

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

EGFR ODAKLI MEME KANSERİ TEDAVİLERİNDE mikroRNA İFADESİNİN
BELİRLENMESİ

Emine Ezel Çilek

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Nisan

2017

ETİK BEYAN

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



Emine Ezel Çilek
İmzası

ONAY

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu danışmanlığında Emine Ezel ilek tarafından hazırlanan bu çalışma 24/04/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hakan Gürdal

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu (Danışman)

İmza:

Üye: Doç. Dr. Işık Yuluğ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Özgür şahin

İmza:

Üye: Doç. Dr. Erkan Yılmaz

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

EGFR Odaklı Meme Kanseri Tedavilerinde mikroRNA İfadesinin Belirlenmesi

Emine Ezel Çilek

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Meme kanseri kompleks moleküler mekanizmaya sahip, gelişmiş ülkelerde kadınlarda en fazla oranda görülen kanser türüdür. ERBB (EGFR) reseptör ailesine ait HER2 reseptörünün aşırı şekilde ifade edildiği alt tipin görüldüğü hasta oranı %30 civarında seyretmektedir. Bununla birlikte tedavide kullanılan odaklı terapilere (trastuzumab, lapatinib vb.) karşı direnç gelişimi büyük bir sorundur.

mikroRNA'ların (miRNA) keşfi ile birlikte meme kanserine katkı yapan ya da tam tersi hücre çoğalmasını sonlandıran pek çok miRNA'nın varlığı tespit edilmiştir. Yapılan son çalışmalarla miRNA'ların tedavi üzerine varlığına odaklanılmakta, tedavi sürecinde rol alabilecek alternatif hedef moleküller olarak kullanımları araştırılmaktadır. Bununla birlikte tedaviye duyarlı miRNA'ların hedef gen profili üzerinde detaylı analizine gidilmemiş, ilaç tedavilerinde etkiledikleri mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır.

Bu tez çalışmasında HER2 pozitif meme kanseri hücreleri BT-474 ve SK-BR-3'te trastuzumaba ve lapatinibe duyarlı miRNA'lar tespit edilmiş ve AGO2-IP analizi kullanılarak miRNA hedeflerinin detaylı analizi gerçekleştirilmiştir. Ek olarak trastuzumaba duyarlı miRNA'lar kullanılarak yapılan network (ağ) analizi sonucu ilaca duyarlı miRNA'lar tarafından kontrol edilen mekanizmaların varlığı sistemik seviyede araştırılmıştır.

2017, 251 sayfa

Anahtar Kelimeler: mikroRNA; meme kanseri; miRNA-miRNA network analizi; AGO2-IP; trastuzumab; lapatinib; SKBR3

ABSTRACT

PhD Thesis

microRNAs as Responsive Elements in Breast Cancer Cell Lines During EGFR Targeted Therapies

Emine Ezel Çilek

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Breast cancer is the most common cancer seen in women. It is a complex disease with different molecular subtypes and some certain receptors have an important role on its molecular classification as well as progression and treatment. HER-2/neu is one of these receptors, which is found to be overexpressed in 20-30% of the patients. It contributes to the progression and pathogenesis of the breast cancer. MicroRNAs (miRNAs) are endogenous non-coding RNAs in 21-25 nucleotides long. They regulate gene expression at the post-transcriptional level and miRNA deregulation is important in many pathological conditions including breast cancer. It is known that some miRNAs show oncogenic and tumor suppressor properties and they might also have effective roles in drug treatment by mediating gene regulation in cancer.

In this study, we aimed to identify miRNA-mediated mechanisms driven by the drug responsive miRNAs and their target genes in lapatinib and trastuzumab treatment. For this purpose, we first found out the drug responsive miRNAs and then we focused on their functional characterization by looking for their potential effects in breast cancer cell lines. We also performed an AGO2-IP experiment to pull down the targets of drug responsive miRNAs. In addition, we constructed miRNA-miRNA networks to figure out the miRNA-mediated mechanisms at systemic level in trastuzumab treatment.

2017, 251 pages

Keywords: microRNA; breast cancer; miRNA-miRNA network models; AGO2-IP; trastuzumab; lapatinib; SKBR3



Annem ve Babam için;

“Elbette ki bunlar kafanın içerisinde oluyor Harry, ama bu neden gerçek olmadığı anlamına gelsin ki?”

J.K. Rowling (Harry Potter ve Ateş Kadehi, Albus Dumbledore)

“Olanaksız elediğinde elinde kalan ihtimal dâhilindeki şey olmasa bile gerçeklerdir.”

Arthur Conan Doyle (Sherlock Holmes)

“Gerçek, hayal gücüne ait bir meseledir.”

Ursula K. Le Guin (Karanlığın Sol Eli)

TEŞEKKÜR

12 yıl süren macera ardından -müzmin bir Ankara Üniversite’li olarak- bu uzun maratону tamamlayabildiğim için çok mutluyum. Doktora tez projesi boyunca bana yardımcı olan, irili ufaklı destek veren herkese çok teşekkürler.

Öncelikle tez danışmanım Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu’na bu tez projesinin gerçekleşmesini sağladığı; işler yolunda gitmediğinde dahi pozitif şekilde destek olduğu; proje üzerine düşünmemi, araştırmamı motive ettiği ve kaynak yaratmaya çalıştığı için çok teşekkür ederim. Tez çalışması boyunca tez izleme komitesi üyeliğini yapan Prof. Dr. Hakan Gürdal ve Doç. Dr. Işık Yuluğ’a önerileri ve tavsiyeleri için teşekkür ediyorum. Ayrıca doktoram boyunca bana maddi destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri’ne (BAP) (Proje no: 14L0415001), L’Oreal Unesco Genç Bilim Kadınlarına Destek Programı’na TÜBİTAK-BİDEB 2211 Yurt İçi Doktora ve 2214 Yurt Dışı Doktora Tez Araştırma Programı’na teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmasının en kritik aşamasının tamamlanmasına katkı sağlayan Prof. Anke van den Berg ve Dr. Joost Kluiver’e gösterdikleri destek, ayırdıkları zaman, araştırma gruplarında bana yer verdikleri için çok teşekkür ediyorum. Özellikle AGO2-IP uygulamasının gerçekleşmesinde teknik bilgileri ile katkı sağlayan Bea Rutgers, Jasper Koerts ve Debora de Jong’a çok teşekkürler. Ayrıca tez çalışmasının biyoinformatik kısmının gerçekleşmesini sağlayan, network analizi ile katkısını ve dostluğunu asla esirgemeyen Hakime Öztürk’e çok teşekkür ediyorum.

Ek olarak; UMCG’de geçirdiğim süre içerisinde bilgileri, destekleri ve gösterdikleri dostluk için beraber çalıştığım arkadaşlarıma çok teşekkürler. Özellikle Yuan, Agnieszka, Melanie laboratuvarında yaptıkları tüm teknik yardımlar için; Nato, laboratuvarın dışında da ne zaman başım sıkışsa yanımda olduğu için; Mathilde ve Jennie, Hollanda hakkındaki yardımlar ve hoş sohbetler için teşekkürler. Reeny’e komşuluğu, ofis arkadaşlığı, dert ortaklığı ve her soruna içtenlikle yardım ettiği için; Hataitip’e tüm sohbetler, yemekler, yaz dönemini sağlıklı bir şekilde atlatmamı sağladığı ve çok uzaktayken bile yanımda olduğu için çok teşekkürler. Ayrıca Van Houtenlaan’da beraber kaldığım tüm arkadaşlarıma Groningen’in evim olmasını sağladıkları için teşekkür ediyorum. Özellikle Ruijie,

kilometrelerce öteden verdiği tüm moral ve destek için; Naomi, en zor ve yoğun dönemlerde yemeklerini ve sohbetlerini paylaştığı için; Fiona, veda yemeği ve tüm güzel organizasyonlar için çok teşekkürler.

İlaveten Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü çalışanlarına, alt laboratuvarında beraber çalıştığımız doktora öğrencisi arkadaşlara gösterdikleri destekler ve yardımlar için teşekkür ediyorum. Doktoranın en zorlu zamanlarını beraber geçirdiğim BGD Lab ekibine yine destekleri ile güzel çalışma ortamı için çok teşekkürler ve başarılar diliyorum.

Son olarak, en büyük teşekkürü annem Gülten Çilek'e etmek istiyorum. Bana hem anne hem baba olduğu, hayallerimi gerçekleştirmemi sağladığı, elinden gelen tüm desteği gösterdiği, en umutsuz anlarda bile umut verdiği için çok teşekkürler.



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
SİMGELER DİZİNİ	xxvi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
2.1. MEME KANSERİ	2
2.1.1. MEME KANSERİNİN HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRILMASI	2
2.1.2. MEME KANSERİNİN MOLEKÜLER SINIFLANDIRMASI	3
2.1.2.1. EGFR (ERBB) Reseptör Ailesi Üyeleri	5
2.1.2.2. EGFR (ERBB) Reseptörlerinin Yapısı ve Aktivasyonu	6
2.1.2.3. EGFR (ERBB) Reseptör Ailesi Sinyal Yolakları	7
2.1.2.4. EGFR (ERBB) Reseptör Ailesinin Meme Kanserinde Rolü	9
2.1.3. EGFR (ERBB) RESEPTÖR ODAKLI TERAPİLERİN MEME KANSERİNDE ÖNEMİ	11
2.1.3.1. Trastuzumab Etki Mekanizması	12

2.1.3.2. Lapatinib Etki Mekanizması	14
2.2. MİKRORNA'LAR VE KANSER.....	15
2.2.1. MİKRORNA'LARIN KEŞFİ.....	15
2.2.2. MİKRORNA'LARIN ADLANDIRILMASI.....	16
2.2.3. MEMELİLERDE MİKRORNA BİYOGENEZİ VE FONKSİYONU	17
2.2.3.1. mikroRNA'nın Sitoplazmada Geçirdiği İşlemler	19
2.2.4. MİKRORNA VE KANSER İLİŞKİSİ.....	20
2.2.4.1. Tümör Süpresör ve Onkogen Olarak mikroRNA'lar	20
2.2.4.2. Meme Kanseri ve mikroRNA İlişkisi	21
2.2.4.3. EGFR (ERBB) Reseptör Etkinliğinde mikroRNA'ların Rolü	22
2.2.4.4. mikroRNA'ların Terapötik Etkileri	22
2.2.4.4.1. EGFR (ERBB) Odaklı Terapilerde mikroRNA'lar	22
<u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u>	<u>24</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM</u>	<u>26</u>
4.1. MATERYAL.....	26
4.1.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	26
4.1.2. İLAÇ UYGULAMASI VE IC50 DEĞERLERİNİN TESPİT EDİLMESİ	27
4.1.3. WST-1 UYGULAMASI.....	27
4.1.4. RNA İZOLASYONU	27
4.1.5. miRNA MİKRODİZİN ANALİZİ.....	27
4.1.6. miRNA EŞ-ZAMANLI PZR YÖNTEMİ.....	27
4.1.7. DHARMACON miRNA MİMİC VE İNHİBİTÖRLER.....	29

4.1.8. LENTİVİRAL VEKTÖRLERİN KLONLANMASI	29
4.1.9. AGO2-IP UYGULAMASI	31
4.1.10. AGO2-IP UYGULAMASI ARDINDAN MİKRODİZİN YAPILMASI	31
4.2. YÖNTEM.....	32
4.2.1. TEZDE UYGULANAN YÖNTEMLER VE İZLENEN BASAMAKLAR	32
4.2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ İDAMESİ.....	33
4.2.3. TRASTUZUMAB VE LAPATİNİB IC ₅₀ DEĞERLERİNİN TESPİTİ.....	34
4.2.4. WST-1 UYGULAMASI İLE HÜCRE ÇOĞALMASININ TESPİTİ	35
4.2.5. HÜCRELERİN UYGUN İLAÇ DOZU İLE MUAMELESİ.....	36
4.2.6. İLAÇ UYGULAMASI ARDINDAN RNA İZOLASYONU	36
4.2.7. İLACA DUYARLI miRNA'LARIN MİKRODİZİN ANALİZİ İLE TESPİT EDİLMESİ	37
4.2.7.1. miRNA Mikrodizin Data Analizi	38
4.2.8. BİYOİNFORMATİK ANALİZ	39
4.2.8.1. İfade Değişikliği Gösteren miRNA'ların Biyoinformatik Analizi	39
4.2.8.2. Network Yapılandırması ve Network Görüntülenmesi	40
4.2.8.3. TCGA (The Cancer Genome Atlas) Data Analizi	41
4.2.8.4. GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) Zenginleştirme Analizi	42
4.2.8.5. Fonksiyonel Zenginleştirme ve Yolak Analizi	42
4.2.9. miRNA İFADELERİNİN EŞ-ZAMANLI RT-PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI.....	42
4.2.10. HÜCRELERİN miRNA MİMİC YA DA İNHİBİTÖRLER İLE TRANSFEKSİYONU	44
4.2.11. HÜCRELERİN LENTİVİRAL miRNA VEKTÖRLER İLE ENFEKSİYONU	45
4.2.11.1. Lentiviral miRNA Vektörlerin Dizaynı	46
4.2.11.2. Plazmid Vektörlerin Klonlanması ve Hazırlanması	48

4.2.11.3. Oligonükleotid Yapısındaki anti-mikroRNA sekansın (shRNA) Dilusyonu	49
4.2.11.4. miRZip Lentiviral Vektörlerin Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi ve İnsert ile Ligasyon	49
4.2.11.5. Kompetant Hücelere Kimyasal Transformasyonun Gerçekleştirilmesi	51
4.2.11.6. Koloni PZR.....	51
4.2.11.7. Vektörlerin Elde Edilmesi için Miniprep Yapılması	52
4.2.11.8. Vektörlerin Elde Edilmesi için Maxiprep Yapılması.....	53
4.2.12. LENTİVİRAL VEKTÖRLERİN HEK293T HÜCRELERİNDE ÇOĞALTILMASI VE MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN VİRÜS İLE ENFEKSİYONU	54
4.2.13. İLGİLİ miRNA'LARIN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ENFEKSİYONU VE FACS ANALİZİ.....	55
4.2.14. İLGİLİ miRNA'LAR İÇİN GFP COMPETITION ASSAY UYGULAMASI	55
4.2.15. İLGİLİ miRNA İFADESİ SUSTURULDUKTAN SONRA APOPTOZİS TESTİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ	56
4.2.16. İLGİLİ miRNA İFADESİNİN SUSTURULDUĞU HÜCRELERDE YARA İYİLEŞME DENEYİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ	57
4.2.17. İLGİLİ miRNA'LARIN SUSTURULDUĞU HÜCRELERDE HÜCRE SIKLUSU TESTİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ	57
4.2.18. AGO2-IP UYGULAMASI	58
4.2.18.1. AGO2-IP Örneklerinden RNA İzolasyonu	61
4.2.18.2. AGO2-IP Örneklerinden Western Blot Yapılması	61
4.2.18.3. AGO2-IP Örneklerinden mRNA Mikrodizin Profillemesi	62
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI</u>	66
5.1. TRASTUZUMAB VE LAPATİNİB IC50 DEĞERLERİNİN TESPİT EDİLMESİ	66

5.2. İLAÇ UYGULAMASI ARDINDAN RNA İZOLASYONU	72
5.3. LAPATİNİBE VE TRASTUZUMABA DUYARLI miRNA'LARIN Mikrodizin Analizi İLE TESPİTİ.....	75
5.4. İFADE DEĞİŞİKLİĞİ GÖSTEREN miRNA'LARIN Biyoinformatik Analizi.....	82
5.5. miRNA İFADELERİNİN EŞ-ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI.....	83
5.6. HSA-miR-345 VE HSA-miR-449A'NIN SKBR3 HÜCRELERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI İÇİN MİMİC VE İNHİBİTÖR İLE TRANSFEKSİYONU.....	87
5.7. SKBR3 HÜCRELERİNİN HSA-miR-449A, HSA-miR-345 VE NT1 miRZip VEKTÖRLERİ İLE ENFEKSİYONU	91
5.7.1. miRZip VEKTÖRLERİNİN RESTRIKSİYON ENZİMLERİ KESİLMESİ VE LİGASYON	92
5.7.2. LİGASYON ARDINDAN KOMPETANT HÜCRELERDE TRANSFORMASYONUN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ VE KOLONİ PZR	94
5.7.3. miRZip449A VEKTÖRÜ İÇİN MINİPREP UYGULAMASI	95
5.7.4. miRZip449A VE miRZip345 İÇİN MAXİPREP UYGULAMASI	96
5.7.5. miRZip345, miRZip449A VE NT1 İLE SKBR3 HÜCRELERİNİN FARKLI HACİMLERDE ENFEKSİYONU.....	97
5.8. SKBR3 HÜCRELERİNDE miRZip345, miRZip449A VE NT2 İÇİN GFP COMPTETİON ASSAY UYGULAMASI.....	108
5.9. SKBR3 HÜCRELERİNDE miRZip345, miRZip449A VE NT1 ENFEKSİYONU ARDINDAN APOPTOZİS TESTİ.....	112
5.10. SKBR3 HÜCRELERİNDE miRZip345, miRZip449A VE NT1 ENFEKSİYONUNUN ARDINDAN YARA İYİLEŞME DENEYLERİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ.....	119
5.11. SKBR3 HÜCRELERİNDE miRZip345, miRZip449A VE NT1 ENFEKSİYONU ARDINDAN HÜCRE SİKLUSU TESTİ.....	121
5.12. HSA-miR-449A VE HSA-miR-345 İFADESİNİN MEME KANSERİ DOKULARINDA ARAŞTIRILMASI.....	126

5.13. miRZip345, miRZip449A VE NT1 ENFEKSİYONU ARDINDAN SKBR3 HÜCRELERİNDE AGO2-IP UYGULAMASI.....	127
5.13.1. AGO2-IP UYGULAMASI İÇİN RNA İZOLASYONU	130
5.13.2. AGO2-IP UYGULAMASI İÇİN WESTERN BLOT YAPILMASI	131
5.13.3. miRZip345, miRZip449A VE NT1 İÇİN AGO2-IP SONRASI MİKRODİZİN UYGULAMASI.....	132
5.13.4. NT1, miRZip449A VE miRZip345'E AİT IP FRAKSİYONUNDA ZENGİNLEŞMİŞ GENLER	139
5.13.5. HSA-miR-449A VE HSA-miR-345'E AİT OLASI HEDEF GENLER İÇİN YOLAK ANALİZİ	166
5.13.6. NT1 VE miRZip VEKTÖRLERİNE AİT IP FRAKSİYONLARINDA İLGİLİ miRNA ZENGİNLEŞMESİNİN KONTROLÜ	169
5.14. TRASTUZUMABA DUYARLI miRNA'LAR KULLANILARAK NETWORK ANALİZİ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ	171
5.14.1. TRASTUZUMABA DUYARLI miRNA'LAR TARAFINDAN EN ÇOK HEDEFLenen GENLER	172
5.14.2. TRASTUZUMAB UYGULAMASI SONRASI FONKSİYONEL OLARAK BAĞLANTILI miRNA ÇİFTLERİ.....	175
5.14.3. miRNA-miRNA NETWORKLERİ İÇİN KÜMELEŞME ANALİZİ.....	177
<u>6. TARTIŞMA VE SONUC.....</u>	182
6.1. TARTIŞMA	182
6.1.1. TRASTUZUMAB VE LAPATİNİB UYGULAMASI ARDINDAN miRNA İFADE ANALİZİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	183
6.1.2. EŞ ZAMANLI PZR İLE DOĞRULANAN miRNA'LAR.....	183
6.1.3. HSA-miR-345'İN VE HSA-miR-449A'IN SKBR3 HÜCRELERİNDE ETKİNLİĞİ	185
6.1.4. AGO2-IP SONRASI ELDE EDİLEN HEDEF GEN PROFİLİNİN ANALİZİ	186

6.1.5. TRASTUZUMAB DUYARLI miRNA'LAR KULLANILARAK OLUŞTURULAN miRNA-miRNA NETWORK MODELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	187
6.1.5.1. Trastuzumaba Duyarlı miRNA'lar Tarafından En çok Hedeflenen Genler.....	187
6.1.5.2. Trastuzumaba Duyarlı ve Fonksiyonel Olarak İlişkili miRNA-miRNA Çiftleri	188
6.1.5.3. miRNA-miRNA Networkleri İçin Kümeleşme Analizi.....	189
6.2. SONUÇ.....	191
<u>7. KAYNAKLAR.....</u>	<u>193</u>
<u>8. EKLER.....</u>	<u>206</u>
<u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>247</u>
<u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>250</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Normal ve kanserli meme dokusunun anatomisi	3
Şekil 2.2. Gen ifadelerine göre tümörlerin 5 ayrı grup içinde toplandığı gösteren dendrogram	4
Şekil 2.3. Meme kanserinin moleküler alt tipleri	5
Şekil 2.4. ERBB reseptörleri ve ligandları.....	6
Şekil 2.5. ERBB reseptör ailesinin aktivasyonu.....	7
Şekil 2.6. HER2 aktivasyonu ve etkilediği sinyal yolları.....	9
Şekil 2.7. EGFR reseptör odaklı terapilerin etkinlik şekli.	11
Şekil 2.8. EGFR odaklı terapilerin etkinlik gösterme şekilleri ve ilaca karşı direnç gelişme yolları.	13
Şekil 2.9. Lapatinib etki mekanizması	15
Şekil 2.10. Memelilerde miRNA biyogenezinin transkripsiyon aşaması ve farklı yolları ..	18
Şekil 2.11 miRNA etkinliğini anlatan modeller.	19
Şekil 4.1 Tez çalışmasında izlenen basamaklar	33
Şekil 4.2. IC50 değerlerinin hesaplanması için uygulanan ilaç konsantrasyonları	35
Şekil 4.3 İlaça duyarlı miRNA'ların hedef analizi gerçekleştirilirken kullanılan veri tabanları ve izlenen yol.	40
Şekil 4.4 Kullanılan network modeli örneği.	41
Şekil 4.5 Olgun miRNA'ların eş zamanlı RT-PZR (Reverz transkripsiyon) basamağı ile cDNA'ya çevrilmesi ve ardından ifadelerinin tespiti (Qiagen'den adapte edilmiştir)	43

Şekil 4.6 Örnek Dharmacon miRIDIAN miRNA inhibitör dizaynı (Dharmacon'dan adapte edilmiştir)	45
Şekil 4.7 Lentiviral pmiRZIP vektör yapısı. (SBI'dan adapte edilmiştir)	47
Şekil 4.8 miRZip vektörlerin örnek etkinlik gösterme şekli (SBI'dan adapte edilmiştir) ...	47
Şekil 4.9 miRZip tasarımının detaylı yapısı (SBI'dan adapte edilmiştir).....	48
Şekil 4.10 Yara iyileşme deneyinin takibi ve zamanlaması.....	57
Şekil 4.11 AGO2-IP uygulaması için meme kanseri hücrelerinde miRZip449a ve NT2 (negatif kontrol) ile yapılan enfeksiyon.	59
Şekil 4.12 AGO2-IP uygulaması için meme kanseri hücrelerinde miRZip345 ve NT1 (negatif kontrol) ile yapılan enfeksiyon.	59
Şekil 4.13 miRZip vektörleri için mikrodizin analizi ve hedef mRNA profilinin bulunması	64
Şekil 4.14 miRZip vektörleri için mikrodizin analizi.	65
Şekil 5.1 BT474 hücrelerinde trastuzumab uygulaması sonrası OD-konsantrasyon eğrisi.	67
Şekil 5.2 BT474 hücrelerinde trastuzumab uygulaması sonrası % canlılık değerleri.	67
Şekil 5.3 SKBR3 hücrelerinde trastuzumab uygulaması sonrası OD-konsantrasyon eğrisi.	68
Şekil 5.4 SKBR3 hücrelerinde trastuzumab uygulaması sonrası % canlılık değerleri.	68
Şekil 5.5 BT474 hücrelerinde lapatinib uygulaması sonrası OD-konsantrasyon eğrisi.	70
Şekil 5.6 BT474 hücrelerinde lapatinib uygulaması sonrası % canlılık değerleri.	70
Şekil 5.7 SKBR3 hücrelerinde lapatinib uygulaması sonrası OD-konsantrasyon eğrisi.	71

Şekil 5.8 SKBR3 hücrelerinde lapatinib uygulaması sonrası % canlılık değerleri.	71
Şekil 5.9 Trastuzumab uygulaması sonrası elde edilen ve mikrodizin analizinde kullanılan RNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.	73
Şekil 5.10 Lapatinib uygulaması sonrası elde edilen ve mikrodizin analizinde kullanılan SKBR3 RNA'larının %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.	74
Şekil 5.11 Lapatinib uygulaması sonrası elde edilen ve mikrodizin analizinde kullanılan BT474 RNA'larının %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.	74
Şekil 5.12 İstatiksel olarak anlamlı ifade değişikliği gösteren ve mikrodizin ifadesi doğrulanan trastuzumaba duyarlı miRNA'lar..	85
Şekil 5.13 İstatiksel olarak anlamlı ifade değişikliği gösteren ve mikrodizin ifadesi doğrulanan lapatinibe duyarlı miRNA'lar.....	86
Şekil 5.14 İstatiksel olarak anlamlı ifade değişikliği gösteren miRNA'ların ortalama Cp değerleri.....	86
Şekil 5.15 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 ifadesinin SKBR3 hücrelerinde 48 saat boyunca inhibisyonu sonucu elde edilen normalize OD değerleri.	88
Şekil 5.16 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 ifadesinin SKBR3 hücrelerinde 48 saat boyunca inhibisyonu sonucu elde edilen % canlılık değerleri.	89
Şekil 5.17 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 ifadesinin SKBR3 hücrelerinde 48 saat boyunca mimic uygulaması sonucu elde edilen normalize OD değerleri.	90
Şekil 5.18 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 ifadesinin SKBR3 hücrelerinde 48 saat boyunca mimic uygulaması sonucu elde edilen canlılık oranları.	91
Şekil 5.19 Ligasyon için kullanılacak olan boş miRZip vektörünün hazırlanması.	93
Şekil 5.20 miRZip449a için transformasyon ardından koloni PZR gerçekleştirilmesi ve %1'lik agaroz jelde 90 V 30 dakika yürütüldükten sonra elde edilen görüntü.	94

Şekil 5.21 miRZip449a için miniprep ardından agaroz jelde yürütme.....	95
Şekil 5.22 miRZip449a vektörlerine ait maxiprep görüntüsü.....	96
Şekil 5.23 miRZip345 vektörlerine ait maxiprep görüntüsü.....	97
Şekil 5.24 SKBR3 hücre kontrol FACS analiz sonuçları.....	99
Şekil 5.25 SKBR3 miRZip345 50 µl ve 250 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları.....	100
Şekil 5.26 SKBR3 miRZip345 750 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları.....	101
Şekil 5.27 SKBR3 miRZip449a 50 µl ve 250 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları.....	102
Şekil 5.28 SKBR3 miRZip449a 750 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları.....	103
Şekil 5.29 SKBR3 NT1 50 µl ve 250 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları.....	104
Şekil 5.30 SKBR3 NT1 750 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları.....	105
Şekil 5.31 SKBR3 NT2 50 µl ve 250 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları.....	106
Şekil 5.32 SKBR3 NT2 750 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları.....	107
Şekil 5.33 SKBR3 hücrelerinde GFP competition assay uygulaması ve normalize GFP değerleri.....	109
Şekil 5.34 SKBR3 hücrelerinde GFP competition assay uygulamasında kullanılan birinci biyolojik tekrara ait GFP ve hücre canlılık oranları.....	110

Şekil 5.35 SKBR3 hücrelerinde GFP competition assay uygulamasında kullanılan ikinci biyolojik tekrara ait GFP ve hücre canlılık oranları	111
Şekil 5.36 SKBR3 hücrelerinde GFP competition assay uygulamasında kullanılan üçüncü biyolojik tekrara ait GFP ve hücre canlılık oranları	112
Şekil 5.37 SKBR3 hücrelerinde apoptozis testi sırasında kullanılan annexin V boyanmayan hücre kontrol.....	114
Şekil 5.38 SKBR3 hücrelerinde apoptozis testi sırasında kullanılan ve annexin V ile boyanan hücre kontrol.....	115
Şekil 5.39 SKBR3 hücrelerinde miRZip345 ile 8. enfeksiyon günü yapılan apoptozis testi.	116
Şekil 5.40 SKBR3 hücrelerinde miRZip449a ile 8. enfeksiyon günü yapılan apoptozis testi.	117
Şekil 5.41 SKBR3 hücrelerinde NT1 ile 8. enfeksiyon günü yapılan apoptozis testi.	118
Şekil 5.42 SKBR3 hücrelerinde miRZip345, miRZip449a ve NT1 enfeksiyonu ardından yapılan apoptozis testi sonuçları.	119
Şekil 5.43 miRZip345, miRZip449a, NT1 ve hücre kontrol (HK) için SKBR3 hücrelerinde yara iyileşme deneyi.....	120
Şekil 5.44 miRZip345, miRZip449a, NT1 ve hücre kontrol (HK) için SKBR3 hücrelerinde yara iyileşme deneyi sonuçları	121
Şekil 5.45 SKBR3 hücrelerinde hücre siklusu testi ve hücre kontrol analizi.	123
Şekil 5.46 SKBR3 hücrelerinde hücre siklusu testi ve NT1 kontrol analizi.	123
Şekil 5.47 SKBR3 hücrelerinde hücre siklusu testi ve NT1 kontrol analizi.....	124
Şekil 5.48 SKBR3 hücrelerinde hücre siklusu testi ve NT1 kontrol analizi.	125
Şekil 5.49 SKBR3 hücrelerinde hücre siklusu testi sonrası faz oranları.	126

Şekil 5.50 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345'in TCGA (The Cancer Genomic Atlas) meme kanseri miRNA-seq ekspresyon datasında bulunan ortalama ifadeleri	127
Şekil 5.51 SKBR3 hücrelerinde AGO2-IP uygulaması öncesi miRZip345, miRZip449a ve NT1 enfeksiyonları ardından FACS sonuçları	129
Şekil 5.52 AGO2-IP sonrası miRZip449a, miRZip345 ve NT1 için western blot görüntülemeleri	131
Şekil 5.53 AGO2-IP sonrası hücre kontrol AGO2 ve IgG örnekleri için western blot görüntülemeleri	132
Şekil 5.54 NT1 IP ilk ve ikinci tekrarları ile miRZip345 IP birinci teknik tekrar, miRZip449a IP birinci teknik tekrar örneklerine ait cRNA jel görüntüleri	133
Şekil 5.55 miRZip345 IP ve miRZip449a IP ikinci teknik tekrar örneklerine ait cRNA jel görüntüleri	133
Şekil 5.56 miRZip345, NT1 ve miRZip449a total birinci ve ikinci teknik tekrar örneklerine ait cRNA jel görüntüleri	134
Şekil 5.57 miRZip345 örneklerine ait normalizasyon sonuçları	135
Şekil 5.58 NT1 örneklerine ait normalizasyon sonuçları	136
Şekil 5.59 miRZip449a ve NT1 örneklerine ait korelasyon sonuçları	137
Şekil 5.60 NT1 ve miRZip449a IP fraksiyonunda zenginleşen genlerin karşılaştırılması.	138
Şekil 5.61 NT1 ve miRZip345 IP fraksiyonunda zenginleşen genlerin karşılaştırılması. .	139
Şekil 5.62 NT1 örneklerine ait gen ifadelerinin TargetScan sonuçları ile karşılaştırması.	166
Şekil 5.63 hsa-miR-449a ait 1.5 kat ve üzeri fark gösteren olası hedefler kullanılarak yapılan gen ontolojisi analizi	168

Şekil 5.64 hsa-miR-345'e ait 1.5 kat ve üzeri olası hedefler kullanılarak yapılan gen ontolojisi analizi.....	169
Şekil 5.65 En çok hedeflenen ilk 30 genin TCGA meme kanseri mikrodizin datasında ifade analizi.	174
Şekil 5.66 BT474 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan en büyük küme.	178
Şekil 5.67 BT474 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan ikinci büyük küme.....	179
Şekil 5.68 BT474 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan son büyük küme.	179
Şekil 5.69 SKBR3 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan en büyük küme.	180
Şekil 5.70 SKBR3 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan ikinci büyük küme.	181
Şekil 5.71 SKBR3 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan ikinci büyük küme.	181

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Meme kanseri hücre hatları, reseptör ifadeleri ve ATCC numaraları.	26
Çizelge 4.2 Çalışmada kullanılan miRNA primerleri.....	28
Çizelge 4.3 miRZip vektörlerine ait sekanslar	29
Çizelge 4.4 Koloni PZR primer çifti.....	30
Çizelge 4.5 Uygulanan ilaçlar ve yapılan mikrodizin analiz sayısı ile hücre hatları.....	37
Çizelge 4.6 Eş zamanlı RT-PZR için kullanılan reaksiyon hacimleri	44
Çizelge 4.7 Plazmid vektör hazırlanırken kullanılan kontrollerin içeriği.....	49
Çizelge 4.8 Ligasyon için kullanılan reaksiyon karışımı.....	50
Çizelge 4.9 Koloni PZR reaksiyon karışımı	52
Çizelge 4.10 Virüs paketlenmesi için plazmid karışımı	54
Çizelge 4.11 AGO2-IP uygulaması ardından targetom analizi için mikrodizin yapılan örnekler	63
Çizelge 5.1 BT474 ve SKBR3 hücrelerinde trastuzumab uygulamasına ait ortalama canlılık oranları	69
Çizelge 5.2 BT474 ve SKBR3 hücrelerinde lapatinib uygulamasına ait ortalama canlılık oranları	72
Çizelge 5.3 Trastuzumab uygulaması sonrası elde edilen ve mikrodizin analizinde kullanılan RNA'ların nanodrop ölçüm sonuçları.	73
Çizelge 5.4 Lapatinib uygulaması sonrası elde edilen ve mikrodizin analizinde kullanılan RNA'ların nanodrop ölçüm sonuçları.....	74
Çizelge 5.5 Her iki hücre hattında da ortak olan trastuzumab duyarlı miRNA listesi	76

Çizelge 5.6 Lapatinib uygulaması ardından hem SKBR3 hem de BT474 hücrelerinde ortak olarak ifadesi değişen miRNA'lar	79
Çizelge 5.7 SKBR3 hücrelerinde trastuzumaba ve lapatinibe ortak cevap veren miRNA'lar	80
Çizelge 5.8 BT474 hücrelerinde trastuzumaba ve lapatinibe ortak cevap veren miRNA'lar	81
Çizelge 5.9 hsa-miR-449a ait TargetScan sonuçları kullanılarak yapılan yolak analizi	82
Çizelge 5.10 Eş zamanlı PZR ile doğrulama için seçilen miRNA'lar.....	83
Çizelge 5.11 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 inhibisyonu sonucu SKBR3 hücrelerinde elde edilen % canlılık oranları	89
Çizelge 5.12 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 mimic uygulaması sonucu SKBR3 hücrelerinde elde edilen % canlılık oranları.....	91
Çizelge 5.13 miRZip vektörünün jelden izolasyon ardından nanodrop ölçüm sonuçları....	93
Çizelge 5.14 miRZip449a miniprep yapılması ardından nanodrop ölçüm sonuçları	95
Çizelge 5.15 miRZip345 ve miRZip449a maxiprep uygulaması ardından elde edilen konsantrasyonlar	97
Çizelge 5.16 Farklı hacimlerde yapılan viral enfeksiyon sonuçları	107
Çizelge 5.17 SKBR3 hücrelerinde miRZip345, miRZip449a ve NT1 9. gün enfeksiyonu sırasında gözlenen canlı hücre ve GFP pozitif hücre oranları.....	118
Çizelge 5.18 AGO2-IP uygulamasında kullanılan hücrelerin GFP oranları ve hücre sayıları	128
Çizelge 5.19 AGO2-IP uygulaması için kullanılan örneklerden RNA izolasyonu sonrası ölçülen konsantrasyonlar.....	130

Çizelge 5.20 hsa-miR-449a ait olası hedef genlerden IP fraksiyonunda 4 kat ve üzeri zenginleşen genler.....	140
Çizelge 5.21 hsa-miR-345 ait olası hedef genlerden IP fraksiyonunda 4 kat ve üzeri zenginleşen genler.....	147
Çizelge 5.22 NT1 ve miRZip345 IP (1.5 kat ve üzeri) karşılaştırma sonuçları.....	154
Çizelge 5.23 NT1 ve miRZip449a (1.5 kat ve üzeri) karşılaştırma sonuçları.....	155
Çizelge 5.24 Hsa-miR-449a'ya ait 1.2 kat ve üzeri fark gösteren olası hedefler kullanılarak yapılan yolak analizi	167
Çizelge 5.25 Hsa-miR-449a'ya ait 1.5 kat ve üzeri fark gösteren olası hedefler kullanılarak yapılan yolak analizi	167
Çizelge 5.26 Hsa-miR-345 1.2 kat ve üzeri fark gösteren olası hedefleri kullanılarak yapılan yolak analizi	168
Çizelge 5.27 Hsa-miR-345 1.5 kat ve üzeri fark gösteren olası hedefleri kullanılarak yapılan yolak analizi	169
Çizelge 5.28 miRZip449a, miRZip345 ve NT1'a ait IP fraksiyonlarından elde edilen GSEA sonuçları	170
Çizelge 5.29 Network analizi için kullanılan son dataya ilişkin bilgiler	171
Çizelge 5.30 BT474 ve SKBR3 networklerinde trastuzumab duyarlı miRNA'lar tarafından en fazla hedeflenen ilk 30 gen	172
Çizelge 5.31 Networkde en fazla hedeflenen genler ve 3'UTR uzunlukları	175
Çizelge 5.32 En yüksek sentralite derecesine sahip olan ilk 15 miRNA.....	176

SİMGELER DİZİNİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
3'UTR	3' translasyona uğramamış bölge
APC	Apoptotik hücre
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Baz çifti
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dulbecco's PBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERBB2	erb-b2 reseptör tyrozin kinaz 2
GFP	Green floresans protein
IGFR1	İnsulin büyüme faktörü-1
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
mikroRNA	miRNA
OD	Optikal yoğunluk
pg	Pikogram
RNA	Ribonükleik asit
shRNA	Kısa saç tokası şeklinde RNA

1. GİRİŞ

Meme kanseri karmaşık moleküler mekanizmaya sahip, görülme sıklığı yüksek olan bir hastalıktır. Gen ifadesi çalışmaları ve bu ifadelerdeki çeşitliliğin gruplandırılması yolu ile günümüzde hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılan moleküler sınıflandırma oluşturulmuştur. Buna göre meme kanseri; Luminal A, Luminal B, HER2 ifade eden, normal-benzeri ve bazal-benzeri (üçlü-negatif: ER-, PR-, HER2-) şeklinde moleküler alt-tiplere ve reseptör ifade varlıklarına göre de ER+, ER-, PR+, PR-, HER2+, HER2- alt-tiplerine ayrılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla mikroRNA'ların gen ifadesi düzenlenmesinde etkili oldukları keşfedilmiştir. Bununla birlikte kanserde de etkin rol oynadıklarına, meme kanserine katkı yapan pek çok mikroRNA olduğuna dair artan çalışmalar bulunmaktadır. EGFR reseptör yolaklarını hedef alan ya da bu yolak tarafından etkinliği değiştirilen mikroRNA'ların varlığına odaklanılmakta, tedavi sürecinde rol alabilecek alternatif hedef moleküller olarak kullanımları ve kanser gelişiminde rol sahibi yolaklar üstünde etkileri araştırılmaktadır. Bu yüzden mikroRNA'ların meme kanseri tedavilerindeki etkinliğinin detaylı şekilde ortaya çıkarılması, özellikle alternatif tedavi yöntemlerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

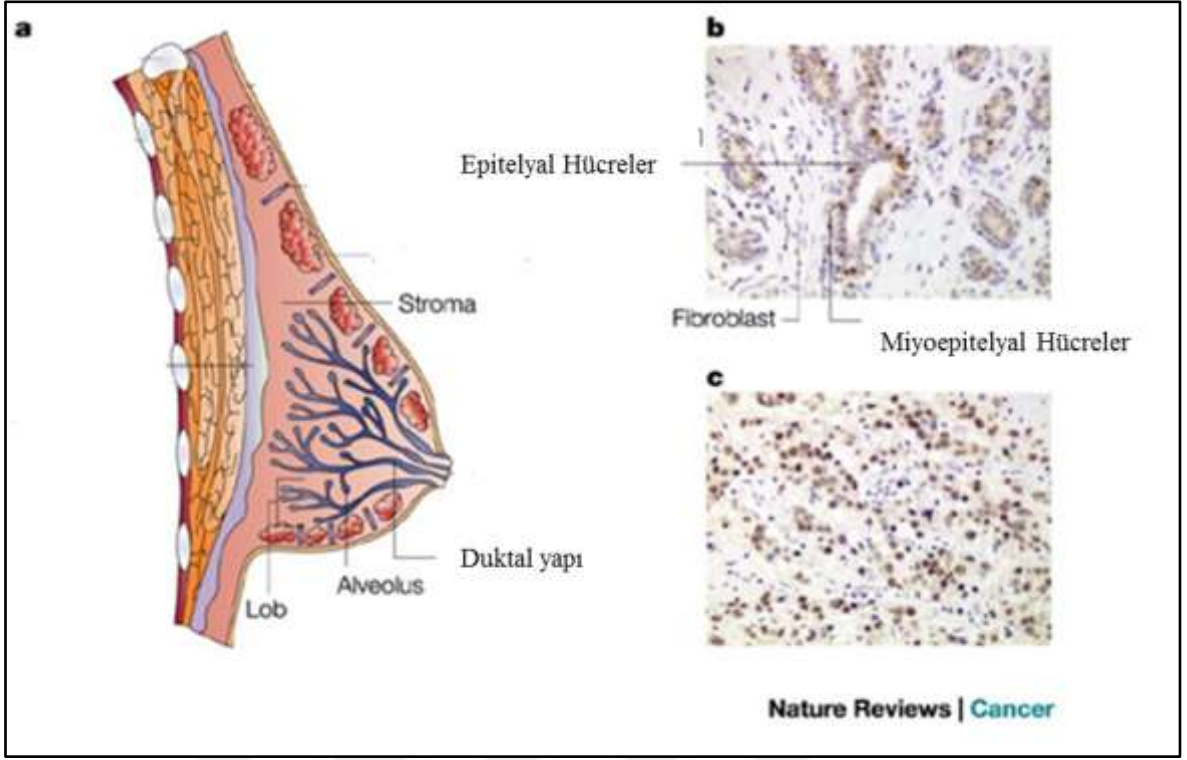
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. MEME KANSERİ

Kanser karmaşık yapıya sahip bir hastalıktır. Elde edilen bulgular, insanlarda kanser gelişiminin birden fazla basamakta geliştiğini ve bu basamakların; normal insan hücrelerinin malignant türevlere dönüşümünü sağlayan genetik değişimlerden ibaret olduğunu göstermektedir (1). Bununla birlikte, meme kanseri 20 ile 59 yaş arasındaki kadınlarda en sık rastlanan ölüm nedenidir. 2016 verilerine göre Batı Dünyası'nda gözlenen mortalite oranı %14 civarındadır (2). Önemli risk faktörleri arasında; yaş, hormon tedavisi uygulanması, geç gebelik, obezite, etnik yatkınlık gibi pek çok değişken bulunan hastalıkta; BRCA1 ve BRCA2 genlerinin genetik olarak aktarılan (kalıtsal mı desek?) mutasyonları bulunmaktadır (3). Meme kanserinin heterojen yapısı, morfolojik olarak farklı olmasından ve kompleks moleküler yapısından kaynaklanmaktadır. Bu yüzden klinik tedavide işlevsel olan bir sınıflandırma şeklinin kullanılması zorunludur. Günümüzde sınıflandırma, histopatolojik ve moleküler olmak üzere iki şekilde kullanılmaktadır ve bu iki sınıflandırma klinik ile beraber değerlendirilmektedir (4).

2.1.1. MEME KANSERİNİN HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRILMASI

Meme kanserinin histopatolojik sınıflandırmasının açıklanması için ilk olarak normal meme dokusunun anlaşılması gerekmektedir. Meme anatomisi süt sentezinin gerçekleştiği ve alveoller yapıdaki epitel hücrelerden oluşan duktal kanallar ve bu duktal kanallarının oluşturduğu meme loblarından oluşmaktadır. Süt sentezini gerçekleştiren epitel hücrelerin etrafını meme bağ dokusunu oluşturan fibroblastlar ve miyoepitelyal hücreler çevreler (5). Şekil 2.1'de gösterildiği gibi meme bezlerinde bulunan duktal epitelyum yapısı iki farklı hücreden oluşmaktadır. Bunlar; luminal hücreler ve bazal benzeri (miyoepitelyal) hücrelerdir. Luminal hücreler süt sentezini sağlarlarken, miyoepitelyal hücreler onları çevrelerler. Meme kanseri her iki hücre tipinden de köken alabilir, sınıflandırması ancak hücresel ve moleküler özellikler gözetilerek yapılabilir (6–8).



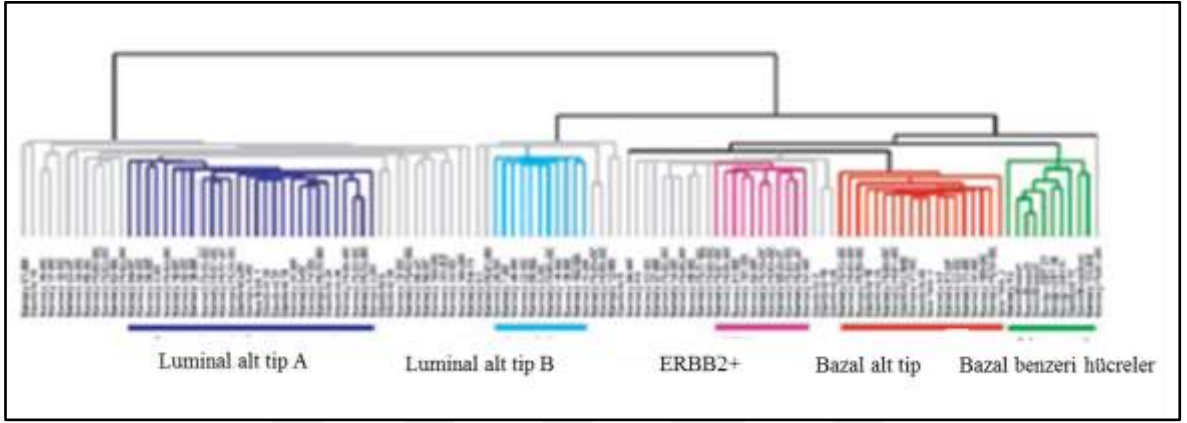
Şekil 2.1 Normal ve kanserli meme dokusunun anatomisi a) Normal meme dokusu yapısı. Her meme bezi yaklaşık 15-20 lobdan ibarettir. b) Her duktal kanal süt üretimini sağlayan epitel hücreler ile çevrilidir. c) Bu düzenli yapı meme kanseri sırasında bozulmaktadır(8)

Buna göre histopatolojik sınıflandırma; tümörün evresi (boyut, metastaz durumu, invaziv olup olmaması), derecesi ile birlikte köken aldığı dokuyu da kapsamaktadır. Böylece meme kanseri temelde; meme dokusunun epitel katmanından köken alan duktal karsinoma ve lobular karsinoma olarak iki farklı histopatolojik şekilde görülebilmektedir (9).

2.1.2. MEME KANSERİNİN MOLEKÜLER SINIFLANDIRMASI

Heterojen moleküler yapıya sahip kompleks bir hastalık olan meme kanseri için hem moleküler sınıflandırma, hem de patolojik sınıflandırma hastaların tedavi sürecine karar verme açısından büyük önem taşımaktadır. Hormonlar ve büyüme faktörleri, biyolojik fonksiyonlarını hücre yüzeyindeki reseptörlere ve proteinlere bağlanarak gösterebilirler. Bu sayede meme kanseri gibi hastalıklar için biyobelirteç ve/veya geliştirilecek terapiler için önemli hedefler haline gelmektedirler. Gen ifadesi çalışmaları ve bu ifadelerdeki çeşitliliğin gruplandırılması yolu ile günümüzde hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılan moleküler sınıflandırma büyük ölçüde oluşturulmuştur (10). Buna göre, ilk olarak meme

kanseri hastalarından alınan tümör örneklerinden gen ifade analizi çalışmaları yapılmıştır. Bu analizler ile farklı oranlarda ifade gösteren, ifade şekillerine göre alt gruplarda toplanan genler elde edilmiştir. Elde edilen gen grupları aynı zamanda klinik seyir ve prognoz ile de karşılaştırılmış, bağlantılı şekilde farklılık gösterdikleri bulunmuştur. Böylece meme kanserinden elde edilen genler Şekil 2.2’de görüldüğü gibi; Luminal A, Luminal B, HER2 (ERBB2+) ifade eden, normal-benzeri ve bazal-benzeri (üçlü-negatif: ER-, PR-, HER2-) olmak üzere moleküler alt tiplere ayrılmıştır (10–12).

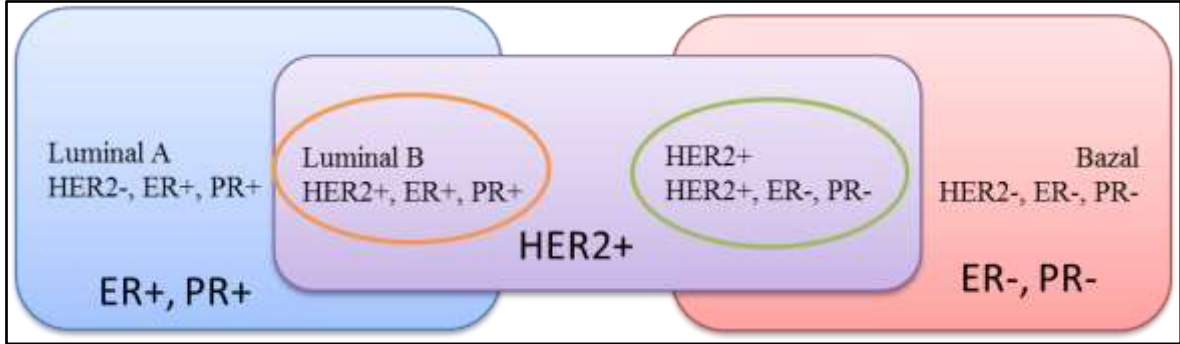


Şekil 2.2. Gen ifadelerine göre tümörlerin 5 ayrı grup içinde toplandığı gösteren dendrogram (12)

Bu çalışma ile elde edilen önemli bulgulardan biri; bazal tip tümörlerin oluşumunun BRCA1 genindeki mutasyon ile büyük oranda bağlantılı olduğu, prognozu daha kötü seyreden bu tümörlerde östrojen (ER) reseptör ve ERBB2 (HER2) reseptör artışının ve ifadesinin gözlenmemesidir (10,12,13).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar üç önemli reseptörün meme kanseri prognozunun değerlendirilmesinde klinik olarak katkı sağladığını göstermiş, meme kanserinin moleküler sınıflandırmasında kullanılabileceklerini kanıtlamıştır (12,13). Bu reseptörler; östrojen (ER) reseptörü, progesteron (PR) reseptörü ve ERBB2 (HER2) reseptörüdür (14,15). Buna göre Luminal A tümörler; ER pozitif ve/veya PR pozitif ve HER2 negatiftir. Luminal B tümörler; ER pozitif ve/veya PR pozitif ve HER2 pozitiftir. HER2 pozitif olarak adlandırılan tümörler ise; ER negatif, PR negatif ve HER2 pozitif olarak gözlenirler. Her üç reseptörün de negatif (ER-, PR-, HER2-) olduğu tümörler ise bazal benzeri olarak görülürler (15). Meme kanserinin prognozu açısından bakıldığında ise hastalık sonrası

hayatta kalma oranının en yüksek olduğu alt tipin; Luminal, en düşük olduğu alt tiplerin; Bazal alt tip ve HER2 pozitif alt tip olduğu gözlenmiştir (14). Meme kanseri alt tiplerinin reseptörler ile ilişkisi Şekil 2.3.'de detaylı olarak gösterilmiştir.



