



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME VE PROSTAT KANSERİNDE pİRNA'LAR İLE
HORMONAL REGÜLASYONUN İLİŞKİSİ**

DOKTORA TEZİ

UZM. BİO. ÇAĞRI ÖNER

DANIŞMAN

DOÇ. DR. DİDEM TURGUT COŞAN

TEMMUZ-2015



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME VE PROSTAT KANSERİNDE pİRNA'LAR İLE
HORMONAL REGÜLASYONUN İLİŞKİSİ**

DOKTORA TEZİ

UZM. BİO. ÇAĞRI ÖNER

DANIŞMAN

DOÇ. DR. DİDEM TURGUT COŞAN

PROJE NO: 2014-576

KABUL VE ONAY SAYFASI

Çağrı ÖNER'in Doktora Tezi olarak hazırladığı "Meme ve Prostat Kanserinde piRNA'lar ile Hormonal Regülasyonun İlişkisi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

29.07.2015

Üye: Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

Üye: Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCI

Üye: Prof. Dr. Berrin TUNCA

Üye: Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21.07/2015 tarih ve 1096.../4958... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu arařtırmada, kanser geliřiminde etkili olduđu dűřünűlen hormonal dűzenlemenin PIWI-interacting RNA (piRNA) ekspresyonuna olan etkisini belirlemek amaçlanmıřtır.

Erkeklerde prostat kanseri, kadınlarda ise meme kanseri yařa ve cinsiyete bağlı olarak görűlme sıklığı en fazla olan kanser tűrleridir. Prostat kanserinin gelişimi androjen bağımlı ve bağımsız; meme kanserinin gelişimi ise ۆstrojen bağımlı ve bağımsız olarak gerçekteşebilmektedir. Kodlamayan RNA (ncRNA) grubunun bir űyesi olan piRNA'lar genomdaki intergenik tekrarlayan elemanlardan meydana gelmektedir. Ayrıca kanserde de bazı piRNA'ların ekspresyonları artmaktadır. Bu artışın hormonlardan etkilenebileceği dűřünülmektedir.

Bu çalıřmada, androjen baėımlı ve baėımsız prostat kanser hűcrelerine (PC-3 ve LNCaP) androjen hormonu; ۆstrojen baėımlı ve baėımsız meme kanser hűcrelerine (MCF-7 ve MDA-MB-231) ۆstrojen hormonu uygulanarak hűcrelerde çoėalma (proliferasyon), tutunma (adezyon) ve canlılık belirlendi. Hűcrelerden RNA izolasyonu yapılarak, cDNA'larda Real Time PCR (RT-PCR) yۆntemiyle piR-651 ve piR-823 ekspresyonları ve ELISA yۆntemi uygulanarak ۆstrojen (17-β-estradiol) ve androjen (dihidrotestosteron; DHT) miktarları belirlendi.

Dıřarıdan uygulanan hormonların hűcrelerde çoėalmayı en fazla arttıran konsantrasyonları belirlendikten sonra, hűcrelerde piRNA ekspresyonları belirlendi. Bu konsantrasyonlarda canlılıėın yűksek olduėu ve tutunmanın (adezyonun) da azaldıėı gözlemlendi. Elde edilen verilere gۆre, LNCaP androjen baėımlı prostat kanser hűcre dizisinde 24.saat 1 nM androjen; PC-3 androjen baėımsız prostat kanser hűcre dizisinde 24.saat 10 nM androjen konsantrasyonları piR-651 ve piR-823 ekspresyonlarını kontrole gۆre arttırdı. MCF-7 ۆstrojen baėımlı meme kanser hűcre dizisinde 24.saat 10 nM ۆstrojen; MDA-MB-231 ۆstrojen baėımsız meme kanseri hűcre dizisinde 24.saat 1 nM ۆstrojen konsantrasyonları piR-651 ekspresyonunu kontrole gۆre arttırdı. piR-823 ekspresyonu sadece MDA-MB-231 hűcrelerinde kontrole gۆre artarken, MCF-7 hűcrelerinde kontrole gۆre azaldı.

Bu çalıřma ile gűnűműzde ۆnemi artan piRNA'ların kanserde hormonlardan etkilenebileceėi gۆsterildi. Hormon uygulandıėında piR-651 eřeye ۆzgű iki kanser tipinde de artıř gۆsterirken, piR-823'űn sadece malign karakterli meme kanser hűcrelerinde arttıėı belirlendi. Bۆylece, piR-823 ekspresyonun farklı kanser tűrlerinde farklı ekspresyonlar gۆsterebileceėi ortaya kondu.

Sonuç olarak eŖeye bađlı kanserlerde ekspresyonlarının arttıđı dűŖűnűlen piR-651 ve piR-823'űn űstrojen veya androjen gibi hormonlarla da artabileceđi belirlendi. Bununla birlikte piR-823'űn kűtű huylu űzellikte olmayan meme kanser hűcrelerinde azaldıđı gűzlendi.

Anahtar Kelimeler: Kanser, űstrojen, Androjen, piR-651, piR-823, Hormonal Regűlasyon

SUMMARY

In this study we purposed to determine the impact of PIWI interacting RNAs (piRNAs) on hormonal regulation, which is known to play an important role in carcinogenesis and cancer development.

Prostate cancer in males and breast cancer in females is the most seen cancer type according to age and gender. Development of prostate cancer can consist of androgen dependent and independent; also development of breast cancer can consist of estrogen dependent and independent mechanisms. piRNAs, member of non-coding RNAs (ncRNA), form in intergenic repetitive elements of genome. Furthermore, expressions of piRNAs increase in cancer. It is thought that this increase can be effected amount of hormones in cancer.

In this study, androgen was applied to androgen dependent and independent prostate cancer cell lines (LNCaP and PC-3); estrogen was applied to estrogen dependent and independent breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). Then proliferation, viability and adhesion were determined in these cell lines. Total RNA was isolated from cells and expressions of piR-651 and piR-823 were determined from obtained cDNAs by using Real Time PCR. By using ELISA method, levels of estrogen (17- β -estradiol) and androgen (dihydrotestosteron; DHT) were observed.

After determining the most proliferative effect of hormones on cancer cells, piRNA expressions were determined in these cells. In the cells which had been shown the most proliferative concentrations of hormones, the highest growth rate and decrease of adhesion was defined. According to control group, expressions of piR-651 and piR-823 were increased by treating 1 nM androgen in LNCaP cells and 10 nM androgen in PC-3 cells on 24th hour. Increased expression of piR-651 was determined in 10 nM estrogen treated MCF-7 cells and 1 nM estrogen treated MDA-MB-231 cells. Although according to control group expression of piR-823 was increased only in MDA-MB-231 cells, piR-823 expression decreased significantly in MCF-7 cells.

This study showed increasingly growing importance of piRNAs can be affected by hormones in cancer. piR-651 expression increased when hormone administered in two gender-specific type of cancer. piR-823 was determined to be increased only in malign estrogen independent breast cancer cells. It has been demonstrated that piR-823 expression may show different expressions in different types of cancer.

As a result, piR-651 and piR-823 whose expressions are thought to increase in sex-linked canceri may increase by effecting with hormones such as estrogen or androgen. Furthermore, it was observed that piR-823 expression decreased in malign breast cancer cells.

Key Words: Androgen, Cancer, Estrogen, Hormonal Regulation, piR-651, piR-823

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY	v
TABLO DİZİNİ	x
ŞEKİL DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser.....	4
2.1.1. Prostat kanseri.....	4
2.1.2. Meme Kanseri	8
2.1.3. Araştırmamızda Kullanılan Kanser Hücre Dizileri	12
2.1.3.1. Androjen bağımlı ve androjen bağımsız prostat kanseri hücre dizileri	12
2.1.3.2. Östrojen bağımlı ve östrojen bağımsız meme kanseri hücre dizileri	15
2.2. Kanser ve Epigenetik Mekanizmalar.....	17
2.3. Kodlamayan RNA Tipleri.....	18
2.3.1. Küçük Engelleyici RNA (Short Interfering/Small Interference, siRNA) ve Oluşumu	19
2.3.2. Mikro RNA (miRNA) ve Oluşumu	21
2.3.3. PIWI-Interacting RNA'lar (piRNA) ve Oluşumu.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
3.1. Hücrelerin yetiştirilmesi	30

3.1.1. Kullanılan Besiyerilerinin Seçimi	31
3.2. Standart Eğrinin Hesaplanması	32
3.3. Çoğalmanın (Proliferasyonun) En Yüksek Görüldüğü Androjen ve Östrojen Miktarlarının Belirlenmesi	33
3.4. Canlılık Belirlemeleri	33
3.5. Çoğalma (Proliferasyon) ve Tutunma (Adezyon) Belirlemeleri	34
3.6. Total RNA İzolasyonu.....	35
3.7. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Ekspresyonların Belirlenmesi.....	36
3.8. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Analizi	37
3.9. İstatistiksel Değerlendirmeler	38
4. BULGULAR	39
4.1. Standart Eğri	39
4.2. En Yüksek Çoğalmayı (Proliferasyonu) Sağlayan Androjen ve Östrojen Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	41
4.2.1. LNCaP hücrelerinin uygun konsantrasyon ve saatin belirlenmesi .	41
4.2.2. PC-3 hücrelerinin uygun konsantrasyon ve saatin belirlenmesi ...	44
4.2.3. MCF-7 hücrelerinin uygun konsantrasyon ve saatin belirlenmesi	46
4.2.4. MDA-MB-231 hücrelerinin uygun konsantrasyon ve saatin belirlenmesi	48
4.3. Çoğalma (Proliferasyon) Belirlemeleri	50
4.3.1. LNCaP hücrelerinde çoğalmanın (proliferasyonun) belirlenmesi...	50
4.3.2. PC-3 hücrelerinde çoğalmanın (proliferasyonun) belirlenmesi	50
4.3.3. MCF-7 hücrelerinde çoğalmanın (proliferasyonun) belirlenmesi ..	51
4.3.4. MDA-MB-231 hücrelerinde çoğalmanın (proliferasyonun) belirlenmesi	51

4.4.	Canlılık Belirlemeleri	52
4.4.1.	LNCaP hücrelerinde canlılığın belirlenmesi.....	52
4.4.2.	PC-3 hücrelerinde canlılığın belirlenmesi	53
4.4.3.	MCF-7 hücrelerinde canlılığın belirlenmesi	53
4.4.4.	MDA-MB-231 hücrelerinde canlılığın belirlenmesi.....	54
4.5.	Tutunma (Adezyon) Belirlemeleri	54
4.5.1.	LNCaP hücrelerinde tutunmanın (adezyonun) belirlenmesi	54
4.5.2.	PC-3 hücrelerinde tutunmanın (adezyonun) belirlenmesi	55
4.5.3.	MCF-7 hücrelerinde tutunmanın (adezyonun) belirlenmesi.....	56
4.5.4.	MDA-MB-231 hücrelerinde tutunmanın (adezyonun) belirlenmesi	56
4.6.	Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Ekspresyonların Belirlenmesi.....	57
4.6.1.	LNCaP hücrelerinde piR-651 ve piR-823 ekspresyonunun belirlenmesi	57
4.6.2.	PC-3 hücrelerinde piR-651 ve piR-823 ekspresyonunun belirlenmesi	58
4.6.3.	MCF-7 hücrelerinde piR-651 ve piR-823 ekspresyonunun belirlenmesi	59
4.6.4.	MDA-MB-231 hücrelerinde piR-651 ve piR-823 ekspresyonunun belirlenmesi	60
4.7.	ELISA	61
4.7.1.	Prostat kanser hücre dizilerinde androjen miktarının belirlenmesi	61
4.7.2.	Meme kanser hücre dizilerinde östrojen miktarının belirlenmesi..	62
5.	TARTIŞMA.....	64
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	73
	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	74

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1 piRNA'ların İlişkili Olduğu Ortaya Konan Proteinler (Pandya vd., 2014 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)	25
Tablo 2.2 Kısa Kodlamayan RNA'lar Arasındaki Farklılıklar (Pandya vd., 2014 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)	27
Tablo 3.1 Real Time PCR'da Kullanılan Primerler (Cheng, 2011; Cui, 2011; Cheng, 2012)	36
Tablo 4.1 MCF-7 Hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerinde Ölçülen Hücre Sayıları ($p>0.05$)	46
Tablo 4.2 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerde Ölçülen Hücre Sayıları ($p>0.05$)	48

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1 Testosteron ve östrojen hormonlarının düzenlenmesi (Engel, 2007 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)	6
Şekil 2.2 Androjen Bağımlı ve Bağımsız Prostat Kanseri Oluşum Mekanizması (Feldman ve Feldman, 2001 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)	8
Şekil 2.3 Meme Anatomisi.....	9
Şekil 2.4 Östrojen Bağımlı ve Bağımsız Meme Kanseri Oluşum Mekanizması (Elizabeth ve Robert, 2009 literatüründen değiştirilerek alınmıştır).....	10
Şekil 2.5 Testosteronun Çekirdek İçine Taşınması (http://www.kaanaydos.com.tr/androjen-reseptoru-ve-aktivasyoadresinden değiştirilerek alınmıştır)	12
Şekil 2.6 Kaderin-Katenin Kompleksi (Tian vd., 2011 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)	14
Şekil 2.7 Transkripsiyon Sonrası Görülen Değişim Mekanizması (Fire vd., 2005 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)	19
Şekil 2.8 siRNA Oluşumu (Siomi, 2011 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)	20
Şekil 2.9 miRNA Oluşum Mekanizması (Siomi, 2011 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)	22
Şekil 2.10 piRNA Biyogenezi (R. J. Ross, Weiner ve Lin, 2014 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)	29
Şekil 3.1 Çalışmamızda Kullanılan Prostat Kanseri Hücre Dizileri. A ; LNCaP, B ; PC-3	30
Şekil 3.2 Çalışmamızda Kullanılan Meme Kanseri Hücre Dizileri. A ; MCF-7, B ; MDA-MB-231.....	31
Şekil 3.3 Standart Eğri Hesaplanması Deney Düzeni	33
Şekil 3.4 Tripin Blue ile Canlılık Belirlenmesi Deney Düzeni	33
Şekil 3.5 Çoğalma (Proliferasyon) ve Tutunma (Adezyon) Deney Düzeni	35

Şekil 3.6 ELISA Deney Düzeneneği.....	37
Şekil 4.1 LNCaP Hücrelerinin Standart Eğri Grafiği	39
Şekil 4.2 PC-3 Hücrelerinin Standart Eğri Grafiği.....	40
Şekil 4.3 MCF-7 Hücrelerinin Standart Eğri Grafiği	40
Şekil 4.4 MDA-MB-231 Hücrelerinin Standart Eğri Grafiği.....	41
Şekil 4.5 Androjen Bağımlı Prostat Kanseri Hücre Dizisi olan LNCaP'in 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) Saatlerindeki Hücre Sayıları *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.....	43
Şekil 4.6 Androjen Bağımsız Prostat Kanseri Hücre Dizisi olan PC-3'ün 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) Saatlerindeki Hücre Sayıları *p<0.05.....	45
Şekil 4.7 Östrojen Bağımlı Meme Kanseri Hücre Dizisi olan MCF-7'nin 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) Saatlerindeki Hücre Sayıları	47
Şekil 4.8 Östrojen Bağımsız Meme Kanseri Hücre Dizisi olan MDA-MB-231'in 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) Saatlerindeki Hücre Sayıları	49
Şekil 4.9 LNCaP Hücrelerinin Çoğalma (Proliferasyon) Grafiği ***p<0.001	50
Şekil 4.10 PC-3 Hücrelerinin Çoğalma (Proliferasyon) Grafiği	51
Şekil 4.11 MCF-7 Hücrelerinin Çoğalma (Proliferasyon) Grafiği *p<0.05 ...	51
Şekil 4.12 MDA-MB-231 Hücrelerinin Çoğalma (Proliferasyon) Grafiği.....	52
Şekil 4.13 LNCaP Hücrelerinin Canlılık Grafiği *p<0.05, ***p<0.001	52
Şekil 4.14 PC-3 Hücrelerinin Canlılık Grafiği	53
Şekil 4.15 MCF-7 Hücrelerinin Canlılık Grafiği *p<0.05.....	53
Şekil 4.16 MDA-MB-231 Hücrelerinin Canlılık Grafiği	54
Şekil 4.17 LNCaP Hücrelerinin Tutunma (Adezyon) Grafiği *p<0.05	55
Şekil 4.18 PC-3 Hücrelerinin Tutunma (Adezyon) Grafiği **p<0.01.....	55
Şekil 4.19 MCF-7 Hücrelerinin Tutunma (Adezyon) Grafiği	56
Şekil 4.20 MDA-MB-231 Hücrelerinin Tutunma (Adezyon) Grafiği	57

Şekil 4.21 LNCaP Hücrelerinde Belirlenen piR-651 (A) ve piR-823 (B) Ekspresyonları ***p<0.001	58
Şekil 4.22 PC-3 Hücrelerinde Belirlenen piR-651 (A) ve piR-823 (B) Ekspresyonları ***p<0.001	59
Şekil 4.23 MCF-7 Hücrelerinde Belirlenen piR-651 (A) ve piR-823 (B) Ekspresyonları ***p<0.001	60
Şekil 4.24 MDA-MB-231 Hücrelerinde Belirlenen piR-651 (A) ve piR-823 (B) Ekspresyonları ***p<0.001	61
Şekil 4.25 LNCaP (A) ve PC-3 (B) Hücrelerinde Androjen Miktarı	62
Şekil 4.26 MCF-7 (A) ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinde Östrojen Miktarı ***p<0.001.....	63

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

CTA	Kanser Testis Antijenleri
PSA	Prostat Spesifik Antijen
α	Alfa
β	Beta
miRNA	Mikro RNA
piRNA	PIWI-Interacting RNA
DNMT3	DNA Metil Transferaz III
piR-651	piRNA-651
piR-823	piRNA-823
LHRH	Lüteinize Edici Hormonu Salan Hormon
LH	Lüteinize Hormon
FSH	Folikül Düzenleyici Hormon
AR	Androjen Reseptörü
DHT	Dihidrotestosteron
IGF-1	İnsülin Growth Faktör-1
JAK/STAT	Janus Kinaz/Sinyal İletici Ve Transkripsyonu Aktive Edici
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol-3-Kinaz/ V-Akt Mürin Timoma Viral Onkogen Homolog Kinaz
MAPK	Mitojenle Aktiflenen Protein Kinaz
ARE	Androjene Cevap Veren Elementler
BRCA-1	Breast Cancer-1
BRCA-2	Breast Cancer-2
LOH	Heterozigotluğun Kaybı
ALA	5-aminolevulinik asit
PpIX	Protoporfirin IX
AP-1	Androjen Protein 1
HER-2	Human Epidermal Growth Factor 2
ER	Östrojen Reseptörü
UV	Ultraviyole
DNMT	DNA metiltransferaz
siRNA	Small İnterfering RNA
RNAi	RNA İnterferans
sRNA	Küçük RNA
dsRNA	Çift Sarmal RNA
snoRNA	Küçük Nükleolar RNA

RISC	RNA İndükleyen Susturma Kompleksi
mRNA	Mesajcı RNA
nt	Nükleotid
Pri-miRNA	Primer miRNA
Pre-miRNA	Prekürsor miRNA
AGO 2	Argonat 2 Proteini
ATP	Adenozin Trifosfat
KCl	Potasyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
TRBP	Trans Aktive Eden RNA Bağlayan Protein
PACT	PKR Kinazın Aktivator Proteini
3'-UTR	3'-Kodlanmayan Bölge (3'-Untranslated Region)
AGO	Argonat Proteini
asiRNA	Tekrarlayan İlişkili Küçük Engelleyici RNA
HP-1a	Heterokromatin Protein-1a
Vret	Vreteno
Shu	Shutdown
Zuc	Zucchini
2'-O	2. Karbonundaki Oksijen Atomu
Chk 2	Checkpoint Protein Kinaz
FBS	Fetal Bovin Serum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FCS	Fetal Calf Serum
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi
GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
NTC	Primer konulmayan kontrol grubu (no template control)
HRP	Horse RAddish Peroksidaz
DC-FBS	Dextran-Chorcal Fetal Bovin Serum

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hem genetik hem de çevresel koşulların değişmesiyle görülme sıklığı her geçen gün artan karmaşık bir hastalıktır. Kanser hücreleri, biyolojik olarak kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyaranlara (ligandlara) gereksinim duymama, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlaşma, apoptozdan kaçabilme, anjiogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme özelliklerine sahiptir (Aköz vd., 2000; Albert, 2007). Kanser hücreleri ile kök hücreler ve eşey hücreleri, kendini onarabilme ve hızlı çoğalma gibi önemli birçok biyolojik durum açısından benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmalar eşey hücrelerinde gelişim sırasında eksprese olan genlerin proto-onkogen ya da onkogen olarak görev aldığını göstermektedir. Testisteki eşey hücrelerinde normal olarak eksprese olan tümör antijeni, kanser/testis antijenleri (CTA), melanoma, meme, mesane, gastrik, akciğer, sarkoma, rahim, prostat ve hepatosellüler kanser gibi çoğu kanser türünde de eksprese olmaktadır. Kanserdeki CTA'lar tümör fenotipindeki ölümsüzlük, invaziv karakter, immün sistemden kaçış ve metastatik kapasiteyi de içeren tümör oluşum mekanizmalarında görülmektedir. Bu da kanserlerin erken tanısında ve kanserde biyomarker olarak alabileceklerini göstermektedir (Costa, Le Blanc ve Brodin, 2007; He vd., 2007; Cheng vd., 2011; Simpson vd., 2005).

Cinsiyet steroid hormonları erkeklerde prostat, kadınlarda rahim ve meme kanseri başta olmak üzere üreme organlarında meydana gelen kanserlerin çoğunun gelişimi ve işleyişinde önemlidir (Ni vd., 2011). Prostat kanseri erkeklerde en yaygın görülen kanser türüdür (Cooperberg, Park ve Carroll, 2004). Prostat kanseri olan veya prostat kanseri geçirmiş baba, kardeş veya amca gibi yakın bir erkek akrabanız varsa, sizin de hastalığa yakalanma riskiniz artar. Prostat kanseri, prostat-spesifik antijenin (Ipsaro, Haase, Knott, Joshua-Tor ve Hannon, 2012) üretimini artırır. Prostat kanseri tedavileri kapsamında prostat bezinin çıkarılması, hormon tedavisi ve radyoterapi yer alır. Prostat kanseri daha çok lenf noduna ya da kemiğe metastaz yapabilmektedir (Feldman ve Feldman, 2001). Steroid bir hormon olan androjen prostat kanserinin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Palmer vd., 2008). Prostat kanseri androjen bağımlı ve bağımsız olmak üzere gelişmektedir. Androjen bağımlı prostat kanser hücreleri, prostat kanserinin gelişiminin erken safhalarında testosterondan 5 α -redüktaz enzim sistemi tarafından oluşturulan 5 α -dihidrotestosterona gerek duymaktadır. Bu hücreler ilk safhada androjene duyarlıdırlar ancak büyümeleri için gerek duymazlar. Androjen bağımsız prostat kanser hücreleri ise, kanser gelişiminin ileri safhalarında görülüp bu safhadan sonra kanser hücreleri büyümek için androjene ihtiyaç duymazlar. Bu tip kanser hücrelerindeki androjenin etkisizliği, androjen reseptöründeki mutasyon, amplikasyon ya da delesyon gibi değişimlere bağlıdır (Feldman ve Feldman, 2001; Litvinov, De Marzo ve Isaacs, 2003; Bagga vd., 2005).

Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra, dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanser tipidir. Her sekiz kadından birinin hayatının belirli bir zamanında meme kanserine yakalanabileceği bildirilmektedir. Erkeklerde de görülmekle beraber, kadın vakalar erkek vakalardan yüz kat fazladır. Meme kanseri süt üreten ya da süt taşıyan dokulardaki hücrelerden köken alır (Kierszenbaum, 2006). Meme kanserinin yaklaşık % 80'i süt (laktifer) kanalların epitel tabakalarından köken alır. Laktifer kanallardaki epitel hücre tabakaları östrojen reseptörüne sahiptir ve meme tümörlerinin yaklaşık % 50-85'i östrojen reseptörü içerir. Alfa (α) ve beta (β) olmak üzere iki tip östrojen reseptörü vardır. α reseptörü β reseptöründen daha fazla östrojene bağlanma yeteneğine sahiptir. β reseptörü, α reseptörünün fizyolojik düzenleyicisi olarak rol oynar. Östrojen reseptörlerinin her ikisi de sitozolde görülür (Horoszewicz, 1983). Normal meme dokularına oranla saldırgan (invaziv) tümörlerde α reseptörünün ekspresyonu β reseptöründen daha fazladır. Bu bulgular, gelişen meme tümörlerindeki olası risklerde ve dokuların östrojene duyarlılığını belirlemede reseptörler arasındaki iletişiminin önemli olduğunu göstermektedir. Östrojen bağımlı tümörlerin çoğu, östrojen hormonunun etkisini azaltan ya da ortadan kaldıran antiöstrojenik tedaviden sonra (tamoksifen uygulaması) geriler (Kierszenbaum, 2006).

Kanser başta olmak üzere çoğu hastalığın oluşumunda ve gelişiminde kodlamayan RNA'ların önemli epigenetik düzenleyici olduğu görüşü her geçen gün artan çalışmalarla desteklenmektedir (Zhou, Hu ve Lai, 2010; Esteller, 2011). Son dönemde kodlamayan RNA'lardan mikro RNA'ların (miRNA) tümör oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte tümörögenizde PIWI-interacting RNA (piRNA) ve PIWI proteinlerinin de etkili olduğunu son çalışmalar göstermektedir (Cheng vd., 2011). Kısa kodlamayan RNA'ların yeni bir sınıfı olan piRNA'lar, kanser tiplerinin çoğunda tümörün oluşumunda görev almaktadır (Cheng vd., 2011; Cheng vd., 2012; Law vd., 2013; Zhang vd., 2013; Cui vd., 2011). piRNA'lar, eşey hücrelerinde, invaziv transpozon elemanlardan genomu koruyan, endojen kaynaklı kodlamayan küçük RNA'lardır (Aravin vd., 2006). piRNA'lar özellikle eşey kök hücrelerinde olmak üzere DNA metilasyonu üzerinden epigenetik olarak transpozonların susturulmasıyla genom bütünlüğünü sağlamaktadır. Erkek eşey kök hücrelerinde piRNA'lar DNA metil transferaz olan DNA Metil Transferaz III (DNMT3)'ün ekspresyonunu etkiler. DNMT3 tarafından DNA metilasyonu gerçekleştirildiği sırada piRNA'ların hareketli DNA parçacığı olan transpozonları susturduğu gözlenmiştir (Cheng vd., 2011).

Çalışmamızda hormon bağımlı ve bağımlı olmayan kanser hücrelerine hormon uygulanmasından sonra, çoğalmada (proliferasyon), tutunmada (adezyon) ve piRNA'larda görülen farklılıklar incelendi. Bu piRNA'ların sadece hormona bağlı kanserlerde mi yoksa hormon bağımsız ilerleyen kanserlerde de mi etkili olduğu ortaya konacaktır. Bu amaçla, androjen bağımlı ve bağımsız prostat kanser hücrelerine (PC-3 ve LNCaP) androjen

hormonu; östrojen bağımlı ve bağımsız meme kanser hücrelerine (MCF-7 ve MDA-MB-231) östrojen hormonu uygulanarak hücre çoğalması (proliferasyonu), tutunması (adezyon), canlılık, hormon ekspresyonu incelenmiştir. Ayrıca eşeye bağılı kanserlerde etkili olduğu düşünölen piRNA'lerden piRNA-651 (piR-651) ve piRNA (piR-823) ekspresyonları belirlenmiştir.

piRNA'lar cinsiyete bağılı kanserlerle ilişkilidir ve çeşitli araştırmalarla bu ilişki ortaya konmuştur. Cinsiyete bağılı kanserin oluşum ve gelişiminde hormonların etkisi büyüktür. Yapılan araştırmalarda piRNA'lar ve hormon ilişkisi henüz ortaya konmamıştır. Bu nedenle androjen bağımlı ve bağımsız prostat kanseri (LNCaP ve PC-3) ile östrojen bağımlı ve bağımsız meme kanseri (MCF-7 ve MDA-MB-231) hücre dizilerinin hormonal düzenlenmesi, gastrik kanser başta olmak üzere çeşitli kanserlerde gösterilmiş olan piR-651 ve piR-823 ekspresyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Araştırmada kullanılan iki kanser tipinin de hormon bağımlı zayıf invaziv MCF-7 ve LNCaP, diğeri hormon bağımsız güçlü invaziv MDA-MB-231 ve PC-3 özelliktedir. Bir taraftan kanser olgusunda etkili olan hormonların piRNA'lar üzerine etkileri araştırılırken; diğeri taraftan da kanser hücrelerinin davranışları üzerine olan etkileri ve ilişkisi de ortaya konabilecektir. Elde edilen veriler bize piRNA'ların kanser ve metastazında etkilerinin hormonal regölasyon etkileşimi ile çalışıp çalışmadığını gösterecektir. Araştırmamızın sonucunda hipotezimizi destekleyen bulgular kanser ve metastazında östrojen ve androjen hormonlarının piRNA ekspresyonu üzerine direkt etkileri literatürde ilk defa ortaya konulacaktır. Böylece piRNA'ların kanserde yeni terapötik strateji olarak kullanılması, ileri dönemde hedefe yönelik yeni ilaçların geliştirilmesi ve yaşam kalitesinin artırılmasına yönelik katkılar sağlayabilmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser günümüzde en çok görülen hastalık tipi olup erken tanı ve tedavi için çalışmalar devam etmektedir. Kanser, hücre kontrol mekanizmalarına yanıt veren normal hücrelerin bu mekanizmaların kontrolünden çıkıp, kontrolsüz olarak büyüeyebilen ve vücudun diğer dokularına saldıran tümörlerin olduğu bir hastalık grubudur (Chiang ve Massague, 2008). Kanser hücreleri, biyolojik olarak kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünmek için dış uyaranlara (ligandlara) gereksinim duymama, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere karşı duyarsızlaşma, apoptozdan kaçabilme, anjiogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme özelliklerine sahiptir (Aköz vd., 2000; Albert, 2007). Karsinogenez; homeostatik "feedback" mekanizmalara yanıt veren normal hücrelerin, bu mekanizmaların kontrolünden çıkıp, kontrolsüz ve birbirlerinden bağımsız olarak büyüeyebilen ve komşu dokulara saldırabilen hücre şekillerine dönüşmeleridir (Chiang ve Massague, 2008). Metastaz, kanser hücrelerinin buldukları mikro çevrelerden yakın ya da uzak mikroçevrelere hareket edebilme yeteneğidir. Böylece tümör hücreleri besin ve oksijen açısından daha yüksek seviyeli mikroçevrelere giderek sayılarını arttırmaları. Yeni bir dokuda çoğalmak üzere yayılırlar. Bu da dokunun ölümüyle ya da işlev kaybıyla sonuçlanır (Bagga vd., 2005).

Kanser hücreleri, kök hücreleri ve eşey hücrelerinde olduğu gibi, kendini onarma ve hızlı çoğalma gibi sayısız önemli biyolojik gelişimler açısından benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmalar eşey hücrelerinde gelişim sırasında eksprese olan genlerin proto-onkogen ya da onkogen olarak görev aldığını göstermektedir. Testisteki eşey hücrelerinde normal olarak eksprese olan tümör antijeni, kanser/testis antijenleri (CTA), melanoma, meme, mesane, gastrik, akciğer, sarkoma, rahim, prostat ve hepatosellüler kanser gibi çoğu kanser türünde de eksprese olmaktadır (Cheng, Wong ve Cheng, 2011). Kanserdeki CTA'lar tümör fenotipindeki ölümsüzlük, invaziv karakter, immün sistemden kaçış ve metastatik kapasiteyi de içeren tümör oluşum mekanizmalarında görülmektedir (Costa vd., 2007). Bu da kanserlerin erken tanısında biyomarker olarak kullanılmalarını sağlamaktadır (He vd., 2007; Simpson vd., 2005). Cinsiyete bağlı steroid hormonlar erkeklerde prostat, kadınlarda rahim ve meme kanseri başta olmak üzere üreme organlarında meydana gelen kanserlerin çoğunun gelişimi ve işleyişinde önemli yere sahiptir (Ni vd., 2011).

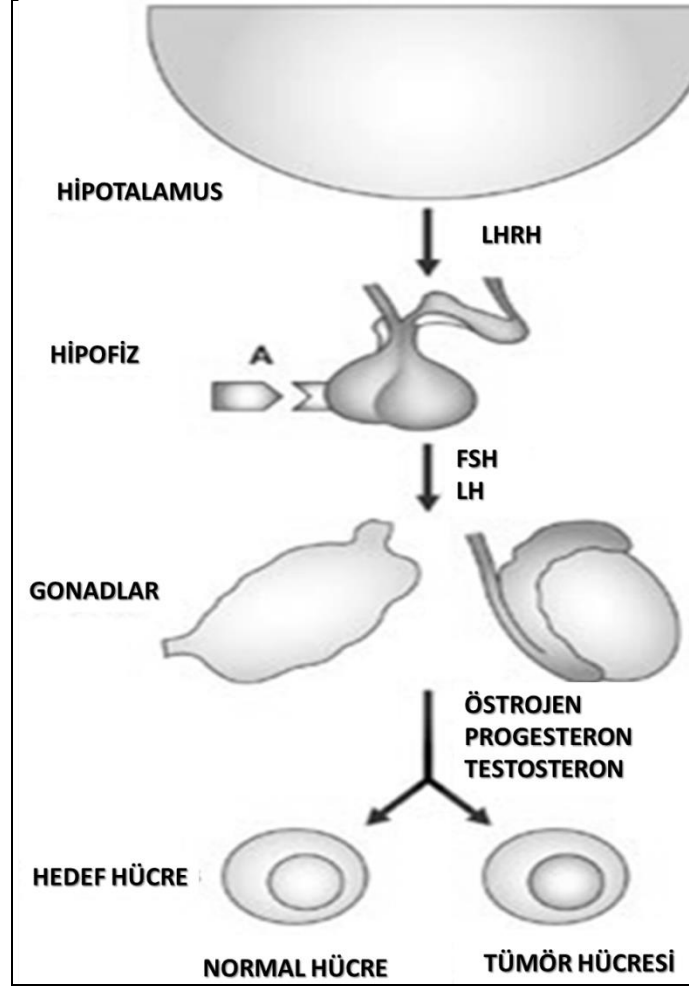
2.1.1. Prostat kanseri

Prostat kanseri erkekler arasında en yaygın görülen kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerde ikinci sırayı almaktadır (Cooperberg vd., 2004). Prostat kanserine yakalanma olasılığı yaşla birlikte artar, olguların çoğu 65

yaş ve üstü erkeklerde görülür. Prostat kanserinde genellikle kanser dokusu üretraya (idrar kesesini penise bağlayan kanal) baskı yapacak kadar büyümeden önce herhangi bir belirti vermez. Prostat kanseri olan veya prostat kanseri geçirmiş baba, kardeş veya amca gibi yakın bir erkek akrabada görülmesi hastalığa yakalanma riskini arttırır. Prostat kanseri prostat-spesifik antijenin (Ipsaro, Haase, Knott, Joshua-Tor ve Hannon, 2012) üretimini artırır. Bu nedenle, kandaki PSA düzeyini ölçen PSA testi prostat kanserinin erken teşhisine olanak sağlayabilir. Prostat kanseri tedavileri kapsamında prostat bezinin çıkarılması, hormon tedavisi ve radyoterapi yer alır. Prostat kanseri daha çok lenf noduna ya da kemiğe metastaz yapabilmektedir (Feldman ve Feldman, 2001). Prostat kanserinin kemiklere metastaz yapmamış olması, kanserin erken tanı ve tedavi edilmesini kolaylaştırıp sağkalımı artırır (Russell ve Kingsley; Feldman ve Feldman, 2001).

Huggins ve Hodges'ın 1941 yılında prostat kanseri tedavisinde androjen eksikliğinin sonuçlarını bildirdikten sonra hormonal tedavinin prostat kanserinin ileri evre tedavisinde başlıca tedavi seçeneği olduğu düşünülmüştür (Huggins ve Hodges, 2002). Ancak daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda uygulanan androjen miktarının tedavi için önemli olduğu, yüksek konsantrasyonda androjen erken evredeki iyi huylu prostat kanseri hastalarına uygulanırsa, kanserin daha agresif hale gelebileceği desteklenmiştir. Uygun miktarda androjenler sağlıklı bireylerde normal maskülinizasyon, dış genitalerin gelişimi, kemik ve kardiyovasküler düzenlenme, eritrositlerin korunması, spermatogenez, cinsel istek, prostat bezinde fizyolojik büyüme ve fonksiyon için gereklidir (Morley, 2000).

Sağlıklı bireylerde prostat dokusunun gelişimi, farklılaşması ve sağkalımı androjenlere, özellikle testosteron ve dihidrotestosterona bağlıdır. Androjen hormonları testosteron, dihidrotestosteron, androstenedion, 17-alfahidroksiprogesteron ve dihidroepiandrostenon'dur. Bu androjenlerin bulunmadığı durumlarda prostat dokusu apoptoza gider ve belirgin atrofi gelişir (Trapman ve Brinkmann, 1996). Testosteron steroid bir hormon olup, doğumdan önce ve sonra testis gelişimini etkilemektedir. Doğumdan sonra testosteron seviyesi erkek gelişiminde 4-6 ay içinde artar (Shalet, 2009). Testosteron salınımı hipotalamus-hipofiz-gonad yolu üzerinden kontrol edilmektedir. Lüteinize edici hormonu salan hormon (LHRH) dekapeptit yapısındadır ve hipotalamustan salgılanır. Plazma yarı ömrü 2-5 dakika olup serum proteazlar tarafından hızlı şekilde parçalanır. LHRH, hipofizden lüteinize hormon (LH) ve folikül düzenleyici hormon (FSH) salınımına neden olur. LH testiste leydig hücrelerini uyararak testosteron salınımına neden olur (Page vd., 2006; Engel ve Schally, 2007)(Şekil 2. 1).



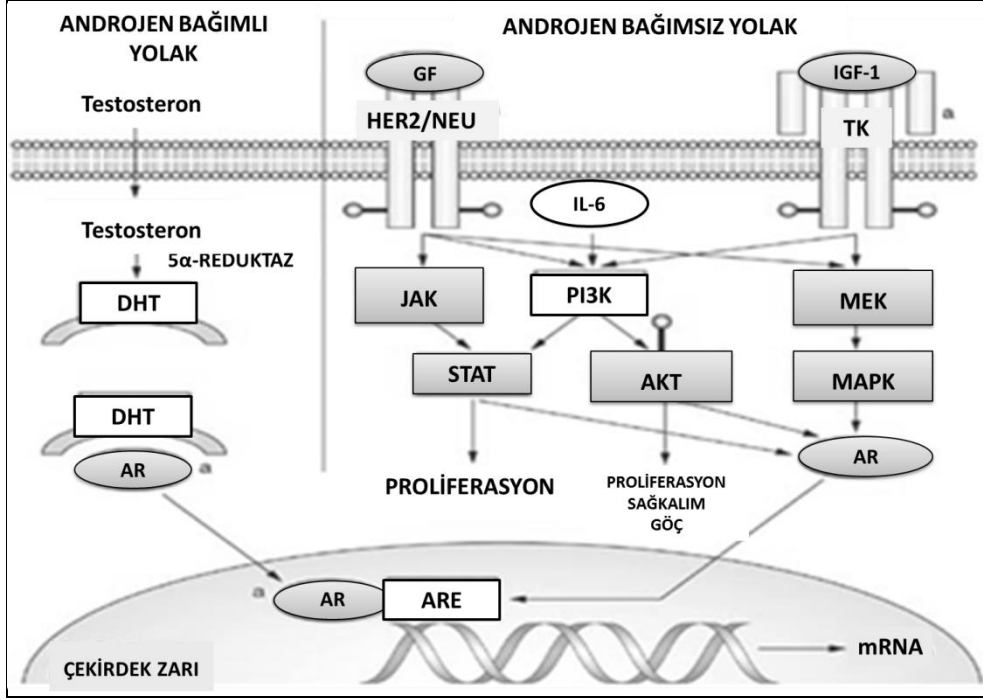
Şekil 2.1 Testosteron ve östrojen hormonlarının düzenlenmesi (Engel, 2007 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)

Testosteron seviyesi gelişme sırasında genitoüriter organlar, kaslar, iskelet, spermatogenez ve erkek fertilitesi gibi ikincil seks karakterlerinin oluşumuna destek olmaktadır (Sengupta, 2013). Testosteron yetersizliği hipogonadizm, iktidarsızlık ve testisle ilişkili hasarlara neden olmaktadır (Kang, Moon, Lee, Han, 2014). Testosteronun kendisi tümör oluşumuna neden olmamakla birlikte tümör hücrelerinin devamı için gereklidir (Walsh, 1975).

Androjenlerin prostat hücreleri üzerindeki çoğaltıcı ve farklılaştırıcı etkileri androjen reseptörü (AR) aracılığıyla gerçekleşir. Dihidrotestosteronun (DHT) AR ile bağlanması sonucunda prostat hücresi içerisinde oluşan DHT-AR kompleksi DNA sentezini ve hücre çoğalmasını uyaracak olan DNA'daki androjen yanıt elemanına bağlanır (Çal ve Şimşir, 2005). En iyi bilinen androjenle düzenlenen gen PSA'yı kodlayan gendir (Litvinov vd., 2003). Androjen varlığı prostattaki epitel ve stromal hücrelerin sayısının artmasına ve farklılaşmasına neden olurken, androjen yokluğu apoptoza yol açmaktadır (Litvinov vd., 2003).

