

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

siRNA KULLANILARAK İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE
DİZİLERİNDE (MCF-7) erk GENİNİN SESSİZLEŞTİRİLMESİ,
BU SESSİZLEŞTİRMENİN ERK PROTEİNİ AKTİVASYONU VE
HÜCRE ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

ARŞ. GRV. FULYA DOĞANER

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. HASAN VEYSİ GÜNEŞ

Ağustos 2012

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

siRNA KULLANILARAK İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE
DİZİLERİNDE (MCF-7) erk GENİNİN SESSİZLEŞTİRİLMESİ, BU
SESSİZLEŞTİRMENİN ERK PROTEİNİ AKTİVASYONU VE
HÜCRE ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

ARŞ. GRV. FULYA DOĞANER

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. HASAN VEYSİ GÜNEŞ

Proje no: 200811038

KABUL VE ONAY SAYFASI

Fulya Doğaner'in Doktora Tezi olarak hazırladığı "siRNA kullanılarak insan meme kanseri hücre dizilerinde (MCF-7) erk geninin sessizleştirilmesi, bu sessizleştirmenin ERK proteini aktivasyonu ve hücre çoğalması üzerine etkilerinin belirlenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

11 Eylül 2012

Üye: Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

Üye: Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN

Üye: Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCİ

Üye: Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP

Üye: Yrd. Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 14.09.2012 tarih ve ...928.../4319... sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

“siRNA Kullanılarak İnsan Meme Kanseri Hücre Dizilerinde (MCF-7) erk Geninin Sessizleştirilmesi, Bu Sessizleştirilenin ERK Proteini Aktivasyonu ve Hücre Çoğalması Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi” başlıklı bu tez, **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu** tarafından 200811038 no’lu proje olarak desteklenmiştir.

ÖZET

siRNA KULLANILARAK İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE (MCF-7) erk GENİNİN SESSİZLEŞTİRİLMESİ, BU SESSİZLEŞTİRMENİN ERK PROTEİNİ AKTİVASYONU VE HÜCRE ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

MAP (Mitogen-activated protein) kinazlar hücre dışı sinyalleri, transkripsiyon faktörlerine ileten protein ailesidir. Hücre içi sinyal yolunda görev yapan bu protein ailesinin üyelerinden ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) büyüme faktörleri ile uyarılarak hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasını etkilerken, JNK (c-jun amino-terminal kinase) ve p38 (high osmolarity glycerol response kinase) strese bağlı uyarımlarla uyarılarak apoptotik sinyallere aracılık eder.

Meme kanseri kadınlarda çok sık görülen ve ölümlü sonuçlanabilen bir kanser tipidir. ERK, p38 ve JNK proteinleri meme kanserinde incelenmiş ve normal dokulara oranla aktivasyonlarında artış olduğu belirlenmiştir. ERK proteininin aktivasyonundaki 5-20 kat artışın insan meme kanserinin metastatik formunun başlangıcının belirlenmesinde önemli bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür. RNAi (RNA interference), gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel olarak baskılanmasına yol açan bir sistemdir. Bu baskılama, siRNAlar (small interference RNA) (21-23 nükleotid) aracılığı ile mRNA'nın yıkımının uyarılması ile gerçekleşir.

Bu çalışmada; MCF-7 insan meme kanseri hücre dizisi ve NIH 3T3 sıçan normal fibroblast hücre dizisi, erk genine özgü siRNA ile transfekte edilerek erk geninin ne kadar sessizleştirildiği ve gen ekspresyon düzeyi total RNA kullanılarak qRT-PCR'da belirlenmiştir. Ayrıca ERK, p38 ve JNK proteinlerinin aktiviteleri de ELISA yöntemi ile belirlenirken, bu sessizleştirmenin hücre çoğalmasını nasıl etkilediği XTT kiti ile ortaya konmuştur.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, MCF-7 insan meme kanseri hücre dizisinde ERK siRNA kullanımını sonucu en etkili sessizleştirmenin 48. saatte 100 nM konsantrasyonda (% 99,85) olduğu belirlendi. Bunların yanında bu sessizleştirmenin

hücre çoğalması ve protein ekspresyonunun azalması üzerine hemen hemen tüm konsantrasyonlarda etkili olduğu gözlemlendi. Sonuçta siRNA uygulamasının kanser tedavisinde oldukça faydalı yardımcı bir araç olabileceği belirlendi.

Anahtar Sözcükler : ERK, MCF-7, NIH 3T3, RNAi, siRNA

SUMMARY

THE SILENCING OF ERK BY USING siRNA IN HUMAN BREAST CANCER CELL LINES (MCF-7), THE EFFECTS OF THIS SILENCING ON ERK PROTEIN ACTIVATION AND CELL PROLIFERATION

MAP (Mitogen-activated protein) kinases, protein family, act as transducers of extracellular signaling to elements regulating transcription. The members of this intracellular signaling pathway protein family; ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) is activated by growth factor signals and induces cell growth, differentiation and proliferation, JNK (c-jun amino-terminal kinase) and P38 (high osmolarity glycerol response kinase) are activated by stress-related stimuli and mediate apoptotic signals.

Breast cancer is seen frequently in women and can result in death. ERK, p38 and JNK proteins were investigated in breast carcinoma and elevated activation was found compared with normal tissue. It has been proposed that 5-20 fold elevation in ERK activation is an important marker in initiation of metastatic form of human breast cancer. RNAi is a system in which leads to posttranscriptional suppression of gene expression. This suppression is mediated by siRNAs (21-23 nucleotide) which induce degradation of mRNA.

In this study, MCF-7 human breast cancer cell line and NIH 3T3 mouse normal fibroblast cell line were cultured. Afterwards, erk gene of MCF-7 and NIH 3T3 cells was silenced by using siRNA. After siRNA transfection, erk gene silencing was measured by qRT-PCR method on mRNA level with total RNA isolated from cells by using total RNA isolation kit. In addition to activations of ERK, p38 and JNK proteins were measured by ELISA and it has been determined how this silencing effects cell proliferation by XTT kit.

When the obtained results are analyzed, it is determined that the most effective silencing occurs at the 48th hour of 100 nM concentrated (% 99,85) ERK siRNA utilization. Besides, it was observed that erk gene silencing was effective for cell

proliferation reducing and protein expression reducing at almost all concentrations. As a result, it was determined that siRNA application might be aidful in cancer treatment.

Key words : ERK, MCF-7, NIH 3T3, RNAi, siRNA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	viii
TABLO DİZİNİ	xii
ŞEKİL DİZİNİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Epigenetik.....	4
2.2. RNA Tipleri ve RNA Interference (RNAi) Mekanizması	5
2.2.1. Mikro RNA (miRNA).....	6
2.2.2. Küçük Sessizleştirici RNA (small interfering RNA=siRNA)	7
2.3. Kanser	9
2.3.1. Meme Kanseri.....	10
2.4. MAP Kinaz Uyarı Yolağı.....	12
2.4.1 ERK Ailesi	13
2.4.2. p38 Ailesi	14
2.4.3. JNK Ailesi.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Gereç.....	16
3.1.1. Hücre Dizileri	16
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	16
3.1.3. Malzemeler	17
3.1.4. Aygıtlar	18

3.2. Yöntem	20
3.2.1. Hücre Kültürü	20
3.2.1.1. Sterilizasyon	20
3.2.1.2. Kullanılan Besiyeri ve Hazırlanışı	20
3.2.1.2.1. İnsan Meme Kanseri Hücre Dizisi (MCF-7).....	21
3.2.1.2.2. Normal Fibroblast Hücre Dizisi (NIH 3T3).....	21
3.2.1.3. Kültür Aşaması ve Pasajlama.....	21
3.2.1.3.1. Kültür Aşaması.....	21
3.2.1.3.2. Pasajlama	21
3.2.1.4. Çalışma için Uygun Miktar da Hücrenin Sayımı	22
3.2.1.4.1. Ölçüme Alınacak Hücrelerin Eldesi.....	22
3.2.1.4.2. Tripa n Blue Boyama Yöntemi	22
3.2.1.5. Ölçümler için Hücrelerin Hazırlanması	24
3.2.2. siRNA Transfeksiyonu.....	25
3.2.2.1. Kültür Hücrelerine siRNA'ların Dağıtılması	25
3.2.3. Total RNA Eldesi	27
3.2.3.1. Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması	29
3.2.4. erk Genindeki Sessizleşmenin qRT-PCR ile Belirlenmesi	30
3.2.5. ERK, P38 ve JNK Aktivasyonlarının ELISA ile Belirlenmesi.....	34
3.2.6. Hücre Çoğalmasının XTT Solüsyonu ile Belirlenmesi	36
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. % Sessizleştirme ile İlgili Bulgular	38
4.2. Protein Aktivite Düzeyi ile İlgili Bulgular	40
4.3. Hücre Çoğalması ile İlgili Bulgular.....	45
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ	52
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	60

TABLO DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. RNA ailesinin en belirgin üyeleri.....	6
Tablo 4.1. MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerine uygulanan siRNA konsantrasyonlarının % sessizleştirme düzeyleri.....	39
Tablo 4.2. MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerine uygulanan 15, 30 ve 100 nM ERK siRNA'nın 48. ve 72. saatlerde fosforlanmış ERK, P38 ve JNK protein aktivite düzeyleri üzerine etkisi.....	42
Tablo 4.3. MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerine uygulanan 15, 30 ve 100 nM ERK siRNA'nın 48. ve 72. saatlerde fosforlanmamış ERK, P38 ve JNK protein aktivite düzeyleri üzerine etkisi.....	44
Tablo 4.4. MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerine uygulanan 15, 30 ve 100 nM ERK siRNA'nın hücre çoğalma düzeyleri üzerine etkisi	46

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. MAP Kinaz Aktivasyon Yolağı ve PTGS	8
Şekil 2.2. MAP Kinaz Uyarı Yolağı ve Biyolojik Cevaplar	13
Şekil 3.1. ERK ve GAPDH gen ekspresyon seviyelerinin QRT-PCR görüntüsü.....	33

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
Ago	Argonaute proteini
BRCA-1	Meme kanseri erken başlangıç-1
BRCA-2	Meme kanseri erken başlangıç-2
DNA	Deoksiribonükleik asit
dsRNA	double strand (çift dallı) RNA
DU145	Prostat kanser hücre dizileri
EF1A	Elongation Factor 1Alpha
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
EGF	Epidermal Growth Faktör (Epidermal Büyüme Faktörü)
Fas	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
G proteini	Guanin proteini
GF	Büyüme faktörü
GRB 2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanozin trifosfat
HeyC2	Ovaryum kanseri hücre dizileri
JNK	c-Jun NH2- Terminal kinase

KGN	Ovaryum granuloza hücre tümörü
LASP1	LIM And SH3 protein
MAP	Mitojen tarafından Aktive Edilmiş Protein
MAPK	MAP Kinaz
MAPKK	MAP Kinaz Kinaz
MAPKKK	MAP kinaz kinaz kinaz
MEK	MAP Kinaz/ERK Kinaz
MCF-7	Meme kanseri hücre dizisi
miRNA	micro RNA
mRNA	mesajcı RNA
NGF	Nerve Growth Factor (Sinir hücresi büyüme faktörü)
NIH 3T3	Normal embriyonik fibroblast hücre dizisi
PAZ	Piwi – Argonaute - Zwillie
pERK	Fosforlanmış ERK proteini
pJNK	Fosforlanmış JNK proteini
pp38	Fosforlanmış P38 proteini
p38	MAP Kinaz proteini
p38 α ve p38 γ	p38 MAPK alt birimleri
PTGS	Post Transcriptional Gene Silencing

RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interference (RNA sessizleştirmesi)
RISC	RNA indüklü sessizleştirme kompleksi
rRNA	ribozomal RNA
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SH2	Src Homoloji Bölgesi
siRNA	Small (short) interfering RNA
STAT	Signal Transduction And Transcription
T-E-Y	Treonin-glutamik asit-tirozin motifi
tRNA	taşıyıcı RNA
UV	Ultraviole

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan 2005 yılı Türkiye kanser istatistiği verilerine dayanılarak hazırlanan raporda, ülkemizde görülen ilk 10 kanser türü arasında meme kanserinin (17,96/100000); akciğer, prostat ve deri kanserinden sonra en yaygın olarak görülen dördüncü kanser türü olduğu belirlenmiştir. Kadınlarda, daha sık görüldüğü (35,47/100.000) belirtilen meme kanseri (15, 22, 24, 61, 70, 73) erkeklerde, kadınlara göre %1 oranında görülür (67). Meme kanserlerinin %10'nunda genetik bozukluk söz konusudur (brca1 ve brca2 genlerindeki mutasyonlar sonucunda). Tedavideki gelişmeler, tarama programları ve toplum bilinçlenmesi sayesinde erken teşhise bağlı olarak ölüm azalmaktadır. Meme kanseri, süt üreten bezlerde ya da süt taşıyan kanallardaki hücrelerden köken alır (1, 67).

Meme kanserinin oluş sıklığı ailesel, endokrin ve çevresel faktörlerce etkilenir. Bu faktörler bilinmelerine rağmen meme kanseri olan hastaların büyük bir kısmında, cinsiyet ve yaş faktörü dışında belirlenen kesin bir risk faktörü yoktur (67).

Meme kanseri tedavisi için en uygun ilaç ve terapi yöntemlerinin belirlenmesi amacıyla çeşitli belirteçler kullanılmıştır. Bu belirteçler arasında; östrojen reseptörleri, epidermal büyüme faktör reseptörleri, laktoferrin ve rezistans proteinler sayılabilir (22). Epidermal Büyüme Faktör Reseptörleri ve etkileştikleri kinaz yolları hücre çoğalması ile meme kanser gelişiminde oldukça önemli yer tutmaktadır (15, 22, 61).

Protein kinazlar ve diğer uyarı sistemleri, bir organizmada, hücrelerin fonksiyonlarını gerçekleştirmesi için etkileşimli bir ağ oluşturur (51). MAP Kinazlar (Mitojen tarafından Aktive edilmiş protein Kinazlar) evrimsel olarak korunmuş, mayalardan insanlara kadar bütün ökaryotik hücrelerde sinyal iletiminde merkezi rol oynayan serin/treonin protein kinazlardır (5, 36, 56).

MAP Kinaz yolu, reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz yolu olarak çalışır. Bu uyarı ise, hem sinyalin çoğalması hem de düzenleyici etkileşimler (sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiği) açısından önemlidir.

Uyarı iletimi G protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve bir protein-serin/treonin kinaz olan MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz=Raf) aktivasyonunu sağlar. Aktifleşen MAPKKK bir protein kinaz olan MEK [MAPKK (MAP Kinaz Kinaz)]'i fosforlar ve aktive eder. MEK, ERK ailesi üyelerini, hem treonin hem de tirozinden fosforlayarak aktive eden iki yönlü özgülüğü olan bir protein kinazdır. MEK'in aktivasyonu ile MAPK (MAP Kinaz) aktive olur. MAPK ise, sitoplazma elemanlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve sonuçta gelen uyarıya karşı hücrenin biyolojik cevabı oluşur (2, 12, 13, 16, 39, 51, 56).

Çok hücreli organizmalarda özellikleri belirlenmiş 3 MAP kinaz ailesi vardır:

- Extracellular signal Regulated Kinase (ERK) ailesi
- p38 MAP Kinaz ailesi
- c-Jun NH2- Terminal kinase (JNK) ailesi (2, 12, 16, 51, 56)

ERK sinyal iletimi, öncelikli olarak hücre çoğalması, sağ kalımı ve farklılaşmasına yol açarken, JNK ve p38 MAP kinaz yolları sıklıkla inflamasyon ve hücre ölümüne neden olur (2, 15, 26).

İnsan tümörlerinin %30'unda Ras/Raf/MEK/ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur. Hepatoselüler karsinoma, akut lösemi, ovaryum kanseri ve meme kanserlerinde ERK aktivasyonunun artmış olduğu ve bu sebeple ERK'in hücre çoğalması ve farklılaşmasını başlatarak kanser gelişiminde önemli role sahip olduğu belirlenmiştir (15, 29, 38, 55, 61, 63, 65).

RNAi evrimsel olarak oldukça korunmuş, biyolojik transkripsiyon sonrası (post-transkripsiyonel) RNA sessizleştirme mekanizmasıdır (6, 23, 57). RNAi mekanizması, hücre gelişimini ve farklılaşmasını kontrol etmek için gen ekspresyonunun düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Bu mekanizma çift iplikli RNA (dsRNA) ile uyarılır. İki farklı mekanizmayla görev yapar (6, 19, 23).

Bunlardan ilki, mikroRNA'lar (miRNA) ile hücrel gen ekspresyonunu düzenlemektir. İkinci RNAi mekanizması ise, küçük sessizleştirici RNA'lar (small interfering RNA= siRNA) üreterek hedef proteinleri sessizleştirmek (virüsler gibi) ve inhibe etmektir (23).

RNAi birçok viral hastalık ve kanser tiplerinde çalışılmıştır. Gerçekten de etkili bir mekanizma olduğu saptanmıştır.

Sars ilişkili Cov virüsünün neden olduğu akciğer patolojisini ve viral RNA oluşumunu azalttığı, West Nile virüsünün öldürücü enfeksiyonundan kısmen koruduğu, Hepatit B virüsünün replikasyonunu ve neden olduğu viral antijen oluşumunu azalttığı, Influenza A virüsünün akciğerlerdeki olumsuz etkisini azaltarak ölümden koruduğu görülmüştür (6).