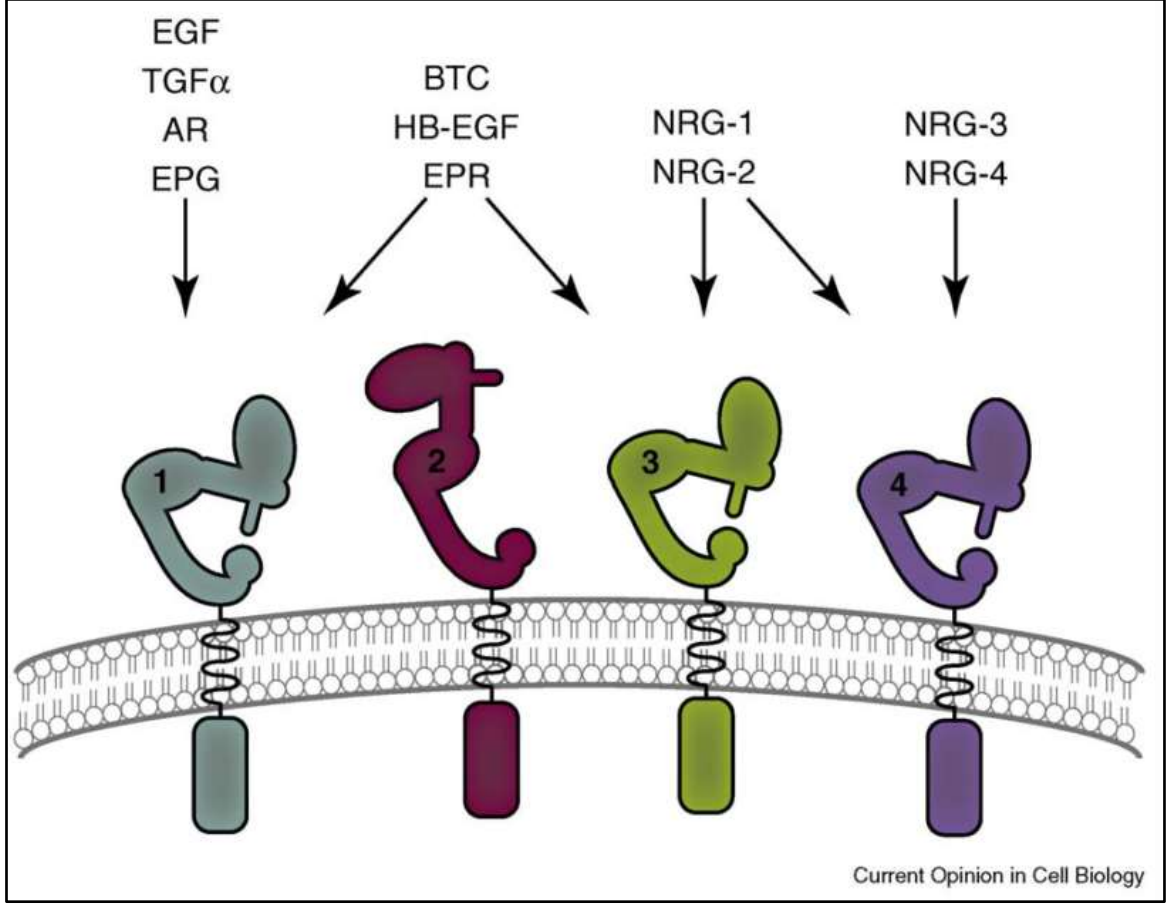
Şekil 2.3. Meme kanserinin moleküler alt tipleri

2.1.2.1. EGFR (ERBB) Reseptör Ailesi Üyeleri

Hücre sinyal mekanizmalarında meydana gelen değişimler; hücre çoğalmasına, büyümesine, hücre ölümünün engellenmesine neden olarak tümör oluşumunun tetiklenmesini sağlamaktadır. Bu sinyallerin pek çoğu “reseptör tirozin kinaz” adı verilen ve hücre zarını boydan boya aşan reseptör ailesi tarafından kontrol edilir (16). Meme kanseri gelişiminde önemli etkileri olan HER2 (ERBB2) hücre yüzey reseptörü bu ailenin üyesidir. Reseptör ailesi meme kanseri gelişimi, tanısı ve tedavisinde önemli role sahip transmembran proteinlerden oluşmaktadır ve ERBB1 (HER1/EGFR), ERBB2 (HER2/HER2/neu), ERBB3 (HER3), ERBB4 (HER4) şeklinde adlandırılırlar. Sıklıkla etkinlik gösteren ligandlar ve reseptörlerin yapısı Şekil 2.4.'te görülmektedir (17). Nöronal, epitelial, mezenşimal olmak üzere pek çok dokuda etkilidirler. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla kanser gelişimindeki bağlantıları ortaya çıkartılmış, özellikle ERBB2 (HER2) ve EGFR (HER1) reseptörlerinde meydana gelen değişimlerin pek çok kanser türünde etkin olduğu, prognozun kötüleşmesine katkı yaptığı ve invazyona neden olduğu gözlenmiştir (18,19).

ERBB reseptör ailesi üyelerinin ERBB3 dışında, sitoplazmada bulunan kısmı kinaz enzim aktivitesine sahip durumdadır. Aktiviteleri normal şartlarda düzenli şekilde gözlenir. Hücre yüzeyindeki kısma bağlanan ve aktivasyonu sağlayan ligandın yokluğunda inaktif halde bulunurlar. Ligandın bağlanmasıyla beraber dimerizasyon gerçekleşir ve sitoplazmada

bulunan kinaz kısımdaki tirozin rezidülerinden fosforile olarak hücre içinde sinyal iletiminin tetiklenmesini sağlarlar. Böylece dışarıdan alınan uyarı hücre içinde değişikliklere (uyarıya) neden olmuş olur (16,18).

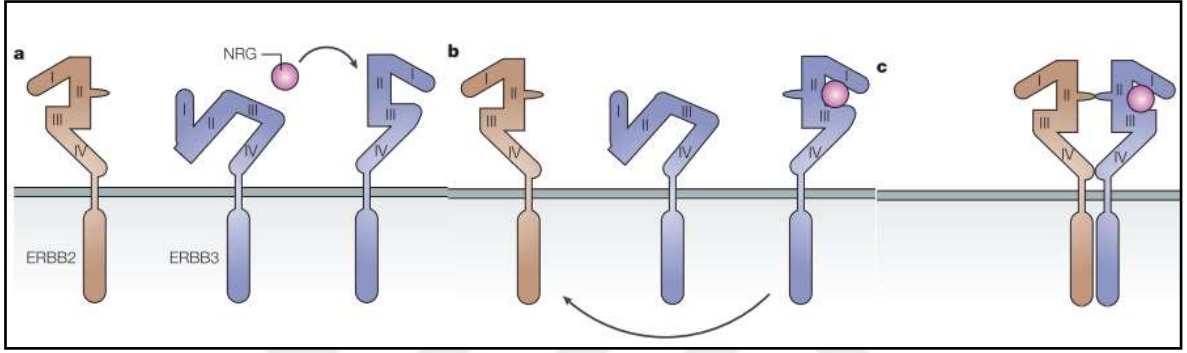


Şekil 2.4. ERBB reseptörleri ve ligandları. ERBB ailesinin 4 üyesi vardır; EGFR (1), ERBB2 (2), ERBB3 (3), ve ERBB4 (4). Ligandların bağlanması takiben reseptörler yapısal değişikliğe uğrar ve homodimer ya da heterodimer yapılar oluştururlar (17)

2.1.2.2. EGFR (ERBB) Reseptörlerinin Yapısı ve Aktivasyonu

EGFR (ERBB) reseptör ailesine ait olan HER2'nin (ERBB2) aşırı ifade edilmesi (HER2+), meme kanseri hastalarının %20-%30'unda görülen bir durumdur. HER2+ meme kanserinin standart kemoterapiye direnç geliştirdiği, çoğunlukla metastaz gösterdiği bilinmektedir (20). ERBB reseptörlerinin hücre dışında bulunan bölgesi 4 adet farklı alandan (domain I-IV) oluşmuştur. Her bir alanın reseptör etkinliğinde önemli rolü bulunmaktadır. II numaralı alanın aktivasyonu ile reseptör-reseptör dimerizasyonu mümkün olmaktadır. II numaralı alan dimerizasyon alanıdır. EGFR, ERBB3, ERBB4 reseptörlerinde bu alan, reseptör

ligand ile bağlanmadığı sürece kapalıdır ve IV numaralı alan ile kilitli şeklindedir. Bu yüzden ligand bağlantısı olmadığı sürece bu reseptörler dimerizasyon oluşturacak duruma geçemezler, hücre içi sinyal yollarını etkileyemezler. Ligand bağlantısı ile II nolu alan serbest hale gelir. Bu sayede diğer reseptörler ile dimerizasyon gerçekleşir ve hücre içerisinde sinyal yollarının aktivasyonu sağlanır. Dimerizasyon aynı reseptörlerin birbiri ile birleşmesi şeklinde; homodimerler halinde olabildiği gibi, farklı reseptörlerin bir araya gelip heterodimer oluşturmasıyla da gerçekleşebilir (18,21). ERBB reseptör ailesinin aktivasyonu Şekil 2.5’de anlatılmıştır (18,21).



Şekil 2.5. ERBB reseptör ailesinin aktivasyonu. a) Ligand bağlanmadığı sürece EGFR, ERBB3 ve ERBB4 reseptörleri kapalı bir form halinde bulunurlar. Bu durumda II numaralı alan ile IV alan birbiriyle kilitli şeklindedir ve dimerizasyon, dolayısıyla reseptörlerin sinyal yollarını aktivasyonu gerçekleşemez b) ERBB2 (HER2) reseptörü ise yapısı gereği sürekli açık halde ve II numaralı alanı dimerizasyon oluşturmaya uygun şekilde bulunur c) Ligand bağlandığı zaman EGFR reseptörünün yapısal şekli değişir ve dimerizasyon kolu olan II numaralı alan serbest hale geçer. Böylece diğer reseptörler ile aktivasyon gerçekleşebilir (18,21)

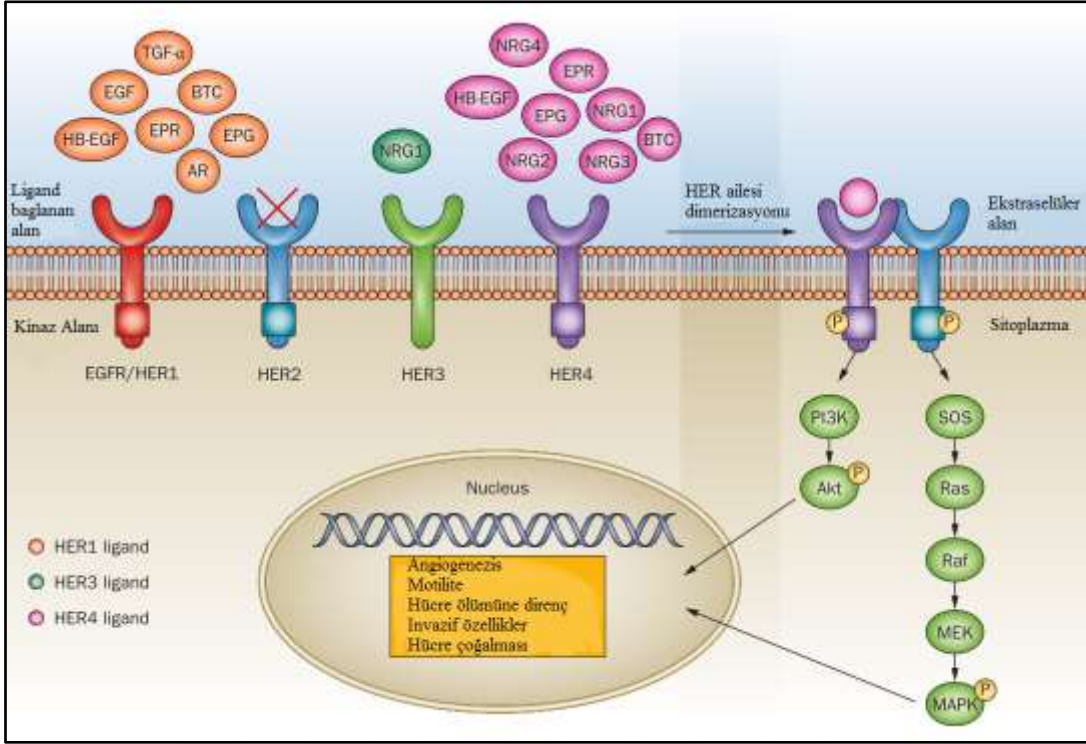
HER2 reseptörünün aşırı ifade edilmesi ile diğer EGFR ailesi üyelerinin aktivasyonu gerçekleşir ve hücre içi sinyal yolları büyük oranda aktive olur (22–24). HER2 reseptörü doğrudan ligandlara bağlanmaz. Monomer halinde bulunduğunda etkisizdir. Bunun yerine ligand ile bağlanıp aktive olmuş diğer EGFR reseptörleri ile bir araya gelerek, heterodimer oluşturarak etkinliğini gösterir ve diğer reseptörlerin dimerizasyon oluşturmak için ilk tercihidir (24).

2.1.2.3. EGFR (ERBB) Reseptör Ailesi Sinyal Yolları

EGF (epidermal büyüme faktörü) ailesine ait peptidler spesifik ERBB reseptörlerine bağlanırlar ve bu spesifiteye göre gruplara ayrılırlar. İlk grup; EGFR (epidermal büyüme

faktörü), TGF-alfa (transforming büyüme faktörü) gibi sadece EGFR (ERBB1; HER1) reseptörüne bağlanan ligandları içerir. İkinci grupta; heparin-binding EGF (HB-EGF), betacellulin (BTC) ve epiregulin (EPR) bulunur ve hem EGFR hem de ERBB4 reseptörlerine bağlanma gösterirler. Üçüncü grup neuregulinlerden oluşur ve ERBB3 ya da ERBB4 reseptörlerine bağlanma kapasitelerine göre iki alt gruba ayrılırlar (18,25).

Ligand bağlanmasının ardından, reseptörün hücre sitoplazmasına bakan kısmında bulunan kinaz enzim alanı aktive olur ve kuyruk kısmındaki tirozinlerin fosforilasyonu sağlanır. Fosforilasyon ile kuyruk kısmıyla ilişkili halde bulunan sinyal yollarının aktivasyonu gerçekleşir. ERBB3 reseptörleri ise bu kinaz enzim alanına sahip değildirler. Bu yüzden ancak başka bir reseptör ile heterodimer oluşturduklarında fosforilasyon ile aktive olma şansını yakarlar. Bunun dışında yine ERBB2 ligandlar ile bağlanmaz, onun yerine ifadesi normalden fazla olduğundan diğer reseptörler tarafından heterodimerizasyon için tercih edilir ve bu şekilde sinyal yollarını etkiler (17,18,25). Şekil 2.6'da görüldüğü gibi ERBB2 ve EGFR (ERBB1) reseptörleri tümör hücrelerinde, normal hücrelerde yaptıkları gibi pek çok benzer yolağı aktive etmiş olurlar. Bunlar; MAPK, PI3K/Akt ve mTOR yolları ile Src kinaz, STAT transkripsiyon faktörleridir. Temelde MAPK yolağı ile hücre proliferasyonunu sağlarken, PI3K aktivasyonu ile hücrenin hayatta kalmasını ve anti-apoptotik sinyalleri kontrol ederler (17,26).



Şekil 2.6. HER2 aktivasyonu ve etkilediği sinyal yolları. HER2 heterodimer oluşturup aktif hale geçtikten sonra RAS ve MAPK yolları aracılığıyla hücre proliferasyonu, metastazı, apoptoze direnci, angienezisi uyarır. EGFR, ERBB4 gibi reseptörler ise PI3K aracılığıyla etkinliğini göstermeye devam etmektedir ve bu yollar arasında iletişim bulunur(26)

2.1.2.4. EGFR (ERBB) Reseptör Ailesinin Meme Kanserinde Rolü

Özellikle ERBB1 (EGFR) ve ERBB2 (HER2), pek çok kanser türünde etkinliği olan ve tümör gelişimini sağlayan reseptörler arasında bulunmaktadır. Çeşitli genetik değişiklikler, örneğin; ERBB2 ifadesinin artış göstermesi ya da EGFR reseptörünün genetik yapısında değişikliklere neden olan delesyonlar, reseptörlerin birlikte fazla oranda ifade edilmesi gibi durumlar olağandışı aktivasyona neden olan başlıca sebepler arasındadır (17,27).

Daha önce bahsedildiği gibi HER2 reseptörünün aşırı ifade edilmesi meme kanseri hastalarının %20-30'unda görülen ve kötü klinik seyir ile ilişkili olan bir durumdur. HER2 reseptörü yapısal formu nedeniyle diğer EGFR ailesi reseptörleri tarafından dimerizasyon için tercih edilmekte ve kolaylıkla aktive olarak meme kanseri gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir (18,19,28). Bu durum özellikle EGFR reseptörlerinin birlikte ya da diğer reseptörler ile ifade edilmelerinin önemini göstermektedir. Örneğin; DiGiovanna ve

arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı bir çalışmada EGFR ifadesinin invazif meme kanseri hastalarında %15 oranında görüldüğü, fakat EGFR pozitif tümörlerin (%87) çoğunluğunun ERBB2 reseptör ifadesine de sahip olduğu bulunmuş, ayrıca ERBB2 reseptörlerinin kötü klinik seyre katkı yapan ve aktif form olan fosforile durumda bulunduğu gözlenmiştir. Bu durum, her iki reseptör ifadesinin birlikte değerlendirmesinin gerekli olduğunu ve klinikte doğru tedavi şekillerinin seçilmesinde önemli ipucu verdiğini göstermektedir (28,29).

Son çalışmalar ile EGFR (ERBB1) reseptörünün epitelyal mezenşimal (EMT) hücre değişimine katkı sağladığı bulunmuştur. Bu değişim hücrelerin morfolojik olarak epitelyal formdan daha agresif seyreden mezenşimal-fibroblastoid forma dönüşmesini içermektedir ve diğer dokulara tümör invazyonu ile migrasyonunun gerçekleşmesindeki en önemli basamaklardan biridir. EGFR/ERBB2 heterodimerlerinin bu değişimi hızlandırdığı, meme kanseri hücrelerinde metastaz oranını artırdığı gözlenmiştir. Yine EGFR, ERBB2 ve diğer reseptörlerin etkilediği sinyal yolları arasındaki çapraz iletişim kanserin invazif hale dönüşmesine ve ilerlemesine katkı yapmaktadır (30,31).

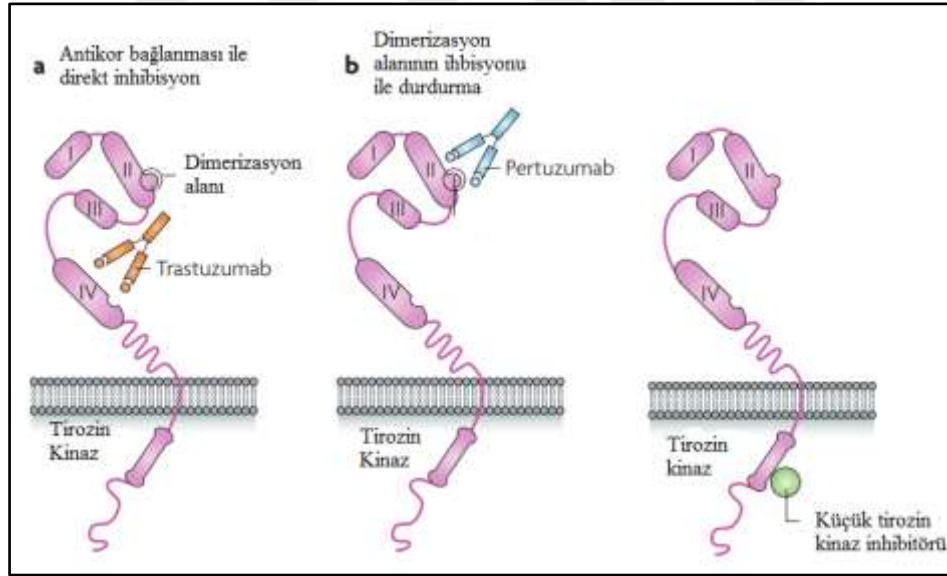
Yine daha önce yapılan çalışmalarla, EGFR/ERBB2 heterodimerlerinin metastaz oranını homodimerlere oranla daha fazla artırdığı ortaya konulmuştur. Reseptörlerin aktivasyon sonrası oluşturduğu homodimerler etkilerini gösterdikten sonra degradasyona uğrayıp ortamdaki uzaklaştırılırken, heterodimer yapılar tekrar hücre yüzeyinde kullanıma sokulmakta ve bu durum kanser gelişiminin daha kararlı şekilde ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır (32).

Öte yandan, EGFR reseptörünün aşırı ifade edilmesinin HER2 odaklı tedavilere negatif etki ettiği ve direnç gelişiminde rol oynadığı da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Buna göre ER- negatif, ERBB2+ meme kanseri hücrelerinde EGFR ifadesinin artışının sağlanması trastuzumab direncine katkı sağlamıştır (33). Son yıllarda yapılan araştırmalar EGFR/ERBB2 aktivasyonunun invazyon ve metastaza olan katkısına odaklanmaktadır. Metastazın tetiklenmesi sırasında bilinen sinyal yolları dışında decorin gibi başka proteinlerin de etkinlik gösterdiği, bunların tedavide kullanılacak yeni biyobelirteçler olabileceği tartışılmaktadır (34). Sonuç olarak, ERBB ailesi içinde özellikle EGFR ifadesi artışının meme kanseri prognozunda ve tedavinin etkinliğinde önemli role sahip olduğu

gösterilmiştir. Yine EGFR/ERBB2 heterodimerlerinin HER2+ meme kanserlerinde meydana gelen dimerizasyonların başında geldiği anlaşılmıştır (35).

2.1.3. EGFR (ERBB) RESEPTÖR ODAKLI TERAPİLERİN MEME KANSERİNDE ÖNEMİ

ERBB reseptörlerinin meme kanserinde fazla oranda ifade edilmesi, kanser tedavisi için önemli hedef adayları haline gelmelerine yol açmıştır. Temel olarak iki çeşit EGFR reseptör odaklı tedavi şekli bulunur. Bunlar; reseptörlerin ekstrasellüler kısmına bağlanan “antikor” terapiler ve hücre içindeki kinaz enzim alanlarına bağlanan inhibitörler aracılığıyla gerçekleştirilen “ tirozin kinaz inhibitör (TKI)” terapileridir. Günümüzde ERBB2+ meme kanseri hastalarında tercih edilen başlıca odaklı tedavi preparatları; Trastuzumab, Lapatinib, Pertuzumab olarak sayılabilir. Bu ilaçlar, hastada kanserin seyrine ve görülen mutasyonlara, reseptör ifadelerine göre birbirleriyle ya da başka ilaçlarla kombinasyonlar şeklinde kullanılabilirler (36). EGFR (ERBB) reseptör ailesi odaklı terapilerin etkinlik gösterme yolu Şekil 2.7’de gösterilmiştir (21).



Şekil 2.7. EGFR reseptör odaklı terapilerin etkinlik şekli. a) Trastuzumab ERBB2 reseptöründe IV numaralı alana bağlanıp reseptör-reseptör etkileşimini önleyerek etkinlik göstermektedir. b) Pertuzumab gibi ajanlar ise bağlanma için dimerizasyon alanını seçer. c) Tirozin kinaz inhibitörleri hücre içinde kinaz enzim aktivitesi gösteren bölgeye bağlanarak sinyal yollarının etkinliğini önlerler (21).

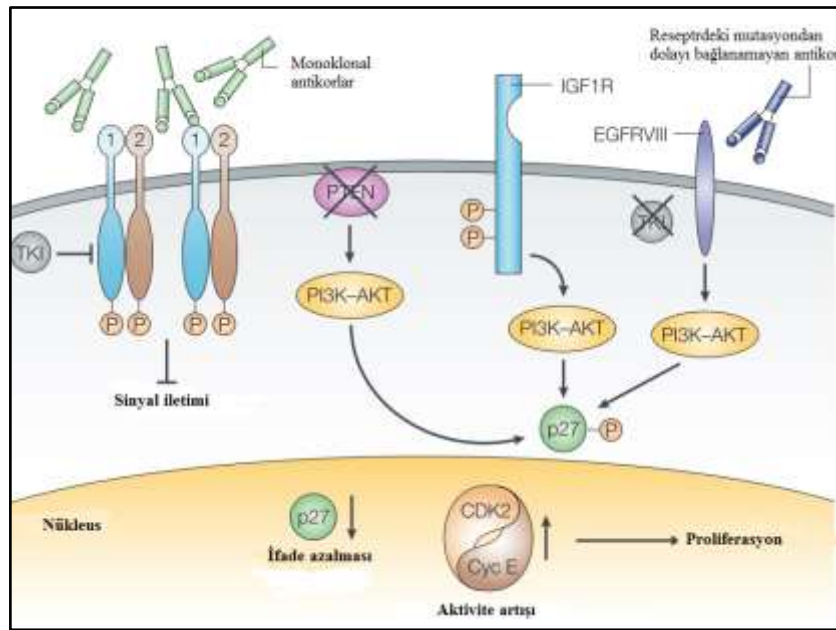
Preklinik modellerde, tümör hücrelerinin ERBB reseptör odaklı TKI ve antikorlarla tedavisi sırasında PI3K–AKT, MAPK, SRC ve STAT gibi önemli sinyal yollarının susturulduğu gözlenmiştir. Yine hastalardan alınan dokulardan yapılan çalışmalar, ERBB reseptörlerinin fosforilasyonunun durdurulmasının hücre ölüm oranının artışına neden olduğunu göstermektedir. Tedavi edilen hastalarda yapılan çalışmalar da bu durumu doğrulamaktadır. Yine de gözden kaçırılmaması gereken en önemli nokta, EGFR (ERBB1) ve ERBB2 reseptörlerinin normal hücre gelişimi için de önemli olduğu ve tamamen işlevsiz bırakılmasının sorunlara neden olabileceğidir. Bu yüzden sadece kanser etkenlerini hedef alan yeni odaklı terapilerin geliştirilmesi ve mevcut olanların daha iyi etki sağlaması için yapılan çalışmalar önemini korumaktadır. Yine, kanserleşme sürecinde hücreler pek çok farklı yolla metastatik tümör hücreleri olma özelliğini kazandıkları için, tek bir tedavi şekliyle bu hücreleri öldürmek mümkün değildir. Örneğin; trastuzumab ile yapılan meme kanseri tedavilerinde pek çok hastada direnç gelişimi gözlenmekte ya da %100 cevap alınmamaktadır. Bunun nedeni, ERBB2 reseptörünün tek başına kanser gelişiminden sorumlu olmaması ve diğer sinyal yolları ile iletişim halinde bulunmasıdır (17,18). Aynı direnç durumuna, EGFR (ERBB1) reseptöründe mutasyon gözlenen ve kinaz inhibitörleri aracılığıyla tedavilerin tercih edildiği kanserlerde de rastlanmıştır. Artan çalışmalar direncin, hücre içi sinyal yollarını aktive eden alternatif mekanizmaların varlığı ve ERBB ailesi dışındaki diğer reseptörlerin etkinliği nedeniyle olabileceğini göstermektedir (17). Bu yüzden reseptörler arası iletişimin daha iyi açıklanması ve yeni hedef moleküller ortaya çıkarılması önemli bir konu olmaya devam etmektedir.

2.1.3.1. Trastuzumab Etki Mekanizması

İnsan monoklonal antikor olan trastuzumab (Herceptin), ERBB2 odaklı terapiler için geliştirilen ilk ajandır. ERBB2+ (HER2+) metastatik meme kanserine sahip hastalarda etkinliği oldukça önemli olan ve özellikle kanserin ilk evresinde, erken dönemde, ya da operasyon öncesi neoadjuvantlar ile birlikte kullanılan, klinikte yaygın kullanıma sahip en güvenilir ilaçlardan biridir (37). Meme kanseri hastalarında trastuzumabın olumlu etkisine dair iki farklı yaklaşım vardır. Bunlardan ilki reseptör etkileşiminin engellenmesi nedeniyle hücre içi sinyal yollarının durdurulması ve hücre çoğalmasını sonlandırması; diğeri ise antikor olması nedeniyle immun sistemi uyararak immün faktörler aracılığıyla hücre ölümünü tetikleyen olumlu bir etki yaratmasıdır (38).

Trastuzumabın bahsedilen ilk etkisini göstermek için PI3K ve MAPK yollarını durdurarak p27 ifadesini arttırdığı ve hücre çoğalmasını engellediği gözlenmiştir (39). Yine yapılan in vivo çalışmalar, doğal ölüm (natural killer) hücrelerinin etkinliği için önemli olan Fc reseptörleri ile ilacın bağlanması sonucu antikor-bağımlı-sitotoksisite (ADCC)'yi uyardığını vurgulamaktadır (40).

Bununla birlikte tedavi gören hastalarda olumlu etkiler gözlenmesine rağmen, hastaların çoğunda tedavinin ilk yılı ardından ilaca karşı direnç geliştiği bilinmektedir. Bunun için trastuzumab tedavisinin moleküler mekanizmalarının daha iyi açığa çıkartılması HER2+ hastaların tedavisi için önemini korumakta ve tedaviye önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir (41,42). Direnç gelişimi ve ilacın etkisiz kalmasına neden olan önemli etkenlerden biri; ERBB2 reseptörlerinin heterodimer oluşturarak etkinlik göstermesidir. Otokrin EGFR aktivasyonu olan hücrelerin çoğalmasının durdurulamamasının yanı sıra, trastuzumab dimerizasyon alanına bağlanmadığı için de etkisiz kalabilmektedir. Şekil 2.8'de belirtildiği gibi diğer reseptörlerin etkinliği, PI3K yolağının etkinliğini kontrol eden ve AKT aktivitesini durduran hücre içi sinyal yolağı proteini PTEN mutasyonu, ilaca karşı gelişen direncin önemli sebepleri arasındadır (17,18). Buna rağmen, direnç mekanizması bütünüyle açıklanamamıştır ve üzerine çalışması gereken bir diğer önemli konudur.



Şekil 2.8. EGFR odaklı terapilerin etkinlik gösterme şekilleri ve ilaca karşı direnç gelişme yolları. IGF1R (İnsulin büyüme faktörü 1 reseptörü) gibi başka reseptörlerin etkinliği,

EGFR mutasyonu sonucu ilacın bağlanamaması, PTEN etkinliğinin ortadan kalkması sonucu PI3K-AKT aktivitesinin durdurulamaması gibi koşulların bir ya da birkaçının görülmesi hücre çoğalmasını artıran başlıca sebeplerdendir (18).

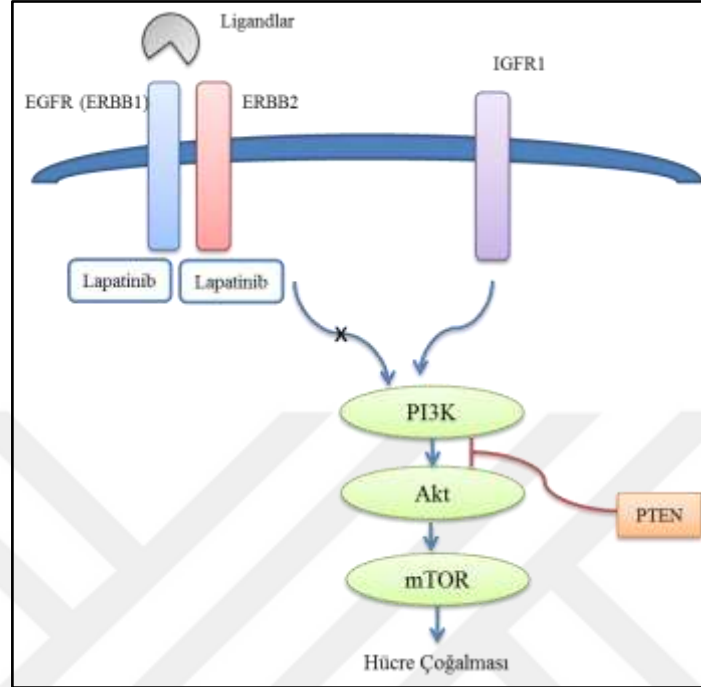
Yapılan son çalışmalar, özellikle IGFR, PDGFR gibi diğer hücre yüzeyi reseptörlerinin trastuzumaba karşı direnç gelişimindeki etkinliği üzerinde durmaktadır. Farklı sinyal yolları arasındaki iletişim daha iyi anlaşılmaya çalışılmakta ve meme kanserinin heterojen yapısından kaynaklı değişikliklerle göz önüne alınarak ilaç direnci mekanizmasını zayıflatacak yeni moleküler hedefler tanımlanmaktadır (43).

2.1.3.2. Lapatinib Etki Mekanizması

Tirozin kinaz inhibitörü olan ilaçlar EGFR reseptörünün kinaz alanına bağlanır ve hücre içerisine geçerek etkinlik gösterirler. Diğer kinaz enzimlerini de etkileyebildikleri için yan etkileri mevcut olmakla birlikte, kinaz inhibitörleri sadece EGFR reseptörüne bağlananlar ve dual olarak EGFR-HER2 reseptörlerine bağlanıp etki gösterenler olarak ikiye ayrılırlar (31). Örneğin; ZD1839/gefitinib (Iressa) sadece EGFR reseptörünün kinaz kısmına bağlanırken, lapatinib (Tyverb) bir dual inhibitördür ve EGFR ile HER2 reseptörlerine birlikte etkir (44).

Lapatinib, HER2+ metastatik meme kanseri hastalarında, diğer kemoterapötiklerin işe yaramadığı durumlarda, Capecitabine ile birlikte kullanılması için onaylanmıştır. Yine menapoz sonrası hastalarda HER2+ olma durumu ve hormon terapisi gerektiren hallerde önerilebilmektedir. Trastuzumab tedavisi almış ama ilerleme kaydedememiş, özellikle beyin gibi organlara metastazlar görülen hastalarda da klinik faz çalışmalarda iyi sonuçlar alınmış bir ilaçtır. Sürdürülen çalışmalar lapatinibin hem trastuzumaba duyarlı hem de dirençli hücrelerde IGFR sinyal yollarına etki gösterebildiğini ve farklı sinyal yolları arasındaki çapraz iletişimi durdurduğunu göstermiştir (44,45). Lapatinib etkisi hem EGFR hem de ERBB2 reseptörleri üzerinden olabilmekle beraber, özellikle ERBB2 ifadesinin arttığı durumlarda etkinliği daha fazladır. Şekil 2.9'da anlatıldığı gibi ilaçla muamele sonrası hücrelerde ERBB2 ve EGFR sinyal yollarının önemli üyesi olan ERK, AKT, RAF gibi proteinlerin ifadelerinde azalma tespit edilmiştir (46). Hücre kültüründe yapılan bir başka çalışma ile lapatinib uygulaması ardından gen ifade değişiklikleri araştırılmış ve ilaç etkinliğinde FOXO3 bağımlı mekanizmanın kilit olabileceği anlaşılmıştır (47). Yeni

bir çalışma ise, HER2+ hücrelerde lapatinib uygulamasının ilk olarak otofajiyi tetiklediğini, daha sonra meme kanseri hücrelerinin hücre ölümünün mekanizmasının gelişmesine neden olduğunu göstermiştir (48).



Şekil 2.9. Lapatinib etki mekanizması. EGFR ve ERBB2 kinaz alanlarına bağlanan lapatinib, özellikle AKT sinyal yolağının işlevini durdurmaktadır.

2.2. MİKRORNA'LAR VE KANSER

2.2.1. MİKRORNA'LARIN KEŞFİ

mRNA'nın translasyonu ve işlenmesi sırasında gerekli olduğu bilinen pek çok "kodlanmamış RNA (non-coding RNA)" varlığı bilinmektedir. 1993 yılında bazı hayvan hücrelerinin, bilinenler dışında küçük RNA'lar üretme yeteneğinde oldukları keşfedilmiş ve bu yapılar mikroRNA (miRNA) olarak belirtilmiştir (49,50). Olgun miRNA'lar; ortalama 20 nükleotid uzunluğa sahip, kodlanmamış RNA (non-coding RNA) özelliğindedir; yani proteine çevrilme şansları yoktur ve tek zincirli yapıdadırlar. Gen ekspresyonunu hedef mRNA'nın genellikle translasyona uğramayan 3'UTR kısmına veya nadir olsa da 5' UTR bölgesine bağlanarak değiştirirler ve post-transkripsiyonel gen regülasyonuna neden olurlar. Bu durum sonuç olarak mRNA translasyonunun inhibe edilmesine veya mRNA'nın degradasyonuna yol açar (51). Victor Ambros ve meslektaşları

(1993), *Caenorhabditis elegans* adlı nematod ile yaptıkları çalışmalar sırasında, *lin-4* ismi verilen ve nematodun larval gelişiminin zamanlamasında öneme sahip bir geni keşfetmişlerdir. Bu genin protein kodlamak yerine, bir çift küçük RNA molekülünü kodlamakta olduğunun bulmuşlar, bu sayede miRNA'ların keşfedilmesini sağlamışlardır (49,52). *lin-4* geni ile ilişkili RNA'nın keşfinden 7 yıl sonra gelinen noktada, nematodlarda başka "kodlanmayan RNA'lar" bulunmazken, nematodlar dışındaki canlılarda da *lin-4* benzeri RNA örneklerine rastlanmamıştır. Bu durum *let-7* geninin keşfedilmesiyle değişmiştir. *let-7* de yaklaşık 22 nükleotidlik bir RNA kodlamakta ve bu RNA, tıpkı *lin-4*'de olduğu gibi, nematodun geç larval evreden yetişkin hale geçmesinde, yani gelişimin zamansal kontrolünde etkili olmaktadır (52). Daha sonra yapılan çalışmalarda *lin-4* geninin aksine *let-7* genin evrimsel olarak, sinekten insana kadar uzanan farklı türler arasında korunduğu anlaşılmış ve miRNA'ların diğer organizmalarda da önemli olabileceğine dair ilk bulgular elde edilmiştir. Örneğin insanlarda, içlerinde beyin, timüs, böbrek, akciğer, karaciğer, dalak gibi organların da olduğu pek çok dokuda farklı ifade düzeylerinde tespit edilmiştir (51).

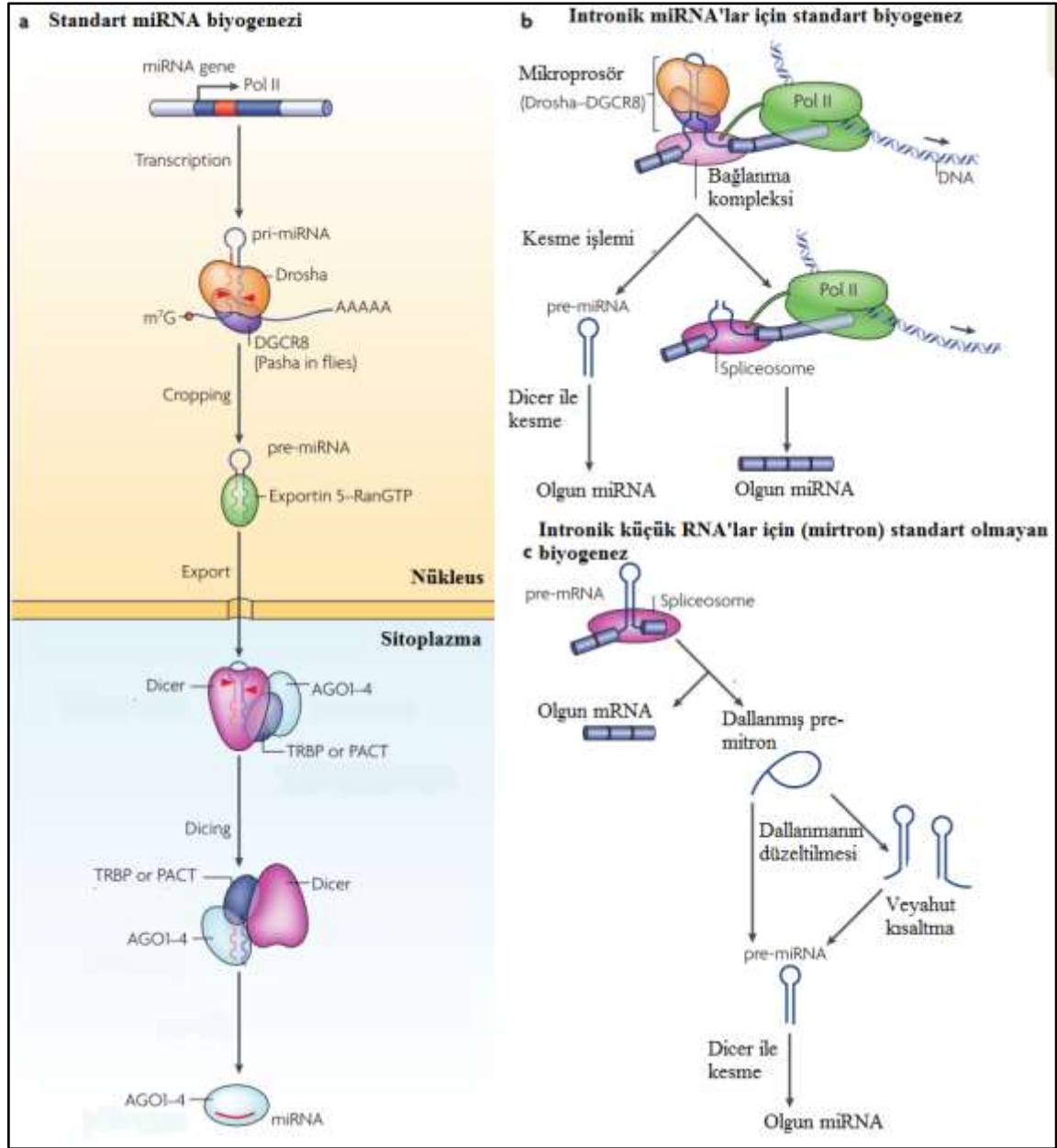
2.2.2. MİKRORNA'LARIN ADLANDIRILMASI

mikroRNA sekanslarını isimlendirmek ve aynı zamanda ulaşılabilirliği olan bir veri tabanı oluşturmak amacıyla "miRBASE" sekans veri tabanı oluşturulmuştur. İsimlendirme sırasında karmaşa olmasını engellemek ve veritabanını etkili kılmak amacıyla sadece keşfi kanıtlanmış ve keşif yöntemleri anlatılarak bir makale ile yayınlanmış mikroRNA'lar kaydedilmektedir. Buna göre sistem, yeni keşfedilmiş miRNA'ların deneysel olarak klonlanmasını veya ifade ve işlevlerinin kanıtlanmasını gerektirir. Günümüzde miRBASE veri tabanında tanımlı toplam 2588 olgun insan miRNA sekansı bulunmaktadır. mikroRNA isimleri üç-dört harflik kısaltmalardan ve rakamlardan oluşur. miRNA'lar isimlendirilirken tür adı en başta yer alırken, olgun miRNA'lar "miR" şeklinde ifade edilir, prekürsör miRNA'lar "mir" olarak kısaltılır (örneğin; hsa-miR-12 ve hsa-mir-12). Sekansında sadece bir-iki nükleotid farkı bulunan paralog olgun miRNA'lar harfler ile birbirinden ayrılmıştır (örneğin; hsa-miR-12a ve hsa-miR-12b). Yine birbirine eş sekanslara sahip ama genomun farklı bölgelerinden ifade edilen miRNA'lar ek rakamlarla birbirlerinden ayrılırlar (örneğin; hsa-miR-101-1 ve hsa-miR-101-2). miRNA'lara ait kollar "3p" ve "5p" şeklinde isimlendirilebilmektedir (53).

2.2.3. MEMELİLERDE MİKRORNA BİYOGENEZİ VE FONKSİYONU

Memelilerde mikroRNA'lar *RNA polimeraz II* enzimi aracılığıyla genom üzerinden ifade edilir ve ilk olarak birden fazla "saç tokası" yapısı içeren pri-miRNA'lar şeklinde sentezlenir. Bu yapılar 5' uçlarında "cap" bir diğer ifadeyle "şapka" ve 3' uçlarında poly-A (poliadenilasyon A) kuyruğu içerirler, çoğunlukla tek bir tanesinden birden fazla olgun mikroRNA oluşturulur (54). Çekirdekte ifade edilen pri-miRNA kesilip, düzenlenerek yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda olan ve saç tokası yapısı içeren prekürsör özellikteki pre-miRNA haline dönüştürülür (54,55). Yine çekirdek içerisinde gerçekleşen bu kesme işlemi, *ribonükleaz III (RNase III)* özelliğindeki *Drosha* enziminin sorumluluğunda devam ettirilir. Memelilerde miRNA biyogenezinin aşamaları Şekil 2.10'da detaylı olarak gösterilmiştir (56).





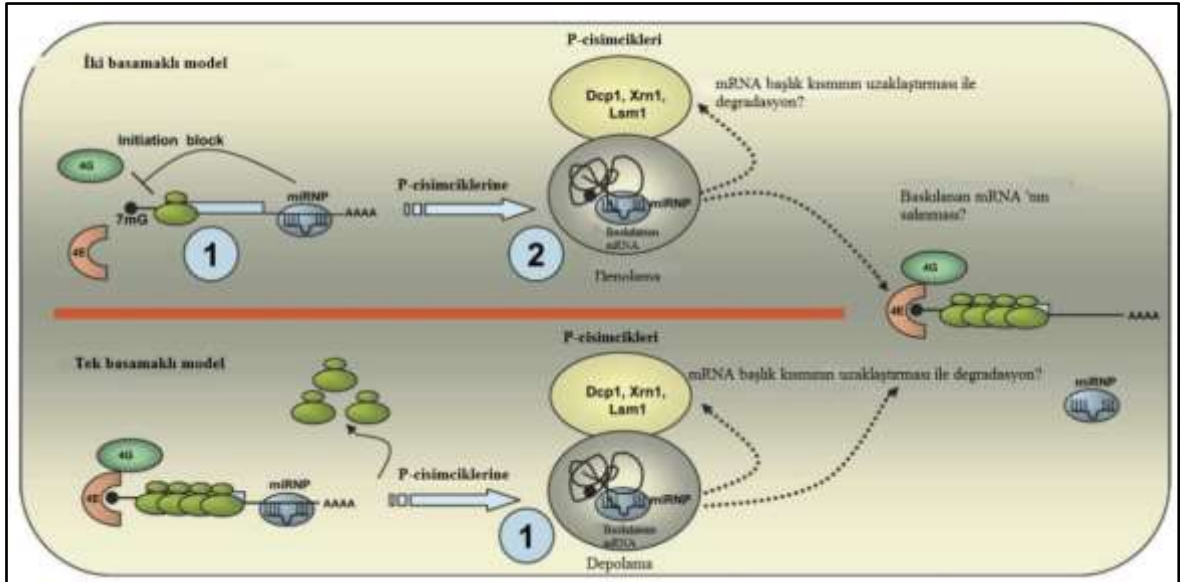
Şekil 2.10. Memelilerde miRNA biyogenezinin transkripsiyon aşaması ve farklı yolları. a şeklinde; miRNA transkripsiyonun ekzonik miRNA için alışagelmış yolu açıklanmıştır. b şeklinde; intronik miRNA için splicing aşaması ve *Drosha* ile kesim işleminden oluşan alışagelmış yol görülürken, c şeklinde ise; intronik miRNA'nın bazen olduğu haliyle *Drosha* kesim işlemine uğramadan splicing sonrası dallanarak veya doğrudan olgun miRNA'yı oluşturması gösterilmektedir (56).

Son zamanda yapılan çalışmalar *Drosha* ve *Dicer* gibi enzimlerin miRNA biyogenezindeki rolü ile ilgili yeni bilgileri ortaya çıkartmıştır. Örneğin; hsa-miR-451 *Dicer* enziminden bağımsız olarak ifade edilmektedir. Minju Ha ve V. Narry Kim (2014) yayımladıkları son derlemede en az 4 farklı yolla miRNA biyogenezinin gerçekleşebildiğini ve biyogenezde

görevli enzimlerin etkisinin pek çok başka protein tarafından düzenlenebildiğini aktarmaktadır (57,58).

2.2.3.1. mikroRNA'nın Sitoplazmada Geçirdiği İşlemler

Sitoplazmada RNase III (ribonükleaz III) özelliğindeki bir başka enzim olan Dicer miRNA biyogenezi için görevi devralır. pre-miRNA'lar kesilerek kısa miRNA dublekslerine çevrilirler (55). Daha sonra miRNA dubleks yapısı ikiye ayrılır ve zincirlerden bir tanesi olgun miRNA olarak Argonaute (AGO) proteinine tutunur. Bu protein "RNA tarafından indüklenen kompleks" (RISC ya da miRISC) içerisinde yer alır ve miRNA'ya rehberlik ederek hedef mRNA'nın 3'UTR kısmına tutunmasında rol oynar (54). Memelilerde yapılan miRNA çalışmaları, miRNA'ların mRNA degradasyonu/represyonu ya da protein traslasyonunun önlenmesi şeklinde iki farklı etkisi olduğunu göstermiştir. Özellikle mRNA'lar üzerindeki etkinin ortaya çıkabilmesi için miRNA:mRNA arasındaki tam baz çifti uyumunun önemi gözlenmiştir. Daha önce bahsedildiği gibi miRNA'lar rehber proteinler aracılığıyla taşınırlar. Bu proteinler miRNA etkisinin ortaya çıkması için gerekebilecek GW182 gibi sitoplazma P-cisimciklerinin ortama çağrılmasında da etkilidirler. Hücre içerisinde miRNA etkinliğini açıklayan modeller Şekil 2.11'de gösterilmiştir(59).



