirildi.

5.2.2.6.Kitozan/siRNA Komplekslerinin Dekompleksasyon Kontrolü

Kitozan/miRNA kompleksi 1:1 oranda 0.1M NaOH çözeltisi ile muamele edildikten kısa süre sonra (miRNA'nın hidrolize olmasını önlemek için 1 dk) %2'lik agaroz jeline yüklenerek elektroforez yöntemi ile değerlendirildi (Laroui, vd., 2011).

5.2.3. İn Vitro Transfeksiyon Çalışmaları

5.2.3.1. Hücre Kültürü Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi Çalışmaları

Kontrol hücre hattı olarak kanser olmayan hücre hattı olan MCF-10A sağlıklı meme hücre kültürü kullanılmıştır. hsa-miR-141 ve hsa-miR-200c mimikleri taşıyan kitozan kompleks formülasyonlarının *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında ise, MCF- 7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-435 meme kanseri hücre kültürleri kullanılmış, hücre kültürlerine ilişkin bilgiler bölüm 5.1. Gereç bölümünde 'Kullanılan Hücre Kültürleri' başlığı altında 5.1.4.'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

In vitro transfeksiyon çalışmaları; T-25 cm² hücre kültürü şişeleri ile 6 ve/veya 24 kuyucuklu plateler kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre pasajları ve hücre

kültürünün devamlılığının sağlanması çalışmalarında, MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-435 hücre hatları için % 10 fetal bovin serum, 100 mM L-glutamin ve 100 mM antibiyotik çözeltisi içeren 0.22'lik filtre kullanılarak steril edilmiş DMEM doku kültürü besiyeri kullanıldı ve MCF-10A hücre hattı için MEGM Bullet kit (Lonza) kullanıldı. *In vitro* transfeksiyon çalışmalarının ilk aşamalarında, belirtilen doku kültürü besiyeri, serum ilavesiz olarak kullanıldı. Belirli zaman aralıklarında hücre sayımı ve canlılık tayini yapıldı.

Pasajlama işlemi hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak 3-4 günde bir yapıldı. Pasajlama için besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücre tabakası 5 ml steril PBS (pH 7.4) tamponu ile 2 kez yıkandı. 1ml tripsin:EDTA (%0.05:% 0.05) çözeltisi ilave edildi ve 37°C' de 2-3 dakika kadar bekletilerek hücre kültür şişesine tutunmuş haldeki hücrelerin tamamen kalkması sağlandı. Hücre tabakasının tamamen dağıldığı invert ışık mikroskobu ile gözlenerek onaylandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 5 ml taze besiyeri ilave edildi ve birkaç kez pipetaj yapılarak hücre kümelerinin ayrılması sağlandı. Kültürler % 5 karbondioksit ve % 98 nem içeren 37°C'lik etüvde inkübe edildi.

5.2.3.2. Normal Meme Hücre Hattı ve Meme Kanseri Hücre Hatlarında Sağlıklı Endojen miRNA Düzey Tayini

Sağlıklı ve kanserli hücre hatlarında endojen miR-141 ve miR-200c miRNA'larının ekspresyon düzeyini belirlemek için kit protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu yapıldı. Hücreden izole edilen RNA'nın spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolü yapıldı. Spesifik miRNA primerleri kullanılarak elde edilen ve kontrolleri yapılan RNA'lardan cDNA sentezlemek için cDNA sentez kiti kullanıldı. Daha sonra elde edilen cDNA'dan Universal Prob Library (UPL), ileri ve geri primerler, master (MgCl, dNTP, PCR tamponu) karışımı ve su ile hedef gen ve house-keeping gen olarak RNU6B Stepone Plus Real-Time PCR cihazında amplifiye edildi. Herbir örnek duplike olarak çalışıldı ve elde edilen Ct (Crossing threshold) değerlerinin ortalaması alındı. $\Delta\Delta Ct$ metoduna göre (önce

housekeeping gene daha sonra kalibratöre göre normalizasyon) ekspresyon düzeyleri belirlendi. Bu işlemle birlikte her örnekte hedef gen ve housekeeping gen duplike olarak amplifiye edildi ve hedef genlerin ortalama Ct değerleri housekeeping genlerden çıkarılarak normalize edildi. Ayrıca yapılan tüm örneklerin median Ct değerleri alındı ve bu kalibratör olarak kabul edilerek tüm değerlerin normalize edilmiş Ct değerleri (delta Ct), kalibratörün delta Ct değerlerinden çıkarıldı ve bu değer PCR verimliliğini temsil eden 2⁻¹ eksi kuvveti alınarak ekspresyon düzeyi belirlendi.

5.2.3.3. Transfeksiyon Öncesi Hücre Ekimi ve Transfeksiyon

Transfeksiyon için hücreler tek tabaka halinde büyütüldü. Hücre ekim işlemi için yöntem 3.1'de belirtildiği şekilde tripsinize edilen hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri eklendi ve 1000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve çökelti halindeki hücreler 1 ml besiyeri içerisinde tekrar dağıtıldı. Steril bir ependorfa 100 µl hücre süspansiyonu, 400 µl besiyeri ve 500 µl % 0.4'lük tripan mavisi çözeltisi kondu. Hücreler Thoma lamınının 16 büyük karelik alanının en üst ve en sağ çizgisi dışında kalan alan üzerindeki toplam ölü ve canlı hücre sayısı şeklinde ters fazlı mikroskoptan gözlenerek sayıldı. Bu işlem Thoma lamınının diğer 16 büyük karelik bölmesi için de tekrarlandı. Ortalama hücre sayısı hesaplandı. Hücre sayısı için aşağıdaki formül kullanıldı.

Ortalama hücre sayısı

$$\text{Hücre sayısı/ml} = \frac{\text{Ortalama hücre sayısı}}{10^{-4}} \times (\text{dilüsyon faktörü}=10)$$

6- kuyucuklu hücre kültürü plağına her bir kuyucuğa 2×10^6 tane hücre ekimi yapıldı. Hücreler bir gece 37°C'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. miRNA ile transfeksiyon işleminden önce hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve

soğuk PBS ile yıkandı, daha sonra 1ml serumsuz taze besiyeri ilave edildi. Her bir hücre hattı için ayrı hazırlanan kompleksleri besiyerine pipetleyerek süspanse edildi ve kompleksin besiyerinde eşit dağılmasını sağlamak için yaklaşık 1 dakika orbital çalkalayıcıda karışması sağlandı. Transfeksiyondan 4 saat sonra 1 ml serumlu besiyeri ilave edildi ve transfeksiyonun 48. saatinde transfeksiyon kontrolleri ve tayinler yürütüldü.

5.2.3.4. Floresans İşaretli Mimik miRNA'ların Hücre İçindeki Transfeksiyonu Floresan Mikroskop ve Konfokal Mikroskop İle İncelenmesi

6-kuyucuklu hücre kültürü plağına ekimi yapılan MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-435 hücre hatlarına, Rhodamin filtre ile maksimum 557-570nm dalga boyunda absorbe olan Dy547 boya eklenmiş (20 nM) *Caenorhabditis elegans* miR-67 (cel-miR-67) miRNA mimikleri ile hazırlanmış olan kitozan/Dy547-miR67 mimik kompleks (20/1 (+/-)) formülasyonu hücre hatlarına transfekte edildi. Dy547- miRNA hücre içerisindeki lokalizasyonları konfokal LSM700 (Zeiss) ve transfeksiyonun 48. saat ve sonrası farklı zaman aralıklarında floresan mikroskop ile incelendi.

5.2.3.5. RT-PCR Yöntemi ile miRNA Doz Çalışmaları

1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Ambion markasının "MirVana™ MiRNA İzolasyon kit" protokolüne uygun yapıldı. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler üzerindeki besiyeri alındı ve besiyeri fazlasını almak için 1ml PBS tamponu ile yıkandı. Liziz/Bağlayıcı tamponu içerisine eklendi. Hücreleri tamamen parçalamak ve homojen bir lizat görmek için kuvvetlice vortekslendi. Hücre lizatına 1/10 volüm miRNA homojenat aditif eklendi ve vorteksleyerek iyice karıştırıldı. Karışım 10 dk buz üzerinde bekletildi. miRNA homojenat aditif eklenmeden önceki lizat volümüne eşit volümde Asit-fenol:kloroform eklendi. Karışması için 30-60 sn

vorteksledikten sonra, sulu ve organik fazı ayırmak için, oda ısısında 5 dk (10.000xg) santrifüj edildi. Dikkatlice alt fazı bozmadan üst fazı volümü not ederek yeni bir tüpe transfer edildi. Sulu faza AGS grade %100 etanol'den 1,25 volümü kadar eklendi ve iyice pipetlendi. Karışımdan genomik DNA'yı elimine etmek için, lizat/etanol karışımı filtre tüp üzerine koyuldu ve 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj santrifüj edildi. Kolonun altına geçen kısım atıldı ve kolon yıkama tamponu ile yıkanarak santrifüj edildi ve daha sonra kolona dengeleme tamponu koyuldu, tekrar santrifüj edildi kolonun altına temiz bir ependorf tüp yerleştirildi. Kolonun üzerine elüsyon solüsyonu eklenerek santrifüj edildi. Elde edilen RNA spektrofotometrik ve elektroforetik olarak kontrol edildi.

Tek zincirli RNA molekülü için konsantrasyon;

RNA konsantrasyonu= $44 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü}$ formülüne göre hesaplandı.

2. cDNA Sentezi

Tez çalışmasında elde edilen ve kontrolleri yapılan RNA'lardan cDNA sentezlemek için Applied Biosystems firmasının "TaqMan® MicroRNA Revers Transcription Kit" kullanıldı. Sentez için dNTP karışımı, Multiscribe™ reverz transkriptaz (RT) enzimi, 10XRT tamponu ve RNaz inhibitör kullanıldı. 10/5 ng/ RNA'dan, 15 µl'lik son karışım (master karışım) içerisinde 1,5µl 10xreverz transkriptaz reaksiyon tamponu, 20 U koruyucu RNaz inhibitörü, 1 mM dNTP, 5 mM DTT ve 10 U reverz transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA eldesi yapıldı. Bunun için ısı döngü cihazında (PCR cihazı) 30 dk 16°C ve 30 dk 42°C'de inkübe edildi ve 85°C'de 5 dk reverz transkriptaz enzim inaktivasyonu yapıldı.

3. Relatif Kantitatif Real Time PCR Çalışması

Elde edilen cDNA'dan Universal Prob Library (UPL), ileri ve geri primerler, master (MgCl, dNTP, PCR tamponu) karışımı ve su ile has-miR-141-3p ve has-miR-

200c-3p hedef genleri ve house-keeping gen olarak RNU6B, Stepone Plus Real-Time PCR cihazında amplifiye edildi. Herbir örnek duplike olarak çalışıldı ve elde edilen Ct (Crossing threshold) değerlerinin ortalaması alındı. $\Delta\Delta Ct$ metoduna göre (önce housekeeping gene daha sonra kalibratöre göre normalizasyon) ekspresyon düzeyleri belirlendi. Bu işlemle birlikte her örnekte hedef gen ve housekeeping gen duplike olarak amplifiye edildi ve hedef genlerin ortalama Ct değerleri housekeeping genlerden çıkarılarak normalize edildi. Ayrıca yapılan tüm örneklerin median Ct değerleri alındı ve bu kalibratör olarak kabul edilerek tüm değerlerin normalize edilmiş Ct değerleri (delta Ct), kalibratörün delta Ct değerlerinden çıkarıldı ve bu değer PCR verimliliğini temsil eden 2' eksi kuvveti alınarak ekspresyon düzeyi belirlendi.

4. miRNA Doz Çalışmaları

Sağlıklı ve kanserli meme hücre hatlarında endojen miRNA düzey tayini Real-Time PCR ile yapıldıktan sonra kanserli meme hücre hatlarında downregüle olan miRNA seviyesini sağlıklı meme hücre hattındaki miRNA seviyesine getirmek için farklı dozlarda miRNA mimik transfeksiyon çalışmaları yapıldı. Transfeksiyon çalışmaları yöntem 3.3.'de belirtildiği şekilde 6 kuyucuklu platelerde yapıldı. Her doz çalışmasında normalize edilmeye çalışılan hücreye transfekte edilecek miRNA miktarı bir önceki çalışmaya göre karar verildi. Kanser hücre hatlarındaki miRNA seviyesini MCF-10A sağlıklı meme hücre hattına göre normalize eden dozla formülasyonlar hazırlandı ve her hücre ve aynı zamanda her hücredeki her miRNA için farklı olan bu formülasyonların hücrelere verilmesinden 48 saat sonra alınan hücre örneklerinde VEGF, E-kaderin, Tinagl1 tayini ELISA yöntemi ile yapıldı.

5.2.4. Proteinlerin ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) Yöntemi İle Tayini

5.2.4.1. VEGF'in ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) Yöntemi İle Tayini

Hücre kültür süspansiyonunun süpernatantında VEGF tayini ELISA yöntemi ile üretici protokolüne uygun olarak yapıldı (Invitrogen, USA). Kültür vasatında biriken VEGF proteini ve rekombinant insan VEGF165 protein standardın dilüsyonları katı faz sandviç ELISA yöntemi kullanılarak analiz edildi. Kültür süpernatantı (insan VEGF antijeni), insan VEGF165'e spesifik poliklonal antikor ile kaplı kuyularda inkübe edildi. Yıkamadan sonra, VEGF'e spesifik biotinlenmiş monoklonal antikor eklendi. İnkübasyondan sonra streptavidin-peroksidaz enzimi ilave edildi. Üçüncü inkübasyondan ve tüm bağlanmayan enzim uzaklaştırılıp yıkandıktan sonra, enzime bağlanarak renk oluşturan substrat solüsyonu eklendi. Bu renkli ürünün yoğunluğu, orjinal numunede var olan VEGF konsantrasyonuna orantılanarak elde edildi. Absorbans 450 nm'de spektrofotometrik okuma ile belirlendi. Kültür süpernatantındaki VEGF miktarı, 0-1500 pg/ml arasında değişen VEGF standartlarının absorbansı ile oluşturulan standard blanklere dayanarak belirlendi. miRNA transfeksiyonu ile VEGF sekresyonunun inhibisyonu (%), numunelerde ki VEGF'in kontrolle karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Tüm çalışmalar üç kere tekrarlandı ve standard sapmaları (\pm) hesaplandı.

5.2.4.2.E-kaderin'in ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) Yöntemi İle Tayini

Hücre kültür süspansiyonunun süpernatantında E-kaderin tayini ELISA yöntemi ile üretici protokolüne uygun olarak yapıldı (USCN Life Science Inc., USA). Kültür vasatında biriken E-kaderin proteini ve rekombinant insan E-kaderin

protein standardın dilüsyonları katı faz sandviç ELISA yöntemi kullanılarak analiz edildi. Kültür süpernatantı (insan E-kaderin antijeni), insan E-kaderin'e spesifik poliklonal antikor ile kaplı kuyularda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyulardaki sıvılar atıldı ve E-kaderin'e spesifik biotinlenmiş monoklonal antikor içeren belirleme reaktifi-A eklendi. İnkübasyondan sonrası yıkama ve aspirasyon işlemlerini takiben streptavidin-peroksidaz enzimi içeren belirleme reaktifi-B ilave edildi. Üçüncü inkübasyondan ve tüm bağlanmayan enzim uzaklaştırılıp yıkandıktan sonra, enzime bağlanarak renk oluşturan substrat solüsyonu eklendi. Bu renkli ürünün yoğunluğu, orjinal numunede var olan E-kaderin konsantrasyonuna orantılanarak elde edildi. Absorbans 450 nm'de spektrofotometrik okuma ile belirlendi. Kültür süpernatantındaki E-kaderin miktarı, 0-20 ng/ml arasında değişen E-kaderin standartlarının absorbansı ile oluşturulan standard blanklere dayanarak belirlendi. miRNA transfeksiyonu ile E-kaderin sekresyonunun inhibisyonu (%), numunelerde ki E-kaderin'in kontrolle karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Tüm çalışmalar üç kere tekrarlandı ve standard sapmaları (\pm) hesaplandı.

5.2.4.3. Tinagl1'in ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) Yöntemi İle Tayini

Hücre kültür süspansiyonunun süpernatantında Tinagl1 tayini ELISA yöntemi ile üretici protokolüne uygun olarak yapıldı (Sunred, Shanghai). Kültür vasatında biriken Tinagl1 proteini ve rekombinant insan Tinagl1 protein standardın dilüsyonları katı faz sandviç ELISA yöntemi kullanılarak analiz edildi. Kültür süpernatantı (insan Tinagl1 antijeni), insan Tinagl1'e spesifik monoklonal antikor ile kaplı kuyulara eklendi. Daha sonra Tinagl1'e spesifik biotinlenmiş monoklonal antikor ve streptavidin-peroksidaz enzimi ilave edildi ve inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüm bağlanmayan enzim uzaklaştırılıp yıkandı ve enzime bağlanarak renk oluşturan substrat solüsyonları eklendi. Bu renkli ürünün yoğunluğu, orjinal numunede var olan Tinagl1 konsantrasyonuna orantılanarak elde edildi. Absorbans 450 nm'de spektrofotometrik okuma ile belirlendi. Kültür süpernatantındaki Tinagl1 miktarı, 0,5-8 ng/ml arasında değişen Tinagl1

standardlarının absorbansı ile oluşturulan standard blanklere dayanarak belirlendi. miRNA transfeksiyonu ile Tinagl1 sekresyonunun inhibisyonu (%), numunelerde ki Tinagl1'in kontrolle karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Tüm çalışmalar üç kere tekrarlandı ve standard sapmaları (\pm) hesaplandı.

5.2.4.4. Igfbp-4'in ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) Yöntemi İle Tayini

Hücre kültür süspansiyonunun süpernatantında Igfbp-4 tayini ELISA yöntemi ile üretici protokolüne uygun olarak yapıldı (RayBiotech, USA). Kültür vasatında biriken Igfbp-4 proteini ve rekombinant insan Igfbp-4 protein standardın dilüsyonları katı faz sandviç ELISA yöntemi kullanılarak analiz edildi. Kültür süpernatantı (insan Igfbp-4 antijeni), insan Igfbp-4'e spesifik monoklonal antikor ile kaplı kuyulara eklendi. 2,5 saat oda sıcaklığında hafifçe çalkalayarak inkübe edildi. Kuyular yıkama solüsyonu ile yıkandı ve kalan sıvı apire edildi. Daha sonra Igfbp-4'e spesifik biotinlenmiş monoklonal antikor eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında hafifçe çalkalayarak inkübe edildi. Kuyular yıkama solüsyonu ile yıkandı. Streptavidin- peroksidaz enzimi ilave edildi ve inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüm bağlanmayan enzim uzaklaştırılıp yıkandı ve enzime bağlanarak renk oluşturan substrat solüsyonları eklendi. 30 dk karanlıkta inkübasyondan sonra stop solüsyonu eklendi. Bu renkli ürünün yoğunluğu, orjinal numunede var olan Igfbp-4 konsantrasyonuna orantılanarak elde edildi. Absorbans 450 nm'de spektrofotometrik okuma ile belirlendi. Kültür süpernatantındaki Tinagl1 miktarı, 0,5-8 ng/ml arasında değişen Igfbp-4 standardlarının absorbansı ile oluşturulan standard blanklere dayanarak belirlendi. miRNA transfeksiyonu ile Igfbp-4 sekresyonunun inhibisyonu (%), numunelerde ki Igfbp-4'ün kontrolle karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Tüm çalışmalar üç kere tekrarlandı ve standard sapmaları (\pm) hesaplandı.

5.2.5. İnvazyon Yöntemi

Hücre dizileri %70-85 kofluenside 3 saat DMEM besiyeri ile 37°C'de CO₂ inkübatöründe bekletildi, daha sonra tripsinize edilerek yüzeyden kaldırılıp, sayım yapıldı. 1×10^5 hücre/insert olacak şekilde DMEM besiyeri ile süspande edilerek, 8 µm por filtreye sahip insertlere ekim yapıldı. 1 saat boyunca 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra miRNA içeren kitozan nanopleksler kuyucuklara koyularak 1 gece inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra insertler %10 formol ile 30 dakika fiske edilip, 15 dakika giemsa ile boyanarak, göç etmeyen hücreler kaldırılıp, göç eden hücrelerin invert mikroskopta sayımı yapıldı.

5.2.6. Apoptoz Çalışması

Normal hücrelerde fosfatidilserin plasm membranının iç kısmında lokalize olurken, apoptozun erken aşamasında fosfatidilserin plasm dışına transloke olur ve hücrenin dış yüzeyinde ortaya çıkar. Annexin V Ca⁺² –bağımlı fosfolipit bağlayıcı proteindir ve bu protein fosfatidilserine yüksek affinite gösterir. Annexin V proteini, FITC ile işaretlenerek apoptotik hücreler için fosfatidilserini saptayan bir prob olarak kullanıldı. Apoptotik hücrelerin sayımı için doğrudan FITC işaretli Annexin V proteini kullanıldı ve değerlendirme yapmak için floresan mikroskopunda görüntülendi. Yöntem üreticinin protokolüne uygun olarak yapıldı.

5.2.7. Hücre Proliferasyon Çalışması

Hücre proliferasyonuna WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) yöntemi ile bakıldı. Bu testin amacı, hücre proliferasyonunu, canlılığını ve sitotoksitesiteyi ölçmektir. Yöntem üreticinin protokolüne uygun olarak kit yardımıyla yapıldı.

Hücreler 96 kuyucuklu plate'e 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Üzerine 100 µl besiyeri (antibiyotiksiz 1xDMEM) ilave edilip bir gece inkübasyona

bırakıldı, daha sonra besiyeri kaldırıldı ve hazırlanan kompleksler 50 µl serumsuz besiyerinde süspande edilerek ilave edildi.

4 saat sonra 50 µl %10 serumlu besiyeri ilave edildi ve 48 saat 37°C'da %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Sürenin sonunda hücrelerin üzerine 10 µl WST-1 hücre proliferasyon ajanı ilave edilerek 37°C'da 4 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 1 dakika boyunca yatay çalkalayıcıda çalkalanması sağlandı ve örnekler 440 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans değerleri ölçüldü ve değerlendirildi.

5.2.8. İstatistiksel Değerlendirme

Proje kapsamında elde edilen in vitro ve in vivo çalışmalara ilişkin sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi, SPSS-20 istatistik programı kullanılarak yapıldı.

6. BULGULAR

6.1. MikroRNA Çalışmalarına İlişkin Bulgular

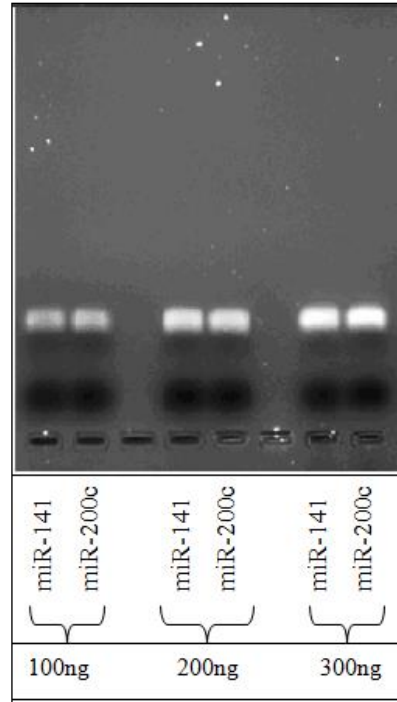
6.1.1. miRNA Mimikleri Hazırlanmasına İlişkin Bulgular

MikroRNA mimikleri yöntem 5.2.1.1.'de belirtildiği gibi son konsantrasyonu 50 nmol olacak şekilde 1XsiRNA tamponu içerisinde çözüldü.

6.1.2. miRNA Mimiklerinin Kontrolüne İlişkin Bulgular

6.1.2.1. miRNA Mimiklerinin Elektroforetik Kontrolüne İlişkin Bulgular

MikroRNA mimikleri yapısal olarak yöntem 5.2.1.2.'de belirtildiği şekilde agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrolü yapıldı. Elektroferez çalışması sonrası jel fotoğrafı Resim 6.1.'de verilmiştir. miRNA mimiklerinin tek bir bant halinde olduğu görüldü.



Resim 6.1. Farklı miktardaki miRNA' ların Agaroz Jeldeki görünümü.

6.1.2.2. miRNA Mimiklerinin Spektrofotometrik Kontrolüne İlişkin Bulgular

Yöntem 5.2.1.2.2.'de belirtildiği şekilde miRNA mimiklerinin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunda spektrofotometrik olarak incelendi. Liyofilize miRNA'ların nanomolü molekül ağırlığı ile çarpılarak mikrogram miktarları hesaplandı ve aynı oranda dilüe edildi. Bu hesaba göre toplam hacimden 1µg miRNA ile yapılan spektrofotometrik ölçüm değerleri (A260/280 ve DNA konsantrasyonu) Tablo 6.1.'de verilmiştir.

Tablo 6.1. miRNA'ların spektrofotometrik ölçümüne ilişkin bulgular

Spektrofotometrik Ölçüm	miR-200c	miR-141
A1/A2	2,2165	2,1020
DNA Konsantrasyonu(µg)	1,2245	1,1510

Teorik olarak hesaplanan miRNA konsantrasyonları spektrofotometre ile doğrulandı.

6.2. Kitozan/miRNA Nanoplekslerin Hazırlanması ve Kontrolüne İlişkin Bulgular

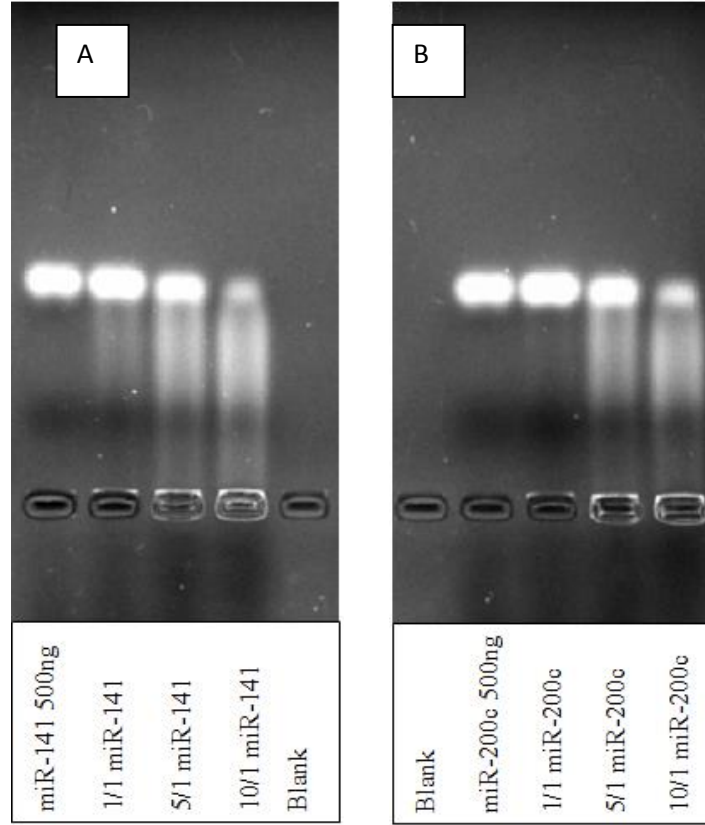
6.2.1. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Hazırlanması

Kitozan/miR-141 ve kitozan/miR-200c kompleksleri yöntem 5.2.2.1.'de belirtildiği şekilde yapıldı.

