

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE miR-185-5p'NİN ETKİNLİĞİNİN PROTEOMİK  
YAKLAŞIMLA BELİRLENMESİ

Vildan Torun

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Demet Cansaran Duman

Temmuz

2019

## ETİK BEYAN

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

Vildan Torun

İmzası

## ONAY

Doç. Dr. Demet Cansaran Duman danışmanlığında Vildan Torun tarafından hazırlanan bu çalışma 23/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Çağdaş Devrim Son

İmza:

Üye: Doç. Dr. Demet Cansaran Duman

İmza:

Üye: Prof. Dr. Hilal Özdağ

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Meme Kanseri Tedavisinde mir-185-5p'nin Etkinliğinin Proteomik Yaklaşımla Belirlenmesi

Vildan Torun

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Demet Cansaran Duman

Meme kanseri dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın görülen kanser tipleri arasındadır. Kanserin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Tedavi amaçlı kullanılan her bir yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajı vardır. Kanser hastalığının kişiye özgü bir hastalık olması, tedavinin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi nedeniyle son yıllarda farklı alternatif tedavi araştırmaları artmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda kanser tedavisinde miRNA'ların yeni nesil biyoişaretleyici ve terapötik ajan olma potansiyelini ortaya çıkarmışlardır. Meme kanseri tedavisinde rutin olarak kullanılan Tamoksifen ve Lapatinip gibi ilaçlara karşı cevap oluşturan ve tedaviye karşı etkinliği belirlenen miRNA'lar son yıllarda kanser araştırmalarının odak noktası olmuştur. Doğada yer alan biyolojik organizmalardan biri olan likenlerden elde edilen usnik asit sekonder metaboliti, rutin tedavide kullanılan ilaçlar kadar aday bir molekül olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirilen öncül çalışmada usnik asitin üç farklı meme kanseri hücreleri üzerine uygulaması sonucunda; BT-474 meme kanser hücresine karşı cevap veren miRNA'lar içinde qRT-PCR'a dayalı validasyon çalışmaları sonucunda ve biyoinformatik temelli yaklaşımlarla değerlendirmeler sonucunda meme kanseri ile ilişkili yollarda işlev gösterdiği belirlenen miRNA miR-185-5p'dir.

Protein yapısındaki bozulmalar yolakların işlevsel özelliklerinde dejenerasyona neden olmaktadır ve nihai olarak da bu durum kanser hastalığına neden olmaktadır. Genlere göre daha etkin fonksiyonel özellik gösteren proteinlerin işlevselliğinin belirlenmesi çalışmaları kanser tedavisinde etkin çözüm arayışında önemli bir adımdır. Gerçekleştirilen tez kapsamında meme kanseri (BT-474) ve normal meme doku hücrelerinde (MCF-12A) usnik aside cevap veren miR-185-5p mimik uygulaması sonrasında protein düzeyindeki farklılaşmalar Sıvı kromatografisi/Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) tabanlı proteomik yöntemle belirlenmiştir. Hücrelerden izole edilen protein örnekleri, nano-LC-MS/MS ile tanımlanarak karşılaştırmalı proteomik analize tabi tutulmuştur. Analiz sonucunda 858 tane protein tanımlanmış olup, meme kanseri ve normal meme hücreleri arasında 86 tanesinin ifadesinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Bu proteinlerden 53 tanesinin ifadesinde artış, 33 tanesinin ifadesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda BT-474 meme kanseri hücresine miR-185-5p mimik uygulaması ile ifade değişimi gösteren proteinler YWHAE, PAK1 ve Katepsin D proteom boyutunda tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarla, proteinlerin meme kanseri hastalığındaki rolünün belirlenmesi ve meme kanserine karşı hedeflenmiş miRNA temelli tedavi yöntemlerinin proteom boyutunda karakterizasyonu sağlanmıştır.

2019, 139 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri, miRNA, proteom.

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

The Determination of miR-185-5p Efficiency in Breast Cancer Treatment by Proteomic Approach

Vildan Torun

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Dr. Demet Cansaran Duman

Breast cancer is one of the most common types of cancer among women. Chemotherapy, radiotherapy and surgical methods are widely used in the treatment of cancer. Each treatment method has its own advantages and disadvantages. In recent years, different alternative treatment studies have been increasing due to the fact that cancer is a specific disease and treatment varies from person to person. Research has revealed the potential of miRNAs to become a new generation biomarker and therapeutic agent in cancer treatment. In recent years, miRNAs, which respond to drugs such as Tamoxifen and Lapatinip, which are routinely used in the treatment of breast cancer, have been identified as the focus of cancer research. Usnic acid secondary metabolite obtained from lichens, which is one of the biological organisms in nature, is a candidate molecule as well as the drugs used in routine treatment. In previous study, usnic acid was applied to three different breast cancer cell lines and usnic acid responsive miRNAs were identified. As a result of this study, it was determined that miR-185-5p is a usnic acid responsive miRNA via qRT-PCR based validation researches and bioinformatic approaches in BT-474 breast cancer cell line. Degradation of the protein structure leads to degeneration of the functional properties of the pathways and ultimately leads to cancer. Studies to determine the functionality of proteins that show more effective functional properties than genes are an important step in the search for an effective solution in cancer treatment.

Within the scope of the thesis, changes in protein level after administration of miR-185-5p responsive to usnic acid in breast cancer (BT-474) and normal breast tissue cells (MCF-12A) were determined by liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS/MS) based proteomic method. Protein samples isolated from the cells were identified by nano-LC-MS/MS and subjected to comparative proteomic analysis. As a result of the analysis, 858 proteins were identified and a significant difference was found in the expression of 86 between breast cancer and normal breast cells. It was found that 53 of these proteins increased expression and 33 of them decreased expression. As a result of the study, it was detected that the proteins that showed the expression change in YWHAE, PAK1 and Cathepsin D protein fold change by the application of miR-185-5p in the BT-474 breast cancer cell line. The role of proteins in breast cancer disease and breast cancer treatment methods based on miRNA were characterized at proteomic level thanks to obtained results.

2019, 139 pages

**KeyWords:** Breast cancer, miRNA, proteome.

## TEŞEKKÜR

Bu tezi yapmamdaki en büyük destekçim, her adımda yanı başımda olan, her konudaki bilgi birikimini ve tecrübesini esirgmeden paylaşan, her konuda tam destek olan, kendisinden çok şey öğrendiğim, üzerimde çok emeği ve hakkı olan, hayatıma dokunan canım Hocam Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN'a,

Deneysilerimde bilgisini esirgemeyen ve yardımcı olan Prof. Dr. Erkan YILMAZ Hocam'a,  
Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk Engin Hocam'a

Tezimi yaptığım Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine,

Yüksek lisans sürecine birlikte başladığım, tüm süreci birlikte paylaştığım, her sıkıntıyı üzüntüyü birlikte atlatıp, azalttığım, mutluluğu ve sevinci paylaşıp çoğalttığım, her şeyi birlikte öğrendiğim canım dostum Elif Değerli'ye,

Hayattaki en değerli varlığım, her zaman bana inanan, güvenen, her düştüğümde kaldıran, arkamda dağ gibi duran destekçilerim, Rabbim'e böyle bir aile verdiği için her nefeste şükrettiğim, hayattaki en büyük şansım olduğuna inandığım balım annem Ayşe Torun'a, canım babam Kasım Torun'a, canımdan parçam ablam Elif Torun'a, kardeşlerim Burak Torun ve Beyza Torun'a ve tatlış babaannem Behice Artuk'a

Sonsuz teşekkür ediyorum...

Vildan TORUN

Ankara, Temmuz 2019

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>SEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>2</b>
2.1. KANSER.....	2
2.1.1. MEME KANSERİ.....	3
2.1.1.1. Meme Kanseri Alt Tipleri.....	3
2.1.1.2. Meme Kanserinde Önemli Risk Faktörleri.....	4
2.1.1.2.1. Östrojen Hormonu ve ER (Östrojen reseptör) sinyali.....	4
2.1.1.2.2. Genetik Yatkınlıklar.....	5
2.1.1.2.3. Meme Kanseri ile ilişkili olan sinyal yolları.....	5
2.1.1.3. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri.....	6
2.1.2. MİKRORNA.....	8
2.1.2.1. miRNA'ların Biyogenezi ve Moleküler Etki Mekanizması.....	9

2.1.3. PROTEOMİK YÖNTEMLER.....	10
2.1.3.1. Etiketsiz Karşılaştırmalı Proteomik Analiz Yöntemi .....	11
<b><u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u></b>	<b>13</b>
<b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>	<b>14</b>
4.1. MATERYAL .....	14
4.2. METOT.....	15
4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜNE DAYALI YÖNTEMLER.....	16
4.2.1.1. Hücre İdamesi.....	17
4.2.1.1.1. Hücre kültürü besiyerinin hazırlanması.....	17
4.2.1.1.2. Hücre Açılması .....	17
4.2.1.1.3. Hücre Pasajlanması.....	18
4.2.1.1.4. Hücre Dondurulması.....	18
4.2.1.1.5. Hücre sayımı .....	19
4.2.2. HSA-MiR-185-5P’NİN TRANSFEKSİYON VE VALIDASYONU .....	19
4.2.2.1. Hücre Canlılığı Testi (MTT) ve Etkin Konsantrasyonun Belirlenmesi Amaçlı miRNA Mimik ve Negatif Kontrol Transfeksiyonu.....	19
4.2.2.2. Hücre Canlılığı Oranının MTT Testi ile Belirlenmesi.....	21
4.2.2.3. Protein ve RNA İzolasyonu Amaçlı hsa-miR-185-5p Mimik Transfeksiyonu ...	21
4.2.2.3.1. hsa-miR-185-5p Mimik Transfeksiyonunun qRT-PCR ile Validasyonu .....	23
4.2.3. PROTEOMİK ANALİZLER .....	24
4.2.3.1. Protein İzolasyonu .....	24
4.2.3.2. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometre Analizi için Örnek Hazırlanması .....	25



4.2.3.3. Peptit Konsantrasyon Tayini.....	28
4.2.3.4. LC-MS/MS Analizi.....	28
4.2.3.5. İstatiksel Analiz .....	30
4.2.3.6. SDS PAGE ve Western Blot Analizi .....	30
<b><u>5. ARASTIRMA BULGULARI.....</u></b>	<b>34</b>
5.1. HSA-miR-185-5P’NİN TRANSFEKSİYONUN VALİDASYONU.....	34
5.2. HSA-miR-185-5P MİMİK VE NEGATİF KONTROLÜN FARKLI KONSANTRASYONDAKİ MTT HÜCRE CANLILIĞI TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ .....	34
5.3. PROTEİN ELDESİ VE MİKTAR TAYİNİ.....	36
5.3.1. PROTEİN MİKTARININ HESAPLANMASI .....	38
5.3.2. PEPTİT KONSANTRASYON MİKTAR TAYİNİ.....	39
5.4. PROTEOM ANALİZİ.....	41
5.4.1. miR-185-5P MİMİK VE NEGATİF KONTROL TRANSFEKSİYONU SONRASI BT-474 VE MCF-12A HÜCRE HATLARINDA TANIMLANMIŞ OLAN PROTEİNLER.....	41
5.4.2. miR-185-5P TRANSFEKSİYONU İLE İFADESİ DEĞİŞMİŞ OLAN PROTEİNLERİN GÖREV ALDIKLARI SİNYAL YOLAKLARINA GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ .....	51
5.4.3. miR-185-5P TRANSFEKSİYONU İLE İFADESİ DEĞİŞMİŞ OLAN PROTEİNLERİN MOLEKÜLER FONKSİYONLARINA GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ .....	52
5.4.4. miR-185-5P TRANSFEKSİYONU İLE İFADESİ DEĞİŞMİŞ OLAN PROTEİNLERİN BİYOLOJİK SÜREÇLERE GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ.....	54
5.4.5. WESTERN BLOT .....	56
<b><u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u></b>	<b>60</b>
6.1. TARTIŞMA .....	60
6.2. SONUÇ .....	71

<b><u>7. KAYNAKLAR .....</u></b>	<b><u>72</u></b>
<b><u>8. EKLER.....</u></b>	<b><u>80</u></b>
EK 1: HSA-MiR-185-5P MİMİK UYGULANMIŞ BT-474 VE MCF-12A HÜCRE HATLARINDA TANIMLANMIŞ PROTEİNLERİN İSİMLERİ VE BİLGİLERİ .....	80
EK 2: HSA-MiR-185-5P MİMİK UYGULANMIŞ BT-474 VE BT-474 KONTROL (BESİYERİ) GRUPLARININ KİYASLANMASINA AİT PROTEİNLERİN İSİMLERİ VE BİLGİLERİ.....	114
EK 3: NEGATİF KONTROL UYGULANMIŞ BT-474 VE BT-474 KONTROL (BESİYERİ) GRUPLARININ KİYASLANMASINA AİT PROTEİNLERİN İSİMLERİ VE BİLGİLERİ.....	119
EK 4: HSA-MiR-185-5P MİMİK UYGULANMIŞ MCF-12A VE MCF-12A KONTROL (BESİYERİ) GRUPLARININ KİYASLANMASINA AİT PROTEİNLERİN İSİMLERİ VE BİLGİLERİ.....	124
EK 5: NEGATİF KONTROL UYGULANMIŞ MCF-12A VE MCF-12A KONTROL (BESİYERİ) GRUPLARININ KİYASLANMASINA AİT PROTEİNLERİN İSİMLERİ VE BİLGİLERİ.....	129
<b><u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u></b>	<b><u>135</u></b>
<b><u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR .....</u></b>	<b><u>137</u></b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 5.1. BT-474 meme kanseri hücrelerinde miR-185-5p transfeksiyon işleminin doğrulaması (53) (*: $p \leq 0.05$ ).....	34
Şekil 5.2. MCF-12A hücre hattına miR-185-5p mimik ve negatif kontrol uygulanması (53) .....	35
Şekil 5.3. BT-474 hücre hattına miR-185-5p mimik ve negatif kontrol uygulanması (53) ( $p < 0.01$ ) .....	35
Şekil 5.4. BSA Standart eğrisi .....	36
Şekil 5.5. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi ile negatif kontrol uygulanan BT-474 hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi şeması.....	41
Şekil 5.6. miR-185-5p transfekte olmuş MCF-12A hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi ile negatif kontrol uygulanan MCF-12A hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi şeması .....	42
Şekil 5.7. miR-185-5p transfeksiyonu ile BT-474 ve MCF-12A spesifik protein şeması ..	42
Şekil 5.8. miR-185-5p transfeksiyon sonrası BT-474 meme kanseri hücre hattına spesifik tanımlanan ifade seviyesi artan ve azalan proteinlerin STRING (Version 10.5) fonksiyonel protein ilişkilendirme ağları programı ile gösterimi.....	48
Şekil 5.9. miR-185-5p transfeksiyon sonrası BT-474 meme kanseri hücre hattına spesifik tanımlanan ve ifade seviyesi artan proteinlerin STRING (Version 10.5) fonksiyonel protein ilişkilendirme ağları programı ile gösterimi .....	49
Şekil 5.10. miR-185-5p transfeksiyon sonrası BT-474 meme kanseri hücre hattına spesifik tanımlanan ve ifade seviyesi azalan proteinlerin STRING (Version 10.5) fonksiyonel protein ilişkilendirme ağları programı ile gösterimi.....	50
Şekil 5.11. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi artan proteinlerin görev aldığı sinyal yolları (PANTHER veri tabanı).....	51

Şekil 5.12. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi azalan proteinlerin görev aldığı sinyal yolları (PANTHER veri tabanı).....	52
Şekil 5.13. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi artan proteinlerin görev aldığı moleküler fonksiyonlar (PANTHER veri tabanı).....	53
Şekil 5.14. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi azalan proteinlerin görev aldığı moleküler fonksiyonlar (PANTHER veri tabanı).....	54
Şekil 5.15. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi artan proteinlerin görev aldığı biyolojik süreçler (PANTHER veri tabanı) .....	55
Şekil 5.16. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi azalan proteinlerin görev aldığı biyolojik süreçler (PANTHER veri tabanı) .....	56
Şekil 5.17. hsa-miR-185-5p transfeksiyonu yapılan BT-474 meme kanseri hücreleri ve kontrol grubunun kıyaslanması ile Katepsin D, PAK1 ve YWHAE proteinlerinin western sonuçları .....	57
Şekil 5.18. miR-185-5p transfeksiyonu yapılan BT-474 meme kanseri hücreleri ve kontrol grubunun kıyaslanması ile Katepsin D proteininin ifade seviyesindeki değişim (**p<0.001) .....	58
Şekil 5.19. miR-185-5p transfeksiyonu yapılan BT-474 meme kanseri hücreleri ve kontrol grubunun kıyaslanması ile YWHAE proteininin ifade seviyesindeki değişim (**p<0.001) .....	58
Şekil 5.20. miR-185-5p transfeksiyonu yapılan BT-474 meme kanseri hücreleri ve kontrol grubunun kıyaslanması ile PAK1 proteininin ifade seviyesindeki değişim (**p<0.001) .	59

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Kullanılan Cihaz listesi .....	15
Çizelge 4.2. Hücre hatları, katalog numaraları ve besiyeri içerikleri.....	17
Çizelge 4.3. BT-474 hücre hattı için hsa-mir-185-5p mimik, negatif kontrol transfeksiyonu ve besiyeri uygulamasının 3 tekrarlı kuyulara dağılımı .....	22
Çizelge 4.4. MCF-12A hücre hattı için hsa-mir-185-5p mimik, negatif kontrol transfeksiyonu ve besiyeri uygulamasının 3 tekrarlı kuyulara dağılımı.....	22
Çizelge 4.5. Üreli lizis buffer içeriği .....	25
Çizelge 4.6. Ayırıcı ve yığma jel yapımı için kullanılan madde ve miktarları.....	31
Çizelge 4.7. Western blot analiz yönteminde kullanılacak olan çözeltiler.....	32
Çizelge 5.1. BSA standart konsantrasyon miktarları ve absorbens değerleri.....	37
Çizelge 5.2. MCF-12A insan meme dokusu normal epitel hücre hattı için Bradford yöntemi sonucunda elde edilen absorbens değerleri .....	37
Çizelge 5.3. BT-474 meme kanseri hücre hattı için Bradford yöntemi sonucunda elde edilen absorbens değerleri .....	38
Çizelge 5.4. BT-474 hücre hattına ait protein konsantrasyon miktarları.....	39
Çizelge 5.5. MCF-12A hücre hattına ait protein konsantrasyon miktarları .....	39
Çizelge 5.6. Hazırlanan BSA standart konsantrasyon miktarları ve ölçülen absorbens değerleri.....	39
Çizelge 5.7. BT-474 meme kanseri hücre hattı ve MCF-12A hücre hattına için Peptit Konsantrasyon testi sonucunda elde edilen peptitlerin absorbens değerleri ve konsantrasyon miktarları .....	40
Çizelge 5.8. miR-185-5p transfeksiyonu sonrası istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı gösteren proteinlerin “Accession” numaraları.....	43

Çizelge 5.9. miR-185-5p transfeksiyonu sonrası BT-474 meme kanseri spesifik ifade seviyeleri artan protein listesi.....	43
Çizelge 5.10. miR-185-5p transfeksiyonu sonrası BT-474 meme kanseri spesifik ifade seviyeleri azalan protein listesi.....	46



## SİMGELER DİZİNİ

$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
ATCC	American Type Culture Collection
$\text{CHCl}_3$	Kloroform
ddH <sub>2</sub> O	Double distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco Modifiye Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
Dulbecco's PBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
miRNA	mikroRNA

## 1. GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlar arasında yaygın olan kanserlerden biridir. Meme kanseri heterojen bir hastalıktır ve protoonkogenler (*RAS* ve *NYC*), tümör baskılayıcı genler (*BRCA1* ve *BRCA2*), farklı sinyal yolları (*PI3K-AKT-mTOR*), epigenetik, iltihaplanma, bağışıklık sistemi bozukluğu, genomik kararsızlık gibi faktörler ile Warburg etkisi ve hücre metabolizmadaki değişiklikler kanserin gelişmesinde ve yayılmasında, önemli rol oynamaktadır (1). Bu çeşitli faktörlerin belirlenmesi kanser hastalığı mekanizmasının daha iyi anlaşılması ve tedavide iyi bir sonucun alınması yönünde büyük bir adım olması beklenmektedir (1).

Meme kanserinin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler, hormon terapisi gibi yöntemler uygulanmakta, ancak kullanılan bu farklı tedavilerin yan etkileri, tedavilerinin uzun süreli olması, mevcut tedavi stratejilerindeki sınırlamalar ve tedaviye dirençli kanser hücrelerinin olması nedeniyle alternatif tedavi yöntemleri araştırılmaktadır (2-4).

Kanser hastalığına karşı rutin tedavide kullanılan ilaçların yanı sıra, likenler ve yaygın olarak kullanılan liken metabolitlerinden biri olan usnik asitin kanser tedavisinde kullanılması alternatif bir yöntem olarak umut vadetmektedir (5-7). Bir başka alternatif yöntem olarak da hücre proliferasyondan apoptoza kadar değişen biyolojik işlemlerde önemli bir rolü olan, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda görev aldığı bilinen ve çeşitli kanser tiplerinin teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılan miRNA'lar gösterilebilir (4, 8). Ayrıca son zamanlarda proteomik tabanlı yaklaşımların, miRNA'ların hedef genlerinin tanımlanması için kullanılacak bir teknoloji olduğu bilinmektedir (9). Proteomik analizlerin, meme kanserindeki değişmiş protein gruplarını ve görev aldıkları sinyal yollarını tanımlamak için bir fırsat sağladığı ve proteomik teknolojilerin geliştirilmesi ve uygulanması ile birçok potansiyel meme kanseri biyobelirtecini tanımlayabileceği anlaşılmıştır (10).



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. KANSER

Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesi ve çoğalmasdır (2). Kanser, tüm insan ölümlerinin yaklaşık %14.6'sından sorumlu olan ve bulaşıcı olmayan dört ana hastalıktan biridir ve bilinen 100'den fazla farklı kanser türü bulunmaktadır (11). Hepatit B, Hepatit C, insan herpes virüsü 8 ve insan papilloma virüsü (HPV) gibi çeşitli virüslerin yanı sıra alkol, tütün kullanımı, ilaçlar, hormonlar, bakteriler, parazitler, mantarlar, obezite, kötü beslenme ve hareketsiz yaşam tarzı gibi nedenler kanser nedeni olarak bilinmektedir (12).

İsviçre Cenevre'de 12 Eylül 2018 tarihinde Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), küresel kanser gözlem tahminlerini GLOBOCAN 2018 veri tabanında yayınlamıştır (13). Bu veri tabanına göre, 2018'de 18.1 milyona yükselen yeni kanser vakalarında, 9.6 milyon kişinin öldüğü tahmin edilmekte, dünyada 5 erkekten 1'i ve 6 kadından 1'i yaşamları boyunca kanser hastalığı geçirmekte olup, 8 erkekten 1'i ve 11 kadından 1'i de bu hastalıktan hayatını kaybetmektedir (13). Akciğer, meme ve kolorektum kanserleri, görülme sıklığı açısından ilk üç kanser türüdür ve mortalite açısından akciğer kanseri birinci, kolorektum kanseri ikinci ve meme kanseri beşinci sıradadır (13). Akciğer ve kadın meme kanserleri, dünya çapında yeni vaka sayıları açısından en fazla görülen kanser tipleridir ve her bir kanser tipi için 2018'de yaklaşık 2.1 milyon tanı belirlenmiştir (13). Kolorektal kanser 1.8 milyon vaka ile en sık teşhis edilen üçüncü kanser, prostat kanseri 1.3 milyon vaka ile dördüncü ve mide kanseri 1.0 milyon vaka ile beşinci sıradadır (13).

Kanser hastalığının tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler, hormon terapisi ve biyolojik moleküllere dayalı ilaç tedavi uygulamaların kullanıldığı yöntemler tek veya beraber de uygulanabilir (2). Kullanılan bu farklı yaklaşım ve tedavilerin kendilerine özgü avantaj ve dezavantajları vardır (2). Radyoterapi yönteminde iyonizan ışınlar kullanarak kanserli hücrelerin öldürülüp, tümörün küçültülmesi hedeflenir ve bu yöntemde vücutta sadece bir bölge tedavi edildiği gibi, tüm vücut da tedavide hedef olabilir (2). Radyoterapi yönteminde kanserli hücreler öldürülürken aynı zamanda sağlıklı hücrelerin de yok olması bir dezavantajdır (2). Kemoterapi yönteminde de amaç tümörlü bölgenin küçültülmesidir, bu işlem kortikosteroidler, antitümör antibiyotikler, alkilleyici

ajanlar, mitotik ve topoizomeraz inhibitörleri gibi kemoterapötik ajanlar kullanılarak yapılır. Ancak bu ilaçların halsizlik, kusma, iştah kaybı gibi yan etkileri olabilir (2). Cerrahi yöntem ile dokudan bir parça alınıp, teşhis konulur ve metastaz gibi olaylarda zararlı kitle vücuttan çıkarılır (2). Hormon tedavi yönteminde vücudun ürettiği hormonların ilaç olarak kullanılıp, kanserli hücrelere bağlanmasını ve bu zararlı hücrelerin büyümesini engellemesi hedeflenir (2). Biyolojik tedavi yönteminde ise kanser aşuları, antitümörojenikler ve monoklonal antikorlar gibi biyolojik maddeler kullanılır (2). Bu tedavilerin hastaya olan yan etkileri ve tedavilerinin uzun süreli olması nedeniyle alternatif tedavi yöntemler geliştirilmeli ve uygulanması amaçlı araştırmalar devam etmektedir (14).

### **2.1.1. MEME KANSERİ**

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %90'ı primer tümörlerin metastatik yayılımından kaynaklanır (15). Meme kanseri, farklı klinik davranışlarla ilişkili olan moleküler mekanizmalara sahip heterojen bir hastalıktır (16). Yapılan çalışmalar sonucunda bu fenotipik çeşitliliğin, meme kanserinin tanı ve prognozunu ciddi şekilde etkilemekte olduğu belirlenmiştir (16).

#### **2.1.1.1. Meme Kanseri Alt Tipleri**

Yeni nesil genomik ve transkriptomik tekniklerin ortaya çıkması ile hücresel ve moleküler heterojenliğe sahip meme kanserinin, tedaviye yanıtları farklı olan beş biyolojik alt tipi tanımlanmıştır (17). Bunlar;

**Luminal A Meme Kanseri Alt Tipi:** Bu alt tip östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitif, insan epidermal büyüme faktörü (HER2) negatif ve düşük Ki-67 seviyelerine sahiptir (17). Luminal A meme kanseri alt tipi, tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 40'ını oluşturur, en iyi prognoza sahip olma eğilimindedir ve tedavileri genel olarak hormonal tedavi şeklinde yapılır (17).

**Luminal B Meme Kanseri Alt Tipi:** Bu alt tip ER ve/veya PR pozitif, HER2 pozitif veya negatif ve yüksek Ki-67 seviyelerine sahiptir (17). Luminal B meme kanseri alt tipi, tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 20'sini oluşturur ve Luminal A meme kanseri alt tipinden biraz daha hızlı büyür ve prognozu biraz daha kötüdür (17).

İnsan Epidermal Büyüme Faktörü (HER2) Meme Kanseri Alt Tipi: Bu alt tip ER ve PR'nün olmadığı, HER2'nin yüksek ifadesinin olduğu bir alt tiptir. Meme kanseri görülme sıklığının %10 ile %15'ini oluşturur. HER2 alt tipine sahip kanser, luminal kanserlerden daha hızlı büyür, ancak Herceptin (Trastuzumab), Perjeta (Pertuzumab), Tykerb (Lapatinib) ve Kadcylla (T-DM1 veya ado-Trastuzumab-Emtansin) gibi HER2 proteinine yönelik ilaçlar ile tedavi gerçekleştirilebilir (17).

Üçlü Negatif/Bazal Benzeri Meme Kanseri (TNBC) Alt tipi: Bu alt tip ER negatif, PR negatif, HER2 negatif olarak tanımlanır. TNBC alt tipi, tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. TNBC, *BRCA1* gen mutasyonlu, 40 yaşın altındaki ve Afrikan-Amerikalı kadınlarda daha yaygındır. TNBC genellikle diğer meme kanseri tiplerinden daha agresif davranma eğilimi gösterir (17).

Normal Benzeri Meme Kanseri Alt tipi: Bu alt tip, ER ve/veya PR pozitif, HER2 negatif ve düşük Ki-67 seviyelerine sahiptir. Bu alt tipin prognozu luminal A kanserinin prognozundan biraz daha kötüdür (17).

#### **2.1.1.2. Meme Kanserinde Önemli Risk Faktörleri**

Meme kanseri için bazı önemli risk faktörleri yaşlılık, genetik yatkınlıklar, obezite ve östrojen maruziyetidir (16).

##### **2.1.1.2.1. Östrojen Hormonu ve ER (Östrojen reseptör) sinyali**

Memelilerde başlıca steroid hormonlarından biri olan östrojen hormonunun, birçok dokudaki rolü hem fizyolojik hem de patolojik olarak uzun yıllardır araştırılmaktadır (18). Özellikle meme dokusundaki östrojen seviyesinin, meme bezinin gelişmesi, büyümesi, meme kanserinin başlangıcı ve ilerlemesi sürecinde önemli bir faktör olduğu bilinmekte ve proliferasyon, farklılaşma ve migrasyon gibi birçok hücrel aktiviteyi kontrol ettiği bilinmektedir (18). Östrojen hormonu etkisini östrojen reseptörlerine (ER) bağlanarak gösterir ve ER'leri, membran östrojen reseptörleri (çoğunlukla G protein-bağlantılı reseptörler) ile nükleer östrojen reseptörlerinden (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) oluşur (17). ER $\alpha$  (*ESR1* tarafından kodlanır) ve ER $\beta$  (*ESR2* tarafından kodlanır) reseptörleri, ligand bağlanması üzerine hedef genlerin ifadesini aktive eden veya baskılayan transkripsiyonel faktörlerdir (17). Meme kanseri hücreleri yüksek ER $\alpha$  ifadesine ve düşük ER $\beta$  ifadesine sahiptir. ER $\alpha$ ,

meme kanserlerinin patogeneğinde önemli bir rol oynar, çünkü meme kanserlerinin yaklaşık % 75'i bu spesifik hormonal reseptör tipinin pozitif ifadesine sahiptir (17).

#### **2.1.1.2.2. Genetik Yatkınlıklar**

Meme kanseri için bazı risk faktörleri bireyin kontrolünün dışındadır. Örneğin, kadın olmak, meme kanserinde erkeklere göre yaklaşık 100 kat daha fazla risk faktörüdür, meme kanserinin çoğunun 55 yaş ve üzerindeki kadınlarda teşhis edilmesi gerçeği de yaşlanmanın meme kanseri üzerindeki riski artırdığını göstermiştir (17).

Genel olarak, meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'u bir ebeveyninden kalıtılan gen mutasyonlarına bağlıdır (17). Kalıtsal meme kanserinin en yaygın nedeni, *BRCA1* veya *BRCA2* genlerinde oluşan mutasyonlar olsa da diğer birçok gende oluşan kalıtsal mutasyonların da meme kanseri gelişimine neden olduğu bilinmektedir (17). Mutasyona uğramış genlerin bazıları arasında; *TP53* (bu genin kalıtsal mutasyonları, lösemi, beyin tümörleri ve sarkomları gibi bazı kanserlerin yanı sıra, meme kanseri riskinde artış olan LiFraumeni sendromuna neden olur), *CHEK2* (bir *CHEK2* mutasyonu, meme kanseri riskini 2 kat artırabilir), *CDH1* (kalıtsal mutasyonlar, invaziv lobüler meme kanseri riskinde artış ile kalıtsal yaygın mide kanserine neden olur), *STK11* (bu gendeki mutasyonlar, meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türü için daha yüksek risk taşıyan Peutz-Jeghers sendromuna yol açabilir), *PALB2* (*BRCA2* geni tarafından yapılan proteinle etkileşime giren bir protein yapar, bu gende mutasyonlara neden olur ve meme kanseri riskini artırır) vardır (17). *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki ve diğer daha az yaygın bulunan genlerdeki mutasyonların analizinin yapılması yüksek risk taşıyan kadınlarda, meme kanseri gelişiminin erken teşhisinde ve önlenmesinde faydalı olabilir (17).

#### **2.1.1.2.3. Meme Kanseri ile ilişkili olan sinyal yolları**

Meme kanserinde sinyal yollarındaki değişiklikler, hücresel büyümenin artmasına, apoptoz seviyesinin düşmesine ve ilaç direncinin gelişmesine yol açan başlıca faktörlerdendir (19). Nükleer Faktör kB (NF-kB) veya Transforme Büyüme Faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) sinyali gibi sinyal iletim yollarındaki değişiklikler, meme kanseri başlangıcına, ilerlemesine ve metastazına etki eder (15).

NF-kB sinyal yolağı, IL-8 ve CXCL1 gibi sitokin ve kemokinler, BCL2 gibi antiapoptotik genler veya kemokin reseptörü CXCR4 gibi tümör büyümesi, invazyon ve metastaz ile ilişkili genlerin transkripsiyonel düzenlenmesi yoluyla tümör gelişiminde çok önemli bir role sahiptir (15). Bu nedenle, NF-kB sinyal yolağının, proliferasyonu uyararak ve apoptozu önleyerek meme kanseri ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır (15). Meme kanseri ile ilişkili olan bir diğer yolak TGF- $\beta$ , hücre döngüsü, hücre çoğalması, epitelial mezenkimal geçiş ve metastaz dahil olmak üzere çeşitli hücrenel işlemlerin önemli bir düzenleyicisidir (15). Yüksek TGF- $\beta$  reseptörü ifadesi ve artan TGF- $\beta$  sinyalizasyonu meme kanseri hastalarının hayatta kalma oranının azalması ile ilişkilidir (15).

### **2.1.1.3. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri**

Son yirmi yıldır meme kanseri ile ilgili yapılan çalışmalar, meme kanserinin teşhisi ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamıştır (20). Meme tümörü olan hastalarda hedefe yönelik tedavi, hormonal tedavi, radyasyon, cerrahi, kemoterapi gibi farklı tedavi yöntemleri uygulanmakta ve Cyclophosphamide, Paclitaxol, Doxorubicin gibi kemoterapi ilaçları, Tamoxifen, Letrozole gibi anti-hormonal ilaçları da kullanılmaktadır (16, 20, 21).

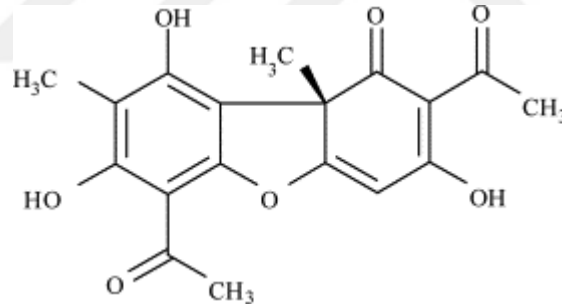
Meme kanserinin patogeneğinde ER $\alpha$ 'nın önemli bir rol oynadığı ve meme kanserlerinin yaklaşık % 75'inde bu hormonal reseptör tipinin pozitif ifadesine sahip olduğu bilindiği için, ER $\alpha$  klinikte endokrin tedavisi için önemli bir hedef olarak seçilmiştir (17, 18). Membranda konumlanan ER $\alpha$ , Tirozin Kinaz Src, PI3K ve Epitelial Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) gibi proteinlerle farklı kompleksler oluşturur ve bu protein komplekslerinde östrojen hormonunun ER $\alpha$ 'ya hızlı bir şekilde bağlanıp, konformasyonunu değiştirmesiyle MAPK ve AKT gibi sinyal yolakları aktive olur ve hücrenel çoğalmanın uyarılması gerçekleşir (18). ER sinyallerinin onkogenik aktivitesi, anti-östrojen ilaçlar kullanılarak inhibe edilir (21). Ancak ilaçların ilk başta etki göstermesine rağmen, hastalığın ilerleyişi ve tümör gelişimi sürecinde etkisini kaybederek direnç gelişimini gösterdiği görülmüştür (21).

Meme kanserinde tedavideki ilerlemelere rağmen, tedaviye direnç kazanan kanser hücreleri ve mevcut tedavi stratejilerindeki sınırlamalar sebebiyle metastatik meme kanseri

hastalarında hala yüksek oranda ölüm gerçekleşmektedir (4). Bu nedenle araştırmacılar alternatif tedavi yöntemleri bulmaya ve etkin aday molekülleri araştırmaya devam etmektedir (20). Ayrıca günümüzde çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinde farklı bir bakış açısı olan, moleküler biyobelirteçlerle hedeflenmiş tedavi yöntemleri de kullanılabilir ve bunlara örnek olarak çeşitli kanser tiplerinin teşhisinde biyobelirteç olarak etkin bir şekilde kullanılan mikroRNA'lar (miRNA) gösterilebilir (4).

Likenler ve onların ürünleri olan sekonder metabolitlerin kanser tedavisinde alternatif bir ilaç aday molekül olarak kullanılması yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (5, 6). Bu çalışmalarda kullanılan liken sekonder metabolitlerinin bazı kanser hücrelerinde etkili olduğu ve ilaç aday molekülü olarak çalışmaların ilerlemesi gerekliliği belirtilmiştir (5, 6).

Likenler, mantar ve alglerden oluşan simbiyotik organizmalardan biri olup, kendilerine özgü çeşitli metabolitler sentezlemektedirler (6, 22). Usnik asit [2,6-diasetil-7,9-dihidroksi-8,9b-dimetil-1,3 (2H, 9bH) -dibenzo-furandion], 1844'te ilk defa izole edilmiştir, en yaygın incelenen liken metabolitlerinden biridir ve doğada *Alectoria*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia* gibi liken türlerinde bol miktarda bulunur (7).



Şekil 2.1. Usnik asitin kimyasal yapısı (22)

Bir liken sekonder metaboliti olan usnik asit, tıbbi, parfümeri, kozmetik, kremler, deodorantlar ve güneşten koruyucu ürünlerde, bazı durumlarda aktif madde olarak, bazılarında ise koruyucu madde olarak kullanılır (7). Ayrıca anti-bakteriyel, (23), anti-inflamatuar (24), anti-viral (25) ve anti-proliferatif (5), anti-mikrobiyal (26) gibi birçok etkinliğe de sahiptir (22).

### 2.1.2. MİKRORNA

miRNA'lar yaklaşık 20-23 nükleotid uzunluğunda, hücrel gen ifadesini transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyede düzenleyen ve protein kodlamayan RNA molekülleridir (27).

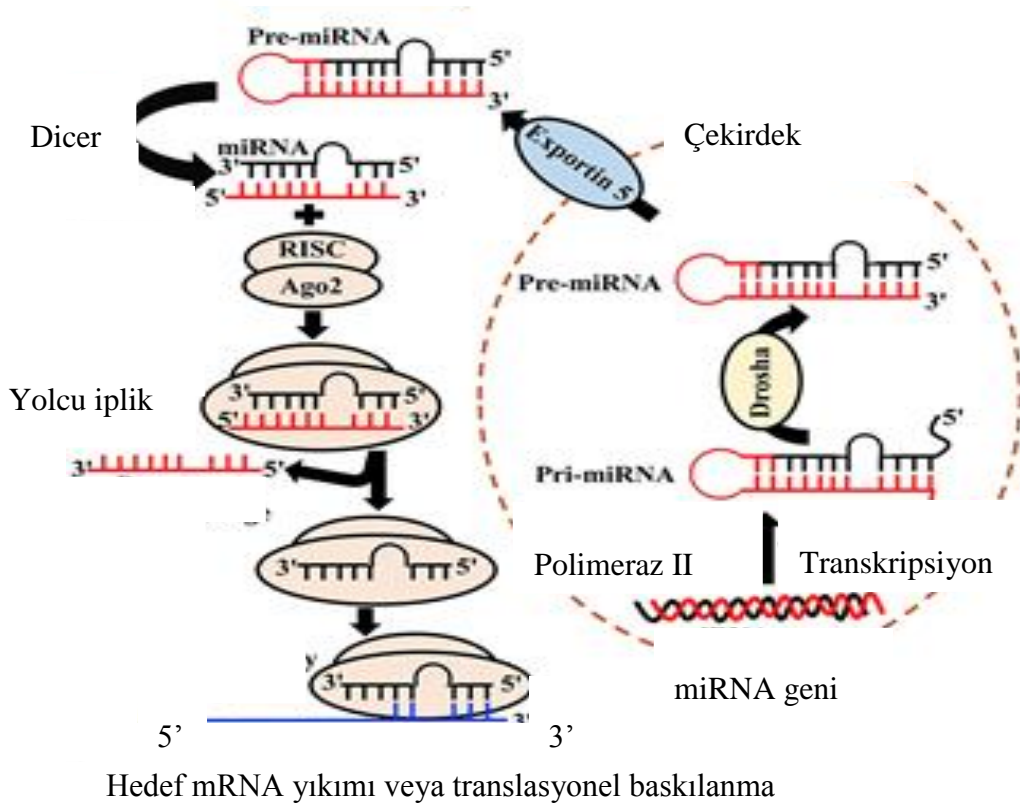
İlk miRNA, 1993 yılında Lee ve çalışma ark. tarafından yuvarlak solucan *Caenorhabditis elegans*'da *Lin-4* olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına rağmen 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe etmesiyle bulunmuştur (28, 29). Ancak miRNA terimi ilk defa 2001 yılından itibaren kullanılmıştır (28, 30). 2000 yılında yine yuvarlak solucan *C. elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen ve *Let-7* olarak isimlendirilen bir miRNA keşfedilmiştir (28, 31, 32).

miRNA'lar inflamasyon, hücre döngüsü düzenlemesi, stres yanıtı, apoptoz ve invazyon gibi hücrel işlemlerde yer alan genleri kontrol eder, hücre içindeki sinyal yollarının düzenlenmesinde görev yapar ve bunların düzensizliğinde kanserin gelişiminde önemli bir rol alır (33). Ayrıca çeşitli kanser türlerinde farklı miRNA'ların ifade değişiklikleri tespit edilerek kanserleşme sürecinde potansiyel rolleri olduğu gözlemlenmiştir (34). Örneğin, *Let-7* (35), *miR-15a/miR-16-1* (36), *miR-143/miR-145* (37) gibi miRNA'ların kanserli hücrelerde ifadeleri azalırken, *miR-17-92* kümesi (38) ve *miR-155* (39) gibi miRNA'ların ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (34-39). *miR-125b*, *miR-145*, *miR-155* ve *miR-21* gibi miRNA'ların, meme tümör dokuları ve normal meme dokuları ile kıyaslandığında önemli ölçüde ifade değişiklikleri gözlenmiştir (40).

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada meme tümörlerinin moleküler patogeneğinde miRNA'ların tümör baskılayıcı veya onkogen olarak işlev gösterdiği bulunmuştur (4). Örneğin yapılan bir çalışmada, *miR-205*'in meme kanseri hücrelerinin büyümesi ve invazyonunu baskıladığı bulunmuş ve böylece *miR-205*'in, meme kanserinde bir tümör baskılayıcı olduğu tespit edilirken (41), başka bir çalışmada *miR-21*'in meme kanseri hücrelerinde yüksek ifadesi gözlenmiş ve lenf nodu metastazıyla ilişkilendirilip bir onkogen olduğu tespit edilmiştir (41, 42).

### 2.1.2.1. miRNA'ların Biyogenezi ve Moleküler Etki Mekanizması

miRNA'ların oluşum aşaması üç adımdan meydana gelir (28). MikroRNA'ların sentezi miRNA genlerinden RNA polimeraz II (RNA pol II) enzimi aracılığı ile başlar (28). Saç tokası şeklindeki primer transkript olan pri-miRNA genomik DNA'dan sentezlenir ve 500-3000 baz uzunluğunda, "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahiptir (28). Çekirdekte bulunan bir RNAaz olan Drosha ve kofaktörü DGCR8 (Pasha)'nın oluşturduğu bir mikroişlemci komplekse bağlanır ve yaklaşık 60-70 nükleotitden oluşan pre-miRNA'lara dönüştürülür (28). Çekirdekte oluşan pre-miRNA'lar Exportin 5 ile sitoplazmaya taşınır (28). Pre-miRNA'lar bir RNA-pol III olan Dicer enzimi ile kesilir ve 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA (miRNA dubleksine) çevrilir (28). Dicer enzimi ayrıca, RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi oluşumunu başlatır (28). RISC kompleksinin içinde yer alan Argonaute proteininin sayesinde 5'ucu daha kararlı olan miRNA bu komplekse katılır (28). miRNA'lar, RISC kompleksine bağlandıktan sonra, Argonaute proteinleri yardımıyla ya mRNA'nın yıkılmasını sağlar ya da translasyonu baskılar (28).