Şekil 2.11 miRNA etkinliğini anlatan modeller. İki basamaklı modelde ilk olarak mRNA'nın başlık kısmı uzaklaştırılırken, tek basamaklı modelde poliribozomlar çözülür

ve kompleks direkt P-cisimciklerine alınır. miRISC kompleksleri, mRNA 3'UTR kısmına yerleştikten sonra direkt poliribozomların dağılmasını sağlayarak (translasyon ilk basamağının durdurulması) ya da P-cisimciği enzimleri ile mRNA'nın şapka ve poliadenilasyon kuyruğunun ortadan kaldırılması ardından translasyonu durdurarak etki gösterebilirler(59).İfadesi durdurulan miRNA:mRNA kompleksi p-cisimcilikleri içerisinde saklanır. Burada ifade geçici olarak baskılanır ya da tamamen durdurulur(59).

Yapılan son çalışmalar sitoplazmada çember şeklinde küçük RNA'ların da bulunduğunu, bunların miRNA ifadesini baskılayabileceğini ve mRNA'ya bağlanmasını önleyebileceğini göstermektedir. Bu yüzden miRNA fonksiyonun düşündüğümüzden daha karmaşık olduğu göz önüne alınmalıdır (60).

2.2.4. MİKRORNA VE KANSER İLİŞKİSİ

mikroRNA'ların kanser gelişimi ile ilişkili olabileceği fikri, miRNA gen ailelerinin genomun daha hassas ve hasar almaya müsait, genellikle kanser ile ilişkili olan genlerin kodlandığı bölgelerinde yer almalarının keşfedilmesine dayanmaktadır (61,62). Kanser oluşumu sırasında mikroRNA katkısına dair ilk bulgular "kronik lenfosittik lökemi" (CLL) üzerine yapılan çalışmalar ile ortaya çıkmıştır. Bu hastalığa neden olan genler kromozomun sıklıkla delesyona uğrayan kritik bir noktasında bulunmaktadır. Çalışmalar burada polisistronik bir mikroRNA grubunun bulunduğunu ve bunların hsa-mir-15a ve hsa-mir-16-1 olduklarını ortaya koymuştur. Daha sonra ilerleyen yıllarda pek çok kanser türünde mikroRNA ifadesinin görüldüğü fark edilmiş, bu ifadeden yararlanarak tümör sınıflandırması, tümör ile normal dokunun ayrımı ve hastalığın hangi aşamada olduğunu tespit amacıyla çalışmalar başlatılmıştır (62).

2.2.4.1. Tümör Süpresör ve Onkogen Olarak mikroRNA'lar

mikroRNA'lar tıpkı protein kodlayan genler gibi tümör baskılayıcı özellik taşıyabilirler. Fonksiyon kayıpları hücre çoğalmasında artışa ve kanser gelişimine neden olabilmektedir. Bu fonksiyon kaybı genomik değişiklikler, delesyonlar, mutasyonlar veya miRNA biyogenezindeki herhangi bir sorun nedeniyle meydana gelebilmektedir(63). Buna en iyi örneklerden biri; hsa-miR-15a ve hsa-miR-16-1 gen ailesinin bulunduğu kromozom bölgesinin delesyonu ile meydana gelen kronik lenfositik lösemi hastalığıdır. Farelerde yapılan çalışmalar, hsa-miR-16-1 gen bölgesinde oluşan nokta mutasyonunun bu hastalığın gelişiminde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu gen ailesinin tümör süpresör etkinliği,

kronik lenfosittik lösemi hastalarında oldukça fazla ifade edilen BCL-2 anti apoptotik hedef geninin keşfi ile ortaya çıkarılmıştır(63).

İlk keşfedilen onkogen miRNA'lerden biri olan miR-155'in c-myc ile birlikte onkogen etki gösterdiği ve Hodgkin Lenfoma, Burkitt Lenfoma gibi hastalıklarda yüksek oranda ifade edildiği bilinmektedir (63). Yine hsa-miR-21 geni ile yapılan çalışmalar bu genin de onkogen özellik gösterdiğini ve önemli hemotolojik kanserler ile solid tümörlerde yüksek oranda ifade edildiğini ortaya koymuştur. hsa-miR-21 glioblastomada hücre ölümünü durduran, baskılayan bir etkidir. Yine aynı genin meme kanseri hücre hatlarında ve glioblastoma karaciğer hücre hatlarında oligonükleotid antisense yapılar kullanılarak susturulması, hücre büyümesini, çoğalmasını durdurmakta ve programlanmış hücre ölümünü başlatmaktadır (63,64).

2.2.4.2. Meme Kanseri ve mikroRNA İlişkisi

miRNA'ların meme kanserinin östrojen ve progesteron reseptör ifade seviyesi, tümör evresi, invazyon ve çoğalma indeksi gibi klinik özellikleri ile yakın ilişki içerisinde olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (65–68). Meme kanseri konusunda yapılan miRNA ifade çalışmaları, miRNA'ların meme kanserini sınıflandırmada ve hastalığın gidişatını belirlemede önemli bir yere sahip olduğunu, tümör dokusunu normal dokudan ayıran miRNA'ların varlığını, meme kanseri gelişimine katkı sağlayan, tümör hücrelerinin metastaz oranını etkileyen özelliklerinin de bulunduğunu vurgulamıştır. Örneğin; üçlü negatif (ER-, PR- HER2-) meme kanseri hasta dokularından yapılan çalışmalarla miRNA ifade profilinin kanserli hastalarda değişiklik gösterdiği, hayatta kalma oranı hakkında ipucu verdiği gözlenmiştir. Yüksek işlem hacimli profillemeye yöntemleri kullanılan bu çalışmalarda hedef mRNA'lar belirlenmiş, ifade durumlarının miRNA'lar ile uyumlu şekilde olduğu anlaşılmıştır (69). Yine miR-155'in meme kanserindeki etkisini anlamak için hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, bu miRNA'nın aşırı ifadesinin tümör gelişimine katkı sağladığını göstermektedir (70). Yani miRNA'lar, hem biyobelirteç olarak, hem de tümör gelişimine katkı yapan etkenler olarak meme kanseri için çok önemlidir.

2.2.4.3. EGFR (ERBB) Reseptör Etkinliğinde mikroRNA'ların Rolü

Son birkaç yıldır yapılan çalışmalarda, pek çok kanser türünde etkili olan ve aşırı ifadesi gözlenen EGFR reseptör ailesinin miRNA'larla olan ilişkisine, aralarındaki moleküler mekanizmaya odaklanılmaya başlanmıştır. Örneğin; üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde yapılan çalışmayla, miRNA (hsa-miR-24) aracılığıyla EGFR (HER1) reseptörünün aktivasyonunun gerçekleşebildiği, miRNA'nın iki fosfataz enzimini (PTPN9 ve PTPRF) hedef alarak susturduğu ve bu sayede tümör gelişimi, hücre çoğalması ile hücre göçüne katkı sağladığı ilk kez belirtilmiştir (71). Yine yapılan bir başka çalışma ile HER2 reseptörünün de mikroRNA'lar tarafından hedef olarak seçilebildiği ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma ile hsa-miR-199b-5p'nin HER2 geninin 3'UTR bölgesine bağlanarak ifadesini etkilediği ve ERK1/2 ya da AKT gibi sinyal yollarının ifadesine de etki ettiği gösterilmiştir. Böylece miR-199b-5p'in HER2+ hücre kültürlerinde agresif meme kanseri ifadesiyle ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (72). miRNA etkisi daha önce bahsedilen şekilde direkt olabildiği gibi, ligandların ifade değişikliği ile de ortaya çıkabilmektedir. Prostat kanseri hücrelerinde yapılan ve prostat kanseri hastalarından alınan örneklerle doğrulanan bir çalışma hsa-miR-203'ün prostat kanseri metastazında EGFR etkinliğini değiştirerek etki sağlayabileceğini ortaya koymuştur(73). Yine de EGFR reseptör ailesinin etkin olduğu kanserlerde mikroRNA'ların rolü tamamen gün ışığına çıkarılmamıştır ve yeni çalışmaların bu duruma katkı sağlanması beklenmektedir.

2.2.4.4. mikroRNA'ların Terapötik Etkileri

2.2.4.4.1. EGFR (ERBB) Odaklı Terapilerde mikroRNA'lar

Daha önce de bahsedildiği gibi EGFR (ERBB) reseptör ailesinin ifadesi miRNA etkinliği sonucu değişebilmektedir. ERBB odaklı terapilerin miRNA ifadesi ile etkinliğinin artıp azalabileceği birkaç çalışmada özellikle vurgulanmıştır. Örneğin; HER2+ hücrelerde yapılan bir çalışmada trastuzumab muamelesi sonrası miRNA ifade profillerinde değişiklik olduğu gözlenmiş ve hsa-miR-194'ün ifadesinin artması sonucu hücre göçünü, invazyonunun durduğu gözlenmiştir (74). Trastuzumab'a duyarlı meme kanseri hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada ise hsa-miR-26a ve hsa-miR-30b'nin ifadelerinin trastuzumab ile düzenlendiği vurgulanmış ve ifade artışı için bu iki miRNA ile

transfeksiyon yapıldığında hücre çoğalmasının gerilediği gözlenmiştir (75). Yine başka bir çalışma ile meme kanseri hastalarında tedavi sonrası ve öncesi hsa-miR-21, hsa-miR-373 ve hsa-miR-210 serum düzeylerine bakılmıştır ve kemoterapi sonrası yoğunluklarının arttığı tespit edilmiştir. hsa-miR-373 serum artışı ile tümörlerin klinik düzeyi arasında bağlantı olduğu anlaşılmıştır (76).

Lapatinib ile yapılan çalışmalar da lapatinib uygulaması sonucu miRNA profillemesinin değiştiğini göstermektedir. Örneğin; trichostatin ve lapatinib uygulaması gerçekleştirilen hücrelerle yapılan çalışmalar, trichostatin aracılığıyla ifadesi tetiklenen hsa-miR-7'nin EGFR (ERBB1) ifadesini azalttığını göstermiştir (77). Yapılan son bir çalışmada, *all-trans* retinoik asit bileşikleri ile lapatinibin beraber uygulandığı HER2+ hücrelerde yine miRNA profillerinin değiştiği gözlenmiştir. Hedef olduğu tahmin edilen transkriptlerle birlikte miRNA'lar modüller şeklinde bağlantı yapılarak bir araya getirilmiş ve 4 farklı modülün başta pro-onkogenik ve anti-onkogenik olmak üzere potansiyel rolleri olduğu tespit edilmiştir. 2. modüldeki miRNA'ların (hsa-miR-125a, hsa-miR-210, hsa-miR-193) ifade artışının SKBR3 hücrelerinde motilite ve hücre büyümesini artırdığı gözlenmiştir (78).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Meme kanseri konusunda yapılan miRNA ifade çalışmaları, miRNA'ların meme kanserini sınıflandırmasında ve hastalığın gidişatını belirlemede önemli bir yere sahip olduğunu, tümör dokusunu normal dokudan ayıran miRNA'ların varlığını, meme kanseri gelişimine katkı sağlayan, tümör hücrelerinin metastaz oranını etkileyen özellikte miRNA'ların bulunduğunu göstermiştir.

Özellikle son birkaç yılda miRNA uygulamalarında elde edilen gelişmelere paralel olarak, miRNA etkinliğinin kanser tedavisindeki yerine odaklanılmaya başlanmıştır. miRNA alanındaki gelişen ve derinleşen çalışmalar miRNA klonlaması, kantitatif PZR ve mikrodizin gibi yöntemleri kullanarak meme kanseri araştırmaları için yeni veriler çıkartmaya devam etmekte ve hastalığın oluşumu ve gelişimi ile ilgili soru işaretlerine cevap aramaya devam etmektedir. Ancak meme kanseri tedavisinde duyarlı olan miRNA'ların saptanmasına, EGFR reseptör ailesi odaklı terapilerde etkin miRNA'ların ve onlara ilişkin moleküler mekanizmanın belirlenmesine yönelik çok az çalışma bulunmaktadır. Terapi sırasında miRNA etkinliğine odaklanan çalışmaların çoğunluğu, miRNA'ların tek başına hücreler üzerindeki etkisine odaklanmakta ve hedef gen profili ya da tedavi sırasında miRNA'lar arasındaki iletişim ile ilgili bilgi sunmamaktadır.

Bu tez çalışmasıyla temel olarak miRNA aracılı gen ifadesi düzenlenmesinin ayrıntılı olarak aydınlatılması hedeflenmiştir. Tedavilere cevap veren mikroRNA'ların varlığına odaklanılmış, tedavi sürecinde rol alabilecek alternatif hedef moleküller olarak kullanımları ve kanser gelişiminde rol sahibi yolaklar üstünde etkileri araştırılmıştır. Tezde kullanılmış olan AGO2-IP yöntemi ilk olarak 2006 yılında Kenne ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir(79). miRNA ve RBP gibi mRNA ifadesi düzenlenmesinde etkin olan yapıların hedef mRNA profilinin (targetom) belirlenmesinde yüksek işlem kapasitesi sağlamaktadır. Her ne kadar hedef tahmininde kullanılan bilgisayar tabanlı yöntemler (PicTar, Miranda, TargetScan vs.) bulunsada hata payları mevcuttur. AGO2-IP yöntemi hedef ile ilgili biyokimyasal ve fiziksel ilişkiyi çok daha güvenilir şekilde ortaya koymaktadır. Buna göre tez çalışmasında amaçlananlar;

1. HER2+ meme kanseri hücrelerinde (SKBR3, BT474) trastuzumaba ve lapatinibe duyarlı miRNA profilinin mikrodizin analizi ile belirlenmesi
2. Tedaviye cevap veren miRNA'ların meme kanseri hücre kültüründe fonksiyonel karakterizasyonun gerçekleştirilmesi
3. AGO2-IP metodu kullanılarak ilgili miRNA'ların hedef gen profilinin bulunması
4. miRNA-miRNA networkleri aracılığıyla ilaç tedavisinde etkinlik gösteren miRNA aracılı moleküler mekanizmaların detaylı araştırılmasıdır.

Bu amaçlar doğrultusunda ilaçların moleküler etki mekanizmalarının miRNA'lar tarafından düzenlenme şekli ve içinde buldukları etkileşim daha iyi anlaşılmasına çalışılmıştır.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışmada kullanılan meme kanseri hücre hatları EGFR (HER1+) ve ERBB2 reseptörü (HER2+) statülerinin pozitif ve lapatinib ile trastuzumab ilaç uygulamalarına duyarlı oldukları bilinen meme kanseri hatlarından seçilmiştir (80). Hücreler “Amerikan Hücre Kültürü Bankası’ndan (ATCC)” alınmıştır. Her gruptan iki farklı hücre ile çalışılmış ve ilaç uygulamaları her iki hücre grubu için de gerçekleştirilmiştir. Hücre hatları Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1 Meme kanseri hücre hatları, reseptör ifadeleri ve ATCC numaraları.

Hücre Kültürü	Reseptör İfadesi	ATCC Kodu
SK-BR-3	HER1+, HER2+ ER-	HTB-30
BT-474	HER1+, HER2+ ER+	HTB-20

Ek olarak lentiviral virüslerin paketlenmesi için kullanılan HEK293T (insan embriyonik böbrek hücresi) hücreleri Prof. Dr. Anke van den Berg’in laboratuvarından temin edilmiştir.

Hücre kültürü idamesi için kullanılan besi yerleri malzemeleri; McCoy's 5A w/ L-Gln (Lonza, Cat. No. 12-688F), DMEM 4.5 g/L Glucose w/ L-Gln (Lonza, Cat. No.12-604F), RPMI 1640 w/ L-Glutamine + 5 mg/mL Bovine insulin (Lonza, Cat. No.BE12-702F), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, Cat. No. S1820-500), Trypsin-EDTA 1X w/o Calcium w/o Magnesium w/ Phenol Red (Biowest, Cat. No. L0930-100), Pen/Strep (Lonza, Cat. No.17-602E), L-Glutamine 200 mM (Lonza, Cat. No. 17-605C) şeklindedir.

Hücrelerin dondurulması için DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, CAS No. 67-68-5) kullanılmıştır.

4.1.2. İLAÇ UYGULAMASI VE IC50 DEĞERLERİNİN TESPİT EDİLMESİ

miRNA ifadesinin araştırıldığı iki ilaçtan trastuzumab (Herceptin) Prof. Hakan Gürdal'ın laboratuvarından temin edilmiştir ve PBS içerisinde 300 mg/mL ana stok olarak saklanmış, farklı konsantrasyonlarda sulandırmalar hazırlanarak kullanılmıştır. Lapatinib ise (lapatinib ditosylate) Santa Cruz Biotechnology (Sc-20205A) firmasından alınmıştır.

4.1.3. WST-1 UYGULAMASI

WST-1 uygulaması için Roche WST-1 kit (Cat no. 11644807001) kullanılmıştır.

4.1.4. RNA İZOLASYONU

RNA izolasyonu için kullanılan materyaller şu şekildedir: Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, Cat no: 79306); kloroform (Sigma, C2432-500 mL); izopraponal (Sigma, 19516-25); etanol (Merck Millipore, CAS no.64-17-5).

4.1.5. MİRNA MİKRODİZİN ANALİZİ

Mikrodizin için Agilent Human miRNA Microarray, Release 19.0, 8x60K kullanılmıştır ve 2549 miRNA içermektedir. Etkiletleme ve hibridizasyon kiti içeriği: T4 RNA Ligase (27 µL); 10X T4 RNA Ligase Buffer (90 µL); Calf Intestinal Phosphatase (22 µL); 10X Calf Intestinal Phosphatase (90 µL); DMSO (180 µL); Moleküler su (450 µL); 2X Hi-RPM Hibridizasyon Buffer (600 µL); 10X Gene Expression Blocking Agent; Cyanine 3-pCp (81 µL) şeklindedir. Yıkama bufferları: Gene Expression Wash Buffer 1, 4L; Gene Expression Wash Buffer 2, 4L; Triton X-102 (10%) şeklindedir. Spike-in kit: Dilution Buffer (2x1.6 mL), Labeling Spike-In (10 µL), Hyb Spike-In (10 µL) şeklindedir.

4.1.6. MİRNA EŞ-ZAMANLI PZR YÖNTEMİ

miRNA ifadelerinin araştırılması için Qiagen miScript PZR sistemlerinden faydalanılmıştır. İki farklı kit kullanılmıştır. Bunlardan ilki ters transkripsiyon işlemi sağlayan miScript II RT Kit (Cat no: 218160)'dir. İçeriği şu şeklindedir: miScript Reverse Transcriptase Mix

(24 µl); 10x miScript Nucleics Mix (50 µl); 5x miScript HiSpec Buffer (100 µl); 5x miScript HiFlex Buffer (100 µl). Diğeri ise eş zamanlı PZR'ın gerçekleşmesini sağlayan miScript SYBR Green PCR kit (Cat no. 218073) içeriği: 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (1 ml); 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix; 10x miScript Universal Primer (1mL) şeklindedir. Kullanılan primerler Çizelge 4. 2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Çalışmada kullanılan miRNA primerleri

miRNA Adı	Primer Sekansı	Katalog Numarası	Ürün Adı
hsa-miR-545-5p	UCAGUAAAUGUUUAUU AGAUGA	MS00010101	Hs_miR-545*_1 miScript Primer Assay
hsa-miR-181d	AACAUUCAUUGUUGUC GGUGGGU	MS00031500	Hs_miR-181d_2 miScript Primer Assay
hsa-miR-449a	UGGCAGUGUAUUGUUA GCUGGU	MS00004228	Hs_miR-449_1 miScript Primer Assay
hsa-miR-581	UCUUGUGUUCUCUAGA UCAGU	MS00004837	Hs_miR-581_1 miScript Primer Assay
hsa-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUAC CAGUG	MS00003577	Hs_miR-150_1 miScript Primer Assay
hsa-miR-935	CCAGUUACCGCUUCCGC UACCGC	MS00010836	Hs_miR-935_1 miScript Primer Assay
hsa-miR-338	AACAAUAUCCUGGUGC UGAGUG	MS00009478	Hs_miR-338-5p_1 miScript Primer Assay
hsa-miR-576*	AAGAUGUGGAAAAAUU GGAAUC	MS00032032	Hs_miR-576-3p_2 miScript Primer Assay
hsa-miR-345-5p	GCUGACUCCUAGUCCA GGGCUC	MS00031766	Hs_miR-345_3 miScript Primer Assay
hsa-miR-544a	AUUCUGCAUUUUUAGC AAGUUC	MS00010087	Hs_miR-544_2 miScript Primer Assay
hsa-miR-623	AUCCCUUGCAGGGGCU GUUGGGU	MS00005124	Hs_miR-623_1 miScript Primer Assay
hsa-miR-541*	UGGUGGGCACAGAAUC UGGACU	MS00031983	Hs_miR-541_2 miScript Primer Assay

hsa-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGU GUGUGG	MS00003787	Hs_miR-206_1 Primer Assay	miScript
hsa-miR-580-5p	UAAUGAUUCAUCAGAC UCAGAU	MS00046004	Hs_miR-580-5p_1 Primer Assay	miScript
hsa-miR-613	AGGAAUGUUCUUCUU UGCC	MS00005054	Hs_miR-613_1 Primer Assay	miScript
hsa-miR-26a*	CCUAUUCUUGGUACU UGCACG	MS00009219	Hs_miR-26a-1*_1 Primer Assay	miScript
hsa-miR-493-3p	UGAAGGUCUACUGUGU GCCAGG	MS00006979	Hs_miR-493-3p_1 Primer Assay	miScript
hsa-miR-298	AGCAGAAGCAGGGAGG UUCUCCA	MS00009275	Hs_miR-298_1 Primer Assay	miScript
RNU6B		MS00033740	Hs_RNU6-2_11 Primer Assay	miScript

4.1.7. DHARMACON MİRNA MİMİC VE İNHİBİTÖRLER

Çalışmada kullanılan hsa-miR-345, hsa-miR-449a mimic ve inhibitörlere ek olarak mimic ile inhibitörlere ait negatif kontroller Dharmacon'da sipariş edilmiştir. miRIDIAN microRNA mimic ve hairpin inhibitörler: hsa-miR-449a mimic (C-300723-03-0005) (5 nmol); hsa-miR-345 mimic (C-300711-05-0005) (5 nmol); miRIDIAN microRNA mimic negatif kontrol (cel-miR-67)(CN-001000-01-05)(5 nmol); hsa-miR-449a hairpin inhibitör (IH-300723-05-0005)(5 nmol); hsa-miR-345 (IH-300711-06-0005)(5 nmol); hairpin inhibitör negatif kontrol (cel-miR-67)(IN-001005-01-05) (5 nmol) şeklindedir.

4.1.8. LENTİVİRAL VEKTÖRLERİN KLONLANMASI

Lentiviral vektör dizaynı gerçekleştirildikten sonra SBI (System Biosciences)'a ait plazmid sistemleri kullanılmıştır. Plazmid içerisine klonlanan shRNA sekansları IDT (Integrated DNA Technologies) firmasında sentezlenmiştir. Vektörlere ait sekans bilgileri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 miRZip vektörlerine ait sekanslar

miRZipNT1 sense

TCCGCTAAGGTCAAGTCGCCCCGATCTTCTGTCAGAGCGAGGGCGACTTAA CCTTAGGTTTTTG
miRZipNT1 anti-sense
GCGATTCCAGTTCAGCGGGGGCTAGAAGGACAGTCTCGCTCCCGCTGAATTGG AATCCAAAACTTAA
miRZip345 sense
GATCCGGCTGACTACTAGTCCAGAGCCCCTTCTGTCAGGAGCCCTGGACTAG GAGTCAGCTTTTTG
miRZip345 anti-sense
AATTCAAAAAGCTGACTCCTAGTCCAGGGCTCCTGACAGGAAGGGGCTCTGGA CTAGTAGTCAGCCG
miRZip449a sense
GATCCGTGGCAGTATATTGTTAGATGATCTTCCTGTCAGACCAGCTAACAATAC ACTGCCATTTTTG
miRZip449a anti-sense
AATTCAAAAATGGCAGTGTATTGTTAGCTGGTCTGACAGGAAGATCATCTAAC AATATACTGCCACG

Kullanılan restriksiyon enzimleri New England Biolabs firmasından sipariş edilmiştir. Kullanılan enzimler: *Bam*HI (10.000 unit, Cat no. R0136S); *Eco*RI (10.000 unit, Cat no. R0101S); T4 DNA ligaz (20.000 unit, Cat no. M0202S) şeklindedir. Jel ekstraksiyonu için Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Cat no. D4001) kullanılmıştır. Koloni PZR için kullanılan primer çiftleri Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Koloni PZR primer çifti

F Mzip	CTGGGAAATCACCATAAACG
R Mzip	TAACCAGAGAGACCCAGTAG

Klonlanan vektörlerin eldesi için Qiagen Miniprep Kit (Cat No./ID: 27104); Qiagen Plasmid Plus Maxi Kit (Cat No./ID: 12963) kullanılmıştır.

4.1.9. AGO2-IP UYGULAMASI

50 mL NT2 buffer için: 50mM Tris (pH7.4)'den 2.5 mL 1M Tris; 150mM NaCl 'den 1.5 mL 5M NaCl; 1mM MgCl₂'den 50 µL 1M MgCl₂; 0.05% Nonidet P-40'den 500 µL 5% NP-40 kullanılmış, 45.45 mL steril su eklenmiştir.

Polysome lizis buffer : 10 mL of 4X PL buffer hazırlanmıştır. 5mM MgCl₂'den 200 µL 1M MgCl₂; 100mM KCl'den 4 mL 1M KCl; 10mM HEPES (pH7.0); 400 µL 1M HEPES 0.5% Nonidet P-40'den 4 mL 5% NP-40 hazırlanmış ve 1.4 mL steril su eklenmiştir.

1 mL lizis buffer için; 250 µL 4x PL buffer'a 1mM DTT'den 1 µL; 100unit/ml Rnase OUT (Gibco)'den 2.5 µL; 1x protease inhibitor (Roche)'den 142.9 µL eklenmiş üzeri 603.6 µL steril su tamamlanmıştır.

IP-buffer 900 µL (X1 IP deneyi için): NT2 buffer (1x) 859 µL; Rnase OUT 40unit/ul (Gibco) 5 µL; Vanadyl ribonucleoside (Gibco) 5 µL; 1M DTT 1 µL; 0.5M EDTA 30 µL kullanılmıştır.

Western blot için kullanılan çözeltiler şu şekildedir: 10% SDS (10 g SDS (N-22), 100 mL ddH₂O); 4X running buffer (18.1 g Tris (T-29) pH 8.8 100 mL'ye tamamlanır); 4X stacking buffer (6.1 g Tris (T-29) pH.6.8 100 mL'ye tamamlanır); 10% APS (1g (A-92) + 10 mL su); elektroforez buffer (3 g Tris, 14.4 g Glycine, 10 ml 10% SDS 1 L olacak şekilde sui le tamamlanır); 5X transfer buffer (180g Glycine, 32.25 g Tris sui le 1900 mL'ye tamamlanır pH 8.3 olarak ayarlanır)

4.1.10. AGO2-IP UYGULAMASI ARDINDAN MIKRODİZİN YAPILMASI

Hedef gen profilinin tespiti için Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 (Ref. 900466) mikrodizin platformu kullanılmıştır. RNA örneklerinin biotinylated komplementer RNA'ya (cRNA) dönüştürmek için Genechip 3' IVT PLUS Reagent Kit kullanılmıştır.

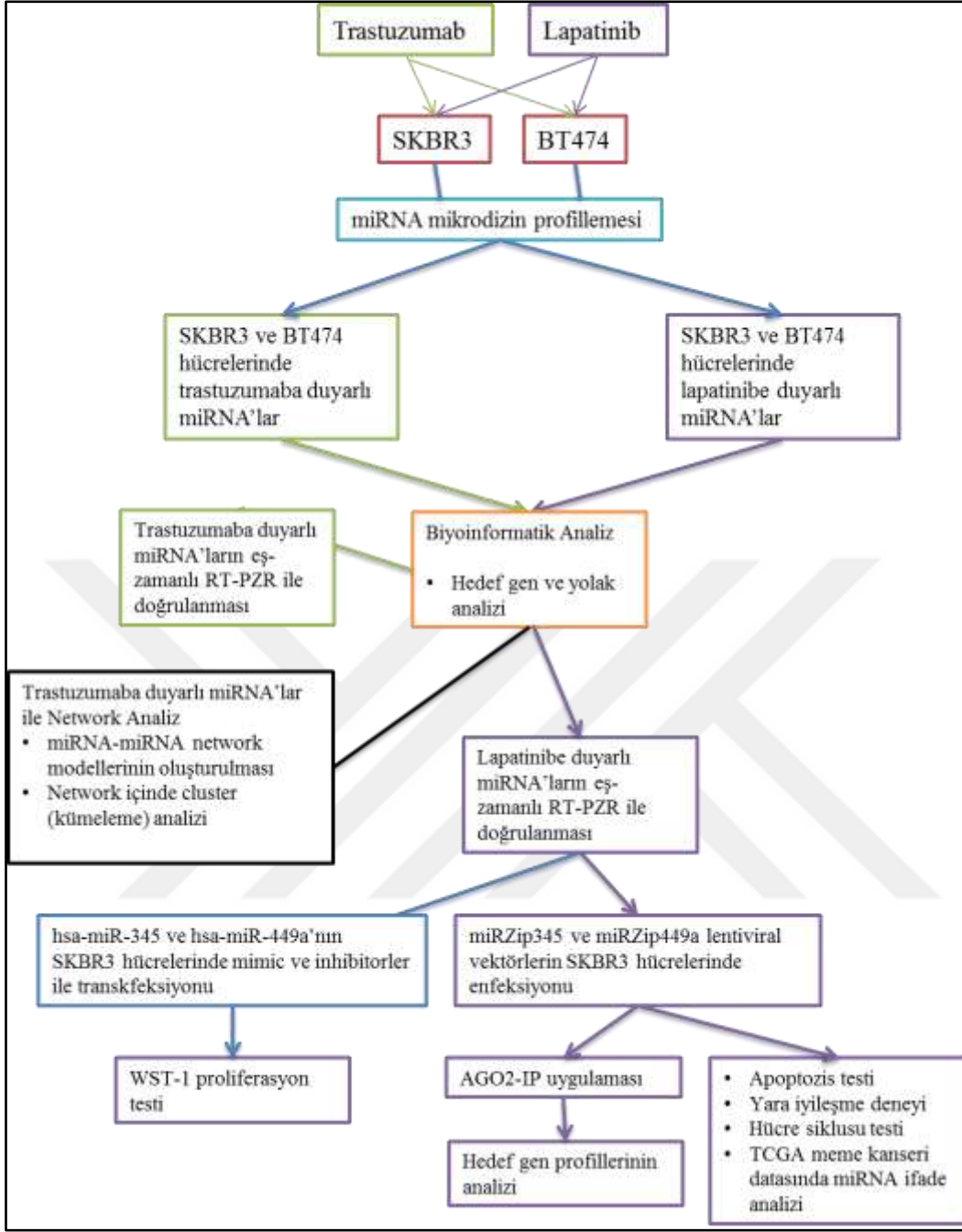
3' IVT Amplifikasyon Kit Modül 1 içeriği : 3' First-Strand Enzyme; 3' First-Strand Buffer; 3' Second-Strand Enzyme; 3' Second-Strand Buffer; 3' IVT Enzyme ; 3' IVT Buffer; 3' IVT Biotin Label ; steril su şeklinedir. 3' IVT Amplifikasyon Kit Module 2 içeriği: 3' Fragmentasyon Buffer; Purifikasyon boncukları şeklinedir. GeneChip Poly-A RNA Kontrol Kit: Poly-A control stok ve Poly-A kontrol dilusyon buffer'dan oluşmaktadır. GeneChip Hibridizasyon Kontrol Kit: 20X Hybridization Kontrol içerir.

GeneChip Hibridizasyon Yıkama ve Boyama Kit (Ref. 900720-C): Pre-Hybridization Mix; 2X Hybridization Mix; DMSO; steril su; Stain Cocktail 1; Stain Cocktail 2; Array Holding Buffer; Wash Buffer A; Wash Buffer B iğerirmektedir. Hibridizasyon işlemi Affymetrix hibridizasyon fırınında geręekleřtirilirken tarama işlemi Affymetrix Scanner ile sağlanmıştır. Ćiplerin yıkama ve tarama işlemleri Genechip Command Console AGCC 3.0 programında geręekleřtirilmiřtir.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. TEZDE UYGULANAN YÖNTEMLER VE İZLENEN BASAMAKLAR

Tez ęalıřmasında yapılan deneyler ve izlenen yöntemler, basamaklar halinde şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Tez çalışmasında izlenen basamaklar

4.2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ İDAMESİ

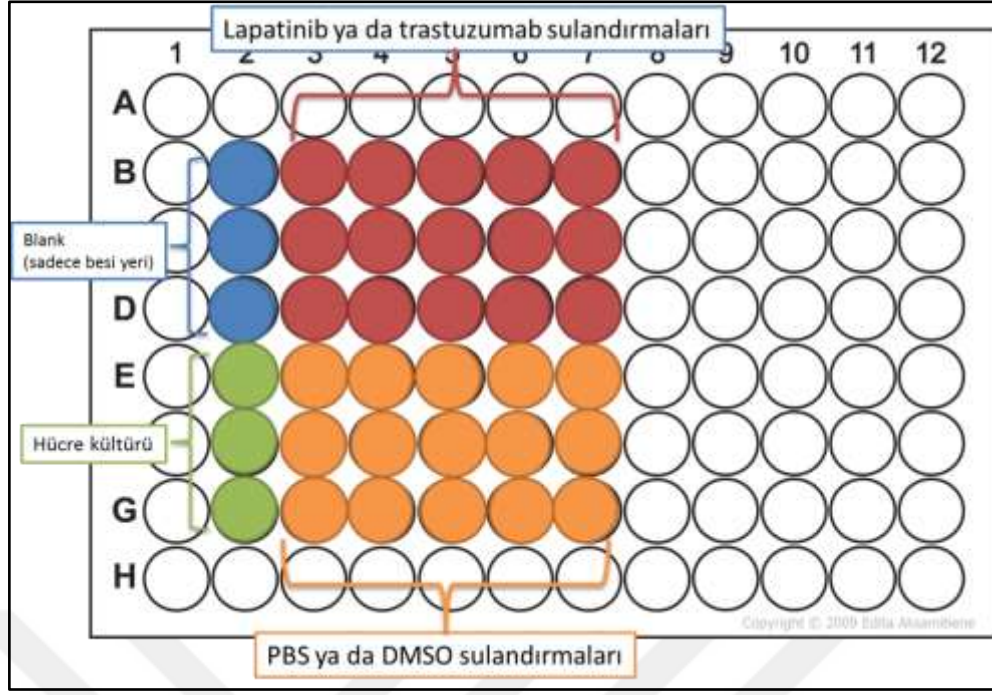
Hücreler (BT474, SKBR3, HEK293T), ATCC tarafından önerilen ve/veya daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre uygun besi yeri ortamında kültür edilmiştir. SKBR3 hücreleri %10 FCS (fötal buzağı serumu), %1 penicillin/streptomycin ve %1 L-glutamin içeren McCoy's 5A besi yerinde idame ettirilmiştir. BT-474 hücreleri

%10 FCS, %1 penicillin/streptomycin ve %1 L-glutamin içeren RPMI 1640 besi yerinde büyütülmüştür. HEK293T hücreleri %10 FCS (fötal buzağı serumu), %1 penicillin/streptomycin ve %1 L-glutamin DMEM besi yerinde 37°C ve %5 CO₂ ortamı sağlayan inkübatörde kültür edilmiştir.

Hücrelerin devamlılığı flaskların neredeyse %80 doldurmuş hücrelerin pasajlanması yöntemi ile sağlanmıştır. Hücreler pasajlama sırasında tripsin enzimi ile muamele edilerek kaldırılmış ve yeni flasklara aktarılmışlardır. Uzun süreli stok olarak saklanacak olan hücreler, %10 DMSO ve %90 FBS içeren saklama ortamında dondurularak, sıvı nitrojende kriyoviallerde saklanmıştır. Hücreler, deneylerin gerekliliklerine göre petri kaplarında, 24-kuyulu, 6-kuyulu ya da 96-kuyulu hücre plakalarında büyütülmüştür.

4.2.3. TRASTUZUMAB VE LAPATİNİB IC₅₀ DEĞERLERİNİN TESPİTİ

96 kuyulu planelere hücre ekimi (her kuyu için 6000-7000 hücre) yapıldıktan 24 saat sonra belirlenen dozlarda ilaç uygulaması gerçekleştirilmiştir. Çeşitli meme kanseri hücre hatların daha önce yapılan çalışmalar sonucu elde edilen IC₅₀ (hücrelerde %50 ölüme neden olan ilaç konsantrasyonu) değerlerine uygun dozlar seçilerek uygulama yapılmıştır. Buna göre; lapatinib ilaç uygulaması konsantrasyonları; 10 µM, 1 µM, 0.5 µM, 0.1 µM, 0.01 µM, 0.001 µM olarak belirlenmiştir ve 72 saat boyunca sürdürülmüştür. Trastuzumab uygulaması ise; 6 µg/mL, 2 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.1 µg/mL konsantrasyonlarında 144 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. 144 saat uygulama yapılan trastuzumab deneyinde 72. saat hücre besi yerleri değiştirilmiştir. İlaç uygulaması her bir sulandırma için 3 adet kuyu kullanılarak yapılmıştır. Diğer 3 kuyuya ise ilacın çözücüsü olan madde kontrol olarak eklenmiştir. Uygulamanın gerçekleştirildiği deney dizaynı Şekil 4.2'de anlatılmıştır.



Şekil 4.2. IC50 değerlerinin hesaplanması için uygulanan ilaç konsantrasyonları

İlaç uygulamasından sonraki 72. saat 10 µl miktarında WST-1 (Roche) tüm kuyucuklara konularak 37°C ve %5 CO₂ koşullarındaki yaklaşık 2 saatlik inkubasyonun ardından spektrofotometre cihazı kullanılarak absorbansın 450 nm dalga boyu olduğu aralıkta ölçüm yapılmıştır. Absorbans değerleri kullanılarak doz-cevap eğrileri oluşturulmuş ve hücrelerin en az %50'sinin öldüğü doz belirlenmiştir. IC50 değerleri (%50 ölüme neden olan ilaç konsantrasyonu) Graphad Prism 6 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Her ilaç hücre ikilisi için bu protokol uygulanmış, hücrelerin muamelesi için gerekli ilaç dozu belirlenmiştir.

4.2.4. WST-1 UYGULAMASI İLE HÜCRE ÇOĞALMASININ TESPİTİ

miRNA'ların ve ilaç uygulamalarının hücre çoğalması üzerine etkisi WST-1 (Roche) uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. WST-1 protokolü yaşayan hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek amacı ile tasarlanmış bir protokoldür ve hücre çoğalması ve sitotoksite testleri için kullanılan bir yöntemdir. Protokol, WST-1'in yaşayan hücreler tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda suda çözülebilen formazan tuzu oluşur ve açığa çıkan formazan boyası bir ELISA ya da spektrofotometre okuyucusu tarafından ölçülür. Absorbans değeri canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

Yani absorbans arttıkça canlı kalan hücrelerin sayısı fazla olmuş olur. Bu yüzden yüksek dozda ilaç uygulaması yapılan sulandırmalarda absorbans düşük beklenirken, ilaç dozu azaldıkça giderek artacaktır.

İlaç uygulamaları ve/veya miRNA transfeksiyonları gerçekleştirildikten sonra en az 48 saat beklemenin ardından WST-1 uygulaması yapılmıştır. 100 µl besi yeri içeren kuyu için 10 µl WST-1 çözeltisi eklenmiştir. 37°C ve %5 CO₂ koşullarındaki 2 saatlik inkübasyonun ardından Victor spektrofotometre kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.

4.2.5. HÜCRELERİN UYGUN İLAÇ DOZU İLE MUAMELESİ

Canlılık oranları üzerine en az %50 civarı etki gösteren ilaç konsantrasyonları hücrelerin muamele edileceği dozlar olarak belirlenmiş ve HER2+ olan SKBR3 ve BT474 hücreleri trastuzumab (herceptin) ve lapatinib ile muamele edilmiştir. Trastuzumab uygulaması 6 µg/mL; lapatinib uygulaması 2 µM konsantrasyon ile yapılmıştır. Bu uygulamalar sonrasında elde edilen hücreler RNA izolasyonunda kullanılacağı için ilaç uygulamaları petri kaplarında yapılmıştır. Her hücre hattı için 2 adet biyolojik tekrar kullanılmış, ayrıca ilaç ile muamele edilen hücrelerin kontrolü olarak, ilaçların içinde çözülmediği kimyasal ile muamele edilen kontrol hücreler de çalışmaya dâhil edilmiştir. İlaç uygulamalarından 24 saat önce 2×10^6 hücre 10 cm'lik petri kaplarına ekilmiştir.

4.2.6. İLAÇ UYGULAMASI ARDINDAN RNA İZOLASYONU

RNA izolasyonu miRNA profillenmesinin elde edilmesi amacıyla yapılmıştır. İlaç uygulamasından sonraki 72. saat (lapatinib) ve 144. saat (trastuzumab) izolasyon yapılacak olan hücreler soğuk PBS ile yıkanmış, ardından 2 mL TRIzol eklenmiş ve bir kazıyıcı yardımı ile TRIzol ile birlikte kazınarak tüplere alınmıştır. Daha sonra RNA'lara 1/5 oranında kloroform eklenip sertçe çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında bekletilmiştir. 14000 rpm hızda 20 dakika 4°C'de santrifüj yardımı ile RNA içeren berrak faz TRIzol karışımından ayrılmıştır. Berrak faza başlangıç TRIzol miktarının yarısı kadar izopropanol eklenip oda sıcaklığında 10 dakika beklenmiştir. Ardından 14000 rpm hızda 25 dakika santrifüj yapılmıştır. Başlangıç TRIzol miktarı kadar %70'lik etanol kullanılarak iki kez yıkama tekrarlanmıştır. Yıkama işlemi 10000 rpm hızda 10 dakika santrifüj ile

gerçekleştirilmiştir. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra RNA peletleri steril su ile belli miktarlarda sulandırılmıştır. RNA kantifikasyonu Nanodrop ND 1000, spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. RNA'ların bütünlüğü %1'lik agaroz jelde, 100 V, 300 mA 30 dakika yürütülmeleri ardından kontrol edilmiştir. Her bir RNA sulandırmasından 1-2 µl yüklenmiştir. Çizelge 4.2'de belirtildiği gibi elde edilen RNA'lar her bir hücre hattı için ilaç uygulanan ve uygulanmayan şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır ve toplam 8 petri kabındaki hücrelerde çalışılmıştır.

Çizelge 4.5 Uygulanan ilaçlar ve yapılan mikrodizin analiz sayısı ile hücre hatları.

Hücre Hattı	İlaç Uygulanacak Örnek Sayısı	Kontrol Sayısı
SKBR3	Trastuzumab X 2	X 2 (PBS)
BT-474	Trastuzumab X 2	X 2 (PBS)
BT-474	Lapatinib X 2	X 2 (DMSO)
SKBR3	Lapatinib X 2	X 2 (DMSO)
Toplam	8 adet ilaç uygulaması	8 adet kontrol

4.2.7. İLACA DUYARLI MİRNA'LARIN MİKRODİZİN ANALİZİ İLE TESPİT EDİLMESİ

İlaç uygulanan ve kontrol olarak kullanılan her iki RNA grubu da miRNA mikrodizin analizi için Agilent Human miRNA mikrodizin platformları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Agilent miRNA platformları Affymetrix platformlardan farklı olarak bir çip üzerinde bir türe spesifik (insan, fare vs.) şekilde hazırlanmıştır. Yani sadece insan miRNA'larının olduğu bir platforma sahiptir ve bu nedenle daha spesifik sonuç vermektedir. Bu yüzden özellikle tercih edilmiştir. Mikrodizin analizinde RNA'lar 50 ng/mL konsantrasyonda hazırlandıktan sonra takip edilen aşamalar şu şekildedir; Fosfataz

muamelesi ve 37° C'de 30 dakika inkübasyon, defosforile RNA hazırlanması (DMSO eklenir, buzda soğutma, etiketleme reaksiyonu eklenir, 2 saat 16°C inkübasyon ve etiketli RNA'nın hazırlanması gerçekleştirilir), vakum yoğunlaştırıcı ile örneğin kurutulması (yaklaşık 2-3 saat, 45°C - 55°C arasında sürdürülür), hibridizasyon karışımının eklenmesi ve buzda soğutma, 20 saat hibridizasyon (55°C, 20 RPM), yıkama ve tarama.

Fosforilasyon ile RNA içeren örneklerden florasan-işaretli miRNA'lar oluşturulur. Bu metod %90'dan fazla verimle RNA molekülünün 3' ucuna bir adet Cyanine (3-pCp) molekülü ligasyonunu kapsar ve örnek işaretleme ile hibridizasyon için gerekli olan basamaklardan biri tamamlanmış olur. Ardından saflaştırma için kolon kullanılmıyorsa, örnekleri kurutularak devam edilir. Bu basamakta DMSO ve bağlanmamış Cyanine-3-pCp uzaklaştırılır. Örnek işaretleme sonrası tamamen kuru olmalıdır, çünkü kalan DMSO hibridizasyon sonucuna olumsuz etki edecektir. Hibridizasyon için örnekler hazırlanır, hibritleme yapılır ve yıkamanın ardından verilerin elde edilmesi için yapılan bilgisayarda tarama işlemi ile protokol sonlandırılır.

miRNA profillemesi için bu çalışmada, 2006 miRNA içeren Agilent Human miRNA Microarray, Release 19.0, 8x60K (G4870A, Agilent Technologies) platformu tercih edilmiştir. Tarama işlemi Roche Nimblegen cihazda, Agilent Scan Software kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.7.1. miRNA Mikrodizin Data Analizi

Mikrodizin sonucu elde edilen sonuçlar BRB Array Tools 4.3.2 kullanılarak analiz edilmiştir. Normalizasyon için "quantile normalizasyon" methodu tercih edilmiştir (81). İstatiksel analiz için bir modifiye t-test yöntemi olan "between groups of array" seçilmiş ve ilaç uygulanan hücre kültürlerinde ifadesi en 2 kat azalan veya artan, p-değeri < 0.05 olan tüm miRNA'lar alınmıştır. Ardından ifade değişikliği gösteren miRNA'ları benzerliklerine göre gruptandırmak için Treeview programı kullanılarak hiyerarşik kümeleme analizi yapılmıştır.

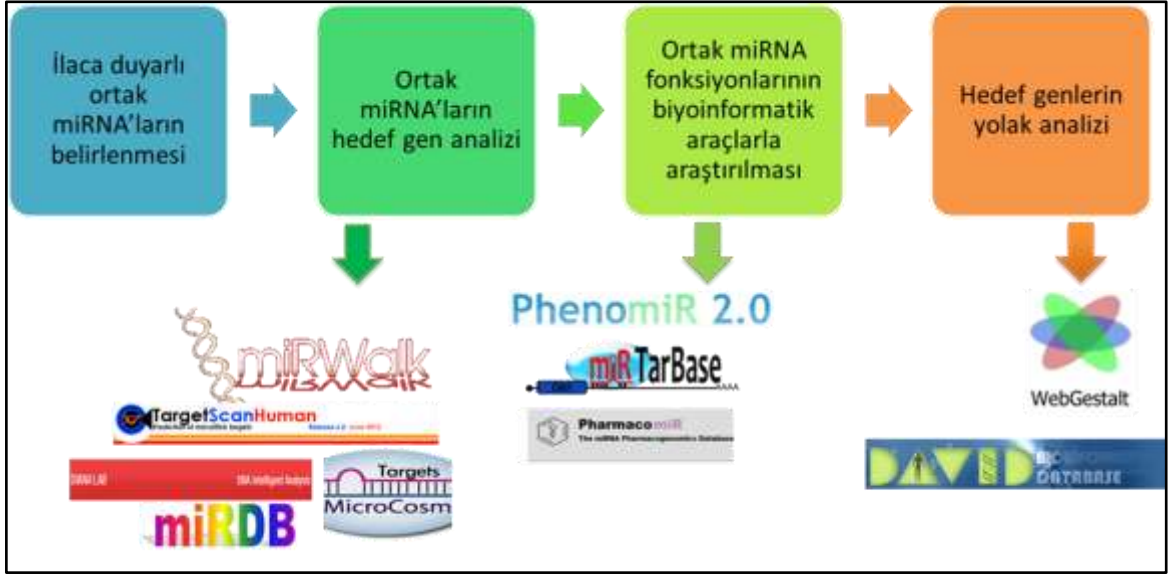
4.2.8. BİYOİNFORMATİK ANALİZ

4.2.8.1. İfade Değişikliği Gösteren miRNA'ların Biyoinformatik Analizi

BT474 ve SKBR3 hücrelerinde trastuzumab veya lapatinib muamelesi sonrasında ortak ifade değişikliği gösteren miRNA'ların hedef genleri ve yer aldıkları yollar bulunmuştur. Hedef analizi için her bir miRNA ilk olarak miRWALK (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) veri tabanında deneysel olarak valide edilmiş hedef genlerin varlığı açısından araştırılmıştır. miRWALK dışında hedef tahmini yapan TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_61/), DIANA tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/>), miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) gibi veri tabanları kullanılmış, her bir veri tabanı tarafından önerilen kıstaslara uygun şekilde hedef genler belirlenmeye çalışılmıştır.

Hedef genlerin bulunması dışında ilgili miRNA'ların fonksiyonun özellikle meme kanserinde ve ilaç etkinliğindeki rolünün tahmini için PhenomiR (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir/>), miRTarBase (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir/>) ve Pharmaco-miR (<http://www.pharmaco-mir.org/>) veri tabanları da kullanılmıştır. PhenomiR; hastalıklarda ve diğer biyolojik işlevlerde farklı ifade olan miRNA'lar hakkında bilgi verirken, miRTarBase literatür taraması ile ilgili miRNA'nın deneysel olarak valide edilmiş hedeflerinin olup olmadığını gösteren bir web tabanlı araçtır. Pharmaco-miR ise protein-ilac etkileşimleri ile ilgili bilgiyi miRNA ifadeleriyle bir araya getirerek ilgili ilaçla etkileşime girebilecek potansiyel miRNA'ların tespitini sağlayan bir veritabanıdır.

Hedef gen analizi ardından Webgestalt (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) arayüzü kullanılarak ve KEGG pathway üzerinde ilgili genlerin bulunduğu yollar tespit edilmiştir, meme kanseri ile ilişkili olup olmadıkları araştırılmıştır. miRNA'ların biyoinformatik analizi için takip edilen yol Şekil 4.3'te detaylı gösterilmiştir.

