

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEME KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK USNİK ASİT'E CEVAP VEREN  
MİR-185-5P'NİN APOPTOZ YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER  
DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

Elif DEĞERLİ

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

Temmuz

2019

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere baēlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Elif Deēerli

İmzası

## ONAY

Doç. Dr. Demet Cansaran Duman danışmanlığında Elif Değerli tarafından hazırlanan bu çalışma 17/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

İmza:

Üye: Dr. Öğretim üyesi Mehmet Kürşat DERİCİ

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Meme Kanseri Tedavisine Yönelik Usnik Asit'e Cevap Veren Mir-185-5p'nin Apoptoz Yolağı Üzerindeki Etkisinin Moleküler Düzeyde Araştırılması

Elif Değerli

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Demet Cansaran Duman

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir. Heterojen bir yapıya sahip olan meme kanseri birçok alt tipte sınıflandırılmaktadır ve tedavi süreci de bu alt tiplere göre düzenlenmektedir. Günümüzde meme kanserinin tedavi sürecinde birçok farklı kimyasal kökenli ilaç kullanılmaktadır fakat zaman içerisinde hastalarda bu ilaçlara karşı direnç oluşumu gözlemlenmektedir. Kimyasal olarak sentezlenen ilaçlardan farklı olarak sentetik moleküller, RNAi tabanlı özellikle miRNA gibi terapötikler veya biyolojik kökenli alternatif ilaç aday moleküllerinin tedavideki etkinlikleri araştırılmaktadır. Doğada biyolojik organizmalardan biri olarak bilinen likenlerden izole edilen usnik asit sekonder metabolitinin de meme kanseri tedavisine olan etkisi mikroRNA seviyesinde daha önceki çalışmada belirlenmiştir. Yapılan çalışmada usnik asitin 3 adet farklı histolojik kökenli meme kanseri hücresine uygulanması sonucu ifadesi değişen mikroRNA'lar belirlenmiştir. miR-185-5p gerçekleştirilen qRT-PCR yöntemine dayalı validasyon çalışmaları sonucu güvenilirliği istatistiksel olarak doğrulanan miRNA olup etkinliğini BT-474 hücre hattında gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca miR-185-5p'nin apoptoz yolağında etkin olabileceği biyoinformatik araçlar vasıtasıyla doğrulanmıştır.

Bu tez çalışmasında meme kanseri tedavisine yönelik usnik asite yanıt oluşturan miR-185-5p'nin apoptoz yolağı üzerindeki etkisi moleküler düzeyde incelenmiştir. Hücre apoptoz oranını belirlemek ve hücre döngüsü analizlerini tamamlamak amacıyla akış sitometrisi cihazı, apoptoz yolağındaki etkili gen ifade seviyelerinin belirlenmesinde qRT-PCR yöntemi kullanılırken miR-185-5p'nin BT-474 hücresindeki hedefinin belirlenmesinde ise western blot ve lusiferaz deneyi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar miR-185-5p'nin apoptoz ilişkili genlerin ifade seviyelerinde önemli oranda değişime neden olduğu ve hücrenin apoptotik sürece girmesini indüklediği anlaşılmıştır. Ayrıca miR-185-5p'nin BT-474 hücresi içerisinde direk olarak 3'UTR BCL2 dizisini hedeflediği ve böylece BCL2 proteini seviyesinde azalmaya neden olduğu western blot yöntemi ile doğrulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre miR-185-5p'nin BT-474 hücresi içerisinde tümör baskılayıcı rol oynadığı gösterilmiştir. Tez kapsamında, miR-185-5p'nin meme kanseri tedavisinde etkili bir ajan olabileceği gösterilmiş olup, gelecekte yapılacak klinik çalışmalar ile doğrulanması durumunda da miR-185-5p meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek bir molekül olabileceği ortaya çıkarılmıştır.

2019, 121 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Meme Kanseri, miR-185-5p, Apoptoz, BCL2

## ABSTRACT

MSc Thesis

The Investigation of The Effect of Usnic Acid Responsive Mir-185-5p in Breast Cancer Treatment on Apoptosis Pathway at Molecular Level

Elif Değerli

Ankara University Biotechnology Institute

Doç. Dr. Demet Cansaran Duman

Breast cancer is the most common cancer types in woman. Breast cancer which is considerably heterogenous in terms of phenotypic features is classified into several subtypes, therefore treatment of breast cancer is regulated with respect to these subtypes. Nowadays, many chemical drugs are utilized for the treatment of breast cancer; however, after a while, resistance to these drugs is observed in patients. Unlike chemically synthesized drugs, the efficiency of synthetic molecules, RNAi based therapeutics, especially microRNAs, or biological origin alternative drug candidate molecules in cancer treatment have been investigated. The effect of usnic acid isolated from lichens that are known as biological organism in nature on breast cancer treatment was investigated at molecular (microRNA) level in the previous studies. In this previous study, after Usnic acid was applied to 3 histologically different breast cancer cell lines, microRNAs with changing expression levels was identified. The validation of miR-185-5p was confirmed based on qRT-PCR method and the efficiency of miR-185-5p was determined in BT-474 cell line. In addition, it is confirmed by bioinformatic tools that miR-185-5p can be effective in apoptosis pathway.

In this thesis, the effect of usnic acid responsive mir-185-5p in breast cancer treatment on apoptosis pathway was investigated at molecular level. Flow cytometry was used to determine the apoptosis ratio and analyze the cell cycle. The apoptosis related genes expression analysis was performed by qRT-PCR and the direct target of miR-185-5p in BT-474 cells was identified by western blot and luciferase reporter assay. Our data showed that miR-185-5p can cause significant changes in apoptosis related genes expression levels, suggesting that cell proliferation was suppressed by miR-185-5p via inducing apoptosis in breast cancer cells. According to western blot results, miR-185-5p lead to decrease BCL2 protein level in BT-474 cells and direct target of miR-185-5p was identified as 3'UTR BCL2 by luciferase reporter assay. Taken together, miR-185-5p could play a role as tumor suppressor in BT-474 cells. In this thesis, it is shown that miR-185-5p may be an effective agent in the treatment of breast cancer and miR-185-5p is promising to be a molecule that can be used in the treatment of breast cancer if it is confirmed by future clinical studies.

2019, 121 pages

**Keywords:** Breast cancer, miR-185-5p, Apoptosis, BCL2

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimin başından beri bana destek olan, akademik eğitim sürecimde yaptığım tüm çalışmalarında beni karşılaştığımız her zorlukta yüreklendiren, her daim hiçbir maddi ve manevi yardımını esirgemeyen çok sevgili danışman Hocam Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN'a,

Tezimin deney aşamasında bize sağladığı akış sitometrisi cihazı desteği için Biyomedikal Mühendisliği Bölümüne ve tez sürecinde bana çok katkısı olan hocam Dr. Öğr. Üyesi Açelya YILMAZER AKTUNA'ya,

Tezin deneysel süreçlerinde Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Ailesine, Prof. Dr. Erkan YILMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Doruk ENGİN hocalarıma,

Sadece Yüksek Lisans Eğitim hayatım sürecinde değil özel yaşantımda da her türlü sıkıntı ve üzüntülü anlarımda her zaman yanımda olan, en sevinçli anlarımızı beraber paylaştığımız ve bana bu süreci en zevkli hale getiren çok kıymetli, değerli, biricik, kalbi temiz dostum Vildan TORUN'a,

Bana her zaman ve her konuda tüm hayatım boyunca destek olan, ileride de bu desteklerini sürdüreceklerini bildiğim, düştüğümde elimden tutup kaldıran, beni her daim yüreklendiren, bana güvenen ve benim en kıymetlilerim olan canım aile üyelerimden biricik annem Zeynep ÇAKMAK'a, sevgili babam Mehmet ÇAKMAK'a ve dünyalar tatlısı kardeşlerim Elvan ÇAKMAK, Hayrunnisa ÇAKMAK ve Rüveyda ÇAKMAK'a,

Hayatlarımızı birleştireceğimize karar verdiğimiz günden itibaren her türlü sıkıntıyı beraber göğüslediğimiz ve her mutlu anımızı beraber paylaştığımız, bana her zaman anlayışlı ve merhametli olan, hayatımın en güzel hediyelerinden biri, çok sevgili biricik eşim Yılmaz DEĞERLİ'ye,

Tüm kalbimle sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum...

Elif DEĞERLİ

Ankara, Temmuz 2019

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ONAY</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. KANSER</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. KANSER GENETİĞİ.....	4
2.1.1.1. Ön-Onkogenler .....	6
2.1.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler.....	7
2.1.2. KANSERİN ALTI ANA ÖZELLİĞİ .....	10
2.1.2.1. Kontrolsüz Hücre Bölünmesi .....	10
2.1.2.2. Büyüme Sinyali Oluşturma.....	11
2.1.2.3. Büyüme Baskılayıcı Sinyallere Karşı Duyarsızlık .....	12
2.1.2.4. Apoptozdan Kaçma .....	13
2.1.2.5. Anjiyogenez ile Damar Oluşumu Sağlanması .....	13
2.1.2.6. Doku İstilasası ve Metastaz.....	14
2.1.3. DÜNYADA VE ÜLKEMİZDE KANSER İNSİDANSI .....	14
<b>2.2. MEME KANSERİ</b> .....	<b>15</b>
2.2.1. MEME KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ .....	16
2.2.2. MEME KANSERİ TEDAVİSİ.....	17
2.2.3. MEME KANSERİ TEDAVİSİ ÜZERİNE ARAŞTIRILAN BİYOLOJİK MOLEKÜLLER .....	19

2.2.3.1. Kanser Tedavisinde Etkin Aday Molekül: Usnik asit .....	20
2.2.3.2. Kanser Tedavisinde Etkin Aday Molekül: MikroRNA'lar .....	21
<b>2.3. HÜCRE DÖNGÜSÜ VE KANSER.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMASI APOPTOZ VE KANSER.....</b>	<b>27</b>
<b><u>3. GEREKÇE VE AMAC .....</u></b>	<b><u>30</u></b>
<b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM .....</u></b>	<b><u>31</u></b>
<b>4.1. MATERYAL .....</b>	<b>31</b>
4.1.1. HÜCRE HATLARI .....	31
4.1.2. KULLANILAN KİMYASALLAR .....	31
4.1.3. KULLANILAN KİTLER .....	32
4.1.4. KULLANILAN SARF MALZEMELER .....	32
4.1.5. KULLANILAN CİHAZLAR .....	32
<b>4.2. YÖNTEM .....</b>	<b>34</b>
4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ .....	35
4.2.1.1. Hücrelerin Büyüme Koşulları .....	35
4.2.1.2. Hücre Açma ve Hücrelerin Devamlılığının Sağlanması .....	35
4.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması .....	36
4.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması .....	36
4.2.2. HÜCRELERE MİR-185-5P TRANSFEKSİYONU.....	37
4.2.3. MTT HÜCRE CANLILIK TESTİ.....	38
4.2.4. AKIŞ SİTOMETRİSİ İLE APOPTOZ ORANI BELİRLENMESİ .....	39
4.2.5. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ .....	40
4.2.6. HÜCRELERDEN RNA İZOLASYONU .....	41
4.2.7. CDNA SENTEZİ.....	42
4.2.8. TRANSFEKSİYON İŞLEMİNİN DOĞRULANMASI.....	42
4.2.9. APOPTOZ YOLAĞINA AİT GENLERİN GEN İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ .....	43
4.2.9.1. qRT-PCR Sonuçlarının İstatiksel Analizi.....	44
4.2.10. MİR-185-5P HEDEF GEN İLİŞKİSİNİN DOĞRULANMASI .....	44
4.2.10.1. Biyoinformatik Analiz .....	45
4.2.10.2. Protein İzolasyonu .....	47
4.2.10.3. Western Blot .....	48



4.2.10.4. Lusiferaz Deneyi.....	50
<b><u>5. ARASTIRMA BULGULARI .....</u></b>	<b><u>51</u></b>
5.1. MTT CANLILIK TESTİ .....	51
5.2. TRANSFEKSİYON İŞLEMİNİN DOĞRULANMASI .....	53
5.3. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ.....	54
5.4. ANNEXIN V İLE BT-474 VE MCF-12A HÜCRELERİNDE APOPTOZ ORANININ BELİRLENMESİ.....	55
5.5. APOPTOZ YOLAĞI GEN İFADE ANALİZİ.....	57
5.6. MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE MİR-185-5P’NİN HEDEF GENİNİN BELİRLENMESİ .....	64
5.6.1. WESTERN BLOT İLE BCL2 PROTEİN SEVİYESİNDEKİ DEĞİŞİMİN BELİRLENMESİ .....	65
5.6.2. LUSİFERAZ DENEYİ İLE MİR-185-5P – BCL2 ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DOĞRULANMASI.....	66
<b><u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</u></b>	<b><u>67</u></b>
6.1. TARTIŞMA.....	67
6.2. SONUÇ... ..	72
<b><u>7. KAYNAKLAR.....</u></b>	<b><u>73</u></b>
<b><u>8. EKLER.....</u></b>	<b><u>83</u></b>
EK-1: Apoptoz Panelindeki Genlerin İsim Listesi .....	83
EK-2: DIANA, miRDB ve miRSytem araçlarında 456 adet ortak olan miR-185-5p’nin hedef gen listesi .....	87
<b><u>9. ÖZGEÇMİŞ .....</u></b>	<b><u>103</u></b>
<b><u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u></b>	<b><u>105</u></b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İyi huylu ve kötü huylu tümör (18) .....	3
Şekil 2.2. Onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyon oluşmasıyla kanser gelişimi (18) .....	5
Şekil 2.3. Kanser oluşumu sürecinde hücrelerde birçok mutasyon oluşumu (23) .....	5
Şekil 2.4. Bir tümör baskılayıcı genin kalan normal kopyasını kaybetmenin altı yolu (20) ..	9
Şekil 2.5. Kanser hücresinin altı ana özelliği (31).....	10
Şekil 2.6. Usnik asit'in 2 farklı yapısı (49).....	20
Şekil 2.7. miRNA biyogenezi (10) .....	22
Şekil 2.8. Hücre döngüsünde gerçekleşen üç ana basamak (18).....	24
Şekil 2.9. Ökaryotik hücrelerde gerçekleşen hücre döngüsü aşamaları (18).....	25
Şekil 2.10. Apoptozun aktifleştirilmesinde görevli üç temel yolak (70).....	29
Şekil 2.11. Kanserli hücrelerin apoptozdan kaçmasına neden olan beş mekanizma (69) ...	29
Şekil 4.1. Deneysel Yöntemler Şeması .....	34
Şekil 4.2. miRDB veri tabanı analiz yöntemi .....	45
Şekil 4.3. DIANA veri tabanı analiz yöntemi .....	46
Şekil 4.4. miRSystem veri tabanı analiz yöntemi.....	46
Şekil 4.5. miR-185-5p çekirdek bölgesi ile 3'UTR BCL2 dizisi eşleşmesi miRmap veri tabanı .....	47
Şekil 5.1. Farklı konsantrasyonlarda miR-185-5p mimik'in BT-474 meme kanseri hücre hattına transfeksiyonu ile elde edilen hücre canlılığı oranı (**p<0.01) (74).....	51

Şekil 5.2. miR-185-5p transfeksiyonu sonrası BT-474 hücresinin canlılık oranı (%) (**p<0.01) .....	52
Şekil 5.3. Farklı konsantrasyonlarda miR-185-5p'nin MCF-12A hücre hattına transfeksiyonu ile elde edilen MTT canlılık testi (74) .....	52
Şekil 5.4. miR-185-5p transfeksiyonu sonrası MCF-12A hücresinin canlılık oranı (%)....	53
Şekil 5.5. BT-474 meme kanseri hücrelerine miR-185-5p transfeksiyonu sonrası miR-185-5p ifade seviyesi (*p<0.05) (74).....	53
Şekil 5.6. BT-474 hücre hattının hücre döngüsü analizi grafikleri A) miRNA-185-5p mimik transfekte olmuş hücreler B) Transfekte olmayan hücreler.....	54
Şekil 5.7. BT-474 hücresinin hücre döngüsü evresindeki hücre yüzdesini gösteren grafik (%) (*p<0.05) .....	55
Şekil 5.8. A) BT-474 hücresinin miR-185-5p transfeksiyonu sonrası akış sitometrisi grafiği B) miRNA-kontrol akış sitometrisi grafiği.....	56
Şekil 5.9. BT-474 hücresinin canlı ve apoptotik hücre yüzdesi grafiği (%) (*p<0.05, **p<0.01).....	56
Şekil 5.10. MCF-12A hücreleri akış sitometrisi grafikleri A) miR-185-5p transfekte hücreler B) miRNA transfekte olmayan hücreler.....	57
Şekil 5.11. MCF-12A hücrelerinin hücre canlılık oranı grafiği (%) .....	57
Şekil 5.12. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücresinin Kaspaz gen ailesine ait qRT-PCR sonuçları (*p<0.05, **p<0.01,***p<0.001 ).....	58
Şekil 5.13. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücresinin BCL gen ailesine ait qRT-PCR sonuçları (*p<0.05, **p<0.01,***p<0.001) .....	59
Şekil 5.14. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücresinin Kinaz gen ailesine ait qRT-PCR sonuçları (*p<0.05, **p<0.01) .....	59

Şekil 5.15. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerinin TRAF gen ailesine ait qRT-PCR sonuçları (*p<0.05,***p<0.001) .....	60
Şekil 5.16. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerinin TNF gen ailesine ait qRT-PCR sonuçları (*p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001) .....	60
Şekil 5.17. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerinin apoptoz yolağına ait genlere ait qRT-PCR sonuçlar (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001) .....	61
Şekil 5.18. Ortak genlerin venn şemasında gösterimi .....	64
Şekil 5.19. 3'UTR BCL2 ve miR-185-5p çekirdek bölgesi baz dizisi eşleşmesi.....	65
Şekil 5.20. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerde kontrol grubuna kıyasla BCL2 protein western blot deney sonuçları .....	65
Şekil 5.21. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerde kontrol grubuna kıyasla BCL2 protein seviyesindeki değişimi gösteren grafik (***p<0.001) .....	66
Şekil 5.22. BT-474 hücrelerinde lusiferaz aktivitesi sonuçları (**p<0.01).....	66

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. İnsan kanserlerinde bulunan çeşitli ön-onkogenler ve hücrel fonksiyonları (24,26,27).....	7
Çizelge 2.2. İnsan kanserlerinde bulunan çeşitli tümör baskılayıcı genler ve hücrel fonksiyonları (30) .....	9
Çizelge 2.3. Üçlü negatif meme kanseri için hedeflenen terapötik yaklaşımlar (42).....	19
Çizelge 2.4. Meme kanserinde tümör baskılayıcı ve onkojenik miRNA'lar (10,13).....	23
Çizelge 2.5. Hücre döngüsü hedefli terapötik ajanlar (63).....	26
Çizelge 4.1. Hücre hatları ve özellikleri .....	31
Çizelge 4.2. Kullanılan cihazlar ve markaları .....	33
Çizelge 4.3. miRNA transfeksiyonu.....	37
Çizelge 4.4. cDNA sentez solüsyonları .....	42
Çizelge 4.5. qRT-PCR reaksiyon koşulları .....	42
Çizelge 4.6. Apoptoz array paneli qRT-PCR koşulları .....	43
Çizelge 4.7. qRT-PCR analizinde $\Delta C_t$ değeri hesaplama .....	44
Çizelge 4.8. qRT-PCR analizinde $\Delta\Delta C_t$ değeri ve gen ifadesi kat değişimi hesaplama .....	44
Çizelge 4.9. Western blot protokolü çözeltileri .....	48
Çizelge 5.1. qRT-PCR sonucunda kontrol grubuna göre tüm genlerin gen ifade seviyesinde meydana gelen kat değişim oranları .....	61

## SİMGELER DİZİNİ

$\mu\text{g}$	Mikrogram
ng	Nanogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
nM	Nanomolar
ATCC	American Type Culture Collection
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
miRNA	mikroRNA
ncRNA	non-coding RNA
lncRNA	long non-coding RNA

## 1. GİRİŞ

Dünya çapında oldukça yaygın olan kanser türlerinden birisi meme kanseridir ve kadın popülasyonunda en fazla ölüme sebep olan kanser türü meme kanseri olarak bilinmektedir (1). Meme kanserinin oldukça heterojen bir yapıya sahip olduğu yapılan moleküler boyuttaki araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır (2). Meme kanseri sahip olduğu farklı histolojik özelliklere göre temel olarak hormon reseptör pozitif (östrojen ve/veya progesteron), insan epidermal büyüme faktörü-2 yüksek ifadeli ve üçlü negatif meme kanseri olmak üzere üç ana başlıkta sınıflandırılmaktadır (3). Hormona duyarlı meme kanserleri genellikle endokrin terapisine tabi tutulmaktadır. Örneğin Tamoksifen ilacı östrojen reseptörü bulunan meme kanserlerinde tedavi amaçlı kullanılırken Trastuzumab ise insan epidermal büyüme faktörü-2 aşırı ifadeli meme kanseri türünde tedavi için kullanılmaktadır (4,5). Üçlü negatif meme kanserinde ise kemoterapi ve ameliyat tercih edilen tedavi yöntemidir (6).

Mevcut tedavi yöntemleri meme kanseri tedavisinde yetersiz kalabilmekte ve bazı klinik zorluklarla karşı karşıya kalılabilmektedir. Örneğin tedavi sürecinde kanserli hücreler kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirebilmekte, bazıları da metastaza neden olabilmektedir (7). Meme kanseri tedavisinde karşılaşılan bu zorluklar sebebiyle daha yenilikçi ve etkili tedavi yöntemleri geliştirebilmek için meme kanserinin moleküler mekanizması üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (8). Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda bilim dünyası mikroRNA'lar üzerinde yoğunlaşmıştır. mikroRNA'lar 22-23 nükleotid uzunluğunda ve küçük kodlamayan RNA dizileri olup transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda rol oynamaktadırlar (9). Birçok bilimsel çalışma meme kanseri gelişim ve ilerlemesinde hem destekleyici hem de baskılayıcı role sahip çeşitli mikroRNA'ların görev aldığı ortaya çıkarmıştır (10). Örneğin mikroRNA-200c aktin düzenleyici proteinlerden olan FHOD1 ve PPM1F hedefleyerek meme kanseri hücrelerinde migrasyonu ve invazyonu baskılayabilmektedir (11). miR-125a/b ve miR-205 yine tümör baskılayıcı mikroRNA'lar olarak bilinmektedir (12). miR-21 ise *TPM1* ve *PDC4* tümör baskılayıcı genlerini hedef alarak meme kanserinde onkojenik özellik göstermektedir (13). Ayrıca miR-155'in meme kanserinde onkojenik fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir (14).

Daha önce gerçekleştirilen çalışmamızda BT-474 meme kanseri hücre hattına Usnik Asit uygulanması sonucunda miR-185-5p'nin ifadesinde artış olduğu belirlenmiştir (15). Elde

edilen bu veri ile miR-185-5p'nin meme kanseri hücrelerinde apoptozu indükleyerek kanser gelişimini baskılayabilecek etkiye sahip olabileceği sonucuna varılmıştır. Tez kapsamında bu hipotezi doğrulamak adına hücre canlılık testi, apoptotik hücre ve hücre döngüsü analizleri, gen ifade analizi, western blot ve lusiferaz deneyleri yapılmıştır. Yapılan bu deneyler sonucunda miR-185-5p'nin meme kanseri hücre hattında apoptoz baskılayıcı bir protein olan BCL2 proteinini hedefleyerek meme kanserinde büyümeyi baskılayabildiği ortaya çıkarılmıştır.

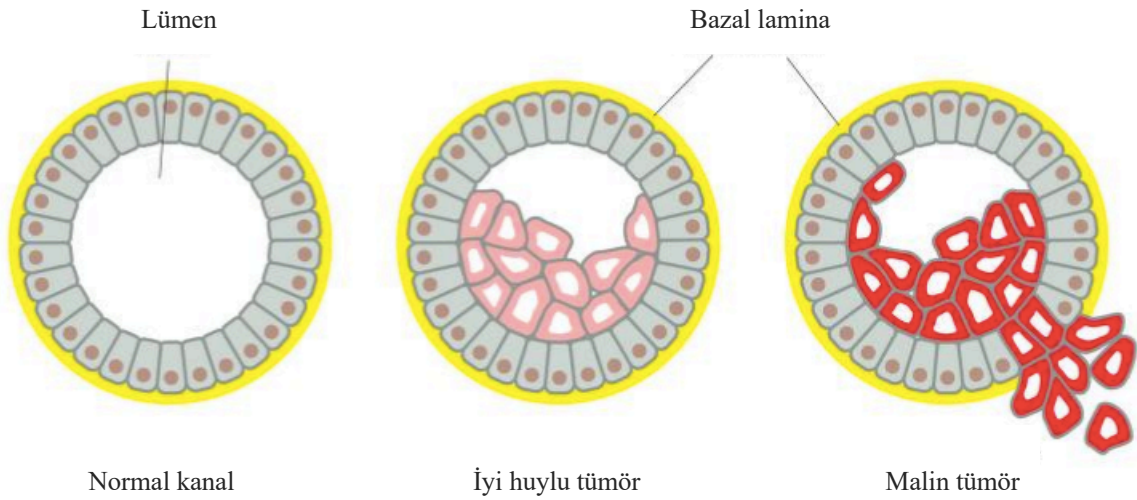




## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. KANSER

Kanser normal hücrelerde kontrollü büyüme ve çoğalma mekanizmasının bozulmasıyla ortaya çıkan bir hastalık türüdür. Bu mekanizmanın bozulması nedeniyle hücrelerde devamlı ve kontrolsüz bir biçimde proliferasyon gerçekleştiği bilinmektedir (16). Literatürde kontrolsüz bir biçimde çoğalmış olan bu hücre topluluğuna **benign (iyi huylu) tümör** ismi verilmektedir. Bazı durumlarda bu tümör hücreleri buldukları dokuyu tahrip ederek ya da kan veya lenf damarları yoluyla farklı doku ve organlara göç edebilmektedirler (*metastaz*) ve böylece vücudun diğer bölgelerinde ikincil bir tümör oluşumuna neden olabilirler. Hücrelerin hareket yeteneği kazanmasına yardımcı olan çeşitli mekanizmaların geliştirilmesiyle farklı dokuları istila eden hücresel yapı **malin (kötü huylu) tümör** olarak adlandırılmaktadır (17) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. İyi huylu ve kötü huylu tümör (18)

Kanser hücreleri köken aldıkları dokuların özelliğine göre isimlendirilirler. Örneğin *karsinom* epitel hücrelerden köken alan kanserlerin adlandırılmasında kullanılırken, bağ dokudan türeyen kanserler ise *sarkom* olarak sınıflandırılırlar (19). Bunun dışında vücutta kan yapıcı hücrelerden türeyen kanserler ise *lösemi* olarak adlandırılır. Bu sınıflandırmalara uymayan ve farklı terimlerle anılan bazı kanser türlerinden olan melanom ise deri hücrelerinden oluşan kanser türü olarak bilinmektedir (19). Temel olarak bu şekilde

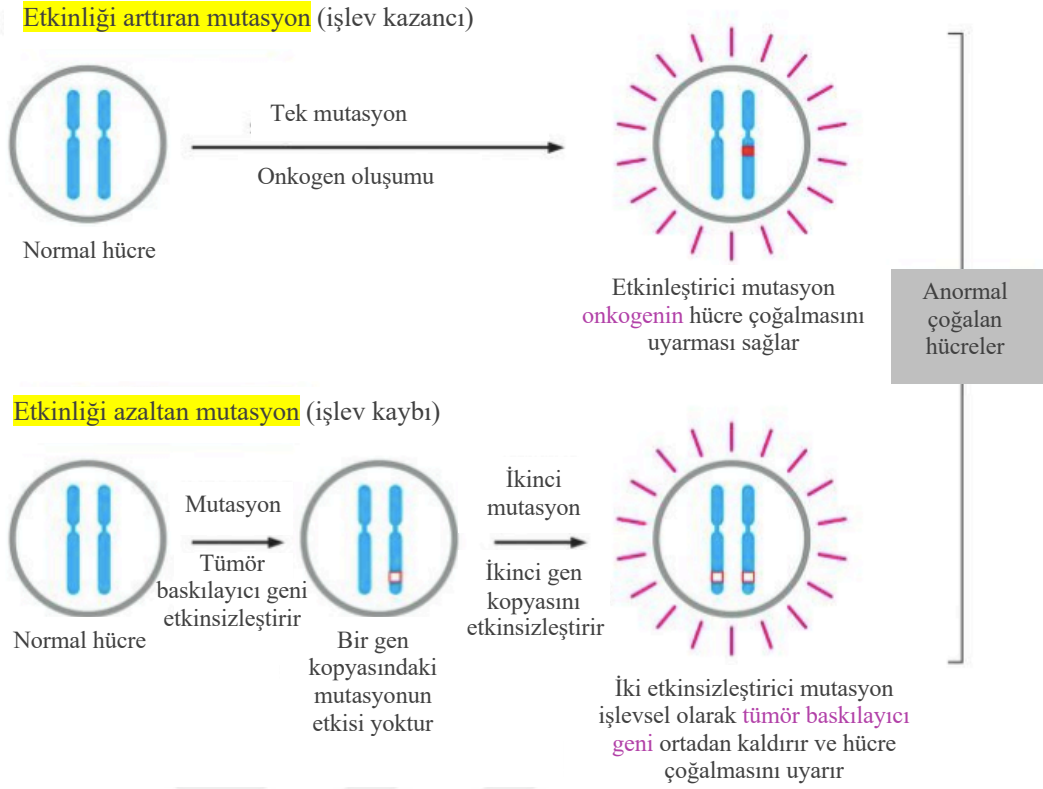
sınıflandırılan kanser türleri yine kendi içlerinde de hücre tipi, vücuttaki yeri ve tümörün yapısına göre alt tiplere ayrılırlar (20).

Kanserin kökeninin tek bir hücreye dayandığı hipotezi günümüzde de klinisyen ve araştırmacılar tarafından kabul görmektedir. Tek hücreden yayılma hipotezine göre kanserin kökeni tek bir birincil tümöre kadar izlenebilmektedir ve bu birincil tümör hücresinin çoğalması ile birlikte kusurlu özelliklerin diğer yavru hücrelere aktarımı sonucunda bir grup sorunlu hücre grubu oluşmaktadır (19). Kanserin kökeninin tek bir hücreye dayandığını söyleyen hipotezi destekleyen ve kromozom analizlerini de içeren birçok araştırma bulunmaktadır. Örneğin kronik miyelositler lösemi hastalarında bulunan akyuvar hücrelerinde aynı kromozomal abnormalite olduğu anlaşılmıştır (20).

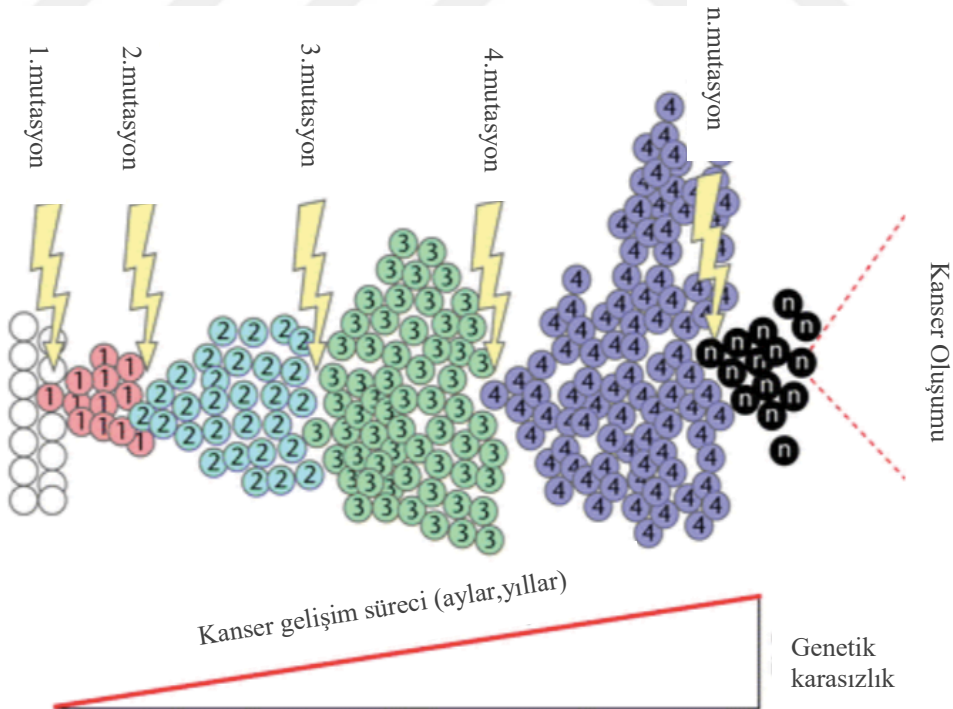
### 2.1.1. KANSER GENETİĞİ

Kanser vakalarının çoğunda gözlemlenen hücresel mekanizmaların bozulması durumu genetik hasarlardan kaynaklanmaktadır (21). Genetik hasarlar DNA dizisinde meydana gelen baz değişimleri veya epigenetik değişimler nedeniyle oluşabilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda kanserin başlamasına *ön-onkogen* ve *tümör baskılayıcı* olmak üzere iki büyük gen sınıfında oluşan mutasyonların neden olduğu anlaşılmıştır (22). Ön-onkogenlerin mutasyona uğrayıp onkogen halini almasıyla hücre aşırı ve kontrolsüz büyümeye doğru eğilim göstermektedir. Onkogenlerin aşırı aktif olduğu bu hücreler mutasyon ile yeni bir işlev kazanmış olup kanser sürecine girerler. Tümör baskılayıcı genler ise normal şartlarda büyümeyi kısıtlama özelliğine sahip olup bu genlerde oluşan herhangi bir mutasyon büyüme kontrolü mekanizmasını olumsuz etkilemektedir. Hücrenin kontrol mekanizmasında oluşan işlev kaybı ile hücre kontrolsüz bir biçimde büyüme başlar ve kanserleşme süreci başlamış olur (17). Somatik hücrelerde bulunan onkogenlerin tek bir kopyasında oluşan mutasyon kanser sürecini başlatabilecek bir potansiyele sahipken, tümör baskılayıcı genlerin genelde iki kopyasında da mutasyon olması ile kanserin oluşmaya başladığı bilinmektedir (18) (Şekil 2.2.).

Kanserin başlayabilmesi için sadece bir gende oluşan mutasyonlar yeterli değildir. Yapılan araştırmalara göre kanserli hücrelerde birçok farklı genlerde mutasyonlara rastlanmıştır. Bu süreçte kanserli hücrelerde mutasyon hızının artmasının yine bu hücrelerde genetik karasızlığı beraberinde getirdiği bilinmektedir (Şekil 2.3.) (23).



Şekil 2.2. Onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyon oluşmasıyla kanser gelişimi (18)



Şekil 2.3. Kanser oluşumu sürecinde hücrelerde birçok mutasyon oluşumu (23)

### 2.1.1.1. Ön-Onkogenler

20. yüzyılın başlarında Amerikalı bir bilim adamı olan Peyton Rous ilk defa tavuklarda tümöre neden olan bir virüs (Rous sarcoma virüs) tanımlamıştır (24). Bu virüste kansere neden olduğu anlaşılan gen ise *v-src* adıyla literatürdeki yerini almıştır (24). Modern bilim teknikleriyle Rous tarafından keşfedilen *v-src* geninin homologlarının insanlarda da bulunduğu anlaşılmış ve bu genlere ise ön-onkogen (*c-onc*) ismi verilmiştir (17). Organizmada ön-onkogenlerin kodladığı proteinlerin genellikle hücre bölünmesini uyarma, hücre farklılaşmasını önleme ve hücre ölümünü durdurma gibi hücre faaliyetlerinde görev aldıkları bilinmektedir. Bu ön-onkogenlerin mutasyonlu versiyonları onkogen olarak adlandırılmakta olup bu onkogenler hücrede bahsedilen proteinlerin ifadesini arttırarak hücre bölünmesinde artışa ve hücre ölümünde azalmaya neden olabilirler (24).

Hücrelerde ön-onkogenlerin onkogene dönüşmesi temel olarak dört farklı mekanizma ile sağlanabilmektedir;

- *Nokta mutasyonu*; sürekli olarak aktif onkogenik proteinlerin oluşmasına neden olabilir.
- *Kromozomal translokasyon*; bir onkogenin bulunduğu kromozomdan başka bir kromozom bölgesine bir kopyasının daha yerleştirilmesiyle ifadesinin arttırılması sağlanabilir.
- *Kromozomal translokasyon*; bir onkogenin ikinci bir gen ile füzyon oluşturmasıyla yeni ve sürekli aktif olan onkogenik bir protein yapısı oluşması sağlanabilir.
- *Gen amplifikasyonu*; anormal DNA eşlenmesi hücrede çok sayıda onkogen kopyası oluşmasına neden olabilir ve bu sebeple hücrede anormal derecede onkogenik protein ekspresyonu gerçekleşir (16,25).