Prostatik kanserinin oluşumunda androjenlerin rolü belirsizlikler içermesine rağmen geç evre prostat kanseri sağkalımında etkin sistemik tedavi seçeneği androjenlerin baskılanmasıdır. Androjen baskılanması, dolaşımdaki androjenin azaltılması veya androjen reseptörlerinin inhibisyonuyla uygulanmaktadır (Çal ve Şimşir, 2005). Yüksek affinite gösteren spesifik androjen reseptörleri tümörde ve kültür hücrelerinin nüklear bölümlerinde ve sitozolünde bulunmaktadır. İn vitro 5 α -dihidrotestosteron hücre büyümesi ve asid fosfatazların üretimini düzenlemektedir (Horoszewicz, 1983). Erken prostat kanserinin oluşumu için androjen bağımlı prostat kanser hücreleri, testosteronun 5 α -redüktaz enzim sistemi tarafından 5 α -dihidrotestosterona çevrilmesine gerek duymaktadır. Bu hücreler androjene kanserin ilk oluşumu sırasında cevap verirler ancak büyümeleri için gerek duymazlar. Androjen bağımsız prostat kanseri hücreleri çoğalmak ve gelişmek için androjene ihtiyaç duymayan hücrelerdir. Androjene karşı bağımlı olmama durumu, androjen reseptöründe görülen mutasyon, amplikasyon ya da delesyon gibi değişimlere bağlıdır (Feldman ve Feldman, 2001)(Şekil 2. 2). Hormonal uygulamalar tümör gelişiminin serum androjen seviyelerine bağlı olduğunu göstermiştir. Hücre büyüme oranı eşeye ya da kaynağın hormonal durumuna bağlı değildir (Horoszewicz, 1983).

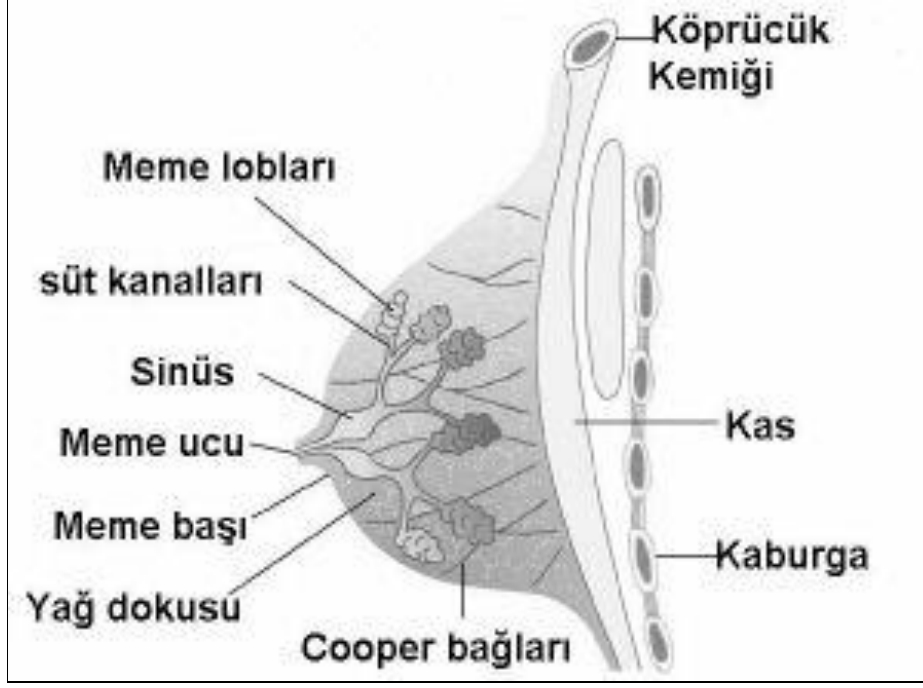
Hormon bağımsız yolda, büyüme faktörlerine duyarlı heterodimerik reseptörler ya da homodimerik tirozin kinaz reseptörleri insulin growth faktör 1 (IGF-1) gibi büyüme faktörüyle uyarılır. Uyarılan reseptörler hücre sayısının artmasında, hücre sağkalımında ya da hücre göçünde etkili olan Janus kinaz/sinyal iletici ve transkripsiyonu aktive edici (JAK/STAT), fosfatidilinositol-3-kinaz/ v-akt mürin timoma viral onkogen homolog kinaz (PI3K/AKT) ya da mitojenle aktiflenen protein kinaz (MAPK) yollarını aktif hale getirir. Yolların aktif hale gelmesi sonucunda sitozoldeki androjen reseptörü aktif hale gelerek çekirdek içine girer. Çekirdek içine giren aktif androjen reseptörü androjene cevap veren elementlerin (ARE) oluşumuna ve sonucunda ise hücre çoğalması ve sağkalımının artmasına neden olmaktadır (Şekil 2. 2).



Şekil 2.2 Androjen Bağımlı ve Bağımsız Prostat Kanseri Oluşum Mekanizması (Feldman ve Feldman, 2001 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)

2.1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra, dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanser tipidir. Her sekiz kadından biri hayatının belirli bir zamanında meme kanserine yakalanabilir. Erkeklerde de görülmekle beraber, kadın vakaları erkek vakalarından yüz kat fazladır. Meme kanseri süt üreten ya da süt taşıyan dokulardaki hücrelerden köken alır (Kierszenbaum, 2006). Meme kanserinin yaklaşık % 80'i süt (laktifer) kanallarının epitel tabakalarından köken alır. Laktifer kanallardaki epitel hücre tabakaları östrojen reseptörüne sahiptir ve meme tümörlerinin yaklaşık % 50-85'i östrojen reseptörü içerir (Kierszenbaum, 2006) (Şekil 2. 3).

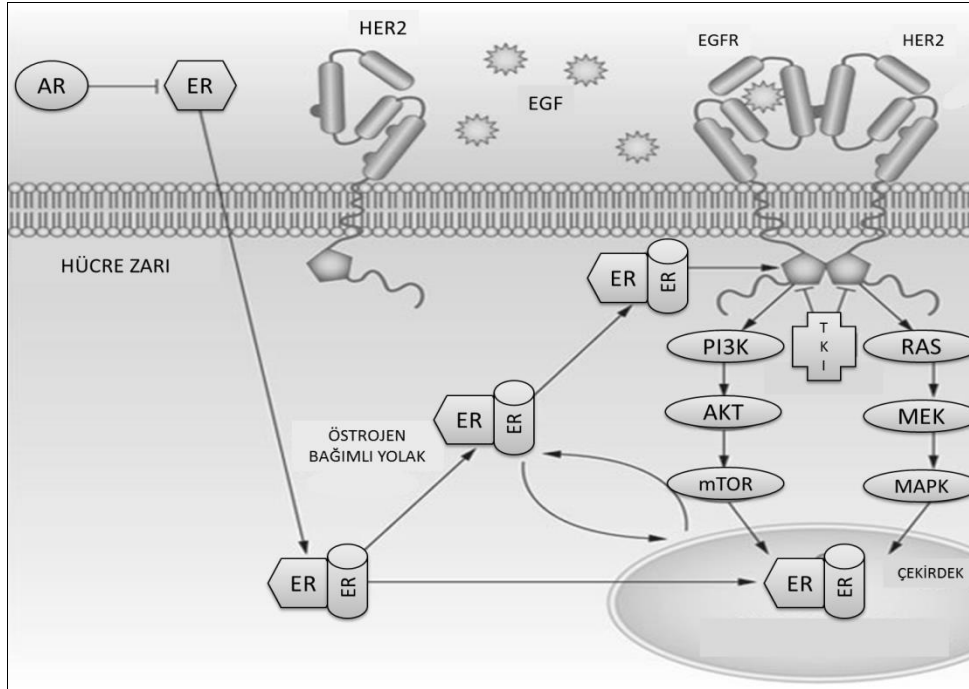


Şekil 2.3 Meme Anatomisi

Alfa (α) ve beta (β) olmak üzere iki tip östrojen reseptörü vardır. α reseptörü β reseptöründen daha fazla östrojene bağlanma yeteneğine sahiptir. β reseptörü, α reseptörünün fizyolojik düzenleyicisi olarak rol oynar. Östrojen reseptörlerinin her ikisi de sitozolde görülür (Horoszewicz, 1983). Normal meme dokularına oranla saldırgan (invaziv) tümörlerde α reseptörünün ekspresyonu β reseptöründen daha fazladır. Bu bulgular gelişen meme tümörlerindeki olası risklerde ve dokuların östrojene duyarlılığını belirlemede reseptörler arasındaki etkileşimin önemli olduğunu göstermektedir. Östrojen bağımlı tümörlerin çoğu antiöstrojenik tedaviden sonra (antiöstrojen olan tamoksifen ile tedaviden sonra) geriler (Kierszenbaum, 2006).

Hastalığın tanısında bireylerin kendisini elle muayene etmesi önemlidir, rutin kontroller ve 40 yaşın üzerinde yılda bir kez mamografi çektirilmesi önerilir. Memede kitle saptandığında kanser olup olmadığını anlamak için biyopsi yapılır. Meme kanseri tedavi şansı yüksek kanserlerdendir, en sık tedavi şekli cerrahidir. Meme kanserinin cerrahi tedavisinde genellikle meme dokusunun tümü alınır. Koltuk altı lenf bezleri de çıkartılarak muhtemel yayılma engellenir. Koltuk altı (aksiller) lenf düğümü metastazları en önemli teşhis faktörüdür (Kierszenbaum, 2006). Eğer kanser yayılmışsa radyoterapi yada kemoterapi uygulanır. Özel kimyasal maddelerle boyanan tümör hücrelerinin tipi anlaşıldıktan sonra östrojen ve progesteron algılayıcılarını bloke eden ilaçlar kullanılarak tümörün büyümesi engellenir. Meme kanseri hücreleri normal büyüme faktörü östrojene ihtiyaç duymadan bölünebilir (Şekil 2. 4). Bazı meme kanser hücreleri, hücre içerisinde yer alan östrojen reseptörünün ekspresyonunun kapatılmasıyla östrojene tepki verme yeteneğini

kaybeder. Hücreler, büyümeyi engelleyen sinyaller gibi dış uyarılara cevap vermeden bölünmeye devam ederler (Elizabeth ve Robert, 2009).



Şekil 2.4 Östrojen Bağımlı ve Bağımsız Meme Kanseri Oluşum Mekanizması (Elizabeth ve Robert, 2009 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)

Östrojen hormonları estradiol, estriol, estran ve türevlerini kapsar. Ovaryum steroidleri tarafından normal meme dokusundaki büyümenin düzenlenmesi, meme gelişimi ve fonksiyonunun düzenlenmesinde önemlidir (Winter ve Couch, 1995; Miller ve O'Neill, 1999). Hem östrojen hem de progesteron normal meme dokusunda mitojenik özelliklere sahiptir (Miller ve O'Neill, 1999). Çoğu meme tümörü, gelişim sırasında büyümenin devam edebilmesi için östrojene ihtiyaç duymaktadır. Aktif östrojenlerin intrasellüler konsantrasyonlarını düzenleyen işlemler meme kanserinin etiyolojisini etkileme yeteneğine sahiptir. Tamoksifen gibi terapötik ajanların östrojen düzenlenmesine karşı meme kanseri hücrelerinin cevap vermesini sağlamada görev aldıkları düşünülmektedir (Jordan ve Murphy, 1990). Postmenopozal kadınlarda östrojen replasman (eksik olanı yerine koyma) tedavisi meme kanseri için risk faktörü olarak değerlendirilmiştir. Premenopozal kadınlarda, ovaryumlar en önemli östrojen kaynağıdır. Meme bezi, metastazı kolaylaştıran zengin kan ve lenf sistemine sahiptir (Kierszenbaum, 2006). Meme kanseri; lenf nodülüne, kemiklere, akciğerlere, beyine ve karaciğere hatta erkeklerde daha uzak mesafedeki prostata kadar yayılabilmektedir (Feng vd., 2010).

Meme kanserlerinin onda birinde genetik bozukluk tespit edilmektedir. Kendiliğinden oluşan meme kanserinden farklı olarak otozomal dominant kalıtsal geçiş gösteren meme kanser türünün olduğu düşünülmektedir. 1990'larda breast cancer-1 (BRCA-1) ve breast cancer-2

(BRCA-2) meme kanserinde belirlenen tümör baskılayıcı genleri tanımlanmıştır. Bu iki gen birlikte tüm meme kanseri vakalarının %5-10'undan sorumludur (Kierszenbaum, 2006). BRCA-1, meme bezinin epitel hücrelerinin çoğalmasıyla ilgili östrojen bağımlı transkripsiyon yollarını baskılar. Buradaki bir mutasyon nedeniyle bu yeteneğin kaybı, tümör oluşumunu kolaylaştırılabilir. BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinde mutasyon olan kadınlar invaziv meme ve ovaryum kanseri riski altındadırlar (Kierszenbaum, 2006). Bu genleri taşıyan bireylerin hayat boyu meme kanserine yakalanma riskleri %60-90, yumurtalık kanserine yakalanma riskleri ise %20-60'tır. BRCA-1 ve BRCA-2 genlerindeki mutasyon sonucu aile hikayelerinde prostat kanseri ve meme kanseri görülen erkeklerde de hem prostat hem de meme kanserine yakalanma riski artmıştır (Bozcuk, 2005). Gen tedavisi meme kanseri için deneme aşamasında olan bir yöntemdir (Hossfeld ve Sherman, 1992; Kutluk ve Kars, 1994; Bozcuk, 2005).

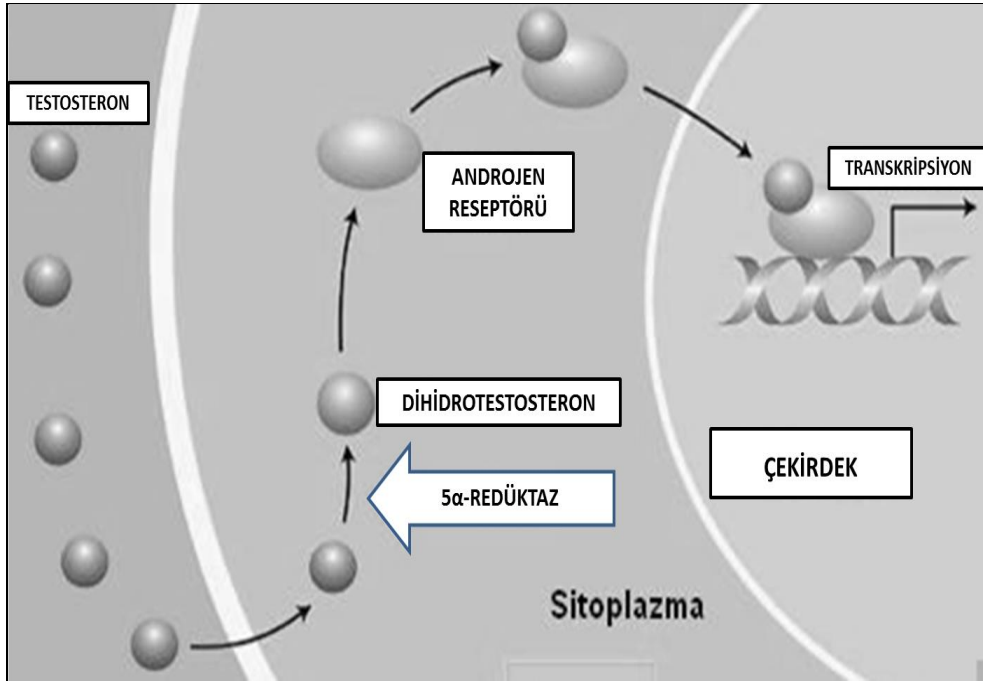
Meme tümörlerinin yaklaşık %60'ı östrojen bağımlı olup östrojenik kimyasallar meme tümörünün büyümesini sağlamaktadır (Heneweer vd., 2005). Östrojen bağımlı meme tümörlerinde, tümör etrafında bulunan fibroblastlar tarafından salgılanan östrojen tümör büyümesini hızlandırmaktadır (Heneweer vd., 2005). Meme kanserinde östrojen reseptörünü hedefleyen endokrin tedaviler östrojen bağımsız meme kanserlerinin %25-30'unda etkili değildir (Ni vd., 2011). Tümör hücrelerinden östrojenin ortamdaki östrojen antagonistleri kullanılarak azaltılması sonucu kanser hücrelerinin apoptoza başlamasını sağlayarak kanser hücrelerinin sağkalımında azalmaya neden olmaktadır (Kyprianou, English, Davidson ve Isaacs, 1991). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, ön uygulama olarak in vitro östrojende büyüyen MCF-7 hücrelerine tamoksifen gibi sitotoksik ilaç uygulanmasıyla apoptozun başladığını bulmuşlardır (Jaattela vd., 1995; Teixeira, Reed ve Pratt, 1995; Huang, 1997). Tamoksifen, bir östrojen reseptör düzenleyicisi olup, meme kanseri tedavisinde etkili bir ajandır (Rajasethupathy vd., 2012). Dokuya özgü östrojen aktiviteye sahip olan ve steroid olmayan bir antiöstrojen tamoksifen, meme kanserinin hormonal tedavisinde tercih edilen bir ilaç olmuştur. Tamoksifen meme dokusundaki antiöstrojenik etkileri nedeniyle meme kanserinin tüm evrelerinin tedavisinde kullanılabilir. Tamoksifenin, kemik yoğunluğu ve serum lipidleri üzerine yararlı östrojen etkileri olmaktadır (Jordan ve Murphy, 1990; Fisher vd., 1994). Aromataz, androjenin östrojene dönüştürülmesinden sorumlu sitokrom P450 enzimidir. Kadınlarda üreme sisteminde, yağ dokusunda, karaciğer ve beyinde bulunur. Aromataz enzimi aynı zamanda testiste Leydig ve Sertoli hücreleri ile birlikte germ hücrelerinde de bulunur (Inkster, Yue ve Brodie, 1995). Östrojen sentetaz olarak bilinen aromataz, östrojen biyosentezinin anahtar bir enzimidir. Aromataz enzimi aktif iken serum testosteron düzeylerinde azalma, östrojen konsantrasyonunda artma görülmektedir. Bir meme tümöründe yer alan östrojenler etrafında yer alan stromal hücrelerdeki aromataz enzimi tarafından oluşup dolaşıma katılmaktadır

(Heneweer vd., 2005). Çoğu çalışma hem prostat hem de meme epitel hücreleri testosteron ve östrojen ortamdan çekildiği zaman apoptoza gittiğini savunmaktadır (Hahm ve Davidson, 1998; Kiess ve Gallaher, 1998).

2.1.3. Araştırmamızda Kullanılan Kansere Hücre Dizileri

2.1.3.1. Androjen bağımlı ve androjen bağımsız prostat kanseri hücre dizileri

Tümör derecesi gibi hem klinik bulgular hem de genetik, ploidi, onkogen/tümör baskılayıcı gen ekspresyonu gibi biyolojik, hormonal ve moleküler bulgular göz önünde bulundurulduğunda heterojen (her iki bulguların da etkili olduğu) özellik gösteren prostat kanserinde her iki bulgu tipi birbirleriyle korelasyon göstermektedir (Russell ve Kingsley). Erken evre prostat kanserinin gelişimi testosteronun 5α -redüktaz enzim kompleksi tarafından 5α -dihidrotestosterona dönüştürülmesiyle artmaktadır (Russell ve Kingsley) (Şekil 2. 5).



Şekil 2.5 Testosteronun Çekirdek İçine Taşınması

(<http://www.kaanaydos.com.tr/androjen-reseptoru-ve-aktivasyon-fizyolojisi.html> adresinden değiştirilerek alınmıştır)

Bu dönüşümün görüldüğü prostat kanser hücrelerine androjen bağımlı prostat kanseri adı verilir. Bazı prostat kanseri hücre tipleri ilk aşamada androjene hassastır ancak büyümeleri için ihtiyaç duymazlar (Russell ve Kingsley). Genellikle prostat kanserinde cerrahi müdahale ya da radyoterapiye uygun olmayan hastalara sürekli ya da belirli periyotlarda hormonal tedavi uygulanır (Rambeaud, 1999; Sciarra, Casale, Colella, Di Chiro ve Di Silverio, 1999; Paul ve Breul, 2000). Hormonal tedavi

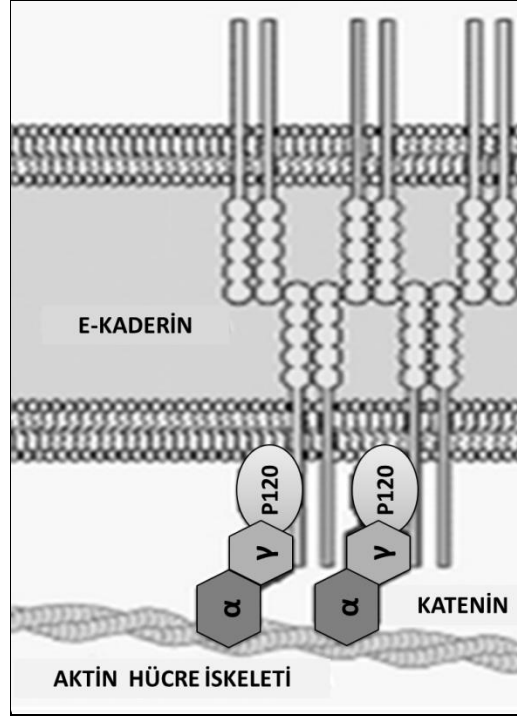
hastalığın etkisini hafifletmek için yapılmaktadır. Ancak her zaman etkili olan bir tedavi şekli olmayıp androjen bağımsız prostat kanserinin kendini yenilemesini engelleyemez (Lara ve Meyers, 1999; Laufer, Denmeade, Sinibaldi, Carbucci ve Eisenberger, 2000). Bu durum androjen reseptöründe oluşan mutasyon (Wang ve Uchida, 1997; Culig vd., 1998), amplikasyon (Henshall vd., 2001) ya da delesyon (Kinoshita vd., 2000) gibi değişimler sonucu oluşmaktadır. Prostat kanseri çeşitli organlara metastaz yapmakla beraber özellikle bölgesel lenf noduna ve iskelet kemiklerine metastaz yapmaktadır (Russell ve Kingsley).

Prostat kanseri hücre dizileri erken tanı ve tedavi uygulamalarında kullanılmaktadır. Prostat kanseriyle yapılan temel araştırmalardan biri androjen bağımlı ve androjen bağımsız prostat kanser hücrelerinin hormonal düzenlemeye gen, protein, hücresel hareket veya morfolojide verdikleri cevapları belirlemek için bu hücre dizilerine androjen hormonu uygulanmasıdır. Prostat tümörleri, etraftaki metabolitlere ve uyarılara karşı aşırı duyarlı androjen reseptörlerine ve/veya mutasyon sonucu hücre içi sinyal yollarının hızlı ve seri çalışmasını sağlayan androjen reseptörlerine sahiptirler. Reseptörlerin etraftaki metabolitlere ve uyarılara karşı aşırı duyarlı olması sonucunda tümör hücreleri düşük androjen seviyeli çevrede yaşamaya adapte olmaktadır (Gleave vd., 1996; Culig vd., 1998). Bu nedenden dolayı özellikle androjen bağımsız prostat kanserinin tedavisinde genellikle hormonal düzenlemenin etkisi hala araştırılmaktadır.

Prostat kanserinin tedavisi için yapılan in vitro araştırmalarda, androjen kısıtlaması ile görülen farklılıkları belirlemek üzere en çok LNCaP prostat kanser hücrelerinden yararlanılmaktadır (Culig, Hoffmann ve Erdel, 1999; Gao, Ossowski ve Ferrari, 1999). Çoğu prostat kanser hücre dizisi metastatik kökenlidir (Claas, 1983). PC-93 ve PC-3 (Kaighn, Narayan, Ohnuki, Lechner ve Jones, 1979), DU-145 (Stone, Mickey, Wunderli, Mickey ve Paulson, 1978) ve TSU-Pr1 (Iizumi, 1978) gibi sık kullanılan diğer kanser hücre dizilerinin hepsi androjen bağımsız hücreler olup hepsinde (bazı durumlarda PC-93 hariç) androjen reseptörü, PSA ve 5 α -redüktaz eksikliği vardır. Bu hücre dizilerinin herhangi biri nude fareye inoküle edildiğinde, farklılaşmanın belirlendiği tümörlerin olduğu gözlenmiştir. Androjen bağımlı hücre dizilerinin azlığı nedeniyle prostat kanserinin erken evre modelini oluşturmak için deneysel çalışmalar yapılmaktadır. Nude fareye intraperitoneal, intramuskular gibi farklı şekillerde kanser hücresi enjekte edilip, LNCaP ve PC-3'ün alt tipleri geliştirilmiştir (Rubio, Villacampa ve Blanco, 1998).

E-kaderin prostat kanserinde bir tanı belirteçidir. Sadece bazal hücrelerde üretilen, prostat kanserinde bulunmayan P-kaderinin olduğu durumlarda, tümör derecesiyle ve anormal E-kaderin boyanması ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. E-kaderinin sitoplazmik ucuna bağlanan α -kaderinin ekspresyonu prostat kanserinde azalmaya neden olmaktadır (Paul, Ewing,

Jarrard ve Isaacs, 1997). Hücre-hücre bağlantısı kalsiyum bağımlı, heterotipik kaderin-katenin etkileşimleriyle düzenlenir (Paul vd., 1997). α -katenin; kaderin-katenin kompleksini hücre iskeletini oluşturan aktin filamentlere bağlamaktadır (Şekil 2. 6).



Şekil 2.6 Kaderin-Katenin Kompleksi (Tian vd., 2011 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)

Gen delesyonları, gen promotörünün hipermetilasyonu ve heterozigotluğun kaybı (LOH) sonucu kaderin-katenin yolağının çalışmaması, tümör invazyonunda ve kanserin gelişiminde rol oynar (Paul vd., 1997). 5. Kromozomda görülen homolog delesyon nedeniyle e-kaderin pozitif olan PC-3 prostat kanseri hücre dizilerinde α -katenin baskılanmaktadır (Ewing vd., 1995). Bu baskılanma sonucunda daha invaziv ve metastatik özellikler ortaya çıkmaktadır. PC-3 hücrelerinin PSA'sı bulunmamakla birlikte p53'ünde ise delesyon ve mutasyon bulunmaktadır (Kaighn vd., 1979; Carroll, Voeller, Sugars ve Gelmann, 1993). Bu hücre dizisinde 5α -redüktaz enzimi ve androjen reseptörü bulunmamaktadır (Kaighn vd., 1979; Carroll vd., 1993). Bu özelliklerinden dolayı çalışmamızda androjen bağımsız prostat kanseri hücre dizisi olarak PC-3 seçilmiştir. PC-3 prostat kanser hücre dizisi kemiğe metastaz yapabilen, Grade IV düzeyinde adenokarsinom görülen 62 yaşındaki erkek hastanın prostat dokusundan elde edilmiştir. İn vitroda uygulanan 5-aminolevulinik asit (Falany ve Falany) tarafından indüklenmiş protoporfirin IX (PpIX) kullanılarak yapılan bir fotodinamik terapi çalışmasında, LNCaP hücrelerine direkt uygulanan 5α -dihidrotestosteron hem fototoksisite açısından hem de androjenin hücre içine alımı açısından daha verimli olduğu belirlenmiştir. Ama bu etki in vitroda androjen bağımsız PC-3

prostat kanseri hücre dizilerinde görülmemektedir (Momma, Hamblin ve Hasan, 1997).

Çalışmamızda kullanılacak olan androjen bağımlı prostat kanseri hücre dizisi ise LNCaP hücre dizisidir. Bu hücre dizisi lenf nodu metastazı görülen prostat kanser dokusuna sahip 50 yaşındaki kafkaslı bir bireyden alınarak üretilmiştir. Bu hücre dizisinin özelliği androjen duyarlı olarak ispat edilen tek prostat kanseri hücre dizisidir (Horoszewicz vd., 1980). LNCaP prostat kanseri hücre dizisi fibroblast interferonlarına dayanıklı olup erkek karyotipindeki bazı marker kromozomlarda anöploidi göstermektedir. LNCaP hücrelerinin malign özellikleri korunmuştur (Horoszewicz, 1983). Bazı laboratuvarlar mezenşim ya da stroma hücreleriyle birlikte inoküle edilmemiş LNCaP'in nude farede zayıf tümörojenik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Gleave, Hsieh, Gao, von Eschenbach ve Chung, 1991; Gleave, Hsieh, von Eschenbach ve Chung, 1992). LNCaP hücre dizisi mutasyonlu androjen reseptörüne sahiptir. Androjen reseptörünün bazı mutasyonları hücrelerin antiandrojenler tarafından uyarılmasıyla ilişkilidir. Bunun sonucunda ise prostat kanserinin geç evresinin tedavisinde kullanılan finasterid gibi ilaçların kullanımı üzerinde sorunlara neden olmaktadır (Russell ve Kingsley). Androjene tepki göstermeyen prostat kanserleri sadece kanserin çok geç evrelerde meydana geldiği düşünülmektedir.

Moleküler analizler p53 mutasyonunun prostat kanseri hücre dizilerinin çoğunda değişim göstermektedir. Ayrıca p53 mutasyonu prostat kanserinin geç evresinde görülmektedir. p53 mutasyonu kanserin erken evresinde olduğu zaman, kanser oluşumuna uygun şartları sağlamaktadır (Downing, Jackson ve Russell, 2002). LNCaP prostat kanseri hücre dizisi p53'ü susturulmuş mutasyona sahiptir (Horoszewicz vd., 1980; Carroll vd., 1993). Bir hasta tedavi protokolü olarak uygulanan yöntemlere benzer şekilde hazırlanan hormonal düzenleme çalışmalarında, LNCaP hücrelerine aralıklı olarak hormon eksiltme uygulanmıştır. Ortamda bulunan androjenden bağımsız ve sağlıklı hücrelerde belirlenen miktarda PSA üretimi başlayınca kadar bu hücrelerin sağkalım zamanında artma belirlenmiştir (Sato vd., 1997). LNCaP hücrelerinde, DNA, androjen reseptörünün ligand bağlanma bölgeleri ve c-Jun lösin bölgesi arasında bir etkileşim oluşmaktadır. Bu iletişim bir transkripsiyon faktörü olan androjen protein 1 (AP-1) ve PSA geninin düzenlenmesindeki düzenleyen androjen reseptörü sinyal iletim yolağını sağlar (Sato vd., 1997).

2.1.3.2. Östrojen bağımlı ve östrojen bağımsız meme kanseri hücre dizileri

İlk izole edilen meme kanseri hücre dizisi 1958 yılında BT-20 olarak adlandırılmıştır. MCF-7 1973'te Michigan Kanser araştırma enstitüsünde bulunmuştur (Soule, Vasquez, Long, Albert ve Brennan, 1973). MCF-7 meme kanser hücreleri 69 yaşında metastatik meme kanserine sahip

kadın hastanın, metastatik meme kanseri hücrelerinin bulunduğu bölgeden elde edilen hücrelerdir (Ossowski, Biegel ve Reich, 1979). MCF-7 hücreleri epitel ve aderent özellikler göstermektedir. Bu hücre tipleri hücresel büyüme için östrojene cevap vermektedir (BolÅın ve Huff, 1976; Katzenellenbogen, Norman, Ecken, Peltz, ve dMangel, 1984; Levenson ve Jordan, 1997). MCF-7 hücreleri, çevresel etkenleri içeren çeşitli bileşenlerin östrojenik etkisini araştırmak için östrojenik reseptöre bağlanma ve hücre çoğalmasını (proliferasyonunu) içeren klasik çalışmalarda kullanılmaktadır (Heneweer vd., 2005). MCF-7 östrojen bağımlı, iyi huylu ve adeziv meme kanseri hücre dizisidir.

MCF-7 hücreleri östrojen reseptörü pozitif, human epidermal growth factor 2 (HER2) reseptörü negatiftir. Progesteron reseptörü hem pozitif hem de negatif olabilmektedir. Bu tip hücre dizilerinde hücresel çoğalma (proliferasyon) belirteci olan Ki-67 seviyesi düşüktür. Endokrin ve kemoterapiye cevap veren hücrelerdir (Holliday ve Speirs, 2011). MCF-7 hücreleri, bir arada tutan yapılardan oluşup güçlü bir hücre-hücre bağlantısı gösterir (Neve vd., 2006). Östrojen reseptörü (ER) pozitif olan MCF-7 hücreleri tümör oluşturma yeteneğine sahiptir. Anti-östrojen tedavilerinde tümör büyümesini inhibe edilmektedir (Burdall, Hanby, Lansdown ve Speirs, 2003). Daha önceden yapılan çalışmalar, memeli karsinom hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde, estradiolün aktivitesi hücre kültürü besiyerine salınan büyüme faktörleri (growth faktörleri) tarafından düzenlendiği gözlenmiştir (Roos, Fabbro, Kong, Costa ve Eppenberger, 1986).

MDA-MB-231 östrojen bağımsız, kötü huylu ve invaziv meme kanseri hücre dizisidir. MDA-MB-231 hücreleri 51 yaşında, adenokarsinoma sahip hastanın meme bezinden elde edilen metastatik epitel karakterli hücrelerdir. Claudin seviyesi düşük olan bölgeden kaynak almaktadır. Östrojen, progesteron ve HER2 reseptörü negatiftir. Ki-67, e-kaderin, klaudin-3, klaudinin-4 ve -7 seviyesi düşüktür. Kemoterapiye verdikleri cevaplar değişken olup orta düzeyde cevap vermektedir (Holliday ve Speirs, 2011). MDA-MB-231 hücreleri, gevşek tutunmalar göstermekle beraber üzüm benzeri ya da yıldız şeklinde yapışkan yapılardan oluşmaktadır. İn vitroda invaziv karakterler göstermektedir (Neve vd., 2006). Güçlü tümör oluşturma yeteneğine sahip hücreler olup, en belirgin karakteristik özelliği metastaz yapabilmeleridir. Anti-östrojen tedavilerine cevap vermezler (Burdall vd., 2003).

Düşük seviyede plazma östrojenine sahip postmenopozal kadınlar için, meme kanseri büyümesi ve gelişmesi tümör mikro çevresinde lokal olarak üretilen östrojen tarafından oluşmaktadır (O'Neill, 1987; Santen vd., 1997; Simpson ve Davis, 2001). Östrojenin intratümöral üretimi östrojen sentezindeki anahtar enzim olan ayrıca karsinom ilişkili stromal fibroblastlar tarafından üretilen aromataz tarafından indüklenmektedir (Santen vd., 1997; Zhao, Agarwal, Mendelson ve Simpson, 1997;

Simpson ve Davis, 2001; Smith ve Dowsett, 2003). Aromataz meme kanserinin endokrin tedavisinin hedefidir. Aromataz inhibitörleri hormon duyarlı meme kanserinin tedavisinde östrojen sentezini yavaşlatmaktadır (Hayashi ve Yamaguchi, 2005; Dowsett vd., 2010). Östrojen meme kanserinin büyümesini, tümör hücrelerindeki östrojen reseptörleri gibi büyümeyle ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyerek sağlamaktadır (Hayashi, 2004; Hayashi, Niwa ve Yamaguchi, 2009).

2.2. Kanser ve Epigenetik Mekanizmalar

Kanser hücreleri çeşitli endojen ve ekzojen sebeplerden dolayı oluşmaktadır. Kanser oluşumunda ekzojen faktör olarak çeşitli kimyasallar, ultraviyole (UV) radyasyonu ve pestisidler gibi DNA'ya etki eden maddeler, endojen faktör olarak mutasyonlar, epigenetik mekanizmalar ya da aile geçmişinde görülen kalıtsal mutasyonlar örnek verilebilir. Çeşitli kanserlerde son zamanlarda mutasyonlardan başka epigenetik mekanizmaların etkisinin en az mutasyonlar kadar olduğu bilinmektedir. Epigenetik değişimler; DNA dizilerindeki gerçek değişikliklere ek olarak, kromatin ve DNA dizilerinde herhangi bir değişim olmadan gen ifadeleri değişimi göstermesidir. Bu değişimler genin DNA dizilerinde olmaz ve epigenetik değişimler olarak adlandırılır (Albert, 2007). Epigenetik mekanizmalar temel olarak 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlardan ilki DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu, DNA'nın CpG adacıklarına, DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından metil grupları bağlayarak genin inaktif forma gelmesini sağlamaktadır. Eğer etkilenen gen bir tümör baskılayıcı gen ise inaktif hale gelmesi hücrenin kanser özelliklerinin artmasına ve kanserleşmeye neden olmaktadır. Gene özelleşmiş DNA hipermetilasyonu ile gerçekleşen düzenlemeler onkogen aktivasyonuna (Wilson, Power ve Molloy, 2007) ve tümör baskılayıcıların susturulmasına (Baylin, 2005) öncülük eder. Anormal DNA metilasyon şekilleri kanser hücrelerinde görülebilir. Zarar görmüş genlerin ekspresyonları metilasyon değişimlerine benzer değişiklikler olarak tanımlanmıştır (Klug ve Cummings, 2002).

Bir başka epigenetik mekanizma ise histonlarda görülen metilasyon, asetilasyon ve modifikasyonlardır. Histon asetilazlar ve histon deasetilazlar DNA'nın nükleozom yapısındaki histon proteinlerine bağlanarak onların konformasyonel değişimlerini sağlamaktadır. Konformasyonel değişimler ya nükleozom yapısındaki DNA'nın gevşemesini sağlayarak genlerin aktivasyonunu ya da daha sıkı hale gelip inaktif hale gelmesini sağlamaktadır. Asetil gruplarının DNA'ya eklenmesi ve çıkarılması ile ilgili süreçler kanser tedavisi araştırmalarının önemli bir alanıdır (Klug ve Cummings, 2002).

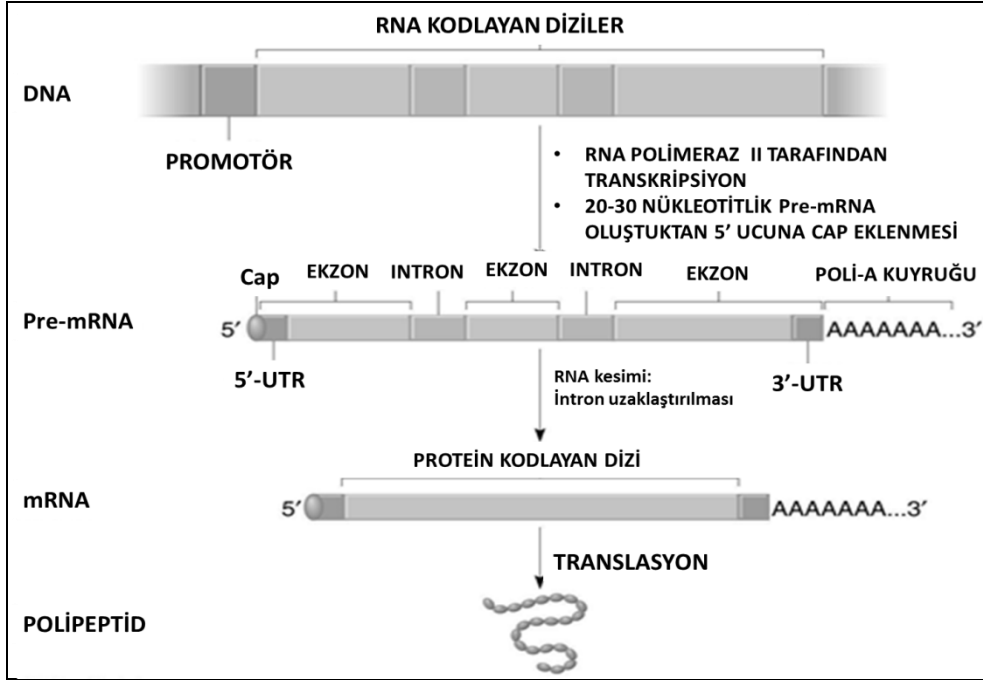
Üçüncü epigenetik mekanizma son zamanlarda yapılan çalışmalarla kanserde hem erken tanıda hem de tedavisinde kullanılabileceği düşünülen RNA İnterferans mekanizmalarıdır. RNA interferans, küçük

kodlama yapmayan RNA parçacıklarının kullanılarak DNA ve/veya protein seviyesinde değişim yapan bir mekanizmadır. Üzerinden en çok çalışılan kodlamayan RNA'lar small interfering RNA (siRNA) ve mikro RNA (miRNA) olup bu kodlamayan RNA'ların hem gen susturulmasında hem de translasyon ve transkripsiyon aşamasında etkili olduğu kanıtlanmıştır (Gündoğdu ve Çelik, 2009). Kısa kodlamayan RNA'lar son zamanlarda gen ekspresyonunun düzenleyicileri arasında yer almaktadır (Verdel, Vavasseur, Gorrec ve Todeschini 2009).

Kanser sıklıkla karmaşık dönüm noktaları olan kompleks bir hastalık olarak sınıflandırılmaktadır. Dönüm noktaları arasında mutasyonel genetik düzenlemeler, belirgin epigenetik değişimler, anjiyogenez ve endojen hayatta kalma mekanizmalarından kaçmak bulunmaktadır (Macaluso, Paggi ve Giordano 2003). DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kısa RNA düzenlenmesi hücrenin epigenetik kaçış yeridir (Siddiqi ve Matushansky, 2012). Kanser hücreleri kök hücrelerle bazı ortak noktalara sahiptir. Bunlar arasında kendi kendini yenileyebilme kapasitesi ve cross-talk (çapraz kuşakların) ortaya çıkması yer almaktadır. Bu açıdan kanser hücreleri kök hücre benzeri hücre tipi olarak düşünölmektedir (Siddiqi ve Matushansky, 2012). Eşey kök hücrelerinin DNA hipometilasyonu, gene özelleşmiş DNA hipermetilasyonu ve küçük RNA'ların yeniden düzenlenmesi gibi epigenetik ve sinyal iletim özelliklerine benzer özelliklerin kanser hücrelerinde tümör oluşumu sırasında kazanıldığına dair kanıtlar giderek artmaktadır (Kierszenbaum, 2006).

2.3. Kodlamayan RNA Tipleri

İlk başta insan genomunun büyük bir parçasının fonksiyonel olmadığı düşünölen bu bölgeler "çöp DNA" olarak adlandırılmıştır. Daha sonra gelişmiş teknikler kullanılarak yapılan çalışmalarda herhangi bir genden kaynaklanmayan ve herhangi bir protein kodlamayan binlerce RNA transkriptleri belirlenmiştir (Carninci vd., 2005; Kapranov vd., 2007). Bu moleküller kodlama yapmayan RNA'lar olarak adlandırılmıştır. Küçük RNA'ların keşfedilmesiyle bu moleküllerin hücrede hedeflenen bir genin susturulmasını sağlayan ve tetikleme yoluyla çalışan bir mekanizma olan RNA interferans (RNAi), eş baskılanma ve transkripsiyondan sonra görölen düzenlemeler gibi kavramlar ortaya çıkmıştır. Eş-baskılanma, bir genin iki allelinden herhangi birinin dominant olmadığı her iki allelin de eşit miktarda çalıştığı eş baskılamadır. RNA'lar sentezlendikten sonra 5' ucunda 7-metil guanozin şapka oluşumu, poli A kuyruğunun takılması ve herhangi bir protein kodlamayan intronların uzaklaştırılması gibi sonradan yapılan değişiklikler transkripsiyondan sonra görölen düzenlenmelerdir (Fire vd, 2005) (Şekil 2. 7).