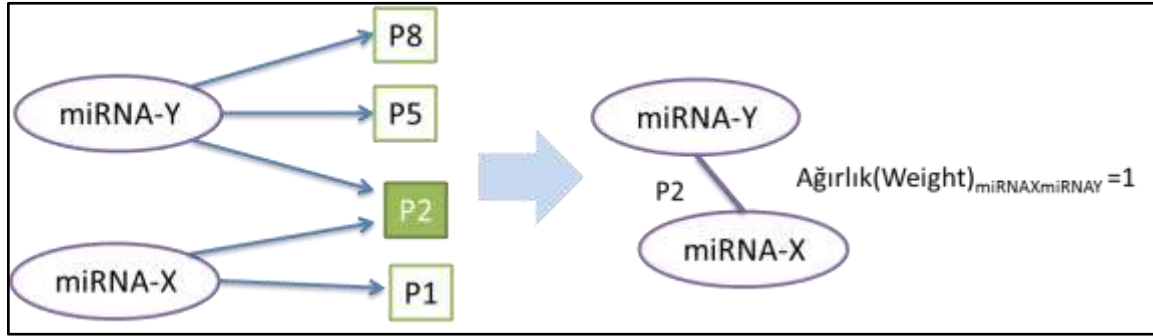


Şekil 4.3 İlaça duyarlı miRNA'ların hedef analizi gerçekleştirilirken kullanılan veri tabanları ve izlenen yol.

4.2.8.2. Network Yapılandırması ve Network Görüntülenmesi

Trastuzumaba cevap veren miRNA listeleri ve hedefledikleri yolaklar kullanılarak miRNA-miRNA networkleri (ağları) oluşturulmuştur. İlk olarak, ilaç uygulaması ardından ifade değişikliği gösterdiği belirlenen miRNA'lara ait olası hedef genler iki farklı veritabanı kullanılarak bulunmuştur. Bu veritabanları farklı yaklaşımlarla gen hedeflerinin belirlenmesini sağlayan DIANA tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/>) ve TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) olarak belirlenmiştir. Hedef genler belirlenirken TargetScan için eşik değer en az -0.3; DIANA MicroT için 0.7 olarak belirlenmiştir. Ardından çıkan sonuçların kesişimi alınmıştır. Her bir miRNA'ya ait olası hedef genlerden oluşan kesişim listeleri kullanılarak yolak analizi yapılmış ve ilgili miRNA'ların hedefledikleri yolaklar tespit edilmiştir. Sonrasında iki miRNA (node'lar) arasında olan etkileşimin (interaksiyon) şeklini ve gücünü (weight) gösterecek şekilde networkler oluşturulmuştur. Visual Studio 2010 ortamında network modelleri yazılmıştır. Network görüntülemesi için sadece istatistiksel olarak anlamlı şekilde bir araya gelen ($P < 0.05$) miRNA çiftleri kullanılmıştır. Bunun için network yapılandırmasından sonra hipergeometrik dağılım analizi yapılmıştır. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi iki miRNA arasındaki ilişki paylaştıkları yolak veya ortak fonksiyon aracılığıyla sağlanmıştır. Network modellerinin görüntülenmesi ve analizi ise Cytoscape 3.2.0 programı ile yapılmıştır (82).

Networkler SKBR3 ve BT474 hücrelerine ait trastuzumaba duyarlı miRNA listeleri ile ayrı ayrı yapılandırılmıştır.



Şekil 4.4 Kullanılan network modeli örneği. Buna göre miRNA-Y P2, P5, P8 gibi yolları hedeflerken; miRNA-X P1 ve P2 gibi yolları hedeflemektedir ve P2 yolağı ikisi arasında ortaktır. İki miRNA P2 aracılığı ile birbiriyle etkileşim içindedir ve etkileşimin ağırlığı tek bir yolak ile olduğu için 1 olarak tanımlanmıştır

Network modeli olarak homojen network modelleri kullanılmıştır. Bu network modelleri tek tip nodların (miRNA) analizi için daha fazla olanak sunmaktadır. Bu modeldeki networkler fonksiyonel olarak ilişkili miRNA'ların bulunması için oluşturulmuş ve miRNA'lar paylaştıkları ortak yollar ya da biyolojik işlevler üzerinden birbirleriyle etkileşime girmiştir. Modelde; nodlar miRNA olarak, “edgeler” ise yollar olarak sunulmuştur. Networkteki en merkezi ve en fazla etkileşim gösteren nodların bulunması için Cytoscape Network Analyzer Plugin kullanılmıştır. Network içindeki benzer özelliklere sahip alt grupların ortaya çıkarılması için Cytoscape Clustermaker2 plugin kullanılarak cluster (kümeleme) analizi yapılmış ve “Markov Cluster (MCL) Algorithm” kullanılarak ilgili edgelerin (yolların) grupların oluşmasına katkısı bulunmuştur. Yine otomatik bir edge eşiği cluster analizinin daha spesifik olarak tamamlanması için uygulanmıştır (83–85).

4.2.8.3. TCGA (The Cancer Genome Atlas) Data Analizi

Network analizi sonucu elde edilen potansiyel hedef genlerin ve ilaca duyarlı miRNA'ların meme kanseri dokularındaki ifadesinin araştırılması için TCGA (The Cancer Genome Atlas) veri analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz UCSC Xena (<http://xena.ucsc.edu>) veritabanı kullanılarak ve TCGA invazif meme kanseri dokularından elde edilen mikrodizin ifade verisi kullanılarak yapılmıştır (86). Hedef genlerin araştırılması için toplam 597 örneğe ait

mikrodizin ifade analizi sonuçları içeren data (AgilentG4502A_07_3 array) kullanılırken, miRNA ifade analizi için İllumina RNaseq datasından faydalanılmıştır.

4.2.8.4. GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) Zenginleştirme Analizi

AGO2-IP sonrası yapılan mRNA mikrodizin analiz verisi kullanılarak, AGO2-IP uygulamasının miRNA'lara ait genler bakımından ne kadar zenginleştiği ve işlemin etkinliği araştırılmıştır. Bunun için GSEA programında faydalanılmış, kontrol ve miRZip verisinde IP fraksiyonunda zenginleşme gösteren genlerin ne kadarının miRNA hedeflerine ait gen setlerinde bulunduğu bakılmıştır. Analiz sırasında en az 1000 gen set permütasyonu kullanılmıştır.

4.2.8.5. Fonksiyonel Zenginleştirme ve Yolak Analizi

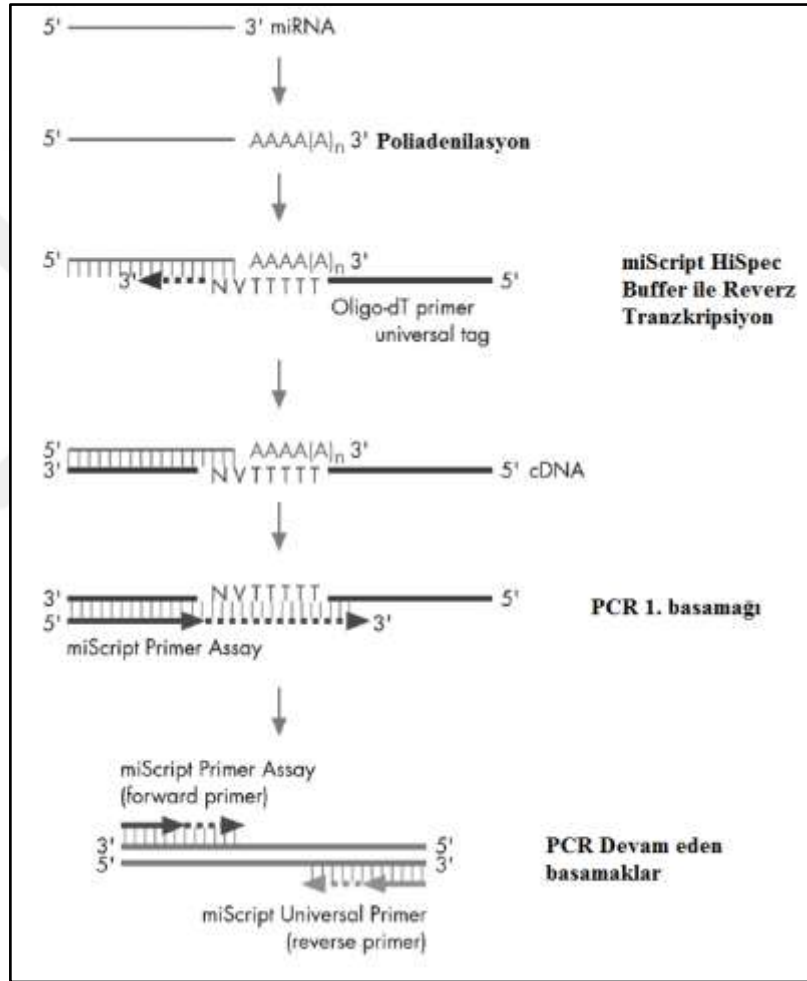
AGO2-IP uygulaması ardından yapılan mikrodizin analizi ile bulunan hedef genlerin zenginleştiği yolaklar Webgestalt (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) ve/veya GeneCodis arayüzü kullanılarak ve KEGG pathway üzerinde ilgili genlerin bulunduğu yolaklar tespit edilmiştir. Genlerin bulunduğu fonksiyonel gruplar ise DAVID veritabanı kullanılarak araştırılmıştır.

4.2.9. MİRNA İFADELERİNİN EŞ-ZAMANLI RT-PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI

Mikrodizin analizi ile elde edilen ifadelerin doğrulanması ve AGO2-IP uygulamasının yeterliliğinin araştırılması için eş zamanlı RT-PZR yöntemi kullanılmıştır. Mikrodizin analizinde ifade değişikliği gösteren miRNA'lar biyoinformatik analiz sonucuna göre eş zamanlı RT-PZR doğrulması için seçilmiştir.

Total RNA kullanılarak yapılan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentez reaksiyonlarında mRNA'yı total RNA'dan ayırmak için mRNA'nın 3' ucunda bulunan polyA (poliadenilasyon) kuyruğu kullanılır ve oligoT primeri polyA kuyruğuna hedef olarak kullanılarak total RNA'nın içinde bulunan mRNA'dan tamamlayıcı DNA sentezlenir. Şekil 4.5'de gösterildiği gibi olgun miRNA'ların 3' uçlarında polyA kuyruğu bulunmamaktadır ve bu durum klasik bir cDNA sentezinin yapılmasını engellemektedir. miRNA'lardan cDNA sentezi için öncelikle miRNA'ların 3' uçlarına polyA kuyruğunu da içeren bir

“universal tag” eklenmiştir (Qiagen). Bu ek hem cDNA sentezi için kullanılan primer sekansını içermektedir (polyA) hem de miRNA'nın boyunu eş zamanlı RT-PZR için yeterli uzunluğa getirmektedir. Bir sonraki basamakta universal tag'e spesifik bir primer kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilir. Sentezlenen cDNA'lar PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır ve PZR sonucunda elde edilen ifadeler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. PZR aşamasında miRNA'lara özel ileri primerler kullanılır. Geri primer olarak cDNA sentez reaksiyonunda da primer olarak kullanılan universal tag'e tamamlayıcı olan universal primer kullanılır.



Şekil 4.5 Olgun miRNA'ların eş zamanlı RT-PZR (Reverz transkripsiyon) basamağı ile cDNA'ya çevrilmesi ve ardından ifadelerinin tespiti (Qiagen'den adapte edilmiştir)

Eş zamanlı RT-PZR sonuçlarının analizi $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. miRNA ifadelerinin analizleri için RNU6-2 referans gen olarak kullanılmıştır. Her bir

miRNA için elde edilen Cp değerleri RNU6 referans geni kullanılarak normalize edilmiş, ardından log₂ tabanında ilaç uygulanan hücrelerdeki miRNA ifadesi ile çözücü uygulanan hücrelerdeki ifade karşılaştırılmıştır. Eş zamanlı RT-PZR için kullanılan reaksiyon hacimleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

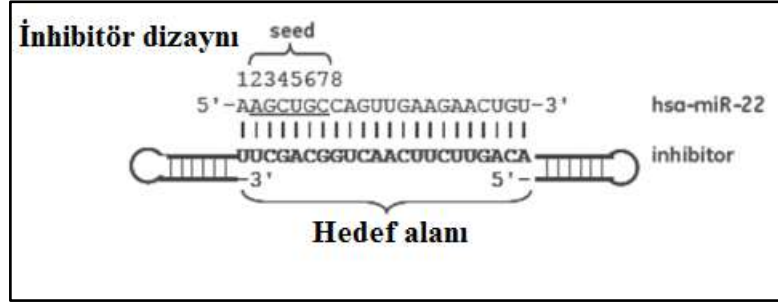
Çizelge 4.6 Eş zamanlı RT-PZR için kullanılan reaksiyon hacimleri

Reaktif	Hacim (µl) / Reaksiyon
SYBR Green Mix	5.0
10X UP	1.0
10X Primer Assay	1.0
H ₂ O	2.0
cDNA (5 ng/µl)	1.0
Toplam	10.0

4.2.10. HÜCRELERİN MİRNA MİMİC YA DA İNHİBİTÖRLER İLE TRANSFEKSİYONU

Eş zamanlı RT-PZR ile doğrulanan tedaviye duyarlı miRNA'lar hücre kültürüne transfekte edilerek ifadelerinin değişimi sağlanmıştır. Ardından hücre proliferasyon testi (WST-1) uygulanarak hücre çoğalmasındaki değişimler gözlenmiş ve bu sayede miRNA'ların kanser hücreleri üzerindeki olası etkisi araştırılmıştır.

Transfeksiyon işlemi kısa süreli etkinlik gösteren (en fazla 96 saat) ve miRNA ifade değişikliği sağlayan Dharmacon miRIDIAN microRNA inhibitör RNA'lar ve Dharmacon miRIDIAN microRNA mimic sistemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.6'da gösterilen inhibitör sistemler, ilgili miRNA'nın hedef genlere bağlanmasını engellerken; mimic sistemler miRNA ifadesini artırarak etkinliğin daha belirgin şekilde ortaya çıkmasını sağlamaktadır.



Şekil 4.6 Örnek Dharmacon miRIDIAN miRNA inhibitör dizaynı (Dharmacon'dan adapte edilmiştir)

Transfeksiyon için hücreler 96 kuyucuklu plaklara (her kuyuda 6000-7000 hücre) ekilmiştir. 24 saat sonra DharmaFECT Duo Transfection Reagent kullanılarak anti-miRNA inhibitörler veya mimicler ile birlikte negatif kontrol RNA kullanılarak 3 biyolojik tekrar olacak şekilde Dharmacon tarafından belirlenen protokole uygun olarak transfekte edilmişlerdir. Transfeksiyon için farklı konsantrasyonlarda (50 nM, 70 nM, 100 nM) mimic ve inhibitör kullanılmıştır. Tüm transfeksiyon sulandırmaları antibiyotik içermeyen besi yeri kullanılarak yapılmıştır ve Dharmacon Duo transeksiyon ajanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyonun ardından hücreler 48 saat boyunca 37 ° C'de inkube edilmiştir. Transfeksiyonlar, hiçbir uygulamanın gerçekleştirilmediği hücre kontrol; negatif kontrol inhibitör ya da mimic içeren negatif kontrol; sadece transfeksiyon ajanının kullanıldığı çözücü ve asıl inhibitör ya da mimiclerin kullanıldığı uygulamaları içermektedir. Yine hesaplama yapılırken ilk olarak sadece besi yeri içeren “blank” OD (optikal yoğunluk) değerleri, hücre içeren tüm diğer uygulamalara ait OD değerlerinden çıkarılmıştır. Ardından inhibisyon ya da mimiclere ait OD değerleri negatif kontrol OD değerlerine bölünerek canlı hücre oranları ve normalize OD değerleri bulunmuştur. Student t-test kullanılarak istatistiksel olarak anlamlı olup olmadıkları kontrol edilmiştir.

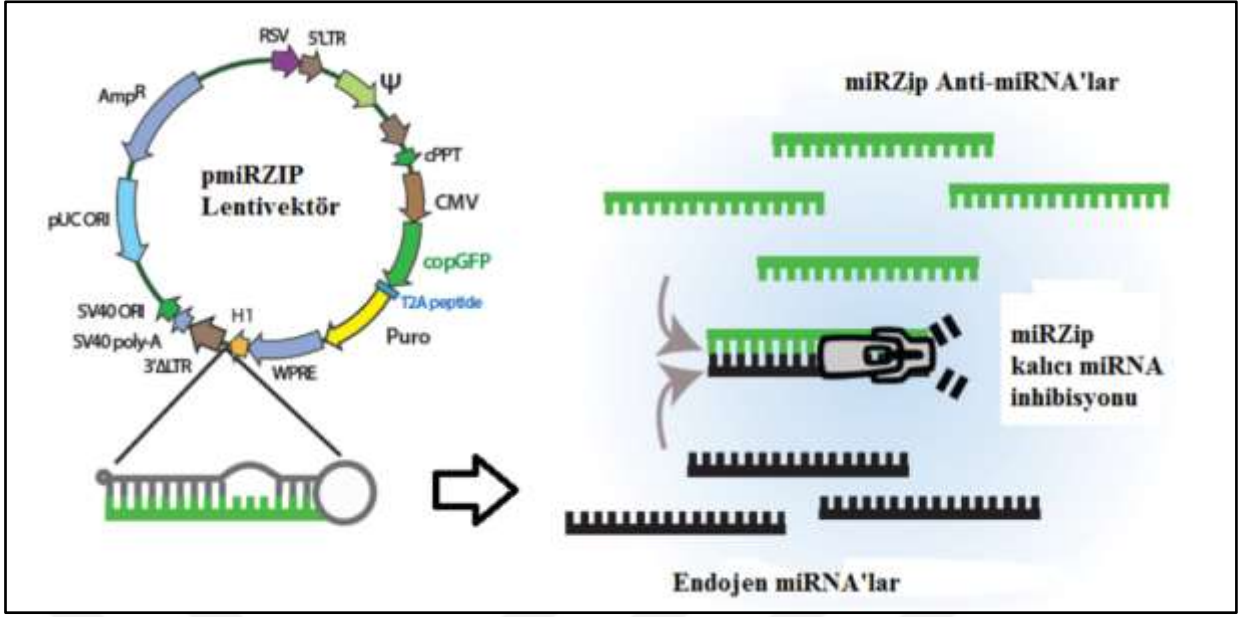
4.2.11. HÜCRELERİN LENTİVİRAL MİRNA VEKTÖRLER İLE ENFEKSİYONU

Özellikle AGO2-IP uygulamasının gerçekleştirilmesi için ilgili miRNA'ların ifade değişikliğini sağlayan transfeksiyon yöntemi olarak lentiviral vektörler ile enfeksiyon tercih edilmiştir. Bunun için, ilk olarak ekspresyon vektörleri tasarlanmıştır ve bu aşamaya ait tüm deneyler Groningen Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı ile işbirliği içinde gerçekleştirilmiştir.

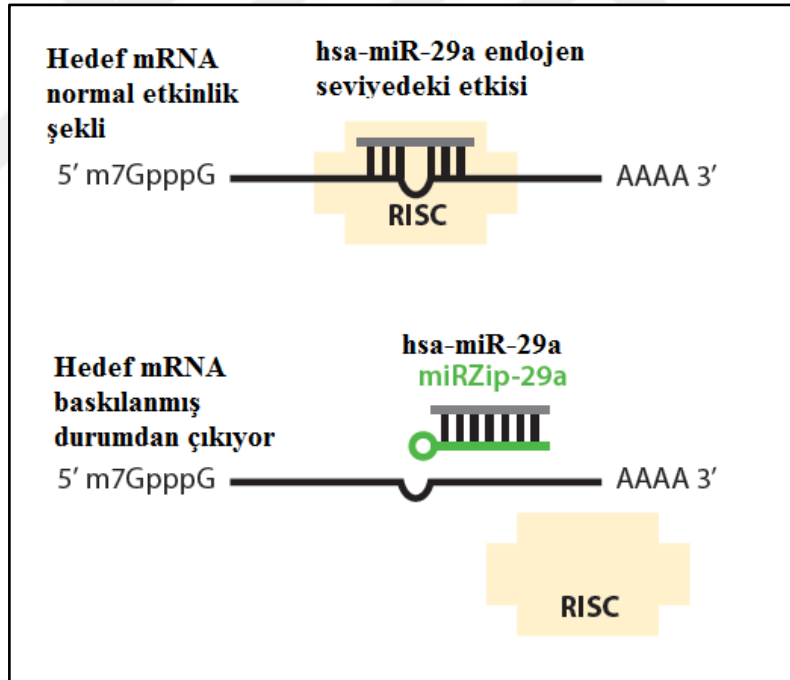
4.2.11.1. Lentiviral miRNA Vektörlerin Dizayını

Lentiviral miRNA vektör sistemleri SBI (System Biosciences) firmasından temin edilerek kullanılmıştır. miRNA vektörleri, puromisin ve/veya GFP (yeşil floresans protein) ifadesi sağlayabilen vektörlerdir. Bu çalışmada kullanılan vektörlerin sadece GFP ifadesinden faydalanılarak enfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği mikroskop altında kontrol edilmiş ve enfekte hücre düzeyi FACS (flow sitometri) cihazında takip edilmiştir. İlaça cevap veren ilgili miRNA'ların hücredeki bazal ifadeleri hücre hatlarında yüksek olduğu, ayrıca transient transfeksiyon metodu ile miRNA'lar susturulduğunda hücre proliferasyonuna etki gösterdiği bulunduğu için AGO2-IP ve ardından yapılacak mikrodizin analizinde daha verimli sonuç almak adına miRNA'ların susturulmasına karar verilmiştir. Bu yüzden anti-miRNA sistemler (miRZip) kullanılmıştır.

Şekil 4.7'de detaylı gösterilen miRZip vektörleri saç tokası şeklindeki tek zincirli shRNA (short hairpin RNA) sekansı içermektedir ve *RNA polimeraz III* için bulunan H1 promotörü sayesinde ilgili sekansın ifadesi gerçekleşmektedir. Dizayn edilen sekanslar (oligonükleotid yapısında) restriksiyon enzimleri *BamHI* ve *EcoRI* için sekans içeren plazmid vektörü içerisine klonlama yolu ile eklenebilmektedir. İlgilendiğimiz miRNA'ları susturacak sekansları içeren bu saç tokası yapıları ifadeleri gerçekleştikten sonra hücre içerisinde tek zincirli anti-miRNA yapılarına dönüştürülmektedir. Ardından ilgili miRNA'lara bağlanarak hedef genlerine etkimelerine engel olmaktadır. miRZip vektörlerin etkinlik gösterme yöntemi Şekil 4.8'de detaylı gösterilmiştir.

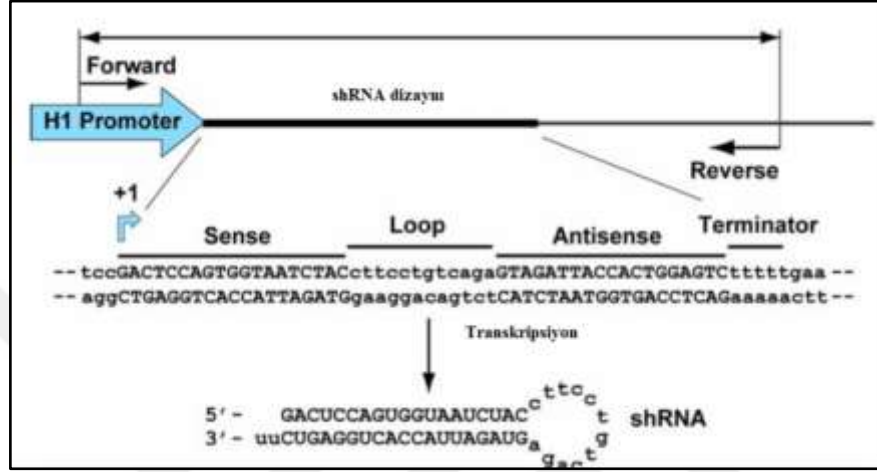


Şekil 4.7 Lentiviral pmirZIP vektör yapısı. H1 promotor bölgesi saç tokası yapısındaki anti-miRNA inhibitörün sentezini sağlarken, CMV promotor bölgesi GFP proteinin ifadesini sağlamaktadır (SBI'dan adapte edilmiştir)



Şekil 4.8 miRZip vektörlerin örnek etkinlik gösterme şekli. Hedef miRNA'ya bağlanarak, hedef miRNA'nın mRNA'ya bağlanıp ifade değişikliği yaratmasını önlemektedirler (SBI'dan adapte edilmiştir)

Şekil 4.9’da tasarımı ayrıntılı olarak gösterilen miRZip vektörleri tasarlanırken kısaca şu basamaklara dikkat edilmiştir; ilgili anti-miRNA kısmın pri-miRNA sekansı (stem-loop) şeklinde ifade olması gereklidir. Stem loop üzerinde antisense ve sense iki kol vardır, antisense kol miRNA’ya bağlanan kısım iken, sense kol miRNA sekasının benzerini taşır. Bu yüzden sense kolun asıl olgun miRNA gibi etkinlik göstermesini önlemek için üzerinde 2-3 nükleotidlik mismatch yaratılır. 5T (TTTTT) sekans kullanılarak tasarım sonlandırılır.



Şekil 4.9 miRZip tasarımının detaylı yapısı. miRNA’ya bağlanacak olan kısım antisense ve sense sekans şeklinde shRNA tasarımı olarak stem loop yapısına eklenir. Hücre içerisinde stem loop yapı ifade edildikten sonra *Dicer* enzimi ile kesilerek shRNA tasarım elde edilmiş olunur (SBI’den adapte edilmiştir).

4.2.11.2. Plazmid Vektörlerin Klonlanması ve Hazırlanması

İlgili miRNA’lara bağlanacak olan inhibitörler tasarlandıktan sonra bu inhibitör sekansları (shRNA) taşıyacak olan vektörlerin klonlanması gerçekleştirilmiştir. Vektörler TOP10 *E. coli* kompetant hücreleri kullanılarak klonlanmışlardır. shRNA sekansı tasarlanırken oligonükeotid yapısında iki RNA sekansı olacak şekilde sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir (Integrated DNA Technologies – IDT) ve 100 °C sıcaklıkta iki RNA bir araya getirilmiştir. Plazmid vektörler ve ilgili shRNA sekansı içeren PCR ürünleri *EcoRI* ve *BamHI* enzimleri ile kesilmiştir. Ligasyonun ardından jel ekstrasyonu (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit) yapılmıştır ve kompetant hücrelere transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ampisilin direnç geninin plazmid içerisindeki varlığı sayesinde ampisilin içeren besi ortamında koloniler seçilmiş ve koloni PCR ile doğru sekans içerip içermedikleri kontrol edilmiştir. Miniprep (QIAprep Spin Miniprep Kit) ile plazmidlerin izolasyonu yapılmıştır.

Plazmid DNA'ların Sanger sekanslama ile doğru sekansı içerip içermedikleri kontrol edilmiştir. Maxiprep (Qiagen Plazmid Midi Kit) ile plazmidler çoğaltılmış ve jelde bütünlükleri kontrol edilmiştir.

4.2.11.3. Oligonükleotid Yapısındaki anti-mikroRNA sekansın (shRNA) Dilusyonu

Oligonükleotid yapısında tasarlanmış olan anti-miRNA sekanslar (shRNA) (Integrated DNA Technologies – IDT) 50 µM Tris-EDTA (TE) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Ardından 20 µL “sense” ve 20 µL “antisense” RNA karıştırılmıştır ve vortekslenmiştir. Bek alevinde beher içerisinde su kaynatıldıktan ve 100 °C olduğundan emin olunduktan sonra karıştırılan RNA çözeltisi 10 dakika boyunca kaynatılmıştır. Ardında yavaşça soğuması sağlanmış ve 50X, 10X yoğunluklarda steril su ile çözülmüştür. Böylece ligasyonda kullanılacak “insert” hazırlanmıştır. Ligasyon için 10X yoğunluk kullanılmıştır.

4.2.11.4. miRZip Lentiviral Vektörlerin Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi ve İnsert ile Ligasyon

Lentiviral plazmid restriksiyon enzimleri olan *BamHI* ve *EcoRI* (New England Biolabs) kullanılarak kesilmiştir. Plazmid kesimi için her iki enzimi de içermeyen “uncut” kontrol, sadece *BamHI* içeren kontrol, sadece *EcoRI* içeren kontrol ve her iki enzimi içeren asıl dilusyon hazırlanmıştır. Kullanılan plazmidin total miktarı 10 µg olacak şekilde ayarlanmıştır. Kontroller 10 µL hacimde olacak şekilde hazırlanırken, plazmid kesimi 30 µL total hacimde gerçekleştirilmiştir. Plazmidler kesim için; 11.8 µL steril su; 3 µL Buffer 4 (New England Biolabs), plazmid DNA 11.11 µL (10 µg), *BamHI* 2µL, *EcoRI* 2 µL olacak şekilde hazırlanan dilusyonlarda kesilmiştir. Hazırlanan dilusyonlar Çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 Plazmid vektör hazırlanırken kullanılan kontrollerin içeriği

	“Uncut” Kontrol	BamHI Kontrol	EcoRI Kontrol	“Two cuts” Plazmid
Steril su	8 µL	7.5 µL	7.5 µL	11.8 µL
Buffer 4	1 µL	1 µL	1 µL	3 µL
BamHI	-	0.5 µL	-	2 µL

EcoRI	-	-	0.5 µL	2 µL
Plazmid DNA	1 µL (500 ng)	1 µL (500 ng)	1 µL (500 ng/µL)	11.8 µL (10 µg)
Total hacim	10 µL	10 µL	10 µL	30 µL

Kesim işlemi için 37 °C sıcaklıkta 3 saat beklenmiştir. Ardından tüm kontroller ve plazmid dilusyonu total hacimlerinin %10 olacak şekilde yükleme boyaması kullanılarak, 3 µL ethidium bromide (EtBr) içeren %0.8'lik agaroz jele yüklenmiştir. %0.5'lik Tris Borate EDTA (TBE) buffer içerisinde 100 V, 400 mA ayarları kullanılarak 30 dakika boyunca jelde yürütülmüşlerdir. Jelde görüntüleme yapılarak kesim işleminin tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edildikten sonra plazmidlerin tamamı jele yüklenmiş, yürütülmüş ve ultra viyole (UV) ışık kullanılarak bir bisturi yardımıyla kesilmiştir. Ardından jel ekstrasyonu yapılmıştır. Jel ekstrasyonu için Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit kullanılmıştır. Kesilen jel parçalarının öncelikle ağırlığı hesaplanmış, ağırlığın 3 katı olacak şekilde AD temizleme buffer eklenmiş, 54 °C'de 15 dakika karıştırılarak çözülmüşlerdir. Kolon tüpler kullanılarak 1 dakika 14.000 g santrifüj edilmişlerdir. Daha sonra filtreden geçen kısım atılmıştır. 30 saniye 14.000 g santrifüj edilerek iki kez etanol ile yıkanmışlar ve 12 µL su eklenerek çözülmüşlerdir. Ardından Nanodrop ND 1000, spektrofotometre ile elde edilen plazmid konsantrasyonu ölçülmüştür.

Ardından “insert” ile ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında vektör:insert kopya sayısı oranlarına dikkat edilmiştir. Buna göre “insert” olarak shRNA kullanıldığı için 1:10 oranı tercih edilmiştir. DNA miktarı hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\text{ng insert} = \{(\text{bp büyüklüğü insert} \times \text{ng vektör}) \div \text{bp vektör}\} \times 10$$

Ligasyon reaksiyonu için kullanılan hesaplama Çizelge 4.5'te detaylı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 Ligasyon için kullanılan reaksiyon karışımı

Ligasyon reaksiyonu	
5X Ligaz buffer	2 µL
Saf vektör DNA	1 µL (100 ng)

insert shRNA	2 µL
Steril su	4 µL
T4 DNA ligaz	1 µL
Total hacim	10 µL

Reaksiyon 25 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ligasyon, insert içeren ama ligaz enzimi içermeyen (ligaz –, insert+); insert içermeyen ama ligaz enzimi içeren (ligaz +, insert-) kontrol kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve bu kontroller kullanılarak kompetant hücelere transformasyon gerçekleştirilmiştir.

4.2.11.5. Kompetant Hücelere Kimyasal Transformasyonun Gerçekleştirilmesi

Her bir ligasyon reaksiyonu için 50 µL TOP10 *E.coli* kompetant hücre kullanılmıştır. Transformasyon yapılırken alev yanında ve buz üstünde çalışılmıştır. Maksimum 10 ng DNA içeren 10 µL ligasyon reaksiyonundan 1 µL alınıp pipetaj yapılmadan, daireler çizilerek kompetant hücreler içerisine aktarılmıştır. 30 dakika buz üstünde tutulmuştur. Daha sonra 42 °C su banyosuna konulmuştur ve 45 saniye bekletilmiş, ardından hemen 2 dakika buz üzerinde tutulmuştur. 450 µL SOC besi yeri eklendikten sonra 150 rpm hızda karışmaları sağlanarak 37°C’de inkübe edilmişlerdir. İki farklı hacimde olacak şekilde (150 µL ve 300 µL) ampisilin içeren LB agar besi yerine ekim yapılmıştır. 37°C’de gece boyu inkübe olmaları sağlanmıştır.

4.2.11.6. Koloni PZR

LB besi yerine ekim gerçekleştirildikten sonra büyüyen kolonilerin doğru büyüklükte olup olmadığını kontrolü ve Sanger sekanslama ile doğru “insert” içerdiklerinin kontrolü için koloni PCR gerçekleştirilmiştir. Bunun dışında, insert içeren ama ligaz enzimi içermeyen (ligaz –, insert+); insert içermeyen ama ligaz enzimi içeren (ligaz +, insert-) kontrol plakeleri ile insert içeren (ligaz+, insert+) plakeler arasındaki koloni sayısı karşılaştırılmıştır ve insert içeren plakelerdeki koloni sayısının daha fazla olduğu doğrulanmıştır. Ardından besi yerinde üreyen en büyük koloniler seçilerek PZR için hazırlanmışlardır. 10 µL tip ucu kullanılarak koloniler ateş yanında seçilmiştir. 100 µL steril su içerisine bırakılmışlardır. Tüpler 100°C’deki ısı bloğunda 10 dakika bekletilmişlerdir ve ardından hemen buz üstüne

konulmuşlardır. Hızlıca santrifüj edilmişlerdir ve 1 µL çözelti PZR için kullanılmıştır. PZR için kullanılan reaksiyon karışımı Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 Koloni PZR reaksiyon karışımı

	1 X (Örnek sayısı)
10X reaksiyon buffer	3 µL
dNTP	3 µL
MgCl ₂	0.9 µL
Primer forward 10 µM	1.5 µL
Primer reverse 10 µM	1.5 µL
Taq polimeraz (İnvitrogen)	0.2 µL
Steril su	18.9 µL
DNA/koloni	1 µL
Toplam	30 µL

PZR için 94°C 5 dakika, 94°C 30 saniye, 55°C 45 saniye, 72°C 30 saniye, 72°C 7 dakika koşulları kullanılmış, 35 siklus olacak şekilde PZR gerçekleştirilmiştir.

4.2.11.7. Vektörlerin Elde Edilmesi için Miniprep Yapılması

E.coli içerisinde çoğaltılan vektörlerin saflaştırılması ve uygun miktarda elde edilmesi için Qiagen Miniprep Kit kullanılarak miniprep gerçekleştirilmiştir. Tüm protokol alev yanında takip edilmiştir. Seçilen koloniler, PZR için alınırken bir miktar bırakılmasına ve tekrar büyümesi için gece boyu inkübasyonun gerçekleştirilmesine dikkat edilmiştir. Ardından koloniler tip yardımıyla tekrar seçilip 3 mL 2YT besi yeri (ampisilin içeren) içerisine atılmış ve gece boyu 37°C'de çalkalanarak inkübe edilmeleri sağlanmıştır.

Ertesi gün, 10 dakika 3000 g 4°C'de santrifüj edilmişlerdir. Süpernatant atılmıştır. Peletler P1 buffer kullanılarak süspansiyon edilmiştir ve 1.5 mL ependorflara alınmıştır. 250 µL P2 buffer eklenmiş, karıştırılmıştır. 250 µL P3 buffer eklenmiş ve karıştırılmıştır. Süpernatant 1.5 mL tüplere aktarılmıştır. Hacminin 0.7 katı olacak şekilde izopropanol eklenmiştir. 15 dakika 10000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır. Peletler 500 µL

%70'lik etanol ile yıkanmıştır. 10 dakika 10000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılmış ve peletler kurutulmuştur. Ardından 20 µL TE buffer içerisinde çözülmüşlerdir. Nanodrop kullanılarak miktarları ölçüldükten sonra, %1'lik agaroz jelde de kontrol edilmişlerdir. Sanger sekanslama (LGC company) için 10 µL karışım hazırlanmıştır. Miniprep ile elde edilen vektörden 100 ng karışıma eklenmiştir, 5 pg miRZip forward primer kullanılmıştır.

4.2.11.8. Vektörlerin Elde Edilmesi için Maxiprep Yapılması

Sanger sekanslama için doğru "insert" içerdiğinden emin olduğumuz vektörlerin miktarını artırmak için Qiagen Maxiprep Kit kullanılmıştır. İlk olarak 12 saat boyunca 1 mL 2YT besi yeri içerisinde miniprepten elde edilen vektörler inkübe edilmiştir. İnkübasyon 37°C'de 150 rpm hızda çalkalama gerçekleştirilerek yapılmıştır. Ardından besi yeri, 500 mL ampisilinli 2YT besi yeri içeren flasklara aktarılmıştır. Gece boyu 37°C'de 150 rpm hızda inkübe edilmiştir. Ertesi gün kültürler 50 mL flasklara bölünmüştür. 3000 g hızda 10 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır, peletler 8 mL P1 buffer ile çözülmüştür. Ardından 8 mL P2 buffer eklenmiştir ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir. 8 mL S3 buffer eklenmiş, 5 kez ters yüz ederek karıştırılmıştır. 3000 g hızda 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sırasında vakum cihazı ve Qiagen Plasmid Plus Maxi spin kolonlar hazırlanmıştır. Lizat/süpernatant QIAfilter kartuşlara transfer edilmiştir ve lizat yeni bir tüpe filtre edilerek konulmuştur. 5 mL BB buffer eklendikten sonra, lizatlar spin kolonlara transfer edilmişlerdir. Vakum başlatıldıktan sonra, tüm sıvı vakumlanana kadar beklenmiştir. Ardından membranda kalan DNA'yı yıkamak için 700 µL PE buffer eklenmiş ve vakum tekrar başlatılmıştır. Yıkama solüsyonunu tamamen uzaklaştırmak için 1 dakika 10000 g hızda santrifüj yapılmıştır. Kolon yeni bir tüpe yerleştirilip 400 µL EB buffer eklendikten sonra 2 dakika beklenmiş ve 1 dakika 10000 g hızda santrifüj yapılmıştır. Vektör konsantrasyonu nanodropta ölçülmüştür ve %0.8'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

4.2.12. LENTİVİRAL VEKTÖRLERİN HEK293T HÜCRELERİNDE ÇOĞALTILMASI VE MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN VİRÜS İLE ENFEKSİYONU

İlgili miRNA'lar ve kontroller için hazırlanan vektörler ilk olarak virüslerin paketlenmesi için HEK293T hücrelerine yapısal plazmidler ile birlikte transfekte edilmiştir. Virüslerin hazırlanması için 3. nesil 4'lü plazmid sistemi kullanılmıştır ve lentivirüs paketlenmesi kalsiyum fosfat kullanılarak yapılmıştır. Buna göre hazırlanan plazmid karışımları Çizelge 4.7'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 4.10 Virüs paketlenmesi için plazmid karışımı

Madde	Miktar
CaCl ₂	15 µL
pMSCV-VSV-G	1 µL (1 µg)
pRSV.REV	1 µL (1 µg)
pMDL-gPRRE	1 µL (1 µg)
Lentivektör	2 µL (1 µg)
Steril su	150 µL'ye tamamlanacak kadar eklenir

Daha sonra her bir plazmid karışımı için 150 µl 2XHBS içeren FACS tüplerine karışım damla damla, pipetle baloncuklar yaparak eklenmiştir. 2 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra HEK293T hücreleri transfekte edilmiştir. 24 saat sonra virüs içeren besi yeri toplanıp medyum değiştirilmiştir. Ertesi gün virüs içeren besi yeri filtre edilmiş ve doğrudan meme kanseri hücreleri belirli hacimlerde virüs kullanılarak enfekte edilmiştir. Enfeksiyon sırasında adjuvant olarak toplam besi yeri hacminin %1 oranında polibren eklenmiştir. Ertesi gün hücreler tripsin ile kaldırılmış ve 3 kez PBS ile yıkanmış, besi yeri ile sulandırılarak yeni planelere alınmıştır. 4 gün sonra GFP ifadesi (yeşil hücreler) mikroskop altında kontrol edilmiştir ve FACS (flow sitometri) analizi ile GFP pozitif (enfekte) hücrelerin oranı tespit edilmiştir.

4.2.13. İLGİLİ MİRNA'LARIN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ENFEKSİYONU VE FACS ANALİZİ

İlgili miRNA'ların susturulması için hazırlanan virüsler farklı hacimlerde (50 µl, 250 µl, 750 µl) kullanılıp meme kanseri hücreleri enfekte edilerek en iyi enfeksiyon oranı için optimize edilmişlerdir. Hücreler enfekte olduktan sonra kendileri için kullanılan normal besi yeri ortamında (%10 PBS, %1 P/S, %1 L-glutamin) büyütülmüşlerdir. Optimizasyon için 50 µl, 250 µl, 750 µl hacimlerdeki hücrelerin enfeksiyonun 4. gününde FACS analizi ile GFP oranları kontrol edilmiştir. Bunun için enfekte hücreler tripsin ile kaldırılmış ve 500 µl kadar sulandırılarak FACS tüplerine alınmıştır. Ardından PBS ile 3 kez yıkanmışlar ve en son 300 µl PBS ile sulandırılıp kontrol edilmişlerdir. FACS analizi BD FACSCalibur cihazı kullanılarak yapılmıştır. Analiz sırasında hücreleri ayırmak için iki kapı kullanılmıştır. Tüm canlı hücrelerin ayrıldığı kapı olarak SSC-H kullanılırken, GFP+ hücrelerin ayrılmasını sağlayan kapı olarak FL2-H ayarlanmıştır. Ardından canlı hücre oranları ve GFP+ hücre oranları FlowJo 9.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir.

4.2.14. İLGİLİ MİRNA'LAR İÇİN GFP COMPETITION ASSAY UYGULAMASI

Optimizasyondan sonra, GFP competition assay için hücreler yaklaşık 60-70 µl hacimde enfekte edilmiştir. GFP competition assay uygulaması, miRNA ifadesi susturulduktan sonra enfekte olan hedef hücrelerde oluşacak değişikliklerin gözlenmesi için yapılmaktadır. Buna göre enfekte olan hücreler, eğer miRNA susturulması hücre çoğalmasını engelleyen bir etki yaratıyorsa ölmeye başlayacaklar ve GFP + (enfekte) hücre oranı gün ve gün azalacaktır. Bunun için başlangıçta enfekte hücre (GFP +) oranının %20-60 arasında olmasına özen gösterilmiştir. Bu oran aralığında enfeksiyonu gerçekleştirilen hücreler ilk olarak enfeksiyonun 4. günü olmak üzere her iki günde bir FACS (BD FACSCalibur) cihazında kontrol edilmiştir ve GFP pozitiflik oranı şeklinde ifade edilen enfekte hücre oranının değişip değişmediği takip edilmiştir. Vektörler ile enfekte olan hücre kültürleri 6 kuyucuklu petriyelerde idame edilmiştir. Deney 3 biyolojik tekrar olacak şekilde farklı zamanlarda tekrarlanmış ve kontrollerin de takibiyle birlikte yaklaşık 40 gün sürdürülmüştür.

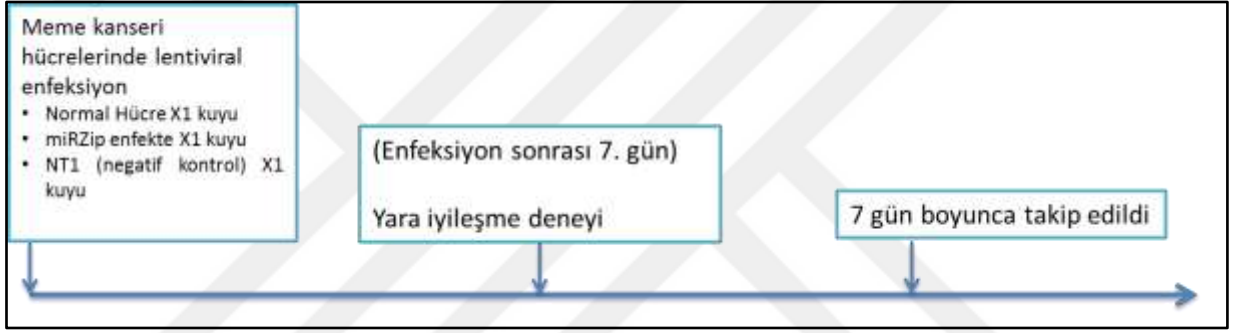
4.2.15. İLGİLİ MİRNA İFADESİ SUSTURULDUKTAN SONRA APOPTOZİS TESTİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Annexin ailesi fosfolipidlere bağlanan kalsiyum bağımlı proteinlerden oluşur ve fosfatidilserin (PS) yapısına bağlanarak apoptotik hücrelerin tespitini sağlarlar. Sağlıklı hücrelerde PS sitoplazmada bulunur. Apoptozisin uyarılmasıyla beraber plazma membranı dışına atılır ve Annexin V gibi floresans özellikte boyalarla boyanır hale gelir. İlgilendiğimiz miRNA'lar, miRZip (anti-miRNA) vektör taşıyan virüslerle meme kanseri hücrelerinin uygun hacimde (en az 800 μ L) enfeksiyonu sonrası susturulmuştur. miRZip vektörlerinin enfekte ettiği hücre oranı 4. gün daha önce bahsedildiği gibi FACS cihazında kontrol edilmiştir ve en az %90 oranında GFP+ hücre gözlenmiştir. Ardından, enfekte hücrelerde proliferasyonun azaldığı enfeksiyon sonrası 8-9. gün apoptozis varlığının araştırılması ve hücre ölümü olup olmadığının sorgulanması için APC Annexin V ve/veya PI (propidium iodide) ile boyama yapılmıştır. Bunun için enfeksiyon olmayan normal hücreler (hücre kontrol), negatif kontrol vektör ile enfekte hücreler (NT1), miRZip vektörleri ile enfekte hücreler kullanılmıştır. Normal hücreler işlemin optimizasyonu için kullanılmıştır.

Boyama yapılan ve yapılmayan normal hücrelerle optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Hücreler toplanırken tripsin ile muamele öncesi besiyeri atılmamış ve içerisinde yüzen ölü hücreler de toplanmıştır. Ardından 1 milyon civarında hücre soğuk PBS ile iki kez yıkanmıştır ve 1X kalsiyum buffer'dan 500 μ L kullanılarak çözülmüştür. 100 μ L kadar olan kısım yeni FACS tüpüne aktarılmış ve GFP oranının tespiti için saklanmıştır. 5 μ L APC Annexin V boya bir başka tüpe ayrılan diğer 100 μ L kısma eklenmiştir. Karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Ardından 300 μ L 1X kalsiyum buffer tüm tüplere eklenmiştir ve örnekler FACS cihazında kontrol edilmiştir. FACS yapılırken apoptotik hücreleri tespit etmek için FL4-H kapısında ölçüm yapılmıştır. Yaklaşık 25000 hücre (events) her bir analiz için cihazda sabit olarak sayılmıştır. FL2 detektörü kullanılarak kapılar her bir hücre analizine uygun şekilde voltaj ayarlaması yapılarak adapte edilmişler. Daha sonra sonuçlar FlowJo 9.0 programı ile analiz edilmişlerdir. Test, farklı zamanlarda 3 biyolojik tekrar yapılarak tekrar edilmiştir.

4.2.16. İLGİLİ MİRNA İFADESİNİN SUSTURULDUĞU HÜCRELERDE YARA İYİLEŞME DENEYİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Öncelikle meme kanseri hücreleri 6-kuyulu platelere her kuyuya 250.000-300.000 hücre olacak şekilde ekilmişlerdir. 24 saat sonra en az %80-90 GFP+ enfekte hücre oranı elde edilecek uygun hacimde virüs kullanılarak (en az 800 µL) enfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Ardından 7. güne kadar enfeksiyon durumu FACS cihazı kullanılarak takip edilmiş ve miRZip etkinliği sonucu miRNA susturulmasının hala aktif olduğu 7. gün yara iyileşme deneyi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 10 µL ipler kullanılarak hücreler tam ortadan bir çizgi olacak şekilde çizilmiştir ve kalkan hücreleri uzaklaştırılmak için PBS ile hücre yüzeyi yıkanmıştır. Deneyin zamanlaması ve planlaması Şekil 4.10'da görülebilmektedir.



Şekil 4.10 Yara iyileşme deneyinin takibi ve zamanlaması

Hücrelerde oluşan hat boyu çizik ve arasındaki boşluğun boyutu, iyileşme süreci farklı üç bölgeden fotoğraflar alınarak her gün takip edilmiştir. Ardından ImageJ analiz programı kullanılarak yara arasındaki boşluk hesaplanmış ve iyileşme süreci karşılaştırılmıştır. Deney farklı zamanlarda 3 biyolojik tekrar yapılarak tekrar edilmiştir.