Onkogenler hücrelerde hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz regülasyonu, anjiyogenez ile yeni damar oluşumu, metastatik özellik kazanımı, hücrelerin ölümsüzleşmesi ve anormal hücre farklılaşması gibi birçok mekanizmada görev alabilirler. Bazı ön-onkogenlerin isimleri, görevleri ve genellikle tespit edildikleri bazı kanser türleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir (24,26,27).

Çizelge 2.1. İnsan kanserlerinde bulunan çeşitli ön-onkogenler ve hücrel fonksiyonları (24,26,27)

Ön-onkogen	Gen fonksiyonu	Tümör
<i>ERBB1 (EGF-R)</i>	Hücre büyümesi ve gelişmesi	Glioblastoma, pankreas
<i>HER2</i>	Hücre çoğalması	Meme kanseri
<i>Siklin D1</i>	Hücre döngüsü regülatörü	Meme, kolon, pankreas ve özafagus kanseri
<i>C-MYC</i>	Hücre döngüsü regülatörü	Burkitt's lenfoma
<i>BCL-2</i>	Apoptoz inhibitörü	Lenfoma, meme kanseri
<i>ABL</i>	Hücre döngüsü ve apoptoz düzenleyicisi	Tüm kronik myeloid lösemi
<i>MDM2</i>	<i>P53</i> ve <i>pRb</i> genlerinin etkisizleştirilmesi	Bazı osteosarkomalar
<i>VEGF</i>	Anjiyogenez ile damar oluşumu	Meme, böbrek, kolorektum kanseri
<i>RAS</i>	Hücre bölünmesi, metastaz oluşumu, hücre döngüsü	İnsan tümörlerinin ortalama % 20'sinde

### 2.1.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler hakkında ilk bilgilere 1969 yılında Henry Harris ve arkadaşları tarafından yapılan somatik hücre hibridizasyonu deneyleri ile ulaşılmıştır (28). Deneyde normal hücreler ile kanserli hücrelerin füzyonu sağlanmış ve böylece her iki hücre tipinden de kromozom içeren hibrit hücreler elde edilmiştir. Çoğu vakada bu hibrit hücrelerin hayvanlarda tümör oluşumuna neden olmadığı gözlemlenmiş ve bunun sebebinin normal

hücreden gelen ve tümör gelişimini engelleyen genlerin neden olduğu düşünülmüştür (28). Daha sonra ilk tümör baskılayıcı gen retinoblastoma üzerine yapılan çalışmalar sonucunda tanımlanmıştır (29). Retinoblastoma oluşumunda etkili olan *Rb* geninin 13. kromozomda bulunduğu ve hastalarda genellikle bu genin delesyona uğradığı karyotip çalışmaları sonucunda anlaşılmıştır. Devam eden çalışmalar ile beraber *Rb* geninin sadece retinoblastomada değil meme, akciğer, mesane gibi birçok kanser türünde de delesyona uğradığı görülmüştür. *Rb* geninin daha sonra hemen hemen her hücrede hücre döngüsünde görev aldığı yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır (18).

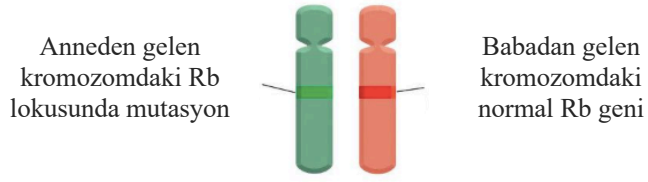
Tümör baskılayıcı genlerin genellikle beş ana protein sınıfını kodladığı bilinmektedir (16);

- *Hücre içi proteinler*; hücre döngüsünün belirli aşamasında gelişmeyi düzenlerler ya da inhibe ederler.
- *Reseptörler veya sinyal iletiminde görevli proteinler*; hücrenin kontrolsüz çoğalmasının engellenmesinde görevlidirler.
- *Hücre döngüsü denetim noktası proteinleri*; DNA zarar görmüşse veya kromozomlar anormal ise hücre bölünmesini durdururlar.
- *Apoptoz indükleyici proteinler*
- *DNA tamirinde görev alan enzimler*

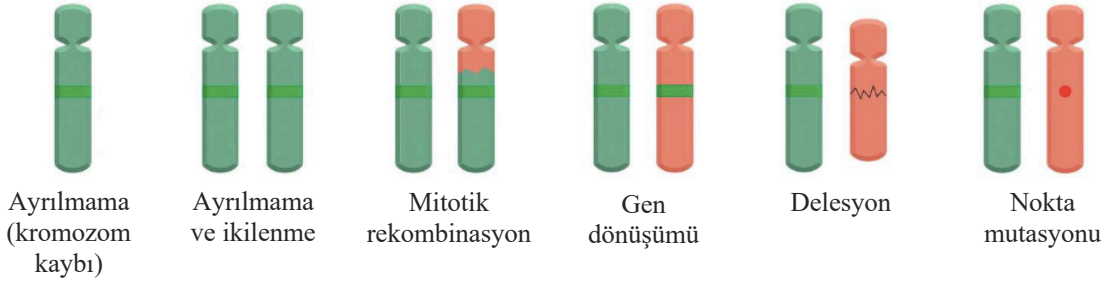
DNA tamirinde görev alan enzimlerde oluşan aksaklıklar direk olarak hücrede tümör oluşumuna neden olmasa da bu enzimlerin çalışmaması sebebiyle hücre DNA'sında mutasyon birikmesi gerçekleşebilir. Bu mutasyonların hücre çoğalmasını veya büyümesinde etkili genlerde oluşması ile beraber hücrede tümör oluşumu meydana gelebilmektedir (16).

Tümör baskılayıcı genlerin kanser oluşturması için çoğunlukla hücrede iki kopyasının da işlevini kaybetmiş olması gerekir (20). Genellikle tek bir kopyada mutasyona sahip olan hücreler sağlıklı hücre gibi davranırlar. Şekil 2.4.'de tek mutasyonlu kopyaya sahip hücrenin diğer normal gen kopyasının da nasıl işlevini kaybedebileceği *Rb* geni üzerinden gösterilmiştir (20). Tümör baskılayıcı genlere örnekler, hücresel fonksiyonları ve neden oldukları bazı kanser türleri Çizelge 2.2.'de ayrıntılı olarak verilmiştir (30).

YALNIZCA BİR NORMAL *Rb* GEN KOPYASI İÇEREN SAĞLIKLI HÜCRE



NORMAL *Rb* GENİNİ ORTADAN KALDIRMANIN OLASI YOLLARI



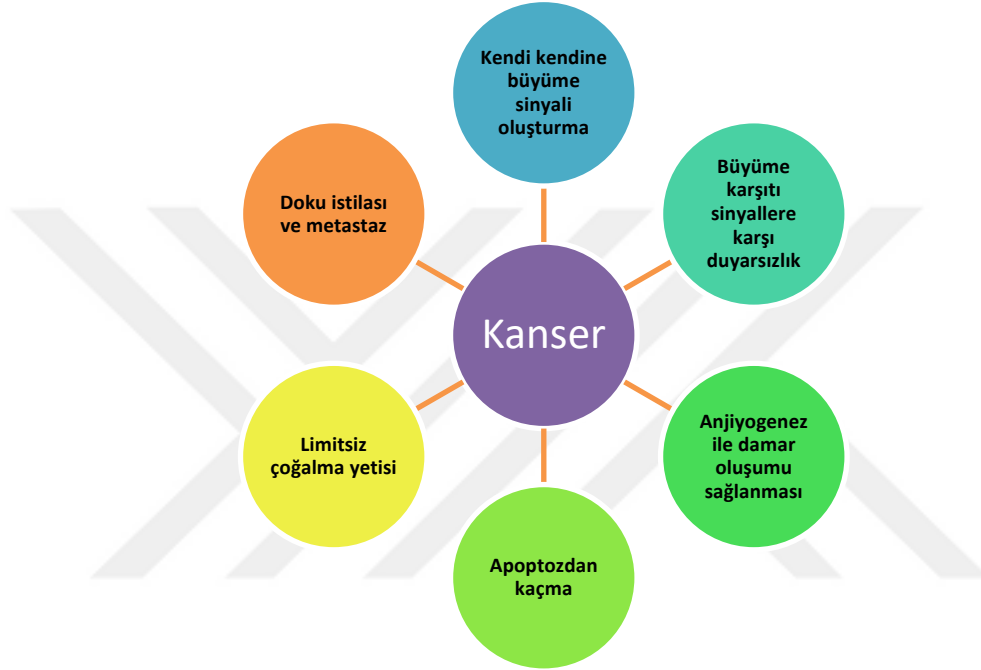
Şekil 2.4. Bir tümör baskılayıcı genin kalan normal kopyasını kaybetmenin altı yolu (20)

Çizelge 2.2. İnsan kanserlerinde bulunan çeşitli tümör baskılayıcı genler ve hücrel fonksiyonları (30)

Tümör baskılayıcı gen	Gen fonksiyonu	Kalıtımsal olmayan kanser
<i>RBI</i>	Hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, hücre ölümü	Birçok farklı kanser
<i>TP53</i>	Hücre bölünmesi, DNA tamiri, hücre ölümü	Birçok farklı kanser
<i>BRCA1, BRCA2</i>	Çift sarmallı DNA kırılması onarımı, hücre bölünmesi, hücre ölümü	Meme ya da yumurtalık kanseri
<i>CDKN2A</i>	Hücre bölünmesi ve ölümü	Birçok farklı kanser
<i>VHL</i>	Hücre bölünmesi, hücre ölümü ve farklılaşması	Belli böbrek kanserleri

## 2.1.2. KANSERİN ALTI ANA ÖZELLİĞİ

Kanser hücreleri mikroskop altında normal hücrelerden ayrılabilir. Genellikle kanser hücreleri normal hücrelere göre daha az farklılaşmış olmaktadır. Yine kanser hücreleri normal hücrelere göre daha büyük ve daha fazla miktarda çekirdeğe sahiptirler (18). Yapılan birçok araştırmalar sayesinde genel olarak kanserli hücrelerin sağlıklı hücrelerden farklı olarak 6 temel mekanizma geliştirdikleri anlaşılmıştır (31) (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Kanser hüresinin altı ana özelliği (31)

### 2.1.2.1. Kontrolsüz Hücre Bölünmesi

Tüm organizmalar kendilerine özgü biçim ve büyüklüğe sahip olan çeşitli hücrelerden oluşmuşlardır. Neredeyse tüm memeli hücrelerde iç çoğalma sınırlamaları vardır (31). Hücrelerde belli mekanizmalar ile çoğalma kontrol edilmekte olup bu sayede organizmada doku ve organ bütünlüğü sağlanmış olur. *In vitro* koşullarda normal hücrelerin sınırlı sayıda bölünme yapabildiği anlaşılmış ve hücrelerin yaşlanma durumuna geçtiklerinde ise bölünme yeteneklerini kayb ettikleri gözlemlenmiştir (23).

Normal hücrelerden farklı olarak kanserli hücrelerin yine laboratuvar ortamında çoğaltılması sağlanmış ancak bu hücrelerin yaşlanma durumuna geçmedikleri sürekli bölünebildikleri



gözlemlenmiştir. Yapılan bu araştırmanın sonucundan da anlaşılacağı üzere kanserli hücreler bölünme kontrol mekanizmalarını baskılayıp sürekli bölünerek ölümsüzleşebilmektedirler. Bu sebeple buldukları dokunun yapısını ve bütünlüğünü bozarak organizma için sağlıklı bir ortam oluşmasına neden olurlar (19,23).

Hücrelerde tıpkıyapımsal yaşlanma kromozomların uçlarında bulunan telomer olarak isimlendirilen diziler ile ilişkilendirilmiştir ve bu dizilerin bütünlüğünü telomeraz enzimi ile sağlamaktadır (32). Normal hücrelerde bölünme sırasında gerçekleşen her DNA eşleşmesi sırasında kromozom uçlarında bulunan bu telomer dizileri bir miktar kısalma eğilimi göstermektedirler çünkü bu hücrelerde telomeraz enziminin sentezi sağlanamamaktadır. Kanserli hücrelerde ise telomeraz enzimini kodlayan gen işlevsel hale getirilip enzimin üretimi sağlanarak hücrelerin tıpkıyapımsal yaşlanmadan kaçması sağlanmış olur. Böylece kanserli hücreler ölümsüzlüğe ulaşmış olmaktadır (31). Ölümsüz hücrelerin % 90'ında ve nerdeyse tüm kanser türlerinin % 85-90'ında telomeraz enziminin aktif olduğu belirlenmiştir (23,31).

#### **2.1.2.2. Büyüme Sinyali Oluşturma**

Hücreler buldukları dokularda çevreleri ile her zaman iletişim halinde bulunurlar. Tek bir hücrenin diğer hücrelerden ayrı bir şekilde canlılığını devam ettirmesi düşünülemez. Bu sebeple hücrelerin davranışlarında dışarıdan gelen büyüme faktörleri oldukça etkilidir. Ligand olarak bilinen bu büyüme faktörleri hücrelerin yüzeyindeki belli reseptörlere bağlanarak hücre içerisinde bir dizi sinyal iletimine neden olurlar. Oluşan uyarılar ile hücre bölünmesi indüklenebilir ya da baskılanabilir. Ancak kanserli hücrelerde durum böyle olmamaktadır. Kanserli hücreler çevreden gelen büyüme faktörleri olmaksızın dahi hücreyi bölünmeye zorlayabilirler. Genellikle ön-onkogenlerin belli mutasyonlar sebebiyle onkogen halini almasıyla beraber kanserli hücrelerde daimî olarak hücre bölünmesi tetiklenmektedir (33).

Kanserli hücreler üç ana mekanizma ile sürekli olarak bölünmeyi tetikleyebilirler (19,23):

- *Hücre dışı büyüme faktörlerinde değişimler*; hücreler çevrelerinde bulunan hücre tipine özel olarak büyüme faktörleri üretirler. Kanserli hücreler ise kendi kendilerine

özel olarak büyüme faktörü üretebilmektedirler. Bu sayede sürekli olarak hücreyi bölünmeye ve çoğalmaya zorlarlar.

- *Reseptörler üzerinde yapılan değişimler*; ligandlar hücre yüzeyinde bulunan büyüme faktörü reseptörlerine bağlanarak hücrelerde bölünmeyi tetiklerler. Bu reseptörlerde oluşan mutasyonlar veya reseptör sayısında oluşan değişimler sebebiyle normal hücre kanserli hücre formuna dönüşebilmektedir. Kanserli hücrelerde genellikle ortamda herhangi bir büyüme faktörü bulunmaksızın bile bu reseptörler mutasyon ile ya sürekli aktif halde tutulabilirler ya da bu reseptörlerin aşırı ifadesi sağlanarak hücre yüzeyinde normalden çok daha fazla sayıda büyüme faktörü reseptörü bulunması sağlanabilir. Her iki durumda da kazanılan özellikler sayesinde hücrenin bölünme sürecine girmesi sağlanmış olur.
- *Hücrede çoğalmayı indükleyen hücre içi sinyal ileticilerinde değişimler*; büyüme faktörlerinin hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanması ile hücre içerisinde bir dizi sinyal iletimi de başlamış olur. Birçok kanser türünde hücre içinde bulunan ve sinyal iletiminde görev alan bu çeşitli proteinlerde mutasyonlar olduğu gözlemlenmiştir.

### **2.1.2.3. Büyüme Baskılayıcı Sinyallere Karşı Duyarsızlık**

Normal hücrelerde hücre bölünmesi düzenlenmesinde görev alan moleküllerden bir grubu anti-proliferatif sinyaller olarak bilinmektedir. Bu inhibitör sinyaller çözülebilen büyüme sinyali inhibitörleri olabildikleri gibi hücre içi ve hücre yüzeyinde de bulunabilirler (23). Büyüme baskılayıcı genler tümör baskılayıcı genler olarak adlandırılmaktadırlar. Kanserli hücreler aşırı şekilde çoğalabilmek için büyüme baskılayıcı sinyallerden etkilenmemek için çeşitli mekanizmalar geliştirebilmektedirler. Genellikle tümör hücreleri genetik ve epigenetik mekanizmaların düzenlenmesi ile tümör baskılayıcılardan kaçabilmektedirler. Genetik mekanizmalar arasında kromozomal delesyonlar ve mutasyonlar bulunmaktadır. Epigenetik düzenlemeler ise DNA metilasyonu, histon metilasyonu ve asetilasyonu sağlanmaktadır. Temelde bu iki mekanizma ile tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarını kaybetmesi sağlanmış olmaktadır. Böylece normal hücreler büyüme baskılayıcı sinyallere karşı direnç göstermeye başlamaktadırlar ve bu süreç dokuda bulunan normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesiyle sonuçlanmaktadır. Tümörlerde fonksiyon kaybına uğramış tümör baskılayıcılara örnek olarak mutasyonlu veya metilasyona uğramış siklin bağımsız

kinaz inhibitörü (*CDKN*), yine mutasyona uğramış fosfataz tensin homolog (*PTEN*) bilinmektedir (34).

#### **2.1.2.4. Apoptozdan Kaçma**

Sağlıklı dokularda hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki denge sağlanarak dokunun bütünlüğü korunmaktadır. Ancak kanserli hücrelerde hücre ölümünde rol alan apoptoz mekanizmasında bazı sorunlar görülmektedir. Kanserli hücreler farklı mekanizmalar üzerinden apoptoza karşı direnç gösterebilmektedirler. Örneğin kanserli hücreler Kaspaz enzimlerinin aktivitesini inhibe edebilmektedirler (35). Bir diğer mekanizmaya örnek olarak kanserli hücrelerin *p53* geninin mutasyona uğraması ve böylece bu genin hücrede işlevini yapamayacak hale gelmesi verilebilir. *p53* geni apoptoz indükleyici bir gen olması nedeniyle, bu genin hücrede mutasyona uğramış olması apoptozu aktifleştiren bir ürünün üretilmemesi anlamına gelmektedir. Buda kanserli hücrelerin apoptozdan kaçarak kontrolsüz bir biçimde büyümeleri için uygun koşulların sağlanmasını mümkün kılar (33).

#### **2.1.2.5. Anjiyogenez ile Damar Oluşumu Sağlanması**

Kanserli hücrelerin bir diğer özelliği ise kendi gelişim ve çoğalmaları için gerekli olan besinlere ve yeterli miktarda oksijene ulaşabilmek amacıyla yeni damar oluşumunu sağlayabilmeleridir. Kanserli hücrelerin yeni damar oluşturması anjiyogenez olarak bilinmektedir (36). Yeni damar oluşumuyla beraber besinsel ihtiyaçların karşılanmasının yanında hücre atıklarının tümör bölgesinden uzaklaştırılması sağlanmış olmaktadır. Çeşitli tümör hücreleri anjiyogenez oluşumunu indükleyebilmek için basit fibroblast büyüme faktörü (bFGF), dönüştürücü büyüme faktörü alfa ( $TGF-\alpha$ ), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi birçok büyüme faktörü salgılamaktadırlar (23). VEGF vasküler oluşumda çok önemli bir yere sahip olan anjiyojenik sitokinlerden biridir. VEGF'in vasküler endotel hücre çoğalmasını tetiklediği gibi vasküler sızıntıyı ve geçirgenliği de arttırdığı ve böylece damar oluşumunu sağladığı anlaşılmıştır (37). bFGF ailesi ise 9 farklı tirozin kinaz reseptörlerinden ve bu reseptörlerin ligandlarından oluşmaktadır. bFGF reseptör-ligand etkileşimi sonucunda hücre içerisinde bir dizi sinyal iletim yolağını tetiklenmiş olmakta ve böylece damar oluşumu süreci başlamış bulunmaktadır (37).

### **2.1.2.6. Doku İstilasası ve Metastaz**

Tümör hücreleri bazı durumlarda buldukları dokudan ayrılarak farklı dokuları istila edebilmektedirler. Tümör hücreleri ulaştıkları yeni dokuda canlılıklarını devam ettirebilmekte ve hatta bu dokuda ikinci bir tümör yapısı oluşmasına neden olabilmektedirler (38). Tümörlü hücrelerin bu şekilde bulunduğu dokudan farklı dokulara ulaşım ikincil tümör oluşturmaları metastaz olarak bilinmektedir ve kanser vakalarında görülen ölüm oranlarının % 90'ını metastatik kanser türleri oluşturmaktadır (35). Tümör hücrelerinin farklı dokulara göç edebilmeleri için belirli özellikler kazanmış olmaları gerekmektedir. Öncelikle buldukları doku çevresine nüfuz edebilmelidirler. Özellikle kan ve lenf damarlarına sızan tümör hücreleri damar içerisinde yaşamını sürdürebilmeli ve yine damar duvarını geçerek yeni bir dokuya sızabilmelidirler. Yeni dokuya nüfuz eden hücreler girdikleri mikro-çevreye uyum sağlayarak buldukları konumda yaşamlarını sürdürebilmelidirler (26). Tümör hücrelerinin bireysel olarak buldukları dokudan ayrılıp başka bölgeye göç edebilme yeteneklerini hücre-hücre bağlantılarını kaybederek kazandıkları bilinmektedir. Böylece tümör hücreleri epitel özelliklerini kaybederek mezankimal özellik kazanmış olup metastaz sürecini başlatabilmektedirler (38).

### **2.1.3. DÜNYADA VE ÜLKEMİZDE KANSER İNSİDANSI**

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılında yaptığı veri değerlendirmelerine göre kanser, 172 ülkenin 91'inde yetmiş yaş altı ölümlerin birinci ya da ikinci sebebi olmaya aday bir hastalıktır (39). Diğer 22 ülkede ise üçüncü ya da dördüncü sırada yerini alacağı değerlendirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı istatistiksel verilere göre ülkemizde 70 yaş altı ölümlere neden olan hastalık türünde kanser ikinci sırada yer almaktadır (39).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) kuruluşuna ait bir bölüm olan Global Kanser İzleme sistemine ait veri tabanı GLOBOCAN olarak bilinmektedir. GLOBOCAN veri tabanında kanser hastalığı hakkında istatistiksel bilgiler sunulmaktadır. GLOBOCAN'a ait istatistiksel verilere göre erkek popülasyonunda dünyada en fazla prostat kanseri görülürken (105 ülke) ülkemizde erkeklerde en sık tanısı konulan ve en çok ölüme sebep olan kanser türü ise akciğer kanseri olarak belirlenmiştir (39).

Kadınlarda ise dünyada en çok tanısı konulan kanser türünün çok büyük bir oran ile meme kanseri (154 ülke) olduğu belirlenmiştir (39). Bu 154 ülkenin içerisinde Türkiye’de bulunmaktadır. Mortalite oranlarına bakıldığında ise dünyada kadın popülasyonunda en çok ölüme sebep olan yine meme kanseri olup, meme kanserini ise serviks kanseri takip etmektedir. Ülkemizde ise yine dünya ile benzer olarak en çok ölüme meme kanserinin neden olduğu GLOBOCAN verilerinden anlaşılmaktadır (39).

## 2.2. MEME KANSERİ

Meme kanseri dünyadaki kadın popülasyonunda en sık teşhisi konulan ve kanser sebepli ölümlerde önde gelen bir hastalıktır (40). Meme kanseri oldukça heterojen bir hastalık olup farklı patolojik ve klinik etkilere sahip özellikler göstermektedir. Geleneksel hormon reseptörü pozitif ve negatif tiplerinin yanı sıra gen ifadesine dayalı çalışmalar kullanılarak da meme kanseri temelde Lüminal A, Lüminal B, HER2-pozitif, üçlü-negatif/basal benzeri ve normal benzeri olmak üzere 5 ana alt tipe ayrılmıştır (4).

**Lüminal A meme kanseri:** Lüminal A meme kanseri hücrelerinde östrojen reseptörü pozitif (ER+) ve progesteron reseptörü pozitif (PR+) iken insan epidermal büyüme faktörü 2 negatif (HER2-) olduğu bilinmektedir. Kanser hastalıklarının genellikle % 40’ını lüminal A meme kanseri oluşturmaktadır. Yavaş büyüyen ve iyi prognoza sahip bir kanser alt tipidir (4).

**Lüminal B meme kanseri:** Meme kanserinin yaklaşık % 20’sini lüminal B meme kanseri oluşturmaktadır. Bu alt tipte ifade seviyelerine göre ER+ ya da PR+ iken HER2 ifadesi pozitif veya negatif olabilmektedir. Bu meme kanseri alt tipinde Lüminal A meme kanserine göre biraz daha hızlı çoğalma olduğu bilinmektedir (41).

**HER2 pozitif meme kanseri:** HER2+ meme kanseri alt tipi meme kanseri vakalarının % 10 ile % 20 arasındaki bir kısmını oluşturmaktadır. Bu alt tipte ER ve PR ifadeleri gözlenmezken HER2 yüksek ifadeli olduğu saptanmıştır. HER2+ meme kanseri lüminal kanser türlerine göre çok daha hızlı çoğalabilmektedir ve genellikle kötü prognaza sahip olduğu bilinmektedir (2).

**Üçlü negatif/Basal benzeri meme kanseri (TNBC):** Üçlü negatif meme kanseri alt tipi ER-negatif, PR-negatif ve HER2- negatif olarak tanımlanmıştır ve meme kanserinin yaklaşık olarak % 15’lik bir bölümünü oluşturmaktadır (42). TNBC *BRCA1* geni mutasyonuna sahip

kadınlarda daha sıklıkla görülmektedir ve diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha agresif olarak ilerlemektedir (4). Ayrıca üçlü negatif meme kanserinde *P53* mutasyonuna sıklıkla rastlanmaktadır. Bu alt tipe ait tüm vakalarda değil ancak çoğunda kötü prognoz olduğu bilinmektedir (41).

**Normal benzeri meme kanseri:** Lüminal A meme kanserine oldukça benzeyen normal benzeri meme kanserinde ER ya da PR pozitif olduğu HER2'nin ise negatif olduğu bilinmektedir. Normal meme kanseri alt tipinin prognozu oldukça iyi olmasına karşın lüminal A tipine göre yine de daha düşük prognoz seviyesine sahiptir (4).

### 2.2.1. MEME KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ

Cinsiyet meme kanseri için bir risk faktörüdür çünkü erkeklere oranla kadınlarda meme kanseri oluşumunun 100 kat fazla olduğu bilinmektedir. 55 yaş ve üstü kadınlarda meme kanseri oranı fazla olduğundan yaşlanma yine risk faktörleri arasındadır. Cinsiyet ve yaşlanma faktörleri dışında meme kanseri risk faktörleri kalıtsal özellikler ve çevresel etmenler olarak iki grupta incelenmektedir. Meme kanserlerinin % 5-10 oranı aileden gelen kalıtsal mutasyonlar sebebiyle oluştuğu bilinmektedir. Kalıtsal meme kanserinin en yaygın sebebi *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde meydana gelen mutasyonlardır. İstatistiksel olarak, *BRCA1* mutasyonu olan kadınlar, yaşamları boyunca % 55-65 oranında meme kanseri riski taşımaktadır. *BRCA2* mutasyonlu kadınlar ise yaşamları boyunca % 45 oranında meme kanseri olma riskiyle karşı karşıya bulunmaktadırlar. *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlarının yanı sıra *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11*, *PALB2* genlerinde meydana gelen mutasyonlar da meme kanseri oluşumu için risk teşkil etmektedirler (4).

Kalıtsal özelliklerin yanında çevresel etmenler de meme kanseri oluşumunda etkili olabilmektedir. Bunlar (4,43);

- *Aile öyküsü*
- *İrk ve etnik köken;* Afrikalı-Amerikalı kadınların her yaşta meme kanserinden ölme olasılığı Asyalı, İspanyol ve Kızılderili kadınların ölme olasılığından daha fazladır.
- *Göğse uygulanan radyasyon terapisi;* Genç yaşta başka kanser tedavileri için göğse radyasyon terapisinin uygulanması daha ileriki zamanlarda meme kanseri oluşumunu tetikleyebilmektedir.

- *Diethylstilbestrol (DES) ilacının kullanımı:* 1940'lı yıllardan 1970'li yılların başlarına kadar hamile kadınlarda düşük riskini azaltmak için DES ilacı yaygın halde kullanılmaktaydı. DES ilacını kullanan kadınlarda meme kanseri riskinin daha fazla olduğu hatta annesi hamileyken bu ilacı kullanan kadınlarda da meme kanseri riskinin olduğu bilinmektedir.
- *Doğum kontrol ve koruyucular:* Hormon içeren korunma yöntemleri meme kanseri oluşumuna sebep olabilmektedir. Oral kontraseptif kullanan kadınların meme kanseri riski bunları hiç kullanmayan kadınlara göre biraz daha yüksektir.
- *Menopoz sonrası hormon replasman tedavisi (HRT):* HRT kullanan kadınlarda meme kanseri oluşum riskinin arttığı bilinmektedir.
- *Aşırı alkol tüketimi:* Günlük alkol tüketim miktarına bağlı olarak kadınlarda aşırı alkol kullanımının meme kanseri oluşmasında risk teşkil ettiği bilinmektedir. Özellikle ER + meme kanseri oluşumu riskinin alkol kullanımının arttırdığı belirtilmiştir.
- *Obezite:* Yağ dokuları vücutta östrojen hormonu miktarını arttırabilmektedir bu sebeple aşırı kilo meme kanseri riskini arttırmaktadır.
- *Çocuk sahibi olmamak ve emzirmemek:* Çocuğu olmayan ya da 30 yaşından sonra ilk çocuk sahibi olan kadınlarda meme kanseri görülme riski daha fazladır.
- *Menstrüasyon evresinin erken yaşta başlaması veya menopozun 55 yaşından sonra durdurulması:* Kadınlar özellikle 12 yaşından önce menstrüasyon döngüsüne girmeleri daha fazla östrojen ve progesteron hormonuna maruz kalmalarına sebep olmaktadır bu sebeple meme kanseri görülme riski erken menstrüasyona girmiş kadınlarda daha fazladır. Ayrıca menopoza geç girilmesi yine hormonlara olan maruziyet süresini arttıracığından meme kanseri riskini arttırmaktadır.
- *Fiziksel aktivite eksikliği:* Elde edilen veriler özellikle menopozdan önceki kadınlarda düzenli fiziksel aktivitenin meme kanseri riskini azaltabileceğini göstermektedir.

### 2.2.2. MEME KANSERİ TEDAVİSİ

Uzun yıllar boyunca araştırmacılar meme kanserinin tedavi edilebilmesi amacıyla klinik araçlar ve moleküler yaklaşımlar geliştirmeye çalışmışlardır. Moleküler yaklaşımlar ile meme kanseri moleküler düzeyde araştırılması ile tedavi için yeni aday moleküllerin

belirlenmesi amaçlanmıştır (44). Cerrahi müdahale meme kanseri tedavisinde en çok kullanılan yöntemdir. Cerrahi yöntemden sonra kemoterapi ve radyasyon terapisi yine tedavi için başvurulmuş temel yöntemler arasındadır. Meme kanseri alt tiplerine bağlı olarak ise endokrin terapiler geliştirilmiştir ve genellikle belli moleküller hedef alınarak meme kanseri hastaları çeşitli ilaçlar ile tedavi edilmektedir. Endokrin tedavisinde hedef olarak belirlenen ana moleküller östrojen reseptör (ER) ve insan epidermal büyüme hormonu 2 (HER2)'dir (8). Üçlü negatif meme kanserinde ise endokrin terapi etkili bir tedavi yöntemi olmadığından bu meme kanseri alt tipi için yeni hedef moleküllerin araştırılması gerekmektedir (42).

**ER hedefli terapi:** ER nükleer reseptör ailesi üyelerinden olup hücrede çoğalmada, hayatta kalmada ve invazyonda önemli rol üstlenmektedir (8). ER'nin hücredeki önemli fonksiyonları bu molekülü meme kanseri tedavisinde etkili bir hedef molekül haline getirmektedir. Östrojen hormonunun östrojen reseptörüne bağlanmasıyla ligand-reseptör etkileşimi gerçekleşmiş olup hücre içerisinde sinyal iletimi başlamış olmaktadır. Meme kanseri tedavisinde de anti-östrojenik molekül olarak Tamoxifen ilacı kullanılmaktadır. Tamoxifen ER'de östrojenin bağlanacağı aktif ligand bölgesine bağlanarak östrojen-ER bağlantısını engellemekte ve böylece ER aktif hale gelememektedir (8). ER'nin aktifleşmesinin engellenmesiyle meme kanseri ilerlemesi baskılanabilmektedir (8). Klinisyenlerin ER hedefli meme kanseri terapi sürecinde en sık karşılaştıkları zorluklardan birisi kanser hücrelerinin endokrin tedavisine karşı direnç geliştirmeleridir. Oluşan direnç östrojenden bağımsız olarak hücrelerin büyüebilmesine ve hayatta kalmasına olanak sağlamaktadır. Bu sebeple uygulanan tedavi etkisini yitirmiş olmaktadır (45).

**HER2 hedefli terapi:** HER2 bir trans-membran tirozin kinaz reseptörü olup 4 farklı EGFR aile üyelerinden bir tanesi olan *ERBB2* geni tarafından kodlanmaktadır (46). 1998 yılında Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ilaç olan Trastuzumab anti-HER2 monoklonal antikor olarak geliştirilmiştir ve HER2 aktivasyonunu inhibe edebilmektedir. Trastuzumabın diğer kemoterapi ajanlarıyla beraber olarak kanser tedavisinde kullanılması sayesinde ER+ ve HER2+ meme kanseri tiplerinin hastada tekrar nüksetmesinin engellendiği ve metastazın daha iyi baskılandığı anlaşılmıştır (8) Meme kanseri tedavisinde bir diğer geliştirilen ilaçlardan bir diğeri Lapatinib ise hem EGFR hem de HER2 inhibitörüdür (47). Lapanitibin 2007 yılında FDA onaylanmasından sonra 2012 yılında yine bir anti-HER2 monoklonal antikor olan Pertuzumabı onaylamıştır (44). Ancak



tedavi sürecinde karşılaşılan sorunlardan birisi özellikle metastatik hastaların Trastuzumaba karşı direnç geliştirmesidir ve bu direnç tedavi sürecini olumsuz etkilemektedir (8).

**Üçlü Negatif Meme kanseri için geliştirilen terapi:** TNBC’de hedef reseptör olmamasından dolayı hormonal ya da Trastuzumab tabanlı tedavi yöntemleri etkili olamamaktadır. Bu sebeple TNBC tedavisinde genellikle cerrahi yöntemler ve kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Ancak yapılan son çalışmalar ile tedavi için hedef olarak bazı reseptörler tespit edilmiştir (6). Çizelge 2.3.’de TNBC için hedeflenen terapötik yaklaşımlar belirtilmiştir (42).

Çizelge 2.3. Üçlü negatif meme kanseri için hedeflenen terapötik yaklaşımlar (42)

Yolak	Hedeflenen Terapötik Yaklaşım
Anjiyogenez	Anti-VEGF monoklonal antikor
Apoptoz	BCL2 spesifik inhibitör, TRAIL monoklonal antikor
Büyüme Faktörü Sinyali	Anti-EGFR monoklonal antikor, EGFR tirozin kinaz inhibitörü
PI3K/mTOR sinyali	mTOR inhibitörü, Rapamisin analogu, PI3K ve AKT inhibitörü, PI3K ve mTOR inhibitörü
Hedgehog	Anti-HH ligand monoklonal antikor, Gli antagonist
NOTCH	Anti-NOTCH monoklonal antikor
WNT/ $\beta$ -katenin sinyali	Anti-WNT ligand monoklonal antikor

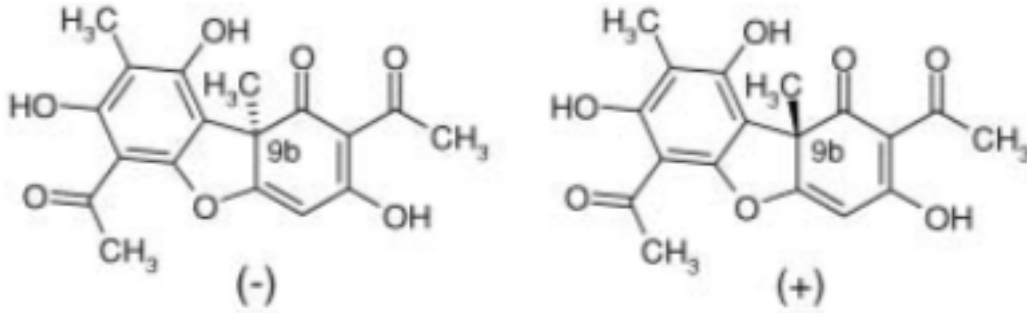
### 2.2.3. MEME KANSERİ TEDAVİSİ ÜZERİNE ARAŞTIRILAN BİYOLOJİK MOLEKÜLLER

Kanser tedavisinde birçok kimyasal ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlara olan direnç gelişiminin oluşması sebebiyle bilim dünyasında farklı terapötik moleküllerin keşfi üzerine odaklanılmıştır. Bu biyolojik moleküllerden bazıları bitkilerden elde edilen moleküller olduğu gibi likenlerden ya da mantarlardan elde edilen moleküllerinde kanser üzerindeki

etkisi araştırılmaktadır. Diğer organizmalarda olduğu gibi insanlarda da bulunan mikroRNA'ların da meme kanseri tedavisi üzerindeki etkisi yapılan çeşitli çalışmalar ile araştırılmaktadır.