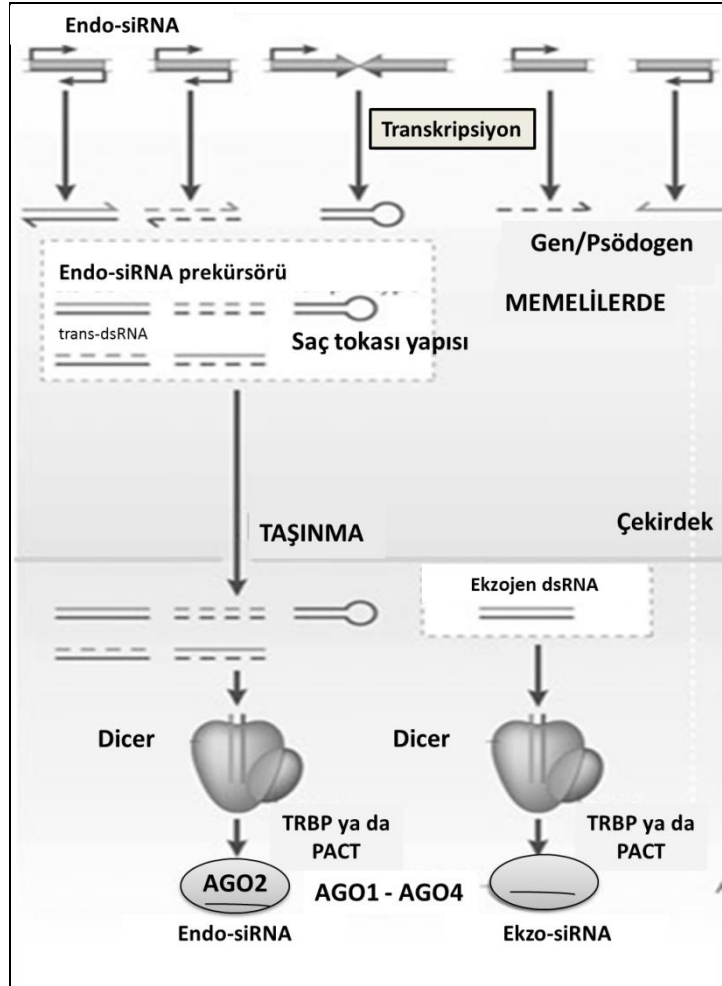
Şekil 2.7 Transkripsiyon Sonrası Görülen Değişim Mekanizması (Fire vd., 2005 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)

Küçük RNA'lar (sRNA), çift sarmal RNA'lardan (dsRNA) oluşan 19–31 nükleotid uzunluğunda, kodlama yapmayan RNA'lardır. Bazılarının, mRNA'ların bir parçası ya da genomun transkripsiyona katılmayan ancak DNA'nın büyük bir bölümünü oluşturan intergenik alanlarından olduğu düşünülmektedir. En önemli görevleri gen aktivasyonunu değiştirmek veya azaltmak amacıyla kullanılan bir teknik olan gen susturulmasında rol oynamalarıdır (Fire vd., 2005). Kodlamayan RNA'lar günümüzde uzun ve kısa olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Kısa kodlamayan RNA'lar siRNA, miRNA, küçük nükleolar RNA (snoRNA) ve piRNA olarak gruplandırılabilir (Fire vd., 2005 ; Mei, Clark ve Mao, 2013). Tüm kısa kodlamayan RNA'lar hücre seviyesinde oluşan düzenleyici mekanizmalarda rol oynamaktadır (Pandya vd., 2014)(Tablo 2. 2). Son zamanlarda, sadece post-transkripsiyonel ve transkripsiyonel seviyelerde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde değil ayrıca kromatin modifikasyonunu ve organizasyonunu etkilenmesinde kısa kodlamayan RNA'ların görev aldığı yeni bir çalışma alanı bulunmuştur (Pandya vd., 2014).

2.3.1. Küçük Engelleyici RNA (Short Interfering/Small Interference, siRNA) ve Oluşumu

Hücrelerde RNAi mekanizmasını uzun dsRNA'lar başlatırken çoğu deneysel çalışmada siRNA'lar kullanılmaktadır (Narry, 2005). siRNA'lar uygun mRNA yıkımı için rehber RNA olarak görev alırlar. Dicer enziminin nükleaz aktivitesi ile dsRNA'lar, 5' - fosfat ve 3' - hidroksil uçlara sahip ve 3' - hidroksil uçlarında 2- 3 nükleotidlik çukurluk bulunan 21- 23 nükleotit

uzunluğunda siRNA'lara parçalanırlar (Şekil 2. 8) (Ross, Carlson ve Brock, 2007). siRNA'nın bu yapısal özelliği RNA indüklenmiş susturma kompleksine (RISC) bağlanması ve RNAi mekanizmasının sonraki aşamaları için önemlidir. siRNA'lar bir genin ekspresyonunu; hedef genin mRNA'sının yıkımını tetikleyerek, hedef genin mRNA'sının translasyonunu engelleyerek ya da transkripsiyonu başlatan bölgede (promotörde) geni sessizleştirici kromatin değişimlerini tetikleyerek engellerler (Narry, 2005; Kim ve Rossi, 2007). RISC kompleksi bir siRNA tarafından çekirdek içindeki siRNA ile tamamlayıcılık ilişkisi gösteren bölgelere yönlendirilir. Kompleks o bölgelerdeki genlerin promotörlerinin etrafındaki kromatini değiştirecek proteinleri oraya toplar. Bu değişim o genlerde transkripsiyon yapmamasına yani genin susturulmasına yol açar (Ross vd., 2007). Herhangi bir siRNA özel bir mesajcı RNA'nın (mRNA) bir bölgesini hedeflediği zaman, genelde aynı mRNA'daki komşu bölgeleri hedefleyen ek siRNA'lar üretilir. RNA'ya bağımlı RNA polimeraz original siRNA tarafından mRNA'da toplandıktan sonra bu ek RNA'ların üretiminde rol oynar (Ross vd., 2007).

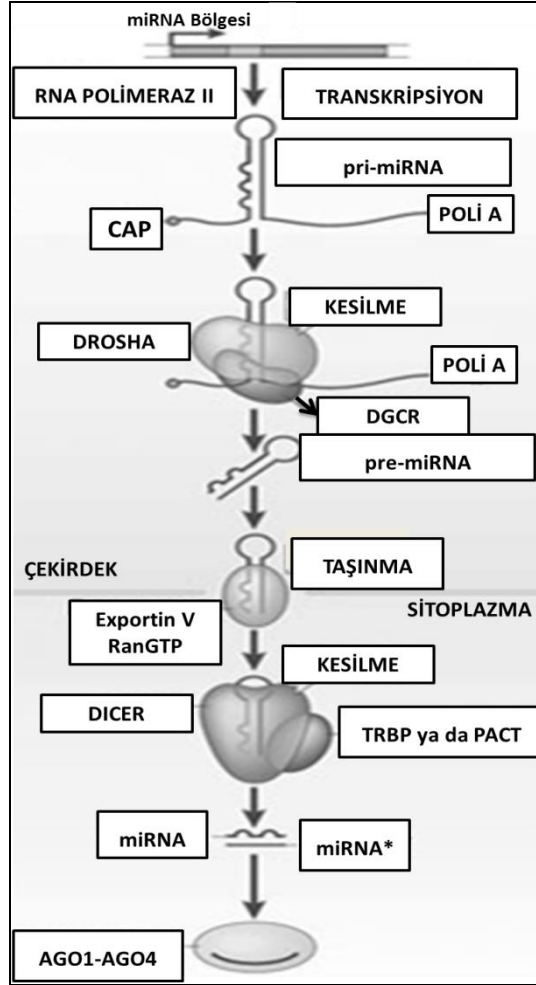


Şekil 2.8 siRNA Oluşumu (Siomi, 2011 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)

2.3.2. Mikro RNA (miRNA) ve Oluşumu

miRNA'lar, hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyen, gelişme, farklılaşma, hücre çoğalması, apoptoz, stres cevapları gibi fizyolojik ve patolojik işlemlerin çeşitliliğinde önemli rol oynayan küçük düzenleyici RNA molekülleridir (Filipowicz, 1998; Elbashir, Lendeckel ve Tuschl, 2001; Narry, 2005; Fire vd., 2005 ; Kosaka, Iguchi ve Ochiya, 2010). İlk miRNA 1993'te Victor Ambros ve meslektaşları, *Caenorhabditis elegans*'ın gelişimini etkileyen lin-4 genini ve bu genin bir bölümü olan protein kodlamayan RNA olduğunu bulmuşlardır (Lee, Feinbaum ve Ambros, 1993).

miRNA 19–24 nükleotit (nt) uzunluğunda, hedef mRNA'nın ekspresyonunu hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyede düzenleyen kısa kodlamayan RNA'lardır (Bartel, 2004; Denli, Tops, Plasterk, Ketting ve Hannon, 2004). Drosha ve Dicer adı verilen endonükleazlar tarafından ile saç tokası şeklindeki prekürsörlerden iki aşamalı bir mekanizmayla oluşurlar (Elbashir vd., 2001; Calin vd., 2004; Bagga vd., 2005; Ventura ve Jacks, 2009; Kosaka vd., 2010). miRNA'lar, saç tokası yapısında (hairpin) RNA öncülerinden (prekürsörlerinden) yapılırlar. İlk olarak endojen genden (çekirdekdeki çift zincirli RNA) RNA polimeraz II (canlı türüne göre RNA polimeraz III de bulunabilir) yardımıyla primer miRNA (pri-miRNA) olarak transkribe edilir. Daha sonra RNA polimeraz III enzimi olan Drosha ile kesilip prekürsör miRNA (pre-miRNA) oluşur. Kesim işlemlerini takiben Exportin V taşıyıcı zar proteinlerinin sistemiyle sitozole geçip, Dicer ile kesilip miRNA oluşur. Son oluşan miRNA 21–25 nt uzunluğunda olup simetrik bir yapıdır (Şekil 2. 9) (Calin vd., 2004; Negrini ve Calin, 2008; Patel ve Sauter, 2011). miRNA oluşumu sırasında miR ve komplementeri miR*'ın oluşmaktadır. Oluşan miRNA zincirlerinden herhangi biri, olgun miRNA'yı oluşturmak için RISC kompleksine girerken (rehber zincir), diğer zincir (yolcu zincir) RISC kompleksindeki argonat 2 proteinine (Ago2) bağlanır ve Ago 2'nin endoribonükleaz aktivitesi tarafından yıkılır. İki zincirden herhangi biri rehber zincir olabilir. RISC, ya hedef mRNA molekülleri üzerine olgun miRNA yükleyerek rehberlik yapar (Harris, Yamakuchi, Ferlito, Mendell ve Lowenstein, 2008) (Şekil 2. 9).



Şekil 2.9 miRNA Oluşum Mekanizması (Siomi, 2011 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)

RISC, kısa çift zincirli RNA moleküllerinden oluşan RNAi'lerin (siRNA ve miRNA) işlenmesinden sorumlu olan bir multiprotein kompleksidir. RISC kompleksi (yaklaşık 500 kDa), endoribonükleaz etkisine sahip proteinlerden oluşur. RISC, ürünlerin salınması için adenosin-tri-fosfata (ATP) ihtiyaç duymayan bir enzimdir. Tüm nükleotid analogları RISC aktivitesinde artış göstermektedir. RISC aktivitesi, tuz titrasyonu ile ölçülebilir ve 80 mM'dan 160 mM'a kadar olan potasyum klorür (KCl) koşullarında RISC aktivitesi değişmez. Nükleotidlerin çoklu fosfat parçalarının bulunması RISC aktivitesini hızlandırır. RISC aktivitesi sodyum klorür (NaCl) içeren reaksiyonlarda değişmez ve düzenleyici etkileri fosfat parçalarıyla ilişkilidir (Gregory, Chendrimada, Cooch ve Shiekhattar, 2005). Argonat 2 proteinleri, trans aktive eden RNA bağlayan protein (Trans-activated RNA Binding Protein, TRBP) ve çift zincirli RNA bağlayıcı protein olan PKR kinazın aktivatör proteininden (PACT) oluşur (Zamore vd., 2000). Argonat 2, RISC'in katalitik merkezinde tanımlanmıştır. Bu kompleks miRNA biyogenezi için gereklidir. RISC, protein sentezini sağlayarak gen ekspresyonunun susturulmasını sağlamaktadır. RISC, kalıp mRNA ile miRNA arasındaki komplementerlikten kaynaklanan hedef

mesajları tanımlar veya hedef mRNA'nın endonükleolitik yıkımıyla ya da translasyonel baskılamayla sonuçlanır (Kim ve Rossi, 2007).

Kodlamayan RNA ailesinin her bir üyesi yüzlerce farklı hedeflere sahip olabilmekle birlikte genlerin yaklaşık %30'u tek bir miRNA tarafından düzenlenebilmektedir (Bartel, 2004). Çoğu miRNA'nın, normal ve kanserli dokular arasında farklı şekilde eksprese edilmiştir. Örneğin; aynı miRNA meme ve pankreas kanserlerinde farklı ekspresyona sahip olabilmektedir. miRNA ekspresyonları kanserin tanı ve tedavisinde kullanılabilir bir araç potansiyeline sahiptir (Lee vd., 2008). miRNA'lar translasyonel baskılanma ve mRNA parçalanması mekanizmalarını kullanarak hücre farklılaşması ve gelişiminde rol oynarlar (Elbashir vd., 2001; Calin vd., 2004; Bagga vd., 2005; Ventura ve Jacks, 2009; Kosaka vd., 2010). miRNA'lar genellikle mRNA'nın dönüştürülmeyen 3' bölgesine (3' UTR) bağlanarak translasyonun baskılamaları ya da mRNA'yı yıkarlar (Bagga vd., 2005). Böylece miRNA'lar translasyon proteinlerine ya mRNA'ları inhibe ederek ya da mRNA moleküllerinin yıkımına sebep olarak etki ederler. miRNA'lar translasyonun endojen inhibitörleri olarak görev yapmasıyla immun sistemdeki gen ekspresyonunun önemli düzenleyicileridirler (Harris vd., 2008). miRNA'ların serum ve plazmada bir biyomarker olarak bulunuşu kandan tanının yapılabilmesi için yeni bir kaynak oluşturmuştur (Mattie vd., 2006).

Çeşitli çalışmalar miRNA'ların çoğalma, hücre döngüsü, apoptoz, farklılaşma, metabolizma, nöronal gelişme ve yaşlanma gibi farklı biyolojik işlemlerde görev aldığını savunmaktadır (Lee ve Ambros, 2001; Bagga vd., 2005; Harfe, 2005; Boehm ve Slack, 2006; Calin, Garzon, Cimmino, Fabbri ve Croce, 2006; Arisawa vd., 2007; Carleton, Cleary ve Linsley, 2007; Hu vd., 2010). Son zamanlarda, kanser hücrelerinde miRNA'ların önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (Elbashir vd., 2001). Kanserlerde yer alan miRNA genlerini yöneten genomik ve gen ekspresyonları çalışmasında genetik olarak kanserli fareler kullanılmıştır. Normal ve kanserli dokulardaki miRNA ekspresyon çalışması miRNA ekspresyon kalıplarını açıklamaktadır. Tümör hücrelerinin az miktarda farklılaşması ya da yüksek oranda çoğalması tümörgenez sırasında miRNA seviyelerinin azaldığını göstermektedir, bu da bazı çoğalma ya da hayatta kalma avantajları sağlamaktadır (Mattie vd., 2006). miRNA ekspresyonunun düzenli kontrolü, hücresel mekanizmanın korunması için önemlidir. Hem plazma hem de serumda ribonükleazlar bulunmasına rağmen, hücre dışı miRNA'lar sağlıklı insanların ve hastaların kanında dolaşır. Dolaşan miRNA'ların çoğu apoptotik yapılar, mikroveziküller ya da eksozomlar gibi sabit yapı olan lipid ya da lipoprotein komplekslerinin içinde bulunur (Elbashir vd., 2001).

Çoğu çalışmaya göre; miRNA'ların ya bir onkogen ya da bir tümör baskılayıcı olarak kullanılabilir olması nedeniyle önemli olduğu düşünülmektedir (Elbashir vd., 2001; Mattie vd., 2006; Harris vd., 2008; Feng, 2010). Yapılan gen ekspresyonu çalışmalarında hem mRNA hem de

miRNA ekspresyonlarına bakıldığında, normal ve kanserli örneklerdeki mRNA ekspresyonunda herhangi bir değişim görülmezken, miRNA ekspresyonunda artma ve artış görülmektedir. Bu nedenden dolayı, miRNA'ların ekspresyon miktarları, tanının doğrulanması ve sınıflandırılmasında mRNA'lardan daha fazla kullanılmaktadır (Lee vd., 2008).

2.3.3. PIWI-Interacting RNA'lar (piRNA) ve Oluşumu

Kanser başta olmak üzere çoğu hastalığın oluşumunda ve gelişiminde kodlamayan RNA'ların önemi her geçen gün artmakta ve araştırmalar epigenetik düzenleyici olarak önemini vurgulamaktadır (Zhou vd., 2010; Esteller, 2011). Son dönemde yapılan çalışmalarda kodlamayan RNA'lardan piRNA ve PIWI proteinlerinin tümörögenizde de etkili olduğu ileri sürülmektedir (Cheng vd., 2011). Kısa kodlamayan RNA sınıfından, *de novo* metilasyonunun düzenlenmesinden sorumlu piRNA'ların da etkili olduğu düşünülmektedir (Aravin ve Bourc'his, 2008; Aravin vd., 2008; Watanabe vd., 2011). Genel olarak piRNA'lar; PIWI proteinleriyle ilişkili, miRNA ve siRNA'dan uzun, tekrarlayan dizilerden ya da transpozon kaynaklı ve testise özelleşmiş olduğu düşünülen kısa kodlamayan RNA dizileridir (Siddiqi ve Matushansky, 2012). piRNA'lar, eşey hücrelerinde invaziv transpozon elemanlardan genomu koruyan endojen kodlamayan küçük RNA'lardır (Aravin vd., 2006). piRNA'lar özellikle eşey kök hücrelerinde olmak üzere DNA metilasyonu üzerinden epigenetik olarak transpozonların susturulmasıyla genom bütünlüğünü sağlamaktadır. piRNA'lar erkek eşey kök hücrelerinde, DNA metil transferaz olan DNMT3'ün ekspresyonunu etkileyerek, DNA metilasyonu üzerinden transpozon susturulması sırasında belirlenmiştir (Cheng vd., 2011).

26–31 nt uzunluğunda ve testiste ekspresyonlarının yüksek olduğu bilinmektedir. piRNA'lar memelilerde ilk kez 2006'da memeli sistemindeki PIWI proteinleri ile ilişkili küçük RNA'nın klonlanmasıyla belirlenmiştir (Aravin vd., 2006; Girard, Sachidanandam, Hannon ve Carmell, 2006; Grivna, Beyret, Wang ve Lin, 2006). piRNA'lar PIWI proteinleri için diziyeye özelleşmiş rehber olarak görev yapmakta olup eşey kök hücrelerindeki PIWI proteini-piRNA yolağı DNA metilasyonu üzerinde transpozonların susturulması için önemli olduğu düşünülmektedir (Aravin, Sachidanandam, Girard, Fejes-Toth ve Hannon, 2007; Aravin ve Bourc'his, 2008; Aravin vd., 2008; Kuramochi-Miyagawa vd., 2008).

Argonat proteinlerinin bir üyesi olan PIWI proteinleriyle olan ilişkilerinden dolayı piRNA'lar olarak adlandırılmaktadırlar. piRNA ve PIWI proteinleri evrimsel olarak iyi korunan yapılardır (Cheng vd., 2011). Argonat proteinleri (AGO), yaklaşık 100 kDa büyüklüğünde olan ve yüksek oranda kısa kodlamayan RNA'ların bağlanma bölgesi içeren ve RNA susturma mekanizmasında anahtar rolü olduğu düşünülen proteinlerdir (Bohmert vd., 1998). 2 alt sınıfa ayrılırlar. Bu sınıflardan biri Arabidopsis

AGO 1'e benzemekte olup Ago alt ailesi olarak adlandırılır. Diğeri ise Drosophilada'daki PIWI proteiniyle ilişkili olup PIWI alt ailesi olarak adlandırılır (Pandya vd., 2014). AGO proteinleri türler arasında korunmuştur ve çoğu organizmada eksprese olmaktadır (Tolia ve Joshua-Tor, 2007). PIWI proteinleri eşey hücreleri ile kısıtlıdır. İnsanda kodlanan Piwi proteinleri HİWİ (PIWIL 1 olarak da adlandırılır), HILI (PIWIL 2 olarak da adlandırılır) HİWİ 3(PIWIL 3 olarak da bilinmektedir) ve HİWİ 2 (PIWIL 4 olarak da bilinmektedir)'dir (Peters ve Meister, 2007). Farklı hayvanlardaki PIWI proteinleri ve homologları (ve alakalı oldukları piRNA uzunluğu) ve olası mekanizmaları Tablo 2. 1'de belirtilmektedir (Pandya vd., 2014). Çoğu hayvan çalışmaları da PIWI proteinlerin özellikle eşey kök hücrelerinde eksprese olduğunu göstermektedir (Houwing vd., 2007). PIWI proteinlerin daha çok eşey kök hücrelerinde bulunması piRNA'ların kök hücre gelişiminde görev alabileceği düşüncesini desteklemektedir.

Tablo 2.1 piRNA'ların İlişkili Olduğu Ortaya Konan Proteinler (Pandya vd., 2014 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)

Argonat Protein Ailesi	piRNA Kaynağı	piRNA Uzunluğu	Etki Mekanizması	Tür
MİLİ (İNSANDA PIWIL 2)	Transpozon ve piRNA Cluster	24–28 nt	Heterokromatin Düzenlenmesi (DNA Metilasyonu)	Homo Sapiens
MİWİ (İNSANDA PIWIL 1)	piRNA Cluster	29–31 nt	Bilinmiyor	Homo Sapiens
MİWİ 2 (İNSANDA PIWIL 4)	Transpozon ve piRNA Cluster	27–29 nt	Heterokromatin Düzenlenmesi (DNA Metilasyonu)	Homo Sapiens
AUB	Transpozonlar, Tekrarlar, piRNA Cluster ve SU (ste) Lokusu	23–27 nt	RNA Yıkımı	Drosophila Melanogaster
AGO 3	Transpozonlar, Tekrarlar (testiste bilinmemekte)	24–27 nt	RNA Yıkımı	Drosophila Melanogaster
PIWI	Transpozonlar, Tekrarlar, piRNA Cluster	24–29 nt	Heterokromatin Düzenlenmesi	Drosophila Melanogaster

piRNA genleri genellikle 2, 4, 5 ve 27. kromozomlarda yer almaktadır (Kim, 2006). Genomdaki yerine göre 3 temel gruba ayrılırlar. Bunlar; tekrarlamayan, tek tekrarlı ve tekrarlanan ilişkili (repeated-associated) piRNA olarak adlandırılır. Tekrarlamayan grup da kendi arasında genom buldukları yerlere göre 3 gruba ayrılır. Bunlar; total DNA miktarının büyük bir kısmını oluşturan, fakat fonksiyonu tam olarak bilinmeyen ve transkripsiyonu yapılmayan DNA bölgelerinden oluşan intergenik piRNA, DNA dizisinde anlamsız dizilere sahip bölgede bulunan intronik piRNA ve

DNA'da anlamlı bölgelerden oluşan ekzonik piRNA'dır. Çoğu piRNA dizileri (ovaryumda %34; testiste %21) dizi haritasında transpozon olarak adlandırılmaktadır. Tekrarlamayan piRNA dizilerin %80'inden fazlası ise intergenik bölgelerden oluşmaktadır (Houwing vd., 2007). Çoğu piRNA 1 kb'dan küçük 100 kb'den büyük olan küçük genom lokuslarındaki küme (cluster) adı verilen bölgelerden oluşmaktadır. Hem tekrarlayan hem de tekrarlamayan piRNA dizileri aynı kümeden (cluster) köken almaktadır (Kim, 2006). Bu moleküllerin temeli genomda yer alan piRNA kümesi (piRNA cluster) adı verilen bölgelerden oluşmaktadır. piRNA kümesi (piRNA cluster), genomdaki intergenik tekrarlayan elementlerden meydana gelmektedir (Brennecke vd., 2007). piRNA cluster'ları 100.000 bazdan fazla olan ve çeşitli transpozon özellikteki DNA dizilerinden oluşmaktadır (Saito ve Siomi, 2010). Bu RNA'ların çoğu retrotranspozonların (rasiRNA; repeated-associated small interfering RNA) da bulunduğu intergenik tekrarlayan bölgelere uyumludur (Aravin vd., 2003; Batista vd., 2008; Klattenhoff ve Theurkauf, 2008).

Başlangıçta *Drosophila*'da bulunan STELLATE proteinini kodlayan gen tekrarları *Drosophila* eşey hücrelerinde susturulması sırasında piRNA'lar belirlenmiştir. Ancak o sıralarda bulunan gen bölgesinin piRNA olduğu bilinmemektedir (Aravin, 2001). Tekrarlayan ilişkili küçük engelleyici RNA'lar (repeated associated small interfering RNA; rasiRNA) *Drosophila Melanogaster* testisinden ve erken embriyonik döneminde belirlenmiştir (Aravin vd., 2003). Daha sonra 2006 yılında yapılan bir araştırmada fare testisinden izole edilmiştir (Aravin vd., 2006; Girard vd., 2006; Grivna vd., 2006; Watanabe vd., 2006). piRNA'ların spermatogenezdeki Mayoz I'de bulunan pakiten evresinden önce eksprese edildiği ilk olarak *Drosophila* ile yapılan çalışmalarda ileri sürülmüştür (Aravin vd., 2006).

miRNA ve siRNA'lardan farklı olarak Dicer bağımsız bir mekanizmayla oluşan piRNA'lar (Vagin vd., 2006; Houwing vd., 2007; Kim, Han ve Siomi 2009; Nagao vd., 2010), bir argonat protein tipi olan, *Drosophila* ile memeli türlerinin kadın ve erkek bireylerinin çoğalmasında görev alan PIWI proteinleriyle birlikte çalışmaktadır (Lin ve Spradling, 1997; Aravin vd., 2006; Girard vd., 2006; Grivna vd., 2006; Kim, 2006; Watanabe vd., 2006). piRNA'nın siRNA'dan farkı; piRNA kümesinde (piRNA cluster) yer alan kalıp zincirin birebir aynısı olmaması ve kendi üstüne katlanmasıdır (Siomi, 2011). miRNA'dan farklı olarak ise; prekürsör gibi ikincil yapılar oluşturmamalarıdır (Tablo 2. 2) (Bartel, 2009; Siomi, 2011). Farelerde, *Drosophila*'da ve Zebrafish'te yapılan genetik çalışmalarda, piRNA'ların germinal gelişimde ve testiste diğer kısa kodlamayan RNA'lardan daha fazla eksprese olduğu belirtilmiştir (Cook, Koppetsch, Wu ve Theurkauf, 2004; Carmell vd., 2007; Chen, Pane ve Schupbach, 2007).

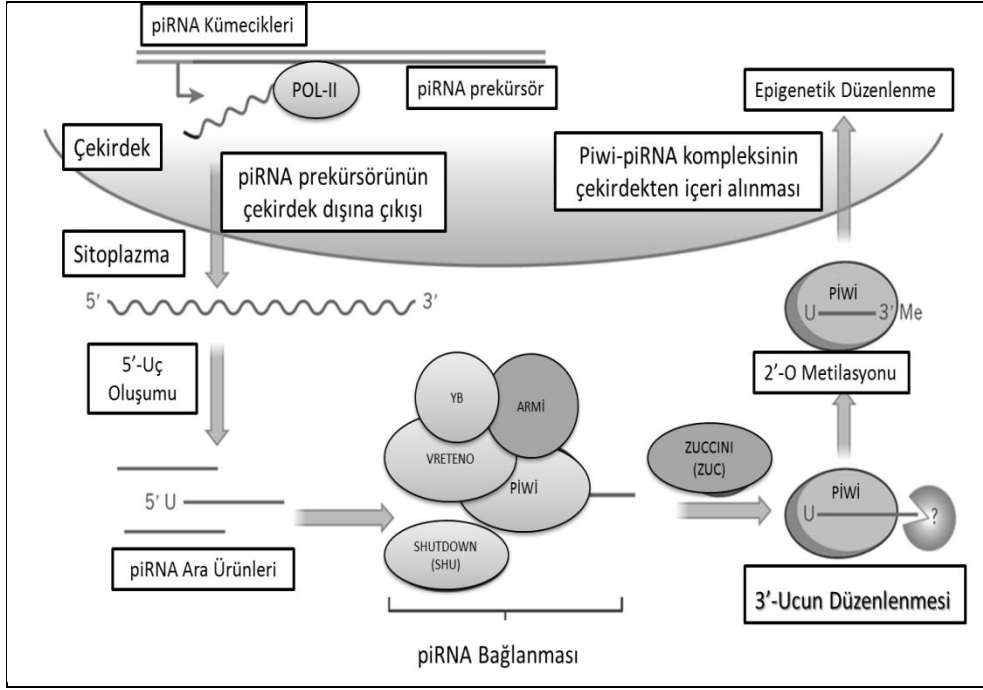
Tablo 2.2 Kısa Kodlamayan RNA'lar Arasındaki Farklılıklar (Pandya vd., 2014 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)

ÖZELLİKLER	siRNA	miRNA	piRNA
Uzunluk	18-24	18-24	23-31
Biyogenez	Dicer Bağımlı	Dicer Bağımlı	Dicer Bağımsız
AGO ile alakası	AGO 2	AGO 1	PIWI Proteinleri
Kaynak	Uzun Çift Zincirli RNA	Genomik DNA / miRNA Bölgesi	Genomik DNA/piRNA Bölgeleri
Lokalizasyonu	Tüm Somatik ve Eşey Hücrelerinde	Tüm Somatik ve Eşey Hücrelerinde	Tüm Somatik ve Eşey Hücrelerinde

piRNA'lar daha çok eşey hücrelerine özel olarak düşünülse de, yakın zamanlardaki çalışmalar piRNA'ların gonad olmayan hücrelerde de önemli rolleri olduğunu göstermektedir (Wu vd., 2010; Cheng vd., 2011; Hirotsugu Ishizu vd., 2012; Cui vd., 2011). Uzun süreli hafıza fonksiyonlarında, DNA metilasyonunda, epigenetik düzenlemelerde, transpozon ve transpozon olmayan elementlerin susturulmasıyla eşey hücrelerini oluşturan primer hücrelerin stabilitesinin önemli rol oynamaktadırlar (Pandya vd., 2014). Buna benzer olarak, Piwi proteinlerinin kromatin ile ilişkili olması ve direkt olarak transkripsiyonu düzenleyen yapısal kromozom proteini olan heterokromatin protein 1a (HP-1a) etkileşimde olması da genomun epigenetik kontrolünde görev alabileceğini desteklemektedir (Brower-Toland vd., 2007). Ayrıca piRNA üretiminde rol alan proteinlerin somatik hücrelerde gen ekspresyonunun kontrolünde (Pal-Bhadra, Bhadra ve Birchler, 2002; Pal-Bhadra vd., 2004; Grimaud vd., 2006) ve öğrenme-hafıza mekanizmasında yer alması (Ashraf, McLoon, Sclarsic ve Kunes, 2006) piRNA'ların biyolojik işlemlerin geniş bir bölümünde rol oynayabileceği sonucunu düşündürmektedir (Klattenhoff ve Theurkauf, 2008). Kanseri hücrelerinde de bu işlemi tümör baskılayıcı genleri de içeren transpozonal genomik bölgelerin susturulduğu savunulmaktadır (Siddiqi ve Matushansky, 2012; Siddiqi, Terry ve Matushansky, 2012). İnsan PIWI protein homoloğu HIWI, çeşitli kanser tiplerinde belirgin şekilde eksprese olup ekspresyonu zayıf klinik prognozuyla bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Siddiqi ve Matushansky, 2012).

Yapılan bir çalışmada transpozonların susturulacağı zaman sitoplazmada olan piRNA ve onlarla ilişkili PIWI proteini çekirdeğe taşındığı belirtilmiştir (Ishizu, Nagao ve Siomi 2011). Primer yolak ve arkasından da Ping-Pong döngüsü olarak 2 basamaktan oluşan biyogenez mekanizmasına sahiptir (Şekil 2. 10) (Pandya vd., 2014). Primer yolakta endonükleaz aktivitesi gösteren ilk olarak *Drosophila*'da kodlanmış TUDOR proteininde tanımlanan korunmuş bir yapısal proteinin 50 amino asitlik bir bölgesini içeren Vreteno (Vret), bir eşleşmiş-şaperon olan Shutdown (Shu) (Zamparini, 2011 ; Ipsaro vd., 2012; D. e. a. Olivieri, 2012; Preall, 2012;

Xiol vd., 2012) ve bir mitokondriyal protein olan Zucchini (Zuc) (Horwich vd., 2007; Nishimasu vd., 2012) gereklidir (Şekil 2. 10). Genel olarak, piRNA kümesinden (piRNA clusterdan) üretilen olgunlaşmamış transkriptler (primer piRNA öncülü), piRNA benzer moleküller içinde işleme girerler. piRNA benzer moleküller daha sonra PIWI proteinlerine bağlanırlar. piRNA'nın PIWI proteinine yönelmesi ve bağlanması piRNA'nın 5' ucu tarafından olduğu düşünülmektedir. piRNA'nın 3' ucu Hen1/Pimet (PIWI proteinleriyle ilişkili bir kompleks, Hen1 Arabidopsis'te miRNA'ların 2. karbonundaki oksijenin metilasyonundan da sorumlu olan bir enzimdir, hayvanlarda ise Hen1'in miRNA'ların metillediği düşünülmektedir) kompleksi tarafından 2. Karbonundaki oksijen atomu (2'-O) metillenir. piRNA'nın 3' ucunda da fazladan birkaç baz bulunduğu ve bu bazların PIWI proteinleriyle birlikte piRNA'nın düzenlenmesini sağladığı düşünülmektedir (Saito vd., 2006; Saito, 2007). Ping-pong döngüsüne primer piRNA'ların girme nedeni, eşey hücrelerindeki piRNA seviyesini arttırıp yüksek tutmaktır. Burada HILI (Drosophila'da Aub; farede Mili) primer piRNA'yı kendi endonükleaz aktivitesi sayesinde keser. Böylece sekonder piRNA'nın 5' ucu oluşur (Gunawardane, 2007; Nishida vd., 2007; Haase vd., 2010). Kesilen piRNA'lar daha sonra Diğer HIWI üyelerine (Ago III; HIWI 2 gibi) transfer edilerek çift taraflı susturma ile 3' ucu oluşturulduğu düşünülmektedir. Oluşturulan piRNA en son bağlı olduğu proteinle beraber çekirdeğe gider ve ilgili transpozona bağlanarak onun DNA üzerinde hareket etmesini engeller (Olivieri, Sykora, Sachidanandam, Mechtler ve Brennecke, 2010; Saito vd., 2010; Saito ve Siomi, 2010; Ishizu, Nagao ve Siomi 2011). piRNA'lar transpozonlara bağlanıp onların hareket etmesini ve dolayısıyla da yeni dizi oluşumu ve ürün oluşumu engeller. Bu engellemeyi kontrol noktası kinazı 2 (checkpoint kinase 2; Chk 2) DNA hasar noktasını aktif hale getirerek yapmaktadır. Aktif hale gelen Chk 2 genellikle kısırlığa neden olan gonadal gelişim sırasındaki mikrotübül organizasyonundaki ve hücrenin boyuna gelişimindeki hasarlarla sonuçlanmaktadır (Khurana ve Theurkauf, 2010; Suzuki, Honda ve Kirino 2012) (Şekil 2.10).



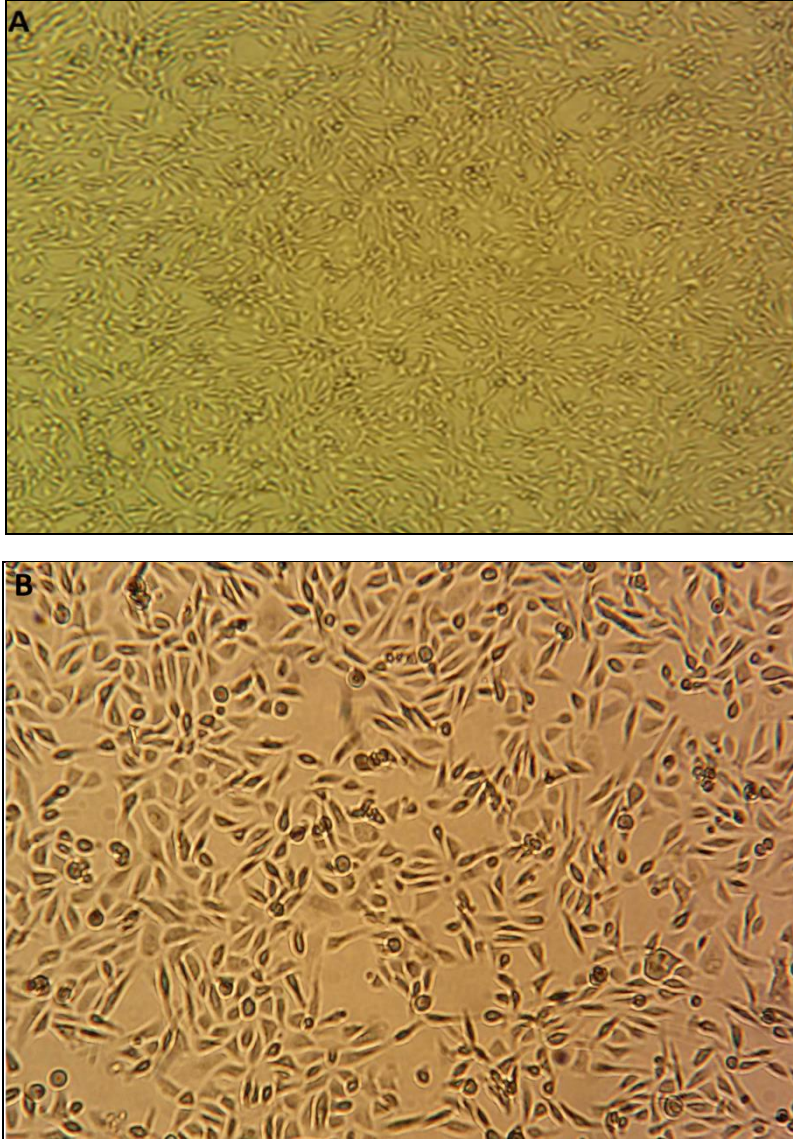
Şekil 2.10 piRNA Biyogenezisi (R. J. Ross, Weiner ve Lin, 2014 literatüründen değiştirilerek alınmıştır)

Eşey hormonları piRNA ve PIWI proteinlerinin ekspresyonlarının artmasına neden olup; piRNA ve PIWI kompleksi transpozonların baskılanmasına sebep olarak genetik bilginin korunmasını, spermatogenez ve maturasyonun düzenlenmesini sağlamaktadır (Kang, Moon, Lee, Han, 2014). piRNA'lar ve onların kofaktörü olan PIWI proteinlerinin fonksiyonlarının kaybedilmesi sonucu oluşan mutasyonlar transpozonların ekspresyonlarının artmasına ve kendi kopyalarını oluşmasına ya da rastgele olarak genomda yeniden düzenlenmesine izin vermektedir (Kalmykova, Klenov ve Gvozdev 2005). piRNA- PIWI proteini yollarının bileşenleri normal gelişimde epigenetik olarak transpozonları susturdukları bilinmektedir. Tümör oluşumu gibi patojenez mekanizmalarında çoğu belirlenemeyen piRNA'ların rol aldığı düşünülmektedir (Mei, Clark ve Mao, 2013). Kanser gelişiminde ise aşırı susturma yaptığı düşünülmektedir. Bunun ispatlanması epigenetik düzenleyici ajanların tümörlere uygulanmasıyla yapılması bu konunun açıklanmasında daha yararlı olabileceği düşüncesini yaratmaktadır (Siddiqi ve Matushansky, 2012). piRNA'lar PIWI proteinleri için diziyeye özelleşmiş rehber olarak görev yapmakta olup eşey kök hücrelerindeki PIWI proteini-piRNA yolağı DNA metilasyonu üzerinde transpozonların susturulması için önemli olduğu düşünülmektedir (Aravin vd., 2007; Aravin ve Bourc'his, 2008; Aravin vd., 2008; Kuramochi-Miyagawa vd., 2008).