Şekil 2.2. miRNA biyogenezi (43)



Meme kanserinde miRNA'ların hücre döngüsü ilerlemesini, apoptoz, anjiyogenez, epitelyal-mezenkimal geçişi, tümör mikro ortamını, invazyonu, metastazı, ilaç direncini ve meme kanseri kök hücrelerinin farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir (44). Bu nedenle, miRNA'ların erken meme kanseri tanısı ve hastalığın seyrinde, moleküler biyobelirteç olarak yeni terapötik stratejilerin gelişmesini sağlaması öngörülmektedir (4, 45).

### 2.1.3. PROTEOMİK YÖNTEMLER

Günümüzde proteomik teknolojilerin geliştirilmesi ve uygulanması ile birçok potansiyel meme kanseri biyobelirteci olabileceği gösterilmiş ve proteomik analizler, meme kanserindeki değişmiş protein gruplarını ve sinyal yollarını tanımlamak için bir fırsat sağlayarak tümörjenez ve kanserin ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (10). Protein ifadesindeki değişikliklerin hastalıkların durumu hakkında verilen bilginin temelini oluşturması, araştırmacıların proteomik çalışmalara odaklanmasını sağlar (46).

Proteomiks alanında kütle spektrometreleri verileri kullanılarak, “Yukarıdan aşağıya” (top-down) proteomiks, “Aşağıdan yukarıya” (bottom-up) proteomiks ve de novo dizileme gibi yöntemler kullanılarak üç tipte protein tanımlaması yapılır (47). Aşağıdan yukarıya (bottom-up) proteomiks yönteminde proteinler Tripsin gibi proteazlarla kesilerek triptik peptitler elde edilir ve bunların protein dizi veri tabanlarında eşleştirilmesiyle protein tanımlaması yapılır (47). Aşağıdan yukarıya (bottom-up) yönteminde triptik peptitler, protein ayrımı işleminin jelde yapıldığı (in gel digestion), sıvı ortamda peptitlerin elde edildiği (in solution) ve filtre destekli örnek hazırlığı (FASP, Filter-Aided Sample Preparation) yöntemleriyle elde edilir (48).

Proteomiks alanında yöntemsel olarak etiketli ve etiketsiz proteomik olmak üzere iki yaklaşım vardır (47). Etiketli proteomik yönteminde, kullanılan proteinlerin yapıtaşları olan aminoasitler izotop atomlar ya da belirlenmiş olan işaretli moleküller kullanılmasıyla işaretlenir ve bu işlem sonucu Kütle Spektrometresi yöntemleri ile karşılaştırmalı protein ifade analizi yapılır (47). Bu yöntemde iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation), ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags), SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) ve  $^{18}\text{O}$  işaretleme teknikleri kullanılır (47). Etiketsiz proteomik yönteminde ise, protein izolasyonu, protein ayrımı ve miktar tayini, kütle

spektrometreleri gibi yöntemlerle protein kimliklendirilmesi ve analizlerinin yapılması süreçleri vardır (47).

### **2.1.3.1. Etiketsiz Karşılaştırmalı Proteomik Analiz Yöntemi**

Kütle spektrometrisi bazlı proteomik yaklaşımlar, biyoinformatik ile birleştiği zaman, biyolojik moleküllerin etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için gerekli olan hücresel protein hedeflerinin sınıflandırılması gibi bilgilere ulaşılmasını izin verir (49). Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) bazlı protein ölçümü, hücrelerde, dokularda, biyolojik sıvılarda ve organizmalardaki biyolojik süreçleri incelemek için kullanılan yüksek verimli olan bir yaklaşımdır (49). LC-MS yöntemi, Sıvı Kromatografi ("Liquid Chromatography", LC) ve ayrımı yapılan proteinlerin kütle spektrometrisi ("Mass Spectrometry", MS) analizine dayanır, LC-MS sistemi sıvı kromatografi cihazı ve kütle spektrometrisinin birleşmesinden oluşur (50).

LC-MS sisteminde sıvı kromatografi analizi kısmında, genelde yüksek basınçlı sıvı kromatografi ("High Pressure Liquid Chromatography", HPLC) tipi ve daha yüksek basınçta çalışan bir başka sıvı kromatografi tipi ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ("Ultra High Pressure Liquid Chromatography", UPLC) kullanılır (50). İyonizasyon kaynağı, dedektör ve analizör gibi kısımlardan oluşan kütle spektrometrisi analizinde ise moleküllerin kütle/elektrik yükü oranı ölçülerek molekül kütlesi açığa çıkmaktadır (50). İyonizasyon kaynakları, analiz edilecek molekülün iyonlaşmasını ve gaz fazına geçmesini sağlar (50). Analizör kısmı, radyo dalgaları, manyetizma ve elektrik alanını kullanarak gaz fazında olan iyonların birbirinden ayrışmasını sağlar (50). Ayrıştırılmış iyonların belirlenerek, her bir iyon için  $m/z$  değerinin ölçülmesi ise dedektör kısmında gerçekleştirilir ve bu ölçümlerin toplamı kütle spektrumu olarak belirlenir (50).

Katı halde bulunan protein-peptit örneklerinin iyonizasyonunun gerçekleştiği Matris destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionization", MALDI) ve sıvı halde bulunan protein-peptit örneklerinin iyonizasyonunun gerçekleştiği elektrosprey iyonizasyon ("Electro Spray Ionization", ESI) gibi iyonizasyon yöntemleri kullanılır (50). TOF ("Time of Flight"), LTQ ("Linear Trap Quadrupole"), Orbitrap ve Q-TOF (Quadrupole-Time of Flight) gibi analizör tiplerinin yanı sıra aynı veya farklı tipte iki analizörün birlikte kullanıldığı melez kütle spektrometrisi de vardır ve bu tip

analizörlerde bir çarpışma tetikleme hücresi ile ikincil bir analizör kullanılır (50). İlk analizörde belirlenen en yüksek yoğunluktaki iyonlar seçilip, çarpışma hücresine gönderilir ve burada seçilen iyonlar ortamdaki N<sub>2</sub> molekülleriyle çarpıştırılarak, parçalanır ve parçalanma sonrasındaki iyonlar ikincil analizörde tekrar ayrıştırılarak analiz edilen peptidin aminoasit dizisinin oluşturulduğu MS/MS kütle spektrumu oluşturulur (50).

Etiketsiz karşılaştırmalı LC-MS/MS analizi yönteminde, analizi gerçekleştirilecek olan örnek, Tripsinizasyon ile peptitlerine parçalanır. Elde edilen triptik peptitlerin, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-UPLC (Nano Ultra Performance Liquid Chromatography) sisteminde kromatografik ayrıştırması gerçekleştirilir, ardışık kütle spektrometreleri (MS/MS, Tandem MS) ile veriler elde edilir. Progenesis QI yazılımı, LC-MS/MS analizinde ortaya çıkan verilerin işlenmesini sağlar. Elde edilen veriler ışığında PANTHER, DAVID, STRING gibi açık erişime sahip olan biyoinformatik araçların kullanılması ile tanımlanmış olan proteinlerin sinyal yolları, biyolojik süreçleri ve moleküler fonksiyonları incelenir.

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Proteinler hücrenin fonksiyonel yapı taşları olduğundan, yer aldığı hücresel olayların aydınlatılmasında, hastalıkların tanısında, tedavilerin belirlenmesinde ve yeni ilaçların geliştirilmesinde kullanılır (46). Ayrıca DNA'daki değişikliklerin proteinlere dönüştüğünde etkili olması, protein ifadesindeki değişikliklerin hastalıkların durumu hakkında verilen bilginin temelini oluşturmasını sağlar ve araştırmacıları proteomik çalışmalara yönlendirir (46). Bu nedenle proteomik çalışmalar yardımıyla çeşitli proteinlerin ifade değişimlerine odaklanılması meme kanseri belirteçlerinin tanımlanmasını ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesini sağlayabilir (46).

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmada, farklı meme kanseri hücre hatları üzerine alternatif ilaç aday molekülü usnik asitin anti-proliferatif etkisi araştırılmış, usnik asitin büyümeyi inhibe edici etkisi meme kanseri hücre hatlarında gösterilmiş ve mikrodizin analizi ile her bir hücre hattında usnik asite cevap veren miRNA'lar tanımlanmıştır (51). BT-474 hücre hattında usnik aside cevap veren miRNA'lardan birinin hsa-miR-185-5p olduğu tespit edilmiş ve yolak analizleri ile bu miRNA'nın kanser ilişkili yolaklarda görev aldığı anlaşılmıştır (51). BT-474 hücre hattında hsa-miR-185-5p'nin ifadesinin, usnik asit muamelesi sonucunda mikrodizin analizinde ve bu analizin validasyon sonucunda arttığı belirlenmiştir (51).

Bu tez çalışmasının amacını BT-474 meme kanseri hücresinde liken sekonder metaboliti olan usnik asite cevap veren miR-185-5p'nin meme kanseri hastalık sürecine olan etkisinin protein düzeyinde ortaya çıkardığı global bir niceliksel proteomik yaklaşım olan LC-MS/MS analizi yöntemi ile belirlenmesi oluşturmaktadır.

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. MATERYAL

**Kullanılan kimyasal malzemeler:** Fetal Bovin Serum (FBS, Biological Industries, Israel), Penisilin/Streptomisin (Biowest, USA), High-Glucose Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma, USA), DMEM-Ham's F12 (Sigma, USA), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) (Goquick, Germany), Hidrokortizon (Pubchem, USA), Insulin (Humulin, USA), PBS (Gibco™, USA) , Tripsin (Gibco™, USA), Transfeksiyon Çözültisi (Qiagen, Germany), hsa-miR-185-5p mimik (Qiagen, Germany), MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma, Germany), Bradford çözeltisi (BioRad).

**Kullanılan sarf malzemeler:** Hücre kültürü flaskı T25 (SARSTEDT, 5025112), Cryo.S kriyovial, Dnase-Rnase içermeyen, 2 ml (ROTH, 60024042), steril polipropilen konik santrifüj tüp, 1.5 ml'lik steril santrifüj tüpü (CELLSTAR® TUBES, Kat.no:188 271), Dnase-Rnase içermeyen, steril, filtreli pipet uçları 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 plaka (ROCHE, Lot:13019801).

**Kullanılan kitleler:** cDNA Sentez Kiti (EURx), FASP™ Protein Digestion Kiti (Lot# 150426 Product#44250, Expedeon, USA), Pierce™ Quantitative Kolorimetrik Peptid Assay Kiti (Thermo Scientific, USA), SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat Kiti (Thermo Scientific, USA, Cat no:34577).

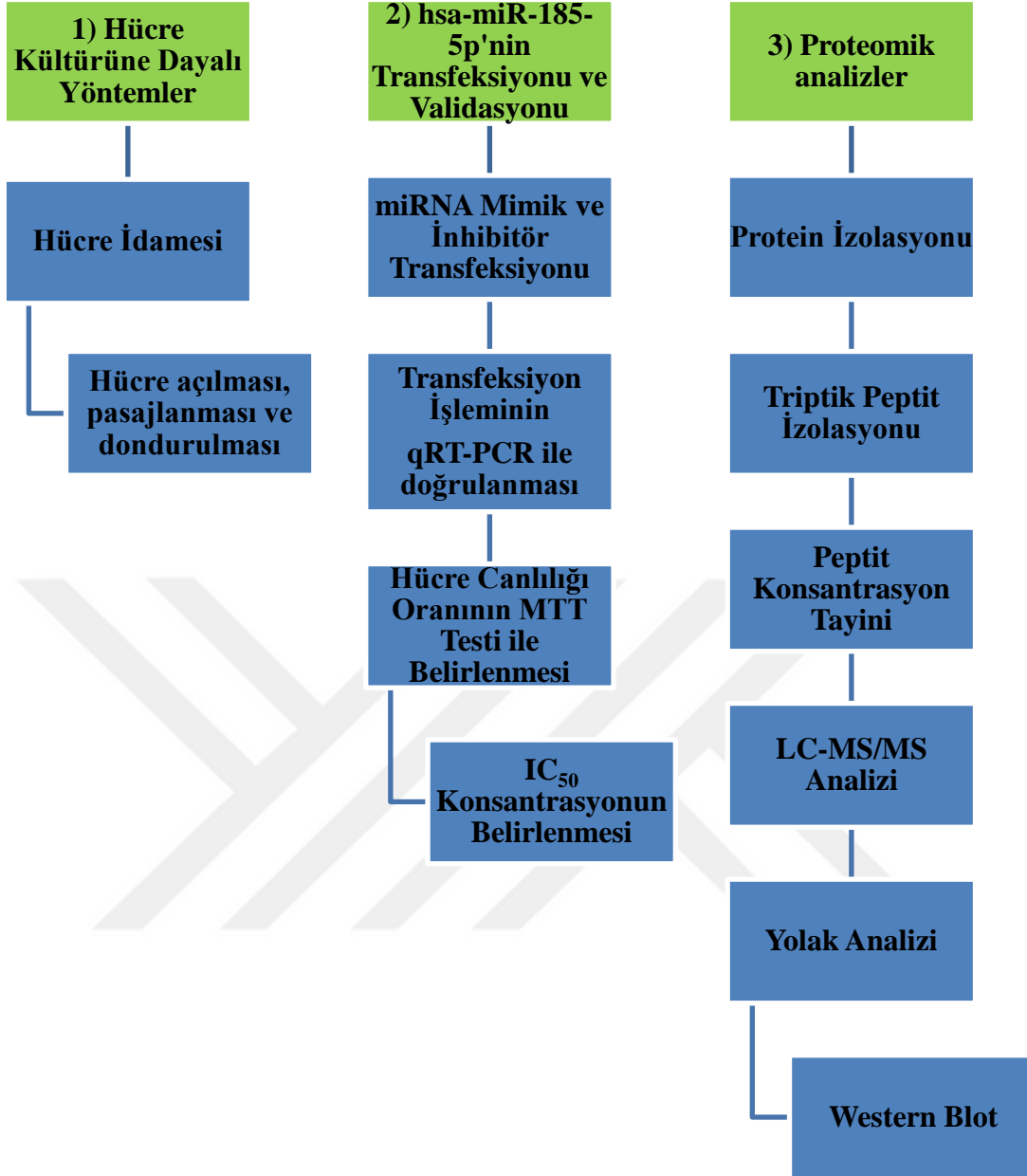
Tez kapsamında kullanılan cihazların listesi Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kullanılan cihazlar listesi

<b>Cihaz Adı</b>	<b>Markası</b>
CO <sub>2</sub> inkübatör	Sanyo CO <sub>2</sub> Incubator
Elektroforez tankı	Thermo Scientific
Mikroplate okuyucu	Victor3 V
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, 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
LC-MS/MS cihazı	Xevo G2-XS QTOF
Western Blot görüntüleme cihazı	Odyssey CLx

#### 4.2. METOT

Gerçekleştirilen tez 3 ana yöntem ve alt basamaklarından oluşmaktadır. Bunlar; Hücre Kültürüne Dayalı Yöntemler, hsa-miR-185-5p mimik transfeksiyonu validasyonu ve Proteomik Analizler'dir. İş Akış şeması Şekil 4.1.'de belirtilmiştir.



Şekil 4.1. İş Akış Şeması

#### 4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜNE DAYALI YÖNTEMLER

##### Hücre Kültürü

Deneyde, ATCC'den temin edilen Katolog Numarası: HTB-20<sup>TM</sup> olan insan meme kanseri hücre hattı BT-474 ve Katolog Numarası: CRL-10782<sup>TM</sup> olan insan meme dokusu normal epitel hücre hattı MCF-12A kullanılmıştır.

#### 4.2.1.1. Hücre İdamesi

##### 4.2.1.1.1. Hücre kültürü besiyerinin hazırlanması

BT-474 insan meme kanseri hücre hattının çoğalması için, içerisinde 10% Fetal Bovin Serum (FBS), 1% Penisilin/Streptomisin (Biowest, USA) bulunan High-Glucose Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma, USA) besiyeri kullanıldı. MCF-12A meme normal epiteliyal hücre hattının çoğalması için ise içerisinde 10% Fetal Bovin Serum (FBS, Biological Industries, Israel), 1% Penisilin/Streptomisin (Biowest, USA), 20 ng/ml Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) (Goquick, Germany), 0.5 mg/ml Hidrokortizon (Pubchem, USA), 10µg/ml İnsülin (Humulin, USA) bulunan DMEM-Ham's F12 (Sigma, USA) besiyeri kullanıldı (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Hücre hatları, katalog numaraları ve besiyeri içerikleri

Hücre hattı	Katalog numarası	Kullanılan Besiyeri içeriği
BT-474 (Meme kanseri hücre hattı)	Kat No. HTB-20 <sup>TM</sup>	DMEM + %10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin
MCF-12A (İnsan meme dokusu normal epitel hücre hattı)	Kat No. CRL-10782 <sup>TM</sup>	DMEM Ham's F12 + %10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin +10 µg/ml insulin + 20 ng/ml EGF + 0.5 mg/ml Hidrokortizon

##### 4.2.1.1.2. Hücre Açılması

Su banyosu 37°C'ye ayarlanır ve kullanılacak besiyerlerinin su banyosunda yaklaşık 15 dk ısınması beklenmiştir. 37 °C'de su banyosunda yaklaşık 15 dk bekletilen DMEM besiyeri laminar flow içerisine alınmıştır. Azot tankından çıkarılan BT-474 hücresinin (Pasaj no:12) yaklaşık 1-2 dk süresinde çözünmesi sağlanmıştır. 15 ml'lik falkon içerisine 5 ml besiyeri olan DMEM besiyeri üzerine kroviyal tüpte çözünen BT-474 hücresi hafifçe eklenmiştir. İçerisinde çözülmüş hücre bulunan falkon 15.000 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda oluşan süpernatant kısmı atılmış, alt kısımdaki pellet 5 ml yeni DMEM besiyeri ile yavaşça çözülmüş ve T25'lik flaska alınmıştır. Hücre mikroskop altında kontrol edilip, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkubatörde inkübasyona bırakılmıştır. Aynı



deneysel işlemler DMEM Ham's F12 besiyeri ile MCF-12A hücresi için de gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.1.1.3. Hücre Pasajlanması**

BT-474 hücreleri günlük olarak mikroskop altında hücre sayısı ve flaska yayılma oranına bakılarak takip edilmiştir. 2. günde BT-474 hücresinin besiyeri, yeni besiyeri ile değiştirilmiştir. 4 günlük inkübasyon sonunda hücreler mikroskop altında kontrol edildiğinde T25'lik flaskta %80-90 oranında bir doluluk gözlenmiştir. Flaskın alt yüzeyinde yapışmış olan hücelere zarar vermeden 4 ml Fosfat Tampon Solüsyonu PBS (Gibco™, USA) ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 ml Tripsin (Gibco™, USA) eklenmiş ve 37°C'deki CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırılarak yaklaşık 2 dk bekletilmiştir. Tripsin eklenmiş hücrelerin durumu mikroskopta incelenmiştir. Flask yüzeyinden tamamıyla ayrılan hücrelerin üzerine yeni 4 ml DMEM besiyeri eklenmiş ve toplam hacim 5 ml olmuştur. Pipetaj yapılarak toplam 5 ml'lik hacmin 2.5 ml'si T25'lik flaskta, diğer 2.5 ml'si başka bir T25'lik flaskta konulmuş olup, her iki flaskın üzerine 2.5 ml yeni besiyeri eklenip 5 ml'ye tamamlanmıştır. Hücreler mikroskop altında kontrol edilip, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde çoğalmaları için inkübasyona bırakılmıştır. Aynı deneysel işlemler DMEM Ham's F12 besiyeri ile MCF-12A hücresi için de gerçekleştirilmiştir.

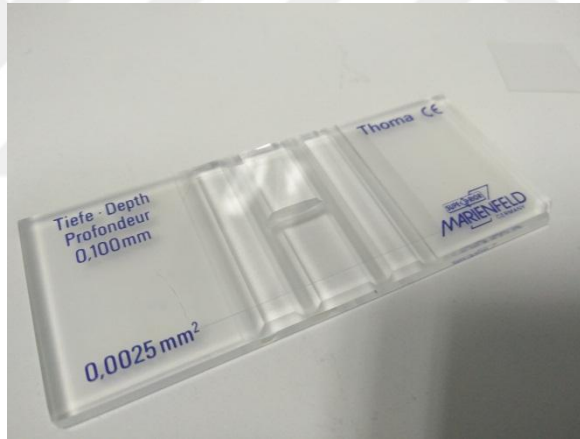
#### **4.2.1.1.4. Hücre Dondurulması**

Dondurma besiyeri, dondurulacak bir hücre için 15 ml'lik falkona %90 Fetal Bovine Serum + %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek hazırlanmıştır. Pasajlanması yapılan BT-474 hücreleri (Pasaj no:12) 4 günlük inkübasyon sonunda, mikroskop altında kontrol edildiğinde T25'lik flaskta %80-90 oranında bir doluluk gözlenmiştir. Flaskın alt yüzeyinde yapışmış olan hücelere zarar vermeden 4 ml Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 ml Tripsin eklenmiş ve 37°C'deki etüve kaldırılarak yaklaşık 2 dk bekletilmiştir. Tripsin eklenmiş hücrelerin durumu mikroskopta incelenmiştir. Flask yüzeyinden tamamıyla ayrılan hücrelerin üzerine yeni 4 ml DMEM besiyeri eklenmiş ve toplam hacim 5 ml olmuştur. T25'lik flasktaki 5 ml'lik hacim 15 ml'lik yeni falkona aktarılmış, falkon 15.000 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen pellete hazırlanan dondurma besiyerinden 1 ml eklenip kroviyal tüpe alınmıştır. İçerisinde hücrelerin bulunduğu kroviyal tüp, kademeli olarak -20°C'de 1 saat bekletilmiş,

1 saat sonunda  $-80^{\circ}\text{C}$ 'ye alınıp, 24 saat bekletilmiştir. Ardından uzun süre muhafaza etmek için sıvı azot tankına yerleştirilmiştir. Aynı deneysel işlemler DMEM Ham's F12 besiyeri ile MCF-12A hücresi için de gerçekleştirilmiştir.

#### 4.2.1.1.5. Hücre sayımı

Thoma Lamı üzerinde iki sayım alanı bulunan özel bir lamdır. Sayım alanlarında bulunan çizgiler mikroskop altında birbirinden ayırt edilebilirler. 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Hücre sayım işlemi bu karelerde var olan hücre sayısına göre yapılır. Hücre PBS ile yıkanıp, Tripsin ile kaldırıldıktan sonra 15 ml'lik falkona alınmıştır ve 15.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Pellet halindeki hücreler taze besiyeri ile süspanse edilip, 50  $\mu\text{l}$  Thoma lamının 1. oluğuna bırakılmış, tekrar 50  $\mu\text{l}$  alınıp 2. oluğa bırakılmıştır. Mikroskop altında 10X objektif büyütmesinde hücre sayımı 3 tekrarlı yapılmış ve aritmetik ortalaması alınarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.



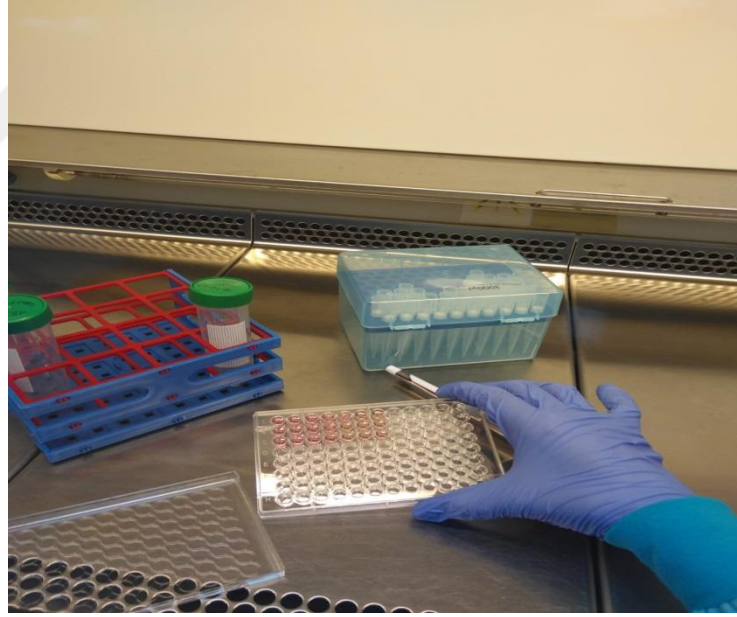
Şekil 4.2. Thoma Lamı

## 4.2.2. HSA-MİR-185-5P'NİN TRANSFEKSİYON VE VALİDASYONU

### 4.2.2.1. Hücre Canlılığı Testi (MTT) ve Etkin Konsantrasyonun Belirlenmesi Amaçlı miRNA Mimik ve Negatif Kontrol Transfeksiyonu

BT-474 ve MCF-12A hücrelerinin transfeksiyonu, Transfeksiyon Çözeltisi (Qiagen, Germany) ve 20  $\mu\text{M}$  stok hsa-miR-185-5p miRNA mimik (Qiagen, Germany) kullanılarak, üretici firmanın protokolü ile gerçekleştirildi.

Hücreler kültür edildikten sonra her bir kuyucuğa  $1 \times 10^5$  hücre 3 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyulu hücre plakalarına ekim yapılmış olup ve 24, 48 ve 72 saat süreli aralıklar ile hücrelere farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 15, 25, 50, 75, 100 nM) miR-185-5p miRNA mimik'in transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyonda 20  $\mu$ M stok miRNA mimik belirlenen konsantrasyonlara uygun hesaplanan miRNA mimik miktarları ayrı ayrı her bir kuyucuğa eklenmiştir. Ayrı bir falkonda her bir kuyucuk için 24.25  $\mu$ l serum içermeyen besiyeri içerisine 0.75  $\mu$ l transfeksiyon çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan bu solüsyon farklı konsantrasyonlarda ki miRNA mimik içeren kuyucuklara ayrı ayrı eklenmiştir. Transfeksiyon kompleksinin oluşması için 96 kuyulu hücre plakaları oda sıcaklığında yaklaşık 10 dk bekletilmiştir. Ayrı bir falkonda içinde  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 175  $\mu$ l besiyeri hazırlanmıştır ve oluşan transfeksiyon kompleksinin üzerine ayrı ayrı eklenmiştir. Besiyerinin eklenmesiyle her bir kuyucukta istenen miRNA mimik konsantrasyonu elde edilmiştir. Hazırlanan 96 kuyulu hücre plakalar 24, 48 ve 72 saat süreli farklı zamanlarda ölçüm alınmak üzere 37°C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde bekletilmiştir.



Şekil 4.3. miRNA mimik etkin konsantrasyonun belirlenmesi amaçlı 96 kuyulu hücre plakası kullanılarak transfeksiyon işlemi

miRNA mimik'in negatif kontrolü olarak, hücrelere negatif kontrol transfeksiyonu da aynı işlemler uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

#### 4.2.2.2. Hücre Canlılığı Oranının MTT Testi ile Belirlenmesi

Hücre canlılığını tespit edebilmek için hücre proliferasyon reaktifi olan MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma, Germany) kullanılmıştır. 5 mg MTT'nin 1 ml PBS'de çözülmesi sağlanarak solüsyonun hazırlanması tamamlanmıştır. MTT solüsyonunun her defasında taze hazırlanmasına dikkat edilmiş ve alüminyum folyo ile etrafı sarılarak karanlıkta muhafaza edilmesi sağlanmıştır.

BT-474 ve MCF-12A hücreleri 96 kuyulu hücre plakalarına kuyu başına  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilip, miRNA mimik ve negatif kontrolün transfeksiyon aşaması yapıldıktan sonra 48 saat  $CO_2$ 'li etüvde bekletilip MTT testi uygulandı. MTT solüsyonu uygulanan plate,  $37^\circ C$  etüve kaldırıldı ve 4 saat beklendi. Sonrasında 100  $\mu l$  izopropanol eklendi. Mikroplaka Okuyucu (VICTOR3 V) 584 nm'de spektrofotometrik okuma üç tekrarlı olarak yapıldı ve  $IC_{50}$  değeri aşağıdaki formülüzasyona göre hesaplanarak 25 nM olarak belirlendi.

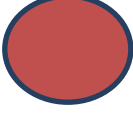

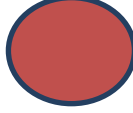
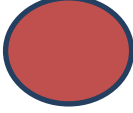
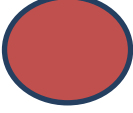
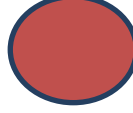


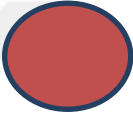
% Canlılık =  $100 \times \frac{\text{Her bir numunenin bulunduğu kuyucukların ortalama OD değeri}}{\text{Negatif kontrol kuyucuklarının ortalama OD değeri}}$

#### 4.2.2.3. Protein ve RNA İzolasyonu Amaçlı hsa-miR-185-5p Mimik Transfeksiyonu

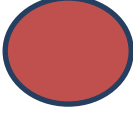

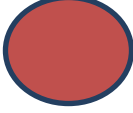
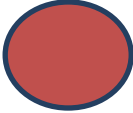
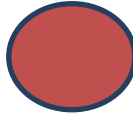
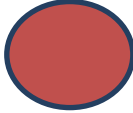
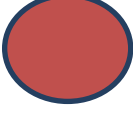

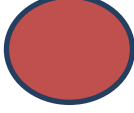
6 kuyulu plakalara her bir kuyuya 1 ml içerisinde 350.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiş ve  $CO_2$ 'li etüve kaldırılmıştır. 24 saat bekletilen 6 kuyulu plakalar etüvden alınarak mikroskopta kontrol edilmiştir. Kuyucuklardaki besiyerleri çekilip atılmış, her bir kuyucuk 2 ml soğuk 1xPBS ile yıkanmış ve her bir kuyucuğa 2 ml çalışılan hücreye uygun besiyeri eklenmiş, üzerlerine  $IC_{50}$  konsantrasyonunda hsa-miR185-5p ve uygun besiyeri bulunan Transfeksiyon Stok'tan 400  $\mu l$  pipet ile dıştan içe doğru saat yönünde aralıklarla damla damla eklenmiştir. miRNA negatif kontrolü ve uygun besiyeri bulunan Transfeksiyon Stok'tan diğer kuyucuklara aynı şekilde 400  $\mu l$  eklenmiştir. Kontrol kuyucuklara ise sadece 400  $\mu l$  hücre besiyeri eklenmiştir (Çizelge 4.3., 4.4.).

6 kuyulu plakalar  $37^\circ C$ 'de %5  $CO_2$ 'li inkübatörde 48 saat süre ile transfeksiyonun validasyonunun belirlenebilmesi için RNA izolasyonu ve proteoma dayalı yöntemlerin gerçekleşmesi için de protein izolasyonu yapmak amacıyla inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 4.3. BT-474 hücre hattı için hsa-mir-185-5p mimik, negatif kontrol transfeksiyonu ve besiyeri uygulamasının 3 tekrarlı kuyulara dağılımı

BT-474 hücrelerine 3 tekrarlı miR-185-5p transfeksiyonu	1 	2 	3 
BT-474 hücrelerine 3 tekrarlı negatif kontrol transfeksiyonu	4 	5 	6 
BT-474 hücreleri ve Besiyeri	7 	8 	9 

Çizelge 4.4. MCF-12A hücre hattı için hsa-mir-185-5p mimik, negatif kontrol transfeksiyonu ve besiyeri uygulamasının 3 tekrarlı kuyulara dağılımı

MCF-12A hücrelerine 3 tekrarlı miR-185-5p transfeksiyonu	1 	2 	3 
MCF-12A hücrelerine 3 tekrarlı negatif kontrol transfeksiyonu	4 	5 	6 
MCF-12A hücreleri ve Besiyeri	7 	8 	9 

#### **4.2.2.3.1. hsa-miR-185-5p Mimik Transfeksiyonunun qRT-PCR ile Validasyonu**

hsa-miR-185-5p mimik transfeksiyonunun qRT-PCR ile validasyonu için transfeksiyon aşaması gerçekleşmiş hücrelerden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

##### **4.2.2.3.1.1. RNA İzolasyonu**

6 kuyulu plakalara her bir kuyuya  $35 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat sonra  $IC_{50}$  değeri olarak belirlenen 25 nM, miRNA-185-5p mimik ve negatif kontrol transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 6 kuyulu plakalardaki hücreler mikroskopta kontrol edilmiştir. Normal hücreler ve kanserli hücreler için ependorf tüpler hazırlanmış, kuyucukların sırasına göre numaralandırılmıştır. Buz üzerine konulan 6 kuyulu plakalardaki kuyucukların her birine 1 ml Genezol (Geneaid, Taiwan) solüsyonu eklenmiş ve numaralandırılmış ependorf tüplere konulmuş ve üzerlerine 200 µl kloroform eklenip, tüpler hafifçe çalkalanıp, oda ısısında 10 dk bekletilmiştir. 10 dk sonra tüpler  $+4^{\circ}C$ 'de 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerde 3 farklı zon gözlenmiş, örneklerde en üstteki bölümde yer alan RNA yeni Ependorf tüplere aktarılmıştır. Tüplere 500 µl izopropanol eklenmiş ve tüpler 1 dk hafifçe aşağı yukarı çalkalanıp, oda ısısında 10 dk bekletilmiştir. 10 dk sonra tüpler  $4^{\circ}C$ 'de 12000 rpm'de 8 dk santrifüj edilmiştir. Tüpün dip kısmında RNA pelleti oluştuğu gözlenmiştir. Pellete dikkat edilerek izopropanol uzaklaştırılmış, tüplere 1 ml % 75'lik etanol (Merck, Germany) eklenerek pellet kaldırılmış, tüpler  $4^{\circ}C$ 'de 7500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş, dip kısmında beyaz pellet oluştuğu görülmüştür. Pelete dikkat edilerek alkol uzaklaştırılmış ve tüpler kapağı açık bir şekilde temiz bir yüzey üzerine kurumaya bırakılmıştır. Alkol uçtuğu görülünce tüplere içindeki peletin miktarına göre 35-50 µl RNaz içermeyen su eklenmiş ve pellet çözülmeye bırakılmıştır. Bu aşamada pelletler çözüldükten sonra buz üzerine alınmış ve RNA örnekleri nanodrop cihazında miktar ve kalite ölçümleri yapılarak  $-80^{\circ}C$ 'ye kaldırılmıştır.

##### **4.2.2.3.1.2. cDNA sentezi**

1000 ng total RNA kullanılarak cDNA sentezi, cDNA sentez kiti (EURx, Poland) kullanılarak yapılmıştır. 5X NG cDNA Buffer oda sıcaklığına alınarak çözünmesi sağlanmış, çözünen Buffer yavaşça vortekslenmiştir. RNase free tüplere 5X NG cDNA

Buffer'dan 2 µl, Oligo(dT) Primer'den 0.5 µl, NG dART RT mix'den 0.5 µl ve RNA (1000 ng) eklenip, solüsyon RNaz içermeyen su ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. PCR cihazı 45 dk 50°C'ye ayarlanmış ve örnekler cihaza yerleştirilmiştir. Örnekler reaksiyon bittikten sonra 85 °C'de 5 dk bekletildikten sonra -20 °C'de saklanmıştır.

#### **4.2.2.3.1.3. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)**

Daha sonra miR-185-5p'ye spesifik primer (5'UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA3') kullanılarak Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) (Roche Light Cycler 480 Real-Time PCR system) başlangıç basamağı için (95°C'de 12 dk 1 döngü), Denatürasyon basamağı için (95°C'de 15 sn, 40 döngü), Bağlanma basamağı için (65°C'de 30 sn, 40 döngü), Uzama Basamağı için (72°C'de 30 sn, 40 döngü) reaksiyon koşullarında gerçekleştirilmiştir.

### **4.2.3. PROTEOMİK ANALİZLER**

#### **4.2.3.1. Protein İzolasyonu**

Protein izolasyonu için 6 kuyulu plakalara her bir kuyuya  $35 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat sonra IC<sub>50</sub> değeri olarak belirlenen 25 nM, hsa-miR-185-5p mimik ve negatif kontrol transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 6 kuyulu plakalardaki hücreler mikroskopta kontrol edilmiştir. BT-474 ve MCF-12A hücreleri için endorf tüpler hazırlanmış, kuyuların sırasına göre numaralandırılmıştır. Kuyulardaki besiyerleri çekilip atılmış, 1 ml soğuk PBS konulup skrapel ile kazıma yapılmış ve örneğe ait endorf tüplere konulmuştur. Daha sonra kuyulara 500 µl soğuk PBS eklenerek skrapel ile biraz daha kazıma yapılmış ve örneğe ait endorf tüpe eklenmiştir. Tüm örnekler için aynı işlemler tekrarlanmıştır. 4°C'ye getirilmiş santrifüj cihazında 1000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmış, süpernatant dikkatlice çekilerek atılmış ve pellet elde edilmiştir.

Total protein izolasyonu sonikasyon yöntemi ile üreli lizis buffer kullanılarak yapılmıştır. Üreli lizis buffer içeriği Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Üreli lizis buffer içeriği

İÇERİK	KONSANTRASYON	MİKTAR
Üre	7 M	21.021 g
Thioure	2 M	7,611 g
Chaps	%4	2 g
DTT	%1	0,5 g
Ampholit	%2	1 ml
Proteaz inhibitörü	-	1 tablet
Distile su	-	Çözelti 50 ml'ye tamamlanır.

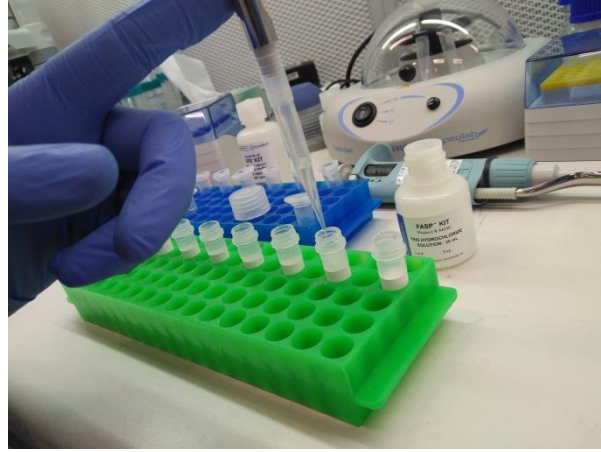
Tüpteki pellet miktarlarına göre 120-150 µl üreli lizis buffer eklenmiştir. Sonikatör ile hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Parçalanmış olan hücreler 12000 rpm'de 40 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan süpernatantlar dikkatli bir şekilde alınıp, endorf tüplere konulmuştur. Protein örneklerinin miktar tayini, Bradford yöntemi ile yapılmıştır. Bir protein çözeltisinin protein içeriğini ölçmek için birçok yöntem vardır. Bradford yöntemi boyanın proteinlere bağlanıp renk oluşturma esasına dayanır. Bu yöntemde negatif yüklü ve proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlanan organik bir boyar madde olan Commassie Brilliant Blue proteine bağlanınca mavi renk oluşturma özelliğinden yararlanır ve 595 nm dalga boyunda maksimum absorban verir (51).

Sığır serum albümini (BSA) 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanarak standart olarak kullanılmıştır. Protein örneklerden 5 µl alınarak 96 kuyulu plakaya konulmuştur. Üzerlerine 245 µl Bradford çözeltisi (BioRad) eklenip, 10 dk karanlık bir ortamda bekletilmiştir. 96 kuyulu plakaya üçer tekrarlı yapılan standartlar ve örneklerin spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçümü gerçekleştirilmiştir.

#### 4.2.3.2. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometre Analizi için Örnek Hazırlanması

Örnekler, filtre destekli örnek hazırlama (FASP) yöntemi, FASP Protein Digestion Kiti (Expedeon, USA) kullanılarak proteomik analiz için hazırlanmıştır. İlk olarak kitin içinde bulunan solüsyonlar hazırlanmıştır.





Şekil 4.4. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometre Analizi için örnek hazırlanması

**Üre solüsyonu hazırlanması:** 1 ml Tris Hidroklorit solüsyonu (Expedeon, USA), FASP kiti içindeki bulunan üre tüpüne (Expedeon, USA) ilave edildi. Solüsyon çözünene kadar vortekslendi.

**10X İodoasetamit solüsyonu hazırlanması:** Hazırlanan ürea solüsyonundan 100 µl kit içerisinde bulunan iodoasetamit tüpüne (Expedeon, USA) eklendi, vortekslendi.

**Tripsin solüsyonu hazırlanması:** 4 µg Tripsin (ThermoFisher Scientific, USA), 75 µl 50 mM Amonyum Bikarbonat çözeltisi (Expedeon, USA) içinde çözüldü.

**UPX ( Çok Amaçlı Protein Ekstaksiyon Kiti) (Expedeon, San Diego, CA) :** SDS, DTT, EDTA, NaCl ve su gibi bileşenlerden oluşur. UPX solüsyonunu içinde bulunan redükte edici ajanlar ve SDS, proteinlerin hücrelerden ve dokulardan ekstraksiyonunu sağlar.

Analizi yapılacak olan protein örnek tüpleri, yeni LoBind eppendorf tüplere (Expedeon, USA) aktarıldı ve vortekslendi. Kullanılacak UPX solüsyonuna proteaz inhibitör kokteyli eklenerek analize hazır hale getirdi. 50 µl UPX örneklerin üzerine eklendi.

Analizlerde kullanılacak 25 mM DTT (Dithiothreitol) (Expedeon, USA) çözeltisi hazırlandı. DTT proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarında bulunan disülfid bağların kırılmasını sağlar ve proteinleri erişilebilir hale getirir. 1 ml Tris Hidroklorit solüsyonu FASP kiti içinde bulunan Üre tüpüne ilave edildi. 37°C'de Thermo Shaker'da solüsyon çözünene kadar döndürüldü.

Tüplere 10 µl DTT ve 10 µl hazırlanan üre çözeltisinden eklendi ve vortekslendi. Örnek tüpleri Thermo Shaker'da 95°C'de 600 rpm'de 7 dk bekletildi ve 15000 rpm'de 15 dk santrifüje bırakıldı. Yeni tüpler alınarak numaralandırıldı. Bunların herbirinin üzerine filtre tüpleri eklendi. Filtre tüplerinin üzerine, filtreye değdirilmeden filtreyi ıslatmak amaçlı 20 µl hazırlanan üre solüsyonundan eklendi. Santrifüjden gelen örnekler yeni hazırlanan tüp + filtreli yeni tüplere eklendi. Her bir örneğin üzerine toplamda 300 µl olacak şekilde üre solüsyonundan eklendi. Örnekler 14000 rpm'de 15 dk santrifüje bırakıldı. Santrifüjden alınan örneklerin üzerine 200 µl daha üre solüsyonu ilave edilerek 14000 rpm'de 20 dk santrifüje bırakıldı. Filtre tüpleri kaldırıp altta kalan örnekler atıldı. Filtreli tüpler 14000 rpm'de 5 dk santrifüje bırakıldı. Kitte bulunan 2 tüp iodoasetamit (IAA) (Expedeon, USA) üzerine 100 µl üre solüsyonundan eklendi ve iodoasetamit çözeltisi hazırlandı. IAA, sistein zincirlerini alkiler ve alkillenme işlemiyle tekrar oluşabilecek disülfid bağlarını engellemiş olur. Santrifüjden gelen filtrenin üzerine 10 µl iodoasetamit ve 90 µl üre çözeltisi eklendi ve filtre kısaca vortekslendi. Tüpler alüminyum folyo ile sarılarak 30 dk boyunca karanlıkta bekletildi. Filtreler 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Filtrelere 200 µl üre çözeltisinden eklendi ve 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüjden gelen tüplerin dipleri döküldü ve üzerlerine 100 µl üre çözeltisinden eklendi ve 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüjden gelen tüplerin üzerlerine 100 µl üre solüsyonundan eklendi ve 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Filtrelerin altı boşaltıldı ve her bir örneğe 150 µl Amonyum bikarbonat çözeltisi (Expedeon, USA) eklendi ve filtre 14000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden gelen tüplerin üzerlerine 100 µl Amonyum bikarbonat çözeltisi eklendi ve 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem iki kez daha tekrarlandı.