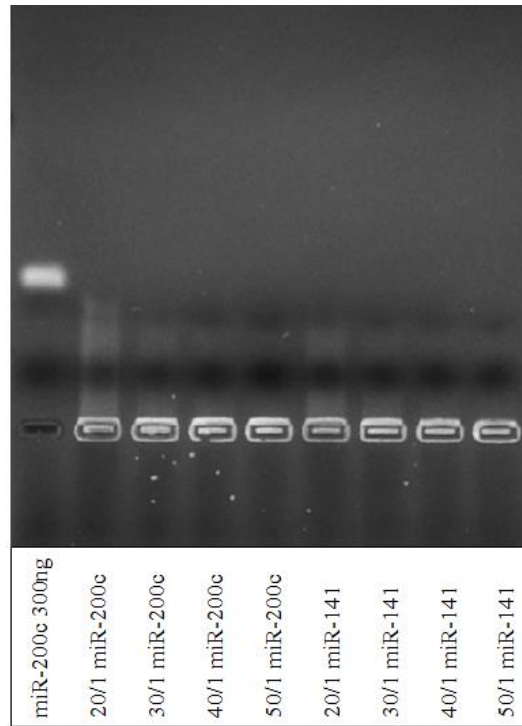
6.2.2. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Kontrolüne İlişkin Bulgular

6.2.2.1. Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Kompleks Oluşumunun Görüntülenmesine İlişkin Bulgular

iRNA içeren kitozan komplekslerine ilişkin elektroforetik inceleme bulguları **Resim 6.2.-6.3.**'de verilmiştir.



Resim 6.2. A-Kitozan/miR-141 (1/1-10/1) kompleksinin elektroforetik kontrolü. B-Kitozan/miR-200c (1/1-10/1) kompleksinin elektroforetik kontrolü.

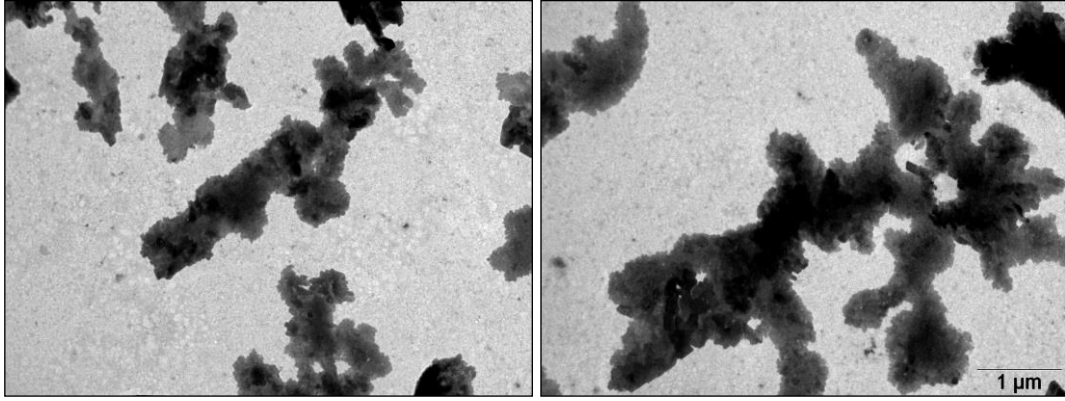


Resim 6.3. Kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 (20/1-50/1) kompleksinin elektroforetik kontrolü.

Kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforezi ile incelenmesinin sonucunda sentetik miRNA mimikleri ile kitozan arasında tam kompleks oluşumu 20/1-50/1 oranlarında gözlemlendi (Resim 6.3.). 1/1-10/1 oranındaki komplekslerde ise kısmi kompleks oluşumu görüldü (Resim 6.2.-A.-B.).

6.2.1.2. Komplekslerin TEM ile Görüntülenmesine İlişkin Bulgular

Kitozan/miRNA kompleks formülasyonunun morfolojik özelliklerini belirlemek amacıyla TEM incelemesi yöntem 5.3.2.1.2.'de belirtildiği gibi negatif boyama yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (**Resim 6.4.**).



Resim 6.4. Kitozan/miRNA komplekslerinin TEM görüntüsü.

TEM incelemesinin sonucunda; *in vitro* ve *in vivo* hücre transfeksiyonu açısından uygun boyutlara sahip kompleks yapılarının oluştuğu gözlemlenmiştir.

6.2.1.3. Komplekslerin Partikül Büyüklüğü Değerlerinin Ölçülmesine İlişkin Bulgular

Serbest miR-141 ve miR200c ve kitozan/miRNA komplekslerinin partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları **Tablo 6.2.**'de verilmiştir.

Tablo 6.2. 15µg mikroRNA ile hazırlanan kompleks formülasyonlarına, serbest mikroRNA'lara ve kitozana ait boyut ve yüzey yükü ölçüm sonuçları.

Formülasyonlar	Oran	Zeta Potansiyeli mV(±SD)	Partikül Boyutu d.nm (±SD)
Kitozan/miR-141	20/1	12.3 ± 0.5	354.9 ± 8
	30/1	16.1 ± 1.2	328.1 ± 12
	40/1	24.5 ± 0.6	407 ± 26
	50/1	25.4 ± 0.2	425.4 ± 50
Kitozan/miR-200c	20/1	12.4 ± 0.8	373.5 ± 25
	30/1	16.9 ± 0.8	367.9 ± 33
	40/1	20.8 ± 1	500.3 ± 80
	50/1	26.1 ± 1.2	596 ± 130
Kitozan	-	32.9 ± 1	693.9 ± 60
Serbest miR-141	-	-14.6 ± 0.7	-
Serbest miR-200c	-	-8.8 ± 0.4	-

Yapılan ölçümlerde, kompleks partikül boyutlarının kitozan/miR-141'de 328.1±12 nm ile 425.4±50 nm ve kitozan/miR-200c'de 367.9±33 ile 596 ± 130 nm arasında değiştiği saptanmıştır.

6.2.1.4. Komplekslerin Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçülmesine İlişkin Bulgular

Kitozan/miRNA kompleksleri ve serbest miRNA'ya ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları **Tablo 6.2.**'de verilmiştir.

Yapılan ölçümler sonucunda, serbest miR-141 ve miR-200c mimiklerinin negatif yüzey yük yoğunluğuna sahip olduğu gözlemlendi. 20/1 (+/-) oranında hazırlanmış olan komplekslerin pozitif yük yoğunluğuna sahip oldukları ve zeta potansiyel değerleri kitozan/miR-141 kompleksleri için 12.3-25.4 mV ve kitozan/miR200c kompleksleri için 12.4-26.2 mV arasında değiştiği saptandı.

Tablo 6.4. Kitozan/miR-200c ve kitozan/miR141 komplekslerinin zeta potansiyeline ilişkin istatistiksel değerlendirmeler.

Zeta Potansiyel Değerleri									
		Kitozan/miR-200c				Kitozan/miR-141			
	Oran	20/1	30/1	40/1	50/1	20/1	30/1	40/1	50/1
Kitozan/ miR-200c	20/1	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	-	-	-
	30/1	-	-	p<0,05	p<0,05	-	p>0,05	-	-
	40/1	-	-	-	p<0,05	-	-	p<0,05	-
	50/1	-	-	-	-	-	-	-	p>0,05
Kitozan/ miR-141	20/1	-	-	-	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
	30/1	-	-	-	-	-	-	p<0,05	p<0,05
	40/1	-	-	-	-	-	-	-	p<0,05
	50/1	-	-	-	-	-	-	-	-

Kitozan/miR-200c ve kitozan/miR141 komplekslerinin zeta potansiyeline ilişkin bulguların istatistiksel değerlendirmeleri Tablo 6.4.'de verilmiştir. Çalışmamızda elde edilen yzey yk olm değerleri, formulasyona ilave edilen kitozan konsantrasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde (+) ynde artmaktadır. Zeta potansiyel sonuçlarının yntem 5.2.8'de belirtildiği şekilde yapılan istatistiksel değerlendirmesi anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

Tablo 6.3. Kitozan/miR-200c ve kitozan/miR141 komplekslerinin partikül boyutuna ilişkin istatistiksel değerlendirmeler.

Partikül Boyut Değerleri									
		Kitozan/miR-200c				Kitozan/miR-141			
	Oran	20/1	30/1	40/1	50/1	20/1	30/1	40/1	50/1
Kitozan/ miR-200c	20/1	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	P>0,05	-	-	-
	30/1	-	-	p<0,05	p<0,05	-	p<0,05	-	-
	40/1	-	-	-	p>0,05	-	-	p<0,05	-
	50/1	-	-	-	-	-	-	-	p<0,05
Kitozan/ miR-141	20/1	-	-	-	-	-	p>0,05	p<0,05	p<0,05
	30/1	-	-	-	-	-	-	p<0,05	p<0,05
	40/1	-	-	-	-	-	-	-	p<0,05
	50/1	-	-	-	-	-	-	-	-

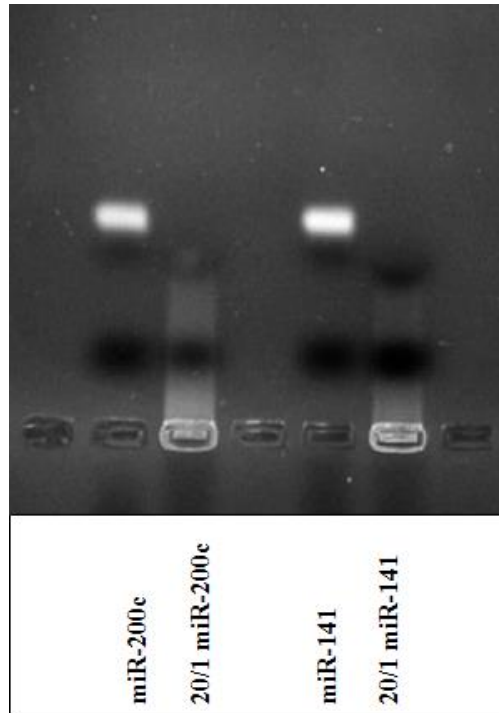
Kitozan/miR-200c ve kitozan/miR141 komplekslerinin partikül boyutlarına ilişkin bulguların istatistiksel değerlendirmeleri Tablo 6.3.'de verilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler sonucuna göre p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen partikül boyutu ölçüm değerleri, formülasyona ilave edilen kitozan konsantrasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde değişmektedir. Partikül boyutu sonuçları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05).

6.2.1.5. Kitozan/miRNA Komplekslerinin Serum Stabilitesine İlişkin Bulgular

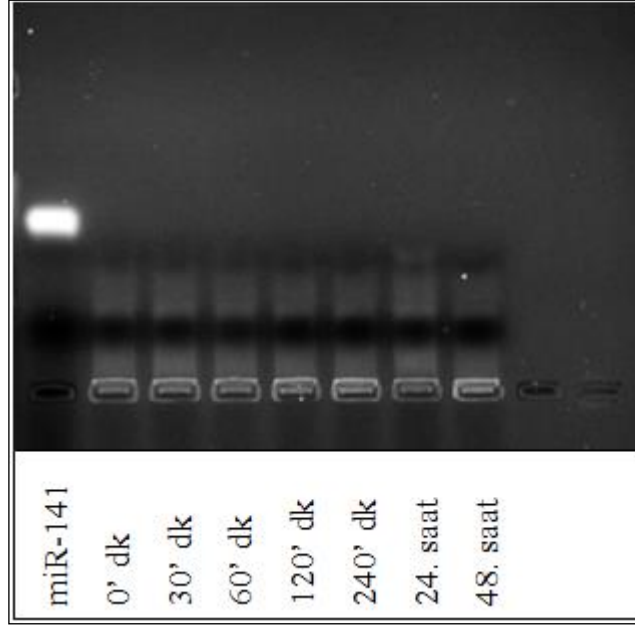
Komplekslerin serumun parçalayıcı etkisine karşı stabilitesini belirlemek üzere; yöntem 5.2.2.1.5.'de belirtildiği şekilde serbest miRNA ve kompleks formülasyonu ile serum stabilite çalışması yapıldı.

Stabilite çalışması öncesinde miRNA'ların ve hazırlanan komplekslerin agaroz jel elektroforezinde elektroforetik kontrolü yapıldı (Resim 6.5.).

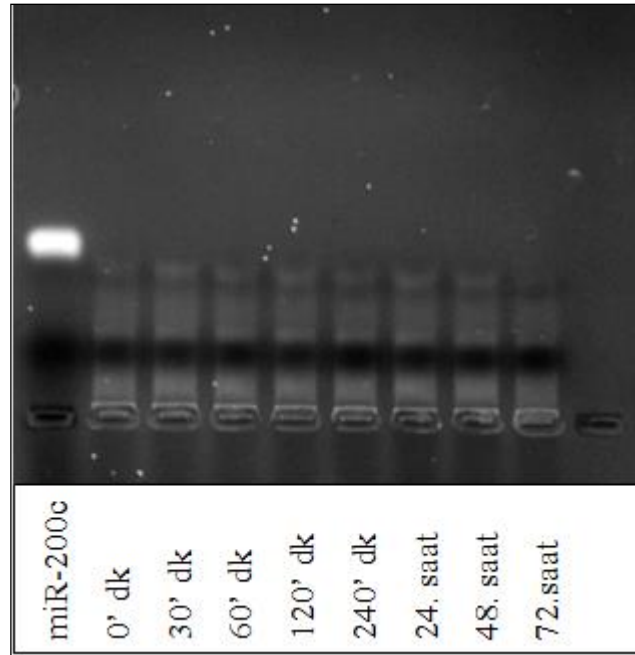
Serum stabilitesi çalışması sonrasında; %10 serum içerisinde inkübe edilen miR-141 ile hazırlanan komplekslerin serum stabilitesi **Resim 6.6.**'da, miR-200c ile hazırlanan komplekslerin serum stabilitesi **Resim 6.7.**'de, serbest miR-200c'nin serum stabilitesi **Resim 6.8.**'de ve serbest miR-141'in serum stabilitesi de **Resim 6.9.**'da verilmiştir.



Resim 6.5. Serum stabilite çalışması öncesinde miRNA'ların ve hazırlanan komplekslerin agaroz jel elektroforezinde elektroforetik kontrolü

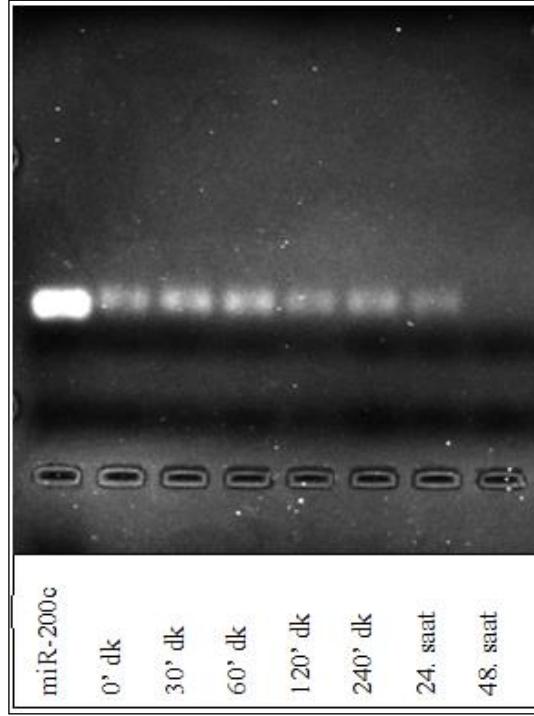


Resim 6.6. miR-141 ile hazırlanan komplekslerin serum stabilitesi

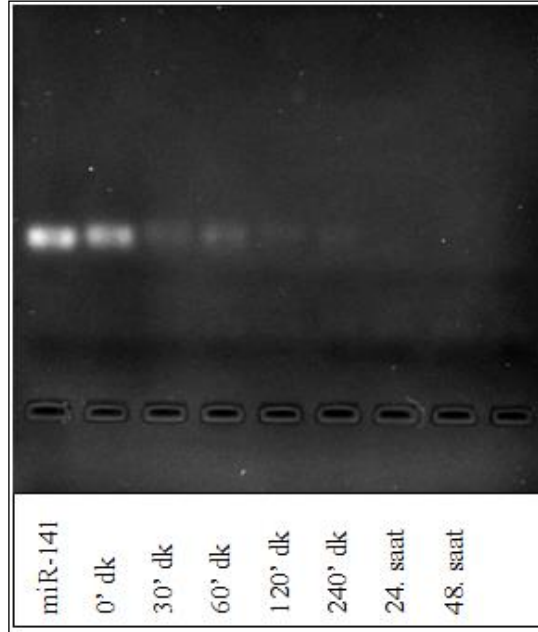


Resim 6.7. miR-200c ile hazırlanan komplekslerin serum stabilitesi

Kitozan/miR-141 ve kitozan/miR-200c kompleksleri %10 serum ile muamele edildiğinde 48.saat sonuna kadar ayrışma olmadığı ve 72.saat sonunda bile kitozan/miRNA komplekslerinin önemli ölçüde varlığını koruduğu ve serum etkisine karşı stabil olduğu gözlemlendi.



Resim 6.8. Serbest miR-200c'nin serum stabilitesi



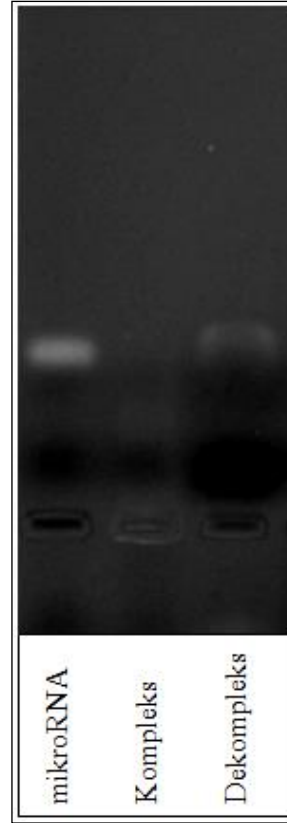
Resim 6.9. Serbest miR-141'in serum stabilitesi

Serbest miR-200c'nin ve miR-141'in serum stabilitesinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmada; miR-200c'nin %10 serum ile muamele edilmesini takiben 0. dakikadan itibaren parçalanmaya başladığı ve zamana bağlı olarak da 48. saat sonunda tamamen parçalandığı gözlenmiştir. miR-141'in %10 serum ile muamele

edilmesini takiben 0. dakikadan itibaren parçalanmaya başladığı ve zamana bağlı olarak da 24. saat sonunda tamamen parçalandığı gözlenmiştir.

6.2.1.6. Kitozan/siRNA Komplekslerinin Dekompleksasyon Kontrolüne İlişkin Bulgular

miRNA mimikleri ile hazırlanan komplekslerin dekompleksasyonu yöntem 5.2.2.1.6.'da belirtildiği şekilde yapıldı. Serbest miRNA, kitozan/miRNA kompleksi ve kitozan/miRNA dekompleksini gösteren agaroz jel bulguları Resim 6.10.'da verilmiştir.



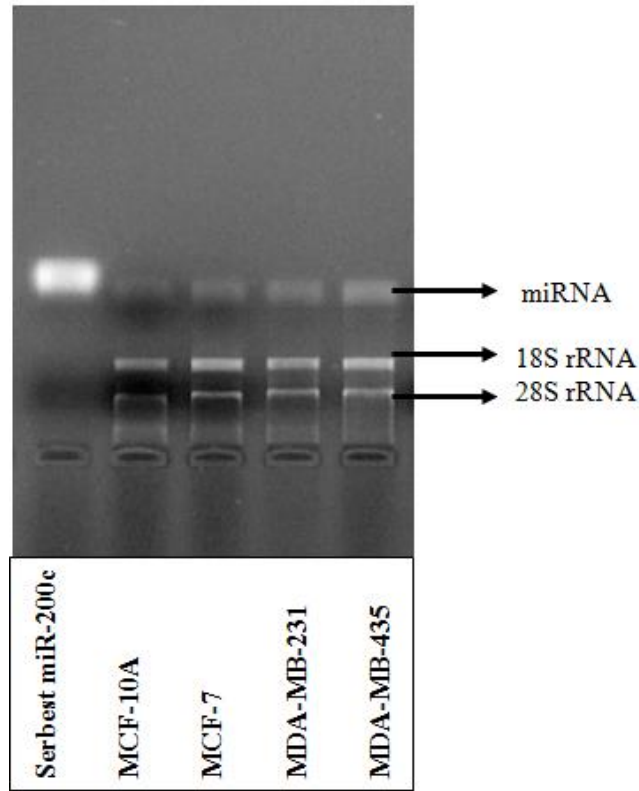
Resim 6.10. Serbest miRNA, kitozan/miRNA kompleksi ve kitozan/miRNA dekompleksini gösteren agaroz jel bulguları

Kitozan/miRNA kompleksinin miRNA'nın yapısını bozmadan dekomplekse olduğu gözlenmiştir.

6.3. İn Vitro Transfeksiyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

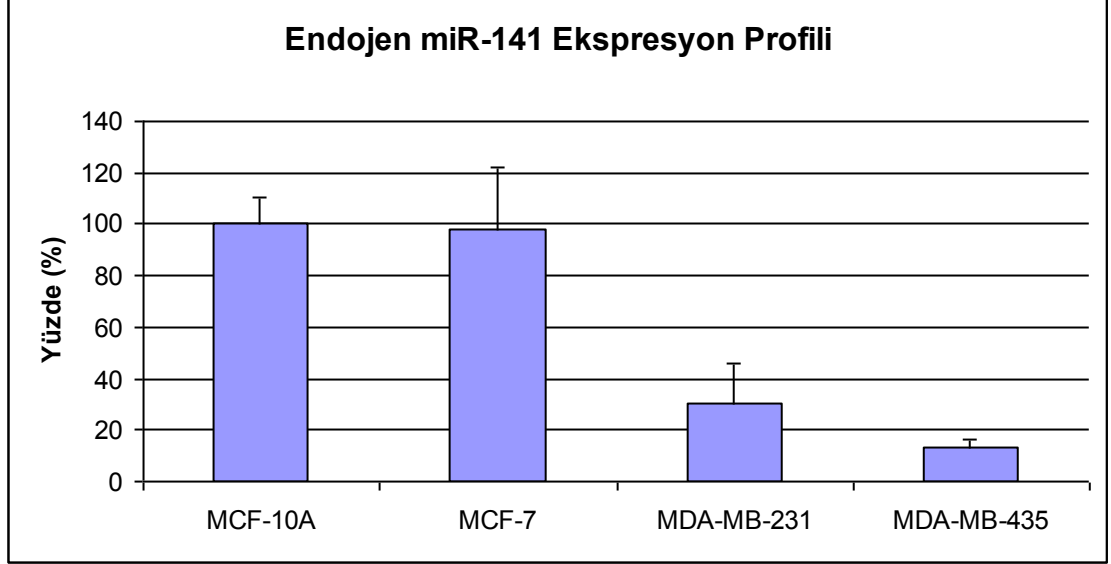
6.3.1. Sağlıklı ve Kanserli Hücrelerde Endojen miRNA Düzey Tayinine İlişkin Bulgular

Sağlıklı meme hücre hattı olarak MCF-10A ve meme kanserli hücre hattı olarak MCF-7, MD-MB-231 ve MDA-MB-435 kullanıldı. Bu hücre hatlarında endojen miR-141 ve miR-200c miRNA mimik tayini yapabilmek için öncelikle üretici protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu (mirVana™ miRNA izolasyon kiti) yapıldı. İzole edilen RNA'ların spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapıldı (Resim 6.11.). Yöntem 5.2.3.2.'de belirtildiği gibi RNA'dan miR-141, miR-200c ve house keeping gen olarak RNU6B'ye spesifik primer kullanılarak cDNA sentezi ve ekspresyon profillemeye için Real-Time PCR yapıldı. Referans örnek olarak MCF-10A hücre hattı seçilerek analiz yapıldı. Real-Time PCR ile elde edilen miRNA profilleri Şekil 6.1.'de verilmiştir.

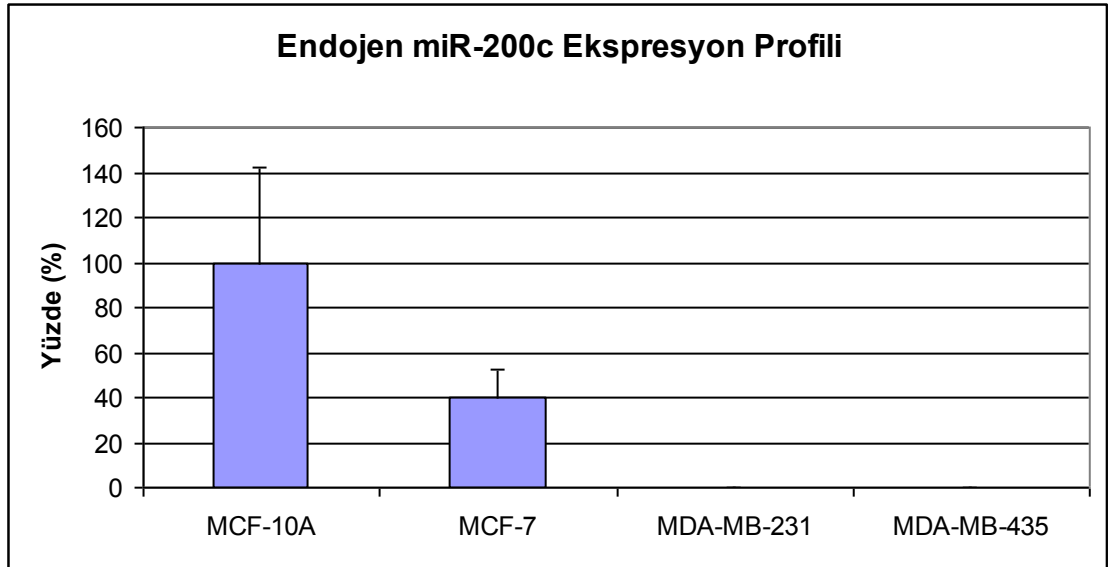


Resim 6.11. Transfeksiyon öncesi hücre hatlarından RNA izolasyonunun elektroforetik kontrolü

Her bir meme hücre hattında miRNA izolasyonunun agaroz jel görüntüsünde en önde miRNA ve hemen arkasında sırasıyla 18S ve 28S ribozomal RNA görülmektedir.



Şekil 6.1. Sağlıklı ve Kanserli Hücre Hatlarında Endojen miR-141 Ekspresyon Profili (n=3)



Şekil 6.2. Sağlıklı ve Kanserli Hücre Hatlarında Endojen miR-200c Ekspresyon Profili (n=3)

Tablo 6.5. Sağlıklı ve kanser hücre hatlarında endojen miRNA düzeyine ait istatistiksel bulgular

Endojen miRNA Düzeyi		
	MCF-10A-miR200c	MCF-10A miR-141
MCF-7	p<0,05	p<0,05
MDA-MB-231	p<0,05	p<0,05
MDA-MB-435	p<0,05	p<0,05

Ekspresyon profileme çalışması analizinde sağlıklı hücre hattı olarak MCF-10A referans olarak seçilmiştir. Şekil 6.1. ve 6.2.'de görüldüğü gibi, miR-200c'nin %60 downregüle olduğu ve endojen miR-141'in ise sağlıklı hücre hattı ile hemen hemen aynı seviyede olduğu gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında, miR-141'in yaklaşık %70 ve miR-200c'nin yaklaşık %99 downregüle olduğu gözlenmiştir. MDA-MB-435 hücre hattında ise, miR-141'in yaklaşık %90 ve miR-200c'nin yaklaşık %99 downregüle olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı ve kanserli hücre hatlarındaki miR-200c ve miR-141 seviyeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuçlara göre kanserli hücre hatlarındaki downregüle miRNA seviyelerini sağlıklı hücre hattının endojen miRNA seviyesine getirebilmek için transfeksiyon ve doz çalışmaları yapılmıştır.