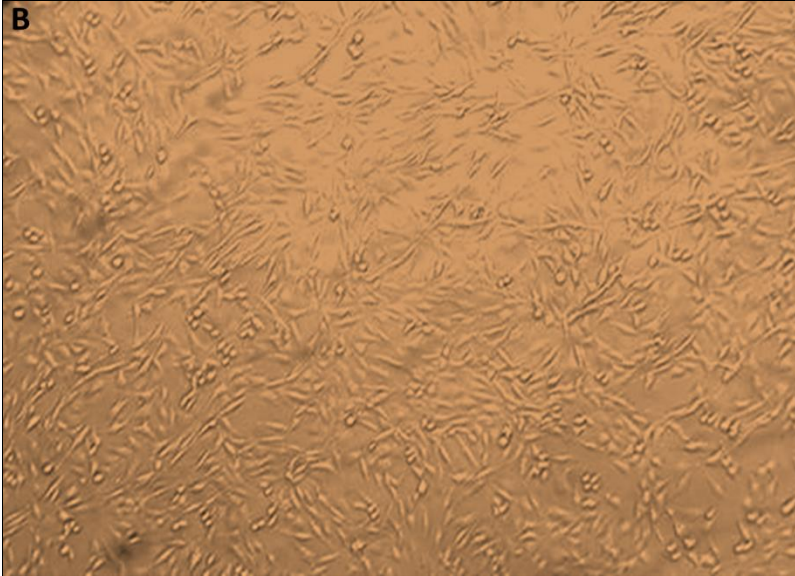
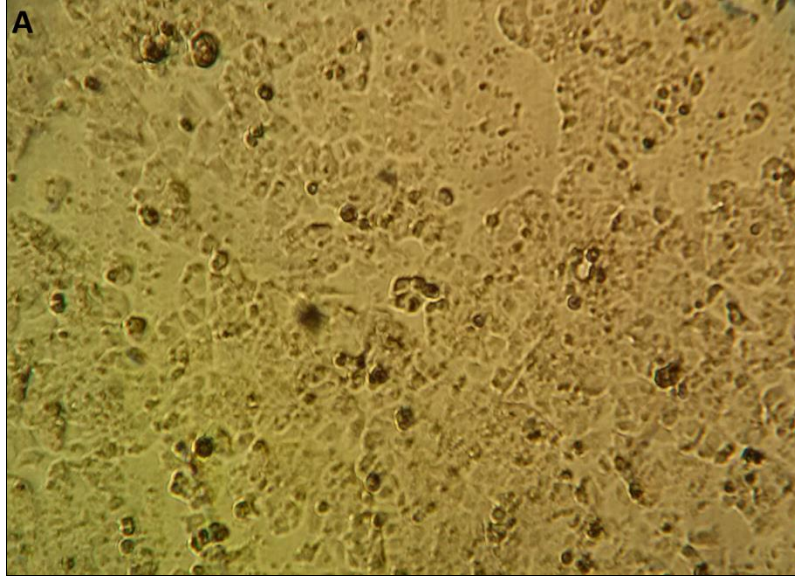
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücrelerin yetiştirilmesi

Prostat kanseri hücre dizileri LNCaP ve PC-3 (Şekil 3. 1; A ve B) ile meme kanseri hücre dizileri MCF-7 ve MDA-MB-231 (Şekil 3. 2; A ve B) (ATCC, Washington D.C., USA) laboratuvarımızda belirlenen rutin kültür koşullarında, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde, 25 ve 75 cm²'lik flasklar (Greiner, Cellstar, Almanya) içerisinde, %10 Fetal Bovin Serum (FBS; Gibco, UK) ve %1 Penisilin/streptomisin içeren Fenol red'li Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, UK) besiyeri kullanılarak çoğaltılıp, yapılacak deneyler için yeterli sayıya ulaştırıldı.



Şekil 3.1 Çalışmamızda Kullanılan Prostat Kanseri Hücre Dizileri. **A;** LNCaP, **B;** PC-3



Şekil 3.2 Çalışmamızda Kullanılan Meme Kanseri Hücre Dizileri. **A**; MCF-7, **B**; MDA-MB-231

3.1.1. Kullanılan Besiyerilerinin Seçimi

Hücre kültürü deneylerinde östrojen ve androjen hormon uygulamalarında iki tip besiyeri kullanıldı. Bunlardan ilki % 10 fetal bovin serum (FBS) ve Fenol red içeren besiyeri olup kanser hücrelerinin belirli bir yoğunluğa gelmesi işleminde kullanıldı. Bu besiyeri hormon uygulamalarından 24 saat önce ortamdan uzaklaştırılarak hücrelerin tipine uygun %5 fetal calf serum (FCS) içeren ya da FBS ve Fenol red içermeyen besiyerleridir. FBS ve Fenol red hücrelerde çoğalmayı sağlamaktadır. FBS içerisinde az miktarda hormon, enzim, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinleri bulunmaktadır. Hücre çeşidi ve uygulamalara göre besiyerindeki serum oranı değişebilir. MCF-7 östrojen duyarlı meme kanser hücreleri ile yapılan ve östrojen hormonunun çeşitli

parametrelerinin incelendiği çalışmalarda, besiyerindeki FBS içeriğindeki östrojen, dışardan uygulanan östrojen ile birleşip ilgili hücrelerde anormal büyümeyi sağladığını gözlenmiştir. Buna ek olarak hormon çalışmalarında verileri göz önünde bulundurularak FBS ve Fenol red maddesinin östrojenin biyolojik özelliklerini taklit edebileceği öne sürülmüştür (Ernst, Schmid ve Froesch, 1989). Furuya Y. ve arkadaşları tarafından MCF-7 hücrelerine östrojen hormonu serum ve Fenol red içermeyen besiyeri ile uygulanmış olup hücre çoğalmasını günde 2 kat arttığı belirlenmiştir (Furuya, Kohno, Fujiwara ve Saitoh, 1989). Çalışmamızda önemli olan kriter, hücrelere östrojen hormonu uygulandığında kontrol grubuna göre en fazla hücresel çoğalmayı sağlayacak konsantrasyonun belirlenmesidir. Bu çalışmada % 5 FCS ile serum içermeyen Fenol red'siz DMEM'in MCF-7 hücreleri üzerinde olan çoğalma ve canlılık etkilerini ayrı ayrı gözlemledik. MCF-7 hücrelerinde en yüksek çoğalma ve canlılık 24. saatte Fenol red ve serum içermeyen DMEM besiyerinde gözlemlendi. Çalışmada kullanılan diğer hücre dizileri için optimizasyonu sağlamak amacıyla %5 FCS içeren Fenol red'siz besiyeri kullanıldı. Optimizasyon için besiyerleri seçilirken daha önce bu hücrelerde yapılan hormon çalışmaları referans olarak alındı ve besiyerleri diğer araştırma sonuçları dikkate alınarak seçildi (BolĀin ve Huff, 1976; Katzenellenbogen vd., 1984; Gierthy vd., 1987; Ernst vd., 1989; Furuya vd., 1989; Jordan ve Murphy, 1990; M. Gleave vd., 1991; Henttu, Liao ve Vihko, 1992; Wiese, Kral, Dennis, Butler ve Brooks, 1992; Lee vd., 1995; Wang ve Phang, 1995; Falany ve Falany, 1996; Gleave vd., 1996; Momma vd., 1997; Santen vd., 1997; Sato vd., 1997 ; Kiess ve Gallaher, 1998; Burow vd., 1999; Gao vd., 1999; Lara ve Meyers, 1999; Sciarra vd., 1999; Kinoshita vd., 2000; Henshall vd., 2001; Huggins ve Hodges, 2002; Burdall vd., 2003; Hayashi, 2004; Çal ve Şimşir, 2005; Hayashi ve Yamaguchi, 2005; Heneweer vd., 2005; Hayashi vd., 2009; Ni vd., 2011).

3.2. Standart Eğrinin Hesaplanması

Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra tripsin (Gibco, UK) ile kaldırıldı. Hücreler neubauer lamında (Marienfeld, Almanya) sayılarak her bir kuyucukta 48×10^3 , 24×10^3 , 12×10^3 , 6×10^3 , 3×10^3 , $1,5 \times 10^3$, 750 ve 0 hücre 96 kuyucuklu plâtelere (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) her biri 7 tekrarlı olacak şekilde dağıtıldı. Besiyerleri konduktan sonra 8 saat 37°C CO_2 'li inkübatörde tutuldu. 8 saat sonra XTT (Biological Industries, İsrail) testi uygulanıp 450 nm'de absorbans ölçüldü. Bu sonuçlar kullanılarak standart eğriler çizilip absorbansa göre hücre sayısını belirleyen denklemler oluşturuldu (Şekil 3. 3).



Şekil 3.3 Standart Eğri Hesaplanması Deney Düzeni

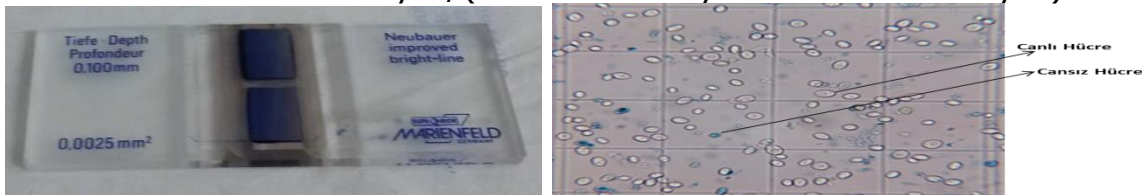
3.3. Çoğalmanın (Proliferasyonun) En Yüksek Görüldüğü Androjen ve Östrojen Miktarlarının Belirlenmesi

Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra tripsin ile kaldırıldı. Neubauer lamında sayılarak her bir kuyucukta 7×10^3 hücre olacak şekilde dağıtıldı. Eşit sayıda hücre kuyucuklara konulduktan sonra 24 saat 37°C CO_2 'li inkübatörde tutuldu. Bir sonraki aşamada ise, uygun dozun belirlenmesi için konu hakkında daha önce yapılan çalışmalar da göz önünde bulundurularak belirli konsantrasyon aralıklarıyla hücrelere kanser türlerine göre östrojen (E2257, Sigma, St. Louis, USA) ve androjen (A0887, Sigma, St. Louis, USA) hormonları uygulandı. 24., 48. ve 72. saatlerde XTT yöntemiyle ölçüm yapılarak hücrelerde etkin ve letal doz belirlenip hücresel çoğalmanın en yüksek olduğu doz ve saate karar verildi. Bundan sonraki aşamalarda belirlenen uygun konsantrasyonlar ve saat olarak deneyler tasarlandı.

3.4. Canlılık Belirlemeleri

Hücrelerde canlılık oranı belirlenmesinde tripan blue yöntemi kullanıldı. Hücreler tripsinlenerek flask tabanından ayrıldıktan sonra tripan blue boyasına (Gibco, UK) maruz bırakıldı. 15 dk sonra boyanan cansız ve boyanmayan canlı hücrelerin miktarı thoma lamında sayılarak belirlendi. Hormon uygulamasının hücre canlılığına olan etkisi belirlendi (Şekil 3. 4).

Formül: $\text{Canlı hücre sayısı} / (\text{canlı hücre sayısı} + \text{ölü hücre sayısı}) \times 100$

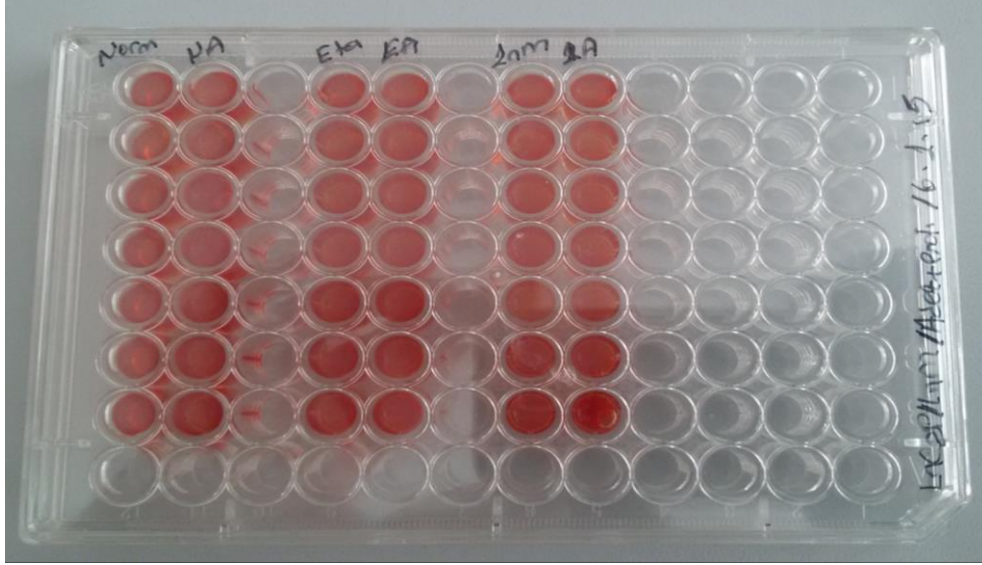


Şekil 3.4 Tripan Blue ile Canlılık Belirlenmesi Deney Düzeni

3.5. Çoğalma (Proliferasyon) ve Tutunma (Adezyon) Belirlemeleri

Hücrelerde oğalma miktarını belirlemek için XTT kiti kullanıldı. Bu deneyde, metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondri enzimlerinin hücre ölümünden kısa bir süre sonra inaktive olma etkinliği üzerine kuruludur. Tetrazolium tuzuna dayalı bir kolorimetrik yöntem olan XTT yöntemi hücrelerin canlılığının ölçülmesi ve değerlendirilmesini kolaylaştıran bir yöntemdir. Hücrelere hormon uygulandıktan sonra ön çalışmalar ile belirlenen saatlerde XTT ölçümü yapıldı. XTT ölçümü için 100 µl aktivasyon solüsyonu içeren 5 ml reaksiyon solüsyonu, içerisinde 100'er µl taze besiyeri bulunan kuyucukların her birine 50 µl eklendi. 2 saat inkübe edildikten sonra ölçüme alındı. Her grup için deneyler en az 3 kez tekrar edilip her bir tekrar için içerisinde 7×10^3 hücre bulunan 7'şer kuyucuk kullanıldı. Kit protokolüne uygun şekilde Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA) cihazında (Labsystems Diagnostics, Finlandiya) 450 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonrasında alınan absorbans cinsinden ham veriler standart eğrilerden çıkan formülde yerine konarak hücresel çoğalmayı (proliferasyonu) belirlemede kullanıldı. Hormonların hücrelerin tutunmasına (adezyonuna) olan etkilerini incelemek için; ön çalışmada elde edilen verilere göre MCF-7 östrojen bağımlı meme kanser hücreleri için 24. saat 10 nM östrojen; MDA-MB-231 östrojen bağımsız meme kanser hücreleri için 24. saat 10 nM östrojen; LNCaP androjen bağımlı prostat kanser hücreleri için 24. saat 1 nM androjen, PC-3 androjen bağımsız prostat kanser hücreleri için 10 nM androjen konsantrasyonu ve saati uygulandı. Bunun için önce flask tabanından tripsin ile kaldırılan hücreler sayılarak 96 kuyucuklu platalere, kuyucuk başına 7×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Her hücre tipi için, biri adezyon uygulanacak diğer kontrol olacak şekilde 7'şer kuyucuğa aktarıldı. 24 saat tutunmaları sağlanıp daha sonra adezyon için ayrılan kuyucuklardaki hücrelere madde uygulanması işleminden sonra besiyeri ile yıkandı. XTT yöntemi uygulandı. Adezyon için ayrılmış kuyucuklardaki hücreler besiyeri ile yıkandıktan sonra 450 nm'de ELISA cihazında ölçümü yapıldı. Sonuçlar formülde yerine konarak adezyon belirlendi (şekil 3. 5).

Formül: $1 - \frac{[(\text{yıkanmamış kuyucuk absorbansı} - \text{yıkanmış kuyucuk}) / \text{yıkanmamış kuyucuk}]$



Şekil 3.5 Çoğalma (Proliferasyon) ve Tutunma (Adezyon) Deney Düzenegi

3.6. Total RNA İzolasyonu

Androjen bağımlı ve bağımsız prostat kanseri hücreleri (LNCaP ve PC-3) ile östrojen bağımlı ve bağımsız meme kanseri hücreleri (MCF-7 ve MDA-MB-231) 75 cm²'lik flasklarda 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilerek çoğaltıldı. Öncelikle kültüre edilen hücreler tripsin ile flask tabandan toplandı ve sayılarak her bir kuyucukta 5 x10⁵ hücre olacak şekilde, 6 kuyucuklu platelere ekildi. 24 saat inkübasyondan sonra belirlenen uygun dozların uygulanması işlemi gerçekleştirildi. Daha önce belirlenen uygulama saati kadar inkübe edildikten sonra hücreler 500 µl tripsin ile plate tabanından kaldırıldı. Tüm aşamalar total RNA izolasyon kit (Ambion Paris Kit, AM1921, Carlsbad, USA) yöntemine göre gerçekleştirildi. Tripsin ile kaldırılan hücreler 4 ml fetal bovin serumsuz besiyeri ile 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pelletin üzerine eş hacimde buz üzerinde eritilen ve hücrelerin zar yapısını bozan cell disruption buffer (yaklaşık 300 µl) eklendi ve pipetlendi. İzolasyonun bu aşamasından sonraki tüm basamaklar oda sıcaklığında yapılmıştır. Cell disruption buffer üzerine yaklaşık 320 µl kit içinde bulunan lizis tamponu eklenip hafifçe alt üst edildi. Karışımın üzerine yaklaşık 320 µl %100 ACS grade etanol (Merck, USA) eklenip tekrar tüp alt üst edildi. Her örnek için toplama tüpüne bir filtre yerleştirilip filtre içine hazırlanan karışımdan en fazla 700 µl olacak şekilde eklendi. 1 dakika 11000 rpm'de santrifüjlendi. Filtrat 700 µl' den fazla ise bu işlem birden fazla kez yapıldı. Filtreden geçen sıvı atılıp filtre aynı toplama tüpüne yerleştirilip içine kitte bulunan yıkama solüsyonu 1'den 700 µl eklendi. 30 saniye santrifüjlenip filtreden geçen sıvı atılıp filtre aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerine yine kitin içinde bulunan yıkama solüsyonu 2/3 500 µl eklenip santrifüjlendi. Filtreden geçen sıvı atılıp filtre aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Filtre içine tekrar 500 µl yıkama solüsyonu 2/3 eklendi. Santrifüjden sonra filtre boş olarak tekrar santrifüjlendi. Filtre yeni bir toplama tüpüne konup filtre içine 100 µl daha önce 95°C' de ısıtılan

elüsyon solüsyonu (kit içinde bulunmaktadır) eklenip 30 saniye santrifüjlendi. Filtre atılıp, izole edilen RNA nanodropta (Multiskan GO, Thermo Scientific, USA) ölçülüp RNA miktarları belirlendikten sonra -80°C'de saklandı.

3.7. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Ekspresyonların Belirlenmesi

Hormonlara maruz kalan hücrelerden izole edilen RNA'lar kit protokolüne (Bioneer AccuPOWER RT/PCR Mix, K-2055, Alameda, USA) uygun olarak reverse transkripsiyon işlemi ile cDNA'ya çevrildi. Nanodropta (Thermo Scientific, Multiskan™ Go, USA) RNA miktarları belirlendi. Örnekler örnek başına 200 ng RNA içerecek şekilde hesaplanarak üzerilerine piR-651 ve piR-823 primerleri (Alpha DNA, Montreal, Quebec) kondu. Toplamda 19 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile dilüe edilerek 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Her hücre tipine uygun Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) (Alpha DNA, Montreal, Quebec) ve hiç primer konulmayan kontrol grubu (no template control, NTC) hazırlandı. Kullanılan primerler Tablo 3.1'de verilmiştir (Cheng, 2011; Cui, 2011; Cheng, 2012).

Tablo 3.1 Real Time PCR'da Kullanılan Primerler (Cheng, 2011; Cui, 2011; Cheng, 2012)

Primerin Adı	Forward Primer	Reverse Primer
piR-651	5'-AGAGAGGGGCCCCGTGCCTTG-3	3'-CCAGTCTCAGGGTCCGAGGTATTC-5
piR-823	5'-AGCGTTGGTGGTATAGTGGT-3	3'-CCAGTCTCAGGGTCCGAGGTATTC-5
GAPDH	5'-CGAGGGGGGAGCCAAAAGGG-3	3'-GAAACTGCGACCCCGACCGT-5

İnkübasyondan sonra, örnekler içinde 1 µl revers transkripsiyon master mix (RT buffer, dNTP, RTrandom primer, nükleaz free su ve Revers Transkriptaz) bulunan tüplere ilave edildi. Toplam 20 µl hacimde olan örneklerden RT-PCR cihazında (Stratagene MxPro3000) 42°C 60 dakika, 94°C 5 dakika işleme tutularak komplemeter DNA (cDNA) eldesi gerçekleştirildi.

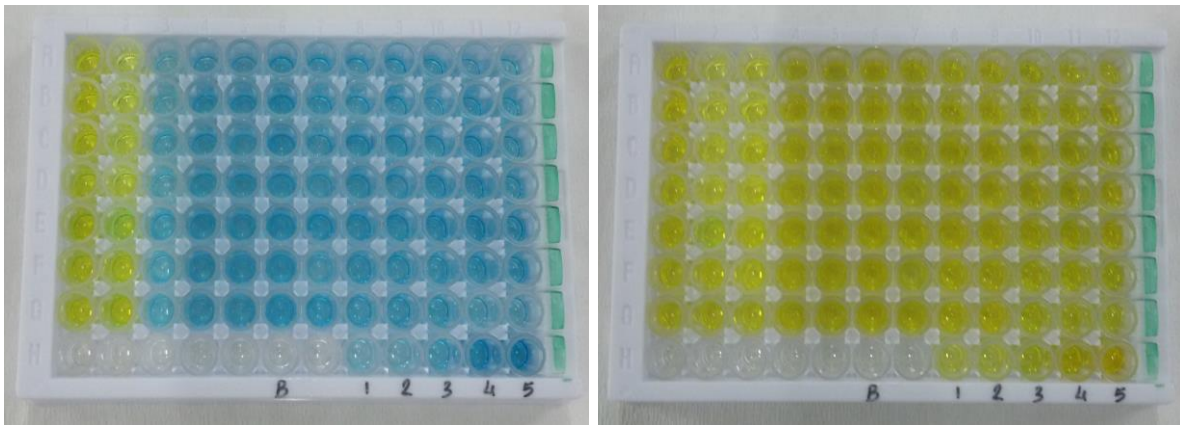
Elde edilen cDNA'lar Real Time PCR aşamasında kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı. Uygulama sırasında cDNA'lar optik kapaklı PCR tüplerine 3 tekrarlı olacak şekilde paylaştırıldı. Her tüpe 5 µl cDNA, 5 µl PCR Grade su ve 10 µl SYBR Green master mix (Agilent Technologies, 3X Brilliant III SYBR Green Master Mix, USA) konularak RT-PCR (Stratagene MxPro3000) aşaması gerçekleştirildi. RT-PCR aşamasında ilk önce 95°C'de 10 dakika tutuldu, daha sonraki aşamada 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 1 dakika ve en son olarak 72°C'de 1 dakika, 40 döngü uygulandı. En son aşamada ise erime sıcaklıklarının (melting temperature, T_m) belirlenmesi için 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye ve tekrar 95°C'de 30 saniye aşamaları uygulanıp deney sonlandırıldı.

Elde edilen her bir örnek RNA'sı için internal (endojen) kontrol ve housekeeping gen olan Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) gen ekspresyonu belirlendi. piR-651, piR-823 ve GAPDH gen ekspresyonlarına

bakılarak elde edilen CT değeri, $\Delta\Delta CT$ değeri olarak hesaplandı. Hedef gen ekspresyonu, house keeping gen GAPDH'e göre normalize edildikten sonra Real-Time PCR cihazında (RT-PCR; Stratagene MXpro3000, UK) elde edilen Ct değerleri kullanılarak $\Delta\Delta CT$ formülüne göre hesaplandı. Kontrol için GAPDH ve hiç primer konulmayan kontrol grubu (no template control, NTC) kullanıldı. 3 tekrarlı hazırlanan örnekler RealTime-PCR'da (Stratagene MX3000p) çoğaltıldı.

3.8. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Analizi

5×10^5 östrojen bağımlı ve bağımsız meme kanseri hücrelerine (MCF-7 ve MDA-MB-231) ve androjen bağımlı meme kanseri hücrelerine (PC-3 ve LNCaP) uygun dozlar verildikten sonra tripsinlererek süspanse hale getirildi. Daha sonra 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Tüpün üstündeki süpernatant alındı. Ayrıca, ELISA kitinin (YHB1142Hu, YH Biosearch Laboratory, Çin) içinde bulunan standartlar 4000, 2000, 1000, 500 ve 250 ng/L olacak şekilde seyreltilerek standart eğri hazırlandı. Kit protokolüne uygun olarak, 96 kuyucuklu platelere her örnekten 40 μ l ve her standarttan 50 μ l olacak şekilde eklendi. Üzerilerine sırasıyla 10 μ l androjen ve östrojen antikoru, 50 μ l streptavidin-horse radish peroksidaz (HRP) eklenerek kuyucukların üstü kapatıldı. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında kit içinde 30X olarak bulunan yıkama solüsyonları distile su ile seyreltilerek 1X'e çekildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra kuyucuklardaki sıvılar atılarak, 30 saniye aralıklarla 5 kere olmak üzere yıkama solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işleminden sonra sırasıyla 50 μ l kromojen ajanı A ve B eklenerek 10 dakika 37°C karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra kuyucuklara 50 μ l durdurma solüsyonu eklenerek 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında (Thermo Scientific, MultiSkan Go, USA) ölçüm yapıldı (Şekil 3. 6).



Şekil 3.6 ELISA Deney Düzenneği

3.9. İstatistiksel Değerlendirmeler

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak yapıldı. Normal dağılım gösteren değişkenlerin gruplar arasındaki karşılaştırmaları tek yönlü varyans analizi (OneWay ANOVA) ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırmalar ise Tukey HSD testi ile gerçekleştirildi. Normal dağılıma uygunluk göstermeyen değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Dunn test kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren piRNA değerleri iki grup arasında Student t testi ile karşılaştırıldı. Tablo ve grafiklerde ortalama \pm standart sapma kullanıldı. $p < 0.05$ önemlilik düzeyi * ile, $p < 0.01$ önemlilik düzeyi ** ile ve $p < 0.001$ önemlilik düzeyi *** ile gösterildi. Tüm analizler IBM SPSS Statistics 21.0 paket programı kullanılarak yapıldı.

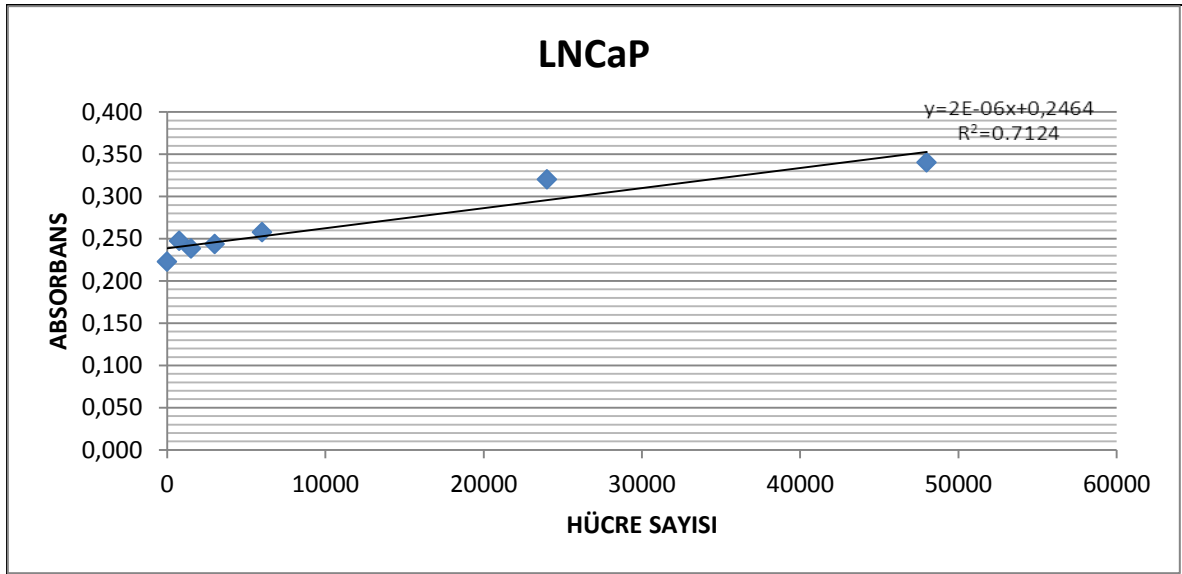
4. BULGULAR

4.1. Standart Eğri

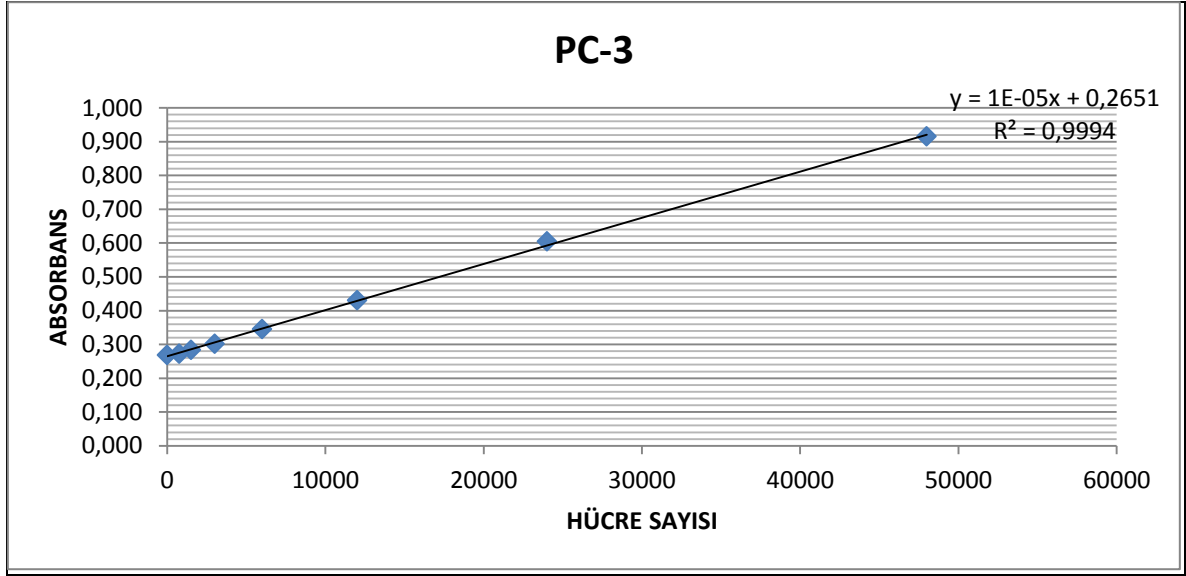
Araştırmanın ilk aşaması olarak hücrelerde standart eğri oluşturuldu. Bunun için gerekli ölçümler 3 kez tekrarlandı, her ölçüm için 8 kuyucuk kullanıldı (n=3x8) ve elde edilen sonuçlara göre standart eğri çizildi. LNCaP, PC-3; MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için standart eğriler Şekil 4.1- 4.4'te gösterildi. Her bir kuyucukta 48×10^3 , 24×10^3 , 12×10^3 , 6×10^3 , 3×10^3 , $1,5 \times 10^3$, 750 ve 0 hücre konulduktan sonra kolorometrik ölçüm yöntemine dayalı XTT yöntemiyle her grubun absorbansı ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri her hücrenin kendi standart eğri grafiğinden oluşturulan formülde yerine konularak çoğalma (proliferasyon) ve tutunma (adezyon) deneylerinde örneklerin absorbansına karşılık gelen hücre sayısı hesaplandı. Hesaplamalarda;

- LNCaP hücreleri için;
Hücre sayısı= (Ölçülen Absorbans-0.2464)/ 2×10^{-6} (Şekil 4.1)
- PC-3 hücreleri için;
Hücre sayısı= (Ölçülen Absorbans-0.2651)/ 10^{-5} (Şekil 4.2)
- MCF-7 hücreleri için;
Hücre sayısı= (Ölçülen Absorbans-0.2349)/ 7×10^{-6} (Şekil 4.3)
- MDA-MB-231 hücreleri için;
Hücre sayısı= (Ölçülen Absorbans-0.2279)/ 4×10^{-6} (Şekil 4.4)

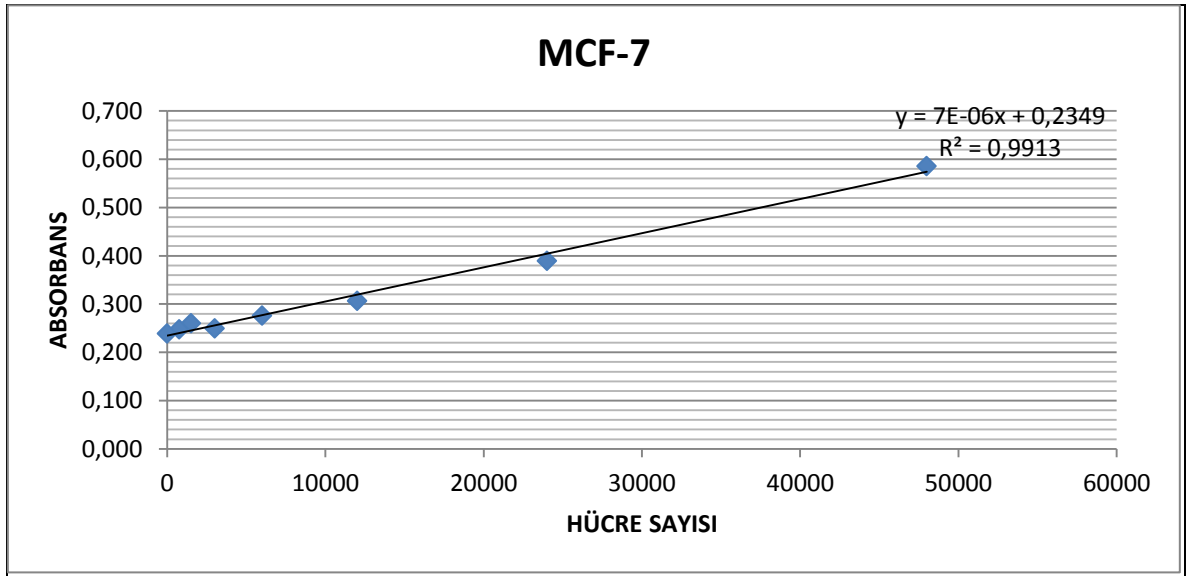
formülleri kullanılarak hücre sayıları belirlendi.



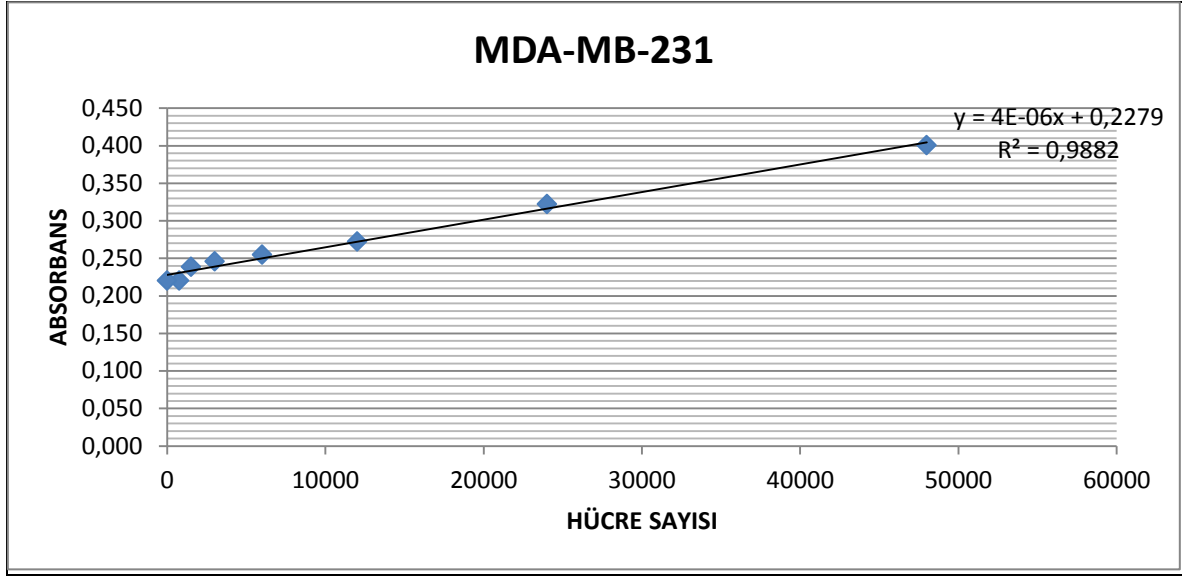
Şekil 4.1 LNCaP Hücrelerinin Standart Eğri Grafiği



Şekil 4.2 PC-3 Hücrelerinin Standart Eğri Grafiği



Şekil 4.3 MCF-7 Hücrelerinin Standart Eğri Grafiği



Şekil 4.4 MDA-MB-231 Hücrelerinin Standart Eğri Grafiği

4.2. En Yüksek Çoğalmayı (Proliferasyonu) Sağlayan Androjen ve Östrojen Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

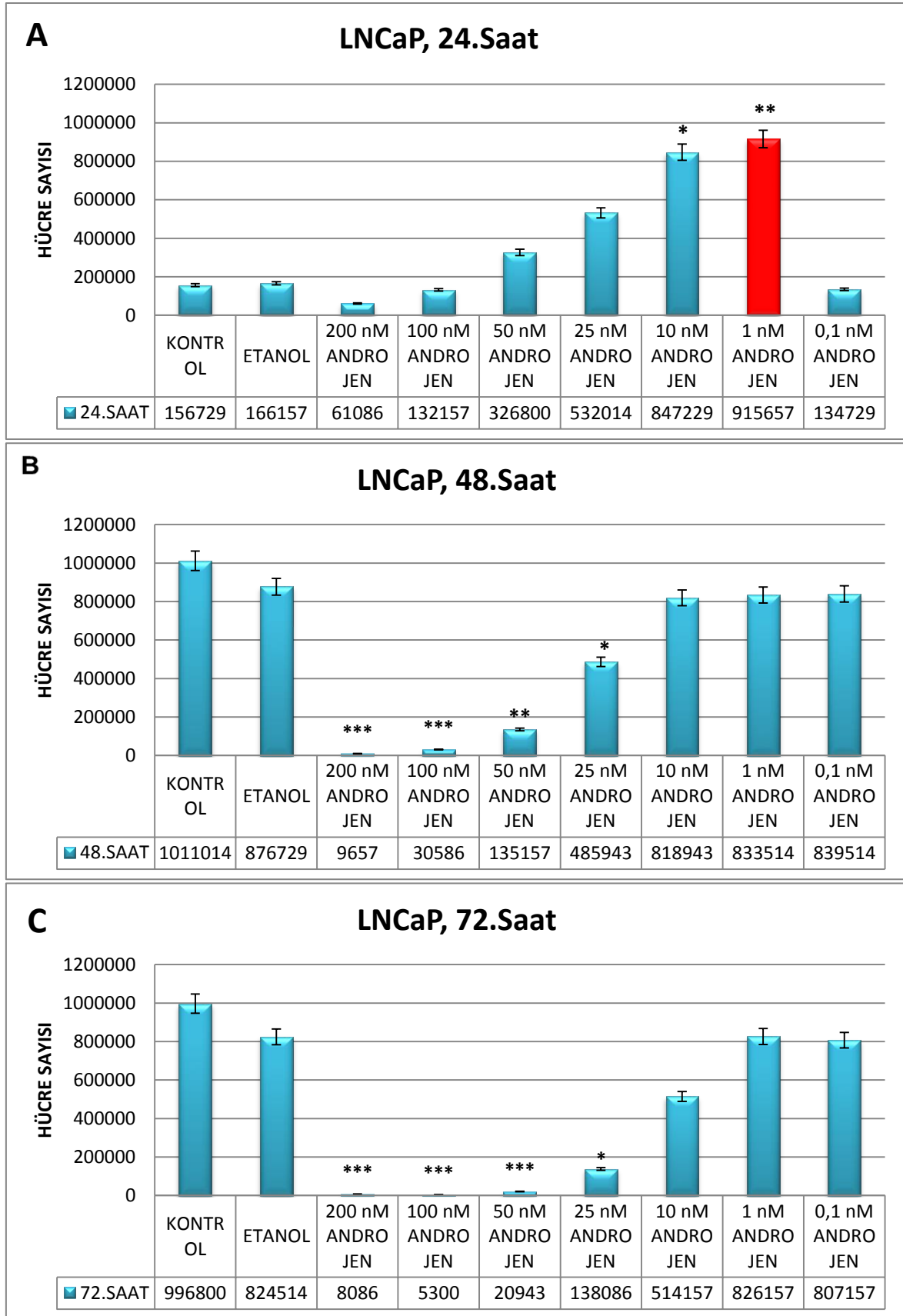
Hücrelere uygulanacak hormon konsantrasyonlarını belirlemede önceki yapılmış araştırmalar baz alınarak konsantrasyonlar belirlendi. Bunun için; LNCaP hücrelerine 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM, 1 nM, 0.1 nM (Horoszewicz, 1983; Lee vd., 1995; Henttu vd., 1992; Zhao, Peehl, Navone ve Feldman, 2000; Wolf, Herzinger, Hermeking, Blaschke ve Horz, 1993), PC-3 hücrelerine 10, 1 ve 0.1 nM (Momma vd., 1997; Trauger, 2009; Tai, 2011), MCF-7 hücrelerine 10, 1 ve 0.1 nM (Karey, 1988; Burow vd., 1999; Yamaguchi, 2014; Wang ve Phang, 1995; Harrington, 2006) ve MDA-MB-231 hücrelerine 10, 1 ve 0.1 nM (Harrington, 2006; Thompson, 1989; Le Bail, 1998) konsantrasyonlarında hormon uygulandı.

4.2.1. LNCaP hücrelerinin uygun konsantrasyon ve saatin belirlenmesi

LNCaP androjen bağımlı prostat kanseri hücrelerine 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM, 1 nM, 0.1 nM androjen uygulandı. Androjen hormonunu besiyerinde çözündürmek için etanol kullanıldı. Bu nedenle ayrıca bir de etanol grubu oluşturuldu. Gruplar arasında istatistiksel olarak normal dağılım görülmedi. Hormon uygulamasından 24 saat sonra yapılan ölçümde 10 nM androjen grubunda (847229 ± 19949) ($p < 0.05$) ve 1 nM androjen grubunda (915657 ± 25069) kontrol grubuna göre (156729 ± 22278) istatistiksel olarak artış gözlemlendi ($p < 0.01$). Hormon uygulamasından 48 saat sonra yapılan ölçümde 200 nM androjen (9657 ± 1675) ($p < 0.001$), 100 nM androjen (30586 ± 3197) ($p < 0.001$), 50 nM androjen (135157 ± 44121) ($p < 0.01$) ve 25 nM androjen uygulanan

(485943±45418) ($p<0.05$) gruplarda kontrol grubuna göre (1011014±76545) istatistiksel olarak azalma gözlemlendi. Hormon uygulamasından 72 saat sonra yapılan ölçümde kontrol grubuna göre (996800±38999) 200 nM androjen (8086±2504) ($p<0.001$), 100 nM androjen (514157±5596) ($p<0.001$), 50 nM androjen (20943±7771) ($p<0.001$) ve 25 nM androjen uygulanan (138086±36242) gruplarda ($p<0.05$) istatistiksel olarak azalma gözlemlendi.