Santrifüjden çıkan tüplerin altları boşaltıldı. Tüplerin altına filtre kaldırılıp 50 µl  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (amonyum bikarbonat) solüsyonu eklendi. Tripsin solüsyonu triptik peptitleri elde etmek için, 4 µg Tripsin'in (ThermoFisher Scientific, USA, Cat no:1862748), 75 µl 50 mM Amonyum bikarbonat (Expedeon, USA) içinde çözülmesi ile hazırlandı. Filtreye 75 µl Tripsin solüsyonu eklendi, filtreli tüplerin ağızları parafilmlemlendi ve filtre kısaca vortekslendi. Filtre 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. 18 örnek için yeni tüpler hazırlanıp numaralandırıldı. Filtreler yeni tüplere alındı. Üzerlerine 50 mM Amonyum bikarbonat çözeltisinden 40 µl eklendi ve filtreler 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden gelen tüplerin üzerlerine Amonyum bikarbonat çözeltisinden 40 µl eklendi ve

14000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden gelen filtrelerin üzerlerine 0.5 mM Sodyum Klorit çözeltisinden 50 µl eklendi ve filtreler 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Filtrat peptit karışımı içermektedir. Bu aşamadaki örnek üzerinden peptit konsantrasyon tayini yapılabilir. Örnekler 4°C'de bekletildi.

#### 4.2.3.3. Peptit Konsantrasyon Tayini

Peptit Assay Solüsyon kiti (Pierce™ Quantitative Kolorimetrik Peptit Assay Kiti, Thermo Scientific, USA) içeriğine göre 15 ml falkonun içerisine A çözeltisinden 1750 µl, B çözeltisinden 1680 µl, C çözeltisinden 70 µl eklendi. Pipetaj yapıldı ve falkon alüminyum folyoya sarılarak vortekslendi. 96 kuyulu bir plaka içerisine bir kuyuya blank olarak 20 µl H<sub>2</sub>O ve A, B ve C çözelti karışımından 180 µl eklendi, beş kuyuya 20 µl standart olarak kullanılan 500, 250, 125, 62.5, 31.25 (ug/ml) olarak seyreltilen BSA ve A, B ve C çözelti karışımından 180 µl eklendi. Diğer 18 kuyuya 10 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl örnek ve A, B ve C çözelti karışımından 180 µl eklendi. 96 kuyulu plaka alüminyum folyo ile sarılarak Thermo shaker'da (Grant-Bio) 1 dk çalkalandı. Daha sonra 15 dk 37°C'de etüve kaldırıldı. Sonuçlar (Synergy H1 Hybrid Reader) cihazında ölçüldü ve peptit konsantrasyonları hesaplandı (480 nm).



Şekil 4.5. Peptit Assay Solüsyon kitine göre hazırlanan A,B ve C çözeltisinin karışımı

#### 4.2.3.4. LC-MS/MS Analizi

hsa-miR-185-5p transfeksiyonu gerçekleştirilmiş olan BT-474 ve MCF-12A hücrelerinden elde edilen proteinler, tripsin enzimi ile muamele edilmiş, tripsinizasyon sonucu oluşan

peptitlerin kütle spektrometresine bağlı bir sıvı kromatografi kolonuna yüklenip birbirinden ayrışması sağlanmış, peptit ağırlıklarının incelenmesi için MS analizi yapılmış, (58) aminoasit sekanslarının belirlenmesi için ise MS/MS analizi yapılmıştır.

Elde edilen triptik peptitler, etiketsiz nano-LC-MS/MS yöntemi ile kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildi. Hazırlanan heri bir örneğin triptik peptit karışımından 5 µL (1 µg) alınarak, LC/MS-MS cihazına (Xevo G2-XS QTOF, Waters, USA) yüklendi. Peptit ayrımı, nanoACQUITY basınçlı sıvı kromatografisi (UPLC, Waters, Milford, MA) üzerinde gerçekleştirildi. Sıvı kromatografisi sisteminde, peptitlerin güçlü bir kromatografik ayrımının gerçekleşebilmesi için kolonların kullanılması gerekir. Kolonlar, %97 mobil faz A (su, %0.1 formik asit, %5 asetonitril) ve %3 mobil faz B (asetonitril, %0.1 formik asit) ile dengelendi. Kolon sıcaklığı 45°C'ye ayarlandı. 5 µL hacimdeki 1 µg triptik peptit, bir analitik kolona (Waters) mobil faz B'nin %5 den %40'a kadar olan gradyan elüsyonuyla, örneklerin tuzlardan uzaklaştığı trap kolondan (Waters) 300 nL/dk akış hızında doğrusal bir gradyan ile 90 dakikada ayrıldı.

Peptit m/z ölçümü ve dizilimi, nanolock sprey iyon kaynağı (Waters) ile bir SYNAPT yüksek tanımlı kütle spektrometresinde gerçekleştirildi. Paralel çarpışma kaynaklı ayrışma (MSE), cihazın pozitif iyon V modunda çalıştırılması ve MS ve MS/MS fonksiyonlarının 6 V düşük çarpışma enerjisi ve 15-40 V yüksek çarpışma enerjisi ile 1.5 sn aralıklarla uygulanmasıyla gerçekleştirildi.

Amino asit dizisi, peptit kütle oranı (m/z) ve ürün iyon bilgisine göre çıkarıldı. Kütle sürüklenmesini düzeltmek için, iç kütle kalibratörü Glu-fibrinopeptit (500 pmol/µL) her 45 saniyede 300 nL/dk akış hızında nanolock sprey iyon kaynağı yoluyla infüze edildi. Peptit sinyal verileri 50 ile 1950 m/z değerleri arasında cihazda toplandı.



Şekil 4.6. LC-MS/MS Cihazı (Xevo G2-XS QTOF, Waters, USA)

#### 4.2.3.5. İstatiksel Analiz

Progenesis-QI LC-MS yazılımı V4.0 (nonlinear dynamics), peptitlerin miktarları ve tanımlanması için kullanılmıştır. Peptit kütle oranı (m/z) 785,8426 olan Glu-fibrinopeptit kalibratör olarak kullanılmış olup, örnekler toplam iyon yoğunluğuna bağlı olarak normalize edilmiştir.

Stu-t testi kullanılarak, p-değerleri ve proteinlerin deneysel oranı hesaplandı ve tanımlanan proteinler, bu iki parametreye göre filtrelendi. Belirlenen proteinlerle ilgili yolak analizi etmek için, STRING (Versiyon: 10.5), PANTHER (Versiyon 9.0) ve DAVID (Versiyon 6.8) veri tabanları birlikte kullanıldı.

#### 4.2.3.6. SDS PAGE ve Western Blot Analizi

Western blot analizine başlamadan önceki ilk aşama olan SDS PAGE jel dökümü için gereken düzenlemeler aşağıda belirtilmiştir. SDS-PAGE jelleri olan ayırıcı (Separating) jel ve yığıma (Stacking) jelleri Çizelge 4.6.'da belirtilen madde ve miktarlar ile hazırlanmıştır.

Çizelge 4.6. Ayırıcı ve yığma jel yapımı için kullanılan madde ve miktarları

Ayırma Jeli (%12)		Yığma Jeli (%4)	
H <sub>2</sub> O	2.58 ml	H <sub>2</sub> O	1.46 ml
1.5 m Tris	1.5 ml	1.5 m Tris	250 µl
% 40 poliakrilamid	1.8 ml	% 40 poliakrialmid	250 µl
% 10 SDS	60 µl	% 10 SDS	20 µl
% 10 APS	60 µl	% 10 APS	20 µl
TEMED	2.4 µl	TEMED	2 µl

Ayırıcı jel hazırlandıktan sonra jel yüzeyi izopropanol (EMSURE, K44834034334), ile kaplanmıştır. Jelin 45 dk polimerize olması beklenmiş ardından üzerindeki izopropanol dökülmüştür. Yığma jeli hazırlanmış ve ayırıcı jelin üzerine eklenmiştir. Jel tarakları konulup, jelin polimerize olması için 30 dk beklenmiştir. Protein örnekleri 20 µl'de 10 µg olacak biçimde 1:4 oranındaki örnek tamponu ile karıştırıldı. 95°C'de transfer cihazında (DRY Both Incubator, Major Science) 5 dk bekletildi. Örnekler jele yüklendi ve elektrotlar bağlandı. Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar 30 dk düşük akımda 100 Volt gerilim uygulandı, ayırıcı jeli geçtikten sonra ise 50 dk 120 Volt gerilimi uygulandı. (Bio-Rad, Power/PAC 3000) Brom fenol mavisi jelin alt ucuna geldiğinde akım kesildi ve jel tanktan uzaklaştırıldı.

Western blot analiz yönteminde kullanılacak olan çözeltiler Çizelge 4.7.'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 4.7. Western blot analiz yönteminde kullanılacak olan çözeltiler

10X Towbin Buffer (Transfer Tamponu) Stok Çözeltisi (1 litre)	30.3 g Tris + 144 g Glisin + 20 ml %10 SDS + Saf su eklenerek çözelti 1 litreye tamamlanır.
1X Towbin Buffer (Transfer Tamponu) Çözeltisi	100 ml 10X Towbin Buffer Stok çözeltisi + 200 ml %100 Metanol + 700 ml saf su ile 1X'e seyreltilir.
10X TBS Stok Çözeltisi (1 litre)	24.23 g Trizma-HCl + 80.06 g NaCl + Saf su eklenerek çözelti 1 litreye tamamlanır (pH= 7.6).
TBST Çözeltisi	10X TBS stok çözeltisi, 10 ml 10X stok + 89.95 ml Saf su + 50 µl Tween 20 (çözeltide son hacim oranı %0.05 olacak şekilde) ile 1X'e seyreltilir.
Bloklama Tamponu	5 g BSA (Çözelti içinde %5 olacak şekilde) + TBST ile 100 ml'ye tamamlanır.
4X Örnek Tamponu (Loading sample Buffer) (10ml)	1 M Tris-HCl (pH=6.8) + 0,8 g SDS + 4 ml Gliserol + 0,5 ml Betamerkaptoetanol + %10 Brom fenol mavisi eklenir.

PVDF membran (Thermo Fisher Scientific, USA) jelin boyutuna uygun olarak (9cm x 6cm) kesildi ve 1 dk %100 metanol ile, 1 dk 1X Towbin transfer tamponuyla ıslatıldı. Yarı kuru transfer için, 2 adet filtre kağıdı 1X Towbin transfer buffer ile ıslatıldı ve cihaza (Biometra An Analytik Jena Company) yerleştirildi. Üzerine ıslatılan membran konuldu, jel membranın üzerine düzgün bir şekilde eklenip, 2 adet filtre kağıdı 1X Towbin transfer buffer ile ıslatılıp, jelin üzerine eklendi. Bu aşamalar sırasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Yapılan sandviç modeli olabildiğince 1X Towbin transfer buffer ile ıslatıldı. Transfer işlemi elektroforez cihazında (Electrophoresis Power Supply-EPS 601, Amershem Biosciences) 15 Volt'ta 90 dk sürede gerçekleştirildi. Proteinlerin transfer olduğu membran bloklama tamponu içinde 90 dk oda sıcaklığında bloke edildi ve bloklama tamponu döküldü. Yeni hazırlanan bloklama tamponunun içinde proteine özgün Anti-CathepsinD (Biolegend, USD, Cat no:678502), Anti14-3-3-Epsilon (Biolegend, USD, Cat no:637901), Anti-PAK1 (Abcam, US, Cat no:ab183894), birincil antikorları 1: 1000 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Anti-βeta Aktin (FineTest, China, Cat no:FNab00872) antikoru da 1:1000 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

Membran, membran poşeti ile kaplanarak içerisine hazırlanan birincil antikorların bulunduğu bloklama tamponu ilave edildi ve gece boyu 4°C’de çalkalayıcıda çalkalandı. Tampon döküldü ve membran TBST çözeltisi ile 3 kez 10 dk süre ile yıkandı. Membran, bloklama tamponu içinde 1:2000 oranında seyreltilerek hazırlanmış ikincil antikor Anti-mouse IgG HRP sekonder antikor (Abcam, USA Cat no: Ab131368) ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 60 dk inkübe edildi. Tampon döküldü ve membran TBST çözeltisi ile 3 kez 10 dk süre ile yıkandı.

Membrandaki protein bantlarının görülmesi amacıyla kit (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Cat no:34577) kullanıldı. Kitin içindeki SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution (Cat no:1862123-LSG) ve SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution (Cat no:1862124-LSG) reaktiflerinin 1:1 (200 µl) oranında bir falkon tüpte karıştırılmasıyla bir çözelti elde edildi. Bu çözelti ışığa duyarlı olduğu için falkon tüp alüminyum folyo ile sarılmıştır. Membranın üzerine bu çözülden eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletilip, görüntüleme cihazı ile (Odyssey Imaging System) (LI-COR ODYSSEY) kullanılarak görüntüledi. Protein miktarlarındaki değişimler görüntüleme cihazına ait Odyssey Imaging System programı ile hesaplanmıştır. Western blot analizi için kullanılan antikorlar 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.



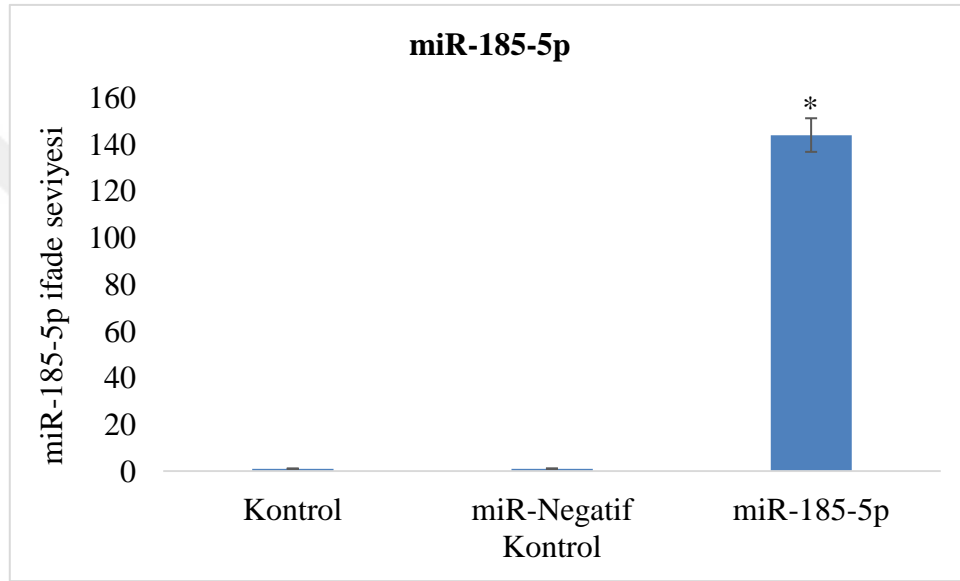
Şekil 4.7. Görüntüleme cihazı (LI-COR ODYSSEY)



## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. HSA-MİR-185-5P'NİN TRANSFEKSİYONUN VALİDASYONU

hsa-miR-185-5p'nin transfeksiyon işleminin doğrulaması Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) ile yapıldı. qRT-PCR verileri, hsa-miR-185-5p transfeksiyonu sonucu BT-474 meme kanseri hücrelerinde miR-185-5p ifadesinin arttığı, MCF-12A normal meme hücrelerinde miR-185-5p ifade seviyesinde artış olmadığını göstermiştir. miR-185-5p'nin ifadesi Şekil 5.1.'de gösterilmiştir.

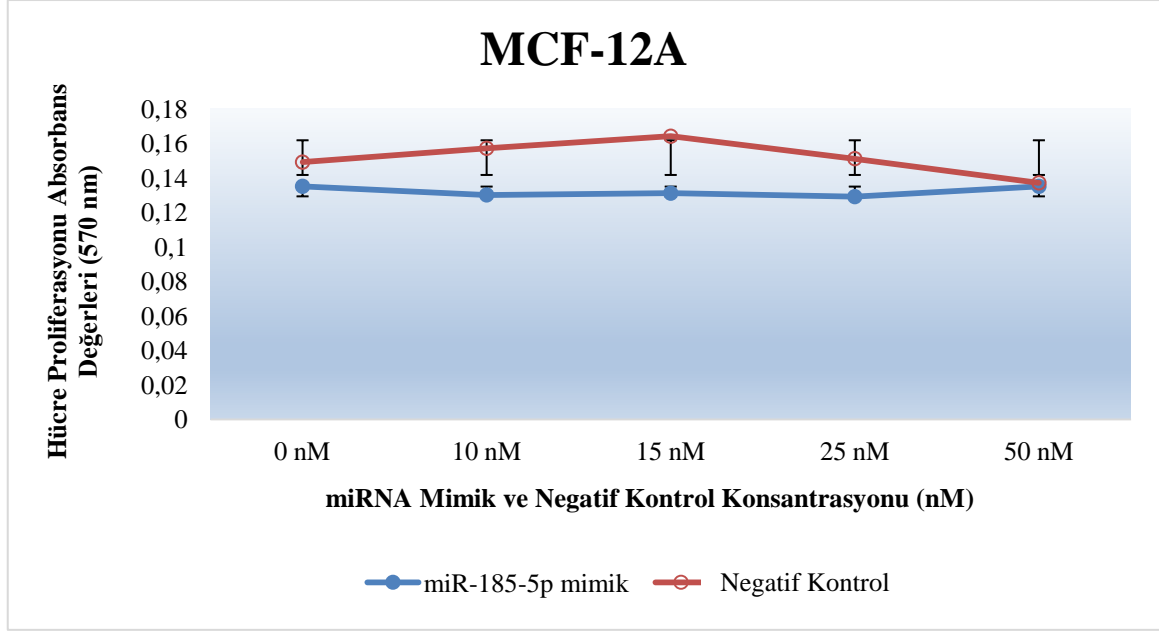


Şekil 5.1. BT-474 meme kanseri hücrelerinde miR-185-5p transfeksiyon işleminin doğrulaması (53) (\*:  $p \leq 0.05$ )

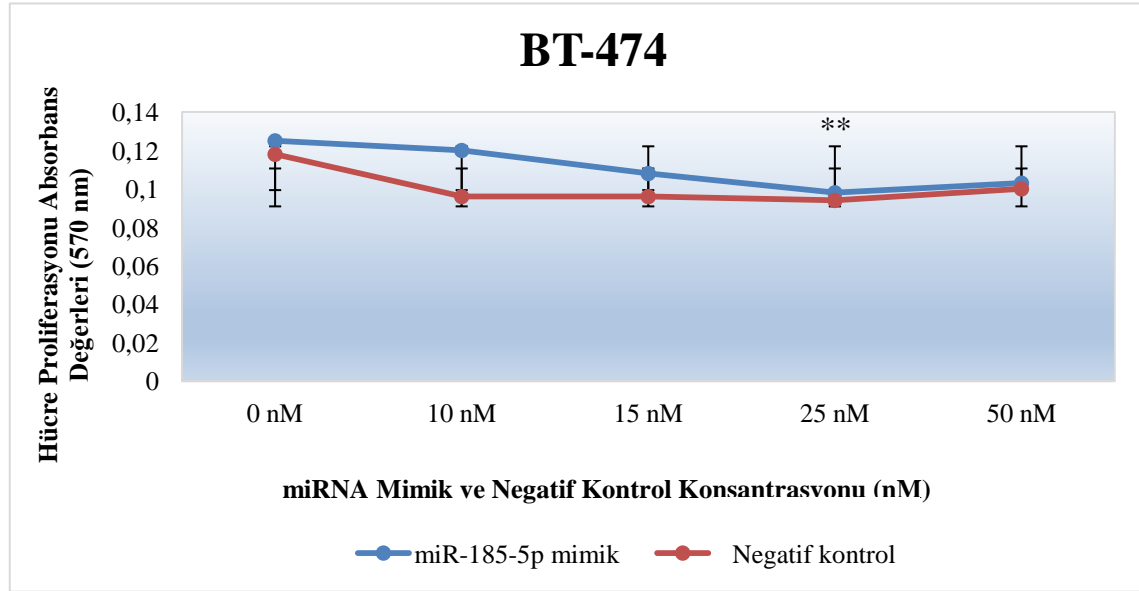
### 5.2. HSA-MİR-185-5P MİMİK VE NEGATİF KONTROLÜN FARKLI KONSANTRASYONDAKİ MTT HÜCRE CANLILIĞI TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

hsa-miR-185-5p'nin kanserli hücre hattı BT-474 ve normal meme hücre hattı MCF-12A'nın hücre çoğalması üzerindeki etkisini araştırmak üzere farklı konsantrasyonlarda hsa-miR-185-5p mimik transfeksiyonu yapıldı. hsa-miR-185-5p mimik ve negatif kontrolün 10, 15, 25 ve 50 nM olarak belirlenen farklı konsantrasyon miktarları, BT-474 ve MCF-12A hücre hatlarına uygulanmış olup hücre canlılığı testi için MTT deneyi yapılmıştır. Deney sonuçlarının 48 saat süreli etkisine bağlı absorbans değerleri Şekil 5.2. ve Şekil 5.3.'te gösterilmiştir. hsa-miR-185-5p mimik ve negatif kontrolün belirlenen

konsantrasyonlarda üç tekrarlı olarak uygulanmasıyla BT-474 meme kanseri hücre hattında en etkili konsantrasyon miktarının 25 nM olduğu belirlenmiştir. Ancak MCF-12A normal meme hücre hattında hücre sel canlılık için farklı konsantrasyon miktarlarında önemli bir azalma miktarı belirlenmemiştir.



Şekil 5.2. MCF-12A hücre hattına miR-185-5p mimik ve negatif kontrol uygulanması (53)

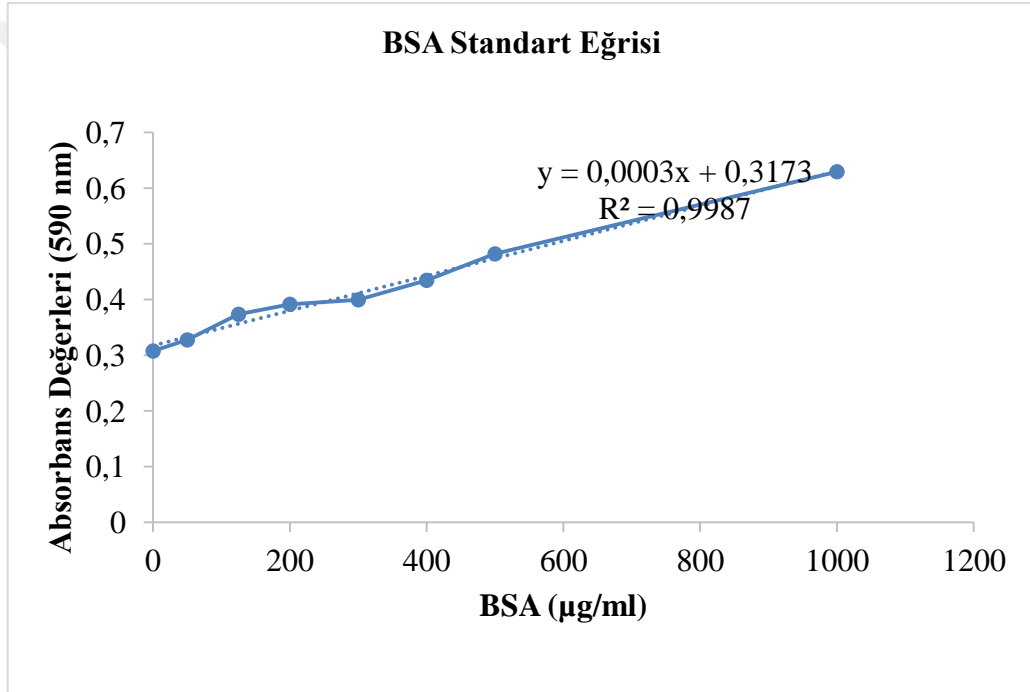


Şekil 5.3. BT-474 hücre hattına miR-185-5p mimik ve negatif kontrol uygulanması (53) (p<0.01)

### 5.3. PROTEİN ELDESİ VE MİKTAR TAYİNİ

miR-185-5p mimik ve negatif kontrolün 25 nM konsantrasyonunda BT-474 meme kanseri ve MCF-12A normal meme hücre hatlarına uygulanması sonucunda sonikasyon yöntemi ve ürelizis buffer ile protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin miktar tayinleri için Bradford yöntemi kullanılmıştır. MCF-12A ve BT-474 hücrelerinde standartların absorbans değerleri Çizelge 5.1.'de ve Şekil 5.4.'de gösterilmiştir. MCF-12A normal meme hücre hattına protein örneklerinin absorbans değerleri Çizelge 5.2.'de, BT-474 meme kanserine ait protein örneklerinin absorbans değerleri Çizelge 5.3.'de gösterilmiştir.

BSA standartı bağlı olarak çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 5.4.'de verilmiştir.



Şekil 5.4. BSA Standart eğrisi

Çizelge 5.1. BSA standart konsantrasyon miktarları ve absorbans değerleri

	<b>BSA Standartları (ug/ml)</b>	<b>OD Değerleri (nM) 1. Tekrar</b>	<b>OD Değerleri (nM) 2.Tekrar</b>	<b>Ortalama</b>
	1000	0.64500	0.61400	0.62950
	500	0.48100	0.48300	0.48200
	400	0.42600	0.44300	0.43450
	300	0.39800	0.40100	0.39950
	200	0.39300	0.39000	0.39150
	125	0.37200	0.37500	0.37350
	50	0.32400	0.33100	0.32750
Lizis Buffer	0	0.312	0.303	0.308

miR-185-5p mimik transfeksiyonu sonrası MCF-12A insan meme epitel hücresinde protein izolasyonu sonrası spektrofotometrede okuma değerleri Çizelge 5.2.'de verilmiştir.

Çizelge 5.2. MCF-12A insan meme dokusu normal epitel hücre hattı için elde edilen protein örneklerinin Bradford yöntemi sonucunda absorbans değerleri

<b>MCF-12A</b>	<b>OD Değerleri (nM) 1.tekrar</b>	<b>OD Değerleri (nM) 2.tekrar</b>	<b>OD Değerleri (nM) 3.tekrar</b>	<b>Ortalama</b>
<b>miR-185-5p 1.tekrar</b>	0.451	0.449	0.000	0.450
<b>miR-185-5p 2.tekrar</b>	0.47600	0.49900	0.48700	0.487
<b>miR-185-5p 3.tekrar</b>	0.466	0.468	0.450	0.461
<b>Negatif kontrol 1.tekrar</b>	0.539	0.569	0.554	0.554
<b>Negatif kontrol 2.tekrar</b>	0.549	0.574	0.561	0.561
<b>Negatif kontrol 3.tekrar</b>	0.454	0.501	0.472	0.476
<b>Besiyeri 1.tekrar</b>	0.579	0.507	0.626	0.571
<b>Besiyeri 2.tekrar</b>	0.711	0.612	0.607	0.643
<b>Besiyeri 3.tekrar</b>	0.637	0.607	0.604	0.616

miR-185-5p mimik transfeksiyonu sonrası BT-474 meme kanseri hücresinde protein izolasyonu sonrası spektrofotometrede okuma değerleri Çizelge 5.3.'de verilmiştir.

Çizelge 5.3. BT-474 meme kanseri hücre hattı için elde edilen protein örneklerinin Bradford yöntemi sonucunda absorbans değerleri

<b>BT-474</b>	<b>OD Değerleri (nM) 1.tekrar</b>	<b>OD Değerleri (nM) 2.tekrar</b>	<b>OD Değerleri (nM) 3.tekrar</b>	<b>Ortalama</b>
<b>miR-185-5p 1.tekrar</b>	0.462	0.465	0.425	0.450
<b>miR-185-5p 2.tekrar</b>	0.43100	0.57000	0.43100	0.477
<b>miR-185-5p 3.tekrar</b>	0.43400	0.46300	0.48500	0.460
<b>Negatif kontrol 1.tekrar</b>	0.463	0.452	0.445	0.453
<b>Negatif kontrol 2.tekrar</b>	0.429	0.488	0.441	0.4526
<b>Negatif kontrol 3.tekrar</b>	0.443	0.426	0.458	0.442
<b>Besiyeri 1.tekrar</b>	0.502	0.502	0.542	0.515
<b>Besiyeri 2.tekrar</b>	0.492	0.554	0.529	0.525
<b>Besiyeri 3.tekrar</b>	0.520	0.463	0.540	0.507

### 5.3.1. PROTEİN MİKTARININ HESAPLANMASI

Protein miktar tayini için absorbans değerleri ölçülen BT-474 ve MCF-12A hücre hatlarına ait protein örneklerinin konsantrasyon miktarları ( $y = 0.003x + 0.3173$ ) X Dilüsyon oranı formülüne göre hesaplandı (y: Konsantrasyon miktarı hesaplanan örneğin Bradford yöntemi sonucunda elde edilen absorbans değerleri ortalaması, m: BSA standart eğrisi grafiğinin eğimi, n: sabit bir sayıdır). miR-185-5p mimik ve negatif kontrolün 25 nM konsantrasyonunda BT-474 meme kanseri ve MCF-12A normal hücre hatlarına uygulanması ve kontrol grubunun da dahil olduğu üçer tekrarlı örneklerden elde edilen proteinlerin konsantrasyon miktarları hesaplanarak Çizelge 5.4. ve Çizelge 5.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.4. BT-474 hücre hattına ait protein konsantrasyon miktarları

Örnek No	miRNA mimik protein miktarı	miRNA negatif kontrol protein miktarı	Besiyeri (kontrol) protein miktarı
miR-185-5p 1.Tekrar	444.55 ug/ml	452.33 ug/ml	660.11 ug/ml
miR-185-5p 2.Tekrar	533.44 ug/ml	451.22 ug/ml	692.33 ug/ml
miR-185-5p 3.Tekrar	477.88 ug/ml	416.77 ug/ml	634.55 ug/ml

Çizelge 5.5. MCF-12A hücre hattına ait protein konsantrasyon miktarları

Örnek No	miRNA mimik protein miktarı	miRNA negatif kontrol protein miktarı	Besiyeri (kontrol) protein miktarı
miR-185-5p 1.Tekrar	442.33 ug/ml	789 ug/ml	1086.77 ug/ml
miR-185-5p 2.Tekrar	566.77 ug/ml	813.44 ug/ml	995.66 ug/ml
miR-185-5p 3.Tekrar	480.111ug/ml	527.88 ug/ml	844.55 ug/ml

### 5.3.2. PEPTİT KONSANTRASYON MİKTAR TAYİNİ

MCF-12A insan meme epitel ve BT-474 meme kanseri hücrelerinde BSA standart absorbans değerleri Çizelge 5.6.'da gösterilmiştir. miR-185-5p mimik transfeksiyonu sonrası BT-474 ve MCF-12A hücrelerinde peptit izolasyonu sonrası spektrofotometrede okuma değerleri ve peptit konsantrasyonları Çizelge 5.7.'de verilmiştir.

Çizelge 5.6. Hazırlanan BSA standart konsantrasyon miktarları ve ölçülen absorbans değerleri

BSA Standartları (ug/ml)	Ortalama OD (nM) Değerleri
31.30	0.062
62.5	0.143
125	0.302
250	0.59
500	1.703

Peptit miktar tayini için absorbens değerleri ölçülen BT-474 ve MCF-12A hücre hatlarına ait peptit örneklerinin konsantrasyon miktarları ( $y = 463.7x - 7.505$ ) x Dilüsyon oranı formülüne göre hesaplandı ve Çizelge 17’de gösterilmiştir (y: Konsantrasyon miktarı hesaplanan peptit örneğinin Peptit Assay Solusyon testi sonucunda elde edilen absorbens değerleri ortalaması, m: BSA standart eğrisi grafiğinin eğimi, n: sabit bir sayı, Dilüsyon oranı ise 2’dir).

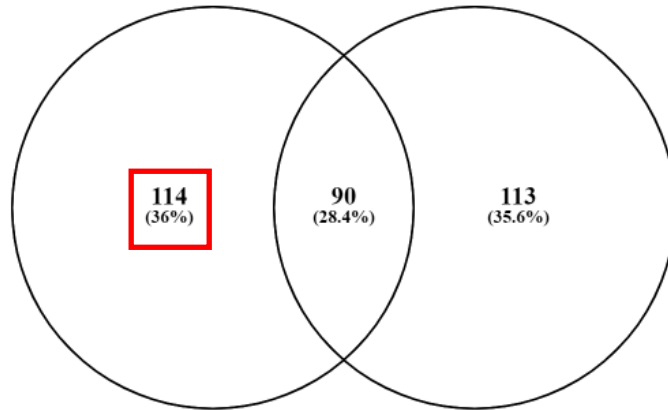
Çizelge 5.7. BT-474 meme kanseri hücre hattı ve MCF-12A hücre hattına için Peptit Konsantrasyon testi sonucunda elde edilen peptitlerin absorbens değerleri ve konsantrasyon miktarları

<b>BT-474</b>	<b>Absorbans Değerleri OD (nM)</b>	<b>Peptit Konsantrasyon Miktarları (ug/ml)</b>
miR-185-5p transfeksiyonu 1.tekrar	0.391	173.801
miR-185-5p transfeksiyonu 2.tekrar	0.38	168.101
miR-185-5p transfeksiyonu 3.tekrar	0.3855	171.251
Negatif kontrol transfeksiyonu 1. Tekrar	0.334	147.370
Negatif kontrol transfeksiyonu 2. Tekrar	0.166	69.469
Negatif kontrol transfeksiyonu 3. Tekrar	0.25	108.420
Besiyeri 1.tekrar	0.559	251.703
Besiyeri 2.tekrar	0.884	402.405
Besiyeri 3.tekrar	0.7215	327.054
<b>MCF12-A</b>		
miR-185-5p transfeksiyonu 1.tekrar	0.409	182.148
miR-185-5p transfeksiyonu 2.tekrar	0.521	234.082
miR-185-5p transfeksiyonu 3.tekrar	0,465	208.115
Negatif kontrol transfeksiyonu 1. tekrar	0.521	234.082
Negatif kontrol transfeksiyonu 2. tekrar	0.609	274.888
Negatif kontrol transfeksiyonu 3. Tekrar	0.565	254.485
Besiyeri 1.tekrar	0.642	290.190
Besiyeri 2.tekrar	0.726	329.141
Besiyeri 3.tekrar	0.684	309.665

## 5.4. PROTEOM ANALİZİ

### 5.4.1. MİR-185-5P MİMİK VE NEGATİF KONTROL TRANSFEKSİYONU SONRASI BT-474 VE MCF-12A HÜCRE HATLARINDA TANIMLANMIŞ OLAN PROTEİNLER

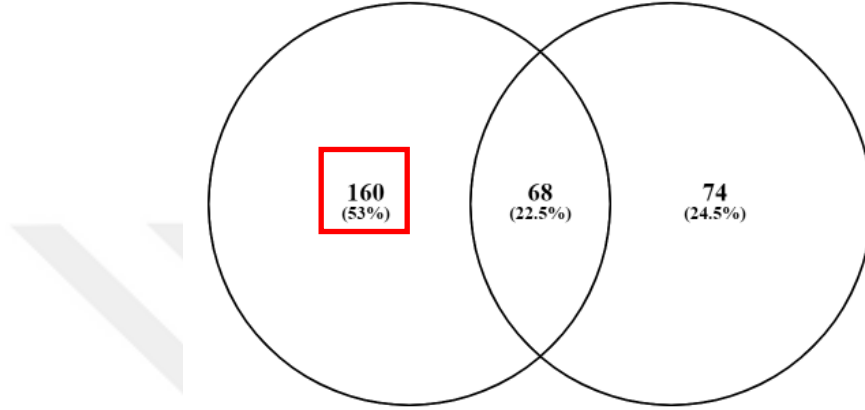
miR-185-5p mimik ve negatif kontrol transfekte edilmiş BT-474 meme kanseri ve MCF-12A normal meme hücre hatlarına ait peptit konsantrasyonlarının LC-MS/MS cihazına yüklenmesiyle birlikte yaklaşık 3000 protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerin arasından peptit sayısı 3 ve üstündeki proteinler seçilerek 858 tane protein belirlenmiştir. Tanımlanan proteinlere ait "Kimlik" numaraları, Proteinlerin isimleri, Peptit sayıları, Benzersiz peptit sayıları ve güven skorlarına ait bilgiler Ek 1 bölümünde verilmiştir. Tanımlanan proteinlerden 86 tanesi meme kanseri ve normal meme hücreleri arasında yapılan biyoinformatik analizler sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir ifade farklılığı göstermiştir. Bu istatistiksel değerlendirme yapılırken ilk önce miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi (Ek 2) ile negatif kontrol uygulanan BT-474 hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi (Ek 3) Venny 2.1.0 programına konularak Venn diyagramı kullanılmıştır. Bu listede (Şekil 5.5) negatif kontrol ve besiyeri kontrolüne ait olan proteinlerin elenmesi sağlanmıştır ve 114 tane protein bulunmuştur.



Şekil 5.5. miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi ile negatif kontrol uygulanan BT-474 hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi şeması



İkincil olarak aynı işlemler MCF-12A hücresi spesifik proteinlerin bulunması için tekrarlanmıştır. miR-185-5p transfekte olmuş MCF-12A hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi (Ek 4) ile negatif kontrol uygulanan MCF-12A hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi (Ek 5) Venny 2.1.0 programına konulmuştur. Bu listede (Şekil 5.6.) negatif kontrol ve besiyeri kontrolüne ait olan proteinlerin elenmesi sağlanmıştır ve 160 tane protein bulunmuştur.



Şekil 5.6. miR-185-5p transfekte olmuş MCF-12A hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi ile negatif kontrol uygulanan MCF-12A hücresi ve kontrol grubuna ait kıyaslanan protein listesi şeması

Üçüncül olarak da; miR-185-5p transfeksiyonu ile MCF-12A spesifik proteinler, BT-474 spesifik proteinlerden çıkarılarak sadece miR-185-5p transfekte olmuş BT-474 hücrelerine özgü 86 tane protein tanımlanmıştır (Şekil 5.7).



Şekil 5.7. miR-185-5p transfeksiyonu ile BT-474 ve MCF-12A spesifik protein şeması

Çizelge 5.8. miR-185-5p transfeksiyonu sonrası istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı gösteren proteinlerin "Kimlik" numaraları

Q14103	P23004	O75306	P26038	O02192	Q97E05	P07339	P23786
P04083	Q03184	Q99KV1	P11799	Q9UTK5	P16106	Q12797	O60282
P11216	P08515	O15372	O76743	P16475	Q60432	P20061	O75531
P31939	Q9WUM3	P13624	Q9USI6	P52209	O75643	P05198	P15690
Q9BXP5	O23755	P48637	Q15436	P23456	P08729	P35978	Q13561
O42184	P12750	P04406	Q28275	P05712	P17077	P01252	P46150
P42655	O35156	P21964	P28799	P49736	P45973	O00299	O13683
P49321	Q13011	P18754	P36066	Q13153	Q01202	P04765	Q12874
O60437	P20951	O43396	P28894	P29692	P04645	P02651	P78406
P16989	Q9D952	Q99170	Q24368	Q00341	P12004	P53634	Q9UL4
P02827	P10668	O62768	P49753	P08727	P16152		

İstatistiksel olarak BT-474 ve MCF-12A hücresi arasında istatistiksel olarak anlamlılık gösteren 86 protein arasında 53 tanesi kontrole göre yüksek ifade gösterirken, 33 tanesi düşük ifade seviyesi göstermiştir (Çizelge 5.9. ve 5.10.). İfade değişimi gösteren bu proteinlerin görev aldıkları sinyal yolları, moleküler fonksiyonları ve biyolojik süreçleri STRING (<https://string-db.org/>), PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) ve DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) veritabanları kullanılarak incelenmiştir (Şekil 5.8., Şekil 5.9. ve Şekil 5.10.).

