

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

MEME KANSERLİ HASTALARDAN ALINAN KAN
ÖRNEKLERİNDE MİR-126 GEN EKSPRESYON DÜZEYİNİN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİO. ÇAĞRI ÖNER

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. DİDEM TURGUT COŞAN

TEMMUZ-2012

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

MEME KANSERLİ HASTALARDAN ALINAN KAN
ÖRNEKLERİNDE MİR-126 GEN EKSPRESYON DÜZEYİNİN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİO. ÇAĞRI ÖNER

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. DİDEM TURGUT COŞAN

PROJE NO: 201111032

KABUL VE ONAY SAYFASI

Bio. Çağrı ÖNER'in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Meme Kanserli Hastalardan Alınan Kan Örneklerinde miR-126 Gen Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

17.07.2012

Üye: Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ


Üye: Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCİ

Üye: Prof. Dr. Serdar ERKASAP

Üye: Yrd. Doç. Dr. M. Cengiz ÜSTÜNER

Üye: Yrd. Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN (Danışman)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.07/2012 tarih ve 922/4233 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

Meme Kanserli Hastalardan Alınan Kan Örneklerinde miR-126 Gen Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi

Amaç: Bu çalışmada, kanserde etkisi araştırılmakta olan miRNA'lerden miR-126'nın meme kanserindeki etkisini ortaya koymak amaçlanmıştır. Böylece meme kanserinin teşhis, tanı veya tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağı hakkında bilgi edinilebilecektir.

Kapsam: Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra, dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanser tipidir. MikroRNA'lar(miRNA), hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyen, gelişme, farklılaşma, hücre çoğalması, apoptoz ve stres cevapları gibi fizyolojik ve patolojik işlemlerin çeşitliliğinde rol oynayan küçük düzenleyici RNA molekülleridir. Epidermal büyüme faktörünbenzeri 7 (egfl7) genininintron 7 bölümünde yer alan miR-126, vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF) sinyal iletimini, anjiyogenezi ve vasküler bütünlüğü düzenleyerek damar gelişiminde rol almaktadır. Omurgalılarda, egfl7 geni biyolojik olarak aktif miRNA'ları (miR-126) kodlar.

Yöntem: Bu çalışmada meme kanseri görülmeyen sağlıklı 15 kişiye ait kan örneği (kontrol) ve meme kanseri görülen 15 hastanın kan örneği alındı. Toplanan kanlardan mononükleer hücreler ayrıştırılarak, bu hücrelerden total RNA elde edildi. Elde edilen RNA'lar revers transkripsiyon ile cDNA'ya dönüştürülerek gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda (Real-Time PCR) gen ekspresyonları belirlendi.

Bulgular: Bu çalışma sonucunda miR-126 gen ekspresyon seviyesi meme kanserli hastalarda, kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulunmuştur. Bu nedenle miR-126'nın meme kanserinde baskılayıcı özelliğe sahip olabileceği düşünülmüştür. Bu sonucun desteklenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, miR-126, Real Time-PCR, gen ekspresyonu

SUMMARY

Investigation of miR-126 Gene Expression in Blood Samples Taken From Breast Cancer Patients and Healthy People

Aim: In this study, we exhibit possible effects of miR-126 gene expression levels on breast cancer. We will have information about whether to use miR-126 as a marker of diagnosis or treatment in breast cancer.

Content: Breast cancer is the most seen cancer type after lung cancer. MicroRNAs (miRNA) are the small regulator RNA molecules which regulate target genes expression and take part in various physiologic and pathological processes such as differentiation, proliferation, development, apoptosis and stress response. miR-126 is located in intron 7 region of epidermal growth factor like 7. miR-126 gene takes part in vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling, angiogenesis and regulating vascular integrity of vessel development. In vertebrates, egfl 7 gene encodes biologically active miRNAs (miR-126).

Method: In this study we have taken blood sample from 15 normal (healthy) individuals as a control and 15 breast cancer patients. Mononuclear cells and total RNA was obtained from collected blood. Total RNA was converted to cDNA by reverse transcription and than gene expression was examined by using Real Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR).

Results: As a result of this study, gene expression levels of miR-126 in breast cancer patients, compared with control group, were found significantly lower. Therefore, we thought that miR-126 has tumor suppressor effects in breast cancer. Further studies are needed to confirm these results.

Key Words: Breast cancer, miR-126, Real-Time PCR gene expression

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
ŞEKİL DİZİNİ	ix
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Nükleik Asitler	5
2.1.1 Nükleik Asitlerin Yapısında Bulunan Moleküller	5
2.1.1.1 Şekerler	5
2.1.1.2 Bazlar	5
2.1.1.2.1 Pirimidin Bazları	6
2.1.1.2.2 Pürin Bazları	6
2.1.1.3 Nükleozidler	6
2.1.1.4 Nükleotidler.....	6
2.2 Nükleik Asitler ve Polinükleotidler	7
2.3 Nükleik Asitlerin Karşılaştırması.....	7
2.3.1 DNA molekülü.....	8
2.3.2 RNA Molekülü	9
2.3.2.1 Haberci RNA (mRNA)	10
2.3.2.2 Taşıyıcı RNA (tRNA)	12
2.3.2.3 Ribozomal RNA (rRNA)	13
2.3.2.4 Heterojen RNA (hnRNA)	14
2.3.2.5 Small Nüklear RNA (snRNA)	14
2.4 Kodlamayan RNA Tipleri	14
2.4.1 Küçük Engelleyici RNA (Short Interfering/Small Interference, siRNA) ve Oluşum Mekanizması	16
2.4.2 Mikro RNA (miRNA) ve Oluşum Mekanizması.....	17
2.5 Kanser ve Oluşum Şekilleri	22
2.5.1 Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	23

2.5.1.1	Klonal orijin	23
2.5.1.2	İmmortalite	23
2.5.1.3	Genetik instabilite	24
2.5.1.4	Kontakt inhibisyonun ve substratuma tutunarak büyüme özelliklerinin kaybı.....	24
2.5.1.5	Çoğalmanın büyüme faktörlerinden ve besinlerden bağımsız olarak devamlı artışı.....	24
2.5.1.6	Metastaz	24
2.5.2	Aşırı kanser hücresi üretiminin nedenleri	26
2.5.2.1	Anormal hücrelerin apoptoza gidememesi.....	26
2.5.2.2	Hücre çoğalmasını anormal şekilde uyararak genetik bozukluklar	27
2.5.2.3	Tümör baskılayıcı genlerdeki anormallikler	28
2.5.2.4	Tümör anjiogenezi	28
2.5.3	Kansere neden olan ekzojen faktörler	29
2.5.4	Kansere neden olan endojen faktörler	29
2.6	Meme Kanseri	32
2.7	miR-126 ve Kanser	35
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	39
3.1	Örneklerin Eldesi ve Hücre Lizisi	39
3.2	Mononükleer Hücre Eldesi	47
3.3	Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....	47
3.3.1	Mononükleer Hücrelerden Total RNA Eldesi	47
3.3.2	Real-Time PCR için Örneklerin Hazırlanması	48
3.3.3	Komplementer DNA (cDNA) Eldesi.....	48
3.3.4	Real-Time PCR.....	49
3.4	İstatistiksel Değerlendirme.....	51
4.	BULGULAR.....	52
5.	TARTIŞMA.....	58
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
7.	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	66
8.	EKLER DİZİNİ.....	71

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. DNA ve RNA Arasındaki Farklar (20 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).....	8
Tablo 2.2. MikroRNA ile siRNA Arasındaki Farklar (46 ve 54 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).....	16
Tablo 2.3. Kanser Hücreleri ile Normal Hücre Arasındaki Farklar (5 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).....	26
Tablo 3.1. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastaların Hormon TMR Değerleri	40
Tablo 3.2. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Meme Kanseri Teşhisi Konan Hastaların Hematoloji Değerleri	41
Tablo 3.3. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastaların Biyokimya Değerleri	42
Tablo 3.4. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastaların Koagülasyon Değerleri.....	43
Tablo 3.5. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastaların Hormon Değerleri.....	44
Tablo 3.6. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastaların ELISA Test Sonuçları.....	45
Tablo 3.7. Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastalardan Elde Edilen Bilgiler.....	46
Tablo 3.8. Real-Time PCR'da Kullanılan Primerler ve Problar	50
Tablo 4.1. Kontrol grubu olan 15 sağlıklı insanın yaş ve CT değerleri.....	53
Tablo 4.2. Meme kanseri tanısı konmuş 15 hastanın yaş ve CT değerleri.....	54
Tablo 4.3. Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen verilerden elde edilen sonuçlar ..	54

Tablo 4.4. 15 sağlıklı kontrol ve 15 meme kanseri hastanın gen ekspresyon ($p= 0.014$ olasılık değerinde) düzeyleri..... 56

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Santral Dogma (24 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)	10
Şekil 2.2. Taşıyıcı RNA'nın (tRNA) Yapısı (20 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)	13
Şekil 2.3. siRNA Oluşumu (54 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).....	17
Şekil 2.4. miRNA'nın oluşumu ve hücre içinde izlediği yol (25 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).....	19
Şekil 2.5. RISC kompleksinin yapısı ve mRNA yıkımındaki rolü (55 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)	20
Şekil 2.6. RISC kompleksinin yapısı ve çalışma prensibi (16 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).....	36
Şekil 2.7. VEGF sinyal iletiminde miR-126'nın SPRED-1 ve PIK3R2 proteinlerine etkisi ve PI3K ve Ras,Raf/MAPK yollarına etkisi (19 ve 69 nolu kaynaklardan değiştirilerek alınmıştır)	37
Şekil 3.1. Real-Time PCR'dan elde edilen verilerin görünümü. Kanser hastasının miR-126 ve GAPDH amplikasyon eğrileri ve RNA (kalıp) kontrolü (no template control, NTC) negatif kontrolün amplikasyon eğrisi. Mavi renk hasta örneğindeki miR-126 CT değerini göstermektedir. Yeşil renkte olan eğri ise; hasta örneğindeki internal kontrol olan GAPDH'in CT değerini göstermektedir. Grafikteki diğer iki renkteki eğri (turuncu ve gri) GAPDH ve miR-126'nın negatif kontrolleri olup gösterdiği değer istatistiksel olarak anlamsız sayılmaktadır.....	50
Şekil 4.1. Kontrol ve hasta örneklerinin yaş dağılım grafiği.....	55

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

RNA: Ribonükleik Asit

sRNAs: Küçük RNA'lar (small RNA)

dsRNA: Çift Sarmal RNA (double strand RNA)

nt: Nükleotid

RNAi :RNA Interferans

miRNA: Mikro RNA

siRNA: Küçük Engelleme RNA (Short Interfering RNA)

RISC: RNA-İndükleyici Susturma Kompleksi

3' UTR: 3' Çevirilmeyen Bölge (Untranslated Region)

pre-miRNA: Prekürsor mikro RNA

ATP: Adenozin Trifosfat

TRBP: Trans Aktive Eden RNA Bağlayan Protein (Trans-activated RNA Binding Protein)

PACT: PKR Kinazın Aktivator Proteinini

Ago2: Argonoat 2 Proteinini

egf17: Epidermal Growth Faktör 7

TNC: Tenascin C

VEGF: Vasküler Endotelial Growth Faktör

RTK: Reseptör Tirozin Kinaz

PIP3: Fosfotidil İnositol Fosfat 3

PIP2: Fosfotidil İnositol Fosfat 2

PI3K: Fosfotidil İnositol 3 Kinaz

SPRED-1: VEGF Sinyal İletimini Engelleyen Tomurcuklanmayla Alakalı Protein 1

PIK3R2: Fosfotidil İnositol-3 Düzenleyici Altbirim 2

VCAM-1: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü 1

FGF: Fibroblast Growth Faktör

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffer Saline)

RT: Revers Transkriptaz

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-PCR, RT-PCR)

BRCA: Meme Kanseri (Breast Cancer)

LOH: Heterozigotluğun Kaybı (Loss of heterozygot)

C_T: Eşik-değer döngü (Threshold cycle)

GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser latince "yengeç" anlamına gelir. Yengeç düşmanını kısırdıktan sonra uzun, dişli kollarıyla sıkıca tutar ve yavaş yavaş kemirerek yer. Bu nedenle, tedavi edilmediği takdirde insanı giderek zayıflatıp halsiz düşüren ve sonunda öldüren bu hastalığa "kanser" adı verilmiştir (60). Kanser hücrelerinin analizi hemen her zaman değişime uğramış tek bir hücrenin büyümesiyle tümörlerin oluştuğunu göstermektedir. Kanser, hücre kontrol mekanizmalarına yanıt veren normal hücrelerin bu mekanizmaların kontrolünden çıkmasıyla, sınırsız olarak büyüeyebilen ve vücudun diğer dokularına saldıran hücrelerin oluştuğu hastalık grubudur. Kanser olgusunun başlangıcı, bu proteinleri kodlayan genlerden birinin mutasyona uğramasına dayanmaktadır (52).

Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra, dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanser tipidir. Her sekiz kadından birinin hayatının belirli bir zamanında meme kanserine yakalanabileceği bildirilmektedir. Erkeklerde de görülmekle beraber, kadın vakaları erkek vakalarından yüz kat fazladır. Meme kanseri süt üreten ya da süt taşıyan dokulardaki hücrelerden köken alır (31). Meme kanserinin yaklaşık % 80'i süt (laktifer) kanalların epitel tabakalarından köken alır. Laktifer kanallardaki epitel hücre tabakaları östrojen reseptörüne sahiptir ve meme tümörlerinin yaklaşık % 50-85'i östrojen reseptörü içerir. Alfa (α) ve beta (β) olmak üzere iki tip östrojen reseptörü vardır. α reseptörü östrojene β reseptöründen daha fazla bağlanma yeteneğine sahiptir. β reseptörü, α reseptörünün fizyolojik düzenleyicisi olarak rol oynar. Normal meme dokularına oranla saldırgan (invaziv) tümörlerde α reseptörünün ekspresyonu β reseptöründen daha fazladır. Bu bulgular gelişen meme tümörlerindeki olası risklerde ve dokuların östrojene duyarlılığını belirlemede reseptörler arasındaki ayarın önemli olduğunu göstermektedir. Östrojen bağımlı tümörlerin çoğu antiöstrojenik tedaviden sonra (antiöstrojen olan tamoksifen ile tedaviden sonra) geriler (31).

Hastalığın tanısında bireylerin kendisini elle muayene etmesi önemlidir, rutin kontroller ve 40 yaşın üzerinde yılda bir kez mamografi çektilmesi önerilir. Memede kitle saptandığında kanser olup olmadığını anlamak için biopsi yapılır. Meme kanseri

tedavi şansı yüksek kanserlerdendir, en sık tedavi şekli cerrahidir (47). Meme kanserinin cerrahi tedavisinde genellikle meme dokusunun tümü alınır. Koltuk altı lenf bezleri de çıkartılarak yayılma olup olmadığı incelenir. Eğer kanser yayılmışsa radyoterapi yada kemoterapi uygulanır (61).

Küçük RNA'lar (sRNA), çift sarmal RNA'lardan (dsRNA) oluşan 19-28 nükleotid uzunluğunda, kodlama yapmayan RNA'lardır. Bazılarının, mRNA'ların bir parçası ya da genomun transkripsiyona katılmayan ama DNA'nın büyük bir bölümünü oluşturan intergenik alanlarından olduğu düşünülmektedir. En önemli görevleri gen aktivasyonunu değiştirmek veya azaltmak amacıyla kullanılan bir teknik olan gen susturulmasında rol oynamalarıdır (18). Küçük RNA'lardan mikroRNA (miRNA)'lar ve küçük engelleyici RNA (small interference/short interference, siRNA)'lar iyi tanımlanmıştır. miRNA ve siRNA'lar biyokimyasal ve fonksiyonel olarak ayırt edilemediklerinden orijinlerine göre ayrılırlar. miRNA'lar dsRNA'ların saç tokası (hairpin) şekilli prekürsörlerinden elde edilirken, siRNA'lar uzun dsRNA'lardan oluşur (18).Sentezlendikleri yerlere bakıldığında ise siRNA'lar canlının kendi hücrelerinden elde edilebildiği gibi (endojen kaynaklı), dışarıdan herhangi bir bakteriofaj ya da virüs genomundan kaynaklanarak hücrelerde (ekzojen kaynaklı) girip hücrede gen susturmasını uygularlar. Oysaki miRNA'lar sadece endojen kaynaklıdır. Her iki kodlamayan küçük RNA'da da transfeksiyon yapılmasının yanı sıra siRNA'lar transpozon ve vektörler (bakteriofaj veya virüsler)tarafından da ekzojen olarak vücuda girebilirler. siRNA'lar gen susturulmasında rol alırlar ve böylece susturulan gen eksprese olamaz. miRNA'lar hedef hücrelerde etkiledikleri gen bölgelerini susturmayıp direkt ekspresyonlarını etkilemektedir. Bu nedenle miRNA'ların kanserin tanı ve tedavisinin araştırılmasında da kullanılabilirken, siRNA'ların sadece tedavi amaçlı kullanılabileceği düşünülmektedir (46, 54).

MikroRNA'lar (miRNA), hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyen, gelişme, farklılaşma, hücre çoğalması, apoptoz, stres cevapları gibi fizyolojik ve patolojik işlemlerin çeşitliliğinde önemli rol oynayan küçük düzenleyici RNA molekülleridir (4, 14, 16, 25, 33, 36, 42-44, 50, 53, 56, 67, 72, 73).miRNA'lar, 18-29 nükleotid

uzunluğunda olup Drosha ve Dicer adı verilen endonükleazlar tarafından saç tokası şeklindeki prekürsörlerden iki aşamada gerçekleşen bir mekanizmayla oluşurlar. Bu miRNA'lar translasyonel baskılanma ve mRNA parçalanması mekanizmalarını kullanarak hücre farklılaşması ve gelişiminde rol oynarlar (4, 12, 14, 33, 39, 42, 56, 67).

Şu ana kadar 1048 miRNA tanımlanmıştır ve bu miRNA'ların genlerde kodlanan tüm proteinlerin yaklaşık % 30'unu düzenlediği belirlenmiştir. Çoğu miRNA'nın, normal ve kanserli dokular arasında farklı şekilde eksprese edildiği bildirilmektedir. Örneğin; aynı miRNA meme ve pankreas kanserlerinde farklı ekspresyon miktarı gösterebilmektedir. miRNA ekspresyon profilleri kanserin tanı ve tedavisinde kullanılacak bir araç potansiyeline sahiptir. Yapılan gen ekspresyonu çalışmalarında hem mRNA hem de miRNA ekspresyonlarına bakıldığında, normal ve kanserli örneklerdeki mRNA ekspresyonunda herhangi bir değişim görülmezken, miRNA ekspresyonunda normal örneklerde artma görülürken, kanserli örneklerde azalma görülmektedir. Bu nedenden dolayı, miRNA'ların ekspresyon profilleri, tanının doğrulanması ve sınıflandırılmasında mRNA'lardan daha etkili şekilde kullanılabilir (36).

Mikro RNA 126 (miR-126), hedef hücrelerdeki mRNA'nın 3'UTR bölgesinde bulunan hedef genleri baskılar. Apoptozun erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, hacimlerinin 1/3'ünü kaybederek apoptotik vezikülleri oluştururlar. Sağlıklı hücrelerde fosfatidilserin plazma zarının iç yüzeyinde bulunur. Sağlıklı hücrelerin tersine, apoptotik hücrelerde plazma zarının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserin fagositik hücrelerin apoptotik hücreleri tanınması için bir sinyal oluşturur. Fagositik hücrelerin reseptörleri fosfatidilserine bağlanır ve fagositozu uyarır. Apoptotik veziküllerin yüzeyinde bulunan ve fagositler için "ye beni" sinyali üreten fosfatidilserin eksozomların yüzeylerinde eksprese edilir. Hücreler arası miRNA taşınması sadece eksozomlarla değil, aynı zamanda apoptotik veziküller kullanılarak da sağlanabilir. Böylece ortama dışarıdan verilen miR-126, yabancı bir bileşen gibi görülmeyip yıkım mekanizmalarından kaçabilir. Bu nedenle mikroRNA'lar fagositoza uğramadan kanda

serbestçe dolaşır. Kanda dolaşarak başka bir hücreye taşınan miRNA taşındığı hücrede de hedef geni baskılar ve hücrenin kanserleşmesini engeller(53).

miR-126 aynı zamanda vasküler sistemde de rol almaktadır ve epidermal büyüme faktörü benzeri 7'nin (egfl7) intron 7 bölümünde yer almaktadır (53).Epidermal büyüme faktörü benzeri 7 (egfl7) genine yerleşen miR-126, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) sinyal iletimini, anjiyogenezi ve vasküler bütünlüğünü düzenleyerek damar gelişiminde rol almaktadır. Omurgalılarda, egfl7 geni biyolojik olarak aktif miRNA'ları (miR-126) kodlar (16).

Çalışmamızda sağlıklı insanlarla karşılaştırıldığında, meme kanserinde miR-126 ekspresyonunun durumunu belirlemek hedeflenmiştir. Elde edilen veriler ışığında, miR-126 ekspresyon seviyesinin kanserde azalış gösterdiği kanısına varılmıştır. Buradan yola çıkarak ilerleyen dönemlerde hastalara lipozomlar gibi moleküler veziküller kullanılarak, uygulanan kanser tedavi yöntemleri arasında miRNA'ların da uygulanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca meme kanserinde miR-126 gen ekspresyonlarını belirlenerek bunun teşhis ve tanıya yönelik kullanılabilmesi de ihtimaller arasındadır. Bütün bu bilgilerin ortaya konması için ileride yapılacak ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Nükleik Asitler

Yapılarında C, H, O, N ve P bulunan nükleik asitler deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) olmak üzere iki çeşittir. İlk defa İsveçli biyokimyacı Friedrich Meischer tarafından çekirdekte keşfedildikten sonra hücrenin diğer kısımlarında da varlığı gösterilmiştir. DNA ve RNA yapılarında bulunan şeker moleküllerine göre adlandırılmıştır (6).