6.3.3. Transfeksiyon Öncesi Hücre Ekimi ve Transfeksiyon

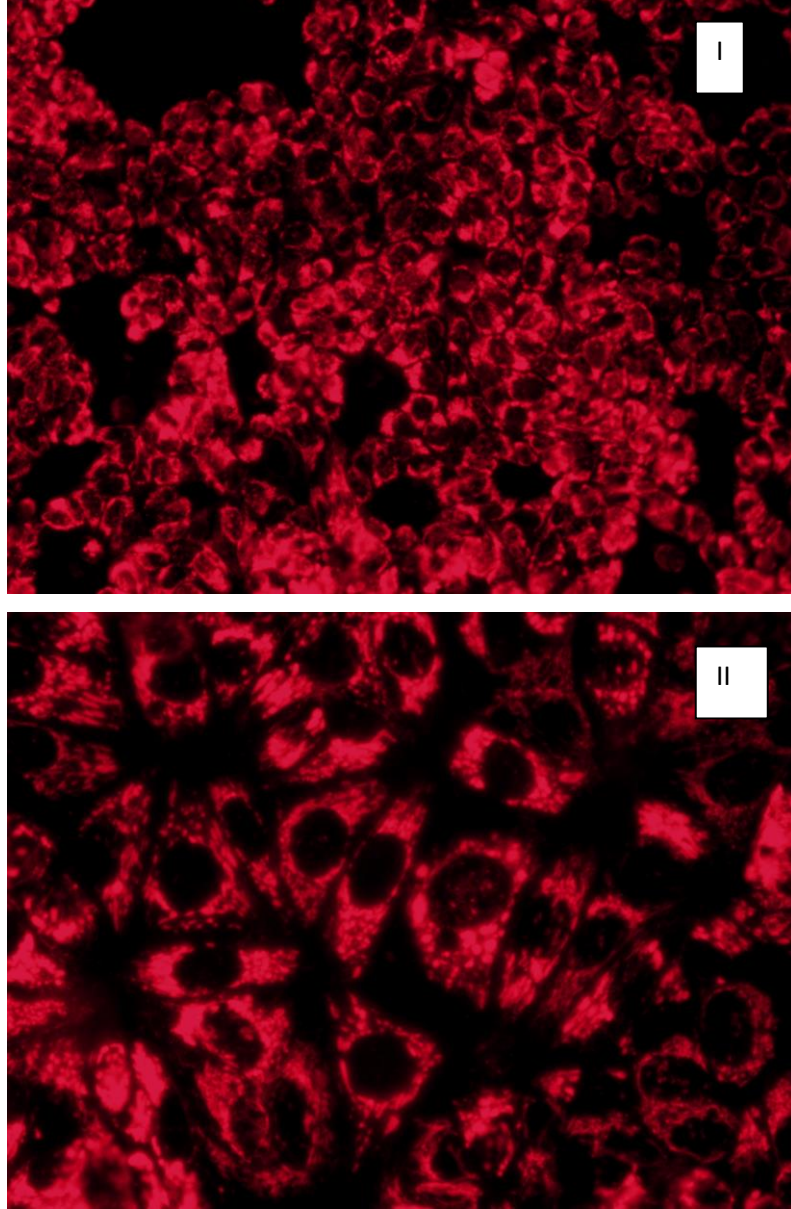
Transfeksiyon öncesinde hücre ekimi ve transfeksiyonu yöntem 5.2.3.3.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

6.3.4. Transfeksiyon Kontrol Çalışmaları

6.3.4.1. Floresans İşaretli Mimik miRNA'ların Hücrede Transfeksiyonunu Floresan ve Konfokal Mikroskop İle İncelenmesine İlişkin Bulgular

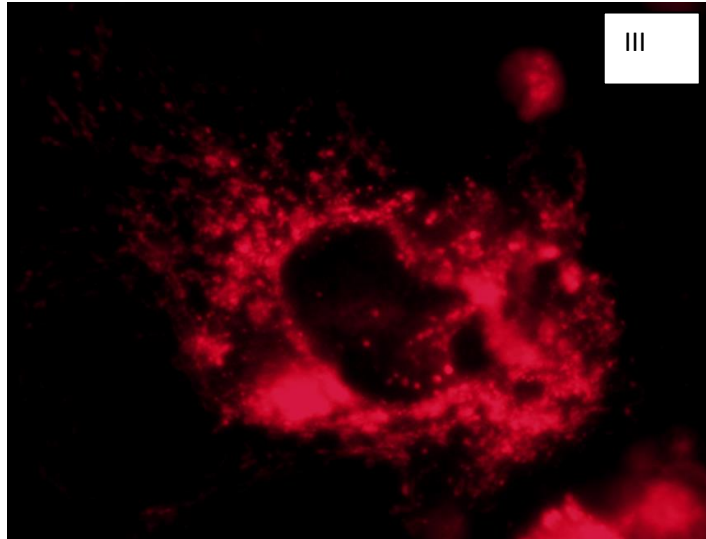
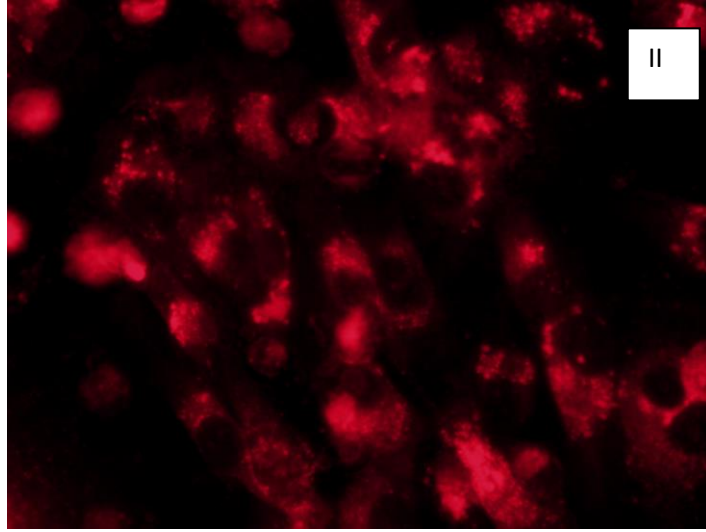
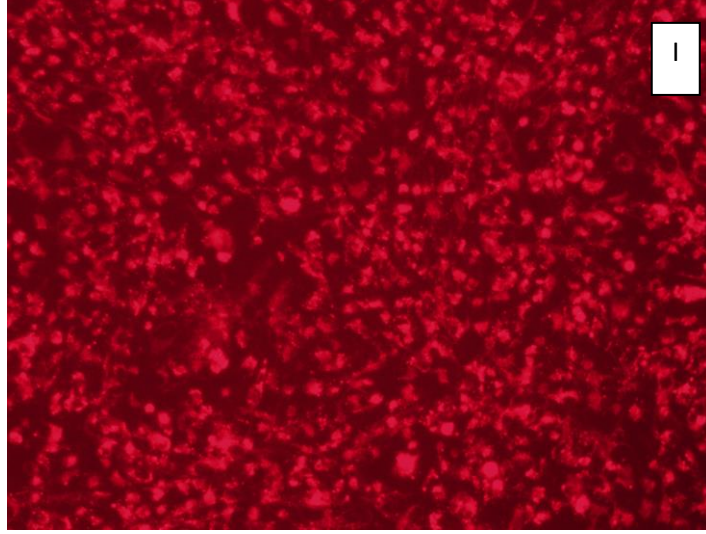
Yöntem 5.2.3.3.'de belirtildiği şekilde hazırlanan, kitozan/Dy547-miR-67 mimik kompleksleri (20/1 (+/-)) hücrelere verilerek, komplekslerin hücre içerisindeki

lokalisasyonları floresan ve konfokal mikroskop ile incelendi. Floresan mikroskop incelemelerine ait görüntüler **Resim 6.12., 6.13. ve 6.14.**'de ve konfokal mikroskop görüntüleri ise Resim 6.15., 6.16. ve 6.17.'de verilmiştir.

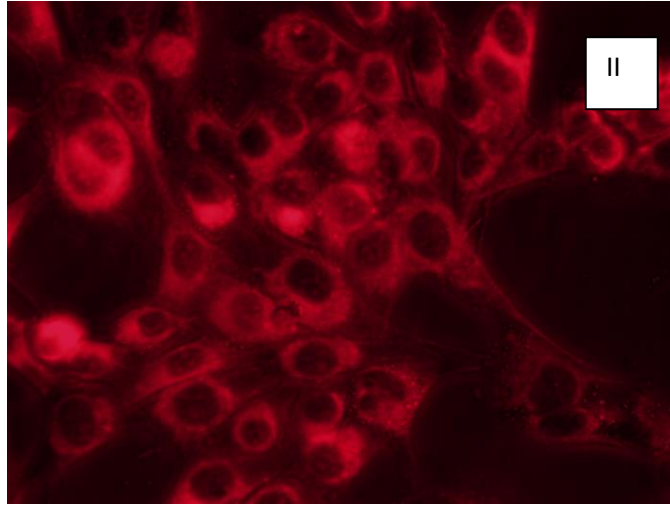
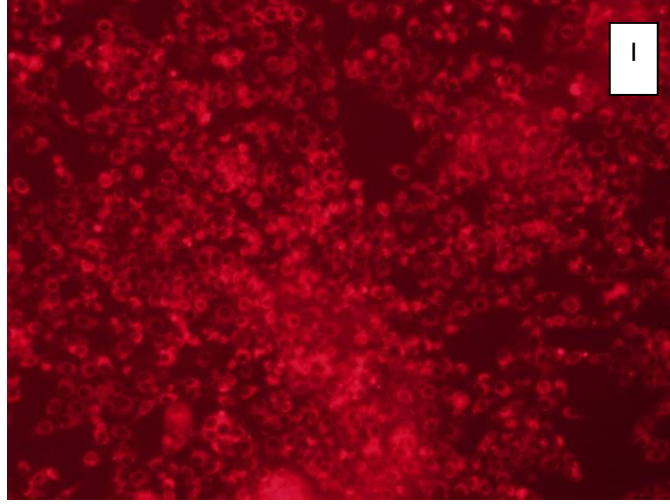


Resim 6.12. Kitozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MCF-7 hücre hattına transfeksiyonundan sonraki 96. saat I. x20 büyütme II. x40 büyütme

MCF-7 hücre hattında kitozan/miRNA transfeksiyonu kalitatif olarak Rhodamin filtre kullanılarak floresan mikroskop altında gözlemlendi ve tüm hücrelerde %100 transfeksiyon tespit edildi (Resim 6.12.).

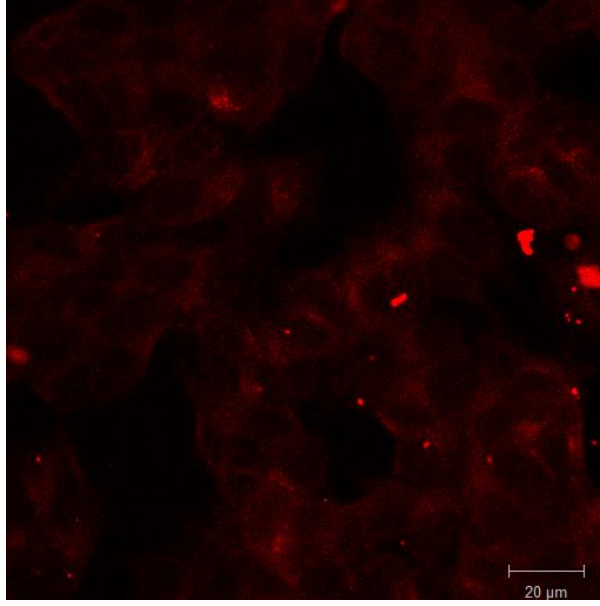


Resim 6.13. Kitozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MDA-MB-231 hücre hattına transfeksiyonundan sonraki 96. saat I-II x4 büyütme III- x40 büyütme

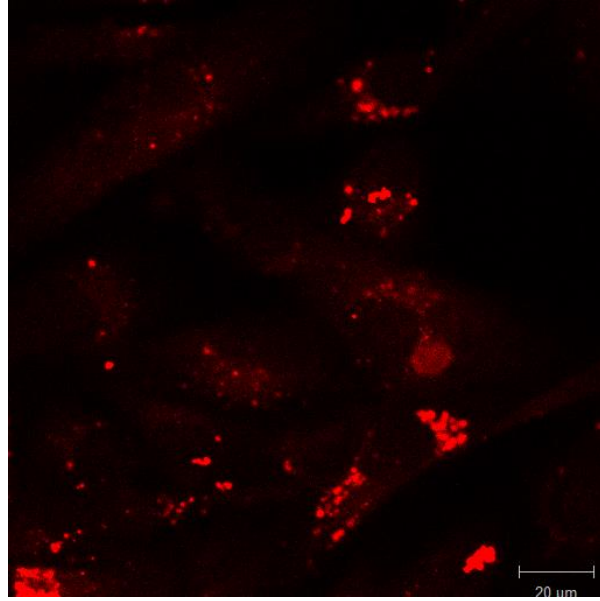


Resim 6.14. Kitozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MDA-MB-435 hücre hattına transfeksiyonundan sonraki 68. saat I-x4 büyütme II-x40 büyütme

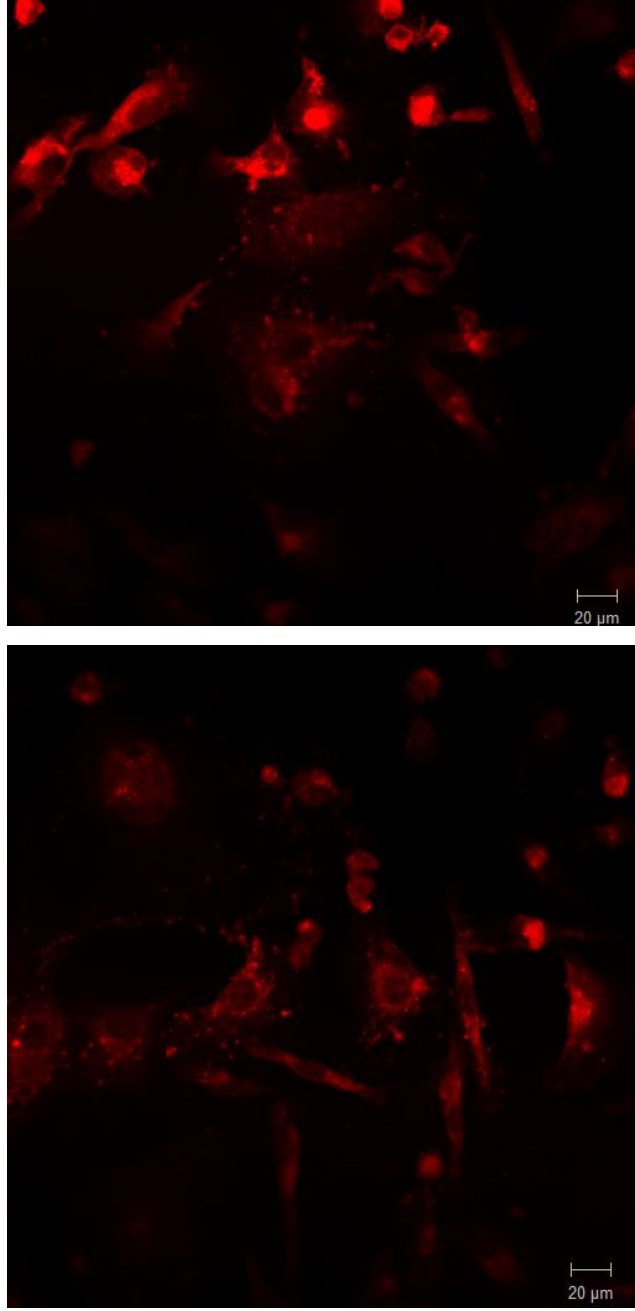
MDA-MB-231 ve MDA-MB-435 hücre hatlarında Rhodamin filtre ile floresan mikroskop altında alınan görüntülere göre tüm hücrelerde kitozan taşıyıcısı ile miRNA transfeksiyonunda transfeksiyon etkinliğinin %100 olduğu tespit edilmiştir.



Resim 6.15. Kitozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MCF-7 Hücre hattına transfeksiyonunun Konfokal Mikroskop Görüntüleri 40X Büyütme



Resim 6.16. Kitozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MDA-MB-231 Hücre hattına transfeksiyonunun Konfokal Mikroskop Görüntüleri 40X Büyütme



Resim 6.17. Kitozan/Dy547-miR-67 mimik (20/1) komplekslerinin MDA-MB-231 Hücre hattına transfeksiyonunun Konfokal Mikroskop Görüntüleri 20X Büyütme

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miRNA transfeksiyonu sonrası alınan konfokal mikroskop görüntüleri de floresan mikroskop görüntülerini desteklemiştir.

6.3.5. RT-PCR Yöntemi ile miRNA Doz Çalışmalarına İlişkin Bulgular

6.3.5.1. RNA İzolasyonuna İlişkin Bulgular

RNA izolasyonu yöntem 5.2.3.5.1’de belirtildiği şekilde yapıldı.

6.3.5.2. cDNA Sentezi

Transfeksiyon sonrası izole edilen RNA’lardan cDNA sentezi yöntem 5.2.3.5.2’de belirtildiği şekilde yapıldı.

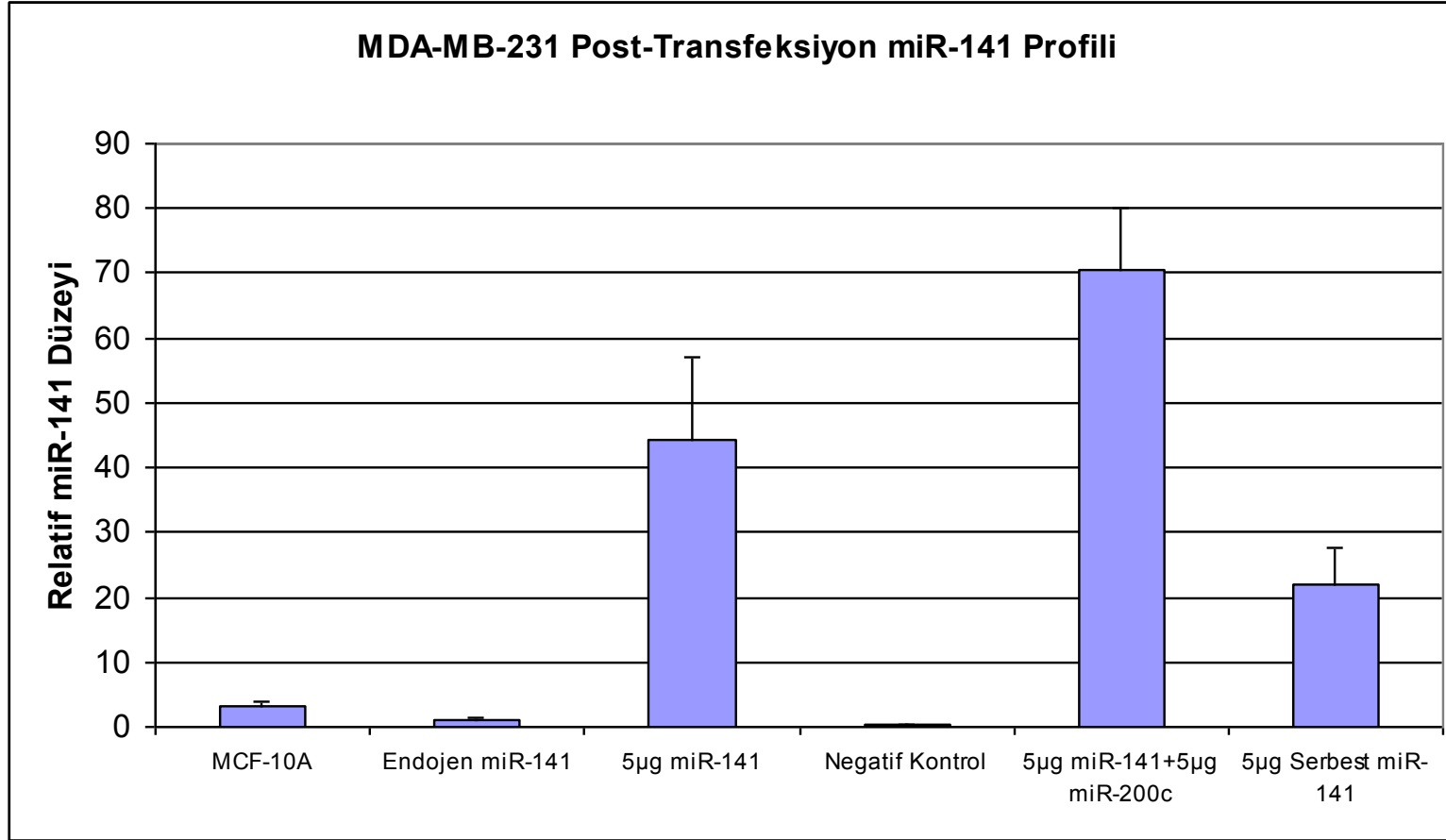
6.3.5.3. Relatif Kantitatif Real Time PCR Çalışması

RT-PCR çalışmaları yöntem 5.2.3.5.3’de belirtildiği şekilde yapıldı.

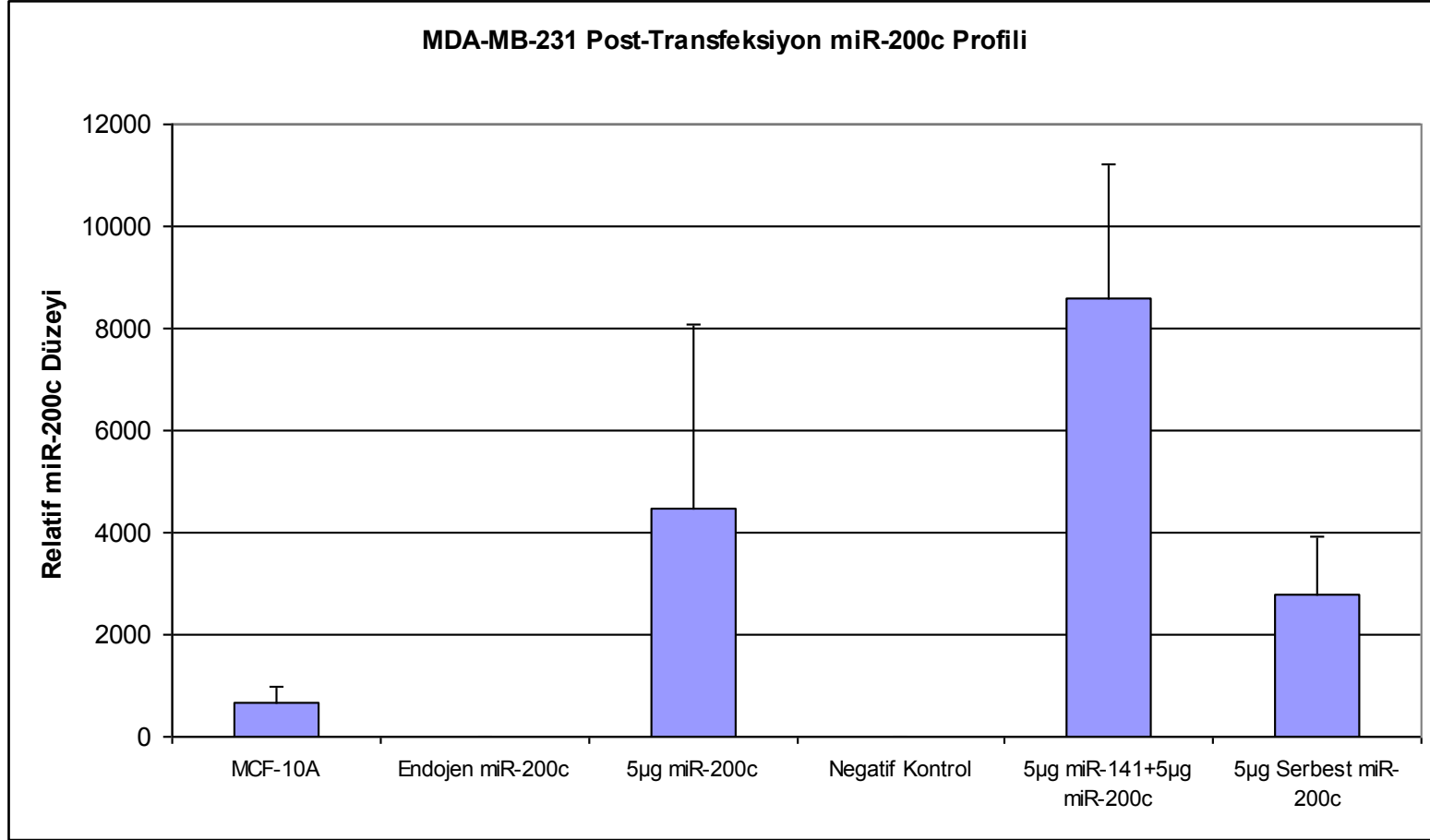
6.3.5.4. miRNA Doz Çalışmalarına İlişkin Bulgular

miRNA doz çalışmaları Yöntem 5.2.3.5.4.’de belirtildiği şekilde yapıldı. Çalışmalar 6 kuyucuklu platelerde yapıldı.