Çizelge 5.9. miR-185-5p transfeksiyonu sonrası BT-474 meme kanseri spesifik ifade seviyeleri artan protein listesi

Kimlik	Benzersiz Peptit Sayısı	Protein	p-değeri	Kat Değişimi
Q14103	4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	6,29E-05	9,64
P23004	3	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core prot	0,00325	9,56
O75306	3	NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit- mit	0,00041	9
P26038	19	Moesin	0,000218	8,82
O02192	4	Heat shock protein 83	0,00563	8,8
Q97E05	3	Chaperone protein htpG	8,69E-06	8,76
P07339	8	Cathepsin D precursor	2,04E-06	8,76

P23786	3	Carnitine O-palmitoyltransferase II- mitochondrial	0,008768	8,66
P04083	6	Annexin I	0,001157	8,44
Q03184	3	Succinyl-CoA ligase	0,00265	8,36
Q99KV1	3	DnaJ homolog subfamily B member 11 precursor	0,00046	8,33
P11799	5	Myosin light chain kinase-smooth muscle and non-m	8,9E-05	8,16
Q9UTK5	10	Abnormal long morphology protein 1	0,000225	8,03
P16106	4	Histone	0,001301	7,99
Q12797	6	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	0,002007	7,83
O60282	7	Kinesin heavy chain isoform 5C	0,035796	7,77
P11216	5	Glycogen phosphorylase-brain form	0,005237	7,37
P08515	3	Glutathione S-transferase 26 kDa	0,000619	7,33
O15372	4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,000512	7,3
O76743	3	ATP-dependent RNA helicase glh-4	0,031052	7,2
P16475	4	Myosin light chain alkali-non-muscle isoform	0,007136	7,12
Q60432	3	150 kDa oxygen-regulated protein precursor	0,003677	7,04
P20061	6	Transcobalamin I precursor	0,002547	7,02
O75531	4	Barrier-to-autointegration factor	0,000561	6,94
P31939	6	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	0,000252	6,81
Q9WUM3	4	Coronin 1B	0,003044	6,81
P13624	5	Signal recognition particle 54 kDa protein	0,000415	6,72
Q9USI6	12	Myosin type II heavy chain 1	0,011095	6,72
P52209	5	6-phosphogluconate dehydrogenase- decarboxylating	0,002393	6,65
O75643	4	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	0,002251	6,63
P05198	6	Eukaryotic translation initiation	0,000618	6,59

		factor 2 subunit		
		NADH-ubiquinone oxidoreductase		
P15690	4	75 kDa subunit- mit	0,007413	6,56
Q9BXP5	4	Arsenite-resistance protein 2	0,014814	6,28
O23755	9	Elongation factor 2	0,000508	6,2
P48637	9	Glutathione synthetase	0,001388	5,8
Q15436	4	Protein transport protein Sec23A	0,00113	5,84
P23456	3	RNA-directed RNA polymerase	0,006723	5,76
P08729	14	Keratin-type II cytoskeletal 7	0,000182	5,56
P35978	4	Kinesin heavy chain	0,00192	4,93
Q13561	3	Dynactin complex 50 kDa subunit	0,055429	4,91
		Restin (Cytoplasmic linker		
O42184	5	protein-170)	0,002742	4,77
		40S ribosomal protein S4-X		
P12750	10	isoform	0,000963	4,47
		Glyceraldehyde 3-phosphate		
P04406	8	dehydrogenase- liver	0,004839	4,41
Q28275	4	Fibronectin	0,015278	3,87
P05712	3	Ras-related protein Rab-2	0,000155	3,54
P17077	3	60S ribosomal protein L9	1,76E-05	3,51
P01252	4	Prothymosin alpha	0,021804	3,47
P46150	4	Moesin/ezrin/radixin homolog	0,055372	2,35
P42655	3	14-3-3 protein epsilon	0,010667	1,95
		UTP--glucose-1-phosphate		
O35156	3	uridylyltransferase 1	0,024517	1,94
		Catechol O-methyltransferase-		
P21964	4	membrane-bound form	0,005022	1,84
P28799	7	Granulins precursor	0,029508	1,44
		DNA replication licensing factor		
P49736	4	MCM2	0,015282	1,4

---

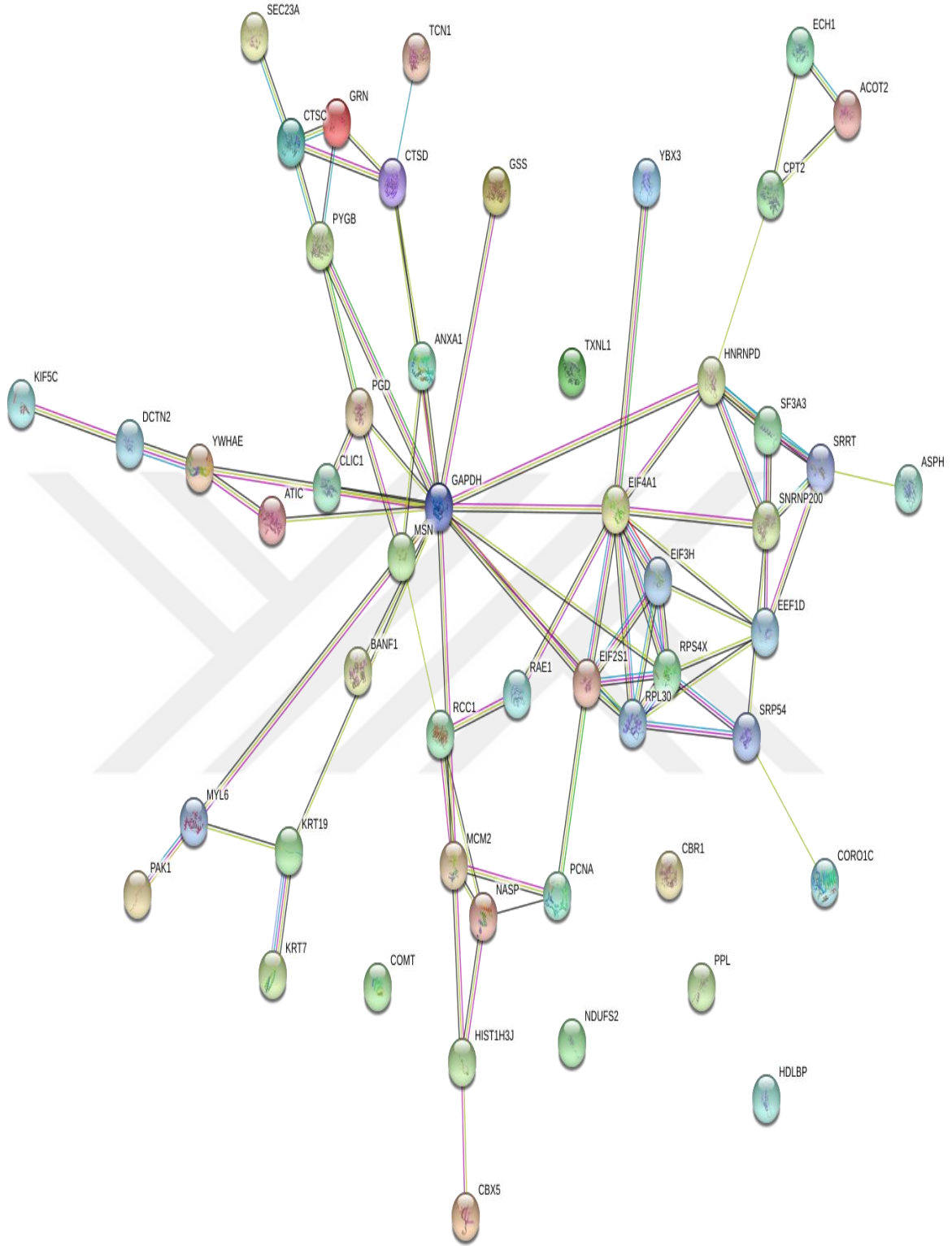
Çizelge 5.10. miR-185-5p transfeksiyonu sonrası BT-474 meme kanser spesifik ifade seviyeleri azalan protein listesi

Kimlik	Benzersiz Peptit Sayısı	Protein	p-değeri	Kat değişimi
P45973	3	Chromobox protein homolog 5	0,009527	0,59
O00299	6	Chloride intracellular channel protein 1	0,001543	0,58
O13683	6	Hypothetical 143.0 kDa protein	7,61E-09	0,57
P49321	8	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	0,013624	0,57
Q13011	6	Delta3-5-delta2-4-dienoyl-CoA isomerase- mitochond	0,000439	0,56
P18754	5	Regulator of chromosome condensation	0,000848	0,56
P36066	3	Hypothetical 54.4 kDa protein	0,0057	0,54
Q13153	4	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	0,003678	0,54
Q01202	4	Paramyosin	0,009424	0,53
P04765	6	Eukaryotic initiation factor 4A-I	0,021454	0,52
Q12874	5	Splicing factor 3A subunit 3	0,008334	0,52
O60437	5	Periplakin	0,049354	0,5
P20951	3	RNA replication protein	0,001973	0,5
O43396	3	Thioredoxin-like protein	0,000193	0,5
P28894	4	Fumarate hydratase C	4,79E-05	0,5
P29692	5	Elongation factor 1-delta	0,00064	0,48
P04645	4	60S ribosomal protein L30	2,27E-05	0,48
P02651	3	Apolipoprotein A-IV precursor	0,046928	0,44
P78406	6	mRNA-associated protein mrnp 41	0,016012	0,44
P16989	4	DNA-binding protein A	0,009247	0,4
Q9D952	8	Envoplakin	0,000133	0,38
Q99170	3	78 kDa glucose-regulated protein homolog precursor	0,011519	0,32
Q24368	3	Iswi protein	0,043569	0,3
Q00341	7	Vigilin (High density lipoprotein-binding protein)	0,040739	0,3
P12004	3	Proliferating cell nuclear antigen	0,035008	0,28
P53634	3	Dipeptidyl-peptidase I precursor	0,022374	0,27

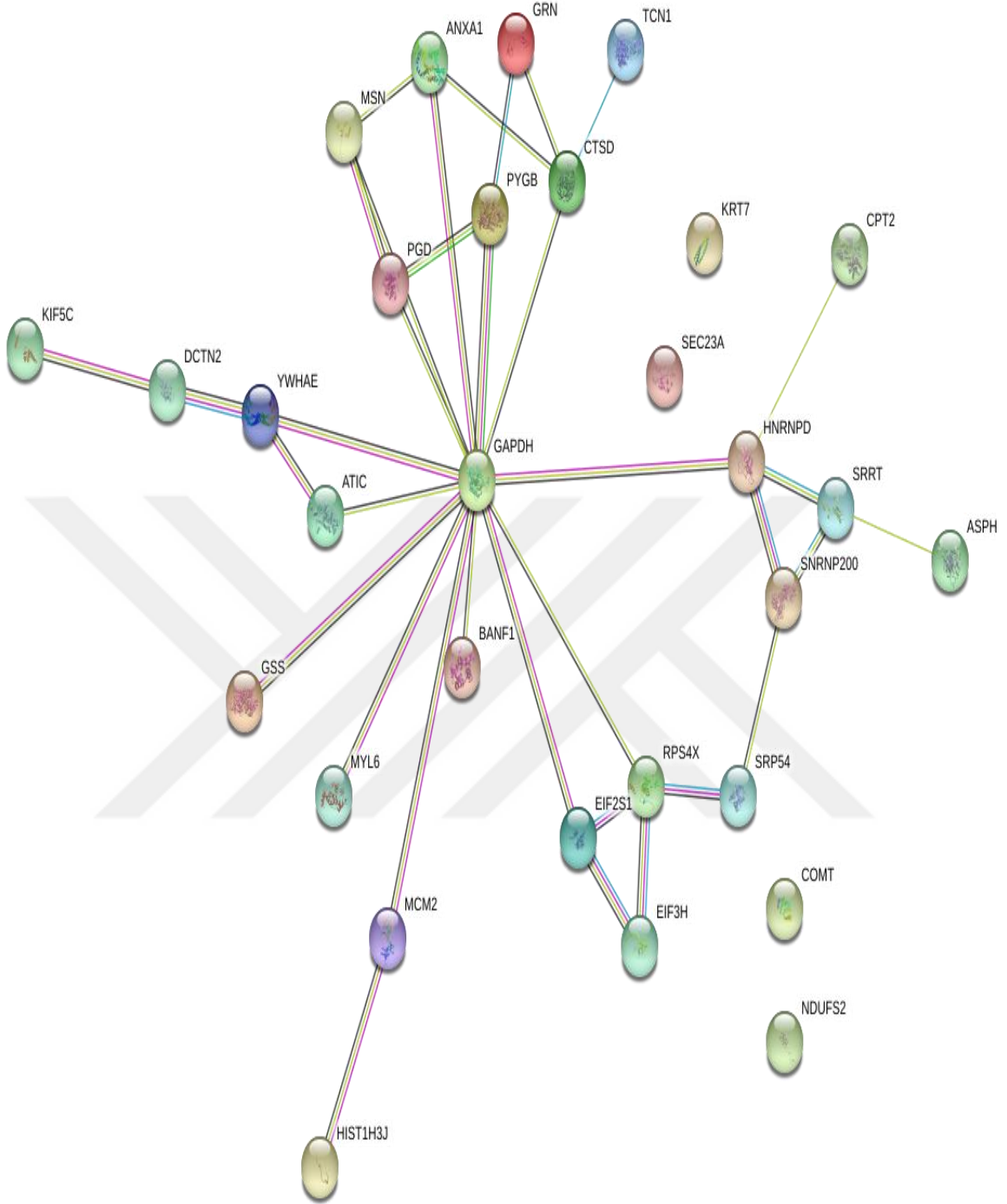
Q9ULV4	3	Coronin 1C	0,004844	0,27
P02827	3	Heat shock 70 kDa protein	2,94E-05	0,27
P10668	5	Cofilin-non-muscle isoform	0,017359	0,22
O62768	3	Thioredoxin reductase	0,006983	0,12
P49753	3	Peroxisomal acyl-coenzyme A thioester hydrolase 2	0,000112	0,1
P08727	19	Keratin-type I cytoskeletal 19	2,38E-05	0,1
P16152	7	Carbonyl reductase	0,000764	0,05

---



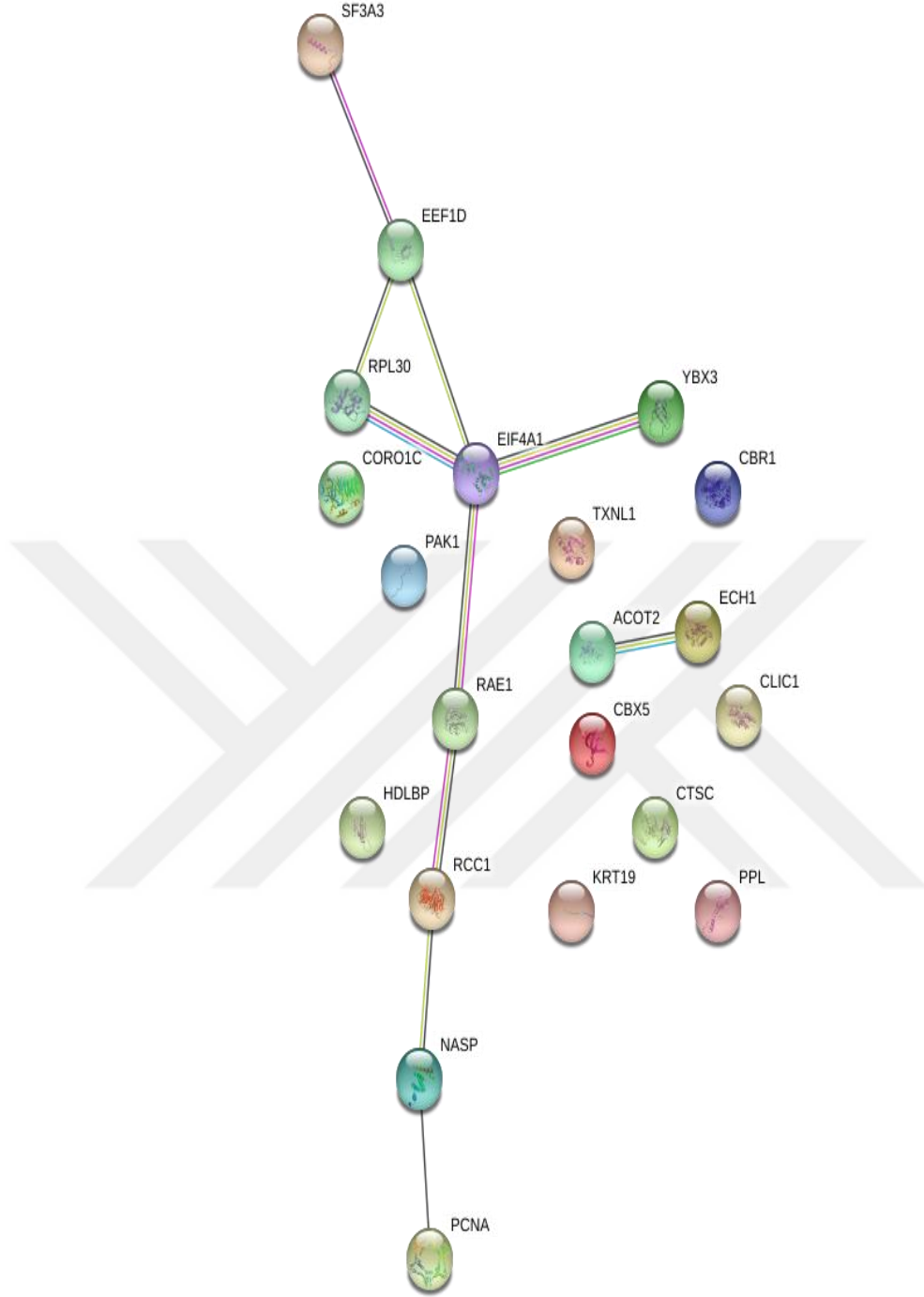


Şekil 5.8. miR-185-5p transfeksiyon sonrası BT-474 meme kanseri hücre hattına spesifik tanımlanan ifade seviyesi artan ve azalan proteinlerin STRING (Version 10.5) fonksiyonel protein ilişkilendirme ağları programı ile gösterimi



Şekil 5.9. miR-185-5p transfeksiyon sonrası BT-474 meme kanseri hücre hattına spesifik tanımlanan ve ifade seviyesi artan proteinlerin STRING (Version 10.5) fonksiyonel protein ilişkilendirme ağları programı ile gösterimi



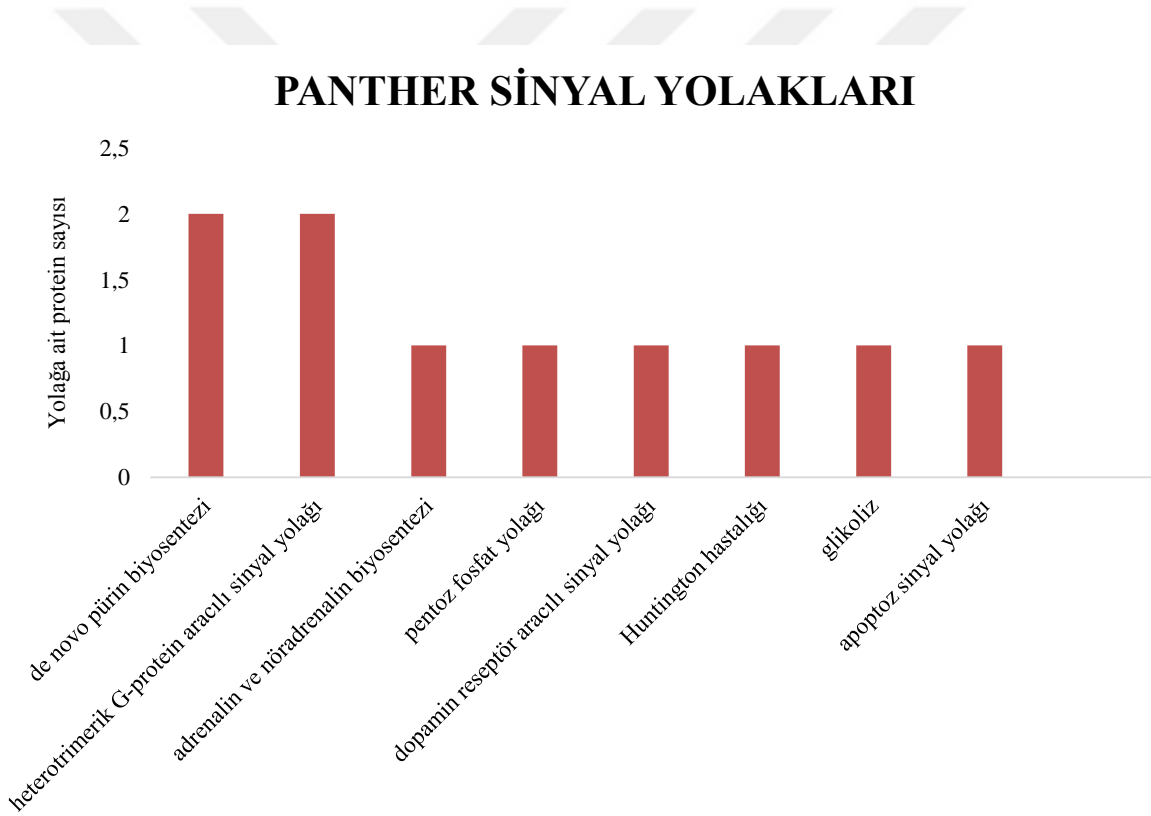


Şekil 5.10. miR-185-5p transfeksiyon sonrası BT-474 meme kanseri hücre hattına spesifik tanımlanan ve ifade seviyesi azalan proteinlerin STRING (Version 10.5) fonksiyonel protein ilişkilendirme ağları programı ile gösterimi

#### 5.4.2. MİR-185-5P TRANSFEKSİYONU İLE İFADESİ DEĞİŞMİŞ OLAN PROTEİNLERİN GÖREV ALDIKLARI SİNYAL YOLAKLARINA GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ

miR-185-5p transfeksiyonu ile ifade değişimi gösteren proteinlerden ifadesi artan proteinlerin PANTHER veritabanında de novo pürin biyosentezi, heterotrimerik G-protein aracılı sinyal yolları, adrenalin ve nöradrenalin biyosentezi, pentoz fosfat yolağı, dopamin reseptör aracılı sinyal yolağı, glikoliz ve apoptoz sinyal yollarında görev aldığı tespit edilmiştir.

miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi artmış olan proteinlerin sinyal yollarının grafiksel ifadesi Şekil 5.11.'de gösterilmiştir.

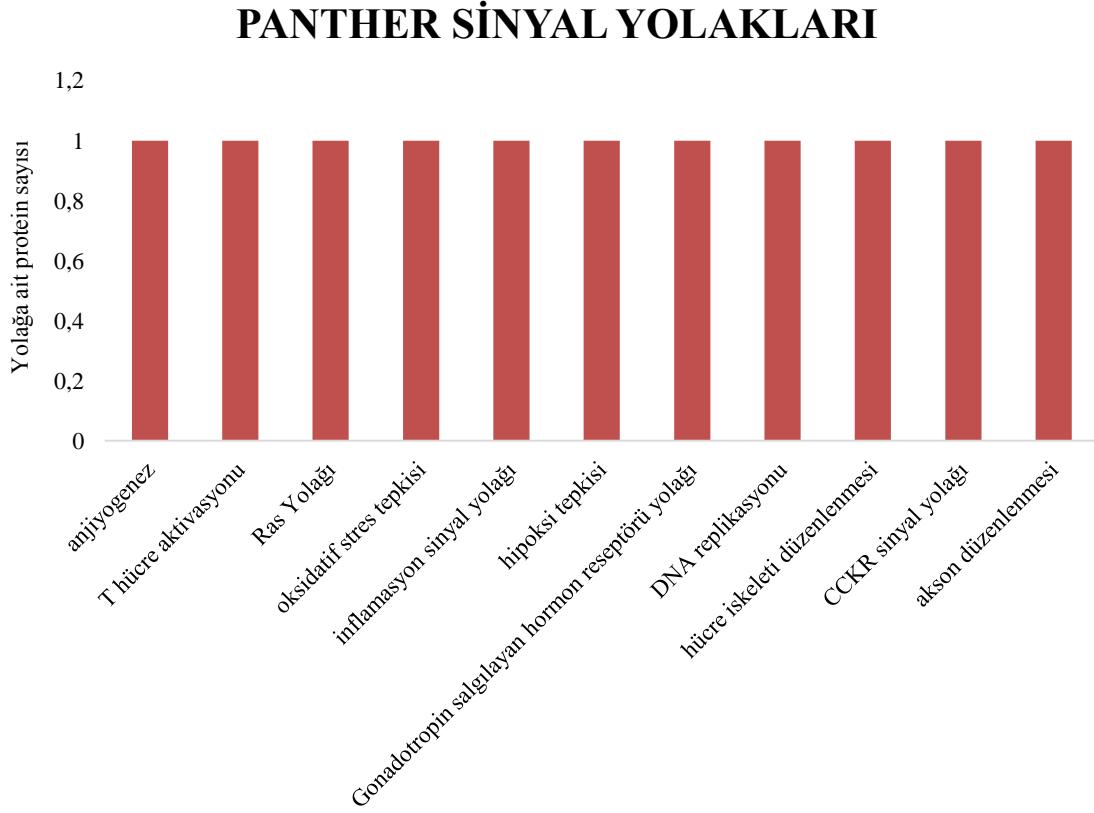


Şekil 5.11. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi artan proteinlerin görev aldığı sinyal yolları (PANTHER veri tabanı)

miR-185-5p transfeksiyonu ile ifade değişimi gösteren proteinlerden ifadesi azalan proteinlerin PANTHER veri tabanında anjiyogenez, T hücre aktivasyonu, Ras yolağı,

oksidatif stres tepkisi, inflamasyon sinyal yolağı ve hücre iskeleti düzenlenmesi gibi sinyal yolaklarında görev aldığı tespit edilmiştir.

miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi azalmış olan proteinlerin sinyal yolaklarının grafiksel ifadesi Şekil 5.12.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.12. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi azalan proteinlerin görev aldığı sinyal yolakları (PANTHER veri tabanı)

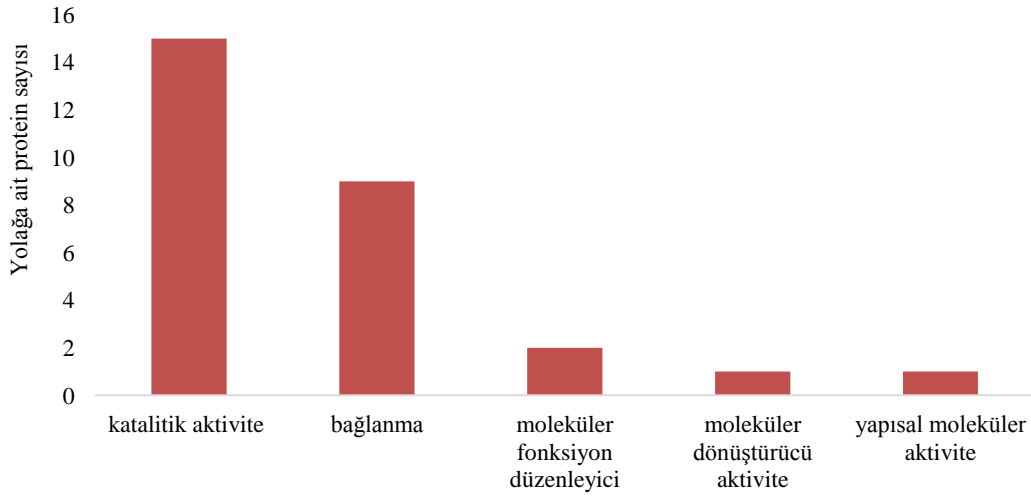
#### 5.4.3. MİR-185-5P TRANSFEKSİYONU İLE İFADESİ DEĞİŞMİŞ OLAN PROTEİNLERİN MOLEKÜLER FONKSİYONLARINA GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ

miR-185-5p transfeksiyonu sonrası ifade değişimi gösteren proteinlerin moleküler fonksiyonları GO veritabanının ek bilgilerini kullanan PANTHER veritabanı ile tespit edilmiştir.

Moleküler fonksiyonuna göre incelendiğinde ifade değişimi gösteren proteinlerden ifadesi artan proteinlerin en büyük grubu katalitik aktiviteye sahiptir, ikinci sıradaki protein grubu bağlanma ile ilgili, üçüncü sıradaki moleküler fonksiyon düzenleyici proteinlerdir.

miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi artmış olan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre gruplandırılmasının grafiği Şekil 5.13.'de gösterilmiştir.

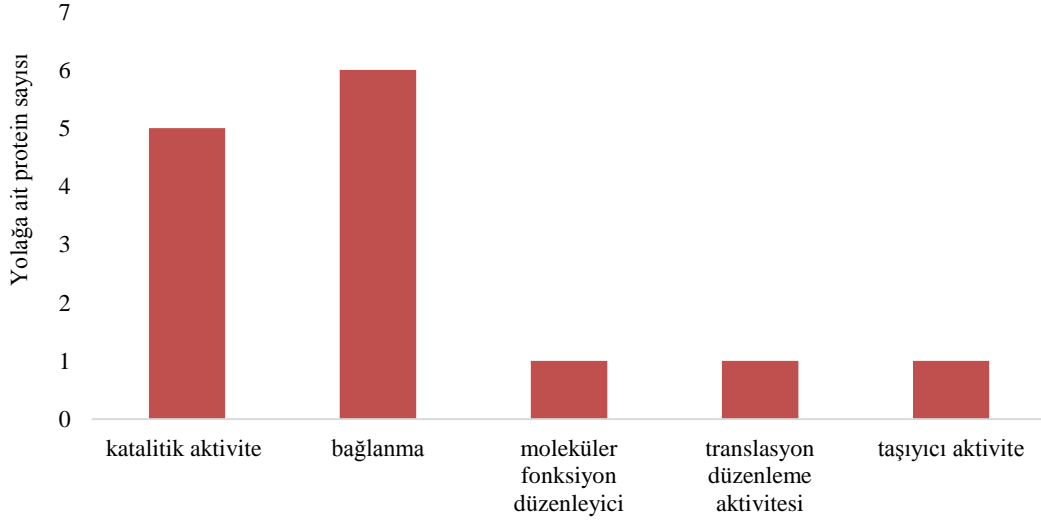
## PANTHER-GO MOLEKÜLER FONKSİYONLARI



Şekil 5.13. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi artan proteinlerin görev aldığı moleküler fonksiyonlar (PANTHER veri tabanı)

Moleküler fonksiyonuna göre incelendiğinde ifade değişimi gösteren proteinlerden ifadesi azalan proteinlerin en büyük grubu bağlanma ile ilgili, ikinci sıradaki protein grubu katalitik aktiviteye sahiptir ve bağlanma ile ilgilidir. Üçüncü sıradaki grup ise moleküler fonksiyon düzenleyici proteinlerdir. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi azalmış olan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre gruplandırılmasının grafiği Şekil 5.14.'de gösterilmiştir.

## PANTHER-GO MOLEKÜLER FONKSİYONLARI



Şekil 5.14. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi azalan proteinlerin görev aldığı moleküler fonksiyonlar (PANTHER veri tabanı)

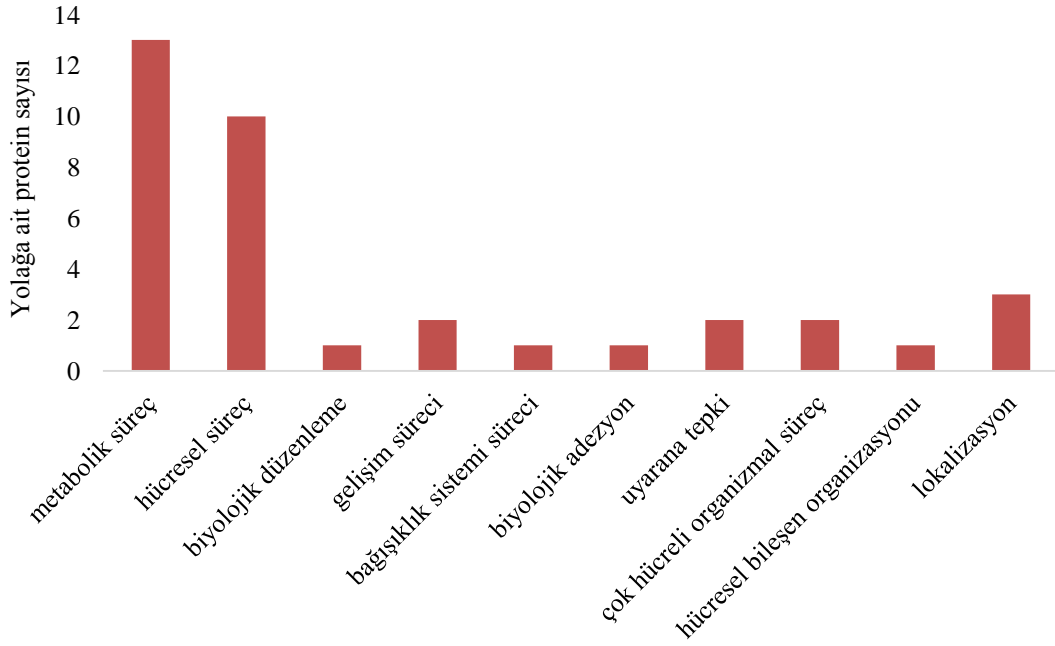
### 5.4.4. MİR-185-5P TRANSFEKSİYONU İLE İFADESİ DEĞİŞMİŞ OLAN PROTEİNLERİN BİYOLOJİK SÜREÇLERE GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ

miR-185-5p transfeksiyonu ile ifade değişimi gösteren proteinlerin biyolojik süreçleri GO veritabanının ek bilgilerini kullanan PANTHER veri tabanı ile tespit edilmiştir.

Biyolojik süreçlere göre incelendiğinde ifade değişimi gösteren proteinlerden ifadesi artan proteinlerin en büyük grubu metabolik süreçlerde görev alır, ikinci sıradaki protein grubu hücresel süreçlerde görev alır.

miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi artmış olan proteinlerin biyolojik süreçlere göre gruplandırılmasının grafiği Şekil 5.15.'de gösterilmiştir.

## PANTHER-GO BİYOLOJİK SÜREÇLER

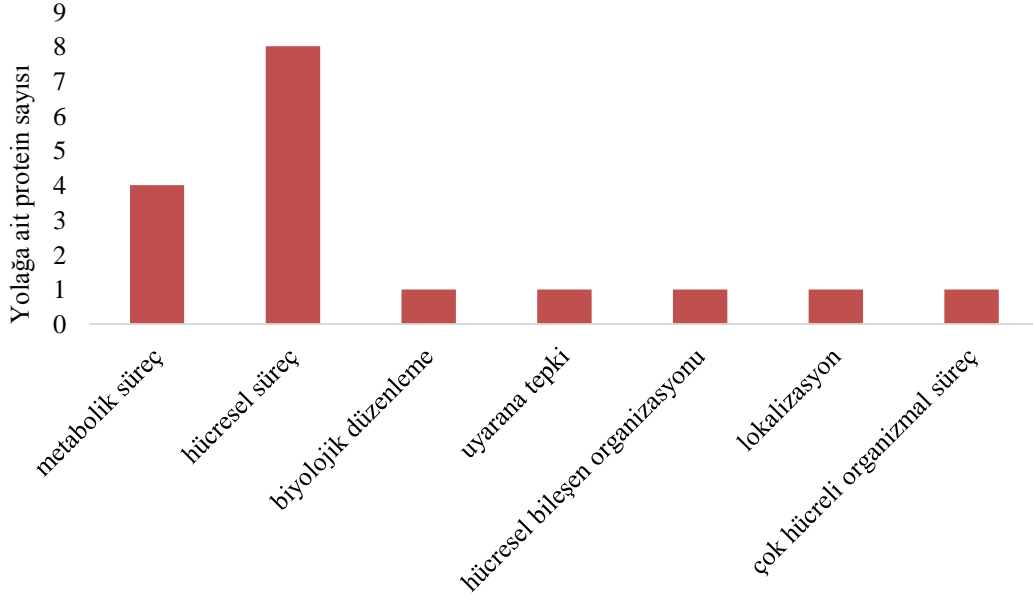


Şekil 5.15. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi artan proteinlerin görev aldığı biyolojik süreçler (PANTHER veri tabanı)

Biyolojik süreçlere göre incelendiğinde ifade değişimi gösteren proteinlerden ifadesi azalan proteinlerin en büyük grubu hücresel süreçler iken, ikinci sıradaki protein grubu metabolik süreçlerde görev alır.

miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi azalmış olan proteinlerin biyolojik süreçlere göre gruplandırılmasının grafiği Şekil 5.16.'da gösterilmiştir.

## PANTHER-GO BİYOLOJİK SÜREÇLER



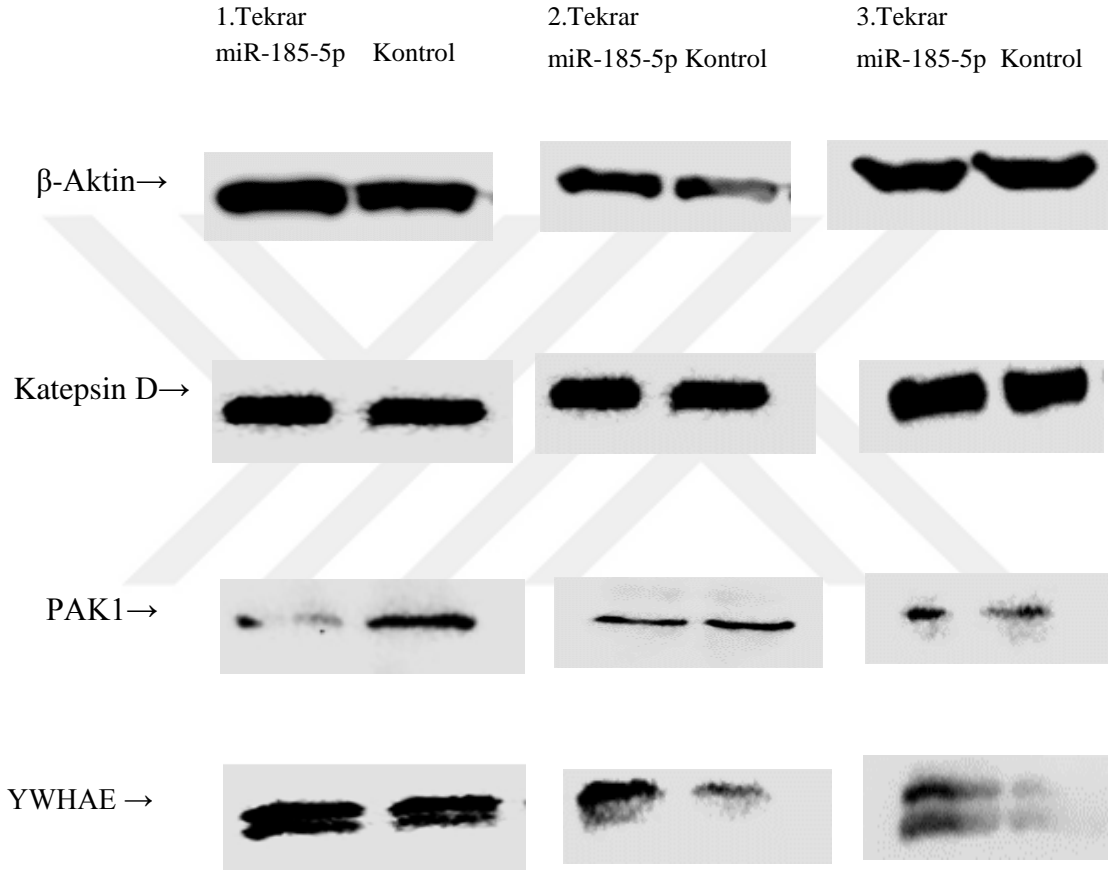
Şekil 5.16. miR-185-5p transfeksiyonu ile ifadesi azalan proteinlerin görev aldığı biyolojik süreçler (PANTHER veri tabanı)

### 5.4.5. WESTERN BLOT

hsa-miR-185-5p transfeksiyonu ile BT-474 insan meme kanseri hücrelerinden elde edilen ve nano-LC-MS/MS analizi sonucunda tanımlanmış olan proteinlerin validasyonu için Western Blot analizi yapılmıştır. LC-MS/MS analizi sonucunda Katepsin D'nin 8,76 kat ifadesinin arttığı, 14-3-3 epsilon (YWHAE)'nin 1,95 kat ifadesinin arttığı, PAK1 proteinin ise 0,54 kat ifadesinin azaldığı görülmüştür. Literatürde yer alan çalışmalarda Katepsin D'nin çeşitli kanser hücrelerinde apoptozisin düzenlenmesinde pozitif bir rol oynadığı, apoptozu indüklediği, tümör büyümesi ile metastazların önlenmesi özelliği belirlenmiştir (54,86-89). YWHAE'nin apoptozu desteklediği, hücre çoğalmasını, invazyonu ve metastazı engellediği belirlenmiştir (55,90-93). PAK1'in çeşitli hücre yüzeyi veya hücre içi sinyallerle aktive olduğu, MAPK sinyal yolunu aktive edip, hücre iskeletinin şeklini değiştirdiği ve meme kanserinde onkogen olarak davrandığı belirlenmiştir (56, 94-97).

İlgili proteinlerin yer aldığı literatürdeki çalışmaların incelenmesiyle literatürdeki verileri destekleyen tez çalışmamızda Katepsin D, YWHAE proteinlerinin ve PAK1 inhibitörlerinin tümör baskılayıcı bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi öngörülmüştür.

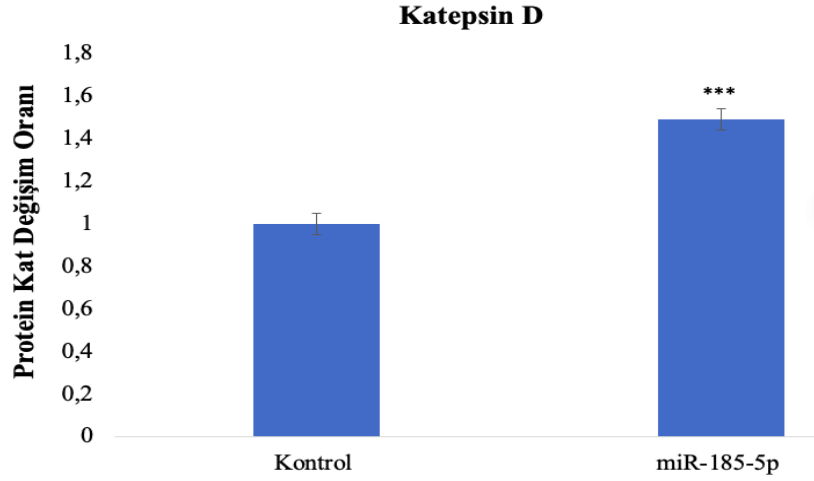
Elde edilen LC-MS/MS analizi sonuçlarına göre protein seviyesinde değişim gösteren bu proteinlerin antikorları belirlenip western blot analizi ile doğrulamasının yapılması amaçlanmıştır. Normalizasyon için  $\beta$ -Aktin kullanılmıştır. 3'er biyolojik tekrar yapılmıştır. Western blot analizi sonuçlarında ise aynı şekilde Katepsin D ve YWHAE proteinlerinin ifadesinin yüksek seviyede, PAK1 proteininin ise düşük seviyede ifade gösterdiği doğrulanmıştır.



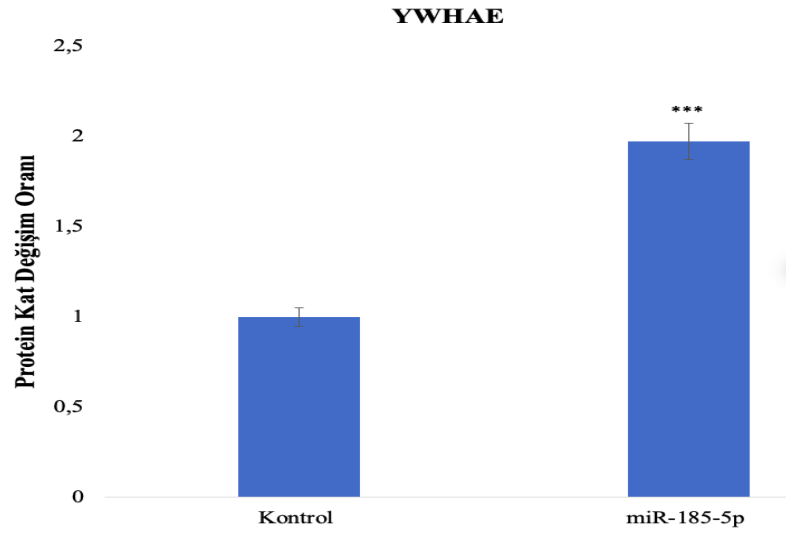
Şekil 5.17. hsa-miR-185-5p transfeksiyonu yapılan BT-474 meme kanseri hücreleri ve kontrol grubunun kıyaslanması ile Katepsin D, PAK1 ve YWHAE proteinlerinin western sonuçları

miR-185-5p transfeksiyonu yapılan BT-474 meme kanseri hücreleri ve kontrol grubunun kıyaslanması ile Katepsin D, YWHAE ve PAK1 proteinlerinin ifade seviyesindeki değişimler Şekil 5.18., Şekil 5.19. ve Şekil 5.20.'de gösterilmiştir.

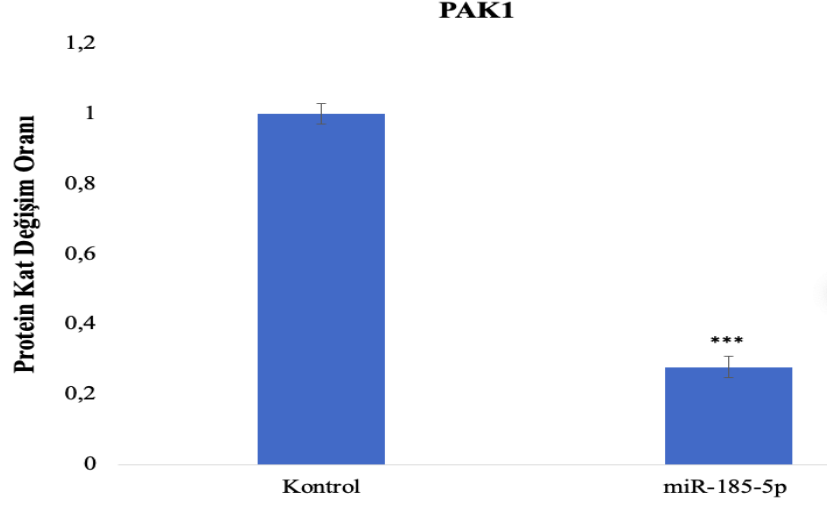




Şekil 5.18. miR-185-5p transfeksiyonu yapılan BT-474 meme kanseri hücreleri ve kontrol grubunun kıyaslanması ile Katepsin D proteininin ifade seviyesindeki değişim (\*\*\*) $p < 0.001$ )



Şekil 5.19. miR-185-5p transfeksiyonu yapılan BT-474 meme kanseri hücreleri ve kontrol grubunun kıyaslanması ile YWHAE proteininin ifade seviyesindeki değişim (\*\*\*) $p < 0.001$ )



Şekil 5.20. miR-185-5p transfeksiyonu yapılan BT-474 meme kanseri hücreleri ve kontrol grubunun kıyaslanması ile PAK1 proteininin ifade seviyesindeki değişim (\*\*\*) $p < 0.001$ )

Sonuçlarda miR-185-5p transfeksiyonu yapılan BT-474 meme kanseri hücreleri ve kontrol grubunun kıyaslanması ile Katepsin D protein seviyesinin 0.49 ve YWHAE protein seviyesinin 0.973 kat arttığı, PAK1 protein seviyesinin ise 0.73 kat azaldığı belirlenmiştir ( $p < 0.001$ ).