2.1.1 Nükleik Asitlerin Yapısında Bulunan Moleküller

Nükleik asitler yalnız kalıtsal bilgiyi taşıyan makromoleküller olmakla kalmayıp bu bilgiyi proteinlere aktarmaktan da sorumludur. Bir polipeptidin sentezinden sorumlu deoksiribonükleik asit (DNA) parçasına gen adı verilir ve proteinlerin primer yapıları ile ilgili bilgiyi DNA molekülü taşımaktadır. Hücrede bulunan diğer bir nükleik asit olan RNA ise protein sentezinden sorumlu olup, kalıtsal bilginin taşınmasına katılmaz. Nükleik asitlerin yapısında temel olarak 3 farklı molekül yer almaktadır. Bunlar; 5 C'lu şekerler, azotlu bazlar ve fosfat gruplarıdır (24).

2.1.1.1 Şekerler

Şekerler, nükleik asitlerin ana omurgası boyunca yer alan ünitelerdir. Beş karbonlu pentozlardır. DNA yapısında deoksiriboz şekeri, RNA yapısında riboz şekeri yer alır. Şekerler arasındaki başlıca fark 2 nolu karbon atomuna bağlı -OH grubundaki oksijenin deoksiriboz şekerinde eksik olmasıdır (24).

2.1.1.2 Bazlar

Nükleik asitlerin yapısında yer alan bazlar iki gruba ayrılır. Bunlar pirimidin ve pürin bazlarıdır. Pürin ve pirimidin bazları ışığı 250-280 nm'de absorbe ettiklerinden, nükleotidlerin kantitatif analizleri yapılabilmektedir (24).

2.1.1.2.1 Pirimidin Bazları

Bu bazlar bir halkada sıralanan dört karbon ve iki azot atomundan yapılmış temel iskelete sahiptir. Pirimidin bazları, sitozin, timin ve urasildir. Sitozin hem DNA hem de RNA yapısında; urasil sadece RNA'da, timin ise sadece DNA yapısında bulunur. Yapılarındaki numaralama iskeletin alttaki azotunda başlar, saat işleyişinin ters yönünde devam eder (6).

2.1.1.2.2 Pürin Bazları

Karbon ve azot atomlarından kurulu iki halka şeklinde temel bir iskelete sahip olan bazlardır. Birinci halka pirimidin iskeleti ile aynıdır. Buna eklenen iki azot ve bir karbon atomu ikinci halkayı meydana getirir. Pürinlerin halkasal yapısındaki numaralama pirimidin halkasındaki üç nolu azotta başlar ve saat işleyişinin aksi yönünde devam eder.

Pürin bazları adenin ve guaninden oluşmaktadır. Her ikisi de hem DNA'da hem de RNA'da bulunmaktadır. Ayrıca nadir de olsa; ksantin, hipoksantin ve ürik asit de nükleik asitlerin yapısında yer alabilmektedir (6).

2.1.1.3 Nükleozidler

Nükleik asitlerin temel yapısında baz, şeker ve fosfat grupları yer alır. Beş karbonlu şekerin bir nolu karbon atomuna bir pürin ya da primidin bazı bağlanınca nükleozidler meydana gelir(72). Şeker ve bazlar arasındaki bağa β -N-glikozidik bağ denir. Bazların riboza bağlanmasıyla ribonükleozidler, deoksiriboza bağlanmasıyla ise deoksiribonükleozidler meydana gelir. Nükleozidler yapılarındaki bazların adı ile isimlendirilir. Örneğin; adeninnükleozidi adenozin timinnükleozididir yani timidindir (6).

2.1.1.4 Nükleotidler

Nükleozid yapısında yer alan beş nolu karbon atomuna bir fosforik asit ilavesiyle nükleotidler (nükleotid monofosfat) meydana gelir (6). Fosfat grubu üçüncü ve beşinci karbonlara aynı anda bağlanınca halkasal fosfat türevleri oluşur. Nükleotidlere iki veya üç fosfat grubu bağlanırsa sırasıyla nükleotid difosfat ve nükleotid trifosfat adını alırlar.

Di ve trifosfatlar çeşitli enzimatik reaksiyonlar ile hidrolize olarak enerji kaynağı görevi yaparlar (72).

2.2 Nükleik Asitler ve Polinükleotidler

Genellikle 50 veya daha az sayıda nükleotid içeren polimerler oligonükleotidler, daha çok sayıda nükleotid içeren nükleik asitler ise polinükleotid olarak isimlendirilir (72). Bir nükleotiddeki şekerin 5'- karbonuna bağlı fosfat grubunun -OH'i ile diğer nükleotiddeki şekerin 3'-OH grubu arasında bir fosfodiester bağı oluşur. Bu şekilde nükleotidlerin fosfodiester bağlarıyla birbirlerine bağlanmalarıyla uzun polinükleotid zincirler ortaya çıkar (7).

2.3 Nükleik Asitlerin Karşılaştırması

Nükleik asitlerden DNA ve RNA arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin; DNA'nın yapısında deoksiriboz şekeri bulunurken, RNA'nın yapısında riboz şekeri bulunur. DNA'nın yapısında bulunan adenin, guanin, sitozin ve timin bazlarına karşılık RNA'nın yapısında adenin, guanin, sitozin ve urasil bulunur. Yani DNA'daki timin'in yerini RNA'da urasil almaktadır. DNA hemen hemen her zaman çift sarmal yapıda bulunur. İstisna olarak bazı virüslerdeki DNA tek dallıdır. RNA ise genellikle tek dallı olup, bazı durumlarda örneğin; tRNA'nın bazı kısımlarında çift sarmalıdır. DNA her zaman kalıtsal bilgiyi taşıyan molekül olarak görev yapar. RNA ise, yapısal görev yapar, ayrıca protein sentezinde genetik bilginin DNA'dan proteine aktarılmasında da aracı rol oynar. Bununla birlikte, çok nadir hallerde, nükleik asidi RNA olan virüslerde, kalıtsal bilgiyi taşıyan bir molekül olarak da görev yapar. DNA'da adenin sayısı timine, guanin sayısı ise sitozine eşittir, RNA'daki bazlar arasında böyle bir oran yoktur (20) (Tablo 2. 1).

Tablo 2.1. DNA ve RNA Arasındaki Farklar (20 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

	DNA	RNA
Şeker birimi	Deoksiriboz	Riboz
Yapısı	Çift zincirli	Tek zincirli
Karakteristik pirimidin zinciri	Timin	Urasil
Tipleri	A, B ve Z	m, t, r, hn, sn, si ve miRNA

2.3.1 DNA molekülü

Kalıtsal materyalin kesinlikle DNA olduğu anlaşıldıktan sonra DNA'nın yapısını anlamak için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. 1953 yılında Cambridge Üniversitesi'nde çalışan Amerikalı genetikçi James D. WATSON ve İngiliz fizikçi Francis H.C. CRICK o güne kadar ortaya konan bilgileri değerlendirerek bugün de geçerliliğini sürdüren DNA'nın üç boyutlu yapısına ait bir model önermişlerdir. Bu modeli açıklarken Watson ve Crick iki önemli bilgi kaynağını kullanmışlardır. Bunlardan ilkinde; Erwin CHARGAFF nükleik asitleri meydana getiren 4 bazı (adenin, guanin, sitozin ve timin) farklı DNA kaynaklarından elde ederek ölçmüş ve adenin miktarının daima timine, guanin miktarının da sitozine eşit olduğunu belirtmiştir. İkinci kaynak Maurice WILKINS ve arkadaşları ile kısmen Rosalind FRANKLIN'in DNA ile yaptığı X-ışınları kristallografi çalışmalarıdır. Bu araştırmacılar DNA'nın sarmal yapısını ortaya koymuş ve linear haldeyken molekülün çapının 2 nm (20 Å), iki baz sırası arasındaki mesafenin 0.34 nm ve DNA'nın bir dönüşünün 3.4 nm olduğunu ve bir dönüşü yaklaşık 10 bazın sığdığını belirtmişlerdir. Bütün bu bilgilerin ışığı altında Watson ve Crick'in ileri sürdüğü modele göre: çift zincirden meydana gelen DNA bir eksen doğrultusunda sağ el çift sarmalı meydana getirir (24).

DNA'nın bu iki sarmalı birbirine antiparalel olarak devam eder. Yani zincirlerden birinin 3' ucu ve diğerinin 5' ucu aynı tarafta bulunur. DNA'nın omurgasını oluşturan, hidrofilik özelliğe sahip şeker ve negatif yüklü fosfat üniteleri çift sarmalın dışa bakan yüzünde ve kendilerini saran su moleküllerine dönüktür. Hidrofobik özelliğe sahip olan pürin ve pirimidin bazları ise çift sarmalın içe bakan yüzünde ve ana eksene dik olarak yer alır. Çift sarmalın çapı 2 nm (20 Å)'dur. Birbirini takip eden bazlar 36° dönüş

göstererek dizilir ve 10 bazın arka arkaya gelmesi çift sarmalın bir tam dönüş yapmasına neden olur. Bir tam dönüşte çift sarmalın boyu 3.4 nm (34 Å) uzar ve her baz 0.34 nm'lik (3.4 Å) bir boy artışı sağlar. DNA'nın iki zinciri bir eksen boyunca çift sarmal meydana getirir. Ancak belirli baz çiftleri 20Å çapındaki çift sarmalın içine sığar. Eğer karşı karşıya duran bazlardan biri pürin ise diğeri mutlaka pirimidin olmalıdır. Çünkü iki pürin bu yapı için büyük, iki pirimidin ise küçüktür (24).

DNA çift sarmalını başlıca iki kuvvet bir arada tutar. Bunlardan birincisi birbirinin komplementeri olan bazlar arasındaki hidrojen bağları, ikincisi ise sarmalın içindeki korunmuş kısım ile sarmalın dışında ve oldukça polar özelliğe sahip kısım arasındaki hidrofobik etkileşimdir. Çift sarmalın omurgasını oluşturmada görev alan fosfat grupları pH 7.0'de negatif yüklüdür ve bu nedenle de nötr pH'da DNA molekülü kuvvetli asidiktir (24).

2.3.2 RNA Molekülü

Adenin, sitozin, guanin ve urasil bazlarını içeren ribonükleotidlerdir. RNA genomuna sahip bazı virüsler hariç tutulduğunda, bütün RNA molekülleri DNA içinde uzun süreli depolanmış bilgiden meydana gelmektedir. RNA bazı virüsler (çift zincirli RNA virüsleri) ve fajlar hariç tutulduğunda tek zincirli bir polinükleotidtir. Kimyasal yapı olarak DNA'ya çok benzemektedir ve hücredeki kararlılığına bakılırsa DNA'dan daha az kararlıdır. RNA hücredeki genetik bilgi transferini sağlayan tüm aşamaları kapsayan işlemlerde büyük bir öneme sahiptir. DNA'daki bilgi transkripsiyon ile RNA'ya aktarılır ve sonrasında RNA'ya aktarılan bilgileri translasyon ile proteinleri meydana getirir. Ökaryotik hücrelerde transkripsiyon çekirdekte, translasyon ise sitoplazmada olmaktadır (8).

RNA molekülü de DNA gibi 260 nanometre (nm) dalga boyundaki mor ötesi (ultraviyole) ışıkta en üst düzeyde emilim verir. RNA da DNA gibi bazik boyalarda boyanır. RNA molekülü kimi özel durumlar dışında tek dallıdır. Temel olarak 3 tip

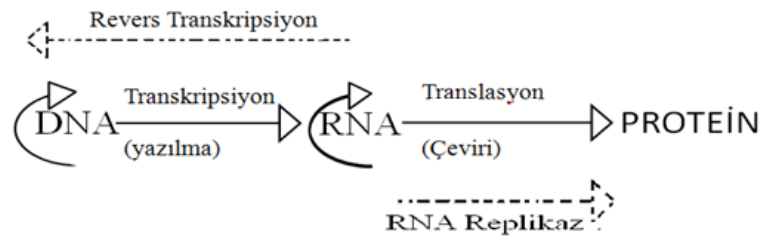
RNA vardır. Ayrıca bu 3 temel RNA'ya ek olarak small nüklear RNA (snRNA) ve heterojen RNA (hnRNA) da bulunmaktadır (8).

2.3.2.1 Haberci RNA (mRNA)

Haberci RNA, mRNA, çekirdekte kromozomun aktif ökromatin bölgesinden sentezlenir. mRNA sentezlenirken çift dallı DNA'nın (dsDNA) sarmalı çözülür ve kalıp görevi yapan DNA dalının karşısında RNA polimeraz enzimi yardımıyla mRNA molekülü şifrelenerek yazılır. Böylece üçlü nükleotidler halinde mRNA zinciri oluşturulur. mRNA'daki üçlü şifreye kodon denir. mRNA, DNA karşısından ayrılır ve bu arada açılmış bulunan DNA sarmal bölümü tekrar kapanır. Sentez sırasında RNA polimeraz enziminden başka, aktive edilmiş öncül moleküller ve Mg^{++} iyonlarına ihtiyaç vardır (24).

mRNA zinciri DNA'dan ayrıldıktan sonra nükleustan çıkarak ribozomlara gelir ve ribozomun küçük alt birimine bağlanır. DNA üzerindeki genetik bilginin, mRNA molekülüne aktarılmasına yazılma (transkripsiyon), mRNA'dan protein molekülü şekline döndürülmesine de çeviri (translasyon) denir (6).

Genetik bilginin DNA'dan RNA'ya bundan da proteine aktarılması şeklinde ortaya çıkan bu akış yolunu Francis CRICK, 1956 yılında, santral dogma olarak adlandırmıştır. Bu kurama göre; DNA kendi kendine çoğalır ve RNA'ya kalıplık yapar, RNA da protein sentezini sağlar. Proteinden DNA'ya dönüş olmamaktadır (24) (Şekil2. 1).



Şekil 2.1. Santral Dogma (24 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

Ancak virüslerle yapılan araştırmalar, RNA moleküllerinin DNA'ya kalıplık yaptığı göstermiştir. Bunu sağlayan enzime revers transkriptaz adı verilmektedir. Bu olaya örnek olarak *Raus sarcoma* virüsünü verebiliriz. Bu virüs sahip olduğu revers transkriptaz enzimi sayesinde kendi RNA'sını kalıp olarak kullanarak DNA sentezi sağlamaktadır. Yine bazı *E. coli* suşlarının sahip oldukları RNA replikaz enzimi sayesinde kendi RNA'larını kalıp olarak kullanarak yeni RNA'lar ve bunlar aracılığıyla da protein sentezledikleri anlaşılmıştır (6).

Hershey 1952 yılında, *E. coli*'nin T2 bakteriofajı ile enfeksiyonunda çok hızlı bir RNA yıkımının yanında çok hızlı bir RNA sentezinin de olduğunu gösterdi. Çünkü faj, enfekte ettiği bakterinin metabolizmasını kendi proteinlerini üretecek şekilde değiştirmekteydi. Hızlı üretilen RNA parçası 1961 yılında MONAD ve JACOB tarafından mRNA olarak adlandırıldı (8).

mRNA'nın geç keşfedilmesinin bazı nedenleri vardır. Bunlardan biri hücre DNA'sının büyük bir kısmı protein oluşumunu kodlamakla beraber, sentezlenen mRNA hücredeki tüm RNA'nın ancak % 5'i kadardır. mRNA'nın yıkımından bir seri enzim sorumludur. Polinükleotid fosforilaz aracılığıyla mRNA, serbest nükleozidlere kolaylıkla yıkılır. Bu enzim interfaz evresinde mRNA'nın tekrar tekrar kullanımını kontrol eder. Başka bir özelliği ise, hücre eğer bir işlev için programlanmamış ise meydana gelecek mRNA'lar da değişik özelliklerde olacaktır. Çünkü her biri değişik bir proteinin sentezini yönetecektir. Yapılan çeşitli kromatografik çalışmalarla birçok mRNA çeşidi belirlenmiştir. mRNA'nın kalıp aldığı DNA bir bireyin tüm hücrelerinde aynıdır. Bununla beraber dokularda hatta aynı hücre içinde farklı mRNA'lar üretilir. Ayrıca, mRNA, DNA'yı kalıp almasına karşılık, baz dizilimi DNA'nınki ile aynı değildir. Çünkü DNA'nın tümü kalıp olarak kullanılmaz, ancak belirli bölgeleri kalıp olarak kullanılır. Bu nedenle mRNA ile DNA arasında ancak bölgesel bir benzerlik bulunur (8).

Yapılan çalışmalar hemen hemen bütün ökaryotik mRNA'ların monosistronik olduğunu, yani sadece bir protein zinciri sentezlediğini ortaya koymuştur. Buna karşılık

prokaryot mRNA'ları polisistroniktir, yani birkaç polipeptid zincir sentezlerler. Ökaryotik mRNA'lar protein sentezi için tek başlama bölgesine sahipken prokaryotik mRNA'lar birkaç tane başlama ve sonlanma noktasına sahiptir. Bu özellik onların boyuna da yansır, bu yüzden prokaryotik mRNA daha uzundur (24).

2.3.2.2 Taşıyıcı RNA (tRNA)

mRNA üzerindeki nükleotid dizisi ile sentezlenmekte olan protein zincirindeki amino asit dizilimini birbirine bağlayan bir adaptör molekülün bulunması gerekir. Bu moleküller bazı amino asitlere özel olarak bağlanma yeteneğinde oldukları için taşıyıcı RNA (tRNA) olarak adlandırılır. tRNA'lar kendilerine öz oldukları amino asitin adıyla anılırlar. Örneğin: Glisine öz tRNA, tRNA_{glisine} yada kısaltılmış olarak tRNA_{gly} olarak yazılır (24).

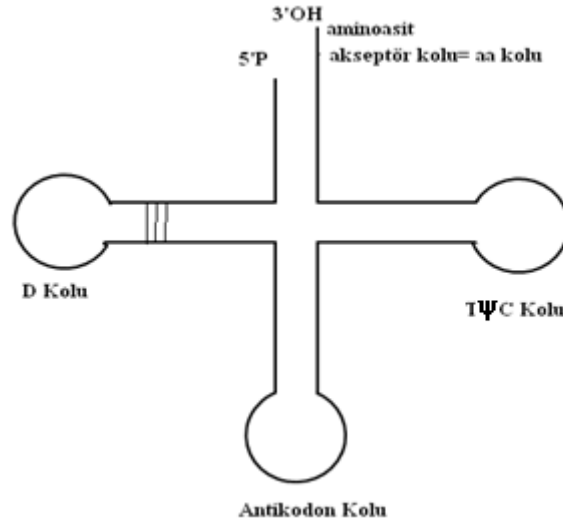
tRNA molekülleri nisbeten küçük moleküller olup yaklaşık 70-80 nükleotid uzunluktadır. Bir öncü molekülün çekirdekte işlenmesi ile oluşurlar. tRNA molekülleri, mRNA nükleotidlerindeki bilginin özel aminoasitlerce tanınmasında adaptör olduklarından ve hücrede de doğal olarak 20 çeşit amino asit bulunduğundan, her hücrede, en az 20 çeşit tRNA molekülü vardır. Çekirdekte sentezlenen tRNA'nın primer yapısı, bir yonca yaprağını andıracak şekilde 3 boyutlu olarak kıvrılarak olgunlaşır. Aldığı son şekil Watson-Crick baz eşleşmesinde 4 kollu olarak tanımlanır. Bu 4 koldan üçü halka şeklinde sonlanır (Şekil 2.2) (6).

Amino asit (akseptör) kolu, tRNA'nın 3' ucunda çıkıntı yapan CCA dizisiyle sonlanan, karşılıklı olarak eşleşmiş bazlardan ibaret kısımdır. Amino asitlerin tRNA'ya bağlandığı bölgedir. Amino asitler karboksil grupları (-COOH) ile tRNA'nın 3' ucundaki adeninin hidroksiline (OH) bağlanırlar (8).

Bazların karşılıklı olarak eşleşmiş olduğu bir bölgenin ucundaki halkasal yapıdaki antikodon kolu, mRNA'daki kodonu tanır. Dolayısıyla bu bölge kodona tamamlayıcı olan bir nükleotid dizisine sahiptir. Kodon ve antikodon bağlanmalarında Watson-Crick tarafından önerilen ve birbirinin tamamlayıcısı olan bazların çiftler oluşturması prensibi

söz konusudur. Kodonlardaki üçlü bazlar, antikodonda antiparalel yönde devam eder (24).

D kolu, dihidroüridin bazının varlığından dolayı bu ismi almaktadır. Amino asitlerin tRNA moleküllerine bağlanmalarını sağlayan amino açil sentetaz enzimini tanıır.TψC kolu, T, pseudoüridin (ψ) ve C içermektedir. Ribozomu tanıyan koldur (20).



Şekil 2.2.Taşıyıcı RNA'nın (tRNA) Yapısı (20 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

2.3.2.3 Ribozomal RNA (rRNA)

Ribozomların yapısında % 60 oranında rRNA ve % 40 kadar protein bulunur. rRNA her zaman ribozomu oluşturan proteinlere bağlı olarak bulunur. rRNA'nın görevi ribozomun oluşmasını sağlamaktır. Çekirdekçiği oluşturan 13, 14, 15, 21 ve 22.kromozomların satellit saplarındaki DNA, rRNA kodlayan genleri taşır. Transkribe olan bu genlerin oluşturduğu 45S rRNA, prekürsör rRNA'dır. Bu 45S prekürsör rRNA'dan 5.8S, 18S ve 28S'lik rRNA'lar oluşur. Bunlara sitoplazmadan gelen ribozomal proteinlerin de katılmasıyla çekirdekçikte büyük bir ribonükleoprotein kompleksi meydana gelir.Bu kompleksten 18S'lik rRNA ayrılarak ribozomun küçük alt birimini, diğer 5.8S ve 28S rRNA ile çekirdekten gelen 5S rRNA da büyük alt birimi oluşturur.Çekirdekçikteki henüz olgunlaşmamış bu alt birimler çekirdeğe geçerek olgunlaşır ve çekirdek porlarından da sitoplazmaya geçerler(6).

2.3.2.4 Heterojen RNA (hnRNA)

Çekirdekte bulunur. Moleküler ağırlığı fazla olan mRNA öncüleridir. Diğer deyimle öncü mRNA heterojen RNA (hnRNA)'dır. Kesip çıkarma (splicing) olayının gerçekleştirilmesinde etkili olan intronları yapılarında taşırlar. İtronların çıkartılıp, geriye kalan ekzonların birleştirilmesiyle mRNA'ları oluşturmak için üretilirler. hnRNA sitozolik RNA'da bulunan dizileri içerir (6-8, 20, 24, 72). Proteinlerle kompleks yaparak heterojen çekirdek ribonükleoprotein partikülleri (hnRNP) olarak adlandırılan yapıları oluşturur. hnRNP moleküllerinin sadece %25 kadarı mRNA'ya çevrilir. Bunlar arasından mRNA'ya çevrilenlerde, ribonükleotid dizilerinin oldukça önemli bir miktarı kesilip çıkarılır ve geri kalan parçalar translasyondan önce birleştirilir. Bu olay ökaryotlarda, parçalı genler (split genler) ve kesip çıkarma ve tekrar birleştirme (splays) olarak adlandırılır (8).