RNAi anti-kanser tedavisi amacıyla uygulandığında ise;

Hepatoselüler karsinomada hücre çoğalmasını telomeraz aktivitesini azaltarak inhibe ettiği (76), LASP1 geni hedeflenerek siRNA uygulandığında, hücre çoğalması ve göçünü inhibe ettiği (24), Ovaryum kanserinde ERK 1 ve ERK 2 genleri hedefli olarak uygulandığında in vitro apoptoz, nekroz ve hücre büyümesini inhibe ettiği tümör hücrelerinin sayısını azalttığı (63, 74), kolorektal kanser hücrelerinde Fas geni hedefli olarak uygulandığında apoptozu uyardığı (8), kolon kanser hücrelerinde STAT6 geni hedefli uygulandığında hücre çoğalmasını inhibe edip apoptozu uyardığı (77), meme kanserinde c-Myc geni hedefli olarak uygulandığında in vitro apoptoz ve hücre büyümesini inhibe ettiği (70) belirlenmiştir.

Bu örnekler RNAi'nin olumlu olarak etkilediği gen ve kanser tiplerinin sadece birkaçıdır ve gelecekte kanser hastalığında çok etkin bir tedavi yöntemi olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma ile, RNAi yöntemi kullanılarak meme kanseri hücre dizilerinde (MCF-7) erk genini sessizleştirerek, bunların kanser oluşumunda önemli yer tutan ERK, p38 ve JNK proteinlerinin aktivasyonuna ve hücre çoğalmasına olan etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epigenetik

Kalıtım materyali olan DNA molekülü, nükleotid olarak adlandırılan küçük yapı taşlarının birleşmesiyle oluşmaktadır. DNA'nın yapısı ve nükleotidlerin dizilişi bir canlının tüm hücrelerinde aynı olmakla birlikte, hücreler arası farklılıklar gen ifadesindeki değişikliklerden kaynaklanmaktadır (7). DNA dizisinden bağımsız olarak gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikler “epigenetik” olarak adlandırılmaktadır (7, 14, 27).

Çoğu hastalığın temelinde de, genotipe göre daha kararsız olan epigenotipin yattığı düşünülmektedir (7). Epigenetik profilin hatalı olmasına neden olan mutasyonlar (epimutasyon) sonucu ortaya çıkan hastalıklar, epigenetik hastalıklar olarak bilinmekte ve üç ana grup altında incelenmektedir (7):

- İmprinted hastalıklar
- Kromatin yapı değişimi ile ortaya çıkan hastalıklar
- Kanser

Bu epigenetik hastalıkların oluşumuna neden olan mekanizmaları ise, üç ana başlıkta toplayabiliriz (7):

1. DNA metilasyonu,
2. Histon modifikasyonları,
3. RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing).

Bu mekanizmalar kalıtsal değişiklikler sağlar. Bunların herhangi birindeki bozukluk gen ifadesinin artmasına veya baskılanmasına neden olmakta ve epigenetik hastalıklara yol açmaktadır (7, 14, 27).

Son yıllarda, kodlamayan RNA (non-coding RNA) adı verilen bazı küçük RNA moleküllerinin epigenetik süreçte rol aldıkları gösterilmiştir. Buna örnek olarak, RNA interferans olarak bilinen, posttranskripsiyonel sessizleştirmelerde görevli olan

miRNA (micro RNA), siRNA (small-interfering RNA) ve X kromozom inaktivasyonundan sorumlu olan XIST RNA verilebilir (7).

2.2. RNA Tipleri ve RNA Interference (RNAi) Mekanizması

Protein sentezinde görev alan ve amino asitlerin doğru biçimde birleşmelerini sağladığı bilinen klasik RNA'ların [mesajcı RNA (mRNA), taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA)] yanında protein kodlamaya katılmayan fakat hücrede daha farklı görevler üstlenen küçük RNA tipleri de belirlenmiştir (**Tablo 2.1.**).

Son 30 yıldır araştırmacılar, değişik organizmalarda tahminen 300'e kadar farklı sayıda nükleotid içeren, çeşitli boyutlarda pek çok küçük düzenleyici RNA'ların varlığını belirlemişlerdir (21, 23, 45). 20–30 nükleotidlik küçük düzenleyici RNA'lar, küçük boyutlu olmaları, birçok miRNA'nın, birbirinin görevini üstlenmesi, biyokimyasal analizlerde kolayca kayboldukları ve klasik genetik yöntemlerle inaktivasyonda zayıf hedefler oldukları için geç keşfedilebilmişlerdir. Öncelikle, *Caenorhabditis elegans*'da yapılan genetik denemelerle 1990'larda *lin-4* ve *let-7* adlı iki miRNA keşfedilmiştir (21, 23, 37, 52). Daha sonra, hayvanlarda, bitkilerde ve mantarlarda etkili molekül olarak siRNA'lar keşfedilmiştir (23, 25, 37, 50).

RNAi, evrimsel olarak oldukça korunmuş, biyolojik transkripsiyon sonrası (post-transkripsiyonel) RNA sessizleştirme mekanizmasıdır (6, 19, 21, 25, 28, 37, 50, 52, 57). Keşfi ilk olarak 1990'da Petunya'da gen sessizleştirmesini keşfeden iki botanikçi tarafından gerçekleştirilmiştir. 1998 yılında Andrew Fire ve Craig Mello nematod *C.elegans*'da dsRNA molekülleriyle gerçekleştirilen gen sessizleştirme mekanizmasına RNAi adını vererek 2006 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülü almışlardır. Bu arada 2001 yılında Tom Tuschl ve arkadaşları, siRNA moleküllerinin memeli hücrelerinde gene özgü sessizleşmeye sebep olduğunu keşfetmişlerdir (19, 21, 23, 25, 37, 50, 52).

Tablo 2.1. RNA ailesinin en belirgin üyeleri (23, 52)

Protein Sentezine Aracılık Eden Klasik RNA'lar	
mRNA (mesajcı RNA)	Protein sentezinde kalıp olarak rol alan protein kodlayan genleri kopyalar.
rRNA (ribozomal RNA)	Ribozomlar olarak bilinen ribonukleoprotein partiküllerinin RNA bileşenleri, proteinlerin aminoasit dizilimine uygun mRNA'ların kodlanmasını sağlar.
tRNA (transfer RNA)	Protein sentez bölgesine bireysel aminoasitlerin taşınmasını sağlayan adaptör moleküller, mRNA'daki özel kodonları tanır.
Kodlamayan düzenleyici RNA'lar (Non-coding regulatory RNAs)	
siRNA (küçük engelleyici RNA) (small interfering RNAs)	Küçük RNA'lar (21–23 nükleotid uzunluğundaki) uzun çift dallı RNA moleküllerinin ayrılması ile oluşur. siRNA'lar, transpozonların aktivitesini ayarlamak için ve viral enfeksiyonla savaşmak için kısmen önemlidir. Fakat protein kodlayıcı genleri de düzenler. Sentetik siRNA'lar deneysel çalışmalar için yapay olarak eksprese edilebilir.
miRNA (microRNA)	Bu küçük RNA'lar (19-25 nükleotid uzunluğundaki), bitkilerde ve hayvanlardaki özel genler tarafından kodlanır ve mRNA translasyonunun baskılanmasında veya mRNA parçalanmasında görev alırlar. Saç tokası şeklinde katlanabilen uzun, tek dallı RNA dizisinden oluşur.
piRNA (Piwi-associated RNA)	Küçük RNA'lar (25–30 nükleotid uzunluğunda) uzun tek dallı öncülerden oluşur. Bunlar Argonaute proteinlerinin Piwi ailesi ile ilişkisinde görev alırlar ve germ hücrelerinin gelişimi için gereklidir.

RNAi sistemi, iki farklı mekanizma kullanır (6, 19, 23). Bunlardan ilki mikroRNA'lar (miRNA), diğeri ise küçük sessizleştirici RNA (small interfering RNA=siRNA) aracılığı ile gerçekleşir.

2.2.1. Mikro RNA (miRNA)

Nükleusda iken tek iplikli saç tokası şeklinde, 70 nükleotid uzunluğundadır. Sitozole geçerken 19-25 nükleotid uzunluğunda bir yapı kazanır (4).

Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde DNA'dan transkribe edilen genler tarafından kodlanır. Proteine çevrilemez. İlk olarak primer miRNAlar olarak sentezlenir, daha sonra Drosha ve Dicer proteinleri (memelilerde kodlanan RNaz III

enzim ailesi üyeleri) ile yaklaşık 70 nukleotidlik prekürsör RNA'yı sonra 21-25 nukleotidlik olgun miRNA'yı oluştururlar. Olgun miRNA'nın sadece bir ipliği rehber olarak RNA indüklü sessizleştirme kompleksine (RISC) bağlanır. RISC'i mRNA'ya hedefler ve burada kompleks, tamamlayıcı dizilerle birleşerek mRNA parçalanması veya translasyonun engellenmesini sağlar (6, 19, 32, 57).

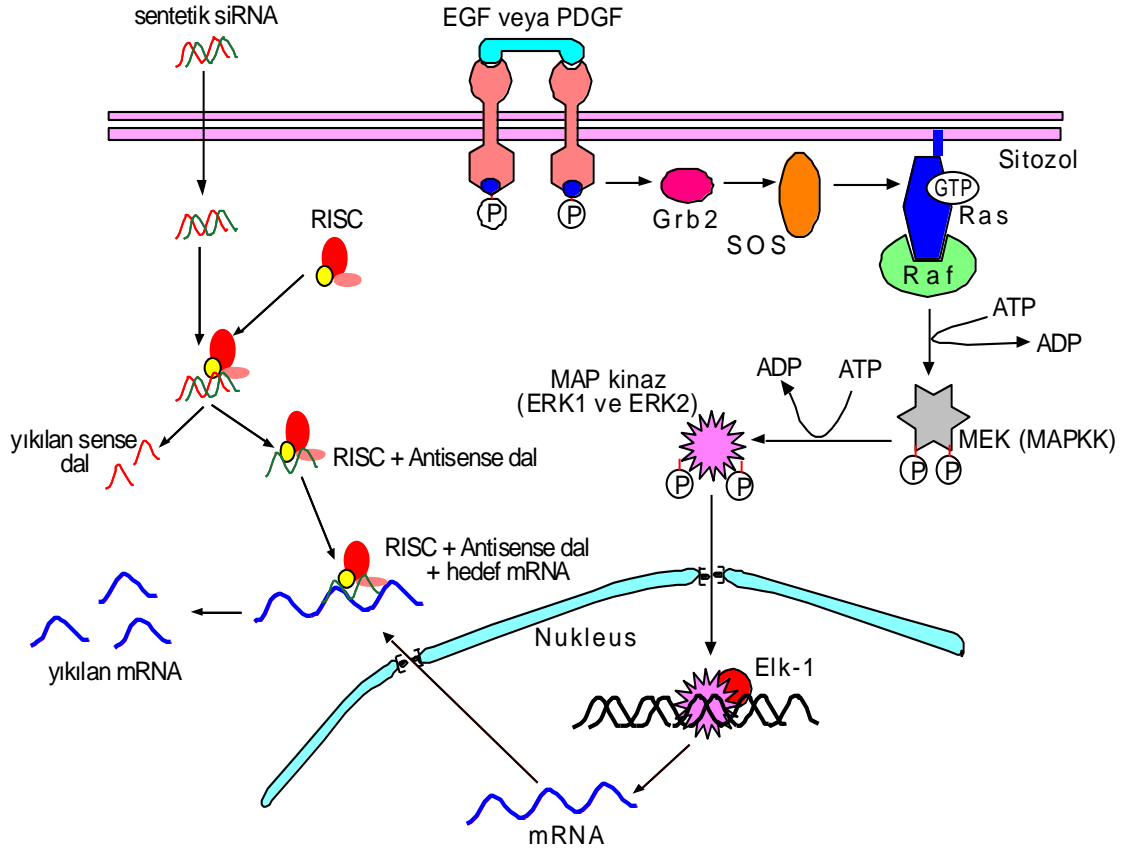
2.2.2. Küçük sessizleştirici RNA (small interfering RNA= siRNA)

Eksojen kaynaklı bir molekül olan siRNA'lar, çift iplikli yapıda olup hedef RNA'nın tamamlayıcısıdır. Endonukleolitik yıkım yapar, 21-23 nukleotid uzunluktadır (4, 21, 25, 37, 52, 62).

Sentetik olarak sentezlenen siRNA'lar, RISC aracılı bir mekanizma kullanarak mRNA'ları yıkar. Bu olayda; 21-23 nukleotid uzunluğunda küçük çift iplikli sessizleştirici RNA olan siRNA'lar hücre içerisine lipid temelli transfeksiyon ajanı ile hücreye verilirler ve bu siRNA'lar, RNA ile uyarılan sessizleştirme kompleksi (RNA-inducing silencing complex=RISC) ile bağlanır. RISC (500 kDa), yapısında endonükleaz, ekzonükleaz ve helikaz enzimlerini içeren, nukleaz aktiviteli RNA-multiprotein kompleksidir (32, 37, 62). RISC'in temel bileşeni Argonaute (Ago) proteini, mRNA kesimi için temel katalitik bölge olup bu protein, antisense dalın 3' ucuna bağlanmada rol alan Piwi – Argonaute - Zwiller (PAZ) bölgesini ve yapısal olarak RNase H'nin aktif bölgesine benzeyen, hedef mRNA'nın kesiminde rolü olduğu tahmin edilen PIWI bölgesini içermektedir (25, 52, 62). Ago, sense siRNA'ya bağlanıp antisense siRNA dalından ayırır ve uzaklaştırır. Geride kalan antisense siRNA ile RISC, hedef mRNA'daki komplementer bölgeye yapışıp endonukleotidik olarak parçalanmasına dolayısıyla protein sentezinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesine neden olur (21, 25, 37, 62). Bu işleme, transkripsiyon sonrası gen sessizleştirilmesi (post-transcriptional gene silencing=PTGS) adı verilir (Şekil 2.1).

RNA interferans canlı organizmada mevcut olan doğal bir işlem olup, in vitro olarak sentezlenen siRNA'lar kullanılarak da endojenik genlerin ekspresyonunu baskılamak mümkündür. RNAi diğer tekniklere göre daha hızlı ve ucuz bir yöntem olması yanında, fonksiyonel genomik araştırmalarında çok ideal bir teknik olarak etkin

bir şekilde kullanılmaktadır. RNAi tekniği kullanılarak, gen ekspresyonunun baskılanması sadece gen fonksiyonunu araştırmada değil aynı zamanda gen terapisinde de önemlidir. Örneğin; bir hastalık normal bir proteinin fazla miktarda ekspresyonundan ya da mutant bir proteinin ekspresyonundan kaynaklanıyorsa RNAi özel proteinin düzeyini azaltmak veya onun zararlı etkilerini düzeltmek için kullanılabilir (25). İlk uygulamalar onkogenler ve viral infeksiyonlarda rol oynayan hedef viral genler üzerinde yapılmıştır. Özellikle RNAi, kanser hücrelerinde hücre döngüsü için önemli olan genlerin ve/veya anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarını baskılayarak kanserin tedavisinde ve tanısında kullanılmaktadır (18, 25, 43, 55, 58).



Şekil 2.1. MAP Kinaz Aktivasyon Yolağı ve Transkripsiyon sonrası gen sessizleştirilmesi (PTGS) (26, 29 ve 31 no'lu kaynaklardan uyarlanmıştır)

2.3. Kanser

Batı toplumlarında her yıl 250-350 kişiden birinin yakalandığı bir hastalıktır (33, 43, 46, 57). Altmış yaşın üzerindeki gruplarda ise kanser sıklığı giderek artmakta olup, 300 kişiden 4-5 kişinin yakalandığı bir seviyeye yükselmektedir (33). Ankara Ticaret Odası'nın, Türk Kanser Araştırma Kurumu ve Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü ile birlikte hazırladığı "kanser yükü 2006" raporuna göre, Türkiye'de 150 bin kişinin kansere yakalandığı, 2020 yılında bu rakamların yüzde 50 oranında artacağını bildirmiştir (30).

Kanser genellikle hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını kısacası normal davranışlarını kontrol eden mekanizmaların bozulmasına bağlı olarak gelişir (43). Hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi temel hücresel süreçleri düzenleyen baskılayıcı genler ve onkogenleri kodlayan bölgelerdeki mutasyonlar kanser gelişiminde kaçınılmazdır (18, 33, 58).

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi için;

- apoptozdan kurtulma,
- büyümeyi inhibe eden sinyallere karşı direnç gösterme,
- sınırsız çoğalma yanında

anjioenez (vücut kanserli hücreleri beslemek, onlara oksijen sağlamak ve atıklarını atmak için kılcal damarlanmayla yeni yollar açar), invazyon (tümörlerin kendini çevreleyen dokulara yayılması) ve metastaz (vücut dolaşım sistemine geçip ikincil alanlarda çoğalması) gibi bir takım değişimlerin meydana gelmesi gerekir (15, 58).

Uyarı iletiminde meydana gelen değişimler, hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylece onkogenik uyarı iletimi, tümör gelişimi ve invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynar (16).

Anormal olarak çoğalan kanser hücrelerine tümör adı verilir. Tümörler, biyolojik davranışlarına göre iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere

ikiye ayrılır. İyi huylu tümörleri oluşturan hücreler, normal hücrelere benzer fonksiyon gösterebilirler, dokuları bir araya getiren hücre yapışma moleküllerince korunurlar ve normal hücreler gibi köken aldıkları dokularda yer alırlar. Kötü huylu tümörler ise, genellikle büyümeye devam eder ve normalden hızlı bölünürler. Bu tümörler oluştuğunda kendini çevreleyen dokulara yayılır (invazyon) ve vücut dolaşım sistemine geçip ikincil alanlarda çoğalırlar (metastaz) (42).

Tümörleri tuedikleri hücreye göre 3 grup altında toplayabiliriz (47):

Karsinomalar: İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluştururlar. Barsak ve meme kanallarında uzanan hücreler gibi epitel hücrelerden gelişirler (47).

Sarkomlar: İnsanda az görülen tümör tipidir. Kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid tümörlerdir (47).

Lösemi ve lenfomalar: İnsan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluştururlar. Kan ya da immun sistem hücrelerinden gelişirler (47).