### 2.2.3.1. Kanser Tedavisinde Etkin Aday Molekül: Usnik asit

Likenler mantarların algler veya siyanobakteriler ile simbiyotik bir yaşam kurması sonucu oluşan organizmalardır (48). Likenler antimikrobiyal, anti-viral, anti-protozoal, anti-proliferatif, anti-tümör, anti-enflamatuar, analjezik, foto-koruyucu, enzim inhibe edici ve anti-anjiyojenik etkilere sahip çeşitli sekonder metabolitler üretebilmektedirler (48). Usnik asit (2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3(2H,9bH)-dibenzofurandione) likenler tarafından üretilen sekonder metabolitler arasında en bilinenlerdendir. İki enantiomeri olan Usnik asit'in yapısal formülü Şekil 2.6.'da gösterilmiştir (49).



Şekil 2.6. Usnik asit'in 2 farklı yapısı (49)

Usnik asit'in de çeşitli kanser türlerine karşı anti-proliferatif etki gösterdiği yapılan çalışmalar sonucu anlaşılmıştır (48,50,51). Usnik asit'in meme kanserinde de tümör oluşumunu baskıladığı yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır (52,53). Usnik asit meme kanserinde tümör baskılayıcı etki gösterirken bu işlemi hücrenin DNA yapısına zarar vermeden yaptığı yapılan bir çalışma sonucu ortaya çıkarılmıştır (54). Usnik asit'in hücreler üzerinde genotoksik etki göstermeme özelliği bu molekülü meme kanseri tedavisinde potansiyel bir aday molekül haline getirmektedir (54). Ayrıca gerçekleştirilen çalışma sonucunda Usnik asit'in farklı kanser türlerine yüksek oranda anti-proliferatif etki gösterdiği, ancak kanser olmayan normal epitel hücreler üzerine daha az oranda etki

gösterdiği belirlenmiştir (54). Böylece Usnik asit'in kanser hücrelerine odaklı göstermesi Usnik asit'in kanser tedavisinde aday bir molekül olduğuna dair bir diğer belirteçtir.

### **2.2.3.2. Kanser Tedavisinde Etkin Aday Molekül: MikroRNA'lar**

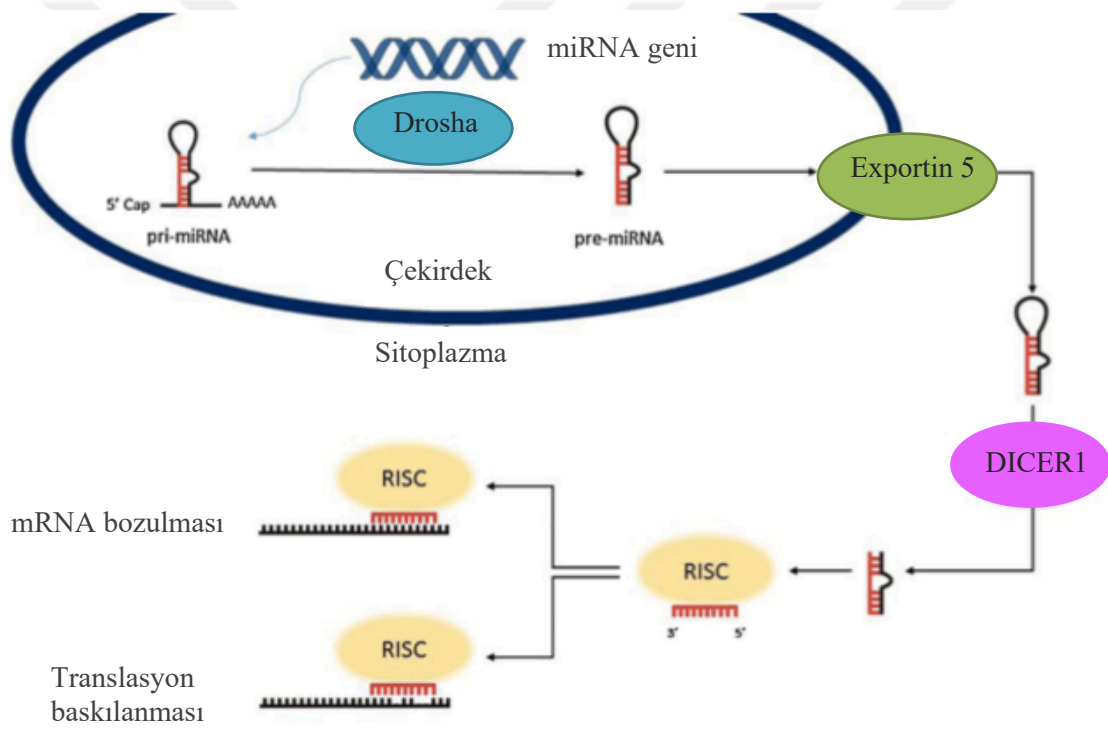
İnsan genomunda düzenleyici görev üstlenen kodlama yapmayan RNA (ncRNA) dizileri bulunmaktadır. Kodlanmayan RNA dizileri nükleotid sayısına göre uzun lncRNA (200-100.000 nükleotid) ve kısa ncRNA olmak üzere iki ana kategoride sınıflandırılmaktadır (55). Kısa ncRNA'lar ise yine kendi içerisinde kökenleri, yapıları, ilişkili efektör proteinleri ve biyolojik rolleri baz alınarak siRNA, piRNA ve mikroRNA olmak üzere üç ana grupta incelenmektedir. ncRNA'lar kromatin yapısı, kromozom segregasyonu, transkripsiyon, RNA işleme, RNA stabilitesi ve translasyon gibi biyolojik olaylarda düzenleyici görev almaktadırlar (56).

ncRNA'lardan bir grup olan mikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık olarak 21-25 nükleotid uzunluğunda kodlanmayan RNA dizileridir ve hücrede transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda görev almaktadırlar (10). İlk miRNA (lin4) 1993 yılında Ambros ve ark. tarafından *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) organizmasında keşfedilmiştir (57). İlk miRNA'nın keşfinden 7 yıl sonra ise Reinhart ve ark. *C. elegans*'da *lin 41* genini baskılayan farklı bir miRNA (let-7) keşfettiler (58). Çalışmada let-7'nin *lin 41* geni 3'UTR mRNA dizisinin belli bir bölgesiyle eşleştiği ve miRNA ile mRNA arasında spesifik bir RNA-RNA bağlantısı kurulduğu ortaya çıkarılmıştır (58). Yapılan bu iki çalışma sonucunda miRNA'ların canlılarda transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda görev aldıkları belirtilmiştir (59).

#### **2.2.3.2.1. miRNA Biyogenezi**

Olgun bir miRNA'nın sentezlenebilmesi için hücre içerisinde bir dizi mekanizmanın çalışması gerekmektedir. İlk olarak saç tokası yapısında bir RNA olan Pri-miRNA belirli bir gen bölgesinden RNA polimeraz II enzimi ile çekirdekte sentezlenmektedir. Daha sonra, sentezlenen Pri-miRNA 70-85 nükleotid uzunluğunda olacak şekilde ribonükleaz olan Drosha enzimi ve DGCR8 kofaktörü yardımıyla kısaltılmaktadır (13). Saç tokası yapısında sentezlenen bu öncül miRNA (pre-miRNA) Exportin-5 molekülü yardımıyla çekirdekten alınarak hücre sitoplazmasına transferi gerçekleştirilmektedir. Sitoplazmaya gelen pre-miRNA RNaz endonükleaz DICER1 enzimi ile 18-25 nükleotid uzunluğunda olacak şekilde

kısaltılıp çift sarmallı yeni bir miRNA yapısı oluşturulmaktadır (60). Sarmal yapı çözüldükten sonra, olgun miRNA, RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) olarak adlandırılan bir protein kompleksi içine katılmakta ve RISC'yi mRNA'yı hedeflemesi için yönlendirmektedir (59). miRNA'lar hedef mRNA'lara bağlanarak mRNA'yı ya parçalayarak ya da translasyonu inhibe ederek gen regülasyonunu sağlamış olurlar. 3'UTR mRNA dizilerine bağlanan miRNA'lar birden çok mRNA'ya hedef olarak bağlanabilirler ya da bir 3'UTR mRNA dizisi birden çok miRNA'nın hedefi olabilmektedir ve böylece miRNA'lar hedefledikleri genin protein seviyesinde azalmaya neden olurlar (61). miRNA biyogenezi Şekil 2.7.'de ayrıntılı bir biçimde gösterilmiştir (10).



Şekil 2.7. miRNA biyogenezi (10)

#### 2.2.3.2.2. mikroRNA'lar ile Kanserin İlişkisi

miRNA'lar kanser hastalığıyla ilk defa 2002 yılında Calin ve ark. tarafından ilişkilendirilmiştir (62). Gerçekleştirilen bu çalışmada miR-15a ve miR-16-1 ifade seviyelerinin kronik lenfosit lösemi (CLL) hücrelerinin % 69'unda azaldığı ya da hiç ifade olmadığı ortaya çıkarılmıştır (62). Calin ve ark. yaptığı çalışmanın ardından araştırmacılar

bilinen miRNA'ların gen haritasını çıkarmaya yönelmişlerdir (10). Yapılan çalışmalar sonucunda akciğerler, prostat, tiroid, hepatoselüler, pankreas, mide, kolorektal, testis, glioblastoma ve lenfatik kanserlerde birçok miRNA'nın ifade seviyesinde değişim olduğu belirtilmiştir (13,60). Ayrıca miRNA'lar hücre çoğalması, tümör gelişimi ve göç gibi farklı biyolojik olaylarda rol oynamaktadırlar. miRNA'lar aktifleştirdikleri veya baskıladıkları yollara bağlı olarak kanser gelişimde onkojenik ya da tümör baskılayıcı rolde olabilmektedirler (63).

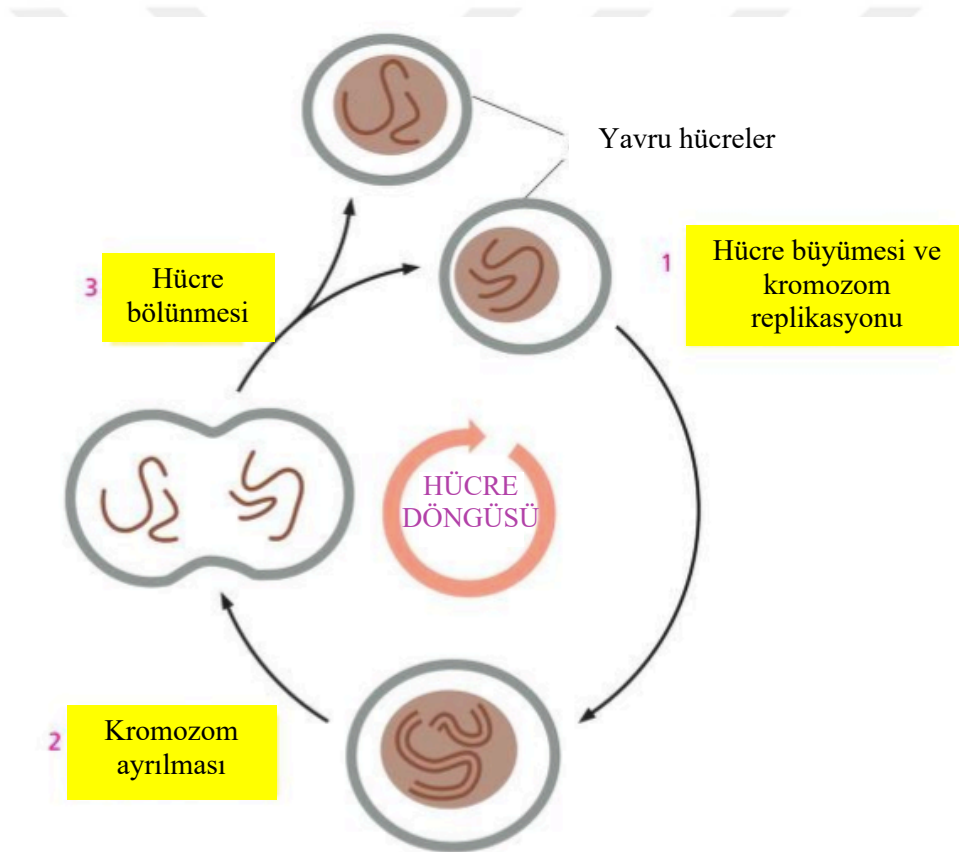
Tümör Baskılayıcı miRNA'lar kanser ilerlemesini ve gelişmesini farklı yolları etkileyerek baskılayabilen özellikte iken onkojenik miRNA'ların ise tümör gelişimi ve ilerlemesine katkı sağladığı belirtilmiştir. Meme kanserinde çeşitli tümör baskılayıcı miRNA'lar Çizelge 2.4.'de belirtilmiştir (10,13).

Çizelge 2.4. Meme kanserinde tümör baskılayıcı ve onkojenik miRNA'lar (10,13)

<b>Tümör baskılayıcı</b>		<b>Onkojenik</b>	
<i>miRNA</i>	<i>Hücre sel Fonksiyon</i>	<i>miRNA</i>	<i>Hücre sel Fonksiyon</i>
miR-205	Hücre çoğalmasını baskılama	miR-27a	Hücre çoğalmasını artırma
miR-206	Hücre göçünü baskılama	mir-21	İnvazyonu indüklemeye
miR-145	Tümör büyümesini baskılama	miR-301a	İnvazyonu indüklemeye
miR-34	G1 fazında hücre döngüsünü durdurma	miR-96	Hücre çoğalmasını indüklemeye
miR-152	Anjiyogenezi baskılama	miR-155	Kemoterapi ilaçlarına karşı direnç gelişimi
miR-125a miR-125b	Tümörleşme sürecini baskılama	miR-373 miR-520c	Hücre göçünü ve invazyonu indüklemeye
miR-31	Metastazı baskılama	miR-196a	Hücre çoğalmasını artırma

### 2.3. HÜCRE DÖNGÜSÜ VE KANSER

Bir hücrenin tüm içeriğini ikiye katlayıp daha sonra bir dizi makro-moleküler olayın gerçekleşmesiyle iki ayrı hücreye ayrılması hücre döngüsü olarak bilinmektedir (16). Hücre döngüsü tüm canlıların çoğalması için gerekli olan temel mekanizmadır. Bakteri ve mayalar gibi tek hücreli canlılarda hücre bölünmesi ile yeni bir organizma oluşurken, çok hücreli kompleks canlılarda hücre bölünmesi sayesinde fonksiyonel yapıya sahip bir organizma oluşması sağlanmaktadır (18). Hücre döngüsü sırasında gerçekleşen olaylar canlı organizmalarda farklılık gösterebilmektedir ancak temel olarak tüm canlılarda hücre döngüsü hücre gelişmesi ve kromozom replikasyonu, kromozomların ayrılması ve hücre bölünmesi olmak üzere üç basamakta gerçekleşmektedir (20) (Şekil 2.8.).



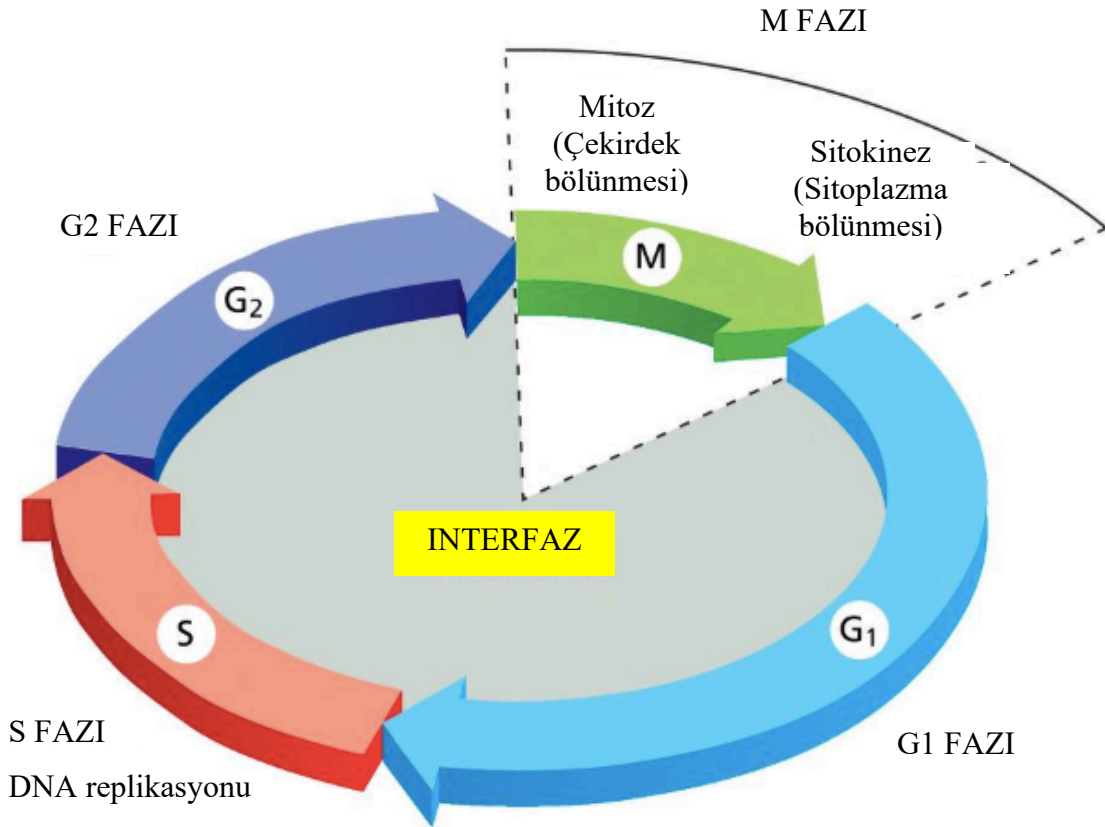
Şekil 2.8. Hücre döngüsünde gerçekleşen üç ana basamak (18)

Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü;

- G1 fazı,
- S (sentez) fazı,

- G2 fazı ve
- M (mitotik) faz olmak üzere dört ana fazda gerçekleşmektedir.

Hücre döngüsündeki en önemli fazlar DNA'nın ikiye katlandığı S fazı ve hücrenin iki yavru hücreye bölündüğü M fazıdır (64). G1 fazı hücrede RNA ve proteinlerin sentezinin tamamlandığı, G2 fazı ise hücrenin mitoz bölünme için hazırlıkların tamamlandığı aşamadır. M fazında ise çekirdek bölünmesi ve sitoplazma ayrılması temel olmak üzere, M fazı kendi içerisinde bir dizi kompleks olayın gerçekleşmesiyle hücrenin ikiye ayrıldığı aşamadır (16) (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Ökaryotik hücrelerde gerçekleşen hücre döngüsü aşamaları (18)

Hücre döngüsü süreci serin/treonin kinaz ailesinden siklin-bağımlı kinaz (CDK) proteinleri tarafından düzenlenmektedir. G1 fazında düzenleyici olarak siklin D-CDK4, siklin D-CDK6 ve siklin E-CDK2 görev almaktadır (65). S fazının başlamasında siklin A-CDK2 etkili iken,

G2 fazının düzenlenmesi siklin B-CDK1 tarafından gerçekleştirilmektedir (66). Hücre döngüsü sürecinde gerçekleşen fazlar ve fazlar arasındaki geçişler *denetim noktaları* adı verilen bir sensör mekanizma tarafından düzenlenmektedir. Bu sensör mekanizma hücre bölünmesi sırasında tamamlanamayan ya da yanlış gerçekleşen olayların tespitini yaparak hücrenin uyarılmasını sağlamakta ve sorunlar çözülene dek hücrenin bölünmesini engellemektedir (64). Kanserli hücrelerde ise bu denetim mekanizmasında bozulmalar meydana geldiği tespit edilmiştir. Hücrelerde denetim mekanizmasının bozulması hücrelerin kontrolsüz bölünmesine ve tümörlü hücrelerin metastatik özellik kazanmasına neden olduğu belirtilmiştir (64,67). Kanserli hücrelerdeki hücre döngüsü denetim mekanizmasındaki arızaların belirlenmesi denetim mekanizmasında görevli olan düzenleyici molekülleri tedavi için birer aday terapötik hedef haline getirmiştir. Çizelge 2.5.'de kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ve etkiledikleri hücre döngüsü fazları belirtilmiştir (64).

Çizelge 2.5. Hücre döngüsü hedefli terapötik ajanlar (64)

Ajan	Hedef	Etkilediği faz
5-Fluouracil	Timidin sentaz	S
Gemcitabine	Nükleozid analog ve ribonükleotit redüktaz	S
Methotrexate	Dihidrofolat redüktaz	S
Irinotecan	Topoizomeraz I	S
Cisplatin	DNA yıldız arası çapraz bağları	S/G2
Docetaxel	Tübülin	M
Paclitaxel	Tübülin	M
Vincristine	Tübülin	M



## 2.4. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMASI APOPTOZ VE KANSER

Canlıların yaşamları sürecinde dokularını oluşturan hücre gruplarında hem ölüm hem de çoğalma görülmektedir. Dokulardaki homeoztaziye sağlamak adına hücre ölümü ve hücre çoğalması arasındaki denge oldukça önemlidir. Hücrelerin intiharı olarak bilinen normal hücre ölümleri hücre içi ölüm mekanizması yardımıyla kontrollü bir şekilde sağlanmaktadır ve bu mekanizma **programlı hücre ölümü** olarak bilinmektedir. Hayvanlarda programlı hücre ölümleri genellikle **apoptoz** mekanizması ile sağlanmaktadır (20). Apoptoz ile dokulardaki istenmeyen veya zarar görmüş hücrelerin ölümü sağlanabilmektedir (68). Örneğin omurgalıların sinir sistemi gelişim sürecinde çeşitli nöron hücrelerinin daha sonraki süreçlerde apoptoz mekanizmasıyla ölümü gerçekleşmektedir. Yine bazı hayvanların ve insanların gelişim sürecinde ellerinde parmakların oluşması bir grup hücrenin apoptoz yardımıyla ölümünün sağlanmasıyla gerçekleşmektedir (18).

Apoptoz sırasında hücrede temel olarak üç biyokimyasal değişiklik meydana gelmektedir (69);

1. Kaspazların aktivasyonu
2. DNA ve protein yıkılması
3. Hücre zarının değişmesi ve fagositik hücreler tarafından tanınma.

Kaspazların aktivasyonu ile hücre içerisinde hayati önem taşıyan proteinlerin yıkılması ve hücre iskeletinin bozulması sağlanmaktadır. Ayrıca aktif kaspazlar DNaz'ları aktifleştirerek çekirdek içi DNA yapısının bozulmasını sağlamaktadır. Hücre zarı iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS)'lerin hücre zarının dış yüzeyine dönmesiyle apoptotik hücrelerin makrofajlar tarafından tanınmasını sağlamaktadır (69).

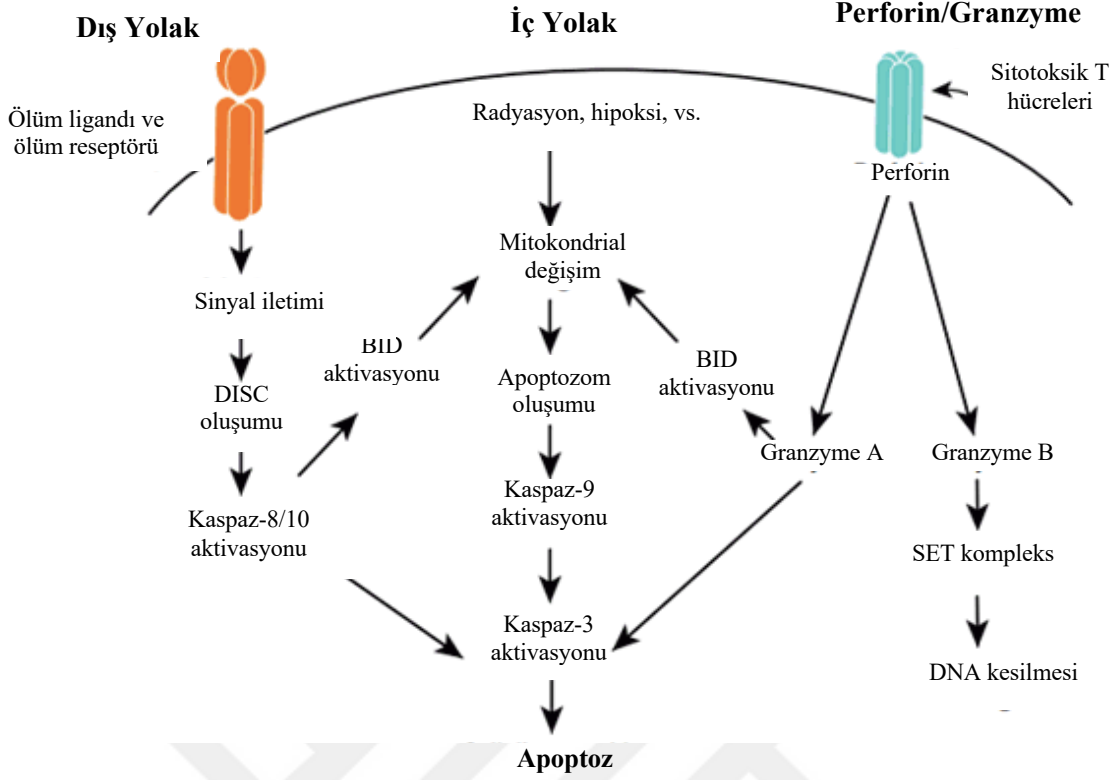
Kaspazlar hem apoptozun uyarılmasında hem de apoptozun gerçekleşmesinde görev alarak apoptoz mekanizmasının temelini oluşturmaktadırlar. Kaspazlar temelde dış, iç ve perforin/granzyme yolağı olmak üzere üç farklı mekanizma üzerinden aktifleştirilmektedir (Şekil 2.10.) (70);

- Dış yolak hücre zarın üzerinde bulunan ölüm reseptörlerine ligandların bağlanmasıyla aktifleştirilmektedir. Ölüm reseptörleri genellikle tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper ailesi üyeleridir. TNF reseptör ailesi üyeleri

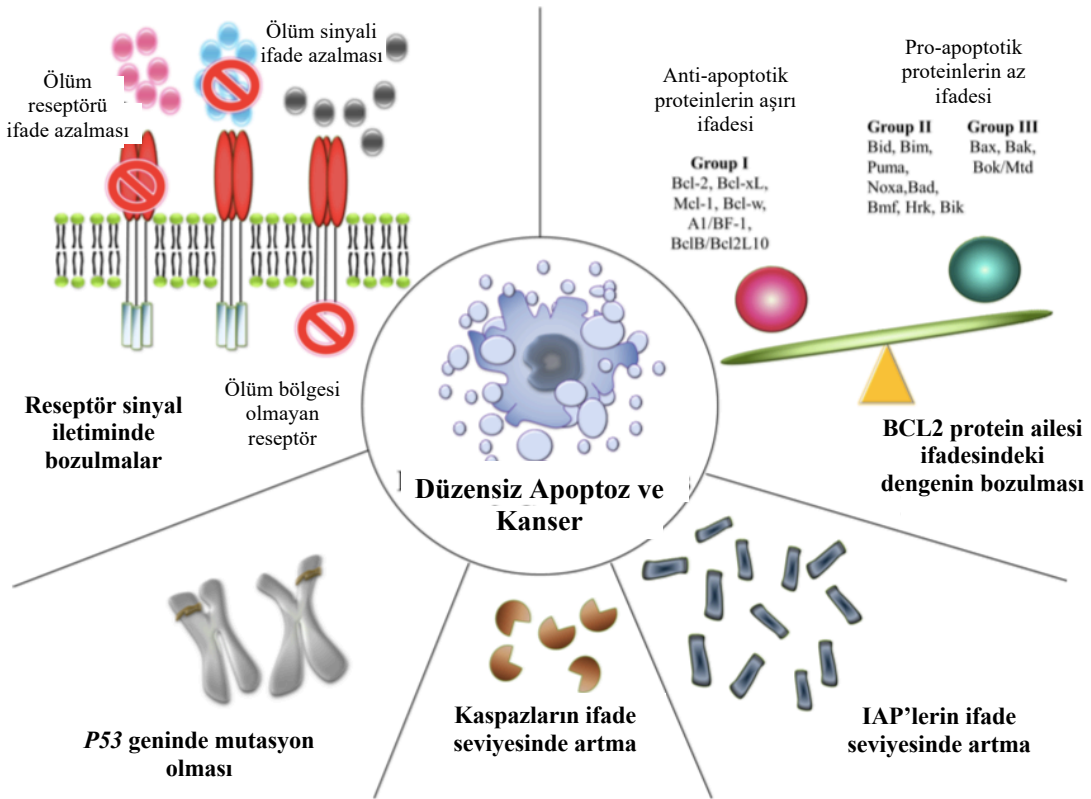
genellikle hücre zarının dışındaki sistein amino asiti zengin bölge ve hücre içinin zarında bulunan ölüm bölgesi olarak adlandırılan iki ayrı bölgeye sahiptirler. Ölüm bölgesi olarak adlandırılan kısmın aktifleşmesiyle hücre içerisinde bir dizi sinyal iletimi gerçekleşmekte ve böylece kaspaz enzimleri aktifleştirilmektedir.

- İç yolağın aktifleştirilmesi ise hücrenin radyasyon, toksinlere, serbest radikallere maruz kalması veya hücrede hipoksi durumunun oluşması sebebiyle gerçekleşmektedir. Ayrıca belli büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin olmaması da iç yolağın aktifleşmesiyle hücrenin apoptoza girmesine neden olmaktadır. İç yolağın aktifleşmesi sonucunda mitokondrinin iç zarında değişime neden olmakta ve zar geçirgen bir hale gelmektedir. Geçirgenleşen zardan mitokondri içerisinde bulunan sitokrom C ve serin proteinaz molekülleri sitoplamaya geçmektedir. Bu proteinler de böylece kaspaz bağımlı mitokondrial yolağı aktifleştirerek apoptoz indüklemektedir. Mitokondrial yolağın BCL-2 protein ailesi üyeleri ile düzenlenmektedir. Hücrede BCL-2, BCL-x, BAG gibi proteinler anti-apoptotik özellik gösterirken BCL-10, BAX, BAK gibi proteinlerde pro-apoptotik özelliktedirler.
- Sitotoksik T hücreleri enfekte olmuş hücrelerin zarlarında perforin denilen bir porun oluşmasına neden olup hücre içerisine granzyme A ve B'nin girmesini sağlarlar. Bu enzimler hücre içerisinde kaspaz aktivasyonuna ya da SET kompleksinin aktifleştirilmesiyle DNA'nın kesilmesine neden olurlar.

1970 yılında Kerr ve ark. yaptığı çalışmada apoptoz ve potansiyel malignant hücreler arasında bir bağlantı olduğunu ortaya çıkarmışlardır (71). Apoptozun baskılanması ve apoptoza karşı oluşan direnç karsinogenez oluşumunda oldukça etkilidir ve hücreler bu iki mekanizmayı çeşitli yollar üzerinden gerçekleştirmektedirler. Kansersiz hücrelerin apoptozdan kurtulması anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki dengenin bozulması, kaspaz fonksiyonlarının baskılanması ve ölüm reseptör sinyallerinde meydana gelen bozulmalar, apoptoz inhibitörü proteinlerinin (IAPs) ifadesinin artırılması ve *p53* geninde meydana gelen mutasyonlar olmak üzere beş mekanizma ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.11.) (69).



Şekil 2.10. Apoptozun aktifleştirilmesinde görevli üç temel yolak (70)



Şekil 2.11. Kanserli hücrelerin apoptozdan kaçmasına neden olan beş mekanizma (69)

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

miRNA'ların keşfiyle beraber hücre içerisinde post-transkripsiyonel regülasyonda görev aldıkları ve genlerin ifade seviyelerinde değişikliklere neden olabildikleri anlaşılmıştır (72). Organizmalardaki miRNA'ların bu önemli görevi sebebiyle çeşitli çalışmalar yapılarak miRNA'ların kanser ile olan ilişkisi ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Birçok çalışma miRNA'ların koloraktal, akciğer, meme, karaciğer kanseri ve lösemi gibi çeşitli insan kanser türlerinde tümör baskılayıcı ve onkojenik olarak görev aldığını göstermiştir (73). Yapılan çalışmalar miRNA profillemesinin kanserli hastaların tanı ve prognozu için kritik olduğunu ortaya koymuş ve bazı miRNA'ların ise kanserde teşhis ve prognostik biyobelirteçler veya terapötik hedefler olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (73). miRNA'ların kanserin tanısında, prognozunda, gelişiminde ve tedavisinde bu denli öneme sahip olması miRNA'ları bilim dünyasında önemli bir konuma getirmiştir. miRNA'ların kanser tedavisindeki potansiyel rolünün daha iyi anlaşılması için daha fazla çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Yapılan ön çalışmalarda liken sekonder metaboliti olan Usnik asit histolojik olarak 3 farklı meme kanseri hücre hatlarına üzerine uygulaması sonucu mikroRNA ifadelerinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir. BT-474 meme kanseri hücre hattında miR-185-5p'nin ifade seviyesindeki değişim qRT-PCR yöntemiyle doğrulanmış ve böylece BT-474 hücreinde miR-185-5p'nin etkinliği belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında, miR-185-5p'nin BT-474 hücresi üzerindeki anti-proliferatif etkisi belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca yapılan çalışmada miR-185-5p'nin meme kanserinde tümör baskılayıcı özelliğe sahip olduğu ve kanser tedavisinde apoptoz yolağını indükleyerek tümör oluşumunu baskılaya bileceği ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Böylece meme kanseri tedavisinde etkili yeni bir aday molekülün olabileceği belirlenmeye çalışılmıştır.