Androjen bağımlı prostat kanser hücre dizisi LNCaP için androjenin hücre çoğalmasını en çok arttırdığı konsantrasyonun 24. saatteki 1 nM olduğu belirlendi. Hormon gruplarının 48 ve 72. saatlerindeki çoğalması kontrol ve etanol gruplarının hücre sayıları göz önünde bulundurulduğunda düşük bulundu. Elde ettiğimiz veriler göz önünde bulundurulduğunda 48 ve 72. saatlerdeki verilerin 24. saatteki verilere göre sağlıklı sonuçlar göstermediğine karar verildi. Bu nedenle bu hücrelerde 24. saat, 1 nM'lık androjen uygulaması yapılan grupta çoğalma, canlılık ve tutunma (adezyon) deneyleri yapılarak piR-651 ve piR-823 ekspresyonları ile hücre içi hormon miktarları belirlendi. 24, 48 ve 72. saatlerdeki ölçümler Şekil 4. 5'te gösterilmiştir.

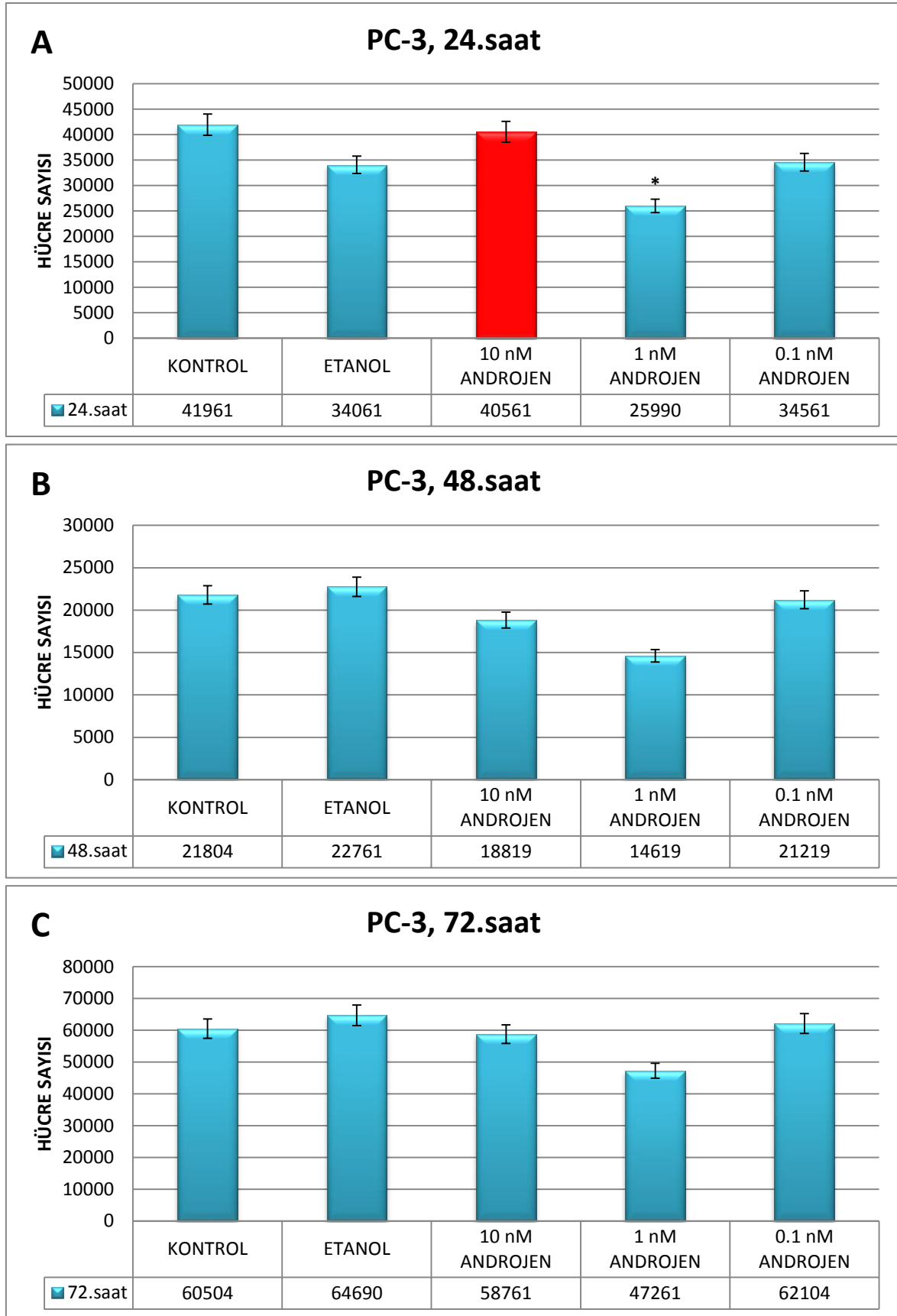


Şekil 4.5 Androjen Bağımlı Prostat Kanseri Hücre Dizisi olan LNCaP'in 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) Saatlerindeki Hücre Sayıları * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4.2.2. PC-3 hücrelerinin uygun konsantrasyon ve saatin belirlenmesi

PC-3 hücrelerine 10 nM, 1 nM, 0.1 nM androjen uygulandı. 24. saat verilerinde tüm gruplar normal dağılım gösterdi. Gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlendi. Kontrol grubuna (41961±907) göre 1 nM androjen (25990±5334) grubunda istatistiksel olarak azalma gözlemlendi (p<0.05).

Androjen bağımsız prostat kanser hücre dizisi PC-3 için androjenin hücre çoğalmasını en çok arttıran konsantrasyonu 24. saatteki 10 nM olduğu belirlendi. Hücre karakteri açısından androjen hormonundan etkilenmediği için hormon uygulanan hücrelerde 24, 48 ve 72. saatlerinde belirlenen hücre çoğalması kontrol grubuna göre düşük olduğu gözlemlendi. Buna ek olarak hormon uygulamasından 72 saat sonra yapılan ölçümde etanol grubundaki çoğalan hücre sayısı 24. saatteki değerlere göre yüksek bulundu. Daha önce yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi kanser hücrelerinde etanol belirli bir süreden sonra siklik AMP (cAMP) seviyesini arttırarak kanser hücrelerinin çoğalmasını arttırmaktadır (Simanowski vd., 1986; Przylipek, Rabe, Hafner, Przylipek ve Runnebaum, 1996; Ginsberg, 1999; Fan vd., 2000; Singletary, Frey ve Yan, 2001). Elde ettiğimiz veriler göz önünde bulundurulduğunda 48 ve 72. saatlerdeki verilerin 24. saatteki verilere göre sağlıklı sonuçlar göstermediğine karar verildi. Bu nedenle bu hücrelerde 24. saat, 10 nM'lık androjen uygulaması yapılan grupta çoğalma (proliferasyon), canlılık ve tutunma (adezyon) deneyleri yapılarak piR-651 ve piR-823 ekspresyonları ile hücre içi hormon miktarları belirlendi. 24, 48 ve 72. saatlerdeki ölçümler Şekil 4. 6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Androjen Bağımsız Prostat Kanseri Hücre Dizisi olan PC-3'ün 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) Saatlerindeki Hücre Sayıları *p<0.05

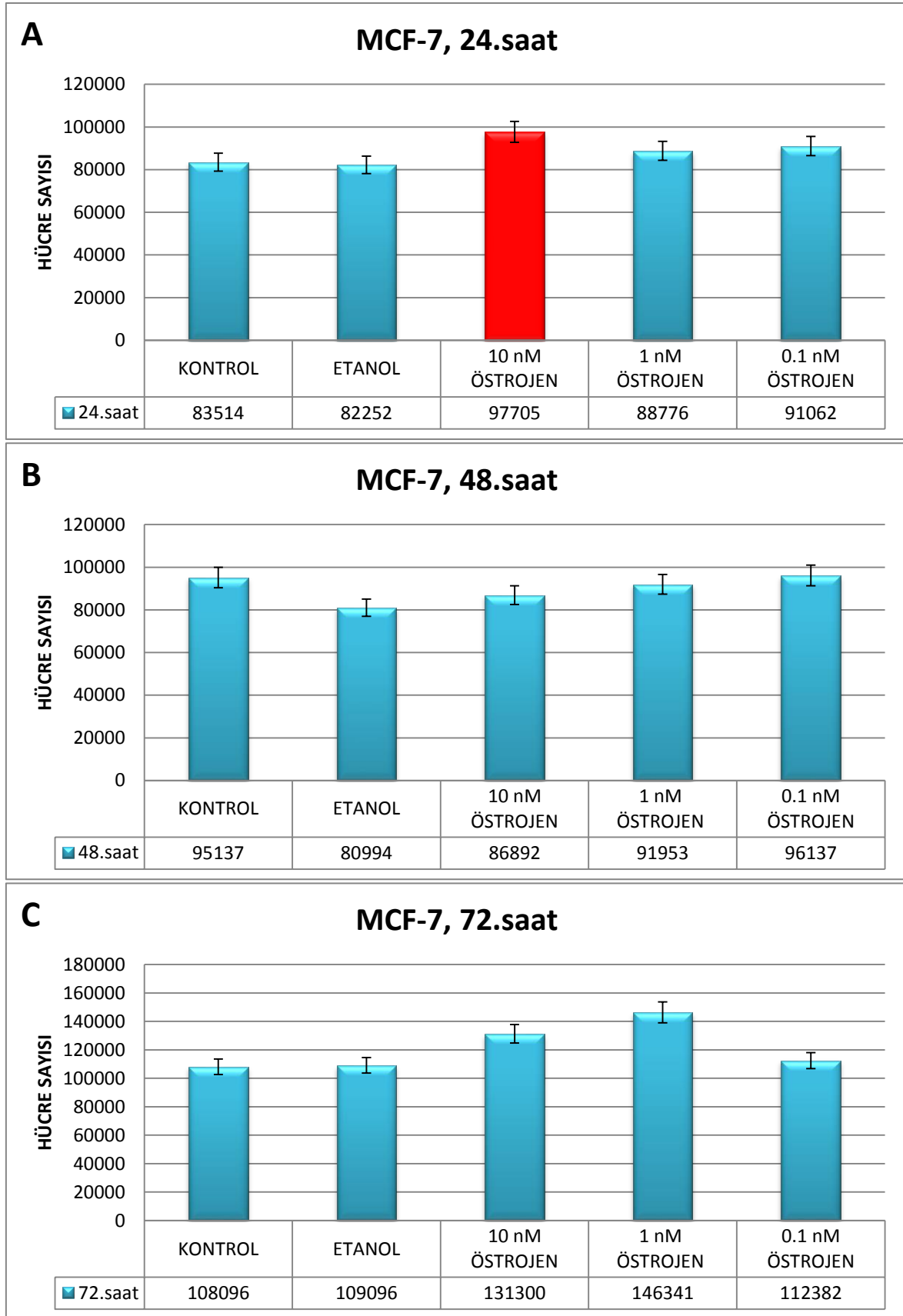
4.2.3. MCF-7 hücrelerinin uygun konsantrasyon ve saatin belirlenmesi

MCF-7 hücrelerine 10 nM, 1 nM, 0.1 nM östrojen uygulandı. Östrojenin besiyerinde çözdürmek için etanol kullanıldığı için östrojenden ayrı olarak bir etanol grubu hazırlandı. Tüm gruplar normal dağılım gösterdi. Gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlenmedi ($p>0.05$). MCF-7 hücrelerinde 24, 48 ve 72. saatlerde ölçülen hücre sayıları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Östrojen bağımlı meme kanser hücre dizisi MCF-7 için östrojenin hücre çoğalmasını en çok arttıran konsantrasyonu 24. saatteki 10 nM olduğu belirlendi. Canlılık ve hücre çoğalmasından elde edilen veriler de göz önünde bulundurulduğunda 48 ve 72. saatlerdeki verilerin 24. saatteki verilere göre sağlıklı sonuçlar göstermediğine karar verildi. Bu nedenle bu hücrelerde 24. saat, 10 nM'lık östrojen uygulaması yapılan grupta çoğalma (proliferasyon), canlılık ve tutunma (adezyon) deneyleri yapılarak piR-651 ve piR-823 ekspresyonları ile hücre içi hormon miktarları belirlendi. 24, 48 ve 72. saatlerdeki ölçümler Şekil 4. 7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 MCF-7 Hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerinde Ölçülen Hücre Sayıları ($p>0.05$)

	24.SAAT	48.SAAT	72.SAAT
KONTROL	83514±3709	95137±5337	108096±19627
ETANOL	82252±5391	80994±3634	109096±6901
10 nM ÖSTROJEN	97704±2881	86892±5600	131300±4551
1 nM ÖSTROJEN	88776±4534	91953±5063	146340±6284
0.1 nM ÖSTROJEN	91061±4889	96137±5179	112381±4988



Şekil 4.7 Östrojen Bağımlı Meme Kanseri Hücre Dizisi olan MCF-7'nin 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) Saatlerindeki Hücre Sayıları

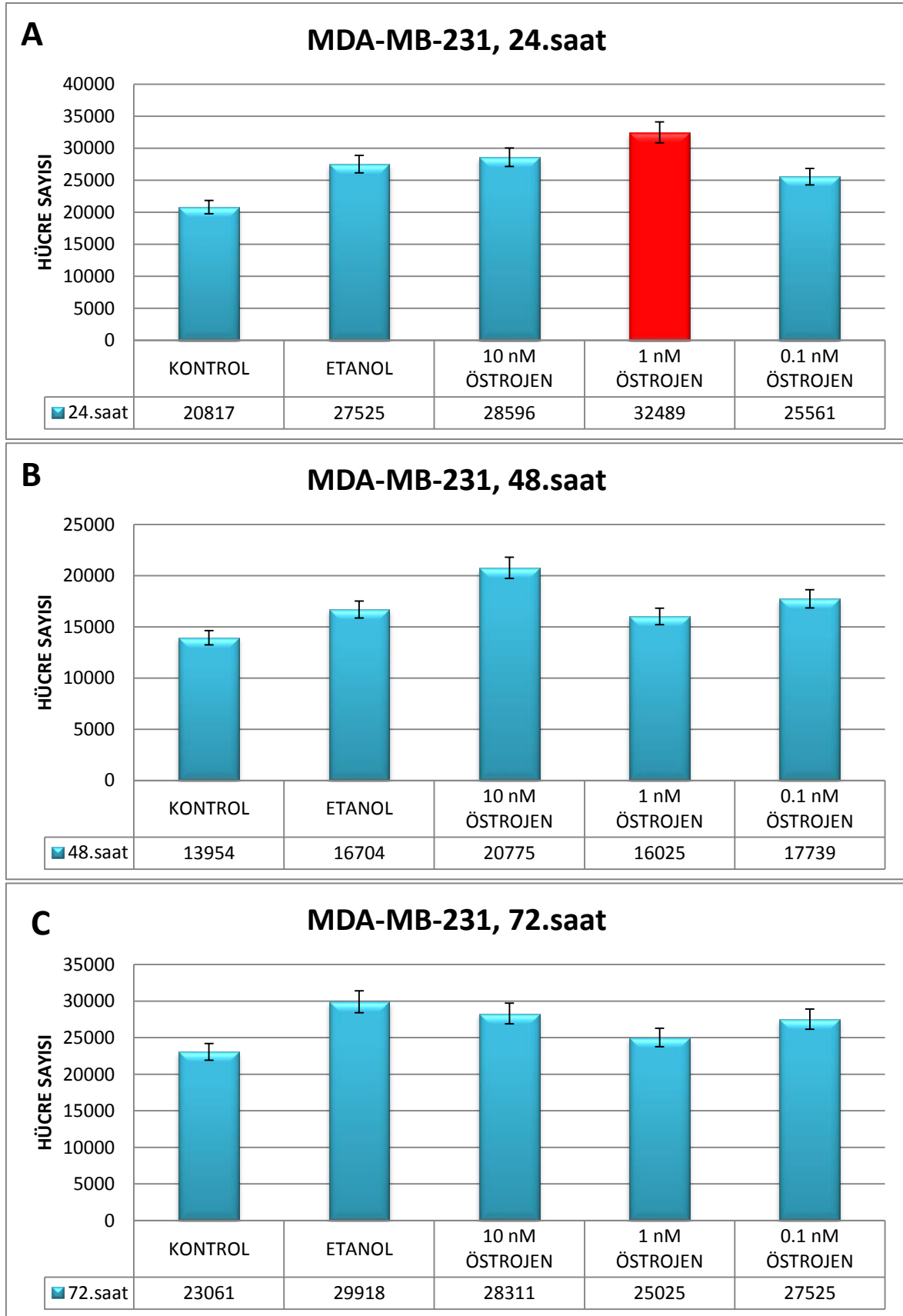
4.2.4. MDA-MB-231 hücrelerinin uygun konsantrasyon ve saatin belirlenmesi

MDA-MB-231 hücrelerine 10 nM, 1 nM, 0.1 nM östrojen uygulandı. Gruplar arasında normal dağılım görülmemekle beraber gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlenmedi ($p>0.05$). MDA-MB-231 Hücrelerinde 24, 48 ve 72. saatlerinde ölçülen hücre sayıları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Östrojen bağımsız meme kanser hücre dizisi MDA-MB-231 için kontrol grubuna göre hücre çoğalmasında en çok artış hormon uygulamasından 24.saat sonra 1 nM konsantrasyonunda olduğu belirlendi. 24.saatteki 1 nM östrojen grubunun hücre sayısındaki artış miktarı kontrol grubunun hücre sayısının %50’sinden fazladır. Bu nedenden dolayı 48 ve 72. saatlerdeki hücre sayılarının 24. saatteki hücre sayısına göre sağlıklı sonuçlar göstermediğine karar verildi. Bu hücrelerde 24.saat, 1 nM’lık östrojen uygulaması yapılan grupta çoğalma (proliferasyon), canlılık ve tutunma (adezyon) deneyleri yapılarak piR-651 ve piR-823 ekspresyonları ile hücre içi hormon miktarları belirlendi. 24., 48. ve 72.saatlerdeki ölçümler Şekil 4. 8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2 MDA-MB-231 Hücrelerinde 24, 48 ve 72.Saatlerde Ölçülen Hücre Sayıları ($p>0.05$)

	24.SAAT	48.SAAT	72.SAAT
KONTROL	20816±2833	13953±586	23061±504
ETANOL	27525±2813	16703±1728	29918±1343
10 nM ÖSTROJEN	28596±3019	20775±3435	28311±527
1 nM ÖSTROJEN	32489±4126	16025±830	25025±1669
0.1 nM ÖSTROJEN	25560±1515	17739±2073	27525±2313

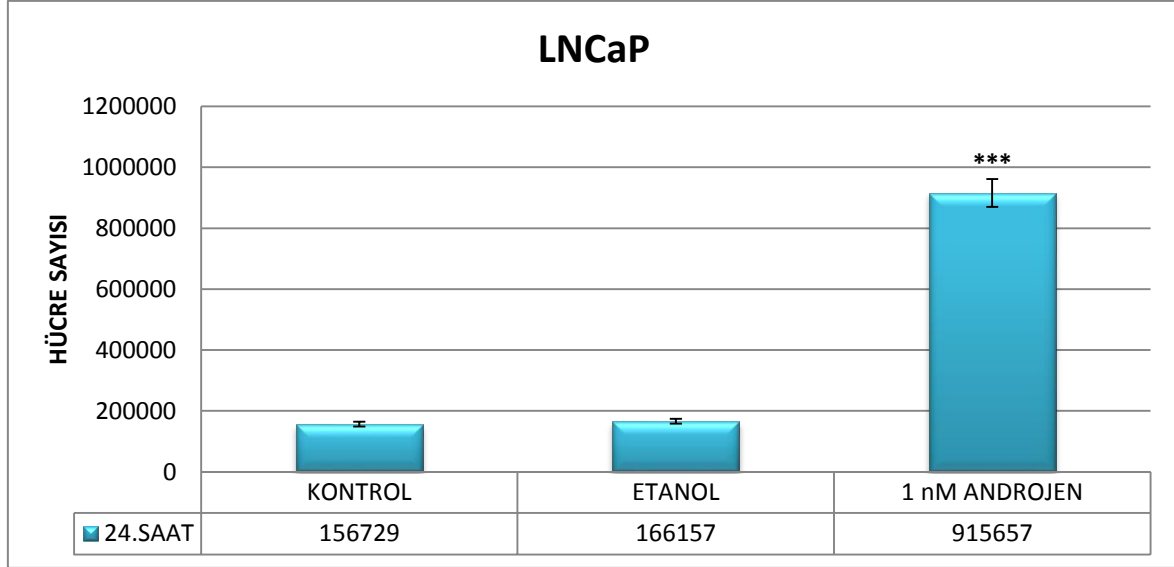


Şekil 4.8 Östrojen Bağımsız Meme Kanser Hücre Dizisi olan MDA-MB-231'in 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) Saatlerindeki Hücre Sayıları

4.3. Çoğalma (Proliferasyon) Belirlemeleri

4.3.1. LNCaP hücrelerinde çoğalmanın (proliferasyonun) belirlenmesi

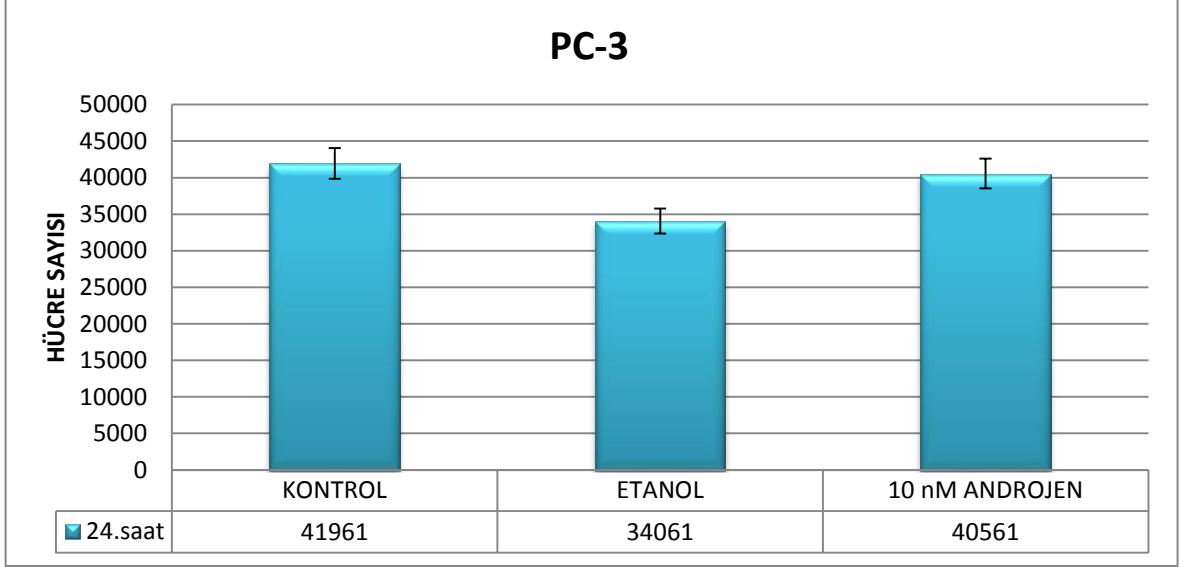
LNCaP hücrelerinde belirlenen hücre sayısına göre gruplar arasında normal dağılım görülmedi. Kontrol grubuna (156729 ± 22278) göre 1 nM androjen grubunun çoğalmasında (915657 ± 25069) önemli düzeyde artış gösterdi (Şekil 4. 9) ($p < 0.001$).



Şekil 4.9 LNCaP Hücrelerinin Çoğalma (Proliferasyon) Grafiği *** $p < 0.001$

4.3.2. PC-3 hücrelerinde çoğalmanın (proliferasyonun) belirlenmesi

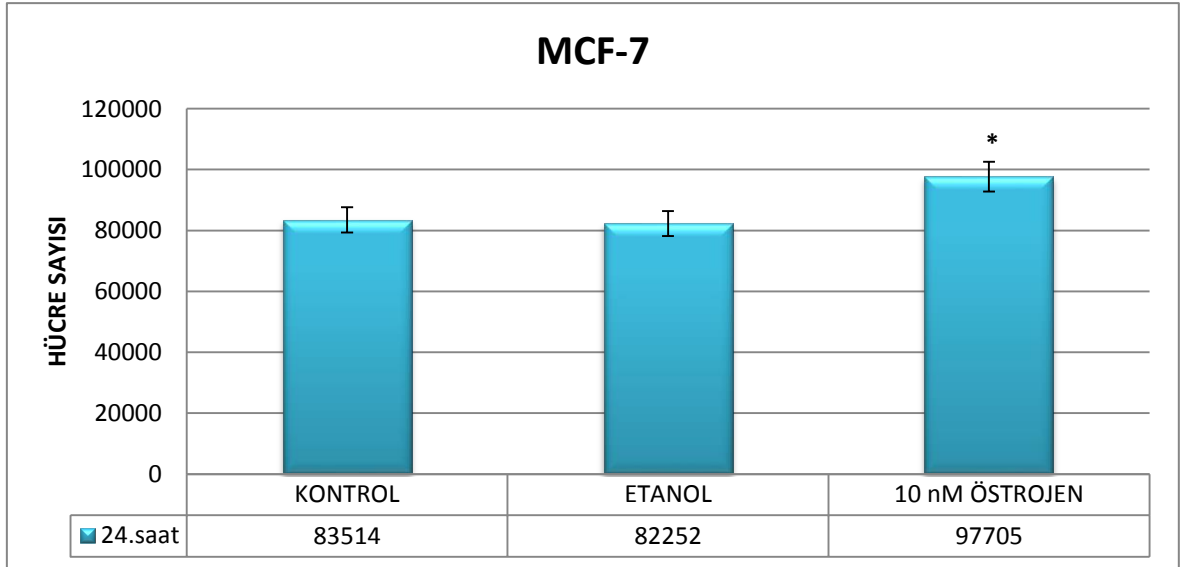
PC-3 hücrelerinde gruplar arasında normal dağılım belirlendi. Kontrol grubunda 41961 ± 907 , etanol grubunda 34061 ± 3411 ve 10 nM androjen grubunda 40561 ± 2097 miktarında hücre belirlendi. Ancak gruplar arasında istatistiksel fark gözlenmedi (Şekil 4. 10) ($p > 0.05$).



Şekil 4.10 PC-3 Hücrelerinin Çoğalma (Proliferasyon) Grafiği

4.3.3. MCF-7 hücrelerinde çoğalmanın (proliferasyonun) belirlenmesi

MCF-7 hücrelerinde gruplar arasında normal dağılım belirlendi. İstatistiksel olarak etanol grubuna (82252 ± 5391) göre 10 nM östrojen grubunun çoğalmasında (97704 ± 2881) istatistiksel olarak artış gözlemlendi (Şekil 4. 11) ($p < 0.05$).

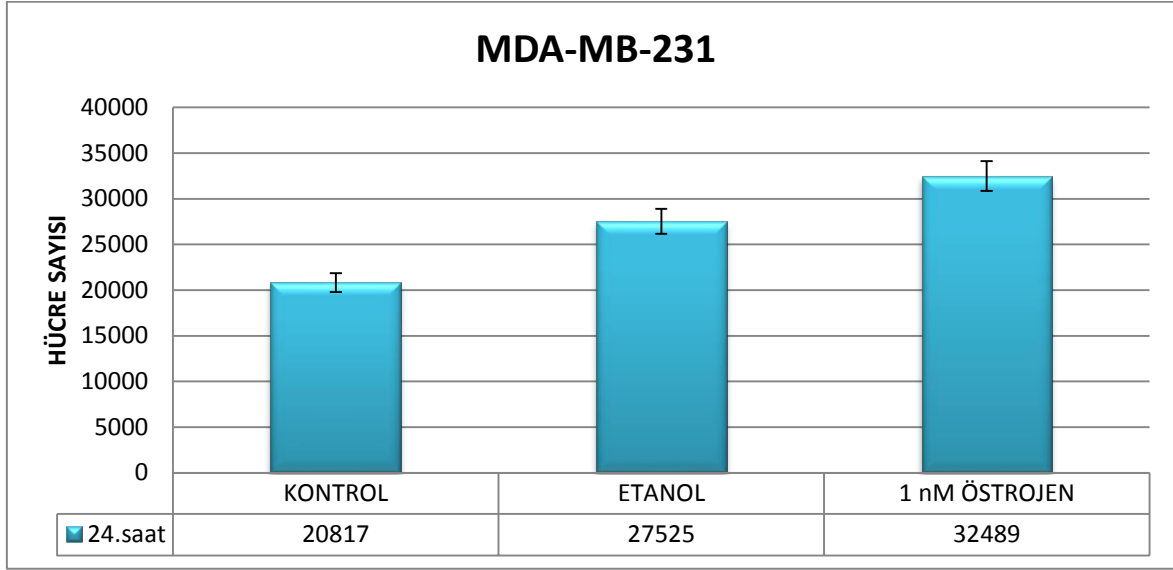


Şekil 4.11 MCF-7 Hücrelerinin Çoğalma (Proliferasyon) Grafiği * $p < 0.05$

4.3.4. MDA-MB-231 hücrelerinde çoğalmanın (proliferasyonun) belirlenmesi

MDA-MB-231 hücrelerinde gruplar arasında normal dağılım görülmedi. Kontrol grubunda 20817 ± 2833 , etanol grubunda 27525 ± 7443 ve 1 nM östrojen grubunda 32489 ± 10917 miktarında hücre belirlendi.

Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4. 12) ($p>0.05$).

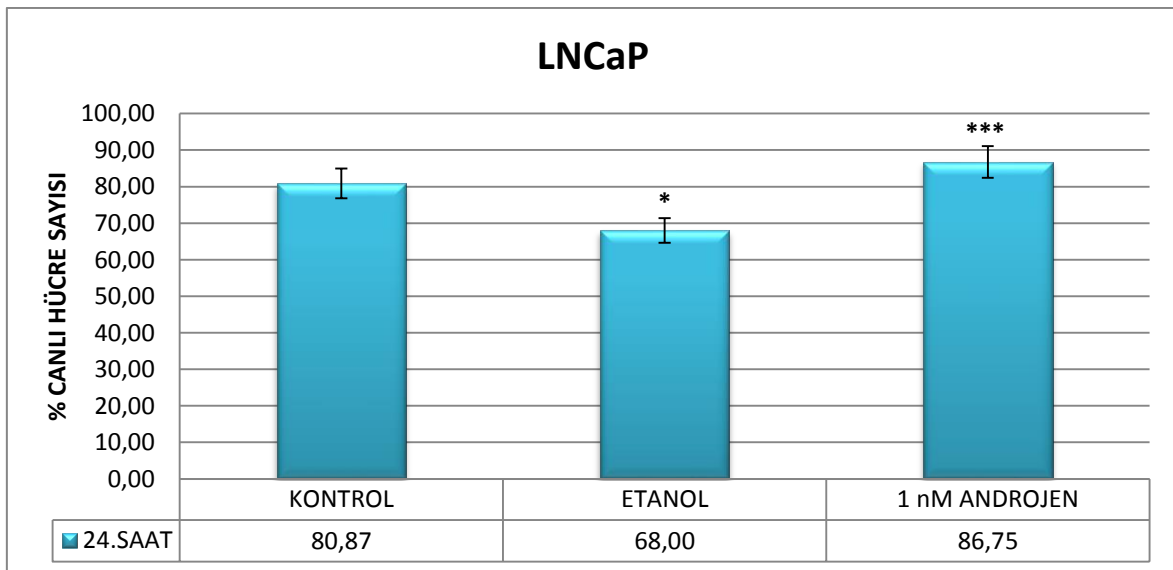


Şekil 4.12 MDA-MB-231 Hücrelerinin Çoğalma (Proliferasyon) Grafiği

4.4. Canlılık Belirlemeleri

4.4.1. LNCaP hücrelerinde canlılığın belirlenmesi

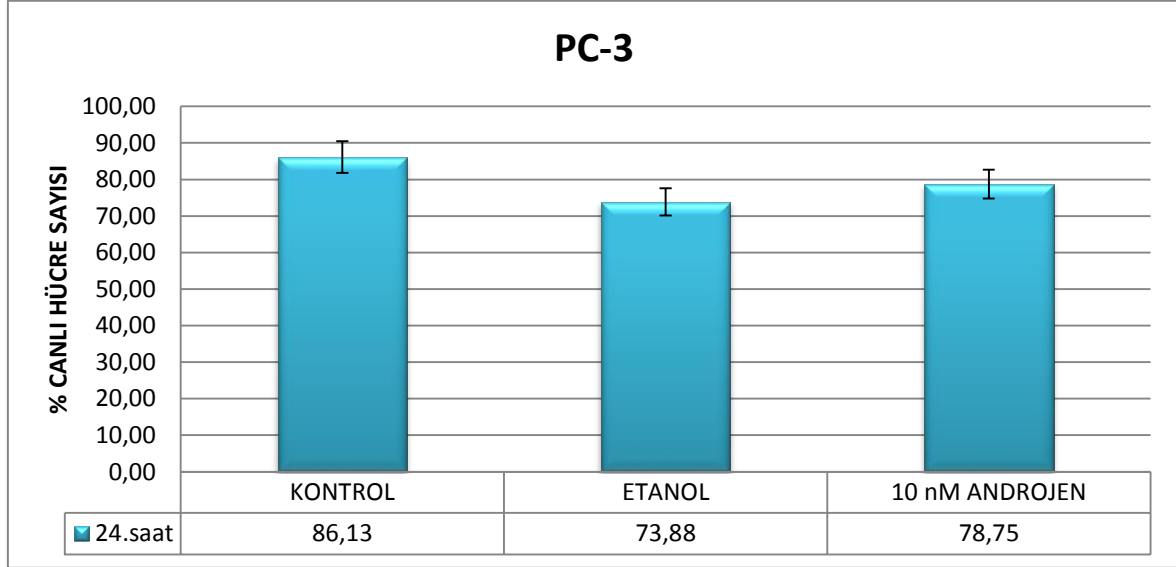
LNCaP hücrelerine uygulanan androjenin hücreyel canlılığa olan etkisinin belirlenmesinde tüm gruplar normal dağılım göstermekle beraber gruplar arasında fark belirlendi ($p<0.001$). Kontrol grubuna (80.87 ± 3.51) göre etanol grubunun % canlı hücre sayısında (68 ± 3.26) istatistiksel olarak azalma gözlemlendi ($p<0.05$). Ayrıca etanol grubuna (68 ± 3.26) göre 1 nM androjen grubunun % canlı hücre sayısında (86.75 ± 2.42) istatistiksel olarak artış gözlemlendi (Şekil 4. 13) ($p<0.001$).



Şekil 4.13 LNCaP Hücrelerinin Canlılık Grafiği * $p<0.05$, *** $p<0.001$

4.4.2. PC-3 hücrelerinde canlılığın belirlenmesi

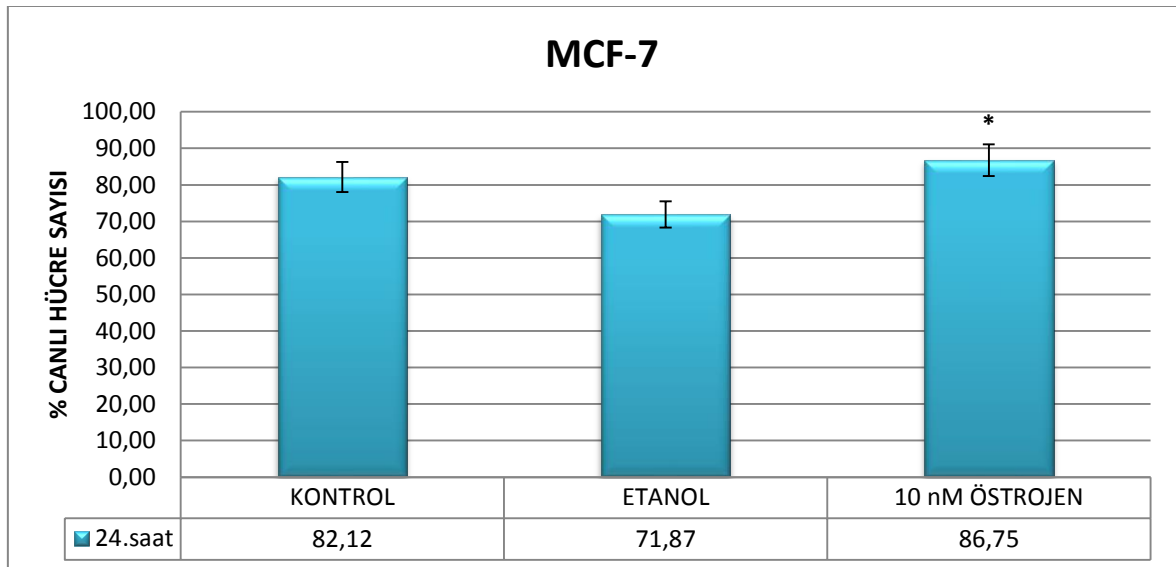
PC-3 hücrelerine uygulanan androjenin canlılığa olan etkisinde gruplar arasında normal dağılım görülmedi. Kontrol grubunda 86.13 ± 5.45 , etanol grubunda 73.88 ± 6.89 ve 10 nM androjen grubunda 78.75 ± 7.37 miktarında % canlı hücre sayısı belirlendi. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlenmedi (Şekil 4. 14) ($p > 0.05$).



Şekil 4.14 PC-3 Hücrelerinin Canlılık Grafiği

4.4.3. MCF-7 hücrelerinde canlılığın belirlenmesi

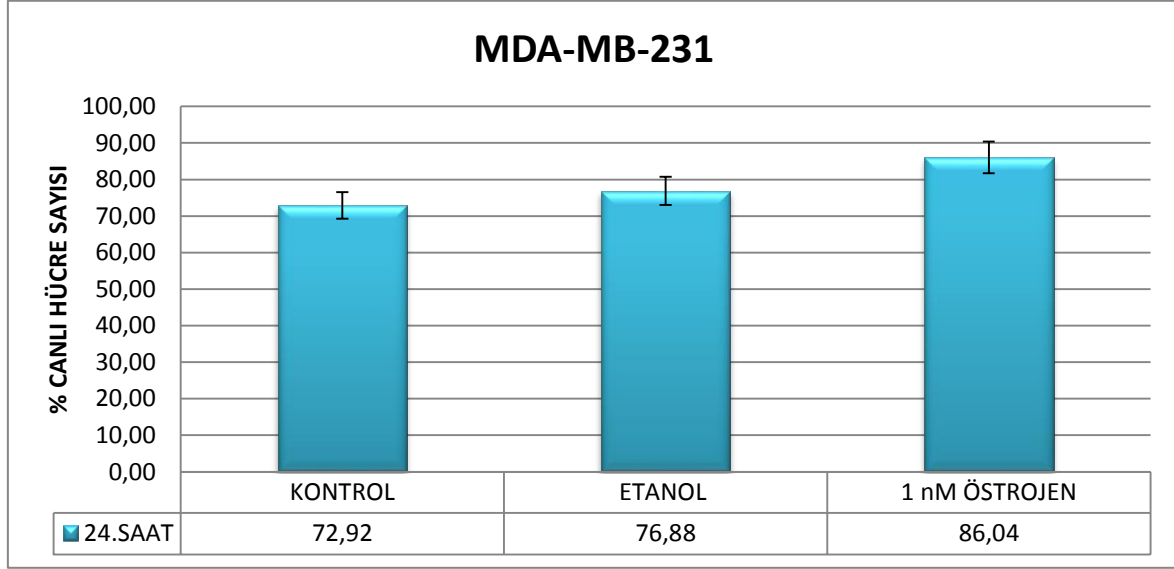
MCF-7 hücrelerine uygulanan östrojenin hücre sel canlılığa olan etkisinde tüm gruplar normal dağılım gösterdi. Etanol grubuna (71.87 ± 2.92) göre 10 nM östrojen grubunun (86.75 ± 3.37) % canlı hücre sayısında istatistiksel olarak artış gözlemlendi (Şekil 4. 15) ($p < 0.05$).



Şekil 4.15 MCF-7 Hücrelerinin Canlılık Grafiği * $p < 0.05$

4.4.4. MDA-MB-231 hücrelerinde canlılığın belirlenmesi

MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan östrojenin hücresel canlılığa olan etkisinde gruplar arasında normal dağılım belirlenmedi. Kontrol grubunda 72.92 ± 4.9 , etanol grubunda 76.88 ± 4.81 ve 1 nM östrojen grubunda 86.04 ± 5.24 miktarında % canlı hücre sayısı belirlendi. Ancak İstatistiksel olarak gruplar arasında fark gözlenmedi (Şekil 4. 16) ($p > 0.05$).