2.3.1. Meme kanseri

Meme, kadınlarda süt üretimi için düzenlenmiş ve farklılaşmış tubuloalveolar bir ekzokrin bezdir. Süt bezi sistemi ile bunları meme başına aktaran kanal sisteminin birleşiminden oluşur (3, 42). Başlangıçta süt aktaran kanal sistemi içinde sınırlı olan kanser hücreleri sonradan kendi bazal zarlarından ilerleyip bağ dokusu içine geçerler. Bu aşamada, tümör hücreleri kan damarları ve lenfatiklerle karşılaşarak metastaz yapma yeteneğine sahip olurlar. Metastaz oluşumu kemik, karaciğer ve akciğerde görülür (3).

Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan 2005 yılı Türkiye kanser istatistiği verilerine dayanılarak hazırlanan raporda, ülkemizde görülen ilk 10 kanser türü arasında meme kanserinin (17,96/100000); akciğer, prostat ve deri kanserinden sonra en yaygın olarak görülen dördüncü kanser türü olduğu belirlenmiştir (73). 2011 yılında Türkiye İstatistik Kurumu tarafından 2006-2008 yılları verilerine dayanılarak hazırlanan

raporda, kadınlarda daha sık görüldüğü (41,6/100.000) (15, 22, 24, 61, 66, 70, 73) belirtilen meme kanseri, erkeklerde ise kadınlara göre %1 oranında görülür (67)

Meme kanserlerinin %10'unda genetik bozukluk söz konusudur (örneğin brca1 ve brca2 genlerindeki mutasyonlar gibi). Tedavideki gelişmeler, tarama programları ve toplum bilinçlenmesi sayesinde erken teşhise bağlı olarak ölüm azalmaktadır (1, 67).

Yayılıcı (invaziv) meme kanserlerinin %80'i süt kanalı (ductal), %10'u süt bezi (lobular) karsinoma iken, kalan %10 sarkoma ve karsinosarkoma gibi çeşitli tiplerdedir. Meme kanserinin oluş sıklığı ailesel, endokrin, çevresel, cinsiyet ve yaş gibi faktörlerden etkilenmektedir (67).

Meme kanseri gelişiminde en önemli risk faktörü aile hikayesidir. Meme kanserine sahip kadınların tümünün %5-10'unda brca1 ve brca2 genlerinden birinde mutasyon olduğu saptanmıştır. Bu genlerin mutasyonları, meme kanseri gelişimini %40-80 etkilemektedir. Yine p53 tümör baskılayıcı geninde mutasyonu olan kişilerde de meme kanseri riski artmaktadır (67).

Uzun dönem östrojene maruz kalmış, 12 yaş öncesi menstruasyona girmiş, 55 yaş sonrasında menopoza girmiş veya 30 yaş sonrasında ilk kez hamile kalmış kadınlarda da meme kanseri riskinin arttığı bulunmuştur. Ayrıca brca1 veya brca2 mutasyonu taşıyan kadınlarda uzun süreli hormon tedavisi veya yüksek dozda östrojen içeren doğum kontrol haplarının kullanımı da riski artırmaktadır (67). Bunların yanında sigara kullanımı, alkol kullanımı, aşırı kilo, fiziksel aktivite, viral enfeksiyon, radyasyon ve çevre kirliliği gibi etkenler de meme kanseri olma riskini artıran faktörlerdendir (1).

Meme kanseri tedavisi için en uygun ilaç ve terapi yöntemlerinin belirlenmesi amacıyla çeşitli belirteçler kullanılmaktadır. Bu belirteçler arasında; östrojen reseptörleri, epidermal büyüme faktör reseptörleri, laktoferrin ve rezistans proteinler başlıcalarıdır (22). Epidermal büyüme faktör reseptörleri ve etkileştikleri kinaz yolları hücre çoğalması ile meme kanser gelişiminde oldukça önemli yer tutmaktadır (15, 22, 61).

2.4. MAP Kinaz Uyarı Yolağı

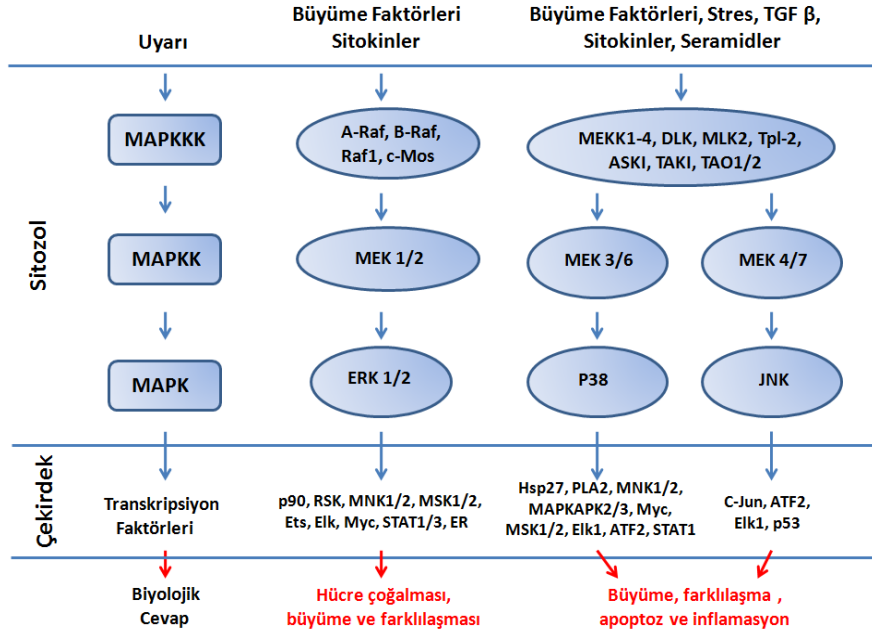
Protein kinazlar ve diğer mesajcı sistemler, bir organizmada hücrelerin fonksiyonlarını gerçekleştirmesi için etkileşimli bir ağ oluşturur (51). MAP Kinazlar (Mitojen tarafından Aktive edilmiş protein Kinazlar) evrimsel olarak korunmuş, mayalardan insanlara kadar bütün ökaryotik hücrelerde uyarı iletiminde merkezi rol oynayan serin/treonin protein kinazlardır (5, 36, 56). Mayalarda, eşleşmeyi, sporlanmayı ve hücre şeklini de içeren, çok sayıda hücre sel yanıtı kontrol ederler (13). Diğer ökaryotik hücrelerde ise, hücre zarından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önemlidirler. Bu uyarı iletim yolu, embriyogenez, yaşama, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi işlevlerin düzenlenmesinde rol oynarlar (16, 36, 56). MAP Kinaz yolu, reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz yolu olarak çalışır.

Bir ligand (örneğin EGF) protein tirozin kinaz reseptörüne bağlanır. İki reseptör proteini yan yana gelerek otofosforilasyonu gerçekleştirir. Aktifleşen reseptör, aracı bir protein olan **GRB 2**, RAS'ı aktiveleştirir. Aktifleşen **RAS**, **RAF** (MAP Kinaz Kinaz=MAPKKK)'ın amino ucunda yer alan düzenleyici bölgesi ile etkileşir. Serin/treonin protein kinaz olan **RAF**'ın aktivasyonu ise, **MEK** (MAP Kinaz Kinaz=MAPKK)'i aktive eder. MEK, iki serin bölgesinden fosforlanır. Aktif MEK de **MAPK**'ı aktive eder. MAPK bir serin /treonin protein kinazdır. Treonin ve tirozin amino asitlerinden fosforlanır. Aktif MAPK nüklear transkripsiyon faktörlerini fosforladığı çekirdeğe girer. Hücre çoğalmasında önemli genlerin transkripsiyonunu sağlar (2, 5, 12, 13, 16, 26, 31, 39, 51, 56) (Bak şekil 2.1).

Çok hücreli organizmalarda özellikleri belirlenmiş 3 MAP kinaz vardır:

- Extracellular signal Regulated Kinase (ERK) ailesi (ERK1/2)
- p38 MAP Kinaz ailesi (p38 α , p38 β , p38 γ ve p38 δ)
- c-Jun NH2- Terminal kinase (JNK) ailesi (JNK1, JNK2 ve JNK3) (2, 12, 16, 51, 56)

Bu MAP Kinazların uyarılmasını sağlayan faktörler ve oluşturdukları biyolojik cevaplar şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. MAP Kinaz yolağı ve bu yolak üzerine etkili bazı faktörler tarafından oluşan cevaplar (2, 16 ve 64 no'lu kaynaklardan uyarlanmıştır)

ERK uyarı iletimi, öncelikli olarak hücre çoğalması, sağ kalımı ve farklılaşmasına yol açarken, JNK ve p38 MAP kinaz yolları sıklıkla inflamasyon (iltihaplanma) ve hücre ölümüne neden olur (2, 15, 26).

2.4.1. ERK ailesi

ERK ailesi üyeleri, genellikle farklılaşmış hücrelerde mayoz, mitoz ve mitoz sonrası görevlerin düzenlenmesinde görev alırlar. İlk belirlenen ve en iyi bilinen MAPK üyelerinden olan ERK ailesinin, 6 izoformu vardır (ERK 1-5 ve ERK 7/8). En çok çalışılan üyelerinden olan ERK 1, ERK 2 ve ERK 5 izoformlarıdır. En iyi bilinen izoform olan ERK1 ve ERK 2'nin aktivasyonundaki sinyal olayları tirozin kinazlar aracılığıyla genellikle hücre zarında başlatılır (71). Büyüme faktörleri, sitokinler, virüs enfeksiyonu, G proteini reseptör ligandları, dönüştürücü ajanlar ve karsinojenler gibi pek çok farklı uyaran ERK1 ve ERK2 yolunu aktive eder (36, 71). İnsan meme kanserinin bazı formlarında ve bazı meme kanseri deney modellerinde ERK 1 ve ERK 2 uyarı yolağının önemli olduğu bildirilmiş olup, insan kanserlerinin yaklaşık %30'unda mutasyonların ERK1 ve ERK 2 yolağında olduğu ileri sürülmüştür. ERK 1 ve ERK 2

uyarısındaki düzensizlik tek başına kanseri oluşturmada başarılı değildir. ErbB2 reseptörü, c-myc ve p53 kodlayan diğer genlerdeki mutasyonlar ve ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler de bu olaya katkıda bulunmaktadır (9).

Ras'ı aktif bir onkogene dönüştüren mutasyonlar, genelde pek çok insan tümörlerinde görülmektedir. Onkogenik Ras, devamlı olarak ERK1 ve ERK2'yi aktive ederek tümör hücrelerinin sayısının artırılmasına katkıda bulunur. Bu nedenle ERK inhibitörleri anti-kanser ajanları olarak klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (36, 71).

ERK ailesinin ERK 3 ve ERK 4 üyeleri aynı alt aileden gelmektedir. İlk olarak 1991'de keşfedilen ERK 3'ün yaklaşık 100 kDa'lık bir protein olduğu belirlenmiştir. Daha sonra 63 kDa'luk bir ERK 3 formunun olduğuna inanılarak buna yeniden ERK 4 adı verilmiştir. ERK 1, ERK 2 ve ERK 5'teki T-E-Y aktivasyon motifi yerine (ERK1 ve ERK 2 aktivasyonu, treonin-glutamik asit-tirozin (T-E-Y) motifindeki treonin ve tirozin iki yönlü fosforilasyonunu gerektirir) ERK 3 ve ERK 4'te S-E-G motifi (serin- glutamik asit-glisin) yer almaktadır ve bu şekilde ikili olarak fosforlandığına inanılmaktadır. ERK 3'ün işlevi tam olarak ortaya konulamamıştır. ERK 4 ise bu motif dışında şu ana kadar tam olarak karakterize edilememiştir (71).

ERK ailesinin üzerinde çalışılan diğer üyesi de ERK 5 olup EGF, NGF, ozmotik stres ve oksidatif stres ile aktive edilmektedir (64). ERK 6 ise, p38 γ olarak bilinmektedir (71).

ERK ailesinin diğer üyeleri de ERK 7 ve ERK 8'dir. ERK 7, ilk olarak 1999 yılında belirlenmiştir. ERK 8, başlangıçta yeni bir MAPK olarak belirlenmiş fakat daha sonra kemirgen ERK 8'in insan ERK 7'si ile homolog olduğu bulunmuştur. Bu yüzden ERK 7 adı, hem ERK7 hem de ERK 8 için kullanılmaktadır (71).

2.4.2. p38 ailesi

p38 MAPK, hücre farklılaşması, büyüme ve apoptozda rol almaktadır (71). p38 MAPK, stres uyaranlarına, büyüme faktörlerine, inflamatuvar sitokinlere, Ultraviyole ışınlarına, ısı ve osmotik şoka karşı cevap oluşturmak için aktive olur. Bunun

aktivasyonu çoğu kez hücre ölümüne yol açmaktadır (9, 71). Buna ilaveten, hücre döngüsü kontrolünde G1 ve G2 kontrol noktalarında p38'in rolü olduğu belirlenmiştir (9, 69). Dört izoforma sahip olan p38 ailesinde (p38 α , β , γ and δ) en çok p38 α eksprese edilmektedir. MKK3/6 (MAPKK) ve SEK (MAPKK), p38'i aktive eder. Ayrıca p38, TAB1 aracılığı ile de aktive edilir. Aktive olan p38 fosforlanır ve aktive edici transkripsiyon faktörü-2, miyosit enhancer faktör-2, Max, Mac, p53 ve Stat1 gibi bazı transkripsiyon faktörlerini aktive eder (71).

2.4.3. JNK ailesi

Bu MAPK ailesinin, sitokinler ve büyüme faktörlerinin yanı sıra hücrel ve çevresel strese maruz kaldıktan sonra hücreyi apoptoza götürdüğü bilinmektedir. Bu şekilde stres ile aktive olduğu için, SAPK (Stress Activated Protein Kinase) olarak da adlandırılır. JNK1, JNK2 ve JNK3 olarak adlandırılan 3 izoformu bulunur (9). JNK1 ve JNK2, hemen hemen her hücrede eksprese edilirken, JNK3 başlıca beyinde bulunmaktadır (9, 69).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre dizileri

Çalışmamızda MCF-7 insan meme kanser hücre dizisi ve NIH 3T3 (Swiss albino mouse) fibroblast hücre dizisi kullanıldı.

3.1.2. Kimyasal maddeler

- Absolü Etanol (Riedel-de Haen)
- Agaroz (peqLab)
- Amfoterisin –B(Biochrom)
- Antibiyotik
- Borik asit (H_3PO_4) (Carlo Erba)
- Bovine İnsülin (Sigma)
- Distile su
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)(Sigma Aldrich)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich)
- Eagle Minimum Essential Medium (EMEM) (Biowest)
- Elisa kiti (RayBio® Cell-Based ERK1/2 (activated) ELISA Sampler Kit)
- Ethidium bromid (Amresco)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Ambresco)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries)
- Glacial Asetik asit ($C_2H_4O_2$) (Riedel-de Haen)
- Hanks' Balanced Salt Solüsyonu (HBSS) (Gibco)
- Loading buffer (Sigma Aldrich)
- Molecular Weight Marker (MBI Fermentas)
- MCF-7 (1 flask) (Şap Enstitüsü)
- NIH 3T3 (1 flask) (Şap Enstitüsü)

- Nukleazsız su (Dr. Zeydanlı)
- Optimem (Gibco)
- PBS (Phosphate buffered solution) (Lonza)
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (Biochrom)
- Primerler (ERK, P38, GAPDH ve 18S (Internal Standart) (Ambion))
- qRT-PCR kiti (Ambion)
- RNA kontaminasyon solusyonu (Appllichem)
- siRNA silencer kiti (Ambion)
- Sodyum bikarbonat (NaHCO₃) (Merck)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Steril distile su (Sigma Aldrich)
- Su banyosu dezenfektanı (Fermaclal D2)
- Super Taq Polimeraz (Ambion)
- Taqman proplar (ERK, P38) (Ambion)
- Total RNA kiti (Ambion)
- Tripin Blue Solüsyonu (Biological Industries)
- Tripsin EDTA 1x (Biological Industries)
- Trizma base toz (Sigma)
- XTT kiti (Biological Industries)

3.1.3. Malzemeler

- Cam kalem
- Cam uzun pastör pipeti (Isolab)
- Cryotüp (2 ml'lik) (TPP)
- Enjektör (1ml, 10 ml, 20 ml) (MedSet)
- Filtre (150x0,22 µm milipor) (Orange Scientific)
- İnkubator dezenfektanı (Biological Industries)
- Kurutma kağıdı
- Kültür plakası (6 kuyucuklu) (Orange Scientific)
- Kültür plakası (96 kuyucuklu) (Orange Scientific)
- Lamel

- Mezür (50 ml'lik, 100ml'lik, 500ml'lik, 1000ml'lik) (Isolab)
- Mikropipet (otomatik) (Eppendorf)
- Mikropipet ucu (10µl- 100 µl) (Corning)
- Mikropipet ucu (silikonlu 1, 200, 1000 µl) (Neptune)
- Neubauer lamı (Marienfeld)
- Opak kapaklı PCR tüpü (Stratogene)
- Parafilm (Pechiney)
- Santrifüj tüpleri (kapaklı) (Orange Scientific) (15ml, 50 ml)
- Steril plastik pipet (5ml-10ml) (Lp Italiana)
- Steril santrifüj tüpü (Corning)
- Şarjlı Pipetör (Isolab)
- Vial (Eppendorf)
- Vidalı Kapaklı Kültür Flaskı (25 cm²'lik ve 50 cm²'lik) (Corning)

3.1.4. Aygıtlar

- Benchtop cooler (Stratogene)
- Binoküler mikroskop (Olympus)
- Buharlı sterilizatör (Nüve)
- Buz makinası (Hoshizaki)
- Buzdolabı (Arçelik)
- CO₂'li inkübatör (Sanyo)
- Derin dondurucu (-20°C) (Arçelik)
- Derin dondurucu (-80°C) (New Brunswick Scientific)
- Elektroforez (Biorad)
- Hassas terazi (Precisa-125A)
- İnkübatör (Ecocell)
- İnverted mikroskop (Euromex)
- Kuru Sterilizatör (Ecocell)
- Laminar kabin (Steril Kabin) (Nuair)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)

- Mikroplate (6 kuyucuklu ve 96 kuyucuklu)
- Mikroplate okuyucu (ELISA) (LabSystems)
- Mikro santrifüj (Sigma Microcentrifuge)
- Mini Santrifüj (Biofuge)
- Nitrojen tankı ve aktarma ünitesi (MVE)
- pH metre (NEL)
- QRT-PCR (Stratagene MX3000P)
- Shaker (Heidolph Polymax 1040, Heidolph Titramax 100)
- Soğutmalı santrifüj (Heraeus Biofuge Stratos)
- Spektrofotometre (Mikro ölçekli) (ASP 3700)
- Su banyosu (Nüve)
- Vorteks (IKA)

3.2.Yöntem

Çalışmamızda MCF-7 meme kanser hücre dizisi ve NIH 3T3 normal fibroblast hücre dizisi kullanıldı. Çalışmaya Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ŞAP Enstitüsünden besiyeri ile birlikte birer flask halinde gelen hücrelerin pasajlanmasıyla başlandı ve ölçümlerde kullanılacak hücre miktarına ulaşabilmek için yeterli sayıda flask elde edilinceye kadar pasajlama işlemine devam edildi. Her bir hücre grubundan yeterli sayıda elde edildikten sonra çalışmaya başlandı. Çalışmamızda % sessizleştirme oranı QRT-PCR yöntemiyle, ERK, P38, JNK protein aktivite düzeyleri ELISA yöntemiyle ve hücre çoğalması XTT yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.2.1. Hücre kültürü

3.2.1.1 Sterilizasyon

Hücre kültüründe kullanılan tüm malzeme ve ajanlar steril edilerek kullanıldı. Radyasyona maruz bırakılan doku kültürü plastikleri (flasklar) ve kullanıma hazır durumdaki steril besiyerleri ticari firmalardan elde edildi. Çok yüksek ısıya dayanıksız materyaller, 8 kg basınç ve 115°C'de 20 dk, cam malzemeler ise 160 °C'de 60-90 dk otoklavlandı. Sıvı ajanlar por büyüklüğü 0.22 µm olan mikrobiyolojik filtreden geçilerek steril edildi. Cam pipetler, kromat çözeltisinde bekletilerek steril edildi. Zefiran, %70 alkol ve özel dezenfektanlarla çalışma ortamı ve steril kabinin temizliği yapıldı. Steril kabine alınacak malzemeler %70 alkolle silindi. Tüm işlemler sırasında steril eldiven kullanıldı.