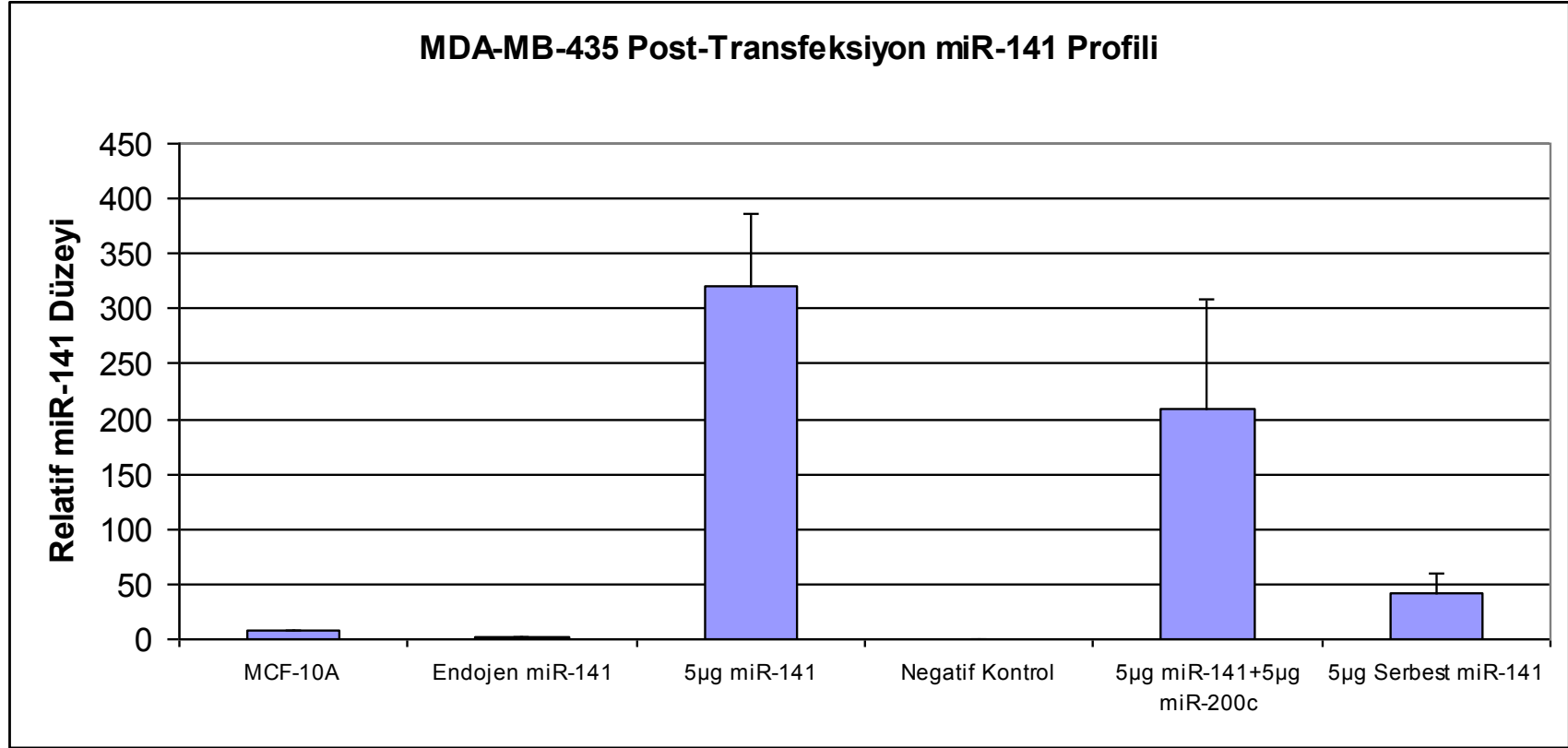
İlk doz çalışmasında MDA-MB-231 ve MDA-MB-435 hücre hatlarına kitozan/miR-141(100/5µg), kitozan/miR-200c (100/5µg), kitozan/negatif kontrol miRNA (100/5µg), kitozan/miR-141+miR-200c (200/5µg+5µg), serbest miR-141 (5µg) ve serbest miR-200c (5µg) transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyonun 48. saatinde RNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen RNA’nın cDNA sentezi ve cDNA ile RT-PCR çalışması yapıldı. 5µg miRNA mimikleri ile yapılan RT-PCR çalışması bulguları Şekil 6.3., 6.4., 6.5. ve 6.6.’da verilmiştir.



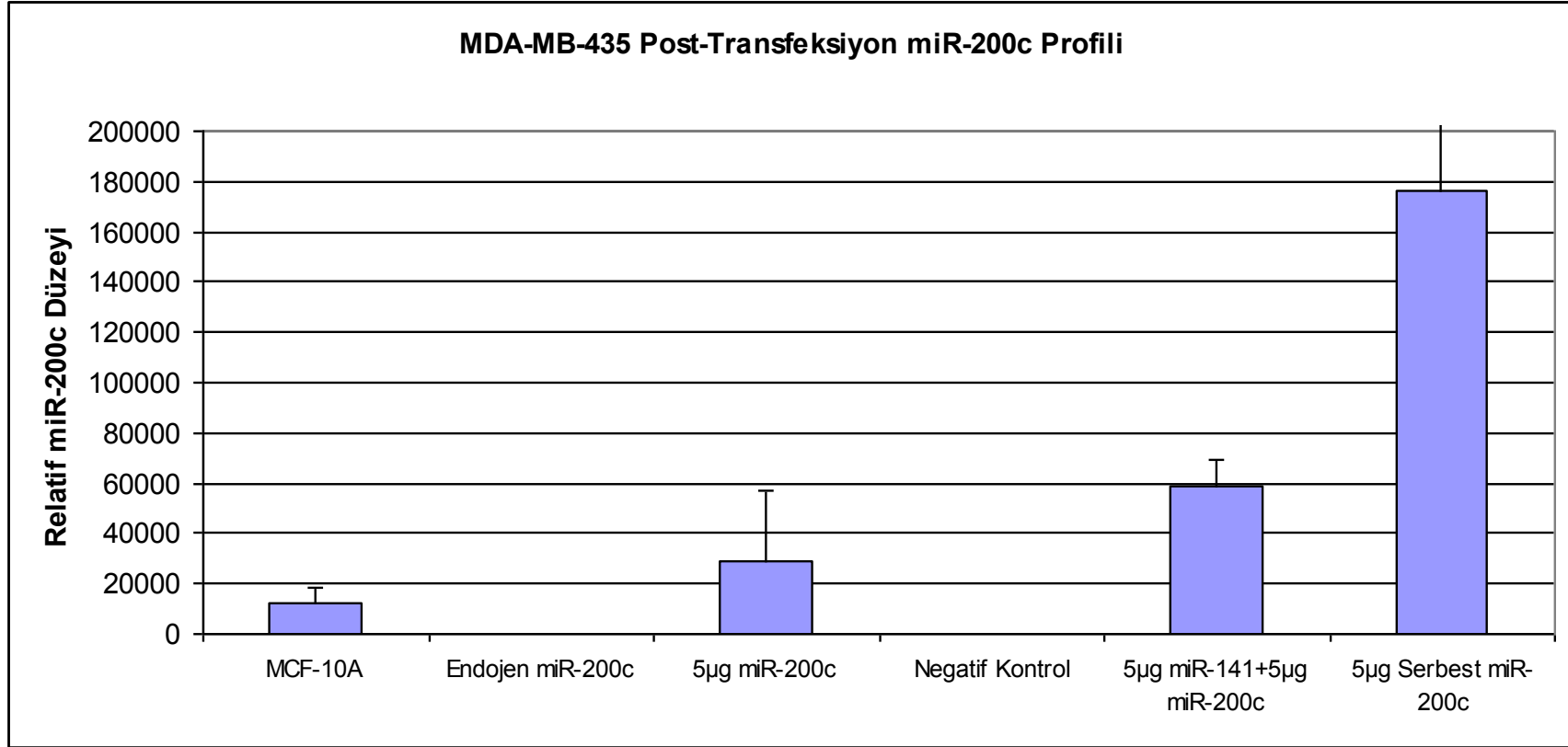
Şekil 6.3. 5µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların ve serbest miR-141'in transfeksiyonu sonrası MDA-MB-231 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili (n=3)



Şekil 6.4. 5µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların ve serbest miR -200c'nin transfeksiyonu sonrası MDA -MB-231 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili (n=3)



Şekil 6.5. 5µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların ve serbest miR-141'in transfeksiyonu sonrası MDA-MB-435 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili (n=3)



Şekil 6.6. 5µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların ve serbest miR -200c'nin transfeksiyonu sonrası MDA -MB-435 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili (n=3)

Kanserli hücre hatlarında miRNA seviyesini sağlıklı meme hücre hattında miR-200c ve miR-141 seviyesine getirmek için yapılan 5µg doz çalışması sonucuna göre, MDA-MB-231 hücre hattında 5µg kitozan/miR-141 transfeksiyonu, miR-141 seviyesini 44 kat artırmış ve MCF-10A'ya göre 14 kat upregüle etmiştir. Kitozan/miR-141 transfeksiyonu ise serbest miR-141 transfeksiyonundan 2 kat fazla hücredeki miR-141 seviyesini artırmıştır.

MDA-MB-231 hücre hattında 5µg kitozan/miR-200c transfeksiyonu, miR-200c seviyesini 4473 kat artırmış ve MCF-10A'ya göre 6.7 kat upregüle etmiştir. Kitozan/miR-200c transfeksiyonu ise serbest miR-200c transfeksiyonundan 1.6 kat fazla hücredeki miR-200c seviyesini artırmıştır.

MDA-MB-435 hücre hattında 5µg kitozan/miR-141 transfeksiyonu miR-141 seviyesini 320 kat artırmış ve MCF-10A'ya göre 43.5 kat upregüle etmiştir. Kitozan/miR-141 transfeksiyonu ise serbest miR-141 transfeksiyonundan 7.7 kat fazla hücredeki miR-141 seviyesini artırmıştır.

MDA-MB-435 hücre hattında 5µg kitozan/miR-200c transfeksiyonu miR-200c seviyesini 29233 kat artırmış ve MCF-10A'ya göre 2.4 kat upregüle etmiştir. Serbest miR-200c transfeksiyonu ise kitozan/miR-200c transfeksiyonundan 6 kat fazla hücredeki miR-141 seviyesini artırmıştır.

5µg miR-141 ve miR-200c transfeksiyonu her iki meme kanseri hücre hattında da miRNA seviyesini sağlıklı hücre hattındaki miRNA seviyesine göre upregüle etmiştir. Meme kanserinde miR-200 ailesinin upregülasyonu metastaz yolağını indüklediği için 2,5 ve 1 µg miRNA dozlar denenmiştir. Ayrıca MDA-MB-231 hücre hattında transfeksiyon sonra hem miR-200c hem de miR-141 seviyesi kitozan taşıyıcı sistem olarak kullanıldığında serbest miRNA transfeksiyonuna göre yaklaşık 2 kat fazla olduğu ve MDA-MB-435 hücre hattında transfeksiyon sonra miR-141 seviyesi kitozan formülasyonu ile verildiğinde serbest miR-141 transfeksiyonundan yaklaşık 7 kat fazla miR-141 miktarını artırdığı tespit edilmiştir.

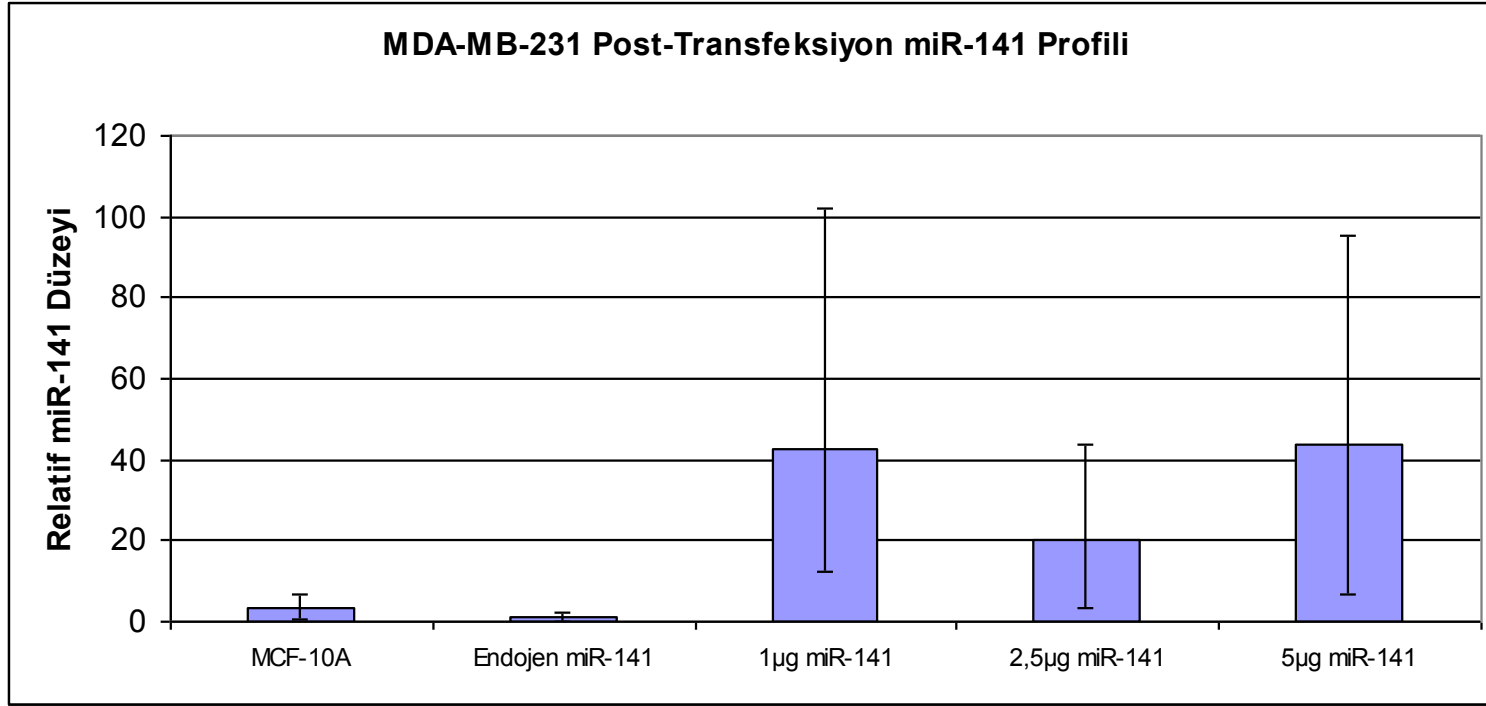
İkinci doz çalışmasında MDA-MB-231 ve MDA-MB-435 hücre hatlarına kitozan/miR-141 (20/1µg ve 50/2,5µg) ve kitozan/miR-200c (20/1µg ve 50/2,5µg) transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyonun 48. saatinde RNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen RNA'nın cDNA sentezi ve cDNA ile RT-PCR çalışması yapıldı. 1µg ve 2,5µg miRNA mimikleri ile yapılan RT-PCR çalışması bulguları Şekil 6.7., 6.8., 6.9. ve 6.10.'da verilmiştir.

Kanserli hücre hatlarında miRNA seviyesini, sağlıklı meme hücre hattındaki miR-200c ve miR-141 seviyesine getirmek için, MDA-MB-231 hücre hattında yapılan çalışma, bulgulara göre; 2,5µg kitozan/miR-141 transfeksiyonu miR-141 seviyesini 20 kat artırmış ve 5µg kitozan/miR-141 transfeksiyonu bulgularına göre yaklaşık %50 miR-141 seviyesi azaldığı gözlenmiştir. Ancak MCF-10A'ya göre 6 kat miR-141'i upregüle etmiştir (Şekil 6.10.).

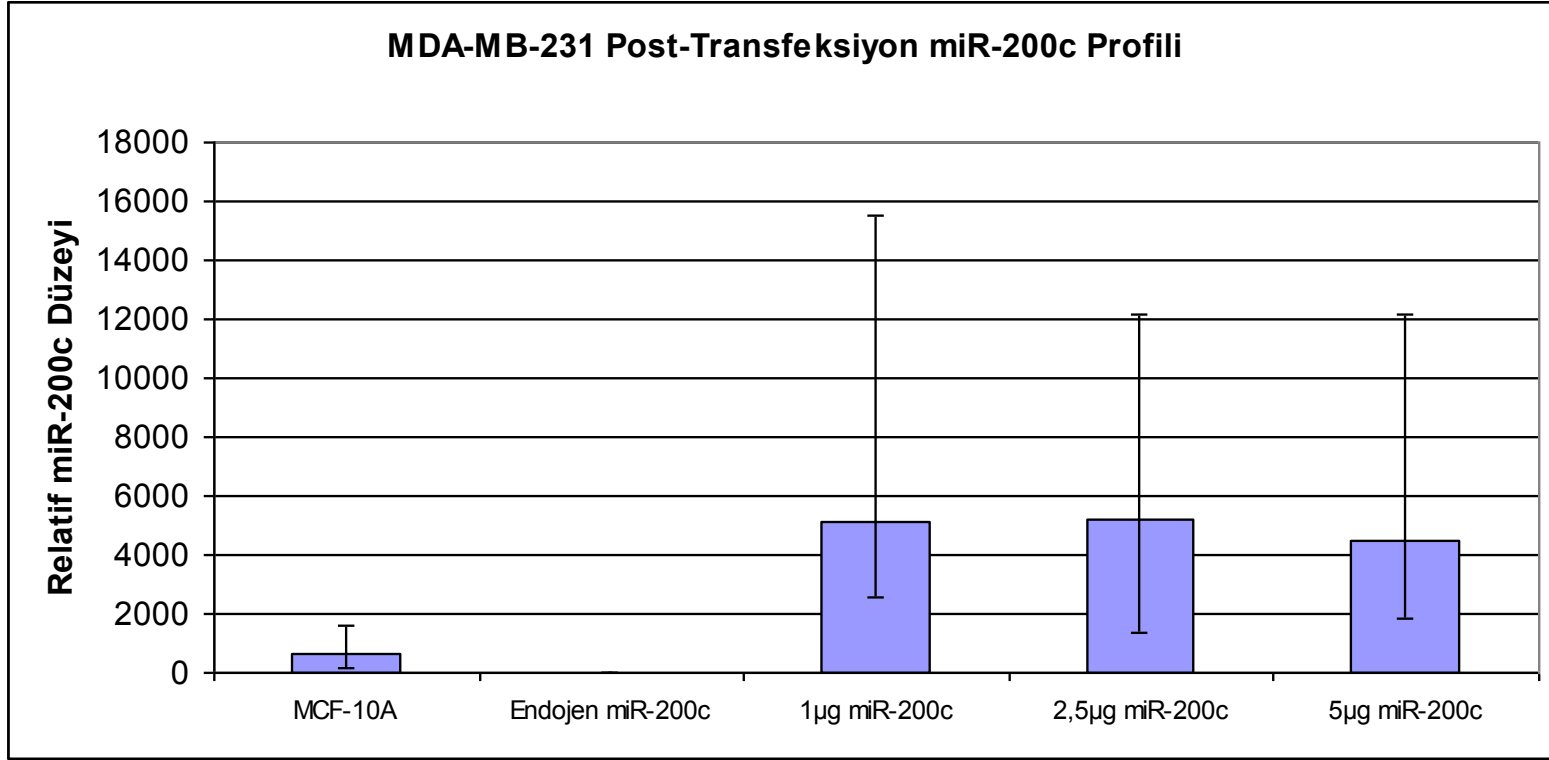
MDA-MB-231 hücre hattında Şekil 6.10.'da görüldüğü gibi 2,5µg kitozan/miR-200c transfeksiyonu miR-200c seviyesini 5137 kat artırmıştır ve MCF-10A'ya göre 7.7 kat miR-200c'yi upregüle etmiştir. 5µg formülasyona göre 1.1 kat miR-200c seviyesi azalmıştır, ancak standart hata aynı oranda yüksektir.

MDA-MB-435 hücre hattında 2,5µg kitozan/miR-141 transfeksiyonu miR-141 seviyesini 259 kat artırdığı ve MCF-10A'ya göre 35 kat upregüle ettiği gözlenmiştir. 5µg kitozan/miR-141 transfeksiyonuna göre 1.2 kat miRNA miktarı azalmıştır. 1µg kitozan/miR-141 transfeksiyonunun ise miR-141 seviyesini 46 kat artırdığı ve MCF-10A'ya göre 6.2 kat upregüle ettiği gözlenmiştir (Şekil 6.10.).

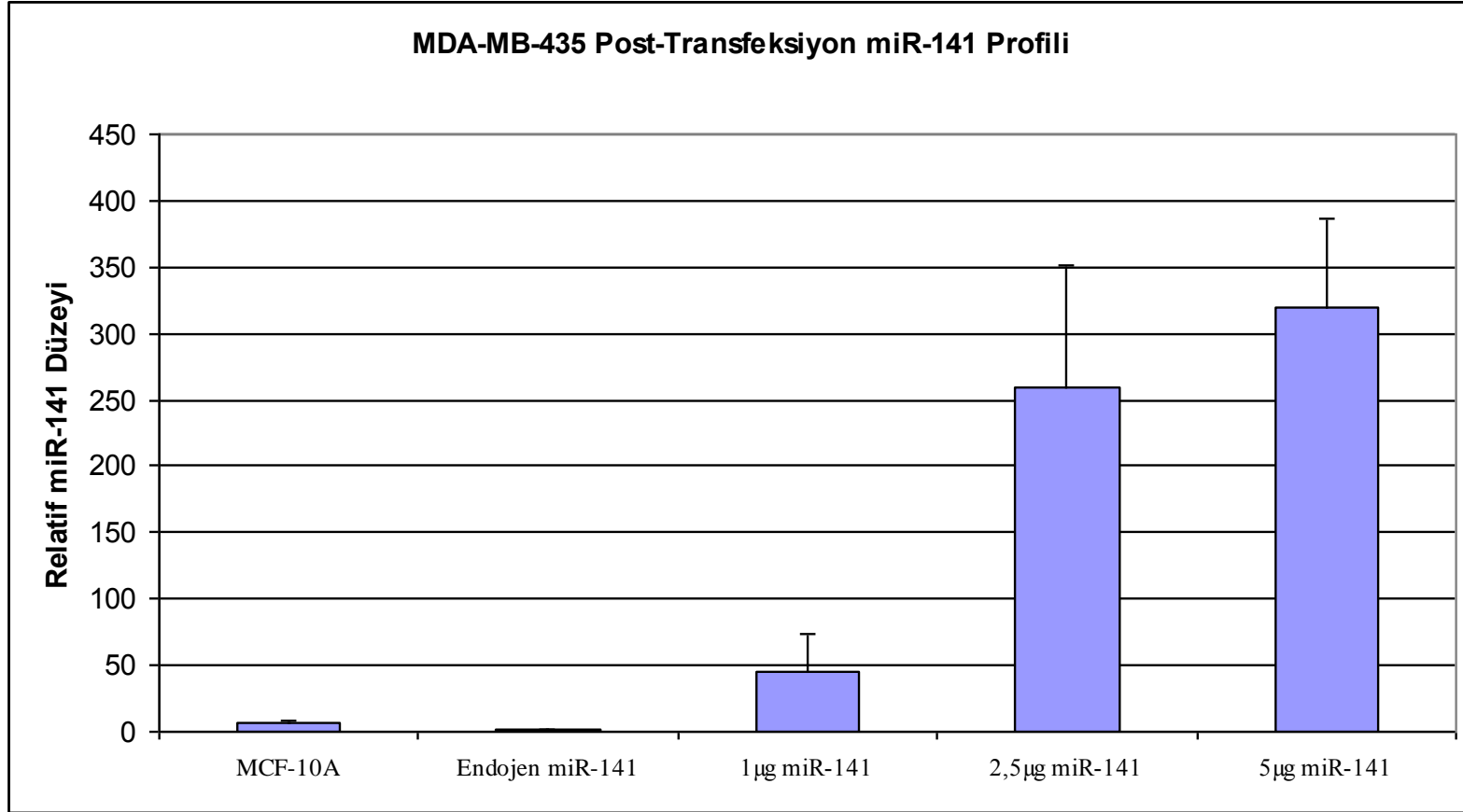
MDA-MB-435 hücre hattında 2,5µg kitozan/miR-200c transfeksiyonunun miR-200c düzeyini 9348 kat artırdığı ve 1µg kitozan/miR-200c transfeksiyonunun ise 14802 kat artırdığı gözlenmiştir. MDA-MB-435 hücre hattında 2,5µg doz çalışmasındaki bulgulara göre, transfeksiyon sonrası miR-200c seviyesi MCF-10A endojen miR-200c seviyesinden daha düşük olduğu, ancak 1 µg doz çalışmasında ise 1.2 kat fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.10.).



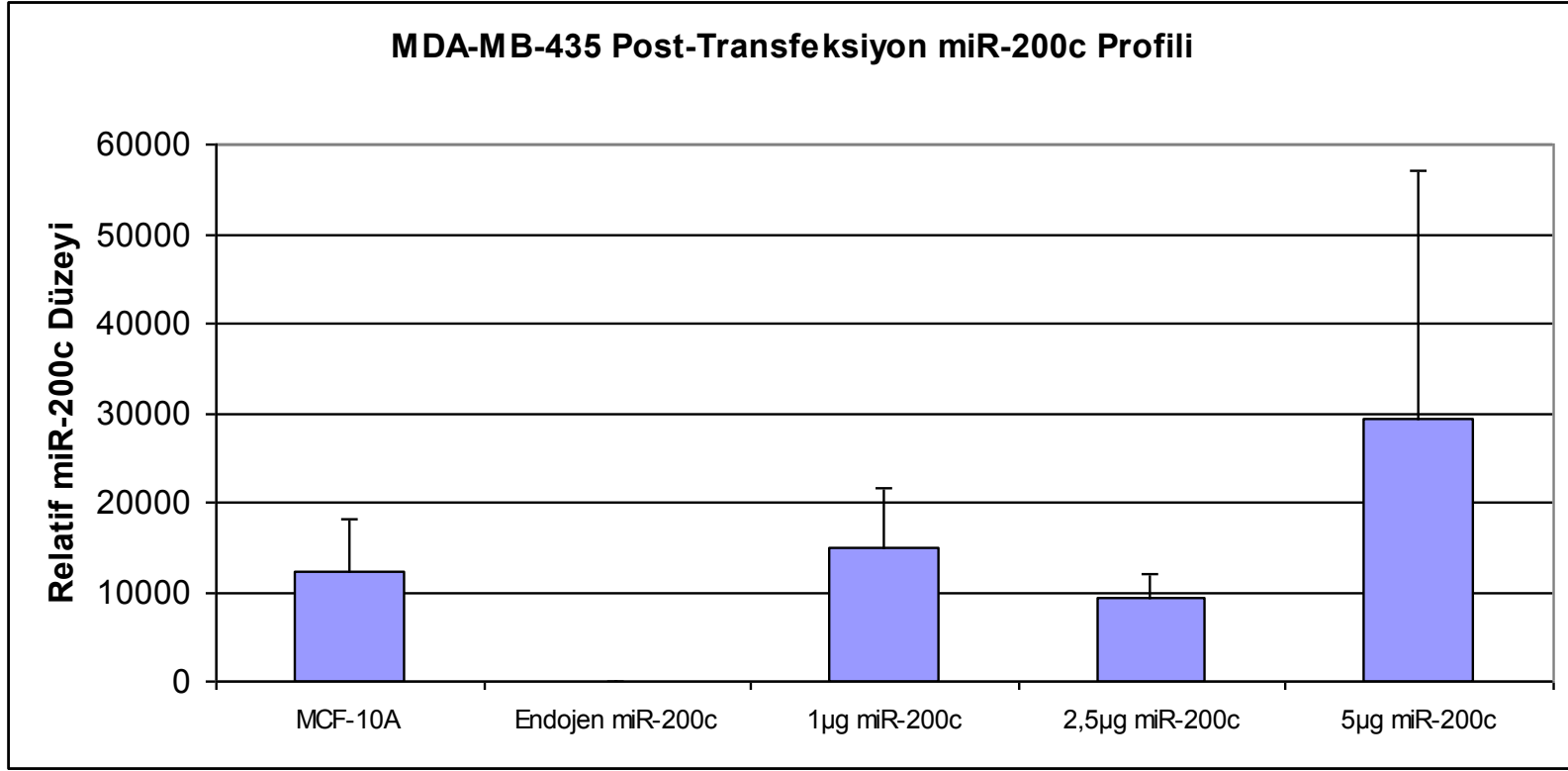
Şekil 6.7. 1-2,5µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-231 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili (n=2)



Şekil 6.8. 1-2,5µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA -MB-231 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili (n=2)



Şekil 6.9. 1-2,5µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-435 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili (n=2)



Şekil 6.10. 1-2,5µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-435 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili (n=2)

MDA-MB-231 ve MDA-MB-435 kanser hücre hatlarında yapılan 2,5µg ve 1µg ikinci doz çalışmalarında da MCF-10A miR-141 ve miR-200c seviyelerine göre transfeksiyonun kanser hücre hatlarındaki miRNA seviyelerini upregüle ettiği tespit edilmiştir. Bu nedenle kanser hücre hatları miR-141 ve miR-200c seviyelerini MCF-10A sağlıklı hücre hattına göre normalize eden doz miktarını bulmak için üçüncü doz çalışması yapılmıştır.