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. MATERYAL

#### 4.1.1. HÜCRE HATLARI

Tez Kapsamında kullanılan meme kanseri ve normal meme hücre hatları ATCC'den temin edilmiştir. Hücrelerin tipleri, nereden temin edildikleri ve kültür ortamı içerikleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücre hatları ve özellikleri

Pasaj no	Hücre hattı	Hücre tipi	Kullanılan hücre katalog numaraları	Ortam içeriği
12	BT-474	Meme kanseri	Kat. No: HTB-20™	DMEM High Glucose +%10 FBS + % 1 Penisilin/Streptomisin
12	MCF-12A	Normal meme hücresi	Kat. No. CRL-10782™	DMEM Ham's F12 +% 10 FBS + % 1+ 10 µg/ml insulin+ 20 ng/ml EGF+ 0.5 mg/ml Hidrokortizon

#### 4.1.2. KULLANILAN KİMYASALLAR

Kullanılan başlıca kimyasallar; DMEM (Gibco), DMEM Ham's F12 (Gibco), Fetal Bovine Serum (Sigma), Penisilin/Streptomisin (Biowest), İnsülin (Humulin), Hidrokortizon (Pubchem), Epidermal Büyüme Faktörü (Goquick), PBS (Gibco), Tripsin-EDTA (Sigma), DMSO (Sigma), MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) (Sigma, MF6004), TRizol (Genozol, XN19001), Üre (Biorad), Proteaz inhibitör (Biorad), kloroform (MERCK, K02545831341), izopropanol (EMSURE, K44834034334), etanol (MERCK, K38999227830), 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, % 40 akrilamid-bisakrilamid (Biorad), % 10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (Biorad), ultra saf su, % 10 APS (Amonyum Persulfat) (Biorad), TEMED (Biorad), BSA (Biorad), Bradford Solüsyonu (Biorad), TBST, Antikor (Cell Signaling), miRNA-185-5p mimik (mimic), miRNA-185-5p negatif kontrol (scramble) (Qiagen), miRNA-185-5p mimik primer (Qiagen), Transfeksiyon Çözeltisi (Qiagen), BCL2 (NM\_000657) Human 3'UTR Clone (Origene, CAT#: SC200550), Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.1.3. KULLANILAN KİTLER

- Dual Luciferase Kit (Promega)
- Human Apoptosis Assay Primer (Real Time Primers, Biorad)
- cDNA Sentez Kit (EURx)
- Annexin V-FITC, (İnvitrogen, Lot#1597071)
- PI/RNase Staining Buffer, (BD Pharmingen, Lot#550825)
- Chemiluminescence Kit (Thermo Fisher Scientific)

#### 4.1.4. KULLANILAN SARF MALZEMELER

Kullanılan başlıca sarf malzemeler;

- 25 ve 75 cm<sup>2</sup> hücre kültürü flask
- Cryo.S kriyovial tüp
- 2 ve 1.5 ml steril PCR tüp
- 15 ml ve 50 ml steril falkon
- Pipet uçları; Dnase-Rnase free, steril, filtreli 10 µl, 100 µl, 1000 µl (BioPointe Scientific® Kat.no:321-4050A)
- Steril serolojik pipetler; 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml (JET BİOFİL, Lot No: 090415-071)
- 96 kuyucuklu düz tabanlı steril plaka (SARSTEDT, Lot:5025111)
- 6 kuyucuklu düz tabanlı steril plaka (SARSTEDT, Lot:5024611)
- 384 kuyucuklu plate (ROCHE, Lot:13019801).
- PVDF Membran
- Western blot için poşet
- Parafilm
- 100 ml, 500 ml ve 1000 ml cam şişe
- Eldiven

#### 4.1.5. KULLANILAN CİHAZLAR

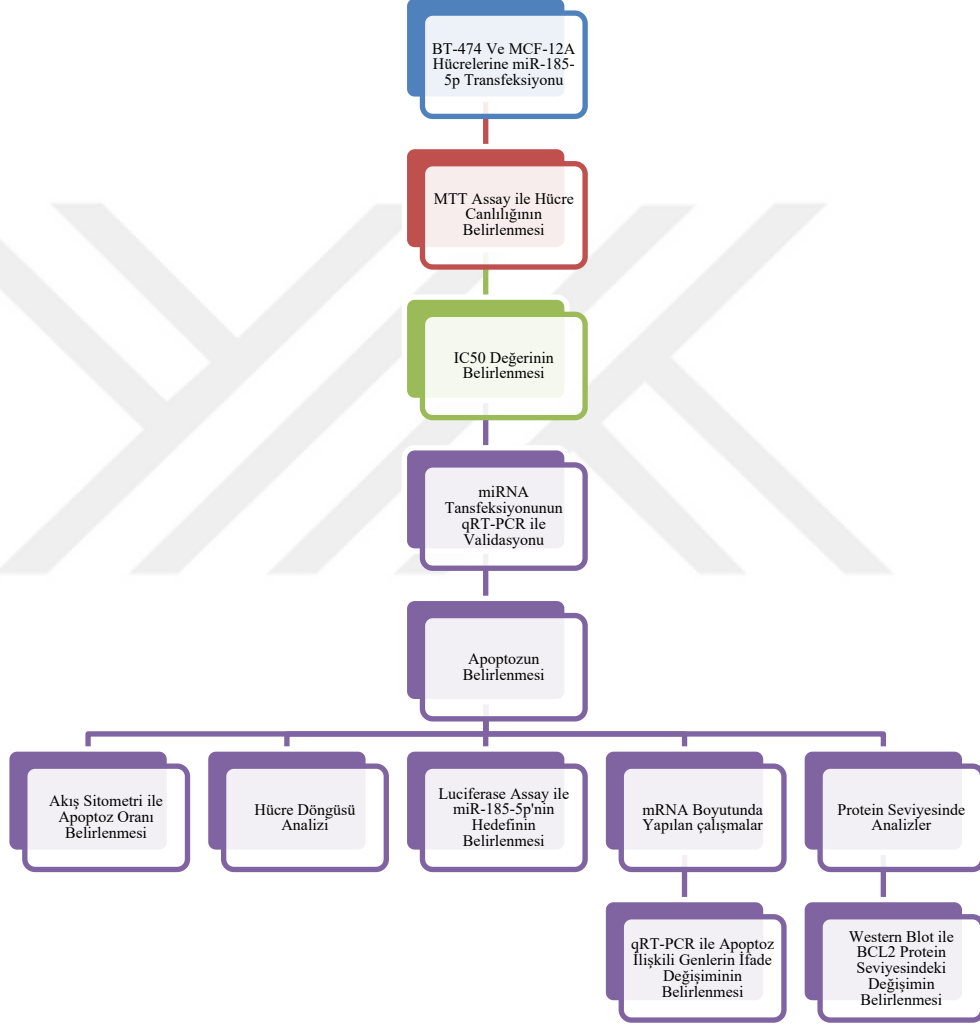
Kullanılan cihazlar Çizelge 4.2.'de markaları ile birlikte belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. Kullanılan cihazlar ve markaları

<b>Cihaz Adı</b>	<b>Markası</b>
CO <sub>2</sub> İnkübatör	Sanyo CO <sub>2</sub> Incubator
Elektroforez tankı	Thermo Fisher Scientific
ELIZA okuyucu	PerkinElmer 1420 Multilabel Counter
Görüntüleme sistemi	Syngene Gene Genius Bio Imaging
Güç kaynağı	Thermo Scientific
Kırık buz makinası	Scotsman
Laminar flow kabin	Holten LaminAir Model 1,8
Mikroskop	Leica DCF290
Nanodrop	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer
Otomatik pipetler 10µl, 20µl, 200 µl, 100µl, 1000µl	Gilson
Real Time PCR	Roche Light Cycler 480
Saf su cihazı	Millipore Synergy, 185
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Rotina 35R
Shaker	Finepcr Orbital Shaker SH30
Sıvı azot tankı	STATEBOURNE cryogenics
Spin santrifüj	BioSan
Su banyosu	Lab-Line Aquabath
Terazi	Shimadzu AX200
Western Blot görüntüleme cihazı	Odyssey CLx
Akış sitometrisi	BD Accuri C6 Plus

## 4.2. YÖNTEM

Gerçekleştirilen tez kapsamında, BT-474 meme kanseri ve MCF-12A normal meme hücrelerinde miR-185-5p'in hücre çoğalması üzerine etkisi, MTT'ye dayalı analiz sonucunda belirlenen etkin dozun transfeksiyonu ile miR-185-5p'nin meme kanseri ve normal meme hücresinde apoptoz yolağı üzerine etkisi moleküler boyutta araştırılmıştır. Tez içeriğinde gerçekleştirilen Deneysel Yöntemler Şeması Şekil 4.1.'de belirtilmiştir.



Şekil 4.1. Deneysel Yöntemler Şeması



## 4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

### 4.2.1.1. Hücrelerin Büyüme Koşulları

BT-474 ve MCF-12A hücre hatları için farklı içeriklerde besiyerleri hazırlanmış ve bu hücreler 37 °C % 5 CO<sub>2</sub> ortamında büyütülmüştür. Tüm hücre kültürü çalışmaları steril güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir.

BT-474 hücre hattı için hazırlanan besiyeri içeriği;

- DMEM yüksek glikoz içerikli besiyeri
- % 10 Fetal Bovine Serum
- % 1 Penisilin/Streptomisin

MCF-12A hücre hattı için hazırlanan besiyeri içeriği;

- DMEM Ham's F12
- % 10 Fetal Bovine Serum
- % 1 Penisilin/Streptomisin
- 10 µg/ml İnsülin, 20 ng/ml EGF, 0.5 mg/ml Hidrokortizon

### 4.2.1.2. Hücre Açma ve Hücrelerin Devamlılığının Sağlanması

1. Sıvı azot içerisinde muhafaza edilen donmuş olan hücrelerin aşamalı olarak çözünmesi sağlanmıştır. Sıvı azot tankından alınan hücreler ilk olarak buzun içerisinde alınmış ve daha sonra hücrelerin 37 °C su banyosunda tamamen çözünmesi sağlanmıştır.
2. Laminar kabin içerisinde alınan hücreler 15 ml'lik falkon içerisinde bulunan 5 ml besiyeri içerisine aktarılmıştır.
3. 1500 rpm'de 5 dakika olmak üzere santrifüj edilen hücrelerin pellet halinde çökmesi sağlanmıştır.
4. Süpernatant kısım atılmış ve pellet halindeki hücreler 5 ml taze besiyerinde çözülmüştür.
5. 5 ml besiyeri içerisinde çözünen hücreler 25 cm<sup>2</sup> filtrelili flaska aktarılmıştır.
6. Flask 37 °C, % 5 CO<sub>2</sub>'li ortama sahip inkübatörde büyümeye bırakılmıştır.

7. Hücrelerin kültür ortamı, morfolojileri ve canlılıkları her gün mikroskop altında incelenmiştir. Uygun ve steril ortam koşullarını sağlamak amacıyla besiyeri içeriği her iki günde bir değiştirilmiştir.

#### **4.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması**

1. % 80-90 oranında doygunluğa ulaşmış hücreler inkübatörden alınarak steril laminar kabin içerisine alınmıştır.
2. Serelojik pipet kullanılarak flask içerisinde bulunan besiyeri çekilip atılmıştır.
3. Flaskın yüzeyine yapışmış olan canlı hücrelere zarar vermeden hücreler 2 ml Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) ile yıkanmış ve PBS flask içerisinde çok bekletilmeden çekilip atılmıştır.
4. Flask yüzeyine yapışmış hücreleri hareket ettirmek amacıyla flask içerisine 1 ml Tripsin-EDTA eklenmiş ve flask 3-4 dakika boyunca inkübatörde inkübe edilmiştir.
5. İnkübatörden çıkarılan hücreler ters mikroskop altında incelenerek hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edilmiştir.
6. Tüm hücrelerin Tripsin içerisinde yüzdüğü anlaşıldıktan sonra flaska 3 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapılmış ve hücreler 15 ml'lik falkona alınmıştır.
7. Tripsini uzaklaştırmak için falkon 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
8. Süpernatant kısım atıldıktan sonra pellet halinde çöken hücreler 5 ml besiyerinde çözülmüş ve iki ayrı 25 cm<sup>2</sup> flask içerisine eşit miktarda paylaştırılmıştır.
9. Her bir flaska 2.5 ml besiyeri eklendikten sonra hücrelere hafifçe pipetaj yapılmış ve sonrasında flasklar 37 °C, % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre alınmıştır.

#### **4.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması**

1. % 80-90 oranında doygunluğa ulaşmış hücreler inkübatörden alınarak steril laminar kabin içerisine alınmıştır.
2. Serelojik pipet ile besiyeri çekilip atıldıktan sonra hücreler 2 ml PBS ile yıkanmıştır.
3. 1 ml Tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin hareket etmesi sağlandıktan sonra hücrelere 3 ml besiyeri eklenmiş ve hücreler 15 ml'lik falkon içerisine alınmıştır.
4. Falkon 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek Tripsinin ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır.

5. Pellet halindeki hücreler % 10 DMSO ve % 90 FBS içeren dondurma medyumu içerisinde pipetaj yapılarak çözülmüştür. Dondurma medyumu içerisindeki hücreler krovial tüpe aktarılmıştır.
6. Hücre dondurma süreci hücrelerin ilk önce 1 saat -20 °C’de daha sonra 24 saat -80 °C’de bekletilmesi ve son olarak azot tankına kaldırılmasıyla aşamalı olarak tamamlanmıştır.

#### 4.2.2. HÜCRELERE MİR-185-5P TRANSFEKSİYONU

BT-474 ve MCF-12A hücreleri MTT canlılık testi için 96 kuyulu plakalara ekilip miR-185-5p transfeksiyonu yapılırken, deneysel aşamalar için ise 6 kuyulu plaklara ekilen hücrelere miR-185-5p transfeksiyonu yapılmıştır. Çizelge 4.3.’de 96 kuyulu plakaya ekilen hücrelere transfekte edilen miR-185-5p konsantrasyonları, diğer solüsyon miktarları ve ekilen hücre sayısı belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. miRNA transfeksiyonu

	<b>10 nM miRNA</b>	<b>15 nM miRNA</b>	<b>25 nM miRNA</b>	<b>50 nM miRNA</b>	<b>75 nM miRNA</b>	<b>100 nM miRNA</b>
<b>miRNA Mimik</b>	0,1 µl	0,15 µl	0,25 µl	0,5 µl	0,75 µl	1 µl
<b>Transfeksiyon Çözültisi</b>	0,75 µl	0,75 µl	0,75 µl	0,75 µl	0,75 µl	0,75 µl
<b>Besiyeri</b>	24,25 µl	24,25 µl	24,25 µl	24,25 µl	24,25 µl	24,25 µl
<b>Hücre Sayısı</b>	175 µl besiyeri içinde 1x10 <sup>5</sup> hücre	175 µl besiyeri içinde 1x10 <sup>5</sup> hücre	175 µl besiyeri içinde 1x10 <sup>5</sup> hücre	175 µl besiyeri içinde 1x10 <sup>5</sup> hücre	175 µl besiyeri içinde 1x10 <sup>5</sup> hücre	175 µl besiyeri içinde 1x10 <sup>5</sup> hücre

miR-185-5p’nin negatif kontrolü olarak hücrelere negatif kontrol (scramble) transfeksiyonu da yapılmıştır. Negatif kontrol (scramble) transfeksiyon protokolü Çizelge 4.3.’deki gibi olup miR-185-5p yerine hücrelere scramble transfeksiyonu yapılmıştır. Transfeksiyon aşamasından sonra plakalar 48 saat süre ile inkübatörde bekletilmiştir. Deney miRNA mimik, negatif kontrol (scramble) transfeksiyonu ve kontrol besiyeri olacak şekilde 3 grupta ve her bir grup için 3 tekrar ile tamamlanmıştır.

Deneysel aşamalar için ise;

1. 6 kuyulu plakalara ekilen hücelere transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir:
2. Her bir kuyuya 2ml besiyeri içerisinde 350.000 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirilmiştir.
3. Hücre ekiminden 24 saat sonra kuyulardaki besiyeri serelojik pipet ile çekilip atılmıştır.
4. Hücreler 1 ml PBS ile yıkanmıştır.
5. Kuyulara 1 ml taze besiyeri eklenmiştir.
6. MTT testi ile belirlenen miR-185-5p'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda (25 nM) hücelere transfeksiyon yapılmıştır;
  - miR-185-5p transfeksiyonu yapılmış (3 tekrar)
  - Scramble transfeksiyonu yapılmış (3 tekrar)
  - Hücelere ise herhangi bir transfeksiyon işlemi (3 tekrar) yapılmamıştır.
7. Daha önceden 15 ml falkon içerisine her bir kuyu için 400 µl FBS'siz DMEM içerisine 12 µl transfeksiyon solüsyonu ve 3 µl miR-185-5p mimik eklenmiştir. Hazırlanan bu solüsyon kuyulara damla damla ve yavaşça eklenerek transfeksiyon işlemi tamamlanmıştır. (Scramble transfeksiyonu için ise her bir solüsyonun miktarı aynı olacak şekilde sadece miRNA yerine scramble eklenerek solüsyon hazırlanmıştır.)
8. 6 kuyulu plakalar 48 saatlik transfeksiyon aşaması için 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre alınmıştır. Bu süreçte hücreler ters mikroskop altında kontrol edilmiş ve gerekli görüldüğü takdirde besiyeri değişimi yapılmıştır.

#### **4.2.3. MTT HÜCRE CANLILIK TESTİ**

Bölüm 4.2.2.'de belirtildiği üzere, 96 kuyulu plakalara ekilip transfeksiyon işlemi yapılmış hücelere MTT hücre canlılık testi yapılmıştır. Transfeksiyon işlemi 24, 48 ve 72 saat olacak şekilde farklı sürelerde tamamlanmıştır. En optimal sonuç 48 saat süre ile yapılan transfeksiyon işlemi sonucunda elde edilmiştir. Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra plakalar inkübatörden alınarak laminar kabin içerisine alınmıştır. Kuyulardaki besiyerleri 1 ml'lik pipet ile çekilip atılmış ardından 1 ml PBS içerisinde 5 mg 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide çözülerek hazırlanan solüsyondan her bir kuyuya 50 µl eklenmiştir. Plakalar 4 saatlik bir inkübasyon için etüve alınmıştır ve 4 saatin sonunda plakalardaki 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide boyası çekilip

atılmıştır. Daha sonra her bir kuyuya 100 µl izopropanol eklenmiştir. İzopropanol ile 10 dk çalkalayıcıda bekletilen hücrelerin ELISA okuyucuda 570 nm’de ölçümü alınmıştır. 3 tekrarlı olacak şekilde yapılan deney sonuçları student t-test yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir.

#### 4.2.4. AKIŞ SİTOMETRİSİ İLE APOPTOZ ORANI BELİRLENMESİ

BT-474 ve MCF-12A hücrelerindeki apoptoz oranı ölçümü için Membrane Permeability/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen) kullanılmıştır. Kit içeriğinin hücrelere uygulaması sonucunda ise ölçümler akış sitometrisi cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerde miR-185-5p transfeksiyonu sonrası oluşan apoptoz oranı belirlenmesi sırasında aşağıda belirtilen aşamalar takip edilmiştir;

1. 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyucuğa  $5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bölüm 4.2.2.’de bahsedildiği şekilde gerçekleştirilen transfeksiyon işleminin ardından hücreler 48 saat süre ile inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.
2. 48 saat sonunda hücre besiyeri çekilip atılmış ve hücreler 500 µl PBS ile yıkanmıştır.
3. Her bir kuyuya 200 µl Tripsin-EDTA eklenmiş ve hücrelerin plakanın yüzeyinden kalkmasını sağlamak amacıyla hücreler en fazla 5 dk süre ile inkübatörde beklemeye alınmıştır.
4. Hücrelerin flaskın tabanından ayrıldığı mikroskopta gözlemlendikten sonra kuyulara 3 ml besiyeri eklenerek hücreler 15ml’lik falkona alınmıştır.
5. Örnek başına  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hücreler sayılmış ve sayılan hücreler ayrı falkona alınmıştır.
6. Falkon  $+4^{\circ}\text{C}$ ’de 1800 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Üstte kalan süpernatant boşaltılmış ve üzerine yaklaşık 5 ml soğuk PBS eklenmiştir.
8. Yıkama işlemi 5 ml soğuk PBS ile tekrar  $+4^{\circ}\text{C}$ ’de 1800 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek tekrarlanmıştır.
9. Tekrar üst sıvı boşaltılmış ve hücreler 1 ml soğuk PBS ile süspanse edilmiştir.
10. Her hazırlanan 1 ml örneğin içine 1 µl YO-PRO ve 1 µl PI ilave edilmiştir.
11. Hazırlanan örnekler 30 dk buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır.
12. Son olarak örnekler akış sitometri ile analizi yapılmıştır.

13. Apoptoz oranı belirlenmesi deneyi 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar student-t test kullanılarak analiz edilmiştir.

#### 4.2.5. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ

BT-474 meme kanser hücrelerinin miR-185-5p transfeksiyonu sonrasında hücre döngüsünde meydana gelen değişim hücre döngüsü analiz kiti (BD Pharmingen) kullanılarak belirlenmiştir. Hücre döngüsü analizi belirlenirken aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

1. 6 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa  $5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde BT-474 meme kanser hücre ekimi yapılmıştır. Hücrelere miR-185-5p transfeksiyonu yapılmış ve hücreler 48 saat inkübatörde uygun koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.
2. 48 saatin ardından kuyulardaki besiyeri çekilip atılmış ve hücreler 500  $\mu$ l PBS ile yıkanmıştır.
3. Kuyulara 200  $\mu$ l Tripsin eklenerek hücrelerin kalkması sağlanmıştır.
4. Kuyulara 3 ml besiyeri eklenmiş ve sonra hücreler 15 ml'lik falkona alınmıştır.
5. Örnek başına  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hücreler sayılmış ve sayılan hücreler ayrı falkona alınmıştır.
6. Falkonlar  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Üstte kalan süpernatant boşaltılmış ve üzerine yaklaşık 5 ml soğuk PBS eklenmiştir.
8. Hücreler 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
9. 5 ml soğuk %70'lik etanol hücrelere yavaş yavaş eklenmiştir. Hücreler bu aşamada  $-20^{\circ}\text{C}$  de en az 2 saat bekletilmiştir.
10. Etanolü uzaklaştırmak için hücreler iki sefer 1X PBS ile yıkanmıştır. Yıkama aşamasında hücreler 5 dk 10000'rpm de santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüj ile hücrelerin dibe çökmesi sağlanmış ve sonrasında süpernatant kısım atılmıştır.
12. Boyama aşamasında her 500  $\mu$ l PI içinde  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hücreler süspanse edilmiştir.
13. Süspanse edilen hücreler 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
14. Daha sonra tüpler  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ışıktan korunmuş ve analizi akış sitometri cihazı ile sağlanmıştır.

15. Hücre döngüsü analiz deneyi 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar student-t test kullanılarak analiz edilmiştir.

#### 4.2.6. HÜCRELERDEN RNA İZOLASYONU

Bölüm 4.2.2.'de belirtildiği üzere 6 kuyulu plakalara ekilen hücrelerin tüm deney gruplarından RNA izolasyonu aşağıda belirtilen yönteme göre yapılmıştır.

1. Hücrelere miR-185-5p mimik transfeksiyonu sonrasında 6 kuyulu plakalar inkübatörden alınarak laminar kabine alınmıştır.
2. Kuyulardaki besiyerleri çekilip atılmıştır.
3. Her bir kuyuya 1 ml Genozol eklenerek hücrelerin plaka yüzeyinden kaldırılması sağlanmış ve her bir kuyudan alınan Genozol içerisindeki hücreler ayrı ayrı 2 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
4. Tüplere 200 µl kloroform eklenmiş ve tüpler hafifçe çalkalanmıştır.
5. 10 dakika oda sıcaklığında bekletilen tüpler daha sonra +4 °C'de 12000 rcf'de 30 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonunda tüplerde 3 farklı faz oluşmuş ve en üst şeffaf fazda RNA olacağından bu faz 1000 µl pipet ile çekilip yeni bir ependorf tüpe aktarılmıştır.
7. Tüplere 500 µl izopropanol eklenmiş ve tüpler 1 dk boyunca hafifçe aşağı yukarı çalkalanmış ve ardından bu tüpler 10 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
8. 10 dk sonra tüplerin +4 °C'de 12000 rcf'de 10 dk santrifüj edilmesiyle RNA'ların pellet olarak tüplerin dibine çökmesi sağlanmıştır. RNA'ların pellet olarak dibe çökmesi sebebiyle süpernatant kısım çekilip atılmıştır.
9. Tüplere 1 ml %75'lik etanol eklenerek pelletler etanol içerisinde çözülmüştür.
10. Tüpler yine +4 °C'de 12000 rcf'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
11. Tüplerin dibindeki pelletlere dikkat edilerek tüplerdeki etanol uzaklaştırılmıştır.
12. Tüpler kapağı açık bir şekilde temiz bir zemin üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Böylece tüplerdeki kalan alkolün uçması sağlandıktan sonra pelletler 35-40 µl RNase serbest suda çözülerek elde edilen RNA'lar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### 4.2.7. CDNA SENTEZİ

cDNA sentezi için EURx cDNA sentez kiti kullanılmıştır. cDNA sentezi için her bir örnekteki RNA miktarı 1000 ng olacak şekilde ayarlanmıştır. RNase içermeyen tüplere eklenen solüsyon miktarları Çizelge 4.4.'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. cDNA sentez solüsyonları

Kimyasal	Miktarı
5X NG cDNA buffer	2 µl
Oligo(dT) Primer	0.5 µl
RNA (1000 ng)	X µl
NG dART RT mix	0.5 µl
RNase-free su	10 µl'ye tamamlandı.

Tüplere Çizelge 4.4.'de belirtilen çözeltiler eklendikten sonra daha önceden 50 °C 45 dk'ya ayarlanmış PCR cihazına örnekler koyulmuştur. 45 dk'lık bu reaksiyondan sonra örnekler 85 °C'de 5 dk daha inkübe edildikten sonra örnekler -20 °C'ye kaldırılmıştır.

#### 4.2.8. TRANSFEKSİYON İŞLEMİNİN DOĞRULANMASI

Bu aşamada izole edilen RNA'lardan bölüm 4.2.5.'de belirtildiği gibi tekrar cDNA sentezi yapıldı. Daha sonra elde edilen cDNA ile miR-185-5p spesifik primer (5'UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA'3) kullanılarak qRT-PCR reaksiyonu ile transfeksiyon işleminin gerçekleşmesine dayalı doğrulama işlemi gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR reaksiyon koşulları Çizelge 4.5.'de belirtilmiştir. qRT-PCR normalizasyonu için housekeeping gen olarak RNU-6 kullanılmıştır.

Çizelge 4.5. qRT-PCR reaksiyon koşulları

Döngü Basamağı	Sıcaklık	Zaman	Döngü Miktarı
Başlangıç Aktivasyonu	95 °C	15 dakika	1



Denatürasyon	94 °C	15 saniye	40
Yapışma	55 °C	30 saniye	
Uzama	70 °C	30 saniye	

#### 4.2.9. APOPTOZ YOLAĞINA AİT GENLERİN GEN İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Bu aşamada 88 adet apoptoz ilişkili gen, 8 adet de housekeeping gen olmak üzere 96 farklı primer bulunan Human Apoptosis Primer Library paneli kullanılmıştır. İlk olarak ana stok oluşturmak için paneldeki her bir kuyuya 40 µl dH<sub>2</sub>O eklenerek primer konsantrasyonunun 10 µM olması sağlanmış ve bu ana stok -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılacak ara stok primer panelini hazırlamak için ise 96 kuyulu plakadaki her bir kuyuya 90 µl dH<sub>2</sub>O eklenmiş ve 90 µl su içeren her bir kuyuya ana stok panelinden 10'ar µl primer çekilerek eklenmiştir. Böylece toplamda her bir kuyuda 100 µl son hacim olması sağlanmıştır. Apoptoz Array qRT-PCR çalışma paneli hazırlamak için ise yine 96 kuyulu bir plaka alınmış ve her bir kuyuya 9 µl karışım (2 µl SYBR green, x µl 500 ng cDNA ve 9 µl'ye tamamlanacak şekilde dH<sub>2</sub>O) ve ara stok primer panelinden her bir primer için 1 µl primer alınarak qRT-PCR paneline eklenmiştir. Daha sonra qRT-PCR reaksiyonu Çizelge 4.6.'daki koşullara göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.6. Apoptoz array paneli qRT-PCR koşulları

Döngü Basamağı	Sıcaklık	Zaman	Döngü Miktarı
Başlangıç Aktivasyonu	95 °C	12 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	40
Yapışma	65 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	30 saniye	

#### 4.2.9.1. qRT-PCR Sonuçlarının İstatiksel Analizi

qRT-PCR deneyi bir grup miR-185-5p transfeksiyonlu BT-474 meme kanser hücreleri içerirken diğer grubu ise miR-185-5p transfeksiyon yapılmamış BT-474 meme kanser hücreleri oluşturmaktadır. qRT-PCR deneyi 2 grup için de 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Normalizasyon için ise *GAPDH* geni kullanılmıştır. Elde edilen her bir gen için kat değişimi aşağıda belirtilen  $\Delta\Delta Ct$  formülü kullanılarak yapılmıştır (Çizelge 4.7.,4.8.). Formülde ifadeler miR-185-5p transfeksiyonu yapılan deneysel grup: **DG**, miR-185-5p transfeksiyonu yapılmayan kontrol grup: **KG**, miR-185-5p transfeksiyonlu deneysel housekeeping grup: **DH** ve miR-185-5p transfeksiyonsuz kontrol housekeeping grup: **KH** olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 4.7. qRT-PCR analizinde  $\Delta Ct$  değeri hesaplama

Ortalama DG Ct değeri	Ortalama KG Ct değeri	Ortalama DH Ct değeri	Ortalama KH Ct değeri	Deneysel $\Delta Ct$ değeri	Kontrol $\Delta Ct$ değeri
A	B	C	D	A-D	B-C

Çizelge 4.8. qRT-PCR analizinde  $\Delta\Delta Ct$  değeri ve gen ifadesi kat değişimi hesaplama

$\Delta\Delta Ct$ değeri	Gen İfadesi Kat Değişimi
(A-D) – (B-C)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$

qRT-PCR verilerinin istatistiksel değerlendirmelerinden sonra sonuçlara ait grafiklerde gen ifadesi kat değişiminin net olarak gösterilebilmesi için 1 kat sayısına göre orantılama ile ayrıca grafik üzerinde gösterim yapılmıştır.

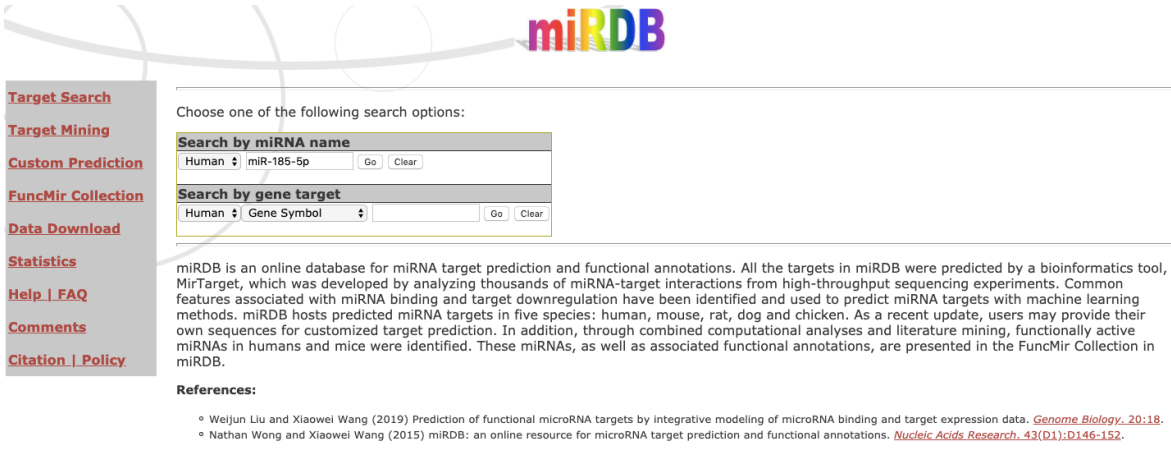
#### 4.2.10. MİR-185-5P HEDEF GEN İLİŞKİSİNİN DOĞRULANMASI

Hedef gen ilişkisinin doğrulanması için BT-474 meme kanser hücrelerinden öncelikle biyoinformatik analizler ile miRNA'nın olası hedefleri araştırılmıştır. Daha sonra hücrelerden protein izolasyonu yapılmıştır. qRT-PCR yöntemiyle belirlenen gen seviyesindeki değişimin protein düzeyinde de doğrulanması için Western blot yöntemi gerçekleştirilmiştir. Western blot yönteminde birincil antikor olarak anti-BCL2 antikorunu

kullanılırken ikincil antikor olarak HRP konjuge antikoru kullanılmıştır. Ayrıca miR-185-5p'nin 3'UTR BCL2 dizisini direk hedef aldığını göstermek amacıyla ise lusiferaz deneyi yapılmıştır.

#### 4.2.10.1. Biyoinformatik Analiz

Analizler miRDB, DIANA ve miRSystem veri tabanları olmak üzere 3 farklı biyoinformatik araç kullanılarak gerçekleştirilmiştir. miRDB analizi için <http://mirdb.org/> adresine girilmiş ve 'Search by miRNA name' kısmına miR-185-5p yazılmıştır ve 'Go' tuşuna tıklayarak miR-185-5p'nin olası hedefleri taranmıştır (Şekil 4.2.).

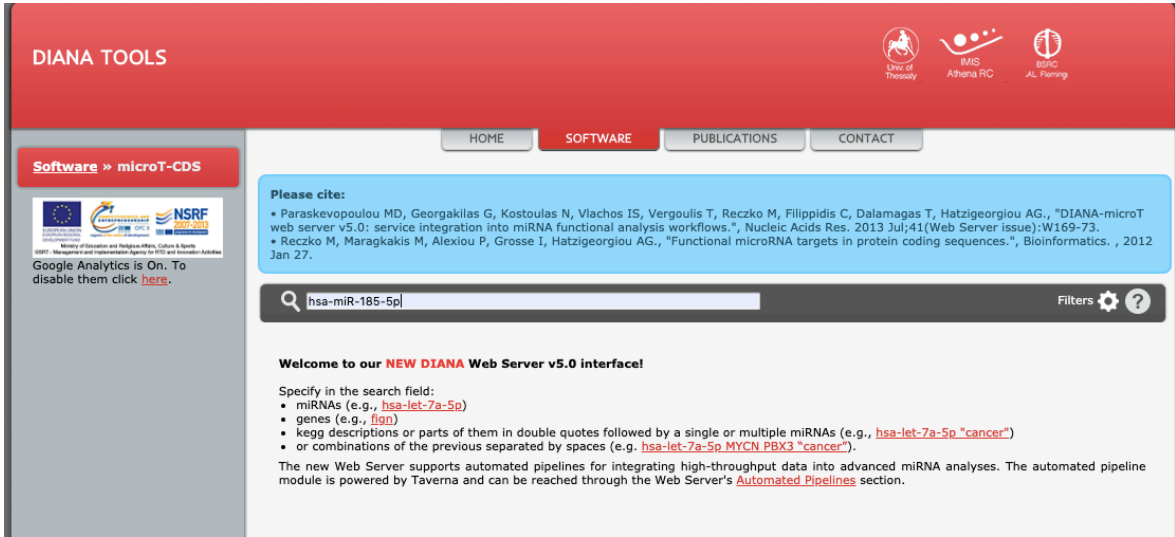


The image shows the miRDB website interface. At the top right, the miRDB logo is displayed. Below it, there is a search section with the text "Choose one of the following search options:". There are two search options: "Search by miRNA name" and "Search by gene target". The "Search by miRNA name" option is selected, and the search term "miR-185-5p" is entered in the input field. The "Search by gene target" option is also visible, with "Gene Symbol" selected in the dropdown menu. To the left of the search section, there is a sidebar menu with the following items: "Target Search", "Target Mining", "Custom Prediction", "FuncMir Collection", "Data Download", "Statistics", "Help | FAQ", "Comments", and "Citation | Policy". Below the search section, there is a paragraph of text describing miRDB as an online database for miRNA target prediction and functional annotations. At the bottom of the page, there is a "References:" section with two entries: "WeiJun Liu and Xiaowei Wang (2019) Prediction of functional microRNA targets by integrative modelling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biology*, 20:18." and "Nathan Wong and Xiaowei Wang (2015) miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Research*, 43(D1):D146-152." At the very bottom, there is a link: "Click here to contact us with questions or comments about this web site. Last modified: January 22, 2019."