3.2.1.2. Kullanılan besiyeri ve hazırlanışı

Kültürde kullanılan hücre tipine özel besiyerleri hazırlandı. Besiyeri için kullanılan tüm malzemeler, steril bir şişede ve por büyüklüğü 0.22 µm olan filtreden geçilerek hazırlandı.

3.2.1.2.1. *Meme kanseri hücre dizisi (MCF-7)*

Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ŞAP Enstitüsünden 25 cm² lik flask içinde gelen MCF-7 hücre dizisi için, 100 ml besiyeri içinde, 10 ml Fetal Bovine Serum (FBS), 1 ml Penisilin/Streptomisin, 2.9 ml sodyum bikarbonat çözeltisi (%7.5) ve 86 ml Minimum Essential Medium (MEM) olacak şekilde besiyeri hazırlandı.

%7.5 sodyum bikarbonat (NaHCO₃) çözeltisinin hazırlanışı:

7.5 g NaHCO₃ tartıldı, 100 ml steril distile suda çözüldü, kullanılmıncaya kadar +4°C'de saklandı.

3.2.1.2.2. *Normal fibroblast hücre dizisi (NIH 3T3)*

Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ŞAP Enstitüsünden 25 cm² lik flask içinde gelen NIH 3T3 hücre dizisi için, 100 ml besiyeri içinde, 10 ml Fetal Bovine Serum (FBS), 1 ml Penisilin/Streptomisin, 2.9 ml sodyum bikarbonat çözeltisi (%7.5) ve 86 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) olacak şekilde besiyeri hazırlandı.

3.2.1.3. *Kültür aşaması ve pasajlama*

3.2.1.3.1. *Kültür aşaması*

MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizileri ve besiyeri içeren flasklar laboratuara geldiği gün, %5 CO₂'li etüvde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda hücrelerin kontamine olup olmadığı inverted mikroskopta incelendi. 48 saat sonra da hücre yoğunluğu aynı mikroskopta kontrol edildi.

3.2.1.3.2. *Pasajlama*

Yeterli çoğalma olan flaskdaki besiyeri tek kullanımlık steril pipet yardımıyla çekildi. Besiyeri çekilmiş flaska, por büyüklüğü 0.22 µm olan filtreden geçilerek enjektör yardımıyla önceden 37°C su banyosunda ısıtılan 1X'lik Tripsin-EDTA'dan 1-2

ml (hücre yoğunluğuna göre) eklendi. Bir iki dakika beklenip, steril cam pastör pipet yardımıyla bu sıvı çekildi. Tripsini çekilen flasklara yine aynı miktarda Tripsin-EDTA eklendi. Flasklar %5 CO₂'li etüvde 37°C'de 5-7 dakika bekletilerek flask tabanına tutunmuş hücrelerin ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskopta kontrol edildi. Flask tabanından ayrılan hücreler, her flask için bir tane olmak üzere, içinde 3 ml besiyeri bulunan, önceden hazırlanmış kapaklı santrifüj tüplerine steril cam pastör pipet yardımıyla aktarıldı. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün dibinde kalan hücrelerle birlikte 0.5 ml sıvı da bırakılarak, üstte kalan süpernatant atıldı. Tüpün dibinde kalan hücreler steril cam pastör pipeti yardımıyla alınarak, önceden içlerine 4 ml besiyeri konmuş 2 ayrı kültür flaskına (hücre yoğunluğuna göre, 2-4 flask olabilir) eşit miktarda dağıtıldı. Pasajlanan hücrelerin flask içindeki yoğunlukları her gün inverted mikroskopta gözlemlendi. Tabanı hücre ile tamamen kaplı olan flasklar ölçüme alındı.

3.2.1.4. *Çalışma için uygun miktarda hücrenin sayımı*

3.2.1.4.1. *Ölçüme alınacak hücrelerin eldesi*

Çalışmada yeterli miktarda üreme sağlandıktan sonra hücreleri tripsinlenerek flask tabanından kaldırıldı. Serbestleşen hücreler, önceden hazırlanmış, içinde besiyeri olan santrifüj tüplerine steril cam pastör pipeti ile aktarıldı. Santrifüj tüplerine aktarılan hücrelerin sayısı, Tripian blue boyama yöntemi yardımıyla Neubauer lamında sayılarak belirlendi.

3.2.1.4.2. *Tripian Blue boyama yöntemi*

Tripian Blue boyama yöntemi, hücre sayımı için kullanılan çeşitli yöntemlerden biridir (34). Tripian blue boyası ölü hücreleri veya dokuları boyamada kullanılan canlı (vital) bir boyadır. Hücreler zardan geçen bileşenlere karşı çok seçici olduklarından tripian blue canlı hücreler tarafından absorbe edilemeyip boyanmazken, ölü hücrelerde zar bütünlüğü bozulduğu için ölü hücreler tripian blue boyası ile

boyanırlar. Dolayısıyla ölü hücreler mikroskop altında mavi renkte görülür. Bu yöntemeye göre boyama işlemi aşağıda belirtilen sıra takip edilerek yapıldı:

1. Bir tüpe 0.5 ml % 0.4 Tripan Blue solüsyonu, üzerine 0.3 ml Hank's Balanced Salts (HBSS) (Dilüsyon faktör= 5) ve son olarak da santrifüj tüpüne alınan hücre süspansiyonundan 0.2 ml kondu.
2. Hazırlanan tüp 5-15 dk oda ısında beklemeye bırakıldı.
3. Süre sonunda tüp içeriği pipetlenerek karıştırıldı, bu süspansiyondan pipetle bir damla alınarak Neubauer lamı üzerine kondu.
4. Neubauer lamının ortasındaki 1 mm alandaki karelerde bulunan tüm hücreler sayıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak her hücre için ortalama bir sayı belirlendi.
5. Mavi boyanan cansız hücreler ile boyanmayan canlı hücreler ayrı ayrı sayıldı.

Not: Her bir karenin çevresindeki sol ve en üst tarafına dokunan hücreler ile orta hattında yer alan hücreler sayıldı. Sağ ve alt alanın çevresindeki hücreler sayılmadı.

Not: Eğer hücrelerin kümeler halinde görülmesi %10'dan fazla ise, hücrelerin yayıldığından emin oluncaya kadar tüm yöntem tekrarlandı.

6. Neubauer lamının her bir karesi 0.1mm^3 ya da 10^{-4} cm^3 toplam hacmi gösterir. 1cm^3 , ~1ml'ye eşit olduğu için, her ml'deki hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı: (34)

Hücre Sayısı= Her Karedeki Sayım X Dilüsyon Faktör X 10^4

Örn. Eğer her karede sayılan hücre sayısı (canlı+cansız) ortalama 45 ise,

$$\text{ml'deki hücre sayısı} = 45 \times 5 \times 10^4 = 2.25 \times 10^6 \text{ hücre/ml.}$$

Bu örnekteki sıvı hacmi 10 ml olsun.

Toplam Hücre= ml'deki hücre sayısı X orjinal sıvı hacmi

Toplam Hücre= 2.25×10^6 (hücre/ml) x 10 ml = 2.25×10^7 hücre.

7. Hücre canlılığını hesaplamak için, canlı hücrelerin sayısına da ihtiyaç vardır. Eğer boyanmamış (canlı) hücrelerin her karedeki ortalama sayısı 37.5 ise, **Toplam Canlı Hücre** = $[37.5 \times 5 \times 10^4] \times 10 \text{ ml} = 1.875 \times 10^7$ 'dür.

8. Hücre canlılığı ise şu formülle bulunur.

Hücre canlılığı (%)=Toplam canlı hücreler/Toplam hücreler (canlı ve cansız) x 100

Hücre canlılığı (%) = $1.875 \times 10^7 / 2.25 \times 10^7 \times 100 = \%83$ oranında canlı hücre var demektir.

Buna göre canlı hücrelerin sayısı belirlenip hücre süspansiyonundan istenen miktar kadar alındı.

3.2.1.5. Ölçümler için hücrelerin hazırlanması

Hücreler ölçümler için flask içinde yeterli sayıya ulaştıklarında tripsinlenerek toplandı. Tripin Blue boyama yöntemi yardımıyla Neubauer lamında sayılarak, her bir ölçüm için gerekli sayıda hücre hazırlandı. MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizisinde, yapılan ön çalışmalarla kullanılacak siRNA dozları ve etkili zaman dilimleri belirlendi. Sonuçta siRNA verilmeyen (kontrol grubu) ile 15, 30, 100 nM'lık erk siRNA dozları ve dozlar için 48 ve 72. saatlerdeki etkilerini araştırmayı planladık.

Bu ön çalışmadan sonra gen düzeyinde siRNA aktivitesini belirlemek için 6 kuyucuklu kültür flasklarında 3 tekrarlı olarak ve protein düzeyinde siRNA aktivitesini, hücre canlılığı ve protein miktarını belirlemek için de 96 kuyucuklu kültür flasklarında 6 tekrarlı olarak uygulama yapıldı.

3.2.2. siRNA Transfeksiyonu

RNAi yöntemi ile gen sessizleştirmeyi kanıtlamak ve siRNA dağılımının optimize edilmesi için sentetik siRNA molekülleri kültür hücrelerine verilirken, kimyasal transfeksiyon ajanı olarak siPORT *NeoFX* kullanıldı.

3.2.2.1. Kültür hücrelerine siRNA'ların dağıtılması

MCF-7 hücre dizisi için ERK siRNA ID: s11137 ve NIH 3T3 hücre dizisi için ERK siRNA ID: s77105 siRNA'lar kullanıldı. Bunlara ilaveten housekeeping gen olan GAPDH'ı (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) hedefleyen GAPDH siRNA (Ambion, AM 1640) ve Negatif Kontrol #1 siRNA (nonsequence-specific siRNA) (Ambion, AM 1640) kullanıldı. (Negatif kontrol #1 siRNA, anlamlı homolojisi olmayan hedeflenmemiş diziler olup, GAPDH'ın mRNA ve protein seviyeleri üzerine etkili değildir; böylece, GAPDH siRNA'nın etkilerini ölçmek için bir temel oluşturulmasını sağlar.)

siRNA'ların kültür hücrelerine dağıtılması işlemi, kit yöntemine göre sırasıyla aşağıdaki gibi yapıldı:

1. Elimizde mevcut ERK siRNA, GAPDH siRNA ve Negatif Kontrol #1 siRNA için deney gruplarını oluşturan 15 nM, 30 nM, 100 nM'lık konsantrasyonlar hazırlandı.
2. (+4°C'deki) İn vitro memeli kültür hücreleri için gerekli serum ihtiyaçlarını azaltmada kullanılan bir medium olan Opti-MEM I ve bir transfeksiyon ajanı olan siPORT NeoFix oda ısısına getirildi.
3. Sağlıklı, büyüyen hücreler, “Çalışma için Uygun Miktar da Hücrenin Sayımı” bölümünde anlatıldığı şekilde tripsinize edilip, sayıldı. 6 kuyucuklu plate için her kuyucukta 2,4 ml besiyeri içinde $2,4 \times 10^5$ adet hücre ve 96 kuyucuklu plateler için her kuyucukta 80 µl besiyeri içinde 8×10^3 adet hücre olacak şekilde hesaplandı. Pipetleme hatası için ortalama yaklaşık %10 hata payı da hesaba katıldı. Bu karışım,

ihtiyaç duyulana kadar 37°C’de tutuldu. (Hücrelerin tekrar yapışmamları için sonraki basamakların hızlı ilerlemesi sağlandı).

4. Steril konik bir tüpte Opti-MEM I ortamında siPORT NeoFix dilüe edildi. Bunun için aşağıda belirtilen miktarlarda karışım hazırlanıp 10 dakika oda ısısında bekletildi.

	96 kuyucuklu	6 kuyucuklu
siPORT NeoFix	0,5 µl	5 µl
Opti-MEM I	9,5 µl	295 µl

5. Diğer steril konik tüplerde, 1. basamakta bahsedilen siRNA konsantrasyonları Opti-MEM I ortamında dilüe edildi (siRNA/ Opti-MEM I karışımı). Bunun için tablodaki miktarlarda karışım hazırlandı.

	96 kuyucuklu	6 kuyucuklu
siRNA konsantrasyonları	1,5 µl	45 µl
Opti-MEM I	8,5 µl	255 µl

6. Basamak 4’teki süre bitiminde hazırlanan bu karışım, basamak 5’deki hazırlanan siRNA/Opti-MEM I karışımı ile karıştırılıp nazikçe pipetlenerek 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonunda oluşan siRNA/ siPORT NeoFix karışımı, belirtilen tekraralarda tasarlanan platelere tablodaki miktarlarda aktarıldı. Transfekte olmamış kontrol olarak etiketlenen kuyucuklarda ise, bu karışım yerine belirtilen hacimde sadece Opti-MEM I kullanıldı ve herhangi bir siRNA muamelesi yapılmadı.

	96 kuyucuklu	6 kuyucuklu
siRNA/ siPORT NeoFix karışımı	20 µl	600 µl
Sadece kontroller için; Opti-MEM I	20 µl	600 µl

8. Basamak 3’de hazırlanan hücrelerin resüspanse edilmesi için nazikçe karıştırıldı ve siRNA/siPORT NeoFX karışımı içeren kuyucuklara ve

transfekte olmamış kontroller olarak ayarlanan kuyucuklara basamak 3'te belirtilen hacimlerde aktarıldı.

9. Karışımların tam olarak dağılması için plateler nazikçe ileri geri sarsıldı. %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de 24 saat inkübe edilerek hücrelerin flask tabanlarına tutunmaları sağlandı.
10. Süre sonunda tüm grupların (siRNA uygulanan ve uygulanmayan grupların) besiyerleri, kültür platelerinden steril cam pastör pipetleriyle uzaklaştırılıp taze besiyeri eklendi.

	96 kuyucuklu	6 kuyucuklu
Eklenecek besiyeri hacmi	100 µl	3 ml

11. Bu işlemden 48 ve 72 saat sonra ERK ve GAPDH sessizleştirmesinin belirlenmesi için 6 kuyucuklu platelerden total RNA eldesi, 96 kuyucuklu platelerden protein düzeyinde sessizleştirme ve hücre çoğalma testinin gerçekleştirilmesi için aşağıda belirtilen diğer uygulamalar her bir test için ayrı platelerde gerçekleştirildi.