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1. TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda en sık görülen malign hastalıklardan biridir (57). 2018 yılında GLOBOCAN veri tabanına göre yaklaşık 2,1 milyon kadın meme kanseri tanısı belirlenmiştir (58). Meme kanseri heterojen bir hastalıktır, klinikteki farklı davranışlarının arkasındaki birçok mekanizmanın hala bilinmemesi, tedaviye dirençli kanser hücrelerinin olması, mevcut tedavi yöntemlerinin yeterli olmaması sebebiyle meme kanseri hastalarında hala yüksek oranda ölüm gerçekleşmektedir ve bu yüzden tedavide farklı alternatif yöntemler bulmak gerekmektedir (4, 20, 59).

MikroRNA'lar 21-25 nükleotit uzunluğunda, hücre gelişimi, farklılaşması, proliferasyonu ve apoptozis gibi biyolojik süreçlerde rol alan protein kodlamayan RNA'lardır (45). miRNA'lar onkogen veya tümör baskılayıcı olarak kanser sürecinde fonksiyon gösterebilirler (60). miRNA'ların metastatik meme kanseri teşhisinde ve sürecinde biyobelirteç olarak kullanılabilmesi yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (45, 60-62). Örneğin, Ma ve ark. yaptığı çalışmada, mikroRNA-10b'nin (miR-10b) metastatik meme kanseri hücrelerinde yüksek oranda ifade edildiğini ve hücre invazyonunu ve metastazı pozitif şekilde düzenlediği gösterilmiştir (60). Ekhelser ve ark. yaptığı çalışmada miR-34a, miR-93 ve miR-373'e ait ifade seviyesinin, meme kanseri hastalarında sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (61). Diğer bir çalışmada ise primer meme tümörlerinin çoğunda miR-126 ve miR-335'in ifadelerinin azaldığı gözlenmiş olup, miR-126'nın tümör büyümesi ve çoğalmasını azaltması ve miR-335'in ise metastazı önlediği tespit edilmiştir ve böylece miR-335 ve miR-126 insan meme kanserinde metastaz baskılayıcı mikroRNA'lar olarak tanımlanmıştır (62). Bu miRNA'ların ifadelerinin azalması metastaz ile ilişkilendirilmiş olup, miR-126 ve miR-335'in meme kanseri modellerinde miRNA ifadelerinin artırılması ile in vivo metastazları baskılayabileceği gösterilmiştir (45, 62).

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmada, MDA-MB-231, BT-474 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerine liken sekonder metaboliti olan alternatif ilaç adayı molekülü usnik asitin anti-proliferatif etkisi araştırılmış ve mikrodizin analizi ile her bir hücre hattında usnik asite cevap veren miRNA'lar tanımlanmıştır (51). Usnik asitin büyümeyi

inhibe edici etkisi meme kanseri hücre hatlarında gösterilmiştir ve 67 adet miRNA MDA-MB-231, 15 adet miRNA BT-474 ve 8 adet miRNA MCF-7 hücre hatlarında tanımlanmıştır (51). Tanımlanan miRNA'ların sadece 6 tanesinin (hsa-miR-3171, hsa-miR-4726-5p, hsa-miR-3198, hsa-miR-5194, hsa-miR-6805-5p, hsa-miR-4306) MDA-MB-231 ve BT-474 hücre hatlarında ortak olduğu, diğer miRNA'ların ise her bir meme kanseri hücre hattına özgü olduğu tespit edilmiştir (51).

Usnik asite cevap veren miRNA hedeflerinin yolak analizi yapılarak ilgili yollar belirlenmiştir (51). BT-474 hücre hattına spesifik miRNA'ların hedeflerinin fokal adezyon, ErbB sinyal ve mTOR sinyal yolları olduğu gözlenmiş ve BT-474 hücre hattında usnik aside cevap veren miRNA'lardan birinin hsa-miR-185-5p olduğu tespit edilmiştir (51). Bu miRNA'nın ifadesinin usnik asit muamelesi sonucunda mikrodizin analizi ile 2.86 kat arttığı belirlenmiştir. Mikrodizin sonuçlarının validasyonu için qRT-PCR yapılmıştır ve usnik asit muamele edilen BT-474 hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla 2.49 kat değişimi ile arttığı belirlenmiştir (51). miR-185-5p'nin hedefleri miRWalk programı ile belirlenmiş, yolak analizi sonuçları ile de çoğu hedefin kanser ilişkili yollarda görev aldığı anlaşılmıştır (51). Hedeflerin MDM2, p53 sinyal yollarında ve CDK4/6 ile Siklin E hücre döngüsü yollarında anahtar rol aldığı ve ayrıca proliferasyon (PI3K, Akt, VEGF, Wnt, IGFR), anjiyogenez (VEGF, HIF-alpha) ve apoptoz (TRAF) gibi kanser sürecinde önemli olan yollarda görev aldığı belirlenmiştir (51). Laboratuvarımızda yapılan ön çalışmalarda miR-185-5p, MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri alt tipine sahip hücrelere ve östrojen reseptörü pozitif olan Luminal B alt tipine sahip BT-474 meme kanseri hücrelerine uygulanmıştır. miR-185-5p uygulanmış, MDA-MB-231 hücrelerinde hücre proliferasyonunun etkilenmediği gözlemlenirken, BT-474 hücrelerinde hücre proliferasyonunun azaldığı belirlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalarda, usnik asitin insan meme kanseri hücre hatlarında antiproliferatif ve invazyonun engellenmesi gibi özellikler göstererek, tümör baskılayıcı bir özellikte olduğu (63, 64) ve meme kanserinde düşük ifade gösteren miR-185-5p'nin, ifadesini artırdığı göz önüne alındığında miR-185-5p'nin tümör baskılayıcı bir miRNA olduğu ortaya çıkarılmıştır (51, 63-66). Tez kapsamında miR-185-5p'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT analizi gerçekleştirilmiş ve meme kanseri hücrelerinde miR-185-5p'nin anti-proliferatif etkisi olduğu belirlenmiştir. miR-185-5p'nin

etkisinin, meme kanseri hücrelerinde ve normal meme doku hücrelerinde yapmış olduğu protein düzeyindeki değişikliklerin ise proteomik bir yöntemle belirlenmesi tezin amacını oluşturmuştur.

Proteomik teknolojileri, hücrelerde ifade edilen proteinlerin kimliğini, miktarını, üç boyutlu yapılarını ve etkileşim gösterdiği molekülleri belirlemeyi amaçlayan, giderek daha önemli hale gelen ve hızla büyüyen geniş bir araştırma alanını kapsayan konu haline gelmiştir (67). Farklı proteomik teknikler sayesinde çeşitli hastalıklardaki protein farklılıklarını kantitatif olarak analiz etmek, kanser teşhis ve tedavisi için biyobelirteç keşfedilmesinde, hücresel olayların aydınlatılmasında, diğer hastalıkların tedavilerinde ve yeni ilaç üretiminde kullanılır (46, 68, 69).

Proteinlerin özellikle kanser hastalığı için biyobelirteç olabileceğine dair çalışmalar gerçekleştirilmiştir (70-72). Örneğin, araştırmacı Lopez'in gerçekleştirdiği çalışmada hepatoselüler karsinom (HCC) için en önemli tümör belirtecinin alfa-fetoproteini (AFP) olduğu ve AFP belirteci ile ultrasonografinin kullanıldığı hastalarda erken teşhisin yapıldığı ve buna bağlı olarak tümörlerin daha kolay tedavi edildiği gösterilmiştir. Ayrıca HCC için diğer bir biyobelirteç olarak des-gama-karboksi-protrombin (DCP) olduğu bulunmuştur (70). Arechavaleta-Velasco ve ark. Büyüme Faktörü olan Progranulin (PGRN), farklı kanser türlerinde önemli biyolojik işlevi olduğu ve bu proteinin tümörojenezin düzenleyicisi olup, hücre çoğalmasını, invazyonu, metastazı anjiyogenezi, malign transformasyonu, antikanser ilaçlara karşı direnci uyardığı tespit edilmiştir (71). Arechavaleta-Velasco ve ark. çeşitli kanser modellerinde büyüme faktörünün (PGRN), biyolojik etkilerine odaklanıp, kanser tedavisinde potansiyel bir biyobelirteç ve hedef olarak görülmesi gerektiğine dair çalışmaları tamamlanmıştır (71). Heo ve ark. yaptığı çalışmada, insan Akciğer Adenokarsinomu'nda Haptoglobin (HP), Inter- $\alpha$  Tripsin İnhibitörü ağır zincir 4 (ITI4H4), Tamamlayıcı C3 prekürsörü, Plazma Kallikrein (KLKB1) ve Inter- $\alpha$  Tripsin İnhibitörü ağır zincir 3 (ITIH3) gibi potansiyel akciğer kanseri biyobelirteçleri olarak nitelendirilen proteinler tanımlanmış olup, KLKB1'in akciğer kanseri için potansiyel bir aday serum biyobelirteçi olduğu doğrulanmıştır (72). Gerçekleştirilen çalışmamızda YWHAE, Katepsin D ve PAK1 proteinlerinin ifade seviyesindeki istatistiksel olarak anlamlı değişim moleküllerin tümör baskılayıcı biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Ouchida ve ark., miR-19a, miR-20a ve miR-92-1'in MCF-7 meme kanseri hücre hattında doğrudan hedef profillerini tanımlayabilmek için nicel bir proteomik yaklaşım kullanmıştır (73). miR-19a, miR-20a ve miR-92-1 susturulduktan sonra iki boyutlu elektroforez ve kütle spektrometrik analiz ile potansiyel hedefler olarak tanımlanan toplamda 123 proteinin ifade seviyesinin arttığı belirlenmiştir (73). Yüksek ifade gösteren proteinlerden dördünün PPP2R2A, ARHGAP1, IMPDH1 ve NPEPL1 mRNA'larında miR-19a veya miR-20a bağlama bölgelerine sahip olduğu gösterilmiştir (73). Her bir bağlanma bölgesi ile plazmidlerin lusiferaz aktivitesinin azaldığı ve spesifik anti-miRNA-LNA'nın varlığında lusiferaz aktivitesinde bir artış gözlenmiştir (73). Western blot analizi ile anti-miR-19a kullanıldıktan sonra IMPDH1 ve NPEPL1'in ifade seviyelerinde artış görülürken, PPP2R2A ve ARHGAP1 proteinlerinin ifade seviyelerinde bir değişiklik görülmemiştir (73). IMPDH1 ve NPEPL1 proteinlerinin bir Western blot analizi ile miR-19a'nın potansiyel doğrudan hedefleri olduğu doğrulanmıştır (73). Yang ve ark. göre, miR-21, invazyon ve göç gibi kanserle ilgili çeşitli süreçlerde rol oynayan onkogenik aktiviteye sahip olduğu ve tümörjenezdeki önemi anlaşıldığından, miR-21'in potansiyel hedeflerinin belirlenmesi için kantitatif bir proteomik strateji kullanmışlardır (8). MCF-7 meme kanseri hücrelerinde miR-21 ifade seviyesini durdurarak, miR-21'in potansiyel hedefleri olabileceği düşünülen 58 proteinin ifadesinde artış gözlemlenmiştir (8). Bu aday hedeflerin 12 tanesine lusiferaz analizi yapılmıştır ve 6 tanesinin miR-21'in doğrudan hedefleri olduğu gösterilmiştir (8). Kromozom yoğunlaşma proteini G (NCAPG), oksidatif strese duyarlı 1 (OXSR1), SEC23 ile ilişkili protein A (SEC23A) ve Programlanmış hücre ölümü 4 (PDCD4) proteini miR-21'in tanımlanan hedefleridir (8). Çalışmanın sonuçları, miR-21'in, translasyon inhibisyonu yoluyla birçok hedefinin ifadesini etkilediğini ve miRNA hedeflerini tanımlamak için proteomik yaklaşımların kullanımının önemini göstermektedir (8). Yan ve ark., miR-373'ün meme kanseri invazyonu ve metastazında rolü olduğunu açıklayan bu çalışmada, miR-373 tarafından düzenlenen genlerin tanımlanması için SILAC bazlı kantitatif proteomik analizi kullanılmıştır (9). Toplamda 3666 protein tanımlanmış ve 335 proteinin miR-373 tarafından düzenlendiği bulunmuştur (9). Bu çalışmada yapılan Lusiferaz ve mutasyon analizleri ile TXNIP ve RABEP1'in miR-373'ün direkt hedef genleri olduğunu doğrulanmıştır (9). Bu sonuçlar, proteomik tabanlı yaklaşımların, miRNA'ların hedef genlerinin tanımlanması için uygun teknoloji olduğunu göstermiştir (9). Gerçekleştirilen çalışmamızda MS-bazlı etiketsiz kantitatif proteomik analizi

kullanılmıştır. miR-185-5p transfeksiyonu sonrası toplamda 858 protein tanımlanmış, 86 tanesinin istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı gösterdiği bulunmuştur. Çalışma sonucunda DCTN2, ANXA1, MSN, GAPDH, RCC1, PAK1, KRT19, PPL ve CORO1C, ATIC, CLIC1, EEF1D, HDLBP, HİST1H3A, YWHAE, SEC23A MCM2, NASP, RAE1, HNRNPD, SRRT, ASPH, COMT, BANF1, SEC23A, TCN1, PYGB, GSS, RAE1, RPL30, RPS4X, CBR1, CPT2, ACOT2, COMT, CTSC, CTSD, KIF5C, CBX5, PGD, EIF4A1, EIF3H, EIF2S1, EEF10, SRP54, CBX5, NDUF32, GRN, MSN, RAE1, EIF4A1, TXNL1, HNRNPD, EIF2S1, PCNA, NDUFS2 proteinlerin Epitelyal Mezenkimal Geçişi (EMT), hücre döngüsü, hücre metabolizması, oksidatif stres ve inflamasyon gibi çeşitli mekanizmaların anlaşılmasında kullanılabileceği belirlenmiştir.

Son yıllarda yüksek çözünürlüklü, hızlı, yüksek verimli, yüksek hassasiyetli iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification), ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag), SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino in Cell Culture) gibi etiketli proteomik ve etiketsiz kantitatif proteomik yaklaşımın da dahil olduğu kütle spektrometrisi tabanlı proteomik teknikler gelişmiştir (69, 74). Ancak, birçok etiketleme yönteminin uzun iş akışı, eksik etiketleme, yüksek konsantrasyonda numune gereksinimi, yüksek maliyetli deney prosedürleri ve sınırlı sayıda numune analizi gibi potansiyel kısıtlamaları vardır (49). Bu nedenle, tez kapsamında bu kısıtlamaların üstesinden gelmek için, herhangi bir izotopik veya kimyasal etiketlemenin olmadığı, etiketlemenin neden olduğu sınırlamaların ortadan kalktığı, moleküler mekanizmaları ve yolakları anlamada, çeşitli hastalıkların ilaç hedeflerinin keşfedilmesinde, normal ve hastalık içeren örneklerde farklı şekilde ifade edilen proteinlerin tanımlanmasında ve biyobelirteç belirlenmesinde büyük bir potansiyeli olan MS-bazlı etiketsiz yöntem kullanıldı (69, 75).

Meme kanserinde miRNA'ların Hücre Döngüsü ilerlemesini, Apoptozu, Epitelyal-Mezenkimal Geçiş'i, İnvazyonu ve Metastazı düzenlediği bilinmektedir (44). Son zamanlarda, Epitelyal Mezenkimal Geçiş'in (EMT) ve Mezenkimal Epitelyal Geçiş'in (MET) meme kanseri metastazı için ana mekanizmalar olduğu bildirilmiş ve mikroRNA'ların EMT ile ilişkili kanser invazyon ve metastazında anahtar faktörler olduğu gösterilmiştir (65, 76). Yin ve ark. çalışmasına göre, Immün glubulin ailesinin bir üyesi olan RAGE, prostat kanseri ve meme kanseri gibi birçok kanser türünde tümör büyümesini ve metastazı artıran bir reseptör olduğu epitel mezenkimal geçişine (EMT) neden olduğu

bilinmektedir (65). miR-185-5p'nin meme kanserinde ifadesinin azaldığı tespit edilmiş ve hedef gen tahmininden elde edilen sonuçlar, miR-185-5p'nin bir RAGE bağlanma yerine sahip olduğu gösterilmiştir (66). Çalışmada hastalarda miR-185-5p'in seviyesinin artırılarak, RAGE'yi hedeflemesi tümör migrasyonunu ve invazyonunu baskılayabileceği öngörülmüştür (65). Çalışmada miR-185-5p'in aşırı ifade seviyesi artışı ile F-aktin polimerizasyonunu inhibe ettiği ve RAGE'yi hedefleyerek insan meme kanseri hücrelerinin Epitelyal Mezenkimal Geçiş'i'ni tersine çevirdiği gözlemlenmiştir ve miR-185-5p'nin, meme kanserinde RAGE'ye bağlanarak potansiyel bir terapötik hedefi temsil ettiği ifade edilmiştir (65). Gerçekleştirilen çalışmamızda ise miR-185-5p'nin ifade seviyesinin artırılarak, miR-185-5p'nin hedefi olabileceği ve insan meme kanseri hücrelerinde Epitelyal Mezenkimal Geçiş'i ve hücre iskeleti organizasyonu ile ilişkili olduğu düşünülen DCTN2, ANXA1, MSN, GAPDH, RCC1, PAK1, KRT19, PPL ve CORO1C, ATIC, CLIC1, EEF1D, HDLBP, HIST1H3A, YWHAE ve SEC23A proteinleri STRING, PANTHER ve DAVID veri tabanları ile tespit edilmiş ve bu proteinlerin meme kanserinin invazyon mekanizması ve EMT'nin potansiyel mekanizmasının anlaşılmasında aydınlatıcı olarak etkili bir terapötik strateji ve EMT belirteç adayları olabileceği belirlenmiştir.

Son yıllarda kanser gelişimi ve hücre döngüsü kontrolü arasındaki bağlantılara odaklanılmış ve kötü huylu tümörlerin birçoğundaki karakteristik özelliğin, hücre döngüsü kontrolünde ve ilerlemesinde görev alan proteinlerin değişen ifade miktarlarından kaynaklanan düzensizlik olduğu düşünülmüştür (77). Ayrıca Hücre Döngüsü ile östrojen sinyali arasında da bir ilişki bulunmuştur (78). ER $\alpha$ 'nın, bir proto-onkogen olarak kabul edilen Siklin D1 ile etkileşimi olduğu bilinmektedir (77, 78). Ostadrahimi ve ark. yaptığı çalışmaya göre; miR-1266-5p ve miR-185-5p'nin, iki anti-apoptotik geni (*BCL2* ve *BCL2L1*) hedeflemesinin, prostat kanserinin moleküler patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Shiva Ostadrahimi ve ark. yaptığı farklı bir çalışmada, prostat kanseri tümör doku ve hücre hatlarında miR-1266-5p ve miR-185-5p'nin ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (79). Bu çalışmada miR-1266-5p ve miR-185-5p'nin ifadesinin artırılması ile miRNA'ların *BCL2* ve *BCL2L1* genlerini inhibe edip proliferasyonu azaltarak, hücre apoptozunu indüklediği ve böylece tümör baskılayıcı olarak davrandıkları ortaya konulmuştur (80). Çalışmamızda ise insan meme kanseri hücrelerinde miR-185-5p'nin ifade seviyesinin artırılarak, miR-185-5p'nin hedefinin olabileceği ve hücre döngüsü ile ilişkili olduğu düşünülen DCTN2, YWHAE, RCC1, MCM2, NASP, PCNA, ANXA1,



MSN, RAE1, HNRNPD, SRRT, ASPH, COMT ve BANF1 proteinleri STRING veri tabanı ile tespit edilmiş ve bu proteinlerin meme kanserinde östrojen sinyali ve hücre döngüsü mekanizması arasındaki ilişkiyi protein boyutunda aydınlatılabileceği etkin terapötik bir hedef olabileceği tespit edilmiştir.

Kanser hücrelerinin metabolik ihtiyaçları ve bağımlılıkları Warburg Etkisi ile açıklanmaktadır (81). Hızlı proliferasyon gösteren tümör hücrelerinin büyük kısmı oksidatif fosforilasyon yerine, aerobik glikolizis olan Warburg Etkisi ile metabolize olur (81). Bu nedenle, oksidatif fosforilasyondan aerobik glikolize geçişin kontrolünün anlaşılması kanser tedavisi için çok önemlidir (82). Ma ve ark. yaptığı çalışmada, miR-361-5p ifadesinin meme kanserinde düşük olduğunu ve bir glikolitik yolağın destekçisi olan FGFR1'i doğrudan hedefleyerek meme kanseri hücrelerinde aerobik glikoliz ve çoğalmayı inhibe ettiğini belirlemişlerdir (82). Ayrıca meme kanseri hücrelerinde invazyon ve metastazı baskılamak için MMP-1'i hedeflemiştir (82). Bir tümör baskılayıcı olarak, miR-361-5p'nin meme kanseri hücrelerinin glikolitik metabolizmasını, proliferasyonunu ve metastazı önlediği tespit edilmiştir (82). Gerçekleştirilen tez kapsamında insan meme kanseri BT-474 hücresinde miR-185-5p'nin ifade seviyesinin artırılarak miR-185-5p'nin hedefinin olabileceği, hücre metabolizması ile ilişkili olduğu düşünülen SEC23A, TCN1, PYGB, ATIC, GSS, GAPDH, RAE1, RPL30, RPS4X, CBR1, CPT2, ACOT2, COMT, CTSC, CTSD, KIF5C, DTCN2, CBX5, PGD, EIF4A1, EIF3H, EIF2S1, EEF10, SRP54, PCNA, CBX5 ve NDUF32 proteinleri STRING veri tabanında tespit edilerek bu proteinlerin meme kanseri ve hücre metabolizması arasındaki ilişkiyi aydınlatacak bir terapötik hedef olabileceği literatüre sunulmuştur.

Kronik inflamasyon meme kanseri gelişimine ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar (83). Interlökin-1 (IL-1), IL6, Tümör Nekroz Faktörü (TNF- $\alpha$ ) ve C-reaktif protein (CRP), meme kanseri ile ilişkilendirilmiş olan inflamasyonun biyobelirteçleridir (83). Bu bağışıklık sistemi biyobelirteçlerinde meme kanseri hastaları ile sağlıklı bireyler arasında önemli farklılıklar vardır. Bunlardan en önemlisi, TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın meme kanseri olan hastalarda artmış bir seviyede olması ve genel bağışıklık sisteminde işlev bozukluğu göstermesidir (83). Aziz'in yaptığı çalışmada, diyabet tip 2, kan zehirlenmesi, romatoid artrit ve inflamatuvar bozukluklar gibi çeşitli hastalıklarda miR-223'ün ifade seviyesinde farklılıklar tespit edilmiştir (84). miR-223'ün STAT5, EPB41L3, Ect2, Pknx1, C/EBPa,

C/EBP $\beta$ , E2F1, FOXO1, NFI-A, Caprin-1, IGF-1R ve ısı şok proteini 90'ı (Hsp90) hedefleyerek inflamasyonu düzenlediği bulunmuştur (84). Bizim çalışmamızda ise insan meme kanseri hücrelerinde miR-185-5p'nin seviyesinin artırılarak, miR-185-5p'nin hedefinin olabileceği, immün sistem ile ilişkili olduğu düşünülen SEC23A, CTSC, GRN, PYGB, CTSD, TCN1, ANXA1, MSN, DCTN2, RAE1, EIF4A1, PAK1 ve PPL proteinleri bulunmuş ve inflamasyon hastalıklarında erken tanı ve terapötik hedef için biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

Oksidatif stres meme kanserini de içeren çeşitli kanser tiplerinde önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif stres, ROS'un (serbest radikaller) aşırı üretilmesini destekleyen antioksidan savunma arasındaki bir rahatsızlıktır (83). Serbest radikaller, anjiyojenik faktör IL-8 ve Vasküler Endotel Büyüme Faktörü'nün (VEGF) tümör hücresi üretimini artırır ve tümör mikro-ortamı içinde damar büyümesini destekleyen bir kollajenaz olan matris metaloproteinazlarının salgılanmasını destekler ve bu nedenle meme karsinomunda anjiyogeneze neden olabilir (83). Degli-Esposti ve ark. çalışmalarında, miR-500a-5p'nin bir çok oksidatif stres genlerinin ifadesini kontrol ettiğini ve oksidatif stres koşulları altında aşırı ifade edildiğini göstermişlerdir (85). Bu hedefler arasında, meme kanseri hastalarında düşük ifadesinin kötü sonuçlarla ilişkilendirilen bir gen olan *NFE2L2*'yi bulmuşlar ve miR-500a-5p'nin kanserleşme sürecine etki ettiğini tespit etmişlerdir (85). Meme kanseri hastalarında miR-500a-5p'nin bir onkogen olduğu ve ifadesinin azaltılarak tedavide kullanılabileceği düşünülürken, bizim çalışmamızda ise insan meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı özelliği olduğunu düşündüğümüz miR-185-5p'nin seviyesinin artırılarak, miR-185-5p'nin hedefinin olabileceği ve oksidatif strese cevap yolları ile ilişkili olduğu düşünülen ANXA1, GSS, TXNL1, HNRNPD, EIF2S1, PCNA, NDUFS2 proteinlerin, meme kanseri hastalarında miR-185-5p ve onun hedefi olabileceği düşünülen genlerinin potansiyel terapötik hedefler olabileceği açığa çıkarılmıştır.

hsa-miR-185-5p transfeksiyonu sonrası, insan meme kanseri hücrelerinden elde edilen proteinlerin nano-LC-MS/MS analizi sonucunda belirlenmiş olan ve miR-185-5p'nin hedefi olduğu düşünülen proteinlerin validasyonunun sağlanması amacıyla Western Blot analizi yapılmıştır. LC-MS/MS analizi sonucunda Katepsin D'nin 8,76 kat yüksek ifadesi, 14-3-3 epsilon (YWHAE)'nin 1,95 kat yüksek ifadesi, PAK1 proteinin ise 0,54 kat düşük

ifadesi bulunmuştur. Western blot sonuçlarında da Katepsin D ve YWHAE proteinlerinin ifadelerinin arttığı, PAK1 proteininin ise ifadesinin azaldığı belirlenmiştir.

Chwieralski ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada apoptozun düzenlenmesinde farklı proteolitik enzimlerin rolü olduğuna dair bulgular yer almaktadır (86). Katepsinler, fizyolojik koşullar altında lizozomun içinde bulunan proteazlardır (86). Katepsinler, oluşan bazı sinyallere cevap olarak, lizozom ile Kaspazların aktivasyonu veya mitokondriden proapoptotik faktörlerin salınımını da içeren, çeşitli yollardan apoptotik hücre ölümünün tetiklendiği sitoplazmaya yayılırlar (86). Katepsin B, L ve D'nin apoptozisin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (86). Deiss ve ark. çalışmasında, Katepsin D'nin inaktif bir membranla ilişkili öncü madde olarak sentezlendiği ve yüksek ifadesinin, HeLa hücrelerinin apoptozisini indüklediği belirlenmiştir (87). Roberg K ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Katepsin D inhibitörü Pepstatin A'nın, oksijene bağlı apoptozu inhibe ettiği bulunmuş ve sitozolik Katepsin D'nin, insan fibroblastlarında Sitokrom-C salımı ve Kaspaz aktivasyonu yönünde proapoptotik bir aracı olarak görev yapabildiği tespit edilmiştir (88). Johansson ve ark. yaptığı çalışmada; Katepsin D'nin, bir geniş spektrumlu protein kinaz inhibitörü olan starosporin ile indüklenen insan foreskin fibroblast apoptozundaki önemini değerlendirilmiştir (89). Elde edilen sonuçlarda, sitozolik Katepsin D'nin, starosporin ile indüklenen apoptoziste anahtar bir aracı olduğu, Sitokrom-C salınımı ve Kaspaz aktivasyonunu artırarak apoptozda pozitif bir rol oynadığı gözlenmiştir (89). Tsukuba ve ark. çalışmasına göre; insan prostat karsinomu hücrelerinden salgılanan Katepsin D'nin, tümör büyümesinin önlenmesine ve metastazların anjiyogenez bağımlı büyümesinin önlenmesine katkı sağlayan anjiyostatin oluşumundan sorumlu olduğu gösterilmiştir (54). Katepsin D 'nin çeşitli uyaranlar ve P53'e bağlı tümör baskılayıcısı ile indüklenen apoptozu aracılık ettiği ve insan meme karsinomu ve prostat karsinomu hücrelerinde tümör büyümesini ve metastazı önleme rolü olduğu gözlemlenmiştir (54). Gerçekleştirilen çalışmamızda da Katepsin D'nin, hsa-miR-185-5p transfekte edilmiş meme kanseri hücrelerindeki LC-MS/MS ve western blot analizleri sonucunda ifadesinin arttığı görülmüştür. Yapılan çalışmalardaki Katepsin D'nin çeşitli kanser hücrelerinde apoptozisin düzenlenmesinde pozitif bir rol oynadığı, apoptozu indüklediği, tümör büyümesi ile metastazların önlenmesi özelliği göz önüne alındığında çalışmamızda da tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olan terapötik hedef için biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

YWHAE (14-3-3 Epsilon), metabolizma, sinyal iletimi, apoptoz ve hücre döngüsü düzenlemesi gibi birçok hücrenel süreçte yer almaktadır (55). Tümör baskılayıcı olarak işlev görür ve ifadesi *P53* ve *BRCA1* ile koordineli olarak düzenlenir (55). Xing-Hua Che ve ark. yaptığı çalışmada; Larinks skuamöz hücre karsinomunda (LSCC), YWHAE'nin, ifadesini ve biyolojik özelliklerini analiz ederek LSCC'nin gelişiminde ve sürecinde rolü araştırılmıştır (90). LSCC dokularında YWHAE'nin protein seviyesinin düşük olduğu görülmüştür (90). LSCC dokularında azalmış YWHAE ifadesi, LSCC'nin başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunduğu böylece YWHAE'nin apoptozu destekleyebileceği ve LSCC'nin invazyonunu engelleyebileceği belirtilmiştir (90). Leal ve ark. yaptığı çalışmada, YWHAE, MYC onkogenin transkripsiyonel bir hedefi olan siklin CDC25B'nin negatif düzenleyicisi olarak görev yaptığı ve CDC25B'nin onkogenetik özellik gösterdiği bulunmuştur (91). Mide kanseri hücre hatlarında, YWHAE'nin ifadesinin artırılması, MYC ve CDC25B ifadelerinin azaltılması ile hücre çoğalmasını, invazyonu ve metastazı inhibe ettiği gözlenmiştir (91). Bunun aksine, MYC, CDC25B'nin ifadelerinin artırılması ve YWHAE'nin ifadesinin azalması yoluyla hücre çoğalması, invazyon ve metastazın arttığı görülmüştür (91). Mide kanseri tümörlerinde YWHAE proteininin ifadesinin azalmış olmasının, CDC25B ve MYC ifadesinin ise artmış olmasının tümör gelişimine ve mide kanseri hücrelerinde metastaz ve invazyona katkı sağladığı belirtilmiştir (91). Ayrıca küçük hücreli akciğer kanserlerinde ve çocuklarda en sık görülen malign beyin tümörü olan medulloblastomlarda (MB) YWHAE ifadesinin azaldığı ve bu proteinin bir tümör baskılayıcı olarak rol oynayabileceği belirlenmiştir (91-93). Bizim çalışmamızda da 14-3-3 epsilon (YWHAE)'nin meme kanseri hücrelerindeki miR-185-5p etkisinin belirlenmesi amaçlı LC-MS/MS ve western blot analizleri sonucunda ifadesinin arttığı görülmüştür. Yapılan çalışmalardaki YWHAE'nin apoptozu desteklediği, hücre çoğalmasını, invazyonu ve metastazı engellediği göz önüne alındığında literatürde ki verileri destekleyen tez çalışmamızda bu proteinin miR-185-5p'nin hedefi olabileceği ve tümör baskılayıcı bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir.

PAK1 molekülü (p21 ile aktive edilmiş kinaz), birçok temel fizyolojik süreçte önemli rol oynar ve bu nedenle birçok kanser tipi de dahil olmak üzere birden fazla patolojik duruma dahil edilir (94). PAK1, MAPK, AKT, Wnt1/ $\beta$ -katenin, ER $\alpha$ , BAD ve NF- $\kappa$ B gibi sinyal yollarında ve hücre şeklini, yapışmayı kontrol eden çeşitli sinyalleri ileten, hücre

hareketliliğinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (95). PAK1 meme kanserinde bir onkogen olarak etki eder ve çeşitli hücre yüzeyi veya hücre içi sinyallerle aktive olur (96). Zhan ve ark. yaptığı çalışmada, miR-494'ün, meme kanserinde *in vitro* ve *in vivo* deneylerde tümör büyümesini baskıladığını ve miR-494'ün meme kanseri dokusunda ifadesinin azalmış olduğu tespit edilmiştir (97). MAPK sinyal yolunu aktive edip, hücre iskeletinin şeklini değiştirerek meme kanserinde onkogen olarak davranan PAK1'in, miR-494'ün doğrudan hedef geni olduğu bulunmuştur (97). Raghavan ve ark.'nın çalışmasında, hormon reseptörü durumu ve PAK1 ifade seviyeleri arasında bir ilişki gözlenmiş, PAK1 ifadesinin belirli progesteron ve östrojenin reseptörleri tarafından kontrol edilebileceğini düşündürmüştür. Elde edilen sonuçlarda, PAK1'in transkripsiyon düzeyinde progesteron reseptörü tarafından düzenlenebileceği öne sürülmüştür (94). Shrestha ve ark. yaptığı çalışmada, PAK1'in meme tümörü örneklerinde ifadesinin arttığı ve PAK1'in merlin inhibisyonu yoluyla eş zamanlı olarak MAPK ve MET sinyalini aktive ettiği gözlemlenmiştir (96). Bu bulgular, insan meme kanserinde PAK1'in yüksek ifadesinin MAPK aktivasyonu için alternatif bir mekanizma olduğunu ve malign transformasyona yol açan çoklu sinyal yollarını düzenleyen bir meme kanseri onkogeni olduğunu göstermiştir (96). Wang ve ark. yaptığı çalışmada, bazı kanser türlerine karşı güçlü antikanser aktivitesi gösterdiği bir antiparaziter ilaç olan Ivermektin'in, sitostatik makrofatofaji/otofajiyi uyararak meme kanseri hücrelerinin büyümesini belirgin şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (56). Ivermektin, meme kanseri hücrelerinde PAK1'in ifadesini inhibe ettiği ve bunun, AKT-MTOR sinyal yolağının etkisizleştirilmesine neden olduğu bulunmuştur (56). Ivermektin PAK1 yıkımını hedefleyebildiği için, meme kanseri tedavisinde umut verici bir tedavi seçeneği olabileceği literatüre sunulmuştur (56). Çalışmamızda elde edilen verilere göre PAK1'in meme kanseri hücrelerindeki miR-185-5p'nin ifadesinin proteom boyutunda belirlenmesi için LC-MS/MS ve western blot analizleri yapıldığında ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalardaki PAK1'in çeşitli hücre yüzeyi veya hücre içi sinyallerle aktive olduğu, MAPK sinyal yolunu aktive edip, hücre iskeletinin şeklini değiştirdiği ve meme kanserinde onkogen olarak davrandığı göz önüne alındığında proteinin ifadesinin azalması ile PAK1 inhibitörlerinin tümör baskılayıcı bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörülmüştür.

Her ne kadar miRNA'ların translasyonu inhibe ederek veya mRNA yıkımını sağlayarak post transkripsiyonel gen ifadesini düzenlemelerine rağmen, bazı miRNA'ların hedef genlerinin ifade seviyelerini artırabildiği de bulunmuştur (98). Bu bilgiler ışığında invazyon ile metastazı engellediği ve apoptozu desteklediği düşünülen YWHAE ve Katepsin D proteinlerinin ifadelerinin çalışmamızda artış göstermesi göz önüne alındığında, elde edilen sonuçlar miR-185-5p'nin meme kanserinde tümör baskılayıcı olarak görev yapabileceğini ortaya çıkarmıştır.

## 6.2. SONUÇ

Gerçekleştirilen tez çalışması sonucunda usnik aside cevap veren miR-185-5p'nin, proteom boyutunda etkisini değerlendirmek amaçlı LC-MS/MS analizi yapılmıştır. miR-185-5p'nin hedefi olabileceği düşünülen proteinler arasındaki ilişki belirlenmiştir. BT-474 meme kanseri hücrelerinde hsa-miR-185-5p'nin protein boyutunda analizi ile miR-185-5p'nin etki gösterdiği 858 protein tanımlanmış olup bunlardan 33 tane proteinin düşük ifade gösterdiği ve 53 tane proteinin yüksek ifade gösterdiği belirlenmiştir. İfade değişimi gösteren proteinlerin sinyal yolları, biyolojik süreçleri ve moleküler fonksiyonları incelenmiştir. İfade değişimi gösteren proteinlerden 3 tanesinin doğrulamasının sağlanması amacıyla western blot analizi yapılmıştır. Sonuçlarda Katepsin D ve YWHAE proteinlerinin ifadelerinin arttığı, PAK1 proteininin ise ifadesinin azaldığı görülmüştür. Bu proteinlerle ilgili elde edilen bilgiler göz önüne alındığında miR-185-5p'nin meme kanserinde tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı belirlenmiştir. Böylelikle usnik asite duyarlı olan miR-185-5p'nin proteom boyutunda etkisinin belirlenmiş olması ile meme kanserine karşı potansiyel yeni bir tedavi yaklaşımının önü açılmıştır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Kormi SMA, Ardekhani S, Azizi A, Spiller L, Martins AP, Nezhad MB. Molecular Genetics in Breast Cancer: Signaling Pathways and Tumor Biology. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(5):1107-22.
2. Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bil Derg*. 2016;5(3):154-165.
3. Yavuz M, İlçe AÖ, Kaymakçı Ş, Bildik G, Diramali A. Meme kanserli hastaların tamamlayıcı ve alternatif tedavi yöntemlerini kullanma durumlarının incelenmesi. *Türk Klin J Med Sci*. 2007;27(5):680-6.
4. Sathipati SY, Ho S-Y. Identifying a miRNA signature for predicting the stage of breast cancer. *Sci. Rep*. 2018;8(1):161-38.
5. Kılıç N, Değerli E, Torun V, Altaytaş F, Cansaran-Duman D. Investigation of synergistic effect of tamoxifen and usnic acid on breast cancer cell line. *JSB*. 2016;1(2):1006.
6. Özenoğlu S, Aydoğdu G, Dinçsoy AB, Taghidizaj AA, Derici K, Yılmaz E, et al. Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 2013;70(4):215-26.
7. Ingolfsdottir K. Usnic acid. *Phytochemistry*. 2002;61(7):729-36.
8. Yang Y, Chaerkady R, Beer MA, Mendell JT, Pandey A. Identification of miR - 21 targets in breast cancer cells using a quantitative proteomic approach. *Proteomics*. 2009;9(5):1374-84.
9. Yan GR, Xu SH, Tan ZL, Liu L, He QY. Global identification of miR - 373 - regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics. *Proteomics*. 2011;11(5):912-20.
10. Liu FJ, Wang XB, Cao AG. Screening and functional analysis of a differential protein profile of human breast cancer. *Oncology Letters*. 2014;7(6):1851-6.
11. Pavlopoulou A, Spandidos DA, Michalopoulos I. Human cancer databases. *Oncology Rep*. 2015;33(1):3-18.
12. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. *World J Clin Oncol*. 2016;7(1):54.
13. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Latest Global Cancer Data: Cancer Burden Rises to 18.1 Million New Cases and 9.6 Million Cancer Deaths in 2018. *Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.

14. Yavuz M, İlçe A, Kaymakçı Ş, Bildik G, Dıramalı A. Meme Kanseri Hastalarının Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi Yöntemlerini Kullanma Durumlarının İncelenmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2017;27:680-686.
15. Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang J, 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(37):4150.
16. Song D, Cui M, Zhao G, Fan Z, Nolan K, Yang Y, et al. Pathway-based analysis of breast cancer. *Am J Transl Res.* 2014;6(3):302.
17. 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 & Diseases.* 2018;5(2):77-106.
18. Luo A, Zhang X. ERFF is essential for Estrogen-Estrogen Receptor alpha signaling pathway in ER positive breast cancer cells. *Biochem. Biophys Res Commun.* 2016;474(2):400-5.
19. Mutlu M, Saatci Ö, Ansari SA, Yurdusev E, Shehwana H, Konu Ö, et al. miR-564 acts as a dual inhibitor of PI3K and MAPK signaling networks and inhibits proliferation and invasion in breast cancer. *Sci. Rep.* 2016;6:32541.
20. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017;50(1):33.
21. Tian M, Schiemann WP. TGF- $\beta$  stimulation of EMT programs elicits non-genomic ER- $\alpha$  activity and anti-estrogen resistance in breast cancer cells. *J Cancer Metastasis Treat.* 2017;3:150.
22. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacology.* 2006;103(1):59-65.
23. Ingólfssdóttir Kn, Chung GA, Skulason VG, Gissurason SR, Vilhelmsdóttir M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. *Eur J Pharm Sci.* 1998;6(2):141-4.
24. Vijayakumar C, Viswanathan S, Reddy MK, Parvathavarthini S, Kundu A, Sukumar E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia.* 2000;71(5):564-6.
25. Scirpa P, Scambia G, Masciullo V, Battaglia F, Foti E, Lopez R, et al. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus. *Minerva Ginecologica.* 1999;51(6):255-60.
26. Cansaran Duman D. Türkiye’de bazı liken türlerindeki usnik asitin HPLC yöntemi ile değerlendirilmesi ve antimikrobiyal aktiviteleri. *Türk Klin J Med Sci.* 2017;64(3):17-21.



27. Çelik DA, Koşar PA, Özçelik N. mikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 2013;20(3):121-7.
28. Karagün BŞ, Antmen B, Şaşmaz İ, Kılınc Y. Mikro RNA and Cancer. Türk Klinik Biyokimya Derg. 2014;12(1):45-56.
29. 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(5):843-54.
30. Ruvkun G. Glimpses of a tiny RNA world. Science. 2001;294(5543):797-9.
31. 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(6772):901.
32. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. Nature. 2000;408(6808):86.
33. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh S-S, Ngankee A, et al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. Cancer Cell. 2009;16(6):498-509.
34. Osada H, Takahashi T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. Carcinogenesis. 2007;28(1):2-12.
35. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Res. 2004;64(11):3753-6.
36. Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, Degli Uberti EC. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. J Cell Physiol. 2005;204(1):280-5.
37. Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia11Note: Susan M. O'Connor and Nicholas G. van Holst Pellekaan contributed equally to this work. Mol Cancer Res. 2003;1(12):882-91.
38. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. Cancer Res. 2005;65(21):9628-32.
39. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. J Pathol. 2005;207(2):243-9.
40. Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res. 2005;65(16):7065-70.

41. Wu H, Zhu S, Mo Y-Y. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res.* 2009;19(4):439.
42. Yan L-X, Huang X-F, Shao Q, Huang M-Y, Deng L, Wu Q-L, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. 2008;14(11):2348-60.
43. Yang Y, Fang S. Small non-coding RNAs-based bone regulation and targeting therapeutic strategies. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;456:16-35.
44. Li L, Xiao B, Tong H, Xie F, Zhang Z, Xiao GG. Regulation of breast cancer tumorigenesis and metastasis by miRNAs. *Expert Rev Proteomics.* 2012;9(6):615-25.
45. McGuire A, Brown JA, Kerin MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer Metastasis Rev.* 2015;34(1):145-55.
46. Sevimli TS, Sevimli M, Özçelik N. Meme kanserinde protein ekspresyon değişimleri ve önemi. *Dicle Tıp Derg.* 2013;40(1):161.
47. Özel D, İğci N, Peker S, Ayhan B, 2014, *Temel Proteomik Stratejiler*, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014.
48. Sürmen MG, Sürmen S, Peñçe S, Özet İ. Fosfoproteomik uygulama basamaklarına genel bakış. *Deneysel Tıp Araştırma Derg.* 2018;81(1):23-32.
49. Nukala SB, Baron G, Aldini G, Carini M, D'Amato A. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics to study the effect of 3PO drug at cellular level. *ACS Med. Chem. Lett.* 2019.
50. Temizkan G, Arda N. *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri Genomik ve Proteomik Analizler*. 1 th ed. Nobel Tıp Kitabevleri Yayınları; 2018.
51. Kiliç N, Islakoglu Y, Buyuk İ, Gur-Dedeoglu B, Cansaran-Duman D. Determination of Usnic Acid Responsive miRNAs in Breast Cancer Cell Lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2018;18. DOI: 10.2174/1871520618666181112120142.
52. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.
53. Degerli E. *Meme Kanseri Tedavisine Yönelik Usnik Asit'e Cevap Veren miR-185-5p'nin Apoptoz Yolağı Üzerindeki Etkisinin Moleküler Düzeyde Araştırılması*: Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2019.
54. Tsukuba T, Okamoto K, Yasuda Y, Morikawa W, Nakanishi H, Yamamoto K. New functional aspects of cathepsin D and cathepsin E. *Mol Cells.* 2000;10(6):601-11.
55. Srihari S, Ragan MA. Systematic tracking of dysregulated modules identifies novel genes in cancer. *Bioinformatics.* 2013;29(12):1553-61.