Şekil 4.2. miRDB veri tabanı analiz yöntemi

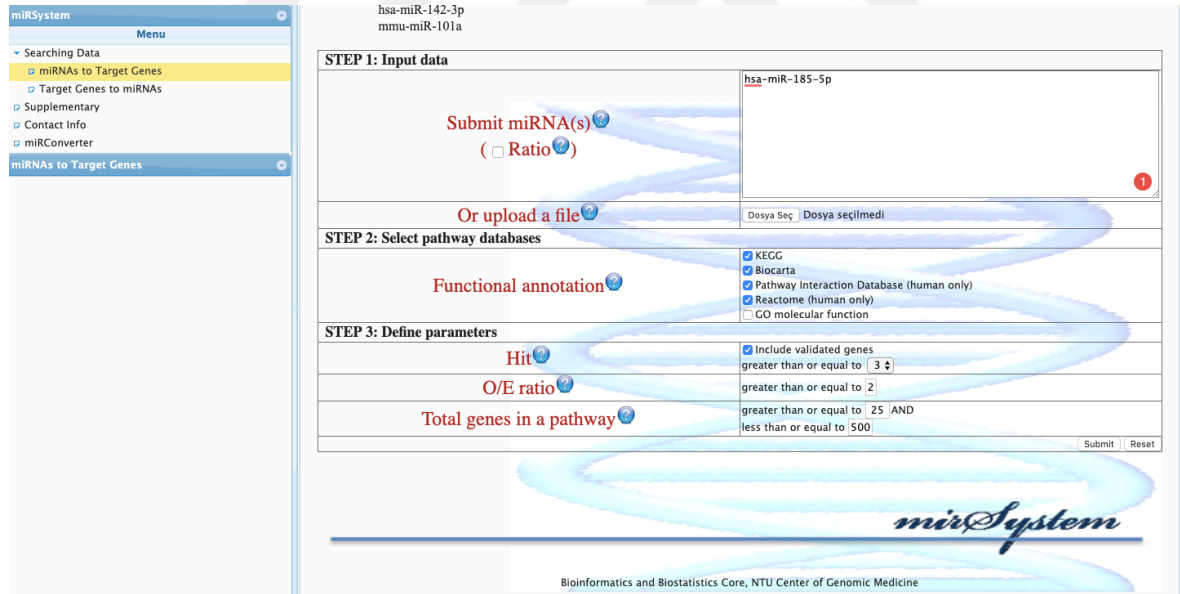
[http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT\\_CDS/index](http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index)

adresine DIANA analizi yapmak için girilmiş, arama kısmına hsa-miR-185-5p yazılmış ve Enter tuşuna tıklayarak miR-185-5p hedefi taranmaya başlanmıştır. Sonraki ekranda gelecek olan 'Threshold' kısmı 0.54'e ayarlanmıştır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. DIANA veri tabanı analiz yöntemi

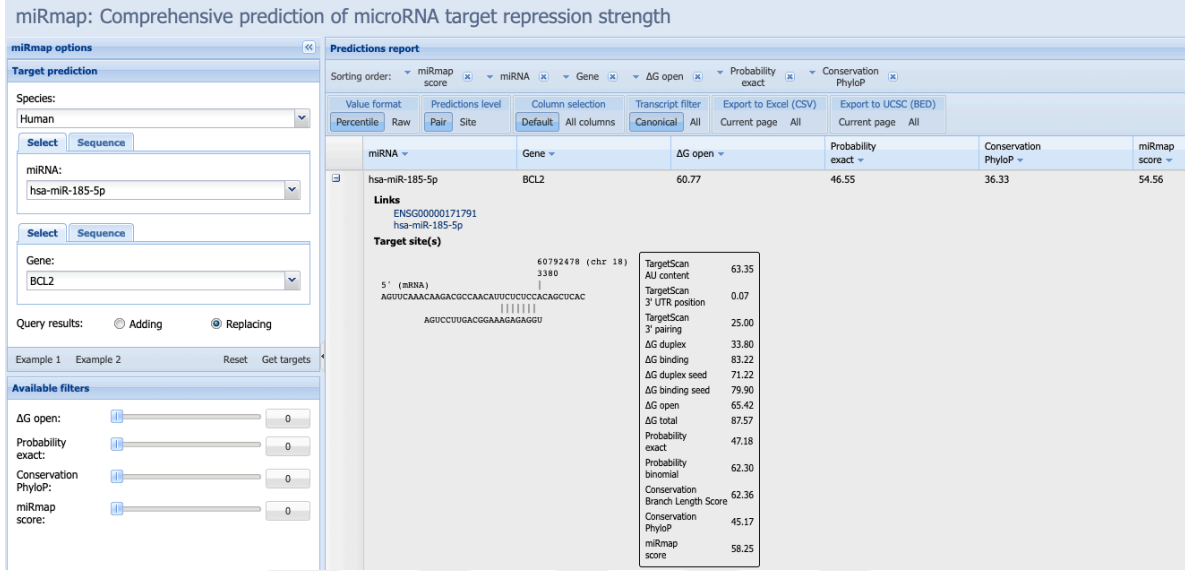
Son olarak miRSystem analizi için ise <http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/index.php> adresine gidilmiştir. 'Input data' kısmına hsa-miR-185-5p yazılmış ve 'Submit' butonuna tıklanarak miR-185-5p'nin hedef gen taraması yapılmıştır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. miRSystem veri tabanı analiz yöntemi

miR-185-5p ile Origene firmasından alınan vektör içerisinde bulunan 3'UTR BCL2 dizisi baz eşleşmesini görüntülemek için ise miRmap aracı kullanılmıştır. miRmap sitesine <https://mirmap.ezlab.org/> adresinden ulaşılmıştır ve miRmap web application butonuna

tıklanmıştır. ‘Species’ kısmında Human, ‘miRNA’ kısmında hsa-miR-185-5p ve ‘Gene’ kısmında ise *BCL2* geni seçilmiştir ve ‘Get Targets’ butonuna tıklanmıştır. Şekil 4.5.’de görüldüğü üzere miR-185-5p çekirdek bölgesi ile 3'UTR *BCL2* dizisi eşleşmesi elde edilmiştir.



Şekil 4.5. miR-185-5p çekirdek bölgesi ile 3'UTR *BCL2* dizisi eşleşmesi miRmap veri tabanı

#### 4.2.10.2. Protein İzolasyonu

6 kuyulu plaklara ekilen ve miR-185-5p transfekte edilmiş hücrelerin protein izolasyonu üreli lizis buffer kullanılarak yapılmıştır. Üreli lizis buffer içerisinde 7 M üre, 2 M Thioure, % 4 chaps, % 1 DTT, % 2 ampholit ve proteaz inhibitörü bulunmaktadır. 6 kuyulu plakalara ekilmiş hücrelerden protein izolasyonu aşağıda belirtilen protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir;

1. Bölüm 4.4.2.’de anlatıldığı üzere scramble ve miR-185-5p’nin 6 kuyulu plakalara ekilmiş hücrelere transfeksiyonundan 48 saat sonra hücreler inkübatörden laminar kabin içerisine alınmıştır.
2. Kuyulardaki besiyerleri çekilip atıldıktan sonra hücreler 1 ml PBS ile yıkanmıştır.
3. Kuyulara 1 ml soğuk PBS eklendikten sonra hücreler kuyulardan hücre kazıyıcı ile kazınarak 2 ml ependorf tüpe aktarılmıştır. Bu işlem kuyulara 0.5 ml PBS eklenerek tekrar edilmiştir.

4. Tüpler 1500 rpm'de +4 °C'de 1 dk santrifüj edilmiş ve ardından süpernatant kısım çekilip atılmıştır. Pellet olarak dibe çöken hücrelere 120 µl üreli lizis buffer eklenmiş ve hücreler sonikatör kullanılarak fiziksel parçalanmaya tabi tutulmuştur.
5. Parçalanmış hücreler 14000 rpm'de +4 °C'de 40 dk boyunca santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonunda proteinler süpernatant kısımda olacağından bu kısım tüplerden çekilip yeni bir steril 0.5 ml ependorf tüpe aktarılmıştır.
7. İzole edilen proteinler -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### 4.2.10.2.1. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Bradford yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bradford yönteminde 96 kuyulu plakaya her bir örnekten 3 tekrar olacak şekilde her bir kuyuya 5 µl protein eklenmiştir. Referans protein olarak yine 3 tekrar olacak şekilde kuyulara daha önceden konsantrasyonları bilinen Proteinlerin üzerine hızlıca 195 µl Bradford solüsyonu eklenmiş ve plaka 10 dk bekletilmek üzere karanlık bir ortama alınmıştır. Daha sonra ELIZA okuyucuda 570 nm'de ölçüm alınmıştır. Örneklerin OD değerlerinin ortalamaları alınarak referans proteinde ne kadarlık konsantrasyonu karşıladığı belirlenmiştir.

#### 4.2.10.3. Western Blot

Western blot için kullanılacak çözeltiler ve içerikleri Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Western blot protokolü çözeltileri

Çözeltiler	İçerikleri
% 4 Toplama jeli	0.5 M Tris-HCl pH 6.8, % 40 Akrilamid-bisakrilamid, % 10 SDS, ultra saf su, % 10 amonyum persulfat, TEMED
% 12 Ayırma Jeli	1.5 M Tris-HCl pH 8.8, % 40 Akrilamid-bisakrilamid, % 10 SDS, ultra saf su, % 10 amonyum persulfat, TEMED
TBS (10X, 1 litre)	24.23 g trizma-HCl, 80.06 g NaCl
TBST	10 ml TBS stok + 89.95 ultra saf su + 50 µl Tween 20
Towbin Transfer Tamponu (10X, 1 litre)	30.3 g Tris, 144 g Glisin, 20 ml % 10 SDS
Bloklama Tamponu	100 ml TBTS içerisinde 5 mg BSA

Her bir kuyuya 10 µg protein yüklemesi yapılacak şekilde protein miktar hesaplamaları yapılmıştır. 1 µl örnekte ne kadar protein olduğu Bölüm 4.2.10.2.1.'de anlatıldığı üzere Bradford yöntemi ile belirlenmiştir.  $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$  denklemi kullanılarak her bir örnekten 10 µg protein çekilip yeni bir tüpe aktarılmıştır. Daha sonra tüplerdeki toplam hacim 20 µl olacak şekilde proteinlere yükleme tamponu eklenmiş ve proteinler % 12 SDS poliakrilamit jelinde yürütülmüştür. Yürütme işlemi önce 30 dk'da 100 V daha sonra 50 dk'da 120 V olmak üzere toplamda 80 dk'da tamamlanmıştır.

Proteinlerin jelde yürütülmesinden sonra Western blot uygulaması temel de 6 adımda tamamlanmaktadır;

1. *Proteinlerin membrana aktarılması*; jel boyutunda kesilen PVDF membran 1 dk boyunca % 100 metanolde çalkalayıcı da muamele edilmiştir. Ardından membran 1 dk daha 1X Towbin transfer tamponuyla (TB) çalkalayıcıda çalkanmıştır. Proteinlerin membrana aktarımında yarı kuru transfer yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde transfer tamponu ile ıslatılan 2 adet filtre kâğıdı arasına jel ve membran yerleştirilmiştir. Yarı kuru cihaz üzerinde hazırlanan bu sandviç TB ile yeterince ıslatıldıktan sonra transfer işlemi 100 V da 1 saat olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.
2. *Bloklama*; proteinlerin transfer olduğu membran % 5 BSA'lı solüsyonda (Bloklama tamponu) 1.5 saat süre ile oda sıcaklığında çalkalanmıştır.
3. *Birincil antikor uygulaması*; 1:1000 oranında seyreltme için 2 ml bloklama tamponunun içerisine 2 µl BCL2 proteine özgün anti-BCL2 birincil antikor eklenmiştir. Membran hazırlanan birincil antikor solüsyonunda gece boyu +4 °C'de çalkayıcıda çalkalanmıştır.
4. *İkincil antikor uygulaması*; membran 3 kere 10'ar dk'lık periyotlar ile 1X TBST içerisinde çalkalanmıştır. 1 µl ikincil antikor 2 ml bloklama tamponu içerisinde çözdürülerek 1:2000 oranında seyreltme işlemi tamamlandıktan sonra membran seyreltilen ikincil antikor solüsyonu içerisinde çalkalayıcı da oda sıcaklığında 1 saat muamele edilmiştir. Referans gen olarak ise bu western blot deneyinde Aktin kullanılmıştır.
5. *Görüntüleme*; membran tekrar 3'er kez 10 dakika süre ile 3 kere olmak üzere 1X TBST içerisinde yıkanmıştır. Membran üzerindeki bantlara 1.5 ml

chemiluminescence kit içerisinde bulunan solüsyondan eklendikten hemen sonra bantların görüntüsü alınmıştır.

6. *İstatistiksel analiz*; western blot protokolü 3 biyolojik tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Kullanılan cihazdan bantların yoğunluk oranı sayısal veri olarak elde edilmiştir. Alınan veriler student t-test ile iki grup arasındaki istatistiksel kıyaslama yapılmıştır.

#### 4.2.10.4. Lusiferaz Deneyi

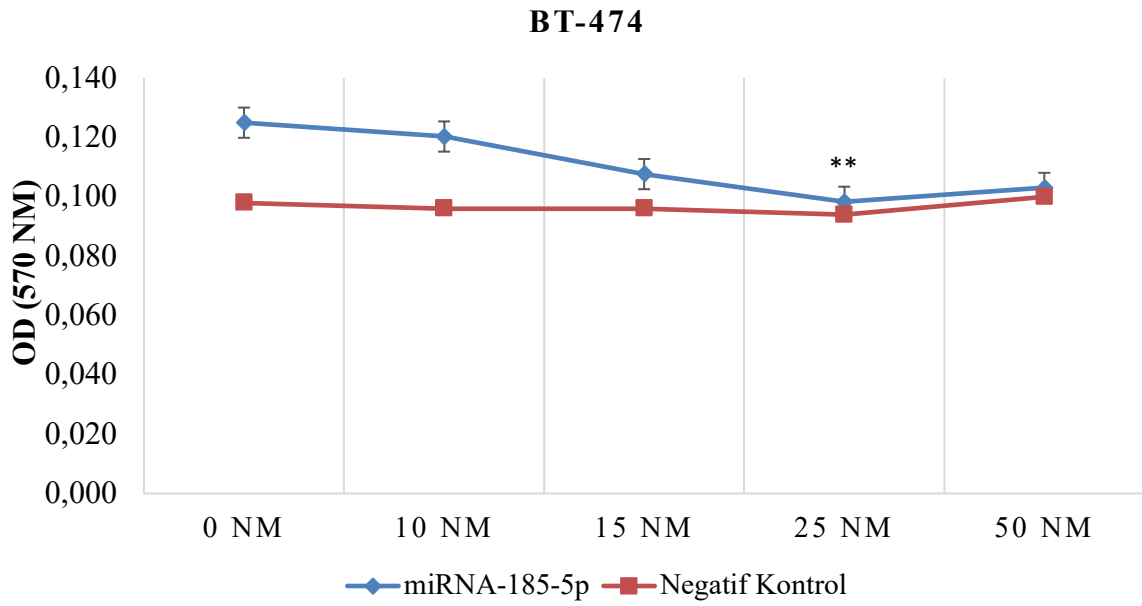
Lusiferaz deneyi Dual Lusiferase Assay Kiti (Promega) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Vektör olarak Origeneden hazır olarak temin edilen 3'UTR BCL2 dizisini içeren Luciferase reporter plasmid kullanılmıştır. Öncelikle her bir kuyuda  $3 \times 10^4$  hücre olacak şekilde BT-474 meme kanseri hücreleri 96 kuyulu plakaya ekilmiştir. Plakaya ekilen hücreler inkübatörde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra hücrelere hem miR-185-5p mimik hem de 3'UTR BCL2 dizisini içeren Luciferase reporter plasmid'in (Origene) birlikte transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan transfeksiyonda son miR-185-5p mimik konsantrasyonu 100 nM iken plasmid transfeksiyonu konsantrasyonu ise 50 nM'dür. Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra kuyuların içerisindeki besiyerleri çekilip atılmış ve her bir kuyu hızlı bir şekilde PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyuların içerisine 20'şer µl lizis tamponu eklenmiş ve plakalar 10 dk çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Son olarak her bir kuyuya 100'er µl Lusiferase Assay çözeltisi (Promega) eklenerek Luminometre cihazında (PerkinElmer 1420 Multilabel Counter) hızlı bir şekilde ölçüm alınmıştır. Her bir deney grubu 3 tekrarlı yapılarak deney tamamlanmıştır. İki farklı grubun karşılaştırılması ise student t-test ile yapılmıştır.



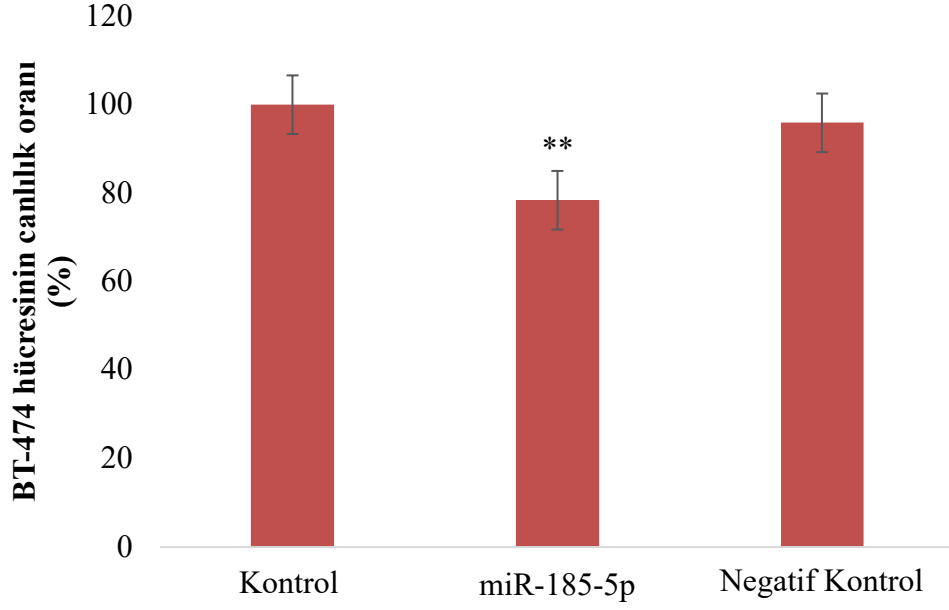
## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. MTT CANLILIK TESTİ

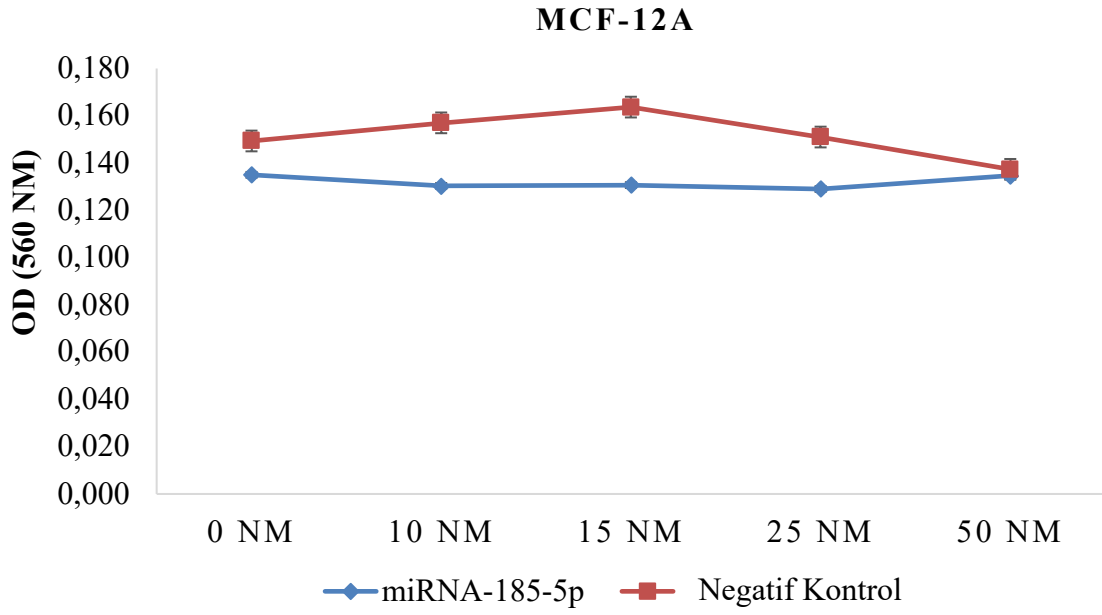
BT-474 ve MCF-12A hücrelerine 0, 10, 15, 25 ve 50 nM konsantrasyonlarında miR-185-5p mimik (mimic) 24, 48 ve 72 saat süre ile doza ve zamana bağlı olarak denemeler yapılmıştır. Zamana bağlı olarak en etkin süre 48 saat olarak belirlenmiştir ve 48 saatlik miR-185-5p transfeksiyonunun ardından MTT hücre canlılık testi yapılmıştır. Şekil 5.1.'de görüldüğü üzere 560 nm'de yapılan spektrofotometrik ölçümler ile miR-185-5p mimik'in BT-474 meme kanseri hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri 48 saat de 25 nM en etkin sonuç olarak belirlenmiştir. 25 nM konsantrasyonunda miRNA mimik'in yaklaşık olarak BT-474 meme kanser hücrelerin % 15'nin ölmesine neden olduğu anlaşılmıştır ( $p < 0.01$ ) (Şekil 5.2.). Ayrıca miR-185-5p mimik'in MCF-12A normal meme hücrelerinde % 4.5 oranında hücre çoğalmasını önlediği MTT deneyi ile belirlenmiştir (Şekil 5.3., Şekil 5.4). miRNA negatif kontrolü olarak hücrelere miRNA scramble transfeksiyonu yapılmış ve elde edilen sonuçlarda % 3 oranında ölüme neden olduğu tespit edilmiştir.



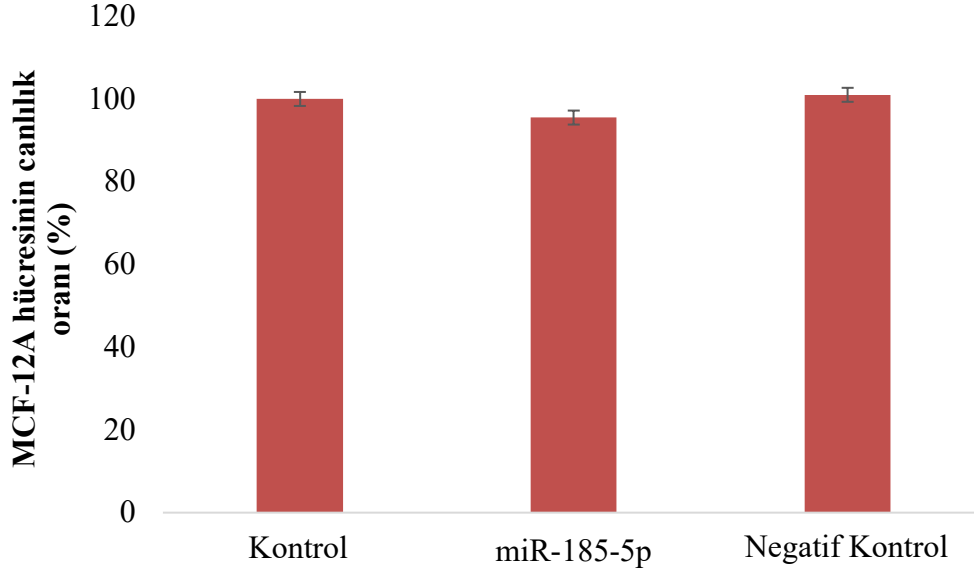
Şekil 5.1. Farklı konsantrasyonlarda miR-185-5p mimik'in BT-474 meme kanseri hücre hattına transfeksiyonu ile elde edilen hücre canlılığı oranı (\*\* $p < 0.01$ ) (74)



Şekil 5.2. miR-185-5p transfeksiyonu sonrası BT-474 hücresinin canlılık oranı (%) (\*\*p<0.01)



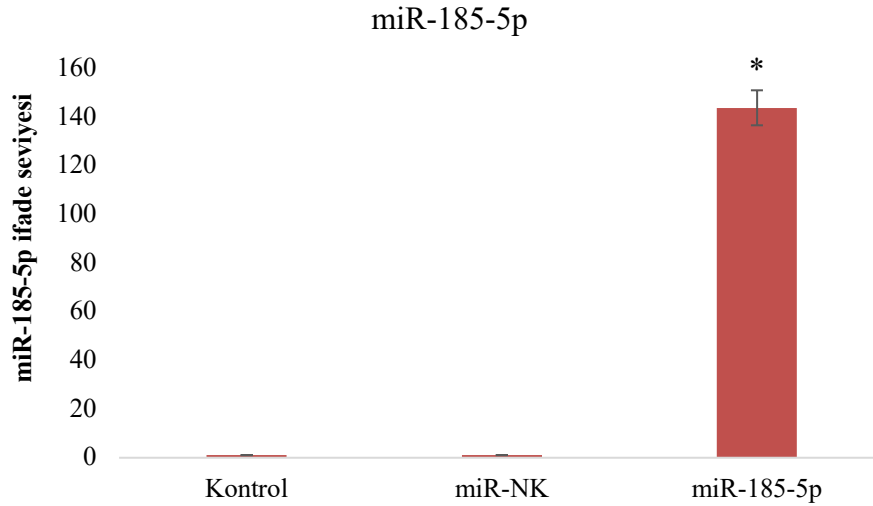
Şekil 5.3. Farklı konsantrasyonlarda miR-185-5p'nin MCF-12A hücre hattına transfeksiyonu ile elde edilen MTT canlılık testi (74)



Şekil 5.4. miR-185-5p transfeksiyonu sonrası MCF-12A hücresinin canlılık oranı (%)

## 5.2. TRANSFEKSİYON İŞLEMİNİN DOĞRULANMASI

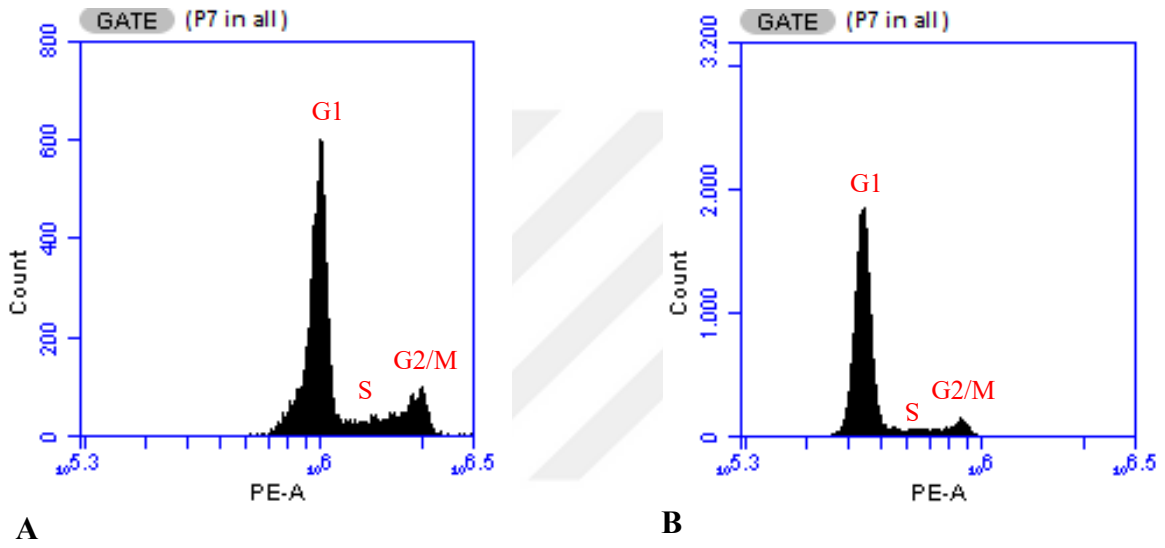
miR-185-5p'nin transfeksiyon işleminin doğrulanması için qRT-PCR analiz yöntemi kullanılmıştır. Şekil 5.5.'de görüldüğü üzere miR-185-5p'nin BT-474 meme kanseri hücrelerine transfeksiyonu ile beraber miR-185-5p'nin ifade seviyesi kontrol grubuna göre yaklaşık 140 kat artmıştır.



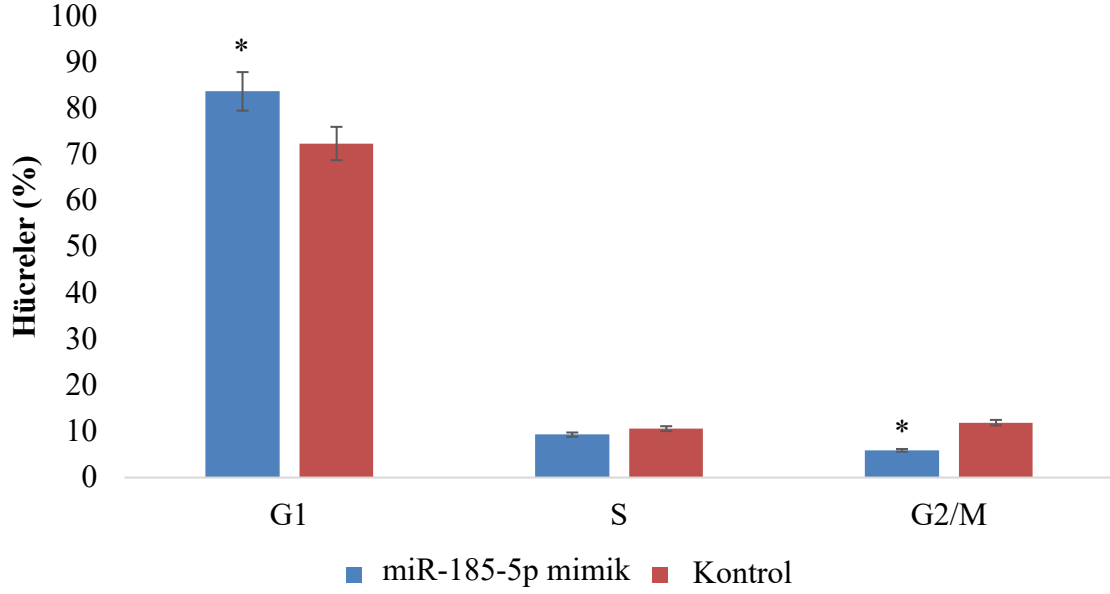
Şekil 5.5. BT-474 meme kanseri hücrelerine miR-185-5p transfeksiyonu sonrası miR-185-5p ifade seviyesi (\*p<0.05) (74)

### 5.3. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ

Hücre döngüsü analizini gerçekleştirmek amacıyla akış sitometrisi cihazı kullanılmıştır. Elde edilen hücre döngüsü analizi sonuçlarına göre miR-185-5p transfeksiyonu yapılmış hücrelerin kontrol grubundaki hücelere kıyasla G1 evresinde takılı kaldıkları belirlenmiştir. Transfekte olmuş hücrelerin % 83,7 si G1 evresinde, % 9,3'ünün S fazında ve % 5,9'unun ise G2/M fazında olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Transfekte olmayan hücrelerde ise G1 fazındaki hücre oranı % 72,4 olarak belirlenmiş olup, % 10,6'sının S fazında ve % 11,9'unun ise G2/M fazında bulunduğu analiz sonuçlarıyla tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ) (Şekil 5.6.,5.7.).



Şekil 5.6. BT-474 hücre hattının hücre döngüsü analizi grafikleri A) miRNA-185-5p mimik transfekte olmuş hücreler B) Transfekte olmayan hücreler



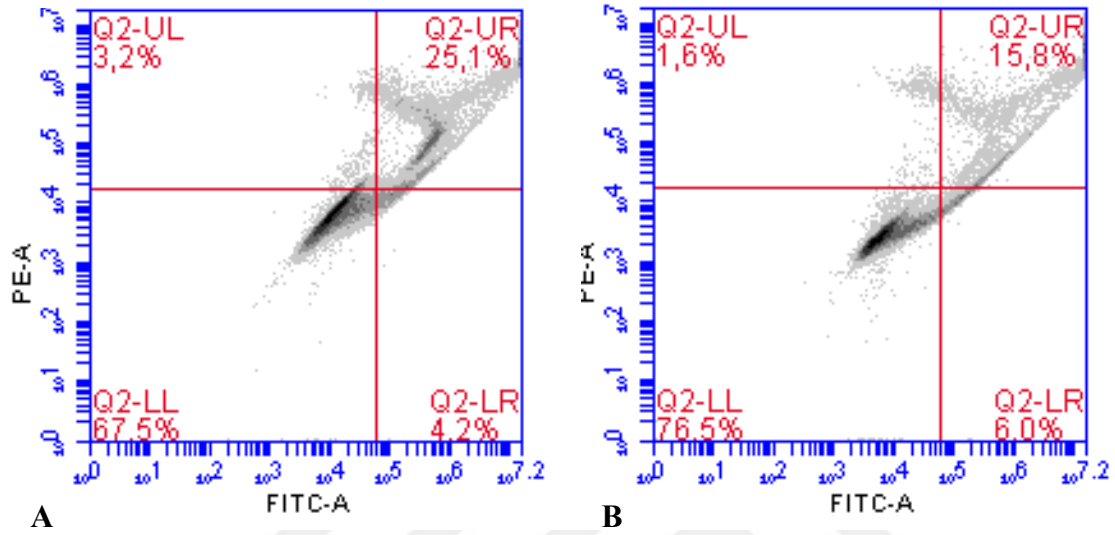
Şekil 5.7. BT-474 hücrelerinin hücre döngüsü evresindeki hücre yüzdesini gösteren grafik (%) (\* $p < 0.05$ )

#### 5.4. ANNEXIN V İLE BT-474 VE MCF-12A HÜCRELERİNDE APOPTOZ ORANININ BELİRLENMESİ

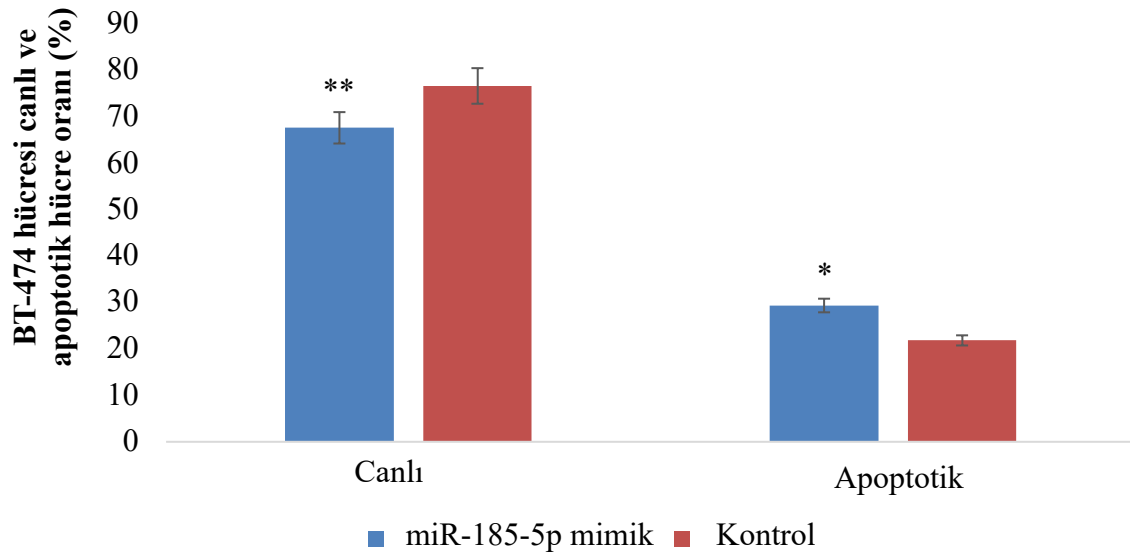
miR-185-5p mimik'in BT-474 ve MCF-12A hücrelerine transfeksiyonunun ardından akış sitometrisi cihazı ile bu hücrelerin apoptoz oranı belirlenmiştir. miRNA transfekte edilmiş BT-474 hücrelerinin % 67,5'inin canlı olarak, % 29,3'ünün ise apoptoza girdiği belirlenmiştir ( $p < 0.01$ ). % 29,5 apoptoz oranını ise % 4,2'sini erken, % 25,1'ini ise geç apoptoz evresindeki hücrelerden oluştuğu belirlenmiştir ( $p < 0.01$ ). Ayrıca apoptotik hücrelerin yanı sıra hücrelerin % 3,2'sinin ise nekrotik evrede olduğu tespit edilmiştir. miRNA kontrol grubunun akış sitometrisi sonuçlarına göre ise hücreler % 76,5 oranında canlılık gösterirken, % 6 erken ve % 15,8 geç olmak üzere toplamda hücrelerin % 21,8'inin ise apoptoza girdiği anlaşılmıştır ( $p < 0.05$ ). Elde edilen bu verilere göre miR-185-5p mimik'in yaklaşık olarak % 9 oranında BT-474 hücrelerinin apoptoza sürüklediği saptanmıştır ( $p < 0.05$ ) (Şekil 5.8., Şekil 5.9.).

miR-185-5p mimik'in MCF-12A hücresi üzerindeki apoptotik etkisi akış sitometri ile belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deney sonuçları MTT hücre canlılık testi sonuçları ile benzerlik göstermekte olup, miR-185-5p transfeksiyonunun ardından MCF-12A

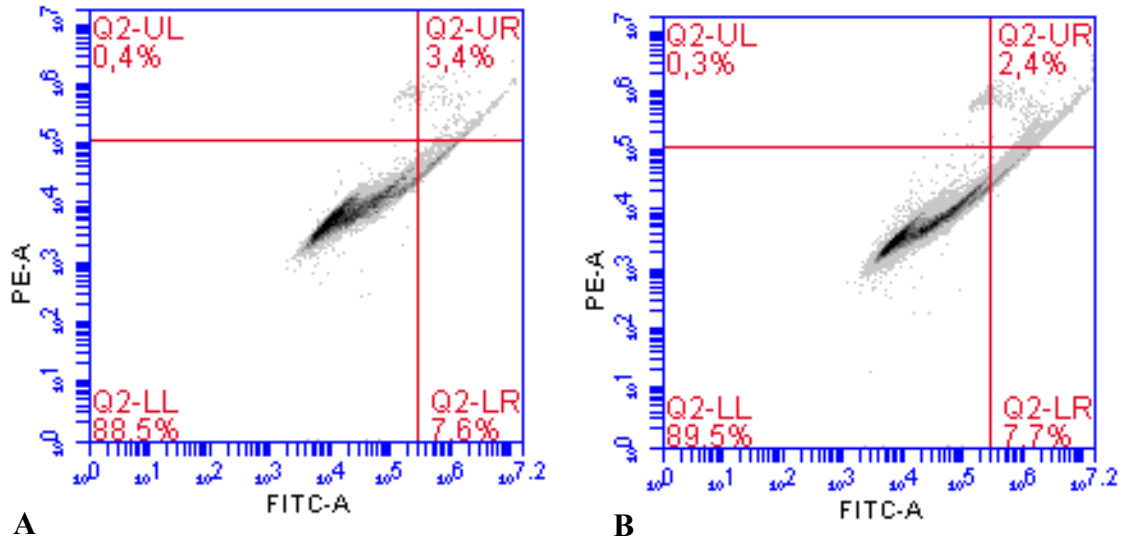
hücrelerinde % 10,1 ölüm oranına rastlanmıştır. (miRNA transfekte olmuş hücrelerin % 88,5’inde hücre canlılığı belirlenirken, miRNA-kontrol grubu hücrelerinde ise % 89,5 oranında hücre canlılığı tespit edilmiştir. Transfekte edilen hücrelerde apoptotik hücre oranı % 11 olarak belirlenmiş olup, benzer bir sonuç olarak da transfekte olmayan hücrelerde apoptoz oranının % 10,1 olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.10., Şekil 5.11.).