3.2.3. Total RNA eldesi

siRNA uygulanan kültür hücrelerinden ($\leq 500,000$ hücre), Ambion total RNA kiti kullanılarak total RNA elde edildi. Bu kitin yöntemine göre işlemler sırasıyla aşağıdaki gibi yapıldı:

1. İzolasyon materyalleri tablodaki gibi hazırlandı:

Yıkama solusyonu 1	Konsantre haldeki solusyona 10.5 ml ACS grade %100 etanol eklenip iyice karıştırılır
Yıkama solusyonu 2/3	Konsantre haldeki solusyona 22.4 ml ACS grade %100 etanol eklenip iyice karıştırılır

2. Her örnek için kitten çıkan filtre vialler ve RNA ayırma vialleri etiketlendi.

3. İhtiyaç duyulan hacimde (her örnek için yaklaşık 2 x 10 µl) Ayırma solüsyonu ortalama %~10 Pipetleme hata payı da hesaplanarak RNase içermeyen bir vialde ayrıldı. 75°C'lik su banyosunda ısıtıldı.
4. Yıkama Solüsyonu 2/3, oda ısısında ılıtıldı.
5. 6 kuyucuklu kültür platelerinden besiyerleri steril cam pastör pipetleri yardımı ile alındı. Hücreler 0,5 ml tripsin yardımı ile kaldırıldı ve içinde 2 ml taze besiyeri bulunan kapaklı santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler parafilm ile kapatılıp, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası kapaklar açılıp süpernatant uzaklaştırıldı. Tüplere 1 ml PBS (1X) (phosphate buffered saline) ilave edilip nazikçe pipetlendi ve kapakları kapatıldı. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı.
7. Santrifüj tüplerine hücre zarlarını parçalayan ve ribonükleazları hızlıca inaktive eden güçlü bir katotrofik ajan olan guanidinium thiocyanate içeren lizis solüsyonundan 100 µl ilave edilip, kuvvetlice vortekslendi.
8. Bu tüplere 50 µl absolü alkol (ACS Grade) ilave edildi ve kısa kısa vortekslendi. Lizat/alkol/hücre karışımı (150 µl) filtrelili tüplere aktarıldı. Kapakları kapatılıp 16500 g'de ~10 saniye mikrosantrifüjde karışımın hepsi filtreden geçinceye kadar santrifüj edildi. RNA'nın bu şekilde filtreye bağlanması sağlandı.
9. Filtrelili tüpler açılıp filtrasyonu kolaylaştırmak için 180 µl Yıkama Solüsyonu 1 eklendi ve kapak kapatılıp 16500 g'de ~10 saniye santrifüj edildi.
10. Filtrelili tüpler açılıp 180 µl Yıkama Solüsyonu 2/3 eklendi ve kapak kapatılıp 16500 g'de ~10 saniye santrifüj edildi.
11. Basamak 10 tekrar edildi.
12. Tüplerin dibindeki toplanan sıvılar, filtreler kaldırılarak boşaltıldı. Aynı viallere filtreler tekrar yerleştirilerek 16500 g'de ~1 dakika santrifüj edildi.
13. Santrifüj sonrası filtreler alınıp daha önceden etiketlenen RNA ayırma viallerine yerleştirildi.

14. Basamak 3'te ısıtılan Ayırma solüsyonundan 10 µl alınıp, her filtrenin merkezine gelecek şekilde pipetlendi. Kapakları kapatılıp, oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi. Filtreden RNA'nın ayrılması için 16500 g'de ~30 saniye santrifüj edildi.
15. Basamak 14 tekrarlanarak çok küçük hacimde RNA'nın tamamen ayrılması sağlandı.
16. Filtreler atılarak ayırma vialine toplanan RNA'ların ng cinsinden miktarı mikro ölçekli spektrofotometrede (ASP 3700) Ayırma solusyonuna karşı okutularak belirlendi.
17. Örnekler kullanılana kadar -80°C'de bekletildi.

3.2.3.1. *Genomik DNA'nın uzaklaştırılması*

qRT-PCR gibi büyük hassaslık gösterilmesi gereken analizler için daha konsantre RNA elde edilmesini sağlamak amacıyla genomik DNA'yı yok etmek gerekir. Bu işlem için kit yöntemine göre sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı:

1. "Total RNA Eldesi" bölümünde elde edilen 20 µl'lik RNA'ya karşılık 2 µl 10X DNase I Buffer ve 1 µl DNase eklendi ve nazikçe karıştırıldı.
2. Bu karışım, 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
3. DNase İnaktivasyon Reaktifi -20°C'den alınıp, inkübasyon boyunca oda ısısında bekletildi. Bu reaktifi kullanılacağı zaman kuvvetlice vortekslendi.
4. İnkübasyon sonunda basamak 3'te hazırlanan viallere 2,3 µl DNase İnaktivasyon Reaktifi eklendi ve kuvvetlice vortekslendi. Bu şekilde vialler oda ısısında 2 dakika bekletildi.
5. Bu sürede vialler bir kez daha kuvvetlice vortekslendi.
6. DNase İnaktivasyon Reaktifinin pellet oluşturması için 18000 g'de 1.5 dakika karışım santrifüj edildi.
7. RNA, RNase içermeyen temiz bir tüpe aktarıldı ve bu şekilde -20°C'de saklandı.

3.2.4. erk genindeki sessizleşmenin qRT-PCR ile belirlenmesi

siRNA uygulanmış iki hücre dizisindeki erk geninin gen düzeyinde bu sessizleştirmeden nasıl etkilendiği aşağıda verildiği şekilde belirlendi:

Quantitative RT-PCR Analizi için örneklerin hazırlanması

“Total RNA eldesi” ve “DNase İnaktivasyonu” bölümlerinde anlatıldığı şekilde elde edilen RNA’ların mikro ölçekli spektrofotometre ile toplam RNA miktarı ng cinsinden belirlenip, her çalışmada 200 ng kullanılacak şekilde hesabı yapıldı.

1. -20°C’de bekletilmekte olan tüm solusyonlar (revers-transkriptaz enzimi olan M-MLV RT ve DNA polimeraz hariç) eritilip buzda bekletildi ve tüm karışımlar kullanılmadan önce hafifçe karıştırıldı.
2. Nukleaz içermeyen viallere, % 10 pipetleme hata payı hesaplanarak tüm reaktifler (M-MLV RT ve RNA template hariç) aşağıda verilen oranlarda karıştırıldı ve bu karışım “master miks” olarak adlandırıldı.

Miktar	Reaktif
8,8 µl	Nukleaz içermeyen su
2,5 µl	10 X RT-PCR Buffer
4 µl	dNTP karışımı (her biri 2,5 mM)
2 µl	Gene özgü primer ve TaqMan Probe (herbiri 10 µM) (ERK/GAPDH/18S)
1 µl	RNase İnhibitör (10 U/µl)
0,5 µl	50X ROX internal referans
0,2 µl	SuperTaq polimeraz (5 U/µl)

3. Çalışılacak örnekler haricinde, deneyin kontrollü devam edebilmesi için M-MLV RT yerine nukleaz içermeyen su kullanılarak hazırlanan “NAC (No Amplicon Control)” ve RNA yerine nukleaz içermeyen su kullanılarak hazırlanan “NTC (No Template Control)” adı verilen iki negatif kontrol vialleri de hazırlandı. Tüm örnekler 3

tekrarlı olarak çalışılırken, negatif kontroller için tek tekrarlı çalışıldı.

4. Deneyin bir diğer kontrol çalışması, “pozitif kontrol” olarak adlandırılan aşamadır. Pozitif kontrol reaksiyonunun amacı, uygun şekilde işleyen MessageSensor RT Kitini doğrulamaktır. Bunun için aşağıda verilen tablodaki karışım hazırlanır.

Miktar	Reaktif
21,6 µl	Nukleaz içermeyen su
5,3 µl	10 X RT-PCR Buffer
8,4 µl	dNTP karışımı (her biri 2,5 mM)
2,1 µl	GAPDH Kontrol primeri (10 µM)
2,1 µl	RNase İnhibitör (10 U/µl)
0,4 µl	SuperTaq polimeraz (5 U/µl)
2,1 µl	M-MLV RT

Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	
20 µl	20 µl	Yukarıdaki tabloda hazırlanan master mix
--	5 µl	HeLaS3 Kontrol RNA(10 ng/µl)
5 µl	--	Nukleaz içermeyen su

5. Her bir siRNA uygulaması için 3 farklı primer uygulaması yapıldı.
- ERK siRNA uygulanan hücrelerin RNA’ları 9 ayrı vialde; üçüne TaqMan problu ERK primeri (2 µl), diğer üçüne GAPDH primeri (2 µl) ve diğer üçüne 18S internal standart (2 µl) gelecek şekilde
 - GAPDH siRNA uygulanan hücrelerin RNA’ları 9 ayrı vialde; üçüne TaqMan problu ERK primeri (2 µl), üçüne GAPDH

primeri (2 µl) ve diğer üçüne bir endojen kontrol olan 18S internal standart (2 µl) gelecek şekilde

c. Negatif kontrol #1 siRNA uygulanan hücrelerin RNA'ları 9 ayrı vialde; üçüne TaqMan problu ERK primeri (2 µl), üçüne GAPDH primeri (2 µl) ve diğer üçüne bir endojen kontrol olan 18S internal standart (2 µl) gelecek şekilde

d. Herhangi bir uygulama yapılmayan "Transfekte olmamış kontrol" olarak belirlenen hücreler 9 ayrı vialde; üçüne ERK primeri (2 µl), üçüne GAPDH primeri (2 µl) ve diğer üçüne de 18S internal standart (2 µl) gelecek şekilde konuldu.

6. Basamak 2'de hazırlanan Master miks karışımına her örnek için 1 µl olacak şekilde M-MLV RT ilave edildi.

7. Çalışılacak tüm örnekler ve kontroller için basamak 5'de hazırlanan primerlerle ve basamak 6'da hazırlanan karışım (master miks ve M-MLV RT karışımı), tek vialde toplandı. Bu karışım, örnek ve kontrol için etiketlenen opak kapaklı viallere 20 µl olarak aktarıldı.

8. Basamak 7'de hazırlanan karışımlara basamak 1'de hazırlanan RNA'lar ve negatif kontroller için Nukleaz içermeyen su ilave edildi.

Quantitative RT-PCR Analizi

9. RNA'lar ilave edildikten sonra opak kapaklı vialler QRT-PCR cihazına yerleştirilip, revers transkripsiyon, RT inaktivasyon/Taq aktivasyon ve Amplifikasyon aşamaları için cihaz ayarlandı.

	Tekrar sayısı	Sıcaklık	Süre
Revers transkripsiyon	1	45°C	15 dk
RT inaktivasyon/Taq aktivasyon	1	95°C	5 dk
Amplifikasyon	40	95°C	15 sn
		60°C	1 dk

10. Süre sonunda örneklerin, ekspresyon miktarının belirlenmesinde önemli olan C_T değerleri elde edilmiştir. C_T değeri eşik-değer döngüsü (treshhold cycle) ya da ilk anlamlı ekspresyonun gerçekleştiği döngü değeridir. Bu değer, sistem başladığından itibaren, üstel oranda ürün oluşması ve logaritmik lineer faza geçiş noktasıdır. Bir C_T değeri 40 veya daha yüksekse bunun anlamı amplifikasyonun olmadığı ve bu değerın hesaplanamayacağıdır (Şekil 3.1).

11. Oluşan gen ekspresyon seviyeleri C_t değeri üzerinden aşağıdaki formüllerle hesaplandı:

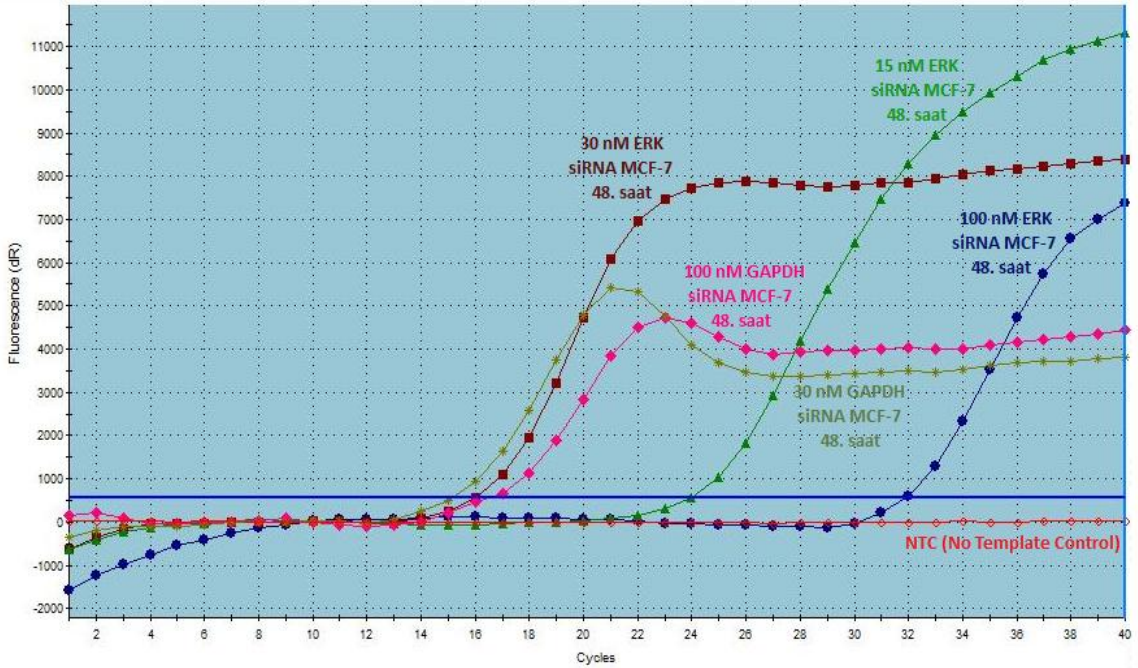
$$\Delta CT_{(ERK\ siRNA)} = CT_{(Hedef\ gen)} - CT_{(GAPDH)}$$

$$\Delta CT_{(siRNA\ uygulanmayan\ kontrol)} = CT_{(Hedef\ gen)} - CT_{(GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{(ERK\ siRNA)} - \Delta CT_{(siRNA\ uygulanmayan\ kontrol)}$$

12. Tüm bu uygulamaların kalan ekspresyonun yüzdesi şöyle belirlenir:

$$\% \text{ azalma} = 100 - 100 \times 2^{-\Delta\Delta CT}$$



Şekil 3.1. siRNA uygulandıktan 48 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen ERK ve GAPDH gen ekspresyon seviyelerinin QRT-PCR örnek görüntüsü.

3.2.5. ERK, P38 ve JNK aktivasyonlarının ELISA ile belirlenmesi

Protein fosforilasyonu, bir hücredeki protein aktivitesinin düzenlenleyicisidir. Yaşayan hücrelerde çoğalma, farklılaşma ve metabolizma gibi olaylarda önemli rol oynamaktadır. siRNA ile muamele edilen ve edilmeyen örneklerdeki ERK, P38 ve JNK fosforilasyonu ELISA ile belirlenerek siRNA'ların bu proteinlerin aktiviteleri üzerine olan etkisi belirlendi. Kit yöntemi (RayBio® Cell-Based ERK1/2 (activated) ELISA Sampler Kit) uygulanırken kullanılacak reaktifler aşağıda verildiği şekilde hazırlandı:

Yıkama Solüsyonu A (20x)	Distile suyla 20 kez sulandırıldı.
Yıkama Solüsyonu B (20x)	Distile suyla 20 kez sulandırıldı.
Quenching Buffer Concentrate (30x)	1x Yıkama Solüsyonu A ile 30 kez sulandırıldı.
Engelleme Solüsyonu (5x)	Distile suyla 5 kez sulandırıldı.
Primer antikorlar	Herbir tüpe 1x'lik Engelleme Solüsyonun'dan 100 µl eklendi. Her bir antikor konsantrasyonu, kullanmadan önce 1x Engelleme Solüsyonu ile 15 kez sulandırılarak çalışıldı.
Anti-Mouse IgG Concentrate	1x Engelleme Solüsyonu ile 1000 kez sulandırıldı ve kullanmadan önce nazikçe karıştırıldı.

Reaktifler hazırlandıktan sonra bu proteinlerin aktivite ölçümleri için aşağıdaki sıra takip edildi:

1. Hücrelerin ekleneceği plate düzeni tasarlanıp "Kültür hücrelerine siRNA'ların dağıtılması" bölümünde anlatılan şekilde 96 kuyucuklu plate yöntemi aynen gerçekleştirildi.
2. 48 saat olarak tasarlanan plâtelardaki besiyeri, transfeksiyondan 48 saat sonra uzaklaştırılıp, her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde 1x Yıkama Solüsyonu

A eklenip plate altüst edildi ve Yıkama Solüsyonu dökülerek uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

3. Her bir kuyucuğa 100 µl Sabitleme Solüsyonu ilave edilip oda ısısında 20 dakika karıştırarak inkübe edildi.
4. Süre sonunda Sabitleme Solüsyonu dökülüp, plate basamak 2'deki gibi 3 kez 1x Yıkama Solüsyonu A ile yıkandı.
5. Her bir kuyucuğa 200 µl 1x Quenching Buffer eklenip oda ısısında 20 dakika inkübe edildi.
6. Süre sonunda Quenching Buffer dökülüp plate basamak 2'deki gibi 4 kez 1x Yıkama Solüsyonu A ile yıkandı.
7. Her bir kuyucuğa 200 µl 1x Engelleme Solüsyonu eklenip 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
8. Süre sonunda Engelleme Solüsyonu dökülüp her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde 1x Yıkama Solüsyonu B eklenip altüst edilerek 3 kez yıkandı.
9. Tasarlanan ilgili kuyucuklara 50 µl uygun 1x anti-phospho-protein antikorlar ve anti-pan-protein antikorlar eklenip oda ısısında 2 saat inkübe edildi.
10. Süre sonunda basamak 9'da eklenen antikorlar dökülerek her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde 1x Yıkama Solüsyonu B ilave edilip plate altüst edilerek 4 kez yıkama yapıldı.
11. Her bir kuyucuğa 50 µl 1x Anti-Mouse IgG ilave edilip 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
12. Süre sonunda basamak 9'da eklenen antikorlar dökülerek her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde 1x Yıkama Solüsyonu B ilave edilip 4 kez yıkama yapıldı.
13. Her bir kuyucuğa 100 µl TMB ekleyip, karanlıkta oda ısısında karıştırarak 30 dakika inkübe edildi.
14. Basamak 13'teki solüsyonun üzerine her bir kuyucuğa 50 µl Durdurma Solüsyonu eklendi.
15. Hemen 450 nm'de ELISA cihazında OD değeri ölçüldü.
16. 72. saat olarak tasarlanan plate'lere de transfeksiyondan 72 saat sonra yukarıdaki yöntem aynen uygulandı.