2.3.2.5 Small Nüklear RNA (snRNA)

Yalnızca çekirdekte bulunur. Üridin bakımından zengindir ve altı tipi vardır (U1-U6), herbirinde 100-215 nükleotid bulunur. RNA kesilmesi ile ilişkilidir. Proteinlerle kompleks yaparak küçük çekirdek ribonükleoproteinleri (small nuclear ribonucleoproteins; snRNP, snurplar) oluştururlar (8). U1'in snRNA'sı intronun 5'-ucu ile homolog olan bir nükleotid dizisi içerir. Bu homoloji nedeniyle meydana gelen baz eşleşmesi, kesip çıkarma ve tekrar birleştirme yapana mekanizmasının (splayozom) ilk basamağını oluşturup bağlanmayı kolaylaştırır (12-17). U2, U4, U5 ve U6 katılımı ile kesip çıkarma (splicing) işlemi başlar (8).

2.4 Kodlamayan RNA Tipleri

Küçük RNA'lar (sRNA), çift sarmal RNA'lardan (dsRNA) oluşan 19-28 nükleotid (nt) uzunluğunda, kodlama yapmayan RNA'lardır. Bazılarının, mRNA'ların bir parçası ya da genomun transkripsiyona katılmayan ama DNA'nın büyük bir bölümünü oluşturan intergenik alanlarından olduğu düşünülmektedir. En önemli görevleri gen aktivasyonunu değiştirmek veya azaltmak amacıyla kullanılan bir teknik olan gen susturulmasında rol oynamalarıdır. Küçük RNA'ların keşfedilmesiyle bu

moleküllerin hücrede hedeflenen bir genin susturulmasını sağlayan ve tetikleme yoluyla çalışan bir mekanizma olan RNA interferans (RNAi), co-supresyon ve post transkripsiyonel düzenlemeler gibi kavramlar ortaya çıkmıştır. Co-supresyon, bir genin iki allelinden herhangi birinin dominant olmadığı her iki allelin de eşit miktarda çalıştığı eş baskılamadır. RNA'lar sentezlendikten sonra 5' ucunda 7-metil guanozin şapka oluşumu, poli A kuyruğunun takılması ve herhangi bir protein kodlamayan intronların uzaklaştırılması gibi sonradan yapılan değişiklikler post-transkripsiyonel düzenlenmelerdir (18).

Küçük RNA'lardan mikroRNA (miRNA)'lar ve küçük engelleyici RNA (small interference/short interference, siRNA)'lar iyi tanımlanmıştır.

miRNA ve siRNA'lar biyokimyasal ve fonksiyonel olarak ayırt edilemediklerinden orijinlerine göre ayrılırlar. miRNA'lar dsRNA'ların saç tokası (hairpin) şekilli prekürsörlerinden elde edilirken, siRNA'lar uzun dsRNA'lardan oluşur (18). Sentezlandıkları yerlere bakıldığında ise siRNA'lar canlının kendi hücrelerinden elde edilebildiği gibi (endojen kaynaklı), dışarıdan herhangi bir bakteriofaj ya da virüs genomundan kaynaklanarak hücrelerde (ekzojen kaynaklı) girip hücrede gen susturmasını uygulurlar. Oysaki miRNA'lar sadece endojen kaynaklıdır. Her iki kodlamayan küçük RNA'da da transfeksiyon yapılmasının yanı sıra siRNA'lar transpozon ve vektörler (bakteriofaj veya virüsler) tarafından da ekzojen olarak vücuda girebilirler. siRNA'lar gen susturulmasında rol alırlar ve böylece susturulan gen eksprese olamaz. miRNA'lar hedef hücrelerde etkiledikleri gen bölgelerini susturmayıp direkt ekspresyonlarını etkilemektedir. Bu nedenle miRNA'ların kanserin tanı ve tedavisinin araştırılmasında da kullanılabilirken, siRNA'ların sadece tedavi amaçlı kullanılabileceği düşünülmektedir (46, 54). İlk keşfedilen küçük RNA miRNA'dır. miRNA'lar ve siRNA'lar arasındaki farklar Tablo 2. 2'de özetlenmiştir. Hem siRNA'lar hem de miRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alırlar (Tablo 2. 2) (46, 54).

Tablo 2.2.MikroRNA ile siRNA Arasındaki Farklar (46 ve 54 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

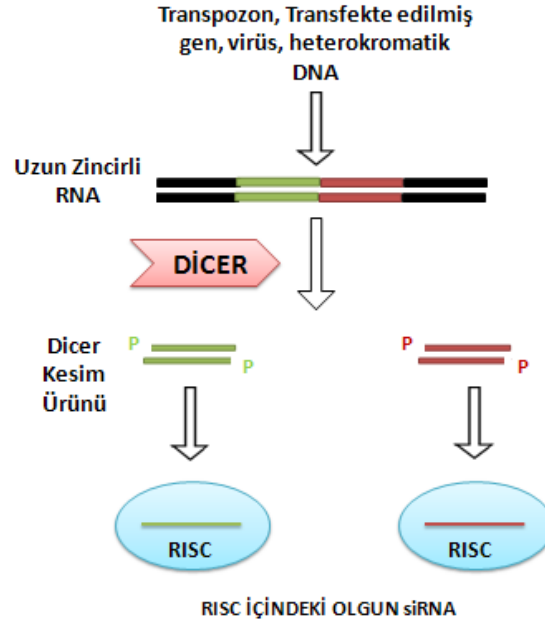
Özellik	miRNA	siRNA
Sentezi	Endojen RNA	Ekzojen veya Endojen RNA
Sentez enzimi	RNA Polimeraz II	RNA Bağımlı Polimeraz
Esas Etki Mekanizması	Translasyonun Baskılanması	mRNA'nın Yıkılması
Normal Homeostazda İşlevi*	Var	Var
Kanser Tanı ve Prognozunda Kullanımı	Var	Yok
Araştırma ve Tedavi Amacıyla Kullanımı	Var	Var

*Homeostaz: Hücre dışı gerçekleşen olaylar karşısında hücrenin kendi metabolizmasını koruma eğilimidir.

2.4.1 Küçük Engelleyici RNA (Short Interfering/Small Interference, siRNA) ve Oluşum Mekanizması

Hücrelerde RNAi mekanizmasını uzun dsRNA'lar başlatırken çoğu deneysel çalışmalarda etki edici moleküller olarak siRNA'lar kullanılmaktadır (46). siRNA'lar uygun mRNA yıkımı için rehber RNA olarak görev alırlar. Dicer enziminin nükleaz aktivitesi ile dsRNA'lar, 5'- fosfat ve 3'- hidroksil uçlara sahip ve 3'- hidroksil uçlarında 2- 3 nükleotidlik çıkıntı bulunan 21- 23 nükleotid uzunluğunda siRNA'lara parçalanırlar (Şekil 2.3) (54). siRNA'nın bu yapısal özelliği RISC kompleksine bağlanması ve RNAi mekanizmasının sonraki aşamaları için önemlidir. siRNA'lar homolog bir genin anlatımını (ekspresyonunu) hedef genin mRNA'sının yıkımını tetikleyerek, hedef genin mRNA'sının translasyonunu engelleyerek ya da transkripsiyonu başlatan bölgede (promotörde) geni sessizleştirici kromatin değişimlerini tetikleyerek engellerler (46, 54). RISC kompleksi bir siRNA tarafından çekirdek içindeki siRNA ile tamamlayıcılık ilişkisi gösteren bölgelere

yönlendirilir. Kompleks o bölgelerdeki genlerin promotörlerinin etrafındaki kromatini değiştirecek proteinleri oraya toplar. Bu değişim o genlerde transkripsiyon yapmamasına (sessizleşmesine) yol açar (54). Herhangi bir siRNA özel bir mRNA'nın bir bölgesini hedeflediği zaman, genelde aynı mRNA'daki komşu bölgeleri hedefleyen ek siRNA'lar üretilir. RNA'ya bağımlı RNA polimeraz original siRNA tarafından mRNA'da toplandıktan sonra bu ek RNA'ların üretiminde rol oynar (54).



Şekil 2.3. siRNA Oluşumu (54 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

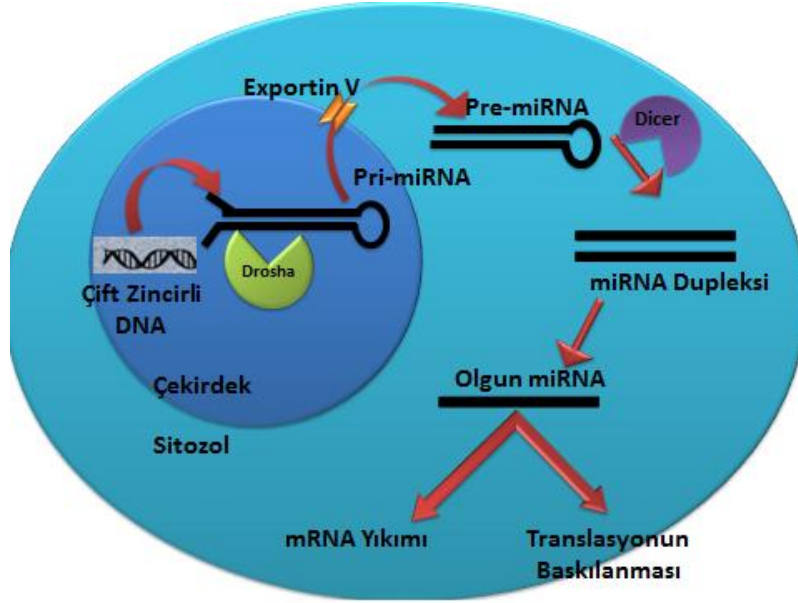
2.4.2 Mikro RNA (miRNA) ve Oluşum Mekanizması

MikroRNA'lar (miRNA), hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyen, gelişme, farklılaşma, hücre çoğalması, apoptoz, stres cevapları gibi fizyolojik ve patolojik işlemlerin çeşitliliğinde önemli rol oynayan küçük düzenleyici RNA molekülleridir (14, 17, 18, 33, 44, 46, 67, 74). İlk miRNA 1993'te *Caenorhabditis elegans*'ın genetik görüntülenmesi sırasında keşfedilmiştir. Ambros ve arkadaşları tarafından 22 nükleotid uzunluğundaki bu RNA molekülü ile ilişkili olan bir gen bularak, bu gene lin-4 adını vermişlerdir. Bu araştırmada keşfedilen lin-4 geninden üretilen pre-lin-4 olgun miRNA oluşturma basamaklarından geçerek mikro RNA halini alıp, lin-14 mRNA'nın 3' ucunda bulunan 3'-UTR bölgesine bağlanarak onun ekspresyonunu baskılar.

miRNA'lar, 18-29 nükleotid uzunluğunda olup Drosha ve Dicer adı verilen endonükleazlar tarafından ile saç tokası şeklindeki prekürsörlerinden iki aşamalı bir mekanizmayla oluşurlar. Bu miRNA'lar translasyonel baskılanma ve mRNA parçalanması mekanizmalarını kullanarak hücre farklılaşması ve gelişiminde rol oynarlar (4, 9, 12, 14, 33, 39, 42, 67).

miRNA'lar genellikle mRNA'nın dönüştürülmeyen 3' bölgesine (3' UTR) bağlanarak translasyonun baskınları ya da mRNA'yı yıkarlar (4). Böylece miRNA'lar translasyon proteinlerine ya mRNA'ları inhibe ederek ya da mRNA moleküllerinin yıkımına sebep olarak etki ederler. miRNA'lar translasyonun endojen inhibitörleri olarak görev yapmasıyla immün sistemdeki gen ekspresyonunun önemli düzenleyicileridirler (25). Farklı miRNA'lar, farklı mRNA'ları hedefler ve hedef özelliği miRNA ve mRNA molekülleri arasındaki dizi komplementerliği ile belirlenir (53). miRNA'ların her türünün yüzlerce farklı mRNA'yı hedef aldığına inanılır (14, 53). miRNA'ların serum ve plazmada bir biyomarker olarak bulunuşu kandan tanının yapılabilmesi için yeni bir kaynak oluşturmuştur (14, 44).

Mikro RNA'lar (miRNA), saç tokası yapısında (hairpin) RNA öncülerinden (prekürsörlerinden) yapılır. İlk olarak endojen genden (çekirdekdeki çift zincirli RNA) RNA polimeraz II (canlı türüne göre RNA polimeraz III de bulunabilir) yardımıyla primer miRNA (pri-miRNA) olarak transkribe edilir. Daha sonra RNA polimeraz III enzimi olan Drosha ile kesilip prekürsör miRNA (pre-miRNA) oluşur. Kesim işlemlerini takiben Exportin V taşıyıcı zar proteinlerinin sistemiyle sitozole geçip, Dicer ile kesilip miRNA oluşur. Son oluşan miRNA 21-25 nt uzunluğunda olup simetrik bir yapıdır (Şekil 2. 4) (9, 48, 53).

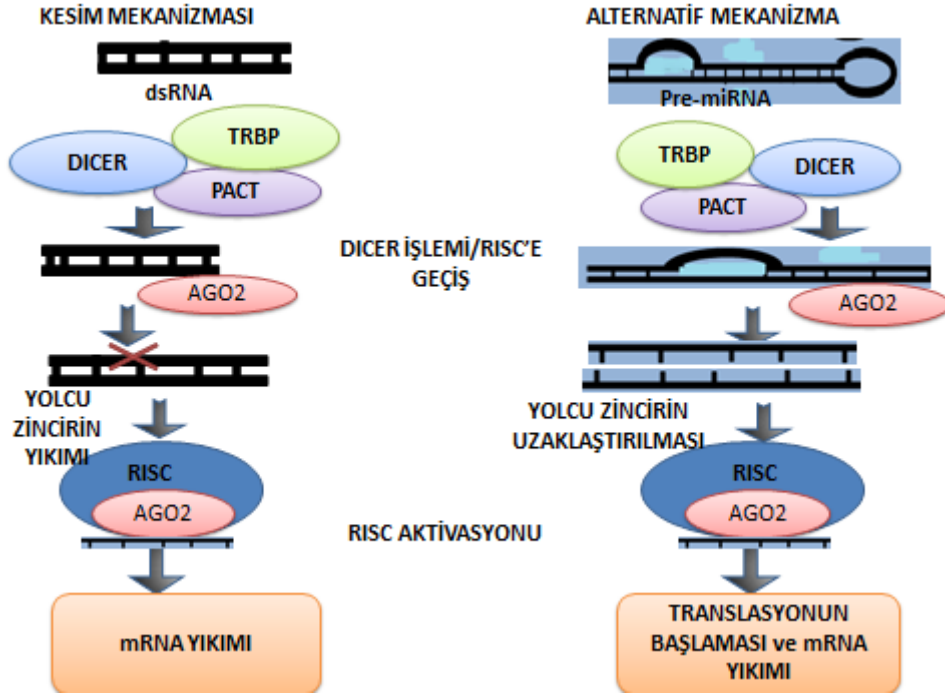


Şekil 2.4. miRNA'nın oluşumu ve hücre içinde izlediği yol (25 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

Çift zincirli RNA (dsRNA)'nın, miRNA/miRNA* (*: komplementer miRNA)'dan oluştuğu öne sürülmektedir. İki RNA zincirinden herhangi biri, olgun miRNA'yı oluşturmak için RNA indükleyen susturma kompleksine (RNA Induced Silencing Complex, RISC) girerken (rehber zincir), diğer zincir (yolcu zincir) RISC kompleksindeki argonat 2 proteinine (Ago2) bağlanır ve Ago 2'nin endoribonükleaz aktivitesi tarafından yıkılır. İki zincirden herhangi biri rehber zincir olabilir. RISC, ya hedef mRNA molekülleri üzerine olgun miRNA yükleyerek rehberlik yapıyorsa mRNA'nın yıkımına neden olur ya da translasyonunun baskılanmasına neden olur (25).

RISC, kısa çift zincirli RNA moleküllerinden oluşan RNAi'lerin (siRNA ve miRNA) işlenmesinden sorumlu olan bir multiprotein kompleksidir. RISC kompleksi (yaklaşık 500 kDa), endoribonükleaz etkisine sahip proteinlerden oluşur. Argonat 2 proteinleri, trans aktive eden RNA bağlayan protein (Trans-activated RNA Binding Protein, TRBP) ve çift zincirli RNA bağlayıcı protein olan PKR kinazın aktivator proteininden (PACT) oluşur (Şekil 2.5) (49). Argonat 2, RISC'in katalitik merkezinde tanımlanmıştır. Bu kompleks miRNA biyogenezi için gereklidir. RISC proteinleri, miRNA'lar, hedef miRNA'lar ve diğer proteinler P veya GW yapıları (P ve GW Body) olarak adlandırılan, lipid ya da lipozom kaynaklı sitoplazmik yapıların içinde bulunurlar(35). RISC, protein sentezini sağlayarak gen ekspresyonunun susturulmasını

sağlamaktadır. siRNA'nın tek bir zinciri ya da miRNA dupleksi bir ribonükleoprotein efektör kompleksine (RISC) dahil olur. RISC, kalıp RNA ile mRNA arasındaki komplementerlikten kaynaklanan hedef mesajları tanımlar veya hedef mRNA'nın endonükleolitik yıkımıyla ya da translasyonel baskılamayla sonuçlanır (Şekil 2. 5) (55).



Şekil 2.5. RISC kompleksinin yapısı ve mRNA yıkımındaki rolü (55 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

Araştırmalar Dicer'in post transkripsiyonel gen susturulmasındaki özelliğinin sadece siRNA ve/veya miRNA oluşumunun başlangıç fazında değil aynı zamanda da efektör fazında da olabileceğini göstermektedir. Ayrıca pre-miRNA işlemi ve RISC fonksiyonel olarak eşleşmiştir ve ATP'ye ihtiyaç duymazlar. Argonat proteinleri RNAi efektör kompleksinin bileşenleridir. miRNA ve siRNA biyokimyasal bileşikler olmasına rağmen, RISC'e giren RNA'ların hepsi argonat proteinlerine bağlanır ve benzer yollarda susturulmaları tanımlanır. RISC, ürünlerin salınması için ATP'ye ihtiyaç duymayan bir enzimdir. Tüm nükleotid analogları RISC aktivitesinde artış göstermektedir. RISC aktivitesi, tuz titrasyonu ile ölçülebilir ve 80 mM'dan 160mM'akadar olan KCl koşullarında RISC aktivitesi değişmez. Nükleotidlerin çoklu

fosfat parçalarının bulunması RISC aktivitesini hızlandırır. RISC aktivitesi NaCl içeren reaksiyonlarda değişmez ve düzenleyici etkileri fosfat parçalarıyla alakalıdır (21).

Geçtiğimiz birkaç yılda, kanser hücrelerinde miRNA'ların önemi tanımlanmıştır (14). Kanserlerde yer alan miRNA genlerini yöneten genomik ve gen ekspresyonları çalışmasında genetik olarak kanserli fareler kullanılmıştır (44). Normal ve kanserli dokulardaki miRNA ekspresyon çalışması miRNA ekspresyon kalıplarını açıklamaktadır (44). Tümör hücrelerinin az miktarda farklılaşması ya da yüksek oranda çoğalması tümör genез sırasında miRNA seviyelerinin azaldığını göstermektedir, bu da bazı çoğalma ya da hayatta kalma avantajları sağlamaktadır (44). miRNA ekspresyonunun düzenli kontrolü, hücre mekanizmasının korunması için önemlidir. Son zamanlarda, ribonükleaz hem plazma hem de serumda bulunmasına rağmen, hücre dışı miRNA'lar sağlıklı insanların ve hastaların kanında dolaşır. Dolaşan miRNA'ların çoğu apoptotik yapılar, mikroveziküller ya da eksozomlar gibi sabit yapı olan lipid ya da lipoprotein komplekslerinin içinde bulunur (14). miRNA ekspresyonunun şekillenmesi kullanışlı bir tanı ve prognostik araç olarak kullanılması önemli şekilde artmaktadır ve çoğu çalışmaya göre; miRNA'ların ya bir onkogen ya da bir tümör baskılayıcı olarak kullanılabilir olması nedeniyle önemli olduğu düşünülmektedir (14, 16, 25, 44).

Şu ana kadar 1048 miRNA tanımlanmıştır ve bu miRNA'ların genlerde kodlanan tüm proteinlerin yaklaşık %30'unu düzenlediği belirlenmiştir. Çoğu miRNA'nın, normal ve kanserli dokular arasında farklı şekilde eksprese edilmiştir. Örneğin; aynı miRNA meme ve pankreas kanserlerinde farklı ekspresyon miktarı gösterebilmektedir. miRNA ekspresyon profilleri kanserin tanı ve tedavisinde kullanılabilir bir araç potansiyeline sahiptir (36, 37). Yapılan gen ekspresyonu çalışmalarında hem mRNA hem de miRNA ekspresyonlarına bakıldığında, normal ve kanserli örneklerdeki mRNA ekspresyonunda herhangi bir değişim görülmezken, miRNA ekspresyonunda artma ve artış görülmektedir. Bu nedenden dolayı, miRNA'ların ekspresyon profilleri, tanının doğrulanması ve sınıflandırılmasında mRNA'lardan daha fazla kullanılmaktadır (36,37).

2.5 Kanser ve Oluşum Şekilleri

Kanser latince "yengeç" anlamına gelir. Yengeç düşmanını kısırdıktan sonra uzun, dişli kollarıyla sıkıca tutar ve yavaş yavaş kemirerek yer. Bu nedenle, tedavi edilmediği takdirde insanı giderek zayıflatıp halsiz düşüren ve sonunda öldüren bu hastalığa "kanser" adı verilmiştir (60).