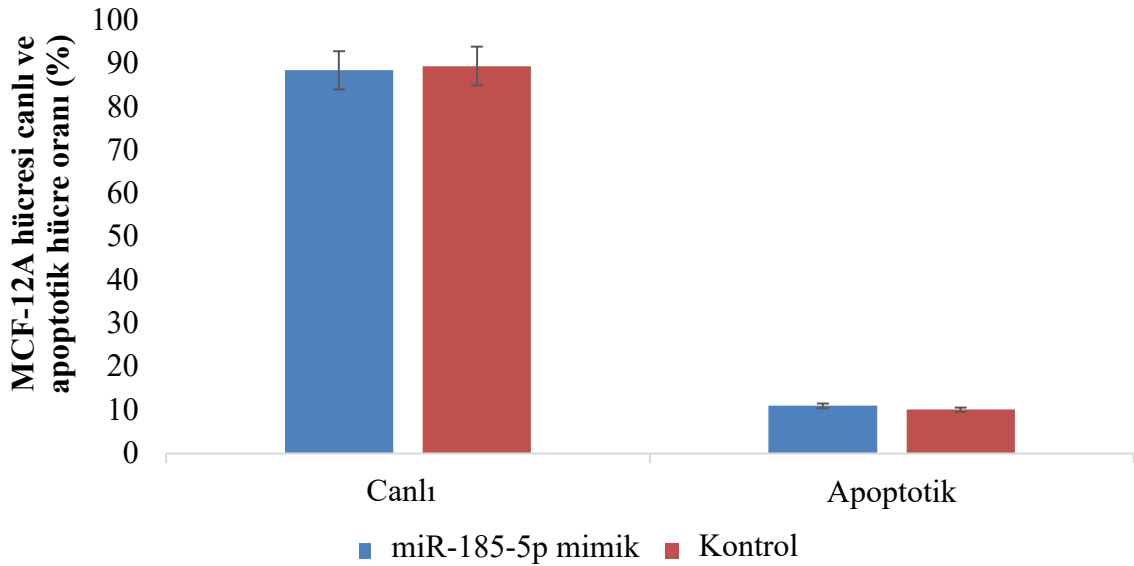
Şekil 5.8. A) BT-474 hücrelerinin miR-185-5p transfeksiyonu sonrası akış sitometrisi grafiği B) miRNA-kontrol akış sitometrisi grafiği



Şekil 5.9. BT-474 hücrelerinin canlı ve apoptotik hücre yüzdesi grafiği (%) (\*p<0.05, \*\*p<0.01)



Şekil 5.10. MCF-12A hücresi akış sitometrisi grafikleri A) miR-185-5p transfekte hücreler B) miRNA transfekte olmayan hücreler



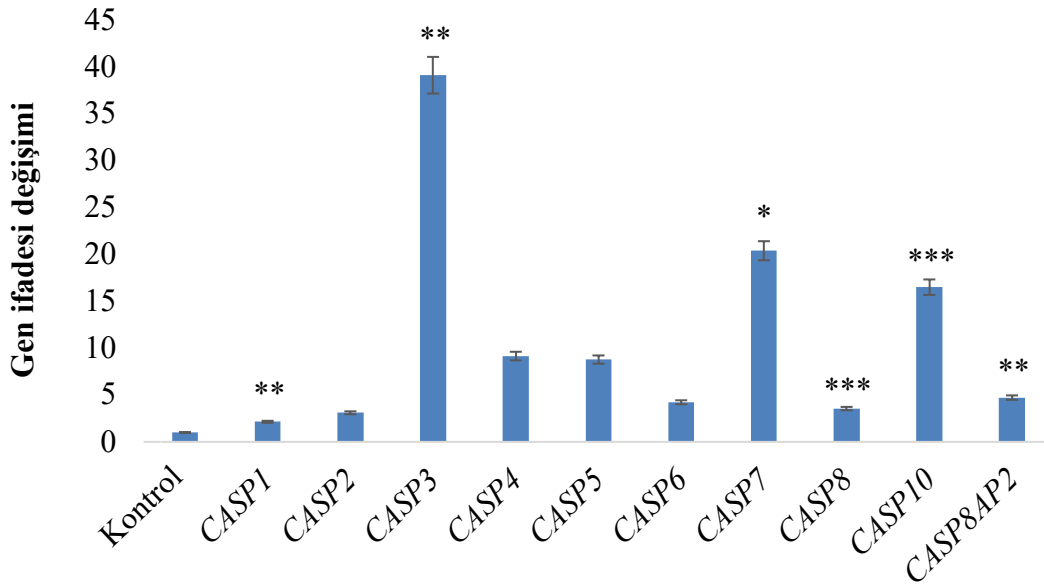
Şekil 5.11. MCF-12A hücrelerinin hücre canlılık oranı grafiği (%)

## 5.5. APOPTOZ YOLAĞI GEN İFADE ANALİZİ

miR-185-5p'nin apoptoz yolağına ait etkisini gen seviyesi düzeyi qRT-PCR cihazı ile incelenmiştir. Çalışmada kullanılan apoptoz array panelinde 88 gene ait primerlerin tümü ile çalışılmıştır ancak 69 gen için anlamlı sonuç elde edilmiştir. Elde edilen apoptoz yolağına ait 69 genin ifade seviyesi farklılaşması delta delta Ct yöntemine göre gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda sadece grafik gösteriminde kat değişiminin daha rahat

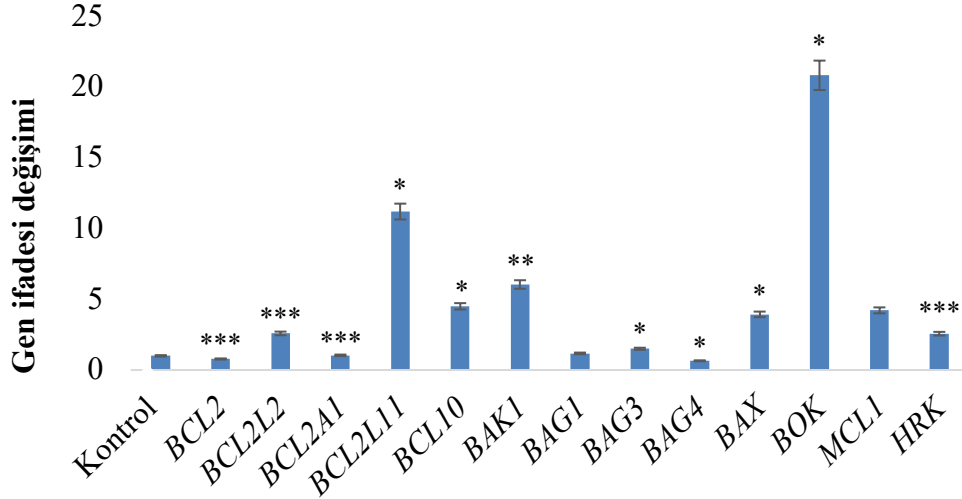
izlenebilmesi amacıyla ayrıca 1 kat sayısına göre sonuçlar grafik de gösterilmiştir. *Kaspaz* gen ailesinin gen ifadesi değişimine ait sonuçlar Şekil 5.12.'de gösterilmiştir. Bu gen ailesinde en fazla gen seviyesinde artışı 39 kat ile *Kaspaz 3*'de gözlemlenirken en az artış 2.1 kat ise *Kaspaz 1* geninde belirlenmiştir ( $p<0.01$ ).

Apoptoz array panelinde yer alan *BCL* gen ailesine ait çeşitli genlerin gen ifade seviyesindeki değişim qRT-PCR cihazı ile belirlenmiş olup Şekil 5.13.'de elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. Sonuçlara göre gen ifadesinde en çok artış 20.8 oranı ile *BOK* geninde gözlemlenmiştir ( $p<0.05$ ). *BOK* geninden sonra ise ifade seviyesinde en çok artış 11.2 kat ile *BCL2L11* geninde görülmüştür ( $p<0.05$ ). *BCL2* ve *BAG4* genlerinde ise kontrol grubuna göre gen ifadesinde sırasıyla 0.7 ve 0.65 oranında azalma olduğu elde edilen sonuçlara göre anlaşılmıştır ( $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ). Diğer taraftan *BAG1* geninin ifade seviyesinde kontrole göre herhangi bir anlamlı değişim gözlemlenmemiştir.



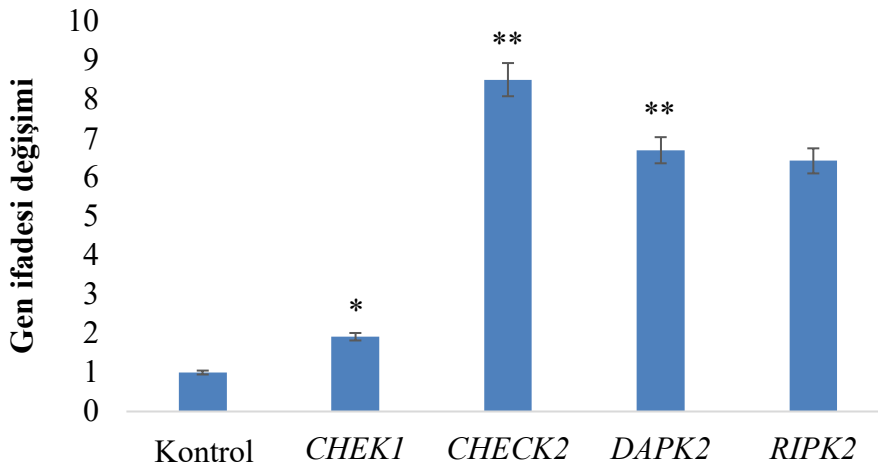
Şekil 5.12. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerinin Kaspaz gen ailesine ait qRT-PCR sonuçları (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ )



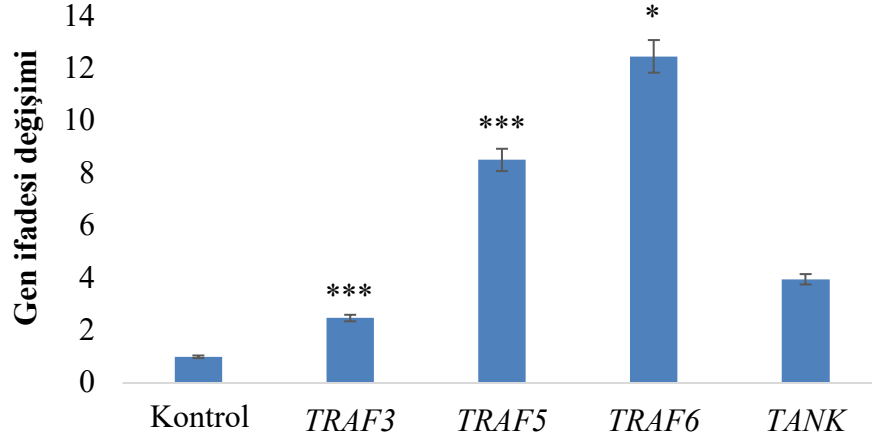


Şekil 5.13. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerinin BCL gen ailesine ait qRT-PCR sonuçları (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

miR-185-5p transfeksiyonu ardından Kinaz ve TRAF gen ailelerine ait gen ifadesindeki değişim de qRT-PCR yöntemi ile incelenmiş olup bu gen ailelerine ait tüm genlerin ifadelerinde kontrol grubuna göre artış gözlemlenmiştir. Kinaz gen ailesinden olan *CHEK2* geninin kontrol grubuna göre ifadesinde 8.5 oranında bir artış belirlenmiş olup ( $p < 0.001$ ), *TRAF* ailesinde ise gen ifade seviyesinde en yüksek artış 12.4 oranı ile *TRAF 6* geninde tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 5.14.,5.15.).

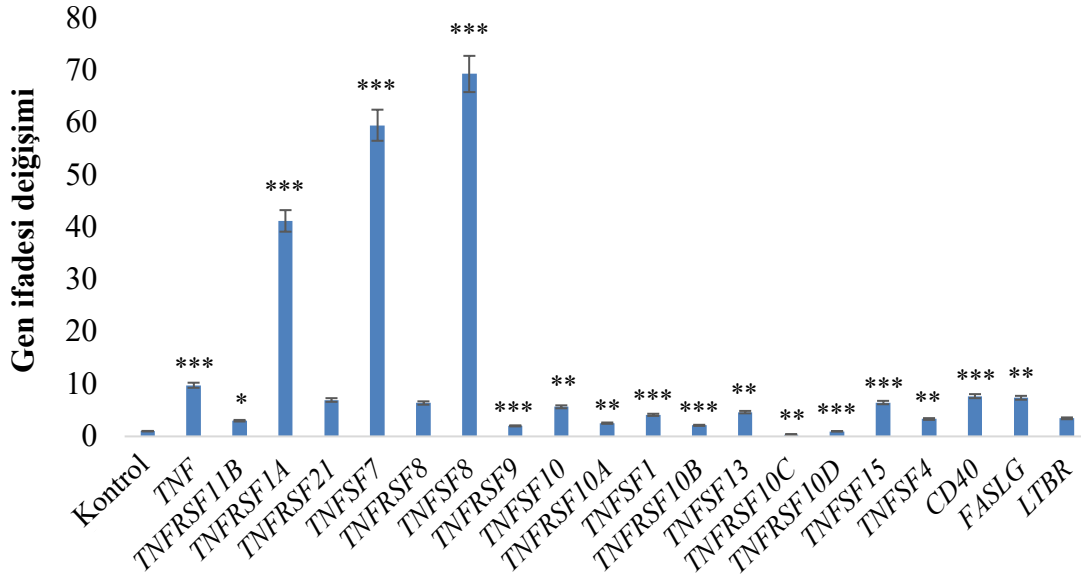


Şekil 5.14. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerinin Kinaz gen ailesine ait qRT-PCR sonuçları (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )



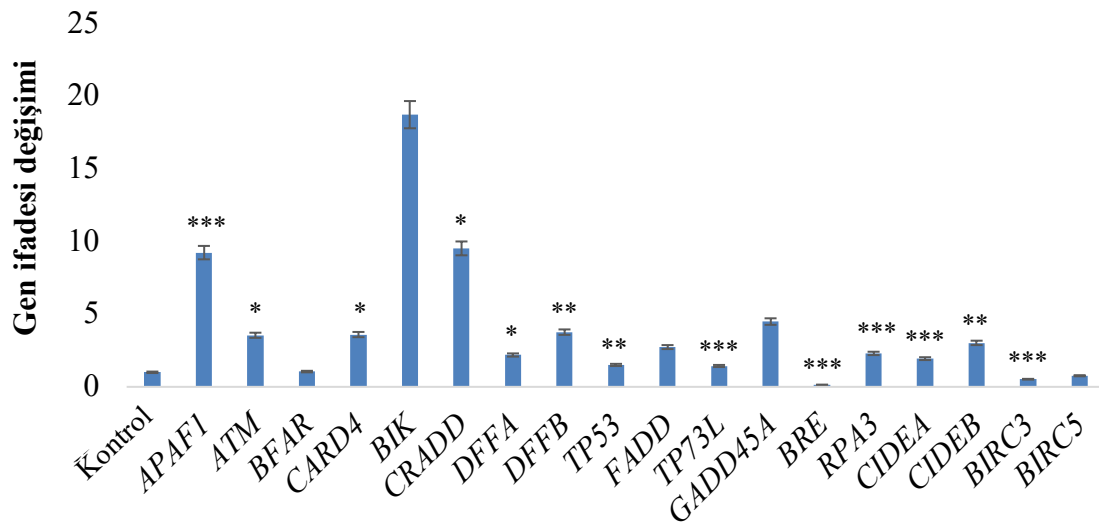
Şekil 5.15. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerinin TRAF gen ailesine ait qRT-PCR sonuçları (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

20 adet TNF gen ailesine ait genlerin mRNA düzeyinde ifade seviyesindeki değişim qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiş olup bu aileye ait genlerin ifade seviyelerinde farklı oranlarda hem artış hem de azalma bulunmuştur. *TNFSF8*, *TNFSF7* ve *TNFRSF1A* genlerinin ifadelerinde sırasıyla 69, 59 ve 41 oranlarında artış görülürken *TNFRSF10C* ve *TNFRSF10D* genlerinde ise mRNA düzeyinde ifadelerinde 0.36 ve 0.97 kat azalma tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) (Şekil 5.16.).



Şekil 5.16. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerinin TNF gen ailesine ait qRT-PCR sonuçları (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

Yukarıda açıklanan gen aileleri dışında apoptoz yolağında işlevi olan diğer genlerinde mRNA düzeyinde ifade değişim analizi yapılmıştır. 18 farklı genin ifade düzeyindeki değişim qRT-PCR yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışılan gen grubunda ifadesinde hem artış hem de azalma olan çeşitli genlere rastlanmıştır. Gen ifadesinde artma görülen genlerden bazıları *BIK*, *APAF1* ve *CRADD* genleridir ( $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ). Bu gen grubunda ifadesinde en fazla 0.14 kat azalma görülen gen *BRE* geni olup bu geni *BIRC3* ve *BIRC5* genleri sırasıyla 0.52 ve 0.76 kat ile takip etmiştir ( $p<0.001$ ). Bu sonuçların yanında *BFAR* geni ifadesinde herhangi bir anlamlı değişimin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 5.17.).



Şekil 5.17. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerinin apoptoz yolağına ait genlere ait qRT-PCR sonuçları (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ )

Tüm genlere ait kat değişim oranları Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. qRT-PCR sonucunda kontrol grubuna göre tüm genlerin gen ifade seviyesinde meydana gelen kat değişim oranları

Gen ailesi	Gen	İfade Değişimi Oranı	p-value
	<i>CASP1</i>	2,14	$p<0.01$
	<i>CASP2</i>	3,11	-
	<i>CASP3</i>	39,12	$p<0.01$
	<i>CASP4</i>	9,16	-

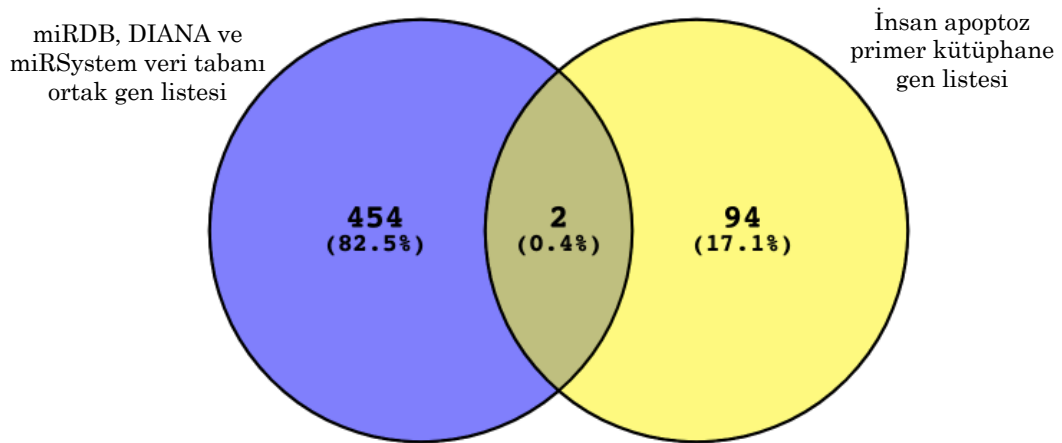
<b>Kaspaz Ailesi</b>	<i>CASP5</i>	8,78	-
	<i>CASP6</i>	4,23	-
	<i>CASP7</i>	20,39	p<0.05
	<i>CASP8</i>	3,56	p<0.001
	<i>CASP10</i>	16,51	p<0.001
	<i>CASP8AP2</i>	4,72	p<0.01
<b>Kinaz Ailesi</b>	<i>CHEK1</i>	1,92	p<0.05
	<i>CHECK2</i>	8,51	p<0.01
	<i>DAPK2</i>	6,70	p<0.01
	<i>RIPK2</i>	6,43	-
<b>BCL2 Ailesi</b>	<i>BCL2</i>	0,78	p<0.001
	<i>BCL2L2</i>	2,58	p<0.001
	<i>BCL2A1</i>	1,04	p<0.001
	<i>BCL2L11</i>	11,20	p<0.05
	<i>BCL10</i>	4,50	p<0.05
	<i>BAK1</i>	6,04	p<0.01
	<i>BAG1</i>	1,17	-
	<i>BAG3</i>	1,50	p<0.05
	<i>BAG4</i>	0,65	p<0.05
	<i>BAX</i>	3,93	p<0.05
	<i>BOK</i>	20,82	p<0.05
	<i>MCL1</i>	4,21	-
	<i>HRK</i>	2,57	p<0.001
<b>TRAF Ailesi</b>	<i>TRAF3</i>	2,48	p<0.001
	<i>TRAF5</i>	8,51	p<0.001
	<i>TRAF6</i>	12,47	p<0.05
	<i>TANK</i>	3,96	-
	<i>TNF</i>	9,78	p<0.001
	<i>TNFRSF11B</i>	3,00	p<0.05

<b>TNF Ailesi</b>	<i>TNFRSF1A</i>	41,21	p<0.001
	<i>TNFRSF21</i>	6,96	-
	<i>TNFSF7</i>	59,51	p<0.001
	<i>TNFRSF8</i>	6,39	-
	<i>TNFSF8</i>	69,31	p<0.001
	<i>TNFRSF9</i>	2,01	p<0.001
	<i>TNFSF10</i>	5,66	p<0.01
	<i>TNFRSF10A</i>	2,53	p<0.01
	<i>TNFSF1</i>	4,13	p<0.001
	<i>TNFRSF10B</i>	2,11	p<0.001
	<i>TNFSF13</i>	4,64	p<0.01
	<i>TNFRSF10C</i>	0,36	p<0.01
	<i>TNFRSF10D</i>	0,98	p<0.001
	<i>TNFSF15</i>	6,48	p<0.001
	<i>TNFSF4</i>	3,33	p<0.01
	<i>CD40</i>	7,70	p<0.001
	<i>FASLG</i>	7,39	p<0.01
<i>LTBR</i>	3,46	-	
<b>Apoptoz İlişkili Diğer Gen Ailesi Üyeleri</b>	<i>APAF1</i>	9,22	p<0.001
	<i>ATM</i>	3,54	p<0.05
	<i>BFAR</i>	1,05	-
	<i>CARD4</i>	3,59	p<0.05
	<i>BIK</i>	18,70	-
	<i>CRADD</i>	9,51	p<0.05
	<i>DFFA</i>	2,19	p<0.05
	<i>DFFB</i>	3,76	p<0.01
	<i>TP53</i>	1,51	p<0.01
	<i>FADD</i>	2,73	-
<i>TP73L</i>	1,43	p<0.001	

	<i>GADD45A</i>	4,48	-
	<i>BRE</i>	0,14	p<0.001
	<i>RPA3</i>	2,30	p<0.001
	<i>CIDEA</i>	1,94	p<0.001
	<i>CIDEB</i>	3,02	p<0.01
	<i>BIRC3</i>	0,52	p<0.001
	<i>BIRC5</i>	0,76	-

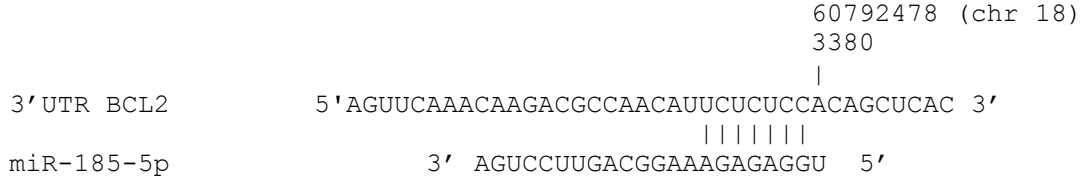
## 5.6. MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE MİR-185-5P'NİN HEDEF GENİNİN BELİRLENMESİ

miR-185-5p'nin meme kanseri hücrelerindeki hedefini belirleyebilmek için ilk olarak biyoinformatik analizler yapılmıştır. Analizler miRDB, DIANA ve miRSystem veri tabanları olmak üzere 3 farklı biyoinformatik araç kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin biyoinformatik analizi Venny 2.1.0 aracı kullanılarak gerçekleştirildi ve miRDB, DIANA ve miRSystem araçlarında 456 genin ortak olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra 456 gen ile elimizde bulunan apoptoz panelindeki genlerin listesi Venny 2.1.0 aracına eklenerek ortak gen listesi elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda *BCL2* ve *FADD* olmak üzere iki genin ortak olduğu saptanmıştır (Şekil 5.18.). Böylece *BCL2*'nin miR-185-5p'nin olası hedeflerinden biri olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.18. Ortak genlerin venn şemasında gösterimi

Ek olarak miRmap veri tabanından elde edilen verilere göre Şekil 5.19.'de 3'UTR BCL2 dizisi ile miR-185-5p'nin çekirdek dizindeki eşleşme gösterilmektedir.

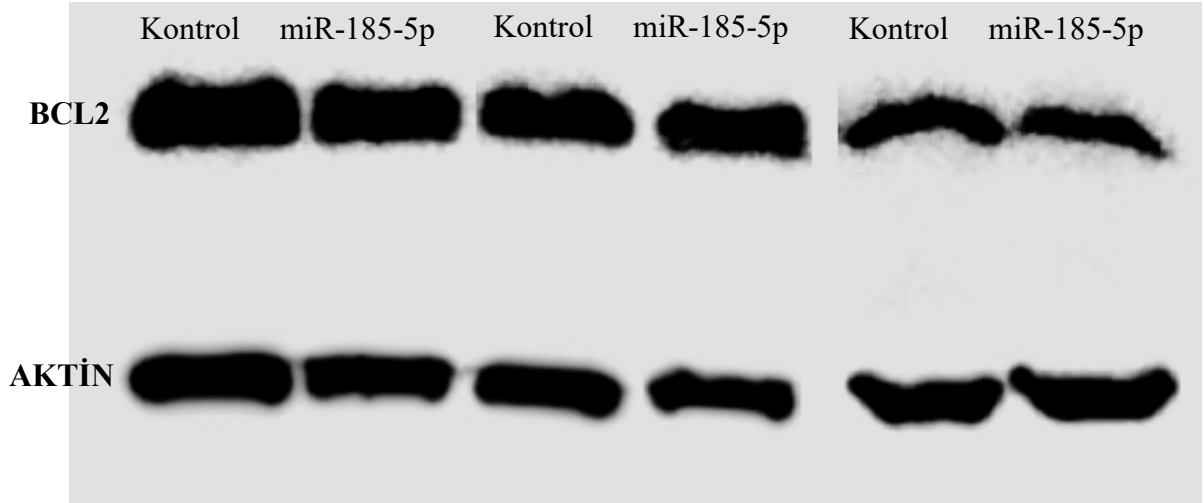


Şekil 5.19. 3'UTR BCL2 ve miR-185-5p çekirdek bölgesi baz dizisi eşleşmesi

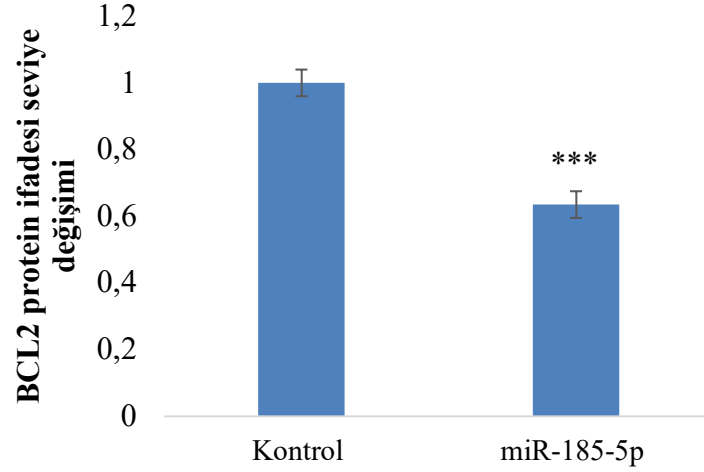
miR-185-5p ile BCL2 arasındaki miRNA-hedef gen ilişkisini deneysel olarak da doğrulamak amacıyla western blot ve lusiferaz deneyi de yapılmıştır.

### 5.6.1. WESTERN BLOT İLE BCL2 PROTEİN SEVİYESİNDEKİ DEĞİŞİMİN BELİRLENMESİ

BT-474 hücrelerine miR-185-5p transfeksiyonunun ardından BCL2 protein seviyesinde meydana gelen değişim western blot yöntemiyle belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubuna kıyasla miR-185-5p transfeksiyonu yapılmış meme kanseri hücrelerinde BCL2 protein seviyesinin yaklaşık 1.5 kat oranda azaldığı gözlemlenmiştir ( $p < 0.001$ ) (Şekil 5.20., 5.21.).



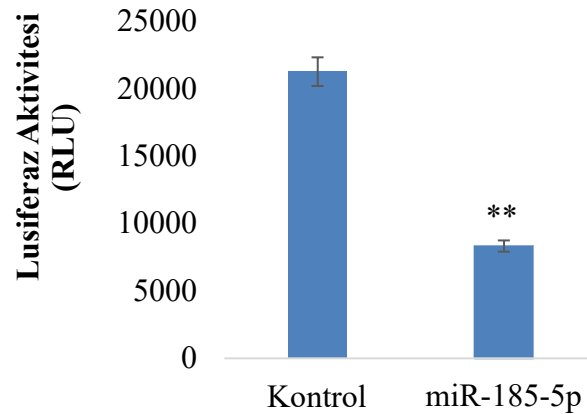
Şekil 5.20. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerde kontrol grubuna kıyasla BCL2 protein western blot deney sonuçları



Şekil 5.21. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 meme kanseri hücrelerde kontrol grubuna kıyasla BCL2 protein seviyesindeki değişimi gösteren grafik (\*\*\*) $p < 0.001$ )

### 5.6.2. LUSİFERAZ DENEYİ İLE MİR-185-5P – BCL2 ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DOĞRULANMASI

miR-185-5p'nin meme kanseri hücrelerinde BCL2 proteinini direk olarak hedeflediğın belirlenmesi amacıyla lusiferaz deneyi yapılmıştır. Bu sebeple lusiferaz raportör geni ile 3'UTR *BCL2* geni dizisini beraber içeren plasmid DNA kullanılmıştır. Tasarlanan bu plasmid ile miR-185-5p'nin meme kanseri hücrelerine beraber transfeksiyonu sağlanarak lusiferaz aktivitesinde meydana gelen değişim analiz edilmiştir. Lusiferaz deneyi sonuçları kontrol grubuna kıyasla miR-185-5p transfekte olan hücrelerde lusiferaz aktivitesinin 2.5 kat azaldığını göstermektedir ( $p < 0.01$ ) (Şekil 5.22.).



Şekil 5.22. BT-474 hücrelerinde lusiferaz aktivitesi sonuçları (\*\*) $p < 0.01$ )



## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1. TARTIŞMA

Meme kanseri her ne kadar gelişmiş tanı teknikleri ile teşhis edilebilse ve farklı tedavi yaklaşımlarıyla da tedavi edilebilse de bu hastalık dünya çapında kadınlarda hala kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (75,76). Yüksek nüks oranı, kemoterapiye direnç ve endokrin tedavisi gibi bazı komplikasyonlar meme kanseri ile mücadelede engel oluşturmaktadır (8,77). Bu nedenle, meme kanserinin altında yatan moleküler mekanizmaların geniş çapta araştırılması ve meme kanseri hastalarına daha iyi tedavi sağlamak için yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir.

Yaklaşık olarak 22-25 nükleotid arası baz dizisine sahip, kısa ve kodlanmayan RNA dizileri olarak bilinen mikroRNA'ların keşfi ve bu miRNA'ların kanser biyolojisinde moleküler düzeydeki araştırmaları sayesinde birçok miRNA'nın çeşitli kanser hücrelerinde normal hücrelere kıyasla farklı oranlarda ifadesinin yapıldığı belirlenmiştir (9,78,79). Ayrıca, çeşitli çalışmalar miRNA'ların, hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz da dahil olmak üzere önemli hücresel işlemlere aracılık ederek kanser gelişiminde ve ilerlemesinde düzenleyici rol üstlendiklerini göstermektedir. Genellikle miRNA'ların hücre düzeyinde yaptığı bu düzenleme, miRNA'ların onkogenler veya tümör baskılayıcı genler ile etkileşime girerek gerçekleştirebileceği bilinmektedir (80). MiRNA'ların kanser gelişiminde önemli hücresel rollere sahip olmasının anlaşılması, kanser tedavisinde miRNA'lar kullanılarak farklı ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebileceği fikrini doğurmuştur. Ayrıca birçok çalışma tümör gelişiminin pro-onkojenik miRNA'ların inhibe edilmesi ya da tümör baskılayıcı miRNA'ların meme kanseri hücrelerine verilmesiyle beraber durdurulabildiğini göstermiştir (81). Örneğin, Han ve ark. yaptığı çalışmada miR-1307-3p'nin SMYD4'ü hedefleyerek meme kanseri gelişimini tetiklediğini görülmüştür (82). Ayrıca yine bu çalışmada kanserli hücrelerde miR-1307-3p seviyesinin düşürülmesiyle ise meme kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasının engellendiği ortaya çıkarılmıştır (82). Zou ve ark. miR-375'in hücre canlılığını, istilasını ve göçünü inhibe edebileceğini göstermişlerdir (83). Ji ve ark. yaptığı çalışmada, miR-3196 ifadesinin normal meme hücrelerine kıyasla meme kanseri hücrelerinde önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu sebeple bir tedavi yaklaşımı olarak Ji ve ark. miR-3196'nın hücrelerde ektopik ifade seviyesini arttırmışlardır. Çalışma

sonucunda miR-3196'nın ERBB3 proteinini hedeflediği, böylece apoptozu indükleyerek hücre proliferasyonunu baskılayabildiği anlaşılmıştır (84).

Son yıllarda miRNA'ya dayalı gerçekleştirilen farmakogenomik çalışmalarda, özellikle meme kanseri tedavisinde klinisyenler tarafından rutin olarak kullanılan Tamoksifen, Paklitaksel vb. ilaçların tedavi sırasında kullanımı sonucu ifade seviyesi değişimine bağlı biyobelirteç olarak kullanımı yer almaktadır (85,86). Ancak klinikte kullanılan bu ilaçların hasta üzerinde zamana bağlı direnç oluşumu ve diğer yan etkileri nedeniyle hala meme kanseri hastaları için etkin çözüm oluşturamamıştır. Bu nedenle araştırmacılar rutinde kullanılan ilaçlara karşı yeni moleküller geliştirmeye veya var olan aday moleküllerin etkinliğinin belirlenmesine dayalı in vivo ve in vitro çalışmalar gerçekleştirmektedirler. Likenlerin en yaygın olarak incelenen sekonder metabolitlerinden birisi usnik asittir. Doğada canlılar tarafından oluşturulan usnik asitin birçok kanser türünde anti-proliferatif etkiye sahip olduğu yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır (48,87). Usnik asitin anti-proliferatif etkiye sahip olduğu kanser türlerine ait hücre hatlarına örnek olarak glioma hücreleri (PRCC ve U87MG) (88), insan gastrik hücreleri (BGC823, SGC7901 and AGS) (51,89), insan akciğer karsinoma hücresi (A549) (90), prostat kanseri hücreleri (CWR22Rv-1) (89), insan kolon adenokarsinoma hücresi (HT29) (89) ve meme kanseri hücreleri (MCF-7, BT-474 and MDA-MB-231) (15) verilebilir. Usnik asitin kanser hücrelerindeki anti-proliferatif etkisinin yanı sıra tümör gelişimini anjiyogenezi ve invazyonu etkileyerek durdurduğu yapılan incelemeler sonucu anlaşılmıştır. Usnik asitin farklı sinyal iletim yollarını etkileyerek akciğer kanseri hücrelerinde (A549, H1650 and H1975) (91) ve meme kanseri hücrelerinde (Bcap-37) tümör gelişimini engellediği görülmüştür (92).