3.2.6. Hücre çoğalmasının XTT solüsyonu ile belirlenmesi

Hücre çoğalma yöntemleri, büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve besiyeri bileşenlerinin çalışılmasında, sitotoksik ajanların ve lenfosit aktivasyonunun görüntülenmesinde ve hücre biyolojisinde oldukça çok kullanılır. Buradaki biyokimyasal işlem, mitokondri enzimlerinin hücre ölümünden kısa bir süre sonra inaktive olma etkinliği üzerine kuruludur. Bu yöntemin hücrelerin yaşayabilirliğini değerlendirmede çok etkili olduğu bilinmektedir. Tetrazolium tuzuna dayalı bir kolorimetrik yöntem olan XTT, radyoaktif izotopları kullanmadan hücrelerin yaşayabilirliklerinin ve çoğalma miktarlarının belirlenmesinde kullanılan bir solüsyondur. Metabolik aktif hücrelerin turuncu renkli formazan bileşenlerine karşı tetrazolium tuzunun XTT'yi azaltma yeteneğine dayalıdır. Boya formu suda çözülebilir niteliktedir ve boya yoğunluğu bir spektrofotometrede okunabilir. Boyanın yoğunluğu, metabolik aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır (59).

Kit iki reaktiften oluşmaktadır:

XTT Reaktifi : XTT Reaktifi içeren steril bir solüsyondur. Solüsyon 37°C'de ısıtılıp berrak bir solüsyon elde edene kadar nazikçe karıştırıldı.

Aktivasyon Reaktifi : PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) içeren steril bir solüsyondur. Solüsyon 37°C'de ısıtılıp berrak bir solüsyon elde edene kadar nazikçe karıştırıldı.

Bu iki solüsyon kullanılarak sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı:

1. Hücrelerin ekleneceği kuyucuk düzeni tasarlanıp "Kültür hücrelerine siRNA'ların dağıtılması" bölümünde anlatılan şekilde uygulama bu ölçüm için de tekrar yapıldı.
2. Reaktifler 37°C'de ısıtılıp karıştırılarak, berrak bir solüsyon haline getirildi.
3. Transfeksiyondan 48 saat sonra, 5 ml XTT solüsyonu+0,1 ml aktivasyon solüsyonu ile bir karışım (sarı renkte) elde edilip her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde dağıtıldı. Karışımın sağlanması için plate ileri geri sallanıp %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de 2 saat inkübe edildi.

4. Süre sonunda plate 450 nanometre dalgaboyunda bir ELISA cihazında ölçüldü.
5. Transfeksiyondan 72 saat sonra olarak tasarlanan platelere de aynı işlemler uygulandı.

3.2.2.6. İstatistiksel değerlendirme

Sonuçlar, ikili karşılaştırmalar için student-t testi, ikiden fazla karşılaştırmalar için tek yönlü varyans (Oneway ANOVA) analizi uygulanarak SPSS 13.0 programı ile karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, meme kanseri (MCF-7) ve normal fibroblast (NIH 3T3) hücre dizilerinde ERK siRNA kullanarak gerçekleştirdiğimiz sessizleştirme sonucunda, uygulanan üç ayrı konsantrasyonunun, belirlenen her iki zaman için, gen ekspresyon seviyesine, ERK, P38 ile JNK enzim aktivitesi ve hücre çoğalma aktivitesi üzerine olan etkileri ile ilgili bulgular belirlenmiş olup, elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1. % Sessizleştirme ile İlgili Bulgular

Çalışmamızda, MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerine 0 nM (kontrol=siRNA uygulanmamış), 15 nM, 30 nM ve 100 nM'lık konsantrasyonlarda ERK siRNA uygulanarak gerçekleştirdiğimiz sessizleştirme oranları **Tablo 4.1**'de gösterilmiştir.

Bu sessizleştirme sonucunda; erk geninin % sessizleştirme oranının MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerinin her ikisinde de en etkili olarak 48. saatte 100 nM konsantrasyonda olduğu gözlemlendi. Bu sessizleştirme oranlarının 72. saatte giderek azaldığı belirlendi.

Tablo 4. 1. MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerine uygulanan siRNA konsantrasyonlarının % sessizleştirme düzeyleri üzerine etkisi

SAAT	Konsantrasyon (nM)	ERK siRNA % Sessizleştirme Düzeyleri		GAPDH siRNA % Sessizleştirme Düzeyleri	
		MCF-7	NIH 3T3	MCF-7	NIH 3T3
48. SAAT	15	86,72	29,30	96,51	71,28
	30	73,97	90,43	96,51	98,11
	100	99,85	93,72	98,35	97,57
72. SAAT	15	71,49	31,66	99,92	98,62
	30	64,60	31,96	99,71	99,32
	100	39,96	22,98	97,58	99,68

(Ort.± sd.: Ortalamalar n=3 olarak hesaplanmıştır.)

4.2. Protein Aktivite Düzeyi ile İlgili Bulgular

MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerinde gerçekleştirilen sessizleştirmenin MAPK yolağında görev alan fosforlanmış ERK, P38 ve JNK protein aktivite düzeyleri **Tablo 4.2.**'de, aynı hücrelerdeki fosforlanmamış ERK, P38 ve JNK protein aktivite düzeylerine ait bulgular ise, **Tablo 4.3**'de görüldüğü gibidir.

Buna göre;

ERK siRNA uygulamasından 48 saat sonra **MCF-7 hücre dizisinde** kontrole göre, **fosforlanmış ERK düzeyleri** her konsantrasyonda azalma göstermesine rağmen, bu azalma 30 nM'lık ERK siRNA uygulanmış hücreler ($P<0.05$) hariç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). **Fosforlanmış P38 düzeylerinde** yine herhangi bir istatistiksel anlam gözlenmemekle birlikte ($P>0.05$), 15 nM'lık konsantrasyonda az da olsa bir artış belirlenmiştir.

Fosforlanmış JNK düzeylerinde ise, her konsantrasyonda azalma gözlenmiş olup, 100 nM'lık konsantrasyon uygulananlarda çok önemli düzeyde anlamlı azalma ($P<0.01$) olduğu belirlenmiştir. Genel olarak bakıldığında, kontrol grubuna göre tüm ölçülen fosforlanmış protein düzeylerinde düşme görülmekle birlikte, istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. En fazla azalma oranı 100 nM konsantrasyonda siRNA uygulanan grupta JNK protein aktivitesinde ortaya çıkmıştır.

ERK siRNA uygulamasından 72 saat sonra **fosforlanmış ERK düzeylerinde** tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir azalma ($P<0.001$) belirlenmiştir. Bu örneklerin **fosforlanmış P38** ve **fosforlanmış JNK düzeylerindeki** değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$).

ERK siRNA uygulamasından 48 saat sonra **NIH 3T3 hücre dizisinde** kontrole göre, **fosforlanmış ERK düzeyleri** tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak ileri düzeyde azalma ($P<0.001$) göstermiştir. Bu örneklerin **fosforlanmış P38 düzeyleri** kontrole göre değişmezken, **fosforlanmış JNK düzeylerinde** istatistiksel olarak bir anlam gözlenmemiştir ($P>0.05$).

ERK siRNA uygulamasından 72 saat sonra **fosforlanmış ERK düzeyleri** yine tüm konsantrasyonlarda kontrole göre, azalma göstermiş olup en etkili azalma 100 nM'lık konsantrasyonda ($P<0.001$) belirlenmiştir. Bu örneklerin **fosforlanmış P38 düzeylerinde** yine en etkili düşüşün 100 nM'lık konsantrasyonlarında ($P<0.001$) olduğu belirlenmiştir. **Fosforlanmış JNK düzeylerinde**, herhangi bir istatistiksel anlam gözlenmese de ($P>0.05$) yine en etkili azalma konsantrasyonlar arasında 100 nM uygulanan grupta belirlenmiştir.

MCF-7 hücrelerinin, **fosforlanmış ERK, P38 ve JNK düzeylerinin** 48. ve 72. saatleri karşılaştırıldığında, siRNA uygulanmış tüm konsantrasyonlarda 48. saatte ölçülen tüm değerlere göre, 72. saatte daha fazla azalma belirlendi. NIH 3T3 hücrelerinin, **fosforlanmış ERK, P38 ve JNK düzeylerinin** 48. ve 72. saatleri karşılaştırıldığında ise, MCF-7 kanser hücre dizisinin aksine 48. saatteki değerlerin daha düşük olduğu belirlendi.

Tablo 4.2. MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerine uygulanan 15, 30 ve 100 nM ERK siRNA'nın 48. ve 72. saatlerde fosforlanmış ERK, P38 ve JNK protein aktivite düzeyleri üzerine etkisi

SAAT	Kons. (nM)	ERK siRNA Protein Aktivite Düzeyleri					
		MCF- 7			NIH 3T3		
		pERK	pP38	pJNK	pERK	pP38	pJNK
48.SAAT	0	0,29 ± 0,017	0,23 ± 0,008	0,22 ± 0,024	0,16 ± 0,012 ³	0,11 ± 0,004 ^{a3}	0,07 ± 0,001 ^{a3}
	15	0,26 ± 0,007	0,29 ± 0,008	0,21 ± 0,018	0,11 ± 0,007 ^{***3}	0,11 ± 0,005 ³	0,07 ± 0,006 ³
	30	0,22 ± 0,002 [*]	0,23 ± 0,005	0,18 ± 0,004	0,12 ± 0,001 ^{***a3}	0,11 ± 0,003 ³	0,22 ± 0,056
	100	0,26 ± 0,035	0,21 ± 0,017	0,14 ± 0,013 ^{**}	0,10 ± 0,006 ^{***2}	0,10 ± 0,004 ³	0,06 ± 0,000 ³
72.SAAT	0	0,29 ± 0,018	0,15 ± 0,012 ^c	0,11 ± 0,001 ^b	0,21 ± 0,026 ¹	0,28 ± 0,064	0,16 ± 0,033
	15	0,13 ± 0,003 ^{***c}	0,17 ± 0,004 ^c	0,13 ± 0,009 ^b	0,13 ± 0,011 ^{***}	0,11 ± 0,002 ^{**3}	0,08 ± 0,001 ³
	30	0,10 ± 0,003 ^{***c2}	0,18 ± 0,013 ^b	0,19 ± 0,103	0,15 ± 0,012 [*]	0,14 ± 0,014 [*]	0,15 ± 0,044
	100	0,15 ± 0,010 ^{***a}	0,13 ± 0,001 ^b	0,14 ± 0,003	0,11 ± 0,002 ^{***2}	0,13 ± 0,015 ^{***}	0,08 ± 0,006 ³

*, **, *** işareti kontrole (siRNA uygulanmamış) konsantrasyona göre karşılaştırmalar için

a, b, c işareti her hücre dizisinin 48. ve 72. saatleri arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için (MCF 48-72 veya NIH 48-72)

1, 2, 3 işareti hücre dizilerinin 48. Saatleri ve 72. Saatleri arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için (MCF 48-NIH 48 veya MCF 72-NIH 72)

(Ort.± sh.: Ortalamalar n=8 olarak hesaplanmıştır.)

*a1 (P<0.05) önemli değişim, **b 2 (P<0.01) çok önemli değişim, ***c 3 (P<0.001) ileri düzeyde önemli değişim

P>0,05 önemli olmayan değişim

ERK siRNA uygulamasından 48 saat sonra **MCF-7 hücre dizisinde**, kontrole göre, **fosforlanmamış ERK, P38 ve JNK düzeylerinde**, tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$).

ERK siRNA uygulamasından 72 saat sonra **fosforlanmamış ERK düzeylerinde**, tüm konsantrasyonlarda, istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir azalma ($P<0.001$) belirlenmiştir. Bu örneklerin **fosforlanmamış P38 düzeylerinde** ise, 30 nM konsantrasyonda istatistiksel olarak çok önemli düzeyde azalma ($P>0,01$) gözlenmiştir. **Fosforlanmamış JNK düzeylerindeki** değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$).

ERK siRNA uygulamasından 48 saat sonra **NIH 3T3 hücre dizisinde**, kontrole göre, **fosforlanmamış ERK düzeyleri** tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir ($P>0,05$). Bu örneklerin **fosforlanmamış P38 düzeyleri** kontrole göre değişmezken, **fosforlanmamış JNK düzeylerinde** ise, 100 nM konsantrasyonda istatistiksel olarak çok önemli düzeyde bir azalma gözlenmiştir ($P<0,01$).

ERK siRNA uygulamasından 72 saat sonra **fosforlanmamış ERK düzeyleri** yine tüm konsantrasyonlarda kontrole göre, azalma göstermiş olup en etkili azalma 100 nM'lık konsantrasyonda ($P<0.001$) belirlenmiştir. **Fosforlanmamış P38 düzeylerinde** tüm konsantrasyonlarda ileri düzeyde anlamlı azalmanın ($P<0.001$) olduğu belirlenmiştir. **Fosforlanmamış JNK düzeylerinde** de, herhangi bir istatistiksel anlam gözlenmese de ($P>0.05$) yine en etkili azalma konsantrasyonlar arasında 30 nM uygulanan grupta belirlenmiştir.

MCF-7 hücrelerinin, **fosforlanmamış ERK, P38 ve JNK düzeylerinin** 48. ve 72. saatleri karşılaştırıldığında, siRNA uygulanmış tüm konsantrasyonlarda 48. saatte ölçülen değerlere göre, 72. saatte daha fazla azalma belirlenmiştir. NIH 3T3 hücrelerinin, **fosforlanmamış ERK, P38 ve JNK düzeylerinin** 48. ve 72. saatleri karşılaştırıldığında ise, MCF-7 hücre dizisinin aksine, 48. saatteki değerlerin daha düşük olduğu belirlendi.

Tablo 4.3. MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerine uygulanan 15, 30 ve 100 nM ERK siRNA'nın 48. ve 72. saatlerde fosforlanmamış ERK, P38 ve JNK protein aktivite düzeyleri üzerine etkisi

SAAT	Kons. (nM)	ERK siRNA Protein Aktivite Düzeyleri					
		MCF- 7			NIH 3T3		
		ERK	P38	JNK	ERK	P38	JNK
48.SAAT	0	0,11 ± 0,011	0,15 ± 0,002	0,12 ± 0,016	0,08 ± 0,003 ^{c1}	0,09 ± 0,006 ³	0,07 ± 0,002 ¹
	15	0,16 ± 0,001	0,23 ± 0,011	0,17 ± 0,009	0,12 ± 0,037	0,09 ± 0,003 ³	0,09 ± 0,001 ³
	30	0,12 ± 0,004	0,15 ± 0,013	0,16 ± 0,013	0,09 ± 0,003 ^{c3}	0,08 ± 0,003 ^{c3}	0,08 ± 0,001 ³
	100	0,11 ± 0,002	0,18 ± 0,016	0,10 ± 0,002 ^b	0,07 ± 0,001 ³	0,08 ± 0,002 ^{c3}	0,06 ± 0,001 ^{**a3}
72.SAAT	0	0,11 ± 0,002 ²	0,13 ± 0,008 ¹	0,10 ± 0,006	0,18 ± 0,015	0,37 ± 0,082	0,18 ± 0,039
	15	0,08 ± 0,001 ^{***c}	0,12 ± 0,008 ^c	0,13 ± 0,006 ^c	0,08 ± 0,006 ^a	0,08 ± 0,002 ^{***a3}	0,17 ± 0,056
	30	0,06 ± 0,001 ^{***c1}	0,11 ± 0,001 ^{**a}	0,12 ± 0,014 ^a	0,22 ± 0,052	0,10 ± 0,002 ^{***3}	0,06 ± 0,001 ^{c2}
	100	0,08 ± 0,002 ^{***c2}	0,16 ± 0,002	0,11 ± 0,002	0,09 ± 0,001	0,09 ± 0,002 ^{***}	0,07 ± 0,003 ³

*, **, *** işareti kontrole (siRNA uygulanmamış) konsantrasyona göre karşılaştırmalar için

a, b, c işareti her hücre dizisinin 48. ve 72. saatleri arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için (MCF 48-72 veya NIH 48-72)

1, 2, 3 işareti hücre dizilerinin 48. Saatleri ve 72. Saatleri arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için (MCF 48-NIH 48 veya MCF 72-NIH 72)

(Ort.± sh.: Ortalamalar n=8 olarak hesaplanmıştır.)

*a1 (P<0.05) önemli değişim, **b 2 (P<0.01) çok önemli değişim, ***c 3 (P<0.001) ileri düzeyde değişim P>0,05 önemli olmayan değişim

4.3. Hücre Çoğalması ile İlgili Bulgular

ERK siRNA uygulamasından 48 saat sonra XTT çoğalma kiti ile 2 saat inkübe edilen MCF-7 hücre dizilerinde kontrole göre, hücre çoğalma düzeyleri uygulanan 15 nM, 30 nM ve 100 nM konsantrasyonlarda azalma göstermesine rağmen, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P>0,05$) (**Tablo 4.4**). siRNA uygulamasından 72 saat sonra ele alınan gruplarda ise, yine tüm konsantrasyonlarda azalma gözlenmiş olup, bu azalmanın 100 nM konsantrasyonda istatistiksel olarak çok önemli düzeyde ($P<0.01$) olduğu belirlendi.

ERK siRNA uygulamasından 48 saat sonra XTT çoğalma kiti ile 2 saat inkübe edilen NIH 3T3 hücre dizilerinde kontrole göre, hücre çoğalma düzeyleri uygulanan tüm konsantrasyonlarda azalma göstermekte olup, bu azalmanın istatistiksel olarak 100 nM konsantrasyonda ileri düzeyde önemli ($P<0,001$) olduğu belirlendi (**Tablo 4.4**). siRNA uygulamasından 72 saat sonra ele alınan gruplarda ise, yine uygulanan tüm konsantrasyonlarda azalma belirlenmesine rağmen, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P>0.05$).