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre kanserin görülme sıklığı Danimarka'da binde üçün üzerinde, Çekoslovakya, Batı Almanya, İtalya ve İngiltere'de binde 2.5-3 arası, Fransa, Polonya, Macaristan ve Doğu Almanya'da 2-2.5 arası, Romanya'da da 1.5-2 arasındadır. Türkiye'de ise kanser görülme sıklığı, en az yüz binde 120 olarak bildirilmiştir. Bu da yılda en az 75 bin yeni kanser hastası anlamına gelmektedir (21).

Kanser, basit bir ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir. Kanser hücreleri, biyolojik olarak kontak inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyaranlara (ligandlara) gereksinim duymama, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçabilme, anjiogenezi uyarması ve metastaz yapabilme özelliklerine sahiptir (22, 56). Kanser, hücre kontrol mekanizmalarına yanıt veren normal hücrelerin bu mekanizmaların kontrolünden çıkıp, kontrolsüz olarak büyüeyebilen ve vücudun diğer dokularına saldıran tümörlerin olduğu bir hastalıklar grubudur. Karsinogenez; homeostatik "feedback" mekanizmalara yanıt veren normal hücrelerin bu mekanizmaların kontrolünden çıkıp, kontrolsüz ve spontan olarak büyüeyebilen ve komşu dokulara invazyon yapabilen hücre şekillerine dönüşmeleridir (65). Kanser tek bir hastalık gibi görünse de gerçekte hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalık grubudur. Kanser genetik ile bağlantılı olabileceği düşüncesi 20. yüzyılın başında ortaya atılmış ve bu düşünce kanser araştırmalarının kaynağı olarak rol oynamıştır (13, 32).

Diğer birçok hastalık gibi insan kanserlerinin etiolojisinde de genetik ve çevresel faktörler birlikte etkilidir. Günümüzde moleküler kanser biyolojisi üzerine kaydedilen ilerlemeler; onkojenik virüsler, gen aktarımında yeni yöntemler ve hücresel

yolların(fiziksel, kimyasal ve viral karsinogenez mekanizmalar) anlaşılmasını sağlayan çalışmalarla gerçekleşmektedir (45). Kanser, sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının normal olarak gerçekleşen uygun miktarda hücre kaybıyla dengelenememesi sonucu gerçekleşir. Kanser hücreleri invazyon yaparlar ve organizmanın organlarını hasara uğrattırır. Kanser hücreleri köken aldıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki, sonuçta hücreler devamlı birikir. Bu dengesizlik (aşırı hücre birikimi), hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından dolayıdır (51).

2.5.1 Kanser Hücrelerinin Özellikleri

2.5.1.1 Klonal orijin

Çoğu kanser hücresi bir anormal hücreden doğar. Bazı kanserler ise birden fazla sayıda malign klonlardan doğabilir. Bu klonlar ya bir saha hasarı (field defect) sonucu (dokunun birden fazla sayıda hücresi karsinojene maruz kalmasıyla) ya da bazı genlerdeki kalıtsal hasarlar sonucu oluşurlar (Tablo 2. 3) (5).

2.5.1.2 İmmortalite

Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler ve çok miktarda hücre oluştururlar. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozomların uçlarında bulunan telomerlerdir. Hücre farklılaşırken, çoğu normal hücre tipinde telomerler gittikçe kısalır. Fakat, kanser hücrelerinde ve kök hücrelerde telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler. Bu enzim normal olarak hücreler farklılaşırken bir taraftan programlı bir şekilde azalır. Tamamıyla farklılaşmış bir hücre istirahat (senesens) durumuna girer ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirdiğinden ölür. Oysa, birçok kanser tipinde telomeraz etkinliğini sürdürür veya aktive edilir. Sonuçta da, telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır (5).

2.5.1.3 Genetik instabilite

Bu durum, DNA tamirindeki ve DNA uyumsuzluklarını (mismatch) tanımadaki defektlerden dolayıdır ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına yol açar. Kanser hücreleri çoğalma kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az yanıt veren klonlar oluştururlar. Bu klonların ortamlarda yaşama yeteneği de gittikçe artar ve böylece metastaz yaparlar (5).

2.5.1.4 Kontakt inhibisyonun ve substratuma tutunarak büyüme özelliklerinin kaybı

Kültür ortamında büyüyen normal hücreler, hücrelerin normalde yapıştığı substratuma yapışamazlarsa bölünemezler. Kontakt inhibisyon, normal hücreler çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde (monolayer) doldurduklarında (konfluent hale geldiklerinde) da bölünme özelliklerini kaybederler. Hatta besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını bulundursa bile bölünmezler. Kanser hücreleri ise, yarı katı bir besiyerinde substratuma yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeye devam edebilirler. Hatta, hücre kültürlerinde birden fazla tabaka oluşsa bile büyümeye devam edebilirler (5).

2.5.1.5 Çoğalmanın büyüme faktörlerinden ve besinlerden bağımsız olarak devamlı artışı

Bu durum kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyümeye devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler. Buldukları ortamdaki besin miktarının azalması onların çoğalmasını durdurmaz, besin azalsa bile çoğalırlar. Ortamları doku değil bir kültür ortamı olduğu için kendiliğinden besin üretimi olmadığından hücreler besin eksikliğinden kendilerinin ölümüne yol açarlar (5).

2.5.1.6 Metastaz

Metastaz, kanser hücrelerinin göç ettikleri mikroçevrelerindeki hücrelerin farklılaşarak onlara katılmasıyla oluşur. Bir tümör mikroskobik ve makroskobik özellikleri ile nispeten sessiz kabul edildiğinde yani lokalize kalacağı, diğer bölgelere

yayılmayacağı düşünülürse "benign" olduğu söylenir. "Malign" olarak değerlendirilen tümör ise komşu yapılara ya da uzak bölgelere yayılan ölüme yol açan tümördür (5, 18).

Tümörler (ya da neoplaziler) normal hücre bölünmesinin düzenleyici etkilerinden bağımsız olarak çoğalan, normal dokudan farklı değişime uğramış ve değişime yol açan uyarı durduktan sonra bile büyümeye devam eden anormal doku kütleleridir (34). İnvazyon, tümörün yabancı dokulara yayılmasını, metastaz ise vücudun uzak bölgelerinde yeni odaklar oluşturulmasını belirtir (34). İnvazivlik ve metastaz bir tümörün malign olduğunu diğer tümör özelliklerinden daha iyi belirler. Büyük ve az farklılaşmış tümörler daha sık metastaz yaparlar (34). Böylece tümör hücreleri sayılarını artırır ve yeni bir dokuda yayılırlar. Bu da dokunun ölümüyle ya da işlev kaybıyla sonuçlanır. Metastaz akciğer ya da meme dokusu gibi farklı dokulardan kaynaklanabilir ve bunlar farklı şekilde etkiler gösterir, nedeni ise kaynak olan dokuların farklı olmasıdır. Metastatik sürecin ilk aşaması tümör hücrelerinin gevşemesi, küçük kan damarlarından ve lenfatik sistemden aktif yada pasif şekilde geçiş yapabilecek yapıya dönüşmesidir (34). Metastatik hücrelerin tümü primer tümörlerden kaynaklanır ve hayvan modellerinde kanser hücrelerinin %0,01'i ya da daha azı metastazı geliştirmek için dolaşıma girer (11). Bu benign tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. Kanser hücreleri ve normal hücreler arasındaki farklar Tablo 2.3'te özetlenmiştir. Metastaz, ekstrasellüler matrikse yapışmaktan sorumlu hücresel proteinlerin kaybı yada anormalliklerinden, hücreler arası etkileşim bozukluğundan, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, bazal membranın üretimindeki anormalliklerden, metalloproteaz gibi bazı enzimlerle (kolejenazlar) bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşir. Sorumlu proteinler keşfedildikçe ve onların mekanizmaları aydınlatıldıkça metastatik süreç daha iyi anlaşılacaktır (5).

Tablo 2.3. Kanser Hücreleri ile Normal Hücre Arasındaki Farklar (5 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

Özellik	Kanser Hücresi	Normal Hücre
Klonal orijin	Var	Yok
İmmortalite	Var	Yok
Genetik instabilite	Var	Yok
Kontakt inhibisyonun ve substratuma tutunarak büyüme özelliklerinin kaybı	Var	Yok
Çoğalmaun büyüme faktörlerinden ve besinlerden bağımsız olarak devamlı artışı	Var	Yok
Metastaz	Var	Yok

2.5.2 Aşırı kanser hücresi üretiminin nedenleri

2.5.2.1 Anormal hücrelerin apoptoza gidememesi

Apoptoz, programlı hücre ölümü demektir. Apoptoz anormal DNA'lı hücreleri yok eder. Anormal DNA'lı hücreler ya tamiri olanaksız DNA hasarı oluşmuş ya da yanlış, eksik veya gereksiz olarak fazla transkribe olmuş DNA'dan dolayı oluşur. Buradaki apoptoz, belli bir tür için gerekli kromozom sayısının uygun miktarda devam ettirilmesinde ve bazı kromozomların genomdaki kaybı olan anöploidinin önlenmesinde ana mekanizmadır. Böylece, DNA'sını sadece doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin mitozu girmesi sağlanır. Apoptoz normal doku kaybından sorumludur. Bunun klasik örneği kurbağa larvalarının kuyruklarının kaybolmasıdır. Apoptoz ayrıca primatlarda embriyogenez döneminde var olan parmakların arasındaki perdelerin kaybolmasından sorumludur. Apoptoz yaşlanmış ve yararsız hale gelen normal hücrelerin ortamdaki yok edilmelerini de sağlar. Apoptoz organizmanın kendi dokularını tanıyan T hücrelerinin yıkımında da rol alır. Böylece, bu hücrelerin organizmaya karşı immun atağı önlenir (5).

Apoptotik hücreler mikroskopik olarak tanınabilir. Bu hücrelerde intrasellüler organeller biraraya toplanırlar. Çekirdek yoğunlaşır ve parçacıklara ayrılır. Hücreler apoptotik cisimciklere ayrıldığında, bu cisimcikler fagositozla komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından alınırlar. Apoptoz inflamatuvar reaksiyona yol açmaz (5).

Kanser hücreleri ve bazı immün sistem hücrelerinin normal dokularda apoptozu anormal olarak indükleyen maddeleri üretmesi sonucu, aşırı kilo kaybı, deri altı yağ dokusundaki azalma, kas kütlelerinde azalma, iç organlarda küçülme, derideki değişiklikler ve saç dökülmeleri gibi belirtileri olan vücudun gerilemesi durumu olarak bilinen kaşeksiye yol açabilir. Apoptoz genetik olarak düzenlenir ve malign hücrelerde bozulabilir. Örneğin, p53 tümör baskılayıcı onkogeni apoptozu uyarırken bcl-2 onkogeni ise apoptozu inhibe eder. Apoptozun inhibisyonu ile, normal hücre ölümü yavaşlar ve aşırı hücre birikmesi olur. Apoptoz tümör hücrelerinin hormonlar, sitotoksik kemoterapi ve radyasyon terapisiyle azaltılmasında (yok edilmesinde) ana mekanizmalardan biridir(5).

2.5.2.2 Hücre çoğalmasını anormal şekilde uyaran genetik bozukluklar

Çok hücreli ökaryotlarda çoğalma; büyüme faktörleri ve besinler gibi dış sinyaller ile hücre sel bağlantı duyarlılığı gibi iç sinyallerle düzenlenir (1). Kanserli hücrelerde ortaya çıkan mutasyonlar rastgele değildir. Genellikle DNA tamir mekanizmalarında, hücre çoğalmasında, hücre ölümü ve farklılaşmasında rol alan proteinleri kodlayan genlerde ortaya çıkar (32). Bu bozukluklar normal çoğalma mekanizmasından bağımsız olarak oluşur. Reseptörlerin veya sinyal aktarıcı proteinlerin mutasyonları veya aşırı üretimleri hücrelerin büyüme faktörlerinden veya diğer mitotik faktörlerden bağımsız hale gelmesine ve böylece kendi başına giden hücre bölünmesine yol açar. Bu gen anormallikleri genellikle dominanttır (5).

Hücre döngüsü, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Hücre çoğalması hücre döngüsü içinde yer alan bazı kontrol noktaları tarafından düzenli olarak kontrol edilir (66).

2.5.2.3 Tümör baskılayıcı genlerdeki anormallikler

Kanser oluşumundan sorumlu genler "tümör baskılayıcı genler"dir. Bu genler hücre döngüsünün baskılanmasından sorumlu genlerdir. Normalde bu genler kanser oluşumunu engeller. Hücre çoğalması ve büyümesini yavaşlatan proteinleri kodlar. Ancak genin mutasyona uğraması ve eksikliğine bağlı hücre kontrolü kaybolur ve hücre kanserleşir. Kalıtsal kanser hastalıkları bu genlerin mutasyonuna bağlıdır. Genin iki kopyasında da bozukluk varsa kanser görülür (10, 60). Bozuklukları halinde organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir. Bu genler resesiftir. Retinoblastoma geni (RB1) bu genler arasında ilk keşfedilen genidir. Ardından, özellikle sık rastlanmayan veya nadir kalıtsal hastalıklarda olmak üzere diğer baskılayıcı gen anormallikleri de saptanmıştır. Wilm's tümörü (WT1), familyal polipozis (APC), familyal melonoma (CDKN20) ve familyal meme ve over kanserleri (BRCA-1 ve BRCA-2) diğer baskılayıcı gen anormalliklerine örnek olarak verilebilir (5).

2.5.2.4 Tümör anjiogenezi

Kan desteği olmayan kanser kolonileri çap olarak 1 mm'den daha fazla büyümmezler. Yeterli kan desteği olmayan koloniler hücre döngüsünün G₀ fazındaki gibi istirahat halinde değillerdir. Bu durumdaki koloniler tipik olarak daha hızlı çoğalırlar fakat artmış çoğalma hızına bağlı olarak hücre ölümü de artar. Kan akışı sağlandıktan sonra, hücre ölüm hızı azalır ve tümör hızla büyür (5). Tümör anjiogenezi, solid bir tümöre doğru yeni damarların ortaya çıkarak o yöne yönelmesini tanımlar ve malignite için gereklidir, çünkü damar olmadıkça tümör metastaz yapamaz.

Perfüzyonla besin maddeleri ile birlikte oksijen de gelir ve yeni oluşan endotel hücreleri salgıladığı büyüme faktörleri aracılığıyla tümörün büyümesini uyarır. Tümör anjiogenezinin anjiogenik faktörler ve anjiogenez inhibitörleri arasındaki dengeyle sağlandığı düşünülmektedir.

En önemli olan ikisi ise temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dür. Sitokinler; değişik hücrelerden salgılanan ve birçok komşu hücreyi etkileyen moleküllerdir. Lenfositlerden salgılanan lenfokinler ve büyüme faktörleri (GF) sitokinlere örnek verilebilir. Bazı lenfokinler lenfositlerde mitozu uyarırken diğerleri bazı hücrelerde lenfositlerin fonksiyonlarını engeller. Farklı dokular epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi değişik büyüme faktörleri salgırlar (64).

2.5.3 Kansere neden olan ekzojen faktörler

Kansere neden olan ekzojen kaynaklı faktörlerin başında yaşam tarzı yer almaktadır. Kişilerin değişik yaşam tarzları nedeniyle sigara içme, tütün çiğneme, alkol kullanımı, hatalı diyet uygulanması, hatalı güneşlenme ve yetersiz egzersiz gibi faktörler kanserleşme sayısında artışa neden olmaktadır. Diğer bir ekzojen faktör ise çevresel ve mesleki etkenlerdir. Bunlar arasında radyasyon, asbest, organik buharlar, pestisitler ve diğer kimyasal, fiziksel ya da enfeksiyon ajanları yer almaktadır (5). Mesleki etkenler arasında çalışma ortamında alınan radyasyonun dışında iş ortamının yarattığı stres sonucunda vücutta serbest radikaller ve reaktif oksijen türevlerinin oluşmaktadır. Vücutta birikmesiyle de kanserleşme ortaya çıkabilmektedir (5).

2.5.4 Kansere neden olan endojen faktörler

Kansere neden olan endojen faktörler arasında ilk sıradasermest radikaller yer almaktadır. Bunlara süperoksit ve hidroksit radikallerini örnek olarak verebiliriz. Endojen faktörler arasında, aile hikayesinde BRCA-1, Ataxia Telangiectasia, APC gibi kanser belirteçleri olarak kabul edilen kalıtsal faktörler yer alıyorsa kanser olma ihtimali daha yüksektir. Ailesinde kanser görülen insanların kanser olma ihtimali daha yüksektir. Bunlardan başka, büyümeyi arttıran ya da baskılayan sinyallerde ve genlerde[onkogenler(Ras gibi), tümör baskılayıcılar (p53 gibi), hormonlar (östrojen ve androjenler gibi) ve büyüme faktörleri (VEGF ve FGF gibi)]endojen faktörler yer almaktadır(34).

Kendiliğinden oluşan (sporadik) kanser olaylarına genlerin karıştığı tahmin edilmektedir. Örneğin; polimorfizm yada mutasyonlar kanser metabolizmasını etkilemektedir (glutatayon transferaz gibi) (2, 34).Genetik bilginin; replikasyon, depolama, ekspresyon (ifade etme) ve mutasyon nedeniyle varyasyon (değişme), olmak üzere dört önemli özelliği vardır. Mutasyon hem kromozomlardaki hem de genlerdeki değişiklikleri ifade eder (32).

Kromozom mutasyonları (kromozomal bozukluklar), kromozom sayısındaki değişiklikler gen ya da kromozom parçalarında delesyonlar, duplikasyonlar ve aynı kromozom içinde yada kromozomlar arasında genetik materyalin yeniden düzenlenmesi şeklindeki değişikliklerdir. Kromozom sayısındaki değişiklikler bir ya da daha fazla haploit kromozom takımının ilavesinden (öploidi) bir ya da daha fazla kromozom ilavesi ya da kaybına kadar (anöploidi) değişkenlik gösterir. Yapısal değişikliklerin çoğu genetik materyalin kaybı ya da yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkan bir ya da daha fazla kromozom kırıklarından oluşur. Kimyasallara ya da radyasyona maruz kalma kromozom kırıklarını artırır.Kırılma sonucu orijinal yapısını koruyamayan kromozomda değişim meydana gelir (3).

Delesyon/duplikasyon/inversiyon; delesyonda, kromozom bir ya da birkaç yerinden kırılabilir ve bir kısmı yok olur. Duplikasyonda ise genetik materyalin bir kısmı genomda birden fazla sayıda bulunur.Bu durum replikasyon hatası sonucu olabileceği gibi mayozda eşit olmayan parça değişimi sırasında da meydana gelebilir. İkinci durumda hem delesyon hem de duplikasyon oluşur. İversiyonda iki kırık sonucu oluşan DNA parçacığı 180° dönüş yaparak tekrar kromozoma katılır. Genetik bilgi kaybolmamakla birlikte genlerin doğrusal dizilişi değişir.Genomda kromozom parçasının yeni bir bölgeye taşınması translokasyonlardır.Karşılıklı translokasyonda homolog olmayan iki kromozomun parçaları karşılıklı olarak yer değiştirir.Böylece inversiyonda olduğu gibi genetik materyal yeniden düzenlenir (3).

1970 yılında yapılan bir çalışma ile insan hücrelerinin kromozomlarının bazı bölgelerinin kırılmalara daha hassas olduğu gösterilmiştir. Bu bölgelerde kromatinin

sıkı sarılmadığı ya da yoğun olmadığı düşünölmektedir.Daha sonraki çalışmalar insanlardaki otozomal kırılğan bölgeler ile kanser arasında ilişki olduğunu göstermiştir (3).

Gen mutasyonları; Transkripsiyonla üretilen mRNA'nın okunmasıyla proteinler üretilir. Genleri kodlayan DNA'daki herhangi bir değişiklik mRNA'nın üretiminde değişime yol açar. mRNA'daki değişim, fonksiyonu uygun olmayan protein üretimine neden olur. DNA'nın tek nükleotidi boyunca olabilecek değişiklik fonksiyonel olmayan bir proteine yol açar. Bu tip değişikliklere nokta mutasyonları denir (3). Ribozomlarda üçlü nükleotidler okunurken nonsense (anlamsız) mutasyonlar, missense (yanlış anlam) mutasyonlar, frameshift (çerçeve kayması) mutasyonları olmak üzere üç şekilde mutasyon olabilir. Nonsense (anlamsız) mutasyonlar, mutasyonla oluşan yeni kodon protein üretiminin erken sona ermesine neden olur.Kısa ve fonksiyonsuz ürün oluşur.Missense (yanlış anlam) mutasyonlar, yeni kodon yanlış amino asitin proteine dahil olmasına neden olur.Frameshift (çerçeve kayması) mutasyonları, bir ya da iki nükleotidin eklenmesi ya da çıkarılmasıyla kodonların farklılaşmasına, oluşum sırasının değişmesine yol açar.Bu da farklı ya da fonksiyonsuz protein oluşumuna yol açar (3).

Gen amplifikasyonu; Çok nadir görölen ve normal DNA replikasyonunda ciddi bir kusurdur. Sonuç, kromozomdan tek kopya yapılacağına çok sayıda kopya üretilmesidir. Kromozomda lokalize olmuş genlerin çok sayıda üretilmesine neden olur.Bazen, amplifiye olan bölgelerin çok sayıda kopyaları üretilir, küçük kromozomlar denen aslında yalancı kromozomlar şekillenir. Genlerin her bir kopyalarının okunup çevrilmesi mRNA'nın ve amplifiye genlere karşılık olan proteinlerin aşırı üretilmesine yol açar. Bu durum normal hücrelerde görülmezken, çoğu kanser hücrelerinde bulunur. Amplifiye bölge onkogen içeriyorsa, genin aşırı ifadesinden dolayı düzensiz hücre büyümesine yol açar.Yumurtalık ve göğüs kanserlerinde ErbB-2 yada HER-2/neu onkogenlerinin, tümörlerin yayılmasında myc onkogeninin amplifikasyonu bu durumu içeren örneklerdir (3).

Epigenetik değişimler; DNA sekanslarındaki gerçek değişikliklere ek olarak, kromatin ve DNA sekanslarında değişim olmadan gen ifadeleri değişime uğrayabilir. Çünkü bu değişimler genin DNA sekanslarında olmaz ve epigenetik değişimler olarak adlandırılır. Epigenetik değişimler metilasyon ve asetilasyon olmak üzere iki tiptir (3).