Laboratuvarımızda Kılıç ve ark.'nın gerçekleştirdiği, meme kanseri hücrelerinin usnik asit ile muamele edilmesinin ardından meme kanser hücrelerinde meydana gelen miRNA seviyelerindeki değişim incelenmiştir ve elde edilen sonuçlarda miR-185-5p ifadesinin BT-474 meme kanser hücresinde önemli oranda artmış olduğu saptanmış ve bu artışın validasyonu qRT-PCR yöntemiyle gösterilmiştir (15). Gerçekleştirilen tez kapsamında, yapılan ön çalışmalarda miR-185-5p'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi MDA-MB-231 hücre hattında araştırılmış ancak miR-185-5p'nin hücre çoğalması üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Devam eden çalışmada, miR-185-5p'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve miR-185-5p'nin BT-474 meme kanseri hücre

proliferasyonunda azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple miR-185-5p'nin BT-474 meme kanser hücresine transfeksiyonu ile hücre içerisinde miRNA'nın ifade seviyesinin artırılması sağlanıp, apoptoz yolağının aktive edilmesi sayesinde tümör gelişiminin baskılanabileceği hipotez olarak belirlenmiştir. miR-185-5p'nin BT-474 hücre hattı üzerindeki işlevi ve apoptoz yolağı üzerindeki etkisi incelenmiştir. miR-185-5p'nin hücre apoptozu üzerindeki rolünü belirlemek amacıyla BT-474 hücresinde akış sitometrisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre miR-185-5p'nin BT-474 hücrelerinde anti-proliferatif etkiye sahip olduğu ve kanserli hücrelerde apoptoz oranını arttırdığı anlaşılmıştır.

Akış sitometrisi cihazı kullanılarak miR-185-5p'nin BT-474 meme kanseri hücre apoptoz oranına olan etkisi incelenmiştir. Akış sitometrisi sonuçlarına göre BT-474 meme kanseri hücresine miR-185-5p uygulanması sonucunda kanserli hücrelerdeki apoptoz %9 oranında arttığı gözlemlenmiştir. Sun ve ark. yaptığı çalışmada da miR-27b-3p'in NCI-H446 ve A549 akciğer kanseri hücrelerine transfeksiyonu yapılmış ve ardından hücre apoptoz oranı akış sitometrisi cihazı yardımıyla belirlenmiştir. Akciğer kanseri hücrelerine miR-27b-3p transfeksiyonu ile bu kanserli hücrelerde oldukça yüksek bir oranda apoptoza rastlanmıştır (72). Bir diğer çalışmada A172 glioblastoma hücrelerinde miR-29b'nin apoptotik etkisi Shin ve ark. tarafından araştırılmıştır. miR-29b'nin A172 hücrelerine transfeksiyonunun ardından yapılan çalışmada A172 kanser hücrelerinin % 19.6'sının apoptoza girdiği akış sitometrisi cihazıyla belirlenmiştir (93). Li ve ark. tarafından yapılan çalışmada miR-15b'nin yumurtalık kanseri üzerindeki apoptotik etkisi incelenmiştir. Yumurtalık kanserine miR-15b transfeksiyonunun ardından kanserli hücrelerdeki apoptoz oranının kontrol grubuna göre neredeyse 2 kat arttığı gözlemlenmiştir (94). Farklı çalışmalardan ve bu tez kapsamında yapılan çalışmalardan da anlaşılacağı üzere miRNA'lar kanserli hücreleri üzerinde apoptotik etki göstermektedirler ve böylece tümör gelişimini baskılabilmektedirler.

Tez çalışmalarımızda hücre döngüsü deneyi yine akış sitometrisi cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Xu ve ark. miR-129'un prostat kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerindeki etkisi incelenmiştir (95). Çalışma sonucunda miR-129 transfeksiyonu yapılmış G1 fazındaki prostat kanseri hücre sayısının kontrol grubunda G1 fazında bulunan kanserli hücre sayısından yaklaşık olarak % 10 fazla olduğu belirlenmiştir. Böylece kanserli hücrelerin hücre bölünmesine girmesi engellenerek hücre çoğalmasında azalma meydana

gelmiştir (95). miRNA'ların kanserli hücrelerin hücre döngüsü üzerindeki etkisini araştıran bir diğer çalışma Wang ve ark.'larının yaptığı miR-1297'nin kolorektal kanseri hücrelerinin hücre döngüsü üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmadır. miR-129'un prostat kanseri hücrelerinin G1 fazında takılmasına neden olup ve hücrelerin S fazına geçmesini engelleyerek hücrenin bölünmesini baskıladığı ve bu sayede tümör gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (96). Zhang ve ark. U87 ve U251 insan glioblastoma hücrelerine miR-767-5p transfeksiyonu yaptıktan sonra akış sitometrisi cihazı kullanarak hücre döngüsü analizi gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada kontrol grubuna göre G1 fazında bulunan miR-767-5p transfekte olmuş U87 hücre oranının % 14 daha fazla olduğu gösterilmiştir. U251 hücresinde de yine miR-767-5p'ile muamele edilmiş U251 glioblastoma hücrelerinin G1 fazı oranı kontrol grubuna göre % 18.8 daha fazla olduğu belirtilmiştir. Kontrol gruplarına kıyasla miR-767-5p transfekte U87 hücrelerinde S fazındaki hücre oranı % 11.5 iken, miR-767-5p transfekte U251 hücrelerinde S fazındaki hücre oranı ise %6.4 olarak belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar ışığında miR-767-5p glioblastoma hücrelerinde hücre döngüsünü etkileyerek hücrenin bölünme aşamasına geçmesini engelleyebilmektedir ve böylece glioblastoma hücrelerinin çoğalmasını baskılayabilmektedir (97). Bu tez kapsamında yapılan BT-474 meme kanser hücrelerinde miR-185-5p'nin hücre döngüsü analiz sonuçlarına göre miR-185-5p transfekte olmuş hücrelerde kontrol grubuna göre G1 fazında bulunan hücre sayısının % 11.3 oranında daha fazla olduğu anlaşılmıştır. miR-185-5p BT-474 meme kanseri hücrelerinin G1 fazında durmasını sağlayarak hücre bölünmesini baskıladı ve böyle tümör gelişimini engellediği ortaya çıkarılmıştır.

Tez kapsamında qRT-PCR cihazı ile gerçekleştirilen analizlerde çalışılan hücrelere miR-185-5p transfeksiyonu sonrasında farklı apoptoz ilişkili genlerin seviyesindeki değişimlere bakılmıştır. Sonuçlar TNF, Kaspaz, BCL, Kinaz, TRAF gen ailelerine ait ve farklı fonksiyonel sınıflardaki apoptoz ilişkili genlerde ifade seviyelerinde değişimlerin olduğunu göstermiştir. Kaspaz ailesine ait *kaspaz 3* ifade seviyesinde artışın meme kanseri hücrelerine miR-148a transfeksiyonu ile sağlandığı Gao ve ark. tarafından yapılan çalışmada sonucunda ortaya çıkarılmıştır (98). Böylece hücrelerin apoptoza girmesi indüklenerek kanserli hücre proliferasyonunun baskılanması sağlanmıştır (98). Tarafımızca yapılan çalışmada da *kaspaz 3* geninin ifade seviyesinde miR-185-5p transfeksiyonu sonrasında yaklaşık 39 kat artış olduğu gözlemlenmiştir. Peng ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise meme kanseri hücrelerinde BCL ailesi üyelerinden *BCL2* ve *BAX* genlerinin ifade seviyelerindeki

değişim miR-1301-3p yukarı ifadesinin sağlanmasının ardından incelenmiştir. Sonuçlar *BCL2* geni ifadesinde azalma olduğunu gösterirken *BAX* geni ifadesinde ise artışın görüldüğünü ortaya çıkarmışlardır (99). Tarafımızca yapılan çalışmada da benzer bir sonuç elde edilmiş olup miR-185-5p transfeksiyonunun meme kanseri hücrelerinde *BCL2* gen seviyesinde 0.78 kat azalmaya neden olurken *BAX* geni seviyesinde 3.93 kat artışa neden olduğu gözlemlenmiştir.

miR-185-5p'nin olası aday geni biyoinformatik miRNA hedef tahmin araçları ile belirlenmiştir. Üç farklı biyoinformatik hedef tahmin araçlarında ortak olarak 3'UTR *BCL2* dizisinin miR-185-5p'nin çekirdek bölgesi ile eşleştiği görülmüştür. Elde edilen bu bilginin deneysel olarak da validasyonunun sağlanması amacıyla western blot ve lusiferaz deneyi yapılmıştır. Tain ve ark. yaptıkları çalışmada çoklu miyelom hücrelerinde miR-497'nin *BCL2* proteini seviyesine olan etkisini araştırmışlardır (100). Western blot analizi sonucunda miR-497 ile transfekte edilmiş miyelom hücrelerinde *BCL2* protein seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (100). Chen ve ark. miR-let7d-5p'yi yumurtalık kanseri hücrelerine transfeksiyonunu gerçekleştirdikten sonra *BCL2* protein seviyesindeki değişimi western blot yöntemiyle belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda miR-let7d-5p'nin yumurtalık kanseri hücrelerinde *BCL* protein seviyesinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (101). Fesler ve ark. HCT116 ve RKO kolon kanseri hücrelerinde miR-15a'nın *BCL2* protein seviyesine olan etkisini araştırmışlardır ve yaptıkları western blot analizi sonucunda miR-15a'nın HCT116 ve RKO hücrelerinde *BCL2* protein seviyesinde önemli oranda azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir (102). Tez kapsamında yapılan western blot deneyi sonuçlarında *BCL2* protein ifadesinin BT-474 meme kanseri hücrelerinde hücrelere miR-185-5p'nin transfeksiyonu ile yaklaşık 2 kat azaldığı görülmüştür. Elde edilen bu verilere göre miR-185-5p'nin BT-474 meme kanseri hücrelerinde *BCL2* genini hedefleyebileceği ortaya çıkarılmış ve böylece apoptozu indükleyerek hücre çoğalmasını baskılayabileceği anlaşılmıştır.

Apoptoz doku homeostazına yardımcı olan programlı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz hücrelerde intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere 2 yolak aracılığıyla düzenlenmektedir. *BCL2*'nin intrinsik yolak üzerinden hücrelerde apoptozu baskıladığı bilinmektedir (102,103). Yapılan son çalışmalarda, çeşitli kanser hücrelerinde miRNA aracılı *BCL2*'nin ifade seviyesinin azaltılması ile beraber apoptozun indüklenmesi

sağlanarak tümör gelişiminin baskılanabileceği anlaşılmıştır. Yu ve ark. gastrik kanser hücrelerinde miR-136'nın *BCL2*'yi hedefleyerek hücrelerin apoptotik yolağa girmesini sağladığını ortaya çıkarmışlardır (104). Bir diğer çalışma olarak Zhu ve ark. melanom hücrelerinde miR-365'nin *BCL2*'yi hedefleyip protein seviyesinde azalmaya neden olduğu ve böylece miR-365'in apoptotik yolağı indükleyerek hücre çoğalmasını baskıladığı görülmüştür (105). Benzer bir çalışma M4e larenks karsinom hücrelerinde Li ve ark. tarafından yapılmıştır (106). Yine kanserli hücrelere miR-34c transfeksiyonu ile beraber hücre canlılığının baskılandığı görülmüştür. Larenks karsinom hücrelerinde hücre canlılığının baskılanmasının altında yatan temel mekanizmanın ise miR-34c'nin *BCL2* protein seviyesinde azalmaya neden olup apoptozu aktifleştirmek olduğu saptanmıştır (106). MEG-01 lösemik hücrelerinde miR-15/16 ifadesinin olmadığı Pekarsky ve ark. tarafından yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır. Pekarsky ve ark. yaptıkları çalışmada miR-15/16'nın hücrelere dışarıdan vererek hücrelerde bu miRNA'nın ifade olmasını sağlamışlardır. Bu sayede miR-15/16 hücrede *BCL2*'yi direk olarak hedefleyip susturarak kanserli hücrelerin apoptozu girmesini sağlamıştır (107). Tarafımızca yapılan bu tez çalışmasında BT-474 hücrelerinde miR-185-5p'nin ifade seviyesinin artırılması 3'UTR *BCL2* dizisinde içeren raportör plazmidinin lusiferaz aktivitesini baskıladığını göstermiştir. Elde edilen tüm bu sonuçlar BT-474 hücrelerinde miR-185-5p'nin *BCL2* genini direk olarak hedeflediği göstermiş ve böylece miR-185-5p'nin BT-474 meme kanser hücre apoptozunu çarpıcı şekilde arttırdığı tarafımızca belirlenmiştir.

## 6.2. SONUÇ

Gerçekleştirilen tez kapsamında, BT-474 meme kanser hücresinde miR-185-5p'nin apoptoz üzerindeki potansiyel mekanizması araştırılmıştır. Elde edilen bulgular miR-185-5p'nin ifadesinde artış, *BCL2*'nin 3'UTR'sini doğrudan hedeflenerek apoptozun tetiklendiği ve böylece hücre çoğalmasının baskılandığını göstermiştir. Tamamlanan çalışmalar sonucunda usnik asitin *BCL2*'nin ifade seviyesinde azalmaya neden olmasının altında yatan temel mekanizmanın ise miR-185-5p aracılı olarak gerçekleştiği anlaşılmıştır. Elde edilen bu veriler ışığında miR-185-5p'nin BT-474 meme kanserinde tümör baskılayıcı olarak görev yapabileceğini ortaya çıkarılmıştır. Gelecekte meme kanseri tedavisinde potansiyel bir terapötik aday olarak görev yapabileceği belirlenmiştir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* 2015;5(10):2929–43.
2. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol.* 2010;23(S2):60–4.
3. Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin.* 2018;13(3):325–38.
4. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* 2018;5(2):77–106.
5. Tong CWS, Wu M, Cho WCS, To KKW. Recent Advances in the treatment of breast cancer. *Front Oncol.* 2018;8(227):26–36.
6. Ahmed Wahba H, Ahmed El-Hadaad H. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med.* 2015;12(122):106–16.
7. Heiser LM, Sadanandam A, Kuo W-L, Benz SC, Goldstein TC, Ng S, et al. Subtype and pathway specific responses to anticancer compounds in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(8):2724–9.
8. Nagini S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer Agents Med Chem.* 2017;17(2):152–63.
9. Wang W, Luo Y. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. *J Zhejiang Univ B.* 2015;16(1):18–31.
10. Zaleska K. MiRNA - Therapeutic tool in breast cancer? Where are we now? *Reports Pract Oncol Radiother.* 2015;20(2):79–86.
11. Jurmeister S, Baumann M, Balwierz A, Keklikoglou I, Ward A, Uhlmann S, et al. MicroRNA-200c Represses Migration and Invasion of Breast Cancer Cells by Targeting Actin-Regulatory Proteins FHOD1 and PPM1F. *Mol Cell Biol.*

2012;32(3):633–51.

12. Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem.* 2007;282(2):1479–86.
13. Mehrgou A, Akouchekian M. Therapeutic impacts of microRNAs in breast cancer by their roles in regulating processes involved in this disease. *J Res Med Sci.* 2017;22.
14. Kong W, He L, Richards EJ, Challa S, Xu CX, Permuth-Wey J, et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene.* 2014;33:679–89.
15. Kilic N, Islakoglu YO, Buyuk A, Gur-Dedeoglu B, Cansaran-Duman D. Determination of Usnic Acid Responsive miRNAs in Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem.* 2018;18.
16. Lodish HF. *Molecular Cell Biology.* Vol. 29, Biochemistry and Molecular Biology Education. 2001. 126–128 p.
17. Snustad DP, Simmons MJ. *Genetics.* 6th ed. WILEY; 2012.
18. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 5th ed. Garland Science; 2008.
19. Weinberg RA. *The Biology of Cancer.* 2nd ed. Garland-Norton; 2014.
20. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Hücrenin Moleküler Biyolojisi.* 4th ed. Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi Yayınları; 2009.
21. Zhu K, Liu Q, Zhou Y, Tao C, Zhao Z, Sun J, et al. Oncogenes and tumor suppressor genes: Comparative genomics and network perspectives. *BMC Genomics.* 2015;16(7):1–11.
22. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. *Introduction to genetic analysis.* 7th ed. New York: W. H. Freeman; 2000.



23. Hejmadi M. Introduction to Cancer Biology. 2nd ed. Bookboon; 2010.
24. Chial H. Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. Nat Educ. 2008;1(1).
25. Pazarbası A, Kasap M. Kanser Genetiği. 2003;12:328–40.
26. Kopnin B. Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors, key for mechanism of carcinogenesis. Biochemistry. 2000;65(1):2–27.
27. Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert Š. Ras oncogenes and their downstream targets. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2007;1773(8):1177–95.
28. Harris H, Miller O, Klein G, Worst P. Suppression of Malignancy by Cell Fusion. Nature. 1969;223:363–8.
29. Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd ed. Sinauer Associates Inc; 2000.
30. Chial H. Tumor Suppressor ( TS ) Genes and the Two-Hit Hypothesis. Nat Educ. 2008;1(1):177.
31. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646–74.
32. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. Nat Rev Genet. 2005;6(8):611–22.
33. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for Making Human Tumor Cells. N Engl J Med. 2002;347(20):1593–603.
34. Amin ARM, Karpowicz PA, Carey TE, Arbiser J, Nahta R, Chen ZG, et al. Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. Semin Cancer Biol. 2015;35:S55–77.
35. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the Hallmarks of Cancer. Am J Cancer Res. 2017;7(5):1016–36.
36. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. Vasc

- Health Risk Manag. 2006;2(3):213–9.
37. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*. 2003;22(42):6549–56.
  38. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. *Crit Revs Oncol*. 2013;18:43–73.
  39. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
  40. Rakha E, Reis-Filho J, Baehner F, Dabbs D, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer Res*. 2010;12(4):207.
  41. Eliyatkin N, Yalcin E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J Breast Heal*. 2015;11(2):59–66.
  42. Toole SAO, Beith JM, Millar EKA, West R, Mclean A, Cazet A, et al. Therapeutic targets in triple negative breast cancer. *J Clin Pathol*. 2013;66:530–42.
  43. Koçak S, Çelik L, Özbaş S, Sak SD, Tükün A, Yalçın B. Meme Kanserinde Risk Faktörleri Riski Değerlendirilmesi Ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu. *J Breast Heal*. 2011;7(2):47–67.
  44. Toss A, Cristofanilli M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015;17(60):1–11.
  45. Musgrove EA, Sutherland R. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:631–43.
  46. Eroglu Z, Tagawa T, Somlo G. Human Epidermal Growth Factor Receptor Family-Targeted Therapies in the Treatment of HER2-Overexpressing Breast Cancer. *Oncologist*. 2014;19:135–50.

47. Iii HAB, Hurwitz HI, Dees EC, Dowlati A, Blackwell KL, Neil BO, et al. Phase I Safety , Pharmacokinetics , and Clinical Activity Study of Lapatinib ( GW572016 ), a Reversible Dual Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases , in Heavily Pretreated Patients With Metastatic Carcinomas. 2005;23(23):5305–13.
48. Koparal T. Anti-angiogenic and antiproliferative properties of the lichen substances ( - ) -usnic acid and vulpinic acid. *Zeitschrift für Naturforsch C*. 2015;70(5–6):159–64.
49. Cocchietto M, Skert N, Luigi P, Sava G. A review on usnic acid , an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*. 2002;89:137–46.
50. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, et al. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An In Vitro Study. *Phyther Res*. 2013;27(3):431–7.
51. Geng X, Zhang X, Zhou B, Zhang C, Tu J, Chen X, et al. Usnic Acid Induces Cycle Arrest , Apoptosis , and Autophagy in Gastric Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Med Sci Monit*. 2018;24:556–66.
52. Song Y, Dai F, Zhai D, Dong Y, Zhang J, Lu B, et al. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. *Angiogenesis*. 2012;15(3):421–32.
53. Zuo S, Wang L, Zhang Y, Zhao D, Li Q, Shao D, et al. Usnic acid induces apoptosis via an ROS-dependent mitochondrial pathway in human breast cancer cells in vitro and in vivo. *R Soc Chem*. 2015;(1).
54. Mayer M, O’Neill M, Murray K, Santos-Magalhães N, Carneiro-Leão AM, Thompson A, et al. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anticancer Drugs*. 2005;16(8):805–9.
55. Gutschner T, Diederichs S, Rna K. A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*. 2012;9(6):703–19.
56. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642–55.

57. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843–54.
58. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403:901–6.
59. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Nature*. 2016;
60. Macfarlane L, Murphy PR. MicroRNA : Biogenesis , Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010;11:537–61.
61. Bartel DP. Review MicroRNAs : Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009;136:215–33.
62. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS*. 2002;99(24):13–8.
63. Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, Webster K, Ng C, et al. MicroRNA-Antagonism Regulates Breast Cancer Stemness and Metastasis via. *Cell*. 2013;154:311–24.
64. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol*. 2012;226:352–64.
65. Planas-Silva M, Weinberg R. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:768–772.
66. Nigg E. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:21–31.
67. Chow A. Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors : Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nat Educ*. 2010;3(9).
68. Yang S, Mao Y, Zhang H, Xu Y, An J, Huang Z. The chemical biology of apoptosis: Revisited after 17 years. *Eur J Med Chem*. 2019;177:63–75.

69. Wong RSY. Apoptosis in cancer : from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(87).
70. Susan E. Apoptosis: A Reveiw of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):496–516.
71. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implicatons in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239–57.
72. Sun Y, Xu T, Cao Y, Ding X. Antitumor effect of miR-27b-3p on lung cancer cells via targeting Fzd7. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21:4113–23.
73. Tan W, Liu B, Qu S, Liang G, Luo W, Gong C. MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy (Review). *Oncol Lett.* 2018;15(3):2735–42.
74. Torun V. Meme kanseri tedavisinde miR-185-5p'nin etkinliğinin proteomik yaklaşımla belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Temmuz 2019.
75. Hu X, Wang JIE, He WAN, Zhao PAN, Ye C. MicroRNA-433 targets AKT3 and inhibits cell proliferation and viability in breast cancer. *Oncol Lett.* 2018;15:3998–4004.
76. Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya A, et al. MicroRNA-520 / 373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- $\kappa$ B and TGF- $\beta$  signaling pathways. *Oncogene.* 2012;31:4150–63.
77. Yin C, Zhang G, Sun R, Pan X, Wang X, Li H, et al. miR - 185 - 5p inhibits F - actin polymerization and reverses epithelial mesenchymal transition of human breast cancer cells by modulating RAGE. *Mol Med Rep.* 2018;18:2621–30.
78. BR C. MicroRNAs as mediators of viral evasions of the immun system. *Nat Immunol.* 2013;14:205–10.
79. Torun V, Değerli E, Cansaran-Duman D. A promising role of lichens for early

- detection and their secondary metabolites on treatment of cancer disease after exposure to carcinogenic heavy metals. In: *Phytoremediation*. 2019. p. 203–14.
80. Munshi A, Mohan V, Yr A. Non-Coding RNAs : A Dynamic and Complex Network of Gene Regulation. *J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics*. 2016;7(1):1–11.
  81. Jansson M, Lund A. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol*. 2012;6:590–610.
  82. Han S, Zou H, Lee J, Han J, Kim HC, Cheol JJ, et al. miR-1307-3p Stimulates Breast Cancer Development and Progression by Targeting SMYD4. *J Cancer*. 2019;10:441–8.
  83. Zou Q, Yi W, Huang J, Fu F, Chen G, Zhong D. MicroRNA-375 targets PAX6 and inhibits the viability , migration and invasion of human breast cancer MCF-7 cells. *Exp Ther Med*. 2017;14:1198–204.
  84. Ji Z, Han S, Xing Y. Overexpression of miR-3196 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis through targeting ERBB3 in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22:8383–90.
  85. Klinge CM. miRNAs regulated by estrogens, tamoxifen, and endocrine disruptors and their downstream gene targets. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;15(3):273–97.
  86. Chen N, Chon HS, Xiong Y, Marchion DC, Judson PL, Hakam A, et al. Human cancer cell line microRNAs associated with in vitro sensitivity to paclitaxel. *Oncol Rep*. 2014;31:376–83.
  87. Dinçsoy AB, Duman DC. Changes in apoptosis-related gene expression profiles in cancer cell lines exposed to usnic acid lichen secondary metabolite. *Turkish J Biol*. 2017;41:484–93.
  88. Emsen B, Turkez H, Joughi AT, Kaya A. The anti - cancer efficacies of diffractaic , lobaric , and usnic acid : In vitro inhibition of glioma. *J Cancer Res Ther*. 2016;941–51.
  89. Nguyen TT, Yoon S, Yang Y, Lee H, Oh S, Jeong M, et al. Lichen Secondary

Metabolites in *Flavocetraria cucullata* Exhibit Anti-Cancer Effects on Human Cancer Cells through the Induction of Apoptosis and Suppression of Tumorigenic Potentials. *PLoS One*. 2014;9(10):1–14.

90. Singh N, Nambiar D, Kale R, Singh R. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. *Nutr Cancer*. 2013;65:36–43.
91. Yang Y, Nguyen TT, Jeong M, Cri F, Yu YH. Inhibitory Activity of (+)-Usnic Acid against non-small cell lung cancer cell motility. *PLoS One*. 2016;1–16.
92. Song Y, Dai F, Zhai D, Dong Y, Zhang J, Lu B, et al. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. *Angiogenesis*. 2012;15(3):421–432.
93. Shin J, Shim HG, Hwang T, Kim H, Kang SH, Dho YS, et al. Restoration of miR - 29b exerts anti - cancer effects on glioblastoma. *Cancer Cell Int*. 2017;17(104):1–9.
94. Li GC, Wang YS, Wang H, Li Y, Qiu Y, Cui S, et al. Upregulated microRNA - 15b alleviates ovarian cancer through inhibition of the PI3K / Akt pathway by targeting LPAR3. *Cell Physiol*. 2019;1–12.
95. Xu S, Ge J, Zhang Z, Zhou W. MiR-129 inhibits cell proliferation and metastasis by targeting ETS1 via PI3K / AKT / mTOR pathway in prostate cancer. *Biomed Pharmacother*. 2017;96:634–41.
96. Wang Y, Xue J, Kuang H, Zhou X, Liao L, Yin F. microRNA-1297 Inhibits the Growth and Metastasis. *DNA Cell Biol*. 2017;36(11):991–9.
97. Zhang J, Xu S, Xu JIA, Li Y, Zhang JIE. miR - 767 - 5p inhibits glioma proliferation and metastasis by targeting SUZ12. *Oncol Rep*. 2019;1–12.
98. Gao W, Ge S, Sun J. Ailanthone exerts anticancer effect by up-regulating miR-148a expression in MDA-MB-231 breast cancer cells and inhibiting proliferation, migration and invasion. *Biomed Pharmacother*. 2019;109(42):1062–9.

99. Peng X, Yan B, Shen Y. MiR-1301-3p inhibits human breast cancer cell proliferation by regulating cell cycle progression and apoptosis through directly targeting ICT1. *Breast Cancer*. 2018;
100. Tian F, Zhan Y, Zhu W, Li J, Tang M, Xiaohui C, et al. MicroRNA-497 inhibits multiple myeloma growth and increases susceptibility to bortezomib by targeting Bcl-2. *Int J Mol Med*. 2019;43(2):1058–66.
101. Chen YANNAN, Ren CC, Yang LI, Nai MANMAN, XU Y-M, ZHANG F, et al. MicroRNA let - 7d - 5p rescues ovarian cancer cell apoptosis and restores chemosensitivity by regulating the p53 signaling pathway via HMGA1. *Int J Oncol*. 2019;54:1771–84.
102. Fesler A, Liu H, Ju J. Modified miR-15a has therapeutic potential for improving treatment of advanced stage colorectal cancer through inhibition of BCL2, BMI1, YAP1 and DCLK1. *Oncotarget*. 2018;9(2):2367–83.
103. Martínez-Arribas F, Alvarez T, Del Val G, Martín-Garabato E, Núñez-Villar MJ, Lucas R, et al. Bcl-2 expression in breast cancer: A comparative study at the mRNA and protein level. *Anticancer Res*. 2007;27:219–22.
104. Yu L, Zhou G-Q, Li D-C. MiR-136 triggers apoptosis in human gastric cancer cells by targeting AEG-1 and BCL2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(21):7251–6.
105. Zhu Y, Wen X, Zhao P. MicroRNA-365 Inhibits Cell Growth and Promotes Apoptosis in Melanoma by Targeting BCL2 and Cyclin D1 (CCND1). *Med Sci Monit*. 2018;24:3679–92.
106. Li R, Zhang H, Zheng X. MiR-34c induces apoptosis and inhibits the viability of M4e cells by targeting BCL2. *Oncol Lett*. 2018;15(3):3357–61.
107. Pekarsky Y, Balatti V, Croce CM. BCL2 and miR-15/16: From gene discovery to treatment. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):21–6.



## 8. EKLER

miR-185-5p'nin BT-474 meme kanseri hücresinde apoptoz ilişkili genlerin gen ifade seviyesinde olan değişimi belirlemek için qRT-PCR analizi yapılmıştır. qRT-PCR analizinde kullanılan primerlerin ve hedef genlerin bulunduğu 96 kuyulu Apoptoz Panelindeki gen listesi ekte verilmiştir (EK-1).

DIANA, miRDB ve miRSystem araçlarında ortak olarak bulunan miR-185-5p'nin hedef genlerinin listesi ekte verilmiştir (EK-2).

Western Blot sonuçlarına ait tam jel görüntüleri ekte verilmiştir (EK-3).

### EK-1: Apoptoz Panelindeki Genlerin İsim Listesi

Kuyu	Sembol	İsim
A1	<i>APAF1</i>	Apoptotic protease activating factor
A2	<i>ATM</i>	Ataxia telangiectasia mutated
A3	<i>BAG1</i>	BCL2-associated athanogene
A4	<i>BAG3</i>	BCL2-associated athanogene 3
A5	<i>BAG4</i>	BCL2-associated athanogene 4
A6	<i>BAK1</i>	BCL2-antagonist/killer 1
A7	<i>BAX</i>	BCL2-associated X protein
A8	<i>BCL10</i>	B-cell CLL/lymphoma 10
A9	<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2
A10	<i>BCL2A1</i>	BCL2-related protein A1
A11	<i>BCL2L1</i>	BCL2-like 1
A12	<i>BCL2L11</i>	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
B1	<i>BCL2L2</i>	BCL2-like 2
B2	<i>BFAR</i>	Bifunctional apoptosis regulator
B3	<i>BIK</i>	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
B4	<i>BIRC1</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 1
B5	<i>BIRC2</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 2
B6	<i>BIRC3</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 3
B7	<i>BIRC4</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 4

B8	<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
B9	<i>BIRC6</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)
B10	<i>BNIP3</i>	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
B11	<i>BRE</i>	Brain and reproductive organ-expressed
B12	<i>BOK</i>	BCL2-related ovarian killer
C1	<i>CASP1</i>	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease
C2	<i>CASP10</i>	Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease
C3	<i>CASP4</i>	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
C4	<i>CASP2</i>	Caspase 2, apoptosis-related cysteine protease
C5	<i>CASP3</i>	Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease
C6	<i>CASP5</i>	Caspase 5, apoptosis-related cysteine protease
C7	<i>CASP6</i>	Caspase 6, apoptosis-related cysteine protease
C8	<i>CASP7</i>	Caspase 7, apoptosis-related cysteine protease
C9	<i>CASP8</i>	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease
C10	<i>CASP8AP2</i>	CASP8 associated protein 2
C11	<i>CFLAR</i>	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
C12	<i>CHEK1</i>	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
D1	<i>CHEK2</i>	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)
D2	<i>CIDEA</i>	Cell death-inducing DFFA-like effector a
D3	<i>CIDEB</i>	Cell death-inducing DFFA-like effector b
D4	<i>CRADD</i>	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor
D5	<i>DAPK1</i>	Death-associated protein kinase 1
D6	<i>DAPK2</i>	Death-associated protein kinase 2
D7	<i>DFFA</i>	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
D8	<i>DFFB</i>	DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide
D9	<i>FADD</i>	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
D10	<i>GADD45A</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
D11	<i>HRK</i>	Harakiri, BCL2 interacting protein
D12	<i>LTBR</i>	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
E1	<i>MCL1</i>	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
E2	<i>MYD88</i>	Myeloid differentiation primary response gene (88)

E3	<i>CARD4</i>	Caspase recruitment domain family, member 4
E4	<i>FAS</i>	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
E5	<i>RIPK2</i>	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2
E6	<i>RPA3</i>	Replication protein A3, 14kDa
E7	<i>TANK</i>	TRAF family member-associated NFkB activator
E8	<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
E9	<i>TNFRSF10A</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
E10	<i>TNFRSF10B</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
E11	<i>TNFRSF10C</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c
E12	<i>TNFRSF10D</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d
F1	<i>TNFRSF11B</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
F2	<i>TNFRSF17</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17
F3	<i>TNFRSF1A</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
F4	<i>TNFRSF21</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
F5	<i>CD40</i>	CD40 antigen (TNF receptor superfamily member 5)
F6	<i>TNFRSF8</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
F7	<i>TNFRSF9</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
F8	<i>TNFSF10</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
F9	<i>TNFSF11</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
F10	<i>TNFSF13</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12
F11	<i>TNFSF13B</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
F12	<i>TNFSF15</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15
G1	<i>TNFSF18</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18
G2	<i>TNFSF4</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
G3	<i>CD40LG</i>	CD40 ligand (TNF superfamily, member 5)
G4	<i>FASLG</i>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
G5	<i>TNFSF7</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7
G6	<i>TNFSF8</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
G7	<i>TNFSF9</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
G8	<i>TP53</i>	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
G9	<i>TP73L</i>	Tumor protein p73-like

G10	<i>TRAF1</i>	TNF receptor-associated factor 1
G11	<i>TRAF2</i>	TNF receptor-associated factor 2
G12	<i>TRAF3</i>	TNF receptor-associated factor 3
H1	<i>TRAF4</i>	TNF receptor-associated factor 4
H2	<i>TRAF5</i>	TNF receptor-associated factor 5
H3	<i>TRAF6</i>	TNF receptor-associated factor 6
H4	<i>TRIP</i>	TRAF interacting protein
H5	<i>ACTB</i>	Actin, beta
H6	<i>B2M</i>	Beta-2-microglobulin
H7	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H8	<i>GUSB</i>	Glucuronidase, beta
H9	<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H10	<i>PGK</i>	Phosphoglycerate kinase 1
H11	<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A
H12	<i>RPL13A</i>	Ribosomal protein L13a

**EK-2: DIANA, miRDB ve miRSystem araçlarında 456 adet ortak olan miR-185-5p'nin hedef gen listesi**

<b>SEMBOL</b>	<b>İSİM</b>
<i>SMG7</i>	SMG7, nonsense mediated mRNA decay factor
<i>SLC16A2</i>	solute carrier family 16 member 2
<i>SOX13</i>	SRY-box 13
<i>HP1BP3</i>	heterochromatin protein 1 binding protein 3
<i>PCDHA8</i>	protocadherin alpha 8
<i>PCDHAC1</i>	protocadherin alpha subfamily C, 1
<i>DLG2</i>	discs large MAGUK scaffold protein 2
<i>PCDHAC2</i>	protocadherin alpha subfamily C, 2
<i>PCDHA13</i>	protocadherin alpha 13
<i>PCDHA10</i>	protocadherin alpha 10
<i>PCDHA5</i>	protocadherin alpha 5
<i>PCDHA6</i>	protocadherin alpha 6
<i>PCDHA11</i>	protocadherin alpha 11
<i>PCDHA3</i>	protocadherin alpha 3
<i>PCDHA9</i>	protocadherin alpha 9
<i>ZNF704</i>	zinc finger protein 704
<i>RAE1</i>	ribonucleic acid export 1
<i>PCDHA4</i>	protocadherin alpha 4
<i>ABCG4</i>	ATP binding cassette subfamily G member 4
<i>PCDHA1</i>	protocadherin alpha 1
<i>PCDHA7</i>	protocadherin alpha 7
<i>PCDHA2</i>	protocadherin alpha 2
<i>CA10</i>	carbonic anhydrase 10
<i>PCDHA12</i>	protocadherin alpha 12
<i>TUBGCP3</i>	tubulin gamma complex associated protein 3
<i>ARID1A</i>	AT-rich interaction domain 1A