Tablo 4.4. MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerine uygulanan 15, 30 ve 100 nM ERK siRNA'nın hücre çoğalma düzeyleri üzerine etkisi

SAAT	Kons. (nM)	ERK siRNA Hücre Çoğalma Düzeyleri	
		MCF- 7	NIH 3T3
48.SAAT	0	1,53 ± 0,041 ³	2,00 ± 0,027
	15	1,36 ± 0,036 ³	1,89 ± 0,035
	30	1,40 ± 0,029 ³	1,93 ± 0,049
	100	1,43 ± 0,084	1,62 ± 0,047 ^{***}
72.SAAT	0	1,32 ± 0,346	2,10 ± 0,039
	15	1,07 ± 0,258	1,73 ± 0,149
	30	0,76 ± 0,200 ^{a 3}	1,87 ± 0,134
	100	0,23 ± 0,005 ^{** c 3}	1,79 ± 0,097

*, **, *** işareti kontrole (siRNA uygulanmamış) konsantrasyona göre karşılaştırmalar için
a, b, c işareti her hücre dizisinin 48. ve 72. saatleri arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için (MCF 48-72 veya NIH 48-72)
1, 2, 3 işareti hücre dizilerinin 48. Saatleri ve 72. Saatleri arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için (MCF 48-NIH 48 veya MCF 72-NIH 72)
(Ort.± sh.: Ortalamalar n=6 olarak hesaplanmıştır.)
*a1 ($P<0.05$) önemli değişim, **b 2 ($P<0.01$) çok önemli değişim, ***c 3 ($P<0.001$) ileri düzeyde değişim $P>0,05$ önemli olmayan değişim

5. TARTIŞMA

siRNA'nın tanımlanmasından sonra gen sessizleştirmesi üzerine etkilerini araştıran birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Kanser hücreleriyle yapılan bu çalışmaların çoğunda siRNA mekanizmasının etkili bir tedavi yöntemi olabileceği ileri sürülmüştür (17, 18, 25, 44, 53-55, 58, 60, 70, 72, 75, 77).

Memelilerde gerçekleştirilen ilk gen sessizleştirme çalışması 2002 yılında McCaffrey ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır (46). *In vivo* olarak gerçekleştirilen bu çalışmada sentetik olarak hazırlanan siRNA, farelere lusiferaz eksprese eden bir plazmid ile birlikte verilmiştir. Sonuçta farelere verilen bu siRNA'nın kontrollerle karşılaştırıldığında karaciğer hücrelerindeki lusiferaz ekspresyonunu %80 oranında düşürdüğü belirlenmiştir (46).

Östrojen reseptörleri (ER α ve ER β) hücre çoğalmasında yer alan hedef genleri düzenleyerek meme kanserinin gelişmesinde ve ilerlemesinde rol oynayan ligand düzenleyici transkripsiyon faktörleridir. NFAT3 proteini, memeli hücrelerinde ER α ve ER β ile etkileşir. NFAT3'ün aşırı ekspresyonu, pS2 ve katepsin D içeren östrojenden duyarlı genlerin upregülasyonunda etkilidir. NFAT3'ün bazı meme kanseri hücre dizilerinde farklı şekilde eksprese edildiği belirlenmiştir (75). Zhang ve arkadaşları (75) yaptıkları bu çalışmada, insan meme kanseri hücrelerinde (ZR75-1), NFAT-3 siRNA kullanarak endojen NFAT3 ekspresyonunu azaltmışlar ve bu azalmanın, hücre çoğalmasını azalttığını belirlemişlerdir. Sonuçta meme kanseri tedavisinde NFAT-3 siRNA kullanımının etkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

EphA2, insan kanserlerinde aşırı eksprese olan bir tirozin kinaz reseptörüdür. EphA2'nin hücre kültürlerinde, göç, invazyon, çoğalma, metastaz, yaşam süresi ve anjiogenez üzerinde etkili olduğu vurgulanmıştır (41). Landen ve arkadaşlarının (41) yaptığı bir çalışmada, ovaryum, meme ve pankreas kanser hücrelerinde 3 farklı mekanizma (antikor aracılı sinyal inhibisyonu, antikor aracılı total EphA2 ekspresyonunun azaltılması ve siRNA aracılı ekspresyon azaltılması) ile EphA2 ekspresyonu azaltılarak bu hücrelerde anjiyogenezin inhibe olduğunu, tümör gelişiminin

azaldığını ve yaşam süresinin azaldığını belirlemişlerdir. EphA2 hedefli siRNA tedavisinin ovaryum kanserinde daha etkili olabileceği sonucuna varmışlardır.

Tümör metastazı, meme kanserli hastalarda hastalığın ve ölümün temel sebebidir. Bir serin treonin protein ailesi üyesi olan Protein kinaz CE (PKCE), hücre invazyonu ve hareketinde yer aldığı bildirilen bir onkogendir. Pan ve arkadaşlarının (49) yaptıkları bir çalışmada, PKCE'nin meme kanseri gelişimindeki ve ilerlemesindeki rolü araştırılmıştır. PKCE seviyeleri çok yüksek olan ve agresif MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerine, PKCE siRNA verildiğinde çoğalmanın, invazyonun ve hareketliliğin, kontrol siRNA verilen gruba göre daha da azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, PKCE'nin agresif metastatik meme kanseri fenotipini geliştirmede önemli ve nedensel bir rol oynadığını ve antikanser tedavisi için siRNA uygulanmasının etkili bir hedef olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

RhoA (Ras homolog A) veya RhoC (Ras homolog C), hücre çoğalması ve invazyonunda görev alan Ras ailesi üyesidir. Meme kanserinde RhoA veya RhoC'in aşırı ekspresyonu, tümör hücrelerinin çoğalması, invazyonu ve tümör bağımlı anjiogenezinde artışa neden olur. Daha önceden, Rho-sinyal yolunun bloke edilmesi yöntemi ya GGTI ya da HMG-CoA redüktaz inhibitörleriyle kullanılarak, bu ekspresyonun seviyesi azaltılmaya çalışılmış fakat RhoA veya RhoC inhibisyonu yeteri kadar sağlanamamıştır. Pille ve arkadaşları (54) tarafından yapılan çalışmada, yeni bir yaklaşım olarak anti-RhoA siRNA ve anti-RhoC siRNAlar, özellikle RhoA veya RhoC sentezini inhibe etmek için kullanılmıştır. MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerine ve HMEC-1 endotelial hücrelere, hedef mRNA'nın oldukça iyi parçalanmasını sağlamak üzere ya RhoA ya da RhoC siRNA (8.5 nM) verilmiş ve ilgili proteinin sentezinin ciddi oranda azaldığı belirlenmiştir. Sonuçta RhoA ya da RhoC siRNA'nın agresif meme kanseri tedavisi için umut verici bir yaklaşım olabileceği ileri sürüldü.

Kanser hastalarında kemoterapik tedavinin başarısızlığa uğramasındaki temel nedenlerden biri de multidrug resistans genleridir. Bu genin ürünü olan bir proteinin (P-glycoprotein (P-gp)) aşırı ekspresyonu ilaçlara karşı direnç gelişimini sağlar. Wu ve arkadaşları (72), ilaca dirençli insan meme kanser hücrelerine (MCF-

7/AdrR, MCF-7/BC-19) ve insan meme kanseri hücre dizisine (MCF-7) *MDR1*-hedefli 200 nM P-gp siRNA ve 100 nM lamin A/C siRNA verilmesi sonucu ilaca dirençli hücrelerde MDR-1 mRNA ve P-gp seviyelerinde önemli bir azalma belirlediler. Böylece bu azalışın MDR hedefli klinik öncesi modellerde etkili olarak kullanılabileceğini gösterdiler.

Bir kan pıhtılaşması başlatıcısı olan Tissue Factor (TF), kanser gelişimi ve metastazında da etkilidir. Hu ve arkadaşları (35) EGFR, P13K, Akt ve ERK inhibitörleri ve bunlarla ilişkili siRNA'ları, meme kanseri (MDA-MB-231) ve ovaryum kanseri hücre dizilerine (OVCAR-3 and SKOV-3) uygulayarak MAPK/ERK sinyal yolağının inhibe edilmesinin Tissue Factor (TF) ekspresyonu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta ilk üç inhibitör ve siRNA'ların (EGFR/P13K/Akt) TF ekspresyonunu azaltıcı yönde etki ederken, ERK inhibitörü ve ERK siRNA uygulanmasının daha önceki çalışmalara zıt olarak bu iki hücre dizisinde TF aktivitesini artırdığını ileri sürmüşlerdir.

MAPK ailesinden olan ERK1/2, P38 ve JNK gibi proteinlerin yer aldığı yolak, normal ve malignant hücre çoğalmasında en önemli düzenleyici mekanizmalardır. Birbirlerine benzer şekilde düzenleme yaparak hem sitozolde hem de nükleusta substratları fosforlayarak hücre içi uyarı oluşumuna katılırlar (11, 48). Yapılan araştırmalar, çift dallı RNA (dsRNA) tarafından uyarılan, diziye özgü bir post-transkripsiyonel gen sessizleştirme yöntemi olan RNAi'nin kanser tedavisinde etkili olduğunu bildirmektedir (25, 43, 44, 56, 57, 70).

Biz de bu çalışmamızda, bir sessizleştirme yöntemi olan RNAi mekanizmasını kullanarak, pek çok kanserde olduğu gibi meme kanserinde de etkili olduğu ileri sürülen MAPK'lardan ERK (10, 15, 38, 55, 60, 61, 62, 70) sessizleştirilmesinin meme kanser hücrelerinde ve normal fibroblast hücrelerinde hangi konsantrasyonda etkili olduğunu, hücre canlılığı ve protein düzeylerini nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda, ERK siRNA uygulanan her iki hücre dizisinde mRNA düzeyinde % sessizleştirme oranı açısından en etkili sonucun 100 nM konsantrasyonda, 48. saatte olduğu (MCF-7 %99,85, NIH 3T3 %93,72) belirlendi.

Yapılan çalışmalardan, Steinmetz ve arkadaşlarının (63) HeyC2 (ovaryum kanseri) hücre dizileri ile yaptıkları çalışmada 50 nM ERK1 ve ERK2 siRNA'ları ile yaptıkları transfeksiyondan sonra ERK1/2 protein düzeyinin 72. saatte önemli düzeyde düşürdüğünü 4. gün ise siRNA etkisinin azalıp ERK1/2 protein seviyelerinin tekrar artmaya başladığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada KGN (ovaryum granuloza hücre tümörü) hücre dizilerinde ise ERK sessizleştirilmesinin ERK1/2 protein düzeyini 24. saatte düşürdüğünü, 48. saatte bu düzeyin belirlenemeyecek kadar azalttığını belirterek 5. günde bile sessizleştirmenin etkisinin sürdüğünü açıklamışlardır.

Bu sonuçlar; ERK1 ve ERK2 sessizleştirilmesinin kanser patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bizim çalışmamızda da, bunlarla uyumlu olarak meme kanser hücrelerinde ERK sessizleştirilmesine genel olarak bakıldığında 48. saatte oldukça etkili bir sessizleştirmenin gerçekleştiği görülmektedir.

Vantaggiato ve ark. (68)'nin çalışmalarında NIH 3T3 hücre dizisinde sessizleştirme sonucu ERK1'in azalması, ERK2 bağımlı sinyalin artmasına ve hücre büyümesine neden olduğunu, buna karşın ERK2 sessizleştirilmiş hücrelerde hücre çoğalmasını hemen hemen durdurduğunu bildirmişlerdir. Sonuçta ERK1'in NIH 3T3 hücrelerinde Ras aracılı onkogenik çoğalmayı ve koloni oluşumunu inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir. Lu ve ark. (44), RNAi transfeksiyonu ile gerçekleştirdikleri MEK1/2 ekspresyonunun azaltılmasına yönelik çalışmalarda MTT yöntemi ile kolon kanser hücre dizilerinde (SW1116), hücre çoğalmasının önemli düzeyde azaldığını belirtmişlerdir. Buna karşılık, Obajimi ve ark. (48), prostat kanser hücre dizilerinde (DU145) ERK siRNA kullanılmasından 34 saat sonra hücre çoğalmasında önemli bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da ERK siRNA uygulanan hücre dizilerinden MCF-7 dizilerinde 100 nM konsantrasyonda 72. saatte, NIH 3T3 hücre dizilerinde ise 100 nM konsantrasyonda 48. saatte önemli düzeyde hücre çoğalmalarında azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar siRNA transfeksiyonunun genel olarak geçici bir süre için olsa da hücre çoğalma oranını azalttığını göstermektedir.

HeLa hücreleri ile lusiferaz proteinlerini sessizleştirerek yapılan bir çalışmada, Persengiev ve ark. (53), 0-200 nM arasında değişen konsantrasyonlarda çeşitli genlerin ekspresyon analizini yaparak siRNA'larla tetiklenen gen

ekspresyonundaki bu etkilerin geçici olmadığını ve siRNA müdahalesi boyunca devam ettiğini bildirilmişlerdir. Diğer çalışmalarda ise, Semirazov ve ark. (60) ile Dönmez ve ark. (17) 100 nM konsantrasyonun non spesifik etkileri meydana getirdiği düşüncesi ile yüksek konsantrasyonlarda uygulamalar yerine düşük konsantrasyonlar uygulanması gerektiğini bildirerek çalışmalarda 20 nM konsantrasyon kullanılmasını önermişlerdir. Buna karşılık yayınlanan pek çok makalede (20, 40, 48) 100 nM konsantrasyonda siRNA'nın kullanıldığı ve üretici firmaların önerdiği bir konsantrasyon olduğu gözlenmiştir. Non-spesifik etkilerden kasıt, gen ekspresyonundaki azalışın, maddenin artan konsantrasyonlarında, madde yoğunluğu etkisinden kaynaklanan ve genin sessizleştirilmesine bağlı olmayan bir düşüş olduğudur. Bizim çalışmamızda ise, ERK için uygulanan sessizleştirme ve sonrasında yapılan ölçümlerdeki tutarlılık 100 nM ERK siRNA kullanımında non-spesifik bir etkinin olmadığı düşünülmektedir.

6.SONUÇ

Değişik konsantrasyonlarda (15 nM, 30 nM ve 100 nM) ERK siRNA kullanarak MCF-7 ve NIH 3T3 hücre dizilerinde gerçekleştirdiğimiz sessizleştirme sonucu önemli görülen aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. ERK siRNA kullanımını sonucu erk genini sessizleştirme oranı MCF-7 hücre dizisinde en etkili olarak 48. saatte 100 nM konsantrasyonda (%99,85), NIH 3T3 hücre dizisinde ise, %93,72 olarak 48. saatte yine 100 nM konsantrasyonda belirlendi.
2. ERK siRNA kullanımının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 100 nM konsantrasyonda 72. saatte hücre çoğalmasında önemli düzeyde azalmaya neden olduğu belirlendi. NIH 3T3 fibroblast hücrelerinde ise, 48. saatte 100 nM konsantrasyonda hücre çoğalmasında azalma belirlendi.
3. ERK siRNA kullanımını sonucu, 72. saatte MCF-7 ve NIH 3T3 hücrelerinde fosforlanmış ERK düzeyinin tüm konsantrasyonlarda, önemli düzeyde azaldığı belirlendi.
4. ERK siRNA kullanımını sonucu 72. saatte MCF-7 hücrelerinde fosforlanmamış ERK düzeyleri tüm konsantrasyonlarda, fosforlanmamış P38 ise 30 nM konsantrasyonda önemli ölçüde azaldığı belirlendi. NIH 3T3 hücrelerinde ise, sadece P38 protein düzeylerinin 72. saatte tüm konsantrasyonlarda azaldığı belirlendi.
5. 100 nM siRNA uygulamasının non-spesifik etki oluşturmadığı, aksine en etkili doz olduğu belirlendi.