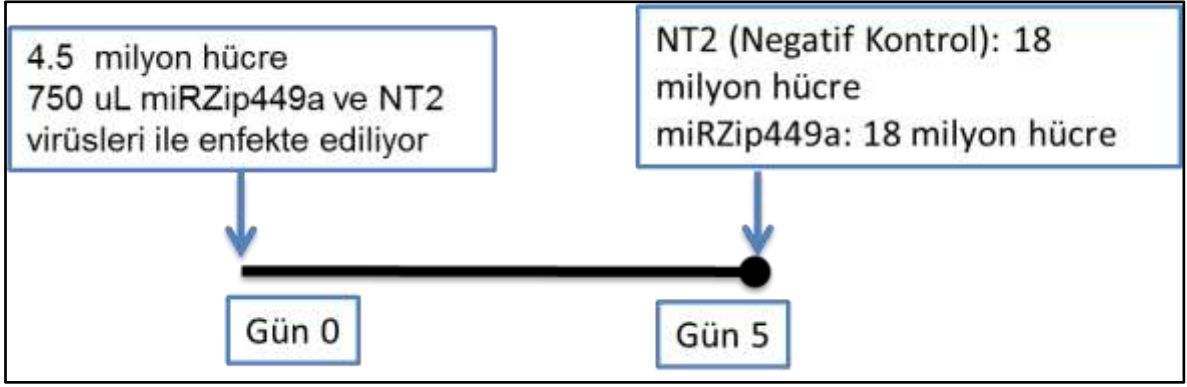
4.2.17. İLGİLİ MİRNA'LARIN SUSTURULDUĞU HÜCRELERDE HÜCRE SIKLUSU TESTİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Hücre siklusu kontrolü DNA replikasyonunun ve hücre bölünmesinin sağlıklı şekilde gerçekleşmesini sağlar. İlgili miRNA'lar susturulduğunda gözlenen hücre ölümünün hücre siklusunun duraksaması ve kontrol mekanizmalarıyla ilişkisinin araştırılması için floresans özellikteki PI (propidium iodide) ile boyama gerçekleştirilerek analiz yapılmıştır. Analizin temel amacı ortamda bulunan DNA'nın floresans boya ile boyanması ve FACS cihazı

kullanılarak tespit edilmesidir. FACS cihazı ile analiz sırasında G0/G1, S ve G2/M olmak üzere üç faz gözlemlenmektedir. Bu fazlara ait DNA miktarı normal hücrelerle karşılaştırılarak hücre siklusunun aksayıp aksamadığı kontrol edilebilmektedir. Buna göre her bir örnekten (miRZip, NT1, hücre kontrol) 3×10^5 hücre 500 μ L hacimde olacak şekilde FACS tüplerine toplanmıştır. Örnekler apoptozis testi için kullanılan hücrelerden elde edilmişlerdir. Bu yüzden %90 ve üzeri GFP+ oranına sahiptirler. Test, apoptozis testi ile aynı anda 8-9. enfeksiyon gününde gerçekleştirilmiştir. 1200 rpm hızda 5 dakika santrifüj ile pelletler elde edilmiştir. Ardından %1 BSA (bovine serum albümin) içeren soğuk PBS ile 1 kez yıkama yapılmıştır. Hücreler, ilk kullanılan hacmin yarısı kadar PI boyama solüsyonu (250 μ L) ile sulandırılmışlardır. Buzda 10 dakika bekletildikten sonra FACS cihazında analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz, G1 pik noktasına göre FL-2 kanalı kullanılarak optimize edilmiştir. Her bir örnekten yaklaşık 25×10^3 hücre sayılarak yapılmıştır. Sonrasında ModFit programı kullanılarak analiz edilen tüm hücreler incelenmiş ve birbirine yapışık hücre çiftleri elenerek G0/G1, S ve G2/M dağılımları histogram analizinde tespit edilmiştir. Hücre siklusu testi farklı zamanlarda 3 biyolojik tekrar kullanılarak tekrarlanmıştır.

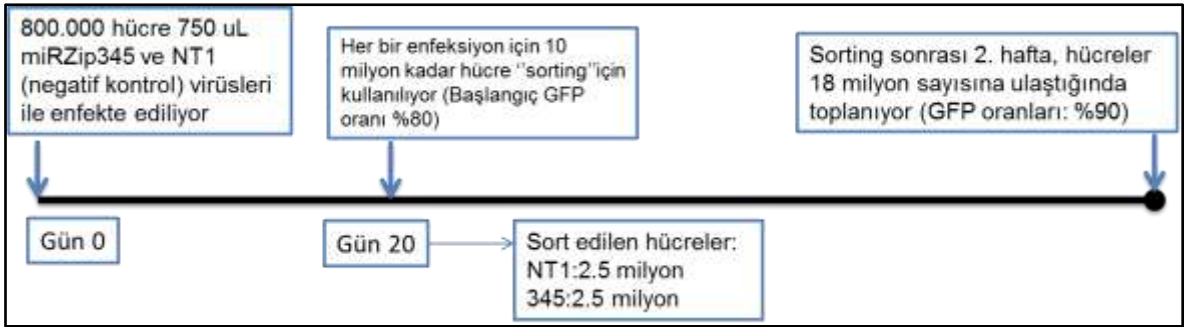
4.2.18. AGO2-IP UYGULAMASI

AGO2-IP uygulamasının gerçekleştirilmesi için ilk olarak meme kanseri hücrelerinde ilgili miRNA'ların tamamen ifadelerinin değişmesi ve susturulmaları sağlanmıştır. Uygulama, daha önce Ping Tan ve arkadaşları tarafından tarif edilen protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (87). AGO2-IP yapılacak hücrelerin tamamında en az %85 ve üzeri GFP+ (enfekte) hücre oranı hedeflenmiştir. İlgili miRNA'ların miRZip vektörleri ile susturulması iki şekilde yapılmıştır; miRZip449a vektörü kullanılırken, hücrelerde çok hızlı ölüm ve proliferasyonda gerileme gözlemlendiği için taze virüs kullanılmış ve enfeksiyon sonrası 5. gün hücrelerin tamamı toplanmıştır. Deney için planlanan zaman aralığı ve kullanılan hücre sayıları Şekil 4.11'de görülebilmektedir. Hücre pelletleri elde etmek için tripsinizasyondan sonra hücreler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmişler ve 3 kez PBS ile yıkanmışlardır. Ardından -20°C 'de saklanmışlardır.



Şekil 4.11 AGO2-IP uygulaması için meme kanseri hücrelerinde miRZip449a ve NT2 (negatif kontrol) ile yapılan enfeksiyon.

miRZip345 vektörü ile enfeksiyon ardından hücreler “sorting” işlemi için toplanmıştır. Sorting işleminin amacı GFP oranı %80 civarında olan hücrelerden enfekte olmayanları ayırmak ve sadece GFP pozitif olanları elde edip büyümektir. İşlem öncesi hücreler tripsin ile kaldırılmış, PBS ile 1200 rmp hızda 5dakika yıkanmıştır. Ardından tekrar 1 mL besi yeri ile sulandırılıp FACS tüplerine süzölmüşlerdir. Sorting işlemi Beckman Coulter MoFiO High performance Cell Sorter cihazı ile yapılmış ve her bir enfeksiyondan %99 GFP+ olan en az 2 milyon hücre toplanmıştır. miRZip345 için hazırlanan deney planı Şekil 4.12’de detaylı olarak sunulmuştur.



Şekil 4.12 AGO2-IP uygulaması için meme kanseri hücrelerinde miRZip345 ve NT1 (negatif kontrol) ile yapılan enfeksiyon.

miRZip345, miRZip449a ve NT1 (negatif kontrol) enfeksiyonu ardından elde edilen pelletler AGO2-IP uygulaması için hazırlanmıştır. Ek olarak normal hücreler ile IgG antikoru kullanılarak immunopresipitasyonun kontrolü yapılmıştır. Uygulama toplamda 3 gün sürmüştür. İlk olarak çöktürme (immunopresipitasyon) işleminde kullanılan boncuklar (fare protein G sepharose boncukları) hazırlanmıştır ve AGO2 antikoru (Clone 2E12-1C9

Abnova) ile bağlanmaları sağlanmıştır. Negatif kontrol olarak IgG antikoru (Milipore) kullanılmıştır. Boncuklarla antikorların bağlanması için 4°C'de gece boyu inkubasyon sağlanmıştır. Ertesi gün hücre lizisi ve immunopresipitasyon (IP) işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan AGO2 antikoru ile bağlı boncuklar 4 kez NT2 buffer kullanılarak yıkanmış ve parçalanmış hücreler ile bir araya getirilip karıştırılmıştır. Lizis işlemi, 100 µl buzda soğutulmuş polizom lizis buffer taze hazırlandıktan sonra örnekler eklenip 5 dakika bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi iki kez 14000 g hızda 4°C'de 10 dakika gerçekleştirilmiştir. Supernatant yeni soğuk IP (immunopresipitasyon) buffer içeren bir tüpe alınmıştır ve RNP (ribonükleotid protein) örneği olarak saklanmıştır. Hızlı bir şekilde karıştırıldıktan sonra 20 µL western blot için, 80 µL RNA izolasyonu için ayrılmıştır. Bu kısım total fraksiyonu oluşturur ve western blot için ayrılan kısım 5X loading buffer ile karıştırılıp 10 dakika kaynatıldıktan sonra, RNA için ayrılan kısım ise 700 µL Qiazol ile karıştırıldıktan sonra -20°C'de saklanmıştır. Ardından geride kalan 900 µL RNP örneği fare anti-human AGO2 (Clone 2E12-1C9, Abnova, Taipei City, Taiwan) ile daha önce kaplanmış sefaroz G boncuklara (Abcam, Cambridge, UK) eklenmiştir. 4°C'de çalkalanarak yapılan 7 saat inkubasyonun ardından örnekler hızlıca santrifüj edilmiş ve boncukların üstünde kalan sıvı flow through fraksiyonu olarak toplanmıştır. Aynen total fraksiyon için yapıldığı gibi 20 µL western blot için ayrılmış, 80 µL RNA izolasyonu için saklanmıştır. Ardından boncuklar 6 kez soğuk NT2 buffer ile yıkanmış ve IP, fraksiyonları toplanmıştır. Buna göre IP fraksiyonu zenginleşmiş AGO2 antikorunun ve ona bağlı miRNA:mRNA komplekslerinin olduğu kısmı (boncuklarla birlikte); total fraksiyon tüm mRNA'ları ve flow through ise AGO2 antikoruna bağlanmayan tüm RNA'ları içermektedir. Son NT2 buffer eklendikten sonra boncuklar hızlıca karıştırılmış ve hızlıca santrifüj edilmiştir. Karışımın tamamı IP fraksiyonunu oluşturmaktadır ve yaklaşık 10 µL olan 1/5 kısmı western blot için; 40 µL kadar olan 4/5'lik kısmı RNA izolasyonu için ayrılmıştır. Western blot için ayrılan kısma 20 µL miktarda 2X sample buffer eklenmiş ve örnekler 10 dakika 100°C'de kaynatılmışlardır. RNA izolasyonuna ayrılan kısma 700 µL Qiazol eklenmiş ve -20°C'de saklanmaları sağlanmıştır.

Ayrılan fraksiyonların her biri için RNA izolasyonu yapılmış, örnekler mikrodizin için hazırlanmıştır. Western blot gerçekleştirilerek AGO2 proteinin örneklerdeki zenginleşme miktarı karşılaştırılmış ve uygulamanın başarılı olduğu gözlenmiştir.

4.2.18.1. AGO2-IP Örneklerinden RNA İzolasyonu

AGO2-IP sonrası total, flow through ve IP fraksiyonlarına ait örneklerden Qiagen miRNeasy Kit kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmunopresipitasyon sonrası 700 µL Qiazol eklenmiş olan örnekler Phase Lock Gel Heavy tüpler kullanılarak 30 saniye 14000 g hızda santrifüj edilmiştir. Ardından oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş ve Phase Lock jel içeren tüplere alınmıştır. 140 µL kloroform eklendikten sonra 15 saniye çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletilip 12000 g hızda 4°C’de 15 dakika santrifüj edilmişlerdir. Berrak üst faz yeni tüplere aktarılmıştır. Sıvı hacminin 1.5 kat fazlası olacak şekilde %100 etanol eklenmiştir. Örneklerin 700 µL kadar kısmı RNeasy mini ya da mikro kolonlara eklenmiştir ve en az 8000 g hızda oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edilmişlerdir. İşlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra 700 µL Buffer RWT eklenmiş ve santrifüj aynı koşullarda tekrarlanmıştır. Ardından 500 µL Buffer RPE eklenmiş ve bu kez 2 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonlar yeni tüplere yerleştirilmiş, maksimum hızda 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Ardından 1.5 mL ependorf tüplere aktarılan kolonlara 30-50 µL steril su eklenmiş, 1 dakika en az 8000 g hızda santrifüj yapılmıştır. Son olarak nanodrop cihazında RNA konsantrasyonları ölçülmüştür.

4.2.18.2. AGO2-IP Örneklerinden Western Blot Yapılması

Western blot için ayrılan ve poliakrilamid jele yüklenmeye hazır hale getirilen total, IP ve flow through fraksiyonlarına ait örnekler eşit hacimlerde yüklenmişlerdir. Hazırlanan jel, running ve stacking jel olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Running jel %7.5 derişimde hazırlanmıştır. İlk olarak %30’luk acryl, running buffer, steril su, %10’luk SDS ve 200 µL TCE (Sigma) karıştırılmış, jel dökülmeden hemen önce APS ve TEMED eklenmiştir. Running jelin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra 0.75 mm’lik tarak kullanılarak %4 derişimde hazırlanmış stacking jel dökülmüştür. Jel tamamen hazır olduktan sonra örnekler 14000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. SDS-PAGE jel elektroforez içine yerleştirildikten sonra running buffer eklenmiş ve 2.5 µL marker (Thermo Protein Marker) ile birlikte 10 µL hacimde örnekler yüklenmiştir. Stacking jelde 130 V 60 mA 1.5 saat boyunca örnekler yürütüldükten sonra blotlama işlemine geçilmiştir. 5X derişimde saklanan transfer buffer (Tris/Gliserin + %20 methanol) 1X olarak sulandırılmıştır. Nitroselüloz membran kullanılarak jel ortada kalacak şekilde blotlama

sandviç hazırlanmış ve 1X transfer buffer ile ıslanması sağlanmıştır. Blotlama işlemi soğuk odada 1 saat 15 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Ardından TBST buffera (Tris/NaCl/Tween 20) %5 oranında olacak şekilde süteklenerak blocking buffer hazırlanmıştır. Membran blocking solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında, çalkalanarak 1 saat bekletilmiştir. Ardından 5 mL TBST, % 5'lik süt ve 25 µL primer antikor (EIF2C2 monoklonal antikor (M01), clone 2E12-1C9)(IgG Milipore 12-371) karışımı antikor dilüsyonu 1:5000 olacak şekilde hazırlanıp eklenmiştir. +4C'de gece boyu yapılan inkübasyonun ardından TBST ile yıkama yapılmış ve 10 µL sekonder antikor (Poliklonal horseradish peroksidaz bağımlı tavşan anti-fare Ig, PO260, Dako, Glostrup, Denmark) (RaMPO, 1:1000) eklenmiştir. Hücre kontrol AGO2-IP ve hücre kontrol IgG örnekleri için ek olarak GaMPO sekonder antikor (Poliklonal horseradish peroksidaz bağımlı keçi anti-fare Ig, Dako, Glostrup, Denmark) 1:1000 dilüsyon ile kullanılmıştır. 1 saat inkübasyonun ardından 3 kez TBST buffer ile yıkama yapılmış ve 1 mL SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Thermo) kullanılarak 5 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Görüntüleme ChemiDoc MP scanner and Image Lab 4.0.1 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.18.3. AGO2-IP Örneklerinden mRNA Mikrodizin Profillemesi

İlgili miRNA'ların hedeflediği mRNA profilinin (targetom) ortaya çıkarılması için total ve IP fraksiyonları kullanılarak mikrodizin analizi yapılmış ve miRNA'lara ait targetom elde edilmiştir. Mikrodizin için Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 platformu kullanılmıştır. Hibridizasyon, yıkama, tarama işlemleri Affymetrix'in belirlediği protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için iki teknik tekrar kullanılmıştır. Targetom profillerinin belirlenmesi için ilk olarak IP ve total fraksiyonları karşılaştırılmıştır. IP fraksiyonunda zenginleşen gen profilleri ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra susturulan (miRZip ile enfekte) örneklerin IP fraksiyonu ile kontrol (NT1) IP fraksiyonları karşılaştırılmış ve NT1 örneklerinde daha fazla ifadesi artmış gözlenen genler targetom olarak belirlenmiştir.

Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 platformu kullanılırken ilk olarak spike-in kontroller hazırlanmıştır. Bunun için 100 ng üzerinden hesaplama yapılarak poly-A kontrol dilüsyonları hazır edilmiştir. Her bir örnekten 70 ng kullanılarak çalışılmıştır. İlk aşamada

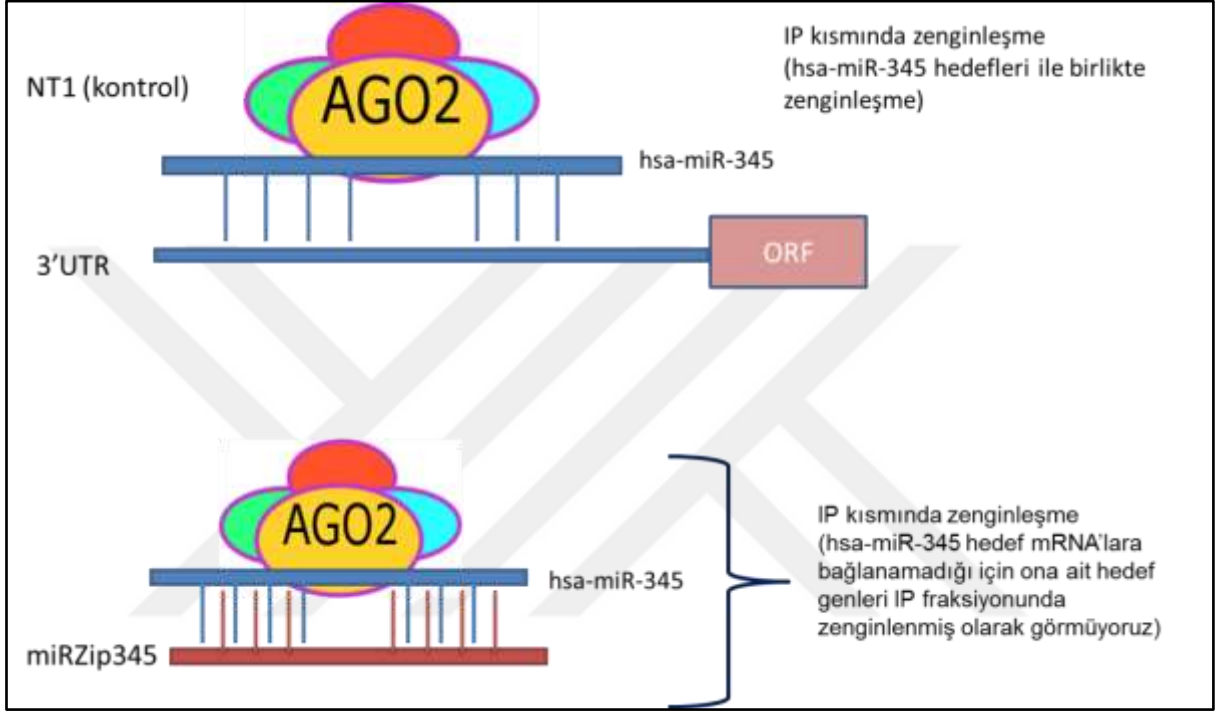
RNA'lar ve T7 olig(dt) primer'ler kullanılarak tek zincirli cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için örnekler ilgili buffer ve enzimle birlikte 2 saat 42°C'de inkübe edilmişlerdir. İkinci aşamada tek zincirli cDNA, çift zincirli cDNA'ya çevrilmiştir ve bu aşamada *DNA polimeraz* ile *RNAse H* enziminden faydalanılmıştır. Örnekler 16°C'de 1 saat, ardından 65°C'de 10 dakika tutularak işlem tamamlanmıştır. Elde edilen cDNA'ların etiketlenmesi ve komplementer RNA (cRNA) eldesi için *in vitro* transkripsiyon yöntemi kullanılarak örnekler biotin ile etiketlenmiştir. Bunun için *T7-RNA polimeraz* enziminden yararlanılmıştır. Örnekler 16 saat boyunca 40°C'de inkübe edilmiş ve ardından saflaştırılmaları işlemine geçilmiştir. Saflaştırma ve yıkama işlemleri manyetik boncuklar kullanılarak yapılmıştır. En az üç kez %80'lik etanol ile yıkama tekrar edilmiştir ve ardından steril su ile örnekler sulandırılmıştır. Nanodrop ölçümü sonrası 250 ng/μL ve üzeri çıkan örnekler ayrıca agaroz jelde kontrol edilmiş ve fragmente olup olmadıklarına bakılmıştır. Daha sonra örneklerin çiplere yüklenerek 16 saat 45°C'deki fırında hibridize olmuşlardır. Ertesi gün Affymetrix AGCC programı kullanılarak örneklerin yıkanma ve tarama işlemleri tamamlanmıştır. Datalar .cel uzantılı dosyalar halinde elde edilmişler ve öncesinde hibridizasyon kalitesi kontrol edilmiştir. AGO2-IP uygulamasının son basamağında mRNA mikrodizin analizi için kullanılan örnekler Çizelge 4.8'de verilmişlerdir.

Çizelge 4.11 AGO2-IP uygulaması ardından targetom analizi için mikrodizin yapılan örnekler

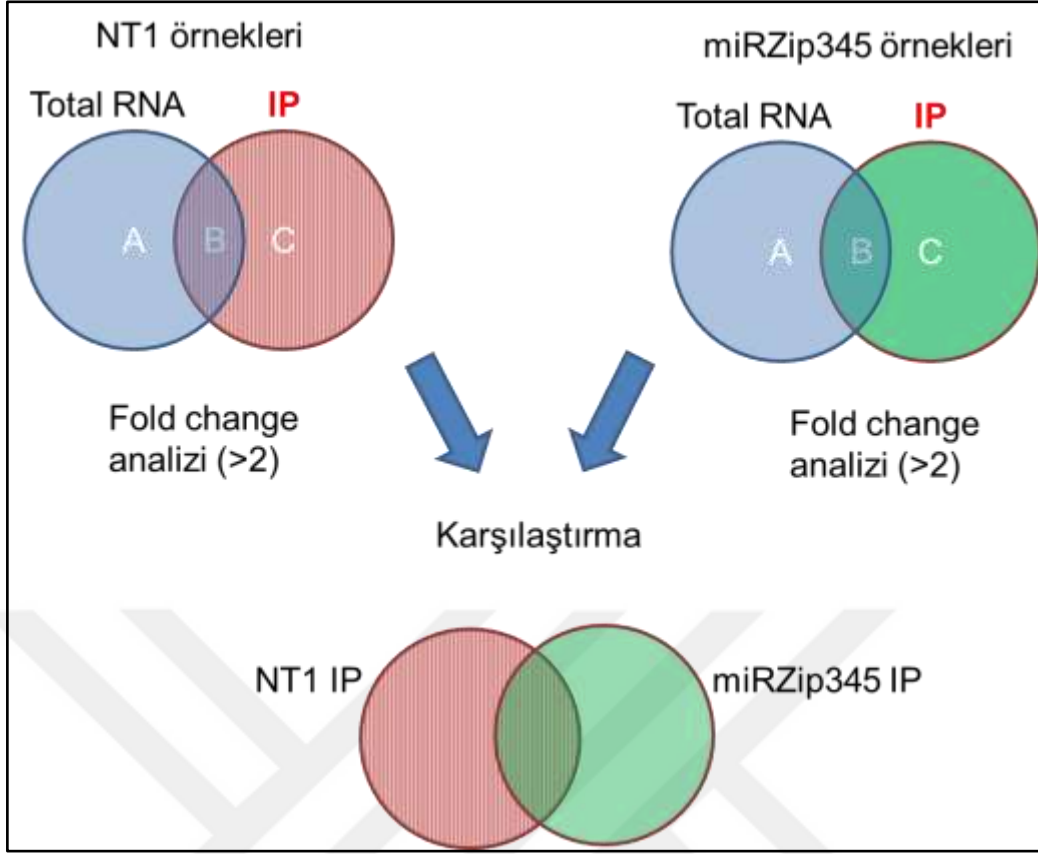
Örnek İsmi	Örnek Sayısı
NT1 (negatif control)	2
miRZip345 total fraksiyon	2
miRZip449a total fraksiyon	2
miRZip449a IP fraksiyon	2
miRZip345 IP fraksiyon	2
Toplam	8 örnek

Mikrodizin mRNA ifade verisine “quantile normalizasyon” yöntemi uygulanarak data analizi gerçekleştirilmiştir. Normalizasyon teknik farklardan dolayı ortaya çıkabilecek farklılıkları (spesifik olmayan bağlanma, yıkama ve boyama aşamasından

kaynaklanabilecek farklılıklar, arka plan gürültüsü gibi) eleyerek biyolojik veri üzerindeki gerçek farkların ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır. Örneklerin data analizi Genespring programında gerçekleştirilmiştir. İlk olarak her bir örnek için IP fraksiyonunda zenginleşen genler bulunmuş, daha sonra miRNA'ların susturulduğu örneklerde kontrole göre farklılık gösteren mRNA'lar belirlenmiştir. Mikrodizin analizine ilişkin detaylı bilgi Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13 miRZip vektörleri için mikrodizin analizi ve hedef mRNA profilinin bulunması



Şekil 4.14 miRZip vektörleri için mikrodizin analizi. İlk olarak miRZip vektörü ile enfekte ya da NT1 ile enfekte örneklerin her ikisinde de IP fraksiyonunda zenginleşen genler bulunmuş, daha sonra ifade farklılıkları $NT1/miRZip \geq 1.5$ olacak şekilde karşılaştırmıştır.

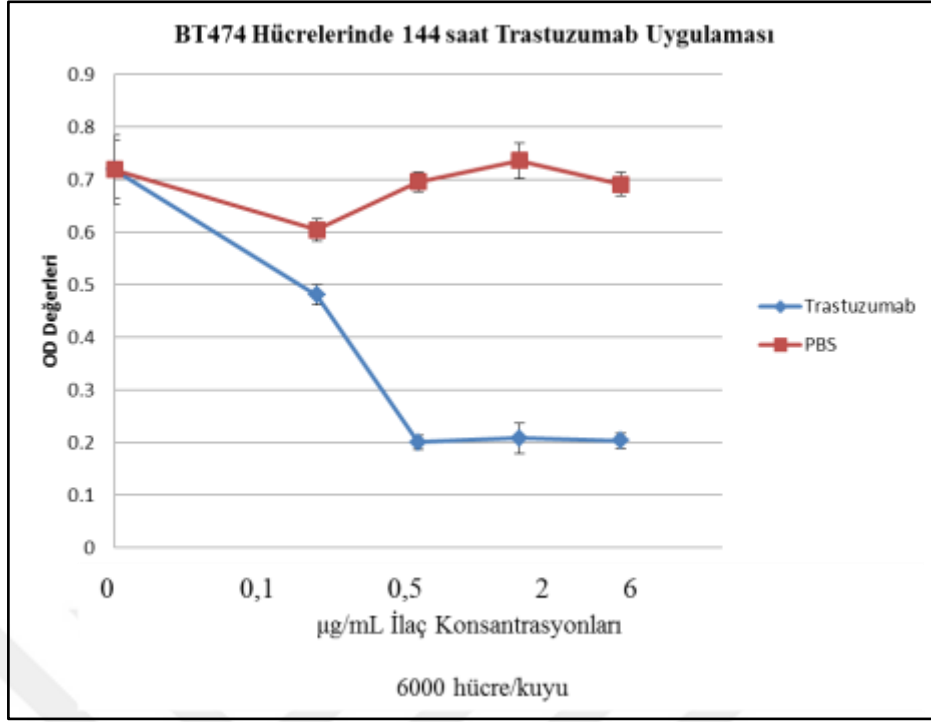
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

EGFR reseptör odaklı ajanlar olan trastuzumab ve lapatinibe karşı meme kanseri hücrelerinde gözlenen miRNA cevabı ilk olarak miRNA mikrodizin analizi kullanılarak belirlenmiştir. İlaçlara duyarlı miRNA'lar tespit edilip gerçek zamanlı-PZR ile ifadeleri onaylandıktan sonra hücre çoğalmasına etki eden iki miRNA (hsa-miR-345 ve hsa-miR-449a) ortaya çıkarılmış ve hedef gen profilleri (targetom) bulunup, fonksiyonel testler yapılarak etkinlikleri araştırılmıştır. Ek olarak trastuzumaba cevap veren miRNA'lar kullanılarak miRNA-miRNA networkleri oluşturulmuş ve fonksiyonel olarak birbirine benzer miRNA'lar olası etkinlik mekanizmaları açıklanarak tespit edilmiştir.

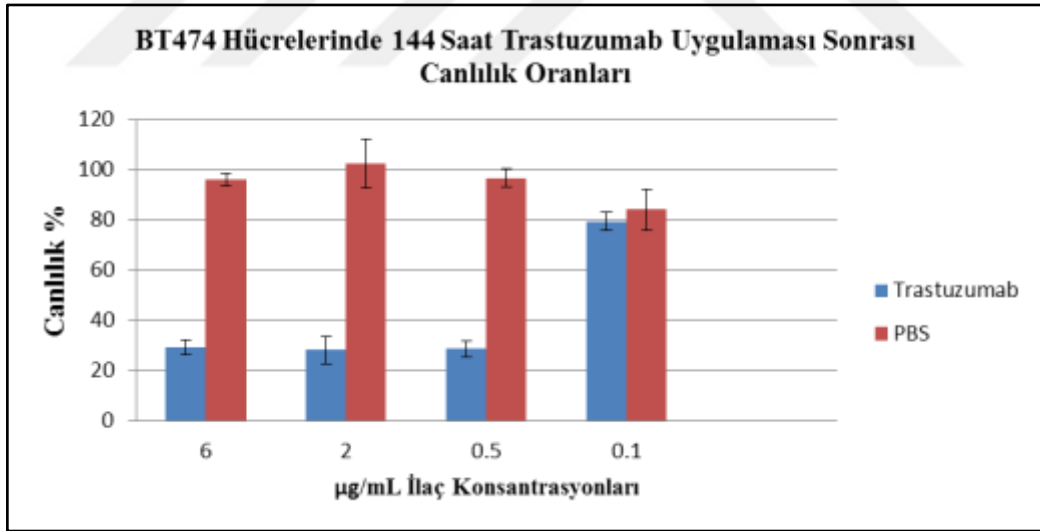
5.1. TRASTUZUMAB VE LAPATİNİB IC50 DEĞERLERİNİN TESPİT EDİLMESİ

Lapatinib ve trastuzumaba ait IC50 değerlerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda ilaç uygulamaları yapılmıştır. İlaç uygulamaları her iki hücre hattında (SKBR3 ve BT474) gerçekleştirilmiştir. Ölçümler WST-1 uygulaması ardından 450 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiş ve OD (absorbans) değerleri kullanılarak canlı hücre oranları ve OD eğrileri hesaplanmıştır.

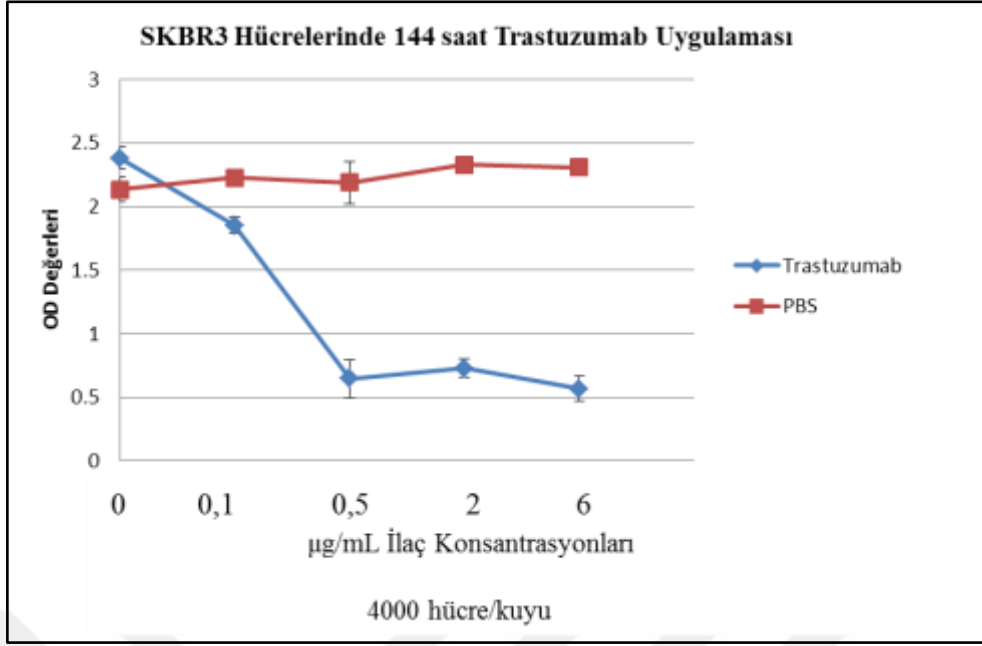
Trastuzumab uygulaması BT474 hücrelerinde 6 µg/mL, 2 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.1 µg/mL konsantrasyonlarında 144 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. 72. saatte hücre besiyerleri değiştirilmiştir. Çözücü olarak PBS kullanılmıştır. İlaç uygulanan her bir kuyuya 24 saat önce 6000 hücre ekilmiştir. Uygulamaya ait OD-doza eğrileri ve canlılık oranları Şekil 5.1'de ve Şekil 5.2'de verilmiştir. SKBR3 hücrelerinde de aynı ilaç konsantrasyonları kullanılmış, 144 saat boyunca uygulama sürdürülmüştür. Uygulamaya ait OD-doza eğrileri ile canlılık oranları Şekil 5.3'te ve Şekil 5.4'te gösterilmiştir.



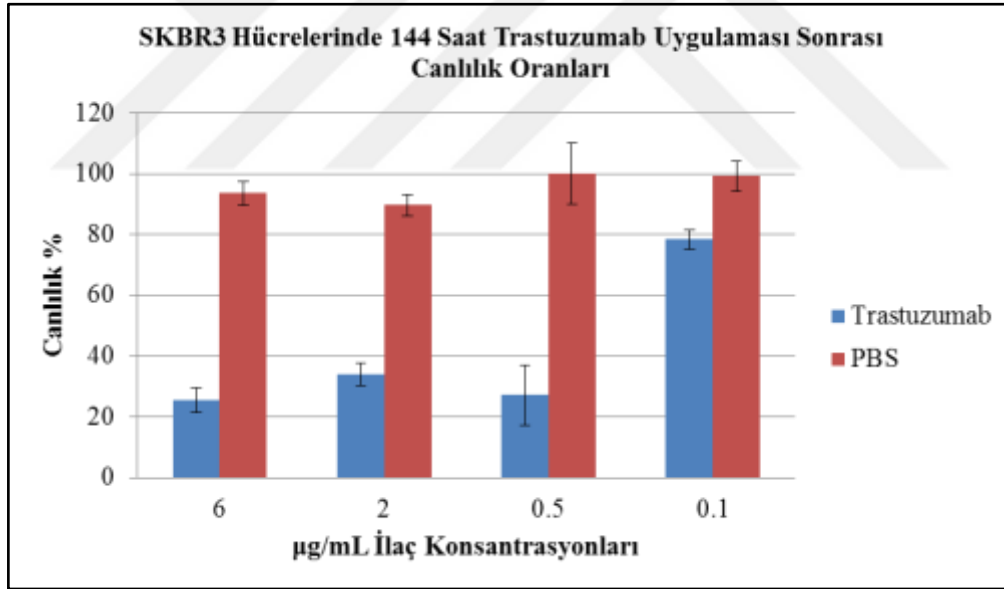
Şekil 5.1 BT474 hücrelerinde trastuzumab uygulaması sonrası OD-konsantrasyon eğrisi. İlaç ve PBS uygulamalarına ait absorbans değerlerinden “blank” (sadece besi yeri) absorbans değerleri çıkarılarak hesaplama yapılmıştır.



Şekil 5.2 BT474 hücrelerinde trastuzumab uygulaması sonrası % canlılık değerleri. Canlılık yüzdeleri her bir ilgili ilaç konsantrasyonunun PBS uygulamasına oranlanması ile hesaplanmıştır.



Şekil 5.3 SKBR3 hücrelerinde trastuzumab uygulaması sonrası OD-konsantrasyon eğrisi. İlaç ve PBS uygulamalarına ait absorbans değerlerinden “blank” (sadece besi yeri) absorbans değerleri çıkarılarak hesaplama yapılmıştır.



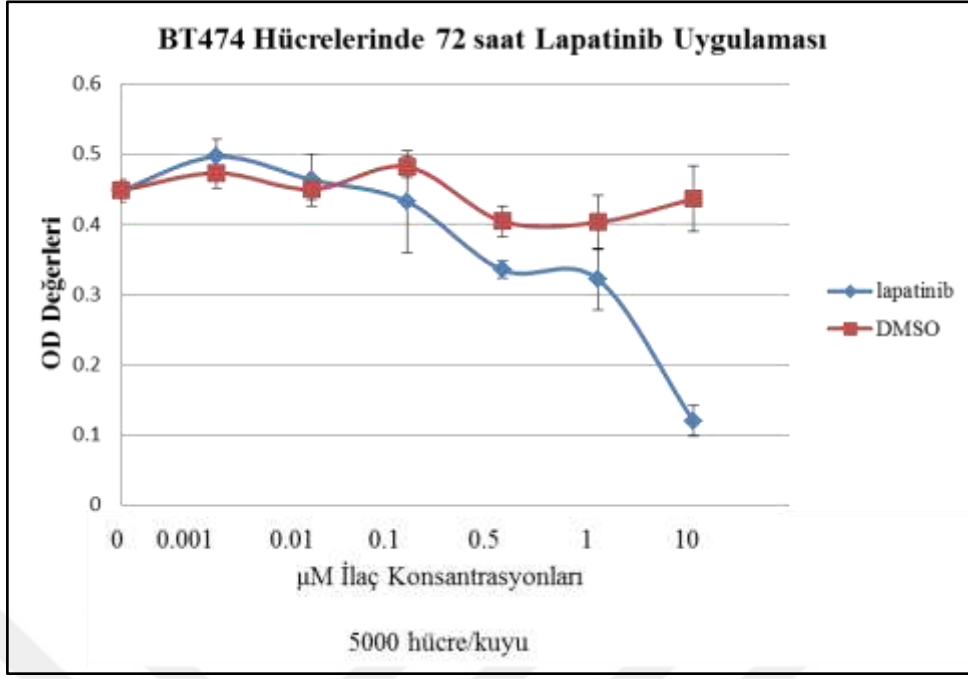
Şekil 5.4 SKBR3 hücrelerinde trastuzumab uygulaması sonrası % canlılık değerleri. Canlılık yüzdeleri her bir ilgili ilaç konsantrasyonunun PBS uygulamasına oranlanması ile hesaplanmıştır.

BT474 ve SKBR3 hücrelerinde trastuzumab uygulamasına ait ortalama canlılık oranları her bir ilaç konsantrasyonu için detaylı olarak Çizelge 5.1’de gösterilmiştir. Graphad Prism 6 programı ile yapılan analiz sonucu IC50 değeri SKBR3 için 0.13 µg/mL, BT474 için 0.07 µg/mL olarak hesaplanmış ve RNA izolasyonu için yapılacak ilaç uygulamasının canlılık değerini %70 civarı düşüren 6 µg/mL olmasına karar verilmiştir.

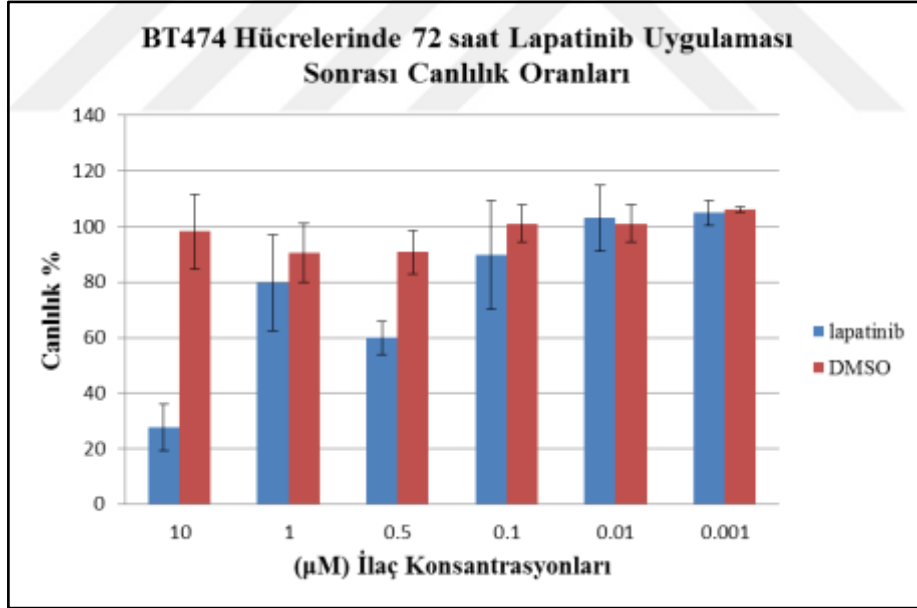
Çizelge 5.1 BT474 ve SKBR3 hücrelerinde trastuzumab uygulamasına ait ortalama canlılık oranları

İlaç Konsantrasyonu	SKBR3	BT474
300 µg/mL	%36	%35
60 µg/mL	%30	%27
30 µg/mL	%41	%30
6 µg/mL	%25	%29
2 µg/mL	%33	%28
0.5 µg/mL	%27	%28
0.1 µg/mL	%78	%79

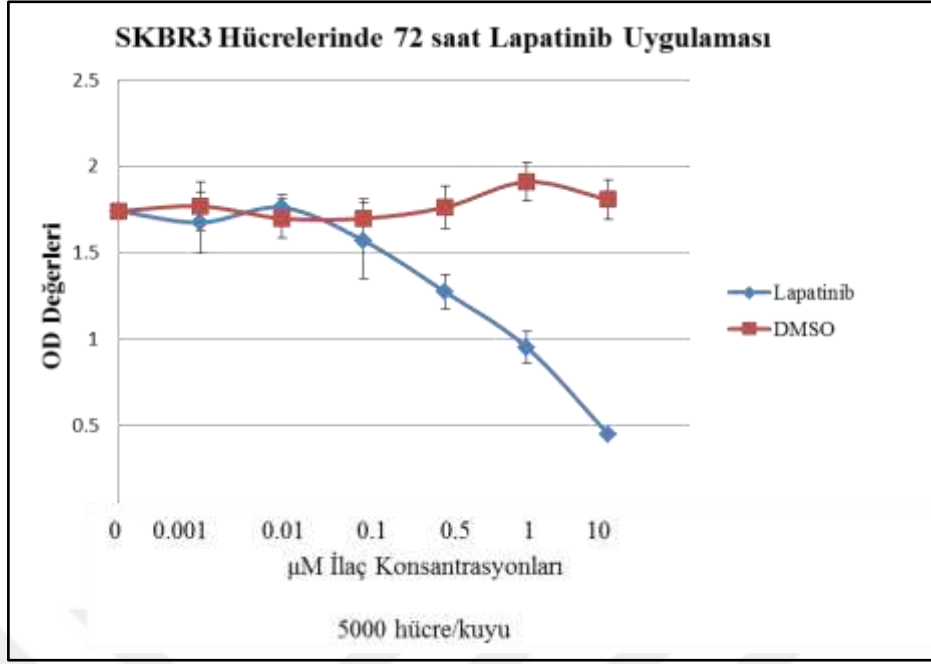
Lapatinib uygulaması için hücreler ilaçla 72 saat boyunca muamele edilmişlerdir. Kullanılacak ilaç konsantrasyonları 1000 µM ana stok sulandırmadan yapılan seri dilusyonlar ile hazırlanmıştır ve çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. Kullanılan konsantrasyonlar 10 µM, 1 µM, 0.5 µM, 0.1 µM, 0.01 µM, 0.001 µM olarak belirlenmiştir. Uygulamanın 24 saat öncesinde her bir kuyuya 5000 hücre gelecek şekilde hücreler ekilmiştir. BT474 hücrelerindeki uygulamaya ait OD-doza eğrileri ve canlılık oranları Şekil 5.5’de ve Şekil 5.6’da verilmiştir. SKBR3 hücrelerine ait OD değerleri ve canlılık oranları ise Şekil 5.7’de ve Şekil 5.8’de gösterilmiştir.



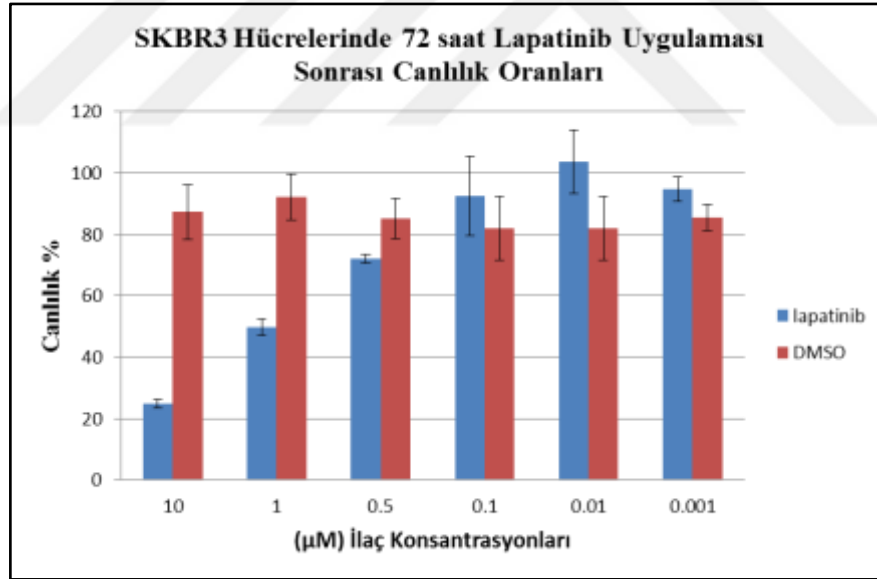
Şekil 5.5 BT474 hücrelerinde lapatinib uygulaması sonrası OD-konsantrasyon eğrisi. İlaç ve DMSO uygulamalarına ait absorbans değerlerinden “blank” (sadece besi yeri) absorbans değerleri çıkarılarak hesaplama yapılmıştır



Şekil 5.6 BT474 hücrelerinde lapatinib uygulaması sonrası % canlılık değerleri. Canlılık yüzdeleri her bir ilgili ilaç konsantrasyonun DMSO uygulamasına oranlanması ile hesaplanmıştır



Şekil 5.7 SKBR3 hücrelerinde lapatinib uygulaması sonrası OD-konsantrasyon eğrisi. İlaç ve DMSO uygulamalarına ait absorbans değerlerinden “blank” (sadece besi yeri) absorbans değerleri çıkarılarak hesaplama yapılmıştır



Şekil 5.8 SKBR3 hücrelerinde lapatinib uygulaması sonrası % canlılık değerleri. Canlılık yüzdeleri her bir ilgili ilaç konsantrasyonunun DMSO uygulamasına oranlanması ile hesaplanmıştır

BT474 ve SKBR3 hücrelerinde lapatinib uygulamasına ait ortalama canlılık oranları her bir ilaç konsantrasyonu için detaylı olarak Çizelge 5.2’de gösterilmiştir. Graphpad Prism 6

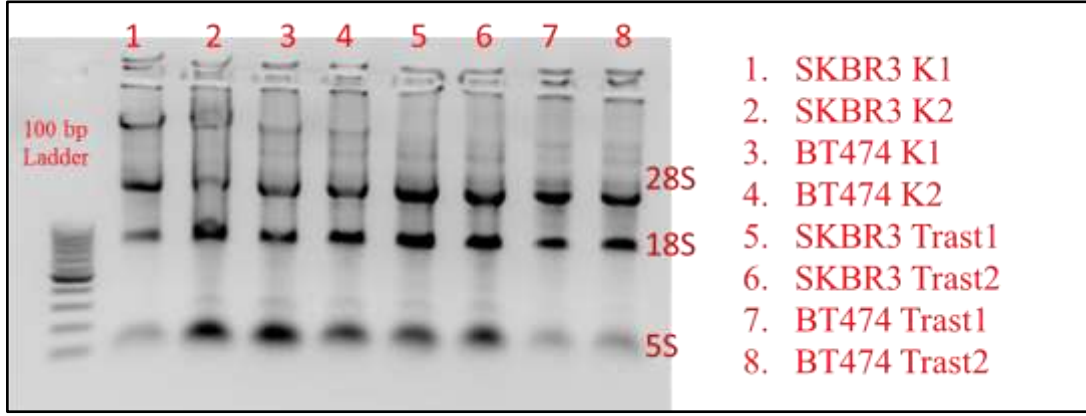
programı ile yapılan analiz sonucu IC50 değeri SKBR3 için 0.7 μM ; BT474 için 0.97 μM olarak hesaplanmış ve RNA izolasyonu için yapılacak ilaç uygulamasının her iki hücre hattı için de canlılık değerini %50 civarı düşüren 2 μM olmasına karar verilmiştir.

Çizelge 5.2 BT474 ve SKBR3 hücrelerinde lapatinib uygulamasına ait ortalama canlılık oranları

İlaç Konsantrasyonu	SKBR3 (% canlılık)	BT474 (% canlılık)
10 μM	24.81	27.55
1 μM	49.81	79.83
0.5 μM	72.17	59.90
0.1 μM	92.46	89.72
0.01 μM	106.21	102.99
0.001 μM	167.49	104.91

5.2. İLAÇ UYGULAMASI ARDINDAN RNA İZOLASYONU

İlaç uygulamalarından 24 saat önce petri kaplarına ekilen hücreler belirlenen konsantrasyonlarda ve sürelerde (lapatinib: 72 saat 2 μM ve trastuzumab: 144 saat 6 $\mu\text{g/mL}$) ilaç ile muamele edilmişlerdir. Ardından TRIzol kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA konsantrasyonları Nanodrop ölçümü ile tespit edilmiş ve %1'lik agaroz jelde yürütülen RNA'ların bütünlüğü kontrol edilmiştir. RNA'larda degradasyon tespit edilmemiştir. Trastuzumaba ait RNA'ların bütünlüğünü gösteren agaroz jel görüntüleri Şekil 5.9'da; nanodrop ölçümlerini gösteren tablo ise Çizelge 5.3'de verilmiştir.

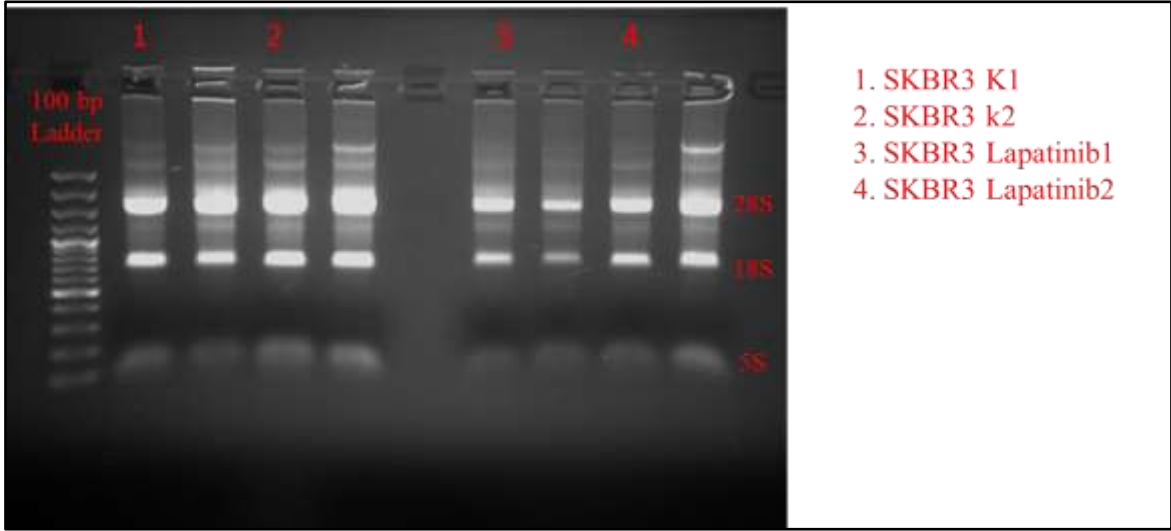


Şekil 5.9 Trastuzumab uygulaması sonrası elde edilen ve mikrodizin analizinde kullanılan RNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri. Her bir ilaç ve PBS uygulaması için iki biyolojik tekrar kullanılmıştır. RNA'lar jelde 100 v ve 300 mA'de 30 dakika yürütülmüşlerdir.