<i>RAB35</i>	RAB35, member RAS oncogene family
<i>ZNF236</i>	zinc finger protein 236
<i>PAK6</i>	p21 (RAC1) activated kinase 6
<i>ADH4</i>	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide
<i>FCRL3</i>	Fc receptor like 3
<i>SGMS1</i>	sphingomyelin synthase 1
<i>MSI1</i>	musashi RNA binding protein 1
<i>PREPL</i>	prolyl endopeptidase like
<i>HIC2</i>	HIC ZBTB transcriptional repressor 2
<i>CDC42</i>	cell division cycle 42
<i>TOX3</i>	TOX high mobility group box family member 3
<i>GPR84</i>	G protein-coupled receptor 84
<i>SIX1</i>	SIX homeobox 1
<i>SLC8A1</i>	solute carrier family 8 member A1
<i>LYN</i>	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase
<i>SRGAP2</i>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2
<i>ATXN1</i>	ataxin 1
<i>PALM2</i>	paralemmin 2
<i>TBC1D5</i>	TBC1 domain family member 5
<i>MS4A2</i>	membrane spanning 4-domains A2
<i>CSRNP2</i>	cysteine and serine rich nuclear protein 2
<i>BASP1</i>	brain abundant membrane attached signal protein 1
<i>TCP1</i>	t-complex 1
<i>RHOA</i>	ras homolog family member A
<i>MECP2</i>	methyl-CpG binding protein 2
<i>KANK2</i>	KN motif and ankyrin repeat domains 2
<i>GNB3</i>	G protein subunit beta 3
<i>KLHL29</i>	kelch like family member 29
<i>ELOVL4</i>	ELOVL fatty acid elongase 4
<i>PCDH9</i>	protocadherin 9
<i>RERE</i>	arginine-glutamic acid dipeptide repeats

<i>PBX2</i>	PBX homeobox 2
<i>ZCCHC12</i>	zinc finger CCHC-type containing 12
<i>KIAA1328</i>	KIAA1328
<i>CCNL2</i>	cyclin L2
<i>SNAP25</i>	synaptosome associated protein 25
<i>KPRP</i>	keratinocyte proline rich protein
<i>PCDH10</i>	protocadherin 10
<i>SLC30A3</i>	solute carrier family 30 member 3
<i>ATP6V1F</i>	ATPase H <sup>+</sup> transporting V1 subunit F
<i>GRIN2B</i>	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B
<i>XYLT1</i>	xylosyltransferase 1
<i>NMNAT2</i>	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2
<i>CXCL9</i>	C-X-C motif chemokine ligand 9
<i>NPNT</i>	nephronectin
<i>NFATC3</i>	nuclear factor of activated T cells 3
<i>PRKAR2A</i>	protein kinase cAMP-dependent type II regulatory subunit alpha
<i>RNF20</i>	ring finger protein 20
<i>AKAP6</i>	A-kinase anchoring protein 6
<i>SPTB</i>	spectrin beta, erythrocytic
<i>YWHAG</i>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma
<i>PM20D1</i>	peptidase M20 domain containing 1
<i>SOX5</i>	SRY-box 5
<i>SCD</i>	stearoyl-CoA desaturase
<i>RHOT1</i>	ras homolog family member T1
<i>SPATA2</i>	spermatogenesis associated 2
<i>PXT1</i>	peroxisomal testis enriched protein 1
<i>GJA1</i>	gap junction protein alpha 1
<i>GJA5</i>	gap junction protein alpha 5
<i>DOCK3</i>	dedicator of cytokinesis 3
<i>LHX2</i>	LIM homeobox 2

<i>KCNN3</i>	potassium calcium-activated channel subfamily N member 3
<i>CD209</i>	CD209 molecule
<i>CGN</i>	cingulin
<i>TMEM139</i>	transmembrane protein 139
<i>MON1B</i>	MON1 homolog B, secretory trafficking associated
<i>FZD4</i>	frizzled class receptor 4
<i>PATZ1</i>	POZ/BTB and AT hook containing zinc finger 1
<i>PIMI1</i>	Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
<i>PHLDB1</i>	pleckstrin homology like domain family B member 1
<i>KLK5</i>	kallikrein related peptidase 5
<i>CNTD1</i>	cyclin N-terminal domain containing 1
<i>ARF3</i>	ADP ribosylation factor 3
<i>CACNG4</i>	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 4
<i>SYNM</i>	synemin
<i>SSTR2</i>	somatostatin receptor 2
<i>BCAT1</i>	branched chain amino acid transaminase 1
<i>MS4A3</i>	membrane spanning 4-domains A3
<i>CCND2</i>	cyclin D2
<i>CPNE6</i>	copine 6
<i>NR1D1</i>	nuclear receptor subfamily 1 group D member 1
<i>MAT2A</i>	methionine adenosyltransferase 2A
<i>HOOK3</i>	hook microtubule tethering protein 3
<i>TCF12</i>	transcription factor 12
<i>LRRC32</i>	leucine rich repeat containing 32
<i>LPCAT3</i>	lysophosphatidylcholine acyltransferase 3
<i>EPB41L1</i>	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 1
<i>ANKFY1</i>	ankyrin repeat and FYVE domain containing 1
<i>FOXP4</i>	forkhead box P4
<i>CHMP7</i>	charged multivesicular body protein 7
<i>SLC25A28</i>	solute carrier family 25 member 28
<i>SPATS2</i>	spermatogenesis associated serine rich 2



<i>ANKRD45</i>	ankyrin repeat domain 45
<i>DYNLL2</i>	dynein light chain LC8-type 2
<i>ATP1A3</i>	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting subunit alpha 3
<i>TAP2</i>	transporter 2, ATP binding cassette subfamily B member
<i>PGLYRP4</i>	peptidoglycan recognition protein 4
<i>AFAP1L2</i>	actin filament associated protein 1 like 2
<i>MLLT11</i>	MLLT11, transcription factor 7 cofactor
<i>ZNF473</i>	zinc finger protein 473
<i>TTBK1</i>	tau tubulin kinase 1
<i>UBXN10</i>	UBX domain protein 10
<i>FBXO41</i>	F-box protein 41
<i>PARP11</i>	poly(ADP-ribose) polymerase family member 11
<i>HDX</i>	highly divergent homeobox
<i>EPHB2</i>	EPH receptor B2
<i>SREBF2</i>	sterol regulatory element binding transcription factor 2
<i>SIGLEC1</i>	sialic acid binding Ig like lectin 1
<i>DCTN3</i>	dynactin subunit 3
<i>HOPX</i>	HOP homeobox
<i>FAM76A</i>	family with sequence similarity 76 member A
<i>INTS6</i>	integrator complex subunit 6
<i>SF1</i>	splicing factor 1
<i>DCX</i>	doublecortin
<i>RIC8B</i>	RIC8 guanine nucleotide exchange factor B
<i>BSN</i>	bassoon presynaptic cytomatrix protein
<i>FAM135B</i>	family with sequence similarity 135 member B
<i>TAF5L</i>	TATA-box binding protein associated factor 5 like
<i>PMF1</i>	polyamine modulated factor 1
<i>PHF21A</i>	PHD finger protein 21A
<i>HCN4</i>	hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 4
<i>EIF4EBP2</i>	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2

<i>RNASE9</i>	ribonuclease A family member 9 (inactive)
<i>MXRA5</i>	matrix remodeling associated 5
<i>SEC22A</i>	SEC22 homolog A, vesicle trafficking protein
<i>PCP4</i>	Purkinje cell protein 4
<i>APH1A</i>	aph-1 homolog A, gamma-secretase subunit
<i>GBA2</i>	glucosylceramidase beta 2
<i>DTNA</i>	dystrobrevin alpha
<i>ELMO1</i>	engulfment and cell motility 1
<i>FIZ1</i>	FLT3 interacting zinc finger 1
<i>MYADM</i>	myeloid associated differentiation marker
<i>SETD5</i>	SET domain containing 5
<i>IL2RA</i>	interleukin 2 receptor subunit alpha
<i>FBXL20</i>	F-box and leucine rich repeat protein 20
<i>SPTBN1</i>	spectrin beta, non-erythrocytic 1
<i>SET</i>	SET nuclear proto-oncogene
<i>CDH23</i>	cadherin related 23
<i>ZNF37A</i>	zinc finger protein 37A
<i>PTPN13</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13
<i>COCH</i>	cochlin
<i>PITPNA</i>	phosphatidylinositol transfer protein alpha
<i>CACNB1</i>	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta 1
<i>AGPAT3</i>	ATP binding cassette subfamily A member 3
<i>FKTN</i>	fukutin
<i>ZADH2</i>	zinc binding alcohol dehydrogenase domain containing 2
<i>GNRHR</i>	gonadotropin releasing hormone receptor
<i>CCDC97</i>	coiled-coil domain containing 97
<i>OPCML</i>	opioid binding protein/cell adhesion molecule like
<i>PLEKHB1</i>	pleckstrin homology domain containing B1
<i>PRSS16</i>	serine protease 16
<i>LARPI</i>	La ribonucleoprotein domain family member 1
<i>MEX3A</i>	mex-3 RNA binding family member A

<i>SARIA</i>	secretion associated Ras related GTPase 1A
<i>BRPF3</i>	bromodomain and PHD finger containing 3
<i>CNTN2</i>	contactin 2
<i>ASTN2</i>	astrotactin 2
<i>GPX6</i>	glutathione peroxidase 6
<i>ARFIP2</i>	ADP ribosylation factor interacting protein 2
<i>ANKRD17</i>	ankyrin repeat domain 17
<i>GLYAT</i>	glycine-N-acyltransferase
<i>CAMK2D</i>	calcium/calmodulin dependent protein kinase II delta
<i>NR6A1</i>	nuclear receptor subfamily 6 group A member 1
<i>CLEC4M</i>	C-type lectin domain family 4 member M
<i>CAPZB</i>	capping actin protein of muscle Z-line subunit beta
<i>THRA</i>	thyroid hormone receptor alpha
<i>SBK1</i>	SH3 domain binding kinase 1
<i>MYBL1</i>	MYB proto-oncogene like 1
<i>TEAD1</i>	TEA domain transcription factor 1
<i>SLC7A1</i>	solute carrier family 7 member 1
<i>BEND4</i>	BEN domain containing 4
<i>TMEM182</i>	transmembrane protein 182
<i>DGKB</i>	diacylglycerol kinase beta
<i>ZFP1</i>	ZFP1 zinc finger protein
<i>GRM6</i>	glutamate metabotropic receptor 6
<i>URM1</i>	ubiquitin related modifier 1
<i>GEMIN8</i>	gem nuclear organelle associated protein 8
<i>RAB15</i>	RAB15, member RAS oncogene family
<i>NEK6</i>	NIMA related kinase 6
<i>CKAP2</i>	cytoskeleton associated protein 2
<i>SSBP2</i>	single stranded DNA binding protein 2
<i>GRB2</i>	growth factor receptor bound protein 2
<i>ZMIZ1</i>	zinc finger MIZ-type containing 1
<i>ZNF385A</i>	zinc finger protein 385A

<i>SNAPC3</i>	small nuclear RNA activating complex polypeptide 3
<i>LUZP1</i>	leucine zipper protein 1
<i>IKZF4</i>	IKAROS family zinc finger 4
<i>SNTB2</i>	syntrophin beta 2
<i>SPIN3</i>	spindlin family member 3
<i>NOVA2</i>	NOVA alternative splicing regulator 2
<i>ZBTB5</i>	zinc finger and BTB domain containing 5
<i>PCLO</i>	piccolo presynaptic cytomatrix protein
<i>CTSK</i>	cathepsin K
<i>GLUD2</i>	glutamate dehydrogenase 2
<i>RAPH1</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1
<i>KRT2</i>	keratin 2
<i>LZTFL1</i>	leucine zipper transcription factor like 1
<i>PDS5B</i>	PDS5 cohesin associated factor B
<i>SIN3A</i>	SIN3 transcription regulator family member A
<i>RRAS2</i>	RAS related 2
<i>GAS7</i>	growth arrest specific 7
<i>ZC3H11A</i>	zinc finger CCCH-type containing 11A
<i>F13A1</i>	coagulation factor XIII A chain
<i>FOXJ2</i>	forkhead box J2
<i>CD84</i>	CD84 molecule
<i>DSC1</i>	desmocollin 1
<i>NCOA2</i>	nuclear receptor coactivator 2
<i>PAX2</i>	paired box 2
<i>EHMT2</i>	euchromatic histone lysine methyltransferase 2
<i>MAGI1</i>	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1
<i>SLC17A7</i>	solute carrier family 17 member 7
<i>SLC13A3</i>	solute carrier family 13 member 3
<i>BEND3</i>	BEN domain containing 3

<i>PRRT2</i>	proline rich transmembrane protein 2
<i>VTI1A</i>	vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1A
<i>OAS3</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3
<i>ITGB3</i>	integrin subunit beta 3
<i>ANKRD34A</i>	ankyrin repeat domain 34A
<i>PPM1L</i>	protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent 1L
<i>GOLPH3L</i>	golgi phosphoprotein 3 like
<i>VGLL3</i>	vestigial like family member 3
<i>EIF4B</i>	eukaryotic translation initiation factor 4B
<i>CDC14B</i>	cell division cycle 14B
<i>BTG2</i>	BTG anti-proliferation factor 2
<i>SYPL2</i>	synaptophysin like 2
<i>PRKAB2</i>	protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 2
<i>MNT</i>	MAX network transcriptional repressor
<i>RBM15B</i>	RNA binding motif protein 15B
<i>MCHR1</i>	melanin concentrating hormone receptor 1
<i>RABL3</i>	RAB, member of RAS oncogene family like 3
<i>GPR26</i>	G protein-coupled receptor 26
<i>ZSCAN22</i>	zinc finger and SCAN domain containing 22
<i>SORT1</i>	sortilin 1
<i>MCCCI</i>	methylcrotonoyl-CoA carboxylase 1
<i>PEX19</i>	peroxisomal biogenesis factor 19
<i>FAIM2</i>	Fas apoptotic inhibitory molecule 2
<i>RNF165</i>	ring finger protein 165
<i>SLAMF6</i>	SLAM family member 6
<i>STAC2</i>	SH3 and cysteine rich domain 2
<i>TANC2</i>	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 2
<i>CPEB2</i>	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2
<i>PPP2R1B</i>	protein phosphatase 2 scaffold subunit Abeta
<i>GLUD1</i>	glutamate dehydrogenase 1
<i>PPM1J</i>	protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent 1J

<i>NEUROD2</i>	neuronal differentiation 2
<i>POSTN</i>	periostin
<i>SLC29A1</i>	solute carrier family 29 member 1 (Augustine blood group)
<i>SEMA4C</i>	semaphorin 4C
<i>SAMD9L</i>	sterile alpha motif domain containing 9 like
<i>TSHR</i>	thyroid stimulating hormone receptor
<i>JAG2</i>	jagged 2
<i>ARL3</i>	ADP ribosylation factor like GTPase 3
<i>NFIX</i>	nuclear factor I X
<i>APP</i>	amyloid beta precursor protein
<i>TFDP1</i>	transcription factor Dp-1
<i>S100A2</i>	S100 calcium binding protein A2
<i>DTX3</i>	deltex E3 ubiquitin ligase 3
<i>PLXDC1</i>	plexin domain containing 1
<i>GABARAP</i>	GABA type A receptor-associated protein
<i>THTPA</i>	thiamine triphosphatase
<i>PFKFB2</i>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2
<i>ATP2B4</i>	ATPase plasma membrane Ca <sup>2+</sup> transporting 4
<i>GABRE</i>	gamma-aminobutyric acid type A receptor epsilon subunit
<i>MLLT3</i>	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 3
<i>SLC7A8</i>	solute carrier family 7 member 8
<i>POU2F2</i>	POU class 2 homeobox 2
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A
<i>ASXL1</i>	ASXL transcriptional regulator 1
<i>EDEMI</i>	ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1
<i>AIM2</i>	absent in melanoma 2
<i>ELAVL3</i>	ELAV like RNA binding protein 3
<i>STIM1</i>	stromal interaction molecule 1
<i>EAF1</i>	ELL associated factor 1
<i>LRRC27</i>	leucine rich repeat containing 27

<i>RICTOR</i>	RPTOR independent companion of MTOR complex 2
<i>PAPPA</i>	pappalysin 1
<i>CDK6</i>	cyclin dependent kinase 6
<i>TCF21</i>	transcription factor 21
<i>PSME3</i>	proteasome activator subunit 3
<i>SLC30A8</i>	solute carrier family 30 member 8
<i>TNRC6B</i>	trinucleotide repeat containing 6B
<i>MOG</i>	myelin oligodendrocyte glycoprotein
<i>COPS4</i>	COP9 signalosome subunit 4
<i>TMEM155</i>	transmembrane protein 155
<i>PIP4K2C</i>	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type 2 gamma
<i>RAB14</i>	RAB14, member RAS oncogene family
<i>PPP1R10</i>	protein phosphatase 1 regulatory subunit 10
<i>MED13L</i>	mediator complex subunit 13 like
<i>CBFA2T3</i>	CBFA2/RUNX1 translocation partner 3
<i>IGF2R</i>	insulin like growth factor 2 receptor
<i>MORC4</i>	MORC family CW-type zinc finger 4
<i>CYP4V2</i>	cytochrome P450 family 4 subfamily V member 2
<i>TBC1D13</i>	TBC1 domain family member 13
<i>HYAL2</i>	hyaluronidase 2
<i>RNF169</i>	ring finger protein 169
<i>PRKG2</i>	protein kinase cGMP-dependent 2
<i>CNGA2</i>	cyclic nucleotide gated channel alpha 2
<i>SYP</i>	synaptophysin
<i>CRX</i>	cone-rod homeobox
<i>TMED4</i>	transmembrane p24 trafficking protein 4
<i>RIMS4</i>	regulating synaptic membrane exocytosis 4
<i>SLCO5A1</i>	solute carrier organic anion transporter family member 5A1
<i>KNCN</i>	kinocilin
<i>IGFBP5</i>	insulin like growth factor binding protein 5
<i>BACH1</i>	BTB domain and CNC homolog 1

<i>UHMK1</i>	U2AF homology motif kinase 1
<i>NSD1</i>	nuclear receptor binding SET domain protein 1
<i>NTRK2</i>	neurotrophic receptor tyrosine kinase 2
<i>FAR1</i>	fatty acyl-CoA reductase 1
<i>CD1D</i>	CD1d molecule
<i>TJP1</i>	tight junction protein 1
<i>TRIM44</i>	tripartite motif containing 44
<i>COL1A1</i>	collagen type I alpha 1 chain
<i>HOXB5</i>	homeobox B5
<i>STK35</i>	serine/threonine kinase 35
<i>HNF4A</i>	hepatocyte nuclear factor 4 alpha
<i>PAK2</i>	p21 (RAC1) activated kinase 2
<i>ABCC1</i>	ATP binding cassette subfamily C member 1
<i>SV2B</i>	synaptic vesicle glycoprotein 2B
<i>RAB11FIP1</i>	RAB11 family interacting protein 1
<i>FMNL3</i>	formin like 3
<i>HSF4</i>	heat shock transcription factor 4
<i>SUMF1</i>	sulfatase modifying factor 1
<i>MGAT5B</i>	alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase B
<i>DYRK1B</i>	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B
<i>TPD52</i>	tumor protein D52
<i>CKAP2L</i>	cytoskeleton associated protein 2 like
<i>FAM184A</i>	family with sequence similarity 184 member A
<i>BICD2</i>	BICD cargo adaptor 2
<i>SEC24C</i>	SEC24 homolog C, COPII coat complex component
<i>DAB2IP</i>	DAB2 interacting protein
<i>PTPRE</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type E
<i>MTPN</i>	myotrophin
<i>MX2</i>	MX dynamin like GTPase 2



<i>SVEP1</i>	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1
<i>FLOT2</i>	flotillin 2
<i>MGAT1</i>	mannosyl (alpha-1,3)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase
<i>PHF12</i>	PHD finger protein 12
<i>PSMD9</i>	proteasome 26S subunit, non-ATPase 9
<i>ZNF3</i>	zinc finger protein 3
<i>KIF3C</i>	kinesin family member 3C
<i>UTY</i>	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked
<i>DNMT1</i>	DNA methyltransferase 1
<i>THSD7A</i>	thrombospondin type 1 domain containing 7A
<i>ZC3HAV1</i>	zinc finger CCCH-type containing, antiviral 1
<i>GOLGA7</i>	golgin A7
<i>TBR1</i>	T-box, brain 1
<i>CLDN18</i>	claudin 18
<i>DPAGT1</i>	dolichyl-phosphate N-acetylglucosaminophosphotransferase 1
<i>KCNC4</i>	potassium voltage-gated channel subfamily C member 4
<i>LBH</i>	limb bud and heart development
<i>GLIPR1L2</i>	GLIPR1 like 2
<i>LRRTM3</i>	leucine rich repeat transmembrane neuronal 3
<i>FAM129A</i>	family with sequence similarity 129 member A
<i>YIPF3</i>	Yip1 domain family member 3
<i>MLLT1</i>	MLLT1, super elongation complex subunit
<i>EDA2R</i>	ectodysplasin A2 receptor
<i>RAB5B</i>	RAB5B, member RAS oncogene family
<i>LMO3</i>	LIM domain only 3
<i>VANGL2</i>	VANGL planar cell polarity protein 2
<i>SLC37A2</i>	solute carrier family 37 member 2
<i>SEPT3</i>	septin 3

<i>ONECUT2</i>	one cut homeobox 2
<i>GOLGB1</i>	golgin B1
<i>BAP1</i>	BRCA1 associated protein 1
<i>SLA2</i>	Src like adaptor 2
<i>INTS5</i>	integrator complex subunit 5
<i>GORASP2</i>	golgi reassembly stacking protein 2
<i>ATP8B1</i>	ATPase phospholipid transporting 8B1
<i>BACH2</i>	BTB domain and CNC homolog 2
<i>MAP4</i>	microtubule associated protein 4
<i>TMED5</i>	transmembrane p24 trafficking protein 5
<i>ZNF831</i>	zinc finger protein 831
<i>KLK2</i>	kallikrein related peptidase 2
<i>ATP7B</i>	ATPase copper transporting beta
<i>HOXC4</i>	homeobox C4
<i>MRPL10</i>	mitochondrial ribosomal protein L10
<i>BICD1</i>	BICD cargo adaptor 1
<i>STAM</i>	signal transducing adaptor molecule
<i>ZCCHC3</i>	zinc finger CCHC-type containing 3
<i>ACTN4</i>	actinin alpha 4
<i>ESAM</i>	endothelial cell adhesion molecule
<i>ZXDB</i>	zinc finger X-linked duplicated B
<i>NTRK3</i>	neurotrophic receptor tyrosine kinase 3
<i>MYLK</i>	myosin light chain kinase
<i>TMPRSS3</i>	transmembrane serine protease 3
<i>ABCC5</i>	ATP binding cassette subfamily C member 5
<i>TCHHL1</i>	trichohyalin like 1
<i>JOSD1</i>	Josephin domain containing 1
<i>SEMA3D</i>	semaphorin 3D
<i>CDK5R1</i>	cyclin dependent kinase 5 regulatory subunit 1
<i>CTSE</i>	cathepsin E
<i>BTBD3</i>	BTB domain containing 3

<i>TRIM5</i>	tripartite motif containing 5
<i>CORO2B</i>	coronin 2B
<i>PTCHD1</i>	patched domain containing 1
<i>SLC38A1</i>	solute carrier family 38 member 1
<i>LSM12</i>	LSM12 homolog
<i>PCOTH</i>	Pro-X-Gly collagen triple helix like repeat containing
<i>SPRY3</i>	sprouty RTK signaling antagonist 3
<i>BCL2L15</i>	BCL2 like 15
<i>SYNGR3</i>	synaptogyrin 3
<i>WDR7</i>	WD repeat domain 7
<i>NOL3</i>	nucleolar protein 3
<i>TMEM189-UBE2V1</i>	TMEM189-UBE2V1 readthrough
<i>KLC1</i>	kinesin light chain 1
<i>RPRD1A</i>	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1A
<i>UBE2N</i>	ubiquitin conjugating enzyme E2 N
<i>OTUD3</i>	OTU deubiquitinase 3
<i>LMNA</i>	lamin A/C
<i>RPL28</i>	ribosomal protein L28
<i>ANKRD52</i>	ankyrin repeat domain 52
<i>NDRG3</i>	NDRG family member 3
<i>FNDC3B</i>	fibronectin type III domain containing 3B
<i>FOSB</i>	FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
<i>FADD</i>	Fas associated via death domain
<i>MAPK14</i>	mitogen-activated protein kinase 14
<i>BCAT2</i>	branched chain amino acid transaminase 2
<i>CADM4</i>	cell adhesion molecule 4
<i>PTK7</i>	protein tyrosine kinase 7 (inactive)
<i>SPACA1</i>	sperm acrosome associated 1
<i>ALCAM</i>	activated leukocyte cell adhesion molecule
<i>GNAI3</i>	G protein subunit alpha 13

<i>UBL7</i>	ubiquitin like 7
<i>BCL2</i>	BCL2, apoptosis regulator
<i>MYO7A</i>	myosin VIIA
<i>SLC39A14</i>	solute carrier family 39 member 14
<i>RSBN1</i>	round spermatid basic protein 1
<i>MEGF9</i>	multiple EGF like domains 9
<i>ADAMTS9</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9



## 9. ÖZGEÇMİŞ

### Elif Değerli

<b>Doğum Yılı:</b>	1991
<b>Yazışma Adresi:</b>	Namık Kemal Mah. Oktay Rıfat Cad. No:5/75 Esenyurt/İstanbul
<b>Telefon:</b>	0545 240 1295
<b>Faks:</b>	-
<b>e-posta:</b>	genelifcakmak@gmail.com

### EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	İstanbul Teknik Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik	2.63	2015
Türkiye	Ankara Üniversitesi	Biyoteknoloji Enstitüsü	Temel Biyoteknoloji	3.80	-

### AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Özel Emsey Hastanesi	Türkiye	İstanbul	Biyokimya, Mikrobiyoloji	Stajyer	2013
Hacettepe Üniversitesi	Türkiye	Ankara	Nanoteknoloji ve Nanotıp	Stajyer	2015
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	Türkiye	Ankara	Kanser Biyolojisi	Öğrenci	2015-2016
Karolinska Enstitüsü	İsveç	Stockholm	Medikal Biyokimya ve Biyofizik	Stajyer	2018

## YAYINLARI

### SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

**Değerli E**, Yangın S, Cansaran-Duman D. 2019. Determination of the effect of RBBR on laccase activity and gene expression level of fungi in lichen structure. 3Biotech.

DOI:10.1007/s13205-019-1832-3.

**Değerli E**, Cansaran-Duman D. Mir-185-5p response to usnic acid suppresses growth and regulating apoptosis of breast cancer cell. (Dergi Değerlendirme aşamasında).

### Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Kılıç N, **Değerli E**, Torun V, Altaytaş F, Cansaran-Duman D. 2016. Investigation of Synergistic effect of Tamoxifen and Usnic Acid on Breast Cancer Cell Line. JSM Biol 1(2): 1006.

### Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar

Torun V, **Değerli E**, Cansaran-Duman D. 2018. A promising role of lichens, their secondary metabolites and miRNAs on treatment of cancer disease after exposure to carcinogenic heavy metals. Phytoremediation, Vol 6, Chapter 9. Springer Nature Switzerland AG. (Ed. Abid A. Ansari, Sarvajeet Singh Gill, Ritu Gill, Guy R. Lanza, Lee Newman). ISBN: 978-3-319-99650-9. pp.203-214.

**Değerli E**, Torun V, Yangın S, Cansaran-Duman D. Mir-185-5p response to usnic acid inhibits the proliferation in breast cancer cell. 12. International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS). June 26-29 2018, Ankara, Turkey. Oral Presentation.

## **10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR**

Kılıç N, **Değerli E**, Torun V, Altaytaş F, Cansaran-Duman D. 2016. Investigation of Synergistic effect of Tamoxifen and Usnic Acid on Breast Cancer Cell Line. JSM Biol 1(2): 1006.

Torun V, **Değerli E**, Cansaran-Duman D. 2018. A promising role of lichens, their secondary metabolites and miRNAs on treatment of cancer disease after exposure to carcinogenic heavy metals. Phytoremediation, Vol 6, Chapter 9. Springer Nature Switzerland AG. (Ed. Abid A. Ansari, Sarvajeet Singh Gill, Ritu Gill, Guy R. Lanza, Lee Newman). ISBN: 978-3-319-99650-9. pp.203-214.

**Değerli E**, Cansaran-Duman D. Mir-185-5p response to usnic acid suppresses growth and regulating apoptosis of breast cancer cell. (Dergi Değerlendirme aşamasında)

## **KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER**

### **Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler**

Değerli E, Torun V, Yangın S, Cansaran-Duman D. Mir-185-5p response to usnic acid inhibits the proliferation in breast cancer cell. 12. International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS). June 26-29 2018, Ankara, Turkey. Oral Presentation.

### **Tez Dışı Yayınlar**

Değerli E, Yangın S, Cansaran-Duman D. 2019. Determination of the effect of RBBR on laccase activity and gene expression level of fungi in lichen structure. 3Biotech. DOI:10.1007/s13205-019-1832-3.

## Chapter 9

# A Promising Role of Lichens, Their Secondary Metabolites and miRNAs on Treatment of Cancer Disease After Exposure to Carcinogenic Heavy Metals



Vildan Torun, Elif Değerli, and Demet Cansaran-Duman

### 9.1 Introduction

#### 9.1.1 *The Effect of Cancer-Causing Chemicals on Environment*

With the rapid development of industrialization and urbanization in recent years, pollution has reached very serious levels, and this situation threatens public health. One of the most dangerous diseases caused by cancer-causing chemicals is cancer. Cancer-causing chemicals are called substances that cause cancer. Cancer-causing chemicals include solvents, heavy metals, pesticides, radioisotopes, carcinogenic microorganisms, and synthetic derivatives of industrial by-products [1]. Cancer-causing chemicals do not always cause cancer, but many of cancer-causing chemicals induce cancer after prolonged and high exposure. The risk of the development of cancer depends on many factors for people, such as the exposed duration and intensity of exposure, the person's genetic profile and how it is exposed, etc. The International Agency for Research on Cancer (IARC), one of the important sections of the World Health Organization (WHO), has identified cancer-causing potential of different substances. In the past 50 years, the IARC has defined the cancer-causing potential of more than 900 substances. The IARC has classified the substances that have the potential of causing cancer into four different groups. These are Group 1, carcinogenic to humans; Group 2A, probably carcinogenic to humans; Group 2B, possibly carcinogenic to humans; Group 3, unclassifiable as to carcinogenicity in humans; and Group 4, probably not carcinogenic to humans [2]. As an example to Group 1, the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is a class I human carcinogen [3] and is shown to cause lymphoma and fibrosarcomas [4]. The

---

V. Torun · E. Değerli · D. Cansaran-Duman (✉)  
System Biotechnology Advance Research Unit, Biotechnology Institute, Ankara University,  
Ankara, Turkey

© Springer Nature Switzerland AG 2018  
A. A. Ansari et al. (eds.), *Phytoremediation*,  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-99651-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-99651-6_9)

203



## Research Article

# Investigation of Synergistic effect of Tamoxifen and Usnic Acid on Breast Cancer Cell Line

Nil Kılıç, Elif Değerli, Vildan Torun, Ferda Altaytaş, and Demet Cansaran-Duman\*

Biotechnology Institute, Ankara University, Central Lab, Ankara, Turkey

## Abstract

The presence of unwanted side effects of many drugs used in cancer treatment brings about research for alternative therapeutic approaches. Lichens, symbiotic organisms of fungi and algae, synthesize metabolites with remarkable biological activities. Usnic acid, one of the lichen secondary metabolite, has been extensively studied in cancer research. The aim of the study was to screen the synergistic effect of tamoxifen and usnic acid on MCF-7 breast cancer cell line. The inhibitory effect of usnic acid on breast cancer cells was determined by MTT assay. Usnic acid has been mainly investigated on cell proliferation of different cancer cell lines in recent years. However, no research has been made to look into the effect of both tamoxifen and usnic acid on breast cancer cell lines.

## INTRODUCTION

Breast cancer is the most frequent cancer type in women and it has the highest mortality rate after lung cancer. Breast cancer development may be associated with some risk factors such as age, race, menopausal age, childbearing age, familial and genetic factors, especially mutations in PTEN, p53 and BRCA1/2 genes and environmental factors [1]. In addition, estrogen, one of the steroid hormones has been shown to be a stimulatory effect on the proliferation of cancer cells, although it is not directly identified as a risk factor for breast cancer development [2]. Gholamreza et al., also demonstrated that estrogen receptors are expressed in the majority of hormone dependent breast cancers types [3]. Tamoxifen as a drug that has agonistic and antagonistic effects on estrogen receptors is used hormone dependent breast cancer for therapeutic purposes [4]. Tamoxifen can be applied to all stages of breast cancer due to its anti-estrogenic effects on the cell of breast tissue. In addition to synthetically produced drugs such as tamoxifen, secondary metabolites obtained from different biological organisms are also promising as a candidate pharmaceutical agent in the treatment of cancer. Secondary metabolites are effective on the disease treatment therefore these compounds can be used with some drugs. Usnic acid, which is a lichen secondary metabolite, has some properties such as antibacterial, anti-inflammatory, antiviral and anti-proliferative activities [5]. Besides all of these properties, usnic acid is also known as an cytotoxic activity on cancer cells [6,7]. It was aim to study the determination of antiproliferative effect both usnic acid and tamoxifen on breast cancer cells.

## \*Corresponding author

Demet Cansaran-Duman, Biotechnology Institute, Ankara University, Central Lab, Tandoğan, Ankara, Turkey, Tel: 90-312-222-58-24-120; Email: dcansaran@yahoo.com

Submitted: 15 November 2016

Accepted: 30 November 2016

Published: 02 December 2016

Copyright

© 2016 Cansaran-Duman et al.

OPEN ACCESS

## Keywords

- Tamoxifen
- Usnic acid
- Cytotoxicity
- Breast cancer cell line

## MATERIALS AND METHODS

### Drugs (Tamoxifen and Usnic acid)

Usnic acid was purchased from Sigma and was prepared in 14 mM DMSO. The stock solutions were prepared to 200  $\mu$ M concentration. In previous studies,  $EC_{50}$  value of usnic acid was determined as 13.11  $\mu$ M on MCF-7 breast cancer cell line in our laboratory. 1M tamoxifen stock solution (Sigma-Aldrich) was prepared with ethanol and serially diluted as 100, 80, 40, 20, 10, 5, 2, 1  $\mu$ g/ml in DMEM medium. To determine the synergistic effect of tamoxifen and usnic acid, 1M tamoxifen stock solution was serially diluted as 100, 80, 40, 20, 10, 5, 2, 1  $\mu$ g/ml in EC 50 value of usnic acid solution (13.11  $\mu$ M).

### Maintenance of MCF-7 Cell Line

Human breast cell line MCF-7 was obtained from the ATCC. MCF-7 cell line was cultured in DMEM containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine and 1% penicillin and streptomycin. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

### Cell viability assay for tamoxifen

MCF-7 cells ( $1 \times 10^6$ ) were seeded in each well of 96-well plate and incubated overnight. The cells treated various doses of tamoxifen (100, 80, 40, 20, 10, 5, 2, 1  $\mu$ g/ml) for 48h. After 48 hours drug administrations, 20  $\mu$ l of 5 mg/ml MTT reagent was added into each well and incubated for 4 h at 37°C. 100  $\mu$ l isopropanol was added into each well and the samples were measured by spectrophotometer at 570 nm. The results represent

*Cite this article:* Kılıç N, Değerli E, Torun V, Altaytaş F, Cansaran-Duman D (2016) Investigation of Synergistic effect of Tamoxifen and Usnic Acid on Breast Cancer Cell Line. *JSM Biol* 1(2): 1006.