Üçüncü doz çalışması için; MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miR-141 (2/0,1µg ve 4/0,2µg) ve kitozan/miR-200c (2/0,1µg ve 4/0,2µg) transfeksiyonu yapıldı. MDA-MB-435 hücre hattında kitozan/miR-141 (2/0,1, 3/0,15 ve 4/0,2) ve kitozan/miR-200c (10/0,5, 15/0,75 ve 16/0,8) transfeksiyonu yapıldı. Üçüncü doz çalışmasına ilişkin bulgular Şekil 6.11., 6.12., 6.13. ve 6.14.'de verilmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattında miR-141 seviyesini normalize etmek için yapılan tüm çalışmalar ele alındığında 100ng miR-141 içeren kitozanla kompleks formülasyonunun miR-141 seviyesini normal seviyeye getirdiği tespit edilmiştir (Şekil 6.11.). miR-200'lerin etkili olduğu yolaklardaki önemli protein seviyelerini belirlemek için yapılan tayinler için tüm doz çalışmaları ele alındı ve bu tayinler MDA-MB-231 hücre hattında downregüle olan miR-141 seviyesini normalize eden 100ng formülasyonla yapıldı.

MDA-MB-231 hücre hattında miR-200c seviyesini normalize etmek için yapılan tüm çalışmalar ele alındı. Şekil 6.12.'de görüldüğü gibi 100ng miR-200c içeren kitozanla kompleks formülasyonunun miR-200c seviyesini normal seviyeye getirdiği tespit edildi. miR-200'lerin etkili olduğu yolaklardaki önemli protein seviyelerini belirlemek için yapılan tayinler MDA-MB-231 hücre hattında downregüle olan miR-200c seviyesini normalize eden 100ng formülasyonla yapıldı.

MDA-MB-435 hücre hattında miR-141 seviyesini normalize etmek için yapılan tüm çalışmalar ele alındı. Şekil 6.13.'de görüldüğü gibi 150ng miR-141 içeren kitozanla kompleks formülasyonunun miR-141 seviyesini normal seviyeye getirdiği tespit edildi. miR-200'lerin etkili olduğu yolaklardaki önemli protein seviyelerini

belirlemek için yapılan tayinler MDA-MB-435 hücre hattında downregüle olan miR-141 seviyesini normalize eden 150ng formülasyonla yapıldı.

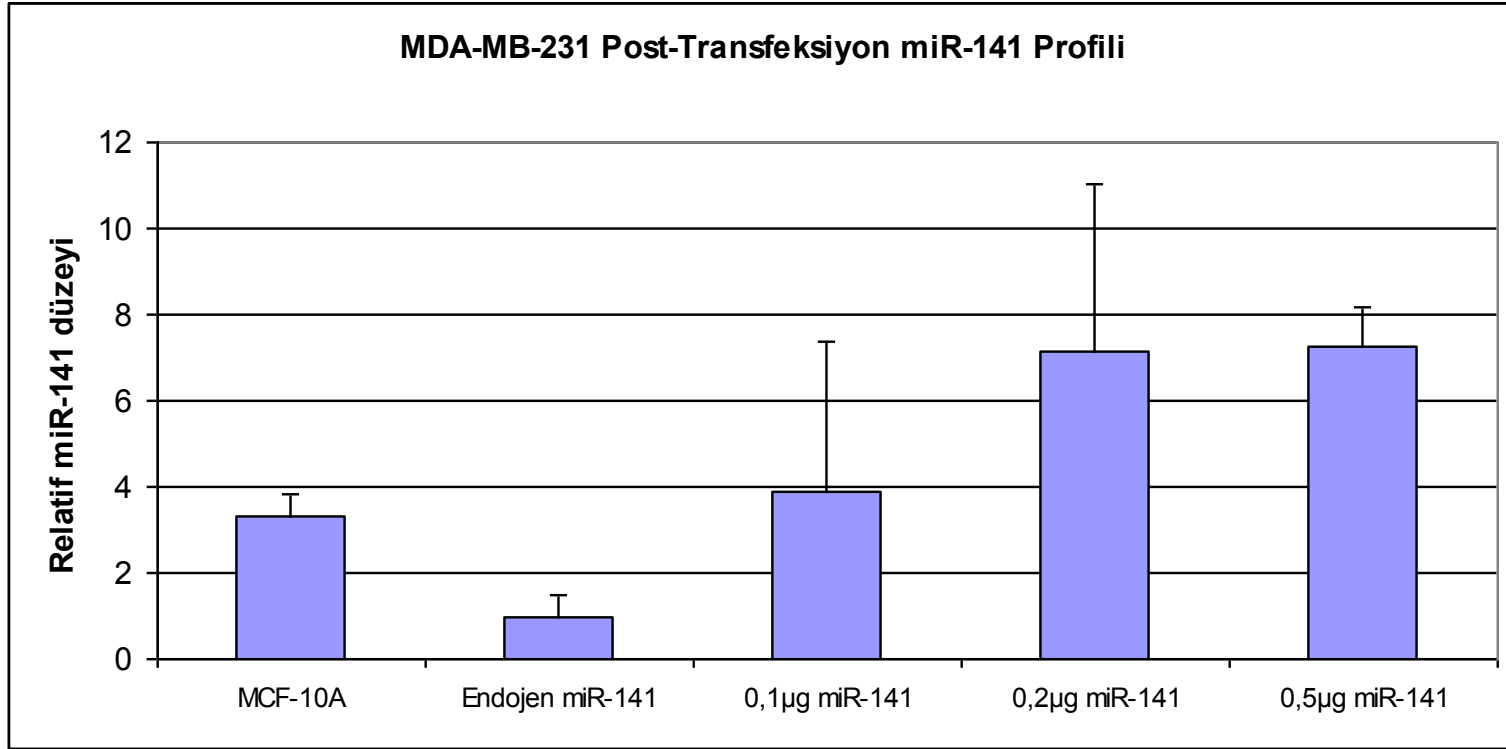
MDA-MB-435 hücre hattında miR-200c seviyesini normalize etmek için yapılan tüm çalışmalar ele alındı. 750ng miR-200c ile hazırlanan kitozan/miR-200c kompleks formülasyonunun miR-200c seviyesini normal seviyeye getirdiği tespit edildi. miR-200'lerin etkili olduğu yolaklardaki önemli protein seviyelerini belirlemek için yapılan tayinler MDA-MB-435 hücre hattında downregüle olan miR-200c seviyesini normalize eden 750ng formülasyonla yapıldı (Şekil 6.14.)

Bulgular 6.3.1'de belirtildiği gibi MCF-7 hücre hattında endojen miR-141 seviyesi sağlıklı meme hücre hattı ile aynı seviyede iken miR-200c %60 downregüle olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle miRNA mimikleri ile yerine koyma tedavisi downregüle olan miR-200c ile yapılmıştır. MCF-7 hücre hattında iki farklı doz çalışması yapıldı. İlk doz çalışmasında 0,1 ve 1µg miR-200c ile hazırlanan kitozan/miR-200c transfeksiyonu yapıldı ve RT-PCR ile miR-200c seviyesi profilendi. İki doz çalışmasına ait birleştirilmiş bulgular Şekil 6.15.'de verilmiştir (Şekil 6.15.)

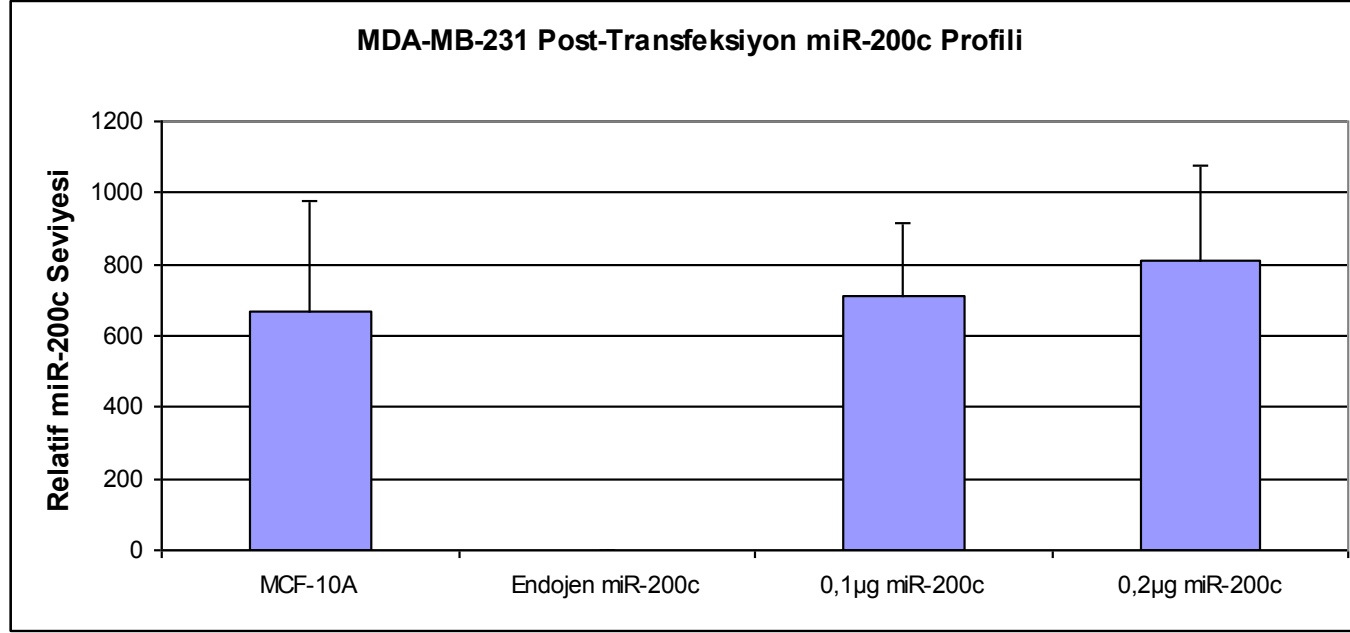
İlk doz çalışmasında 1µg formülasyon endojen miR-200c seviyesini 2.8 kat artırdığı ve MCF-10A'ya göre standart sapması yüksek olmakla beraber 1.3 kat upregüle ettiği tespit edilmiştir. 0,1µg formülasyon ise standart sapma da göz önüne alındığında fark gözlenmemiştir.

İkinci doz çalışması 0,1 ve 1µg doz çalışması bulguları göz önüne alınarak 0,5 ve 0,75µg miR-200c ile hazırlanan kitozan/miR-200c ile yapıldı.

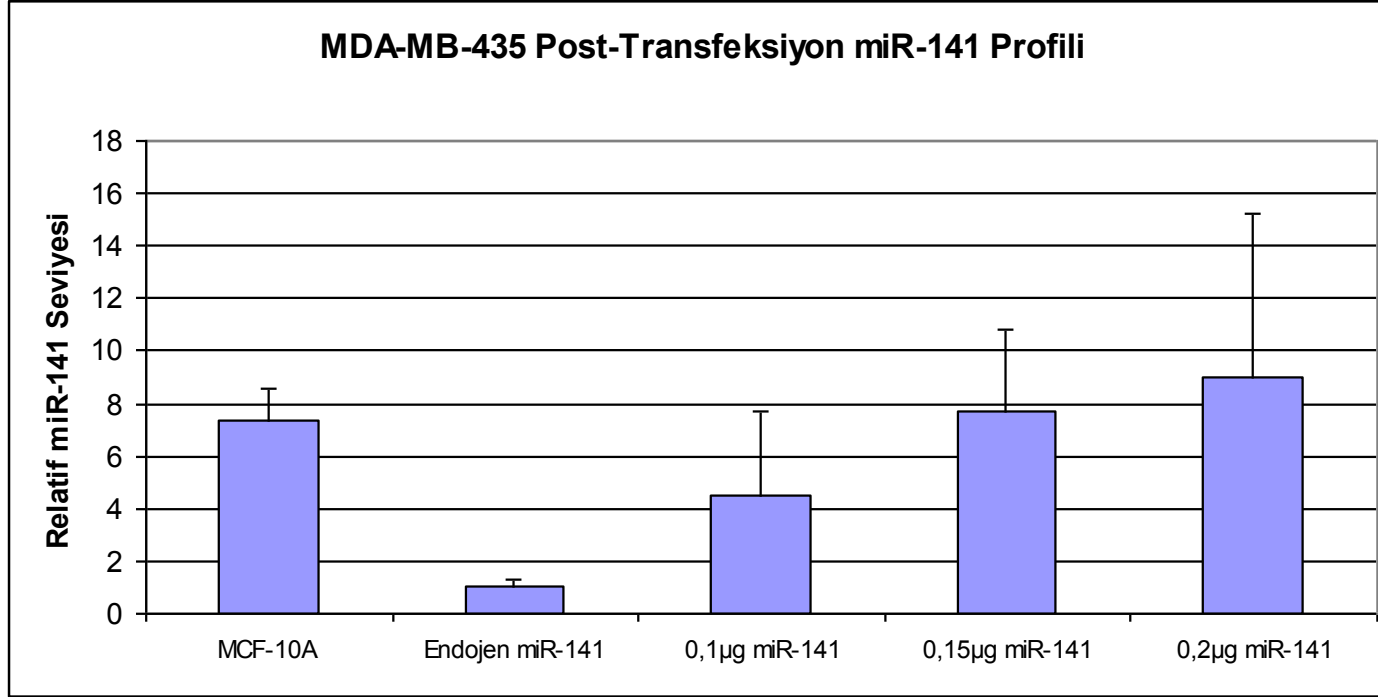
MCF-7 hücre hattında miR-200c seviyesini normalize etmek için yapılan tüm çalışmalar ele alındı. 750ng miR-200c içeren kitozan/miR-200c formülasyonunun miR-200c seviyesini normal seviyeye getirdiği tespit edildi. miR-200'lerin etkili olduğu yolaklardaki önemli protein seviyelerini belirlemek için yapılan tayinler MCF-7 hücre hattında downregüle olan miR-200c seviyesini normalize eden 750ng formülasyonla yapıldı (Şekil 6.15.)



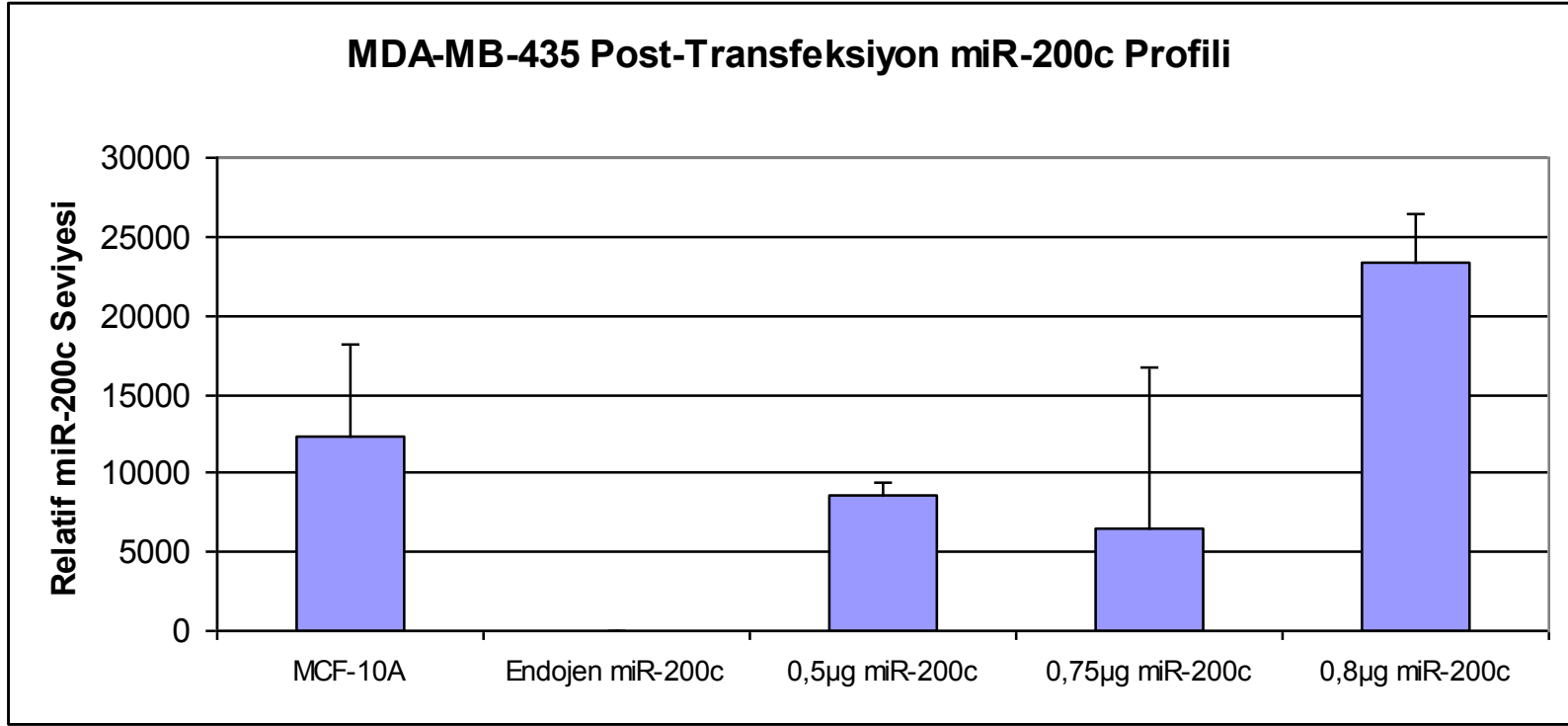
Şekil 6.11. 0,1 ve 0,2 µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-231 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili (n=2)



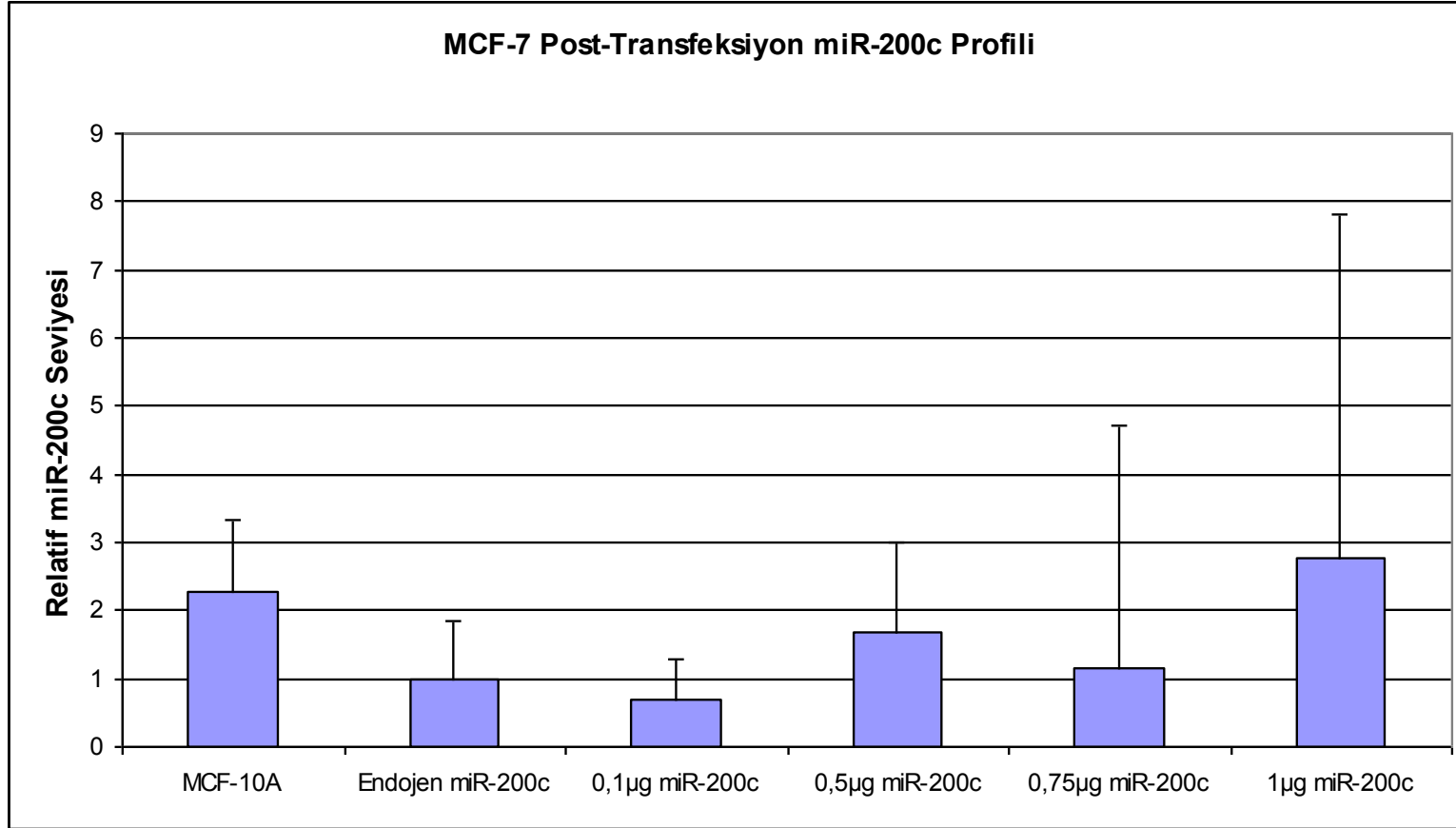
Şekil 6.12. 0,1 ve 0,2µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-231 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili (n=2)



Şekil 6.13. 0,1, 0,15 ve 0,2µg miR-141 ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-435 Hücre Hattında miR-141 Ekspresyon Profili (n=2)



Şekil 6.14. 0,5, 0,75 ve 0,8µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MDA-MB-435 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili (n=2)



Şekil 6.15. 0,1-0,5-0,75-1µg miR-200c ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyonu sonrası MCF-7 Hücre Hattında miR-200c Ekspresyon Profili (n=2)

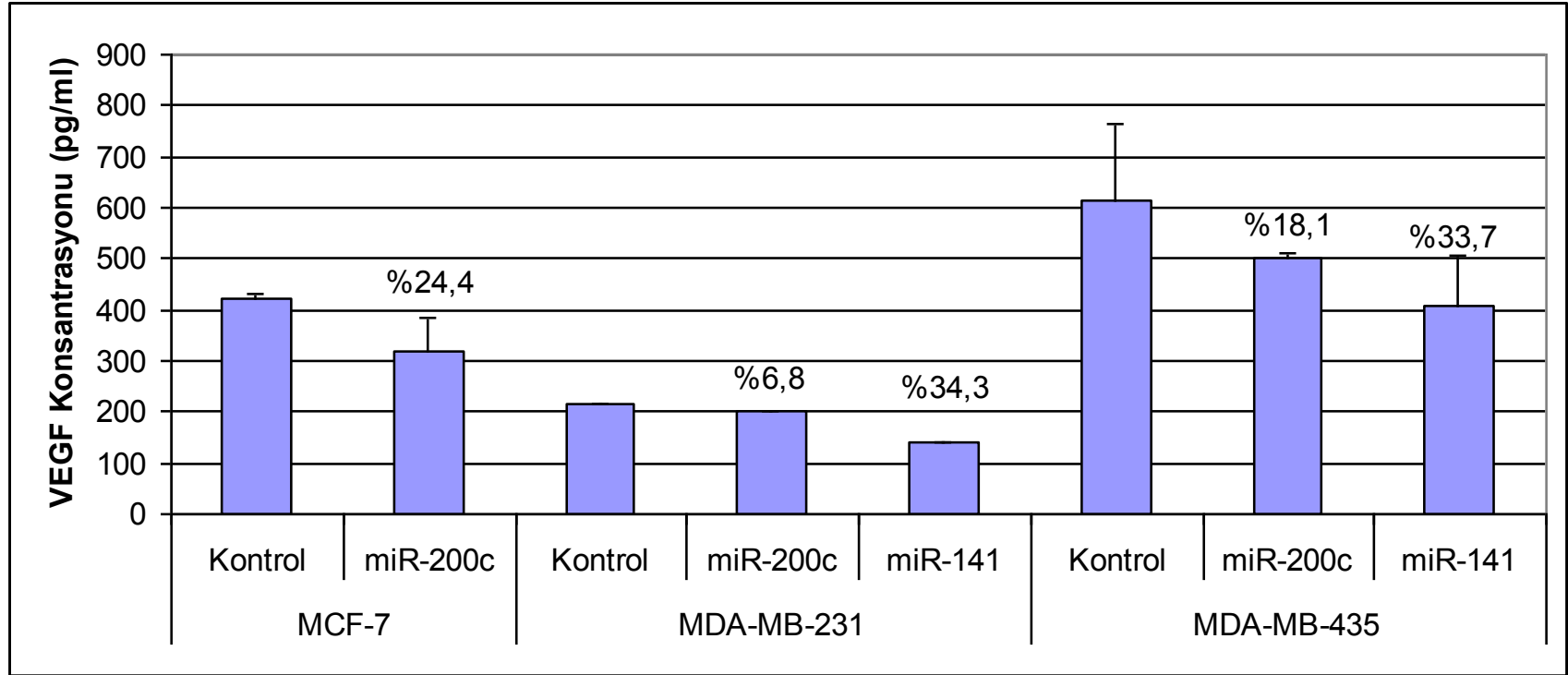
Yapılan tüm doz çalışmaları ele alınarak kanser hücre hatlarında downregüle olan miR-200c ve miR-141 seviyesini, sağlıklı meme hücre hattı olan MCF-10A'daki endojen miRNA seviyesine getiren doz miktarları belirlendi. Buna göre; 6 kuyucuklu plâtelere yapılan çalışmalar için, MDA-MB-231 hücre hattında miR-141 seviyesi 200ng miR-141 mimikleri ile ve miR-200c seviyesi 100 ng miR-200c mimikleri ile hazırlanan kitozan kompleks formülasyonu ile normalize olduğu belirlendi. MDA-MB-435 hücre hattı için miR-141 seviyesi 150 ng miR-141 mimikleri ile ve miR-200c seviyesi 700 ng miR-200c mimikleri ile hazırlanmış kitozan kompleksleri ile normal miR-200c ve miR-141 seviyesi sağlandığı gözlemlendi. MCF-7 hücre hattında ise miR-141 seviyesi sağlıklı hücre hattı MCF-10A miR-141 seviyesine yakın olduğu için çalışılmazken, miR-200c seviyesi 750 ng miR-200c mimikleri ile hazırlanan kitozan/miR-200c formülasyonu ile normalize edildiği tespit edilmiştir.

6.4. Protein Ekspresyonunun ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Bulgular

6.4.1. VEGF'in ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Bulgular

Kanser hücre hatlarında kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 transfeksiyon sonrası hücrelerdeki VEGF miktarını ölçmek amacıyla yöntem 5.2.4.'de belirtildiği gibi ELISA tayini yapıldı.

Yapılan ELISA tayini sonucunda, MCF-7 hücre hattında kitozan/miR200c transfeksiyon sonrası VEGF %24,4 oranında, MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miR200c ve kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrası VEGF'i sırasıyla %6,8 ve %34,3 oranında baskıladığı ve MDA-MB-435 hücre hattında kitozan/miR200c ve kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrasında VEGF seviyesinin sırasıyla %18,1 ve %33,7 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (**Şekil 6.16**).