Metilasyon; bazı DNA nükleotidlerinin bazına metil (-CH₃) grubunun eklenmesiyle modifiye olması şeklindedir. DNA metilasyonu DNA'nın belirli bölgelerinin inaktivasyonu ile ilgilidir. Anormal DNA metilasyon şekilleri kanser hücrelerinde görülebilir. Zarar görmüş genlerin ekspresyonları metilasyon değişimlerine benzer değişiklikler olarak tanımlanmıştır (3).

Asetilasyon, DNA'nın histon proteinlerine asetil (-CH₃C=O) gruplarının eklenmesiyle modifiye hale gelmesidir. Bu DNA histon etkileşiminin gevşemesine neden olur ve gen ifadesindeki artışla ilgilidir. Asetil gruplarının DNA'ya eklenmesi ve çıkarılması ile ilgili süreçler kanser tedavisi araştırmalarının önemli bir alanıdır (3).

2.6 Meme Kanseri

Meme dokusundaki fibrokistik değişimler; 20-40 yaş arasındaki hastalarda, en sık rastlanan iyi huylu meme bezi durumudur. Hormonal dengesizlikler fibrokistik değişimlerle beraber görülürler. Bu durumda, bağ doku stromasında ve kanal kistlerinin oluşumunda bir çoğalma gözlemlenir. Ağrı, hızlı büyüyen kistlerde düzenlidir (31).

İyi huylu meme hastalıkları arasında ikinci derecede en yaygın olarak görülen fibroadenom, 20-30 yaşları arasındaki genç kadınlarda görülür. Fibroadenomlar, yavaş büyüyen epitel ve bağ dokusu kütesidir ve ağrı yapmazlar (31).

Jinekomasti, erkek göğsünün büyümesidir; adrenal kortekste östrojen-testis androjen dengesinin değişmesi sonucu oluşur. Karaciğerin östrojenleri yıkmasından sorumlu olduğu için sirozda da gözlenebilir. Jinekomasti Klinifelter sendromunun (47, XXY) tipik özelliğidir (31).

Meme kanserinin yaklaşık % 80'i süt (laktifer) kanalların epitel tabakalarından köken alır. Laktifer kanallardaki epitel hücre tabakaları östrojen reseptörüne sahiptir ve meme tümörlerinin yaklaşık % 50-85'i östrojen reseptörü içerir. Alfa (α) ve beta (β) olmak üzere iki tip östrojen reseptörü vardır. α reseptörü östrojene β reseptöründen daha fazla bağlanma yeteneğine sahiptir. β reseptörü, α reseptörünün fizyolojik düzenleyicisi olarak rol oynar. Normal meme dokularına oranla saldırgan (invaziv) tümörlerde α reseptörünün ekspresyonu β reseptöründen daha fazladır. Bu bulgular gelişen meme tümörlerindeki olası risklerde ve dokuların östrojene duyarlılığını belirlemede reseptörler arasındaki ayarın önemli olduğunu göstermektedir. Östrojen bağımlı tümörlerin çoğu antiöstrojenik terapiden sonra (antiöstrojen olan tamoksifen ile tedaviden sonra) geriler (31).

Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra, dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanser tipidir. Her sekiz kadından birinin hayatının belirli bir zamanında meme kanserine yakalanabileceği bildirilmektedir. Erkeklerde de görülmekle beraber, kadın vakaları erkek vakalarından yüz kat fazladır. Meme kanseri süt üreten ya da süt taşıyan dokulardaki hücrelerden köken alır (31).

Meme kanserlerinin onda birinde genetik bozukluk tesbit edilmektedir (47). Yakın zamana dek kendiliğinden oluşan meme kanserinden farklı olarak otozomal dominant kalıtsal geçiş gösteren meme kanserinin varlığını kesin olarak ispatlamak mümkün olmamıştır. Ama 1990'larda BRCA-1 ve BRCA-2 olmak üzere iki meme kanseri yatkınlık geni tanımlandı. Bu iki gen birlikte tüm meme kanseri vakalarının %5-10'undan sorumludurlar (31, 47). BRCA-1, meme bezinin epitel hücrelerinin çoğalmasıyla ilgili östrojen bağımlı transkripsiyon yollarını baskılar. Buradaki bir mutasyon nedeniyle bu yeteneğin kaybı, tümör oluşumunu kolaylaştırılabilir (31). BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinde mutasyon olan kadınlar invaziv meme ve ovaryum kanseri riski altındadırlar (31). Heterozigotluğun kaybolması (LOH) ile tümör baskılayıcı gen oldukları düşünülen bu genlerin hücre içi fonksiyonları hala araştırılmaktadır. Bu genleri taşıyan bireylerin hayat boyu meme kanserine yakalanma riskleri %60-90, yumurtalık kanserine yakalanma riskleri ise %20-60'tır. İlginç olarak

BRCA-1 ve BRCA-2 genlerindeki mutasyon sonucu aile hikayelerinde prostat kanseri ve meme kanseri görülen erkeklerde de hem prostat hem de meme kanserine yakalanma riski artmıştır (8). Gen tedavisi meme kanseri için deney aşamasında olan bir yöntemdir (8, 21, 26, 35).

Hastalığın tanısında bireylerin kendisini elle muayene etmesi önemlidir, rutin kontroller ve 40 yaşın üzerinde yılda bir kez mamografi çektilmesi önerilir. Memede kitle saptandığında kanser olup olmadığını anlamak için biopsi yapılır. Meme kanseri tedavi şansı yüksek kanserlerdendir, en sık tedavi şekli cerrahidir (47).

Meme kanserinin cerrahi tedavisinde genellikle meme dokusunun tümü alınır. Koltuk altı lenf bezleri de çıkartılarak yayılma olup olmadığı incelenir. Eğer kanser yayılmışsa radyoterapi yada kemoterapi uygulanır. Özel kimyasal maddelerle boyanan tümör hücrelerinin tipi anlaşıldıktan sonra östrojen ve progesteron algılayıcılarını bloke eden ilaçlar kullanılarak tümörün büyümesi engellenir. Meme kanseri hücreleri normal büyüme faktörü östrojene ihtiyaç duymadan bölünebilir. Bazı kanser hücreleri, sonunda hücre içerisinde östrojen reseptörünün ifadesinin kapatılmasıyla östrojene tepki yeteneğini kaybeder. Hücreler, eksternal büyüme sinyallerini geçerek bölünmeye devam eder (61).

Postmenopozal kadınlarda östrojen replasman (eksik olanı yerine koyma) tedavisi meme kanseri için risk faktörü olarak değerlendirilmiştir. Premenopozal kadınlarda, ovaryumlar en önemli östrojen kaynağıdır. Meme bezi, metastazı kolaylaştıran zengin kan ve lenf sistemine sahiptir (31). Meme kanseri; lenf nodülüne, kemiklere, akciğerlere, beyine ve karaciğere hatta daha uzak mesafedeki prostata kadar yayılabilmektedir (15). Koltuk altı (aksiller) lenf düğümü metastazları en önemli teşhis faktörüdür (31).

2.7 miR-126 ve Kanser

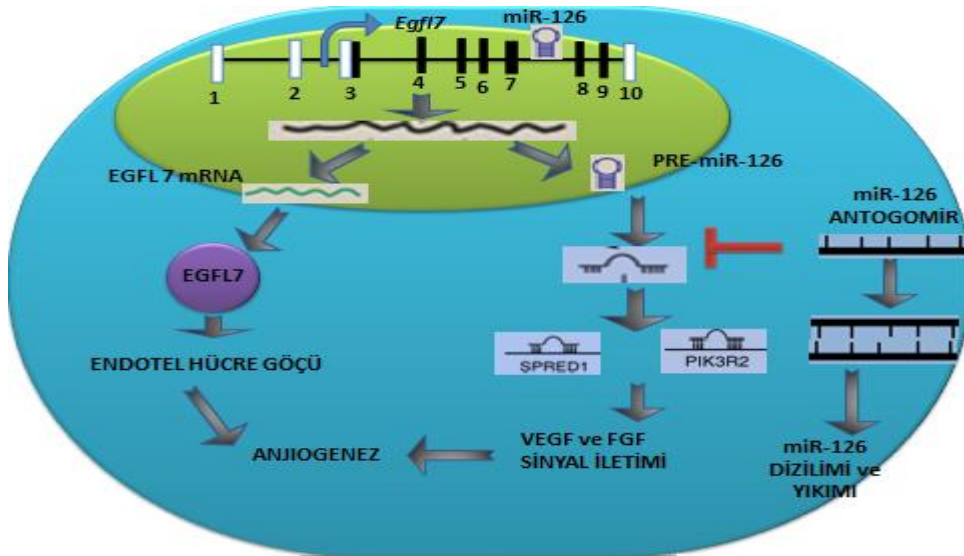
miR-126, 9. kromozomun 9p34.3 bölgesinde bulunan epidermal growth faktör benzeri 7'nin (egfl7) intron 7 bölümünde bulunmaktadır (12). miR-126 aynı zamanda vasküler sistemde de rol almaktadır (53). egfl-7'nin 3'-UTR bölgesinde miR-126'nın doğrudan bağlanma bölgesi bulunmaktadır. miR-126, apoptotik yapıları artırır ve alıcı hücrelerdeki hedef genlerini represe eder. Sadece eksozomlar değil aynı zamanda apoptotik yapılar hücreler arasında miRNAları transfer edebilir. Apoptotik hücrelerin yüzeyinde bulunan ve fagositler için "ye beni" sinyali üreten fosfatidilserin eksozomların yüzeylerinde eksprese edilir (53). Hücreler arası miRNA taşınması sadece eksozomlarla değil, aynı zamanda apoptotik veziküller kullanılarak da sağlanabilir Böylece ortama dışarıdan verilen miR-126, yabancı bir bileşen gibi görülmeyip yıkım mekanizmalarından kaçabilir. Bu da mikroRNA'ların fagositoza uğramadan kanda serbestçe dolaşmasına yardım eder. Kanda dolaşarak başka bir hücreye taşınan miRNA taşındığı hücrede de hedef geni baskılar ve hücrenin kanserleşmesini engeller (51).

Tümör gelişimindeki miR-126'nın rolü, primer tümörlerdeki ve kanser hücre dizilerindeki miR-126/miR-126*'ın azaltılarak düzenlenmesi (downregülasyonu, bir hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerin azalması) belirlenmiştir. miR-126/miR126*'ın aşırı olarak ifade edilmesi ile kanser hücrelerinin sayılarını katlanarak arttırması sonucu tümör gelişimini, göçünü, invazyonunun azalmasına yol açtığı düşünülmektedir (14, 16, 50).

RISC protein kompleksine benzer görevlere sahip olan ve miR-126'nın ekspresyonuna bağlı farklı mekanizmalar (metastaz, invazyon ve anjiyogenez oluşumu) da vardır. Epidermal growth faktör benzeri 7 (egfl7) genine yerleşen miR-126, vaskular endotelial growth faktör (VEGF) sinyal iletimini, anjiyogenezi ve vasküler bütünlüğünü düzenleyerek damar gelişiminde rol almaktadır. Omurgalılarda, egfl7 geni biyolojik olarak aktif miRNA'ları (miR-126) kodlar (16). Damar gelişiminde miR-126'nın görevini belirlemek için zebrafish ve faredeki miR-126 eksikliği in vivo olarak çalışılıp benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Buna göre; damar büyümesinde endotelial hücre

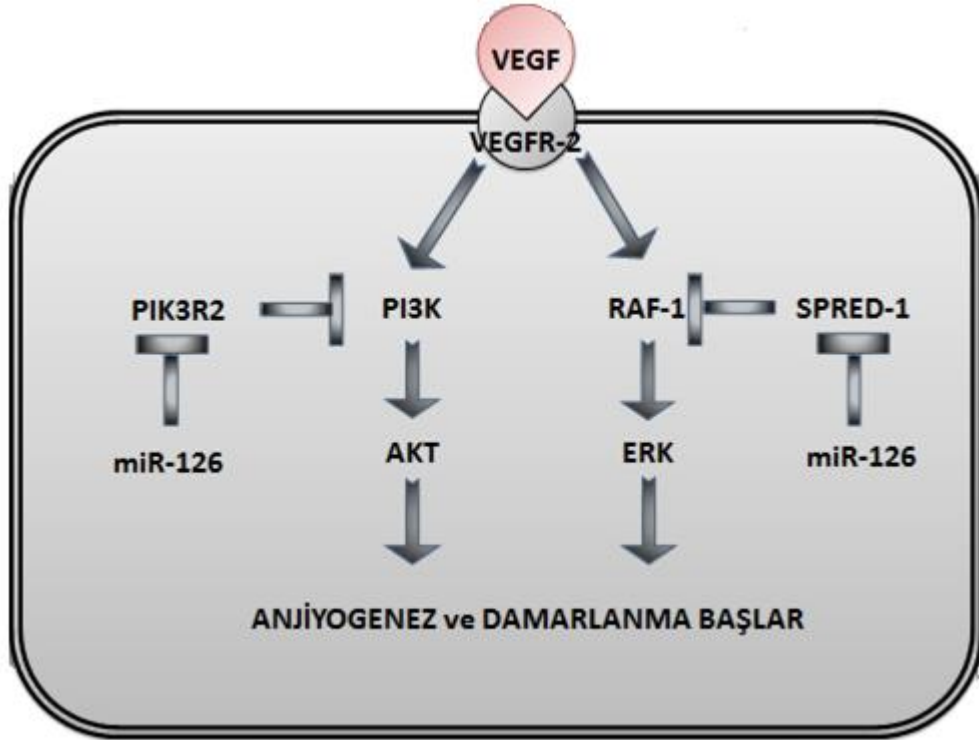
göçü bozulmuş, damar lümenlerinin çöktüğü gözlenmiştir (16, 23). Damar gelişimindeki hücre göçünün bozulması, miR-126 ekspresyonunun metastazı zıt yönde etkilediğini göstermektedir. Buna ek olarak, damar lümeninin çöküşüyle de damarlanmayı (anjiogenezi) azalttığı sonucuna varabiliriz (16).

Moleküler seviyede yapılan çalışmalarda, anjiyogenezde önemli bir yere sahip olan VEGF Sinyal İletimini Engelleyen Tomurcuklanmayla Alakalı Protein 1 (Sprouty-Related EVH1 Domain Containing Protein 1, SPRED-1) ve Fosfotidil İnositit-3 Düzenleyici Altbirim 2 (Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulatory Subunit Beta, PIK3R2) adlı iki gen bölgesine rastlanmıştır. SPRED-1 ve PIK3R2'yi baskılayan miR-126'nın MAP kinaz ve PI3K yollarında VEGF sinyal iletimini düzenlediği bildirilmektedir (Şekil 2. 6) (16, 23, 25, 53). Vasküler endotel hücreleri başta olmak üzere tümör hücreleri de anjiyoblastik öncüllerden farklılaşır ve çoğalırlar. Bu işlemler anjiyogenezin oluşmasıyla başlamaktadır. miR-126, endotel hücrelerinin VEGF'ye olan cevabın oluşmasından sorumludur. VEGF, doğrudan göç indüklendiği zaman anjiyogenik tomurcuklanmada sap hücrelerinin çoğalması indükler. Growth faktörlere cevap olarak endotel cevapların düzenlenmesi için bir mekanizma kinaz sinyal iletim yolağının inhibisyonudur. Tomurcuklanma ve tomurcuklanmayla alakalı proteinler growth faktör sinyal iletiminin düzenleyicileridir (16, 23).



Şekil 2.6. RISC kompleksinin yapısı ve çalışma prensibi (16 nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

miR-126 önemli olarak; SPRED-1, VCAM-1 ve PIK3R2'nin 3' UTR bölgesini içeren RNAlardan elde edilen lusiferazın aktivitesini baskılar. SPRED-1, MAP-kinaz yolağının aktivasyonunu indüklerken, PIK3R2 ise PI3K yolağının aktivitesini negatif olarak etkilemektedir. MAP kinaz ve PI3K yolaklarının growth faktörler tarafından aktivasyonu ERK ve AKT'nin fosforilasyon seviyelerinin de değişmesini sağlamaktadır. VEGF tarafından indüklenen ERK ve AKT fosforilasyonu, miR-126'sı knockdown hücrelerde azalmıştır (19).miR-126 seviyeleri düştüğü zaman, SPRED-1 ve PIK3R2 proteini artar. ERK fosforilasyonundaki hasar SPRED-1'in durdurulmasıyla kurtulabildiği zaman, AKT fosforilasyonuna bağımlı VEGF'deki hasar da PIK3R2'si durdurulmuş siRNA tarafından düzeltilebilir (Şekil 2. 7) (3, 23, 63).



Şekil 2.7. VEGF sinyal iletiminde miR-126'nın SPRED-1 ve PIK3R2 proteinlerine etkisi ve PI3K ve Ras,Raf/MAPK yolaklarına etkisi (19 ve 69 nolu kaynaklardan değiştirilerek alınmıştır)

miR-126'nın proanjyogenik özellikleri, MAP kinaz sinyal iletiminin bir negatif düzenleyicisi olan SPRED-1 ile bağlantılıdır. miR-126'nın eksikliği, SPRED-1'in ekspresyonunda artma yaparak VEGF ve FGF gibi growth faktörlerin neden olduğu hücreler arası anjyogenik sinyalinin iletimini engeller. miR-126 anjyogenezi, SPRED-

1'in ekspresyonunu önleyerek düzenler. SPRED-1 hücrenin hareket etme yeteneğini (motilitesi) ve Rho-bağımlı aktinin yeniden düzenlenmesini indükler (19, 28).

Endotel hücrelerdeki reseptörlere VEGF ve FGF bağlanması çekirdekte anjiyogenezde rol alan genlerin transkripsiyonunu düzenleyen MAP kinaz sinyal yolağının aktivasyonuna öncülük eder. miR-126, Ras/MAP kinaz sinyal iletiminin negatif düzenleyicisi olan SPRED-1'in ekspresyonunu baskılar. Böylece, miR-126 eksikliği, anjiyogenik sinyal iletiminin hızlandığı yerde bulunan VEGF ve FGF'ye yanıt olarak MAP kinaz sinyal iletimini azaltır (19, 28).

miRNA'lar ve onların kanserle olan ilişkisi son zamanlarda üzerinde çalışılan konulardan biridir. Yakın zamanlarda miR-126'nın tümör çoğalması ve metastazında bir rolü olabileceği düşünülmektedir ve araştırılmaktadır (12).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Örneklerin Eldesi ve Hücre Lizisi

Araştırmamızda kullanılan kan örnekleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'na başvuran hastalardan sağlanmıştır. Meme kanseri teşhisi konan 15 hasta ve 15 sağlıklı gönüllünün herbirinden alınan 10 ml kan EDTA'lı tüpe kondu. Araştırmaya katılan bireylere aydınlatma ve onam formu imzalatılmış olup, araştırmanın Etik Kurul Belgesi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Kurulundan temin edilmiştir. Alınan kanlardan mononükleer hücreler elde edildi.

Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan sağlanan meme kanseri teşhisi konmuş 15 hastadan toplanan bilgiler Tablo 3.1 ile 3.7 arasında gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastaların Hormon TMR Değerleri

HASTA YAŞI	CA-125 (u/ml)	CA-19-9 (u/ml)	CA-15-3 (u/ml)	CEA (ng/ml)
61	14,10	<2,50	82,5*	3,36*
55	--	--	--	--
47	--	--	21,1	1,51
39	--	--	--	--
52	--	--	--	--
68	8,54	8,94	9,14	1,37
73	10,1	3,62	24,9	1,87
62	--	--	--	--
52	6,61	<2,50	18,7	0,776
47	14,6	21,1	28	1,74
36	8,05	3,87	31,1	1,67
47	10,1	<2,50	23,1	1,47
60	--	--	39,6	1,06
40	10,2	12,6	20,8	1,58
43	11,6	7,8	10	1,41
REFERANS ARALIĞI	1,9-16,3	0-34	6,4-58	0-2,5

Tablo 3.2. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Meme Kanseri Teşhisi Konan Hastaların Hematoloji Değerleri

Hasta Yaşı	HGB (g/dl)	Hematokrit (%)	Eritrosit (10 ⁶ /UI)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (gr/dl)	RDW (%)	Lökosit (10 ³ /UI)	Nötrofil (%)	Absolü Nötrofil S. (10 ³ /UI)	Lenfosit (%)	Absolü Lenfosit S. (10 ³ /UI)	Monosit (%)	Absolü Monosit S. (10 ³ /UI)	Eosinophil (%)	Absolü Eosinophil S. (10 ³ /UI)	Bazofil (%)	Absolü Bazofil S. (10 ³ /UI)	PLT (10 ³ /ul)	MPV (fl)	PCT (%)	PDW	
61	13,5	42,3	4,27	99,2	31,6	31,8	14,6*	9,18	69*	6,34	19,9*	1,83	6,7	0,61	1,1	0,11	0,2	0,02	256	8,6	0,22	40,1	
55	13,1	39	4,44	87,8	29,5	33,6	13,6	6,51	47,9*	3,12	39,5	2,57	6	0,39	2,5	0,16	0,9	0,06	250	7,5	0,19	53,3	
47	12,6	37,6	4,75	79,2*	26*	32,4	15,4*	9,1	55,1*	5	30,4	2,8	6,9	0,6	5,6*	0,5*	1,8	0,2	234	11*	0,257	16,4	
39	14	41	4,82	85	29	34,1	12,8	9,8	60,5*	5,9	29,6	2,9	7,4	0,7	1,8	0,2	0,7	0,1	255	9,2	0,234	15,9	
52	9,9	29,8*	3,54*	84,1	28	33,3	13,8	9,4	67,7*	6,3	23	2,2	8,2	0,9*	0,6*	0,1	0,5	0	380	8,6	0,327	16,4	
68	13,9	38,6	4,29	90	32,3	35,9	13	6,3	61,5*	3,9	24,7	1,5*	10,5*	0,7	2,7	0,2	0,6	0	250	8,5	0,213	16,1	
73	13	36,7	4,67	78,4*	27,8	35,4	14,4	7,3	56,2*	4,1	33,4	2,4	7,5	0,5	2,3	0,2	0,6	0	302	8,8	0,267	16,5	
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	13,9	38	4,46	85,3	31,1	36,4*	13,1	8,5	66,2*	5,6	21,8	1,8	6,8	0,6	1,5	0,1	3,7	0,3	291	9	0,26	16,7	
47	15,7*	43,9	5,24*	83,7	29,9	35,7	12,6	4,8	72,1*	3,4	22,1	1,1*	5,1	0,2*	0,4*	0*	0,3	0	191	8,8	0,167	16,7	
36	12,9	37,4	4,52	82,7	28,5	34,4	14	10,6	70,9*	7,5*	21,8	2,3	5,4	0,6	1,4	0,1	0,5	0	312	9,7	0,303	15,7	
47	13,1	38,3	4,57	83,7	30	35	12,4	9,3	71*	7*	24,6	1,9	7,1	0,6	1,1	0*	0,3	0	252	9,5	0,222	16,7	
60	13,5	38,2	4,26	89,6	31,7	35,4	13,6	6,5	61,2*	4	28,6	1,9	7,6	0,5	2,2	0,1	0,4	0	220	9,6	0,211	16,1	
40	14,6	41,7	4,86	85,8	30,1	35,1	12,3	6,8	50,6*	3,4	41,5*	2,8	6,2	0,4	1,1	0,1	0,6	0	258	9,1	0,233	16,1	
43	9,8	29,5*	3,93	74,9*	25*	33,4	16,5*	6	64,6*	3,9	22,1	1,3*	12,4*	0,7	0,2*	0*	0,7	0	285	9,4	0,266	16,3	
Normal Değer	11,7 - 15,7	35 - 47	3,8 - 5,2	80 - 100	27- 34	31 - 36	11,7 - 14,6	3,5 - 11	20- 40	2--- 7	20- 40	1,5 - 4,0	4 - 10	0,2 - 0,8	1,0- 3,0	0 - 0,45	-	-	150 - 388	6,9 - 10,8	-	-	

