

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

MEME KANSERLİ OLGULARDA miR-125a VE miR-34a mikroRNA'LARININ
GENOMİK DİZİLERİNİN DİZİLEME YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÜMMÜHAN DEMİR

DANIŞMAN

DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU

EYLÜL 2008

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

MEME KANSERLİ OLGULARDA miR-125a VE miR-34a mikroRNA'LARININ
GENOMİK DİZİLERİNİN DİZİLEME YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÜMMÜHAN DEMİR

DANIŞMAN

DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU

EYLÜL 2008

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ümmühan DEMİR'in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "*Meme Kanseri Olgularında miR-125a ve miR-34a microRNA' larının Genomik Dizilerinin Dizleme Yöntemiyle İncelenmesi*" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

06.10.2008

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Prof.Dr. Enver İHTİYAR




Üye: Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU



Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR



Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15/10/2008 tarih ve 762/3536 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr.Ferruh YÜCEL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	v
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. mikroRNAlar.....	3
2.1.1. mikroRNA Genleri ve Yapısı.....	3
2.1.2. mikroRNA'nın İşlenmesi.....	4
2.1.3. RISC yapısının oluşumu.....	5
2.1.4. mikroRNAların Çalışma Prensipleri.....	6
2.1.5. pre-miRNA'nın Yapısı.....	6
2.1.6. mikroRNA Tek Nükleotit Polimorfizmleri.....	7
2.2. mikroRNAlar ve Kanser.....	8
2.2.1. Tümör Baskılayıcı mikroRNAlar.....	9
2.2.2. Onkogenik mikroRNAlar.....	10
2.2.3. mikroRNAların Aktivitelerinin Kanserdeki Bozulma Mekanizmaları.....	11
2.2.4. mikroRNAlarda Mutasyonlar.....	11
2.3. Meme Kanseri.....	12
2.3.1. Kanser.....	12

2.3.2. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması.....	12
2.3.3. Meme Kanseri Moleküler Patolojisi.....	14
2.3.3.1. Meme Kanserinin Çok Aşamalı Gelişim Modeli.....	14
2.3.3.2. Meme Kanserinin Moleküler Olarak Sınıflandırılması.....	14
2.3.3.3. Meme Kanserinde Onkogenler.....	15
2.3.3.4. Meme Kanserinde Tümör Baskılayıcılar.....	16
2.3.3.5. Meme Kanserinde Biyomarkerlar.....	16
2.3.4. mikroRNAlar ve Meme Kanseri.....	17
2.3.4.1. Meme Kanserinde Onkogenik mikroRNAlar.....	18
2.3.4.2. Meme Kanserinde Tümör Baskılayıcı mikroRNAlar.....	19
2.4. TP53 geni.....	20
2.4.1. p53'ün Yapısı.....	20
2.4.2. p53'ün Fonksiyonu.....	21
2.4.3. miR-34a	22
2.5. ERBB2 ve ERBB3.....	24
2.5.1. ERBB ve Kanser.....	25
2.5.2. miR-125a.....	26
2.6. DNA dizileme	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	29
3.1. Hasta Grubu.....	29
3.2. Gereçler	29
3.2.1. Kullanılan Aletler.....	29
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	30
3.3. Yöntemler	31
3.3.1. Taze Doku ve Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi.....	31

3.3.2. İzole Edilen DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu.....	32
3.3.2.1. miR-34a Genomik Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu ..	32
3.3.2.2. miR-125a Genomik Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu..	33
3.3.3. PCR Ürünlerinin Purifiye Edilmesi.....	35
3.3.4. PCR Ürünlerinin Dizi Analizi İçin Hazırlanması Amacıyla Döngü Dizileme.....	36
3.3.5. Döngü Dizileme Ürünlerinin Pürifiye Edilmesi.....	37
3.3.6. Ürünlerin Dizi Analizi İçin Cihaza Yüklenmesi.....	37
3.3.7. Sonuçların Analizi.....	38
3.3.8. İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR	39
4.1. miR-34a'nın Genomik Dizisinin İncelenmesi.....	39
4.2. miR-125a'nın Genomik Dizisinin İncelenmesi.....	39
4.2.1. miR-125a polimorfizmi İçin İstatistiksel Analiz.....	43
4.2.2. Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgesi Tahmini.....	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ.....	51
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	52
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Son yıllarda mikroRNAların işlevlerinin ve kanserdeki rollerinin anlaşılmaya başlanması hem kanserin moleküler patolojisinin anlaşılmasında hem de yeni moleküler hedefe yönelik tedaviler geliştirilmesinde umut olmuştur.

Çalışmamızda 28 meme kanserli hastanın kan ve doku örnekleri ve 50 meme kanseri açısından sağlıklı bireyin kan örneklerinde miR-34a ve miR-125a mikroRNAlarının genomik dizileri dizileme yöntemi ile incelenmiştir. miR-34a'nın genomik bölgesinde herhangi bir polimorfizm veya mutasyon saptanmamıştır. miR-125a'nın transkribe olmayan bölgesinde bilinen bir polimorfizm kontrol ve hasta örneklerinde belirlenmiştir. Bu polimorfizmin hastalara ait örneklerdeki genotip dağılımı; %50,0 TT,%32,1 CT, %17,9 CC şeklindedir. Kontrol örneklerindeki dağılımı ise % 56,0 TT,% 36,0 TC, %8,0 CC' dir. Kontroller ve meme kanserli örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Polimorfizmin bulunduğu bölge, internet tabanlı bir programla transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgesi taşıyıp taşımadığı yönünde incelenmiştir. Bu polimorfizmin bulunduğu bölgeye TT genotipi için Gata-1 transkripsiyon faktörü bağlanırken, CC genotipi için Sp-1 transkripsiyon faktörü bağlanmaktadır. Sp-1 ER için koaktivatör görevi gördüğü için meme kanseri gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir.

Çalışmamızda meme kanserinde miRNA mutasyonlarının seyrek görüldüğü sonucuna varılmış olsa da, net sonuca varmak için bu konuda daha çok çalışma yapılması gerekmektedir. Çalışmamız miR-125a'nın meme kanserindeki önemini ortaya koymuştur ve miR-125a'nın hücrel yolaklarla bağlantısının kurulması için fonksiyonel analizler yapılması gerekliliğini vurgulamıştır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, miR-34a, miR-125a, dizileme.

SUMMARY

Breast cancer is the type of cancer most frequently seen among women in the world. Recently understanding the functions of microRNAs and their roles in cancer progression has been providing expectations for understanding the molecular pathology of breast cancer and developing new molecular targeted therapies.

In our study, genomic sequences of miR-34a and miR-125a were studied in tissue and blood samples from 28 patients with breast cancer and 50 healthy controls with respect to breast cancer by DNA sequencing. Any mutation or polymorphisms were not detected in genomic sequence of miR-34a. A known polymorphism in non-transcribed region of miR-125a was found in patients and control cases. The genotype frequencies of this polymorphism in patient group are 50.0 % TT, 17.9 % CC, 32.1 % CT. The frequencies in control group are 56.0% TT, 8.0 %CC, 36.0 % TC. The genotype frequency difference between patient and control group is statically not significant ($p>0.05$).

The region containing this polymorphism was analyzed whether it contains a binding site for a transcription factor or not. While Gata-1 transcription factor binds this region for TT genotype, Sp-1 transcription factor binds this region for CC genotype. Because Sp-1 is a coactivator for ER, it is known that Sp-1 takes part in breast cancer progression.

In our study, although it was concluded that miRNA mutations in breast cancer is a rare event more studies are needed to perform to drive an exact conclusion. Our study showed the importance of miR-125a in breast cancer and it emphasized the necessity of performing functional analysis to associate miR-125a with cellular pathways in breast cancer.

Key words: Breast cancer, miR-34a, miR-125a, DNA sequencing.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: mikroRNA'nın işlenmesi	5
Şekil 2.2: mikroRNA ve mRNA'nın 3' UTR bölgesinin baz eşleşmesi.....	6
Şekil 2.3 : pre-miRNA yapısı.....	7
Şekil 2.4 : p53'ün etkilediği hücrel yolaklar.....	21
Şekil 2.5 : miR-34a'nın p53 yolağındaki yeri.....	23
Şekil 2.6 : ErbB reseptörlerinin etkilediği hücrel yolaklar.....	25
Şekil 4.1 : - 54 T>C polimorfizmi için heterozigotluğun (CT genotipi) dizi analizinde görüntüsü.....	41
Şekil 4.2 : - 54 T>C polimorfizmi için homozigotluğun (CC genotipi) dizi analizinde görüntüsü	42
Şekil 4.3 : 54 T>C polimorfizmi için homozigotluğun (TT genotipi) dizi analizinde görüntüsü.....	42
Şekil 4.4. : TT genotipi için transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri.....	44
Şekil 4. 5. : CC genotipi için transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 : Hastalara ait bilgiler.....	40
Çizelge 4.2 : Meme kanserli örneklerde miR-125a – 54 T>C polimorfizminin genotip dağılımları	41
Çizelge 4.3 : Kontrol örneklerinde miR-125a – 54 T>C polimorfizminin genotip dağılımları.....	41
Çizelge 4.4 : miR-125a – 54 T>C polimorfizminin hasta ve kontrol örneklerinde istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CNV	Kopya sayısı değişiklikleri
dNTP	Deoksi ribonükleik asit tri fosfat
ddNTP	Dideoksi ribonükleik asit tri fosfat
ER	Östrojen reseptörü
ERBB2	Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 geni
ErbB2	Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 proteini
KLL	Kronik lenfositik lösemi
mg	Mili gram
mikroRNA(miRNA)	Mikro ribonükleik asit
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RB	Retinoblastoma
RISC	RNA ile tetiklenen sessizleştirici kompleks
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
tRNA	Taşıyıcı ribonükleik asit
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
Sp-1	Spesifik protein-1
TBE	Tris-Borik EDTA
UTR	Translasyona uğramayan bölge
µl	Mikrolitre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda mikroRNAların normal gelişimde ve hastalıklardaki rolü ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar mikroRNAların birçok kanser türünde etkili oldukları yönünde ipuçları sağlamaktadır. mikroRNAlar kanserin moleküler patolojisi ile ilgili sorulara cevap olmaya aday gözükmektedir.

miRNAlar 20-22 nükleotitik kısa RNA molekülleridir. miRNAlar mRNA'nın 3' UTR bölgesinde hedef transkripti ile baz eşleşmesi yaparak, bu transkriptlerin translasyonunu değişik mekanizmalar ile baskılar (52). miRNAlar bu şekilde görev yaparak gen düzenlenmesinin bir boyutunu oluşturmaktadır. Bu düzenlenmenin çeşitli mekanizmalarla bozulması hastalıklara sebep olmaktadır. Kanserde miRNA ekspresyon profilleri incelenmiş ve bazı miRNAların ekspresyonlarının azaldığı bazılarının ise arttığı belirlenmiştir (34, 45, 67, 71). Birçok kanser türünde bu çalışmaların tekrarlanması ve fonksiyonel analizler sonucu, ekspresyonu azalan miRNAların "tümör baskılayıcı" özellik gösterdiği ve genelde onkogenlerin transkriptlerini hedeflediği ve ekspresyonu artan miRNAların "onkogenik" özellik gösterdiği ve tümör baskılayıcı genlerin transkriptlerini hedeflediği sonucuna varılmıştır (5, 6, 12, 70).

Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (24). Meme kanseri moleküler patolojisi diğer kanser türlerine göre daha iyi açıklanmış olsa da cevaplanmayı bekleyen sorular bulunmaktadır. miRNAlar bu boşlukları doldurmaya aday gözükmektedir.

TP53 sporadik meme kanseri vakalarının üçte birinde mutasyona uğramıştır (37, 39, 40, 51). p53 birçok hücreyel yolağın başında yer alan ve telomer kısalması, DNA hasarı, onkogenik aktivasyon gibi birçok kanserle ilgili strese hücreyel cevap oluşturacak genleri düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (1, 41, 62, 71). Yapılan çalışmalarda miR-34a mikroRNAsının da p53'ün transkripsiyonunu düzenlediği genlerden biri

olduğu sonucuna varılmıştır ve miR-34a'nın apoptoz, h¼cre d¼ng¼s¼n¼n durdurulması gibi h¼creyel olaylarda işlev g¼sterdiđi belirlenmiştir (27, 28, 54, 63, 64). miR-34a'nın da p53 gibi t¼m¼r baskılayıcı ¼zellik g¼sterdiđi ve meme kanserinde aktivitesi bozulan bir miRNA olduğunu d¼ř¼nmekteyiz.

ERBB2 geni meme kanserlerinin %25-40'ında aşırı ekspresyonu g¼r¼len bir gendir (37,51). Yapılan alışmalar miR-125a'nın bu transkripti hedeflediği ve ¼zellikle ERBB2 aşırı ekspresyonu g¼r¼len meme kanserlerinde ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (4, 57). Dolayısıyla miR-125a t¼m¼r baskılayıcı bir miRNA'dır.

Bu bilgiler işığında çalışmamızda meme kanserli olguların kan ve doku ¼rneklerinde miR-34a ve miR-125a'nın genomik dizilerinin mutasyon ve polimorfizm açısından incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bulunan dizi değişikliklerinin polimorfizm veya mutasyon olup olmadığını belirlemek için meme kanseri açısından sağlıklı kontrol bireylerinin kan ¼rneklerinde de analiz yapılmıştır. Bu şekilde bu miRNAların meme kanserindeki rolleri aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. mikroRNAlar

1990'lara kadar bilinen üç çeşit RNA molekülü mevcuttu: mRNA, tRNA ve rRNA. mikroRNAlar 1993 yılında ilk olarak C. Elegansta bulundu ve daha sonra insanda da bu mikroRNAların homologları ortaya kondu (42). İlk olarak gelişimde görev aldıkları belirlenen miRNAların birçok hücresel olayda faaliyet gösterdikleri şu an bilinmektedir. Son on yılda bu nedenle miRNAların yapı ve işlevlerini belirlemek için yoğun çalışmaların yapıldığını görmekteyiz.

2.1.1. mikroRNA genleri ve yapısı

mikroRNA'lar diğer genler gibi DNA üzerinden transkribe edilir ve proteine dönüştürülmeden küçük RNA molekülleri halinde gen regülasyonunda görev alır (21, 24). miRNA genleri Y kromozomu hariç bütün kromozomlarda dağılmıştır. Bu miRNAların % 50'si yığınlar halinde bulunur ve polisistronik olarak transkribe edilir. İlk olarak miRNA genlerinin intergenik bölgelerde bulunduğu düşünülüyordu. Şu anki bilgilerimize göre ise miRNAlar kodlandıkları genomik bölgeye göre üç gruba ayrılmaktadır:

1. Protein kodlayan transkripsiyon birimlerindeki intronik miRNAlar: İçinde buldukları genin promotorunu paylaştıkları için bu genle aynı ekspresyon paterni gösterirler.

2. Kodlamayan transkripsiyon birimlerindeki intronik miRNAlar

3. Kodlamayan transkripsiyon birimlerindeki ekzonik miRNAlar: Protein kodlayan genlerde bulunan promotora benzer promotora sahiptirler (38, 58).