Şekil 6.16. Tedavi öncesi ve sonrası arasında VEGF ekspresyonunun karşılaştırılması (n=3)

6.4.2. E-kaderin'in ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Bulgular

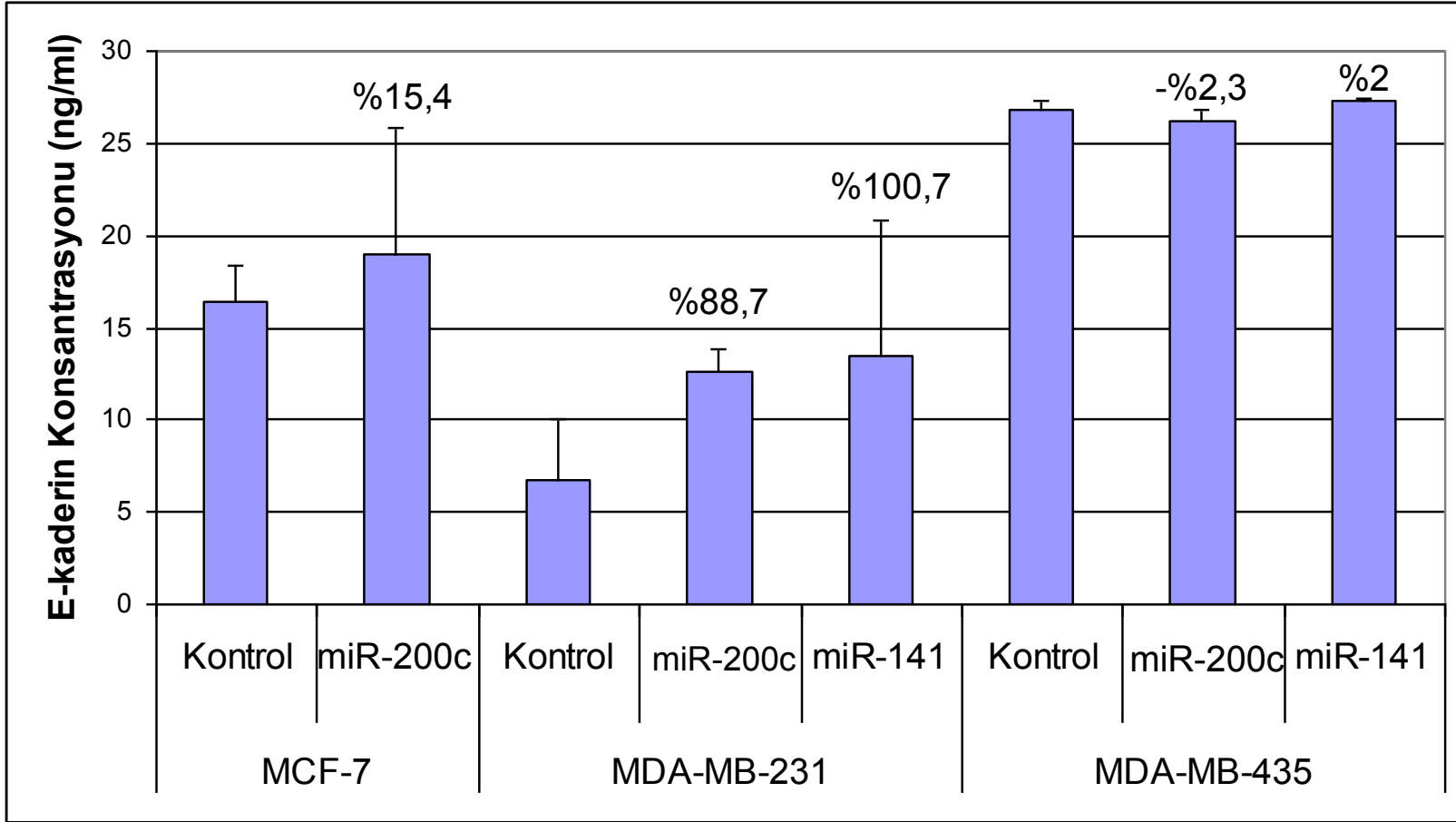
Kanser hücre hatlarında kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 transfeksiyon sonrası hücrelerdeki E-kaderin miktarını ölçmek amacıyla yöntem 5.2.4.'de belirtildiği gibi ELISA yöntemi kullanılarak tayini yapıldı.

Yapılan ELISA tayini sonucunda, MCF-7 hücre hattında kitozan/miR200c transfeksiyonu sonrası E-kaderin %15,4 oranında arttığı gözlemlendi, MDA-MB-231 hücre hattında/miR200c ve kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrasında E-kaderin seviyesinin sırasıyla %88,7 ve %100,7 oranında kanser hücre hattına göre daha fazla olduğu ve MDA-MB-435 hücre hattında kitozan/miR200c ve kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrasında E-kaderin seviyesinin sırasıyla %2,3 azaldığı ve %2 arttığı tespit edilmiştir (**Şekil 6.17**).

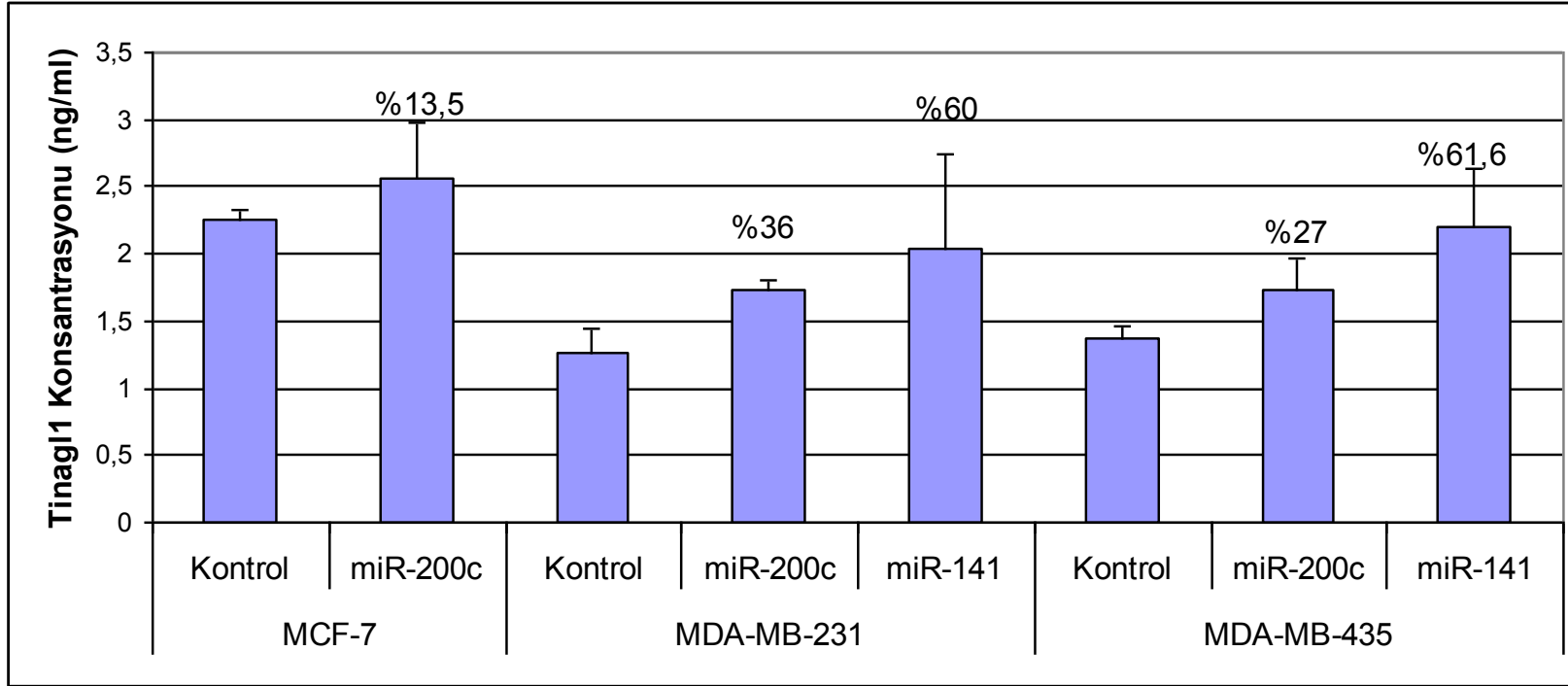
6.4.3. Tinagl1'in ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Bulgular

Kanser hücre hatlarında kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 transfeksiyon sonrası hücrelerdeki Tinagl1 miktarını ölçmek amacıyla yöntem 5.2.4.'de belirtildiği gibi ELISA yöntemi kullanılarak tayini yapıldı.

Yapılan ELISA tayini sonucunda, MCF-7 hücre hattında kitozan/miR200c transfeksiyonu sonrası ve tümör kontrol grubunda Tinagl-1 protein miktarı kıyaslandığında Tinagl-1 protein miktarının %13,5 oranında arttığı gözlemlendi. MDA-MB-231 hücre hattında Tinagl1 seviyesi kitozan/miR-200c transfeksiyonu sonrasında %36 arttığı ve kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrasında %60 arttığı tespit edildi. MDA-MB-435 hücre hattında da Tinagl1 seviyesi kitozan/miR-200c transfeksiyonu sonrasında %27 arttığı ve kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrasında %61,6 arttığı gözlemlenmiştir (**Şekil 6.18**).



Şekil 6.17. Tümör hücrelerinde tedavi öncesi ve sonrası arasında E-kaderin ekspresyonunun karşılaştırılması (n=3)



Şekil 6.18. Tümör hücrelerinde tedavi öncesi ve sonrası arasında Tinagl1 ekspresyonunun karşılaştırılması (n=3)

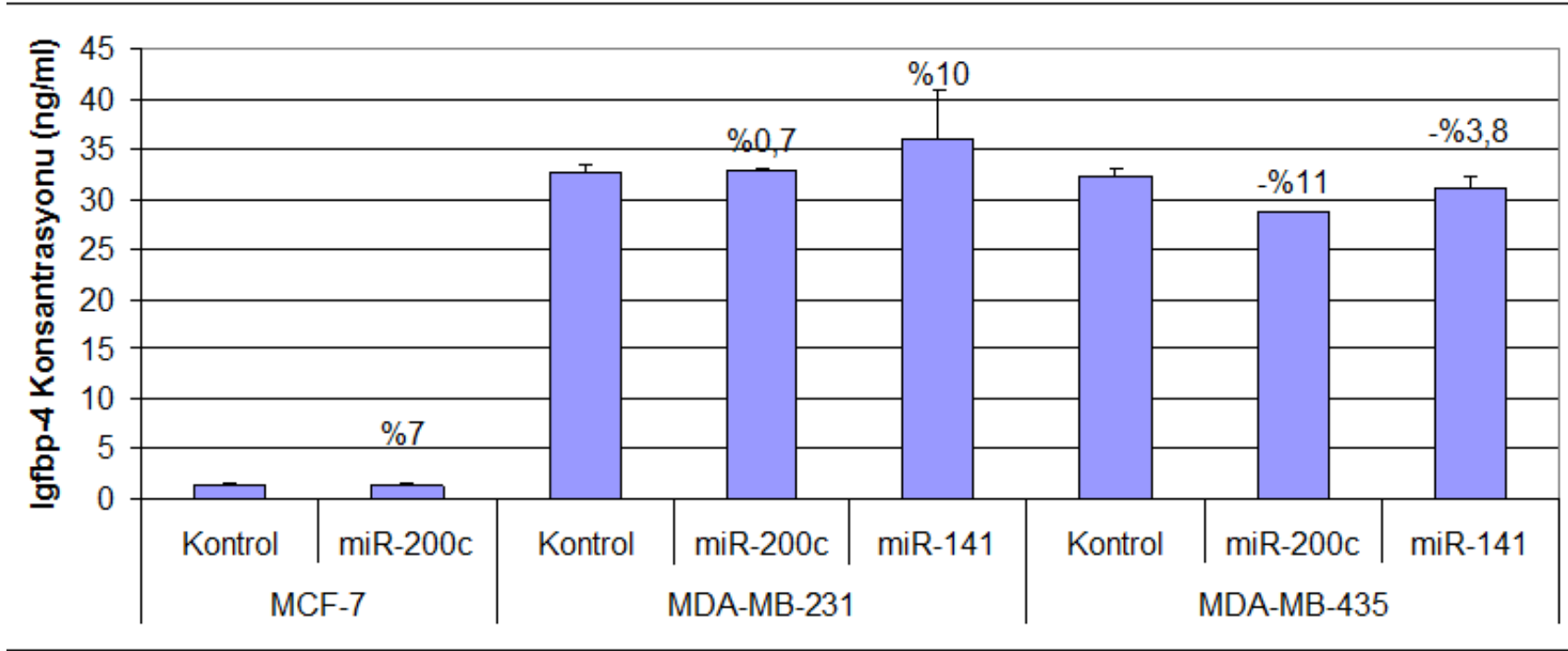
6.4.4. Igfbp-4'ün ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Bulgular

Kanser hücre hatlarında kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 transfeksiyon sonrası hücrelerdeki Igfbp-4 miktarını ölçmek amacıyla yöntem 5.2.4.'de belirtildiği gibi ELISA yöntemi kullanılarak tayini yapıldı.

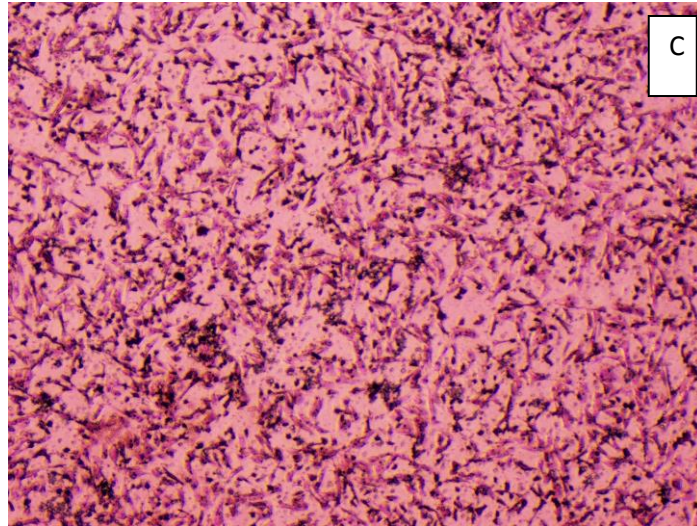
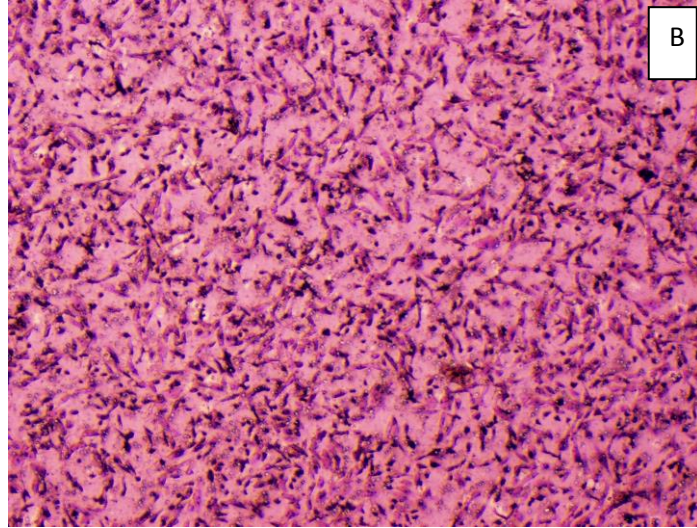
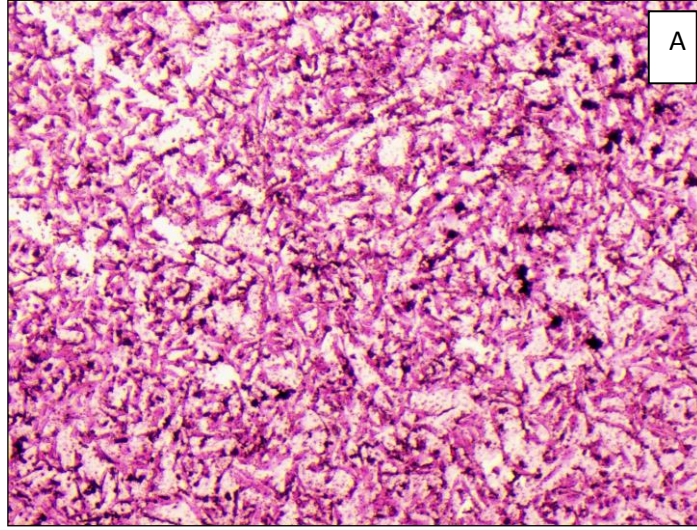
Yapılan ELISA tayini sonucunda, MCF-7 hücre hattında kitozan/miR200c transfeksiyonu sonrasında ve tümör kontrol grubunda Igfbp-4 protein miktarı kıyaslandığında Igfbp-4 protein miktarının %7 oranında arttığı gözlemlendi. MDA-MB-231 hücre hattında Igfbp-4 seviyesi kitozan/miR-200c transfeksiyonu sonrasında %0,7 arttığı ve kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrasında %10 arttığı tespit edildi. MDA-MB-435 hücre hattında da Igfbp-4 seviyesi kitozan/miR-200c transfeksiyonu sonrasında %11 azaldığı ve kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrasında ise %3,8 azaldığı tespit edilmiştir (**Şekil 6.19**).

6.5. İnvazyon Yöntemine İlişkin Bulgular

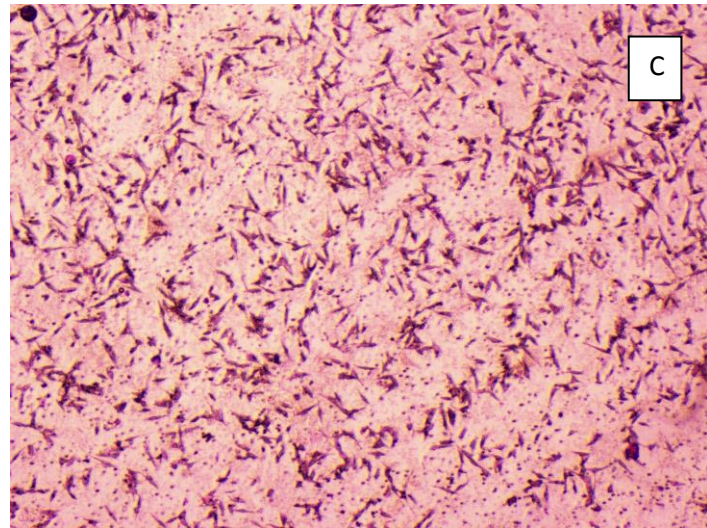
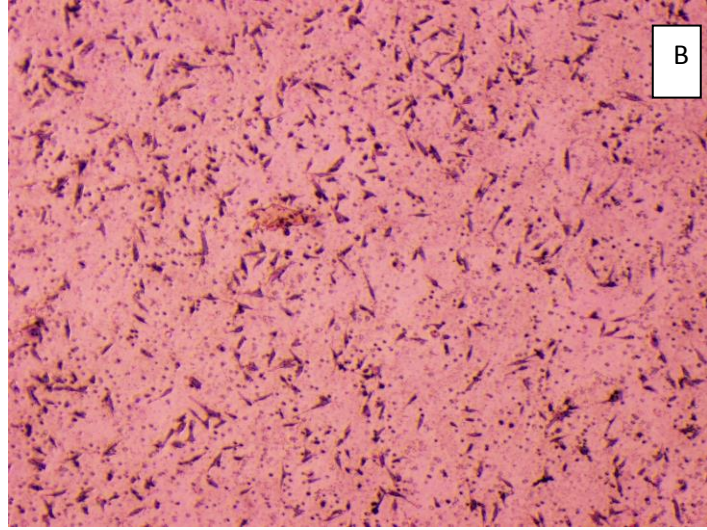
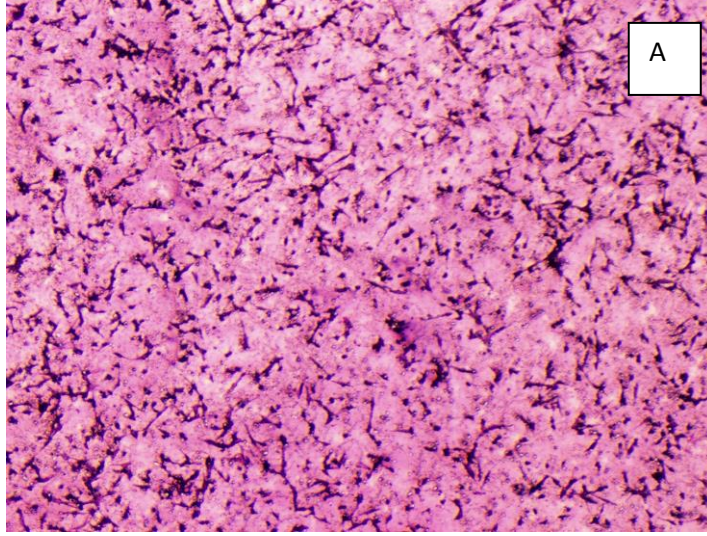
İnvazyon testi yöntem 5.2.8.'de belirtildiği şekilde yapıldı. Tümör kontrol grubu, kitozan/miR-141 ve kitozan miR-200c kompleksleri için 1×10^5 hücre/insert olacak şekilde DMEM besiyeri ile süspande edilerek, 8 µm por filtreye sahip insertlere ekim yapıldı. Hücreler tutunduktan sonra besiyeri kaldırıldı ve 1 ml serum free besiyeri içerisinde kompleksler süspande edildi ve insete eklendi. 24 saat sonra %4 Paraformaldehit (PFA) ile fiksasyon ve giemsa ile boyanmasının ardından hücre hatlarında invazyon bulgularına ait görüntüler Resim 6.18.ve 6.19.'da verilmiştir.



Şekil 6.19. Tümör hücrelerinde tedavi öncesi ve sonrası arasında Igfbp-4 ekspresyonunun karşılaştırılması (n=3)



Resim 6.18. A-MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonu, B-MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrası invazyonu, C-MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miR-200c transfeksiyonu sonrası invazyonu. X10 büyütme



Resim 6.19. A- MDA-MB-435 hücrelerinin invazyonu, B- MDA-MB-435 hücre hattında kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrası invazyonu, C- MDA-MB-435 hücre hattında kitozan/miR-200c transfeksiyonu sonrası invazyonu. X10 büyütme

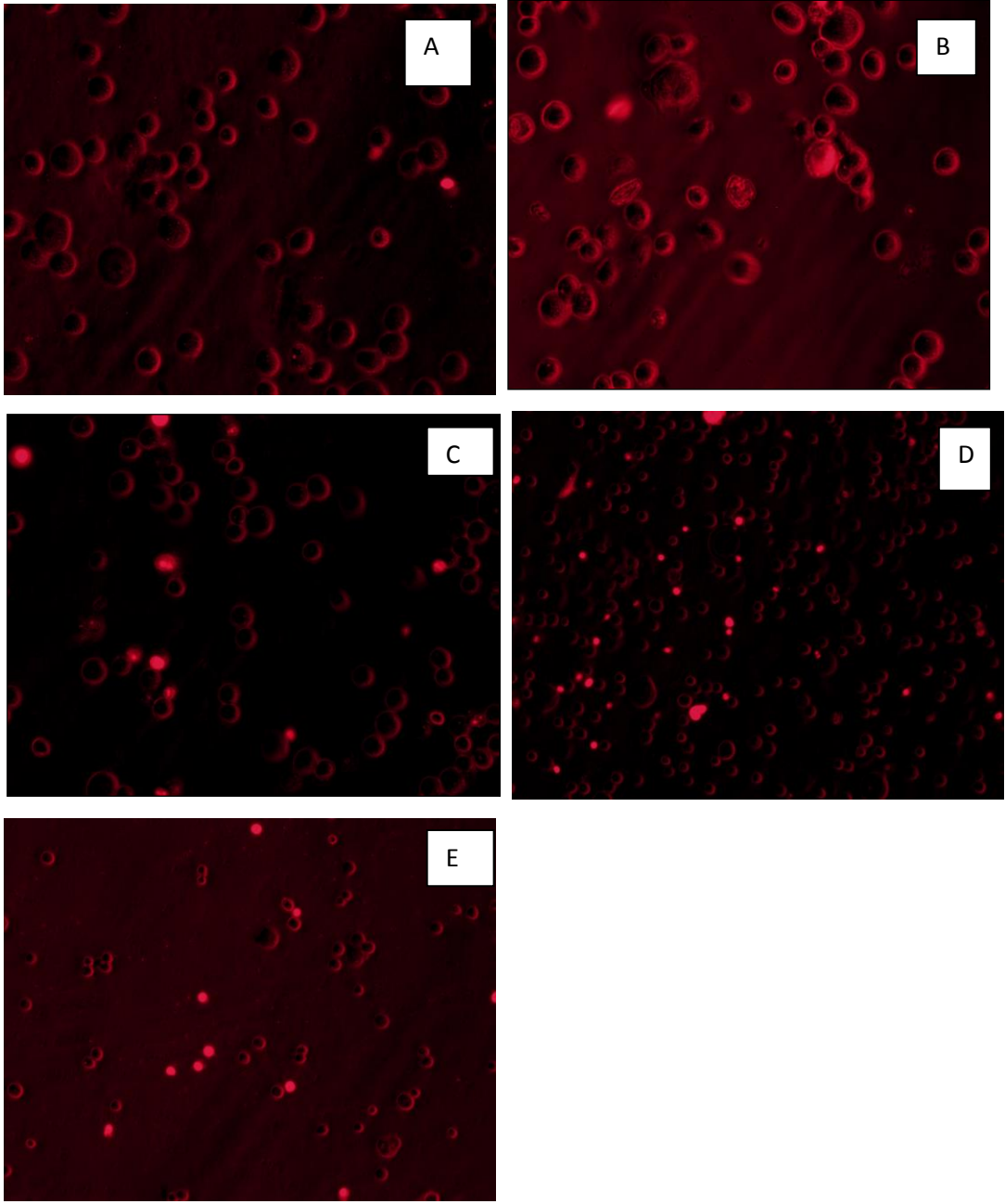
İnvazyon çalışması bulgularına göre, MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miR-200c uygulama sonrası invazyon %35,6 ve kitozan/miR-141 uygulama sonrası invazyon % 40,5 oranında azaldığı görülmüştür (Şekil 6.18.). MDA-MB-435 hücre hattında ise kitozan/miR-200c uygulama sonrası invazyonun %15,2 ve kitozan/miR-141 uygulama sonrası invazyonun %56,2 oranında inhibe olduğu tespit edilmiştir. MDA-MB-435 hücre hattında kitozan/miR-200c uygulaması sonrasındaki invazyondaki inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Fakat MDA-MB-435 hücre hattı ve kitozan/miR-141 uygulaması ve MDA-MB-231 hücre hattı ve kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 uygulaması aralarındaki fark istatistiksel olarak ileri derece anlamlıdır ($p<0,01$).

Tablo 6.6. İnvazyon bulgularına ilişkin istatistiksel bulgular

İNVAZYON				
	MDA-MB-231 Pozitif Kontrol	MDA-MB-231 miR-200c	MDA-MB-435 Pozitif Kontrol	MDA-MB-435 miR-200c
MDA-MB-231 miR-200c	$p>0,05$	-	-	-
MDA-MB-231 miR-141	$p<0,05$	$p<0,05$	-	-
MDA-MB-435 miR-200c	-	-	$p<0,05$	-
MDA-MB-435 miR-141	-	-	$p<0,05$	$p>0,05$

6.6. Apoptoz Çalışmasına İlişkin Bulgular

Apoptoz çalışması yöntem 5.2.6.'da belirtildiği şekilde yapıldı. Apoptoz çalışması sonrası her hücre hattı için ayrı floresan mikroskobu görüntüleri Resim 6.20'de verilmiştir.