Tablo 3.3. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastaların Biyokimya Değerleri

HASTA YAŞI	SODYUM (mEq/L)	POTASYUM (mEq/L)	KLOR (mEq/L)	GLUKOZ (mg/dl)	ÜRE AZOTU (mg/dl)	KREATİNİN (mg/dl)	TOTAL PROTEİN (g/dl)	ALBÜMİN (g/dl)	KALSİYUM (mg/dl)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALKALEN FOSFATAZ (U/L)	AMİLAZ (U/L)	FOSFOR (mg/dl)	BİLİRUBİN TOTAL (mg/dl)	BİLİRUBİN DİREK (mg/dl)	GGT (U/L)
61	144	4,81	105	110*	15,9	1,18	7,5	4,5	9,4	21	13	257	116*	3,11	0,29	0,03	--
55	143	4,28	109	84	13,8	0,9	7,2	4,5	9	34	30	157	66	0,28	0,09*	--	--
47	143	4,52	105	86	11,8	0,71	7,3	4,7	9,4	14	11	149	34	3,75	0,46	0,11	18
39	140	4,03	105	96	11,3	0,79	6,8	4,5	9	28	52*	166	60	--	0,32	0,06	--
52	141	8,53*	107	126*	10,1	0,76	6,5	3,7	8,5*	21	14	177	47	--	0,17	0,03	--
68	142	4,44	--	89	22,8*	0,85	7	4,5	9,5	19	12	180	--	3,03	1,28*	0,25	40
73	146	5,21	111*	67*	28,5*	0,54	5,6*	3,7	8,2*	23	15	224	137*	--	1,24*	0,34*	--
62	139	3,76	103	201*	18,3	0,71	6,5	4,2	8,8	20	20	220	54	--	0,5	0,01	--
52	140	5,84*	109	89	12,6	0,75	7,6	4,7	9,9	45*	25	--	48	--	0,33	0,03	--
47	141	4,81	103	406*	14,2	0,62	7,5	4,8	10,4*	27	26	--	68	3,12	1,37*	0,03	--
36	143	4,84	109	80	8,3	0,68	6,9	4,8	9,5	22	11	162	41	3,44	0,4	0,01	14
47	141	4,51	105	87	13,1	0,71	7,1	4,3	9,4	23	11	168	62	--	0,5	0,01	--
60	143	4,26	--	84	15,7	0,85	6,8	4	9,7	30	38	--	240*	4,06	0,58	0,01	28
40	141	4,71	107	77	9,6	0,76	7,7	4,5	9,1	26	20	186	67	--	0,22	0,01	--
43	142	4,36	106	84	8	0,7	7,9	4,7	9,2	26	13	120	40	--	0,54	0,01	--
REFERANS ARALIĞI	135-150	3,5-5,5	98-110	70-110	5,0-20,0	0,5-1,2	6-8,5	3,5-5	8,6-10,2	0-40	0-41	0-270	28-100	2,7-4,5	0,1-1,1	0-0,3	10-71

Tablo 3.4. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastaların Koagülasyon Değerleri

HASTA YAŞI	PTZ	INR	A_PTT(sn)
61	11,2	0,978	23,7*
55	11,1	0,964	24,9
47	11,6	0,968	29,1
39	13	1,078	32,9
52	11,5	0,991	30,8
68	11,6	0,997	32,9
73	10,7	0,897	27,7
62	--	--	--
52	10,9	0,91	30,4
47	10,4	0,866	24,7
36	11,3	0,942	30
47	11,3	0,951	30,6
60	--	--	--
40	11,9	0,992	31,6
43	12,5	1,112	30,1
REFERANS ARALIĞI	8.0-14.0	0.8-1.2	24-40

Tablo 3.5. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastaların Hormon Değerleri

HASTA YAŞI	Alfa Fetoprotein (AFP, IU/ml)
61	2,26
55	--
47	--
39	--
52	--
68	2,07
73	5,33
62	--
52	2,65
47	3,13
36	1,97
47	2,03
60	--
40	2,13
43	1,78
REFERANS ARALIĞI	0,5-5,5

Tablo 3.6. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastaların ELISA Test Sonuçları

HASTA YAŞI	HBSAG	ANTİ HCV	HIV 1/2 ANTİKOR-P24 ANTİJEN
61	NEGATİF /0,87	NEGATİF/0,39	NEGATİF/ 0,34
55	--	--	--
47	--	--	--
39	NEGATİF /0,93	NEGATİF/0,24	NEGATİF/ 0,27
52	--	--	--
68	NEGATİF/ 0,92	NEGATİF/ 0,24	NEGATİF/ 0,35
73	POZİTİF/ 183,19	NEGATİF/ 0,5	NEGATİF/ 0,32
62	--	NEGATİF/ 0,26	NEGATİF/ 0,4
52	NEGATİF/ 0,99	NEGATİF/ 0,18	NEGATİF/ 0,40
47	NEGATİF/ 1,04	NEGATİF/ 0,27	NEGATİF/ 0,28
36	NEGATİF/ 0,90	NEGATİF/ 0,19	NEGATİF/ 0,30
47	NEGATİF/ 0,82	NEGATİF/ 0,41	NEGATİF/0,29
60	NEGATİF/ 0,78	NEGATİF/ 0,43	NEGATİF/ 0,25
40	NEGATİF/0,80	NEGATİF/ 0,35	NEGATİF/ 0,31
43	NEGATİF/ 0,86	NEGATİF/ 0,23	NEGATİF/ 0,39

Tablo 3.7. Meme Kanseri Teşhisi Konmuş Hastalardan Elde Edilen Bilgiler

Yaş	Başvuru ve Tanı	Aile Hikayesi	Bulguları	Tümör Tipi	Ameliyat Türü
61	Meme MalignNeoplazmi	CA Tanısı Yok	Sağ üst orta kadranda ciltte çekilme yapan yaklaşık 3x3 cm'lik sert kıvamlı kitle	GRADE 1	Mastektomi, Modifiye Radikal
55	Memede Tanımlanmamış Kitle	Ablası Meme CA ve Rahim CA Abisi Pankreas CA	Memede asimetri var. Meme başında çekilme. Sol memede sarı kıvamlı meme akıntısı var. Sol memede dış alt kadranda 1.5x 2 cm ele gelen kitle var.	GRADE 3	Mastektomi, Modifiye Radikal
47	Meme MalignNeoplazmi	CA Tanısı yok	Sol memede üst kadranda meme başından yaklaşık 6 cm uzaklıkta meme cildine dik yerleşimli ve ciltten yaklaşık 6 mm derinlikte yer alan düzensiz şekillidir. Meme başında çekilme ve akıntı yok. Yaklaşık ebatı 0.9x0.7x0.6 cm'dir.	GRADE 2	Mastektomi, Modifiye Radikal
39	Memede Tanımlanmamış Kitle	CA Tanısı yok	Memede asimetri var. Meme başında çekilme. Sol memede dış alt kadranda 2x2 cm ele gelen kitle var	GRADE 2	Mastektomi, Modifiye Radikal
52	Memede Tanımlanmamış Kitle	Abisi Akciğer CA	Sağ memede şişlik, duyarlılık yok. Meme başında çekilme mevcut. Hafif kızarıklık. Sağ memede üst dış kadranda 3x1.2x1 cm boyutundadır.	GRADE 3	Mastektomi, Modifiye Radikal
68	Memede Tanımlanmamış Kitle	CA Tanısı yok	Memede asimetri var. Sol memede 2x2x2 cm boyutunda kitle mevcuttur. Meme başında çekilme ve akıntı yok.	GRADE 3	Mastektomi, Modifiye Radikal
73	Memede MalignNeoplazmi	CA Tanısı yok	Sağ memede saat 10-11 hizasında, 4.5x3.5x4 cm boyutundadır.	GRADE1	Mastektomi, Modifiye Radikal
62	Memede MalignNeoplazmi	CA Tanısı yok	Sağ memede 1.5x1.7x0.8 cm boyutundadır. Meme başında çekilme ve akıntı var.	GRADE 2	Mastektomi, ModifiyeRadikal
52	Memede Tanımlanmamış Kitle	CA Tanısı yok	Sol memede saat 10 hizasında 3x2.5x1.5 cm büyüklüğünde kitle var. Memede ağrı kızarıklık yok. Tümör şekli düzensizdir.	GRADE 2	Mastektomi, Modifiye Radikal
47	Meme MalignNeoplazmi	Abla ve Abide Karaciğer CA	Sağ memede dış kadranda 3.5x2.6x2.5 cm büyüklüğünde kitle var. Memede ağrı ve şişlik var. Sol memede ise 33x26x22 mm boyutunda kitle varlığı da görülmektedir.	GRADE 2	Mastektomi, Modifiye Radikal
36	Meme MalignNeoplazmi	Teyzesinde meme CA bulgusu vardır.	Sağ memede saat 11 hizasındaki kalsifikasyon içeren kitle bulgusu. Sağ memede 2x1 cm boyutunda ağırlı ele gelen şekilde kitle vardır.	GRADE 2	Mastektomi, Modifiye Radikal
47	Meme MalignNeoplazmi	CA Tanısı yok	Sol memede saat 10 hizasında 3x4.1x3cm büyüklüğünde kitle var. Meme başında çekilme yok ve akıntı yok.	GRADE 3	Mastektomi, Modifiye Radikal
60	Meme MalignNeoplazmi	CA Tanısı yok	Sağ memede 3x2x1.5 cm büyüklüğünde kitle var. Memede ele gelen kitle var.	GRADE 2	Mastektomi, Modifiye Radikal
40	Memede Tanımlanmamış Kitle	CA Tanısı yok	Sol memede orta kadranda 2.1x2x3.4 cm büyüklüğünde kitle var. Memede ağrı kızarıklık yok. Meme başında akıntı yok.	GRADE 2	Mastektomi, Modifiye Radikal
43	Meme MalignNeoplazmi	CA Tanısı yok	Sol memede ele gelen kitle var. 1.5x 2x 0.6 cm boyutunda kitle vardır. Meme başında çekilme yoktur.	GRADE 3	Mastektomi, Modifiye Radikal

3.2 Mononükleer Hücre Eldesi

Steril bir tübe 4 ml Ficoll-Paque PLUS (Amersham, 18-1152-69, New Jersey, USA) kondu. EDTA'lı tüpten 4 ml kan çekilerek steril başka bir tübe alındı. Kan ve fosfat tamponlu tuz (phosphate buffer saline, PBS) 1:1 oranında karıştırılıp, Ficoll-Paque PLUS ile karışmayacak şekilde eklendi. Ficoll-Paque PLUS ve PBS'li kandan oluşan tüp 1800 rpm'de 18°C'de 25 dakika santrifüj edildi. Ayrılan mononükleer hücreler, pipetle toplanıp 15 ml'lik santrifüj tüpüne kondu. Santrifüj tüplerinin üstüne 2 ml PBS konulup hücreler solüsyon içinde homojen hale getirildi. Daha sonra 2500 rpm'de 18°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüpün dibinde yaklaşık 0.5 ml pelet kalacak şekilde sıvı alındı ve kalan 0.5 ml pellet homojenize edildi. Üstü PBS ile 2 ml'ye tamamlanıp tekrar 2500 rpm'de 18°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüpün dibinde 0.5 ml kalacak şekilde sıvı alındı ve dışarıdan vurularak tekrar hücre pelleti kaldırılarak homojenize edildi. Bir vial konulup üstü yaklaşık 1,5 ml'ye PBS'le tamamlandıktan sonra -80°C'ye kaldırıldı. Tüm işlemlerde steril malzemeler kullanıldı.

3.3 Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

3.3.1 Mononükleer Hücrelerden Total RNA Eldesi

Mononükleer hücrelerden total RNA RNeasy kiti (Qiagen, AM1921, Carlsbad, USA) ile elde edildi. Kitin içinde bulunan 2X RNeasy liziz/Bağlanma solüsyonu 415 µl 2-merkaptoetanol ile karıştırıldı. Yıkama solüsyonu 2/3, 64 ml %100'lük ACS grade etanol ile iyice karıştırıldı.

Derin dondurucuda (-80°C) saklanan mononükleer hücreler 2500 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Vialin dibinde 0.2 ml pellet kalacak şekilde sıvı çekildi. Kitin içinde yer alan Cell Disruption Buffer'dan vialde bulunan hücre pelletinin üzerine 300 µl konup kuvvetlice vortekslendi. Üzerine 320 µl 2X RNeasy liziz/Bağlanma solüsyonu eklendi ve pipetlendi. Bu işlemlerin hepsi buz üzerinde yapıldı. Homojen haldeki karışıma daha sonra 320 µl %100'lük ACS grade etanol kondu ve hafifçe pipetleme yapıldı.

Kitin içindeki toplama tüpünün içine filtre yerleştirilip, hücre lizatından 700 µl filtreye kondu. 12000 g'de 45 saniye 18⁰C santrifüj edilerek lizatın filtreden geçmesi sağlandı. Filtreden geçen sıvı (filtrat) atılıp filtre aynı toplama tüpüne kondu. Filtre içine geriye kalan 260 µl hücre lizatı eklenerek bir önceki basamaktaki işlemler uygulandı. Tekrar filtreden geçen sıvı uzaklaştırılıp filtre aynı tüpe kondu. Filtre içine kit içindeki yıkama solüsyonu 1'den 700 µl eklenip 45 saniye 12000 g'de 18⁰C'de santrifüj edildi. Filtreden geçen sıvı atılıp filtre aynı toplama tüpüne kondu. Filtre içine yıkama solüsyonu 2/3'ten 500 µl eklenerek 12000 g'de 45 saniye 18⁰C'de santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Son yıkama işleminden sonra 30 saniye filtreye bir şey konmadan 12000 g'de 45 saniye 18⁰C'de santrifüj edildi. Böylece filtrede kalan yıkama solüsyonu artıkları ortamdaki uzaklaştırıldı.

Yıkama işlemlerinden sonra filtre yeni bir toplama tüpüne kondu ve üstüne daha önceden 95⁰C'de ısıtılan ayrıştırma çözeltisinden (elüsyon solüsyonundan) 50 µl kondu ve 12000 g'de 45 sn 18⁰C'de santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrar edildi. İkinci santrifüjden sonra filtre atılıp toplama tüpünün dibindeki RNA miktarı nanodrop'ta (ATCGenes, ASP 3700) 260 nm'de ölçülüp daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -80⁰C'de saklandı.

3.3.2 Real-Time PCR için Örneklerin Hazırlanması

Real time PCR işlemi için örneklerden aynı miktarda (200 ng) RNA kullanıldı. RNA'ların üzerine primerler konup üzeri 19 µl olacak şekilde nükleaz free suyla tamamlandı. Hazırlanan örnekler 70⁰C'de 5 dakika inkübe edildi. Her örnek için bir adet GAPDH ve kalıp olmayankontrol grubu (no template control, NTC) hazırlandı.

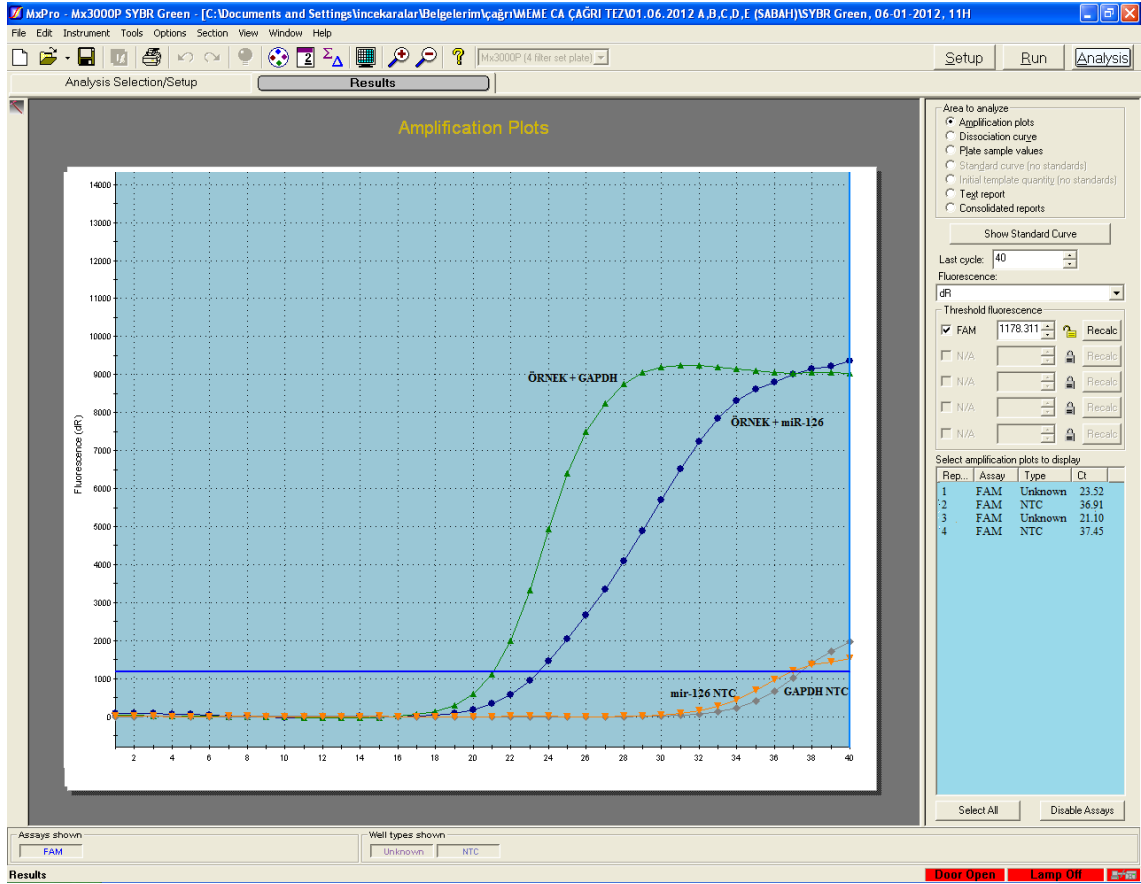
3.3.3 Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

1 µl revers transkripsiyon master mix karışımı içeren tüplere (Bioneer, AccuPower RT/PCR Mix, K-2055, Alameda, USA) total RNA'lar eklenerek,

komplementer DNA'lar (cDNA) elde edildi. Bunun için 19 µl olan total RNA, primerler ve master mix (Bioneer, AccuPower RT/PCR Mix, K-2055, Alameda, USA) karışımı 42°C'de 60 dakika, daha sonra ise 94°C'de 5 dakika PCR işlemine tabi tutuldu.

3.3.4 Real-Time PCR

Elde edilen cDNA optik kapaklı PCR tüplerine 3 tekrarlı olacak şekilde paylaştırıldı. Her tüpe 5 µl cDNA, 5 µl nükleaz free su ve 10 µl SYBR Green Mix konarak (Agilent Technologies, 2X Brilliant III SYBR GREEN Master Mix, USA) RT-PCR aşaması gerçekleştirildi. Elde edilen her bir örnek RNA'sı için internal (endojen) kontrol olarak Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) gen ekspresyonu da belirlendi. miR-126 ve GAPDH gen ekspresyonlarına bakılarak elde edilen C_T değeri, $\Delta\Delta C_T$ değeri olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.1). Bu değer yaptığımız RT-PCR yönteminin değerlendirilmesinde asıl bilgiyi vermektedir. $\Delta\Delta C_T$ değeri, miR-126'nın C_T değerinden GAPDH C_T değerinin çıkarılmasından sonra $\Delta\Delta C_T$ $2^{-(C_T^{\text{miR-126}} - C_T^{\text{GAPDH}})}$ formülünde değerlerin yerine konması ile hesaplanmaktadır. Kontrol için GAPDH ve kalıp olmayan kontrol grubu (no template control, NTC) kullanıldı. 3 tekrarlı hazırlanan örnekler Real-Time-PCR'da (Stratagene MX3000p) çoğaltıldı. Kullanılan primerler Tablo 3.8'de verilmiştir (41, 76).



Şekil 3.1. Real-Time PCR'dan elde edilen verilerin görünümü. Kanser hastasının miR-126 ve GAPDH amplikasyon eğrileri ve RNA (kalıp) konulmamış (no template control, NTC) negatif kontrolün amplikasyon eğrisi. Mavi renk hasta örneğindeki miR-126 CT değerini göstermektedir. Yeşil renkte olan eğri ise; hasta örneğindeki internal kontrol olan GAPDH'in CT değerini göstermektedir. Grafikteki diğer iki renkteki eğri (turuncu ve gri) GAPDH ve miR-126'nın negatif kontrolleri olup gösterdiği değer istatistiksel olarak anlamsız sayılmaktadır.