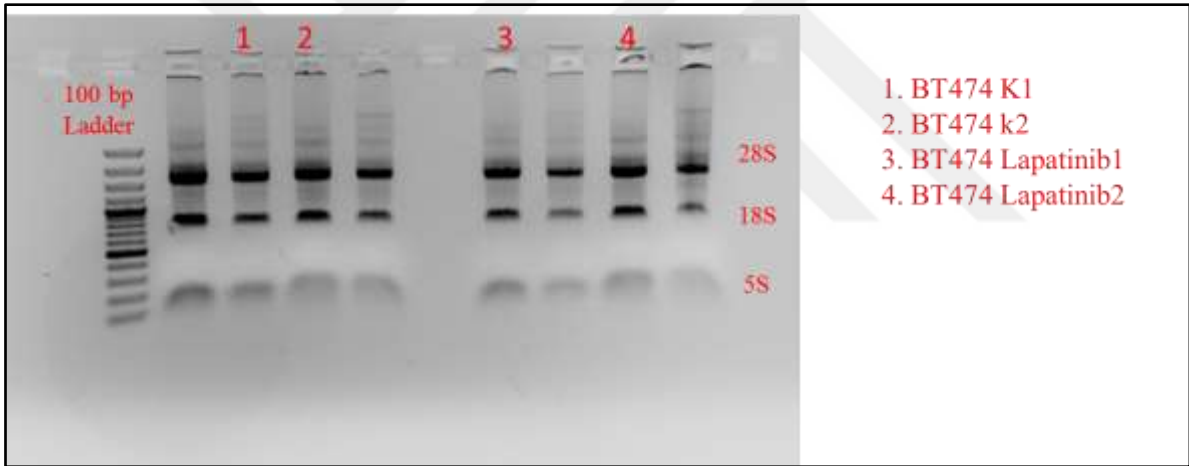
Çizelge 5.3 Trastuzumab uygulaması sonrası elde edilen ve mikrodizin analizinde kullanılan RNA'ların nanodrop ölçüm sonuçları.

Örnek	RNA Konsantrasyonu (ng/mL)	260/280	260/230
SKBR3 K1	756.4	2.03	2.10
SKBR3 K2	2026	2.05	2.10
BT474 K1	1415.1	2.09	2.17
BT474 K2	940.5	2.07	2.14
SKBR3 Trast1	1205.1	2.09	2.04
SKBR3 Trast2	824.5	2.07	2.04
BT474 Trast1	326.9	2.04	1.66
BT474 Trast2	458.3	2.01	1.76

Lapatinibe ait RNA'ların bütünlüğünü gösteren agaroz jel görüntüleri Şekil 5.10'da ve Şekil 5.11'de; nanodrop ölçümlerini gösteren tablo ise Çizelge 5.4'de verilmiştir.



Şekil 5.10 Lapatinib uygulaması sonrası elde edilen ve mikrodizin analizinde kullanılan SKBR3 RNA'larının %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri. Her bir ilaç ve PBS uygulaması için iki biyolojik tekrar kullanılmıştır. RNA'lar jelde 100 v ve 300 mA'de 30 dakika yürütülmüşlerdir.



Şekil 5.11 Lapatinib uygulaması sonrası elde edilen ve mikrodizin analizinde kullanılan BT474 RNA'larının %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri. Her bir ilaç ve PBS uygulaması için iki biyolojik tekrar kullanılmıştır. RNA'lar jelde 100 v ve 300 mA'de 30 dakika yürütülmüşlerdir

Çizelge 5.4 Lapatinib uygulaması sonrası elde edilen ve mikrodizin analizinde kullanılan RNA'ların nanodrop ölçüm sonuçları

Örnek	RNA Konsantrasyonu (ng/mL)	260/280	260/230

SKBR3 K1	414	1.97	2.14
SKBR3 K2	439.8	2.07	2.24
BT474 K1	323.9	1.99	2.24
BT474 K2	344.5	1.99	2.13
SKBR3 Lapatinib1	187.09	2.17	1.34
SKBR3 Lapatinib2	270.19	2.05	1.90
BT474 Lapatinib1	391	1.98	2.13
BT474 Lapatinib2	532.6	2.06	2.06

5.3. LAPATİNİBE VE TRASTUZUMABA DUYARLI MİRNA'LARIN MİKRODİZİN ANALİZİ İLE TESPİTİ

RNA izolasyonu sonrası mikrodizin uygulaması Agilent Human miRNA mikrodizin platformları kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve 50 ng/mL RNA kullanılmıştır. Uygulamanın ardından data analizi BRB Array Tools 4.3.2 kullanılarak yapılmıştır. Normalizasyon için “quantile normalizasyon” metodu tercih edilmiştir (79). İstatiksel analiz için bir modifiye t-test yöntemi olan “between groups of array” seçilmiş ve ilaç uygulanan hücre kültürlerinde ifadesi en 2 kat azalan veya artan, P-değeri < 0.05 olan tüm miRNA'lar bulunmuştur. Ardından ifade değişikliği gösteren miRNA'ların gruplandırması için Treeview programı kullanılarak kümeleme analizi yapılmıştır ve “heatmap” çizilmiştir.

Trastuzumab ilaç uygulaması ardından BT474 hücrelerinde ifade değişikliği gösteren toplam 265 miRNA tespit edilmiştir. Bunlardan 135 tanesinin ifadesi azalırken, 130 tanesinin ifadesi en az 2 kat değişim göstererek artmaktadır. SKBR3 hücrelerinde toplam 202 miRNA'nın ifade değişikliği gösterdiği bulunmuştur. 104 tanesinin ifadesi artarken, 98 tanesinin ifadesi azalmaktadır. Her iki hücre hattında da ortak olan miRNA'ların sayısı ise 50 olarak bulunmuştur. Her iki hücre hattında da ortak olan miRNA'lar ise Çizelge 5.5'de verilmiştir. Trastuzumab uygulaması ardından BT474 hücrelerinde ifade değişikliği

gösteren miRNA'ların tam listesi Ek-1'de, SKBR3 miRNA listesi ise Ek-2'de sunulmuştur.

Çizelge 5.5 Her iki hücre hattında da ortak olan trastuzumab duyarlı miRNA listesi

miRNA ID	SKBR3 p-değeri	SKBR3 Kat değışımi	BT474 p-değeri	BT474 Kat değışımi
hsa-miR-580	0.0035767	16.18	0.001392	5.89
hsa-miR-613	0.0350629	6.24	0.0096497	3.29
hsa-miR-5090	0.0015621	6.16	0.0483493	2.56
hsa-miR-2392	0.0015115	6.07	0.0149213	3.58
hsa-miR-623	0.0168282	5.61	0.0243095	2.76
hsa-miR-4750-5p	0.0060778	4.69	0.0051319	3.81
hsa-miR-33a-3p	0.0100228	4.53	0.0298384	0.37
hsa-miR-4472	0.0076724	3.92	0.0090176	3.37
hsa-miR-4481	0.0078399	3.86	0.0195027	2.75
hsa-miR-3127-5p	0.0237291	3.6	0.0439468	2.41
hsa-miR-4447	0.0097844	3.59	0.0117179	3.99
hsa-miR-181d	0.00896	3.59	0.0398194	2.37
hsa-miR-601	0.0463435	3.32	0.0338262	2.36
hsa-miR-130b-5p	0.0464179	3.17	0.0245657	0.33
hsa-miR-216b	0.0245426	3.08	0.0495969	0.45
hsa-miR-1268a	0.0249578	3.04	0.0340529	2.33
hsa-miR-138-2-3p	0.0393388	3.01	0.0327977	0.41
hsa-miR-3656	0.0398731	2.8	0.0421986	2.21
hsa-miR-26a-	0.0354726	2.71	0.0312461	3.38

1-3p				
hsa-miR-493-3p	0.0410695	2.69	0.0201837	4.95
hsa-miR-371a-5p	0.0391787	2.67	0.0194027	2.85
hsa-miR-589-5p	0.0465787	2.48	0.0048072	4.77
hsa-miR-99a-3p	0.0471686	0.41	0.0069146	0.15
hsa-miR-146b-3p	0.0430942	0.37	0.0258481	0.4
hsa-miR-519e-3p	0.0461255	0.36	0.0302709	2.57
hsa-miR-127-5p	0.0411847	0.36	0.033832	2.45
hsa-miR-18a-3p	0.0272841	0.36	0.0345647	0.4
hsa-miR-34c-3p	0.040274	0.35	0.0035619	7.69
hsa-miR-365b-5p	0.0343413	0.35	0.030063	0.36
hsa-miR-3116	0.0307848	0.35	0.0326677	3.13
hsa-miR-548aq-5p	0.0461832	0.35	0.0464526	0.34
hsa-miR-647	0.0304733	0.34	0.0094015	0.32
hsa-miR-382-3p	0.0355528	0.34	0.0162142	3.18
hsa-miR-185-3p	0.03341	0.34	0.0248966	0.34
hsa-miR-545-5p	0.0345218	0.33	0.0079419	0.21
hsa-miR-4746-5p	0.0268011	0.33	0.0254426	0.31
hsa-miR-4257	0.0403781	0.33	0.0258715	0.4

hsa-miR-3691-3p	0.0385537	0.33	0.0404707	0.4
hsa-miR-5692a	0.0151513	0.31	0.007352	0.12
hsa-miR-943	0.0202132	0.31	0.0327177	0.24
hsa-miR-2052	0.0317003	0.3	0.0294035	0.25
hsa-miR-4789-5p	0.0143541	0.29	0.0053838	4.76
hsa-miR-578	0.0173729	0.28	0.0153884	2.95
hsa-miR-655	0.0485127	0.25	0.0213592	3.22
hsa-miR-567	0.0057375	0.24	0.0044409	0.2
hsa-miR-615-3p	0.0100128	0.21	0.0112228	0.28
hsa-miR-296-3p	0.0180521	0.21	0.0221598	0.23
hsa-miR-581	0.0073494	0.2	0.0106609	3.17
hsa-miR-1247-3p	0.0366819	0.18	0.0436788	0.36
hsa-miR-19a-5p	0.0309777	0.1	0.0288498	3.57

Lapatinib ilaç uygulaması ardından BT474 hücrelerinde ifade değişikliği gösteren toplam miRNA sayısı 215 olarak tespit edilmiştir. Bunlardan 113 tanesinin ifadesi azalırken, 112 tanesinin ifadesi en az 2 kat değişim göstererek artmaktadır. SKBR3 hücrelerinde toplam 182 miRNA'nın ifade değişikliği gösterdiği bulunmuştur. 86 tanesinin ifadesi artarken, 96 tanesinin ifadesi azalmaktadır. Her iki hücre hattında da ortak olan miRNA'ların sayısı ise 26 olarak bulunmuştur. Hem SKBR3 hem de BT474 hücrelerinde ortak olan miRNA'lar Çizelge 5.6'da verilmiştir. Lapatinib uygulaması ardından BT474 hücrelerinde ifade değişikliği gösteren miRNA'ların tam listesi Ek-3'de, SKBR3 miRNA listesi ise Ek-4'de sunulmuştur.

Çizelge 5.6 Lapatinib uygulaması ardından hem SKBR3 hem de BT474 hücrelerinde ortak olarak ifadesi değişen miRNA'lar

miRNA ID	SKBR3 p-değeri	SKBR3 Kat değışımi	BT474 p-değeri	BT474 Kat değışımi
hsa-miR-649	0.0000697	0.03	0.0477518	2.65
hsa-miR-302f	0.0011234	19.33	0.0092123	4.19
hsa-miR-3181	0.0044865	7.05	0.0127053	5.01
hsa-miR-3685	0.0048051	4.93	0.0184364	3.51
hsa-miR-938	0.0067209	0.18	0.0050742	10.55
hsa-miR-5008-3p	0.0128734	3.8	0.0204132	0.27
hsa-miR-452-3p	0.0187347	3.71	0.0071855	0.12
hsa-miR-216b-5p	0.0236523	0.24	0.0193426	3.27
hsa-miR-371a-5p	0.0258661	0.29	0.0087925	6.03
hsa-miR-186-3p	0.027389	3.36	0.0244425	0.16
hsa-miR-454-5p	0.0355297	0.11	0.0335019	5.05
hsa-miR-3927-5p	0.0381989	2.72	0.0126461	4.03
hsa-miR-875-3p	0.0382157	0.22	0.0370454	2.7
hsa-miR-663b	0.0388995	0.12	0.0324123	4.39
hsa-miR-570-3p	0.0394342	6.56	0.0245283	0.33
hsa-miR-150-5p	0.0404574	0.38	0.0179707	0.3
hsa-miR-19b-1-5p	0.0445013	4.37	0.030334	3.13
hsa-miR-4699-5p	0.0448839	6.88	0.0352529	0.36
hsa-miR-581	0.0455131	4.76	0.002554	10.26
hsa-miR-935	0.0456317	0.34	0.0114829	0.24
hsa-miR-338-5p	0.0469992	0.33	0.0224895	0.29
hsa-miR-449a	0.0476983	2.78	0.0042273	8.85

hsa-miR-4800-5p	0.0485977	0.4	0.0363381	3.11
hsa-miR-4486	0.0488079	3.07	0.0029227	0.16
hsa-miR-26a-1-3p	0.0496053	0.39	0.0265481	0.31
hsa-miR-185-3p	0.049672	0.26	0.0350819	0.27

Bununla birlikte iki farklı ilaç uygulaması ardından ortak şekilde ifadesi değişen miRNA'ların varlığı araştırılmıştır. Her iki hücre hattında ve her iki ilaç uygulamasında birden ifadesi ortak değişen sadece 4 miRNA bulunmuştur. Bunlar; hsa-miR-185-3p, hsa-miR-26a-1-3p, hsa-miR-371a-5p ve hsa-miR-581 şeklindedir. Hücre hatları kendi içlerinde de karşılaştırılmıştır ve SKBR3 hücresinde hem trastuzumaba hem lapatinibe duyarlı, aynı şekilde ifade değişikliği gösteren 11 miRNA bulunmuştur. İlgili miRNA'lar Çizelge 5.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.7 SKBR3 hücrelerinde trastuzumaba ve lapatinibe ortak cevap veren miRNA'lar

miRNA ID	Trastuzumab p-değeri	Trastuzumab Kat değışımi	Lapatinib p-değeri	Lapatinib Kat değışımi
hsa-miR-345-5p	0.0010757	0.064	0.026465	0.28
hsa-miR-4750-5p	0.0060778	4.69	0.039997	5.88
hsa-miR-544a	0.0161229	3.13	0.0498843	3.48
hsa-miR-623	0.0168282	5.61	0.0375884	3.48
hsa-miR-4760-5p	0.021372	0.11	0.0354407	0.34
hsa-miR-182-3p	0.0311323	0.35	0.045315	0.31
hsa-miR-649	0.0331432	0.36	0.0000697	0.03
hsa-miR-185-3p	0.03341	0.34	0.049672	0.26
hsa-miR-365b-5p	0.0343413	0.35	0.0233101	0.33
hsa-miR-541-3p	0.039253	0.29	0.0078022	0.24
hsa-miR-938	0.0404244	0.39	0.0067209	0.18

BT474 hücrelerinde hem trastuzumaba hem lapatinibe duyarlı, aynı şekilde ifade değişikliği gösteren 22 miRNA bulunmuştur. İlgili miRNA'lar Çizelge 5.8'de verilmiştir.

Çizelge 5.8 BT474 hücrelerinde trastuzumaba ve lapatinibe ortak cevap veren miRNA'lar

miRNA ID	Trastuzumab p-değeri	Trastuzumab Kat değışimi	Lapatinib p-değeri	Lapatinib Kat değışimi
hsa-miR-3680-3p	0.0072642	4.45	0.0066811	11.21
hsa-miR-581	0.0106609	3.17	0.002554	10.26
hsa-miR-371a-5p	0.0194027	2.85	0.0087925	6.03
hsa-miR-150-3p	0.0219531	0.37	0.01761	0.2
hsa-miR-490-5p	0.0230238	0.33	0.0071992	0.087
hsa-miR-130b-5p	0.0245657	0.33	0.0123768	0.21
hsa-miR-185-3p	0.0248966	0.34	0.0350819	0.27
hsa-miR-576-3p	0.0262989	3.81	0.0484043	2.91
hsa-miR-6716-3p	0.0271763	0.37	0.0224017	0.19
hsa-miR-4539	0.0322147	0.3	0.0394072	0.38
hsa-miR-943	0.0327177	0.24	0.0235571	0.16
hsa-miR-138-2-3p	0.0327977	0.41	0.0230871	0.24
hsa-miR-3605-5p	0.0375177	0.38	0.0410619	0.34
hsa-miR-5009-3p	0.0396833	3.73	0.022548	3.54
hsa-miR-3688-5p	0.0404558	0.44	0.0482229	0.28
hsa-miR-631	0.0411589	0.44	0.0233268	0.27
hsa-miR-661	0.0436862	2.48	0.0203034	3.4
hsa-miR-411-3p	0.0444517	0.42	0.0346933	0.3
hsa-miR-3133	0.0444599	0.34	0.0350272	0.28
hsa-miR-3662	0.0450344	0.4	0.0087598	0.23
hsa-miR-513c-3p	0.0459936	0.36	0.0373382	0.36
hsa-miR-548aq-5p	0.0464526	0.34	0.0247095	0.17

5.4. İFADE DEĞİŞİKLİĞİ GÖSTEREN MİRNA'LARIN BİYOİNFORMATİK ANALİZİ

BT474 ve SKBR3 hücrelerinde trastuzumab veya lapatinib muamelesi sonrasında ortak ifade değişikliği gösteren miRNA'ların olası hedef genleri ve zenginleştikleri yollar çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak araştırılmıştır. Biyoinformatik analizdeki amaç miRNA'ların sahip olabileceği olası fonksiyonel etkinliklerin tanımlanmasına çalışmaktır. Bu şekilde meme kanseri gelişiminde etki gösterebilecek ilaca duyarlı miRNA'ların bulunması hedeflenmiştir. Biyoinformatik analizi için ilk olarak her iki hücre hattında ortak ifade değişikliği gösteren miRNA listelerine odaklanılmıştır. Onun dışında Çizelge 5.7 ve Çizelge 5.8'de verilen, her iki ilaca da cevap veren miRNA'lar da araştırılmıştır. Analiz ardından 14 adet miRNA ilk aşamada eş-zamanlı PZR ile ifadelerinin doğrulanması ve hücre kültürlerinde fonksiyonlarının araştırılması için seçilmiştir. Örnek olarak hsa-miR-449a için hedef gen analizi TargetScan veriabanı kullanılarak ve içerik skoru minimum -0.4 seçilerek yapılmıştır. 324 adet olası hedef gen bulunmuştur. hsa-miR-345 içinse içerik skoru -0.3 olarak alınmıştır ve 111 adet olası hedef bulunmuştur. Ardından WebGestalt veritabanı kullanılarak yolak analizi yapılmış ve p-değeri <0.05 olan yollar seçilmiştir. Ek olarak ilgili miRNA'ları fonksiyonları ve fenotipleri hakkında ön bilgi elde etmek için PhenomiR 2.0 ve Pharmacomir gibi veritabanları kullanılmıştır. PhenomiR kullanılarak hsa-miR-499a ve hsa-miR-345 gibi miRNA'ların meme kanseri örneklerinden yapılan mikrodizin analizinde ifade oldukları; Pharmacomir veritabanının da ise hsa-miR-449a'nın lapatinible ilişkili olabileceği bulunmuştur. hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 ile ilgili yollar örnek olarak Çizelge 5.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 5.9 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345'e ait TargetScan sonuçları kullanılarak yapılan yolak analizi

Yolak Adı (hsa-miR-449a)	Gen Sayısı	Doğrulanmış p-değeri
Prostat kanseri	6	0.002
Kanser yolları	10	0.0027
Melanoma	5	0.0027
Glioma	5	0.0027

Adherens bağlanma	5	0.0027
Hücre Siklusu	6	0.0034
Notch sinyal yolağı	4	0.004
Yolak Adı (hsa-miR-345)	Gen sayısı	Doğrulanmış p-değeri
Nikotin ve nikotinamid metabolizması	3	0.0002
Mismatch onarımı	2	0.0063
Homolog rekombinasyon	2	0.0063
DNA replikasyonu	2	0.0076
Nükleotid ekzisyon onarımı	2	0.0092
Sitokin-sitokin reseptör etkileşim yolağı	3	0.0398

5.5. MİRNA İFADELERİNİN EŞ-ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI

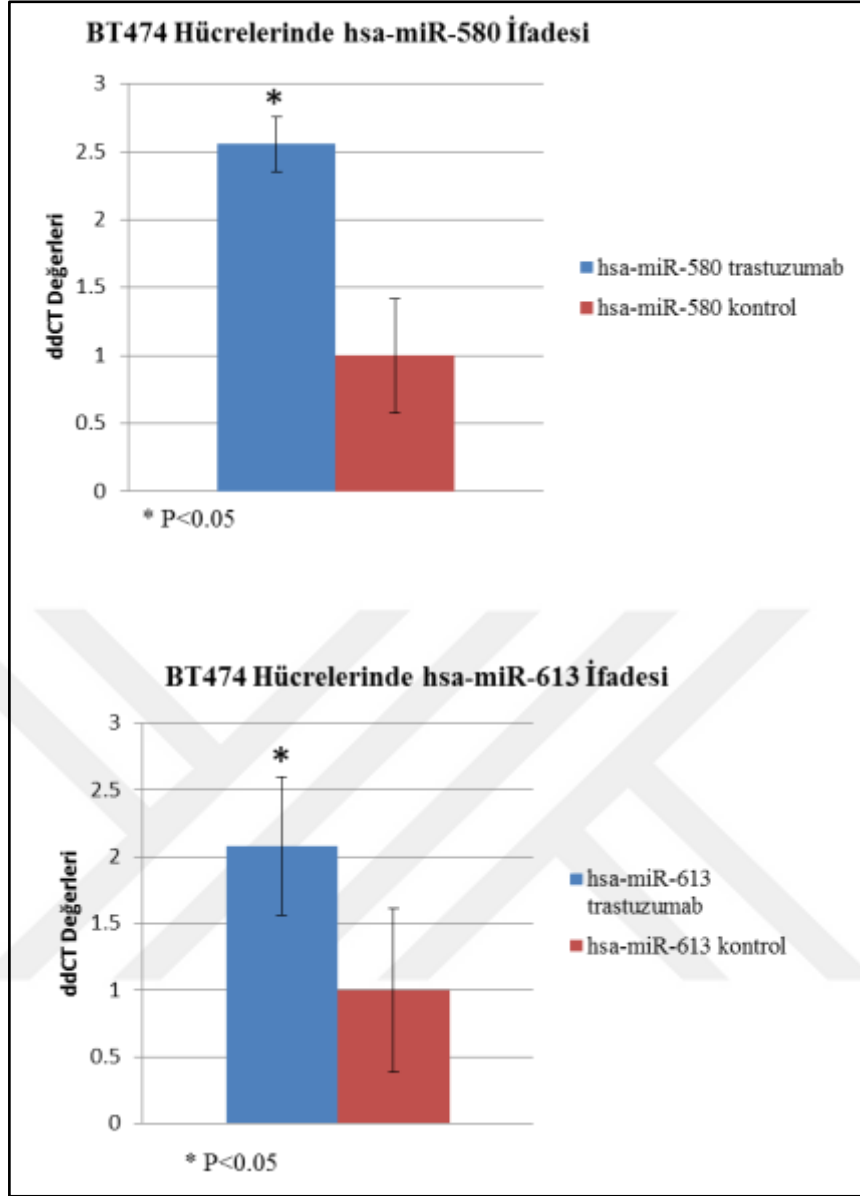
Biyoinformatik analiz ardından eş-zamanlı PZR doğrulaması için seçilen miRNA'lar Çizelge 5.10'da verilmiştir.

Çizelge 5.10 Eş zamanlı PZR ile doğrulama için seçilen miRNA'lar

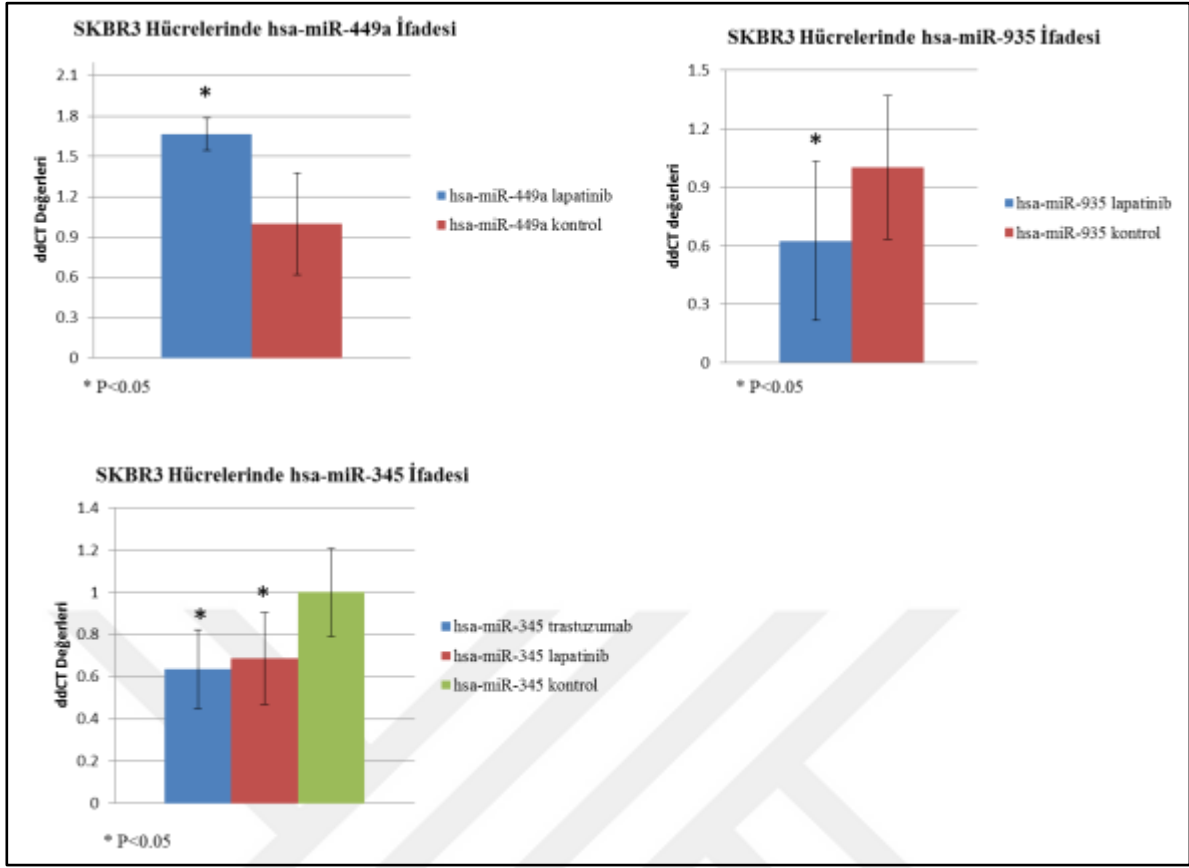
miRNA ID	Duyarlı olduğu ilaç	Araştırılacak hücre hattı
hsa-miR-345-5p	Lapatinib ve Trastuzumab	SKBR3
hsa-miR-541-3p	Lapatinib ve Trastuzumab	SKBR3
hsa-miR-544a	Lapatinib ve Trastuzumab	SKBR3
hsa-miR-623	Lapatinib ve Trastuzumab	SKBR3
hsa-miR-576	Lapatinib ve Trastuzumab	BT474
hsa-miR-580	Trastuzumab	BT474 ve SKBR3
hsa-miR-613	Trastuzumab	BT474 ve SKBR3

hsa-miR-26a-1-3p	Trastuzumab	BT474 ve SKBR3
hsa-miR-493	Trastuzumab	BT474 ve SKBR3
hsa-miR-150-5p	Lapatinib	BT474 ve SKBR3
hsa-miR-449a	Lapatinib	BT474 ve SKBR3
hsa-miR-581	Lapatinib	BT474 ve SKBR3
hsa-miR-935	Lapatinib	BT474 ve SKBR3
hsa-miR-338	Lapatinib	BT474 ve SKBR3

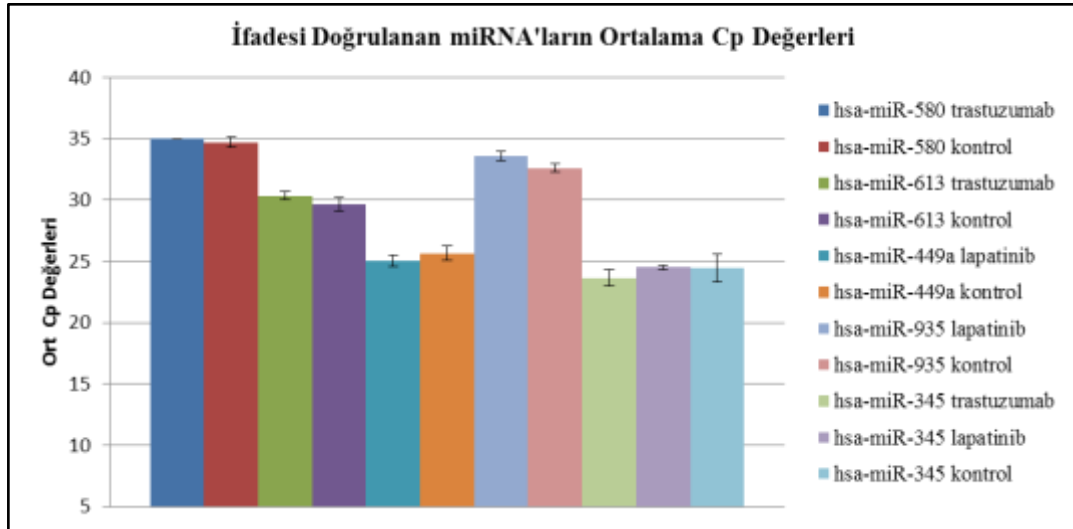
miRNA'ların her biri mikrodizin deneylerinde kullanılan RNA'lar kullanılarak eş-zamanlı PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Her bir örnek için en az iki biyolojik tekrar kullanılarak deney gerçekleştirilmiştir. hsa-miR-580, hsa-miR-613, hsa-miR-345, hsa-miR-449a ve hsa-miR-935 eş-zamanlı PZR ile ifadesi doğrulanan ve istatistiksel olarak ifade değişikliği anlamlı olan miRNA'lar olarak bulunmuştur. İfade değişikliği hesaplanırken $\Delta\Delta Ct$ metodundan faydalanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı ifade değişikliği gösteren ve mikrodizin ifadesi doğrulanan tüm miRNA'ların $\Delta\Delta Ct$ (ddCt) değerleri Şekil 5.12'de ve Şekil 5.13'te verilmiştir. miRNA'ların ortalama Cp değerleri ise Şekil 5.14'de gösterilmiştir.



Şekil 5.12 İstatiksel olarak anlamlı ifade değişikliği gösteren ve mikrodizin ifadesi doğrulanan trastuzumaba duyarlı miRNA'lar. Eş-zamanlı PZR en az iki biyolojik tekrar kullanılarak yapılmıştır. P-değerleri student t-test kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.13 İstatiksel olarak anlamlı ifade değişikliği gösteren ve mikrodizin ifadesi doğrulanan lapatinibe duyarlı miRNA'lar. Eş-zamanlı PZR en az iki biyolojik tekrar kullanılarak yapılmıştır. P-değerleri student t-test kullanılarak hesaplanmıştır.

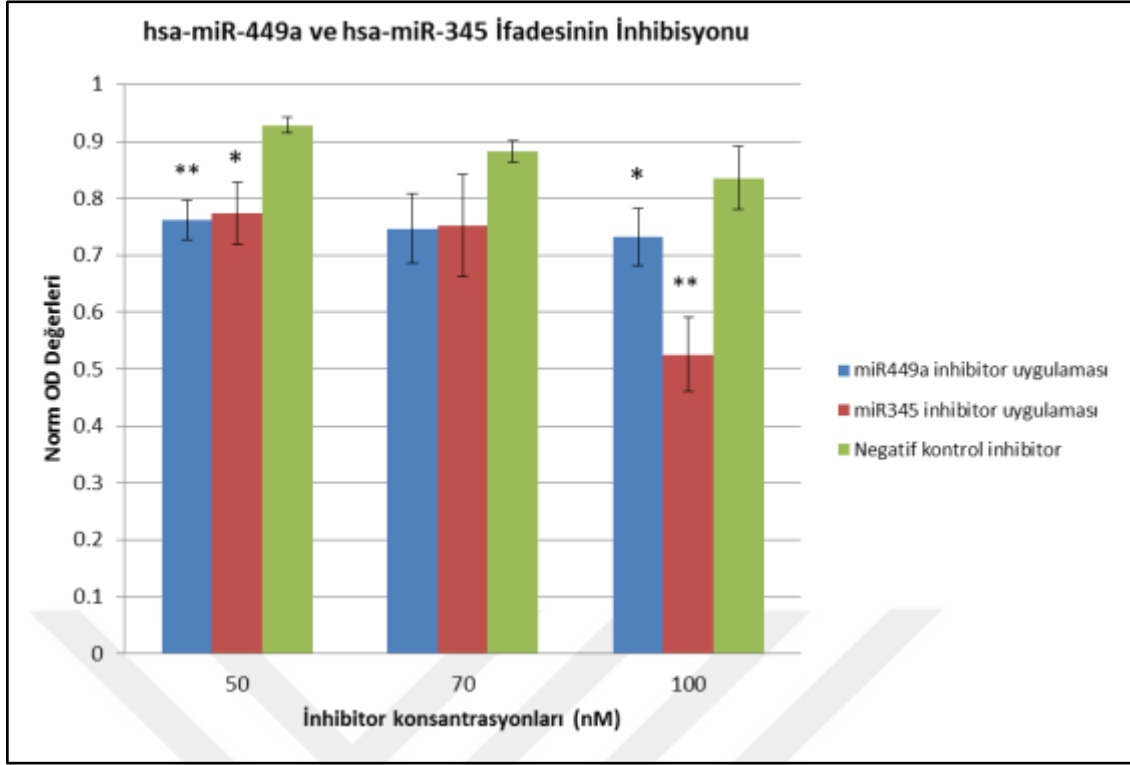


Şekil 5.14 İstatiksel olarak anlamlı ifade değişikliği gösteren miRNA'ların ortalama Cp değerleri.

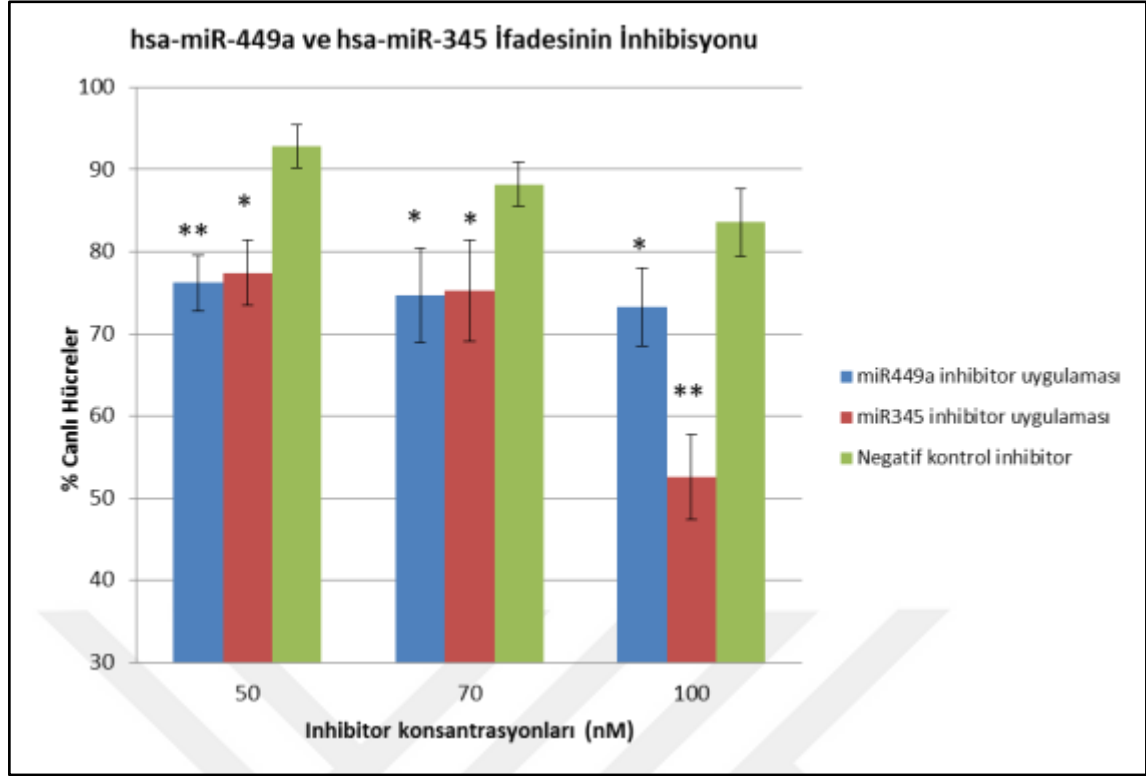
5.6. HSA-MİR-345 VE HSA-MİR-449A'NIN SKBR3 HÜCRELERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI İÇİN MİMİC VE İNHİBİTÖR İLE TRANSFEKSİYONU

Eş zamanlı RT-PZR ile doğrulanan tedaviye duyarlı miRNA'lardan hsa-miR-449a ve hsa-miR-345, ifade değişikliklerinin hücre kültürü üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla ileriki aşamalar için seçilmiştir. Seçimde, eş-zamanlı PZR ile bulunan ifade düzeyleri ve biyoinformatik analiz sonuçlarının yanı sıra aynı hücrelerde ve aynı ilaç uygulamasında ters yönlü ifade değişikliği göstermeleri de etkili olmuştur.

Her iki miRNA'ya ait inhibitör ve mimic oligonükleotid yapılar Dharmacon firmasının belirttiği protokole uygun olarak 96 kuyulu plâtelere ifade değişikliği gösterdikleri hücre kültürüne (SKBR3) ayrı ayrı transfekte edilmiştir ve önerilen süre olan 48 saat boyunca beklenmiştir. Uygulama için her bir kuyuya 6000-7000 hücre ekilmiştir. Transfeksiyonlar 3'lü biyolojik tekrarlar kullanılarak yapılmıştır. Ardından hücre proliferasyon testi (WST-1 testi) uygulanarak spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiş ve hücre çoğalması üzerine etkileri araştırılmıştır. Buna göre hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 ifadeleri inhibitör kullanılarak susturulduğunda hücre çoğalmasının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde gerilediği gözlenmiştir. İnhibitörler ile yapılan transfeksiyonlara ait sonuçlar Şekil 5.15'te, Şekil 5.16'da ve Çizelge 5.10'da gösterilmiştir.



Şekil 5.15 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 ifadesinin SKBR3 hücrelerinde 48 saat boyunca inhibisyonu sonucu elde edilen normalize OD değerleri. hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 farklı konsantrasyonlarda (50, 70 ve 100 nM) inhibitör kullanılarak susturulmuştur. Her bir transfeksiyon için 3 biyolojik tekrar kullanılmıştır. Ardından WST-1 testi sonucunda elde edilen OD değerleri kullanılarak normalizasyon yapılmıştır. Normalizasyon miRNA inhibisyonu yapılan değerlerinin, negatif kontrol değerlerine bölünmesi ile gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol ise uygulama yapılmayan hücre kontrol kısmına oranlanmıştır. Böylece inhibisyonların etkisi ile negatif kontrol sonuçları karşılaştırılmıştır. 50 nM ve 100 nM konsantrasyonda yapılan inhibisyonlar sonucu görülen hücre çoğalmasındaki düşüş her iki miRNA için yapılan student t-test ardından istatistiksel olarak anlamlı (** $P < 0.005$, * $P < 0.05$) bulunmuştur



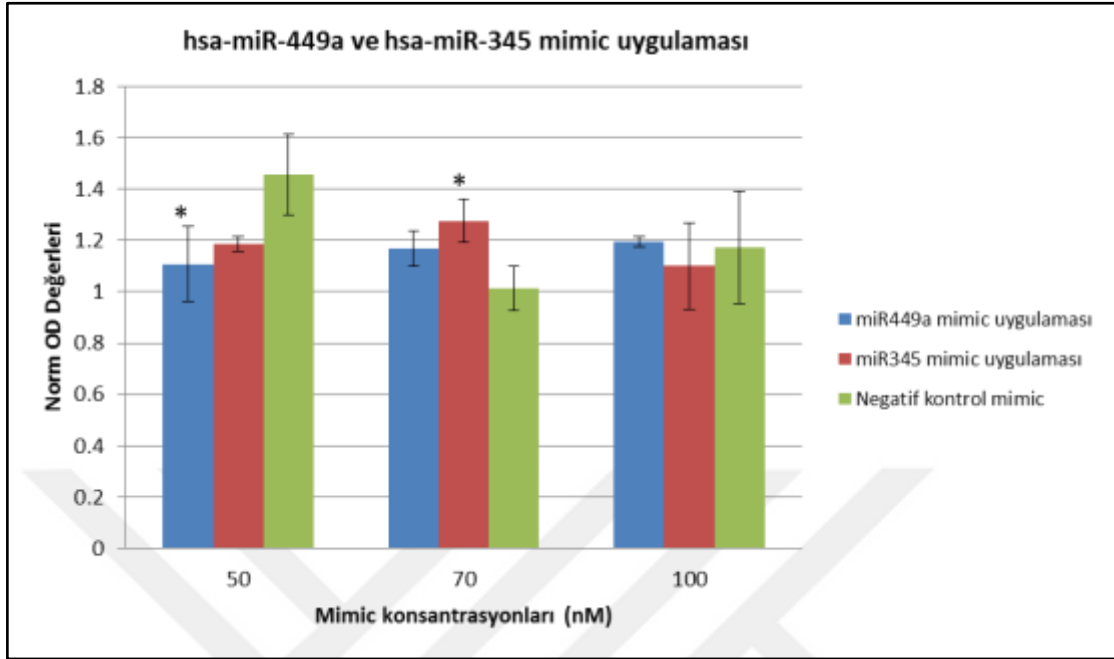
Şekil 5.16 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 ifadesinin SKBR3 hücrelerinde 48 saat boyunca inhibisyonu sonucu elde edilen % canlılık değerleri. hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 farklı konsantrasyonlarda (50, 70 ve 100 nM) inhibitör kullanılarak susturulduktan sonra elde edilen OD değerleri ile canlı hücrelerin yüzdesi hesaplanmıştır. Canlı hücre oranları hesaplanırken miRNA inhibisyonuna ait OD değerleri negatif kontrol OD değerlerine bölünüp 100 ile çarpılmıştır. Negatif kontrol ise hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücre kontrol kısmına oranlanmıştır. Böylece negatif kontrol inhibitör ile transfecte hücreler ile canlılık oranları karşılaştırılmıştır. Yapılan student t-test sonucunda farklı konsantrasyonların (50, 70, 100 nM) her birinde hsa-miR-345 ve hsa-miR-449a inhibisyonu sonucu gözlenen hücre çoğalmasındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı (** $P < 0.005$, * $P < 0.05$) bulunmuştur

hsa-miR-449a, hsa-miR-345 inhibisyon uygulamasının negatif kontrol ile karşılaştırılması sonucu elde edilen canlılık oranları Çizelge 5.11’de verilmiştir.

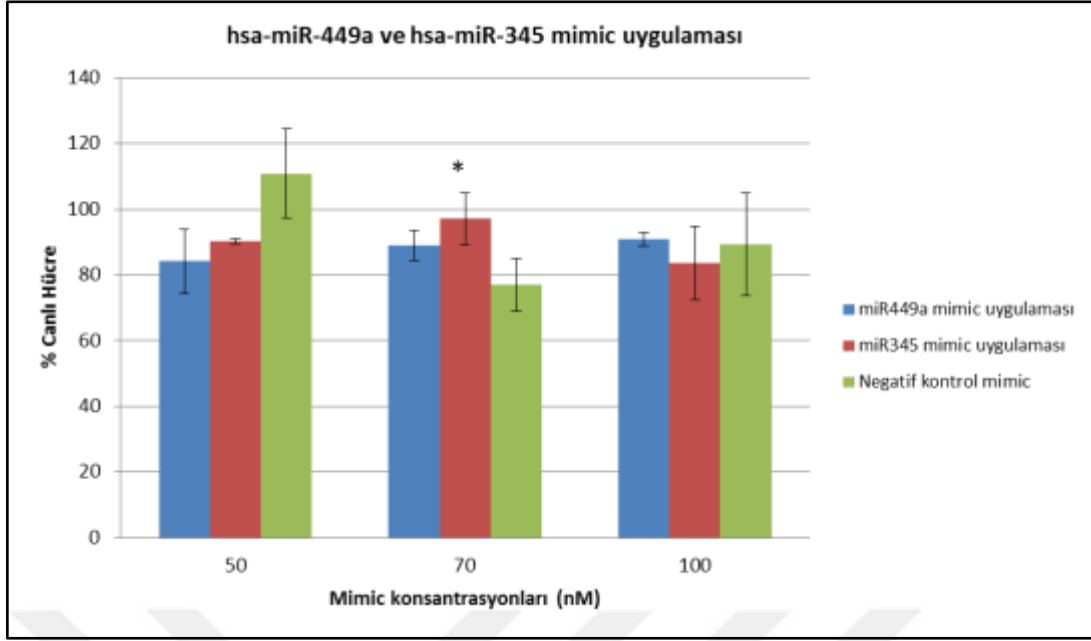
Çizelge 5.11 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 inhibisyonu sonucu SKBR3 hücrelerinde elde edilen % canlılık oranları

miRNA inhibitör	50 nM	70 nM	100 nM
hsa-miR-449a	%76	%74	%73
hsa-miR-345	%77	%75	%52

hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 için mimicler kullanılarak yapılan transfeksiyon sonuçları Şekil 5.17’de, Şekil 5.18’de ve Çizelge 5.12’de gösterilmiştir.



Şekil 5.17 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 ifadesinin SKBR3 hücrelerinde 48 saat boyunca mimic uygulaması sonucu elde edilen normalize OD değerleri. hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 farklı konsantrasyonlarda (50, 70 ve 100 nM) mimic kullanılarak ifadesi artırıldıktan sonra elde edilen OD değerleri normalize edilmiştir. Normalizasyon için mimic uygulamaları, negatif kontrol mimic uygulamalarına bölünmüştür. Negatif kontrol hiçbir uygulama yapılmayan hücre kontrol ile karşılaştırılmıştır. Ardından student t-test yapılarak değişikliklerin anlamlı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Buna göre hsa-miR-449a 50 nM mimic uygulaması için gözlenen azalma $P<0.05$ olarak bulunurken; hsa-miR-345 70 nM mimic uygulamasında görülen artış $P<0.05$ olarak gözlenmiştir



Şekil 5.18 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 ifadesinin SKBR3 hücrelerinde 48 saat boyunca mimik uygulaması sonucu elde edilen canlılık oranları. hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 farklı konsantrasyonlarda (50, 70 ve 100 nM) mimik kullanılarak ifadesi artırıldıktan sonra elde edilen OD değerleri negatif kontrol mimik uygulamalarına bölünmüş ve 100 ile çarpılarak hesaplama tamamlanmıştır. Negatif kontrol ise hiçbir uygulama yapılmayan hücre kontrol ile karşılaştırılmıştır. Ardından student t-test yapılarak değişikliklerin anlamlı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Buna göre hsa-miR-345 70 nM mimik uygulamasında görülen artış $P < 0.05$ olarak gözlenmiştir

hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 mimik uygulamasının negatif kontrol ile karşılaştırılması sonucu elde edilen canlılık oranları Çizelge 5.11’de verilmiştir.