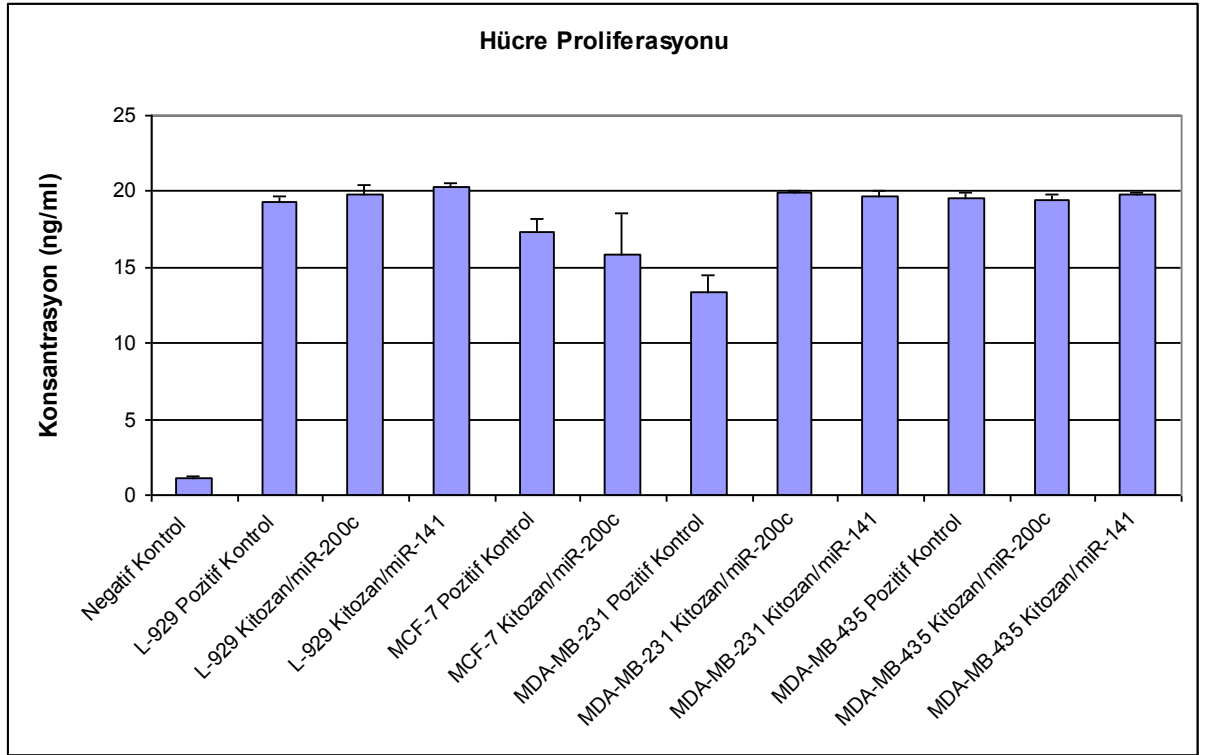


Resim 6.20. Apoptoz bulgularına ait resimler. A-MCF-7-Kitozan/miR-200c, B-MDA-MB-231-Kitozan/miR-200c, C-MDA-MB-231-Kitozan/miR-141, D-MDA-MB-435-Kitozan/miR-200c, E-MDA-MB-435-Kitozan/miR-141

Kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 transfeksiyonu sonrasında apoptotik hücre belirlenmedi.

6.7. Hücre Proliferasyon Çalışmasına İlişkin Bulgular

Sağlıklı hücre hattı (L-929) ve kanserli hücre hatlarında (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435) yapılan hücre proliferasyon çalışması WST-1 ajanı kullanılarak yöntem 11’de belirtildiği gibi yapıldı. Hücre proliferasyon çalışmasına ait bulgular Şekil 6.20.’de verilmiştir.



Şekil 6.20. Sağlıklı ve Kanser hücre hatlarında yapılan hücre proliferasyon çalışması

Hücre proliferasyon bulgularına göre, sağlıklı hücre hattı; L929 fare fibroblast hücresinde kitozan/miR-200 formülasyonu pozitif kontrole göre değişmediği, ancak kitozan/miR-141 formülasyonunun proliferasyonu artırdığı tespit edilmiştir. MCF-7 hücre hattına uygulanan kitozan/miR-200c formülasyonunun hücre proliferasyonunu kontrole göre değiştirmedeği gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 formülasyonları kontrole göre hücre proliferasyonunu artırırken, MDA-MB-435 hücre hattında kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 formülasyonları uygulandığında kontrole karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunun değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 6.20.).

6.8. İstatistiksel Değerlendirme

Yöntem 5.2.8’de belirtildiği gibi Student t-test kullanılarak yapıldı.

Tablo 6.7. MDA-MB-231 Hücre Hattında 5µg miR-141 Doz Çalışması

MDA-MB-231 Hücre Hattında 5µg miR-141 Doz Çalışması						
	MCF-10A	Endojen	K/miR-141 (5µg)	Negatif K.	Beraber	Serbest miR-141
MCF-10A	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
K/miR-141 (5µg)	-	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Negatif K.	-	-	-	-	p<0,05	p<0,05
Beraber	-	-	-	-	-	p<0,05
Serbest miR-141	-	-	-	-	-	-

Tablo 6.8. MDA-MB-231 Hücre Hattında 5µg miR-200c Doz Çalışması

MDA-MB-231 Hücre Hattında 5µg miR-200c Doz Çalışması						
	MCF-10A	Endojen	K/miR-200c (5µg)	Negatif K.	Beraber	Serbest miR-200c
MCF-10A	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
K/miR-200c (5µg)	-	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Negatif K.	-	-	-	-	p<0,05	p<0,05
Beraber	-	-	-	-	-	p<0,05
Serbest miR-200c	-	-	-	-	-	-

Tablo 6.9. MDA-MB-435 Hücre Hattında 5µg miR-141 Doz Çalışması

MDA-MB-435 Hücre Hattında 5µg miR-141 Doz Çalışması						
	MCF-10A	Endojen	K/miR-141 (5µg)	Negatif K.	Beraber	Serbest miR-141
MCF-10A	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
K/miR-141 (5µg)	-	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Negatif K.	-	-	-	-	p<0,05	p<0,05
Beraber	-	-	-	-	-	p<0,05
Serbest miR-141	-	-	-	-	-	-

Tablo 6.10. MDA-MB-435 Hücre Hattında 5µg miR-200c Doz Çalışması

MDA-MB-435 Hücre Hattında 5µg miR-200c Doz Çalışması						
	MCF-10A	Endojen	K/miR-200c (5µg)	Negatif K.	Beraber	Serbest miR-200c
MCF-10A	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
K/miR-200c (5µg)	-	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Negatif K.	-	-	-	-	p<0,05	p<0,05
Beraber	-	-	-	-	-	p<0,05
Serbest miR-200c	-	-	-	-	-	-

Tablo 6.11. MDA-MB-231 Hücre Hattında 2. Doz Çalışması

MDA-MB-231 Hücre Hattında Doz Çalışması					
	MCF-10A	Endojen	K/miR-141 (1µg)	K/miR-141 (2,5µg)	K/miR-141 (5µg)
MCF-10A	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
K/miR-141 (1µg)	-	-	-	p<0,05	p>0,05
K/miR-141 (2,5µg)	-	-	-	-	p<0,05
K/miR-141 (5µg)	-	-	-	-	-
MDA-MB-231 Hücre Hattında Doz Çalışması					
	MCF-10A	Endojen	K/miR-200c (1µg)	K/miR-200c (2,5µg)	K/miR-200c (5µg)
MCF-10A	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
K/miR-200c (1µg)	-	-	-	p>0,05	p>0,05
K/miR-200c (2,5µg)	-	-	-	-	p>0,05
K/miR-200c (5µg)	-	-	-	-	-

Tablo 6.12. MDA-MB-435 Hücre Hattında 2. Doz Çalışması

MDA-MB-435 Hücre Hattında Doz Çalışması					
	MCF-10A	Endojen	K/miR-141 (1µg)	K/miR-141 (2,5µg)	K/miR-141 (5µg)
MCF-10A	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
K/miR-141 (1µg)	-	-	-	p<0,05	p<0,05
K/miR-141 (2,5µg)	-	-	-	-	p<0,05
K/miR-141 (5µg)	-	-	-	-	-

Tablo 6.13. MDA-MB-435 Hücre Hattında 2. Doz Çalışması

MDA-MB-435 Hücre Hattında Doz Çalışması					
	MCF-10A	Endojen	K/miR-200c (1µg)	K/miR-200c (2,5µg)	K/miR-200c (5µg)
MCF-10A	-	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
K/miR-200c (1µg)	-	-	-	p<0,05	p>0,05
K/miR-200c (2,5µg)	-	-	-	-	p<0,05
K/miR-200c (5µg)	-	-	-	-	-

Tablo 6.14. MDA-MB-435 Hücre Hattında 3. Doz Çalışması

MDA-MB-435 Hücre Hattında Doz Çalışması					
	MCF-10A	Endojen	K/miR-141 (0,1µg)	K/miR-141 (0,15µg)	K/miR-141 (0,2µg)
MCF-10A	-	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
K/miR-141 (0,1µg)	-	-	-	p<0,05	p<0,05
K/miR-141 (0,15µg)	-	-	-	-	p>0,05
K/miR-141 (0,2µg)	-	-	-	-	-

Tablo 6.15. MDA-MB-435 Hücre Hattında 3. Doz Çalışması

MDA-MB-435 Hücre Hattında Doz Çalışması					
	MCF-10A	Endojen	K/miR-200c (0,5µg)	K/miR-200c(0,75µg)	K/miR-200c (0,8µg)
MCF-10A	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
K/miR-200c (0,5µg)	-	-	-	p>0,05	p<0,05
K/miR-200c (0,75µg)	-	-	-	-	p<0,05
K/miR-200c (0,8µg)	-	-	-	-	-

Tablo 6.16. MDA-MB-231 Hücre Hattında 3. Doz Çalışması

MDA-MB-231 Hücre Hattında Doz Çalışması					
	MCF-10A	Endojen	K/miR-141 (0,1µg)	K/miR-141 (0,2µg)	K/miR-141 (0,5µg)
MCF-10A	-	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05
K/miR-141 (0,1µg)	-	-	-	p<0,05	p<0,05
K/miR-141 (0,2µg)	-	-	-	-	p>0,05
K/miR-141 (0,5µg)	-	-	-	-	-

Tablo 6.17. MDA-MB-231 Hücre Hattında 3. Doz Çalışması

MDA-MB-231 Hücre Hattında Doz Çalışması				
	MCF-10A	Endojen	K/miR-200c(0,1µg)	K/miR-200c (0,2µg)
MCF-10A	-	p<0,05	p>0,05	p<0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05
K/miR-200c (0,1µg)	-	-	-	p<0,05
K/miR-200c (0,2µg)	-	-	-	-

Tablo 6.18. MCF-7 Hücre Hattında Doz Çalışması

MCF-7 Hücre Hattında Doz Çalışması						
	MCF-10A	Endojen	K/miR-200c (0,1µg)	K/miR-200c (0,5µg)	K/miR-200c (0,75µg)	K/miR-200c (1µg)
MCF-10A	-	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Endojen	-	-	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05
K/miR-200c (0,1µg)	-	-	-	p<0,05	p>0,05	p<0,05
K/miR-200c (0,5µg)	-	-	-	-	p>0,05	p>0,05
K/miR-200c (0,75µg)	-	-	-	-	-	p<0,05
K/miR-200c (1µg)	-	-	-	-	-	-

Tablo 6.19. VEGF ELISA bulgularına ait istatistiksel bulgular

VEGF ELISA					
	MCF-7 Pozitif Kontrol	MDA-MB-231 P. Kontrol	MDA-MB-231 miR-200c	MDA-MB-435 P. Kontrol	MDA-MB-435 miR-200c
MCF-7 miR-200c	p<0,05	-	-	-	-
MDA-MB-231 miR-200c	-	p<0,05	-	-	-
MDA-MB-231 miR-141	-	p<0,05	p>0,05	-	-
MDA-MB-435 miR-200c	-	-	-	p<0,05	-
MDA-MB-435 miR-141	-	-	-	p<0,05	p>0,05

Tablo 6.20. E-kaderin ELISA bulgularına ait istatistiksel bulgular

E-kaderin ELISA					
	MCF-7 Pozitif Kontrol	MDA-MB-231 P. Kontrol	MDA-MB-231 miR-200c	MDA-MB-435 P. Kontrol	MDA-MB-435 miR-200c
MCF-7 miR-200c	p<0,05	-	-	-	-
MDA-MB-231 miR-200c	-	p<0,05	-	-	-
MDA-MB-231 miR-141	-	p<0,05	P>0,05	-	-
MDA-MB-435 miR-200c	-	-	-	p<0,05	-
MDA-MB-435 miR-141	-	-	-	p<0,05	p<0,05

Tablo 6.21. Tinagl1 ELISA bulgularına ait istatistiksel bulgular

Tinagl1 ELISA					
	MCF-7 Pozitif Kontrol	MDA-MB-231 P. Kontrol	MDA-MB-231 miR-200c	MDA-MB-435 P. Kontrol	MDA-MB-435 miR-200c
MCF-7 miR-200c	p<0,05	-	-	-	-
MDA-MB-231 miR-200c	-	p<0,05	-	-	-
MDA-MB-231 miR-141	-	p>0,05	p>0,05	-	-
MDA-MB-435 miR-200c	-	-	-	p<0,05	-
MDA-MB-435 miR-141	-	-	-	p>0,05	p<0,05

Tablo 6.22. Igfbp-4 ELISA bulgularına ait istatistiksel bulgular

Igfbp-4 ELISA					
	MCF-7 Pozitif Kontrol	MDA-MB-231 P. Kontrol	MDA-MB-231 miR-200c	MDA-MB-435 P. Kontrol	MDA-MB-435 miR-200c
MCF-7 miR-200c	p>0,05	-	-	-	-
MDA-MB-231 miR-200c	-	p>0,05	-	-	-
MDA-MB-231 miR-141	-	p>0,05	p>0,05	-	-
MDA-MB-435 miR-200c	-	-	-	p<0,05	-
MDA-MB-435 miR-141	-	-	-	p<0,05	p<0,05

Tablo 6.23. Hücre proliferasyon bulgularına ait istatistiksel bulgular

HÜCRE PROLİFERASYON ÇALIŞMASI							
	H0 Pozitif Kontrol	H0 miR-200c	H1 Pozitif Kontrol	H2 Pozitif Kontrol	H2 miR-200c	H3 Pozitif Kontrol	H3 miR-200c
H0 miR-200c	p>0,05	-	-	-	-	-	-
H0 miR-141	p<0,05	p>0,05	-	-	-	-	-
H1 miR-200c	-	-	p>0,05	-	-	-	-
H2 miR-200c	-	-	-	p<0,05	-	-	-
H2 miR-141	-	-	-	p<0,05	p>0,05	-	-
H3 miR-200c	-	-	-	-	-	p>0,05	-
H3 miR-141	-	-	-	-	-	p>0,05	p>0,05

H0:L929

H1:MCF-7

H2:MDA-MB-231

H3:MDA-MB-435

7. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Erken teşhis ve tedaviye karşın meme kanseri dünyada ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Son 10 yılda hastalığın biyolojik heterojenitesine ilişkin bulgunun artması, meme kanserinde etkin farklı patolojik moleküllerin bulunması ile tedavide yeni alternatifler ortaya çıkmıştır. Bu moleküller meme kanseri ile ilgili örneğin, sinyal transdüksiyonu, hücre siklusu, apoptotik, pro-anjiyogenik ve metastatik yollar gibi değişik proseslerde görev alırlar. Bunlar arasında yeni diagnostik ve terapötik hedeflerden mikroRNA'lar (miRNA'lar) yeni bir sınıf küçük endojen kodlanmayan RNA'lardır. miRNA'lar iyi korunmuş yapılar olup ve normal biyolojik fonksiyonlarda örneğin hücre farklılaşma, proliferasyon ve apoptosis bağlantılı komplike bir gen regülasyon network (ağ) yapısı oluştururlar (Serpico ve ark., 2014). MiRNA'lar farklı tip kanserlerde olduğu gibi meme kanseri patogenezi ile de ilgilidirler. MiRNA'lar normal ve meme kanser dahil anormal biyolojik reaksiyonların kritik regülatörleridir. miRNA'lar 21-25 nükleotidlik kodlanmayan RNA'lar olup gen ekspresyonu post-transkripsiyonel kademede regüle ederler. Anormal miRNA ekspresyonu sadece tümör başlatıcı ve geliştirici sinyal yollarını aktive etmez aynı zamanda kanserde metastaz gelişmesini ve rezistansı da hızlandırır. Hedef miRNA'nın ekspresyon durumuna bağlı olarak miRNA-terapötikleri 2 gruba ayrılabilir:

- 1- miRNA'lar yüksek oranda eksprese olduğu durumlarda miRNA inhibisyon
- 2- miRNA ekspresyonu azaldığında ise miRNA yerine koyma tedavisi (replacement) (Zhang ve ark., 2013).

Hastalığın patolojisinde miRNA'nın upregülasyonu etkili ise miRNA bloke edilmeli, protein ekspresyonu baskılanabilir. Aksi durumda, yani miRNA ekspresyonu azaldığında/bulunmadığı durumlarda endojen miRNA ile aynı sekansı içeren bir miRNA mimik tedavisi de kullanılabilir. Doğal miRNA ile aynı biyolojik fonksiyonu sağlamak için kullanılan mimik RISC kompleksine girebilmeli ve hedef mRNA'yı etkilemelidir.

Teorik olarak aynı sekansa sahip tek sarmallı RNA, mature RNA olarak miRNA mimik fonksiyonu görür. Buna karşın, çift sarmallı miRNA mimikleri bir rehber (guide) ve bir yolcu (passenger) iplikçiğe sahip olup tek sarmallılardan potansiyel olarak 100-1000 kat daha etkilidir (Bader ve ark., 2011)

Literatür bulguları miRNA'ların tümör gelişmesinde çok önemli bir rol oynadıklarını, tümörün alttiplerine bağlı olarak miRNA'ların farklı şekilde eksprese olduklarını ve her bir miRNA'nın ekspresyon profilinin tümörün malign özelliklerini belirlediğini göstermektedir. (Blenkiron ve ark., 2007; Iorio ve ark., 2005)

Beş üyeden oluşan miR-200 ailesi 2 farklı genomik bölgede bulunan 2 kluster formundadır (miR-200a, -200b, 429 ve miR-200c, -141). miR-200 ailesi kanserin başlaması, metastaz, diağnoz ve tedavisindeki rolleri nedeniyle dikkat çekici moleküllerdir. Son çalışmalarda miR-200 ailesinin hücrenin malign transformasyonunu inhibe ederek tümör başlamasını inhibe ettiği ileri sürülmüştür. miR-200 ekspresyon kaybı karsinogenezin erken safhasında önemli rol oynayabilir (Humphries ve Yang, 2015).

Diğer taraftan kanser metastaz, çok-kademeli bir sinyal kaskadının sonucudur. Son çalışmalar miR-200 ailesinin metastazın her bir kademesinde etkili olabileceğini göstermiştir (Humphries ve Yang, 2015). miR-200'ler anjiyogenezi inhibe ederek tümör gelişmesini inhibe etmektedir.

Bu önemli özelliklerine karşın miRNA'ların hücrenel alımının çok zayıf olması, endozomal kaçış, immunojenisite, kanda degradasyon ve hızlı renal klirens gibi tedavide kullanımını sınırlayan sorunlar mevcuttur. Bu sorunları gidermede en iyi çözüm uygun bir taşıyıcı formüle edilmesidir. Uygun bir taşıyıcı sistemle taşınan miRNA'nın hedef organa ulaşarak, hücre membranından geçip hücreye girebilir ve aktif formda intraselüler hedefe ulaşabilir. miRNA taşıyıcı sistem olarak diğer nükleik-asit taşınmasında kullanılan viral ve viral olmayan sistemler mutajenik, immunojenik özelliği, sınırlı gen taşıma kapasitesi ve üretim problemleri nedeniyle son yıllarda çalışmalar viral-olmayan sistemler üzerinde yoğunlaşmıştır. Viral

olmayan sistemler arasında katyonik lipitler, polimerler, dendrimerler ve nanopartiküller denenmiştir (Ben-Shushan ve ark., 2014). Viral olmayan gen taşıyıcı sistemler arasında kitozan; biyouyumlu, biodegrade olan, düşük toksisiteye sahip bir biyopolimer olarak dikkat çekmektedir.

Kitozan miRNA çalışmaları;

Bu tezde miR-200 klusteri miR-200c ve miR-141'in kitozanla oluşturduğu nanokompleksin downregüle olduğu değişik meme kanseri hücre hatlarında transfeksiyon etkinliği, sağlam meme ile kıyaslanması uygun kompleks dozajı ile endojen miRNA seviyesinin sağlanması ve kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 komplekslerinin meme kanseri hücre hattında anjiyogenez, invazyon, metastaz ve endotel-mezenkimal dönüşümü etkisi kısaca etki mekanizması araştırılmıştır.

Bu amaçla miR-200c ve miR-141'in elektroforetik ve spektroforetik yöntemle kalite kontrolleri yapılarak, kitozanla kompleksleri hazırlanmıştır. Denenen farklı N/P oranlarında (1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50) tam kompleks oluşumu Resim 6.2. ve 6.3.'de görüldüğü gibi 1/20 oranında kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 ile elde edilmiş, kompleks oluşumu elektroforetik olarak kontrol edilmiştir. Daha sonra komplekslerin mikroskopik (TEM) kontrolleri yapılmış, boyut, yüzey yükü ölçümleri ve serum stabilitesi çalışılmıştır. Tablo 6.2.'de görüldüğü gibi kitozan miR-200c komplekslerinin boyutları 367.9 ± 33 ile 596 ± 130 nm arasında; zeta potansiyel değerleri ise 12.4-26.2 mV arasında değişmektedir. Kitozan/miR-141 komplekslerinin boyutları 328.1 ± 12 ile 425.4 ± 50 nm arasında; zeta potansiyel değerleri ise 12.3-25.4 mV arasında değişmektedir.

Komplekslerin serum stabilitesine ilişkin bulgulara göre Resim 6.6. ve 6.7.'de görüldüğü gibi kitozan/miR-200c komplekslerinin 48. saate kadar, kitozan/miR-141 komplekslerinin 72. saate kadar serum etkisine karşı korunmuş, serbest miR-200c serumla muamele edidiği 0. dakikadan itibaren parçalanmaya başladığı ve 48. saatin sonunda tamamen parçalandığı (Resim 6.8.) ve serbest miR-141'in ise Resim 6.9'da

görüldüğü gibi serumla muamele edildiği 0. dakikadan itibaren parçalanmaya başladı ve 24. saatin sonunda tamamen parçalandığı tespit edilmiştir.

Kitozan komplekslerinin nükleik asitleri serum etkisine karşı koruyucu etkilerine ilişkin bu bulgu literatür verilerine uygundur (Şalve ve ark.)

Daha sonra hazırlanan kompleksler içinde en düşük N/P oranı olan 1/20 oranı seçilerek in vitro hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.

miRNA komplekslerini meme kanseri hücrelerine uygulamadan önce sağlam ve malign meme kanseri hücrelerine endojen miRNA seviyeleri RT-PCR yöntemi ile saptanmıştır. Sağlam meme hücreleri olarak MCF-10A; meme kanseri hücresi olarak ise farklı özellikte hücreler kullanılmıştır. Bunlar; ER(+), PR(-) ve HER2(-) MCF-7, ER(-), PR(-) ve HER2(-) MDA-MB-231 ve ER(-), PR(-) ve HER2(-) MDA-MB-435 hücreleridir.

Sağlam MCF-10A ve kanserli hücrelerde miR-141 ve miR-200c düzeyleri sırasıyla Şekil 6.1. ve 6.2.'de gösterilmiştir.

Endojen miR-200c ekspresyon düzeyi MCF-10A'nın ekspresyonuna göre (%100 alındığında) MCF-7'de %60 downregüle ve MDA-MB-231 ve MDA-MB-435'de %99 downregüle olmuştur (Şekil 6.2.)

Endojen miR-141 düzeyi ise MCF-10A'ya göre MCF-7'de değişmemiş ancak %2 oranında azalma görülmüştür. MDA-MB-231'de %70; MDA-MB-435 hücre hattında ise %90 downregüle olmuştur. Bu sonuçlar kanserli hücrelerde miR-200c ve miR-141'in downregüle olduğuna ilişkin literatür verilerine uygunluk göstermektedir (Rhodes ve ark., 2015; Feng ve ark., 2014).

Çalışmada transfeksiyon kontrolü floresan özellikte mimiklerle hazırlanan kitozan kompleksleri ile yapıldı. Komplekslerin hücre içine girişi ve hücre içindeki yerleri konfokal mikroskopla incelendi. Resim 6.12-6.14.'de görüldüğü gibi 48. ve

96. saatte izlenen floresans komplekslerinin hücre membranını geçerek hücre içine internalizasyonunu göstermektedir.

Bilindiği gibi hücredeki miRNA seviyesi önemlidir. Çok yüksek oranda miRNA ekspresyonu hücre canlılığı için olumsuz etki yapabilmektedir (Vasudevan, 2012). Bu nedenle endojen miR-200c ve miR-141 seviyesini sağlayacak dozda ekspresyonu için farklı dozlarda (0.1-5µg) miR-200c ve miR-141 içeren kitozan kompleksleri ile çalışma yapıldı, RT-PCR ile hücre miRNA düzeyleri saptandı. Her hücre için uygun miRNA dozu saptandı. miR-200c için uygun doz MCF-7'de 0,75 µg, MDA-MB-231'de 0,1 µg ve MDA-MB-435'de 1 µg'dır. miR-141 için uygun doz MDA-MB-231 hücre hattı için 0,1 µg ve MDA-MB-435 için 150 ng'dır (p>0,05)(Şekil 6.3.-6.15.).

Belirlenen dozda kitozan-miRNA komplekslerinin uygulanmasından sonra miR-200c ve miR-141'in anjiyogenez VEGF etkisini saptamak için VEGF tayini ELISA yöntemi ile yapıldı.

VEGF tayini bulgularına göre Şekil 6.16.'da görüldüğü gibi miRNA uygulanmayan tümör gruplarına göre ve kitozan/miRNA uygulanan gruplarda VEGF konsantrasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Belirlenen dozda kitozan/miR-200c transfeksiyonu yapılan MCF-7 hücre hattında VEGF seviyesinin tümör grubuna göre (%100 alındığında) %24,4 oranında azaldığı, MDA-MB-231 hücre hattında %6,8 oranında azaldığı ve MDA-MB-435 hücre hattında ise %18,1 oranında azaldığı saptanmıştır. Kitozan/miR-141 transfeksiyonu yapılan MDA-MB-231 hücre hattında VEGF seviyesinin tümör grubuna göre (%100 alındığında) %34,3 oranında azaldığı ve MDA-MB-435 hücre hattında ise %33,7 oranında azaldığı tespit edilmiştir (p<0,05).

miR-200c ve miR-141 miRNA'larının VEGF'i hedefleyerek ekspresyonunu regüle ettiğine ve anjiyogenezi baskıladığına ilişkin bu bilgi literatüre uygundur (Zhang ve ark., 2014).