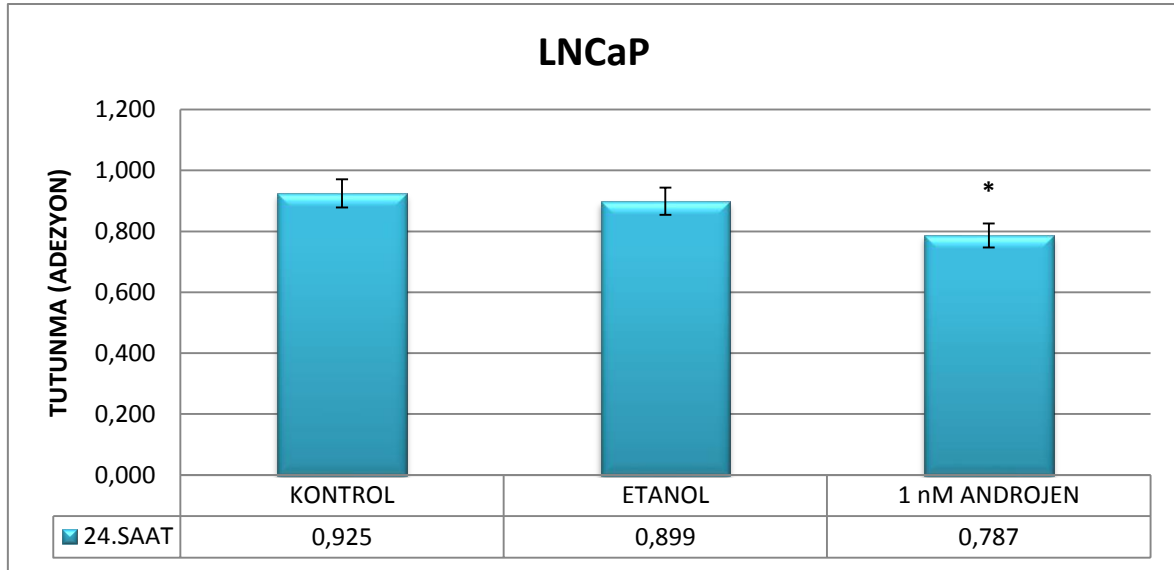
Şekil 4.16 MDA-MB-231 Hücrelerinin Canlılık Grafiği

Canlılık açısından tüm hücreler değerlendirildiğinde LNCaP ve MCF-7 hücrelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

4.5. Tutunma (Adezyon) Belirlemeleri

4.5.1. LNCaP hücrelerinde tutunmanın (adezyonun) belirlenmesi

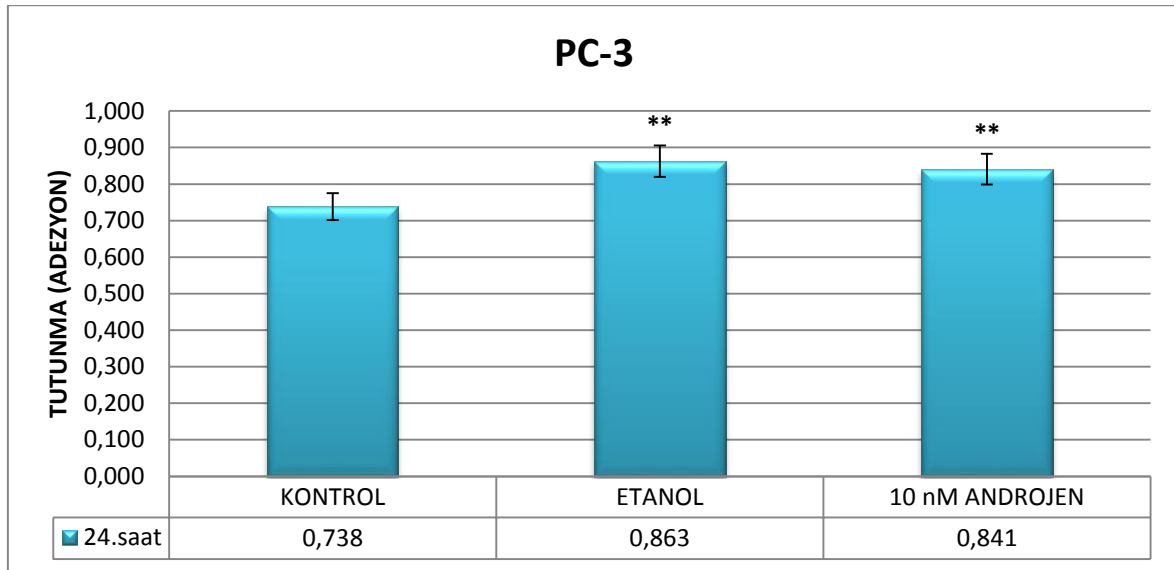
LNCaP hücrelerinde gruplar arasında normal dağılım görülmedi. İstatistiksel olarak kontrol grubuna (0.925 ± 0.93) göre 1nM androjen grubunun tutunmasında (0.787 ± 0.116) azalma gözlemlendi (Şekil 4. 17) ($p < 0.05$).



Şekil 4.17 LNCaP Hücrelerinin Tutunma (Adezyon) Grafiği * $p < 0.05$

4.5.2. PC-3 hücrelerinde tutunmanın (adezyonun) belirlenmesi

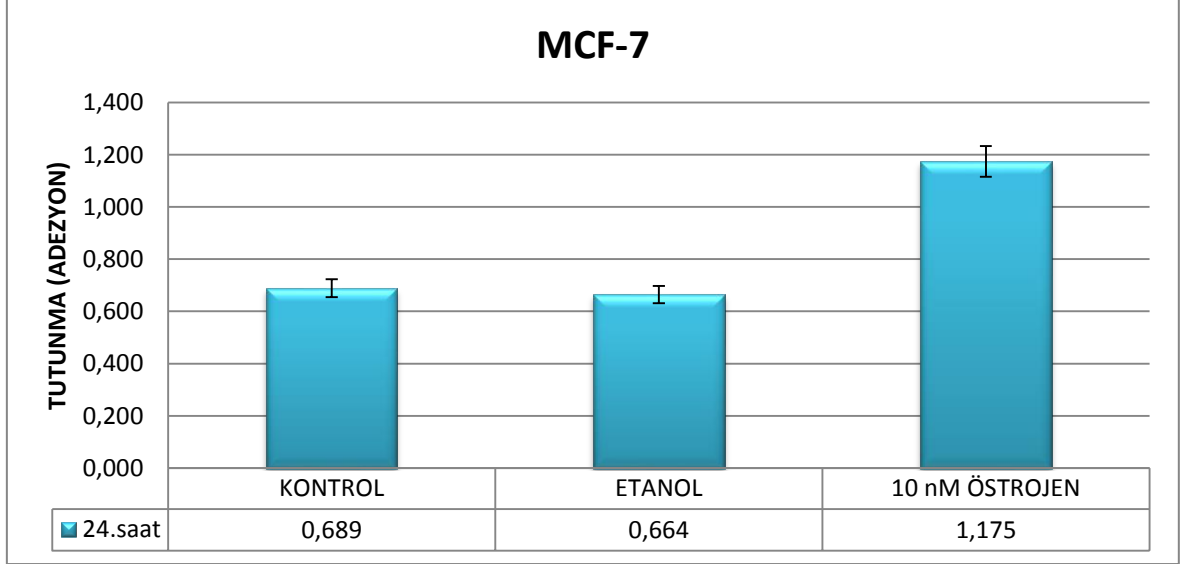
PC-3 hücrelerinde gruplar arasında normal dağılım belirlendi. Kontrol grubuna (0.738 ± 0.02) göre etanol grubunun (0.863 ± 0.022) ve 10 nM androjen grubunun tutunmasında (0.841 ± 0.022) istatistiksel olarak artış belirlendi (Şekil 4. 18) ($p < 0.01$).



Şekil 4.18 PC-3 Hücrelerinin Tutunma (Adezyon) Grafiği ** $p < 0.01$

4.5.3. MCF-7 hücrelerinde tutunmanın (adezyonun) belirlenmesi

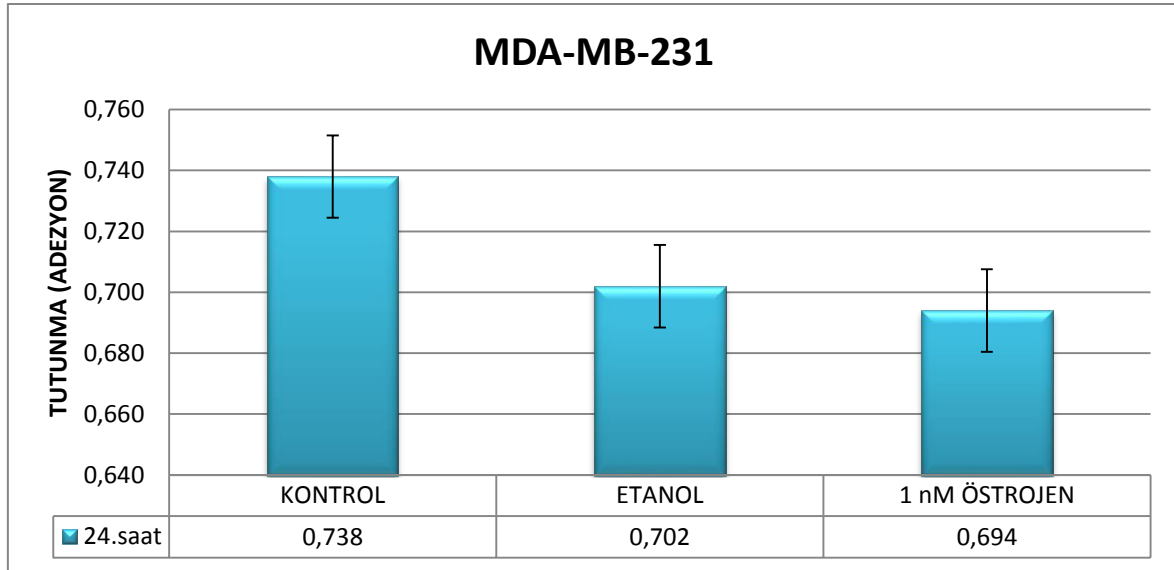
MCF-7 hücrelerinde gruplar arasında normal dağılım görülmedi. Kontrol grubunda 0.689 ± 0.063 , etanol grubunda 0.664 ± 0.046 ve 10 nM östrojen grubunda 1.175 ± 0.21 miktarında tutunma (adezyon) ölçüldü. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlenmedi (Şekil 4.19) ($p > 0.05$).



Şekil 4.19 MCF-7 Hücrelerinin Tutunma (Adezyon) Grafiği

4.5.4. MDA-MB-231 hücrelerinde tutunmanın (adezyonun) belirlenmesi

MDA-MB-231 hücrelerinde tüm gruplar normal dağılım gösterdi. Kontrol grubunda 0.738 ± 0.021 , etanol grubunda 0.702 ± 0.011 ve 1 nM östrojen grubunda 0.694 ± 0.01 miktarında tutunma (adezyon) ölçüldü. İstatistiksel olarak gruplar arasında fark belirlenmedi (Şekil 4. 20) ($p > 0.05$).



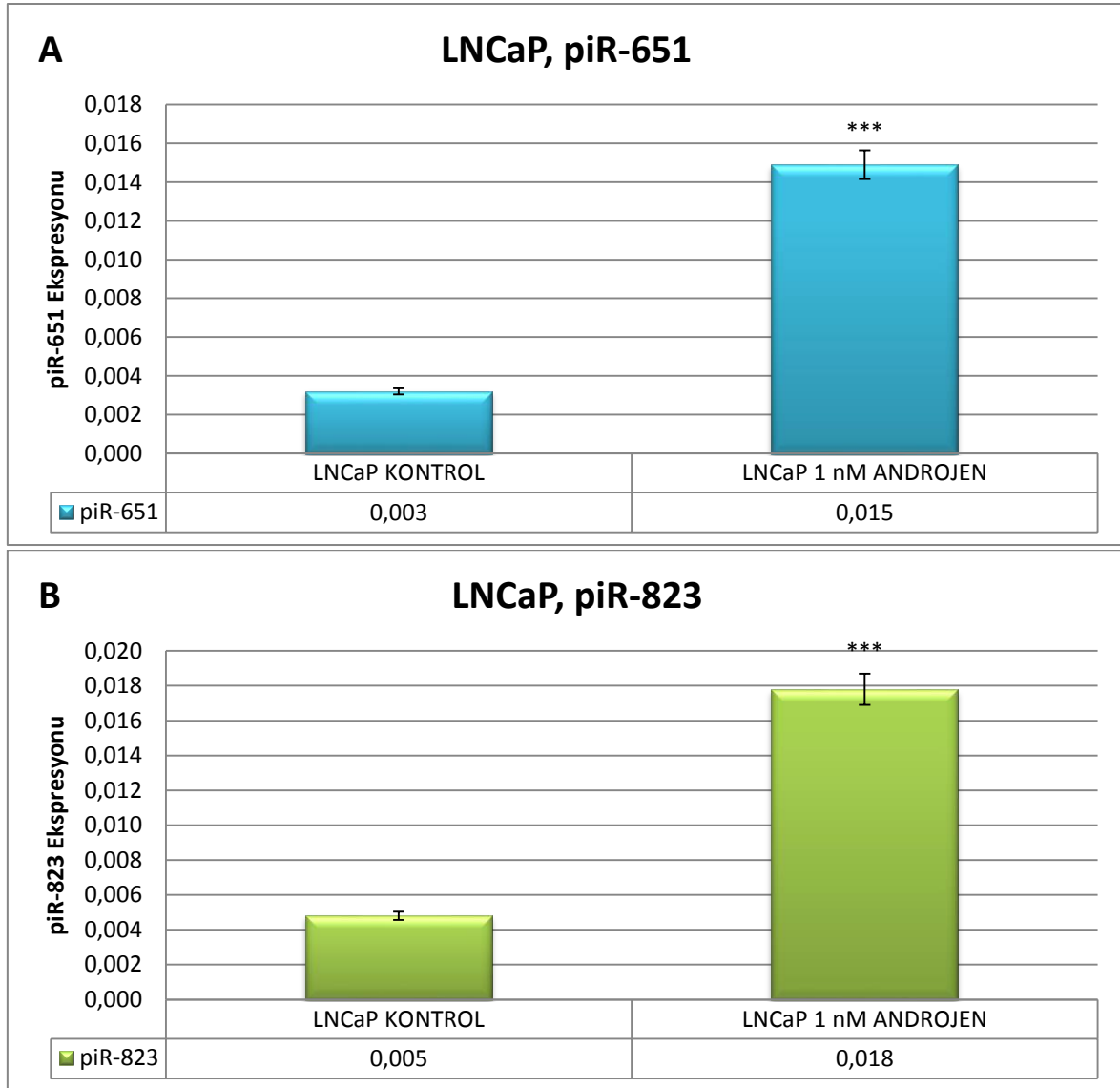
Şekil 4.20 MDA-MB-231 Hücrelerinin Tutunma (Adezyon) Grafiği

Hormon uygulamasından sonra sadece prostat kanseri hücrelerindeki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu sonuca göre androjen uygulanan LNCaP hücrelerinde tutunmanın (adezyonun) azaldığı, PC-3 hücrelerinde ise arttığı belirlendi.

4.6. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Ekspresyonların Belirlenmesi

4.6.1. LNCaP hücrelerinde piR-651 ve piR-823 ekspresyonunun belirlenmesi

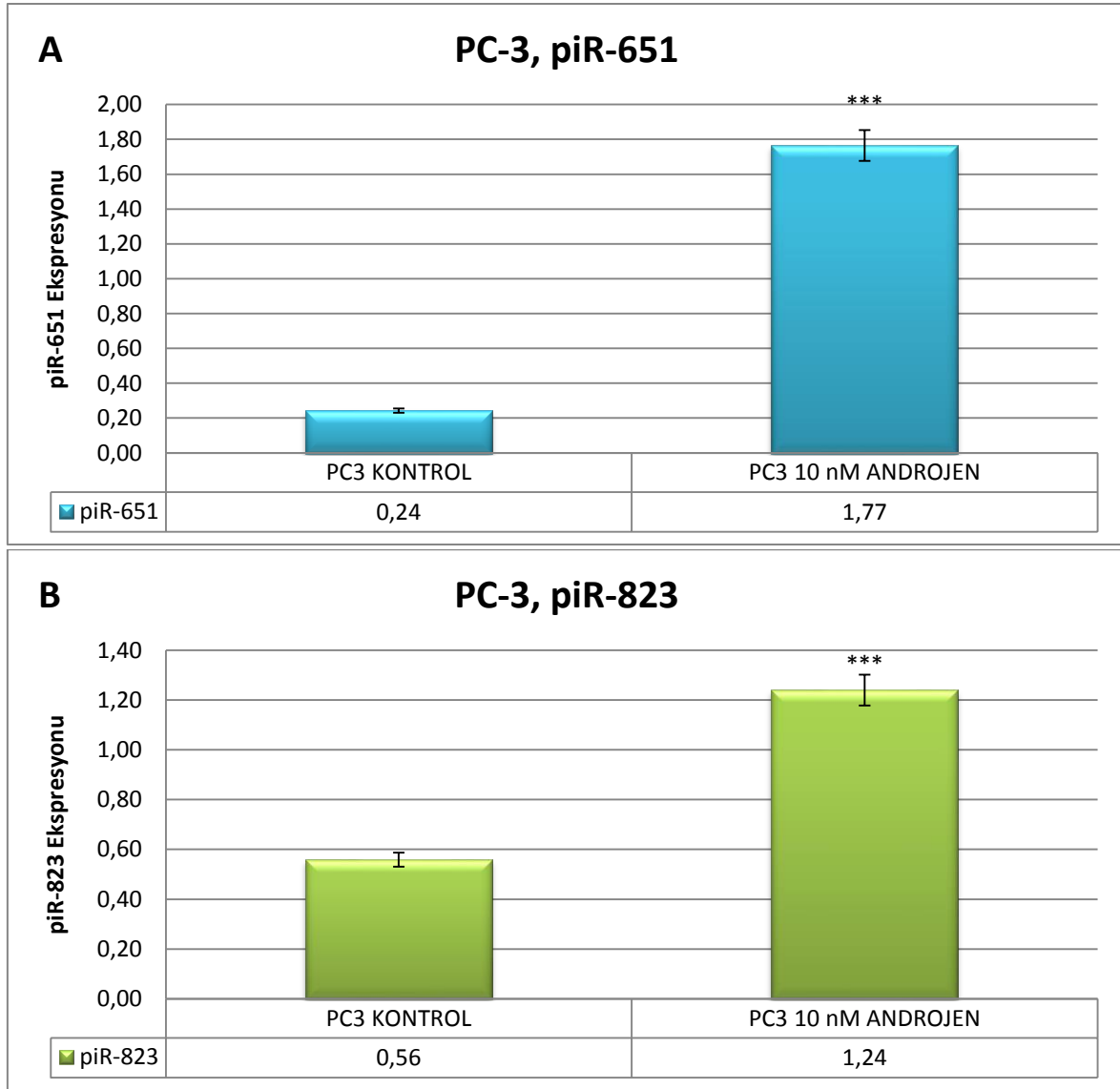
LNCaP hücrelerine uygulanan 1 nM konsantrasyonundaki androjenin 24. saatinde belirlenen piR-651 ve piR-823 ekspresyonlarında tüm gruplar arasında normal dağılım belirlendi. İstatistiksel olarak gruplar arasında fark belirlendi. 1 nM androjen grubunun piR-651 ekspresyonunda (0.015 ± 0.00008) kontrol grubuna (0.003 ± 0.00008) göre istatistiksel olarak artış gözlemlendi ($p < 0.001$). 1 nM androjen grubunun piR-823 ekspresyonunda (0.018 ± 0.00008) kontrol grubuna (0.005 ± 0.00008) göre istatistiksel olarak artış gözlemlendi (Şekil 4. 21) ($p < 0.001$).



Şekil 4.21 LNCaP Hücrelerinde Belirlenen piR-651 (A) ve piR-823 (B) Ekspresyonları
***p<0.001

4.6.2. PC-3 hücrelerinde piR-651 ve piR-823 ekspresyonunun belirlenmesi

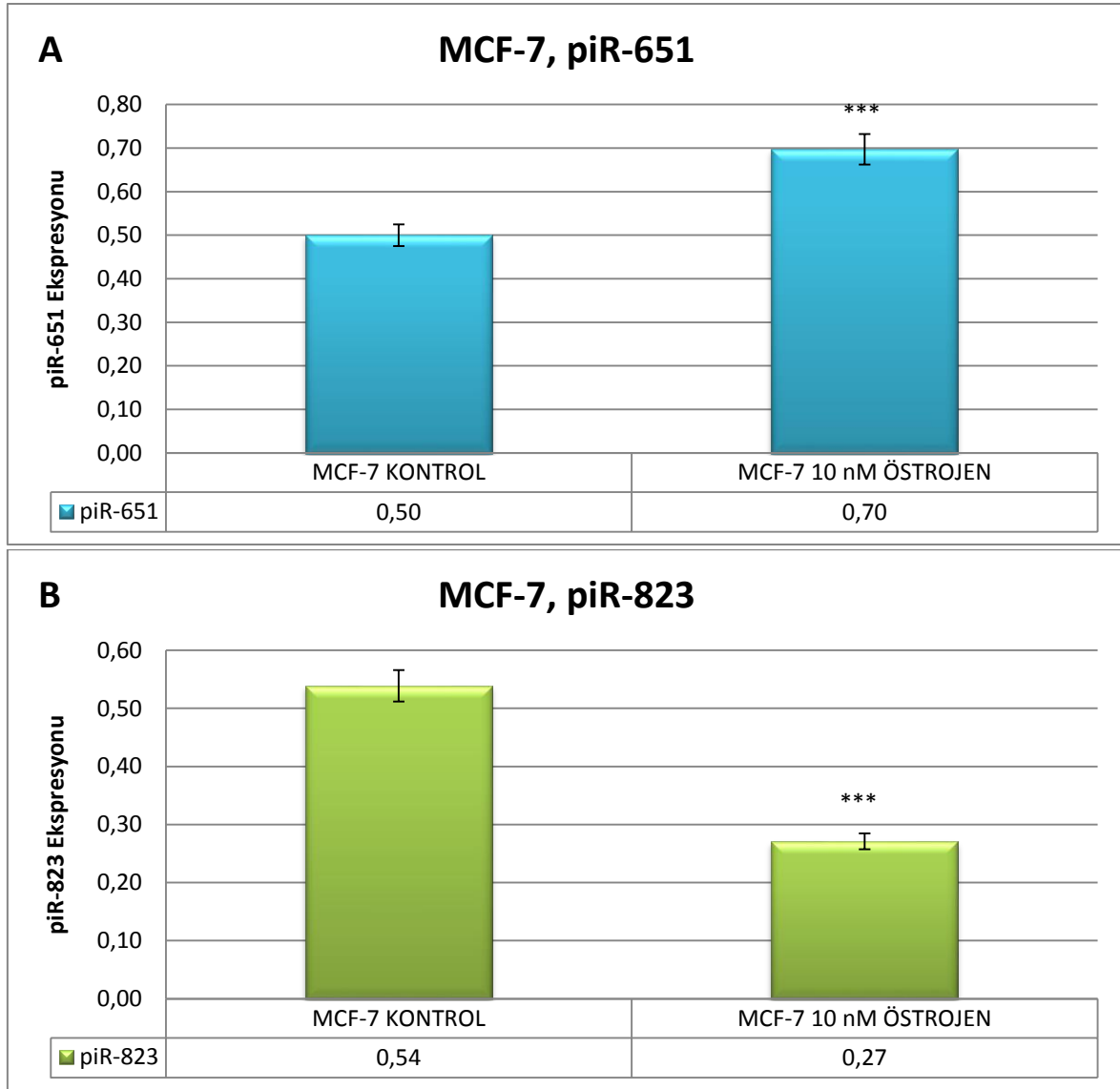
PC-3 hücrelerine uygulanan 10 nM konsantrasyonundaki androjenin 24. saatinde belirlenen piR-651 ve piR-823 ekspresyonlarında tüm gruplar normal dağılım gösterdi. İstatistiksel olarak gruplar arasında fark belirlendi. 10 nM androjen grubunun piR-651 ekspresyonunda (1.77 ± 0.00008) kontrol grubuna (0.24 ± 0.00001) göre istatistiksel olarak artış gözlemlendi ($p < 0.001$). 10 nM androjen grubunun piR-823 ekspresyonunda (1.24 ± 0.00008) kontrol grubuna (0.56 ± 0.00008) göre istatistiksel olarak artış gözlemlendi (Şekil 4. 22) ($p < 0.001$).



Şekil 4.22 PC-3 Hücrelerinde Belirlenen piR-651 (A) ve piR-823 (B) Ekspresyonları
***p<0.001

4.6.3. MCF-7 hücrelerinde piR-651 ve piR-823 ekspresyonunun belirlenmesi

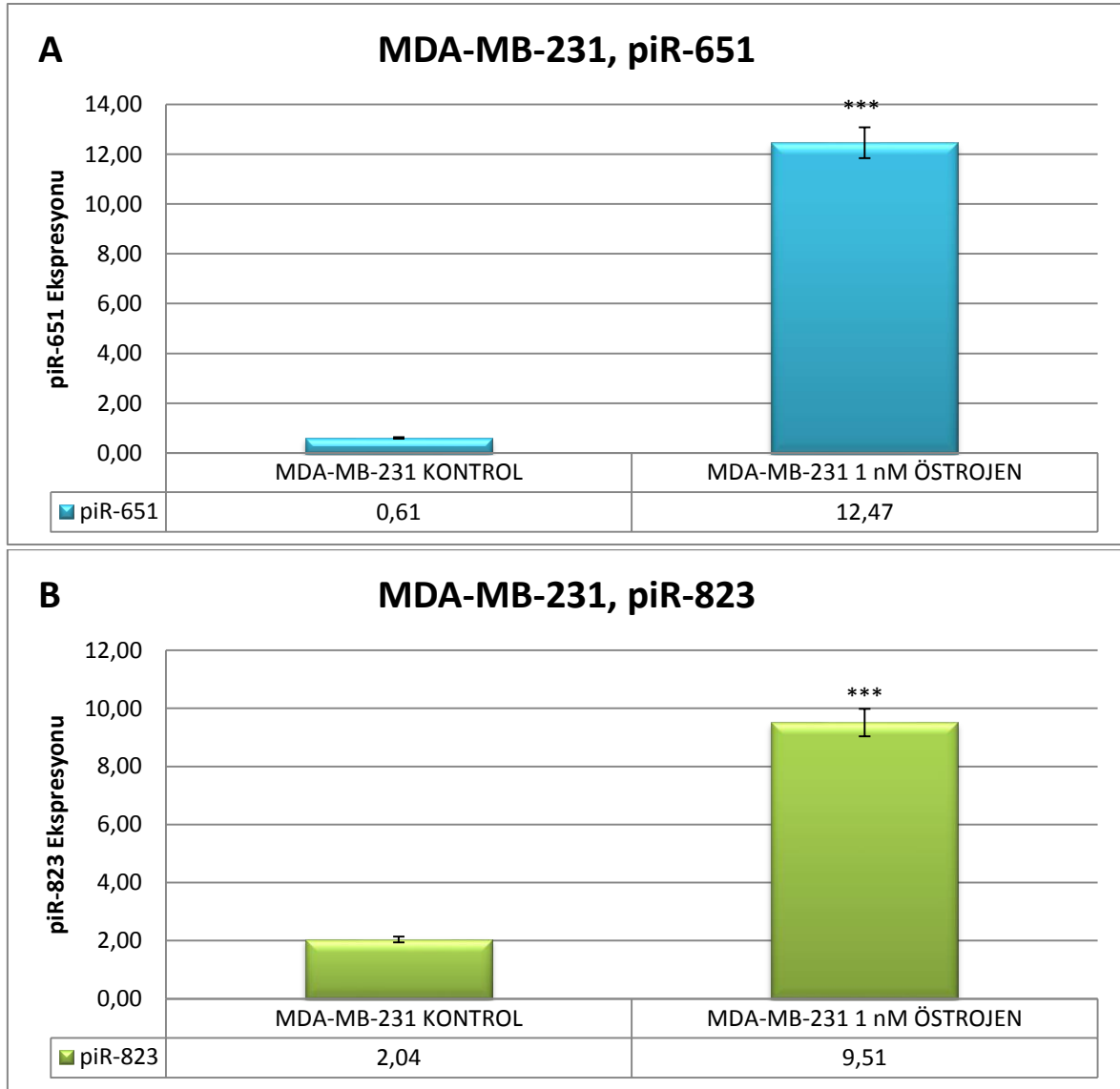
MCF-7 hücrelerine uygulanan 10 nM konsantrasyonundaki östrojenin 24. saatinde belirlenen piR-651 ve piR-823 ekspresyonlarında tüm gruplar normal dağılım gösterdi. İstatistiksel olarak gruplar arasında fark belirlendi. 10 nM östrojen grubunun piR-651 ekspresyonunda (0.7 ± 0.00008) kontrol grubuna (0.5 ± 0.00008) göre istatistiksel olarak artış gözlemlendi ($p < 0.001$). 10 nM östrojen grubunun piR-823 ekspresyonunda (0.27 ± 0.00008) kontrol grubuna (0.54 ± 0.00008) göre istatistiksel olarak önemli derecede düşüş gözlemlendi (Şekil 4. 23) ($p < 0.001$).



Şekil 4.23 MCF-7 Hücrelerinde Belirlenen piR-651 (A) ve piR-823 (B) Ekspresyonları
***p<0.001

4.6.4. MDA-MB-231 hücrelerinde piR-651 ve piR-823 ekspresyonunun belirlenmesi

MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan 1 nM konsantrasyonundaki östrojenin 24. saatinde belirlenen piR-651 ve piR-823 ekspresyonlarında tüm gruplar normal dağılım gösterdi. İstatistiksel olarak gruplar arasında fark belirlendi. 1 nM östrojen grubunun piR-651 ekspresyonunda (12.47 ± 0.00008) kontrol grubuna (0.61 ± 0.00008) göre istatistiksel olarak artış gözlemlendi ($p < 0.001$). 1 nM östrojen grubunun piR-823 ekspresyonunda (9.51 ± 0.00008) kontrol grubuna (2.04 ± 0.00008) göre istatistiksel olarak artış gözlemlendi (Şekil 4. 24) ($p < 0.001$).

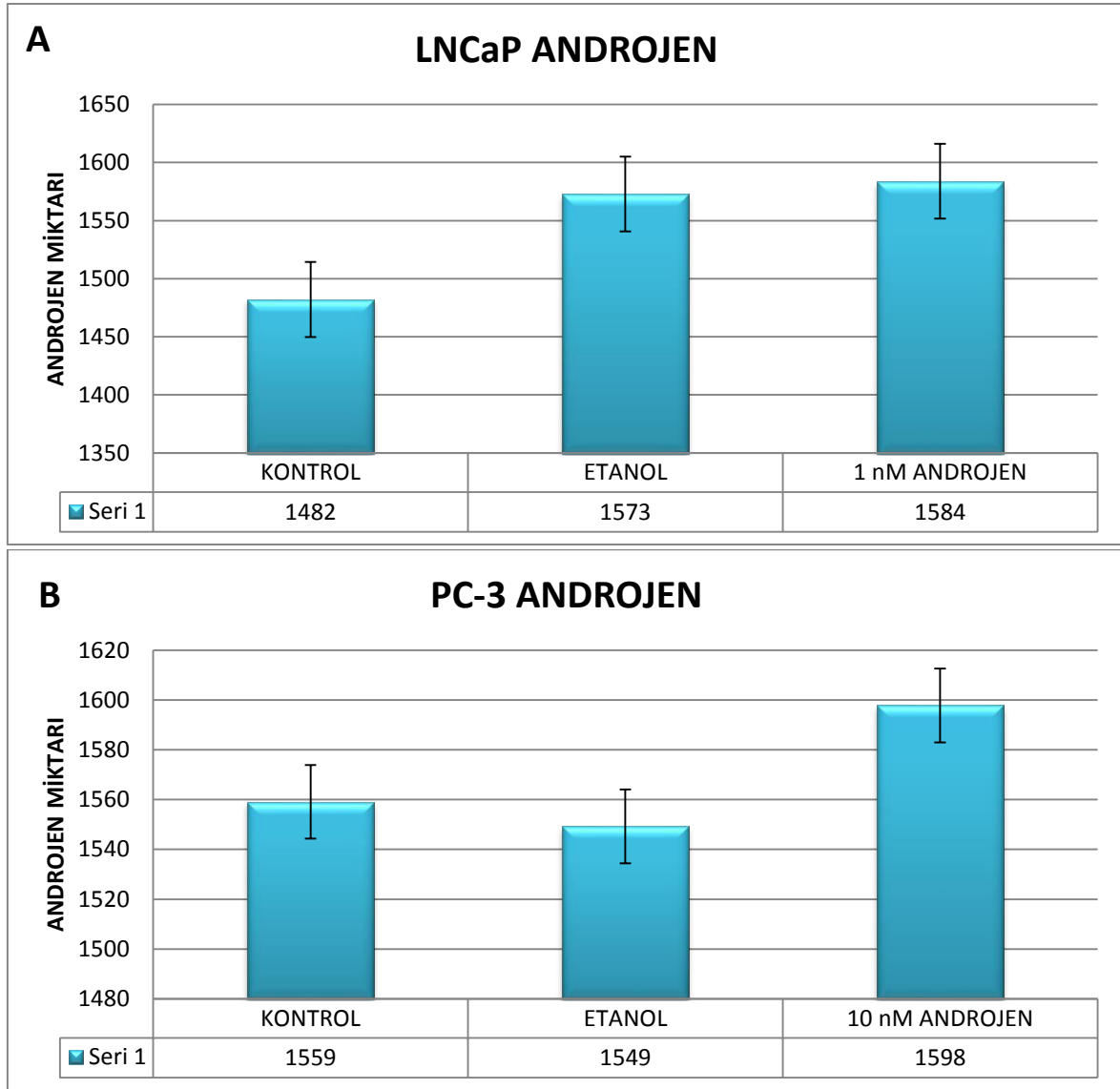


Şekil 4.24 MDA-MB-231 Hücrelerinde Belirlenen piR-651 (A) ve piR-823 (B) Ekspresyonları *** $p < 0.001$

4.7. ELISA

4.7.1. Prostat kanser hücre dizilerinde androjen miktarının belirlenmesi

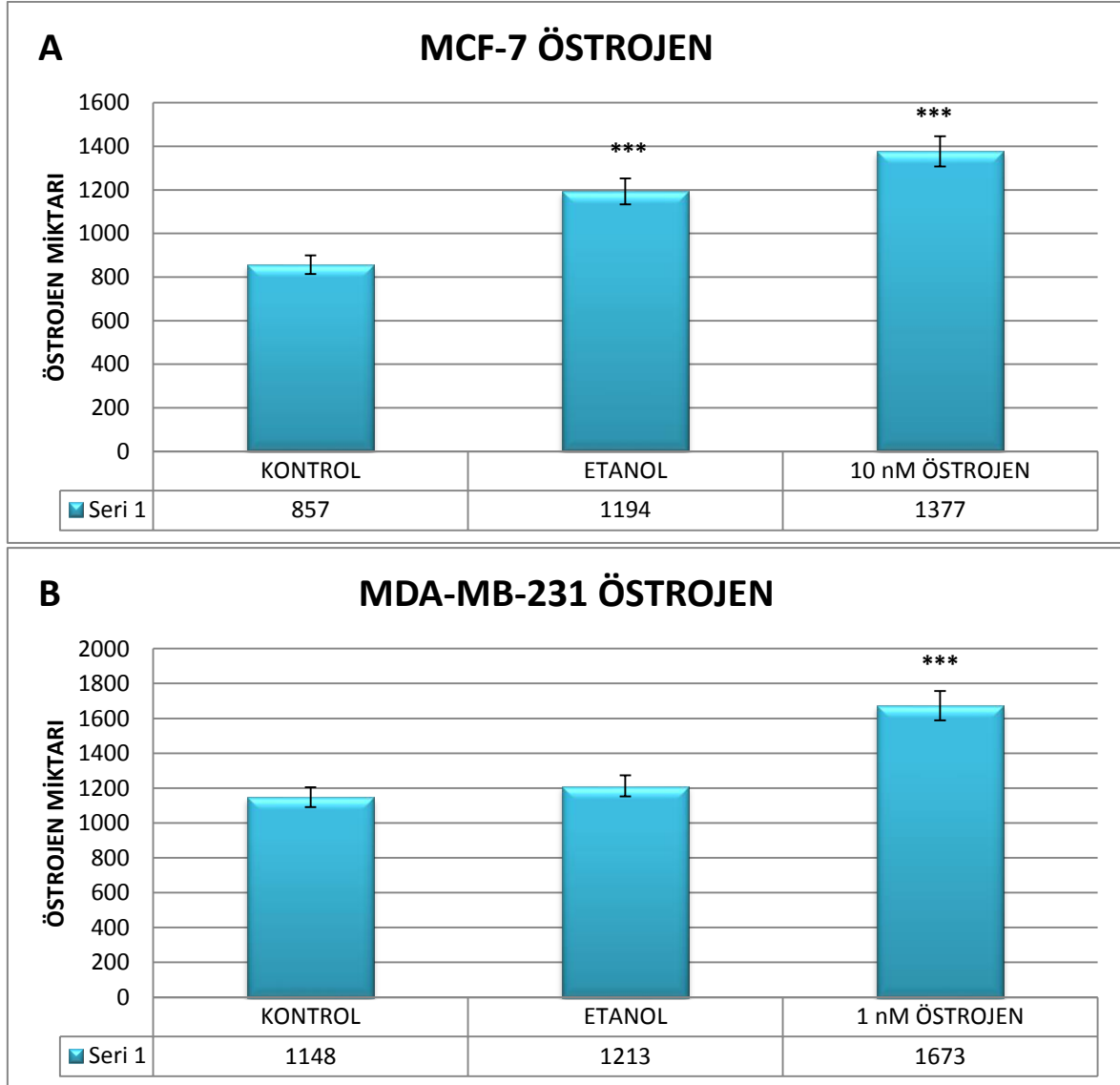
Androjen bağımlı prostat kanser hücre dizisi olan LNCaP ve androjen bağımsız prostat kanser hücre dizisi olan PC-3 hücrelerine androjen uygulamasından sonra hücre içindeki androjen miktarı ELISA yöntemi kullanılarak belirlendi. Her iki hücre dizisinin tüm grupları normal dağılım gösterdi. Hücre içi androjen miktarlarında LNCaP ve PC-3 hücrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark belirlenmedi (Şekil 4. 25, A ve B) ($p > 0.05$).



Şekil 4.25 LNCaP (A) ve PC-3 (B) Hücrelerinde Androjen Miktarı

4.7.2. Meme kanser hücre dizilerinde östrojen miktarının belirlenmesi

Östrojen bağımlı meme kanser hücresi MCF-7 ve östrojen bağımsız meme kanser hücresi MDA-MB-231 hücrelerine östrojen uygulamasından sonra hücre içi östrojen miktarı ELISA yöntemi kullanılarak belirlendi. Her iki hücre dizisinin de tüm grupları normal dağılım gösterdi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki hücre içi östrojen miktarı bakımından gruplar arasında fark belirlendi ($p < 0.001$). Hücre içi östrojen miktarları, MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna (857 ± 29.1 ng/L) göre etanol grubu (1194 ± 54.96 ng/L); kontrol (857 ± 29.1 ng/L) ve etanol grubuna (1194 ± 54.96 ng/L) göre 10 nM östrojen grubunda ($1377 \pm 32,26$ ng/L) istatistiksel olarak arttı ($p < 0.001$) (Şekil 4. 26, A). MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol (1148 ± 33.32 ng/L) ve etanol grubuna (1213 ± 57.22 ng/L) göre 1 nM östrojen grubunda (1673 ± 40.25 ng/L) istatistiksel olarak hücre içi östrojen miktarında artış belirlendi ($p < 0.001$) (Şekil 4. 26, B).



Şekil 4.26 MCF-7 (A) ve MDA-MB-231 (B) Hücrelerinde Östrojen Miktarı ***p<0.001

Kanser hücrelerine hormon uygulanmasından sonra hücre içi östrojen ve androjen miktarlarının belirlenmesinde; hormon bağımlı ve bağımsız kanser hücrelerinde hücre içi seviyelerde artış olduğu gözlemlendi. Prostat kanser hücrelerindeki hücre içi hormon seviyelerinde artış belirlenmesine rağmen bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Hücrelerin hormon bağımlı ya da bağımsız olmaları ile uygulanan hormonlardan sonra hücre içi hormon miktarlarındaki farklılıklar arasında herhangi bir ilişki bulunmadı.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda kanser hücrelerinin bulunduğu ortamdaki hormonların piRNA'lar üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan kanser hücrelerine uygulanacak hormon konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla yapılan literatür taraması sonucunda çeşitli bilgilere ulaşılmıştır. Horoszewicz J. S. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, LNCaP hücrelerine 1nM, 10 nM, 100 nM ve 1 mM miktarında androjen uygulanmış ve androjenin etkin konsantrasyonunun 1 nM ile 10 nM arasında olduğu belirlenmiştir (Horoszewicz, 1983). Yapılan başka bir çalışmada, Lee C. ve arkadaşları 1nM konsantrasyonundaki androjenin uygulanması, LNCaP hücrelerinin sayısının artmasına ve hücreSEL büyümenin en yüksek seviyeye çıkmasına neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Lee vd., 1995). Henttu P. ve arkadaşları tarafından androjenin prostat kanserinde görülen mRNA'lara olan etkisini araştırmak için yapılan çalışmada en uygun androjen konsantrasyonu 40 nM olarak belirlenmiştir (Henttu vd., 1992). Androjenin uygun konsantrasyonunun bulunması için Zhao X. ve arkadaşları tarafından kurgulanan deneyde kullanılan androjen konsantrasyonları 1, 10 ve 100 nM olarak karar verilmiştir (Zhao, Peehl, Navone ve Feldman, 2000). Wolf D. A. ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, mRNA ve protein ekspresyonunu belirlemek için 120 saatlik tasarlanan bir deney için uygun androjen konsantrasyonunu 3,3 nM olarak belirlenmiştir (Wolf, Herzinger, Hermeking, Blaschke ve Horz, 1993). Çalışmalardan elde edilen veriler göz önünde bulundurularak LNCaP androjen bağımlı prostat kanser hücre dizilerine 200, 100, 50, 25, 10, 1 ve 0,1 nM konsantrasyonlarındaki androjen hormonu uygulandı. Uygulama sonrasında elde edilen verilere göre 24. saatte uygulanan 1 nM konsantrasyonundaki androjenin kontrol grubuna göre hücrelerin sayısında en yüksek artışı gösterdiği bulundu.