56. Wang K, Gao W, Dou Q, Chen H, Li Q, Nice EC, et al. Ivermectin induces PAK1-mediated cytostatic autophagy in breast cancer. *Autophagy*. 2016;12(12):2498-9.
57. Ma X, Dong W, Su Z, Zhao L, Miao Y, Li N, et al. Functional roles of sialylation in breast cancer progression through miR-26a/26b targeting ST8SIA4. *Cell Death Dis*. 2016;7(12):e2561.
58. Cancer IAfRo. Latest Global Cancer Data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018.
59. Zeidan BA, Townsend PA, Garbis SD, Copson E, Cutress RI. Clinical proteomics and breast cancer. *The Surgeon*. 2015;13(5):271-8.
60. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007;449(7163):682.
61. Eichelser C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K, Schwarzenbach H. Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clin Chem*. 2013;59(10):1489-9
62. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;451(7175):147.
63. 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.
64. 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.
65. 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(3):2621-30.
66. Wang R, Tian S, Wang H-B, Chu D-P, Cao J-L, Xia H-F, et al. MiR-185 is involved in human breast carcinogenesis by targeting Vegfa. *FEBS Lett*. 2014;588(23):4438-47.
67. Cho WC. Proteomics technologies and challenges. *Genomics, Proteomics Bioinformatics*. 2007;5(2):77-85.
68. Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer*. 2007;6(1):25.
69. Dai P, Wang Q, Wang W, Jing R, Wang W, Wang F, et al. Unraveling molecular differences of gastric cancer by label-free quantitative proteomics analysis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):69.

70. Lopez JB. Recent developments in the first detection of hepatocellular carcinoma. *Clin Biochem Rev.* 2005;26(3):65.
71. Arechavaleta-Velasco F, Perez-Juarez CE, Gerton GL, Diaz-Cueto L. Progranulin and its biological effects in cancer. *Med Oncol.* 2017;34(12):194.
72. Heo SH, Lee SJ, Ryoo HM, Park JY, Cho JY. Identification of putative serum glycoprotein biomarkers for human lung adenocarcinoma by multilectin affinity chromatography and LC- MS/MS. *Proteomics.* 2007;7(23):4292-302.
73. Ouchida M, Kanzaki H, Ito S, Hanafusa H, Jitsumori Y, Tamaru S, et al. Novel direct targets of miR-19a identified in breast cancer cells by a quantitative proteomic approach. *PloS One.* 2012;7(8):e44095.
74. Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer.* 2007;6:25.
75. Atrih A, Mudaliar MA, Zakikhani P, Lamont DJ, Huang JT, Bray SE, et al. Quantitative proteomics in resected renal cancer tissue for biomarker discovery and profiling. *Br J Cancer.* 2014;110(6):1622-33.
76. Liu F, Gu LN, Shan BE, Geng CZ, Sang MX. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update. *Oncol Lett.* 2016;12(6):4869-76.
77. Landberg G, Roos G. The cell cycle in breast cancer. *Apmis.* 1997;105(8):575-89.
78. 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.
79. Ostadrahimi S, Fayaz S, Parvizhamidi M, Abedi-Valugerdi M, Hassan M, Kadivar M, et al. Downregulation of miR-1266-5P, miR-185-5P and miR-30c-2 in prostatic cancer tissue and cell lines. *Oncol Lett.* 2018;15(5):8157-64.
80. Ostadrahimi S, Abedi Valugerdi M, Hassan M, Haddad G, Fayaz S, Parvizhamidi M, et al. miR-1266-5p and miR-185-5p Promote Cell Apoptosis in Human Prostate Cancer Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(8):2305-11.
81. Kısaçam MA. Kanser hücrelerinin metabolik ihtiyaçları ve bağımlılıkları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bil Vet Derg.* 2017;31(1):067-72.
82. Ma F, Zhang L, Ma L, Zhang Y, Zhang J, Guo B. MiR-361-5p inhibits glycolytic metabolism, proliferation and invasion of breast cancer by targeting FGFR1 and MMP-1. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):158.
83. De Boer MC, Worner EA, Verlaan D, van Leeuwen PAM. The Mechanisms and Effects of Physical Activity on Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2017;17(4):272-8.

84. Aziz F. The emerging role of miR-223 as novel potential diagnostic and therapeutic target for inflammatory disorders. *Cell Immunol.* 2016;303:1-6.
85. Degli Esposti D, Aushev VN, Lee E, Cros MP, Zhu J, Herceg Z, et al. miR-500a-5p regulates oxidative stress response genes in breast cancer and predicts cancer survival. *Sci Rep.* 2017;7(1):15966.
86. Chwieralski CE, Welte T, Buhling F. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis.* 2006;11(2):143-9.
87. Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J.* 1996;15(15):3861-70.
88. Roberg K, Kagedal K, Ollinger K. Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am J Pathol.* 2002;161(1):89-96.
89. Johansson AC, Steen H, Ollinger K, Roberg K. Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death Differ.* 2003;10(11):1253-9.
90. Che XH, Chen H, Xu ZM, Shang C, Sun KL, Fu WN. 14-3-3epsilon contributes to tumour suppression in laryngeal carcinoma by affecting apoptosis and invasion. *BMC Cancer.* 2010;10:306.
91. Leal MF, Ribeiro HF, Rey JA, Pinto GR, Smith MC, Moreira-Nunes CA, et al. YWHAE silencing induces cell proliferation, invasion and migration through the up-regulation of CDC25B and MYC in gastric cancer cells: new insights about YWHAE role in the tumor development and metastasis process. *Oncotarget.* 2016;7(51):85393-410.
92. Konishi H, Nakagawa T, Harano T, Mizuno K, Saito H, Masuda A, et al. Identification of frequent G(2) checkpoint impairment and a homozygous deletion of 14-3-3epsilon at 17p13.3 in small cell lung cancers. *Cancer Res.* 2002;62(1):271-6.
93. Cvekl A, Jr., Zavadil J, Birshtein BK, Grotzer MA, Cvekl A. Analysis of transcripts from 17p13.3 in medulloblastoma suggests ROX/MNT as a potential tumour suppressor gene. *Eur J Cancer.* 2004;40(16):2525-32.
94. Raghavan S, Venkatraman G, Rayala SK. Cloning and functional characterization of human Pak1 promoter by steroid hormones. *Gene.* 2018;646:120-8.
95. Semenova G, Chernoff J. Targeting PAK1. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(1):79-88.
96. Shrestha Y, Schafer EJ, Boehm JS, Thomas SR, He F, Du J, et al. PAK1 is a breast cancer oncogene that coordinately activates MAPK and MET signaling. *Oncogene.* 2012;31(29):3397-408.
97. Zhan MN, Yu XT, Tang J, Zhou CX, Wang CL, Yin QQ, et al. MicroRNA-494 inhibits breast cancer progression by directly targeting PAK1. *Cell Death Dis.* 2017;8(1):e2529.

98. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007;318(5858):1931-4.



## 8. EKLER

EK 1: Hsa-Mir-185-5p Mimik Uygulanmış BT-474 ve MCF-12A Hücre Hatlarında Tanımlanmış Proteinlerin İsimleri Ve Bilgileri

Kimlik	Protein	Peptit sayısı	Benzersiz Peptit Sayısı	Güven Değerleri
P42704	130 kDa leucine-rich protein (LRP 130) (GP130).	51	37	360.505
P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	39	29	2.791.265
Q00610	Clathrin heavy chain 1 (CLH-17).	49	28	3.556.984
Q9NZM1	Myoferlin (Fer-1 like protein 3).	38	27	2.131.167
P02545	Lamin A/C (70 kDa lamin).	61	25	5.845.018
P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1 (STI1)	33	23	2.250.696
P15144	Aminopeptidase N (EC 3.4.11.2)	36	23	3.034.015
P02769	Serum albumin precursor	43	23	3.661.904
Q00839	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U)	30	22	2.223.869
P07814	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	34	22	1.998.026
P34932	Heat shock 70 kDa protein 4	26	21	1.681.584
P36776	Lon protease homolog-mitochondrial precursor	25	20	1.478.865
P35579	Myosin heavy chain-nonmuscle type A	110	19	9.140.243
P19338	Nucleolin (Protein C23).	26	19	2.130.858
P08727	Keratin_type I cytoskeletal 19 (Cytokeratin 19)	46	19	4.473.436
P26038	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	31	19	2.681.644
Q02218	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component-mitochondrial	24	18	1.626.194
P13667	Protein disulfide isomerase A4 precursor	34	18	2.756.824
P40939	Trifunctional enzyme alpha subunit-mitochondrial	30	18	2.478.238
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein	29	18	1.990.196

	glycosy			
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3	22	18	1.489.481
P02786	Transferrin receptor protein 1 (TfR1) (TR) (TfR)	30	17	2.121.847
P27824	Calnexin precursor	21	17	2.185.289
P55060	Importin-alpha re-exporter	24	15	1.574.876
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	17	15	1.360.462
Q9QXS1	Plectin 1 (PLTN) (PCN)	21	15	1.292.525
P23246	Splicing factor-proline-and glutamine-rich	21	15	1.504.127
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	37	15	3.394.541
P08799	Myosin II heavy chain-non muscle.	23	15	127.686
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein	18	15	1.804.992
P04792	Heat shock 27 kDa protein (HSP 27)	19	14	1.774.897
P04626	Receptor protein-tyrosine kinase ERBB-2 precursor	24	14	1.989.166
P07942	Laminin beta-1 chain precursor (Laminin B1 chain).	25	14	1.504.085
Q02790	FK506-binding protein 4 (Possible peptidyl-prolyl	20	14	1.684.323
P54886	Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS)	19	14	1.203.973
P08729	Keratin-type II cytoskeletal 7 (Cytokeratin 7)	41	14	3.500.787
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A.	33	14	3.281.533
P11940	Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding	30	13	1.858.443
P50454	Collagen-binding protein 2 precursor (Colligin 2)	15	13	1.310.834
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	29	13	252.705
Q9Y4L1	150 kDa oxygen-regulated protein precursor	35	13	2.665.823
P75471	Cytadherence high molecular weight protein 2	26	13	1.288.815
P30038	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase-mitochondrial	17	13	1.292.493



Q16658	Fascin (Singed-like protein)	18	13	1.754.357
P78371	T-complex protein 1-beta subunit (TCP-1-beta)	20	13	148.453
P05783	Keratin_type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin 18)	30	13	2.648.704
P49748	Acyl-CoA dehydrogenase- very-long-chain specific	23	13	1.745.891
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	23	13	2.668.154
Q14847	LIM and SH3 domain protein 1 (LASP-1) (MLN 50).	20	13	1.991.923
P17844	Probable RNA-dependent helicase p68	24	12	1.731.515
P35221	Alpha-1 catenin (Cadherin-associated protein)	30	12	1.969.337
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	20	12	1.472.126
O43143	Putative pre-mRNA splicing factor RNA helicase	21	12	1.273.731
P18206	Vinculin (Metavinculin).	27	12	1.815.018
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	25	12	2.313.974
Q9NY33	Dipeptidyl-peptidase III	13	12	790.473
P38159	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	16	12	1.152.799
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	16	12	1.168.665
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3	17	12	1.073.065
Q9USI6	Myosin type II heavy chain 1	25	12	1.361.057
P07954	Fumarate hydratase-mitochondrial precursor	18	12	1.225.561
Q9Y4W6	AFG3-like protein 2	22	12	1.135.731
P38117	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	17	12	1.193.432
O75131	Copine III	13	11	77.487
Q29443	Serotransferrin precursor (Siderophilin)	18	11	1.082.085
P08670	Vimentin	49	11	5.733.012
Q9Y617	Phosphoserine aminotransferase	13	11	1.133.413
Q9NQC3	Reticulon 4 (Neurite outgrowth inhibitor)	18	11	1.287.962
Q99832	T-complex protein 1-eta subunit (TCP-1-eta)	17	11	1.163.891

P49588	Alanyl-tRNA synthetase	20	11	1.265.772
P21107	Tropomyosin 5-cytoskeletal type	27	11	2.263.066
P13010	ATP-dependent DNA helicase II-80 kDa subunit	21	11	1.370.445
P80723	Brain acid soluble protein 1 (BASP1 protein)	15	11	1.178.242
P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase	28	11	2.393.558
P10809	60 kDa heat shock protein-mitochondrial precursor	43	11	4.123.791
P26639	Threonyl-tRNA synthetase-cytoplasmic	22	11	1.370.366
P33194	DNA damage binding protein 1	18	11	952.642
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein (PTB)	16	10	1.192.243
Q92841	Probable RNA-dependent helicase p72	28	10	1.927.418
P12750	40S ribosomal protein S4- X isoform	11	10	80.134
P41252	Isoleucyl-tRNA synthetase-cytoplasmic	15	10	866.407
P11047	Laminin gamma-1 chain precursor (Laminin B2 chain)	26	10	1.613.362
P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	21	10	1.106.202
Q99323	Myosin heavy chain-non-muscle (Zipper protein)	34	10	1.978.788
Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP 1).	17	10	1.158.455
Q16698	2_4-dienoyl-CoA reductase-mitochondrial precursor	13	10	1.076.267
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	16	10	857.504
P51858	Hepatoma-derived growth factor (HDGF)	12	10	990.288
P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein	17	10	1.238.564
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	17	10	1.294.838
P06748	Nucleophosmin (NPM)	16	10	1.429.264
P22570	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase-mitochondrial	16	10	1.193.431
Q9UTK5	Abnormal long morphology protein 1 (Sp8)	21	10	987.621
Q13451	51 kDa FK506-binding protein (FKBP51)	15	10	1.204.253

P50990	T-complex protein 1-theta subunit (TCP-1-theta)	24	10	1.837.476
Q13200	26S proteasome regulatory subunit S2	16	10	886.105
P33176	Kinesin heavy chain	25	10	1.347.489
P43243	Matrin 3	19	10	105
P78347	General transcription factor II-I (GTFII-I)	18	10	955.252
P31930	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein	18	10	1.593.168
Q14764	Major vault protein (MVP)	18	10	1.086.719
P21249	Major antigen	18	10	820.407
P34897	Serine hydroxymethyltransferase-mitochondrial	20	10	1.452.344
P29401	Transketolase	28	10	2.668.078
P22695	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein	18	10	1.664.049
Q01813	6-phosphofructokinase-type C	19	10	1.541.362
P29742	Clathrin heavy chain	28	9	1.613.252
O23755	Elongation factor 2 (EF-2)	18	9	1.068.907
O75694	Nuclear pore complex protein Nup155	12	9	656.126
P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-like NUK-34	14	9	975.054
P30084	Enoyl-CoA hydratase-mitochondrial precursor	15	9	1.307.591
P10253	Lysosomal alpha-glucosidase precursor	15	9	909.939
P13928	Annexin A8 (Annexin VIII)	14	9	1.149.308
Q9UKX3	Myosin heavy chain-skeletal muscle-extraocular	32	9	1.682.062
P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosin	16	9	908.857
Q06210	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	14	9	690.507
P51659	Estradiol 17 beta-dehydrogenase 4	23	9	1.378.368
P12956	ATP-dependent DNA helicase II-70 kDa subunit	17	9	1.448.478
P13639	Elongation factor 2 (EF-2)	37	9	3.033.964

P21399	Iron-responsive element binding protein 1	15	9	733.444
P05659	Myosin II heavy chain-non muscle	16	9	938.016
P15121	Aldose reductase	24	9	2.436.275
P30041	Antioxidant protein 2 (1-Cys peroxiredoxin)	15	9	1.454.618
P48637	Glutathione synthetase	15	9	986.954
P23588	Eukaryotic translation initiation factor 4B	15	9	802.012
P30153	Serine/threonine protein phosphatase 2A-65 KDA	14	9	925.812
P50416	Carnitine O-palmitoyltransferase I-mitochondrial	22	9	1.346.154
P08964	Myosin-1 isoform (Type II myosin)	28	9	1.562.991
P19096	Fatty acid synthase	11	9	643.907
P26006	Integrin alpha-3 precursor (Galactoprotein B3)	19	9	1.239.405
P41653	Hypothetical 244.6 kDa protein ycf2	11	9	571.321
Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4	11	9	796.724
P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase-mitochondrial	13	9	1.144.684
Q02455	Myosin-like protein MLP1	17	9	891.793
O14157	Myosin type II heavy chain 2	27	9	1.571.759
P16991	Nuclease sensitive element binding protein 1	12	8	908.304
P26640	Valyl-tRNA synthetase 2	14	8	772.039
P49321	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	12	8	605.478
P48047	ATP synthase oligomycin sensitivity conferral prot	10	8	974.945
P55809	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme transferase-mitochondrial A	17	8	1.395.667
P41091	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit	14	8	816.049
Q9NZN4	EH-domain containing protein 2	12	8	775.054
P25205	DNA replication licensing factor MCM3	10	8	451.513
Q16881	Thioredoxin reductase	18	8	1.472.269
Q15029	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	15	8	798.644

	compone			
O95831	Programed cell death protein 8-mitochondrial	18	8	113.019
P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase-cytoplasmic	24	8	1.517.634
P35232	Prohibitin	11	8	960.723
O00159	Myosin Ic (Myosin I beta) (MMI-beta)	23	8	1.452.468
P15559	NAD(P)H dehydrogenase	8	8	567.692
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	21	8	1.920.722
Q03252	Lamin B2	27	8	1.664.182
P49241	40S ribosomal protein S3A	15	8	1.297.705
P49411	Elongation factor Tu-mitochondrial precursor	28	8	288.519
P07237	Protein disulfide isomerase precursor (PDI)	30	8	2.758.698
Q15233	54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein	17	8	1.105.557
P49419	Antiquitin	14	8	86.706
P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	13	8	922.573
P04406	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-liver	27	8	2.627.434
Q92499	ATP-dependent helicase DDX1 (DEAD-box protein 1)	13	8	685.996
P35606	Coatomer beta'subunit	22	8	1.283.588
P23526	Adenosylhomocysteinase	17	8	1.291.175
P14105	Myosin heavy chain-nonmuscle	77	8	5.928.243
P07339	Cathepsin D precursor	22	8	1.453.436
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	13	8	970.769
P05787	Keratin_ type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin 8)	41	8	4.330.768
Q05682	Caldesmon (CDM)	17	8	911.253
P43155	Carnitine O-acetyltransferase	20	8	1.425.919
P37802	Transgelin 2 (SM22-alpha homolog)	13	8	1.248.972
Q13268	HEP27 protein (Protein D)	10	8	99.168
P32322	Pyrroline-5-carboxylate reductase	11	8	941.366

Q15155	Protein pM5 precursor	12	8	655.001
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	33	8	235.242
O60568	Procollagen-lysine-2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	9	8	574.138
P36957	Dihydrolipoamide succinyltransferase component of	12	8	589.611
P40121	Macrophage capping protein (Actin-regulatory protein)	10	8	698.848
P21613	Kinesin heavy chain	14	8	737.339
Q9D952	Envoplakin (p210) (210 kDa cornified envelope precursor)	19	8	845.873
P21397	Amine oxidase [flavin-containing] A	18	8	1.540.085
P00367	Glutamate dehydrogenase 1-mitochondrial precursor	28	8	3.359.317
Q9Y2Q3	Glutathione S-transferase-mitochondrial	12	8	891.719
Q13423	NAD(P) transhydrogenase-mitochondrial precursor	40	8	3.664.116
P27816	Microtubule-associated protein 4 (MAP 4)	16	7	890.272
O95433	Protein C14orf3 (Protein HSPC322)	9	7	539.627
P07737	Profilin I	10	7	1.031.791
P54136	Arginyl-tRNA synthetase	16	7	889.699
P35222	Beta-catenin	8	7	439.866
P35613	Basigin precursor	7	7	519.186
O75521	Peroxisomal 3-2-trans-enoyl-CoA isomerase	9	7	614.586
P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	19	7	1.388.154
Q9PI30	DNA-directed RNA polymerase beta'chain	10	7	478.476
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	49	7	4.186.538
P50502	Hsc70-interacting protein (Hip)	8	7	606.132
P07602	Proactivator polypeptide precursor	17	7	1.281.133
Q14247	Src substrate cortactin (Amplixin) (Oncogene EMS1)	20	7	139.684

O60664	Cargo selection protein TIP47 (47 kDa mannose 6-ph	10	7	578.423
P52292	Importin alpha-2 subunit	9	7	543.068
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	19	7	1.603.978
Q05944	Heat shock 70 kDa protein.	21	7	1.861.714
Q11102	Hypothetical 131.5 kDa protein C02F12.7 in chromos	9	7	535.477
P25786	Proteasome subunit alpha type 1	10	7	675.425
P28799	Granulins precursor (Acrogranin)	8	7	601.864
P40925	Malate dehydrogenase-cytoplasmic	10	7	728.738
Q15019	Septin 2 (NEDD5 protein homolog)	11	7	856.178
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II	12	7	1.043.481
P42126	3_2-trans-enoyl-CoA isomerase-mitochondrial precu	9	7	607.387
P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	10	7	608.065
P09211	Glutathione S-transferase P	15	7	1.495.678
Q02952	A-kinase anchor protein 12	13	7	662.162
O60716	Catenin delta-1 (p120 catenin) (p120(ctn))	12	7	629.676
P18669	Phosphoglycerate mutase_ brain form	13	7	1.221.612
P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosy	8	7	534.373
Q9XHR2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	13	7	586.779
P24539	ATP synthase B chain-mitochondrial precursor	12	7	846.333
Q90705	Elongation factor 2 (EF-2)	33	7	226.121
O60282	Kinesin heavy chain isoform 5C	13	7	633.048
Q12931	Heat shock protein 75 kDa-mitochondrial precursor	26	7	2.029.239
P41250	Glycyl-tRNA synthetase	13	7	702.299
P42765	3-ketoacyl-CoA thiolase-mitochondrial	12	7	729.038
P06733	Alpha enolase	32	7	3.079.399

P26641	Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	15	7	1.162.422
O55131	Septin 7 (CDC10 protein homolog)	11	7	866.801
P13804	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit-mitochondri	15	7	1.331.668
P36871	Phosphoglucomutase	11	7	759.499
O15061	Desmuslin	15	7	891.865
P02567	Myosin heavy chain D (MHC D)	15	7	763.174
Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma	15	7	869.622
P32119	Peroxioredoxin 2 (Thioredoxin peroxidase 1)	11	7	887.931
P35016	Endoplasmin homolog precursor (GRP94 homolog)	17	7	1.005.316
P00735	Prothrombin precursor	10	7	630.227
P39019	40S ribosomal protein S19	11	7	774.433
P30101	Protein disulfide isomerase A3 precursor	34	7	2.900.671
Q07955	Splicing factor_ arginine/serine-rich 1	10	7	677.146
P16152	Carbonyl reductase	12	7	928.593
Q00341	Vigilin (High density lipoprotein-binding protein)	15	7	771.338
P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	9	6	517.738
P34062	Proteasome subunit alpha type 6	9	6	607.714
P24733	Myosin heavy chain-striated muscle	11	6	518.412
P78406	mRNA-associated protein mrnp 41 (RAE1 protein homo	9	6	537.631
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit-mitochondrial	19	6	1.194.873
Q14974	Importin beta-1 subunit	12	6	771.035
Q15942	Zyxin (Zyxin 2)	9	6	607.748
P04083	Annexin I (Lipocortin I) (Calpactin II)	18	6	1.672.998
P11310	Acyl-CoA dehydrogenase-medium-chain specific- mitochondrial	11	6	739.196
O00299	Chloride intracellular channel protein 1	9	6	683.651



P22234	Multifunctional protein ADE2	12	6	737.676
P34574	Probable clathrin heavy chain	12	6	58.682
P47897	Glutaminyl-tRNA synthetase	11	6	622.685
P24821	Tenascin precursor (TN) (Hexabrachion)	11	6	632.829
P04765	Eukaryotic initiation factor 4A-I (eIF-4A-I)	19	6	1.602.955
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein	12	6	90.655
P14565	Tral protein (DNA helicase I)	11	6	440.073
P55265	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	15	6	688.224
P09058	40S ribosomal protein S8	6	6	458.135
O19048	Poly(rC)-binding protein 1 (Alpha-CP1) (hnRNP-E1)	13	6	999.416
P27348	14-3-3 protein tau (14-3-3 protein theta)	15	6	1.321.525
P16070	CD44 antigen precursor (Phagocytic glycoprotein I)	10	6	703.622
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	16	6	963.418
P13489	Placental ribonuclease inhibitor	8	6	509.299
O13683	Hypothetical 143.0 kDa protein	7	6	341.514
Q15084	Protein disulfide isomerase A6 precursor	15	6	101.369
P95647	60 kDa chaperonin 2 (Protein Cpn60 2)	7	6	344.931
O75533	Splicing factor 3B subunit 1	18	6	920.901
P35908	Keratin-type II cytoskeletal 2 epidermal	15	6	1.160.089
Q9Y263	Phospholipase A-2-activating protein (PLAP)	6	6	33.117
Q99460	26S proteasome regulatory subunit S1	6	6	375.833
Q14259	Enhancer of rudimentary homolog	6	6	583.072
Q14157	Hypothetical protein KIAA0144	7	6	375.802
Q99439	Calponin H2_ smooth muscle (Neutral calponin)	7	6	465.968
P00938	Triosephosphate isomerase	17	6	2.173.794
P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor (Fetuin-A)	10	6	961.285

P35214	14-3-3 protein gamma (Protein kinase C inhibitor protein)	17	6	1.582.721
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	13	6	788.844
Q9UHG3	Prenylcysteine lyase precursor	10	6	767.105
P19012	Keratin-type I cytoskeletal 15 (Cytokeratin 15)	16	6	1.288.692
Q63009	Protein arginine N-methyltransferase 1	9	6	582.834
P30046	D-dopachrome tautomerase	7	6	464.573
P35287	Ras-related protein Rab-14	10	6	826.969
Q92355	Hypothetical 192.5 kDa protein C6G9.10C in chromos	13	6	638.201
P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosy	6	6	399.177
P27641	ATP-dependent DNA helicase II-80 kDa subunit	10	6	521.701
P20061	Transcobalamin I precursor (TCI)	6	6	354.856
P12861	Heat shock protein 83	12	6	913.522
P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	6	6	654.857
P28838	Cytosol aminopeptidase	7	6	396.063
P04181	Ornithine aminotransferase- mitochondrial precursor	8	6	511.647
P27176	RNA-directed RNA polymerase	9	6	383.042
P05091	Aldehyde dehydrogenase-mitochondrial precursor	21	6	1.614.416
O15142	Actin-like protein 2 (Actin-related protein 2)	8	6	560.444
P22359	Chaperone protein htpG (Heat shock protein htpG)	7	6	340.579
P27190	DNA primase traC	8	6	385.848
P58238	Proteasome activator complex subunit 1	8	6	505.999
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	8	6	631.017
P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	9	6	680.206
P22314	Ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9 protein)	31	6	2.033.833

Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase-mitochondrial protein	9	6	555.026
P12814	Alpha-actinin 1	42	6	3.839.268
P05556	Integrin beta-1 precursor	26	6	1.892.049
P21912	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein	9	6	609.602
P23193	Transcription elongation factor S-II	10	6	650.409
P23152	Splicing factor_ arginine/serine-rich 3	9	6	569.372
P30043	Flavin reductase	8	6	548.737
P08237	6-phosphofructokinase-muscle type	8	6	452.372
P07099	Epoxide hydrolase 1	8	6	585.997
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	28	6	1.469.998
P05198	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit	9	6	557.168
Q13011	Delta3-5-delta2-4-dienoyl-CoA isomerase-mitochondrial	8	6	551.867
P34955	Alpha-1-antiproteinase precursor	9	6	546.424
P00387	NADH-cytochrome B5 reductase	7	6	549.008
P08133	Annexin VI (Lipocortin VI)	24	6	1.528.736
Q92804	TATA-binding protein associated factor 2N	9	6	565.931
Q16401	26S proteasome subunit S5B	8	6	440.739
P21291	Cysteine-rich protein 1 (CRP1)	8	6	709.717
Q10567	Adapter-related protein complex 1 beta 1 subunit	25	5	1.461.259
P23358	60S ribosomal protein L12	7	5	67.588
P20810	Calpain inhibitor (Calpastatin)	8	5	42.463
O75390	Citrate synthase-mitochondrial precursor	11	5	832.251
O00469	Procollagen-lysine-2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	7	5	450.477
P40926	Malate dehydrogenase-mitochondrial precursor	22	5	2.101.774
Q99798	Aconitate hydratase-mitochondrial precursor	25	5	1.782.529

P17987	T-complex protein 1-alpha subunit (TCP-1-alpha)	21	5	1.692.351
P55084	Trifunctional enzyme beta subunit-mitochondrial p	23	5	178.805
Q9UBR2	Cathepsin Z precursor	9	5	706.719
Q14126	Desmoglein 2 precursor (HDGC)	6	5	308.097
P36189	Fatty acid synthase	8	5	64.098
P26196	Probable ATP-dependent RNA helicase p54	6	5	321.107
P37039	NADPH-cytochrome P450 reductase	15	5	868.636
Q04984	10 kDa heat shock protein-mitochondrial (Hsp10)	13	5	1.100.314
P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	8	5	642.358
P11576	14-3-3 protein eta	12	5	984.239
O60437	Periplakin (195 kDa cornified envelope precursor)	22	5	1.118.669
P42330	Probable trans-1-2-dihydrobenzene-1-2-diol dehydro	12	5	782.484
P43121	Cell surface glycoprotein MUC18 precursor	7	5	421.288
P14868	Aspartyl-tRNA synthetase	21	5	1.236.157
P43897	Elongation factor Ts-mitochondrial precursor	5	5	317.682
P54727	UV excision repair protein RAD23 homolog B	6	5	462.952
P49189	Aldehyde dehydrogenase-E3 isozyme	9	5	569.842
P11137	Microtubule-associated protein 2 (MAP 2) (MAP2B)	23	5	1.383.448
P41832	BNI1 protein (Synthetic lethal 39)	14	5	716.465
P48725	Pericentrin	10	5	462.785
P14731	Lamin B1	24	5	1.578.402
Q07590	SAV protein	10	5	588.565
O95573	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	8	5	434.221
Q92598	Heat-shock protein 105 kDa	25	5	1.647.393

P21675	Transcription initiation factor TFIID 250 kDa subunit	6	5	296.247
P35900	Keratin_ type I cytoskeletal 20 (Cytokeratin 20)	10	5	554.318
P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	6	5	49.196
P22087	Fibrillarin (34 kDa nucleolar scleroderma antigen)	10	5	678.193
P43490	Pre-B cell enhancing factor precursor	10	5	830.387
P01024	Complement C3 precursor	10	5	559.399
P25388	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit	15	5	1.351.415
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein-mitochondrial	6	5	668.713
O13287	6-phosphogluconate dehydrogenase-decarboxylating	11	5	574.867
P56959	RNA-binding protein FUS (Pigpen protein)	10	5	859.352
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	15	5	1.348.251
P29358	14-3-3 protein beta/alpha	15	5	1.370.968
Q92105	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase	13	5	695.685
P29692	Elongation factor 1-delta	14	5	1.140.511
O51578	Exodeoxyribonuclease V beta chain	10	5	541.506
O75746	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aral	13	5	791.288
Q92973	Importin beta-2 subunit	6	5	326.491
P13647	Keratin_ type II cytoskeletal 5 (Cytokeratin 5)	24	5	2.012.982
P11216	Glycogen phosphorylase-brain form	14	5	820.361
P18754	Regulator of chromosome condensation	10	5	626.297
P54651	Heat shock cognate 90 kDa protein	12	5	837.025
P12532	Creatine kinase-ubiquitous mitochondrial precursor	8	5	508.087
P18708	Vesicular-fusion protein NSF	12	5	622.537
P36542	ATP synthase gamma chain-mitochondrial precursor	12	5	861.225

P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase-decarboxylating	11	5	704.432
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 (P195)	27	5	1.678.854
P28072	Proteasome subunit beta type 6 precursor	6	5	385.135
P29312	14-3-3 protein zeta/delta	17	5	1.681.137
P05067	Alzheimer's disease amyloid A4 protein precursor	13	5	808.467
O43776	Asparaginyl-tRNA synthetase-cytoplasmic	11	5	762.679
Q10713	Mitochondrial processing peptidase alpha subunit	8	5	462.815
Q14978	Nucleolar phosphoprotein p130	8	5	444.794
Q15459	Splicing factor 3 subunit 1	12	5	675.386
P12830	Epithelial-cadherin precursor (E-cadherin)	7	5	467.216
P48449	Lanosterol synthase	9	5	575.113
P39027	40S ribosomal protein S15a	9	5	686.205
Q9HAV7	GrpE protein homolog 1-mitochondrial precursor	7	5	465.622
Q13310	Polyadenylate-binding protein 4	19	5	1.140.125
P53590	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain-mitochondrial	9	5	514.749
P07226	Tropomyosin-fibroblast non-muscle type	19	5	1.601.066
P14927	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 kDa pr	6	5	441.708
P51649	Succinate semialdehyde dehydrogenase-mitochondrial	10	5	642.297
P50402	Emerin	5	5	318.168
Q9Y678	Coatomer gamma subunit (Gamma-coat protein)	11	5	599.173
Q9H4M9	EH-domain containing protein 1 (Testilin) (hPAST1)	11	5	55.87
P10668	Cofilin-non-muscle isoform	12	5	1.180.719
P54819	Adenylate kinase isoenzyme 2- mitochondrial	11	5	895.129
P13624	Signal recognition particle 54 kDa protein	9	5	463.821

	(SRP54)			
P46781	40S ribosomal protein S9	6	5	361.357
P11799	Myosin light chain kinase-smooth muscle	7	5	357.397
P46405	40S ribosomal protein S12	6	5	500.218
P79136	F-actin capping protein beta subunit (CAPZ beta)	8	5	702.328
P14314	Protein kinase C substrate-80 kDa protein-heavy	20	5	1.474.867
P51648	Fatty aldehyde dehydrogenase	8	5	450.577
O42184	Restin (Cytoplasmic linker protein-170) (CLIP-170)	17	5	790.005
P02468	Laminin gamma-1 chain precursor	17	5	1.039.658
P25120	60S ribosomal protein L8	6	5	535.133
Q12874	Splicing factor 3A subunit 3	7	5	36.875
P49755	Transmembrane protein Tmp21 precursor	5	4	319.646
P50895	Lutheran blood group glycoprotein precursor	6	4	358.559
P19367	Hexokinase-type I	30	4	2.366.122
Q9PHZ3	Chaperone protein htpG (Heat shock protein htpG)	8	4	527.329
P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	6	4	44.278
P27715	Phorbol ester/diacylglycerol-binding protein	4	4	189.793
P56537	Eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF-6)	6	4	462.225
P11055	Myosin heavy chain-fast skeletal muscle-embryonic	25	4	1.367.522
P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	15	4	1.222.876
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	12	4	939.125
O14773	Tripeptidyl-peptidase I precursor	6	4	296.832
P35998	26S protease regulatory subunit 7 (MSS1 protein)	11	4	695.048
O15067	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	6	4	298.975
P00491	Purine nucleoside phosphorylase	6	4	370.752
P06737	Glycogen phosphorylase-liver form	12	4	606.076

P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein	5	4	431.299
P16394	Heat shock 70 kDa protein	13	4	1.239.837
P01252	Prothymosin alpha	6	4	492.011
Q01202	Paramyosin	8	4	376.873
P07384	Calpain 1-large [catalytic] subunit	14	4	82.104
P52943	Cysteine-rich protein 2 (CRP2) (ESP1 protein)	6	4	530.786
P33993	DNA replication licensing factor MCM7	8	4	431.752
Q00765	Polyposis locus protein 1 (TB2 protein)	5	4	332.943
Q9Y3E5	Hypothetical protein CGI-147.	4	4	317.002
P49609	Aconitate hydratase_ mitochondrial precursor	8	4	48.294
P00403	Cytochrome c oxidase polypeptide II	6	4	402.289
P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1	5	4	445.651
P02578	Actin 1	24	4	2.140.463
P51148	Ras-related protein Rab-5C (RAB5L) (L1880)	8	4	583.188
Q14203	Dynactin 1 (150 kDa dynein-associated polypeptide)	6	4	287.029
P53992	Protein transport protein Sec24C	12	4	707.998
P24534	Elongation factor 1-beta (EF-1-beta)	5	4	391.282
P21964	Catechol O-methyltransferase-membrane-bound form	5	4	295.686
P10515	Dihydrolipoamide acetyltransferase	11	4	693.353
P23116	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	30	4	1.393.532
P20700	Lamin B1	30	4	2.261.055
P04643	40S ribosomal protein S11	5	4	344.971
P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulation	6	4	280.745
O17071	Probable 26S protease regulatory subunit S10B	6	4	313.332
P43815	Alanyl-tRNA synthetase	13	4	529.504
Q9WUM3	Coronin 1B (Coronin 2)	6	4	327.666



O08638	Myosin heavy chain-smooth muscle isoform (SMMHC).	35	4	2.359.326
P11498	Pyruvate carboxylase-mitochondrial precursor	11	4	63.735
P51968	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 homolog	11	4	798.015
P15170	G1 to S phase transition protein 1 homolog	6	4	318.922
O75439	Mitochondrial processing peptidase beta subunit	11	4	710.057
P20290	Transcription factor BTF3	4	4	353.972
P35978	Kinesin heavy chain	13	4	67.738
O60313	Dynamin-like 120 kDa protein-mitochondrial precursor	13	4	645.741
P25788	Proteasome subunit alpha type 3	10	4	694.065
P50533	Chromosome assembly protein XCAP-E	5	4	249.216
P04645	60S ribosomal protein L30	8	4	628.464
P22307	Nonspecific lipid-transfer protein-mitochondrial	13	4	798.795
Q13510	Acid ceramidase precursor	6	4	343.263
P13662	Nuclear transport factor 2 (NTF-2)	5	4	470.359
P27595	Hexokinase-type I	27	4	1.858.054
P09661	U2 small nuclear ribonucleoprotein A	6	4	350.127
O43681	Arsenical pump-driving ATPase	4	4	255.904
Q99426	Tubulin-specific chaperone B	5	4	300.649
Q92743	Serine protease HTRA1 precursor	6	4	36.602
P17220	Proteasome subunit alpha type 2	4	4	271.819
P04720	Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	25	4	2.090.146
Q15428	Splicing factor 3A subunit 2	6	4	345.894
P10587	Myosin heavy chain-gizzard smooth muscle.	33	4	2.091.027
O14408	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase	6	4	277.271
P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional	11	4	945.405
Q14566	DNA replication licensing factor MCM6	13	4	746.946

Q04760	Lactoylglutathione lyase	5	4	372.715
P09960	Leukotriene A-4 hydrolase	6	4	347.667
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	4	4	441.971
P11021	78 kDa glucose-regulated protein precursor	34	4	3.971.828
Q92947	Glutaryl-CoA dehydrogenase-mitochondrial precursor	4	4	227.758
Q64252	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	5	4	29.619
P08473	Neprilysin	13	4	860.109
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicas	6	4	298.521
P13648	Lamin A	28	4	2.302.045
Q10947	Hypothetical 139.9 kDa protein B0361.3 in chromosom	8	4	378.464
P34896	Serine hydroxymethyltransferase-cytosolic	5	4	284.155
P00533	Epidermal growth factor receptor precursor	6	4	334.857
P13668	Stathmin (Phosphoprotein p19) (pp19)	10	4	907.508
O00151	PDZ and LIM domain protein 1	8	4	615.106
P00737	Haptoglobin-1 precursor	7	4	445.743
P09527	Ras-related protein Rab-7	16	4	1.230.694
P31696	Agrin precursor	9	4	367.458
P18827	Syndecan-1 precursor (SYND1) (CD138 antigen)	5	4	346.397
P52907	F-actin capping protein alpha-1 subunit	7	4	463.524
P16546	Spectrin alpha chain-brain	7	4	397.864
Q9KE51	Chaperone protein htpG (Heat shock protein htpG)	6	4	375.402
Q28275	Fibronectin (FN) (Fragment)	5	4	283.605
O02192	Heat shock protein 83 (HSP 82)	17	4	1.446.728
P24724	Heat shock protein 90 (HSP90)	16	4	1.094.629
P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase	9	4	507.855

Q15436	Protein transport protein Sec23A	9	4	562.694
P49368	T-complex protein 1-gamma subunit (TCP-1-gamma)	16	4	1.184.761
P35421	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	5	4	290.671
P08778	Keratin-type I cytoskeletal 47 kDa	9	4	489.005
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	17	4	1.156.517
P33992	DNA replication licensing factor MCM5	4	4	206.009
P54578	Queuine tRNA-ribosyltransferase	9	4	591.487
P46869	Kinesin-like protein FLA10 (KHP1 protein)	8	4	353.217
Q9Y6M9	NADH-ubiquinone oxidoreductase B22 subunit	4	4	229.054
P02722	ADP-ATP carrier protein_ heart isoform T1	17	4	1.123.758
P50914	60S ribosomal protein L14 (CAG-ISL 7)	5	4	264.662
O84641	Transcription elongation factor	7	4	292.264
P49256	Vesicular integral-membrane protein VIP36 precursor	8	4	437.233
P36422	Isoleucyl-tRNA synthetase	4	4	18.726
P21926	CD9 antigen (P24) (Leukocyte antigen MIC3)	4	4	272.666
P26043	Radixin	16	4	1.335.663
O94826	Mitochondrial precursor proteins import receptor	16	4	985.464
P16106	Histone	9	4	616.479
P00390	Glutathione reductase-mitochondrial precursor	7	4	385.323
Q13153	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	5	4	276.736
Q9Z1E9	Golgi apparatus protein 1 precursor	22	4	1.109.563
P10155	60-kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	7	4	30.692
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	42	4	4.237.134
Q9Y5S9	RNA-binding protein 8	4	4	25.361
Q9UG63	ATP-binding cassette-sub-family F-member 2	7	4	418.217
P13135	Calcium-dependent protease-small subunit	7	4	45.824

P12845	Myosin heavy chain C (MHC C)	9	4	425.425
P09010	Lamin L	18	4	1.175.878
P52709	Probable threonyl-tRNA synthetase-cytoplasmic	9	4	470.296
P46664	Adenylosuccinate synthetase-non-muscle isozyme	5	4	229.379
Q15257	Protein phosphatase 2A- regulatory subunit B'	5	4	246.667
O35501	Stress-70 protein-mitochondrial precursor	45	4	4.034.481
Q14956	Putative transmembrane protein NMB precursor	5	4	251.032
Q15181	Inorganic pyrophosphatase	7	4	515.861
P38646	Stress-70 protein-mitochondrial precursor	45	4	4.261.665
P53675	Clathrin heavy chain 2 (CLH-22)	18	4	1.279.655
Q9WY22	Primosomal protein N' (Replication factor Y)	6	4	33.057
Q01844	RNA-binding protein EWS	10	4	670.642
P37399	ATP synthase beta chain-mitochondrial precursor	7	4	535.655
Q9BXP5	Arsenite-resistance protein 2	9	4	479.371
P51572	B-cell receptor-associated protein 31	7	4	450.875
P05165	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain-mitochondrial	7	4	358.236
P55327	Tumor protein D52 (N8 protein)	7	4	476.508
P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase precursor	7	4	443.353
P28894	Fumarate hydratase C	5	4	301.072
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2 (EF-1-alpha-2)	17	4	1.549.018
P46150	Moesin/ezrin/radixin homolog (D17 protein)	9	4	495.729
O15320	Meningioma-expressed antigen 6/11	5	4	238.382
P24789	Vimentins 1 and 2	20	4	1.428.304
Q60301	Hypothetical protein MJECS02	9	4	471.965
P17140	Collagen alpha 2(IV) chain precursor	9	4	406.253
O15144	ARP2/3 complex 34 kDa subunit (P34-ARC)	5	4	293.098