Uygun dozda kitozan/miRNA komplekslerinin hücelere verilmesinden sonra miR-200c ve miR-141'in EMT'ye etkisini belirlemek için EMT'de önemli molekül olan E-kaderin ELISA yöntemi ile tayin edildi.

Tümör grupları ve tümör gruplarına belirlenen dozda kitozan/miRNA uygulama sonrası hücelerdeki E-kaderin protein ekspresyon seviyeleri Şekil 6.17'deki gibidir. Buna göre tümör grupları %100 alındığında kitozan/miR-200c'nin; MCF-7 hücre hattında E-kaderin seviyesini %15,4 artırdığı, MDA-MB-231 hücre hattında %88,7 artırdığı ($p < 0,05$) ve MDA-MB-435 hücre hattında ise E-kaderin seviyesinin değişmediği ancak %2,3 oranında azaldığı ($p > 0,05$) gözlenmiştir. Kitozan/miR-141'in; MDA-MB-231'de E-kaderin seviyesini %100,7 ($p < 0,05$) artırdığı ve MDA-MB-435'de ise değiştirmedeği ancak %2 oranında artırdığı saptanmıştır ($p > 0,05$).

miR-200c ve miR-141'in EMT transkripsiyon faktörlerinden ZEB1/2'yi hedefleyerek EMT'yi baskıladığı bilinmektedir. miR-200 ailesi epitel fenotipe önemli moleküllerden olan E-kaderini baskılayan ZEB'leri baskılayarak E-kaderin ekspresyonunu da indirekt olarak regüle etmektedir. miR-200c ve miR-141 mimikleri kullanılarak hazırlanan komplekslerin hücelere verilmesiyle MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki E-kaderin seviyesindeki artış literatüre uygundur (Rhodes ve ark., 2015).

miR-200 ailesinin upregülasyonu SEC23A'yı hedefleyerek metastazı inhibe eden Tinagl1 ve Igfbp-4 proteinlerini indirekt olarak deregüle etmesi metastatik kolonizasyona yol açmaktadır (Korpal ve ark., 2012). miRNA'ların yanlış regüle edilmeleri de kanser gibi çeşitli hastalıklara yol açmaktadır (Vasudevan, 2012).

Belirlenen dozda kitozan/miRNA uygulanan hücelerdeki Tinagl1 tayini ELISA yöntemi ile tayin edildi.

Buna göre hücelerdeki Tinagl1 seviyesi Şekil 6.18'de gösterildiği gibidir. Kitozan/miR-200c transfeksiyonu yapılan MCF-7 hücre hattında Tinagl1 seviyesinin

tümör grubuna göre (%100 alındığında) %13,5, MDA-MB-231’de %36 ve MDA-MB-435’de %27 oranlarında arttığı gözlenmiştir. Kitozan/miR-141 transfeksiyonu yapılan MDA-MB-231 hücre hattında Tinagl1 seviyesinin tümör grubuna göre (%100 alındığında) %60 ve MDA-MB-435’de %61,6 oranında arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Hücrelerdeki Igfbp-4 seviyesini belirlemek için yapılan ELISA yöntemi bulgularına göre ise Şekil 6.19’de gösterilmiş olup kitozan/miR-200c transfeksiyonu yapılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında Igfbp-4 seviyesinin tümör grubuna göre (%100 alındığında) değişmediği, ancak %7 ($p>0,05$) ve MDA-MB-231’de %0,7 oranında arttığı ($p>0,05$) ve MDA-MB-435’de ise %11 oranlarında azaldığı ($p<0,05$) gözlenmiştir. Kitozan/miR-141 transfeksiyonu yapılan MDA-MB-231 hücre hattında Igfbp-4 seviyesinin tümör grubuna göre (%100 alındığında) %10 arttığı ($p>0,05$) ve MDA-MB-435’de ise değişmediği ve %3,8 oranında azaldığı ($p<0,05$) tespit edilmiştir.

Belirlenen dozda kitozan-miRNA komplekslerinin uygulanmasından sonra miR-200c ve miR-141’in invazyona etkisini tespit etmek için 8µm porlara sahip insertler kullanılarak invazyon tayini yapıldı.

Tümör hücre hatlarında miR-200c ve miR-141’in invazyona etkisi Resim 6.18 ve 6.19.’daki gibidir. Buna göre göç eden hücre sayısı (tümör kontrol grubu %100 alındığında); MDA-MB-231 hücre hattında kitozan/miR-200c uygulanmasından sonra tümör kontrol grubuna göre %35,6 oranında ($p<0,05$) ve kitozan/miR-141 uygulamasından sonra %40,5 oranında azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$). MDA-MB-435 hücre hattında kitozan/miR-200c uygulanmasından sonra tümör kontrol grubuna göre %15,2 oranında ($p>0,05$) ve kitozan/miR-141 uygulamasından sonra %56,2 oranında azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$).

EMT ve anjiyogenezi regüle ederek invazyonu baskılayan miR-200 ailesi kanserde downregüle olmaktadır. Kitozan taşıyıcı sistem kullanılarak bazal ekspresyon seviyesine getirilen miR-200c ve miR-141; EMT ve anjiyogenezi

baskılayarak invazyonu azaltmıştır. Bu bilgiler literatüre uygundur (Rhodes ve ark., 2015; Pecot ve ark., 2014).

Sonuçta, miRNA'ların kitozan ile 20/1 (N/P) oranından sonra tam kompleks oluşturduğu gözlenmiştir. Yapılan ölçümlerde, kompleks partikül boyutlarının kitozan/miR-141'de 328.1 ± 12 ile 425.4 ± 50 nm ve kitozan/miR-200c'de 367.9 ± 33 ile 596 ± 130 nm arasında değiştiği, zeta potansiyel değerlerinin ise kitozan/miR-141 kompleksleri için 12.3-25.4 mV ve kitozan/miR200c kompleksleri için 12.4-26.2 mV arasında değiştiği saptanmıştır. Stabilitate çalışmasında kitozanın miRNA'yı serum ve enzim degradasyonuna karşı koruduğu gözlenmiştir. İn vitro hücre kültürü çalışmasında, ilk olarak sağlıklı meme hücre hattı MCF-10A referans olarak seçilerek ekspresyon profillemesi çalışması analizinde, miR-200c'nin %60 downregüle olduğu ve endojen miR-141'in sağlıklı hücre hattı ile aynı seviyede olduğu gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında, miR-141'in yaklaşık %70 ve miR-200c'nin yaklaşık %99 downregüle olduğu gözlenmiştir. MDA-MB-435 hücre hattında ise, miR-141'in yaklaşık %90 ve miR-200c'nin yaklaşık %99 downregüle olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre kanserli hücre hatlarındaki downregüle miRNA seviyelerini sağlıklı hücre hattının endojen miRNA seviyesine getirebilmek için transfeksiyon ve doz çalışmaları yapılmıştır. Farklı miRNA dozlarında yapılan çalışmalarda, her üç meme kanser hücre hattında miRNA seviyesini endojen seviyeye getiren dozlar ve N/P oranları qRT-PCR çalışmaları ile belirlenmiştir. İn vitro transfeksiyon çalışmasında, kitozan/Dy547-miR-67 mimik kompleksleri (20/1 (+/-)) hücrelere verilerek Dy547-miR-67 mimik komplekslerinin hücre içerisindeki lokalizasyonları floresan ve konfokal mikroskop ile incelenmiştir. Kitozan/miR-200c ve kitozan/miR-141 komplekslerinin kanser hücre hatlarına transfeksiyonu sonrası hücrelerdeki VEGF, E-kaderin, Tinag11, Igfb4 miktarları ELISA ile ölçüldü. Komplekslerin kanser hücrelerinde apoptoz ve hücre proliferasyonuna etkisinin olmadığı gözlemlenirken, kanser hücrelerinde invazyonu azalttığı tespit edildi.

Sonuç olarak, çalışmamızda miR-200c ve miR-141'in kitozan kompleksleri ile hücrelere stabil olarak taşındığı, hücreye internalize olarak kanser hücrelerinde bozulan miRNA regülasyonunun tedavi edilmesiyle kanser hücrelerinin invazivliğini

azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kitozan komplekslerinin miRNA için güvenilir ve etkin bir taşıyıcı sistem olduğu gösterilmiştir. Bu alışma gelecekte kitozan polimeri ile yapılacak miRNA taşıyıcı sistem araştırmaları ve miR-200 aile üyelerinin meme kanserindeki rollerinin anlaşılması için de temel oluşturmaktadır.

8. KAYNAKLAR

Akbuğa J, Özbaş-Turan S, Erdoğan N. Plasmid-DNA loaded chitosan microspheres for in vitro IL-2 expression. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 58(3): 501-507.

Anaya-Ruiz M, Perez-Santos M. Innovation status of gene therapy for breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(9):4133-6.

Andorfer CA, Necela BM, Thompson EA, Perez EA. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Trends in Mol Med.* 2011; 17:313-319.

Aravalli R N. Development of microRNA therapeutics for hepatocellular carcinoma. *Diagnostics.* 2013; 3: 170-191.

Aydiner A, Topuz E. Meme Kanseri Tanı-Tedavi-Takip İstanbul Konsensusu. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. İstanbul; 2006, s:1-80.

Bader AG, Brown D, Stoudemire J, Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Therapy.* 2011; 18(12): 1121-1126.

Bail S, Swerdel M, Liu H, Jiao X, Goff LA, Hart RP, Kiledjian M. RNA. Differential regulation of microRNA stability. 2010; 16:1032–1039.

Barron N, Keenan J, Gammell P, Martinez VG, Freeman A, Masters JR, Clynes M. Biochemical Relapse Following Radical Prostatectomy and miR-200a Levels in Prostate Cancer. *The Prostate.* 2012; 72:1193-1199.

Bendoraitė A, Knouf EC, Garg KS, Parkin RK, Kroh EM, Ventura AP, Godwin AK, Karlan BY, Drescher CW, Knudsen BS, Tewari M, O'Briant KC, Urban N.

Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: Evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition. *Gynecologic Oncology*. 2010; 116:117-125.

Ben-Shushan D, Markovsky E, Gibori H, Tiram G, Scomparin A, Satchi-Fainaro R. Overcoming obstacles in microRNA delivery towards improved cancer therapy. *Drug Delivery and Translational Res*. 2014; 4(1): 38-49.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001; 409(6818):363– 366.

Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Inmaculada D, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavaré S, Caldas C, Miska EA. MikroRBA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. 2007; 8(10); R214.

Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. *Gene Therapy*. 2011; 18: 1104–1110.

Calin GA, Croce CM. MikroRNA signatures in human cancers. *Nature Rev*. 2006; 6:857-866.

Chang CJ, Chao CH, Xia JY, Yang JY, Xiong Y, Li CW, Yu WH, Rehman SK, Hsu JL, Lee HH, Liu M, Chen CT, Yu D, Hung MC, p53 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol*. 2011; 13(3): 317-323.

Chen J, Murchison E P, Tang R, Callis T E, Tatsuguchi M, Deng Z, Rojas M, Hammond S M, Schneider M D, Selzman C H, Meissner G, Patterson C, Hannon G J, Wang D. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *PNAS*. 2008; 105(6): 2111-2116.

Chen, J., Murchison, E. P., Tang, R., Callis, T. E., Tatsuguchi, M., Deng, Z., Rojas, M., Hammond, S. M., Schneider, M. D., Selzman, C. H., Meissner, G., Patterson, C., Hannon, G. J., Wang, D. "Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure", PNAS. 2008; 105(6): 2111-2116.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature. 2005; 436(7051): 740–744.

Choi YC, Yoon S, Jeong Y, Yoon J, Baek K, Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Signaling by miR-200b, Mol Cells. 2011; 32: 77-82.

D'Amato NC, Howe EN, Richer JK. MikroRNA regulatin of epithelial plasticity in cancer. Cancer Letters. 2013; 341:46-55.

Deng X, Cao M, Zhang J, Hua K, et al. Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for co-delivery of MiR-34a and doxorubicin in therapy against triple negative breast cancer. Biomaterials. 2014; 35: 4333-4344.

Deng, X., Cao, M., Zhang, J., Hua, K., et al. "Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for co-delivery of MiR-34a and doxorubicin in therapy against triple negative breast cancer", Biomaterials. 2014; 35: 4333-4344.

Dhayat S A, Mardin W A, Köhler G, Bahde R, Vowinkel T, Wolters H, Senninger N, Haier J, Mees S T. The microRNA-200 family-A potential diagnostic marker in hepatocellular carcinoma?. Journal of Surgical Oncology. 2014; 110(4): 430-438.

Ding W, Dang H, You H, Steinway S, Takahashi Y, Wang H-G, Liao J, Stiles B, Albert R, Rountree CB. miR-200b restoration and DNA methyltransferase inhibitor block lung metastasis of mesenchymal-phenotype hepatocellular carcinoma. Oncogenesis. 2012; 1: e15.

Epstein, D.M. Special delivery: microRNA-200-containing extracellular vesicles provide metastatic message to distal tumor cells, *J. Clin. Invest.* 2014; 124(12):5107-5108.

Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2006; 6(4): 259-269.

Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins J F, Patrawala L, Cheng A, Ford L, Weidhaas J B, Brown D, Bader A G, Slack F J. The let-7 microRNA reduces tumor growth in Mouse models of lung cancer. *Cell Cycle.* 2008; 7(6): 759-764.

Feng X, Wang Z, Fillmore R, Xi Y. miR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Letters.* 2014; 344: 166-173.

Fenton R, Longo D. *Tumor Cancer Cell Biology and Angiogenesis.* 2011; Chapter 24:294-318.

Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T. Development of Small RNA Delivery Systems for Lung Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2015; 16:5254-5270.

Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA. Characterization of MicroRNA Expression Levels and Their Biological Correlates in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* 2007; 67(6):2456-2468.

Geng Y, Lin D, Shao L, Yan F, Ju H. Cellular delivery of quantum dot-bound hybridization probe for detection of intracellular pre-microRNA using Chitosan/Poly(c-Glutamic Acid) complex as a carrier. *PLOS ONE.* 2013; 8(6): e65540, 1-8.

Goh JN, Loo SY, Datta A, Siveen KS, Yap WN, Cai W, Shin EM, Wang C, Kim JE, Chan M, Dharmarajan AM, Lee AS-G, Lobie PE, Yap CT, Kumar AP. microRNAs

in breast cancer: regulatory roles governing the hallmarks of cancer. *Biol. Rev.* 2015; Jan 28:000–000.

Gramantieri L, Fornari F, Callegari E, Sabbioni S, Lanza G, Croce C M, Bolondi L, Negrini M. MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2008; 12(6A): 2189-2204.

Gravgaard. KH, Lyng MB, Laenkholm AV, Sokilde R, Nielsen BS, Litman T, Ditzel, HJ. The miRNA-200 family and miRNA-9 exhibit differential expression in primary versus corresponding metastatic tissue in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012; 134:207-217.

Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res.* 2005; 65(9): 3509-3512.

Grünweller A, Hartmann RK. RNA Interference as a gene specific approach for molecular Medicine. *Current Medicinal Chem.* 2005; 12:3143-3161.

Guo, X., Huang, L., Recent advances in nonviral vectors for gene delivery. *Accounts Chem. Res.* 2012; 45:971–979.

Gurtan AM, Sharp PA. The role of miRNAs in regulating gene expression Networks. *J Mol Biol.* 2013;425(19): 3582-3600.

Hay E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel).* 1995; 154:8–20.

Huang RY, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* 2012; 125:4417–4422.

Humphries B, Yang C. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget.* 2015;6(9): 6472-98.

Hung CS, Liu HH, Liu JJ, Yeh CT, Chang TC, Wu CH, Ho YS, Wei PL, Chang YJ. MicroRNA-200a and -200b mediated hepatocellular carcinoma cell migration through the epithelial to mesenchymal transition markers. *Annals of Surgical Oncology*. 2013; 20: S360-S368.

Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multipl-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002; 297(5589):2056-60.

Hwang H-W, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British Journal of Cancer*. 2006; 94(6): 776-780.

Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm*. 2014; 459:70-83.

Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Braccioli L, Tagliabue E. Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. *The Breast*. 2011; 53: 563-S70.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65:7065–70.

Jazbutyte V, Thum T. MicroRNA-21:From Cancer to Cardiovascular Disease. *Cancer Drug Targets*. 2010; 11(8):926-935.

Jovanovic M, Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene*. 2006; 25(46): 6176-6187.

Jurmeister S, Baumann M, Balwierz A, Keklikoglou I, Ward A, Uhlmann S, Zhang JD, Wiemann S, Sahin Ö. microRNA_200c repress migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F. *Molecular and Cellular Biology*. 2011; 633-651.

Kaboli PJ, Rahmat A, Ismail P, Ling KH. MicroRNA-based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment. *Pharmacological Research* 2015; 97:104–121.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009; 119:1420–1428.

Kamangar F., Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24:2137–2150.

Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115:209–216.

Kim T, ve ark.. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J. Exp. Med.* 2011; 208:875–883.

Kisielow, M., Kleiner, S., Nagasawa, M., Faisal, A., & Nagamine, Y. Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA. *Biochem J.* 2002; 363(Pt 1): 1 – 5.

Korpala M, Kang Y. The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA Biology.* 2008; 5(3): 115-119.

Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery C L, Hwang H-W, Chang T-C, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murine Liver Cancer Model. *Cell.* 2009; 137(6): 1005-1017.

Ku G, McManus MT. Behind the Scenes of a Small RNA Gene-Silencing Pathway. *Human Gene Ther.* 2008; 19:17-26.

Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*. 2000; 46:1–27.

Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Lacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature Genetics*. 2007; 39:673-677.

Lee HJ. Exceptional stories of microRNAs. *Exp Biol Med*. 2013; 238:339-343.

Lee JW, Park YA, Choi JJ, Lee YY, Kim CJ, Choi C, Kim TJ, Lee NW, Kim BG, Bae DS. The expression of the miRNA-200 family in endometrial endometrioid carcinoma. *Gynecologic Oncology*. 2011; 120:56-62.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5): 843-854.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., & Yim, J., et al. The nuclear RNase III *drosha* initiates MicroRNA processing. *Nature*. 2003; 425(6956): 415– 419.

Leung RKM, Whittaker PA. RNA interference:from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*. 2005; 107:222-239.

Li C, Feng Y, Coukos G, Zhang L. Therapeutic MicroRNA Strategies in Human Cancer. *The AAPS Journal*. 2009;11(4):747-757.

Li Y, VandenBoom II TG, Kong D, Wang Z, Ali S, Philip PA, Sarkar FH. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-mesenchymal transition in gemcitabine resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2009; 69(16): 6704-12.

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

Majeed W, Aslam B, Javed I, Khaliq T, Muhammad F, Ali A, Raza A. Breast cancer: major risk factors and recent developments in treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(8):3353-8.

Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT, Leong KW. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*. 2001; 70: 399-421.

Mao, HQ., Roy, K., Troung-Le, VL., Janes, KA., Lin, KY., Wang, Y., August, JT., Leong, KW. “Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency”, *Journal of Controlled Release*. 2001; 70:399-421.

McCrudden CM, McCarthy HO. Current status of gene therapy for breast cancer: progress and challenges. *The Application of Clinical Genetics*. 2014; 7:209-220.

Medina P P, Slack F J. microRNAs and cancer. *Cell Cycle*. 2008; 7(16): 2485-2492.
Natarajan A, Venugopal SK. microRNA profiles in docetaxel-resistant human non-small cell lung carcinoma, *Translational Research on Breast Cancer: miRNA, siRNA and Immunoconjugates in Conjugation with Nanotechnology for Clinical Studies, Breast Cancer - Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics*, Dr. Susan Done (Ed.), ISBN: 978-953-307-730-7, InTech, 2011; p:361-380.

Pecot CV, Rupaimoole R, Yang D, Akbani R, Ivan C, Lu C, Wu S, Han HD, Shah MY, Rodriguez-Aguayo C, Bottsford-Miller J, Liu Y, Kim SB, Unruh A, Gonzalez-Villasana V, Huang L, Zand B, Moreno-Smith M, Mangala LS, Taylor M, Dalton HJ, Sehgal V, Wen Y, Kang Y, Baggerly KA, Lee JS, Ram PT, Ravoori MK, Kundra V, Zhang X, Ali-Fehmi R, GonzalezAngulo AM, Massion PP, Calin GA, Lopez-

Berestein G, Zhang W, Sood AK. Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. *Nat Commun.* 2013; 4: 2427.

Pereira DM, Rodrigues PM, Barralho PM, Rodrigues CMP. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. *Drug Discovery Today*,. 2013; 16(5-6): 282-289.

Petrocca F, Lieberman J. Micromanipulating cancer. *RNA Biology.* 2009; 6(3): 335-340.

Pimentel F, Bonilla P, Ravishankar YG, Contag A, Gopal N, LaCour S, Lee T, Niemz A. Technology in MicroRNA Profiling: Circulating MicroRNAs as Noninvasive Cancer Biomarkers in Breast Cancer. *J Lab Autom.* 2014; Dec 18.

Pulaski, B.A., Ostrand-Rosenberg, S. Reduction of Established Spontaneous Mammary Carcinoma Metastases following Immunotherapy with Major Histocompatibility Complex Class II and B7.1 Cell-based Tumor Vaccines, *Cancer Research.* 1998; 58 (7): 1486-1493.

Rhodes LV, Martin EC, Segar HC, Miller DF, Buechlein A, Rusch DB, Nephew KP, Burow ME, Collins-Burow BM. Dual regulation by microRNA-200b-3p and microRNA-200b-5p in the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer. *Oncotarget.* 2015; Mar 21.

Roth JA. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2006; 6(1): 55-6.

Rui W, Bing F, Hai-Zhu S, Wei D, Long-Bang C. Identification of microRNA profiles in docetaxel-resistant human non-small cell lung carcinoma cells (SPC-A1). *J. Cell. Mol. Med.* 2010; 14(1): 206-214.

Schliekelman MJ, Gibbons DL, Faca VM. Targets of the Tumor Suppressor miR-200 in Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancer Res.* 2011; 71: 7670-82.

Schooneveld EV, Wildiers H, Vergote I, Vermeulen PB, Dirix LY, Laere SJV. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Research.* 2015; 17:21.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, & Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003; 115: 199–208.

Serpico D, Molino L, Cosimo SD. MicroRNA in breast cancer development and treatment. *Cancer Treatment Rev.* 2014; 40(5):595-604.

Shi M, Guo N. MicroRNA expression and its implications for the diagnosis and therapeutic strategies of breast cancer. *Cancer Treatment Rev.* 2009; 35(4): 328-334.

Shimono Y, Ugalde MZ, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, Diehn M, Liu H, Panula SP, Chiao E, Dirbas FM, Somlo G, Pera R A R, Lao K, Clarke MF. Down-regulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell.* 2009; 138(3): 592-603.

Soifer HS, Rossi JJ, Saetrom P. MicroRNAs in Disease and Potential Therapeutic Applications. *Mol Ther.* 2007; 15(12): 2070-2079.

Soriano A, Jubierre L, Almazan-Moga A, Molist C., Roma J, de Toledo JS, Gallego S, Segura MF. microRNAs as pharmacological targets in cancer. *Pharmacological Research.* 2013;75: 3-14.

Sotillo E, Thomas-Tikhonenko A. Shielding the Messenger (RNA): microRNA-based anticancer therapies. *Pharmacology and Therapeutics.* 2011; 131: 18-32.

Şalva E, Akbuğa J. In Vitro Silencing Effect Of Chitosan Nanoplexes Containing Sirna Expressing Vector Targeting Vegf In Breast Cancer Cell Lines. *Die Pharmazie*. 2010; 65(12):896-903.

Şalva E, Kabasakal L, Eren F, Ozkan N, Cakalağaoğlu F, Akbuğa J. Local delivery of chitosan/VEGF siRNA nanoplexes reduces angiogenesis and growth of breast cancer in vivo. *Nucleic Acid Ther*. 2012; 22(1): 40-48.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009; 139:871–890.

Turan S O, Akbuğa J, Sezer A D. Topical application of antisense oligonucleotide-loaded chitosan nanoparticles to rats. *Oligonucleotides*. 2010; 3(20): 147-153.

Uchino K, Ochiya T, Takeshita F. RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2013; 43(6): 596-607.

Uhlmann S, Zhang JD, Schwager A, Mannsperger H, Riazalhosseini Y, Burmester S, Ward A, Korf U, Wiemann S, Sahin Ö. miR-200bc1429 cluster targets PLCyI and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR- 200a/14l in breast cancer. *Oncogene*. 2010; 29: 4297-4306.

Valladares-Ayerbes M, Reboredo M, Medina-Villaamil V, Iglesias-Diaz P, Lorenzo-Patino MJ, Haz M, Santamarina I, Blanco M, Fernandez-Tajes J, Quindos M, Carral A, Figueroa A, Anton-Aparicio LM, Calvo L. Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *J Trans Med*. 2012; 10:186.

Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012; 3(3):311-30.

Verghese ET, Hanby AM, Speirs V, Hughes TA, Small is beautiful: microRNAs and breast cancer-where are we now? *Journal of Pathology*. 2008; 215:214-221.

Wang H. Predicting Cancer-Related MiRNAs Using Expression Profiles in Tumor Tissue. *Curr Pharm Biotechnol*. 2014;15(5):438-44.

Whittaker PA. What is the relevance of bioinformatics to pharmacology?. *Trends Pharmacol Sci*. 2003; 24(8): 434– 439.

Xia H, Ng SS, Jiang S, Cheung WKC, Sze J, Bian X, Kung H, Lin M. miR-200a-mediated downregulation of ZEB2 and CTNNB1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion. *Bipchem and Biophysical Res Com*. 2010; 391:535-541.

Yang J, Liu H, Zhang X. Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers *Biotechnology Advances* 2014;32:804–817.

Yeh TS, Wang F, Chen TC, Yeh CN, Yu MC, Jan YY, Chen MF. Expression profile of miR-200 family in hepatocellular carcinoma with bile duct tumor thrombus. *Ann Surg*. 2014; 259(2):346-54.

Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*. 2014; 15(8):541-55.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*. 2007; 302:1-12.

Zhang HF, Xu LY, Li EM. A family of pleiotropically acting microRNAs in cancer progression, miR-200: potential cancer therapeutic targets. *Current Pharm Design*. 2014; 20(11):1896-1903.

Zhang J, Jin H, Liu H, Iv S, Wang B, Liu H, Ding M, Yang Y, Li L, Zhang J, Fu S, Xie D, Wu M, Zhou W, Qian Q. MiRNA-99a directly regulates AGO2 through translational repression in hepatocellular carcinoma. *Oncogenesis*. 2014b; 3: e97.

Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart R A. Progress in microRNA delivery. *Journal of Controlled Release*. 2013; 172: 962-974

Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in microRNA delivery. *J Cont Release*. 2013; 172(3):962-974.

Zidar N, Kojc N, Cardesa A. Down-regulation of microRNAs of the miR-200 family and miR-205, and an altered expression of classic and desmosomal cadherins in spindle cell carcinoma of the head and neck—hallmark of epithelial-mesenchymal transition. *Human Path*. 2011; 42:482-488.

Zou S.W, Ai, K.X, Wang,Z.G, Yuan, Z, Yan J, Zheng Q. The role of Med19 in the proliferation and tumorigenesis of human hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2011;32: 354–360.

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Kübra	Soyadı	KABAN
Doğum Yeri	ÜSKÜDAR	Doğum Tarihi	04/12/1989
Uyruğu	T.C.	Tel	(507) 881 6873
E-mail	kubra.kbn@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi	2015
Lisans	Sakarya Üniversitesi	2011
Lise	Ferit İnal Lisesi	2006

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
62,5								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office Programları	İyi
SPSS	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.