Bütün bu sonuçlar ele alındığında, siRNA uygulamaları geçici olarak da olsa incelenen proteinlerin ekspresyonunu ve hücre çoğalmasını azaltıcı yönde etkilediği anlaşılmaktadır. Bu etkinin geçici olması nedeni ile kanser tedavisinde bu şekilde kullanılmasının pek etkili olamayacağı ancak sessizleştirme en etkili olduğu

48-72. saatler arasında asıl kanser tedavi yöntemleri ve ilaç kullanımına katkıda bulunabileceği, diğer yandan 72 saat aralıklarla uygulanacak birkaç siRNA transfeksiyonunun etkilerinin araştırılmasının da bilim ve tedavi açısından olumlu sonuçlar verebileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Adami, H.O., Hunter, D. and Trichopoulos, D., 2002, Textbook of Cancer Epidemiology, Oxford University Press, New York, 1st Edition, 301-334 p.
2. Aouadi, M., Binetruy, B., Caron, L., Marchand-Brustel, L. and Bost, F., 2006, Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice, *Biochimie*, 88, 1091-1098 s.
3. Aydınтуğ, S., 2004, Meme kanserinde erken tanı, *Sted*, 13, 226-228 s.
4. Balcan, E., Genin Moleküler Biyolojisi Ders Notları. <http://www.erdalbalcan.com>
5. Başaran, A., 2004, Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı, Nobel Kitabevi, İstanbul, 7. Baskı, 225-228 s.
6. Berkhout, B. and Hasnoot, J., 2006, The interplay between virus infection and the cellular RNA interference machinery, *FEBS Letters*, 580, 2896-2902 p.
7. Bora, G. ve Erdem Yurter, H., 2007, Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38, 48-54 s.
8. Borralho, P.M., Silva, I.B.M., Aranha, M.M., Albuquerque, C., Leitao, C.N., Steer, C.J. and Rodrigues, C.M.P., 2007, Inhibition of Fas expression by RNAi modulates 5-fluorouracil-induced apoptosis in HCT116 cells expressing wild-type p53, *Biochimica & Biophysica Acta*, 1772, 40-47 p.
9. Boutros, T., Chevet, E. and Metrakos, P., 2008, Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase/MAP Kinase Phosphatase regulation: Roles in cell growth, death, and cancer, *Pharmacological Reviews*, 60, 261–310 p.
10. Byun, H.J., Hong, I.K., Kim, E., Jin, Y.J., Jeoung, D.I., Hahn, J.H., Kim, Y.M., Park, S.H. and Lee, H., 2006, A splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways. *Journal Biology of Chemistry*, 17;281(46), 34833-47 p.
11. Chen, L., Mayer, J.A., Krisko, T.I., Speers, C.W., Wang, T., Hilsenbeck S.G. and Brown, P.H., 2009, Inhibition of the p38 Kinase suppresses the proliferation of human ER-Negative breast cancer cells, *Cancer Research*, 69 (23), 8853-8861 p.
12. Cobb, M.H. and Schaefer, E.M., 1996, MAP Kinase signaling pathways, *Promega Notes Magazine*, 59, 37-41 p.
13. Cooper, G.M. and Hausman, R.E., 2006, Hücre Moleküler Yaklaşım, İzmir Tıp Kitabevi, 3. Baskı, İzmir, 565-570 s.
14. Cortez, C.C. and Jones, P.A., 2008, Chromatin, cancer and drug therapies, *Mutation Research*, 647, 44-51 p.
15. Davidson, B., Konstantinovskiy, S., Kleinberg, L, Nguyen, M.T.P., Bassarova, A., Kvalheim, G., Nesland, J.M. and Reich, R., 2006, The Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) p38 and JNK are markers of tumor progression in breast carcinoma, *Gynecologic Oncology*, 102, 453-461 p.
16. Doğan, A.L. ve Güç, D., 2004, Sinyal iletim mekanizmaları ve kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 34-42 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

17. Dönmez, Y. and Gündüz, U., 2011, Reversal of multidrug resistance by small interfering RNA (siRNA) in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells, *Biomed Pharmacother.* 65(2), 85-89 p.
18. Duursma, A.M. and Agami, R., 2003, Ras interference as cancer therapy, *Seminars in Cancer Biology*, 13, 267-273 p.
19. Gartel, A.L. and Kandel, E.S., 2006, RNA interference in cancer, *Biomolecular Engineering*, 23, 17-34 p.
20. Geoghegan-Morphet, N., Burger, D., Lu, X., Sathish, V., Peng, T., Sims, S.M. and Feng, Q., 2007, Role of neuronal nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 15;75(2), 408-416 p.
21. Gerald, K., 2002, *Cell and Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc, Florida, 4th Edition, 451-455 p.
22. Giancotti, V., 2006, Breast cancer markers, *Cancer Letters*, 243, 145-159 p.
23. Grobhans, H. and Filipowicz, W., 2008, Molecular Biology: The expanding world of small RNAs, *Nature*. 24(451), 414-416 p.
24. Grunewald, T.G.P., Kammerer, U., Schulze, E., Schindler, D., Honig, A., Zimmer, M. and Butt, E., 2006, Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells, *Experimental Cell Research*, 312, 974- 982 p.
25. Gündoğdu, R. ve Çelik, V., 2009, RNA İnterferans (RNAi), *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(1-2), 34-47 s.
26. Güneş, H.V., 2006, *Moleküler Hücre Biyolojisi*, Kaan Kitabevi, Eskişehir, 2. Baskı, 342-343 s.
27. Herranz, M., Esteller, M., 2007, DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets, *Methods Molecular Biology*, 361, 25-62 p.
28. Howard, K., 2003, Unlocking the money-making potential of RNAi, *Nature Biotechnology* 21, 1441- 1446 p.
29. http://scbt.com/gene_silencers.html
30. <http://www.atonet.org.tr/yeni/index.php?p=804&l=1>
31. http://www.google.com.tr/url?sa=t&source=web&cd=1&ved=0CBcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fcumhuriyet.dundar.dr.tr%2FDonem1%2FDonemI20052006%2F2006III%2FfizzetYelkovan%2FSignal_Transduction_II.ppt&rct=j&q=cumhuriyet.dundar.dr.tr%2F...%2FfizzetYelkovan%2FSignal_Transduction_II.ppt&ei=XxLeTay_CYrMhAeH2bjECg&usq=AFQjCNFPwAeESZiwx bPstVeAZhDHNpThA&sig2=Xu4uBDXhFqZUpm2txQKhmg&cad=rja
32. <http://www.istanbul.edu.tr/fen/mbg/notlar/1209360229.pdf>
33. <http://www.kanser.org/toplum/knedir.php>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

34. <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/datasheet/Z359629dat.pdf>
35. Hu, C., Huang, L., Gest, C., Xi, X., Janin, A., Soria, C., Li, H. and Lu, H., 2012, Opposite regulation by PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways of tissue factor expression, cell-associated procoagulant activity and invasiveness in MDA-MB-231 cells, *Journal of Hematology & Oncology*, 5(16), 1-10 p.
36. Johnson, G.L. and Lapadat, R., 2002, Mitogen-Activated Protein Kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases, *Science*, 298 (5600), 1911-1912 p.
37. Karagüzel, A., Kalay, E. ve Celep, F., 2007, RNA İnterferans (RNAi): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 33(1), 41-44 s.
38. Kim, S., Hahn, J., Min, Y., Yoo, N., Ko, Y. and Lee, W., 1999, Constitutive activation of Extracellular Signal Regulated Kinase in human acute leukemias: Combined role of activation of MEK, hyperexpression of Extracellular Signal-Regulated Kinase and downregulation of a phosphatase, PCA1, *Blood*, 93, 3893-3899 p.
39. Kolch, W., 2000, Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions, *Biochemical Journal*, 351, 289-305 p.
40. Kuo, P.L., Hsu, Y.L., Chang, C.H. and Chang, J.K., 2005, Osteole-mediated cell differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in human osteoblast cells, *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 314 (3), 1290-1299 p.
41. Landen, C.N., Kinch, M.S. and Sood, A.K., 2005, EphA2 as a target for ovarian cancer therapy, *Expert Opin Ther Targets*, 9(6), 1179–1187 p.
42. Lippman, M.E., 1998, Breast Cancer, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Companies, New York, 14th Edition, 562-567 p.
43. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L. and Darnell, J., 2004, *Molecular Cell Biology*, W.H Freeman and Company, New York, 5th Edition, 935-941 p.
44. Lu, R., Wang, X., Chen, Z.F., Sun, D.F., Tian, X.Q. and Fang, J.Y., 2007, Inhibition of the Extracellular Signal-regulated Kinase/ Mitogen-activated Protein Kinase pathway decreases DNA methylation in colon cancer cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (16) 12249–12259 p.
45. Mattick, J.S. and Makunin, I. V., 2005, Small regulatory RNAs in mammals, *Human Molecular Genetics*, 14 (1), 121–132 p.
46. McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J. and Kay, M.A., 2002, RNA interference in adult mice, *Nature (London)*, 418, 38–39 p.
47. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R. and Willard, H.F., 2001, *Genetics and Cancer: Thompson & Thompson, Genetics in Medicine*. W.B. Saunders Company Press, USA, 6th Edition, 311-313 p.
48. Obajimi, O. and Melera, P.W., 2011, ERK suppression in DU145 cells selected for AG2034 resistance is associated with decreased ATP, GARFT inactivation and increased ERK signaling, *The Open Drug Resistance Journal*, 1, 1-11 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

49. Pan, Q., Bao, L.W., Kleer, C.G., Sabel, M.S., Griffith, K.A., Teknos, T.N. and Merajver, S.D., 2005, Protein kinase C{varepsilon} is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy, *Cancer Research*, 65 (18), 8366–8371 p.
50. Pan, Q., Cai, R., Liu, X. and Qian, C., 2006, A novel strategy for cancer gene therapy: RNAi, *Chinese Science Bulletin*, 51(10), 1145-1151 p.
51. Pearson, G., Robinson, F., Gibson T.B., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M.H., 2001, Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase pathways: Regulation and physiological functions, *Endocrin Reviews*, 22(2), 153-183 p.
52. Pehlivan, S., Durmaz, B., Aykur, A. ve Özkınay, F., 2006, Küçük RNA'ların etki mekanizmaları ve önemi, *ARŞİV Kaynak Tarama Dergisi*, 15, 320-330 s.
53. Persengiev, S.P., Zhu, X. and Green, M.R., 2004, Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs), *RNA*, 10(1):12-8 p.
54. Pille, J.Y., Denoyelle, C., Varet, J., Bertrand, J.R., Soria, J., Opolon, P., Lu, H., Pritchard, L.L., Vannier, J.P., Malvy, C., Soria, C. and Li, H., 2005, Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro and in vivo, *Molecular Therapy*, 11(2), 267–274 p.
55. Reddy, L.S., Sarojamma, V. and Ramakrishna, V., 2007, Future of RNAi in Medicine: A review, *World Journal of Medical Sciences*, 2(1), 1-14p.
56. Roux, P.P. and Blenis, J., 2004, ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: A family of protein kinases with diverse biological functions, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (2), 320–344 p.
57. Sapru, M.K., Yates, W., Hogan, S., Jiang, L., Halter, J. and Bohn, M.C., 2006, Silencing of human alpha synuclein in vitro and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi, *Experimental Neurology*, 198, 382-390 p.
58. Scholzova, E., Malik, R., Sevcik, J. and Kleibl, Z., 2007, RNA regulation and cancer development, *Cancer Letters*, 246, 12-23 p.
59. Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paul, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D, and Boyd, M.R., 1988, Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug, Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines, *Cancer Research*, 48, 4827-4833 p.
60. Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D.N. and Fesik, S.W., 2003, Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures, *Proc Natl Acad Sci*, 27;100(11):6347-52 p.
61. Sivaraman, V.S., Wang, H., Nuovo, G.J. and Malbon, C.C., 1997, Hyperexpression of Mitogen-activated Protein Kinase in human breast cancer, *Journal of Clinical Investigation*, 99, 1478-1483 p.
62. Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. and Josua-Tor, L., 2004, Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity, *Science*, 305, 1434–1437 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

63. Steinmetz, R., Wagoner, H.A., Zeng, P., Hammond J.R., Hannon T.S., Meyers J.L. and Pescovitz, O.H., 2004, Mechanisms regulating the constitutive activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway in ovarian cancer and effect of Ribonucleic Acid Interference for ERK ½ on cancer cell proliferation, *Molecular Endocrinology*, 18, 2570-2582 p.
64. Tanoue, T. and Nishida, E., 2003, Molecular recognitions in the MAP kinase cascades, *Cellular Signalling*, 15, 455-462 p.
65. Tsukada, Y., Miyazawa, K. and Kitamura, N., 2001, High intensity ERK signal mediates hepatocyte growth factor-induced proliferation inhibition of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2, *The Journal of Biological Chemistry* 276, 40968-40976 p.
66. Turkish Statistical Institute TurkStat, 2011, Turkey in Statistics 2011, 23 p.
67. Vanpoznak, C. and Seidman, A.D., 2002, *Encyclopedia of Cancer*, Academic Press, Amsterdam, 2nd Edition, 287-299 p.
68. Vantaggiato, C., Formentini, I., Bondanza, A., Bonini, C., Naldini, L. and Brambilla, R., 2006, ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially, *Journal of Biology*, 5 (14), 14.1-14.15 p.
69. Wagner, E.F. and Nebreda, Á.R., 2009, Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development, *Nature Reviews Cancer*, 9, 537-549 p.
70. Wang, Y., Liu, S., Zhang, G., Zhou, C., Zhu, H., Zhou, X., Quan, L., Bai, J. and Xu, N., 2005, Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo, *Breast Cancer Research*, 7, R220- R228 p.
71. Whyte, J., Bergin O., Bianchi, A., McNally, S. and Martin, F., 2009, Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development, *Breast Cancer Research*, 11(5), 209-209 p.
72. Wu, H., Hait, W.N. and Yang, J.M., 2003, Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells, *Cancer Research*, 63(7), 1515-1519 p.
73. Yılmaz, H.H., Yazıhan, N., Tunca, D., Sevinç, A., Olcayto, E.Ö., Özgül, N. and Tuncer, M., 2011, Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 41(1), 10-16 p.
74. Zeng, P., Wagoner, H.A., Pescovitz, O.H. and Steinmetz, R., 2005, RNA Interference (RNAi) for Extracellular Signal-Regulated Kinase 1(ERK1) alone is sufficient to suppress cell viability in ovarian cancer cells, *Cancer Biology & Therapy*, 4(9), 961-967 p.
75. Zhang, H., Xie, X., Zhu, X., Zhu, J., Hao, C., Lu, Q., Ding, L., Liu, Y., Zhou, L., Liu, Y., Huang, C., Wen, C. and Ye, Q., 2005, Stimulatory cross-talk between NFAT3 and estrogen receptor in breast cancer cells, *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 43188-43197 p.
76. Zhang, P.H, Zou L.Z. and Tu Z.G., 2006, RNAi-hTERT inhibition hepatocellular carcinoma cell proliferation via decreasing telomerase activity, *Journal of Surgical Research* 131, 143-149 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

77. Zhang, M., Zhou, Y., Xie, C., Zhou, F., Chen, Y., Han, G. and Zhang, W.J., 2006, STAT6 specific shRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in colon cancer HT-29 cells, *Cancer Letters*, 243, 38-46 p.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel bilgiler

Adı-Soyadı : Fulya DOĞANER
Doğum tarihi ve yeri : 17/03/1980-AFYON
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : Atatürk Bulvarı Hacer Hanım Apt. No:119/4 26020
ESKİŞEHİR - fulyadoganer@mynet.com

Eğitim Durumu

İlköğretim : Atatürk İlkokulu
Orta öğretim : Şemsettin Karahisari Ortaokulu
Lise : Hoca Ahmed Yesevi Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)
Lisans : ESOGÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Doktora : ESOGÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yabancı Dil : İngilizce (ÜDS : 60.00)

Üye olunan Bilimsel Kuruluşlar

Türkiye Biyologlar Derneği Üyeliği
TUBİTAK Araştırmacı Bilgi Sistemi (ARBİS) Üyeliği
Moleküler Kanser Araştırma Derneği (MOKAD) Üyeliği
The European Association for Cancer Research (EACR) Üyeliği
Hücre Ölümü ve Araştırma Derneği (HÖAD) Üyeliği

Yayınlar

Makale: Bayram B, Sayın E, Gunes HV, Degirmenci I, Turkoglu Z, **Doganer F**,
Cosan DT.: DD genotype of ACE gene I/D polymorphism is associated in a
turkish study population with osteoarthritis. Molecular Biology Reports 38
(3):1713–1716, 2011

Poster Bildirileri :

- Doğaner F**, Turgut Coşan D, Özbayer C, Saydam F, Soyocak A, Değirmenci İ,
Güneş H.V, Kurt H, Üstüner M.C, Bal C “The Effects of Tannic Acid on Heart

Tissue and Blood in Experimental Hypertension” *4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: focus on Calcium Signaling and TRP Channels Congress*, Abstract Book, p:61, June 26-29, 2012, Isparta, Turkey

2. Özbayer C, Turgut Coşan D, Saydam F, Soyocak A, **Doğaner F**, Değirmenci İ, Güneş H.V, Kurt H, Üstüner M.C, Bal C “The Effect of Tannic Acid on Liver Damage Mediated by Chronic Nitric Oxide Inhibitor” *4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: focus on Calcium Signaling and TRP Channels Congress*, Abstract Book, p:41, June 26-29, 2012, Isparta, Turkey
3. Soyocak A, Turgut Coşan D, **Doğaner F**, Özbayer C, Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV, Kurt H, M. Üstüner MC, Bal C.“Doğal bir bileşen olan tannik asit hipertansiyonda etkili midir?” *XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, s:130, Antalya, 27-30 Ekim 2011.
4. Saydam F, Turgut Coşan D, Soyocak A, **Doğaner F**, Özbayer C, Güneş HV, Değirmenci İ, Üstüner MC, Kurt H, Bal C. “N (omega)-nitro-L-arjinin uygulanan sıçanlarda tannik asitin sistolik kan basıncı, böbrek dokusundaki oksidatif stres ve bazı idrar parametreleri üzerine etkisi” *XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, s:130, Antalya, 27-30 Ekim 2011
5. Hasan Veysi Güneş, **Fulya Doğaner**, Didem Turgut Coşan, İrfan Değirmenci, Cengiz Bal “p38 siRNA Transfeksiyonunun NIH 3T3 Fibroblast Hücre Dizisi Üzerine Etkisi” *XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, s:118, Antalya 27-30 Ekim 2011)
6. Mehmet Cengiz Üstüner, **Fulya Doğaner**, Cansu Özbayer, İrfan Değirmenci, Faruk Saydam, Hasan Veysi Güneş “Karaciğer Hepatosisitesinde Mitokondriyal Lipid Peroksit ve Süperoksit Dismutaz Seviyeleri” *XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, s:148, Bodrum, Muğla 28-31 Ekim 2009

Bilimsel Etkinlikler

Projeler :

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen 'siRNA kullanarak insan meme kanseri dizilerinde (MCF-7) erk ve p38 genlerinin sessizleştirilmesi, bu sessizleştirmenin ERK, p38 ve JNK aktivasyonları ve hücre çoğalmasına olan etkilerinin belirlenmesi' başlıklı projede **Araştırmacı**

Katılan kurs ve eğitim programları :

1. ESOGÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 2007
2. Oksidatif stres, DNA hasarı, DNA onarımı, hastalıklarla ilişkisi. Teorik Kurs, 15-18 Haziran 2010, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir
3. Advances in Immunology and Cancer Biology. Workshop, 15-17 Nisan 2011, Boğaziçi University, İstanbul, Turkey.
4. DNA Tabanlı Moleküler Yöntemler Uygulamalı, 2-3 Haziran 2011, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul Türkiye.
5. RNA Tabanlı Moleküler Yöntemler Uygulamalı, 4-5 Haziran 2011, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul Türkiye.
6. II. Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumu, 24-25 Haziran 2011, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
7. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Teorik Kursu, 26 Ekim 2011 Antalya
8. I. Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu, 24-25 Kasım 2011, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye