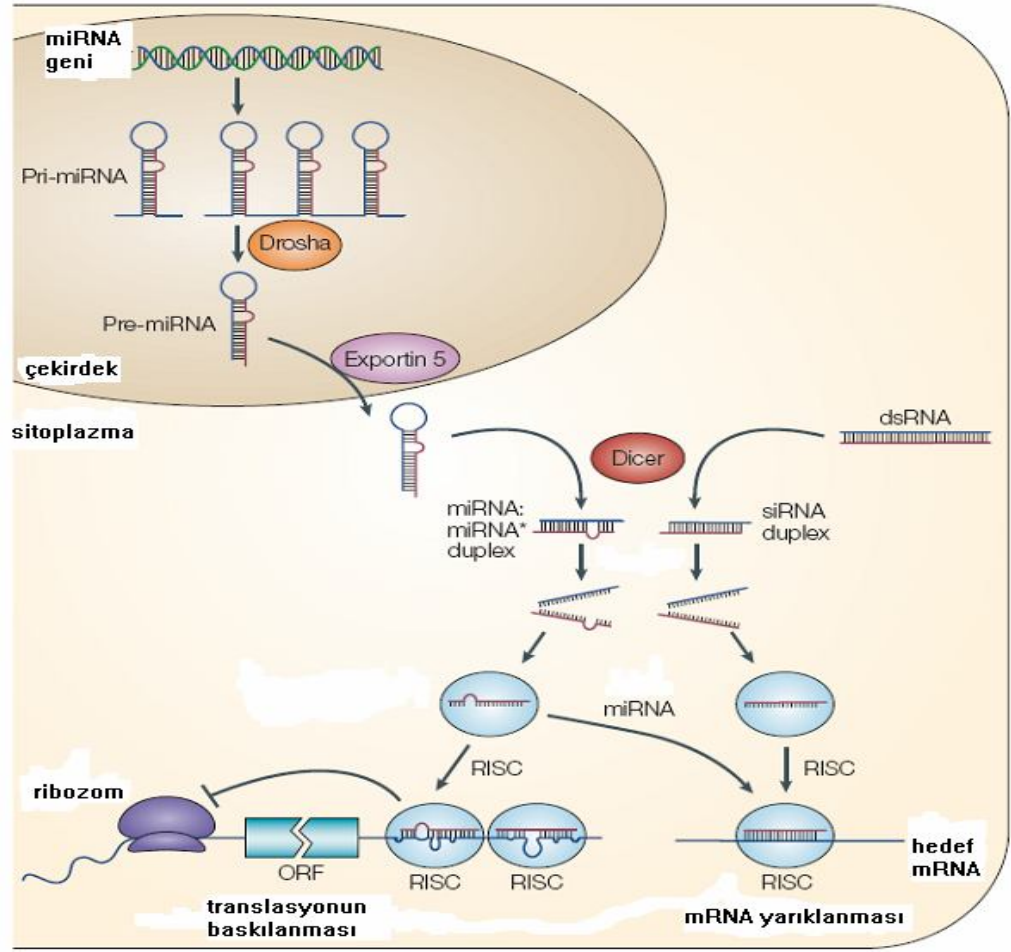
2.1.2. mikroRNA'nın işlenmesi

miRNA genleri RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilir. Oluşturulan transkript “cap” ve poli(A) kuyruğuna sahiptir. Bu oluşan ilk transkript pri-miRNA olarak isimlendirilir. Bu pri-transkriptin olgun miRNA'ya dönüştürülmesi üç aşamada gerçekleşir (Şekil 2.1):

1. “Cropping”: pri-miRNA Drosha isimli enzim ile kesilerek pre-miRNA oluşturulur. 160 kD'luk bir nükleer Ribonükleaz III endonükleaz olan Drosha yaklaşık 200 nükleotitlik pre-miRNA'nın yan kanat dizilerini keserek 70–80 nükleotitlik pre-miRNA'yı ortaya çıkarır. Drosha enzimi pri-miRNA'nın gövde-ilmek yapısını tanıyarak gövdede belli bir noktadan kesimi yapar. Drosha'nın tanımadaki bu özgülüğü, yardımcı proteinlerle sağladığı düşünülmektedir. Bu proteinlerden Di George sendromu kritik bölge geni 8 (DGCR8) (veya Pasha) iki molekülü ve Drosha'nın iki molekülü ile birleşerek heterotetramerik bir mikroprosesör oluşturur. DGCR8 iki tane çift iplik RNA bağlanma bölgesi içerdiği için bu tanımda görev aldığı düşünülmektedir.

2. Export (taşınma): Exportin -5 (exp5)/ranGTP ile pre-miRNA heterotrimerik yapı oluştururlar. Bu yapı pre-miRNA'nın yapısını stabilize ederek sitoplazmaya taşınmasını sağlar. Zar deliklerinden geçip sitoplazmaya gelindiğinde RanGTP RanGDP'ye hidrolize olarak pre-miRNA'nın serbest kalması sağlanır.

3. Dicing: pre-miRNA RNase III Dicer tarafından 18-22 nükleotitlik miRNA'ya dönüştürülür. Dicer için de yardımcı proteinler vardır. İnsandaki TRBP kesilme işleminden daha çok miRNA'nın stabilitesi ve işlevsel yapı oluşturmasında görev alır (16, 21, 38,58).



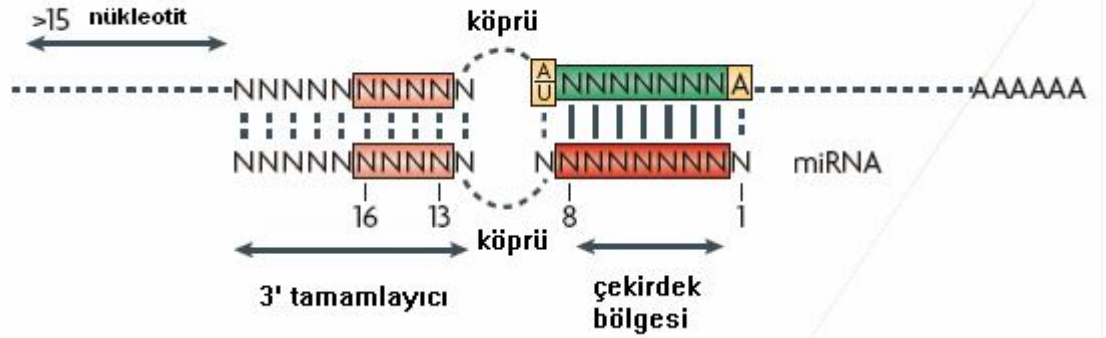
Şekil 2.1. mikroRNA'nın işlenmesi (He, L. and Hannon, G.J., 2004, *microRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation, Nature reviews Genetics, 5, 522 -531 p.*)

2.1.3. RISC yapısının oluşumu

Olgun miRNAlar işlevlerini gerçekleştirmek için başka proteinlere de ihtiyaç duyarlar. Bu proteinlerle birlikte RNA ile tetiklenen sessizleştirici kompleksi (RISC) oluştururlar. Bu yapıdaki tanımlanmış proteinler Argonaute ailesi proteinleridir. Olgun miRNA bu yapıya katılırken tek zincir hale geçer. Argonaute protein ailesinin üyeleri iki domain içerir. Bunlardan Dicer'a benzeyen PAZ domaini tek zincir RNA'nın 3' ucuna bağlanır. Yapılan çalışmalar Argonaute proteinlerinin hedefi kesen endonükleazlar olduğunu göstermektedir (16,21).

2.1.4. mikroRNAların Çalışma Prensipleri

miRNAlar post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu kontrol eden moleküllerdir. mRNAların 3' UTR bölgeleriyle baz eşleşmesi yaparak bu mRNAların degradasyonunu sağlar veya traslasyona uğramalarını engellerler (Şekil 2.2). Aslında miRNAlar sadece hedefi bulan ve miRISC yapısını hedefe yönlendiren moleküllerdir. Asıl mRNA degradasyonunu veya translasyonun durmasını sağlayan RISC yapısını oluşturan diğer proteinlerdir (21).



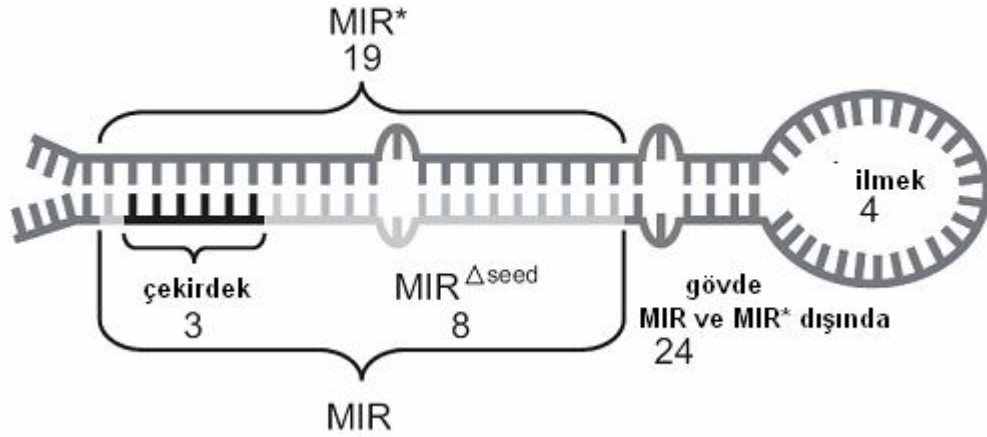
Şekil 2.2. mikroRNA ve mRNA'nın 3' UTR bölgesinin baz eşleşmesi (*Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N., 2008, Mechanism of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?, Nature Reviews Genetics, Advance online publication, 102-114 p.*)

Hücrede bilinen mRNAların yaklaşık %30'unun bu miRNAların hedefi olduğu bilinmektedir (12). Bu bilgiye dayanarak miRNA'ların birçok hücresel olayda görevli olduğunu söyleyebiliriz. miRNAlar ilk olarak gelişim ve farklılaşmadaki rolleriyle ortaya çıkarılmıştır. Şu an kanser dahil birçok hastalıkta rolleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (16).

2.1.5. pre-miRNA'nın yapısı

Pre-miRNA farklı görevleri olan birimlerden oluşur. Bu birimler:

1. Çekirdek Bölgesi
2. Çekirdeğin dışında kalan olgun miRNA bölgesi(MIR^{Δseed})
3. Olgun miRNA ile baz eşleşmesi oluşturan gövde bölgesi (MIR*)
4. Olgun miRNA(MIR) ve MIR* kapsamayan gövde bölgesi
5. İlmeğe bölgesi (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. pre-miRNA yapısı (Saunders, M. A., Liang, H. and Li, W., 2007, *Human polymorphism at microRNAs and microRNAs target sites*, PNAS, 104, 3300-3305 p)

Çekirdek bölgesi miRNA'nın 5'ucundaki 2-8 nükleotitleri arasındaki bölgedir. Bu bölge mRNA'yı tanıyarak baz eşleşmesi oluşturan bölge olduğu için ayrı bir öneme sahiptir (16, 48, 56).

2.1.6. mikroRNA tek nükleotit polimorfizmleri

İnsan genomundaki tek nükleotit değişiklikleri (SNPs) ve kopya sayısı değişiklikleri (CNVs) çeşitliliğin temel sebepleridir. SNPler genomda dağılmışlardır ve mikroRNA genomik bölgelerinde de bulunmaları kaçınılmazdır. Bu fikir ile 2005 yılında mikroRNAların genomik dizilerindeki varyasyonların araştırılması amacıyla 173 miRNA'nın genomik dizisi

dizilenmiştir. Pre-miRNA bölgelerine ait 10 polimorfizm bildirmişlerdir (35). mikroRNA genomik dizisindeki varyasyonlar buldukları bölgeye göre, mikroRNA'nın işlenmesini veya hedef seçimini değiştirebilir (22).

Duan ve ark. yaptıkları çalışma miR-125a genomik bölgesindeki bir polimorfizmin pri-miRNA işlenmesini engellediği için pre-miRNA miktarını azalttığını ortaya koymuştur (17).

mikroRNA genomik dizilerinde bulunan polimorfizmler ile ilgili asosiasyon çalışmaları da sınırlıdır. Arisawa ve ark. miR-27a genomik bölgesindeki bir polimorfizm ile erkeklerde gastrik mukozal atrofi arasında bağlantı kurmuşlardır (2). Hu ve ark. küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde miR-196-a2 genomik dizisindeki bir polimorfizmin hem olgun miRNA miktarını artırdığını hem de hedef transkriptine bağlanma kuvvetini değiştirdiğini, bu nedenle de hastalıkla anlamlı şekilde ilişkili olduğunu bulmuşlardır (33). Yine Hu ve ark. miR-196-a2 ve miR-499'da bulunan polimorfizmlerin meme kanserinde artmış riske sebep olduğunu bildirmişler ve bu mikroRNAların hedef genlerinin de meme kanserinde önemli rol oynamaları ile mekanizmayı açıklamışlardır (32).

Ayrıca mikroRNAların genomik bölgelerinde yeni mutasyon ve polimorfizm arayışı da sürmektedir. Bu amaçla yapılan iki çalışmadan birinde 8 polimorfizm ve 14 mutasyon tanımlanmıştır (68). Diğer çalışmada ise 2 yeni polimorfizm bildirilmiştir (69).

2.2. mikroRNAlar ve Kanser

Kanser genetik bir hastalıktır. Kanser oluşum ve gelişiminde “tümör baskılayıcı” ve “protoonkogen” olarak isimlendirilen genlerin çeşitli mekanizmalarla uygunsuz işlev göstermeleri etkilidir. mikroRNAların ortaya

çıkarılmasından kısa bir süre sonra bu düzenleyici moleküllerin kanserdeki rolleri de araştırılmaya başlanmıştır.

Calin ve ark. KLL hastalarında yaptıkları çalışmada, bu hastaların yarısından fazlasında görülen 13q14 delesyonunun daha önce düşünüldüğü gibi bir “tümör baskılayıcı” geni hedeflemek yerine miR-15 ve miR-16’yı hedeflediğini göstermişlerdir (9). Daha sonra yapılan çalışmalarda bu miRNAların anti-apoptotik faktör olan BCL2’nin ekspresyonunu negatif olarak düzenledikleri ortaya konmuştur (13).

Calin ve ark. miRNA genleri ve kanser arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışmayı yapmıştır (9). Buna benzer çalışmalar bu çalışmayı takip etmiş ama bilinen 700 üzerinde miRNA ve bunların çoğunun kanserli hücrelerde ekspresyon düzeylerinde farklılıkların ortaya konmasına rağmen, yukarda bahsettiğimiz gibi kanserde etki mekanizması açıklanan miRNA sayısı sınırlıdır. Bu konuda çalışmalar yoğun şekilde sürmektedir. Bu çalışmalar ışığında kanserde etkili miRNAlar protein kodlayan genlerde olduğu gibi “tümör baskılayıcı” miRNAlar ve “onkogenik” miRNAlar olarak iki gruba ayrılmıştır (70).

2.2.1. Tümör baskılayıcı mikroRNAlar

Çeşitli kanser türlerinde ekspresyon düzeyleri azaldığı için bazı miRNAların tümör baskılayıcı miRNAlar olduğu düşünülmüştür. Ekspresyon düzeyi azalan bu miRNAlarla fonksiyonel çalışmalar yapıldığında bunların genelde onkogenleri hedef aldıkları görülmüştür (5,13). Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA’nın ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur. Tümör baskılayıcı genlerde olduğu gibi, tümör baskılayıcı miRNAları inaktive etmek için de kanserli hücreler çeşitli mekanizmalar kullanır.

1. Kromozomal yeniden düzenlenmeler: Tümör baskılayıcı mikroRNAların genelde kanserlerde delesyona uğrayan kromozomal bölgelerde yer aldığı belirlenmiştir (8,16)
2. Mutasyonlar (14, 20)
3. Epigenetik değişiklikler (14, 43)

2.2.2. Onkogenik mikroRNAlar

Ekspresyon çalışmalarında, çeşitli kanser türlerinde ekspresyonu azalan mikroRNAlar onkogenik miRNAlar olarak düşünülür. Bunlara “onkomir” adı verilir. Bu miRNAların aktivitelerinin artması hedefleri olan tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarının azalmasına, dolayısıyla tümör oluşum ve gelişimine sebep olur. Bu miRNAların aktivitelerinin artması için kullanılan mekanizmalar:

1. Kromozomal translokasyonlar (14, 16).
2. Genomik artışlar: B-hücreli lenfomalarda 13q31-32 bölgesinin amplifikasyona uğradığı bilinmektedir. Bu bölgede miR-17-92 miRNA yığınının bulunduğu gösterilmiştir. Bu onkogenik miRNA yığınının mekanizması araştırıldığında, bu miRNAların c-myc tarafından aktive edildiği ve bu yığındaki miR-17-5p ve miR-20a'nın E2F1 transkriptini hedefledikleri belirlenmiştir. E2F1'in aktivasyonu normal hücreleri apoptoza götürür. Fakat bu miRNAların amplifikasyona uğradığı hücrelerde, E2F1'in ekspresyonu azalacağı için onkogeneze tetiklenir (48, 50).

2.2.3. mikroRNAların Aktivitelerinin Kanserdeki Bozulma Mekanizmaları

1. miRNA ekspresyon düzeyinin değişmesi: Birçok kanser türünde miRNAların ekspresyon düzeylerinin normal dokulara göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bazı miRNAların ekspresyon düzeyleri artarken bazılarınıninki azalmıştır. Bu ekspresyon değişimini açıklamak için birçok mekanizma öne sürölmüştür. Bu mekanizmalar; miRNAların promotor bölgelerindeki metilasyon, miRNAlardaki mutasyonlar, miRNA işlenmesinin değişmesi olabilir (5).

2. miRNA işlenmesinin değişmesi: miRNA işlenmesinde görev alan Drosha ve RISC yapısının oluşmasında yer alan Argonate ailesi üyesi proteinleri etkileyen mutasyon veya ekspresyon değişimleri de olgun miRNA oluşmasını ve RISC yapısının görevini yerine getirmesini engeller. Bu nedenle bazı kanser türlerinde bu proteinlerin ekspresyon düzeyleri ve kodlayan genlerin mutasyonlarının da moleküler patogeneizde rol oynadığı gösterilmiştir (14, 71).

3. miRNA: mRNA eşleşmesini sağlayan dizilerde mutasyonlar: Bu mutasyonlar miRNAlardaki mutasyonlar ve mRNA'nın 3'UTR bölgesindeki mutasyonlar olarak iki gruba ayrılabilir. mRNA'nın 3' UTR kısmındaki mutasyonlar i) miRNA'nın bağlanmasını azaltabilir veya arttırabilir ii) miRNAlar için yeni bağlanma bölgeleri oluşturabilir (22).

2.2.4. mikroRNAlarda Mutasyonlar

Birçok kanser türünde kansere yakalanan bireyler için aile öyküsü bulunduğu halde, bu durumdan sorumlu kalıtsal mutasyonları taşıyan genler sadece belli kanserler için tanımlanabilmiştir. miRNAların kanserde oynadıkları rol göz önünde bulundurulduğunda bu miRNAları kodlayan genlerdeki mutasyonların da protein kodlayan genlerde olduğu gibi ailesel kanserlerde yatkınlık etkisi veya kanser oluşumunda etkisi olabileceği düşünölebilir. Bu mutasyonlar i) olgun miRNA'nın

yapısını değiştirerek hedef transkripti ile eşleşmesini değiştirebilir ii) pri- veya pre-miRNA'daki mutasyonlar miRNA'nın işlenmesini etkileyebilir iii) pri-miRNA'nın promotor bölgesindeki mutasyonlar transkripsiyon oranını değiştirebilir (22).

KLL ile ilgili yapılan çalışmada miRNA genlerinde %15 somatik mutasyon saptanması ve pri-miR-16-1/15a'da germ-line bir mutasyon bulunması miRNAların da bu açıdan incelenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur (7). Ayrıca bir miRNA'nın birçok genin transkriptini hedefliyor olması, küçük bir değişikliğin dahi malign transformasyonda önemli sonuçları olacağını düşündürmektedir (20).

2.3. Meme Kanseri

2.3.1. Kanser

Kanser hücrenin normal döngüsünü kaybederek, kontrol sistemlerinden kaçıp uygunsuz şekilde bölünmesidir. Hücre bölünmesi genetik kontrol altındadır. Hücreler davranışlarını düzenlemek için kontrol olarak görev yapan ve nasıl davranmaları gerektiğini anlatan karmaşık sinyaller alır, gönderir ve yorumlarlar. Bunun sonucunda her hücre sosyal sorumluluk sahibi bir şekilde organizmanın iyiliği için gerekli zamanda bölünür, farklılaşır, durur veya ölür. Herhangi bir mutasyon daha hızlı bölünebilen bir hücre çeşidi ortaya çıkardığında bu klon üstünlüğü ele geçirir. Fakat bir hücrenin kanserli hücreye dönüşmesi için tek bir mutasyon yeterli değildir. Normal bir hücrenin invaziv bir kanser hücresine dönüşmesi için en az 6 -7 mutasyon gereklidir (1, 62).

2.3.2. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması

Histolojik olarak meme karsinomları iki ana gruba ayrılır: in situ karsinom ve invaziv karsinom. In situ karsinomda epitelyal hücreler bazal membranla çevrilidir, invaziv(infiltratif) karsinomda ise neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya

geçerler. Meme kanserinin Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre histolojik olarak sınıflandırılması aşağıda görülmektedir (36).

1. In situ karsinom

- In situ duktal karsinom
- In situ lobuler karsinom

2. İnvaziv karsinom

- İnvaziv duktal karsinom
- İnvaziv lobuler karsinom
- Tubuler karsinom
- İnvaziv kribriform karsinom
- Medülller karsinom
- Müsinöz karsinom
- İnvaziv papiller karsinom
- İnvaziv mikropapiller karsinom
- Apokrin karsinom
- Sekretuar (juvenil) karsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Metaplastik karsinom
- Nöroendokrin karsinom
- İnflamatuar karsinom

2.3.3. Meme Kanseri Moleküler Patolojisi

2.3.3.1. Meme Kanserinin Çok Aşamalı Gelişim Modeli

Meme kanseri başlangıcının ilk işareti duktal hiperplazidir. Bu aşamada değişik şekil ve kromatin yapıdaki çekirdekler içeren, düzgün dağılım göstermeyen epital hücrelerinin çoğalması görülür. Bu hücreler beningdir fakat hiperplaziden atipik hiperplaziye dönüşüm kanser riskinin artmasıyla bağlantılıdır. Sonraki aşama duktal

veya lobular olarak karsinoma in situ gelişimidir. Bu aşamada malign özellikteki hücrelerin artışı görülür fakat henüz basement membrandan stromaya invazyon gerçekleşmemiştir. Son aşamada hücreler basement membrandan ayrılır invaziv hale gelir. İnvaziv karsinomların çoğu (%85 -95) duktaldır, kalanı infiltrating lobulardır. Bu çok aşamalı modelin her aşamasında hücreye büyüme yönünde belli bir avantaj sağlayan bir genetik değişimin gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu genetik değişiklikler kolorektal kanser modelinde biliniyorken, meme kanseri modelinde genetik değişiklikler bilinmesine rağmen bunların tam olarak hangi aşamada ve hangi sırayla meydana geldiği bilinmemektedir (37).

2.3.3.2.Meme Kanserinin Moleküler Olarak Sınıflandırılması

Sorlie ve ark. meme kanserlerini moleküler özelliklerine göre beş gruba ayırmışlardır. Bu gruplandırma gen ekspresyon paternlerine dayanarak yapılmıştır (60, 61). Buna göre meme kanseri moleküler alt tipleri şunlardır:

1. Bazal-benzeri: En homojen alt gruptur. Normal meme bezlerinin bazal epital hücrelerine benzer bir gen ekspresyon paternleri olduğu için bu adı almışlardır. TP53 geni mutasyonları görülür ve östrojen reseptör negatiftir (26, 61) Kalıtsal BRCA1 mutasyonları taşıyan bireylerde bazal benzeri meme kanseri olduğu bildirilmiştir. Bu tip, kısa relaps dönemi ve uzak metastazlarla karakterizedir (60).

2. Luminal A: Luminal B alt tipi ile birlikte luminal epital hücrelere benzer bir gen ekspresyon paternleri olduğu için bu ismi almışlardır. Bu alt tipte TP53 geni yabancıl durumdadır ve östrojen reseptör pozitifdir (26,61). Toplam yaşam süresi bu hastalarda daha uzundur ve prognozları iyidir (61). BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında Luminal A tip kanser gelişir (60).

3. Luminal B: Luminal B alt tipi Luminal A tipe benzemekle birlikte prognostik olarak orta grupta sınıflandırılmaktadır.

4. HER2: ERBB2(HER2/NEU) geninin aşırı ekspresyonu ile karakterizedir. Prognozu kötüdür. Yaşam süreleri daha kısadır ve metastazları yaygındır (60).

5. Normal-benzeri (60).

2.3.3.3. Meme Kanserinde Onkogenler

Meme kanserinde etkili olduğu düşünülen onkogenler: C-MYC, INT2, EMS1, CCND1, RAS ve ERBB2'dir (37).

c-myc proteini hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu düzenleyen bir fosfoproteindir. Meme karsinomlarının %32'sinde MYC-protoonkogeninin amplifiye olduğu veya yapısal değişikliğe uğradığı bildirilmiştir. C-MYC'in östrojen ve progesteron tarafından aktive edildiği düşünüldüğü için bu genin hormonal tedaviye yanıt vermeme ve kemoterapiye dirençten sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ancak histolojik grade ve tip ile ilişkisi bilinmemektedir (51).

2.3.3.4. Meme Kanserinde Tümör Baskılayıcılar

Germ-line mutasyonları meme kanseri için yatkınlık oluşturan iki gen vardır. Bunlardan BRCA1 genomik stabilitenin korunmasında görev alır. Sporadik meme kanserinde mutasyonları görülmez fakat işlevsiz durumdadır. BRCA2 DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü ve transkripsiyonda görev alır. Sporadik meme kanserinde nadiren inaktif durumdadır (37).

TP53 sporadik meme kanserinde en sık mutasyona uğrayan genidir fakat meme kanseri oluşumunun geç safhalarında mutasyona uğradığı bildirilmektedir. Ailesel olmayan meme kanserlerinin üçte birinde mutasyona uğramıştır. Mutasyonlar genelde

p53 proteininin DNA'ya bağlanarak p53'le transkripsiyonu uyarılan genleri aktive etmesini önler (39).

PTEN genindeki germ-line mutasyonlar meme kanserine sebep olur. Sporadik meme kanserinde somatik mutasyonları çok nadirdir fakat genelde ekspresyonunda azalma görülmektedir (37). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu ekspresyon azalmasının mikroRNAlar ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (20).

2.3.3.5. Meme Kanserinde Biyomarkerlar

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanserdir. Bu nedenle yeni biyomarkerlar bulmak, bu biyomarkerların klinik önemini belirlemek ve yeni tedaviler geliştirmek çok önemlidir.

Meme kanserinde bilinen prognostik faktörlerin en önemlisi östrojen reseptör (ER) ve projesteron reseptördür (PgR). Düşük gradeli tümörler ER ve PgR pozitifdir ve 16q bölgesinin kaybı ile birlikte görülür. Yüksek gradeli tümörler ise her iki reseptör için de negatiftir (23). ER pozitif tümörler ER'a ligandı olan östrojenin bağlanmasını engelleyen ajanlarla tedavi edilebilir. Ancak tümör bu ajanlara karşı direnç geliştirebilir. Genelde bu direnç gelişimini takiben Egfr ve ErbB-2(Her2/neu) tarafından kinaz yollarının uyarılması görülür (23). HER2/NEU gen amplifikasyonu veya protein artışı görülen tümörler histolojik olarak yüksek grade'lidir, kötü prognostiktir, lenf nodu metastazı olabilir (36).

Protein kinaz B/AKT(PKB/AKT) yolağı ER tarafından aktive edilen bir yoldur. Birincil invaziv meme tümörlerinin % 80'inde PKB/AKT 473'üncü serin pozisyonunda fosforiledir.

MAPK yolağı da ER tarafından aktive edilen diğer bir kinaz yolağıdır. Fosforile MAPK endokrin tedaviye kısa süreli cevap ve kısa yaşam süresi ile ilişkilidir.

Fra-1, Fos-ilişkili antijen-1'dir. Fos, ER'ün transkripsiyonu uyarması sırasında kofaktör olarak görev yapar. Fra-1 tümör gelişiminde etkili proteinlerin ekspresyonunu etkilediği için meme kanserinde agresif fenotipin göstergesidir (23).

E-kaderin, β -katenin ile birlikte Ca-bağlı hücrel adhezyondan sorumludur. E-kaderin genelde tümör dediferensiyasyonu ve kanser metastazıyla ilişkili olan epitalyel-mejankimal dönüşümde görev alır. E-kaderini kodlayan gen CDH1 invaziv duktal meme karsinomlarının %50'sinde mutasyona uğramıştır ve infiltrating lobular meme karsinomunda da ekspresyonu hiç görülmemektedir (23, 37).

2.3.4. mikroRNAlar ve Meme Kanseri

mikroRNAların görev aldığı hücrel olaylar düşünüldüğünde bu küçük moleküllerin kanser oluşumunda da rol aldıkları söylenebilir. miRNA hedef genleri arasında birçok tümör supresör ve onkogen olması da bunu desteklemektedir.

miRNAların ekspresyon paternleri birçok meme kanseri hücre hattında, normal ve kanserli meme dokusunda incelenmiştir (34, 45, 67). Farklı ekspresyon gösteren miRNAlar ile tümörün grade'i, moleküler subtipi ve klinik özellikleri arasında ilişki kurulmuştur (4).

Ekspresyon değişiklikleri yanında miRNA genlerinin kopya sayısı değişiklikleri de normal ve tümörlü dokular karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bu kopya sayısı değişikliklerinin yüksek bulunması (%72,8) ekspresyon değişikliklerini bir anlamda açıklamaktadır (71). Ekspresyon değişikliklerine sebep olabilecek diğer bir mekanizma ise epigenetik değişikliklerdir. Lehman ve ark. çalışmasına göre meme kanserinde belli mikroRNAlarda %34 -86 arası olguda hipermetilasyon saptanmıştır. Bu çalışmada metilasyona uğradığı tanımlanan mikroRNAlar: miR-9-1, miR-124a3, miR-148, miR-152 ve miR-663'tür (43).

2.3.4.1. Meme Kanserindeki Onkogenik mikroRNAlar

Meme kanserinde mikroRNAlar ile yapılan çalışmalar sonunda meme kanserinde protein kodlayan genlere benzer şekilde mikroRNAlar için de tümör baskılayıcı ve onkogenik mikroRNAlar tanımlanmıştır.

1. miR-21: miR-21 meme kanseri dokuları ve normal dokular karşılaştırıldığında ekspresyonunda en fazla artış görülen mikroRNA olarak tanımlanmıştır (34). Bu mikroRNAnın fonksiyonel çalışmalarla tanımlanan iki hedef geni bulunmaktadır. Bunlardan TPM1 mikrofilament organizasyonunu ve yapışkan- bağımsız büyümeyi düzenleyen bir tümör supresördür. PDCD4 ise apoptozda görev alan bir tümör supresördür. miR-21 bu tümör supresör genlerin eksprese olmasını baskılayarak tümör oluşumuna sebep olmaktadır.

2. miR-10b: miR-10b ilk ekspresyon çalışmalarında meme kanserli dokuda normal dokuya göre ekspresyonu azalmış olarak bulunmuştu (34). Fakat daha sonraki çalışmalar miR-10b'nin özellikle metastatik meme kanseri hücrelerinde önemli şekilde arttığını gösterdi. miR-10b'nin hücre göçü ve invazyondaki bu önemli rolünü açığa çıkarmak için hangi yolda görev aldığı araştırıldı. Bunun sonunda, transkripsiyon faktörü Twist'in miR-10b'nin ekspresyonunu uyardığı ve miR-10b'nin homeobox D10 (HOXD-10) transkriptini hedeflediği bildirildi. HOXD10'un translasyonunun miR-10b tarafından baskılanması hücre içinde pro-metastatik faktör olan RHOC'nin aktive olmasına sebep olacak bir dizi değişikliğe sebep olmaktadır. Bu durum miR-10b'nin onkogenik etkisini açıklamaktadır.

3. miR-27a: miR-27a'nın hedef transkripti bir transkripsiyon faktörü olan ZBTB10'dur. ZBTB10 Sp1 transkripsiyon faktörünün represörüdür. Sp1, hücrelerin G₀/G₁ fazından S fazına devamını sağlar. miR-27a'nın ZBTB10'un translasyonunu baskılaması Sp1'in artmasına ve hücrelerin kontrolsüz olarak hücre döngüsüne devamına sebep olur (65).

2.3.4.2. Meme Kanserinde Tümör Baskılayıcı mikroRNAlar

1. miR-206: Fonksiyonel çalışmalarda miR-206'nın östrojen reseptör α transkriptini hedeflediği belirlenmiştir. Bu mikroRNAnın ekspresyonu da ER- α negatif tümörlerde artmıştır. Tam mekanizma bilinmemekle birlikte, bu bulgular miR-206'nın meme kanserinde tümör supresör etkisi olduğunu düşündürmektedir (65).

2. miR-17-5p: miR-17-5p geni meme kanserli örneklerde heterozigotluk kaybı (LOH) görülen 13q3 bölgesinde bulunmaktadır. Bu mikroRNA AIB1 transkriptini hedeflemektedir. AIB1 ER- α ve E2F1'in transkripsiyonel aktivitelerini arttıran bir ko-faktördür. AIB1 transkriptinin miR-17-5p tarafından baskılanması östrojen ile indüklenen meme kanserini ve E2F1'den dolayı östrojen ile indüklenmeyen meme kanserini baskılar (65).

3. miR-125a ve miR-125b: Bu mikroRNAların HER2 amplifiye veya over-eksprese meme kanserlerinde ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (4, 34).

2.4 TP53 geni

Bir hücreye baktığımızda üç tane seçeneği vardır: Olduğu gibi kalabilir, bölünebilir veya ölebilir. Bazı hücreler farklılaşma seçeneğine de sahiptir. Hücre kararını iç ve dış uyaranları alıp yorumlayarak verir. Onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin görevi bu sinyallerin oluşturulması alınması, iletilmesi ve yorumlanmasıdır (62). Dolayısıyla bu genlerde meydana gelen herhangi bir bozukluk hücrenin vereceği kararı etkiler. Bu da "kanserli hücre" kavramı ile uyumludur. Çünkü kanserli hücre bölünmeme kararı vermesi gereken durumda bölünme kararı veren hücredir.

Hücrelerin bu kararları verdiği noktalarda görevli en önemli üç gen vardır. Bunlar TP53, RB1 ve CDKN2A'dır (1, 62, 66). Kanserli hücreler bu genleri bir şekilde inaktive etmeli ve bu kontrol noktalarını aşmalıdır.

TP53 geni 17p13.1 lokusunda yer alır. 393 amino asitlik bir protein kodlar. p53 proteini ilk olarak 1979'da SV40 virüsüyle enfekte olan hücrelerde saptanmıştır.

2.4.1. p53'ün yapısı

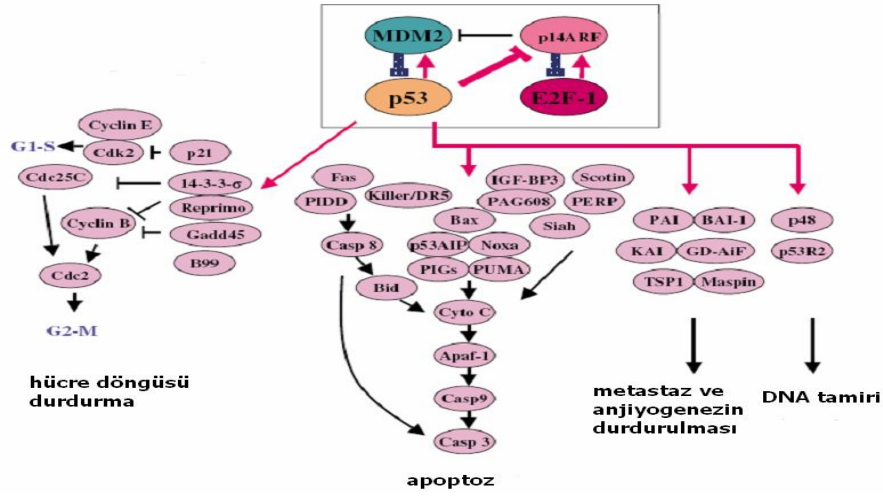
p53'ün yapısını anlamak p53'ün görevlerine ışık tutacaktır. Bu açıdan önemlidir. Aktif p53 tetramer halde bulunur ve her monomer birçok bölgeden oluşur.

1. Asidik N-terminal bölge(kodon 1- 101): İki temel bölge içerir.
2. Korunmuş DNA bağlanma bölgesi(kodon 102- 292): Belli genlerin promotorlarındaki spesifik dizileri tanıyarak bağlanmayı sağlayan bölgedir.
3. Bazik C-terminal bölgesi (kodon 293-393) : Tetramerizasyon ve p53 aktivitesinin düzenlenmesinde yer alır (40).

2.4.2. p53'ün Fonksiyonu

Normal hücrelerde p53 düzey ve aktivitesi düşüktür. Hücrel strese cevap olarak p53 birçok hücrel fonksiyon gerçekleştirir (Şekil 2.4). Bu fonksiyonlar:

1. G1/S noktasında p21^{WAF1/CIP1} proteininin aktivasyonu ile ve G2/M noktasında GADD45 ve 14-3-3 σ proteinlerinin yardımı ile iki temel hücre döngüsü noktasında hücreyi durdur.
2. Apoptozu tetikler. p53 intrinsik ve ekstrinsik apoptoz yollarında görev alan proteinleri kodlayan genleri aktive ederek veya baskılayarak apoptozda görev alır (40, 62).



Şekil 2.4. p53'ün etkilediği hüresel yollar (Haris, S.L. and Levine, A.J., 2005, *The p53 pathway: positive and negative feedback loops, Oncogene, 24, 2899-2908 p*)

p53 diğer transkripsiyon faktörlerine benzer hareket eder. p53'ün bağlanması kromatin yeniden düzenleyicileri veya histon asetil transferazları veya metil transferazları toplayarak genel transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz için geni erişilebilir hale getirmesidir. İkinci mekanizma; p53'ün mediator kompleks ile doğrudan etkileşerek transkripsiyonu aktive etmesidir (41).

2.4.3. miR-34a

miR-34a 1p36 bölgesinde yerleşik bir protein kodlamayan küçük RNA molekülüdür. Genomik bölgesine göre bakıldığında, protein kodlamayan transkripsiyon birimlerindeki mikroRNAlara örnektir. İki ekzondan oluşur ve promotor bölgesinde p53 bağlanma bölgesi taşır (63).

mikroRNAların kanserde global olarak azalmaları belirlendikten sonra (5), bu küçük moleküllerin tümörögenezdeki rollerini araştırmak için birçok çalışma yapılmaktadır. p53 tümör baskılamada çok önemli bir role sahiptir.

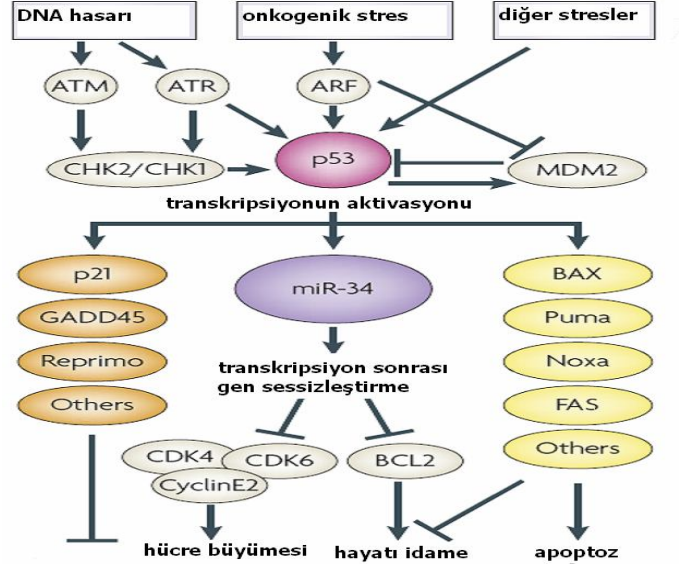
Birçok hücrel olayda görev alan bu proteine mikroRNAların da yardım ediyor olabileceği teorisiyle yola çıkan bilim adamları, bu mikroRNAları tanımlamak için yabancı tip TP53 geni taşıyan ve TP53 geni taşımayan hücrelerde mikroRNAların ekspresyon paternini incelemişlerdir.

2007 yılında He ve ark. bu konudaki ilk çalışmayı yapmış ve miR-34 ailesinin p53 tarafından düzenlendiğini bulmuşlardır. p53'ün görev aldığı hücrel yolları miR-34 ailesinin yardımıyla düzenlediğini belirtmişler (Şekil 2.5) ve bunu da daha önce p53 tarafından baskılandığı düşünülen CDK4 ve CCNE2'nin aslında miR-34 tarafından baskılandığını göstererek kanıtlamışlardır (28).

Tarasov ve ark. p53 tarafından düzenlenen mikroRNAları araştırmışlar ve miR-34a'nın bu miRNAlar içinde en fazla indüklenen olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada miR-34a'nın apoptozu ve G₁ fazında durdurulmayı tetiklediği ortaya konmuştur (63). Buradaki önemli nokta miR-34a'nın transkripsiyonlarını düzenlediği hedef genlerdir. NOTCH1 ve DLL1 miR-34a'nın doğrulanmış hedefleridir ve bu genlerin tümör oluşumundaki rolleri birçok çalışma ile gösterilmiştir (19). Bu da miR-34a'nın "tümör supresör" rolünü kanıtlamaktadır. miR-34a p53'e bağlı veya bağımsız olarak apoptoz, DNA tamiri, anjiyogenez, hücre döngüsü gibi pek çok hücrel olayda görevli genleri hedefleyerek bu rolünü gerçekleştirmektedir (11).

miR-34a'nın apoptoz ve G₁ fazında durdurma özelliği birçok çalışmayla ortaya çıkarıldıktan sonra belli kanser türlerinde de miR-34a'nın tümör supresör fonksiyonunu araştıran çalışmalar yapılmıştır. Kolon kanserli doku örneklerinde normal kontrollerle karşılaştırıldığında miR-34a'nın ekspresyonunun azaldığı ve dışarıdan miR-34a'nın hücreye verilmesinin tümör baskılayıcı etkisi olduğu ortaya konmuştur. miR-34a tümör baskılayıcı fonksiyonunu E2F yolağının aktivitesini azaltıp p53/p21 yolağının aktivitesini artırarak hücre döngüsünü

durdurarak yerine getirmektedir (64). Hücre döngüsünün devamını sağlayan CCND1 ve CDK6 transkriptleri de miR-34a'nın hedefidir (27,28).



Şekil 2.5. miR-34a'nın p53 yolağındaki yeri (He, L., He, X.,Lowe, S.W. and Hannon, G.J., 2007, *microRNAs join the p53 network-another piece in tumor suppression puzzle. Nature Reviews Cancer, advance online publication, 1-4 p*)

Birçok çalışma miR-34a'nın tümör supresör rolünü kanıtlarken miR-34a'nın onkogenik etki yaptığını gösteren makaleler de vardır (18, 53). miR-34a'nın hücre tipine bağlı olarak hem onkogenik hem tümör baskılayıcı davranabileceği öne sürülmüştür (18).

2.5. ERBB2 ve ERBB3

Hücre çevreden gelen uyarıları yorumlayarak hayatını idame ettirme, bölünme veya hücre ölümüne gitmeye karar verebilir. Hücrenin hayatını devam ettirmesini sağlayan en önemli sinyal molekülleri büyüme faktörleridir. Epidermal büyüme faktörleri (EGF) bunlardan biridir ve ErbB reseptör ailesine bağlanarak hücre yolları sayesinde belli hücresel cevapların ortaya çıkmasını

sağlar. Bu sinyal yolları; EGF miktarı, ErbB reseptörlerinin ekspresyon miktarları ve pozitif ve negatif düzenleyicilerin varlığıyla kontrol edilir (30).

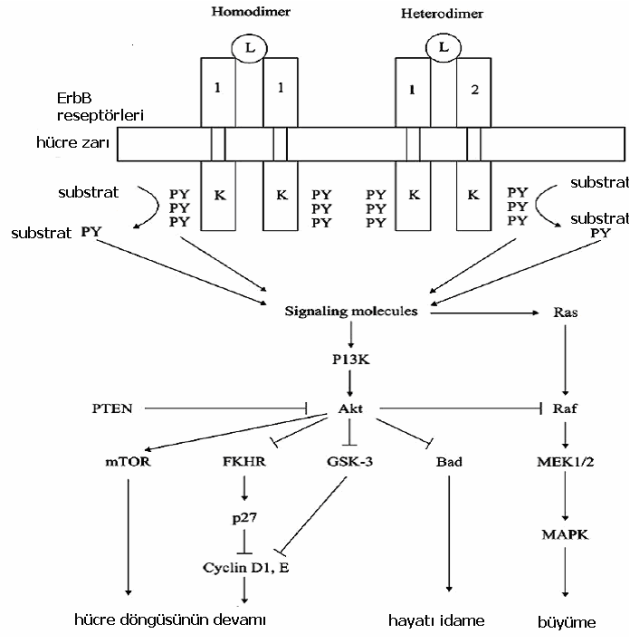
ErbB(EGF) reseptör ailesi 4 üyeden oluşur.(ErbB1/EGFR, ErbB2/Her2/neu, ErbB3/Her3, ErbB4/Her4) Bunlar tirozin kinaz transmembran reseptörleridir. Yapılan son çalışmalarda miR-125a ve miR-125b'nin ERBB2 ve ERBB3'ün ekspresyon düzeyini azaltıcı faktörler olduğu belirlenmiştir (57).

EGF'nin bağlanması ErbB reseptörünün dimerizasyonuna ve reseptörlerin karşılıklı tirozin fosforilasyonu ile tirozin kinaz bölgesinin aktifleşmesine sebep olur. Bu fosforlanmış bölgeler Src homoloji 2 bölgesi taşıyan proteinlerin bağlanmasını sağlar. Bu proteinler Grb2, Nck ve Shc'dir. Bu proteinlerin bağlanması ile bir kinaz kaskadı oluşur ve hücredeki protein fonksiyonları ve transkripsiyon aktivasyonu gibi olaylar uyarılır (Şekil 2.6) (30).

2.5.1. ERBB ve kanser

ERBB reseptör genleri; gen amplifikasyonları, yapısal yeniden düzenlenmeler ve somatik mutasyonlarla onkogene dönüşerek kanser gelişiminde etkili olurlar. Meme kanserlerinin %25'inde ERBB2'nin aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir (30,37). ERBB2'nin aşırı ekspresyonu hücre döngüsü kontrol noktalarının bozulmasına sebep olur. Özellikle G₁/S noktası ErbB2'ye bağlı yollarla kontrol edilir. Bu yollar Ras/ERK, p38MAPK ve PI3K'dır. Sonuçta ErbB2 aktivasyonu D-tipi siklinlerin ekspresyonu ve p21 ve p27 gibi siklin-bağlı kinaz (CDK) inhibitörlerinin düzenlenmesini sağlar (3). ErbB2 apoptozun düzenlenmesinde de rol oynar (30).

Son çalışmalarda, ERBB2'nin hücre yolaklara ihtiyaç duymadan nükleusa göç ederek transkripsiyon kompleksinin bir parçası olarak görev yapıp bu hücre fonksiyonları yerine getirdiği öne sürülmüştür (3).



Şekil 2.6. ErbB reseptörlerinin etkilediği hücreyel yolaklar (Nicolini, A., Carpi, A. And Tarro, G., 2006, *Biomolecular markers of breast cancer. Frontiers in BioScience, 11, 1818-1843 p*).

2.5.2. miR-125a

miR-125a 19q13.41 bölgesinde lokalize bir mikroRNA'dır. Embriyogenezdeki rolüyle önem kazanan bu mikroRNA ERBB2 ve ERBB3 gibi iki önemli büyüme faktör reseptörünün mRNA'sını hedefleyerek bu görevini yerine getirmektedir (57, 59).

miR-125a'nın meme kanserinde rol oynayan bir miRNA olabileceği ile ilgili ilk veri Iorio ve ark. çalışmasında elde edilmiştir (34). Bu çalışmada miR-125a'nın ekspresyonunun meme kanserli örneklerde önemli şekilde azaldığı gösterilmiştir. Daha sonraki çalışmalar da bu veriyi destekler nitelikte olduğu için şu an miR-125a ve paraloğu olan miR-125b'nin meme kanseriyle ilgili iki tümör supresör miRNA olduğu düşünülmektedir.

miR-125a'nın ERBB2 aşırı ekspresyonu ve amplifikasyonu gösteren meme kanserlerinde ekspresyon azalışının görülmesi, miR125a ve miR-125b'nin ekspresyonlarını normale döndürmenin bu tip kanserlerin gelişimini durdurabileceği teorisinin ortaya atılmasına sebep olmuştur. Bu amaçla yapılan çalışmada meme kanseri hücre hatlarının, miR-125a ve miR-125b ekspresyonu arttığında, büyümelerinin azaldığı ve daha az göç ve invazyon potansiyeli gösterdiklerini ortaya koymuştur. Ayrıca bu miRNAların ekspresyonu meme kanserinde önemli bir yolak olan Erk1/2 ve Akt yolakların da sinyal iletimini azaltarak hücre döngüsünün durmasına sebep olmuştur (57).

Duan ve ark. yaptıkları çalışmada miR-125a'nın genomik dizisinde bulunan bir polimorfizmin pri-miRNA'nın pre-miRNA'ya işlenmesini etkileyerek hem olgun miRNA miktarını yani miRNA ekspresyonunu azalttığını hem de hedef transkriptinin translasyonunu baskılamasını engellediğini ortaya koymuşlardır (17).

2.6. DNA Dizileme

İnsan genom projesi ile insan genomunun tümünün baz dizisinin çıkarılması hedeflenmiştir. %99 oranında tamamlanan çalışma DNA dizileme teknolojilerine de yeni boyutlar kazandırmıştır. Temel olarak DNA dizilenmesi konusunda iki teknik vardır: Bunlar Maxim-Gilbert ve Sanger yöntemleridir.

Maxim-Gilbert: Bu yöntemde floresan veya başka bir yöntemle işaretlenmiş bir DNA bölgesi belli bir baza spesifik kimyasal reaksiyonlarla parçalanarak fragmanlara ayrılır. Her spesifik reaksiyon için ayrı bir kuyu kullanılarak poliakrilamid jelde yürütülür ve görüntülenerek baz dizisi belirlenir.

Sanger: Bu yöntemde in-vitro ortamda DNA sentezi sırasında sentezi durdurucu ddNTP moleküllerinin ortama eklenmesi ile sentezin durdurulması amaçlanır. ddNTP'ler normalde DNA sentezi sırasında zincirin uzaması için bağ sağlayan 3' oksijen molekülüne sahip değildir. İşaretli primerler veya ddNTPler

varlığında DNA dizisi 4 farklı reaksiyon yapılarak (her reaksiyon için bir ddNTP) poliakrilamit jelde veya her ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) farklı floresan boya ile işaretlenerek otomatik kapiler elektroforez sistemlerinde bütün baz dizisi elde edilebilir (47)

Deneysel olarak DNA'nın dizilenmesi dört aşamadan oluşur:

1. PCR: Dizileme yapacağımız genomik bölgenin sınırlandırılmasını ve çoğaltılmasını sağlar. Dizi spesifik primerler, DNA polimeraz enzimi ve serbest nükleotitler varlığında in vitro ortamda dizilenecek bölge sınırlandırılır ve milyonlarca kez çoğaltılır.
2. PCR sonrası pürifikasyon: PCR sonrası ortamda bazı artık ürünler (primer artıkları, dNTPs ve enzim) bulunabilir. Bunlar sonraki aşamalar için problem oluşturabileceğinden ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlemde düşük moleküler ağırlıklı primer ve nükleotitleri uzaklaştırmak amacıyla ticari olarak üretilmiş basit bir spin-kolon sistemi kullanılabilir. İşlem sonunda saf halde çift sarmallı PCR ürünü elde edilir.
3. Döngü dizileme: Döngü dizileme durdurucu nükleotitlerin (ddNTPs) eklenmesi için yapılan asimetrik bir PCR'dır. Standart PCR'dan farklı olarak tek bir primer ve durdurucu nükleotitler ortama eklenir ve rutin denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları ile floresan işaretli ddNTPs bağlanması sağlanır. Böylece otomatik dizi analiz sisteminin okuması için hazır fragmanlar oluşturulur.
4. Döngü dizileme ürünlerinin pürifikasyonu ve otomatik dizi analizi sistemine yüklenmesi: Döngü dizileme sonrası ortamda bazı artıklar bulunmaktadır. Bu artıklar otomatik dizi analiz sisteminde sorun oluşturacağı için temizlenmesi gerekmektedir. Bu işlem için standart olarak sodyum asetat-alkol serisi yöntemi kullanılabilir. Ancak daha hızlı ve verimli sonuç verebilen ticari olarak üretilmiş

sefadeks içeren spin-kolonları kullanmak da mümkündür. Bu temizleme işleminin ardından ürünler otomatik dizi analizi cihazına yüklenerek floresan işaretli fragmanların bir kamera yardımı ile okunması ve bir program ile analizi sonucu DNA dizisi elde edilir (47).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Hasta grubu

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında meme kanseri tanısı almış 28 hastanın hem kan ve hem de meme kanserli doku örnekleri dâhil edilmiştir. Meme kanserli doku örnekleri operasyon sonrası serum fizyolojik içine alınmış ve -80°C 'de dondurulmuş ve soğuk zincir ile laboratuvarımıza ulaşmıştır. Kan örnekleri EDTA'lı tüp içinde -80°C 'de saklanmış ve yine soğuk zincir ile laboratuvarımıza gelmiştir. Ayrıca meme kanseri açısından sağlıklı 50 kontrol bireyinin kanı da çalışmamızda kullanılmıştır. Çalışmamız Mart 2008-Eylül 2008 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Meme kanserli olguların kan ve doku örnekleri ve kontrol bireylerinin kan örneklerinde miR-125a ve miR-34a mikroRNalarının genomik dizileri DNA dizilime yöntemiyle incelenmiştir.

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan Aletler

Elektroforez için güç kaynağı (EKR)
Hassas terazi (Setra)
Pipet takımı (Gilson)
Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)
Manyetik karıştırıcı (ısıtıcılı) (Heidolph)
Elektroforez aleti (Consort E844)
Mikrosantrifüj (Sigma)
PCR aleti (thermal cycler) (PE GenAmp PCR System 9700)
Su banyosu (Nüve)
Vorteks (Heidolph)
Mezür (100'lük 1000'lik)

Beher (250'lik, 500'lük)
Deep-freeze (Arçelik)
Mikrodalga fırın (Arçelik)
Buzdolabı (Arçelik)
Falkon tüpü (50'lik)
Ependorf Tüpü (1,5 ml'lik)
PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)
Toplama tüpü (QIAGEN)
Spin kolonu (QIAGEN)
Mini soğutucu
Genetik analizör (ABI 310)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Agaroz (Scharlou)
Borik asit (Sigma)
dNTP seti (Promega)
EDTA (Sigma)
Etanol (95%) (Tekel)
Etidyum Bromid (Sigma)
Proteinaz K (Roche)
10XPCR buffer (Bioron)
Tissue lysis buffer (Roche)
Moleküler Weight Marker (Fermantas)
Taq DNA polimeraz (Bioron)
6X Jel yükleme tamponu (Sigma)

3.3.Yöntemler

3.3.1. Taze doku ve kan örneklerinden DNA elde edilmesi

Taze doku ve kan örneklerinden DNA elde edilmesinde robotik DNA izolasyon sistemi kullanılmıştır. Kan örnekleri için robotik sistemdeki protokol aynen uygulanırken doku için bazı ön işlemler uygulanmıştır.

Taze dokudan DNA elde edilmesi için uygulanan protokol kısaca;

- Doku örneklerinden 5-10 mg arası küçük parçalar alınmıştır.
- Bisturi yardımıyla yüzey alanını genişletmek amacıyla mekanik parçalama gerçekleştirilmiştir.
- Örnekler eppendorf tüpüne alınarak 500 µl PBS eklenmiştir.
- 14.000 rpm'de 10 dakika döndürülmüş ve süpernatantı atılmıştır.
- Eppendorf tüpünde dipte kalan doku üzerine 30 µl proteinaz K ve 200 µl doku parçalayıcı tampon eklenmiştir.
- Proteinaz K aktivitesi için 56⁰ C'de 2-3 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında 30 dakikada bir vorteks yapılarak homojenizasyon sağlanmıştır.
- Su banyosundan alınan örnekler robotik DNA izolasyon sistemine yüklenmiştir.
- Sample volume 200 µl, elution volume 100 µl ve "total plasma nucleic acid isolation" programı seçilmiştir.

Kan örnekleri ise doğrudan robotik DNA izolasyon sistemine yüklenmiştir. Sample volume 200 µl, elution volume 100 µl ve “ DNA isolation blood” protokolü seçilmiştir.

Robotik sistemde proteinaz K, yıkama solüsyonları ve DNA'yı tutmak için manyetik parçacıkların ve pipetaj için boş kuyucukların bulunduğu bir kartuş sistemi, pipet uçlarının yerleştirilmesi için tip trayler ve örnek ve elüsyon tüpleri için bir rak bulunmaktadır. Robotik sisteme kartuş ve tip trayler yerleştirilip örnek ve elüsyon tüpleri koyulduktan sonra bütün işlemleri otomatik gerçekleştirmektedir. İşlem yaklaşık 25 dakika sürmekte ve elde edilen DNA örnekleri -20⁰ C'de saklanmaktadır.

3.3.2. İzole Edilen DNA Örneklerinin PCR İle Amplifikasyonu

3.3.2.1. miR-34a genomik bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

miR-34a'nın amplifikasyonu için primer dizileri:

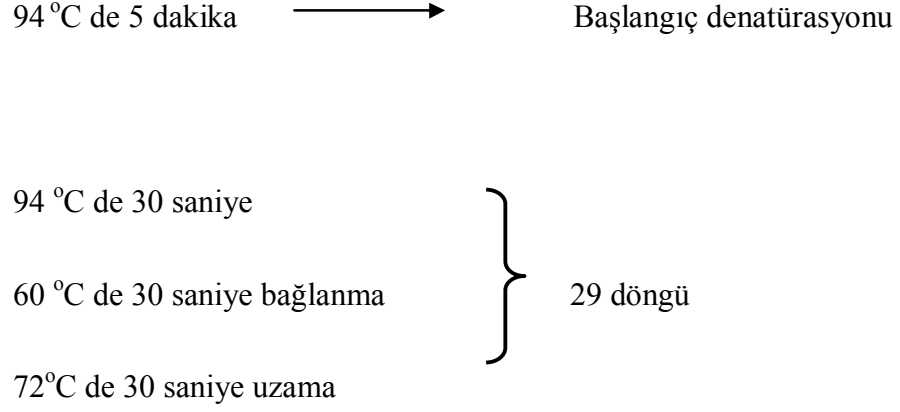
primer F: 5'AGATGGAGTCTTGCTAGTTGCCTG'3

primer R: 5'CAGAAGAGCTTCCGAAGTCCTGG'3

PCR miksi:

ddH ₂ O	37,9 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP mix (10mM)	1 µl
primer F (10µM)	0,4 µl
primer R (10µM)	0,4 µl
Taq pol (5 u/µl)	0,3 µl
DNA	5 µl
	+ -----
	50 µl

PCR şartları:



En sonunda 72°C de 5 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanmıştır.

3.3.2.2. miR-125a genomik bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

miR-125a genomik bölgesinin amplifikasyonu için iki farklı primer çifti kullanılmıştır.(Tekrar dizilerinden dolayı dizileme sırasında yaşanan zorlukları aşmak için iki farklı primer çifti kullanılmıştır.) Primer dizileri:

primer 1F: 5'-CTCTGGCTCTCAGAATGTCTCTG-3

primer 1R: 5'-GGTCAGAAGTCAGGCCAGC-3

primer 2F: 5'-GGCTCTCAGAATGTCTCTGTGC'3

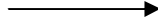
primer 2R: 5'-ACCTTTATGAAGTCACCACAGG'3

PCR miksi:

ddH ₂ O	37,9 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP mix (10mM)	1 µl
primer F (10µM)	0,4 µl
primer R (10µM)	0,4 µl
Taq pol (5 u/µl)	0,3 µl
DNA	5 µl
	+ -----
	50 µl

PCR şartları:

94 °C de 5 dakika



Başlangıç denatürasyonu

94 °C de 30 saniye

56 °C(primer2), 58,5 °C(primer 1) de 30 saniye bağlanma

72°C de 30 saniye uzama



35 döngü

En sonunda 72°C de 5 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanmıştır.

3.3.3.PCR ürünlerinin purifiye edilmesi

PCR ürünleri, Qiagen QiaQuick PCR purification kiti kullanılarak PCR reaksiyonu artıklarından temizlenmiştir. Kısaca;

- PCR ürünü eppendorf tüpe alınmıştır.
- PCR ürününün üzerine miktarının 5 katı Buffer PB eklenmiştir. (40 µl PCR ürünü için 200 µl PB eklenmiştir.)
- Pipetaj yapılarak filtreli tüplere aktarılmıştır.
- 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve süzüntü dökülmüştür.
- Filtreli tüp tekrar toplama tüpüne yerleştirilerek üzerine 750 µl buffer PE eklenmiştir.
- 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama yapılmıştır.
- Süzüntü dökülmüş, filtreli tüp toplama tüpüne yerleştirilmiş ve bir kere daha 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Süzüntü toplama tüpü ile birlikte atılarak filtreli tüp temiz bir eppendorf tüpüne yerleştirilmiştir.
- Filtreli tüpe buffer EB eklenerek PCR ürününün filtreden eppendorfa süzülmesi için önce 1 dakika oda sıcaklığında beklenmiş ve sonra 13000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
- Elde edilen ürün hemen döngü dizileme yapılacaksa +4⁰ C'de veya uzun süre için -20⁰C'de saklanmıştır.

3.3.4. PCR ürünlerinin dizi analizi için hazırlanması amacıyla döngü dizileme

Döngü dizileme Applied Biosystem Big Dye Terminator V 1.1 kiti ile gerçekleştirilmiştir. Protokol ve döngü dizileme programı aşağıdaki gibidir.

5x Döngü dizileme buffer	2 µl
Big Dye terminatör (V1.1)	4 µl
primer F/R (1 µM)	3.2 µl
Pürifiye edilmiş PCR ürünü	10.8 µl

+

20 µl

95 °C de 15 saniye

50 °C'de 5 saniye bağlanma

60 °C de 4 dakika uzama

} 35 döngü

3.3.5. Döngü Dizileme Ürünlerinin Pürifiye Edilmesi

Döngü dizileme sonrası artıklardan arındırmak için Qiagen firmasının Dye-Ex kiti kullanılmıştır. Kısaca;

-Kitte bulunan filtreli tüpler vorteks yapılmış, alt emniyet kapakları kırılmış ve üst kapakları 45⁰C açılmıştır.

- Filtreli tüpler toplama tüplerine yerleştirilerek 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır.

- Toplama tüpü süzüntü ile birlikte atılmış ve filtreli tüp ependorf tüpe yerleştirilmiştir.

- Döngü dizileme ürünlerinin hepsi filtreli tüpe aktarılmıştır.

- 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir.

- Filtreli tüp atılmış ve ependorf pürifiye döngü dizileme ürünleri ile saklanmıştır.

3.3.6. Ürünlerin dizi analizi için cihaza yüklenmesi

Döngü dizileme ürünleri ABI 310 cihazına yüklenmek için tüplere aktarılmıştır. Tüplerin kapakları kapatılarak traye dizilmiştir. ABI 310 cihazında örnekler için yeni örnek listesi oluşturulmuş dye/primer set olarak KB_310-BDT-V1.1.rapid36 seçilmiştir. Cihaza yükleme listesinde module olarak Seq.POP6.Rapid.E.md4 seçilerek kapiler elektroforez gerçekleştirilmiştir.

3.3.7. Sonuçların analizi

Cihazda Sequencing Analysis V 5.1 ile analiz edilen sonuçların dizi dosyaları NCBI web sitesinin database ile karşılaştırmak için BLAST yapılmıştır.

3.3.8. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz SPSS 16.0 programı ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında meme kanseri tanısı almış 28 hastanın kan ve tümörlü doku örneklerinde ve meme kanseri açısından sağlıklı 50 bireyin kan örneklerinde miR-125a ve miR-34a mikroRNA'larının genomik dizileri dizileme yöntemi ile incelenmiştir. 3 hasta ile ilgili bilgilere ulaşılamamıştır. Bu hastaların bilgileri göz önünde bulundurulmadığında, hastalarımızın yaş ortalaması $52,92 \pm 2,6$ 'dır. Olgularımızın evreleri; 3 olgu grade 1, 13 olgu grade 2, 9 olgu grade 3 olarak belirlenmiştir. ER ve Her2/neu statüsü immünohistokimyasal yöntem ile incelenmiştir. Sadece 6 olgu Her2/neu pozitifdir yani bu proteinin artışı görülmektedir. Hastalarla ilgili diğer bilgiler Çizelge 4.1'de görülmektedir. Kontrol grubumuzun yaş ortalaması $28,64 \pm 1,46$ 'dır.

4.1. miR-34a'nın genomik dizisinin incelenmesi

Meme kanserli 28 vakanın kan ve kanserli doku örneklerinde ve 50 meme kanseri açısından sağlıklı bireyin kan örneklerinde, mir-34a'nın genomik dizisi incelenmiştir. Sonuçlar NCBI insan genomik dizisi veri tabanı ile karşılaştırılmış ve ne meme kanserli vakaların kan ve doku örneklerinde ne de kontrol bireylerinin kan örneklerinde herhangi bir polimorfizm veya mutasyon saptanmamıştır.

4.2. miR-125a'nın genomik dizisinin incelenmesi

Meme kanserli 28 vakanın kan ve kanserli doku örneklerinde ve 50 meme kanseri açısından sağlıklı bireyin kan örneklerinde, mir-125a'nın genomik dizisi incelenmiştir. Sonuçlar NCBI insan genomik dizisi veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. miR-125a'nın transkribe olmayan bölgesinde hem meme kanserli olguların kan ve doku örneklerinde hem de kontrol olgularının kan örneklerinde bir polimorfizm saptanmıştır. Daha önce belirlenmiş olan ve "ensembl" insan genomik dizisi veri tabanında ve NCBI SNP(rs12976445) veri tabanında bildirilmiş olan bu polimorfizmin meme kanserli

örnekler ve kontrol bireylerindeki frekansları çizelge 4.2 ve 4.3 'te verilmiştir. Meme kanserli vakaların kan ve doku örneklerinin bu polimorfizm açısından sonuçları birbirleriyle uyumludur. Polimorfizm transkribe olmayan bölgede olduğu için miR-125a – 54 T>C olarak isimlendirilmiştir. Bu polimorfizm için üç farklı genotipin dizi analizi görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Hastalara ait bilgiler

(inv.duc.:invaziv duktal, lob.:lobular, DCIS: duktal karsinom in situ, B: bilinmiyor)

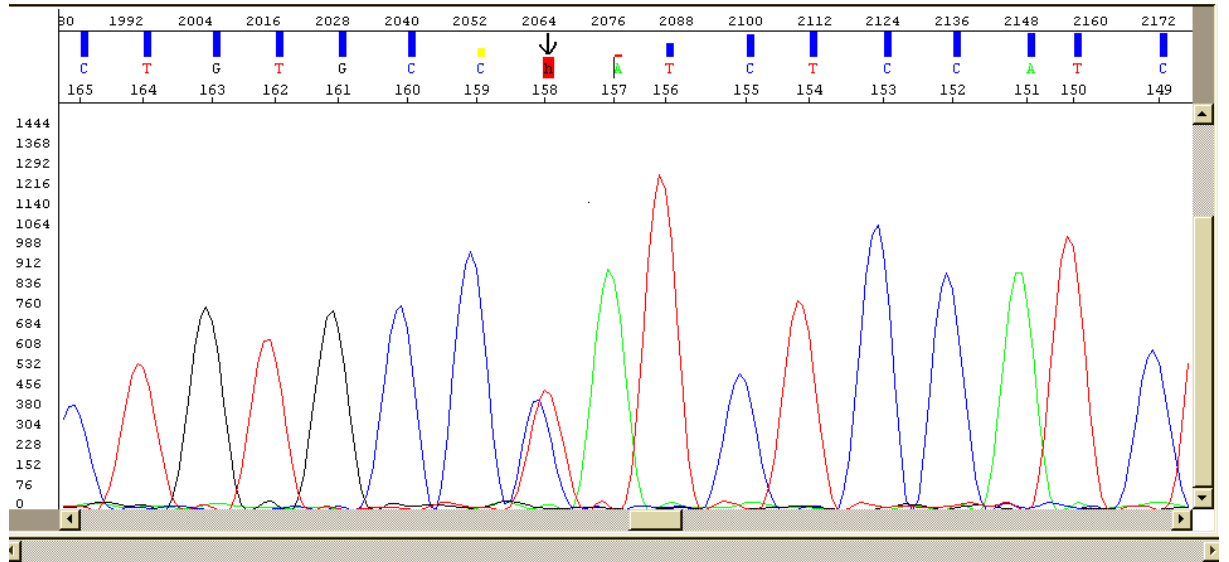
Hasta no	Her2/neu	ER	Yaş	Tümör tipi	Grade	Metastaz
01	B	B	B	B	B	B
02	B	B	B	B	B	B
03	-	+	63	inv. duc.	3	Akc.antrum mediastende rektum
04	-	+	60	inv. duc.	1	Yok
05	+	+	44	multifokal inv. duc.	3	Yok
06	-	+	40	multifokal mikst inv.	3	Yok
07	-	+	65	inv. duc.	1	Yok
08	-	+	69	multifokal multisentrik inv. papiller	3	Yok
09	-	+	80	inv.duc.	2	Yok
10	-	+	45	multisentrik inv.duc.	2	Yok
11	-	+	52	inv. duc.	2	Yok
12	-	+	32	multifokal inv duc.	2	Yok
13	-	+	46	inv. duc.	2	Yok
14	B	B	B	B	B	B
15	-	-	64	inv.duc.	2	Yok
16	+	+	57	inv.duc.	3	Yok
17	+	+	48	multifokal inv.duc.	2	Yok
18	-	+	48	multifokal inv.duc.	2	Yok
19	+	+	44	multifokal inv.duc.	3	Yok
20	-	+	75	multisentrik inv duc.	2	Yok
21	+	+	39	inv.duc.	3	Yok
22	-	+	46	multifokal inv.duc. - DCIS	2	Yok
23	-	-	77	multifokal invapokrin	3	Yok
24	+	+	57	multifokal inv.duc.-DCIS	3	Yok
25	-	+	45	inv.lob.	2	Yok
26	-	+	43	inv.duc.	1	Yok
27	-	+	39	multifokal inv.duc.	2	Yok
28	-	+	45	inv.duc.	2	Yok

Çizelge 4.2: Meme kanserli örneklerde miR-125a – 54 T>C polimorfizminin genotip dağılımları

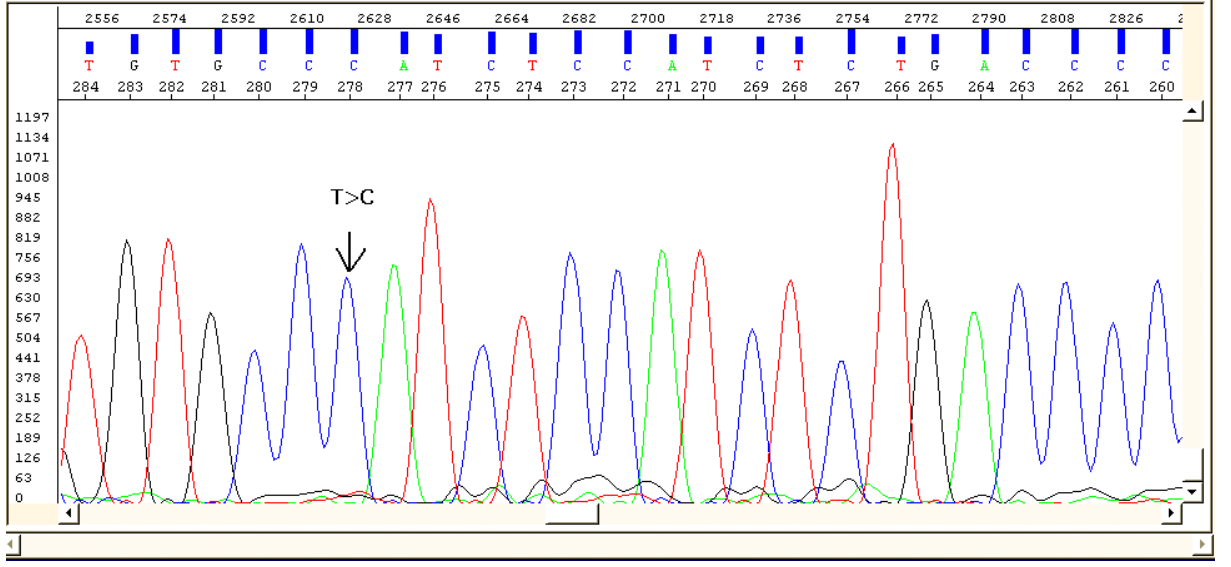
Genotip	Sayı	Yüzde	Geçerli yüzde	Kümülatif yüzde
CT	9	32,1	32,1	32,1
CC	5	17,9	17,9	50,0
TT	14	50,0	50,0	100,0
Total	28	100,0	100,0	

Çizelge 4.3: Kontrol örneklerinde miR-125a – 54 T>C polimorfizminin genotip dağılımları

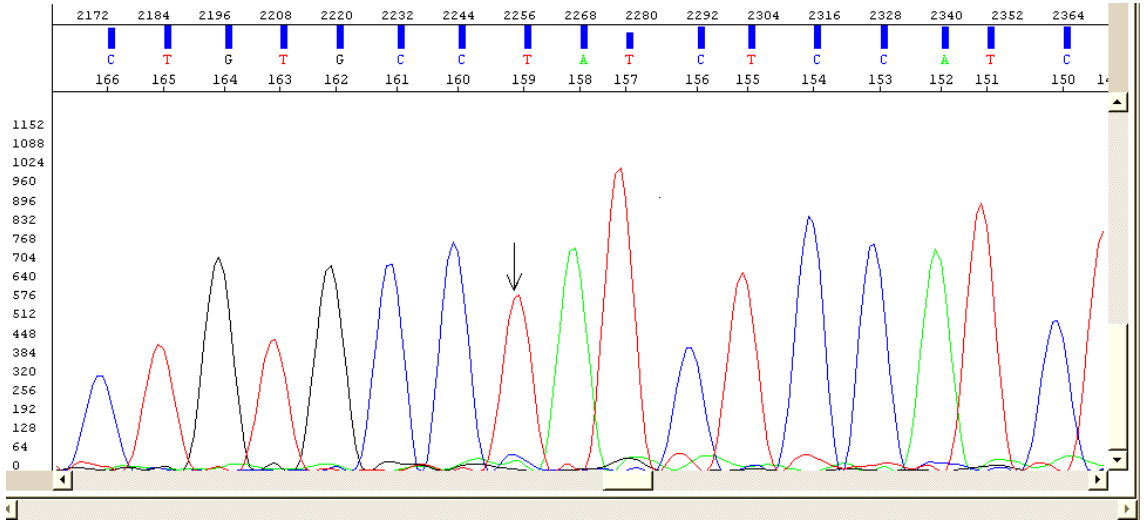
Genotip	Sayı	Yüzde	Geçerli yüzde	Kümülatif yüzde
CT	18	36,0	36,0	36,0
CC	4	8,0	8,0	44,0
TT	28	56,0	56,0	100,0
Total	50	100,0	100,0	



Şekil 4.1. – 54 T>C polimorfizmi için heterozigotluğun (CT genotipi) dizi analizinde görüntüsü



Şekil 4.2. – 54 C>T polimorfizmi için homozigotluğun (CC genotipi)
dizi analizinde görüntüsü



Şekil 4.3. -54 T>C polimorfizmi için homozigotluğun (TT genotipi)
dizi analizinde görüntüsü

4.2.1. miR-125a polimorfizmi için istatistiksel analiz

miR-125a genomik bölgesinde bulunan polimorfizm meme kanserli hastalarda ve meme kanseri açısından sağlıklı kontrol bireylerinde SPSS 16.0 istatistiksel analiz programı kullanılarak X^2 testi ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.4). Kontrol ve hasta bireylerde bu polimorfizm açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,426$)

Çizelge 4.4: miR-125a – 54 T>C polimorfizminin hasta ve kontrol örneklerinde istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-kare	1,709 ^a	2	,426
Likelihood Ratio	1,637	2	,441
Linear-by-Linear Association	,938	1	,333
Vaka sayısı	78		

4.2.2. Transkripsiyon Faktörü bağlanma bölgesi tahmini

miR-125a için belirlenen polimorfizmin transkribe olmayan bölgede olduğu için, promotor bölgede olduğu düşünülerek bu bölgenin herhangi bir transkripsiyon faktörü için bağlanma dizisi içerip içermediği www.gene-regulation.com sitesindeki AliBaba 2.1 programı ile analiz edilmiştir. Bu programa göre bu bölge Gata-1 transkripsiyon faktörü için bağlanma bölgesi içermektedir (Şekil 4.4) ve normal baz “T” yerine mutant baz “C”nin bulunması bağlanma bölgesini ortadan kaldırmaktadır ve Sp-1 transkripsiyon faktörünün bağlanması için bölge oluşturmaktadır (Şekil 4.5).

seq ↓
 tgtgcctatctccatctctgacccccaccccagggtctaccgg

Segments:

2.2.1.1	125	134	<u>===GATA-1=</u>
2.1.2.2	133	142	<u>==RXR-beta</u>
1.1.3.0	135	144	<u>=C/EBPalp=</u>
2.1.2.1	135	144	<u>=RAR-alpha=</u>
2.1.2.3	135	144	<u>=REV-ErbA=</u>
2.3.2.1	141	150	<u>===Egr-1==</u>
2.3.2.3	141	150	<u>====GLI3==</u>

Şekil 4.4. TT genotipi için transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri

Seq ↓
 tgtgccatctccatctctgacccccaccccagggtctaccgg

Segments:

2.3.1.0	129	138	<u>====Sp1====</u>
2.1.2.2	133	142	<u>==RXR-beta</u>
1.1.3.0	135	144	<u>=C/EBPalp=</u>
2.1.2.1	135	144	<u>=RAR-alpha=</u>
2.1.2.3	135	144	<u>=REV-ErbA=</u>
2.3.2.1	141	150	<u>===Egr-1==</u>
2.3.2.3	141	150	<u>====GLI3==</u>

Şekil 4.5. CC genotipi için transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri

5.TARTIŞMA

ERBB2 ve ERBB3 meme kanserinde çok önemli iki onkogendirler. ERBB2 meme kanserlerinde %25-40 arası aşırı ekspresyon göstermektedir (36, 37). Bu yüzden meme kanserinin moleküler alt tiplerinden biri Her2/neu (+) (ERBB2 pozitif) olarak adlandırılmıştır. Bu alt tip kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (60). miR-125a ERBB2 ve ERBB3 genlerinin transkriptlerini hedeflemektedir (17, 57). ERBB2'nin aşırı ekspresyon göstermesi durumunda miR-125a'nın görevini yapamadığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda bu fikirden yola çıkılarak miR-125a'nın görev yapamamasından miR-125a'daki mutasyonların sorumlu olabileceği düşünülerek miR-125a'nın genomik dizisi incelenmiştir. TP53 meme kanserli vakaların üçte birinde mutasyona uğramaktadır (37, 39, 40). miR-34a'nın p53 tarafından düzenlenen bir mikroRNA olduğu ve promotor bölgesinde p53 bağlanma bölgesi taşıdığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (11, 27, 28, 54). miR-34a p53 ile bağlantısından dolayı çalışmamıza dahil edilmiştir. Dolayısıyla çalışmamız için seçilen miRNAlar meme kanseri moleküler patolojisi düşünülerek seçilmiştir.

Çalışmamız hem kurgusu hem sonuçları açısından dünyadaki ilk çalışmadır. Çalışmamız sonucunda miR-34a'nın genomik bölgesinde ne kontrol vakalarının kan örneklerinde ne de meme kanserli vakaların kan ve doku örneklerinde herhangi bir polimorfizm veya mutasyon belirlenmemiştir. miR-125a'nın genomik bölgesinde – 54 T>C polimorfizmi belirlenmiştir. Bu polimorfizm için genotip dağılımı meme kanserli bireylerde %50,0 TT, %32,1 CT, %17,9 CC, kontrol bireylerinde % 56,0TT, % 36,0 TC, %8,0 CC şeklindedir. Bu polimorfizm NCBI ve ensembl veri tabanlarında yer almaktadır ancak literatürde ve veri tabanlarında ne popülasyon frekansına ne de herhangi bir hastalıkla ilgili asosiasyon çalışmasına rastlanmamıştır. Çalışmamız bu polimorfizm için popülasyon oranı veren ve ayrıca bu polimorfizm ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran dünyadaki ilk çalışmadır. Ancak hasta sayımızın azlığından dolayı tümörün histolojik tipi, HER2/NEU statüsü, evresi gibi özellikleri ile bu polimorfizm arasında istatistiksel bir analiz yapılmamıştır. Literatürde çalışmamızın aynısı bulunmadığı için benzer literatürler ile tartışılacaktır.

Iorio ve ark. yaptıkları çalışmada miR-125a'nın ekspresyonunun meme kanserli örneklerde önemli şekilde azaldığını göstermişlerdir (34). Duan ve ark. yaptıkları çalışmada miR-125a'nın çekirdek bölgesinde bulunan bir polimorfizmin pri-miRNA'nın pre-miRNA'ya işlenmesini önleyerek miRNA'nın ekspresyonunu azalttığını ortaya koymuştur (17). Bu iki çalışma birlikte düşünüldüğünde miRNA ekspresyonunun kanserde azalma mekanizmasının mutasyon veya polimorfizm olduğu düşünülmüştür fakat çalışmamızda Duan ve ark. saptadığı polimorfizm hiçbir kontrol bireyinde veya meme kanserli olguda saptanmamıştır. Bu durum başka bir mekanizma ile ekspresyonun azaldığını düşündürmektedir. Çalışmamızda saptanan polimorfizm miR-125a'nın transkribe olmayan bölgesindedir ve CC genotipi belirgin şekilde meme kanserli örneklerde yüksektir. Şu ana kadar miR-125a ile ilgili fonksiyonel çalışmalar yeterli olmadığından net bir yorum yapmak mümkün olmasa da bu bölgenin miR-125a için promotor bölge olduğu ve bu polimorfizmin miR-125a'yı düzenleyen başka bir molekül etkilediği için kanserle ilgili bir risk oluşturduğu öne sürülebilir. Bu hipotezi kanıtlamak için bu polimorfizmin miR-125a'nın ekspresyonunu nasıl etkilediği ve miR-125a'yı düzenleyen başka bir molekül olup olmadığı araştırılmalıdır.

Çalışmamızda bulunan polimorfizmin promotor bölgede olduğu kabul edilerek bu bölgeye bağlanan bir transkripsiyon faktörü olup olmadığı araştırılmış ve Gata-1 transkripsiyon faktörünün bu bölgeye bağlandığı bulunmuştur (31). Mutant bazın bu bölgede bulunması ise Sp-1 transkripsiyon faktörü için yeni bir bağlanma bölgesi ortaya çıkarmaktadır. Er'ünün bilinen hücre çekirdeğine geçerek transkripsiyonu uyarma görevinin yanında koaktivatörler ile kompleks oluşturarak da bu görevini yerine getirdiğini gösteren çalışmalar vardır. Er'ünün koaktivatörlerinden biri de Sp-1'dir (46, 55). Bu nedenle Er pozitif meme kanserlerinde Sp-1'in etkili olabileceği düşünülebilir. Bu uygulamalar teorik olup bunları kanıtlamak için mutlaka fonksiyonel çalışma yapılmalıdır. Çalışmamız da bu fonksiyonel çalışmalar için yol gösterici olmuştur.

miRNA genomik bölgelerindeki polimorfizmler ile ilgili ilk çalışmayı 2005 yılında Iawa ve ark. yapmıştır. Bu çalışmada 96 sağlıklı bireyde 173 pri-miRNA dizilenmiş ve 10 tane polimorfizm bulunmuştur. Bu polimorfizmler miRNA'nın hangi bölgesinde bulduklarına göre öneme sahiptirler (35). Bizim çalışmamızda da 50 tane

sağlıklı bireyde 2 pri-miRNA dizilenmiştir ve 1 polimorfizm bulunmuştur. Iawa'nın çalışmasında 173 pri-miRNA'da sadece 10 polimorfizm bulunduğu düşünüldüğünde miR-34a bölgesinde hiçbir polimorfizm bulmamış olmamız normal gözükmektedir.

Iwai ve ark. çalışmasından yola çıkarak Arisawa ve ark. miR-27a polimorfizmi ve gastrik atrofi arasındaki ilişkiyi araştırmış ve genel olarak anlamlı bir ilişki bulamamış fakat erkek bireyler için artmış risk tespit etmiştir. Bu çalışmada miR-27a'nın seçilmesi miR-27a'nın hedef transkriptlerinin bu hastalıkta rol oynadıklarının bilinmesidir (2). Bizim çalışmamız aslında bir polimorfizm çalışması değildir fakat bulduğumuz polimorfizm ve meme kanseriyle ilişkisi açısından bu çalışmaya benzemektedir.

Wu ve ark. çeşitli kanserli örneklerde ve kanser hücre hatlarında 288 miRNA geninin dizisini incelemişlerdir. 8 yeni SNP ve 14 yeni mutasyon belirlemişlerdir. 9 mutasyon pri-miRNA, 4 mutasyon pre-miRNA ve 1 mutasyon olgun miRNA bölgesinde bulunmaktadır. Bu mutasyonlardan let-7e'deki mutasyonun ekspresyonu azalttığı sonucuna varmışlardır (68). Bu çalışma miRNA'daki mutasyonların miRNA'ların ekspresyonlarının kanserde azalma mekanizması olabileceğini göstermektedir. Çalışmamız daha fazla kanserli örnek ve daha geniş miRNA genleriyle tekrarlandığında bu çalışma ile aynı sonuca ulaşılabileceği düşünülmektedir.

Yang ve ark. hepatoselüler kanserlerde 59 miRNA'nın dizisini 96 hepatoselüler kanserli hastanın doku örneklerinde incelemişler ve 4 dizi varyantı bulmuşlardır. Bunlardan miR-192'de bulunan dizi değişiminin germ-line mutasyon olduğuna ve miRNA'nın ikincil yapısını değiştirdiği sonucuna varmışlardır. Ancak ekspresyonunu nasıl etkilediğini incelememişlerdir. Bu çalışmada miRNA mutasyonlarının hepatoselüler kanserler için nadir görülen bir durum olduğu sonucuna varılmıştır (69). Bizim çalışmamızda 28 meme kanserli doku örneğinde sadece 2 mikroRNA'nın (miR-34a ve miR-125a) genomik dizileri incelenmiş ve hiçbir mutasyon tespit edilmemiştir. Bu nedenle meme kanseri için de aynı durum söz konusu olabilir. Fakat bu konuda daha fazla miRNA ile daha geniş çalışmalar yapılması gerektiği açıktır.

Meme kanseri ile pre-miRNA dizilerindeki yaygın polimorfizmler arasındaki ilişkiyi ilk gösteren Hu ve ark. 'nın yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada 1009 meme kanserli hasta ve 1093 meme kanseri açısından sağlıklı bireyin kan örneklerinde miR-196a2, miR-146a, miR-149 ve miR-499'daki polimorfizmleri incelenmiştir. miR-196a2 ve miR-499'daki polimorfizmlerin meme kanseri için artmış risk oluşturduğunu belirlemişlerdir. miR-499 için artmış risk belirlenen CC genotipinin hastalardaki frekansı % 24 iken kontrollerdeki frekansı %20'dir (32). Bizim çalışmamız polimorfizm çalışması olarak düşünülmediği için hasta (28 birey) ve kontrol gruplarımızın(50 birey) birey sayıları bu çalışmalara göre çok düşüktür. Bu nedenle çalışmamızda miR-125a genomik bölgesinde saptadığımız polimorfizm için kontrol ve hasta bireyler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. Oysa bizim miR-125a genomik bölgesinde belirlediğimiz polimorfizm için risk faktörü olarak düşündüğümüz CC genotipi frekansı kontrol örneklerinde %8 iken hasta örneklerinde %17,9'dır. Bu nedenle bu polimorfizm için daha geniş hasta ve kontrol grubu ile çalışıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edileceğini düşünmekteyiz.

Diederichs ve ark. 91 kanserli hücre hattında 15 miRNA'yı dizi değişiklikleri açısından incelemişlerdir. 15 pri-miRNA ve 1 pre-miRNA dizisinde olmak üzere 16 dizi değişikliği bulmuşlardır. Bu değişikliklerden miR-143'de bulunan dizi değişikliği ayrıca kontrol bireylerinin de %13.5'inde saptanmıştır. miR-143'ün transkribe olmayan bölgesinde bulunan bu değişikliğin polimorfizm olduğu sonucuna varmışlardır. Yapılan analizde bu polimorfizmin miRNA'nın ikincil yapısını değiştirdiği ortaya konmuştur fakat ekspresyonunda bir değişikliğe sebep olmamıştır (15). Biz de çalışmamızda miR-125a'nın transkribe olmayan bölgesinde bir polimorfizm saptadık. Bu çalışma saptanan polimorfizmin miRNA dizisindeki bölgesi açısından çalışmamıza benzemektedir. Biz de çalışmamızda bulunan polimorfizmin miRNA'nın ikincil yapısını ve ekspresyonunu nasıl etkilediğini belirlemek yönünde analiz yapılmasının gerektiğini düşünmekteyiz.

p53 yolağı DNA hasarı, telomer kısalması, onkogen aktivasyonu hiperaktif sitokin sinyalleri ve hipoksi gibi kanserle ilgili stres sinyalleri için sensör görevi görür. p53, bu sinyallere, hücre büyümesi, hücre ölümü, DNA tamiri, angiogenez gibi hücrel cevaplar vermek için gerekli genlerin transkripsiyonunu düzenleyen bir transkripsiyon

faktörüdür (40, 41, 66). miRNAlar ile p53'ün ilişkisini anlamak amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda miR-34a'nın p53 tarafından uyarılarak ve p53'ün tümör supresör görevini dolaylı olarak yerine getirmesi için bazı genleri negatif yönde baskılayarak p53 yolağına katıldığını göstermişlerdir (11, 27, 28, 34). Bu çalışmaların hepsi fonksiyonel çalışma olup hiçbiri kanserle veya özellikle meme kanseri ile miR-34a arasında bir bağlantı kurmamışlardır. Fakat bu çalışmalar miR34a ile p53 arasındaki bağlantıyı ortaya koydukları için çalışmamızda meme kanserinde çok önemli bir tümör supresör olan p53 tarafından düzenlenen miR-34a'nın genomik dizisi incelenmiştir. Çalışmamız miR-34a'nın meme kanserinde etkili olduğu fikriyle kurgulanan ve miR-34a'nın genomik dizisinin meme kanserinde incelendiği dünyadaki ilk çalışmadır. Çalışmamızda hiçbir mutasyon veya polimorfizm saptanmaması, miR-34a'nın fonksiyonunun meme kanserinde bozulması ile ilgili başka bir mekanizma olabileceği ihtimalini akla getirmektedir. Nitekim Lodygin ve ark. miR-34a'nın meme kanserli hücre hatlarında metillendiğini göstererek bu teorimizi desteklemişlerdir. Bu çalışmada meme kanseri hücre hatlarının %25'inde miR-34a'nın metillendiği bulunmuştur (44). Fakat bu çalışma miR-34a'daki mutasyonların da, bu miRNA ekspresyonunun meme kanserinde bozulma mekanizmalarından biri olabileceği ihtimalini ortadan kaldırmamaktadır. Çalışmamız daha fazla örnekle yapıldığında ve miR-34a hem metilasyon hem de mutasyonlar açısından incelendiğinde daha anlamlı olacağını düşünmekteyiz.

Tazawa ve ark. miR-34a'nın ekspresyonunun kolon kanserli örneklerin %36'sında azaldığını göstermişlerdir. miR-34a'nın E2F sinyal yolağını etkileyerek hücre büyümesini durdurduğunu kanıtlamışlardır. miR-34a'nın ekspresyonunun düşmesini TP53 geninin mutasyon veya delesyonlar ile inaktive olarak miR-34a'nın ekspresyonunu uyaramamasına bağlamışlardır (64). Çalışmamızda miR-34a genomik bölgesinde mutasyon saptanmaması, meme kanserli örneklerde TP53 mutasyonları veya delesyonları olmasından kaynaklanabilir. Bu yüzden örneklerin TP53 geni incelenmesi, mekanizmanın anlaşılması açısından uygundur.

C-MYC meme kanserinde büyük öneme sahip bir onkogendir. Chang c-Myc tarafından düzenlenen miRNAları araştırmış ve miR-34a'nın bu onkogen tarafından

baskılandığını bulmuştur (10). Bu da meme kanserlerinde miR-34a'nın ekspresyon azalışını açıklayan bir mekanizmadır. Örneklerimizde miR-34a genomik bölgesinde mutasyon saptamamızın sebebi miR-34a'nın bu mekanizma ile baskılanması olabilir.

Literatürdeki veriler de miRNA mutasyonlarının kanserde çok sık görülen bir durum olmadığını ortaya koymaktadır (68, 69). Çalışmalar miRNAların promotor bölgelerinin saptanması, metilasyon paternlerinin incelenmesi, belli miRNAları düzenleyen moleküllerin araştırılması ve miRNAların hücrel yolaklarda yerlerinin belirlenmesi şeklinde devam etmektedir (15,44). Bizim çalışmamız da literatürle bu açıdan uyumlu olup miRNAların transkribe olmayan bölgeleri ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

6. SONUÇ

Çalışmamızda 28 meme kanserli vakanın kan ve taze doku örneklerinde ve 50 meme kanseri açısından sağlıklı bireyin kan örneklerinde, miR-34a ve miR-125a mikroRNAlarının genomik dizileri DNA dizileme yöntemi ile incelenmiştir. Meme kanserli bireylerin kan ve doku örneklerinde bu mikroRNAların genomik dizilerinde herhangi bir polimorfizm veya mutasyon olup olmadığını saptamak ve bu şekilde bu mikroRNAların meme kanseri moleküler patolojisi ile ilişkisini ortaya koymak amaçlanmıştır. Çalışmamız sonucunda;

- miR-34a'nın genomik bölgesinde hem kontrol hem de meme kanserli bireyler için herhangi bir polimorfizm veya mutasyon saptanmamıştır.
- miR-125a'nın genomik bölgesinde bilinen bir polimorfizm (- 54 T>C), hasta ve kontrol bireylerinde saptanmıştır.
- miR-125a – 54 T>C polimorfizmi için hem meme kanserli olgularda hem de kontrol bireylerinde genotip frekansları belirlenmiştir.
- İstatistiksel olarak bu polimorfizm için hasta ve kontrol bireylerinde genotip dağılımında anlamlı bir fark bulunmamıştır.
- miR-125a genomik bölgesinde bulunan bu polimorfizm miR-125a'nın transkribe olmayan bölgesinde olup promotor bölge olarak kabul edildiğinde Web tabanlı bir programla yaptığımız analizde bu polimorfizmin bulunduğu bölgeye TT genotipi durumunda Gata-1 transkripsiyon faktörü ve CC genotipi durumunda Sp-1 transkripsiyon faktörünün bağlandığı belirlenmiştir.
- miRNAlar ve kanserle ilgili yapılacak çalışmalarda; miRNAların transkribe olmayan bölgelerine, miRNAları düzenleyen diğer moleküllere ve miRNAların epigenetik düzenlenmesine de yoğunlaşılması gerekliliği ortaya konmuştur.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., 2002, *Molecular Biology Of The Cell*, Fourth Edition.
2. Arisawa, T., Tahara, T., Shibata, T., Nagasaka, M., Nakamura, M., Kamiya, Y., Fujita, H., Hasegawa, S., Takagi, T., Wang, F., Hirata, I. And Nakano, H., 2007, A polymorphism of microRNA 27a genome region is associated with the development of gastric mucosal atrophy in Japanese male subjects, *Dig. Dis. Sci*, 52, 1691-1697 p.
3. Badache, A. and Gonçalves, A., 2006, The ERBB2 signalling network as a target for breast cancer therapy, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 11, 13–25 p.
4. Blenkiron, C., Goldstein, L. D., Thorne, N. P., Spiteri, I., Chin, S., Dunning, M. J., Barbosa-Morais, N. L., Teschendorff, A. E., Gren, A. R., Ellis, I. O., Tavaré, S., Caldas, C. and Miska, E., 2007, A MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype, *Genome Biology*, 8.
5. Calin, G.A. and Croce, C.M., 2006, microRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6, 857-866 p.
6. Calin, G.A. and Croce, C.M. 2006, microRNA-cancer connection: The beginning of a new tale, *Cancer Research*, 66,15, 7390- 7394 p.
7. Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N. I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C., Kipps, T.J., Negrini, M. and Croce, C.M., 2005, A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia, *The New England Journal of Medicine*, 353, 1793-1801 p.
8. Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C.M., 2004, Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers, *PNAS*, 101, 2999-3004 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

9. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. and Croce, C.M., 2002, Frequent deletions and down regulation of microRNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. PNAS, 99, 15524 -15529 p.
10. Chang, T. C., Yu, D., Lee, Y., Wentzel, E. A., Arking, D. E., West, K. M., Dang, C. V., Thomas-Tikhonenko, A. and Mendell, J. T., 2008, Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis, Nature Genetics, 40, 43-50 p.
11. Chang, T.C., Wentzel, E.A., Kent, O. A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K. H., Feldmen, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C. J., Arking, D. E., Beer, M. A., Maitra, A. and Mendell, J. T., 2007, Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis, Molecular cell, 26, 1-8 p.
12. Cho W. C.S., 2007, OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. Molecular Cancer, 6, 60, 1 -7 p.
13. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Ageilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M. and Croce, C.M., 2005, miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. PNAS, 10, 39, 13944- 13999 p .
14. Cowland, J.B., Hother, C. and Gronbek, K., 2007, MicroRNAs and cancer, APMIS, 115, 1090-1106 p.
15. Diederichs, S. and Haber, D.A., 2006, Sequence variations of microRNAs in human cancer: alterations in predicted secondary structure do not effect processing. Cancer Research, 66,12, 6097- 6104 p .
16. Di Leva, G., Calin, G.A. and Croce, M.C.,2006, MicroRNAs: Fundamental Facts and involvement in human diseases, Birth Defects Research, 78, 180-189 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

17. Duan, R., Pak, C. and Jin, P., 2007, Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA, *Human Molecular Genetics*, 16, 1124-1131 p.
18. Dutta, K., Zhong, Y., Liu, Y., Yamada, T., Akatsuka, S., Hu Q., Yoshihara, M., Ohara, H., Takehashi, M., Shinohara, T., Masutani, H., Onuki, J. and Toyokuni, S., 2007, Association of microRNA-34a overexpression with proliferation is cell type-dependent, 98, 1845-1852 p.
19. Efstratiadis, A., Szabolcs, M. and Klinakis, A., 2007, Notch, Myc and breast cancer, *Cell Cycle*, 6, 4, 418-429 p.
20. Fabbri, M., Ivan, M., Cimmino, A., Negrini, M. and Calin, G.A., 2007, Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer: the strange case of Dr Jekyll and Mr Hyde, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 7, 1009-1019 p.
21. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N., 2008, Mechanism of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?, *Nature Reviews Genetics*, Advance online publication, 102-114 p.
22. Georges, M., Coppeters, W. and Charlier, C., 2007, Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease, *Current Opinion in Genetics and Development*, 17, 166 -176 p.
23. Giancotti, V., 2006, Breast cancer markers, *Cancer Letters*, 243, 145 -159 p.
24. Grosshans, H. and Filipowicz, W., 2006, The expanding world of small RNAs, *Nature*, 451, 414-416 p.
25. Haris, S.L. and Levine, A.J., 2005, The p53 pathway: positive and negative feedback loops, *Oncogene*, 24, 2899-2908 p.
26. Haverty, P.M., Fridlyand, J., Li, L., Getz, G., Beroukhi, R., Lohr, S., Wu, T.D., Cavet, G., Zhang, Z. and Chant, J., 2008, High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors, *Genes, Chromosomes and Cancer*, 47, 530-542 p.
27. He, L., He, X., Lowe, S.W. and Hannon, G.J., 2007, microRNAs join the p53 network- another piece in tumor suppression puzzle. *Nature Reviews Cancer*, advance online publication, 1-4 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

28. He, L., He, X., Lim, P. L., Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A. L., Linsley, P. S., Chen, C., Lowe, S.W., Cleary, M. A. and Hannon, G.J., 2007, A microRNA component of the p53 tumor suppressor network, *Nature*, 447, 1130-1135 p.
29. He, L. and Hannon, G.J., 2004, microRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation, *Nature reviews Genetics*, 5, 522 -531 p.
30. Henson, E.S. and Gibson, S.B., 2006, Surviving cell death through epidermal growth factor(EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy, *Cellular signalling*, 18, 2089-2097 p.
31. <http://www.gene-regulation.com>
32. Hu, Z., Liang, J., Wang, Z., Tian, T., Zhou, X., Chen, J., Miao, R., Wang, Y., Wang, X. And Shen, H., 2008, Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese woman, *Human Mutation*, 0, 1-6 p.
33. Hu, Z., Chen, J., Tian, T., Zhou, X., Gu, H., Xu, L., Zeng, Y., Miao, R., Jin, G., Ma, H., Chen, Y. and Shen, H., 2008, Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival, *The Journal of Clinical Investigation*, 1-9 p.
34. Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Menard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G.A., Querzoli, P., Negrini, M. and Croce, C. M., 2005, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer, *Cancer Research*, 65, 7065-7070 p.
35. Iwai, N. and Naraba, H., 2005, Polymorphisms in human pre-miRNAs, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331, 1439-1444 p.
36. İlvan, Ş., 2006, Meme karsinomu patolojisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 54, 65-71 p.
37. Kenemans, P., Verstraeten, R.A. and Verheijen, R.H.M., 2004, Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer, *Maturitas*, 49, 34-43 p.
38. Kim, V.N. and Nam, J., 2006, Genomics of microRNA, *Trends in Genetics*, 22, 165-173 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

39. Kumar, S., Walia, V., Ray, M. and Elble, R.C., 2007, p53 in breast cancer: mutations and countermeasures, *Frontiers in Bioscience*, 12, 4168 -4178 p.
40. Lacroix, M., Toillon, R. and Leclercq, G., 2006, p53 and breast cancer, an update, *Endocrine-Related Cancer*, 13, 293-325 p.
41. Laptenko, O. and Prives, C., 2006, Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities, *Cell Death and Differentiation*, 13, 951-961 p.
42. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V., 1993, The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 5, 843-854 p.
43. Lehmann, U., Hasemeier, B., Römermann, D., Müller, M., Langer, F. and Kreipe, H., 2007, Epigenetic inactivation of microRNA genes in mammary carcinoma, *Verh Dtsch Ges Pathol*, 91, 214-220 p.
44. Lodygin, D., Tarasov, V., Epanchintsev, A., Berking, C., Knyazeva, T., Körner, H., Kynazev, P., Diebold, J. and Hermeking, H., 2008, Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*, 7, 16, 2591 -2600 p.
45. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R. and Golub, T.R., 2005, microRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435, 834- 838 p.
46. Marino, M., Galluzzo, P. and Ascenzi, P., 2006, Estrogen signalling multiple pathways to impact gene transcription. *Current Genomics*, 7, 497 -508 p.
47. McPherson, M.J. and Moller, S.G., 2006, PCR, 2nd edition. Taylor&Francis Group, MPG BOOKS Limited, Bodmin, Cornwall, UK.
48. Mendell, J.T., 2005, MicroRNAs: Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy, *Cell Cycle*, 4, 1179 -1184 p.
49. Nicolini, A., Carpi, A. And Tarro, G., 2006, Biomolecular markers of breast cancer. *Frontiers in BioScience*, 11, 1818-1843 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

50. O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V. and Mendell, J.T., 2005, c-Myc regulated microRNAs modulate E2F1 ekspresyon, *Nature*, 435, 839 -843 p.
51. Öztürk, M., 2006, Meme kanserinin genetiği ve risk faktörleri, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 54, 15 -26 p.
52. Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N. and Filipowicz, W., 2007, Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology*, 17, 118 -126 p.
53. Pogribny, I. P., Tryndyak, V. P., Boyko, A., Rodriguez-Juarez, R., Beland, F. A. and Kovalchuk, O., 2007, Induction of microRNAome deregulation in rat liver by long-term tamoxifen exposure, *Mutation Research*, 619, 30-37 p.
54. Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bnetwich, Z. and Oren M., 2007, Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis, *Molecular cell*, 26, 1-13 p.
55. Safe, S. and Kim, K., 2008, Nonclassical Genomic Er/Sp And Er/Ap-1 1 Signaling Pathways. *J. Mol. Endocrinol.* Online publication.
56. Saunders, M. A., Liang, H. and Li, W., 2007, Human polymorphism at microRNAs and microRNAs target sites, *PNAS*, 104, 3300-3305 p.
57. Scott, G. K., Goga, A., Bhaumik, D., Berger, C. E., Sullivan, C. S. and Benz, C., 2007, Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of microRNA miR-125a or miR-125b, *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 1479-1486 p.
58. Sevignani, C., Calin, G.A., Siracusa, L.D. and Croce, C.M., 2006, Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression, *Mammalian Genome*, 17,189-202 p.
59. Silveri, L., Tilly, G., Vilotte, J. and Provost, F., 2006, MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer, *Reprod. Nutr. Dev.*, 5, 549-556 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

60. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Maron, J.S., Nobel, A., Shibin, D., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lonning, P.E., Brown, P.O., Borresen-Dale, A. and Botstein, D., 2003, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets, *PNAS*, 100, 8418-8423 p.
61. Sorlie, T., Wang, Y., Xiao, C., Johnsen, H., Naume, B., Samaha, R. and Borresen –Dale, A., 2006, Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms, *BMC genomics*, 7, 1-15 p.
62. Strachan, T. and Read, A. P., 1999, *Human Molecular Genetics 2*, 2nd Edition, Garland Science, BIOS Scientific Publishers, USA.
63. Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Mensen, A., Meister, G. and Hermeking, H., 2007, Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing, *Cell Cycle*, 6, 1586-1593 p.
64. Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M. and Nakagama, H., 2007, Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *PNAS*, 104, 15472 -15477 p.
65. Verghese, E.T., Hanby, A.M. and Hughes, T.A., 2008, Small is beautiful: microRNAs and breast cancer-where are we now?, *Journal of Pathology*, 215, 214-221 p.
66. Vogelstein, B. and Kinzler, K.W., 2004, Cancer genes and pathways they control, *Nature Medicine*, 10, 789-799 p.
67. Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Ferracin, M., Prueitt, R.L., Yanihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Haris, C.C. and Croce, C.M., 2006, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets, *PNAS*, 103, 2257-2261 p.
68. Wu, M., Jolicoeur, N., Li, Z., Zhang, L., Fortin, Y., L'Abbe, D., Yu, Z. and Shen, S., 2008, Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis*, Online publication.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

69. Yang, J., Zhou, F., Xu, T., Deng, H., Ge, Y., Zhang, C., Li, J. and Zhuang, S., 2008, Analysis of sequence variations in 59 microRNAs in hepatocellular carcinomas, *Mutation Research*, 638, 205-209 p.
70. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P. and Anderson, T.A., 2007, microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302, 1 -12 p.
71. Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T.L., Barchetti, A., Ward, M.R., Yao, G., Medina, A., O' Brein-Jenkins, A., Katsaros, D., Hatzigeorgiou, A., Gimotty, P.A., Weber, B.L. and Coukos, G., 2006, microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer, *PNAS*, 103, 9136-9141 p.

Ümmühan Demir

Kişisel Bilgi

- Milliyet: T.C
- Doğum Yeri ve yılı: Muş/1981
- Adres: Tepekum Mah. 7. Sok. No: 43 Adapazarı/Sakarya
- e-mail: ummuhand@yahoo.com

Eğitimi

- Lise: Ankara Özel Muradiye Fen Lisesi, Ankara
- Lisans: Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik, İstanbul
- Yüksek Lisans: Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi Tıbbi Genetik, Eskişehir

Bildiği diller

- İngilizce: Çok iyi seviyede