Tablo 3.8. Real-Time PCR'da Kullanılan Primerler ve Problar

Primerin Adı	Forward Primer	Reverse Primer
miR-126	3'- GTCCGCTCGTACCGTGAGTAATA-5'	3'-CCAGTCTCAGGGTCCGAGGTATTC-5'
GAPDH	3'- GGGAAAACCGAGGGGGGAGC-5'	3'-GAAACTGCGACCCCGACCGT-5'

RT-PCR aşamasında ilk önce 95°C'de 10 dakika tutuldu, daha sonraki aşamada 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 1 dakika ve en son olarak 72°C'de 1 dakika, 40 göngü uygulandı. En son aşamada ise erime sıcaklıklarının (melting temprature, Tm) belirlenmesi için 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye ve tekrar 95°C'de 30 saniye aşamaları uygulanıp deney sonlandırıldı.

3.4 İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmanın istatistiksel değerlendirmesi için SPSS IBM 20.0 programı kullanılmıştır. $\Delta\Delta C_T$ değerleri normal dağılmamakla birlikte Mann-Whitney U testi ile analiz yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler olarak medyan (%25-%75) yüzdelik dilimleri arasında yapılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada 15 sağlıklı ve 15 meme kanseri tanısı konmuş hastalardan oluşan iki ayrı deney grubu bulunmaktadır. Kan örneklerinden mononükleer hücreler elde edilip, daha sonra bu hücrelerden total RNA'lar izole edilmiştir. Elde edilen total RNA'lardan miR-126 genine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) ile örneklerin C_T değerleri elde edilmiştir. C_T olarak adlandırılan kavram eşik-değer döngüsü ya da treshhold cycle miktarıdır. Bu değer, RT-PCR'da üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. C_T ; gen ekspresyonu miktarının belirlenmesinde önemli bir parametredir. Başlangıçtaki yüksek miktarda genomik DNA (cDNA), PCR esnasında ürün artışına ve böylece C_T değerinin düşüşüne neden olacaktır. Böylece C_T değeri 40 veya daha yüksekse gen ekspresyonu artışının olmadığı ve bu değer düşük olacağı sonucuna varılır. Eğer gen ekspresyonu varsa, C_T değeri 40'ın altında olacaktır (57, 69). Kontrol grubuna ait hastaların yaşları, miR-126 değerleri, GAPDH değerleri ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Kontrol grubu olan 15 sağlıklı insanın yaş ve CT değerleri

Yaş	miR-126 CT Değeri	GAPDH CT Değeri	$\Delta\Delta C_T$ değeri
66	15,8	15,84	1,03
52	15,86	16,63	1,71
67	15,87	16,99	2,17
64	16,89	16,17	0,61
58	22,5	22,64	1,1
49	20,36	19,34	0,49
62	28,28	19,52	0,002
47	20,38	19,36	0,49
72	20,37	19,35	0,50
48	17,75	16,8	0,52
48	19,87	17,88	0,25
41	20,46	17,74	0,15
39	20,48	17,71	0,15
40	18,9	19,17	1,21
38	21,79	20,11	1,68

Çalışmamızda yer alan ikinci grup ise 15 adet meme kanseri tanısı konmuş hastanın kan örneğinden oluşan hasta grubudur. Bu grupta elde edilen veriler kontrol grubuna uygulanan aynı yöntemler kullanılarak elde edilmiştir. Ayrıntılı bilgiler Tablo 4. 2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Meme kanseri tanısı konmuş 15 hastanın yaş ve CT değerleri

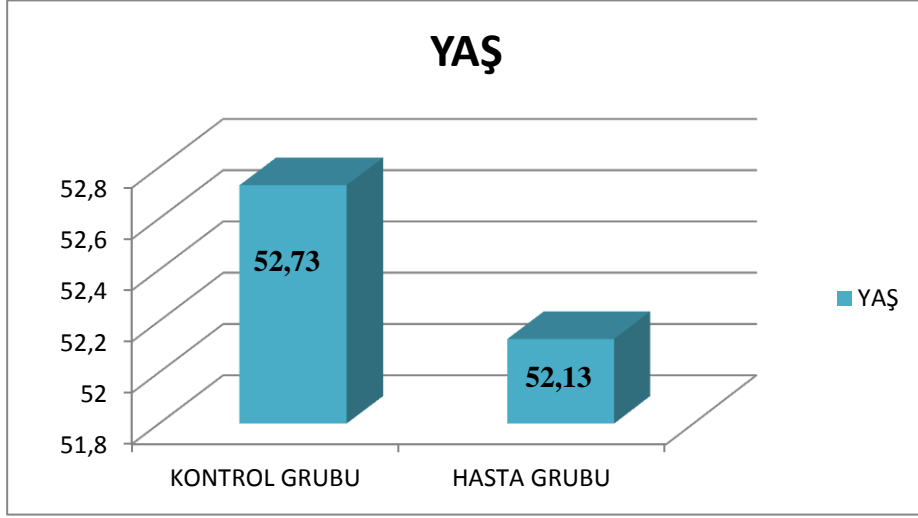
Yaş	miR-126 CT Değeri	GAPDH CT Değeri	$\Delta\Delta C_T$ değeri
61	23,52	21, 10	0,19
55	22,67	21,62	0,48
47	22,2	22,47	1,2
39	22,49	22,5	1,01
52	38,13	36,68	0,37
68	31,96	31,29	1,59
73	35,25	22,74	0
62	28	24,54	0,09
52	28,15	25,64	0,19
47	23,5	20,27	0,11
36	28,38	20,55	0,04
47	28,07	24,47	0,08
60	32,64	29,41	0,11
40	26	22,77	0,09
43	30,09	26,86	0,11

Tablo 4. 1 ve 4. 2’de gösterilen veriler, SPSS IBM 20.0 ‘de değerlendirilmiştir. Bu veriler deneylerden elde edilmiş olan ham verilerdir. Bütün değişkenler için normallik testi uygulanmıştır. Yaş, normal dağılım göstermiştir ve Student’s t testi ile analizi yapılmıştır. miR-126, GAPDH ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri normal dağılım göstermeyip, Mann-Whitney U testi ile analiz yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama-standart sapma ve medyan (%25-%75) yüzdeler dilimleri verilmiştir. İstatistik analizlerinden sonra elde edilen veriler Tablo 4.3’te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen verilerden elde edilen sonuçlar

	KONTROL GRUBU	HASTA GRUBU	Olasılık Değeri (p)
	Medyan(%25-%75)	Medyan(%25-%75)	
miR-126	20.36 (16.89_20.48)	28.07 (23.5-31.96)	< 0.001
GAPDH	17.88 (16.8-18.36)	22.77 (21.62-26.86)	< 0.001
$\Delta\Delta C_T$	0.52 (0.25-1.21)	0.11 (0.09-0.48)	0.014

Yaş, miR-126, GAPDH ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri olmak üzere dört farklı değişkende istatistiksel analiz yapılmıştır. Yaş değerlerinde herhangi bir fark görülmemektedir. Ortalama yaş, kontrol grubunda $52,73 \pm 11,30$; hasta grubunda ise $52,13 \pm 10,94$ 'tür (Şekil 4.1).



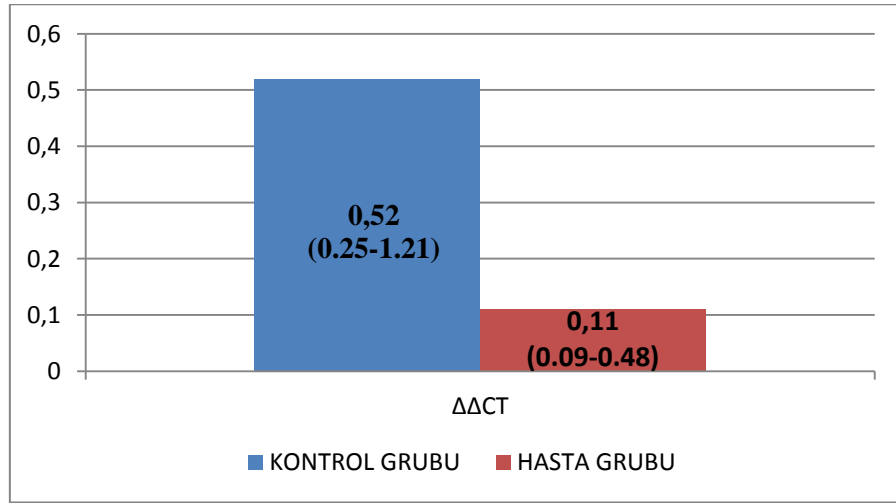
Şekil 4.1. Kontrol ve hasta örneklerinin yaş dağılım grafiği

Diğer üç değişken normal dağılım göstermemiştir. miR-126 bakımından kontrol grubu medyanı 20,36 (16,89-20,48); hasta grubunun medyanı ise 28,07 (23,5-31,96)'dir. Olasılık değerleri (p) her iki değişken için $<0,001$ 'dir. $\Delta\Delta C_T$ değişkeni; kontrol grubu için 0,52 (0,25-1,21) olup, bu değer hasta grubu için 0,11 (0,09-0,48)'dir. p değeri 0,014'tür. Hasta grubu [0,11 (0,09-0,48)] kontrol grubuna [0,52 (0,25-1,21)] göre miR-126 gen ekspresyonunda bir azalma göstermektedir. miR-126'nın meme kanserinde bir tümör baskılayıcı gen olduğunu desteklemektedir. Veriler Tablo 4. 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4.4. 15 sağlıklı kontrol ve 15 meme kanseri hastanın gen ekspresyon ($p= 0.014$ olasılık değerinde) düzeyleri

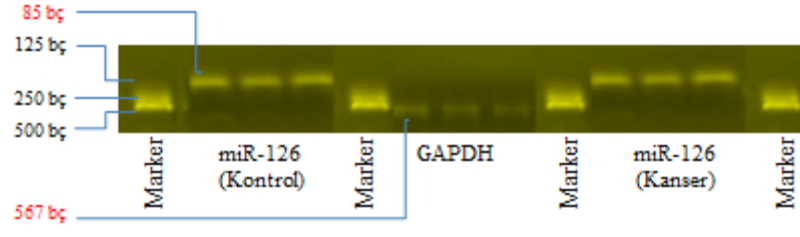
	$\Delta\Delta C_T$ DEĞERİ ($p=0.014$)
HASTA GRUBU (n=15)	0.11 (0.09-0.48)
KONTROL GRUBU (n=15)	0.52 (0.25-1.21)

Hasta grubunda [0.11 (0.09-0.48)] kontrol grubuna [0.52 (0.25-1.21)] göre $\Delta\Delta C_T$ değerinde azalma tesbit edilmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Veriler göz önünde bulundurulduğunda miR-126 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre hasta grubunda azalma göstermiştir (Şekil 4. 2).



Şekil 4.2. Kontrol ve meme kanseri gruplarında gen ekspresyon değerlerinin grafiği

RT-PCR'dan elde edilen verilerin bir sağlaması olarak RT-PCR'dan çıkan cDNA'lar %2'lik Agaroz jelde yürütüldü. Jel görüntüsünde 85 baz çiftlik (bç) mir-126 bantları ve 567 bç'lik GAPDH bantları görülmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. %2'lik agaroz jel elektroforezi ile gözlenen 85 bç miR-126 ve 567 bç'lik GAPDH bantları.

5. TARTIŞMA

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda miRNA'ların biyolojik görevleri hakkında çok çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Şimdilerde miRNA'ların, onkomir olarak hücre büyümesinde ve doku farklılaşmasında rol aldığı konusunda birçok araştırmaya rastlanmaktadır (4, 12, 16, 27, 38, 40, 41, 43, 48, 50, 59, 63, 76, 77). Örneğin, *C. elegans* ile yapılan bir araştırmada lin-4 ve let-7 tarafından kodlanan miRNA'ların hücre farklılaşması ve çoğalmasının ayarlanmasında yer aldığı bildirilmiştir (59). lin-4 ve let-7 gen bölgelerinden oluşan miRNA'ların insan hücre dizilerinde de hücre çoğalmasını kontrol ettiği bulunmuştur (59, 65). miRNA genlerinin %50'si kırılğan bölgelerden ve kanserle ilişkili genomik bölgelerden oluşmaktadır. Bu durum miRNA'ların kanser patogenezinde önemli bir yere sahip olabileceğini düşündürmektedir (27, 62).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde miR-126'nın meme kanserli hastaların kan dokusundan elde edilen periferel hücrelerde incelendiği araştırmaya rastlanmamıştır. Zaten kanda bulunan miRNA gen ekspresyonunun belirlendiği çalışma sayısı da sınırlıdır. Ancak bu çalışmaların yapılması miR-126'nın kan hücrelerindeki durumunun bilinmesi açısından önemlidir. Ancak bu şekilde teşhis ve tanıda bu moleküllerin kullanılıp-kullanılmayacağı hakkında bilgi sahibi olunabilecektir. Çalışmamızda kanda miR-126'nın kontrol grubuna göre kanserli hastalarda daha az eksprese edildiği belirlenmiştir.

Liu ve arkadaşları (2011), malign olmayan ve normalde uterus içinde bulunması gereken endometrial hücrelerin uterus dışında bulunması durumu olan endometriosis oluşumunda, miR-126'nın, hücreler arası sinyal yollarında etkili olan bir adaptör proteini olan Crk'nın ekspresyonuna bağlı olarak etkileyebileceğini bildirmiştir. Uterusun iç yüzünü örten tabakanın hem salgı bezi hem de destek dokusunda incelenen miR-126'nın ektopik endometriosis hastalarında önemli derecede düştüğü gözlemiştir. Bu araştırmada deney gruplarından Crk mRNA seviyesinde bir değişim gözlenmezken

Crk protein seviyesinin aşırı derecede arttığı tesbit edilmiştir. Bu nedenle bu iki molekül arasında bağlantı kurulmuş ve yüksek Crk proteini seviyesinin miR-126 ekspresyonunda azalmayı sağladığı bildirilmiştir (39).

Crawford ve arkadaşları (2008), küçük hücreli akciğer kanseri hücre dizilerinde (NSCLC) miR-126'nın invazyon üzerine etkisini, hem hücre dizilerinde hem de hastalardan toplanan örneklerde araştırmıştır. Bu çalışmanın sonucunda miR-126'nın fonksiyonel hedeflerinden biri olan Crk'yı etkilediğini, miR-126'nın aşırı ekspresyonu ile Crk proteininde azalma olduğunu, mRNA'larında ise bir değişim olmadığını gözlemiştir (12). Ayrıca Crawford ve arkadaşları adezyon, göç ve invaziv kapasitenin artmasını sağlayan Crk ekspresyonu azaldığı zaman, NSCLC hücre dizilerinde, miR-126'nın bu hücrelerin adezyon, göç ve invaziv kapasiteyi azalttığı gözlemiştir (12). Liu ve arkadaşları (2011) ile Crawford ve arkadaşlarının (2008) çalışmaları birbirlerini destekler niteliktedir. Bu araştırmalar birlikte değerlendirildiğinde Crk ve miR-126'nın kanserde zıt ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmaktadır (12, 40).

Lin ve arkadaşları (2012) da, hsa-miR-126 ve hsa-miR-183'ün metastatik NSCLC hücrelerinde inceledikleri çalışmada miR-126'nın akciğer kanserindeki ekspresyonu Crk proteininde bir düşüşe neden olduğunu gözlemişler. Kanda bulunan miRNA'ların tanı, tedavi ve kanserin biyolojik göstergesi olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceğini bildirmiştir (38).

Sun ve arkadaşları (2010), küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinde miR-126'nın, EGFL 7 gen bölgesini hedefleyerek hücre çoğalmasını azalttığını araştırmıştır. Elde ettikleri verilere göre, miR-126'nın aşırı ekspresyonunun in vitroda NSCLC hücrelerinde EGFL 7 ürünlerinin miktarının artmasını sağladığını gözlemiştir. Bunun sonucunda da EGFL 7 ürünlerinin miktarının artmasının hücre çoğalmasını azalttığını bulmuştur (59). Hücre döngüsü analizleri kullanarak, miR-126'nın G1/S geçiş noktasını bloklayarak ya da geciktirerek hücre döngüsünü düzenlediğini ileri sürmüşlerdir (59).

Sempere L. F. ve arkadaşları (2010), meme, kolorektal, akciğer, pankreas ve prostat kanserli dokularda düşük ekspresyon gösteren miR-34a ve -126 ve yüksek ekspresyon gösteren miR-21 ve -155'i, immunohistokimyasal (IHC) ve florasan tabanlı in situ hibridizasyon (ISH) yöntemi ile incelemiştir. miR-126 ve miR-155 ekspresyonlarının endotelial ve immun hücrelerinde, miR-34a ve 21 ekspresyonlarının ise, kanser hücrelerinde varlığı tesbit edilmiş ve daha önce çeşitli araştırmacılar tarafından elde edilen bulguları desteklemiştir (58). Böylece farklı yöntemler kullanılarak da miRNA'lar belirlenmiştir.

Bir miRNA gen bölgesi 200'den fazla farklı hedef gen bölgesine bağlanabilir ve bu bağlandıkları yerler farklı hücresel görevlere sahip olabilir. Örneğin; Otsubo ve arkadaşları(2011),gastrik kanserde miR-126'nın hedef bölgesi olarak,DNA üzerinde belli bir diziye bağlanarak transkripsiyonu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan SOX2 genini seçmiştir. Otsubo ve arkadaşları, mikroRNA-126'nın inhibe ettiği SOX2'nin ekspresyonu ve gastrik kanserle ilişkisini inceledikleri çalışmada, miR-126'nın sadece gastrik kanser hücre dizilerindeki SOX2 ekspresyonunu engellemediğini, çoğu kanser hücre dizilerinde SOX2'nin ekspresyonunu düşürdüğünü bulmuştur. Ayrıca ekspresyonun azalmasının sonucu olarak gastrik kanser hücre dizilerinin birbirlerine bağımlı ve bağımsız olarak büyümesini arttırmaktadır. Sonuç olarak da miR-126'nın SOX2 gen ekspresyonunu azaltarak gastrik kanseri arttırdığını gözlemiştir (50).

Feng ve arkadaşlarının (2010),yaptıkları bir çalışmada miR-126'nın gastrik kanser hücre dizilerinde (SCG-7901) ekspresyonunun azaldığını ve bu nedenle de tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını bildirmiştir. Yapılan bu çalışmanın diğer bir sonucu miR-126 ekspresyon seviyesinin hücre büyümesinde etkili olduğunun gösterilmesidir. Feng ve arkadaşlarına göre; miR-126 hücreleri kanserleşmeye karşı koruyan miRNA'lar arasında yer almaktadır. Ayrıca klinik olarak tanı konmasında lenf nodu metastazı ve tedavisinde biyomarker olarak kullanılabileceğini de bildirmiştir (16).

Tavazoie S.F. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2008), miR335, miR-126 ve miR-106 ekspresyonlarının metastatik odaklarda önemli derecede düşüş gösterebileceğini bulmuştur. miR-335 ve miR-126 düşük ekspresyonu ile metastazlar arasında bir bağlantı olabileceği ve bu nedenle de gelişen metastazın belirlenmesinde marker olarak kullanılabilirleri bildirilmiştir (43). Ayrıca, başka araştırmalarda da miR335, miR-126 ve miR-206 ekspresyonlarının metastatik odaklarda düşüş gösterebileceği ve miR-335 ve miR-126 metastazındaki düşük ekspresyonun gelişen metastazın belirlenmesinde marker olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (4, 63).

Meme kanserli hücrelerin metastazında farklı miRNA'ların farklı etkilerinin olduğu ortaya konmuştur. Robert Weinberg'in grubundan olan Ma ve arkadaşları (2008), ilk olarak miR-10b'nin meme kanserinin invazyonunu ve metastazını başlattığını bulmuştur (48). İlk çalışmalarında miR-10b'nin HOXD10'u baskılayarak prometastatik RHOC genini dolaylı olarak aktive ettiği göstermiştir. HOXD10 tümör invazyonuna ve metastazına yol açar. İkinci çalışmalarında; miR-373 ve miR-520c'nin CD44 geninin kısmen düzenlenmesini sağlayarak tümör invazyonu ve metastazında görevli olabileceğini ispatlamıştır. Son çalışmalarında; miR-335, miR-206 ve miR-126'nin meme kanserli hücrelerin baskılayıcısı olduğu tanımlanmıştır. miR-335'in eksikliğinin SOX4 ve TNC'nin (kodlanan tenascin C) aktivasyonuna öncülük ettiğini bildirmiştir. HOXD ve TNC metastatik özelliklerin kazanılmasından sorumludur (43, 48). Küçük kodlamayan RNA bölgelerinin keşfinden beri gen regülasyonunun miRNA'larla düzenlenmesi daha iyi anlaşılmıştır. Zhang ve arkadaşları (2008), bir çalışmada IRS-1'i miR-126'nin hedef geni olarak seçmiştir. Araştırmanın sonucunda da miR-126'nın, meme kanseri hücre dizisi olan (MCF-7) ve metastatik karakterli meme kanseri hücre dizilerinde (MDA-MB-231) IRS-1'e etki ederek hücre büyümesini azalttığını gözlemiştir (76). Bu çalışma ile kendi çalışmamızın sonuçlarını karşılaştırdığımızda, bizim çalışmamızda da benzer şekilde miR-126 gen ekspresyonunun kanserli grupta azaldığı görülmüştür. Bu sonuç, miR-126'nın tümör baskılayıcı gen olarak görev yapabildiğini destekler niteliktedir.

Zhu ve arkadaşları (2011), meme kanserinde mir-126 ve VEGF/PI3K/AKT sinyal yolağı arasındaki ilişkiye bakmıştır. Bu sinyal yolağı aktive edildiği zaman meme tümörlerinde miR-126 ekspresyonu azalmıştır. Ayrıca miR-126'nın memelilerde egfl7 gen bölgesinde bulunduğunu da desteklemiştir. miR-126'yı HUVEC hücrelerinde susturmuşlardır. miR-126'sı susturulan egfl7 geninin ekspresyonu, miR-126'sı aktif olan kanser hücrelerindeki egfl 7 gen ekspresyonuyla karşılaştırıldığında; mRNA ve protein seviyesinde farklılık görülmemektedir (77). Bunun sonucunda da kanserli hücrelerde miR-126 ekspresyonunun düşük olduğunu ileriye sürmüştür (77).