Çizelge 5.12 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 mimik uygulaması sonucu SKBR3 hücrelerinde elde edilen % canlılık oranları

miRNA mimik	50 nM	70 nM	100 nM
hsa-miR-449a	% 84	% 88	% 90
hsa-miR-345	% 90	% 97	% 83

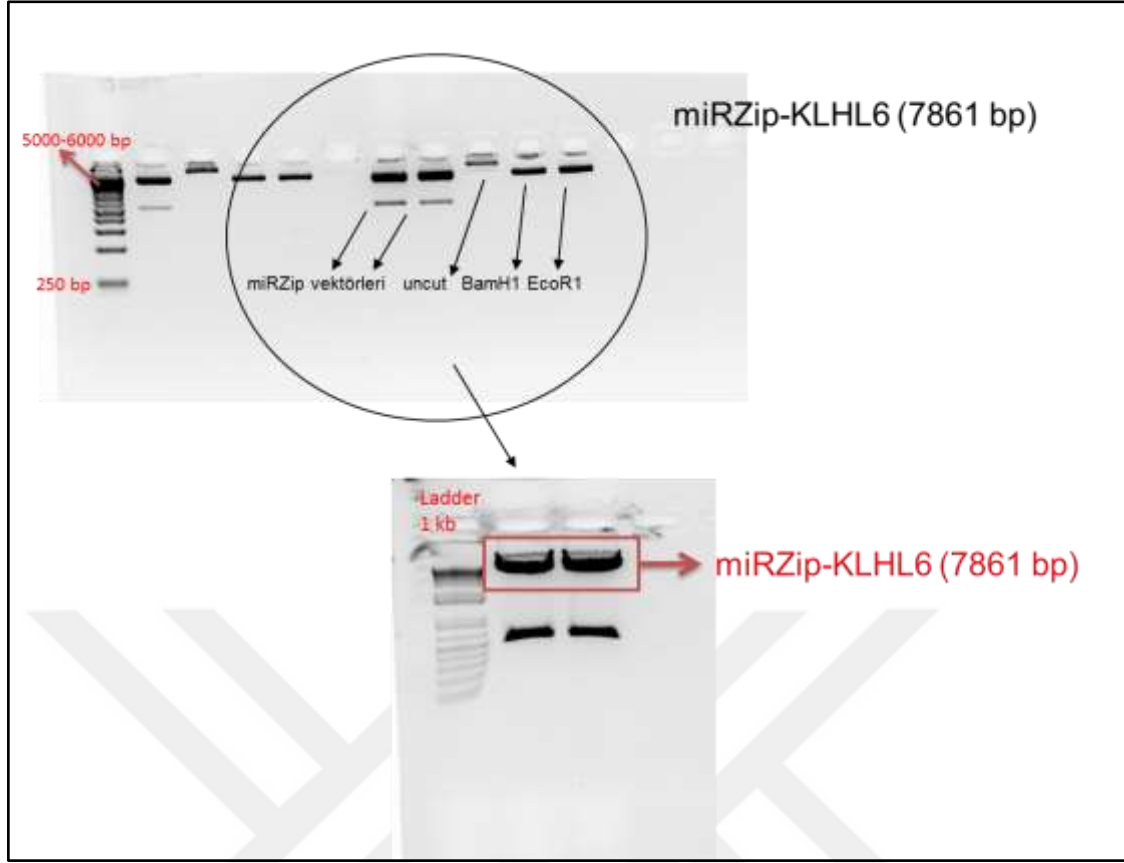
5.7. SKBR3 HÜCRELERİNİN HSA-MİR-449A, HSA-MİR-345 VE NT1 MİRZİP VEKTÖRLERİ İLE ENFEKSİYONU

SKBR3 hücrelerinde hsa-miR-345 ve hsa-miR-449a inhibisyonu ardından hücre çoğalmasının gerilediğinin gözlenmesi üzerine, her iki miRNA’nın hücreler üzerindeki

uzun süreli etkisinin araştırılmasına ve AGO2-IP yöntemi ile potansiyel hedef genlerinin bulunmasına karar verilmiştir. Bunun için her iki miRNA'nın sürekli olarak susturulmasını sağlayacak lentiviral vektör (miRZip) tasarımları gerçekleştirilmiştir. hsa-miR-345 susturmak için kullanılan miRZip345 vektörü daha önce hazırlanmış şekilde ev sahibi araştırma grubunun kütüphanesinde bulunduğundan, sadece maxiprep ile çoğaltılması sağlanmıştır. miRZip449a ise en baştan tasarlanmıştır. Kontrol olarak kullanılan miRZipNT1 (NT1) ve miRZipNT2 (NT2) kullanıma hazır olarak bulduklarından herhangi bir çoğaltma işlemi yapılmamıştır. miRZip vektörlerinin kullanılmasında ilgili miRNA'ların eş zamanlı PZR sonucu elde edilen Ct değerlerinin düşük olması (bazal ifadelerinin yüksek olması) da göz önüne alınmıştır.

5.7.1. MİRZİP VEKTÖRLERİNİN RESTRİKSİYON ENZİMLERİ KESİLMESİ VE LİGASYON

Yöntem kısmında anlatıldığı gibi lentiviral plazmid (KLHL6) restriksiyon enzimleri olan *BamHI* ve *EcoRI* kullanılarak kesilmiştir. Plazmid kesimi için her iki enzimi de içermeyen “uncut” kontrol, sadece *BamHI* içeren kontrol, sadece *EcoRI* içeren kontrol, ve her iki enzimi içeren asıl kesim hazırlanmıştır. Bu kontrollerin hazırlanmasının amacı kesim işleminin doğruluğunun araştırılmasıdır. Buna göre kesim yapılmayan vektör, yapılan dilusyonlardakine göre jelde daha yukarıda görülmeli, ardından tek kesim yapılan vektörler tarafından takip edilmelidir. Kesimler fazla miktarda vektör elde etmek için iki dilusyon hazırlanarak yapılmıştır. Kesim ardından ürünlerin 1 µl kadarı %0.8'lik agaroz jelde yürütülmüş ve kesimin başarıyla tamamlandığı görülmüştür. Ardından her iki enzimin de kullanıldığı dilusyon tamamen jele yüklenmiş ve jelden izolasyon yapılmıştır. Jel görüntüleri Şekil 5.19'da verilmiştir.



Şekil 5.19 Ligasyon için kullanılacak olan boş miRZip vektörünün hazırlanması. İlgili örnekler %0.8 agaroz jelde, 90 V’de 30 dakika, 1 kb marker kullanılarak yürütülmüşlerdir. İlgili vektör enzimlerle kesilerek içerdiği “insert” kısımdan ayrılmış ve boş olan 7861 bp büyüklükteki vektör (kırmızı ok ile gösterilen) jelden izole edilmiştir.

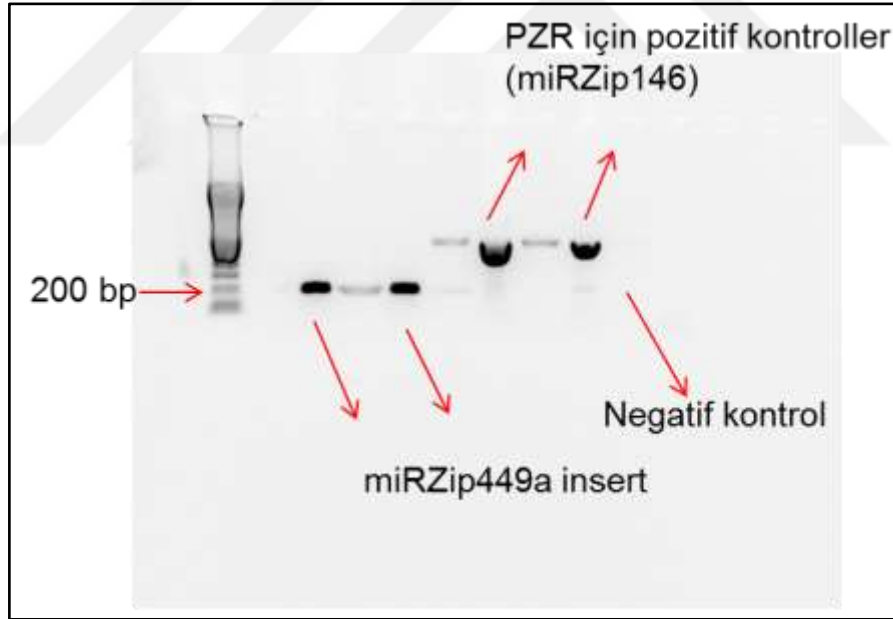
Jelden izolasyon yapılan vektörlerin konsantrasyonu nanodrop kullanılarak ölçülmüştür. Ligasyon için vektör konsantrasyonunun en az 100 ng/μL olması gerekmektedir. Nanodrop sonuçları Çizelge 5.13’de verilmiştir.

Çizelge 5.13 miRZip vektörünün jelden izolasyon ardından nanodrop ölçüm sonuçları

Boş vektör	Konsantrasyon (ng/μL)	260/280	260/230
miRZip1	178.65	1.90	1.91
miRZip2	122.29	1.86	1.54

5.7.2. LİGASYON ARDINDAN KOMPETANT HÜCRELERDE TRANSFORMASYONUN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ VE KOLONİ PZR

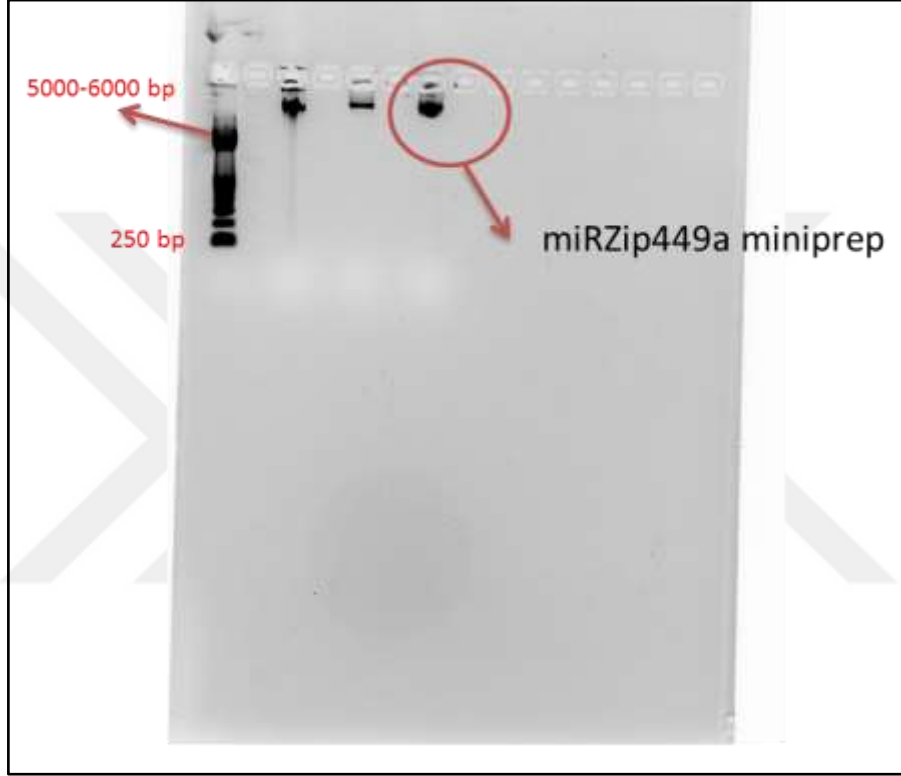
Ligasyon için enzimlerle kesilerek hazırlanan boş miRZip vektörü ve daha önce shRNA şeklinde sentezlenip, uygun sıcaklıkta bekletilerek hazır hale getirilen “insert” kullanılmıştır. Bu işlem için iki kontrol hazırlanmıştır. İlk kontrol; ligaz -, insert-, vektör+; diğer kontrol; ligaz+, insert-, vektör+ şeklindedir. Transformasyon işlemi bu vektörler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre ampisilin içeren besi ortamında sadece ya da kontrollere göre daha fazla sayıda üç komponenti de içeren insert ile ligasyonu sağlanmış vektörlerin üremesi gözlenmiştir. miRZip449a vektörünün transforme edildikten sonra ekildiği besi yerinde 6 koloni gözlenirken, kontrollerde beklendiği gibi hiç koloni gözlenmemiştir. Ardından en büyük koloniler seçilerek doğru büyüklükte insert içerip içermedikleri PZR ile kontrol edilmiş ve agaroz jelde PZR ürünleri yürütüldükten sonra uygun büyüklükte (160 bp) oldukları görülmüştür. PZR için agaroz jel görüntüleri Şekil 5.20’de verilmiştir.



Şekil 5.20 miRZip449a için transformasyon ardından koloni PZR gerçekleştirilmesi ve %1’lik agaroz jelde 90 V 30 dakika yürütüldükten sonra elde edilen görüntü. 100 bp büyüklükte marker kullanılmıştır ve PZR pozitif kontrol için miRZip146a vektöründen faydalanılmıştır. Negatif kontrol olarak steril su kullanılmıştır.

5.7.3. MİRZİP449A VEKTÖRÜ İÇİN MİNİPREP UYGULAMASI

Besi yerinde transformasyon sonrası üretilen vektörlerin saflaştırılması, uygun miktarda elde edilmesi ve Sanger sekanslama ile insertün kontrolü için miniprep yapılarak miktarları artırılmıştır. Miniprep ardından 1 µl vektör kontrol edilmek için %0.8'lik agaroz jelde yürütülmüştür ve nanodropta ölçüm yapılmıştır. Agaroz jel görüntüsü Şekil 5.21'de verilmiştir. Nanodrop sonuçları ise Çizelge 5.14'de sunulmuştur.



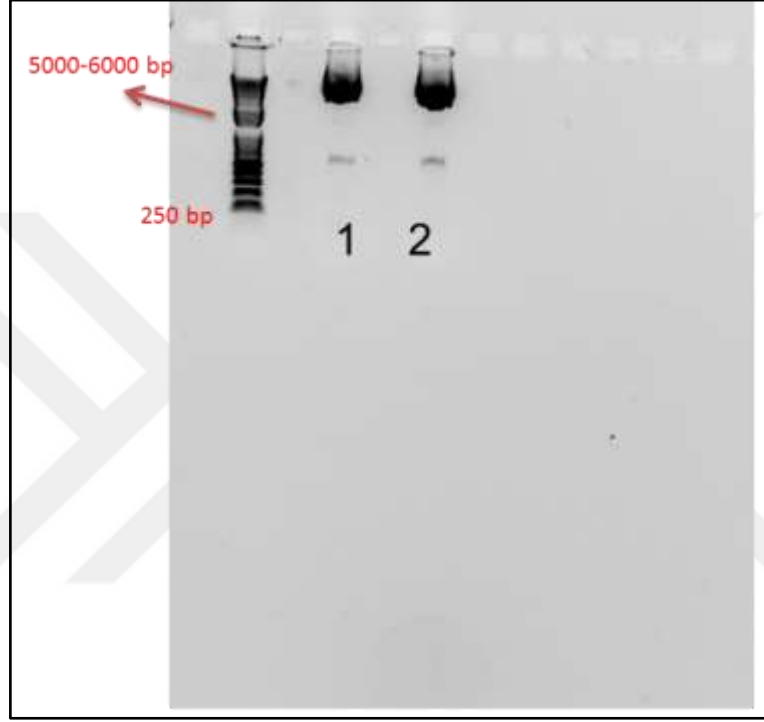
Şekil 5.21 miRZip449a için miniprep ardından agaroz jelde yürütme. Örnekler %0.8'lik agaroz jelde, 90 V'de 30 dakika boyunca yürütülmüştür. 1 kb marker kullanılmıştır. Vektör beklendiği gibi 6000 bp ve üzeri büyüklükte görülmektedir.

Çizelge 5.14 miRZip449a miniprep yapılması ardından nanodrop ölçüm sonuçları

Vektör	Konsantrasyon (ng/µl)	260/280	260/230
miRZip449a miniprep	275.79	1.90	2.10

5.7.4. MİRZİP449A VE MİRZİP345 İÇİN MAXİPREP UYGULAMASI

Sanger sekanslama ile doğru “insert” içerdiğinden emin olduğumuz vektörlerin miktarını artırmak için maxiprep yöntemi kullanılmıştır. Maxiprep ardından miRZip449a ve miRZip345 vektörleri bir kez daha %0.8’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Miktarları nanodrop kullanılarak ölçülmüştür. Jel görüntüleri Şekil 5.22’de ve Şekil 5.23’de verilmiştir. Nanodrop ölçüm sonuçları ise Çizelge 5.15’de gösterilmiştir.



Şekil 5.22 miRZip449a vektörlerine ait maxiprep görüntüsü. 1 ve 2 numaralı örneklerin her ikisi de miRZip449a maxiprep örnekleridir. Vektör ile miRZip449a insert’e ait toplam büyüklük 7900 bp civarındadır. Örnekler %0.8’lik agaroz jelde, 90 V 30 dakika boyunca yürütülmüşlerdir. 1 kb marker kullanılmıştır.



Şekil 5.23 miRZip345 vektörlerine ait maxiprep görüntüsü. Vektör ile miRZip345 insert ait toplam büyüklük 7900 bp civarındadır. Örnekler %0.8'lik agaroz jelde, 90 V 30 dakika boyunca yürütülmüşlerdir. 1 kb marker kullanılmıştır.

Çizelge 5.15 miRZip345 ve miRZip449a maxiprep uygulaması ardından elde edilen konsantrasyonlar

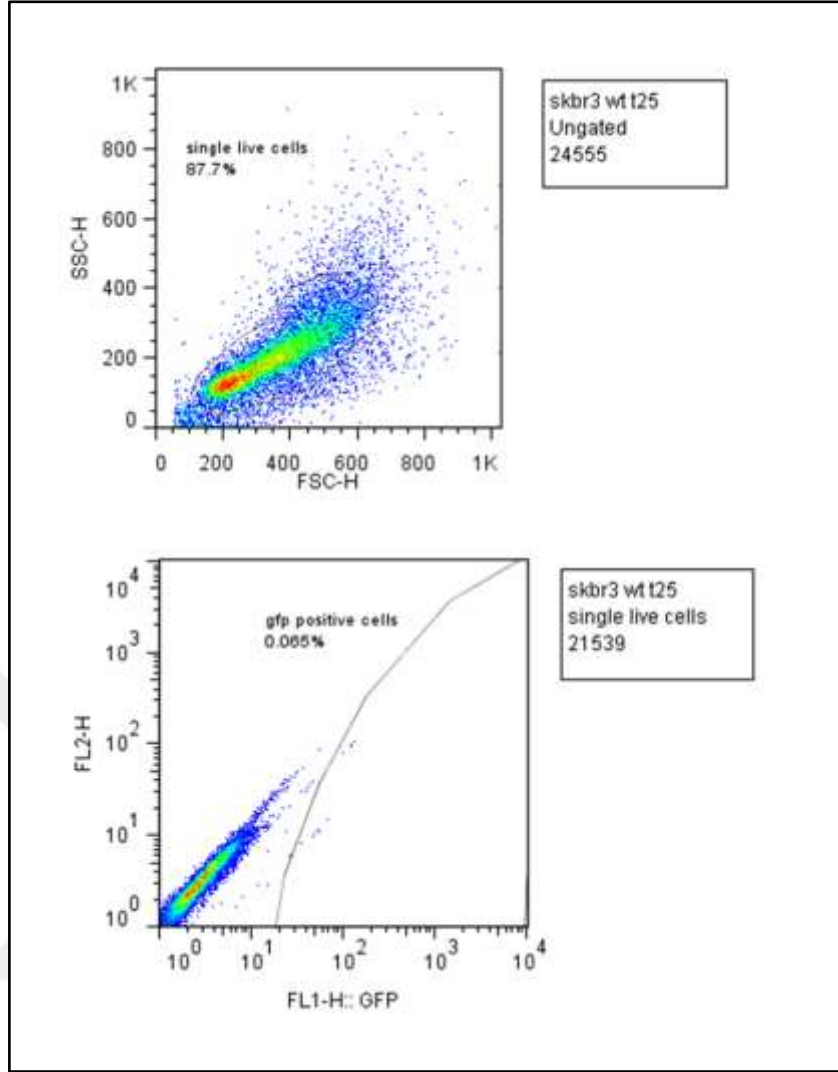
Vektör	Konsantrasyon (ng/ µl)	260/280	260/230
miRZip449a maxiprep	1163.33	1.92	2.43
miRZip449a maxiprep	1592.23	1.90	2.38
miRZip345 maxiprep	1453.27	1.92	2.37

5.7.5. MİRZİP345, MİRZİP449A VE NT1 İLE SKBR3 HÜCRELERİNİN FARKLI HACİMLERDE ENFEKSİYONU

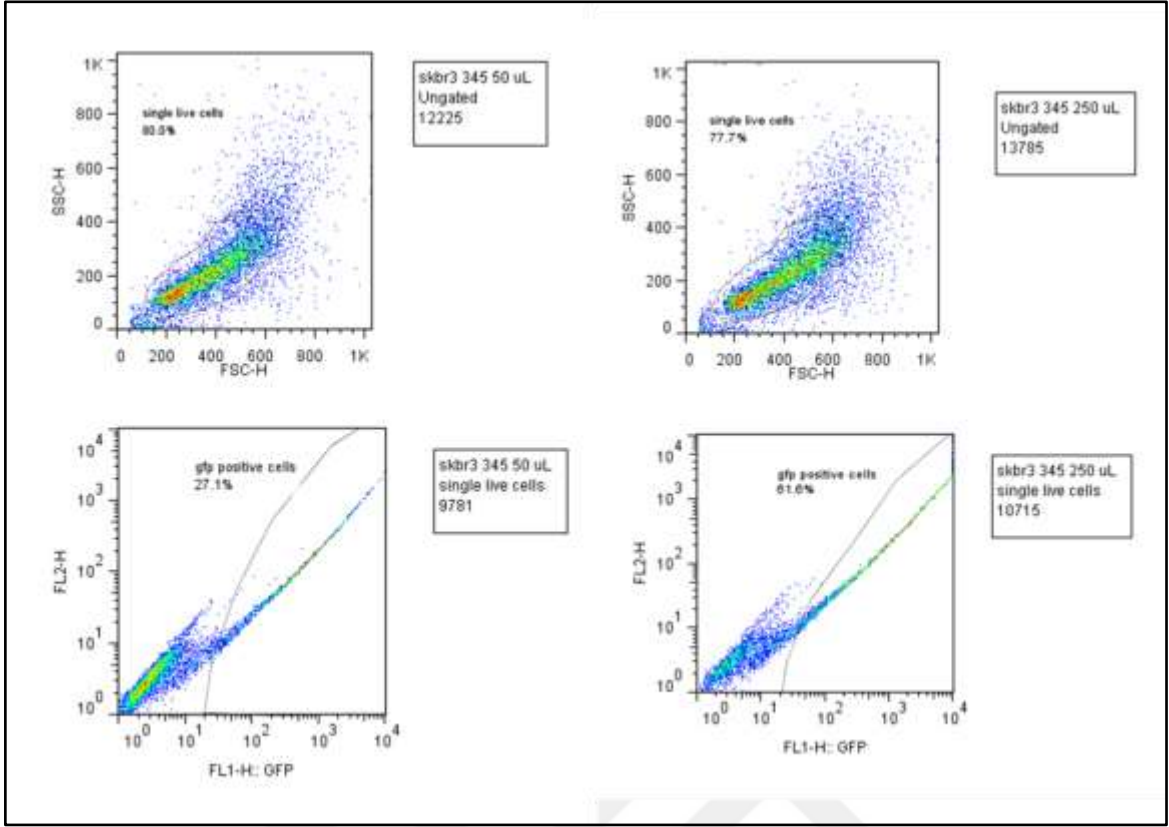
HEK293T hücrelerinde lentiviral vektörlerin bir araya getirilip virüsün paketlenmesi ardından miRZip449a, miRZip345 ve NT1 virüslerini içeren besi yeri toplanmış ve filtre edilmiştir. 6 kuyulu platelere bir gece önceden ekilmiş SKBR3 hücrelerine farklı hacimlerde enfekte edilmişlerdir.

miRZip449a, miRZip345 ve NT1 (negatif kontrol) enfeksiyonu için 50 µl, 250 µl, 750 µl hacimlerde virüs kullanılmıştır. Enfekte hücrelerle aynı sayıda hiçbir enfeksiyon

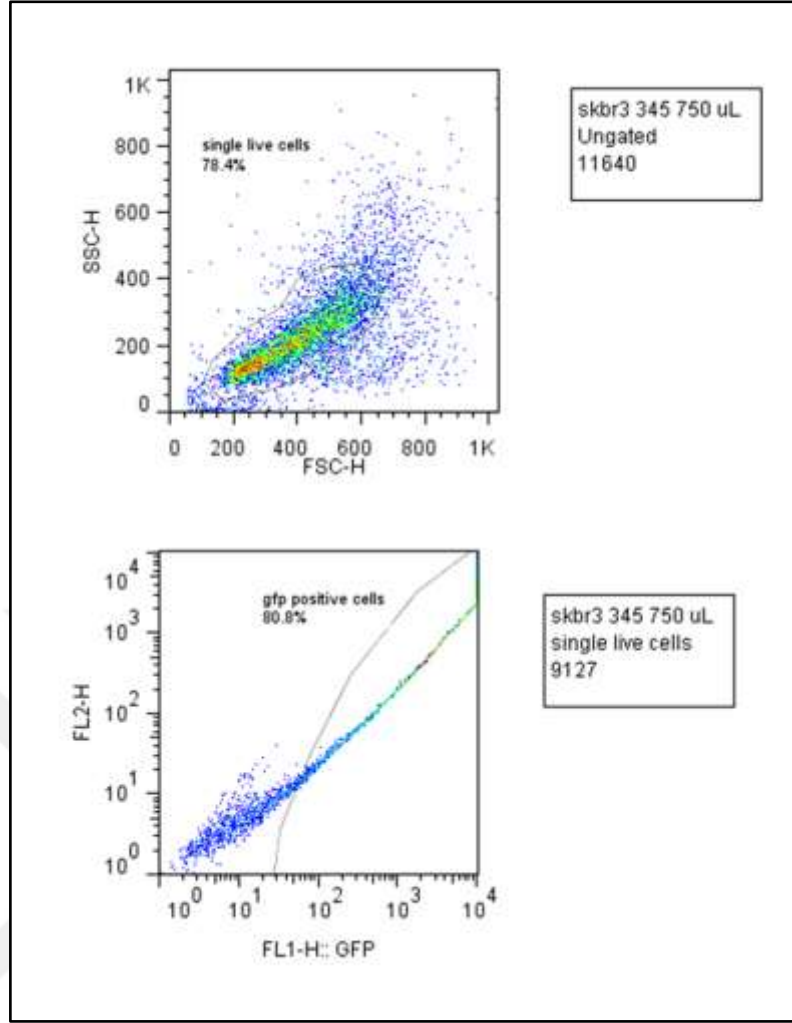
yapılmamış hücre kontrol grubu da analize dahil edilmiştir. Enfeksiyon ardından 4. gün kontrol edilen hücrelerin analiz sonuçları virüs hacmi arttıkça GFP+ hücre oranının arttığını, bununla beraber canlı hücre sayısının olumsuz etkilenmediğini ve 750-800 µl hacimde yapılacak enfeksiyonun maksimum oranda GFP+ hücre elde etmemizi sağladığını göstermiştir. Analiz sırasında ayrıca hücrelerin karakteristik olarak tek tek (singlet) olarak ayrılmadığı ve daha çok çiftler halinde bulunduğu (doublet), bu yüzden gerçek GFP oranlarının daha yüksek olma ihtimalinin olduğu da göz önüne alınmıştır. Hücre kontrol FACS analiz sonuçları Şekil 5.24'de; miRZip345 50 µl ve 250 µl enfeksiyon sonuçları Şekil 5.25'de; miRZip345 750 µl enfeksiyon sonuçları Şekil 5.26'da; miRZip449a 50 ve 250 µl sonuçları Şekil 5.27'de; miRZip449a 750 µl sonuçları Şekil 5.28'de; NT1 50 ve 250 µl sonuçları Şekil 5.29'da; NT1 750 µl sonuçları ise Şekil 5.30'da; NT2 50 ve 250 µl sonuçları Şekil 5.31'de; NT2 750 µl sonuçları Şekil 5.32'de gösterilmiştir. Farklı hacimlerde yapılan analizlerin tüm GFP sonuçları ise Çizelge 5.16'da verilmiştir.



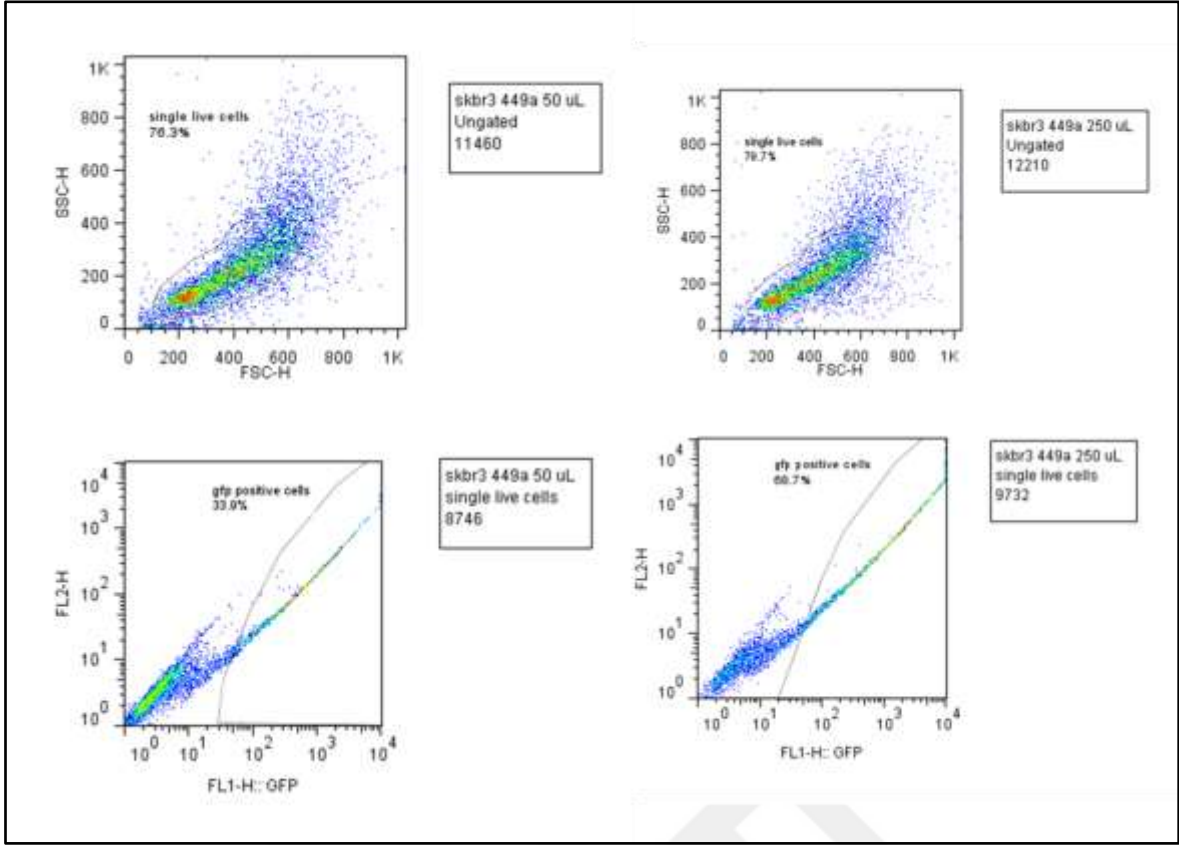
Şekil 5.24 SKBR3 hücre kontrol FACS analiz sonuçları. Canlı hücre oranı %87.7 olarak bulunurken, FL2-H kapısında GFP pozitif hücreler gözlenmemektedir.



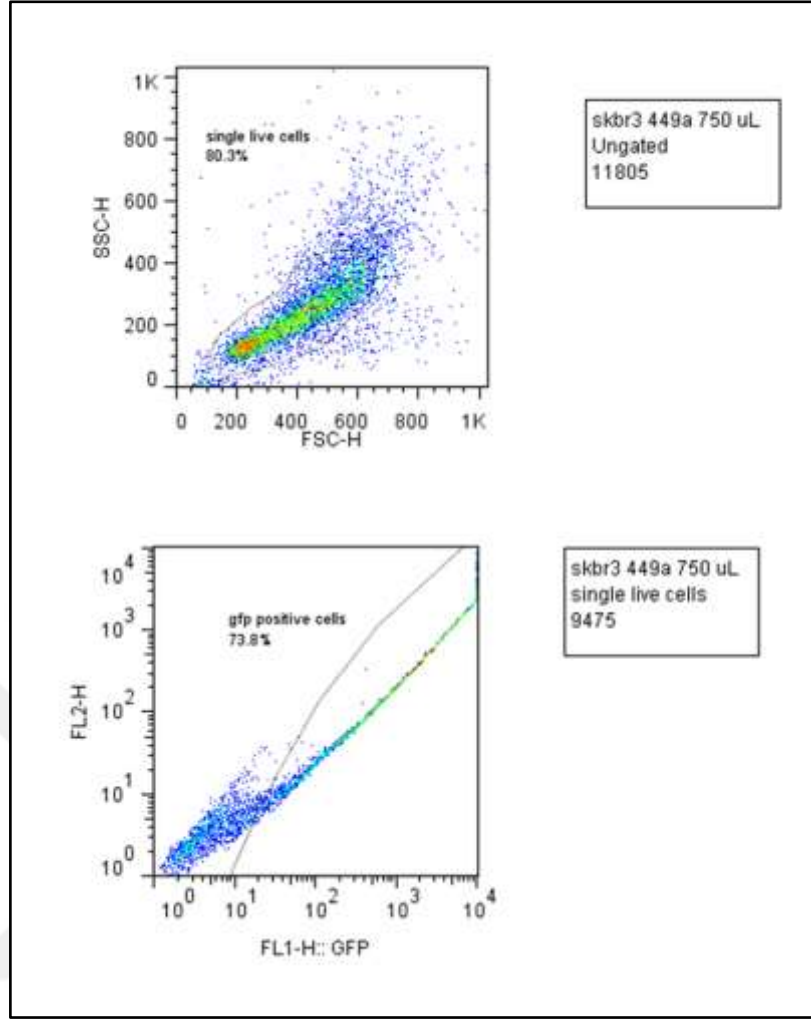
Şekil 5.25 SKBR3 miRZip345 50 µl ve 250 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları. 50 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %80 olarak bulunurken, FL2-H kısmında GFP pozitif hücre oranı %27.1 olarak gözlenmektedir. 250 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %77.7 iken, FL2-H kısmında GFP pozitif hücre oranı %61.6 olarak gözlenmektedir.



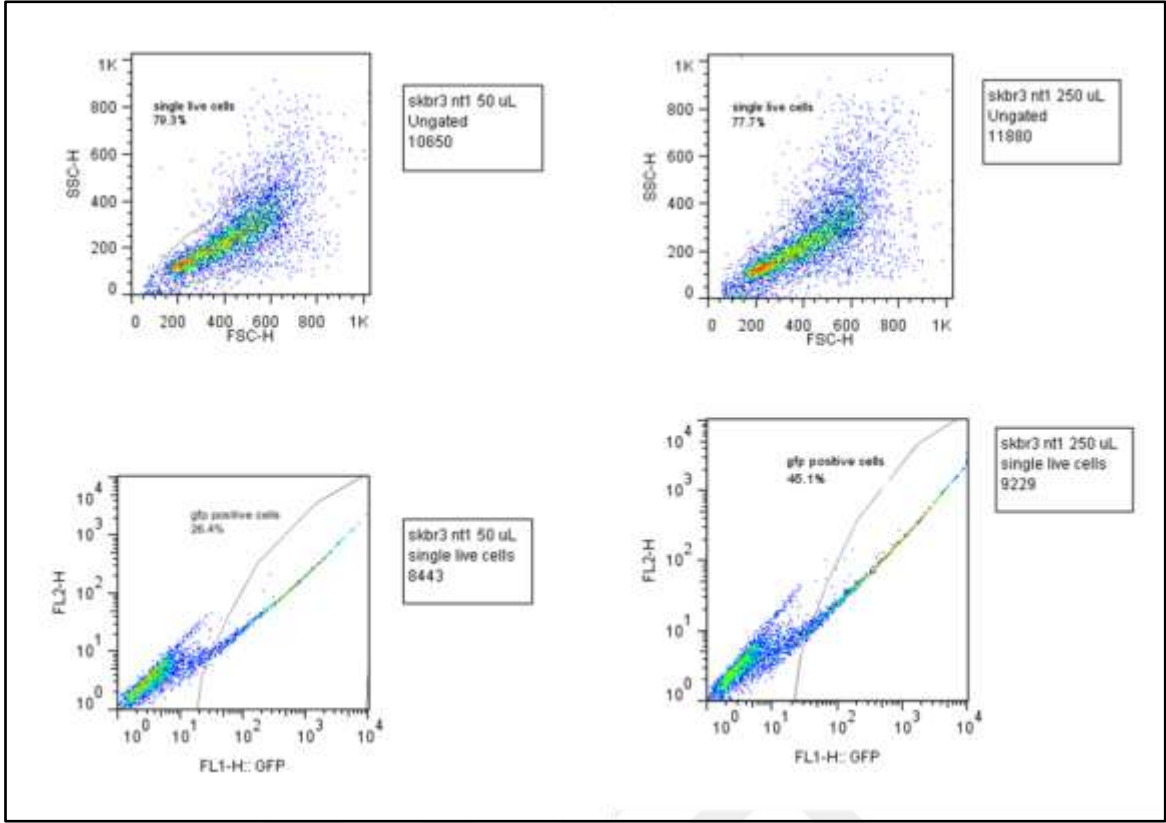
Şekil 5.26 SKBR3 miRZip345 750 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları. 750 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %78.4 olarak bulunurken, FL2-H kapısında GFP pozitif hücre oranı %80.8 olarak gözlenmektedir.



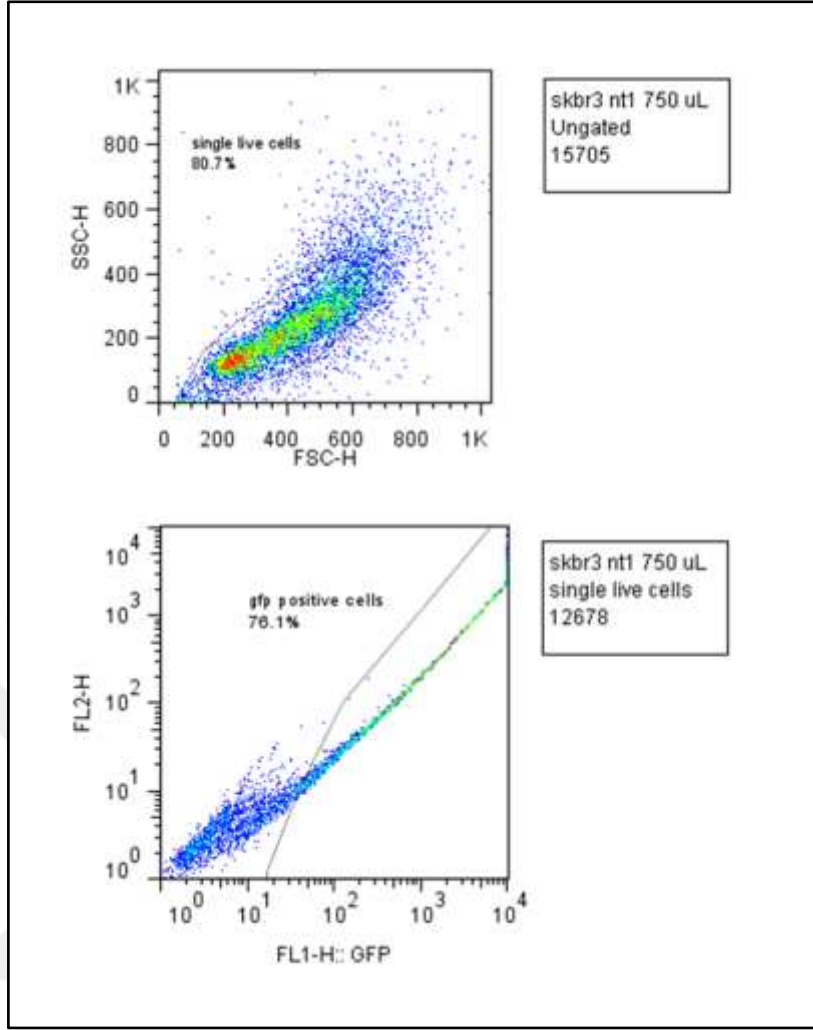
Şekil 5.27 SKBR3 miRZip449a 50 µl ve 250 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları. 50 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %76.3 olarak bulunurken, FL2-H kapısında GFP pozitif hücre oranı %33.9 olarak gözlenmektedir. 250 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %79.7 iken, FL2-H kapısında GFP pozitif hücre oranı %68.7 olarak gözlenmektedir.



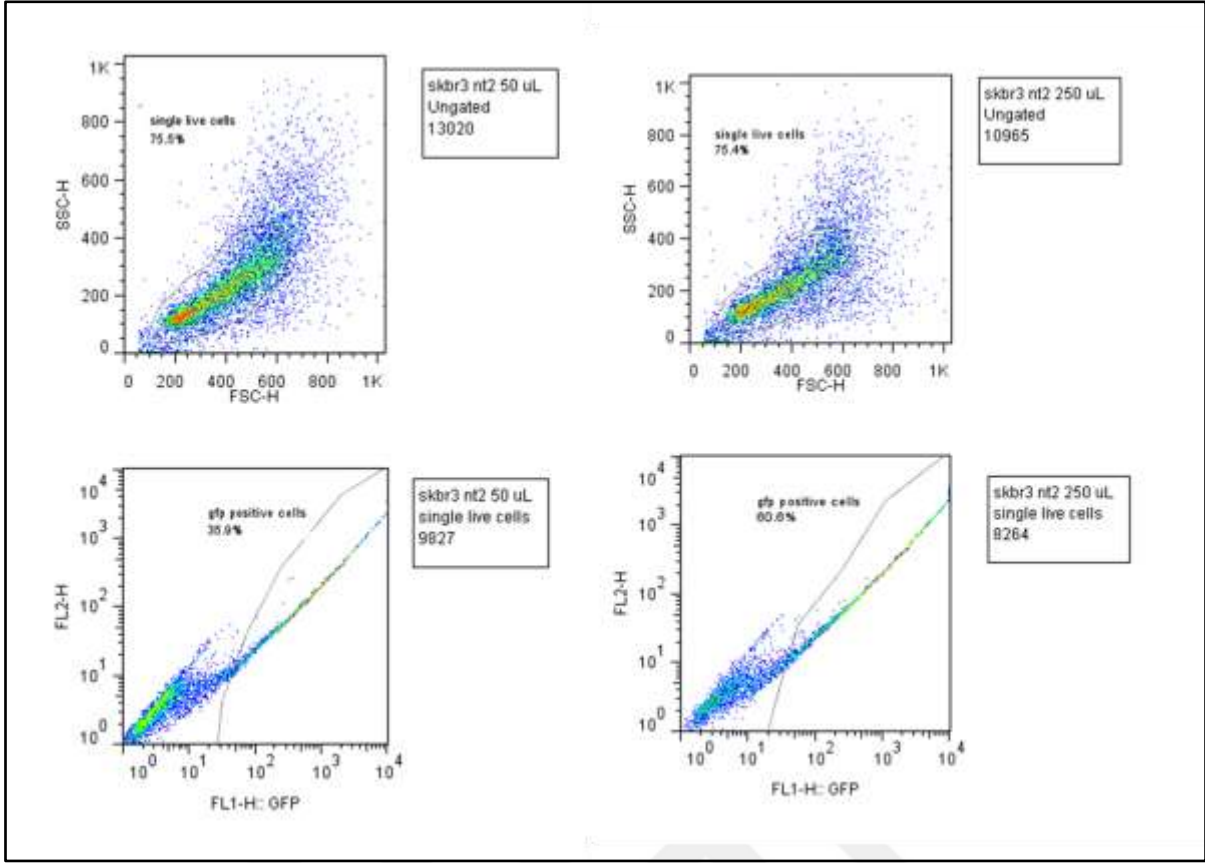
Şekil 5.28 SKBR3 miRZip449a 750 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları. 750 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %80.3 olarak bulunurken, FL2-H kapısında GFP pozitif hücre oranı %73.8 olarak gözlenmektedir.



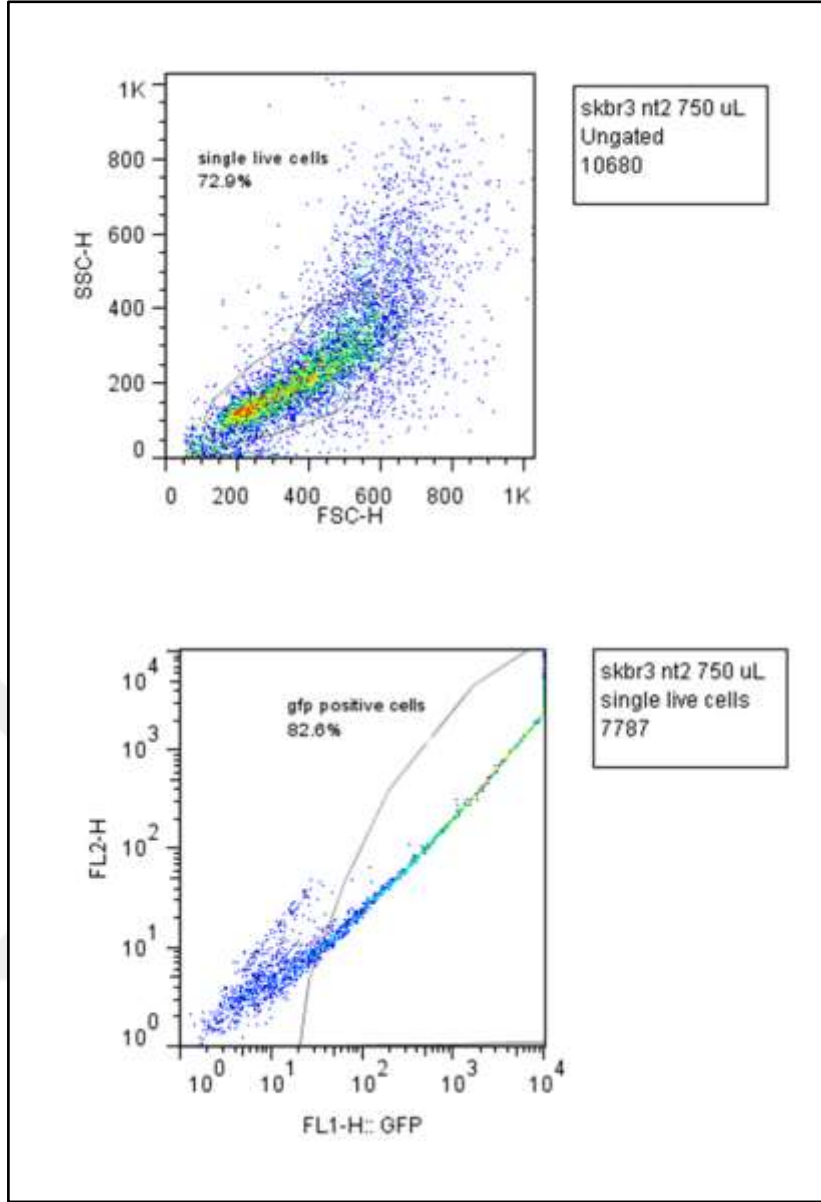
Şekil 5.29 SKBR3 NT1 50 µl ve 250 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları. 50 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %79.3 olarak bulunurken, FL2-H kapısında GFP pozitif hücre oranı %26.4 olarak gözlenmektedir. 250 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %77.7 iken, FL2-H kapısında GFP pozitif hücre oranı %45.1 olarak gözlenmektedir



Şekil 5.30 SKBR3 NT1 750 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları. 750 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %80.7 olarak bulunurken, FL2-H kapısında GFP pozitif hücre oranı %76.1 olarak gözlenmektedir



Şekil 5.31 SKBR3 NT2 50 µl ve 250 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları. 50 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %75.5 olarak bulunurken, FL2-H kapısında GFP pozitif hücre oranı %35.9 olarak gözlenmektedir. 250 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %75.4 iken, FL2-H kapısında GFP pozitif hücre oranı %60.6 olarak gözlenmektedir



Şekil 5.32 SKBR3 NT2 750 µl virüs ile enfeksiyonun 4. günü ardından FACS analiz sonuçları. 750 µl enfeksiyon için canlı hücre oranı %72.9 olarak bulunurken, FL2-H kapısında GFP pozitif hücre oranı %82.6 olarak gözlenmektedir

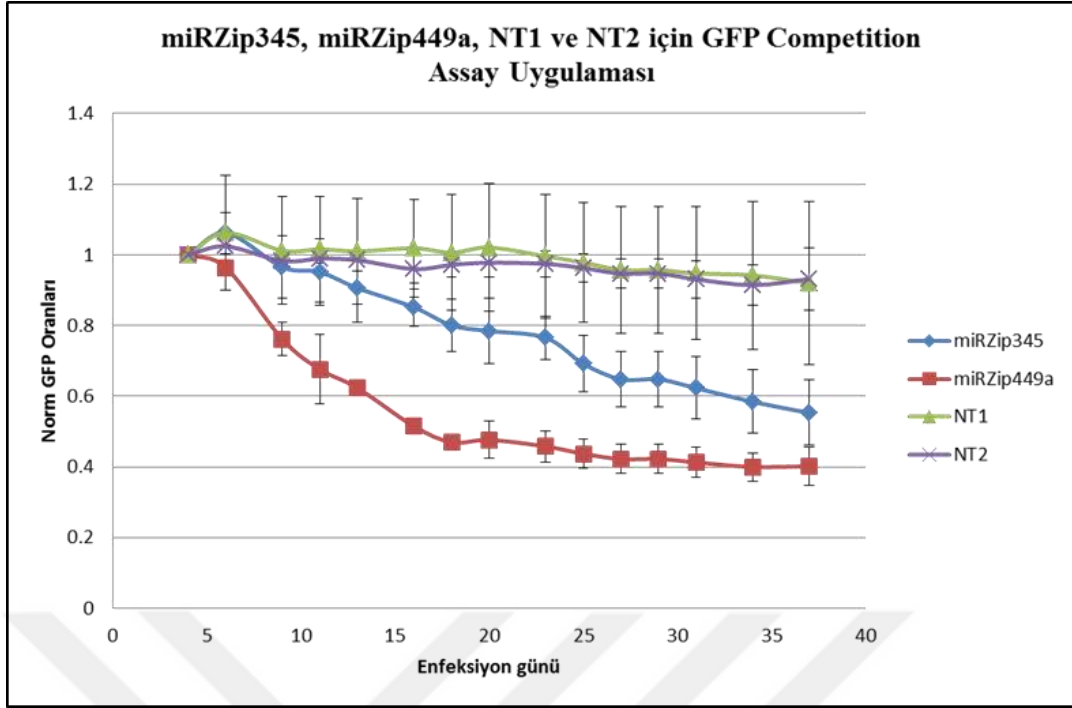
Çizelge 5.16 Farklı hacimlerde yapılan viral enfeksiyon sonuçları

Vektör	Virüs Hacmi	% Canlı Hücre	% GFP	Vektör	Virüs Hacmi	% Canlı Hücre	% GFP
NT1	50 µl	79.3	26.4	NT2	50 µl	75.5	35.9
NT1	250 µl	77.7	45.1	NT2	250 µl	75.4	60.6