PC-3 androjen bağımsız prostat kanser hücrelerine uygulanacak androjen konsantrasyonları daha önce yapılan çalışmalarda ortaya çıkan sonuçlar göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Momma T. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 10^{-7} ile 10^{-13} M konsantrasyonları aralığında androjen hormonu uygulanmıştır. Yalnız PC-3 hücreleri androjen bağımsız prostat kanser hücreleri olduğu için uygulanan androjen konsantrasyonlarından hiçbiri hücre çoğalması açısından istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır (Momma vd., 1997). Yapılan başka bir çalışmada ise, ortamda aktif androjen reseptörü ile etkileşip hücre çoğalmasını engelleyen bir maddenin çeşitli prostat kanser hücre dizilerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada LNCaP ve PC-3 hücrelerine 1, 10 ve 50 nM konsantrasyonlarında androjen uygulandıktan sonra hücrelerin çoğalmasını engelleyen madde verilmiştir. Hücrelerin çoğalmasını engelleyen bu madde androjen reseptörünü inhibe ederek LNCaP hücrelerinin çoğalmasını engellemiştir. Ancak, androjen reseptörü olmayan PC-3 hücrelerinin çoğalmasına herhangi bir etki yaratmamıştır (Trauger, 2009). Tai S. Ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir

çalışmada ise PC-3 hücrelerinin androjen reseptörünü ve prostat spesifik antijeni üretmediklerini ve hücre çoğalmalarında androjen hormonunun miktarıyla ilişkili olmadığını savunmaktadırlar (Tai, 2011). Daha önceki çalışmalardaki bulgular ve LNCaP hücre dizisinde gözlemlendiğimiz sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde PC-3 hücrelerine 10 nM, 1 nM ve 0.1 nM konsantrasyonundaki androjen hormonu uygulandı. Hücre karakteri açısından androjen hormonundan etkilenmediği için hormon uygulanan hücrelerde 24, 48 ve 72. saatlerinde belirlenen hücre çoğalması kontrol grubuna göre düşük olduğu gözlemlendi. Buna ek olarak hormon uygulamasından 72. saat sonra yapılan ölçümde etanol grubundaki çoğalan hücre sayısı 24. saatteki değerlere göre yüksek bulundu. Daha önce yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi kanser hücrelerinde etanol belirli bir süreden sonra siklik AMP (cAMP) seviyesini arttırarak kanser hücrelerinin çoğalmasını arttırmaktadır (Simanowski vd., 1986; Przylipek, Rabe, Hafner, Przylipek ve Runnebaum, 1996; Ginsberg, 1999; Fan vd., 2000; Singletary, Frey ve Yan, 2001). Elde ettiğimiz veriler göz önünde bulundurulduğunda 48. ve 72. saatlerdeki verilerin 24. saatteki verilere göre sağlıklı sonuçlar göstermediğine karar verildi. Bu nedenden dolayı 24. saatte uygulanan 10 nM konsantrasyonundaki androjenin kontrol grubuna göre hücrelerin sayısında en yüksek artışı gösterdiği bulundu.

MCF-7 hücreleri ile yapılan ve östrojen hormonunun çeşitli parametrelerine bakıldığı çalışmalarda, araştırmacılar normal büyüme besiyeri olan %10 FBS içeren Fenol red'li besiyerinin östrojen aktivitesini etkileyip anormal büyümeyi sağladığını savunmaktadır. Bu belirsizliği ortadan kaldırmak için araştırmacılar farklı uygulamalar denemişlerdir. Bir grup araştırmacı FBS'nin sağladığı östrojen miktarını en aza indirmek için dextran chorcal ile filtre edilmiş FBS (DC-FBS) kullanmıştır (Teixeira, 1995b; Le Bail, 1998; Tsai, 2001 ; Yamaguchi, 2014). Bazı araştırmacılar hücre kültürü deneylerinde kullanılan başka bir serum türü olan fetal calf serum (FCS) kullanmışlardır. Wiese T. E. ve arkadaşlarının serum içeriklerine göre hangi besiyerinin daha etkili olduğunu araştırdıkları bir çalışmada, FCS içeren besiyerlerinin dışarıdan verilen östrojenin etkilerini saptırmadığını desteklemektedir (Wiese vd., 1992). Hormon çalışmalarında uygulanan farklı yöntemlerden biri, serum ve Fenol red'in östrojenik etkisini en aza indirmek için hormon uygulanmasından 24 saat önce %10 FBS içeren Fenol red'li besiyerini ortamdaki uzaklaştırıp, serum ve Fenol red içermeyen besiyeri ile değiştirmektir. Furuya Y. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, MCF-7 hücrelerine östrojeni serum ve Fenol red içermeyen besiyeri ile uygulamışlardır. Bu uygulamayla hücre çoğalmasını günde 2 kat arttırmışlardır. Sadece FBS ya da DC-FBS içeren besiyeri ile hormon uygulandığında hücresel çoğalmanın inhibe olduğunu ve serum tiplerinin deneylerde kullanılmasının zorunlu olmadığını savunmuşlardır (Furuya vd., 1989). Yapılan başka bir çalışmada östrojenin hücreler tarafından kullanılabilmesi için serum olmayan DMEM besiyerinde östrojen uygulaması yapılmıştır (Falany ve Falany, 1996). Gierthy J. ve arkadaşları östrojenin plasminojen aktivatörü üzerinde olan

etkisini araştırmak için MCF-7 hücrelerine östrojen hormonunu serumsuz besiyeri ile uygulanmıştır (Gierthy vd., 1987). Çalışmamızda önemli olan kriter, hücrelere hormonu uygulandığında kontrol grubuna göre en fazla çoğalma göstermesidir. Çalışmamız sırasında % 5 FCS içeren, Fenol red'siz DMEM ile serum ve Fenol red içermeyen DMEM'in MCF-7 hücrelerindeki çoğalma ve canlılık etkilerini gözlemledik. Sonuçları karşılaştırıldığında MCF-7 hücrelerinde en yüksek hücrenel çoğalma ve canlılığın 24. saatte Fenol red'siz ve serum içermeyen DMEM'de gözlemlendi. Çalışmamızda daha önceden yapılan çalışmaların sonuçları da değerlendirilerek, kullanılan tüm kanser hücreleri deneyden önde %10 FBS içeren Fenol red'li besiyerinde çoğaltıldı. Deneylerden 24 saat önce MCF-7 hücrelerine fenol red ve serum içermeyen besiyeri (verilen östrojenin aktivitesini tam belirleyebilmek için), diğer hücrelere ise deneylerde optimizasyon sağlanabilmesi için %5 FCS içeren Fenol red'siz besiyeri uygulanmıştır.

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde östrojenin hücrelere olan etkisini araştıran çalışmalarda, çeşitli konsantrasyonlarda östrojen hormonu hücrelere uygulanıp hücre çoğalmasına olan etkileri incelenmiştir. Karey P. ve Sirbasku D. tarafından yapılan bir çalışmada 10^{-6} ile 10^{-15} M konsantrasyonları arasında östrojen hormonu MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır ve en fazla çoğalmanın 1 ile 10 nM arasında olduğunu belirlemişlerdir (Karey, 1988). Östrojenin meme kanser hücrelerine olan etkisinin araştırıldığı başka çalışmalarda ise, 1 nM konsantrasyonundaki östrojenin hücre çoğalmasını arttırdığını savunmuşlardır (Burow vd., 1999; Yamaguchi, 2014). Yapılan bir başka çalışmada, MCF-7 hücrelerine 0.01 nM ile 1 nM arasında östrojen konsantrasyonlarının uygulanması daha anlamlı bulunmuştur (Wang ve Phang, 1995). Harrington W. R. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, 10^{-8} ile 10^{-12} M konsantrasyonlarındaki östrojen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine uygulanmış ve MCF-7 hücrelerinin çoğalması en yüksek 10^{-10} M konsantrasyonunda belirlemişlerdir (Harrington, 2006). MDA-MB-231 hücreleri için ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda hücrenel çoğalmanın eşit seviyelerde olduğunu ve östrojenin bu hücrelerde etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir. Bu yüzden östrojen bağımsız MDA-MB-231 hücrelerine 10^{-8} M konsantrasyonundaki östrojenin ideal olduğunu düşünölmüştür (Harrington, 2006). MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde yapılan başka bir çalışmasında, 10^{-9} ile 10^{-6} M konsantrasyonları arasında östrojen uygulanmıştır. MDA-MB-231 östrojen bağımsız hücrelerinde östrojen aşırı bir fark göstermemekle birlikte 10^{-8} - 10^{-7} M konsantrasyonları arasında hücre sayısında diğer gruplara göre az miktarda artış gözlenmiştir. MCF-7 östrojen bağımlı meme kanseri hücrelerinde ise en yüksek hücre sayısı 10^{-9} M konsantrasyonunda belirlenmiştir (Thompson, 1989). Östrojen uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin Genistein gibi flavanoidlere verdikleri tepkileri incelemek için tasarlanan bir çalışmada, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine 0,1 ile 10 nM konsantrasyonlarında östrojen uygulanmış, daha sonra bu hücrelerde hücre sayısında çoğalma ve hücrenel canlılık incelenmiştir (Le

Bail, 1998). Çalışmamızda, daha önce yapılan çalışmalar da göz önünde bulundurularak MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine 0,1 nM, 1 nM ve 10 nM konsantrasyonlarında östrojen hormonu uygulandı. 24.saat 10 nM konsantrasyonunda uygulanan östrojen hormonu MCF-7 hücrelerinde en yüksek hücresel çoğalmayı göstermesinden dolayı uygun bulundu. Östrojen bağımsız MDA-MB-231 hücrelerinde ise 24.saat 1 nM konsantrasyonundaki östrojen, hücresel çoğalmada en yüksek seviyeyi göstermiş olmasından dolayı uygun bulundu.

Birçok hastalığa karşı tanı ya da tedavi çalışmalarında hücrelere uygulanan maddelerin ve/veya kimyasalların hücre sayısına olan etkilerini belirlemek için hücresel çoğalma (proliferasyon) deneyleri yapılmaktadır. Bu deneyin temeli tetrazolium tuzuna dayalı bir kolorimetrik yöntem olan XTT yöntemine dayanmaktadır. Androjen bağımlı prostat kanser hücrelerinin sayısı ortamdaki androjen hormonu ile androjen reseptörlerinin birlikte çalışmasıyla artmaktadır. Tai S. ve arkadaşları LNCaP hücrelerinde androjen reseptörünün ve prostat spesifik antijenin sürekli çalıştığını ve hücre büyümesinin androjen miktarının azalması ile azaldığı belirlenmiştir (Tai, 2011). Yapılan başka bir çalışmada, androjen varlığı LNCaP hücrelerinde çoğalmayı arttırdığı bulunmuştur (Lee vd., 1995). Zhu M. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, androjenlerin prostat bezinin normal büyümesi için gerekli olduğunu savunmaktadırlar. Ancak aynı şekilde androjenler prostat tümörlerinin gelişimi ve sağkalımında da etkili olduğunu savunmuşlardır (Zhu, 2010). Prostat kanserinde görülen adeziv ve anti adeziv ajanların hücreler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, androjenlerin kanser gelişimi ve çoğalmasının artmasında etkili olduğunu belirtmiştir. Aynı çalışmada androjenlerin prostat kanser hücrelerinin sağkalımında da etkili olduğunu savunulmaktadır (Evangelou, 2002). LNCaP prostat kanser hücre dizisinin özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, tümör gelişiminin serum androjen seviyeleri ile ilişkili olduğu savunulmaktadır. Buna ek olarak, hücresel çoğalmanın androjen miktarına bağlı olduğunu bildirilmiştir. Bazı durumlarda ortamda bulunan androjenin, transkripsiyon faktörü olan asit fosfataz salınımını arttırarak in vitro hücresel çoğalmayı da arttırdığı belirlenmiştir (Horoszewicz, 1983). Çalışmamızda 24 saat, 1 nM androjenin LNCaP hücrelerinde hücresel çoğalmayı arttırdığı belirlendi. LNCaP hücrelerine östrojen uygulandığında hücre canlılığında artış gözlemlendi.

PC-3 prostat kanser hücreleri androjene tepki vermeyen hücrelerdir (Tai, 2011). Momma T. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 10^{-7} ile 10^{-13} M konsantrasyonları aralığında androjen hormonu uygulanmıştır. Yalnız PC-3 hücreleri androjen bağımsız prostat kanser hücreleri olduğu için uygulanan androjen konsantrasyonlarından hiçbiri hücre çoğalması açısından istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır (Momma vd., 1997). Başka bir çalışmada ise PC-3 hücrelerinin androjenlere, glukokortikoidlere ya da epidermal veya fibroblast büyüme faktörlerine cevap vermediği belirtilmiştir (Kaighn vd., 1979). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde PC-

3 hücrelerine uygulanan androjen, kanser hücrelerinin çoğalması ve canlılığında herhangi bir etkisi olmadığı belirlendi.

Meme kanseri hücrelerinin çoğalması, gelişimi, transkripsiyonel ve translasyonel mekanizmaları, birçok sinyal molekülü ve hücre döngüsü ile düzenlenmektedir. Heneweer M. ve arkadaşları, MCF-7 hücrelerinin östrojen ve/veya östrojene benzer özellikteki bileşenlere maruz kalması sonucu hücre çoğalmasının arttığını bulmuşlardır (Heneweer vd., 2005). Yapılan başka bir çalışmada, östrojenin MCF-7 hücrelerinin büyüme oranını arttırdığı belirlenmiştir (Gierthy vd., 1987). Furuya Y. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 10 nM östrojen konsantrasyonunun MCF-7 hücrelerinin büyümeleri için en ideal konsantrasyon olduğunu ileri sürülmüştür (Furuya vd., 1989). MCF-7 hücrelerine 6 gün boyunca östrojen uygulanan bir çalışmada kontrole göre hücre sayısında 2,8 kat artış olduğu bulunmuştur (Wiese vd., 1992). Yapılan başka bir çalışmada ise, 1 nM östrojen uygulanan MCF-7 hücrelerinde kontrole göre hücre çoğalma oranının arttığı belirlenmiştir (Yamaguchi, 2014). Daha önce yapılan çalışmalardan Wang T. T. Y. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada östrojenin MCF-7 hücrelerini apoptoza girmesini engellediğini savunmuşlardır (Wang ve Phang, 1995). Ayrıca Burow M. E. ve arkadaşları tarafından yapılmış başka bir çalışmada ise dışarıdan verilen östrojenin MCF-7 hücrelerinin apoptozdan kaçabilmesine yardımcı olabildiğini ileri sürülmüştür (Burow vd., 1999). Elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda uygulanan konsantrasyondaki östrojenin MCF-7 hücrelerinin çoğalmasında ve canlılığında etkili olduğu gözlemlendi.

MDA-MB-231 hücreleri östrojen bağımsız hücreleridir. Hücrelerin çoğalması östrojen hormonunun varlığından etkilenmez. MDA-MB-231 hücrelerinin östrojenden (10^{-8} M) etkilenmemesi nedeninin araştırıldığı bir çalışmada, östrojen varlığında apoptozun kontrolünde önemli bir rol oynayan Bcl-2 protein ekspresyonunda değişim gözlenmemiştir. Değişimin olmamasının nedenini ise, ilaç (hormon) direncinin apoptoz mekanizmasından farklı başka bir mekanizma üzerinde etkisinin olabileceğini savunmuşlardır (Teixeira, 1995b). Bu durum göz önünde bulundurularak yapılan bir çalışmada, ortamdaki östrojen miktarı MDA-MB-231 hücreleri gibi östrojen bağımsız hücrelerde AKT aktivitesini düzenleyerek Scr onkoproteininin fosforilasyonu için gerekli olduğunu ileri sürmektedir (Tsai, 2001). Yapılan bir başka çalışmada ise, 24 ve 48 saat boyunca 10^{-8} ile 10^{-9} M östrojen uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde kontrole göre 24 saat 10^{-9} M östrojen hücre canlılığı için ideal bulunmuştur (Rajah, 2012). Çalışmada elde edilen verilere göre MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan östrojen konsantrasyonları kanser hücrelerinde çoğalmayı ve canlılığı arttırmış olsa da istatistiksel olarak gözlenen artış anlamlı bulunmadı.

Kanser ve inflamatuvar hastalıklarda tutunma (adezyon) hem patolojik hem de fizyolojik olarak önemlidir. Hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantı

moleküllerinin fonksiyonu ve ekspresyonundaki değişimler kanser oluşumu ve gelişmesiyle ilişkilidir. Tümör dokusuna uygulanan anti-kanser ilaçların etkisi hücrel tutunma (adezyon) ve tümör hücrelerinin yoğunluğundan etkilenir (Palmer vd., 2008). Hücre bağlantı molekülleri metastaz gelişiminde önemli düzenleyiciler olarak bilinmektedir. LNCaP hücreleri adeziv özellikteki hücrelerdir. Bu hücelere uygulanan 1 nM androjen hücrelerin yapışma özelliklerini azalttığı belirlendi. Yapılan bir çalışmada normalde androjen bağımsız ve metastatik kaynaklı PC-3 prostat kanser hücrelerine androjen reseptörünün cDNA'sı transfekte edilmiştir. Daha sonra transfekte olan PC-3 hücre dizisine androjen uygulanmıştır. Androjen uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra bu hücelerde tutunmayı engelleyen molekül olan müsinin (MUC-1'in) ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (Evangelou, 2002). Başka bir çalışmada, androjenlerin epitel hücrelerinin mezenşim hücrelerine dönüşümünde ve prostat kanser hücrelerinin sağlıklı dokuya saldırmasındaki rolü araştırılmıştır. Epitel-mezenşim değişimi (EMT), embriyonik gelişim sırasında morfogenez hareketi sağlamaktadır. Ayrıca EMT kanserde metastaz olgusunda da önemli yer almaktadır. E-kaderin ve β -kaderin epitel hücelerde bulunup hücrenin adeziv olduğunun belirteçidir. N-kaderin ve vimentin ise mezenşim hücrelerinin invaziv özelliğini ortaya koyan belirteç olarak düşünülmektedir. Androjenler prostat tümöründeki e-kaderin ve β -kaderini, n-kaderin ve vimentine dönüştürmesini başlatarak invaziv potansiyelde artışa neden olmuştur. Ortama androjen verilmesi metastatik karakterlerin çoğalmasını, tutunmanın azalmasını sağlamıştır (LNCaP, LNCaP T β R1 ve PC-3)(Zhu, 2010). Cooper ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada insan kemik iliği endotel hücrelerinin bulunduğu ortamda PC-3 hücrelerinin hücrel işlevlerini, androjen ve sitokinlerin etkilediği düşünülmüştür. Cooper ve arkadaşlarının elde ettikleri verilere göre ortamda bulunan insan kemik iliği endotel hücreleri tarafından salgılanan tümör büyüme faktörü beta (TGF- β) ile PC-3 hücelere uygulanan androjenin konsantrasyonu, bu hücelerin ortama tutunmasında (adezyonunda) azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir (Cooper vd., 2002). Zhu ve Kyprianou tarafından yapılan bir çalışmada androjenlerin ekstrasellüler matriksete TGF- β ile birlikte metastatik prostat kanser hücrelerinin karakterini değiştirebileceğini savunmaktadır (Zhu ve Kyprianou, 2010). Çalışmamızda PC-3 hücelere uygulanan androjenin kanser hücrelerinde tutunmanın (adezyonun) artmasına neden olduğu gözlemlendi. Östrojenin meme kanser hücelere olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada östrojen hormonunun MCF-7 hücelere tutunmayı arttırdığını savunmuşlardır (Burow vd., 1999). Sapino A. ve arkadaşları östrojene maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin yapışma plaklarında artma ve tutunmaya (adezyona) özel yapıların sayısının arttığını bulmuşlardır (Sapino, 1986). MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücelere yapılan bir çalışmada, östrojen uygulanan MDA-MB-231 östrojen bağımsız hücelere tutunmada (adezyonda) bir fark göstermemekle diğer gruplara göre az miktarda artış gözlemlenmiştir (Thompson, 1989). Elde

ettiğimiz verilere göre istatistiksel olarak meme kanser hücrelerinin her ikisine de uygulanan östrojen hücrelerin bulunduğu ortama tutunma karakterlerinde belirgin bir etki yaratmamıştır.

Kısa kodlamayan RNA'ların yeni bir sınıfı olan piRNA'lar tümör oluşumunda görev aldığı çeşitli çalışmalarla ileri sürülmüştür (Cheng vd., 2011; Cheng vd., 2012; Law vd., 2013; Zhang vd., 2013; Cui vd., 2011). Kanser-piRNA arasındaki ilişki çeşitli araştırmalarla çalışılmaktadır. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar piRNA'ların kanser gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir (Lu, 2010; Cheng, 2011; Huang, 2012). piRNA'lar ve PIWI proteinlerinin tümör oluşumunda potansiyel role sahip olduğu düşünülmektedir (Handler vd., 2011). HeLa hücrelerinde piRNA tanımlanması, kanser gelişiminde piRNA'ların etkisinin araştırılmasında büyük önem taşımakla beraber piRNA araştırmalarının çoğunun HeLa hücrelerinde yapılmasına teşvik etmiştir. HeLa hücrelerinde piRNA ile PIWI proteinlerinin etkileşimine bakılmıştır (Yang vd., 2013). HeLa hücrelerinde yapılan bir çalışmada, HILI proteininin aşırı ekspresyonu sonucu transpozon olan LINE 1 gen bölgesinin ekspresyonunda azalma görülmüştür. Bu azalma LINE 1'in tekrarlayan dizilerinden oluşan piRNA'ların ekspresyonunda da azalmaya neden olduğu savunulmaktadır. Ancak HILI proteini baskılandığında piRNA ekspresyonunda artış gözlenmemiştir (Lu vd., 2010). Lu Y. Ve arkadaşlarının elde ettikleri veriler piRNA ekspresyonunun PIWI proteinlerinin ekspresyonuna cevap olarak düzenlenebileceği fikrini desteklemektedir (Cheng, 2011; Siddiqi ve Matushansky, 2012). *Drosophila melanogaster*'da yapılan bir çalışmada, PIWI proteinlerini ve piRNA mekanizmasında görev alan diğer bileşenleri kodlayan genlerin ekspresyonu malign beyin tümörünün büyümesine yol açtığı belirlenmiştir (Janic, Mendizabal, Llamazares, Rossell ve Gonzalez, 2010).

piRNA'lar hem normal eşey kök hücrelerinde hem de kanser hücrelerinde yüksek seviyededir. Yang Q. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, sağlıklı insan testislerinde bilinen 770 ve 5 tane de yeni miRNA dizisi ile 20121 adet piRNA dizisi belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada ileri düzey dizileme (Next Generation Sequencing; NGS) yöntemiyle piRNA ile miRNA dizilerinde ortak dizi eşleşmeleri belirlenmiştir. Yang ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma, miRNA ve piRNA'ların spermatogenezde düzenleyici rollerinin olduğunu gösterip, bu alanda yapılan çalışmalar için yararlı bir kaynak olmaktadır (Yang vd., 2013). Sıçan beyninde yapılan bir çalışmada, geçici fokal iskemiden sonra piRNA ekspresyonunda değişim belirlenmiştir (Dharap, Nakka ve Vemuganti, 2011). Yapılan bir başka çalışmada, *Aplysia* nöronlarında cAMP responsive element-binding 2 (CREB2) bölgesinin piRNA'lar tarafından metilasyonu ile uzun dönem hafızanın korunmasını sağladığı belirlenmiştir (Rajasethupathy vd., 2012). Yapılan bir çalışmada, piRNA ekspresyonunun embriyonik ve neonatal dönemde belirlenmemesine rağmen, ergenlik ve olgunluk döneminde arttığı belirlenmiştir (Tang F, 2008). Kang ve

arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, sağlıklı erkek sıçanların testisine, testosteron hormonu verilmiş olup belirli zaman aralıklarında piRNA ekspresyonlarına bakmışlardır. Sonuç olarak testosteronun testiste PIWI proteininin ve piRNA ekspresyonunu arttırdığını belirlemişlerdir (Kang, Moon, Lee, Han, 2014).

Chu H. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada kolorektal kanserinin gelişiminde piRNA kümeleri (piRNA clusterları) içeren bölgelerin tek nükleotit polimorfizmini (single nucleotide polymorphism/SNP) araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda piR-015551 ve uzun kodlamayan RNA bölgesi olan lnc00964-3 bölgesinin polimorfizmine sahip bireylerin kolorektal kanserine yakalanma riskinin yüksek olduğunu belirlemişlerdir (Chu, Xia, vd., 2015). Hepatoselüler karsinomanın mikroarray ve diğer fonksiyonel deney sonuçlarına göre piR-Hep1 gen bölgesinin ekspresyonu sağlıklı dokulara göre hepatoselüler karsinom dokusunda % 46,6 arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada piR-Hep1 gen bölgesinin susturulması sonucunda kanser hücrelerinin çoğalmasına, göçüne ve sağlıklı dokulara saldırmasına engel olduğu ileri sürülmüştür (Law vd., 2013). Mesane kanserinde yapılan başka bir çalışmada ise piRNA'ların tümör oluşumunda rolleri olduğu gösterilmiştir (Chu, Hui, vd., 2015).

Çalışmamızda araştırılan piR-651 ve piR-823'ün gastrik kanser başta olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişiminde görev aldığı düşünülmektedir (Cheng vd., 2011; Cheng vd., 2012; Ipsaro vd., 2012; Cui vd., 2011). Yan H. ve arkadaşları, multiple myelomalı hastaların doku örneklerinde ve hücre dizilerinde piR-823 ekspresyonunda artma belirlemişlerdir. Aynı çalışmada multiple myeloma hücre dizilerinde, piR-823'ün susturulması sonucu apoptozla ilişkili protein ekspresyonları ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan elemanların işlevlerinin bozulmasına neden olduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak, piR-823, DNMT3A ve 3B *de novo* DNA metiltransferazlar ile doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir (Yan vd., 2015). Yan H. ve arkadaşlarının multiple myelomada elde ettikleri verilerdeki gibi teröpötik xenograft modellerinde piR-823'ün susturulması tümör büyümesinde etkili olarak inhibe etmektedir (Yan vd., 2015). Ancak yapılan bir başka çalışmada ise gastrik kanserde piR-823 ekspresyonunun azaldığı ve *in vivo* ve *in vitro*da tümör baskılayıcı özellik gösterdiği bildirilmiştir (Cheng vd., 2012). Farklı kanser tiplerinde farklı özellik (heterojenik; tümör baskılayıcı ya da onkogenik özellik) gösteren piR-823'ün ekspresyonu tümör oluşumunda ikili rol oynadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda elde edilen verilere göre androjen LNCaP ve PC-3 prostat kanser hücrelerinde piR-823 ekspresyonunu arttırmaktadır. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan östrojen piR-823 ekspresyonunu arttırmaktadır. Kanser hücrelerine dışarıdan hormon uygulanarak hormon seviyesini arttırmak piR-823 ekspresyonunu prostat kanser hücre dizilerinde ve kötü huylu östrojen bağımsız meme kanser hücrelerinde piR-

823'ün onkogenik özelliğe sahip olduğu ve hormon miktarının artması ile bu özelliğin arttığı gözlemlendi. MCF-7 meme kanser hücrelerine uygulanan östrojen ile piR-823 ekspresyonu azalmaktadır. Elde edilen bu sonuç ise hormon uygulanan iyi huylu östrojen bağımlı meme kanser hücresinde piR-823'ün farklı ekspresyon gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Dışarıdan östrojen hormonu verilerek yapılan tedavinin (hormonal tedavi) MCF-7 iyi huylu östrojen bağımlı kanser hücrelerinde normalde yüksek olan piR-823 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda piR-651 kanser gelişiminde etkisi olduğu düşünülen piRNA bölgesidir. Daha önceden yapılan çalışmalarda, sağlıklı dokulara göre mide, kolon, akciğer ve meme tümörlerinin de bulunduğu çeşitli tümörlerde sağlıklı dokulara göre piR-651 ekspresyonu artmaktadır (Liu X, 2006; Cheng vd., 2011). Buna ek olarak mide, pankreas ve özofagus kanserlerini içeren daha birçok kanser türünde, kanser gelişimi sırasında artan piR-651 ile PIWI protein ekspresyonunun etkisi olabileceğini destekleyen klinik veriler bulunmaktadır (Grochola vd., 2008; He, Wang, Wang, Fan, Shou, Wang vd., 2009; Wang vd., 2012). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, piR-651 gastrik tümör hücrelerinin lenf noduna metastaz yapmasında görev alabileceği ileri sürmüştür (Cheng vd., 2011). Mide kanserinde piR-651 susturulduğunda, kanser hücrelerinin büyümesinin azaldığı gözlemlenmiştir (Cui vd., 2011). Liu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kanserli dokularda piR-651'in ekspresyonunun sağlıklı dokulara göre yüksek olduğunu savunmuşlardır (Liu, 2006). Bu çalışmalar kanserdeki piRNA ekspresyon seviyelerini belirlemede yapılan çalışmalar arasında yer almaktadır (Siddiqi ve Matushansky, 2012). Ayrıca piR-651 ekspresyonunun mezotelyoma, hepatoselüler ve serviks kanserinde de arttığı araştırılmıştır (Cheng vd., 2011).

Dışarıdan uygulanan hormonların hücrelerde çoğalmayı en fazla arttıran konsantrasyonları belirlendikten sonra, bu hücrelerde piRNA ekspresyonları değerlendirildi. Çeşitli konsantrasyonlarda uygulanan hormonların en fazla çoğalmayı sağlayan konsantrasyonlarında canlılığında en yüksek olduğu, tutunmanın ise azaldığı gözlemlendi. Farklı olarak MDA-MB-231 hücrelerinde tutunmada azalış olduğu saptandı. Uygulama sonrası hücrelerde piR-651 ve piR-823 ekspresyonlarının arttığı gözlemlenirken, sadece piR-823 ekspresyonunun östrojen bağımlı meme kanser hücresi olan MCF-7'de azaldığı gözlemlendi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, günümüzde giderek önemi artan piRNA'ların hormonlardan etkilenebileceği gösterilmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde;

Hücre çoğalması ve canlılığının androjen veya östrojen uygulandığında arttığı, hücre tutunmasında PC-3 hücreleri hariç diğer hücrelerde azaldığı gözlemlendi.

Androjen hormonu uygulanan LNCaP ve PC-3 prostat kanser hücreleriyle; östrojen hormonu uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde piR-651 ekspresyonunun arttığı belirlendi.

Androjen hormonu uygulanan LNCaP ve PC-3 prostat kanser hücrelerinde ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde piR-823 ekspresyonunun arttığı; MCF-7 meme kanser hücrelerinde ise piR-823 ekspresyonunun azaldığı belirlendi.

Bu çalışmanın sonuçları,

1. Gonad gelişimi sırasında ve kanserde piR-651 ve piR-823 ekspresyonlarında görülen artışın bazı kanser hücrelerinde hormonal düzenlenmeyle ilişkili olabileceğini,
2. Bu piRNA ekspresyonlarının kanserin mikroçevresindeki hormon miktarı ve kanser hücrelerinin türüne göre değiştiğini göstermektedir.

Araştırmamızın piRNA'lar hakkında yapılacak olan çalışmalara önemli katkı sağlayacağını ve bazı kanser türlerinde uygulanan hormon tedavilerinde bu özelliklerin göz önünde bulundurulması açısından kaynak oluşturabileceğini düşünmekteyiz. piRNA'ların kanserdeki mekanizmaları hakkında ayrıntılı bilgi ve kesin sonuçlar için moleküler alanda yapılacak olan daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aravin, A. A., Tulin, A. V., Vagin, V. V., Rozovsky, Y. M., Gvozdev, V. A. (2001). Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr. Biol.*, 11, 1017-1027.
- Aköz, M., Vatansev, H., Gürbilek, M., Akkuş, İ., Vatansev, C. ve Kaptanoğlu, B. (2000). Glutasyon S-transferaz (GST) izoenzimlerin çeşitli kanser vakalarında araştırılması. *Genel Tıp Dergisi*, 10(1), 13-19.
- Albert, J., Lewis, Raff, Roberts, Walter. (2007). Molecular biology of the cell (Vol. 4, pp. 879-964).
- Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M. J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M. ve Tuschl, T. (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 442(7099), 203-207. doi: 10.1038/nature04916
- Aravin, A. A. ve Bourc'his, D. (2008). Small RNA guides for de novo DNA methylation in mammalian germ cells. *Genes Dev*, 22(8), 970-975. doi: 10.1101/gad.1669408
- Aravin, A. A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J. ve Tuschl, T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*, 5(2), 337-350.
- Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D. ve Toth, K. F. (2008). A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell*, 31, 785-799.
- Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Girard, A., Fejes-Toth, K. ve Hannon, G. J. (2007). Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science*, 316(5825), 744-747. doi: 10.1126/science.1142612
- Arisawa, T., Tahara, T., Shibata, T., Nagasaka, M., Nakamura, M., Kamiya, Y., Fujita, H., Hasegawa, S., Takagi, T., Wang, F. Y., Hirata, I. ve Nakano, H. (2007). A polymorphism of microRNA 27a genome region is associated with the development of gastric mucosal atrophy in Japanese male subjects. *Dig Dis Sci*, 52(7), 1691-1697. doi: 10.1007/s10620-006-9648-5

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ashraf, S. I., McLoon, A. L., Sclarsic, S. M. ve Kunes, S. (2006). Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell*, *124*, 191-205.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R. ve Pasquinelli, A. E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, *122*(4), 553-563. doi: 10.1016/j.cell.2005.07.031
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions *Cell* *136*(2), 215-233. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002
- Batista, P. J., Ruby, J. G., Claycomb, J. M., Chiang, R., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Chaves, D. A., Gu, W., Vasale, J. J., Duan, S., Conte, D., Jr.Luo, S., Schroth, G. P., Carrington, J. C., Bartel, D. P. ve Mello, C. C. (2008). PRG-1 and 21U-RNAs interact to form the piRNA complex required for fertility in *C. Elegans*. *Mol Cell*, *31* (1), 67-78. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.002
- Baylin, S. B. (2005). DNA Methylation and Gene Silencing in Cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, *2*(1), 4-11. doi: 10.1038/ncponc0354
- Boehm, M. ve Slack, F. J. (2006). MicroRNA control of lifespan and metabolism. *Cell Cycle*, *5*(8), 837-840.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. ve Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J*, *17*(1), 170-180. doi: 10.1093/emboj/17.1.170
- BolÁin, M. G. ve Huff, K. (1976). The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res.*, *36*, 4595-4601.
- Bozcuk, A. N. (2005). *Genetik* (Vol. 2): Palme Yayıncılık.
- Brennecke, J., Stark, A., Dus, M., KellisM, Sachidanandam, R., Hannon, G. J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. . *Cell*, *128* 1089-1103.
- Brower-Toland, B., Findley, S., D.Jiang, L., Liu, L., Yin, H., Dus, M., Zhou, P., Elgin, S. C. ve Lin, H. (2007). *Drosophila piwi* associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev*, *21*(18), 2300-2311. doi: 10.1101/gad.1564307

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. ve Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res*, 5(2), 89-95.
- Burow, M. E., Tang, Y., Collins-Burow, B. M., Krajewski, S., Reed, J. C., McLachlan, J. A. ve Beckman, B. S. (1999). Effects of environmental estrogens on tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in MCF-7 cells. *Carcinogenesis*, 20(11), 2057-2061.
- Calin, G. A., Garzon, R., Cimmino, A., Fabbri, M. ve Croce, C. M. (2006). MicroRNAs and leukemias: How strong is the connection? *Leuk. Res.*, 30, 653-655.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dan Dumitru, C., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. ve Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2999-3004 doi: DOI 10.1073/pnas.0307323101
- Carleton, M., Cleary, M. A. ve Linsley, P. S. (2007). MicroRNAs and cell cycle regulation. *Cell Cycle*, 6(17), 2127-2132.
- Carmell, M. A., Girard, A., van de Kant, H. J., G.Bourc'his, D., Bestor, T. H., de Rooij, D. G. ve Hannon, G. J. (2007). MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Developmental Cell*, 12(4), 503-514. doi: DOI 10.1016/j.devcel.2007.03.001
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C. vd. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309(5740), 1559-1563. doi: 10.1126/science.1112014
- Carroll, A. G., Voeller, H. J., Sugars, L. ve Gelmann, E. P. (1993). p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* 23(2), 123-134.
- Chen, S. (1998). Aromatase and breast cancer. *Front Biosci*, 3, 922-933.
- Chen, Y., Pane, A. ve Schupbach, T. (2007). Cutoff and aubergine mutations result in retrotransposon upregulation and checkpoint activation in *Drosophila*. *Curr Biol*, 17(7), 637-642. doi: 10.1016/j.cub.2007.02.027
- Cheng, J., Deng, H., Xiao, B., Zhou, H., Zhou, F., Shen, Z. ve Guo, J. (2012). piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates in vitro and in vivo tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. *Cancer Lett*, 315(1), 12-17. doi: 10.1016/j.canlet.2011.10.004

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Cheng, J., Guo, J. M., Xiao, B. X., Miao, Y., Jiang, Z., Zhou, H. ve Li, Q. N. (2011). PiRNA, the new non-coding RNA is aberrantly expressed in human cancer cells, . *Clinica Chimica Acta*, 412(17-18), 1621-1625. doi: DOI 10.1016/j.cca.2011.05.015
- Cheng, Y. H., Wong, E. W. ve Cheng, C. Y. (2011). Cancer/testis (CT) antigens carcinogenesis and spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 1(3), 209-220. doi: 10.4161/spmg.1.3.17990
- Chiang, A. C. ve Massague, J. (2008). Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Metastasis. *New England Journal of Medicine*, 359 (26), 2814-2828. doi: Doi 10.1056/Nejmra0805239
- Chu, H., Hui, G., Yuan, L., Shi, D., Wang, Y., Du, M., Zhong, D., Ma, L., Tong, N., Qin, C., Yin, C., Zhang, Z. ve Wang, M. (2015). Identification of novel piRNAs in bladder cancer. *Cancer Lett*, 356(2 Pt B), 561-567. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.004
- Chu, H., Xia, L., Qiu, X., Gu, D., Zhu, L., Jin, J., Hui, G., Hua, Q., Du, M., Tong, N., Chen, J., Zhang, Z. ve Wang, M. (2015). Genetic Variants in Noncoding PIWI-Interacting RNA and Colorectal Cancer Risk. *Cancer*, 0(12), 2044-2052. doi: 10.1002/cncr.29314
- Claas, F. H. J. ve Steenbrugge, G. J. (1983). Expression of HLA-like structures on a permanent human tumor line PC-93. *Tissue Antigens* 21, 227-232.
- Cook, H. A., Koppetsch, B. S., Wu, J. ve Theurkauf, W. E. (2004). The Drosophila SDE3 homolog armitage is required for oskar mRNA silencing and embryonic axis specification. *Cell*, 116(6), 817-829. doi: Doi 10.1016/S0092-8674(04)00250-8
- Cooper, J. R., Bhatia, J. K., Muenchen, H. J., McLean, L., Hayasaka, S., Taylor, J., Poncza, P. J. ve Pienta K. J. (2002). The regulation of prostate cancer cell adhesion to human bone marrow endothelial cell monolayers by androgen dihydrotestosterone and cytokines. *Clinical & Experimental Metastasis*, 19,25-33.
- Cooperberg, M. R., Park, S. ve Carroll, P. R. (2004). Prostate cancer 2004: Insights from national disease registries. *Oncology (Williston Park)*, 18(10), 1239-1247.
- Costa, F. F., Le Blanc, K. ve Brodin, B. (2007). Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells*, 25(3), 707-711. doi: 10.1634/stemcells.2006-0469