P46561	Probable ATP synthase beta chain-mitochondrial	15	4	1.189.096
P40340	TAT-binding homolog 7	7	4	346.898
P16475	Myosin light chain alkali-non-muscle isoform	8	4	737.869
P15690	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit-mitochondrial	15	4	1.019.694
P14618	Pyruvate kinase-M1 isozyme	39	4	3.824.325
P48643	T-complex protein 1-epsilon subunit	15	4	99.595
O75531	Barrier-to-autointegration factor	4	4	283.044
P30040	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	10	4	813.013
P40227	T-complex protein 1-zeta subunit (TCP-1-zeta)	15	4	1.065.566
P49736	DNA replication licensing factor MCM2	10	4	551.493
Q92524	26S protease regulatory subunit S10B	7	4	43.697
P27708	CAD protein	15	4	834.202
O75367	Core histone macro-H2A.1 (Histone macroH2A1)	4	4	243.844
P16989	DNA-binding protein A	9	4	583.029
P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	10	4	846.625
P30837	Aldehyde dehydrogenase X-mitochondrial precursor	10	4	677.027
P54996	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	7	4	396.133
Q60649	SKD3 protein	5	4	237.205
P34537	Hypothetical 97.1 kDa protein R05D3.4 in chromosom	7	4	397.351
O15372	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	8	4	433.525
Q05866	78 kDa glucose-regulated protein homolog precursor	6	4	346.071
P43331	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	4	4	286.589
P36290	Genome polyprotein	6	4	289.722
P47583	DNA-directed RNA polymerase beta chain	7	4	340.791
P10619	Lysosomal protective protein precursor	7	3	393.826

P17545	DNA-directed RNA polymerase II largest subunit	11	3	507.005
P47813	Eukaryotic translation initiation factor 1A	4	3	254.991
P25375	Saccharolysin	7	3	331.823
O95816	BAG-family molecular chaperone regulator-2	4	3	235.347
P49753	Peroxisomal acyl-coenzyme A thioester hydrolase 2	4	3	219.847
P43686	26S protease regulatory subunit 6B	4	3	230.136
P23131	60S ribosomal protein L23 (L17)	4	3	306.311
P53451	T-complex protein 1_ delta subunit (TCP-1-delta)	10	3	550.559
P47985	Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit	8	3	550.265
P70288	Histone deacetylase 2 (HD2) (YY1 transcription factor)	8	3	54.684
O43399	Tumor protein D54	8	3	669.809
P20951	RNA replication protein (176 kDa protein)	6	3	232.922
Q9BPW8	NipSnap1 protein	7	3	406.639
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP)	10	3	748.316
Q99613	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	7	3	398.299
Q01581	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase-cytoplasmic	7	3	444.001
Q08170	Splicing factor- arginine/serine-rich 4	9	3	503.502
Q14839	Chromodomain helicase-DNA-binding protein 4	9	3	407.669
P12576	RNA polymerase beta subunit	8	3	364.478
Q99KV1	DnaJ homolog subfamily B member 11 precursor	6	3	324.053
Q9UUE2	Protein csx2	4	3	159.974
P17922	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	3	3	140.779
P52758	14.5 kDa translational inhibitor protein	4	3	294.999
P17077	60S ribosomal protein L9	4	3	295.386

P08515	Glutathione S-transferase 26 kDa	4	3	248.742
P49649	Preprotein translocase secA subunit	7	3	342.242
P45973	Chromobox protein homolog 5	4	3	177.895
Q07812	Apoptosis regulator BAX-membrane isoform alpha	4	3	281.559
P31937	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-mitochondrial	9	3	671.041
P11387	DNA topoisomerase I	8	3	432.008
P17080	GTP-binding nuclear protein RAN (TC4) (Ran GTPase)	11	3	91.354
Q99615	DnaJ homolog subfamily C member 7	4	3	188.632
P34455	Probable aconitate hydratase-mitochondrial precur	8	3	374.802
Q15691	Microtubule-associated protein RP/EB family member	9	3	634.652
Q9Y277	Voltage-dependent anion-selective channel protein	11	3	776.618
P23229	Integrin alpha-6 precursor (VLA-6)	11	3	554.984
P45878	FK506-binding protein precursor (FKBP-13)	4	3	258.279
Q15654	Thyroid receptor interacting protein 6	3	3	162.039
P29398	DNA-directed RNA polymerase beta chain	4	3	193.612
P37880	Arginyl-tRNA synthetase	10	3	538.661
Q92376	Kinesin-like protein 1	6	3	345.308
P12004	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Cyclin)	12	3	881.201
P32391	Actin-like protein 3 (Actin-related protein 3)	11	3	817.322
P30044	Putative peroxisomal antioxidant enzyme (PLP)	6	3	507.126
P45357	Heme/hemopexin utilization protein C precursor	4	3	136.281
P38205	Putative methyltransferase NCL1	7	3	366.611
P46060	Ran-GTPase activating protein 1	8	3	425.519
Q13630	GDP-fucose synthetase	6	3	329.689

Q13247	Splicing factor-arginine/serine-rich 6	9	3	463.739
P80724	Brain acid soluble protein 1 (BASP1 protein)	6	3	391.781
Q15437	Protein transport protein Sec23B	4	3	221.907
P43330	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	6	3	411.671
O67125	DNA polymerase III alpha subunit	8	3	379.844
P34991	Cyclin A/CDK2-associated protein p19	5	3	339.822
P04062	Glucosylceramidase precursor	8	3	469.331
O43396	Thioredoxin-like protein	4	3	256.254
O35156	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase 1	4	3	227.715
P05712	Ras-related protein Rab-2	8	3	564.097
P51375	Ferredoxin-dependent glutamate synthase	4	3	178.943
Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	4	3	198.014
Q24368	Iswi protein (Imitation swi protein)	7	3	374.166
P40457	Hypothetical 195.1 kDa protein in DNA43-UBI1 inter	6	3	28.549
P13693	Translationally controlled tumor protein (TCTP)	4	3	340.605
P17931	Galectin-3 (Galactose-specific lectin 3)	6	3	353.569
O75380	NADH-ubiquinone oxidoreductase 13 kDa-A subunit	4	3	261.089
Q06968	Flagellin	4	3	18.89
Q9UZC8	DNA double-strand break repair rad50 ATPase	6	3	246.836
P52434	DNA-directed RNA polymerases I-II-and III	4	3	225.211
P10486	Type I restriction enzyme EcoR124II R protein	8	3	383.911
Q16629	Splicing factor-arginine/serine-rich 7	8	3	58.514
O60361	Putative nucleoside diphosphate kinase	10	3	728.242
Q9PB05	Chaperone protein dnaK (Heat shock protein 70)	7	3	606.881
Q9EQB9	Zinc finger protein ZNF287	4	3	247.491
Q08046	Elongation factor 1-alpha	6	3	360.674



Q00796	Sorbitol dehydrogenase	4	3	225.128
P53007	Tricarboxylate transport protein-mitochondrial protein	8	3	607.573
P55145	Arginine-rich protein	9	3	495.451
Q13442	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	4	3	254.786
O43278	Kunitz-type protease inhibitor 1 precursor	4	3	196.426
P33991	DNA replication licensing factor MCM4	9	3	522.336
Q13428	Treacle protein	7	3	399.848
P56836	Chaperone protein dnaK (Heat shock protein 70)	7	3	36.493
Q15293	Reticulocalbin 1 precursor	9	3	692.607
P21189	DNA polymerase II	6	3	231.441
P49020	Cop-coated vesicle membrane protein p24 precursor	4	3	26.017
P12035	Keratin_type II cytoskeletal 3 (Cytokeratin 3)	9	3	762.783
Q10701	Probable helicase helY	7	3	290.923
Q45388	TEX protein	4	3	160.096
P23786	Carnitine O-palmitoyltransferase II-mitochondrial	7	3	331.641
O00217	NADH-ubiquinone oxidoreductase 23 kDa subunit	7	3	426.718
P46776	60S ribosomal protein L27A	4	3	265.966
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	10	3	780.825
O50288	ATP synthase alpha chain	8	3	603.307
Q28177	Phakinin (Beaded filament structural protein 2)	4	3	192.281
Q38676	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A isoform	7	3	330.857
Q9WZF8	Trigger factor (TF)	4	3	184.995
Q92597	NDRG1 protein	4	3	190.635
P43588	Proteasome regulatory subunit RPN11 (MPR1 protein)	7	3	334.497
P35658	Nuclear pore complex protein Nup214	4	3	197.742

P47547	Chaperone protein dnaK (Heat shock protein 70)	9	3	560.497
Q9UII2	ATPase inhibitor-mitochondrial precursor	7	3	397.618
P27730	Calpain	4	3	180.534
P17980	26S protease regulatory subunit 6A	8	3	401.752
P50897	Palmitoyl-protein thioesterase precursor	7	3	465.431
P70859	Flagellar hook-associated protein 1 (HAP1)	4	3	18.852
P56192	Methionyl-tRNA synthetase	4	3	211.838
O70736	DNA polymerase	4	3	19.61
O67762	DNA-directed RNA polymerase beta chain	8	3	361.322
P18031	Protein-tyrosine phosphatase-non-receptor type 1	10	3	59.919
P55735	SEC13-related protein	6	3	369.522
Q99805	Transmembrane 9 superfamily protein member 2 precursor	4	3	209.618
Q12263	Serine/threonine-protein kinase GIN4	4	3	129.076
Q9NZB2	Protein C9orf10	4	3	192.884
O67323	Alanyl-tRNA synthetase	8	3	290.337
Q9NR30	Nucleolar RNA helicase II	8	3	493.077
P05314	Ferredoxin--nitrite reductase-chloroplast precursor	3	3	142.756
O97680	Thioredoxin	3	3	317.847
P42655	14-3-3 protein epsilon	15	3	1.337.966
Q94738	97 kDa heat shock protein (Heat shock protein 110)	3	3	206.532
Q9KAC0	DNA mismatch repair protein mutS	5	3	237.877
Q9YAG3	Seryl-tRNA synthetase	5	3	223.953
Q28115	Glial fibrillary acidic protein-astrocyte (GFAP)	14	3	821.767
P48673	Vimentin beta	15	3	1.153.937
P00366	Glutamate dehydrogenase	23	3	2.187.087
P40261	Nicotinamide N-methyltransferase	3	3	208.821

O43684	Mitotic checkpoint protein BUB3	5	3	303.045
O95239	Chromosome-associated kinesin KIF4A	5	3	21.911
Q06193	Elongation factor 2 (EF-2)	5	3	276.732
Q08156	Mast/stem cell growth factor receptor precursor	5	3	218.232
P12749	60S ribosomal protein L26	5	3	319.447
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP]-mitochondrial precursor	22	3	1.712.073
P41753	Heat shock 70 kDa protein	15	3	1.173.116
Q03184	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming]	5	3	25.611
Q00688	Rapamycin-selective 25 kDa immunophilin (FKBP25)	5	3	245.662
O00571	DEAD-box protein 3 (Helicase-like protein 2)	22	3	1.447.931
P02827	Heat shock 70 kDa protein (HSP70)	15	3	1.397.704
P02651	Apolipoprotein A-IV precursor (Apo-AIV)	5	3	253.329
P97372	Proteasome activator complex subunit 2	5	3	302.833
P35239	Ras-related protein Rab-5B	5	3	352.645
P23514	Coatamer beta subunit (Beta-coat protein)	6	3	359.377
P16919	RhsD protein precursor	3	3	122.817
P23225	Ferredoxin-dependent glutamate	6	3	312.713
O95793	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog	6	3	344.349
Q45477	Isoleucyl-tRNA synthetase	6	3	253.294
P08106	Heat shock 70 kDa protein (HSP70)	26	3	2.522.103
Q01233	Heat shock 70 kDa protein (HSP70)	13	3	121.736
P40112	Proteasome subunit beta type 3	6	3	413.517
O23627	Glycyl-tRNA synthetase	6	3	300.857
Q63120	Canalicular multispecific organic anion transport	3	3	145.778
P49006	MARCKS-related protein	3	3	199.791

O75306	NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit-mitochondrial	6	3	346.558
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase-1	22	3	1.308.551
P16525	DNA replication terminus site-binding protein	3	3	147.575
P17655	Calpain 2-large [catalytic] subunit precursor	6	3	417.084
P48819	Vitronectin precursor (Serum spreading factor)	3	3	134.456
P21872	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosin	6	3	33.302
O15173	Membrane associated progesterone receptor componen	6	3	324.386
P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	4	3	239.935
P09203	Tubulin beta-1 chain	26	3	2.480.906
P05179	Cytochrome P450 2C7	3	3	155.305
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	15	3	1.400.003
P21266	Glutathione S-transferase Mu 3	3	3	176.893
P31691	ADP_ATP carrier protein-mitochondrial precursor	5	3	29.942
P31350	Ribonucleoside-diphosphate reductase M2 chain	6	3	312.151
P12429	Annexin III (Lipocortin III)	5	3	325.384
P13538	Myosin heavy chain-skeletal muscle-adult	22	3	1.237.811
O60841	Translation initiation factor IF-2	5	3	283.441
P00568	Adenylate kinase isoenzyme 1	5	3	310.847
O15027	Hypothetical protein KIAA0310	5	3	283.491
Q03247	Apolipoprotein E precursor (Apo-E)	3	3	157.188
O05069	Mu-like prophage FluMu transposase A	5	3	135.363
P14732	Lamin B2	19	3	1.118.197
P78332	RNA-binding protein 6 (RNA binding motif protein 6)	5	3	210.593
O61998	Heat shock protein 90	17	3	1.456.007
P20004	Aconitate hydratase-mitochondrial precursor	19	3	1.168.456

P97379	Ras-GTPase-activating protein binding protein 2	6	3	44.107
P16422	Tumor-associated calcium signal transducer 1 precursor	3	3	213.571
P20357	Microtubule-associated protein 2 (MAP 2)	19	3	1.100.409
P22059	Oxysterol-binding protein 1	5	3	269.952
Q27954	Coatomer alpha subunit (Alpha-coat protein)	18	3	972.064
Q07021	Complement component 1-Q subcomponent binding protein	6	3	422.401
P35875	Poly [ADP-ribose] polymerase	5	3	292.389
Q9AJ79	Antigenic heat-stable 120 kDa protein (PS120)	5	3	239.994
O75340	Programed cell death protein 6	5	3	323.718
P21910	Lamin L(II)	18	3	1.167.854
P54071	Isocitrate dehydrogenase [NADP]-mitochondrial precursor	18	3	1.375.431
P09622	Dihydrolipoamide dehydrogenase-mitochondrial precursor	18	3	1.283.383
Q9JLV1	BAG-family molecular chaperone regulator-3	6	3	317.592
Q9H1E3	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase	3	3	11.779
P20042	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit	5	3	292.913
Q97E05	Chaperone protein htpG (Heat shock protein htpG)	6	3	362.187
O02494	Eukaryotic initiation factor 4A	5	3	304.876
O95197	Reticulon protein 3	4	3	261.419
P13496	150 kDa dynein-associated polypeptide (DP-150)	3	3	150.394
O43291	Kunitz-type protease inhibitor 2 precursor	3	3	26.092
O43272	Proline oxidase-mitochondrial precursor	5	3	221.389
P04155	PS2 protein precursor (HP1.A)	3	3	238.285
P04264	Keratin_ type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1)	16	3	1.063.167
P53396	ATP-citrate (pro-S-)-lyase	21	3	145.64
P00505	Aspartate aminotransferase-mitochondrial	22	3	1.799.208

	precursor			
P08239	Guanine nucleotide-binding protein G(O)-alpha subunit	6	3	282.233
P36066	Hypothetical 54.4 kDa protein	3	3	132.185
Q60432	150 kDa oxygen-regulated protein precursor	22	3	1.668.885
P05141	ADP-ATP carrier protein-fibroblast isoform	16	3	1.334.881
P23456	RNA-directed RNA polymerase	5	3	23.892
P09653	Tubulin beta-5 chain (Beta-tubulin class-V)	18	3	1.607.079
Q9NYK5	Mitochondrial 60s ribosomal protein L39 (MRP-L39)	4	3	165.308
Q04695	Keratin_type I cytoskeletal 17 (Cytokeratin 17)	16	3	1.378.528
Q99020	CARG-binding factor-A (CBF-A)	5	3	472.128
P09467	Fructose-1-6-bisphosphatase	3	3	204.313
P17075	40S ribosomal protein S20	5	3	47.752
P50140	Chaperonin homolog HSP60-mitochondrial precursor	12	3	740.996
Q13561	Dynactin complex 50 kDa subunit	5	3	292.531
P21851	Adapter-related protein complex 2 beta 1 subunit	22	3	1.271.505
O43896	Kinesin-like protein KIF1C	5	3	24.364
P19028	POL polyprotein	3	3	148.555
P54812	Transitional endoplasmic reticulum ATPase homolog	14	3	868.199
O59787	Signal recognition particle 72 kDa protein homolog	4	3	17.48
P20674	Cytochrome c oxidase polypeptide VA-mitochondrial	7	3	383.321
P49257	ERGIC-53 protein precursor	12	3	695.072
O60763	General vesicular transport factor p115	12	3	697.178
O62768	Thioredoxin reductase	12	3	919.402
Q04595	PYRBI protein	3	3	15.095
P18091	Alpha-actinin-sarcomeric	12	3	713.684

P09790	IgA-specific serine endopeptidase precursor	6	3	281.108
O96008	Probable mitochondrial import receptor subunit	6	3	42.416
P05786	Keratin-type II cytoskeletal 8	28	3	2.621.255
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	6	3	416.131
Q9UIJ7	GTP:AMP phosphotransferase mitochondrial	12	3	841.211
Q46323	Excinuclease ABC subunit B	3	3	145.262
P11638	Quinic acid utilization activator	3	3	153.604
P48722	Osmotic stress protein 94	12	3	712.128
Q9Y3F4	UNR-interacting protein	6	3	389.306
Q09446	Hypothetical 92.8 kDa protein C04A2.7 in chromosom	3	3	148.465
Q08277	Heat shock protein 82	13	3	1.084.608
P23004	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein	12	3	850.181
P49915	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	5	3	377.321
Q15392	24-dehydrocholesterol reductase precursor	5	3	289.145
O09175	Aminopeptidase B	5	3	306.576
Q03042	cGMP-dependent protein kinase-isozyme 1	5	3	237.667
P48515	Translation initiation factor IF-2	3	3	15.018
O76041	Nebulette (Actin-binding Z-disk protein)	4	3	129.047
O76743	ATP-dependent RNA helicase glh-4	5	3	252.587
P50311	Phosphoglycerate kinase	6	3	314.479
Q15356	Small nuclear ribonucleoprotein F (snRNP-F)	3	3	224.436
O88487	Dynein intermediate chain 2-cytosolic (DH IC-2)	3	3	158.533
P10909	Clusterin precursor	3	3	193.187
P00974	Pancreatic trypsin inhibitor precursor	4	3	330.581
P53634	Dipeptidyl-peptidase I precursor	3	3	195.966
Q08379	Golgin-95	5	3	259.742

P05094	Alpha-actinin 1	42	3	3.342.104
P40429	60S ribosomal protein L13a	5	3	291.263
P45253	HemK protein homolog	3	3	137.698
Q28141	ATP-dependent RNA helicase A	27	3	1.818.765
O08557	NG-NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	6	3	292.774
P09543	2'-3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	3	3	157.778
Q9ULV4	Coronin 1C (Coronin 3) (hCRNN4)	6	3	342.439
P30575	Enolase 1	5	3	290.977
Q90734	Alpha-actinin 4	36	3	3.075.293
P48674	Vimentin	12	3	993.103
P02795	Metallothionein-II (MT-II)	5	3	527.162
P27635	60S ribosomal protein L10	5	3	300.614
P51540	Adenosylhomocysteinase	6	3	425.955
P29353	SHC transforming protein	3	3	163.588
Q64658	Cytochrome P450 11B2-mitochondrial precursor	3	3	149.193
Q60524	Ubiquitin-protein ligase E3 Mdm2	3	3	156.424
P20340	Ras-related protein Rab-6A	12	3	781.143
P04412	Epidermal growth factor receptor precursor	3	3	148.126
O00154	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	3	3	158.808
Q12888	Tumor suppressor p53-binding protein 1	6	3	328.469
Q13838	Probable ATP-dependent RNA helicase p47	13	3	902.538
O67124	Probable DNA double-strand break repair rad50 ATPase	5	3	35.653
Q01650	Large neutral amino acids transporter small subunit	4	3	272.414
O14737	Programed cell death protein 5 (TFAR19 protein)	5	3	381.863
P02565	Myosin heavy chain-fast skeletal muscle-embryonic	26	3	1.422.273



Q9C0A0	Contactin associated protein-like 4 precursor	7	3	334.503
O15382	Branched-chain amino acid aminotransferase-mitochondrial	5	3	265.387
P06756	Integrin alpha-V precursor	6	3	299.492
Q57440	3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase	3	3	157.115
P17210	Kinesin heavy chain	6	3	270.003
P43061	Argininosuccinate lyase	3	3	135.222
P42024	Alpha-centractin (Centractin)	5	3	304.977
P11476	Ras-related protein Rab-1A (YPT1-related protein)	12	3	913.858
Q99170	78 kDa glucose-regulated protein homolog precursor	13	3	953.641
P25111	40S ribosomal protein S25	5	3	283.992
P30997	Alpha-2 catenin (Alpha N-catenin)	14	3	844.411
Q9Z765	Preprotein translocase secA subunit	6	3	300.154

**EK 2: hsa-miR-185-5p Mimik Uygulanmış BT-474 ve BT-474 Kontrol Gruplarının Kıyaslanmasına Ait Proteinlerin İsimleri ve Bilgileri**

Kimlik	Protein	P Değeri	Kat Değişimi
Q9XHR2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,002858668	9,97161255
P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit_	0,00221061	9,66390327
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (hnRNP	6,28563E-05	9,64961412
P23004	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core prot	0,003249519	9,56709743
P35232	Prohibitin.	0,00593163	9,55408099
P07384	Calpain 1_ large [catalytic] subunit (EC 3.4.22.17	0,005487351	9,28999063
Q12263	Serine/threonine-protein kinase GIN4 (EC 2.7.1.-).	0,000670652	9,24290284
O75306	NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit_ mit	0,000409678	9,0050214
P26038	Moesin (Membrane-organizing extension spike protei	0,000217656	8,82731741
O02192	Heat shock protein 83 (HSP 82).	0,005629859	8,80208216
P02468	Laminin gamma-1 chain precursor (Laminin B2 chain)	0,009843211	8,76852512
Q97E05	Chaperone protein htpG (Heat shock protein htpG) (	8,69352E-06	8,76360436
P07339	Cathepsin D precursor (EC 3.4.23.5).	2,04218E-06	8,7615748
P49189	Aldehyde dehydrogenase_ E3 isozyme (EC 1.2.1.3) (G	0,000386546	8,75392013
P23786	Carnitine O-palmitoyltransferase II_ mitochondrial	0,008767994	8,66917556

P05659	Myosin II heavy chain_ non muscle.	4,81078E-06	8,63897357
P11055	Myosin heavy chain_ fast skeletal muscle_ embryoni	0,004032692	8,55983918
P15170	G1 to S phase transition protein 1 homolog (GTP-bi	0,000669185	8,55408336
P04083	Annexin I (Lipocortin I) (Calpactin II) (Chromobin	0,001157162	8,44155432
Q03184	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain_ hydr	0,002649777	8,36782386
Q99KV1	DnaJ homolog subfamily B member 11 precursor.	0,00046006	8,33648696
P95647	60 kDa chaperonin 2 (Protein Cpn60 2) (groEL prote	0,000263465	8,3321082
P11799	Myosin light chain kinase_ smooth muscle and non-m	8,90152E-05	8,16963222
P02567	Myosin heavy chain D (MHC D).	0,001001509	8,08905186
Q01581	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase_ cytoplasmic (E	0,006178467	8,08281074
Q9UTK5	Abnormal long morphology protein 1 (Sp8).	0,000225238	8,03195327
P16106	Histone H3.1 (H3/a) (H3/c) (H3/d) (H3/f) (H3/h) (H	0,00130098	7,99737575
P13928	Annexin A8 (Annexin VIII) (Vascular anticoagulant-	0,015521383	7,95281758
P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase_ cytoplasmic (C1-THF	0,002762833	7,85660236
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase (EC 1.14.11.	0,002006979	7,83164532
P40926	Malate dehydrogenase_ mitochondrial precursor (EC	0,001470909	7,81843161
O60282	Kinesin heavy chain isoform 5C (Kinesin heavy chai	0,035795929	7,77574946
Q15029	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein compone	0,015081656	7,76803033
P18708	Vesicular-fusion protein NSF (N-ethylmaleimide-sen	8,2438E-05	7,72784781
Q92499	ATP-dependent helicase DDX1 (DEAD-box protein 1) (	0,000207641	7,65303691
P04792	Heat shock 27 kDa protein (HSP 27) (Stress-respons	0,001380349	7,49687965
Q15155	Protein pM5 precursor.	0,002340248	7,37980986
P11216	Glycogen phosphorylase_ brain form (EC 2.4.1.1).	0,005236953	7,37087846
Q08379	Golgin-95.	3,58032E-05	7,33248744
P08515	Glutathione S-transferase 26 kDa (EC 2.5.1.18) (GS	0,000619262	7,33223854
O15372	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,000511625	7,30582368
O76743	ATP-dependent RNA helicase glh-4 (Germline helicase	0,031051513	7,2148193
P16475	Myosin light chain alkali_ non-muscle isoform (MLC	0,007135981	7,12756804
Q60432	150 kDa oxygen-regulated protein precursor (Orp150	0,003676573	7,04083682
P20061	Transcobalamin I precursor (TCI) (TC I).	0,002546739	7,02408539
Q9NQC3	Reticulon 4 (Neurite outgrowth inhibitor) (Nogo pr	0,001302741	6,96759403
O75531	Barrier-to-autointegration factor (Breakpoint clus	0,000560871	6,94391894
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH [Inc	0,000251661	6,81361962
Q9WUM3	Coronin 1B (Coronin 2).	0,003043752	6,81110726
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13) (Mu	3,35292E-05	6,78683538
P40227	T-complex protein 1_ zeta subunit (TCP-1-zeta) (CC	0,001699591	6,74379985
Q9Y617	Phosphoserine aminotransferase (EC 2.6.1.52) (PSAT	0,000205844	6,73479878
P13624	Signal recognition particle 54 kDa protein (SRP54)	0,000414545	6,72958834
Q9USI6	Myosin type II heavy chain 1.	0,011095283	6,72030003
P29401	Transketolase (EC 2.2.1.1) (TK).	0,00036565	6,70437068
P04643	40S ribosomal protein S11.	6,80286E-05	6,6858051
P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase_ decarboxylating	0,002392903	6,65170177
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	0,002250712	6,63983802

P05198	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit	0,000618136	6,59907025
P15690	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit_mit	0,007413209	6,56079281
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP F)	0,000726828	6,50592267
P21851	Adapter-related protein complex 2 beta 1 subunit (	0,001083919	6,43537631
P21397	Amine oxidase [flavin-containing] A (EC 1.4.3.4) (	0,007588899	6,30942094
O95433	Protein C14orf3 (Protein HSPC322).	0,003413322	6,30566253
Q9BXP5	Arsenite-resistance protein 2.	0,014814198	6,28690975
Q9Y678	Coatmer gamma subunit (Gamma-coat protein) (Gamma	0,003806146	6,27228229
O23755	Elongation factor 2 (EF-2).	0,000507615	6,20161235
P55327	Tumor protein D52 (N8 protein).	1,46686E-05	6,18408053
Q15437	Protein transport protein Sec23B (SEC23-related pr	0,019765707	6,1804963
P48637	Glutathione synthetase (EC 6.3.2.3) (Glutathione s	0,001388191	5,89471627
Q15436	Protein transport protein Sec23A (SEC23-related pr	0,001129659	5,84630089
P21291	Cysteine-rich protein 1 (CRP1) (CRP).	0,001466937	5,84492272
P07737	Profilin I.	0,000234176	5,78669003
P09467	Fructose-1_6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) (D-fruct	0,000220644	5,77315767
P23456	RNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.48) (L prote	0,006723329	5,76567383
Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma (	0,002950068	5,65897162
P27595	Hexokinase_type I (EC 2.7.1.1) (HK I) (Brain form	5,04085E-06	5,63029261
P08729	Keratin_type II cytoskeletal 7 (Cytokeratin 7) (K	0,000181919	5,56797575
P06733	Alpha enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate	0,000651509	5,28963859
P00938	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) (TIM).	0,000817012	5,14225092
O75694	Nuclear pore complex protein Nup155 (Nucleoporin N	0,002925993	5,08636125
P16991	Nuclease sensitive element binding protein 1 (Y bo	0,001499206	4,98072807
P35978	Kinesin heavy chain.	0,00191969	4,93555568
Q13561	Dynactin complex 50 kDa subunit (50 kDa dynein-ass	0,055428589	4,91960438
P20810	Calpain inhibitor (Calpastatin) (Sperm BS-17 compo	0,016279739	4,91535648
P46405	40S ribosomal protein S12.	0,007995781	4,83779447
O42184	Restin (Cytoplasmic linker protein-170) (CLIP-170)	0,002742217	4,77313829
P12750	40S ribosomal protein S4_ X isoform (Single copy a	0,000963241	4,47250545
P04406	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase_liver (E	0,00483937	4,41096769
P20290	Transcription factor BTF3 (RNA polymerase B transc	0,006242249	4,24882062
P49915	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] (EC 6.3.5.2)	0,000857973	4,20042386
P11940	Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding p	0,015355225	4,02543979
O15320	Meningioma-expressed antigen 6/11 (MEA6) (MEA11).	5,74441E-06	3,94372473
Q28275	Fibronectin (FN) (Fragment).	0,015278373	3,8721731
O14157	Myosin type II heavy chain 2.	0,003770479	3,58404441
P05712	Ras-related protein Rab-2.	0,000154677	3,54982889
P17077	60S ribosomal protein L9.	1,75619E-05	3,51031848
P01252	Prothymosin alpha.	0,021803789	3,4796738
O50288	ATP synthase alpha chain (EC 3.6.3.14).	0,000246271	2,89667205
P12576	RNA polymerase beta subunit (EC 2.7.7.48) (Large s	0,03936131	2,56148723
P46150	Moesin/ezrin/radixin homolog (D17 protein).	0,055371647	2,35620906

P42655	14-3-3 protein epsilon (Mitochondrial import stimu	0,010666813	1,95281831
O35156	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase 1 (EC	0,024516988	1,94640749
P21964	Catechol O-methyltransferase_ membrane-bound form	0,00502174	1,84500722
P05786	Keratin_ type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin 8) (C	0,048658388	1,64211074
P28799	Granulins precursor (Acrogranin) [Contains: Paragr	0,029508357	1,44923717
P49736	DNA replication licensing factor MCM2 (Nuclear pro	0,015281525	1,40781076
P70288	Histone deacetylase 2 (HD2) (YY1 transcription fac	0,01863395	0,60129145
P45973	Chromobox protein homolog 5 (Heterochromatin prote	0,00952708	0,59947844
O19048	Poly(rC)-binding protein 1 (Alpha-CP1) (hnRNP-E1).	0,002377249	0,58984239
P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1).	0,002334227	0,58883338
O00299	Chloride intracellular channel protein 1 (Nuclear	0,001543215	0,58158125
P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein (Protei	0,005711402	0,5719297
O13683	Hypothetical 143.0 kDa protein C11E3.02C in chromo	7,6095E-09	0,57148687
P49321	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP).	0,013623689	0,57092973
P13639	Elongation factor 2 (EF-2).	0,000745503	0,5671795
Q13011	Delta3_5-delta2_4-dienoyl-CoA isomerase_ mitochond	0,000439267	0,56479214
P18754	Regulator of chromosome condensation (Cell cycle r	0,000847907	0,56377059
P52907	F-actin capping protein alpha-1 subunit (CAPZ alph	0,00022726	0,56188526
Q14764	Major vault protein (MVP) (Lung resistance-related	4,05298E-06	0,55424143
P49609	Aconitate hydratase_ mitochondrial precursor (EC 4	0,012327715	0,55250953
P00735	Prothrombin precursor (EC 3.4.21.5).	0,006743933	0,5521764
P36066	Hypothetical 54.4 kDa protein in APL2-MYO3 interge	0,005699652	0,5490371
Q13153	Serine/threonine-protein kinase PAK 1 (EC 2.7.1.-)	0,003678157	0,54242662
P25120	60S ribosomal protein L8.	0,005096617	0,54234313
P52943	Cysteine-rich protein 2 (CRP2) (ESP1 protein).	0,000346259	0,54011639
Q01202	Paramyosin.	0,009424179	0,53883354
P14618	Pyruvate kinase_ M1 isozyme (EC 2.7.1.40) (Pyruvat	0,003289176	0,53492408
P04765	Eukaryotic initiation factor 4A-I (eIF-4A-I) (eIF4	0,021454026	0,52987202
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9) (GPI) (	0,004438157	0,52629746
O97680	Thioredoxin.	0,019560682	0,52538459
P30575	Enolase 1 (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydr	0,004355738	0,5234955
Q04760	Lactoylglutathione lyase (EC 4.4.1.5) (Methylglyox	0,002889739	0,52319682
Q12874	Splicing factor 3A subunit 3 (Spliceosome associat	0,008334436	0,52190153
Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,032277247	0,51433255
P40261	Nicotinamide N-methyltransferase (EC 2.1.1.1).	0,004186977	0,51000048
O60437	Periplakin (195 kDa cornified envelope precursor)	0,049354181	0,50809067
P20951	RNA replication protein (176 kDa protein) (ORF 1)	0,001973372	0,50736117
O43396	Thioredoxin-like protein (32 kDa thioredoxin-relat	0,000192847	0,5073035
P28894	Fumarate hydratase C (EC 4.2.1.2) (Fumarase C).	4,7928E-05	0,50349595
Q9UBR2	Cathepsin Z precursor (EC 3.4.22.-) (Cathepsin X)	0,030265325	0,50297518
P13668	Stathmin (Phosphoprotein p19) (pp19) (Oncoprotein	0,007744241	0,49137946
P29692	Elongation factor 1-delta (EF-1-delta) (Antigen NY	0,000640411	0,48979302
Q92804	TATA-binding protein associated factor 2N (RNA-bin	0,011645698	0,48191781

P04645	60S ribosomal protein L30.	2,26945E-05	0,48084374
Q14157	Hypothetical protein KIAA0144.	0,00064883	0,47831596
P29398	DNA-directed RNA polymerase beta chain (EC 2.7.7.6	0,000337991	0,46963482
Q9KE51	Chaperone protein htpG (Heat shock protein htpG) (	0,008789964	0,46635971
P02651	Apolipoprotein A-IV precursor (Apo-AIV).	0,046928393	0,44798385
O94826	Mitochondrial precursor proteins import receptor (	0,050183639	0,44787615
P78406	mRNA-associated protein mrnp 41 (RAE1 protein homo	0,016011839	0,44342778
P00533	Epidermal growth factor receptor precursor (EC 2.7	0,027066272	0,44297716
P18669	Phosphoglycerate mutase_ brain form (EC 5.4.2.1) (	0,000130412	0,435884
P41250	Glycyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.14) (Glycine--tRN	0,004606184	0,43146507
Q09446	Hypothetical 92.8 kDa protein C04A2.7 in chromosom	0,000255615	0,42326961
P29353	SHC transforming protein.	0,002742837	0,41865827
Q01844	RNA-binding protein EWS (EWS oncogene) (Ewing sarc	1,24133E-05	0,41482655
Q08046	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha) (14 NM fila	0,001315508	0,41156772
O15144	ARP2/3 complex 34 kDa subunit (P34-ARC) (Actin-rel	0,000212068	0,41070971
P16989	DNA-binding protein A (Cold shock domain protein A	0,009246949	0,40661114
Q9D952	Envoplakin (p210) (210 kDa cornified envelope prec	0,000133477	0,38884846
P27641	ATP-dependent DNA helicase II_ 80 kDa subunit (Ku	0,004038758	0,37809857
P23514	Coatomer beta subunit (Beta-coat protein) (Beta-CO	0,045161263	0,3717042
P02769	Serum albumin precursor (Allergen Bos d 6).	0,000248598	0,36380326
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP]_ mitochondrial pre	0,002610056	0,35441656
P22314	Ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9 protein).	0,051274114	0,33615534
P05387	60S acidic ribosomal protein P2.	0,047577677	0,32822197
P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (EC 1.1.1	0,05368687	0,32456499
Q99170	78 kDa glucose-regulated protein homolog precursor	0,011518996	0,32014859
O75746	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aral	0,037026127	0,31876567
P00558	Phosphoglycerate kinase 1 (EC 2.7.2.3) (Primer rec	0,046095307	0,3136854
Q24368	Iswi protein (Imitation swi protein) (Nucleosome r	0,043568972	0,3099991
Q00341	Vigilin (High density lipoprotein-binding protein)	0,040739145	0,30729464
P12429	Annexin III (Lipocortin III) (Placental anticoagul	0,035277745	0,30479931
Q64658	Cytochrome P450 11B2_ mitochondrial precursor (EC	0,015982715	0,30408545
P55735	SEC13-related protein.	0,000126203	0,29851977
P12004	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Cyclin)	0,035008147	0,28733922
P53634	Dipeptidyl-peptidase I precursor (EC 3.4.14.1) (DP	0,022373975	0,27455098
Q9ULV4	Coronin 1C (Coronin 3) (hCRNN4).	0,00484425	0,27238683
P02827	Heat shock 70 kDa protein (HSP70).	2,94453E-05	0,27162274
P23225	Ferredoxin-dependent glutamate synthase_ chloropla	0,02418557	0,25255624
P40112	Proteasome subunit beta type 3 (EC 3.4.25.1) (Prot	0,023003452	0,24943164
P17922	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain (EC 6.1.1.	1,98958E-05	0,22753357
P10486	Type I restriction enzyme EcoR124II R protein (EC	0,002298706	0,2248677
P10668	Cofilin_ non-muscle isoform.	0,017359306	0,22146919
P19012	Keratin_ type I cytoskeletal 15 (Cytokeratin 15) (	0,000813676	0,20196389
Q01233	Heat shock 70 kDa protein (HSP70).	0,002591778	0,19915849

P31350	Ribonucleoside-diphosphate reductase M2 chain (EC	0,01607926	0,19712148
P36290	Genome polyprotein [Contains: Coat protein VP4 (P1	6,92627E-06	0,18872371
P31937	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase_ mitochondrial	0,000868108	0,18598721
P41753	Heat shock 70 kDa protein.	5,16563E-05	0,18250064
P34455	Probable aconitate hydratase_ mitochondrial precur	0,00660234	0,17791064
P19367	Hexokinase_ type I (EC 2.7.1.1) (HK I) (Brain form	0,000193633	0,13663044
O62768	Thioredoxin reductase (EC 1.6.4.5).	0,006982932	0,12906352
P48722	Osmotic stress protein 94 (Heat shock 70-related p	0,000623732	0,11248823
O43291	Kunitz-type protease inhibitor 2 precursor (Hepato	0,000139927	0,11237406
P49753	Peroxisomal acyl-coenzyme A thioester hydrolase 2	0,000111948	0,10276255
P08727	Keratin_ type I cytoskeletal 19 (Cytokeratin 19) (	2,37673E-05	0,10199367
P08106	Heat shock 70 kDa protein (HSP70).	0,002779109	0,0864551
O76041	Nebulette (Actin-binding Z-disk protein).	4,27388E-05	0,07664461
Q14974	Importin beta-1 subunit (Karyopherin beta-1 subuni	0,001118252	0,06551982
P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1 (EC 1.1.1.184) (NADPH	0,000764241	0,05878634
Q9Z765	Preprotein translocase secA subunit.	1,78247E-06	0,05141849
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) (N	2,06783E-06	0,03450487

**EK 3: Negatif Kontrol Uygulanmış BT-474 ve BT-474 Kontrol Gruplarının Kıyaslanmasına Ait Proteinlerin İsimleri ve Bilgileri**

Kimlik	Protein	p Değeri	Kat Değişimi
P53992	Protein transport protein Sec24C	0,003148012	9,738226285
Q10947	Hypothetical 139.9 kDa protein	0,023134875	9,48844565
Q12263	Serine/threonine-protein kinase GIN4	0,003535422	9,464360678
P95647	60 kDa chaperonin 2	0,000368481	9,270645234
Q9XHR2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,014211902	9,191647638
P40227	T-complex protein 1-zeta subunit	0,011929692	8,97150431
Q9C0A0	Contactin associated protein-like 4 precursor	3,33785E-05	8,854186856
P05659	Myosin II heavy chain-non muscle	0,003157226	8,680004663
O14737	Programed cell death protein 5	0,003932412	8,386258511
P07384	Calpain 1- large [catalytic] subunit	0,030932594	8,223184367
P21851	Adapter-related protein complex 2 beta 1 subunit	0,00021968	8,017590279
P35232	Prohibitin	0,001925524	7,987468841
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II	0,000730817	7,827482514
Q01581	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase-cytoplasmic	0,01586431	7,671123742
P18206	Vinculin (Metavinculin)	0,002763371	7,65674454
Q9NQC3	Reticulon 4	0,000991319	7,591469148
P15170	G1 to S phase transition protein 1 homolog	0,036453917	7,472067322
P04643	40S ribosomal protein S11	0,008040757	7,332306517
Q15019	Septin 2 (NEDD5 protein homolog)	0,000144968	7,301473316

Q06210	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	0,01388166	7,234830853
Q05944	Heat shock 70 kDa protein	0,023496739	7,231953933
P55327	Tumor protein D52	0,042403592	7,096524169
Q03042	cGMP-dependent protein kinase- isozyme 1	0,010596267	7,068778202
Q15942	Zyxin (Zyxin 2)	0,01276835	7,000714798
P49189	Aldehyde dehydrogenase-E3 isozyme	0,046662573	6,94393343
P39027	40S ribosomal protein S15a	0,002982059	6,833498323
Q08379	Golgin-95	0,015852479	6,664679123
Q92499	ATP-dependent helicase DDX1	0,00299274	6,568093891
P33194	DNA damage binding protein 1	0,000280498	6,34925128
O75694	Nuclear pore complex protein Nup155	0,000888189	6,145410662
P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha	0,017216729	6,098146145
P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase-tytoplasmic	0,014797999	5,952396433
Q15155	Protein pM5 precursor	0,034190692	5,895433466
P40926	Malate dehydrogenase-mitochondrial precursor	0,030960871	5,700179136
P00387	NADH-cytochrome B5 reductase	0,007769258	5,68990794
P02468	Laminin gamma-1 chain precursor	0,026527426	5,604303219
Q29443	Serotransferrin precursor	0,011828104	5,542465941
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	0,000792506	5,395357045
Q15029	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein	0,042946581	5,378350968
P02567	Myosin heavy chain D	0,018375555	5,339871765
Q12931	Heat shock protein 75 kDa-mitochondrial precursor	0,004854576	5,332132266
P17980	26S protease regulatory subunit 6A	0,000295969	4,69363535
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	0,038692112	4,693065012
P21397	Amine oxidase	0,045780273	4,680845379
P45253	HemK protein homolog	0,000500599	4,641759797
P17931	Galectin-3	0,03497512	4,565613024
O00154	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	0,004359646	4,552994084
P09467	Fructose-1-6-bisphosphatase	0,001712414	4,302962726
P20290	Transcription factor BTF3	0,019467849	4,242987737
P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor	0,044465961	4,222015963
P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	0,0488622	4,175524622
P00491	Purine nucleoside phosphorylase	0,002337129	4,05172432
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	3,64604E-07	3,985807143
O95433	Protein C14orf3 (Protein HSPC322)	0,041267652	3,93002727
P02795	Metallothionein-II (MT-II)	0,022346874	3,92306397
P16991	Nuclease sensitive element binding protein 1	0,048610885	3,850432228
P58238	Proteasome activator complex subunit	0,041845062	3,562698231
P00938	Triosephosphate isomerase	0,011461685	3,453798488
P11940	Polyadenylate-binding protein 1	0,018292068	3,030114088
O15320	Meningioma-expressed antigen 6/11	0,053899055	3,02806222
P41653	Hypothetical 244.6 kDa protein ycf2	0,000767398	3,005995489
Q08156	Mast/stem cell growth factor receptor precursor	5,33738E-05	2,824538069