Wang F. ve arkadaşları (2010), yaş (48 yaşını ortalamakabul ederek alt ve üst sınırlar kabul edilerek), tümör tipi (malign, benign ve tümör safhasına göre), östrojen ve progesteron miktarlarına göre miR-21, -106a, -126, -155, -199a ve -335'in gen ekspresyonlarına bakmıştır. miR-21, -106a ve -155'in ekspresyon seviyeleri yüksek iken, miR-126, -199a ve -335'te ekspresyon seviyelerini düşük bulmuştur. Bu veriler göz önünde bulundurularak meme kanserinde 3 miRNA'nın (miR-126, -199a ve -335) ekspresyonunun düştüğü bulmuştur. Wang ve arkadaşları çoklu parametreleri göz önünde bulundurarak, kandan elde edilen hücrelerde incelenen altı miRNA'nın, meme kanseri tanısı ve tedavisinde biyomarker olarak kullanılabilceğini öne sürmüştür (68).

Zhang H. ve arkadaşları (2011), yaptıkları çalışmada miR-126'nın MCF-7 hücrelerinde çoğalmayı nasıl etkilediğini belirlemek için MCF-7 hücre dizilerine 100 nmol/L miR-126 ve negatif kontrol olarak miRNA taklidi transfekte etmiştir. 48 saat sonra, MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını MTT yöntemi ile ölçmüştür. Deney sonucunda da miR-126'nın etkisi negatif kontrol olan miRNA taklidi ile karşılaştırmıştır ve MCF-7 hücrelerindeki çoğalmayı miR-126 %86 hayatta kalma oranını sağlayarak inhibe ettiğini gözlemiştir. Elde edilen verilere göre bu dizilerde miR-126'nın kanserle ilişkili genlerin düzenlenmesinde görev aldığı, meme kanseri hücre dizilerinde tümör baskılayıcı özellikte olduğu ve bu hücre dizilerinde düşük ekspresyon gösterdiği bulmuştur. miR-126 hedef genleri arasındaki kanserle ilişkili genler arasında insülin reseptör ürünü 1 (insülin receptor substrate 1; IRS-1), geniş nötral amino asit taşıyıcı

küçük alt ünitesi 1 (Large neutral amino acids transporter small subunit 1; SLC7A5), VEGF Sinyal İletimini Engellleyen Tomurcuklanmayla Alakalı Protein 1 (Sprouty-related VEGF-1 domain containing protein 1; SPRED-1) ve protoonkogen C-crk (proto-oncogene C-crk, P38; CRK) yer almaktadır (75).

Çeşitli araştırmacılar tarafından da miR-126'nın tümör baskılayıcı özellik taşıdığı bulunmuştur. Jung ve arkadaşları (2012), meme kanserinde epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2)'yi etkileyen bir kimyasal ilaç olan trastuzumab kullanan hastaların plazma örneklerinde miR-210, -21, -29a ve -126 gen ekspresyonunu incelemiştir. Çalışma sonucunda bu miRNA'ların tümör baskılayıcı olduğunu bulmuştur (29). Kastl L. ve arkadaşları (2012), MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre dizilerinde bir kimyasal tedavi ilacı olan docataxel'e direncin miR-34a, -141, -7, -16, -30a, -125a-5p ve -126 gen ekspresyonları üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Docataxel, β -tubulin altbirimi olan mikrotübüllerin depolimerizasyonunu inhibe ederek hücre döngüsünü durdurur ve apoptozu engeller. Sonuç olarak docataxel uygulanan bu hücre dizilerinde miR-34a ve -141gen ekspresyonunda artış gözlenmiş, miR-126 dahil olmak üzere diğer miRNA'ların ekspresyonunda ise azalma görülmüştür (30).

Yang ve arkadaşları (2011), miR-126 ve miR-335'in meme kanseri riski ile arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Yang ve arkadaşlarının çalışmasında BRCA1/2 geninde mutasyon olan ve aile geçmişinde de meme kanseri tanısı konan hastalardan alınan kanlardan genomik DNA elde edilerek gen ekspresyonunu incelemiştir. Sonuç olarak, bizim bulgularımıza zıt olarak miR-126 ve miR-335'in kanser metastazında ekspresyonunun arttığını bulmuştur (71).

Günümüzde kodlamayan küçük RNA'lar ve özellikle miRNA'lar hakkında gerek dokuda ve gerekse kanda yapılan çalışmalar henüz yeterli sayıda değildir. Dokuda, kültüre edilmiş hücrelerde, serum ve plazmadaki miR-126 gen ekspresyonu ve protein miktarlarının kantitatif ve kalitatif analizlerinin daha fazla olması gerekmektedir. Ayrıca miRNA'ların kanserin yanında diğer hastalıklarla olan ilişkileri hakkında da bilinenler

çok fazla değildir. miR-126'nın kanser ve hücre döngüsü ile etkileşimleri gibi daha birçok mekanizma ile olan ilişkilerinin ortaya çıkarılması için yapılacak daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamıza göre miR-126 gen ekspresyonu, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında meme kanseri tanısı konmuş hastaların kanından elde edilen örneklerde azalmış olarak bulunmuştur. Bu durumda miR-126'nın bir tümör baskılayıcı olabileceğini bildiren çalışmalarda da olduğu gibi bizim çalışmamızda da kanserli grupta azalma göstermesi bu çalışmaları destekler niteliktedir.

Çalışmamız bu konuda yapılacak olan diğer araştırmalar için bir ön çalışma niteliğindedir. İlerleyen dönemlerde daha fazla örnekle ve daha geniş kapsamlı incelenmesi gerekmektedir. Yapılan tüm araştırmalar bir kanser markeri bulma ve kansere çare olabilecek moleküllerin keşfedilmesine yöneliktir. Günümüzde kanser tedavilerinde kemoterapiden ayrı olarak alternatif bir tedavi yöntemi olan gen tedavi çalışmaları ülkemizde ve dünyada sürmektedir. Kemoterapi her ne kadar bir tedavi yöntemi olsa da bazı yan etkileri vardır ve bu yan etkiler hastalara zarar vermektedir. Örneğin; çalışmamız süresince hastalardan kan toplarken, hastanın damarlarında incelme, kansızlık, halsizlik, saç ve kıl dökülmesi gibi rahatsızlıkların olduğu görülmüştür. Yapılan gen tedavi çalışmaları ile kanseri durdurmak için hastaya birçok yan etkisi olan kimyasal madde vermek yerine uygun gen bölgesini kanserli hücreye aktararak tedavi amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada incelenen miR-126 ilerde hem teşhis hem de tedavi için kullanılabilir niteliktedir. Bunun için günümüzde birçok kanser araştırmacısının ilgisini çeken miRNA'lar, marker ya da tedavinin bir parçası olma yolunda gelişmektedir. Literatürde çok fazla geçmişi olmayan bu moleküllerin araştırılması gelecekte keşfedilecek mekanizmalara ışık tutması nedeniyle önemlidir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. AGAMİ R. ve BERNARDS R.,2002, Convergence of mitogenic and DNA damage signaling in the G1 phase of the cell cycle, *Cancer Letters*, 177:111-118 p.
2. AKÖZ M., VATANSEV H., GÜRBİLEK M., AKKUŞ İ., VATANSEV C., KAPTANOĞLU B., 2000, Glutasyon S-transferaz (GST) izoenzimlerin çeşitli kanser vakalarında araştırılması, *Genel Tıp Dergisi*, 10 (1): 13-19 s.
3. ALBERT, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS, WALTER, *Molecular biology of the cell*, 4.baskı, Bölüm 15, 879-964 s.
4. BAGGA S. ve ark.,2005, Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation, *Cell*, 122(4), 553–563 p.
5. BARRY B., LOWİTZ, DENNİS A. C., *Medical Oncology & Principles Of Cancer Biology*.
6. BAŞARAN A.,2010, *Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı*, Pelikan Yayıncılık, 8. Baskı, 155-174 s.
7. BAŞARAN N.,1999, *Tıbbi Genetik*, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, 8.Baskı, 4-48 s.
8. BOZCUK A. N.,2005, *Genetik*, Palme Yayıncılık, 2. Baskı, 303-304 s.
9. CALİN G.A. ve ark.,2004, Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 2999–3004 p.
10. CALIN G. A. ve CROCE C. M.,2006, Micro-RNA-cancer: the beginning of a new tale, *Cancer Res.*, 66, 7390-739 p.
11. CHIANG A.C. ve MASSAGUE J.,2008, Molecular origins of cancer: Molecular basis of metastasis, *The New England Journal of Medicine*, 359 (26),2814-2828 p.
12. CRAWFORD M. ve ark.,2008, MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373, 607-612 p.
13. EKMEKÇİ A. ve ERBAŞ D.,1991, *Kanserin Moleküler Mekanizması*, 47-103 s.
14. ELBASHİR S.M., ve ark., 2001, RNA Interference is Mediated by 21- and 22- Nucleotide RNAs, *Genes & Development*, 15, 188- 200 p.
15. Emory University, *The Genes of Cancer*, “<http://www.cancerguest.org>”.
16. FENG R. ve ark.,2010, miR-126 functions as a tumour supressor in human gastric cancer, *Cancer Letters*,298,50-63 p.
17. FİLİPOWICZ W., 1998, RNAi: The Nuts and Bolts of The RISC Machine, *Cell*, 122, 17- 20 p.
18. FIRE A. ve ark.,2005, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391, 806–811p.
19. FISH J. E. ve ark.,2008, miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity, *Cell*, 15(2): 272–284 p.

20. GOODMAN S. R.,2011, Tıbbi Hücre Biyolojisi, Nobel Tıp Kitabevi, 3.Baskı, 149-190 s.
21. GREGORY I. R., CHENDRİMADA T. P., COOCH N., SHIEKHATTAR R., 2005, Human rısc couples microRNA biogenesis and post-transcriptional gene silencing, Cell, 123, 631–640 p.
22. GUNDOĞDU R. Ve ÇELİK V.,2009, RNA interferans (RNAi), Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 25 (1,2), 34-47 s.
23. GUO C. ve ark.,2008, The non-coding RNA, mir-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers, Genes Chromosomes Cancer., 47(11): 939–946 p. doi:10.1002/gcc.20596.
24. GÜNEŞ H. V.,2006, Moleküler Hücre Biyolojisi, Kaan Kitabevi, 2. Baskı, 163-260 s.
25. HARRIS T. A., YAMAKUCHI M., FERLITO M., MENDELL J. T., LOWENSTEIN C. J., 2008, MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1, PNAS, 105 (5), 1516-1521 p.
26. HOSSFELD D.K. ve SHERMAN C.D.,1992, Klinik Onkoloji, Uluslararası Kanser Savaş Birliği, Ankara, 3-7 s.
27. IORİO M.V. ve ark.,2005, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer, Cancer Res.,65, 7065–7070 p.
28. JOHNSON S.M. ve ark. , 2005, RAS is regulated by the let-7 microRNA family, Cell, 120, 635–647 p.
29. JUNG E ve ark.,2012, Plasma MicroRNA 210 Levels Corralate with Sensitivity to Tratzumab and Tumor Presence in Breast Cancer Patients, Cancer, 118, 2603-2614 p. DOI 10.1002/cncr.26565.
30. KASTL L., BROWN I. ve SCHOFİELD A.C., 2012, miRNA-34a is Associated with Docataxel Resistance in Human Breast Cancer Cells, Breast Cancer Res Treat, 131, 445-454 p. DOI 10.1007/s10549-011-1424-3.
31. KIERSZENBAUM A. L.,2006, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş, Palme Yayıncılık, 606-607 s.
32. KLUG W., S. ve CUMMİNGS R., M., 2002, Genetik Kavramlar, ÖNER C., Palme Yayıncılık, 635-657 s.
33. KOSAKA N., IGUCHI H., OCHIYA T., 2010, Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis, Cancer Science, 10 (10), 2087-2092 p.
34. KUMAR V., COTRAN S. R., ROBBİNS L. S., 2000, Basic Pathology Temel Patoloji, ÇEVİKBAŞ U., Nobel Yayınları, 133-174 p.
35. KUTLUK T. ve KARS A.,1994, Kanser Konusunda Genel Bilgiler, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu, Ankara, 13-18 s.
36. LEE R. C., FEİNBAUM R. L., AMBROS V., 1993, The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14, Cell, 75: 843–854 p.
37. LEE E. J. ve ark.,2008, Systemic Evaluation of MicroRNA Processing Patterns in Tissues, Cell Lines and Tumors, RNA, 14, 35-42 p. DOI 1261/rna.804508.

38. LIN Q. ve ark., A Cluster of Specified MicroRNAs in Peripheral Blood as Biomarkers for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer by Stem-Loop RT-PCR, 2012, *J Cancer Res. Clin. Oncol.* 138, 85-93 p. DOI 10.1007/s00432-011-1068-z.
39. LIU B. Ve ark.,2009,miR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo, *Lung Cancer*, 66, 169-175 p.
40. LIU S., GAO S., WANG X. Y., WANG D. B., 2011, Expression of miR-126 and Crk in endometriosis: miR-126 may affect the progression of endometriosis by regulating Crk expression, *Arch Gynecol Obstet*, Springer-Verlag. doi:10.1007/s00404-011-2112-6.
41. LUO X. ve ark.,2011, PolyA RT-PCR-based quantification of microRNA by using universal TaqMan probe, *Biotechnol Lett.* DOI 10.1007/s10529-011-0813-3.
42. MALLICK R., PATNAIK S. K., YENDAMURI S., 2010, MicroRNAs and lung cancer: Biology and applications in diagnosis and prognosis, *Journal of Carcinogenesis*, 9;8.
43. MATTES J., COLLISIN A., PLANK M., PHIPPS S., FOSTER P. S., 2009, Antagonism of microRNA-126 supresses the effector functionof TH2 cells and development of allergic airways disease, *PNAS*, 106 (44), 18704-18709 p.
44. MATTIE ve ark.,2006, Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies, *Molecular Cancer*, 5 (24).
45. MELLORS R. C.,2003, Etiology of Cancer: Carcinogenesis, Imhotep Virtual Medical School,.
46. NARRY K.V.,2005, Small RNAs: Classification, Biogenesis, and Function, *Mol. Cells*, 19, 1-15 p.
47. National Cancer Institute, Cancer Research Portfolio, 2003, "<http://researchportfolio.cancer.gov/biology.html>".
48. NEGRINI M. ve CALIN G. A.,2008,Breast cancer metastasis: a microRNA story, *Breast Cancer Research*, 10 (303).
49. NIKOLIC I., PLATE K. H., SCHMİDT M. HH., 2010, EGFL7 meets miRNA-126:an angiogenesis alliance, *Journal of Angiogenesis Research*, 2:9.
50. OTSUBO ve ark.,2011, MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and contributes to gastric carcinogenesis, *Plus One*, 6 (1), e16617, 1-9 p.
51. ÖZER A. ve AKPİRİK M.,2003, Yeni Ufuklara "Kanserle Savaş", *Bilim ve Teknik*, Şubat, 23 s.
52. ÖZTÜRK M.,1997, Kötü Haber Genlerde Saklı Kanser, *Bilim ve Teknik*, 352, 32-39 s.
53. PATEL N. ve SAUTER E.R.,2011, Body fluid micro(mi)RNAs as biomarkers for human cancer, *Journal of Nucleic Acids Investigation*, 2 (1).
54. ROSS J. S., CARLSON J. A., BROCK G., 2007, miRNA: the new gene silencer, *Am J Clin Pathol*, 128, 830-6.
55. ROSSÍ J. ve KIM D. H.,2007, Strategies for silencing human disease using RNA interference, *Nature Reviews Genetics*, 8, 173-184 p. doi:10.1038/nrg2006.

56. SAYDAM F., D EĞİRMENCİ İ. VE GÜNEŞ H. V., 2011, MikroRNA'lar ve kanser, Dicle Medical Journal, 38 (1): 113-120 p.
57. SCHMİTTGEN T. D., JIANG J., LIU Q. ve YANG L., 2004, A High-Throughput Method to Monitor The Expression of MicroRNA Precursors, Nucleic Acids Research 32, 4.DOI 10.1093/nar/gnh040.
58. SEMPERE L. F. ve ark.,2010, Fluorescence- Based Codetection with Protein Markers Reveals Distinct Cellular Compartments for Altered MicroRNA Expression in Solid Tumors, Clin Cancer Res, 16 (16), 4246-4255 p. doi: 1158/1078-0432.CCR-10-1152.
59. SUN Y. ve ark.,2010, miR-126 inhibits non-small cell lung cancer cells proliferation by targetting EGFL 7, Biochemical and Biophysical Research Communications, 391, 1483-1489 p.
60. ŞENEL F., ÇIRAKOĞLU B., ULUS S., 2003, Yeni Ufuklara “Kanserle Savaş”, Bilim ve Teknik, Şubat, 2-3 s.
61. ŞENGELEN M.,2002, Türkiye'de Kanser İstatistikleri, Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 35-39 s.
62. TAKAMİZAWA J. ve ark.,2004, Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival, Cancer Res., 64, 3753–3756 p.
63. TAVAZOIE S.F. ve ark.,2008, Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis, Nature Publishing, 451 (10), 147-154 p.
64. THOMAS N., S., B., 1996, Apoptosis and Cell Cycle Control in Cancer, BIOS ScientificPublisher, 109-123 p.
65. ULUKAYA E., Kanserın Genel Özellikleri ve Apoptozisle İlişkisi, “http://www.biyokimya.uludag.edu.tr/Lecture_Cancer_2002.pdf”.
66. ULUKAYA E., Hücre Döngüsü ve Apoptozis, “<http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>”.
67. VENTURA A. ve JACKS T.,2009, MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way, Cell, 136, 586-591p.
68. WANG F., ZHENG A., GUO J. VE DING X., 2010, Correlation and Quantitation of MicroRNA Aberrant Expression in Tissues and Sera from Patients with Breast tumor, Gynecologic Oncology, 119, 586-593p.doi: 10.1016/j.gyno.2010.07.021.
69. WANG S. ve ark.,2008, An endothelial-specific microRNA governs vascular integrity and angiogenesis, Cell,15(2): 261–271 p.
70. WANG X.,2009, A PCR-Based Platform for MicroRNA Expression Profiling Studies, RNA, 15;4, 716-723p. DOI 10.1261/rna.1460509.
71. YANG R. ve ark.,2011, Genetic Variants Within miR-126 and miR-135 are not Associated with Breast Cancer Risk, Breast Cancer Res Treat, 127, 549-554 p. DOI 10.1007/s10549-010-1244-x.
72. YILDIRIM A., BARDAKCI F., KARATAŞ M., TANYOLAÇ B., 2007, Moleküler Biyoloji, Protein Sentezi ve Yıkımı, Nobel yayınevi, 1. Basım, 13-17, 55-91, 143-167, 197-217 s.

73. YOSHIDA T. ve ark.,2006, Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors, *Oncogene*, 25, 6056-6066 p.
74. ZAMORE P.D., ve ark., 2000, RNAi: Double-Stranded RNA Directs The ATP Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23,Nucleotide Intervals, *Cell*, 101, 25-33 p.
75. ZHANG H., ZHOU Q., LU Y., DU J., ve SU S., 2011, Aidi Injection Alters the Expression Profiles of MicroRNAs in Human Breast Cancer Cells, *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 31 (1), 10-16 p.
76. ZHANG J. ve ark.,2008, The cell growth supressor, miR-126, targets IRS-1, *Biochemical and Biophysical Rsearch Communications* 377, 136-140 p.
77. ZHU N. ve ark.,2011, Endothelial-Spesific Intron-Derived miR-126 is Down Regulated in Human Breast Cancer and Targets Both VEGFA and PIK3R2, *Mol Cell Biochem*, 351, 157-164 p. DOI 10.1007/s11010-011-0723-7.

8. EKLER DİZİNİ

EK.1: Özgeçmiş

EK.1

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Çağrı ÖNER

Doğum tarihi ve yeri: 18.01.1986-Tarsus/MERSİN

Uyruğu: T.C

Medeni durumu: Bekâr

İletişim adresleri: Büyükdere mah. Şair sok. Uzunkaya Apt. 10/1

ESKİŞEHİR

Eğitim Durumu

İlkokul; 1992-1997, Mersin Özel Türkmen Koleji

Ortaokul; 1997-2001, Mersin Özel Türkmen Koleji

Lise; 2001-2004, İçel Anadolu Lisesi

Lisans; 2004-2009, Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans; 2009-Devam Edilmekte, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yabancı Diller; İngilizce, Almanca

Mesleki Deneyim

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

Hücre Ölümü Araştırmacıları Derneği (HÖAD)

Burslar

- Tübitak Bursu

Projeler

1. Meme Kanseri ve Metastazında miR-126'nın Moleküler Mekanizmasının İncelenmesi (BAP, Araştırmacı)
2. İnsan oküler yüzey ve adnekslerine ait epitel hücre kültürlerinde androjenlerin inflamatuvar yollar üzerine etkisi (TÜBİTAK, Bursiyer)

Sözlü konferanslar veya seminerler

Verilen Seminerler

1. HÜCRE ZARININ YAPISI VE HÜCRE ZARI BAĞLANTILARI, 2010, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2. HÜCRELER ARASI TAŞINMA BİÇİMLERİ, 2010, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
3. KANSER VE SİNYAL YOLAKLARI, 2010, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
4. KODLAMAYAN KÜÇÜK RNA'LARIN KANSER İLE İLİŞKİSİ, 2011, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

5. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ, 2012, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
6. KODLAMAYAN RNA'LAR, MİKRO RNA ve KANSER, 2012, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, FEN BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

Katılan kurslar ve eğitim

1. DENEY HAYVANLARI KULLANIMI ile İLGİLİ EĞİTİM PROGRAMI, 20 EYLÜL- 1 EKİM 2010, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, ESKİŞEHİR
2. MOLEKÜLER BİYOLOJİDE YENİ TEKNOLOJİLER KURSU 26 EKİM 2011, ANTALYA
3. XII. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK KONGRESİ 27-30 EKİM 2011, ANTALYA
4. I. HÜCRE ÖLÜMÜ ARAŞTIRMA TEKNİKLERİ TEORİK KURSU 24-25 KASIM 2011, İZMİR
5. 17 025, LABORATUVAR AKREDİTASYON EĞİTİMİ, 10-11 ARALIK 2011, ESKİŞEHİR
6. KÖK HÜCRE ve GEN TEDAVİSİ SEMPOZYUMU, 27 ŞUBAT 2012, BURSA