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Cui, L., Lou, Y. R., Zhang, X. J., Zhou, H., Deng, H. X., Song, H. J., Yu, X. C., Xiao, B. X., Wang, W. H. ve Guo, J. M. (2011). Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using piRNAs as markers. . *Clinical Biochemistry*, 44(13), 1050-1057. doi: DOI 10.1016/clinbiochem.2011.06.004
- Culig, Z., Hobisch, A., Hittmair, A., Peterziel, H., Cato, A. C., Bartsch, G. ve Klocker, H. (1998). Expression, structure and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma. *Prostate* 35(1), 63-70.
- Culig, Z., Hoffmann, J. ve Erdel, M. (1999). Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor blocker bicalutamide is associated with prostate tumor progression in a new model system. *Br J Cancer*, 81, 242-251.
- Çal, Ç. ve Şimşir, A. (2005). Prostat kanseri hücrelerinde androjen baskılama tedavisine direnç gelişiminin mekanizmaları. *Türk Üroloji Dergisi*, 31(1), 21-30.
- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F. ve Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231-235. doi: 10.1038/nature03049
- Dharap, A., Nakka, V. P. ve Vemuganti, R. (2011). Altered expression of PIWI RNA in the rat brain after transient focal ischemia. *Stroke*, 42(4), 1105-1109. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.598391
- Downing, S. R., Jackson, P. ve Russell, P. J. (2002). Mutations within the tumour suppressor gene p53 are not confined to a late event in prostate cancer progression: A review of the evidence. *Urol. Oncol.* , 6, 103-110.
- Dowsett, M., Cuzick, J., Ingle, J., Coates, A., Forbes, J., Bliss, J., Buyse, M., Baum, M., Buzdar, A., Colleoni, M., Coombes, C., Snowdon, C., Gnant, M., Jakesz, R., Kaufmann, M., Boccardo, F., Godwin, J., Davies, C. ve Peto, R. (2010). Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J Clin Oncol*, 28(3), 509-518 doi: 10.1200/JCO.2009.23.1274
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. ve Tuschl, T. (2001). RNA Interference is Mediated by 21- and 22- Nucleotide RNAs. *Genes ve Development*, 15(2), 188- 200 doi: Doi 10.1101/Gad.862301
- Elizabeth, A. M. ve Robert, L. S. (2009). Biological Determinants of Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Nat. Rew. Cancer*, 9, 631-643.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Engel, J. B. (2007). Drug Insight: clinical use of agonists and antagonists of luteinizing-hormone-releasing hormone. *Nature Clinical Practice Endocrinology ve Metabolism*, 3, 157-167. doi: 10.1038/ncpendmet0399
- Ernst, M., Schmid, C. ve Froesch, E. R. (1989). Phenol red mimics biological actions of estradiol: enhancement of osteoblast proliferation in vitro and of type I collagen gene expression in bone and uterus of rats in vivo. *J Steroid Biochem*, 33(5), 907-914.
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.*, 12(12), 861-874. doi: 10.1038/nrg3074
- Evangelou, A., Letarte, M., Marks, A. ve Brown, T. J. (2002). Androgen modulation of adhesion and antiadhesion molecules in PC-3 prostate cancer cells expressing androgen receptor. *Endocrinology*, 143(10), 3897-3904.
- Ewing, C. M., Ru, N., Morton, R. A., Robinson, J. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Barrett, J. C. ve Isaacs, W. B. (1995). Chromosome 5 suppresses tumorigenicity of PC3 prostate cancer cells: Correlation with re-expression of alpha-catenin and restoration of E-cadherin function. *Cancer Res*, 55(21), 4813-4817.
- Falany, J. L. ve Falany, C. N. (1996). Expression of Cytosolic Sulfotransferases in Normal Mammary Epithelial Cells and Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res*, 56(7), 1551-1555.
- Fan, S., Meng, Q., Gao, B., Grossman, J., Yadegari, M., Goldberg, I. ve Rosen, E. (2000). Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 60, 5635-5639.
- Feldman, B. J. ve Feldman, D. (2001). The Development of Androgen-independent Prostate Cancer. *Nat Rev Cancer*, 1(1), 34-45. doi: 10.1038/35094009
- Feng, R. vd. (2010). miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer. *Cancer Letters*, 298, 50-63.
- Filipowicz, W. (1998). RNAi: The Nuts and Bolts of The RISC Machine. *Cell*, 122, 17- 20
- Fire, A. vd. (2005). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Fisher, B., Costantino, J. P., Redmond, C. K., Fisher, E. R., Wickerham, D. L. ve Cronin, W. M. (1994). Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst*, 86(7), 527-537.
- Furuya, Y., Kohno, N., Fujiwara, Y. ve Saitoh, Y. (1989). Mechanisms of Estrogen Action on the Proliferation of MCF-7 Human Breast Cancer Cells in an Improved Culture Medium. *Cancer Res*, 49(23), 6670-6674.
- Gao, M., Ossowski, L. ve Ferrari, A. C. (1999). Activation of Rb and decline in androgen receptor protein precede retinoic acid-induced apoptosis in androgendependent LNCaP cells and their androgen-independent derivative. *J Cell Phys*, 179, 336-346.
- Gierthy, J. F., Lincoln, D. W., Gillespie, M. B., Seeger, J. I., Martinez, H. L., Dickerman, H. W. ve Kumar, S. A. (1987). Suppression of Estrogen-regulated Extracellular Tissue Plasminogen Activator Activity of MCF-7 Cells by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res*, 47(23), 6198-6203.
- Ginsberg, E. (1999). Estrogen, alcohol and breast cancer risk. *J. Steroid Biochem. Mol. Bio.* 69, 299-306.
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J. ve Carmell, M. A. (2006). A germlinespecific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442, 199-202.
- Gleave, M., Hsieh, J. T., Gao, C. A., von Eschenbach, A. C. ve Chung, L. W. (1991). Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer Res*, 51(14), 3753-3761.
- Gleave, M., Santo, N., Rennie, P. S., Goldenberg, S. L., Bruchovsky, N. ve Sullivan, L. D. (1996). Hormone release and intermittent hormonal therapy in the LNCaP model of human prostate cancer. *Prog. Urol.*, 6 375-385.
- Gleave, M. E., Hsieh, J. T., von Eschenbach, A. C. ve Chung, L. W. (1992). Prostate and bone fibroblasts induce human prostate cancer growth in vivo: implications for bidirectional tumor-stromal interaction in prostate carcinoma growth and metastasis. *J Urol*, 147(4), 1151-1159.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Gregory, I. R., Chendrimada, T. P., Cooch, N. ve Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and post-transcriptional gene silencing. *Cell*, 123, 631-640.
- Grimaud, C., Bantignies, F., Pal-Bhadra, M., Ghana, P., Bhadra, U. ve Cavalli, G. (2006). RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell*, 124(5), 957-971. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.036
- Grivna, S. T., Beyret, E., Wang, Z. ve Lin, H. (2006). A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, 20(13), 1709-1714. doi: 10.1101/gad.1434406
- Grochola, L. F., Greither, T., Taubert, H., Moller, P., Knippschild, U., Udelnow, A., Henne-Bruns, D. ve Wurl, P. (2008). The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour-related death. *Br J Cancer*, 99(7), 1083-1088. doi: 10.1038/sj.bjc.6604653
- Gunawardane, L. S. vd. (2007). A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science*, 315, 1587-1590.
- Gündoğdu, R. ve Çelik, V. (2009). RNA interferans (RNAi). *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25 (1,2), 34-47.
- Haase, A. D., Fenoglio, S., Muerdter, F., Guzzardo, P. M., Czech, B., Pappin, D. J., Chen, C., Gordon, A. ve Hannon, G. J. (2010). Probing the initiation and effector phases of the somatic piRNA pathway in *Drosophila*. *Genes Dev*, 24(22), 2499-2504. doi: 10.1101/gad.1968110
- Hahm, H. A. ve Davidson, N. E. (1998). Apoptosis in the mammary gland and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 5(3), 199-211. doi: DOI 10.1677/erc.0.0050199
- Handler, D., Olivieri, D., Novatchkova, M., Gruber, F. S., Meixner, K., Mechtler, K., Stark, A., Sachidanandam, R. ve Brennecke, J. (2011). A systematic analysis of *Drosophila* TUDOR domain-containing proteins identifies Vreteno and the Tdrd12 family as essential primary piRNA pathway factors. *Embo Journal*, 30(19), 3977-3993. doi: DOI 10.1038/emboj.2011.308
- Harfe, B. D. (2005). MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*, 15(4), 410-415. doi: 10.1016/j.gde.2005.06.012

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Harrington, W. R., Kim, S.H., Funk, C.C., Madak-Erdogan, Z., Schiff, R., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S. (2006). Estrogen dendrimer conjugates that preferentially activate extranuclear, nongenomic versus genomic pathways of estrogen action. *Mol Endocrinol.*, 20(3), 491-502.
- Harris, T. A., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Mendell, J. T. ve Lowenstein, C. J. (2008). MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(5), 1516-1521. doi: 10.1073/pnas.0707493105
- Hayashi, S. (2004). Prediction of hormone sensitivity by DNA microarray. *Biomed Pharmacother*, 58(1), 1-9.
- Hayashi, S., Niwa, T. ve Yamaguchi, Y. (2009). Estrogen signaling pathway and its imaging in human breast cancer. *Cancer Sci*, 100(10), 1773-1778. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01243.x
- Hayashi, S. ve Yamaguchi, Y. (2005). Estrogen signaling and prediction of endocrine therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56 Suppl 1, 27-31. doi: 10.1007/s00280-005-0096-2
- He, C., Zuo, Z., Chen, H., Zhang, L., Zhou, F., Cheng, H. ve Zhou, R. (2007). Genome-wide detection of testis- and testicular cancer-specific alternative splicing. *Carcinogenesis*, 28 (12), 2484-2490. doi: 10.1093/carcin/bgm194
- He, W., Wang, Z., Wang, Q., Fan, Q., Shou, C., Wang, J. vd. (2009). Expression of HIWI in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. *BMC Cancer*, 9, 426.
- Heneweer, M., Muusse, M., Dingemans, M., de Jong, P. C., van den Berg, M. ve Sanderson, J. T. (2005). Co-culture of primary human mammary fibroblasts and MCF-7 cells as an in vitro breast cancer model. *Toxicol Sci*, 83(2), 257-263. doi: 10.1093/toxsci/kfi025
- Henshall, S. M., Quinn, D. I., Lee, C. S., Head, D. R., Golovsky, D., Brenner, P. C., Delprado, W., Stricker, P. D., Grygiel, J. J. ve Sutherland, R. L. (2001). Altered expression of androgen receptor in the malignant epithelium and adjacent stroma is associated with early relapse in prostate cancer. *Cancer Research*, 61(2), 423-427.
- Henttu, P., Liao, S. S. ve Vihko, P. (1992). Androgens up-regulate the human prostate-specific antigen messenger ribonucleic acid (mRNA), but down-regulate the prostatic acid phosphatase mRNA in the LNCaP cell line. *Endocrinology*, 130(2), 766-772. doi: 10.1210/endo.130.2.1370795

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Hirotsugu Ishizu, H. S. vd (2012). Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes ve Development*, 26, 2361-2373.
- Holliday, D. L. ve Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 13(4), 215. doi: 10.1186/bcr2889
- Horoszewicz, J. S. (1983). LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. *Cancer Research*, 43, 1809-1818.
- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S. Chu, T. M., Wajsman, Z. L., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, U., Chai, L. S., Kakati, S., Arya, S. K. ve Sandberg, A. A. (1980). The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res*, 37, 115-132.
- Horwich, M. D., Li, C., Matranga, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P. ve Zamore, P. D. (2007). The Drosophila RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol*, 17(14), 1265-1272. doi: 10.1016/j.cub.2007.06.030
- Hossfeld, D. K. ve Sherman, C. D. (1992). Klinik Onkoloji. *Uluslararası Kanser Savaş Birliği*, 3-7.
- Houwing, S., Kamminga, L. M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D. V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C. B., Plasterk, R. H., Hannon, G. J., Draper, B. W. ve Ketting, R. F. (2007). A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell*, 129(1), 69-82. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.026
- Hu, W., Chan, C. S., Wu, R., Zhang, C., Sun, Y., Song, J. S., Tang, L. H., Levine, A. J. ve Feng, Z. (2010). Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504. *Mol Cell*, 38(5), 689-699. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.027
- Huang, G. H., Xue, X., Shen, S., Gao, E., Guo, G., Shen, X. ve Zhang. X. (2012). Altered expression of piRNAs and their relation with clinicopathologic features of breast cancer. *Clin Transl Oncol*.
- Huang, Y., Ray, S., Reed, J. C., Ibrado, A. M., Tang, C., Nawabi, A., Bhalla, K. (1997). Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 42, 73-81.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Huggins, C. ve Hodges, C. V. (2002). Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. *J Urol*, 167, 948-951.
- Iizumi, T., Yazaki, T., Kanoh, S., Kondo, I., ve Koiso, K. . (1978). Establishment of a new prostatic carcinoma cell (TSU-Pr1). *J. Urol.*, 137, 1304-1306.
- Inkster, S., Yue, W. ve Brodie, A. (1995). Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(6), 1941-1947. doi: 10.1210/jcem.80.6.7539819
- Ipsaro, J. J., Haase, A. D., Knott, S. R., Joshua-Tor, L. ve Hannon, G. J. (2012). The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature*, 491(7423), 279-283. doi: 10.1038/nature11502
- Ishizu, H., Nagao, A. ve Siomi, H. (2011). Gatekeepers for Piwi-piRNA complexes to enter the nucleus. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 21, 484-490.
- Jaattela, M., Benedict, M., Tewari, M., Shayman, J. A. ve Dixit, V. M. (1995). Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells, *Oncogene*, 10, 2297-2305.
- Janic, A., Mendizabal, L., Llamazares, S., Rossell, D. ve Gonzalez, C. (2010). Ectopic expression of germline genes drives malignant brain tumor growth in Drosophila. *Science*, 330(6012), 1824-1827. doi: 10.1126/science.1195481
- Jordan, V. C. ve Murphy, C. S. (1990). Endocrine Pharmacology of Antiestrogens as Antitumor Agents. *Endocrine Reviews*, 11(4), 578-610.
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. ve Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*, 17(1), 16-23.
- Kalmykova, A. I., Klenov, M. S. ve Gvozdev, V. A. (2005). Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the Drosophila male germline. *Nucleic Acids Res*, 33, 2052- 2059.
- Kang, H. J., Moon, J. M., Lee, H. Y. ve Han. S. W. (2014). Testosterone alters testis function through regulation of piRNA expression in rats. *Mol Biol Rep*, 41, 6729-6735. doi: DOI 10.1007/s11033-014-3558-y

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. A., Duttagupta, R., Willingham, A. T., Stadler, P. F., Hertel, J., Hackermuller, J., Hofacker, I. L., Bell, I., Cheung, E., Drenkow, J., Dumais, E., Patel, S., Helt, G., Ganesh, M., Ghosh, S., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Tammana, H. ve Gingeras, T. R. (2007). RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*, 316(5830), 1484-1488. doi: 10.1126/science.1138341
- Karey, K. P. ve Sirbasku, D. A. (1988). Differential Responsiveness of Human Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and T47D to Growth Factors and 17 α -Estradiol. *Cancer Research*, 48, 4083-4092.
- Katzenellenbogen, B. S., Norman, M. J., Ecken, L. R., Peltz, S. ve dMangel, W. F. (1984). Bioactivities, estrogen receptor interactions, and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxytamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 44, 112-119.
- Khurana, J. S. ve Theurkauf, W. (2010). piRNAs, transposon silencing, and Drosophila germline development. *J Cell Biol*, 191, 905-913.
- Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık.
- Kiess, W. ve Gallaher, B. (1998). Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol*, 138(5), 482-491.
- Kim, D. H. ve Rossi, J. J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet*, 8(3), 173-184. doi: 10.1038/nrg2006
- Kim, V. N. (2006). Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. *Genes Dev*, 20(15), 1993-1997. doi: 10.1101/gad.1456106
- Kim, V. N., Han, J. ve Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 126-139.
- Kinoshita, H., Shi, Y., Sandefur, C., Meisner, L. F., Chang, C., Choon, A., Reznikoff, C. R., Bova, G. S., Friedl, A. ve Jarrard, D. F. (2000). Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer. *Cancer Res*, 60(13), 3623-3630.
- Klattenhoff, C. ve Theurkauf, W. (2008). Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development*, 135(1), 3-9. doi: 10.1242/dev.006486

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Klug, W. S. ve Cummings, R. M. (2002). *Genetik Kavramlar*: Palme Yayıncılık.
- Kosaka, N., Iguchi, H. ve Ochiya, T. (2010). Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 101(10), 2087-2092. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x
- Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T. W., Li, K. E., Matsuda, Y., Kimura, T., Okabe, M., Sakaki, Y., Sasaki, H. ve Nakano, T. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes ve Development*, 22(7), 908-917. doi: Doi 10.1101/Gad.1640708
- Kutluk, T. ve Kars, A. (1994). Kanser Konusunda Genel Bilgiler. *Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu*, 13-18
- Kyprianou, N., English, H. F., Davidson, N. E. ve Isaacs, J. T. (1991). Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Res*, 51(1), 162-166.
- Lara, P. N. ve Meyers, F. J. (1999). Treatment options in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Invest*, 17(2), 137-144.
- Laufer, M., Denmeade, S. R., Sinibaldi, V. J., Carbucci, M. A. ve Eisenberger, M. A. (2000). Complete androgen blockade for prostate cancer: What went wrong? . *J. Urol.*, 164, 3-9.
- Law, P. T., Qin, H., Ching, A. K., Lai, K. P., Co, N. N., He, M., Lung, R. W., Chan, A. W., Chan, T. F. ve Wong, N. (2013). Deep sequencing of small RNA transcriptome reveals novel non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 58(6), 1165-1173. doi: 10.1016/j.jhep.2013.01.032
- Le Bail, J. C., Varnat, F., Nicolas, J.C. ve Habrioux, G. (1998). Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. *Cancer Lett.*, 130(1-2), 209-216.
- Lee, C., Sutkowski, D. M., Sensibar, J. A., Zelner, D., Kim, I., Amsel, I., Shaw, N., Prins, G. S. ve Kozlowski, J. M. (1995). Regulation of proliferation and production of prostate-specific antigen in androgen-sensitive prostatic cancer cells, LNCaP, by dihydrotestosterone. *Endocrinology*, 136(2), 796-803. doi: 10.1210/endo.136.2.7530653
- Lee, E. J. vd. (2008). Systemic Evaluation of MicroRNA Processing Patterns in Tissues, Cell Lines and Tumors. *RNA*, 14, 35-42. doi: 1261/rna.804508

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lee, R. C. ve Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 862-864. doi: 10.1126/science.1065329
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. ve Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Levenson, A. S. ve Jordan, V. C. (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.*, 57, 3071-3078.
- Lin, H. ve Spradling, A. C. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 124(12), 2463-2476.
- Litvinov, I. V., De Marzo, A. M. ve Isaacs, J. T. (2003). Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 2972-2982.
- Liu, X., Sun, Y., Guo, J., Ma, H., Li, J., Dong, B., Jin, G., Zhang, J., Wu, J., Meng, L. ve Shou, C. (2006). Expression of *hiwi* gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *Int J Cancer* 118(8), 1922-1929.
- Lu, Y., Li, C., Zhang, K., Sun, H., Tao, D., Liu, Y., Zhang, S. ve Ma, Y. (2010). Identification of piRNAs in HeLa cells by massive parallel sequencing. *BMB Rep*, 43(9), 635-641. doi: 10.5483/BMBRep.2010.43.9.635
- Macaluso, M., Paggi, M. G. ve Giordano, A. (2003). Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer. *Oncogene*, 22(42), 6472-6478.
- Mattie, M. D., Benz, C. C., Bowers, J., Sensinger, K., Wong, L., Scott, G. K., Fedele, V., Ginzinger, D., Getts, R. ve Haqq, C. (2006). Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer*, 5(24), 24. doi: 10.1186/1476-4598-5-24
- Mei, Y., Clark, D. ve Mao, L. (2013). Novel dimensions of piRNAs in cancer. *Cancer Lett*, 336(1), 46-52. doi: 10.1016/j.canlet.2013.04.008
- Miller, W. R. ve O'Neill, J. S. (1999). The significance of steroid metabolism in human cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 37, 317-325.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Momma, T., Hamblin, M. R. ve Hasan, T. (1997). Hormonal modulation of the accumulation of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin and phototoxicity in prostate cancer cells. *Int J Cancer*, 72(6), 1062-1069.
- Morley, J. E. (2000). Testosterone replacement and the physiologic aspects of aging in men. *Mayo Clin Proc*, 75 Suppl, S83-87.
- Nagao, A., Mituyama, T., Huang, H., Chen, D., Siomi, M. C. ve Siomi, H. (2010). Biogenesis pathways of piRNAs loaded onto AGO3 in the *Drosophila* testis. *RNA*, 16, 2503-2515.
- Narry, K. V. (2005). Small RNAs: Classification, Biogenesis, and Function. *Mol. Cells*, 19, 1-15.
- Negrini, M. ve Calin, G. A. (2008). Breast cancer metastasis: a microRNA story. *Breast Cancer Res*, 10(2), 203. doi: 10.1186/bcr1867
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J. P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P. T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N. J., Kuo, W. L., Stilwell, J. L., Pinkel, D., Albertson, D. G., Waldman, F. M., McCormick, F., Dickson, R. B., Johnson, M. D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A. ve Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10(6), 515-527. doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.008
- Ni, M., Chen, Y., Lim, E., Wimberly, H., Bailey, S. T., Imai, Y., Rimm, D. L., Liu, X. S. ve Brown, M. (2011). Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell*, 20(1), 119-131. doi: 10.1016/j.ccr.2011.05.026
- Nishida, K. M., Saito, K., Mori, T., Kawamura, Y., Nagami-Okada, T., Inagaki, S., Siomi, H. ve Siomi, M. C. (2007). Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine piRNA complexes in *Drosophila* male gonad. *RNA*, 13(11), 1911-1922. doi: 10.1261/rna.744307
- Nishimasu, H., Ishizu, H., Saito, K., Fukuhara, S., Kamatani, M. K., Bonnefond, L., Matsumoto, N., Nishizawa, T., Nakanaga, K., Aoki, J., Ishitani, R., Siomi, H., Siomi, M. C. ve Nureki, O. (2012). Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature*, 491(7423), 284-287. doi: 10.1038/nature11509
- O'Neill, J. S. ve Miller, W. R. (1987). Aromatase activity in breast adipose tissue from women with benign and malignant breast diseases. *Br J Cancer*, 56, 601-604

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Olivieri, D., Sykora, M. M., Sachidanandam, R., Mechtler, K. ve Brennecke, J. (2010). An in vivo RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *EMBO J*, 29(19), 3301-3317. doi: 10.1038/emboj.2010.212
- Olivieri, D. vd. (2012). The cochaperone Shutdown defines a group of biogenesis factors essential for all piRNA populations in *Drosophila*. *Mol Cell* 47, 954-969.
- Ossowski, L., Biegel, I. ve Reich, E. (1979). Mammary plasminogen activator correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell*, 16, 929-940.
- Page, S. T., Lin, D. W., Mostaghel, E. A., Hess, D. L., True, L. D., Amory, J. K., Nelson, P. S., Matsumoto, A. M. ve Bremner, W. J. (2006). Persistent intraprostatic androgen concentrations after medical castration in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(10), 3850-3856. doi: 10.1210/jc.2006-0968
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. ve Birchler, J. A. (2002). RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell.*, 9, 315-327.
- Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B. A., Gandhi, S. G., Chikka, M. R., Bhadra, U., Birchler, J. A. ve Elgin, S. C. (2004). Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science*, 303(5658), 669-672. doi: 10.1126/science.1092653
- Palmer, C. P., Mycielska, M. E., Burcu, H., Osman, K., Collins, T., Beckerman, R., Perrett, R., Johnson, H., Aydar, E. ve Djamgoz, M. B. (2008). Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA): application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na⁺ channel expression. *Eur Biophys J*, 37(4), 359-368. doi: 10.1007/s00249-007-0219-2
- Pandya, G. M., Ramani, U., V., Janmeda, M., Dangar, N. S., Tyagi, K., Brahmkshtri, B. P. ve Kharadi, V. B. (2014). piRNA: Basics and their Association with PIWI proteins. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 8(3), 303-308.
- Patel, N. ve Sauter, E. R. (2011). Body fluid micro(mi)RNAs as biomarkers for human cancer. *Journal of Nucleic Acids Investigation*, 2(1).
- Paul, R. ve Breul, J. (2000). Antiandrogen withdrawal syndrome associated with prostate cancer therapies: incidence and clinical significance. *Drug Saf*, 23(5), 381-390.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Paul, R., Ewing, C. M., Jarrard, D. F. ve Isaacs, W. B. (1997). The cadherin cell-cell adhesion pathway in prostate cancer progression. *Br J Urol*, 79 Suppl 1(1), 37-43.
- Peters, L. ve Meister, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*, 26(5), 611-623. doi: 10.1016/j.molcel.2007.05.001
- Preall, J. B. vd (2012). Shutdown is a component of the Drosophila piRNA biogenesis machinery. *RNA*, 18, 1446-1457.
- Przylipiak, A., Rabe, T., Hafner, J., Przylipiak, M. ve Runnebaum, B. (1996). Influences of ethanol on in vitro growth of human mammary carcinoma call line MCF-7. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 258, 137-140.
- Rajah, T. T., Peine, K. J., Du, N., Serret, C. A. ve Drews, N. R. (2012). Physiological concentrations of genistein and 17 β -estradiol inhibit MDA-MB-231 breast cancer cell growth by increasing BAX/BCL-2 and reducing pERK1/2. *Anticancer Res.*, 32(4), 1181-1191.
- Rajasethupathy, P., Antonov, I., Sheridan, R., Frey, S., Sander, C., Tuschl, T. ve Kandel, E. R. (2012). A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell*, 149(3), 693-707. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.057
- Rambeaud, J. J. (1999). Intermittent complete androgen blockade in metastatic prostate cancer. *Eur Urol*, 35 Suppl 1(1), 32-36.
- Richards, J. A., Petrel, T. A. ve Brueggemeier, R. W. (2002). Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 80(2), 203-212.
- Roos, W., Fabbro, D., Kong, W., Costa, S. D. ve Eppenberger, U. (1986). Correlation between hormone dependency and the regulation of epidermal growth factor receptor by tumor promoters in human mammary carcinoma cells *Cell Biology*, 83, 991-995.
- Ross, J. S., Carlson, J. A. ve Brock, G. (2007). miRNA: the new gene silencer. *Am J Clin Pathol*, 128(5), 830-836. doi: 10.1309/2JK279BU2G743MWJ
- Rubio, N., Villacampa, M. M. ve Blanco, J. (1998). Traffic to lymph nodes of PC- 3 prostate tumor cells in nude mice visualized using the luciferase gene as a tumor cell marker. *Lab. Invest.* , 78, 1315-1325.
- Russell, P. J. ve Kingsley, E. A. Human Prostate Cancer Cell Lines, Methods in Molecular Medicine (Vol. 81).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Saito, K., Nishida, K. M., Mori, T., Kawamura, Y., Miyoshi, K., Nagami, T., Siomi, H. ve Siomi, M. C. (2006). Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev*, 20(16), 2214-2222. doi: 10.1101/gad.1454806
- Saito, K. vd. (2007). Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.*, 21 1603-1608.
- Saito, K., Ishizu, H., Komai, M., Kotani, H., Kawamura, Y., Nishida, K. M., Siomi, H. ve Siomi, M. C. (2010). Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev*, 24(22), 2493-2498. doi: 10.1101/gad.1989510
- Saito, K. ve Siomi, M. C. (2010). Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals. *Dev Cell*, 19(5), 687-697. doi: 10.1016/j.devcel.2010.10.011
- Santen, R. J., Santner, S. J., Pauley, R. J., Tait, L., Kasetta, J., Demers, L. M., Hamilton, C., Yue, W. ve Wang, J. P. (1997). Estrogen production via the aromatase enzyme in breast carcinoma: which cell type is responsible? . *J Steroid Biochem Mol Biol*, 61, 267-271
- Sapino, A., Pietribiasi, F., Bussolati, G. ve Marchisio, P. C. (1986). Estrogen- and tamoxifen-induced rearrangement of cytoskeletal and adhesion structures in breast cancer MCF-7 cells. *Cancer Res.*, 46(5), 2526-2531.
- Sato, N., Sadar, M. D., Bruchovsky, N., Saatcioglu, F., Rennie, P. S. ve Sato, S. (1997). Androgenic induction of prostate-specific antigen gene is repressed by protein- protein interaction between the androgen receptor and AP-1/c-Jun in the human prostate cancer cell line LNCaP. *J. Biol. Chem.* , 272, 17485-17494.
- Sciarra, A., Casale, P., Colella, D., Di Chiro, C. ve Di Silverio, F. (1999). Hormone-refractory prostate cancer? Anti-androgen withdrawal and intermittent hormone therapy. *Scand J Urol Nephrol*, 33(4), 211-216.
- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*, 4(6), 624-630.
- Shalet, S. M. (2009). Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatr Blood Cancer*, 53(2), 285-288. doi: 10.1002/pbc.22000
- Siddiqi, S. ve Matushansky, I. (2012). Piwis and piwi-interacting RNAs in the epigenetics of cancer. *J Cell Biochem*, 113(2), 373-380. doi: 10.1002/jcb.23363

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Siddiqi, S., Terry, M. ve Matushansky, I. (2012). Hiwi mediated tumorigenesis is associated with DNA hypermethylation. *PLoS One*, 7, 33711.
- Simanowski, V., Seitz, H., Baier, B., Kommerell, B., Schmidt-Gayk, H. ve Wright, N. (1986). Chronic ethanol consumption selectively stimulates rectal cell proliferation in rat. *Gut*, 27, 278-282.
- Simpson, A. J. vd. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 5 615-625.
- Simpson, E. R. ve Davis, S. R. (2001). Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis-some new perspectives. *Endocrinology*, 142, 4589-4594.
- Singletary, K. W., Frey, R. S. ve Yan, W. (2001). Effect of ethanol on proliferation and estrogen receptor α expression in human breast cancer cells. *Cancer Letters*, 165, 131-137.
- Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. ve Aravin, A. A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12 246-258.
- Smith, I. E. ve Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*, 348(24), 2431-2442. doi: 10.1056/NEJMra023246
- Soule, H. D., Vasquez, J., Long, A., Albert, S. ve Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1413.
- Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H. ve Paulson, D. F. (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer*, 21(3), 274-281.
- Suzuki, R., Honda, S., ve Kirino, Y. (2012). PIWI Expression and Function in Cancer. *Frontiers in Genetics*, 3(204), 1-8.
- Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C. Z. ve Huang, J. (2011). PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate*, 71(15), 1668-1679. doi: 10.1002/pros.21383
- Tang, F., Hayashi, K., Kaneda, M., Lao, K. ve Surani, M. A. (2008). A sensitive multiplex assay for piRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 369, 1190-1194.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Teixeira, C., Reed, J. C. ve Pratt, M. A. (1995). Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 55 3902-3907.
- Thompson, E. W., Katz, D., Shima, T. B., Wakeling, A. E., Lippman, M. E. ve Dickson, R. B. (1989). ICI 164,384, a pure antagonist of estrogen-stimulated MCF-7 cell proliferation and invasiveness. *Cancer Res.*, 49(24), 6929-6934.
- Tolia, N. H. ve Joshua-Tor, L. (2007). Slicer and the argonauts. *Nat Chem Biol*, 3(1), 36-43. doi: 10.1038/nchembio848
- Trapman, J. ve Brinkmann, A. O. (1996). The androgen receptor in prostate cancer. *Pathol Res Pract*, 192(7), 752-760. doi: 10.1016/S0344-0338(96)80097-5
- Trauger, R., Corey, E., Bell, D., White, S., Garsd, A., Stickney, D., Reading, C. ve Frincke, J. (2009). Inhibition of androstenediol-dependent LNCaP tumour growth by 17-alpha-ethynyl-5alpha-androstane-3alpha, 17beta-diol (HE3235). *British Journal of Cancer*, 100, 1068-1072. doi: 10,1038/sj.bjc.6604987
- Tsai, E. M., Wang, S. C., Lee, J. N. ve Hung, M. C. (2001). Akt activation by estrogen in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Cancer Res.*, 61(23), 8390-8392.
- Vagin, V. V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V. ve Zamore, P. D. (2006). A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. . *Science*, 313, 320-324.
- Ventura, A. ve Jacks, T. (2009). MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*, 136(4), 586-591. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.005
- Verdel, A., Vavasseur, A., Le Gorrec, M. ve Touat-Todeschini, L. (2009). Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. . *Int J Dev Biol.*, 53(2-3), 245-257.
- Walsh, P. C. (1975). Physiologic basis for hormonal therapy in carcinoma of the prostate. *Urol Clin North Am*, 2, 125-140.
- Wang, C. ve Uchida, T. (1997). [Androgen receptor gene mutations in prostate cancer]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 88(5), 550-556.
- Wang, T. T. ve Phang, J. M. (1995). Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res.*, 55(12), 2487-2489.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Wang, Y., Liu, Y., Shen, X., Zhang, X., Chen, X. ve Yang, C. (2012). The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 5, 315-325.
- Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N. ve Imai, H. (2006). Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev*, 20(13), 1732-1743. doi: 10.1101/gad.1425706
- Watanabe, T., Tomizawa, S., Mitsuya, K., Totoki, Y., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Iida, N., Hoki, Y., Murphy, P. J., Toyoda, A., Gotoh, K., Hiura, H., Arima, T., Fujiyama, A., Sado, T., Shibata, T., Nakano, T., Lin, H., Ichiyanagi, K., Soloway, P. D. ve Sasaki, H. (2011). Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. *Science*, 332(6031), 848-852. doi: 10.1126/science.1203919
- Wiese, T. E., Kral, L. G., Dennis, K. E., Butler, W. B. ve Brooks, S. C. (1992). Optimization of estrogen growth response in MCF-7 cells. *In Vitro Cell Dev Biol*, 28A(9-10), 595-602.
- Wilson, A. S., Power, B. E. ve Molloy, P. L. (2007). DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1775(1), 138-162. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.08.007
- Winter, J. S. D. ve Couch, R. M. (1995). *Sexual differentiation. In: Endocrinology and Metabolism*. New York: McGraw-Hill. Inc.
- Wolf, D. A., Herzinger, T., Hermeking, H., Blaschke, D. ve Horz, W. (1993). Transcriptional and posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. *Mol Endocrinol*, 7(7), 924-936. doi: 10.1210/mend.7.7.8413317
- Wu, Q., Ma, Q., Shehadeh, L. A., Wilson, A., Xia, L., Yu, H. ve Webster, K. A. (2010). Expression of the Argonaute protein PiwiL2 and piRNAs in adult mouse mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(4), 915-920.
- Xiol, J., Cora, E., Kogelgruber, R., Chuma, S., Subramanian, S., Hosokawa, M., Reuter, M., Yang, Z., Berninger, P., Palencia, A., Benes, V., Penninger, J., Sachidanandam, R. ve Pillai, R. S. (2012). A role for Fkbp6 and the chaperone machinery in piRNA amplification and transposon silencing. *Mol Cell*, 47(6), 970-979. doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.019

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Yamaguchi, Y., Seino, Y., Takei, H., Kurosumi, M. ve Hayashi, S. (2014). Detection of estrogen-independent growth-stimulating activity in breast cancer tissues: implication for tumor aggressiveness. *Cancer Microenviron.*, 7(1-2), 23-31. doi: 10.1007/s12307-013-0139-x
- Yan, H., Wu, Q. L., Sun, C. Y., Ai, L. S., Deng, J., Zhang, L., Chen, L., Chu, Z. B., Tang, B., Wang, K., Wu, X. F., Xu, J. ve Hu, Y. (2015). piRNA-823 contributes to tumorigenesis by regulating de novo DNA methylation and angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia*, 29(1), 196-206. doi: 10.1038/leu.2014.135
- Yang, Q., Hua, J., Wang, L., Xu, B., Zhang, H., Ye, N., Zhang, Z., Yu, D., Cooke, H. J., Zhang, Y. ve Shi, Q. (2013). MicroRNA and piRNA profiles in normal human testis detected by next generation sequencing. *PLoS One*, 8(6), e66809. doi: 10.1371/journal.pone.0066809
- Zamore, P. D. vd. (2000). RNAi: Double-Stranded RNA Directs The ATP Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell*, 101, 25-33.
- Zamparini, A. L. vd. (2011). Vreteno, a gonad-specific protein, is essential for germline development and primary piRNA biogenesis in Drosophila. *Development*, 138 4039-4050.
- Zhang, H., Ren, Y., Xu, H., Pang, D., Duan, C. ve Liu, C. (2013). The expression of stem cell protein Piwil2 and piR-932 in breast cancer. *Surg Oncol*, 22(4), 217-223. doi: 10.1016/j.suronc.2013.07.001
- Zhao, X. Y., Peehl, D. M., Navone, N. M. ve Feldman, D. (2000). 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell growth by androgen-dependent and androgen-independent mechanisms. *Endocrinology*, 141(7), 2548-2556. doi: 10.1210/endo.141.7.7549
- Zhao, Y., Agarwal, V. R., Mendelson, C. R. ve Simpson, E. R. (1997). Transcriptional regulation of CYP19 gene (aromatase) expression in adipose stromal cells in primary culture. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 61(3-6), 203-210.
- Zhou, H., Hu, H. ve Lai, M. (2010). Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms. *Biol Cell*, 102, 645-655.
- Zhu, M. L. ve Kyprianou, N. (2010). Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells. *FASEB J.*, 24(3), 769-777. doi: 10.1096/fj.09-136994

Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Çağrı ÖNER
Doğum tarihi ve yeri: 18.01.1986, Tarsus/MERSİN
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : Büyükdere Mah. Şair sok. Uzunkaya Apt. 10/1
ESKİŞEHİR

Eğitim Durumu

İLKOKUL	ADI	Özel Türkmen Koleji
	DÖNEM	1992-1997
ORTAOKUL	ADI	Özel Türkmen Koleji
	DÖNEM	1997-2001
LİSE	ADI	İçel Anadolu Lisesi
	DÖNEM	2001-2004
ÜNİVERSİTE	ADI	Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü
	DÖNEM	2004-2009
	ORTALAMA	2.35/ 73,5
YÜKSEK LİSANS	ADI	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Temel Tıp Bilimleri; Tıbbi Biyoloji A.D.
	DÖNEM	2009- 2012
	ORTALAMA	3.96/ 98,8
DOKTORA	ADI	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Temel Tıp Bilimleri; Tıbbi Biyoloji A.D.
	DÖNEM	2012- TEZ AŞAMASINDA
	ORTALAMA	3.88/

Mesleki Deneyim

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

- HÜCRE ÖLÜMÜ ARAŞTIRMA DERNEĞİ (HÖAD), Asossiye Üye

Yayınlar

ULUSAL ve ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN POSTERLER

•“THE IMPORTANCE OF MIR-126 IN BREAST CANCER”; **ÖNER Ç.**, TURGUT COŞAN D., ERKASAP S. M., DEĞİRMENCİ İ., GÜNEŞ H. V., ŞAHİN MUTLU F.; 2013, EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN GENETIC CONGRESS, 8-12 HAZİRAN 2013, PARİS/FRANSA.

•“MEME KANSERİ METASTAZINDA MİKRO RNA ETKİSİ”; **ÖNER Ç.**, TURGUT COŞAN D., ERKASAP S. M., DEĞİRMENCİ İ., GÜNEŞ H. V., ŞAHİN MUTLU F.; 2013, 13.TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK KONGRESİ, 27-30 EKİM 2013, KUŞADASI/AYDIN.

•“OTHERWISE PERSPECTIVE OF VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNELS”; **ÖNER Ç.**, ÇOLAK E., TURGUT COŞAN D.; 2014, 5. THE INTERNATIONAL CONGRESS ON CELL MEMBRANES and OXIDATIVE STRESS, FOCUS ON CALCIUM SIGNALLING AND TRP CHANNELS, 9-12 EYLÜL 2014, ISPARTA.

•“THE IMPORTANCE OF VOLTAGE GATED CHANNELS IN BREAST CANCER”; TURGUT COŞAN D., SOYOCAK A., **ÖNER Ç.**, ERKASAP M. S., BAYMAN E., MUTLU ŞAHİN F., DJAMGOZ M.B.A.; 2014, 5. THE INTERNATIONAL CONGRESS ON CELL MEMBRANES and OXIDATIVE STRESS, FOCUS ON CALCIUM SIGNALLING AND TRP CHANNELS, 9-12 EYLÜL 2014, ISPARTA.

•“THE IDENTIFICATION OF TOTAL OXIDANT AND ANTIOXIDANT LEVELS IN MESOTHELIOMA”; DAL A., TURGUT COŞAN D., **ÖNER Ç.**, AK G., SOYOCAK A., METİNTAS M., ÇOLAK E., GÜNEŞ H.V.; 2014, 5. THE INTERNATIONAL CONGRESS ON CELL MEMBRANES and OXIDATIVE STRESS, FOCUS ON CALCIUM SIGNALLING AND TRP CHANNELS, 9-12 EYLÜL 2014, ISPARTA.

•“REGULATION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE SECRETION IN HUMAN MEIBOMIAN GLAND EPITHELIAL CELLS”; AFSUN SAHİN, DİDEM COSAN, **CAĞRI ONER**, HASAN V. GUNES, NİLGUN YİLDİRİM, HİKMET BASMAK; 2015, ARVO 2015 ANNUAL MEETING, 2-8 MAYIS 2015, DENVER, COLORADO.

-

Bilimsel Etkinlikler

Burslar

• **TÜBİTAK PROJE BURSUSU:** İnsan oküler yüzey ve adnekslerine ait epitel hücre kültürlerinde androjenlerin inflamatuvar yolaklar üzerine etkisi, 2012-2015.

Ödüller

• **POSTER ÖDÜLÜ:** TITANIUM ROSE POSTER AWARD; "THE IMPORTANCE OF VOLTAGE GATED CHANNELS IN BREAST CANCER", TURGUT COŞAN D., SOYOCAK A., ÖNER Ç., ERKASAP M. S., BAYMAN E., MUTLU ŞAHİN F., DJAMGOZ M.B.A.; 5. THE INTERNATIONAL CONGRESS ON CELL MEMBRANES and OXIDATIVE STRESS, FOCUS ON CALCIUM SIGNALLING AND TRP CHANNELS, 9-12 EYLÜL 2014, ISPARTA.

Projeler

• "Meme Kanseri ve Metastazında miR-126'nın Moleküler Mekanizmasının İncelenmesi", 2011-2014, OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ (BAP), Araştırmacı.

• "İnsan meme kanser hücrelerinin invazyon ve metastazında voltaj kapılı potasyum kanallarının (Kv1.3 ve Kv10.1) rolü", 2010-2014, TÜBİTAK, Araştırmacı.

• "İnsan oküler yüzey ve adnekslerine ait epitel hücre kültürlerinde androjenlerin inflamatuvar yolaklar üzerine etkisi", 2012-2015, TÜBİTAK, Bursiyer/Araştırmacı.

• "Meme ve Prostat Kanserinde piRNAlar ile Hormonal Regülasyonun İlişkisi", 2014-2015, OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ (BAP), Araştırmacı.

Seminerler

• "HÜCRE ZARININ YAPISI VE HÜCRE ZARI BAĞLANTISI", 2010, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

• "HÜCRELER ARASI TAŞINMA BİÇİMLERİ", 2010, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

• "KANSER VE SİNYAL YOLAKLARI", 2010, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

• "KODLANMAYAN KÜÇÜK RNA'LARIN KANSER İLE İLİŞKİSİ", 2011, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

•"*REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ*", 2012, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

•"*KODLAMAYAN RNA'LAR, MİKRO RNA ve KANSER*", 2012, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, FEN BİLİMLERİ FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ KULÜBÜ

•"*ENTOSİS*", 2013, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

•"*VİROFAJLAR ve SPUTNİK*", 2013, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

•"*RHO/ROCK YOLAĞI VE KANSER*", 2014, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

•"*miRNA'LAR ve MEME KANSERİ*", 2014, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Kurslar ve Eğitim Programları

•"*MOLEKÜLER BİYOLOJİDE YENİ TEKNOLOJİLER KURSU*", 26 EKİM 2011, ANTALYA.

•"*XII. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK KONGRESİ*", 27-30 EKİM 2011, ANTALYA.

•"*I. HÜCRE ÖLÜMÜ ARAŞTIRMA TEKNİKLERİ - TEORİK KURSU*", 24-25 KASIM 2011, İZMİR.

•"*17 025, LABORATUVAR AKREDİTASYON EĞİTİMİ*", 10-11 ARALIK 2011, ESKİŞEHİR.

•"*KÖK HÜCRE ve GEN TEDAVİSİ SEMPOZYUMU*", 27 ŞUBAT 2012, BURSA.

•"*II. HÜCRE ÖLÜMÜ ARAŞTIRMA TEKNİKLERİ - TEORİK KURSU*", 01-02 KASIM 2012, ESKİŞEHİR.

•"*IV. MULTİDİSİPLİNER KANSER ARAŞTIRMA KONGRESİ*", 13-16 ARALIK 2012, BURSA.

•"*EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN GENETIC CONGRESS*", 8-12 HAZİRAN 2013, PARİS/FRANSA.

•"*XII. TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK KONGRESİ*", 27-30 EKİM 2013, KUŞADASI/AYDIN.

•“5. *THE INTERNATIONAL CONGRESS ON CELL MEMBRANES and OXIDATIVE STRESS, FOCUS ON CALCIUM SIGNALLING AND TRP CHANNELS*”, 9-12 EYLÜL 2014, ISPARTA.

•“SANKO ÜNİVERSİTESİ, TIPTA İNOVASYON BULUŞMALARI 1; MOLEKÜLER TIPTA BİYOMÜHENDİSLİK VE İNOVASYON”, 20-21 MART 2015, GAZİANTEP.