P36422	Isoleucyl-tRNA synthetase	0,04577797	2,66465609
O14157	Myosin type II heavy chain 2	0,00418837	2,487486491
P20340	Ras-related protein Rab-6A	0,026344906	2,089269693
O67323	Alanyl-tRNA synthetase	0,012101375	1,841900352
P10486	Type I restriction enzyme EcoR124II R	0,002779359	1,782994811
Q01650	Large neutral amino acids transporter small subunit	0,015047894	1,658046485
P12861	Heat shock protein 83	3,93043E-05	1,508588085
P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	0,034379757	0,60695637
P17220	Proteasome subunit alpha type 2	0,004365846	0,598016843
P00974	Pancreatic trypsin inhibitor precursor	0,036612349	0,597556935
Q92355	Hypothetical 192.5 kDa protein	0,010321328	0,584708822
Q15233	54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein	0,012423176	0,582937549
Q00610	Clathrin heavy chain 1 (CLH-17)	0,000417361	0,581033663
P40112	Proteasome subunit beta type 3	0,04623037	0,579517837
Q15428	Splicing factor 3A subunit 2	0,010463997	0,577864933
P17987	T-complex protein 1-alpha subunit (TCP-1-alpha)	0,052165587	0,575103518
Q60301	Hypothetical protein MJEC502	0,055837769	0,570393099
Q90705	Elongation factor 2 (EF-2)	0,002628456	0,566092876
Q9KE51	Chaperone protein htpG (Heat shock protein htpG)	0,00554624	0,564400631
P31350	Ribonucleoside-diphosphate reductase M2 chain	0,023900099	0,561470333
P13693	Translationally controlled tumor protein (TCTP)	0,007999529	0,56118367
P26641	Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	0,043423409	0,557773374
P25111	40S ribosomal protein S25	0,000973229	0,557539883
P00441	Superoxide dismutase	0,003200024	0,549428645
P13662	Nuclear transport factor 2	0,043954325	0,545440866
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3	0,032834801	0,545405157
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	0,016634367	0,541593815
P48722	Osmotic stress protein 94	0,051212182	0,530414874
Q16401	26S proteasome subunit S5B	0,036989853	0,526396043
P34932	Heat shock 70 kDa protein 4	0,03872188	0,519464667
Q07812	Apoptosis regulator BAX- membrane isoform alpha	0,041492104	0,514629468
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,004930218	0,512035903
P54071	Isocitrate dehydrogenase [NADP]- mitochondrial	0,021806556	0,511125137
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	0,019585548	0,508647225
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	0,016406319	0,493327373
P52709	Probable threonyl-tRNA synthetase-cytoplasmic	0,042064781	0,490537558
Q14126	Desmoglein 2 precursor (HDGC)	0,00592597	0,489876544
P37802	Transgelin 2 (SM22-alpha homolog)	0,028817069	0,483357961
P52907	F-actin capping protein alpha-1 subunit	0,024455807	0,478884313
P29398	DNA-directed RNA polymerase beta chain	6,00776E-05	0,471221711
P14618	Pyruvate kinase_ M1 isozyme	0,007321881	0,470653472
P13668	Stathmin (Phosphoprotein p19)	0,014367728	0,461676162
P09622	Dihydrolipoamide dehydrogenase- mitochondrial	0,049911246	0,459924667



P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	3,50389E-05	0,443797901
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	0,020971861	0,441910028
Q9Z765	Preprotein translocase secA subunit	0,000254452	0,432957086
P19338	Nucleolin	0,040611787	0,427662007
Q92743	Serine protease HTRA1 precursor	0,040759237	0,418005066
P54136	Arginyl-tRNA synthetase	0,039435872	0,41621756
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP]- mitochondrial	0,000222963	0,400629823
P08106	Heat shock 70 kDa protein (HSP70)	0,042623639	0,393198757
P15144	Aminopeptidase N	0,053043927	0,389334051
Q9BPW8	NipSnap1 protein	0,04604056	0,38029787
P09211	Glutathione S-transferase P	0,043676143	0,374100979
P35900	Keratin-type I cytoskeletal 20	0,043401588	0,373470444
O76041	Nebulette	0,044753892	0,372138522
Q14157	Hypothetical protein KIAA0144	0,023425431	0,369161352
P37399	ATP synthase beta chain- mitochondrial precursor	0,043743826	0,336520897
O15144	ARP2/3 complex 34 kDa subunit	0,019260095	0,333948821
P25120	60S ribosomal protein L8	0,043637719	0,332066627
P41250	Glycyl-tRNA synthetase	0,011903139	0,32878495
Q04760	Lactoylglutathione lyase	0,00518727	0,324073298
Q60524	Ubiquitin-protein ligase E3 Mdm2	0,032203671	0,323491495
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	0,051403389	0,323420145
Q14259	Enhancer of rudimentary homolog	0,031024735	0,323370509
O15061	Desmusli	0,031457838	0,309489275
P13639	Elongation factor 2	0,022836604	0,304014339
P53007	Tricarboxylate transport protein-mitochondrial	0,02072974	0,303700997
P24733	Myosin heavy chain-striated muscle	0,035910377	0,296766584
O00571	DEAD-box protein 3	0,027360527	0,289968891
P13538	Myosin heavy chain- skeletal muscle-adult	0,050781005	0,288731301
P25388	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit	0,000484915	0,288112293
Q9UBR2	Cathepsin Z precursor	0,013083715	0,287502819
P40261	Nicotinamide N-methyltransferase	0,03745819	0,287203387
Q14839	Chromodomain helicase-DNA-binding protein 4	0,018532872	0,286441615
P05786	Keratin_ type II cytoskeletal 8	0,000397655	0,282532455
Q15691	Microtubule-associated protein RP/EB family member	0,045830208	0,277523957
Q9PB05	Chaperone protein dnaK	0,045321505	0,276325788
P00505	Aspartate aminotransferase-mitochondrial precursor	0,044269648	0,273818577
P51968	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 homolog	0,002213852	0,269511876
Q15437	Protein transport protein Sec23B	0,041492974	0,266996798
P21613	Kinesin heavy chain	0,02473303	0,263448229
P06756	Integrin alpha-V precursor	0,000150707	0,261115532
P49368	T-complex protein 1-gamma subunit	0,038756375	0,259959188
P02769	Serum albumin precursor	0,008530699	0,254543184
P12532	Creatine kinase-ubiquitous mitochondrial precursor	0,017357734	0,251556146

P23225	Ferredoxin-dependent glutamate synthase	0,030716207	0,251095349
Q9JLV1	BAG-family molecular chaperone regulator-3	0,034354659	0,247888169
P49915	GMP synthase	0,03211129	0,241326182
O15173	Membrane associated progesterone receptor componen	0,031063129	0,238153145
Q14978	Nucleolar phosphoprotein p130	0,009534228	0,236245659
P41753	Heat shock 70 kDa protein	0,000197195	0,23144392
Q13442	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	0,02890725	0,231391345
Q01233	Heat shock 70 kDa protein	0,028023683	0,228521564
P35658	Nuclear pore complex protein Nup214	0,027714422	0,227502705
P00533	Epidermal growth factor receptor precursor	0,027450304	0,22662649
P23514	Coatomer beta subunit	0,021358307	0,222306926
P30044	Putative peroxisomal antioxidant enzyme	0,026087761	0,22201382
Q09446	Hypothetical 92.8 kDa protein C04A2.7 in chromosom	0,003297131	0,21426351
P19367	Hexokinase-type I	0,02040365	0,21320493
P13648	Lamin A	0,006041453	0,210597063
P21675	Transcription initiation factor TFIID 250 kDa subunit	0,01427304	0,202467286
P49609	Aconitate hydratase-mitochondrial precursor	0,006435774	0,192145302
Q00796	Sorbitol dehydrogenase	0,018200327	0,19153689
P30575	Enolase 1	0,017023927	0,186280018
P31937	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-mitochondrial	0,001546331	0,18596731
O19048	Poly(rC)-binding protein 1	0,009664285	0,184907273
P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1	0,016445961	0,183610137
Q64658	Cytochrome P450 11B2-mitochondrial precursor	0,001956627	0,176495957
Q92804	TATA-binding protein associated factor 2N	0,00758649	0,171950659
P29353	SHC transforming protein	0,013778394	0,170427155
P42024	Alpha-centractin	0,013713344	0,170085882
P31691	ADP_ATP carrier protein-mitochondrial precursor	0,013499364	0,168955893
P47583	DNA-directed RNA polymerase beta chain	0,010941779	0,16325977
P47813	Eukaryotic translation initiation factor 1A	8,18666E-05	0,15331097
P05094	Alpha-actinin 1	0,008200752	0,148918172
P17922	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	0,002670334	0,147950396
Q08046	Elongation factor 1-alpha	8,28839E-06	0,14677438
Q99798	Aconitate hydratase- mitochondrial precursor	0,00246784	0,145551379
O50288	ATP synthase alpha chain	0,007637146	0,132124227
P46869	Kinesin-like protein FLA10	0,001704628	0,127164871
P55735	SEC13-related protein	0,004904989	0,108538652
P49649	Preprotein translocase secA subunit	3,12385E-05	0,108084557
O60716	Catenin delta-1	0,004128739	0,107383269
O75746	Calcium-binding mitochondrial carrier protein	0,004646881	0,105932544
P07954	Fumarate hydratase-mitochondrial precursor	5,34944E-05	0,094101188
P21872	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosin	0,003305059	0,090762454
O94826	Mitochondrial precursor proteins import receptor	0,003299041	0,090686903
P19012	Keratin-type I cytoskeletal 15	0,002131469	0,084878411

P17080	GTP-binding nuclear protein RAN	1,62753E-07	0,080972201
P13647	Keratin-type II cytoskeletal 5	0,000347398	0,080071931
P05141	ADP-ATP carrier protein- fibroblast isoform	0,002507899	0,079954519
Q14974	Importin beta-1 subunit	0,002292911	0,077656809
P36290	Genome polyprotein	0,002351253	0,077605737
O95239	Chromosome-associated kinesin KIF4A	8,75666E-05	0,075853328
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein	0,000224297	0,050965767
P11021	78 kDa glucose-regulated protein precursor	0,000846022	0,047991895
Q9H4M9	EH-domain containing protein 1	0,00055956	0,039374964
P08473	Nepriylsin	0,000312447	0,029713294
P12429	Annexin III	0,000289797	0,028647
P27641	ATP-dependent DNA helicase II- 80 kDa subunit	0,000163392	0,021662981

**EK 4: hsa-miR-185-5p Mimik Uygulanmış MCF-12A ve MCF-12A Kontrol (besiyeri) Gruplarının Kıyaslanmasına Ait Proteinlerin İsimleri ve Bilgileri**

Kimlik	Protein	p Değeri	Kat Değişimi
P28072	Proteasome subunit beta type 6 precursor	3,96352E-06	9,66284442
P33992	DNA replication licensing factor MCM5	0,000214428	9,57900926
P05556	Integrin beta-1 precursor	7,52592E-05	8,93141325
P13489	Placental ribonuclease inhibitor	3,88248E-05	8,44385915
O59787	Signal recognition particle 72 kDa protein homolog	0,002492647	7,99995184
P05165	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain- mitochondri	0,004469363	7,76255442
P18708	Vesicular-fusion protein NSF	2,92831E-06	7,73182874
Q9H4M9	EH-domain containing protein 1	0,004233923	7,66559615
Q01844	RNA-binding protein EWS	0,000139734	7,4988194
O23627	Glycyl-tRNA synthetase	0,004985752	7,41958116
P40227	T-complex protein 1-zeta subunit	0,00010308	7,40050148
P40939	Trifunctional enzyme alpha subunit-mitochondrial	0,002539246	7,3337531
Q9Y3F4	UNR-interacting protein	0,001866202	6,86669441
P30043	Flavin reductase	0,005429972	6,8663446
O14157	Myosin type II heavy chain 2	0,023731767	6,86429243
P79136	F-actin capping protein beta subunit	0,000113469	6,50763815
P33194	DNA damage binding protein 1	0,002075245	6,45271966
O60361	Putative nucleoside diphosphate kinase	0,004628648	6,35089535
O95433	Protein C14orf3	0,001378506	6,29472092
P15559	NAD(P)H dehydrogenase	0,016483352	6,13606824
P36542	ATP synthase gamma chain- mitochondrial precursor	1,62651E-05	6,12815263
Q11102	Hypothetical 131.5 kDa protein	7,61597E-05	6,00986224
P22234	Multifunctional protein ADE2	0,00028789	5,91882058
P51540	Adenosylhomocysteinase	0,00263713	5,82321283

P04792	Heat shock 27 kDa protein	0,012198716	5,7655286
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein	0,007841237	5,62526322
Q10713	Mitochondrial processing peptidase alpha subunit	0,000617283	5,33932631
P15144	Aminopeptidase N	2,52772E-05	5,25902506
O42184	Restin	0,017502225	5,04875648
P21291	Cysteine-rich protein 1	0,00192354	5,0009757
P42024	Alpha-centractin	0,053122215	4,8793334
P05179	Cytochrome P450 2C7	0,000287984	4,84968416
P34455	Probable aconitate hydratase-mitochondrial precur	0,052794546	4,69812086
P27595	Hexokinase-type I	0,000763042	4,47209664
P23131	60S ribosomal protein L23 (L17)	0,038197749	4,4359492
P18827	Syndecan-1 precursor (SYND1)	0,001187536	4,28404185
P37802	Transgelin 2	0,006581922	4,10593534
P15121	Aldose reductase	0,008671487	4,01596358
O15320	Meningioma-expressed antigen 6/11	0,00073226	3,96141231
P11021	78 kDa glucose-regulated protein precursor	0,01570226	3,94978676
Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,027274291	3,88556802
P25388	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit	1,12131E-06	3,8645891
P52943	Cysteine-rich protein 2 (CRP2)	0,006686806	3,78578842
P02786	Transferrin receptor protein 1	0,019603579	3,75803225
P24821	Tenascin precursor (TN) (Hexabrachion)	0,002428252	3,73361237
P47583	DNA-directed RNA polymerase beta chain	6,01592E-05	3,71357786
Q92597	NDRG1 protein	5,50905E-05	3,69113689
O00154	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	0,006694123	3,58121728
P29401	Transketolase	0,009676568	3,57805394
P07737	Profilin I	0,012180962	3,5355488
P13662	Nuclear transport factor 2	0,000905684	3,52567632
P20700	Lamin B1	0,047484795	3,4824699
Q9Y678	Coatomer gamma subunit	0,004612119	3,43033025
O05069	Mu-like prophage FluMu transposase A	0,003533168	3,4104757
Q01233	Heat shock 70 kDa protein	0,014023939	3,31404466
P00367	Glutamate dehydrogenase 1-mitochondrial precursor	0,006641309	3,30647771
P09203	Tubulin beta-1 chain	0,031465634	3,26039767
P23225	Ferredoxin-dependent glutamate synthase	8,62632E-06	3,2233978
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit- mit	0,009165393	3,06324307
P09543	2'-3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	1,68159E-06	2,99314819
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II	0,013311794	2,90131466
Q9Y6M9	NADH-ubiquinone oxidoreductase B22 subunit	0,001611734	2,83007772
O84641	Transcription elongation factor greA	0,006604517	2,63455313
Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma	0,016566076	2,62837445
P49368	T-complex protein 1-gamma subunit	0,001430374	2,61950616
P55735	SEC13-related protein	0,003440152	2,56102673
P11498	Pyruvate carboxylase-mitochondrial precursor	0,000111754	2,5378114

Q16881	Thioredoxin reductase	0,0046833	2,51828653
Q01650	Large neutral amino acids transporter small subunit	0,002098629	2,30304455
Q28177	Phakinin	0,002511781	2,29213271
Q9JLV1	BAG-family molecular chaperone regulator-3	0,047066491	2,25522211
P70288	Histone deacetylase 2	0,031496299	2,24532049
P04406	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-liver	0,039242315	2,23645987
P24733	Myosin heavy chain- striated muscle	0,001985205	2,22487452
P31937	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase- mitochondrial	0,034657863	2,21094907
P97379	Ras-GTPase-activating protein binding protein 2	0,024843947	2,17233714
P00974	Pancreatic trypsin inhibitor precursor	0,005324655	2,15037065
P52292	Importin alpha-2 subunit	0,004042281	2,10001328
Q14126	Desmoglein 2 precursor (HDGC)	0,002731495	2,08570116
Q9KE51	Chaperone protein htpG (Heat shock protein htpG)	0,001777682	2,05644506
P02578	Actin 1	7,52556E-05	2,0013176
O88487	Dynein intermediate chain 2_ cytosolic	0,015541161	1,99586153
P38205	Putative methyltransferase NCL1	0,003701421	1,98741467
P51649	Succinate semialdehyde dehydrogenase-mitochondria	6,65799E-08	1,88663009
O75367	Core histone macro-H2A.1	0,01884787	1,86340871
O67124	Probable DNA double-strand break repair rad50	0,005747481	1,78006875
Q92743	Serine protease HTRA1 precursor	0,01567504	1,77469824
O97680	Thioredoxin	0,037927543	1,77000067
P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosy	0,004868823	1,76101367
P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor	0,000217249	1,73839129
P36290	Genome polyprotein	0,017408637	1,73387723
P49649	Preprotein translocase secA subunit	5,5527E-05	1,71075305
P40429	60S ribosomal protein L13a	0,00847284	1,64821905
P28799	Granulins precursor	0,000206405	1,64264389
P00735	Prothrombin precursor	0,030199611	1,64140967
P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase precursor	0,003066074	1,63737328
P27641	ATP-dependent DNA helicase II-80 kDa subunit	0,003883743	1,58632717
P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	0,007217093	1,57397476
P05786	Keratin_ type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin 8)	0,004042868	1,57107993
P46869	Kinesin-like protein FLA10	0,055780566	1,56453785
P35613	Basigin precursor	0,002299818	1,56234836
P35658	Nuclear pore complex protein Nup214	0,007409842	1,54537031
P21872	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosin	0,000171118	1,49305012
Q9BPW8	NipSnap1 protein	0,010864821	1,49188121
P21675	Transcription initiation factor TFIID 250 kDa	0,005283046	1,491528
Q29443	Serotransferrin precursor	0,010608	1,45023908
P11055	Myosin heavy chain- fast skeletal muscle- embryonic	0,000465369	1,43106581
Q9KAC0	DNA mismatch repair protein mutS.	0,002390694	1,42297699
Q12931	Heat shock protein 75 kDa- mitochondrial precursor	0,010570195	1,40085848
P11476	Ras-related protein Rab-1A	0,046737358	0,60704962

P35998	26S protease regulatory subunit 7	0,009404878	0,60647589
Q07812	Apoptosis regulator BAX- membrane isoform alpha	0,020041297	0,60368216
P26196	Probable ATP-dependent RNA helicase p54	0,002713974	0,60364071
P50533	Chromosome assembly protein XCAP-E	0,033205879	0,60153111
P21266	Glutathione S-transferase Mu 3	0,017038015	0,59587287
P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	0,007400276	0,59570106
P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase	0,008614429	0,5948616
P27708	CAD protein	0,000360752	0,58607787
P13668	Stathmin (Phosphoprotein p19)	0,019165263	0,58494107
P16394	Heat shock 70 kDa protein	0,018655751	0,5836275
P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	0,005364512	0,57712408
Q92598	Heat-shock protein 105 kDa	2,55881E-05	0,5765567
Q14764	Major vault protein	0,053901283	0,57394441
P30046	D-dopachrome tautomerase	0,006724874	0,56886638
P07384	Calpain 1- large [catalytic] subunit	0,016758273	0,56669416
P51858	Hepatoma-derived growth factor (HDGF)	0,012013062	0,56655466
Q9H1E3	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent	0,016589904	0,56332273
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	0,002314876	0,55822536
P11940	Polyadenylate-binding protein 1	0,035738134	0,54910435
P46781	40S ribosomal protein S9	0,000444242	0,54794714
P45357	Heme/hemopexin utilization protein C precursor	0,003579499	0,5466267
Q9Y617	Phosphoserine aminotransferase	0,002983552	0,54469871
O60841	Translation initiation factor IF-2	0,026943312	0,54356312
P21399	Iron-responsive element binding protein 1	0,045607122	0,5370268
O13287	6-phosphogluconate dehydrogenase-decarboxylating	0,044717658	0,53637063
O75874	Isocitrate dehydrogenase	0,0020809	0,53411296
P25120	60S ribosomal protein L8	3,80451E-05	0,51771771
P42655	14-3-3 protein epsilon	0,012681101	0,5114453
Q9Z765	Preprotein translocase secA subunit	2,2837E-05	0,50980604
O95816	BAG-family molecular chaperone regulator-2	0,023648263	0,50337883
Q99439	Calponin H2-smooth muscle (Neutral calponin)	0,036126731	0,50050543
O75521	Peroxisomal 3-2-trans-enoyl-CoA isomerase	0,000179836	0,49840328
P56959	RNA-binding protein FUS	0,000437519	0,49726808
P46405	40S ribosomal protein S12	0,00143894	0,49412552
Q07590	SAV protein	0,037392389	0,49207922
P18669	Phosphoglycerate mutase-brain form	0,006201571	0,46892516
Q01813	6-phosphofructokinase- type C	8,86661E-05	0,46649742
P22314	Ubiquitin-activating enzyme E1	0,014482188	0,46318579
O60664	Cargo selection protein TIP47	0,011582329	0,45671765
P43243	Matrin 3	0,013008777	0,45172357
Q15019	Septin 2 (NEDD5 protein homolog)	0,008287318	0,44888991
P17080	GTP-binding nuclear protein RAN	0,00803715	0,44449731
P16152	Carbonyl reductase	3,45766E-05	0,44255203

P12576	RNA polymerase beta subunit	0,049417367	0,43613218
P00441	Superoxide dismutase	0,00038958	0,43397692
Q04984	10 kDa heat shock protein-mitochondrial	0,029177057	0,43306372
P30101	Protein disulfide isomerase A3 precursor	0,000223303	0,42648077
P22695	Ubiquinol-cytochrome C reductase	0,006852287	0,41773329
P06733	Alpha enolase	4,05128E-06	0,40967109
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	0,000591236	0,40371077
O50288	ATP synthase alpha chain	0,006893949	0,40143986
P54651	Heat shock cognate 90 kDa protein.	0,001755999	0,39227161
P17140	Collagen alpha 2(IV) chain precursor	0,012849838	0,38765016
Q00688	Rapamycin-selective 25 kDa immunophilin	0,001430174	0,38441126
P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein	0,013810833	0,37813017
P55060	Importin-alpha re-exporter	0,000486089	0,36677583
P53451	T-complex protein 1-delta subunit	0,049302143	0,36180834
P30041	Antioxidant protein 2	0,000611677	0,35524926
O75340	Programed cell death protein 6	1,72192E-05	0,35388633
Q14839	Chromodomain helicase-DNA-binding protein 4	0,041879884	0,349098
P31930	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein	0,042164414	0,34730527
O00151	PDZ and LIM domain protein 1	0,002865363	0,34548714
Q07021	Complement component 1-Q subcomponent binding protein	0,007004773	0,34470064
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	1,04753E-06	0,34280884
P21107	Tropomyosin 5- cytoskeletal type	0,035026849	0,33346185
Q63120	Canalicular multispecific organic anion transporte	0,007012062	0,32066553
O19048	Poly(rC)-binding protein 1	0,043959558	0,30997492
Q92804	TATA-binding protein associated factor 2N	0,053754201	0,30941017
P12861	Heat shock protein 83	4,51377E-05	0,30810542
O09175	Aminopeptidase B	0,015829879	0,30636901
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	0,001087072	0,29208037
P05314	Ferredoxin--nitrite reductase- chloroplast precurs	0,045114455	0,29019699
P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,05070868	0,28791026
P23116	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,01842963	0,28381136
Q12263	Serine/threonine-protein kinase GIN4	0,007449714	0,28057093
P20290	Transcription factor BTF3	0,046509803	0,27287945
P49411	Elongation factor Tu_ mitochondrial precursor	0,001181224	0,27153919
P48643	T-complex protein 1_ epsilon subunit	0,00156696	0,26908214
Q13838	Probable ATP-dependent RNA helicase p47	0,000527537	0,26530839
P00366	Glutamate dehydrogenase	0,039705185	0,260634
P01024	Complement C3 precursor	0,048376508	0,25908313
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	0,007484074	0,25590999
O35501	Stress-70 protein-mitochondrial precursor	0,028412731	0,25188811
Q9UG63	ATP-binding cassette- sub-family F	0,000448752	0,24800529
P32119	Peroxiredoxin 2	0,022122507	0,24627218

Q13561	Dynactin complex 50 kDa subunit	0,002011336	0,24066992
P13928	Annexin A8	0,001191417	0,23743242
P17931	Galectin-3	0,008264852	0,23618414
P07226	Tropomyosin_ fibroblast non-muscle type	0,004083645	0,23064942
P19012	Keratin_ type I cytoskeletal 15	0,000124251	0,21881085
P09211	Glutathione S-transferase P	0,000847324	0,21187621
P23152	Splicing factor_ arginine/serine-rich 3	0,007163201	0,20982048
P20810	Calpain inhibitor	0,009795136	0,20831618
P21397	Amine oxidase	0,014425843	0,2013033
P27176	RNA-directed RNA polymerase	7,61535E-05	0,18557481
P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	0,000496604	0,18547922
P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosy	0,010017636	0,17659042
P42765	3-ketoacyl-CoA thiolase-mitochondrial	0,027707789	0,17358901
Q92355	Hypothetical 192.5 kDa protein	0,00932171	0,17227318
Q04695	Keratin_ type I cytoskeletal 17	0,004408002	0,1666026
P07099	Epoxide hydrolase 1	0,000789767	0,16351574
O14773	Tripeptidyl-peptidase I precursor	0,000191989	0,16021945
O00159	Myosin Ic	0,000133288	0,15793638
Q9NQC3	Reticulon 4	0,002814709	0,15744011
P50416	Carnitine O-palmitoyltransferase I-mitochondrial	0,000805675	0,15616254
P50140	Chaperonin homolog HSP60- mitochondrial precursor	0,005198483	0,15589255
P34955	Alpha-1-antiproteinase precursor	0,001377127	0,15006
P19028	POL polyprotein	0,001064834	0,14925817
O43896	Kinesin-like protein KIF1C	0,002236735	0,14206048
P10253	Lysosomal alpha-glucosidase precursor	0,000939547	0,13759888
P45973	Chromobox protein homolog 5	3,52964E-05	0,12588818
P21912	Succinate dehydrogenase	0,003823016	0,12116628
P25375	Saccharolysin	0,003034272	0,11597766
O43291	Kunitz-type protease inhibitor 2 precursor	0,000124382	0,11218663
Q99613	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,000361743	0,10731459
Q15293	Reticulocalbin 1 precursor	0,010985153	0,06214101
P42330	Probable trans-1-2-dihydrobenzene-1	3,21135E-05	0,06064293
P19367	Hexokinase_ type I	3,48981E-05	0,05013825

**EK 5:** Negatif Kontrol Uygulanmış MCF-12A ve MCF-12A Kontrol Gruplarının Kıyaslanmasına Ait Proteinlerin İsimleri ve Bilgileri

Kimlik	Protein	p Değeri	Kat Değişimi
P48673	Vimentin beta	0,015941684	9,352583565
P05165	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain_ mitochondrial	0,004439028	8,911778293
Q9Y3F4	UNR-interacting protein	0,022758649	6,87106671



O00217	NADH-ubiquinone oxidoreductase	0,026894129	6,171698697
P36542	ATP synthase gamma chain- mitochondrial precursor	0,020161554	5,562914965
O00154	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	0,000320289	5,158295339
P02786	Transferrin receptor protein 1	0,002970485	4,273109333
P50311	Phosphoglycerate kinase	0,016431999	4,15964746
P24821	Tenascin precursor	0,05360978	4,070210024
P25388	Guanine nucleotide-binding protein	0,000849741	3,999386844
Q16881	Thioredoxin reductase	0,000422088	3,874471294
P52292	Importin alpha-2 subunit	0,021194706	3,839024861
Q01233	Heat shock 70 kDa protein	0,045281443	3,798840124
P23786	Carnitine O-palmitoyltransferase II- mitochondrial	0,003377842	3,756613102
O67323	Alanyl-tRNA synthetase	0,049994053	3,636452837
Q01650	Large neutral amino acids transporter small subunit	0,00685803	3,521285302
O70736	DNA polymerase	0,040211278	3,309621088
P21851	Adapter-related protein complex 2 beta 1 subunit	0,032967035	3,233916772
Q13153	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	0,019125297	2,844096616
P23131	60S ribosomal protein L23	0,000890757	2,822142143
O00299	Chloride intracellular channel protein 1	0,000251374	2,642468131
P00491	Purine nucleoside phosphorylase	0,043060888	2,621854252
Q15257	Protein phosphatase 2A-regulatory subunit B'	0,011287678	2,594775391
P50897	Palmitoyl-protein thioesterase precursor	0,05455968	2,577584638
P34574	Probable clathrin heavy chain	0,007690264	2,49729231
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosy	0,011106206	2,432046982
P17922	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	0,015617038	2,332589558
P37039	NADPH-cytochrome P450 reductase	0,033546834	2,302033678
P48515	Translation initiation factor IF-2	0,030367271	2,245330131
P17210	Kinesin heavy chain	0,001178078	2,21852821
Q14126	Desmoglein 2 precursor	0,000393785	2,022454363
Q9Y6M9	NADH-ubiquinone oxidoreductase B22 subunit	0,016231568	2,003745307
P08515	Glutathione S-transferase 26 kDa	2,02848E-05	1,807841941
Q02952	A-kinase anchor protein 12	0,010310027	1,796088091
O75367	Core histone macro-H2A.1	0,004634701	1,767223365
P48819	Vitronectin precursor	0,004924549	1,753504529
P36189	Fatty acid synthase	0,042000388	1,741469675
P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosy	0,010802284	1,715511002
Q15029	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein compone	0,036112908	1,694836086
O42184	Restin	0,031033524	1,641677325
P35613	Basigin precursor	0,003231604	1,604223905
P47985	Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur	0,00314248	1,528654877

P49006	MARCKS-related protein	0,027240422	1,48412984
Q13310	Polyadenylate-binding protein 4	0,000544432	1,443963814
Q9C0A0	Contactin associated protein-like 4 precursor	0,03580833	1,420520016
O67125	DNA polymerase III alpha subunit	0,035701678	1,412999152
Q24368	Iswi protein	0,009017913	1,402735197
P16152	Carbonyl reductase [NADPH]	0,030956277	0,603071851
P31691	ADP-ATP carrier protein-mitochondrial precursor	0,02055016	0,601127706
P00403	Cytochrome c oxidase polypeptide II	0,002970304	0,599296024
P00441	Superoxide dismutase	0,005176582	0,593632546
P04406	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-liver	0,037330357	0,582212225
P53451	T-complex protein 1-delta subunit	0,042305358	0,562254676
P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,031363396	0,559405326
P55060	Importin-alpha re-exporter	0,022592105	0,544524236
O62768	Thioredoxin reductase	0,037210507	0,536362703
P27715	Phorbol ester/diacylglycerol-binding protein unc-1	0,000922273	0,536315566
Q08156	Mast/stem cell growth factor receptor precursor	0,033348014	0,515870328
P25375	Saccharolysin	0,038385695	0,514897207
P10809	60 kDa heat shock protein- mitochondrial precursor	0,002388793	0,512935639
Q15019	Septin 2	0,005457133	0,510936118
O13287	6-phosphogluconate dehydrogenase-decarboxylating	0,019321367	0,504251417
Q13838	Probable ATP-dependent RNA helicase p47	0,002262888	0,502649128
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	0,018631852	0,495376858
O60664	Cargo selection protein TIP47	0,010663646	0,492725251
P13668	Stathmin	0,025046083	0,491459332
P22359	Chaperone protein htpG	0,023026451	0,490090931
O15382	Branched-chain amino acid aminotransferase-mitoch	0,04721076	0,486687066
Q92804	TATA-binding protein associated factor 2N	0,024014005	0,485945948
P11047	Laminin gamma-1 chain precursor	0,002428916	0,485178972
P05659	Myosin II heavy chain- non muscle	2,2881E-06	0,480228972
P51659	Estradiol 17 beta-dehydrogenase 4	0,027304292	0,474096159
P05141	ADP-ATP carrier protein-fibroblast isoform	0,001882707	0,46988136
P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	0,032249134	0,455456322
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	0,00180746	0,447539584
O67124	Probable DNA double-strand break repair	0,033863005	0,434824615
P22695	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein	0,000539536	0,434757997
P34537	Hypothetical 97.1 kDa protein R05D3.4 in chromosom	0,010575685	0,432794601
Q15356	Small nuclear ribonucleoprotein F	0,041084299	0,423632092
Q07021	Complement component 1	0,035869674	0,419653594
P50140	Chaperonin homolog HSP60-mitochondrial	0,017118663	0,419245895

	precursor		
P21397	Amine oxidase	0,00025363	0,41913808
P30101	Protein disulfide isomerase A3 precursor	0,000316181	0,41649827
P09211	Glutathione S-transferase P	0,017394094	0,4076411
Q9UG63	ATP-binding cassette-sub-family F- member 2	0,033497541	0,406615952
O15067	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	0,020374872	0,40275526
P12861	Heat shock protein 83	0,049020435	0,386260673
P78347	General transcription factor II-I	0,042005979	0,382991485
P32119	Peroxiredoxin 2	0,019622838	0,371071092
P05314	Ferredoxin--nitrite reductase-chloroplast precurs	0,038215596	0,363811653
Q13423	NAD(P) transhydrogenase-mitochondrial precursor	0,005397742	0,361697348
P49649	Preprotein translocase secA subunit	0,035054956	0,360301729
P30041	Antioxidant protein 2	0,050754884	0,355666787
P48735	Isocitrate dehydrogenase	0,012038813	0,332151254
P02769	Serum albumin precursor	0,016838382	0,330846906
P28799	Granulins precursor	0,00922322	0,328929414
Q04695	Keratin-type I cytoskeletal 17	0,049688162	0,324341017
P21872	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosin	0,005331379	0,321800393
P11476	Ras-related protein Rab-1A	0,030828492	0,306325025
P42655	14-3-3 protein epsilon	0,001214673	0,294976311
Q12263	Serine/threonine-protein kinase	0,027302437	0,294662885
Q07590	SAV protein	0,005526125	0,277761395
Q9UZC8	DNA double-strand break repair rad50 ATPase	0,000931865	0,262212446
O75340	Programed cell death protein 6	0,030114396	0,261169101
O60437	Periplakin	0,013266774	0,254205332
P34955	Alpha-1-antiproteinase precursor	0,043177859	0,242887786
O43684	Mitotic checkpoint protein	0,026340027	0,242805056
P27176	RNA-directed RNA polymerase	0,000118679	0,241325104
P48643	T-complex protein 1-epsilon subunit	0,000648491	0,240719767
Q13561	Dynactin complex 50 kDa subunit	0,002433613	0,238646579
Q14956	Putative transmembrane protein NMB precursor	0,004091169	0,236903203
P13010	ATP-dependent DNA helicase II-80 kDa subunit	0,036306682	0,236861131
P17980	26S protease regulatory subunit 6A	0,011170088	0,231024858
P35875	Poly [ADP-ribose] polymerase	1,63816E-06	0,227946365
Q03184	Succinyl-CoA ligase	0,010274845	0,22717228
P22307	Nonspecific lipid-transfer protein-mitochondrial	0,046864888	0,217010314
Q99439	Calponin H2-smooth muscle	0,015892739	0,202302644
P19028	POL polyprotein	0,007691186	0,198378154
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase-1	0,009388766	0,194021666
P16525	DNA replication terminus site-binding protein	0,020698845	0,193242118

P49411	Elongation factor	6,64636E-05	0,192061529
P29312	14-3-3 protein zeta/delta	0,005482238	0,183263018
P31350	Ribonucleoside-diphosphate reductase M2	0,002463291	0,181114852
P13639	Elongation factor 2	0,004125572	0,176733723
P21912	Succinate dehydrogenase	0,01154137	0,17588766
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	0,002673393	0,171722544
P80724	Brain acid soluble protein 1	0,022379065	0,169223911
Q01581	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase-cytoplasmic	0,009417767	0,16620686
P41252	Isoleucyl-tRNA synthetase- cytoplasmic	0,00255596	0,154869387
O60568	Procollagen-lysine-2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	0,000149769	0,150503365
P34991	Cyclin A/CDK2-associated protein p19	0,00080003	0,142980132
P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosy	0,008547816	0,139796779
P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase-cytoplasmic	0,000187846	0,135379351
Q9USI6	Myosin type II heavy chain 1	0,006812604	0,132000863
P40925	Malate dehydrogenase-cytoplasmic	0,001008539	0,131026787
P45973	Chromobox protein homolog 5	5,33926E-05	0,11509176
O00151	PDZ and LIM domain protein 1	0,000532857	0,102078399
P07099	Epoxide hydrolase 1	0,000142917	0,087944967
O75390	Citrate synthase- mitochondrial precursor	0,002106218	0,085952211
P23116	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,006571716	0,038968545
P17075	40S ribosomal protein S20	0,001969824	0,030236998
Q99460	26S proteasome regulatory subunit S1	0,000349715	0,017515664

## EK 6: David Analizi Sonuçları

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 4.05	G		Count	P_Value	Benjamini
GOTERM_MF_DIRECT	<a href="#">cadherin binding involved in cell-cell adhesion</a>	RT			8	2.2E-5	1.2E-3
GOTERM_CC_DIRECT	<a href="#">cell-cell adherens junction</a>	RT			8	2.7E-5	1.5E-3
GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">cell-cell adhesion</a>	RT			6	1.2E-3	1.6E-1
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 2.12	G		Count	P_Value	Benjamini
GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">translational initiation</a>	RT			5	7.3E-4	1.4E-1
UP_KEYWORDS	<a href="#">Protein biosynthesis</a>	RT			4	6.0E-3	1.4E-1
UP_KEYWORDS	<a href="#">Initiation factor</a>	RT			3	8.8E-3	1.7E-1
GOTERM_MF_DIRECT	<a href="#">translation initiation factor activity</a>	RT			3	1.4E-2	3.7E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">RNA transport</a>	RT			4	4.8E-2	9.8E-1
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 1.64	G		Count	P_Value	Benjamini
GOTERM_CC_DIRECT	<a href="#">vesicle</a>	RT			7	1.3E-6	1.1E-4
GOTERM_CC_DIRECT	<a href="#">focal adhesion</a>	RT			7	6.7E-4	2.2E-2
UP_KEYWORDS	<a href="#">Cell projection</a>	RT			4	2.6E-1	8.5E-1
UP_KEYWORDS	<a href="#">Cell membrane</a>	RT			7	8.0E-1	1.0E0
GOTERM_CC_DIRECT	<a href="#">plasma membrane</a>	RT			10	8.3E-1	1.0E0
UP_KEYWORDS	<a href="#">Membrane</a>	RT			13	9.8E-1	1.0E0
Annotation Cluster 4		Enrichment Score: 1.09	G		Count	P_Value	Benjamini
GOTERM_CC_DIRECT	<a href="#">mitochondrion</a>	RT			10	9.5E-3	1.1E-1
UP_SEQ_FEATURE	<a href="#">transit peptide:Mitochondrion</a>	RT			4	1.2E-1	1.0E0
UP_KEYWORDS	<a href="#">Transit peptide</a>	RT			4	1.4E-1	7.4E-1
UP_KEYWORDS	<a href="#">Mitochondrion</a>	RT			5	2.9E-1	8.6E-1
Annotation Cluster 5		Enrichment Score: 0.76	G		Count	P_Value	Benjamini
UP_KEYWORDS	<a href="#">Helicase</a>	RT			3	4.7E-2	4.4E-1
UP_SEQ_FEATURE	<a href="#">nucleotide phosphate-binding region:ATP</a>	RT			6	1.0E-1	1.0E0
INTERPRO	<a href="#">P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase</a>	RT			5	2.0E-1	1.0E0
UP_KEYWORDS	<a href="#">ATP-binding</a>	RT			6	2.5E-1	8.7E-1
UP_KEYWORDS	<a href="#">Nucleotide-binding</a>	RT			7	2.7E-1	8.5E-1
GOTERM_MF_DIRECT	<a href="#">ATP binding</a>	RT			6	4.6E-1	1.0E0
Annotation Cluster 6		Enrichment Score: 0.13	G		Count	P_Value	Benjamini
GOTERM_CC_DIRECT	<a href="#">extracellular space</a>	RT			7	1.6E-1	7.5E-1
UP_KEYWORDS	<a href="#">Disulfide bond</a>	RT			8	7.5E-1	1.0E0
GOTERM_CC_DIRECT	<a href="#">extracellular region</a>	RT			4	8.3E-1	1.0E0
UP_KEYWORDS	<a href="#">Secreted</a>	RT			4	8.7E-1	1.0E0
UP_SEQ_FEATURE	<a href="#">disulfide bond</a>	RT			6	8.7E-1	1.0E0
UP_SEQ_FEATURE	<a href="#">glycosylation site:N-linked (GlcNAc...)</a>	RT			6	9.9E-1	1.0E0
UP_KEYWORDS	<a href="#">Glycoprotein</a>	RT			6	9.9E-1	1.0E0
UP_SEQ_FEATURE	<a href="#">signal peptide</a>	RT			4	9.9E-1	1.0E0
UP_KEYWORDS	<a href="#">Signal</a>	RT			5	9.9E-1	1.0E0
Annotation Cluster 7		Enrichment Score: 0.08	G		Count	P_Value	Benjamini
GOTERM_MF_DIRECT	<a href="#">DNA binding</a>	RT			6	5.6E-1	1.0E0
GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">regulation of transcription, DNA-templated</a>	RT			4	8.4E-1	1.0E0
UP_KEYWORDS	<a href="#">Transcription regulation</a>	RT			4	9.3E-1	1.0E0
UP_KEYWORDS	<a href="#">Transcription</a>	RT			4	9.4E-1	1.0E0
GOTERM_BP_DIRECT	<a href="#">transcription, DNA-templated</a>	RT			3	9.8E-1	1.0E0
Annotation Cluster 8		Enrichment Score: 0	G		Count	P_Value	Benjamini
UP_SEQ_FEATURE	<a href="#">transmembrane region</a>	RT			3	1.0E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	<a href="#">Transmembrane helix</a>	RT			3	1.0E0	1.0E0
UP_KEYWORDS	<a href="#">Transmembrane</a>	RT			3	1.0E0	1.0E0

## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Adı, Soyadı;** Vildan Torun

<b>Doğum Yılı:</b>	05.01.1992
<b>Yazışma Adresi:</b>	Fatih Mahallesi, Mehtap Sokak, No:8/8 Pursaklar/ANKARA
<b>Telefon:</b>	05073664525
<b>Faks:</b>	-
<b>e-posta:</b>	vildantrn@gmail.com

## EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Haliç Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2015
Türkiye	Ankara Üniversitesi	Biyoteknoloji	Temel Biyoteknoloji	2019

## AKADEMİK MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Sassari Üniversitesi	İtalya	Sassari	Tıp, Cerrahi ve Deneysel Bilimler Anabilim Dalı- Deneysel Patoloji ve Onkoloji Laboratuvarı	Stajyer	01.10.2018/ 04.02.2019
Ankara Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Türkiye	Ankara	Biyokimya ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı	Stajyer	01.07.2012/ 01.08.2012

## YAYINLARI

### Yayınlanan Makedeler

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 Biology*. 1(1006): 1-4.

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

**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.

### **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.



## 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: 90-312-222-58-26-120; 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 ( $1 \times 10^4$ ) 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.

## 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