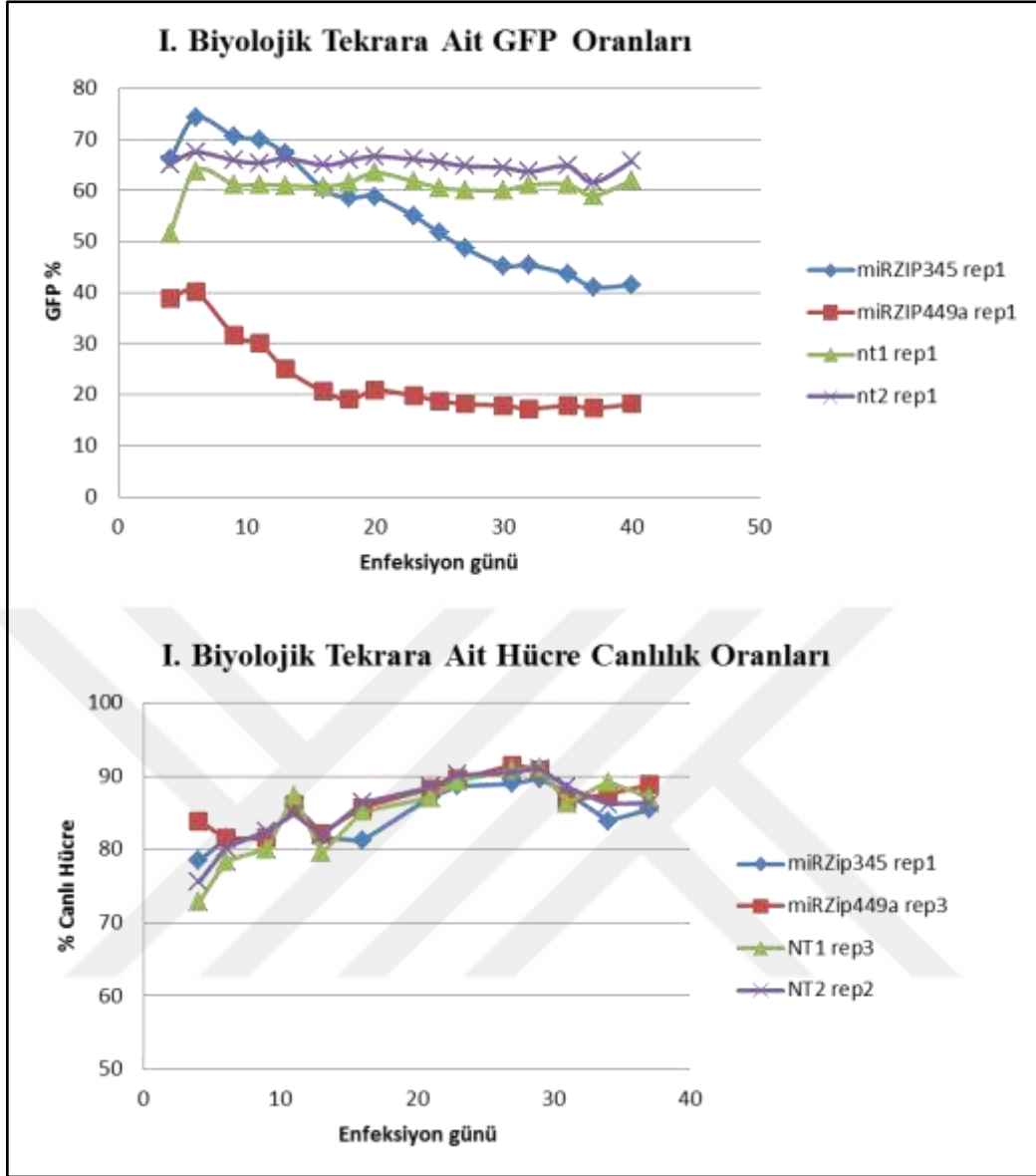
NT1	750 µl	80.7	76.1	NT2	750 µl	72.9	82.6
miRZip449a	50 µl	76.3	33.9	miRZip345	50 µl	80	27.1
miRZip449a	250 µl	79.7	68.7	miRZip345	250 µl	77.7	61.6
miRZip449a	750 µl	80.3	73.8	miRZip345	750 µl	78.4	80.8

5.8. SKBR3 HÜCRELERİNDE MİRZİP345, MİRZİP449A VE NT2 İÇİN GFP COMPETITION ASSAY UYGULAMASI

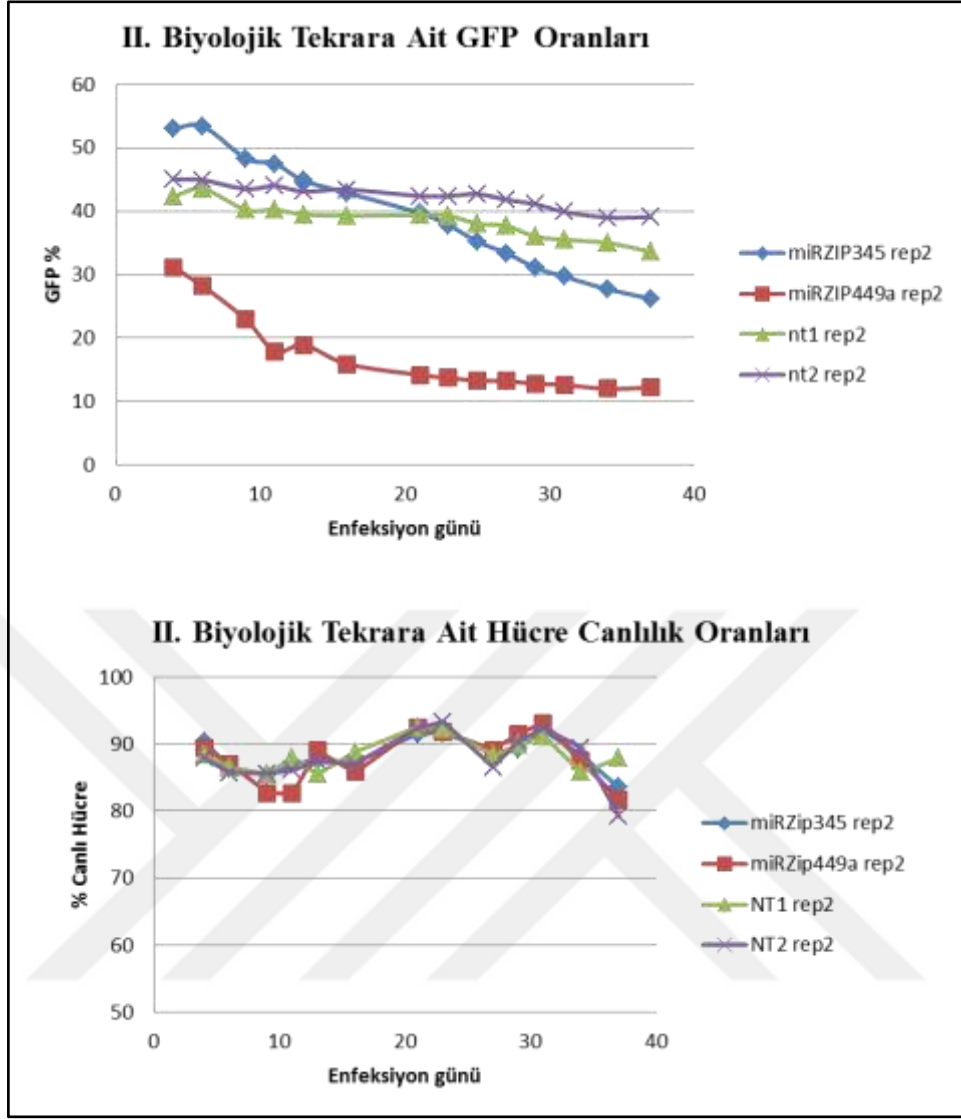
Optimizasyondan sonra, GFP competition assay için SKBR3 hücreleri yaklaşık olarak 40-100 µl hacimde enfekte edilmiştir. GFP competition assay uygulaması için başlangıç GFP oranının %20-60 arasında olması beklenmektedir. Böylece GFP+ hücre oranının toplam hücre popülasyonunda azalması ya da çoğalması etkin bir şekilde takip edilebilmektedir. GFP competition assay her bir miRZip vektörü ve kontrol için farklı zamanlarda gerçekleştirilen 3 ayrı biyolojik tekrar ile yapılmıştır. İlk biyolojik tekrar için miRZip449a, miRZip345, NT1 ve NT2 virüslerinden 50 µl kullanılmıştır. İkinci tekrar için 40 µl; üçüncü tekrar için 80 µl virüs kullanılmıştır. Ölçümler 2 veya 3 günde olacak şekilde 37 gün boyunca sürdürülmüştür. GFP+ hücrelerin yanısıra canlı hücre oranları da kontrol edilmiştir. Ardından, ilerleyen günlerdeki virüs etkisinin daha iyi ortaya çıkarılması için 4. enfeksiyon gününden sonraki tüm GFP+ hücre oranları 4. enfeksiyon günündeki değere bölünerek normalize edilmiştir. Sonuç olarak hsa-miR-345 veya hsa-miR-449a'nın susturulduğu GFP+ hücrelerin zamanla azalırken, normal hücre popülasyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu durum ilgili miRNA'ların ifadesinin azalmasının hücre ölümüne katkı sağladığına işaret etmektedir. Normalize GFP competition assay sonuçları Şekil 5.33'de, birinci biyolojik tekrara ait GFP ve hücre canlılık oranları Şekil 5.34'de; ikinci biyolojik tekrara ait GFP ve hücre canlılık oranları Şekil 5.35'de; üçüncü biyolojik tekrara ait GFP ve hücre canlılık oranları Şekil 5.36'da gösterilmiştir. Normalize GFP değerleri; biyolojik tekrarlara ait GFP oranları ile canlı hücre oranları ise Ek-5'de verilmiştir.



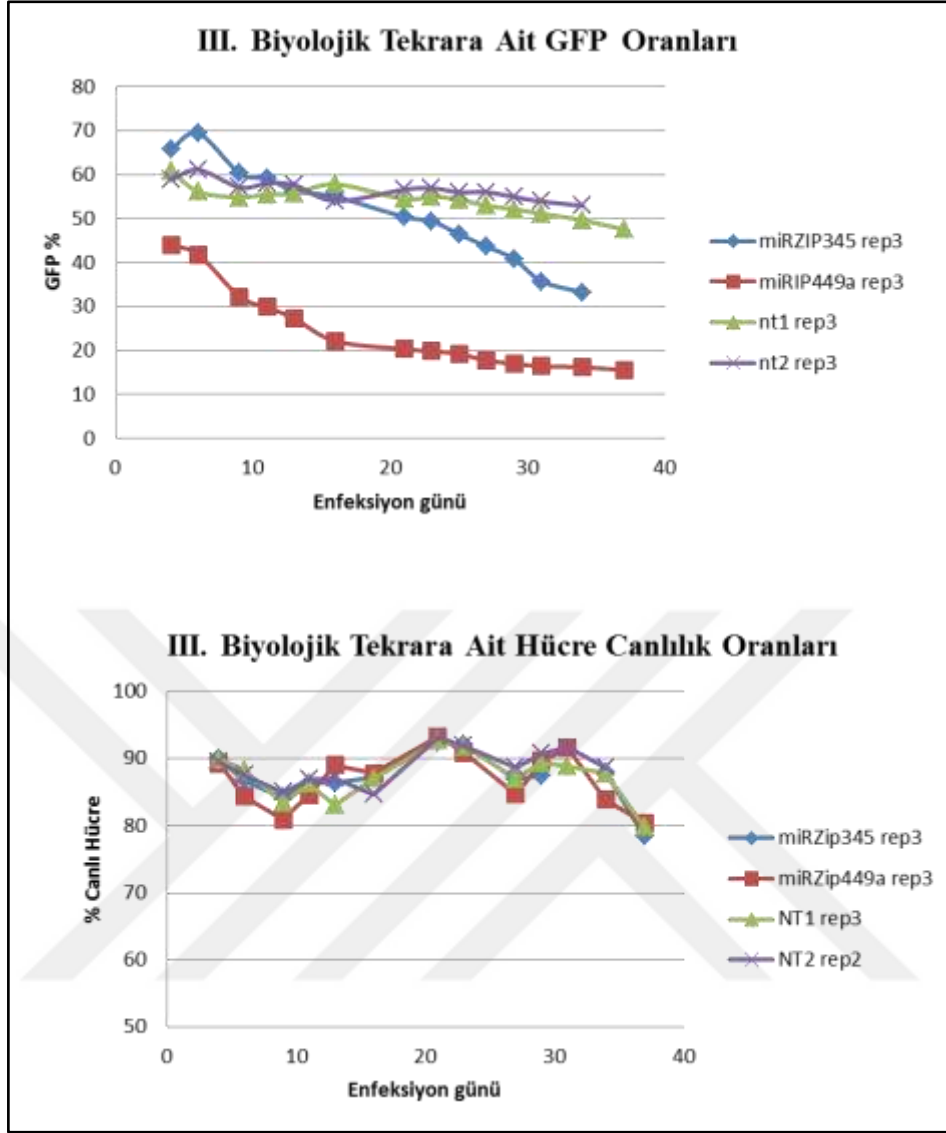
Şekil 5.33 SKBR3 hücrelerinde GFP competition assay uygulaması ve normalize GFP değerleri.



Şekil 5.34 SKBR3 hücrelerinde GFP competition assay uygulamasında kullanılan birinci biyolojik tekrara ait GFP ve hücre canlılık oranları



Şekil 5.35 SKBR3 hücrelerinde GFP competition assay uygulamasında kullanılan ikinci biyolojik tekrara ait GFP ve hücre canlılık oranları



Şekil 5.36 SKBR3 hücrelerinde GFP competition assay uygulamasında kullanılan üçüncü biyolojik tekrara ait GFP ve hücre canlılık oranları

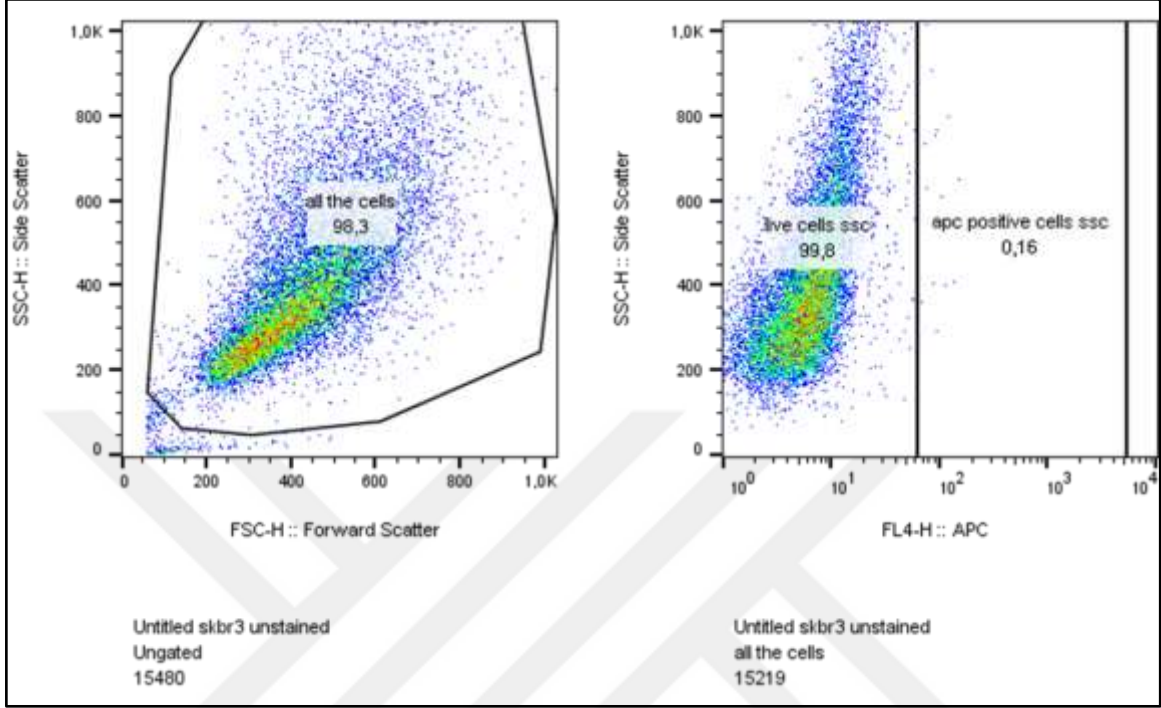
5.9. SKBR3 HÜCRELERİNDE MİRZİP345, MİRZİP449A VE NT1 ENFEKSİYONU ARDINDAN APOPTOZİS TESTİ

Apoptozisin tetiklenmesi aktivasyon mekanizmalarının harekete geçmesiyle başlar ve geri döndürülemez şekilde hücre ölümüne yol açar. Aktivasyon mekanizmaları intrinsik yollar ve ekstrinsik yollar olmak üzere iki şekildedir. İntrinsik yolak, hücre stres altındayken intraselüler sinyaller tarafından aktive edilen ve strese bağlı olarak mitokondri iç membran yüzeyinden salgılanan proteinlerin etkinliğinden oluşur. Ekstrinsik yolak ise ekstraselüler ligandlar tarafından aktive edilir. Bu ligandlar hücre yüzeyindeki reseptörlere

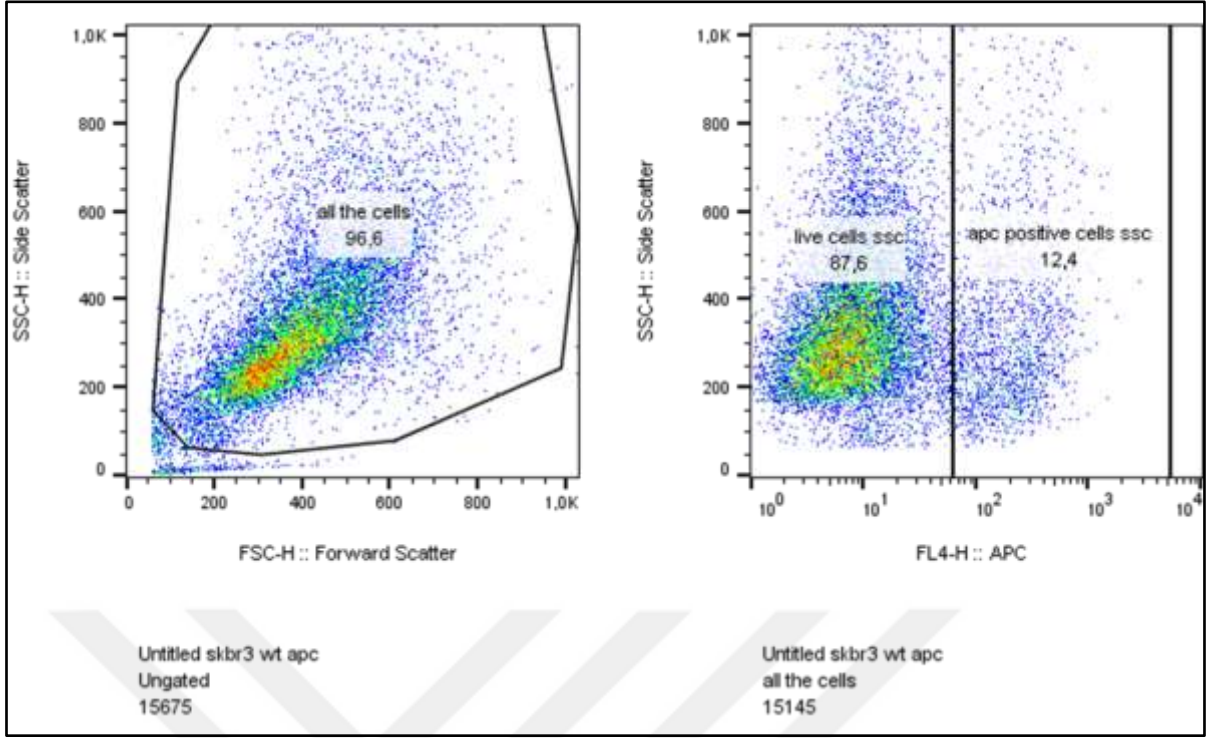
bağlanırlar ve hücre ölümüne yol açan yolları uyarırlar. Ekstrinsik yolak TNF (tümör nekrozis faktör) ve Fas-Fas ligand aracılı modellerle ilişkili iken; intrinsik yolak mitokondri membran geçirgenliğini etkileyen, niktrik oksit gibi efektörlere bağımlıdır. Her iki yolak da, “infaz” yolağı denilen ve *kaspaz 3* aktivasyonun görüldüğü bir yolda kesişirler (88).

Annexin ailesi ise fosfolipidlere bağlanan kalsiyum bağımlı proteinlerden oluşur ve fosfatidilserin (PS) yapısına bağlanarak apoptotik hücrelerin tespitini sağlarlar. Sağlıklı hücrelerde PS, hücre membranının sitoplazmaya bakan tarafında yer alır. Apoptozisin uyarılmasıyla beraber ekstraselüler membrana taşınır ve Annexin V gibi floresans özellikte boyalarla boyanıp FACS cihazında tespit edilebilir. Apoptozisin erken döneminde plazma membranı propidium iodide (PI) ve 7-AAD gibi boyaları dışarıda tutar, bu yüzden sadece Annexin V ile boyanan hücreler (PI/7-AAD negatif) apoptozisin erken evresinde kabul edilir. hsa-miR-345 ve hsa-miR449a'nın SKBR3 hücrelerinde susturulması ardından gözlenen hücre ölümünün apoptozise bağlı olup olmadığını araştırmak için miRZip345, miRZip449a ve NT1 ile enfekte hücrelerde Annexin V ile boyama gerçekleştirilmiştir. Boyama ardından apoptotik hücrelerin varlığı FACS cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Boyama işlemi, GFP+ hücrelerin toplam hücre popülasyonunda giderek azalmaya başladığı 8. ya da 9. enfeksiyon günü gerçekleştirilmiştir. Test yapılırken GFP+ hücre oranının en az %90 ve üzeri olmasına dikkat edilmiş, apoptotik hücreler ayrıştırılırken GFP düzeyleri de kontrol edilmiştir. Uygulama hücre kontrol, NT1 (negatif kontrol), miRZip449a, miRZip345 ile enfekte hücreler için yapılmış, hücre kontrol için annexin V ile boyanan ve boyanmayan iki kontrol hazırlanmıştır. Buradaki amaç normal koşullarda hasar görmüş ya da annexin V (APC) kapısına geçen hücrelerin var olup olmadığını tespit etmektir. Kullandığımız hücreler GFP+ olduğu ve FACS cihazında GFP kanalı (FL2-H) ile PI kanalı aynı aralıkta bulunduğu ve GFP floresans etkinliği yanlış pozitif (PI pozitif) etki verebildiği için PI boyama sonuçları dikkate alınmamıştır. Bu yüzden apoptozise yol açtığı gözlenen miRZip345 ve miRZip449a ait etkinin geç veya erken apoptozis olup olmadığı bilinmemektedir. Apoptozis testi farklı zamanlarda yapılan 3 biyolojik tekrar kullanılarak tamamlanmıştır. Daha sonra NT1 (negatif kontrol) ile miRZip449a ve miRZip345 enfeksiyonu sonrası elde edilen apoptotik hücre oranları karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı şekilde apoptotik hücre oranının arttığı gözlenmiştir. Apoptozis testine ait FACS

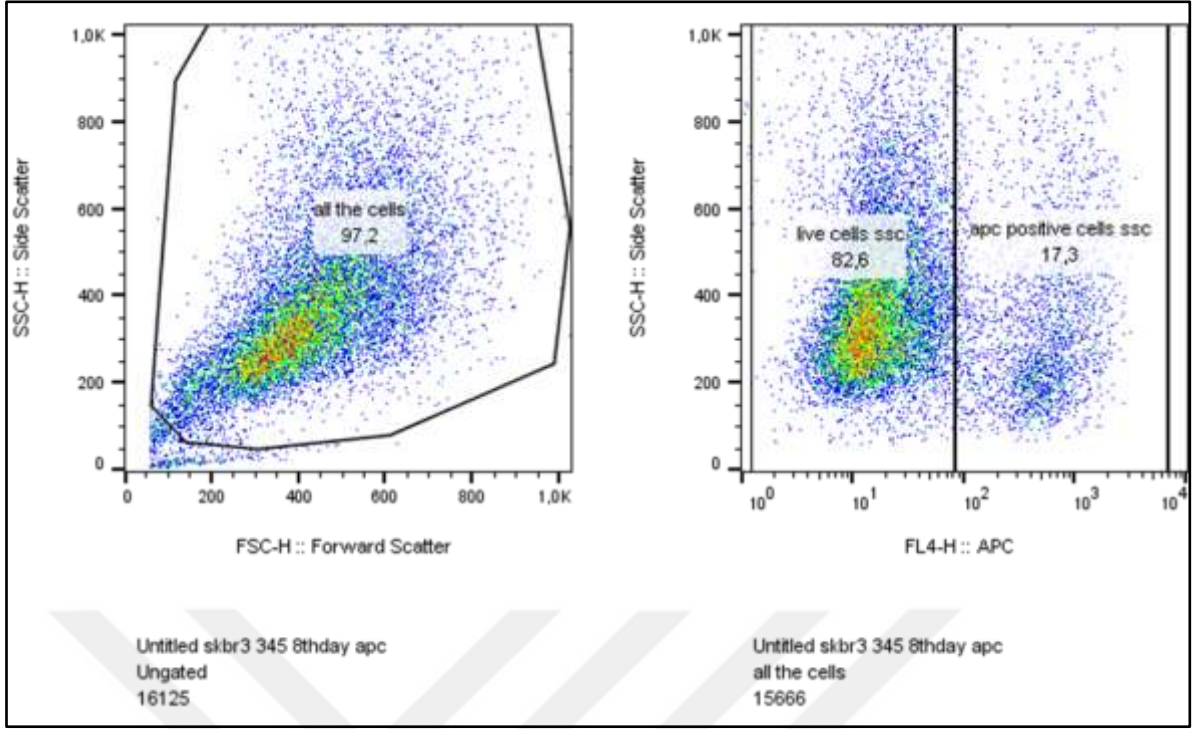
analiz sonuçları Şekil 5.37’de; Şekil 5.38’de; Şekil 5.39’da, Şekil 5.40’da ve Şekil 5.41’de verilmiştir. Apoptozis testinin gerçekleştirildiği hücrelerin GFP oranları Çizelge 5.17’de gösterilmiştir. Testin karşılaştırma sonuçları ise Şekil 5.42’de verilmiştir.



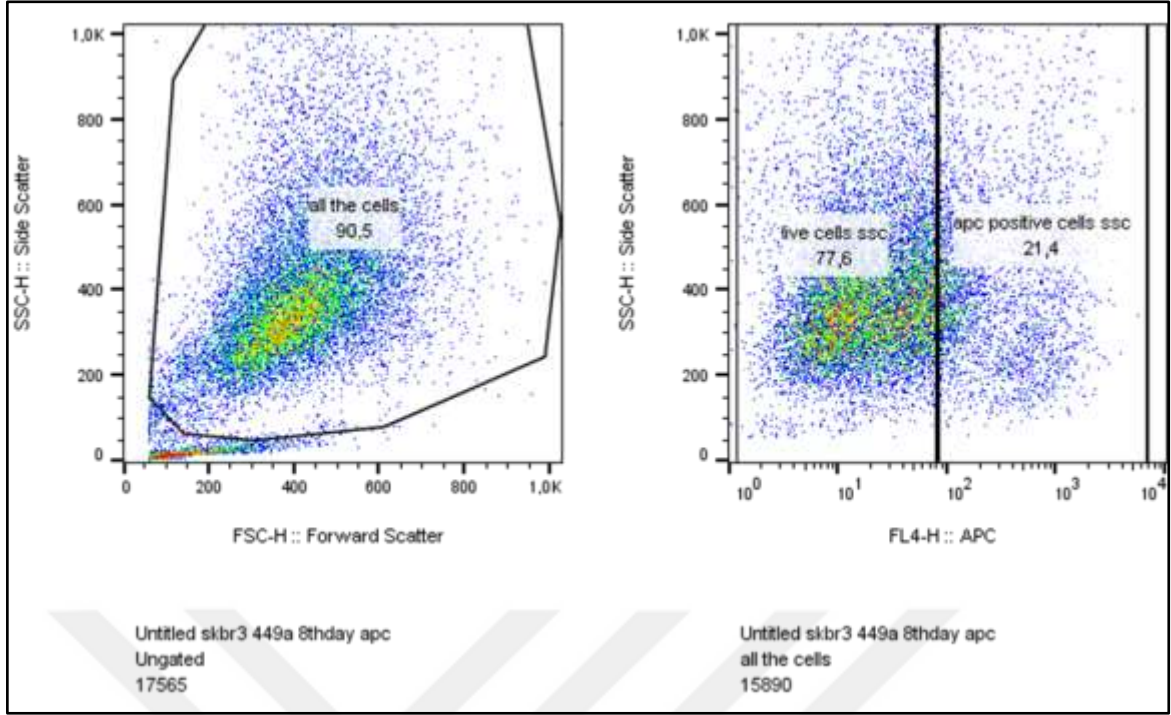
Şekil 5.37 SKBR3 hücrelerinde apoptozis testi sırasında kullanılan annexin V boyanmayan hücre kontrol. Analize canlı ve cansız tüm hücre popülasyonu (%98.3) dâhil edilmiştir



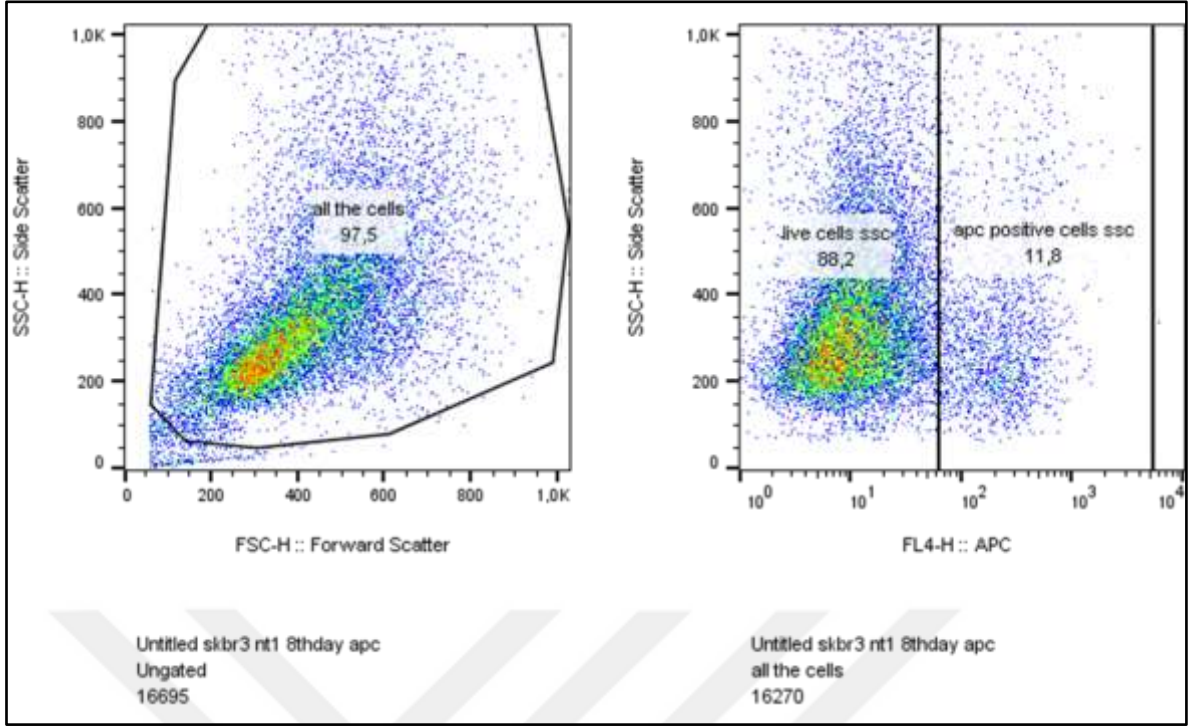
Şekil 5.38 SKBR3 hücrelerinde apoptozis testi sırasında kullanılan ve annexin V ile boyanan hücre kontrol. Analize dahil edilen tüm hücre popülasyonunun oranı %96.6'dır. APC kapısında %12.4 oranında hücrenin annexin ile boyandığı gözlenmektedir. Bu hücreler tripsin ile muamele sırasında zarar gören hücreler olarak göz önüne alınmıştır



Şekil 5.39 SKBR3 hücrelerinde miRZip345 ile 8. enfeksiyon günü yapılan apoptozis testi. Analize dahil edilen tüm hücre popülasyonunun oranı %97.2'dir. APC kapısında %17.3 oranında hücrenin annexin ile boyandığı ve apoptotik olduğu gözlenmektedir



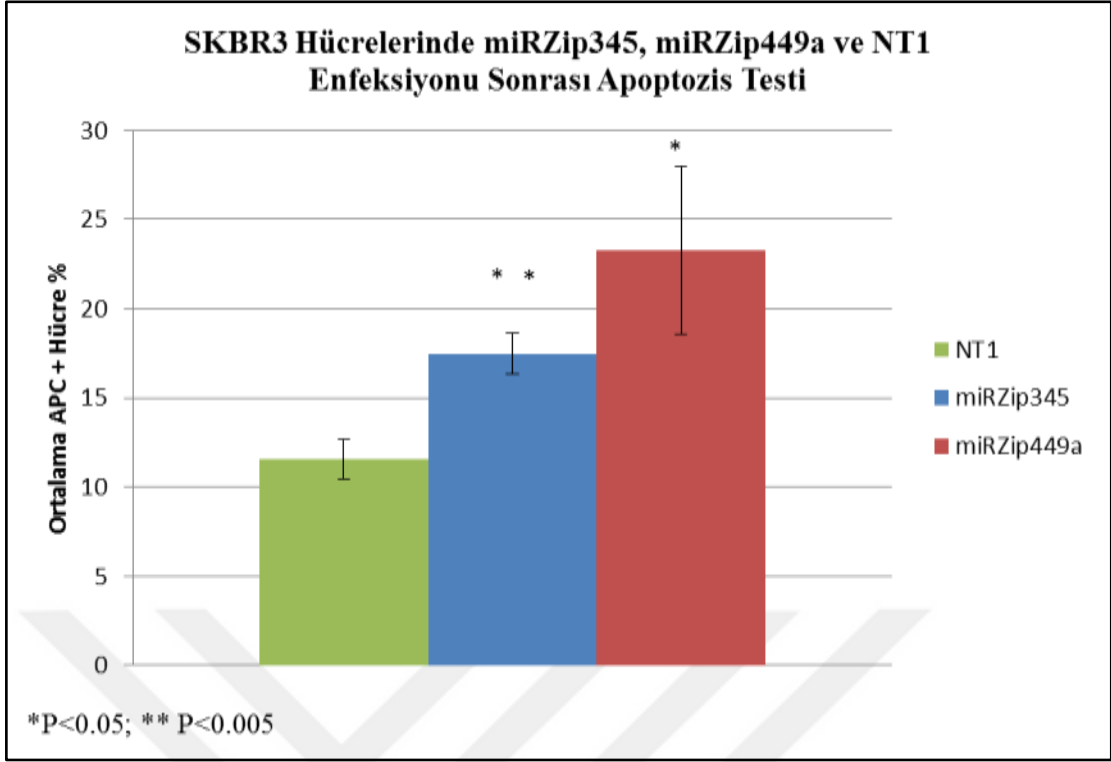
Şekil 5.40 SKBR3 hücrelerinde miRZip449a ile 8. enfeksiyon günü yapılan apoptozis testi. Analize dahil edilen tüm hücre popülasyonunun oranı %90.5'dir. APC kapısında %21.4 oranında hücrenin annexin ile boyandığı ve apoptotik olduğu gözlenmektedir



Şekil 5.41 SKBR3 hücrelerinde NT1 ile 8. enfeksiyon günü yapılan apoptozis testi. Analize dahil edilen tüm hücre popülasyonunun oranı %97.5'dir. APC kapısında %11.8 oranında hücrenin annexin ile boyandığı ve apoptotik olduğu gözlenmektedir

Çizelge 5.17 SKBR3 hücrelerinde miRZip345, miRZip449a ve NT1 9. gün enfeksiyonu sırasında gözlenen canlı hücre ve GFP pozitif hücre oranları

Örnek	Canlı Hücre (%)	GFP+ hücre (%)
miRZip449a	81.8	99.4
miRZip345	90.6	99.5
NT1	90.5	99.4
Hücre Kontrol	93.5	0

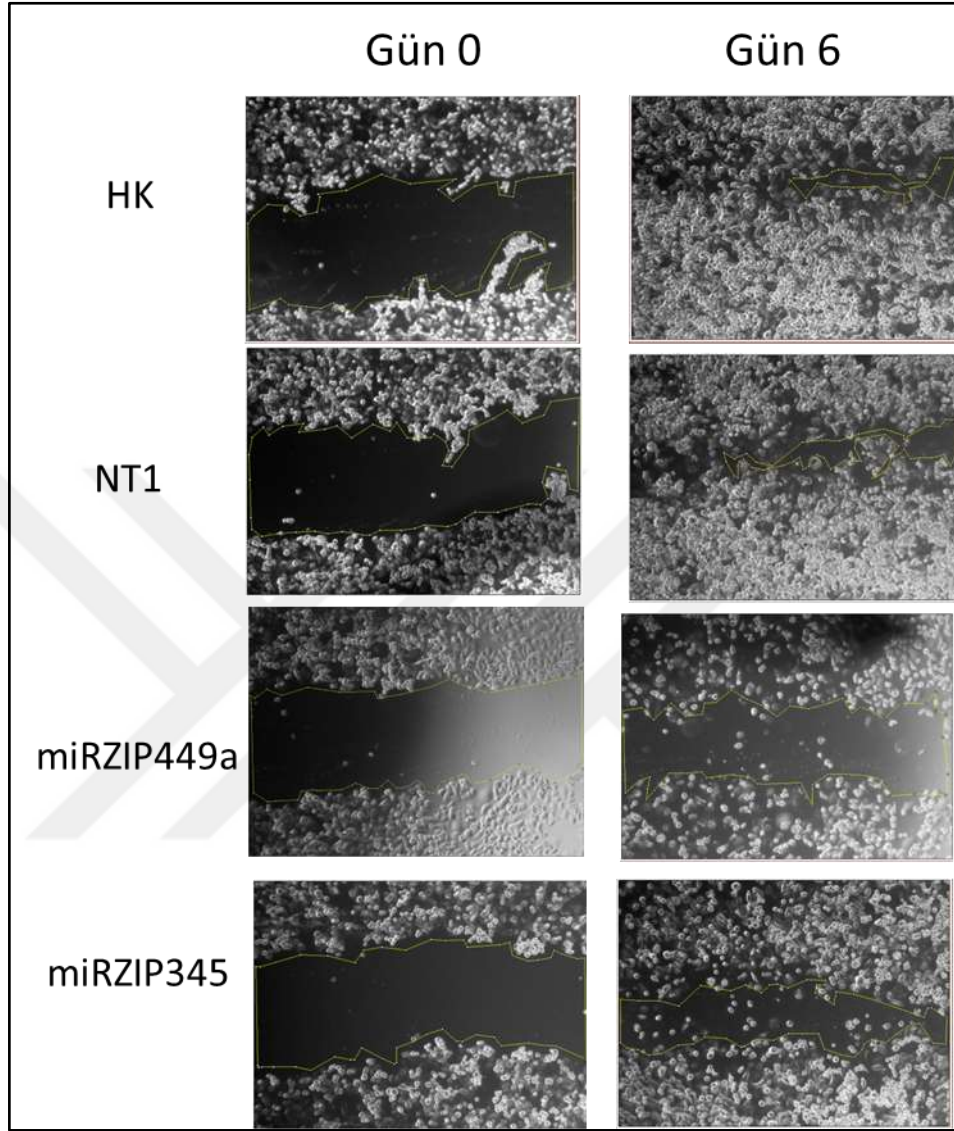


Şekil 5.42 SKBR3 hücrelerinde miRZip345, miRZip449a ve NT1 enfeksiyonu ardından yapılan apoptozis testi sonuçları. miRZip345 ve miRZip449a enfeksiyonu ardından istatistiksel olarak anlamlı şekilde (*P<0.05; **P<0.005) apoptotik (APC pozitif) hücrelerinde artışı gözlenmiştir

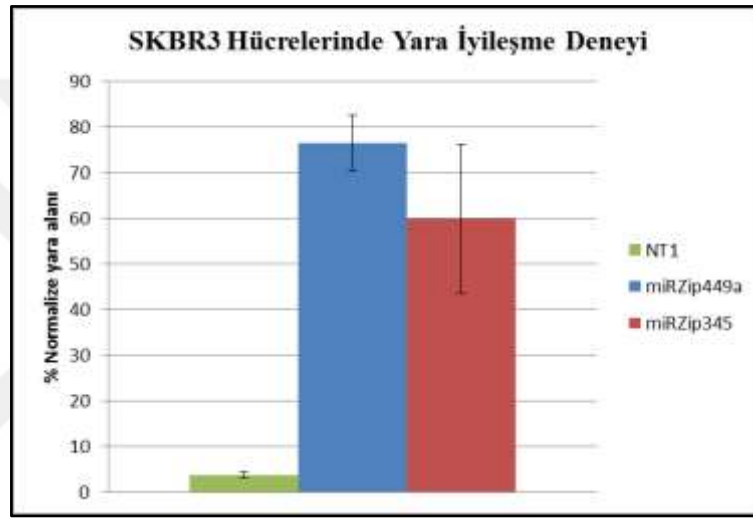
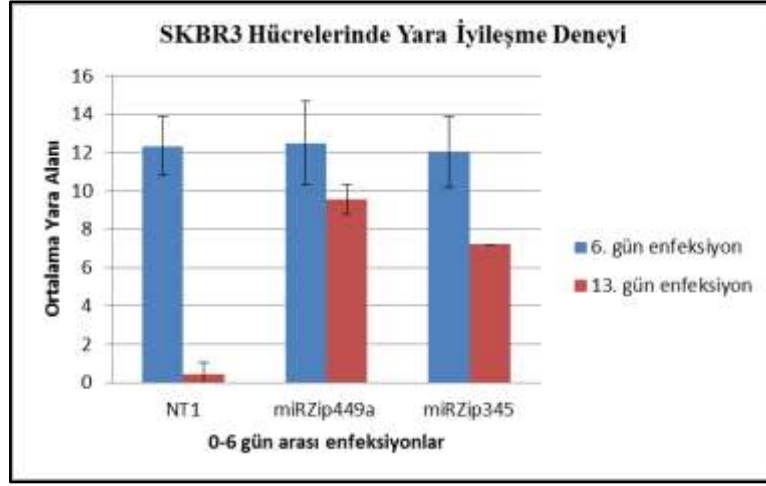
5.10. SKBR3 HÜCRELERİNDE MİRZİP345, MİRZİP449A VE NT1 ENFEKSİYONUNUN ARDINDAN YARA İYİLEŞME DENEYLERİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Yara iyileşme deneyi monolayer hücrelerde migrasyonun gözlenmesi için kullanılan ekonomik ve kolay bir testtir (89). hsa-miR-345 ve hsa-miR-449a'nın SKBR3 hücrelerinde hücre ölümünü tetiklediğinin bulunması ardından kanser hücrelerinin migrasyonu üzerine etkisinin olup olmadığını araştırmak için yara iyileşme deneyi yapılmıştır. Hücre ölümünün görülmeye başlandığı 7. enfeksiyon gününde 6 kuyulu platelerde büyütülen ve miRZip345, miRZip449a ve NT1 ile enfekte hücreler bir tip yardımıyla çizilmiştir. Ardından yaranın iyileşme süreci her bir enfeksiyon yapılan kuyunun 3 farklı bölgesinden fotoğraflar çekilerek 6 gün boyunca takip edilmiştir. Farklı zamanlarda yapılan iki biyolojik tekrar ile çalışılmıştır. Ardından analiz yapılırken yara alanları NT1 yara alanı ile

karşılaştırılmış, miRZip449a ve miRZip345 ile enfekte hücrelerin migrasyonun azaldığı, hatta durduğu doğrulanmıştır.



Şekil 5.43 miRZip345, miRZip449a, NT1 ve hücre kontrol (HK) için SKBR3 hücrelerinde yara iyileşme deneyi. İlgili miRNA'lar susturulduklarında migrasyon azalmaktadır. 6. gün kontrol hücrelerindeki yara tamamen kapanırken, enfekte hücrelerde hala gözle görünür şekilde açıktır



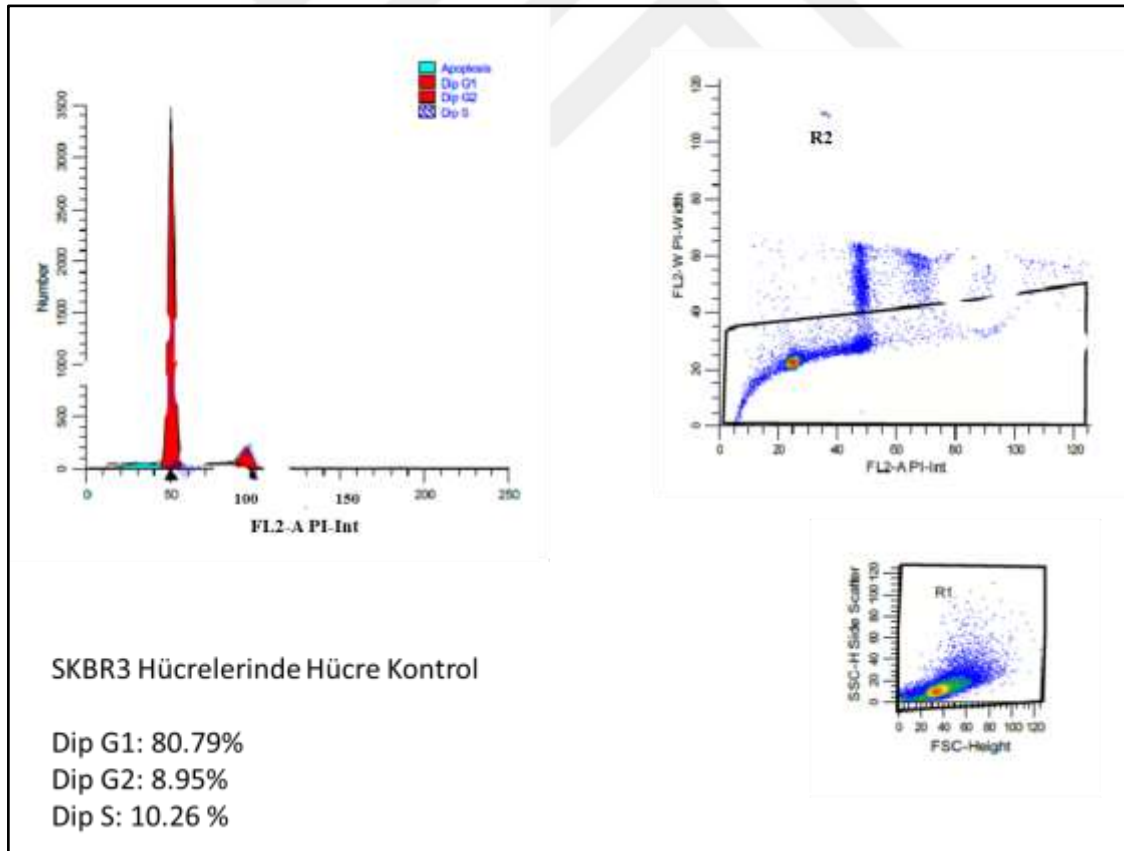
Şekil 5.44 miRZip345, miRZip449a, NT1 ve hücre kontrol (HK) için SKBR3 hücrelerinde yara iyileşme deneyi sonuçları. Yara oluşturulan 0. gün (enfeksiyonun 7. günü) ve 6. gün (enfeksiyonun 13. günü) arasındaki iyileşme farkı gözlenmektedir. miRZip vektörleri ile enfekte hücrelerde yara iyileşmesi çok azken, NT1 ile enfekte kontrol hücrelerinde yara iyileşmesi tamamlanmıştır.

5.11. SKBR3 HÜCRELERİNDE MİRZİP345, MİRZİP449A VE NT1 ENFEKSİYONU ARDINDAN HÜCRE SİKLUSU TESTİ

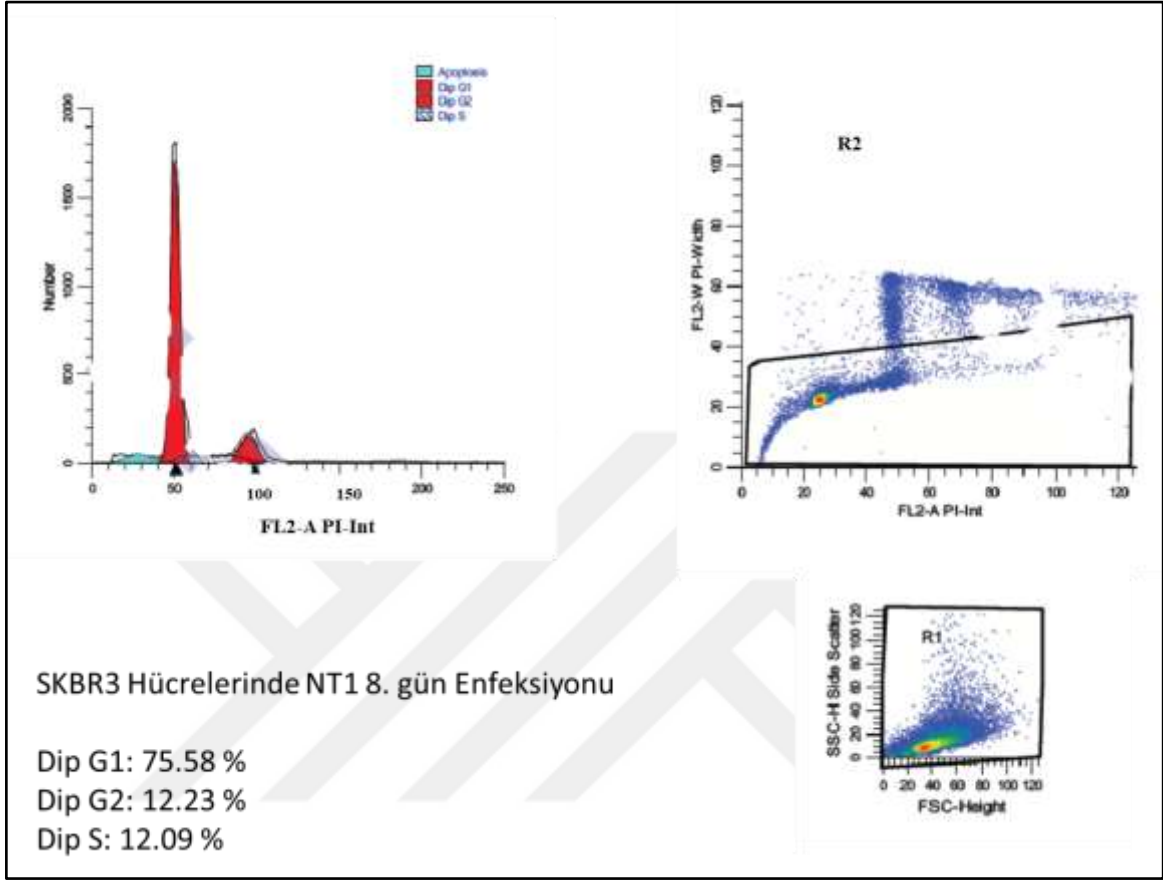
Hücre siklusu kontrolü DNA replikasyonunun ve hücre bölünmesinin sağlıklı şekilde gerçekleşmesini sağlar. Ökaryotlarda hücre siklusu, G0 (dinlenme fazı); G1 (aktif faz); S (DNA replikasyonun gerçekleştiği faz); G2 (hücre bölünmesi için gerekli proteinlerin oluşturulduğu faz); M (mitozisin gerçekleştiği faz) olmak üzere farklı aşamalardan oluşur. Özellikle kanser hücrelerinde önemli olan G1/S ve G2/M iki adet kontrol noktasını

oluşturur. Hücre bölünmesi sırasında DNA hasarının varlığı tespit edildiğinde bu iki noktada görev alan proteinler hücre siklusunu durdururlar ve mitozun oluşmasını engeller. Bu kontrol mekanizmaları başlıca p53 ve Rb (retinoblastoma) transkripsiyon faktörleri tarafından yönetilir.

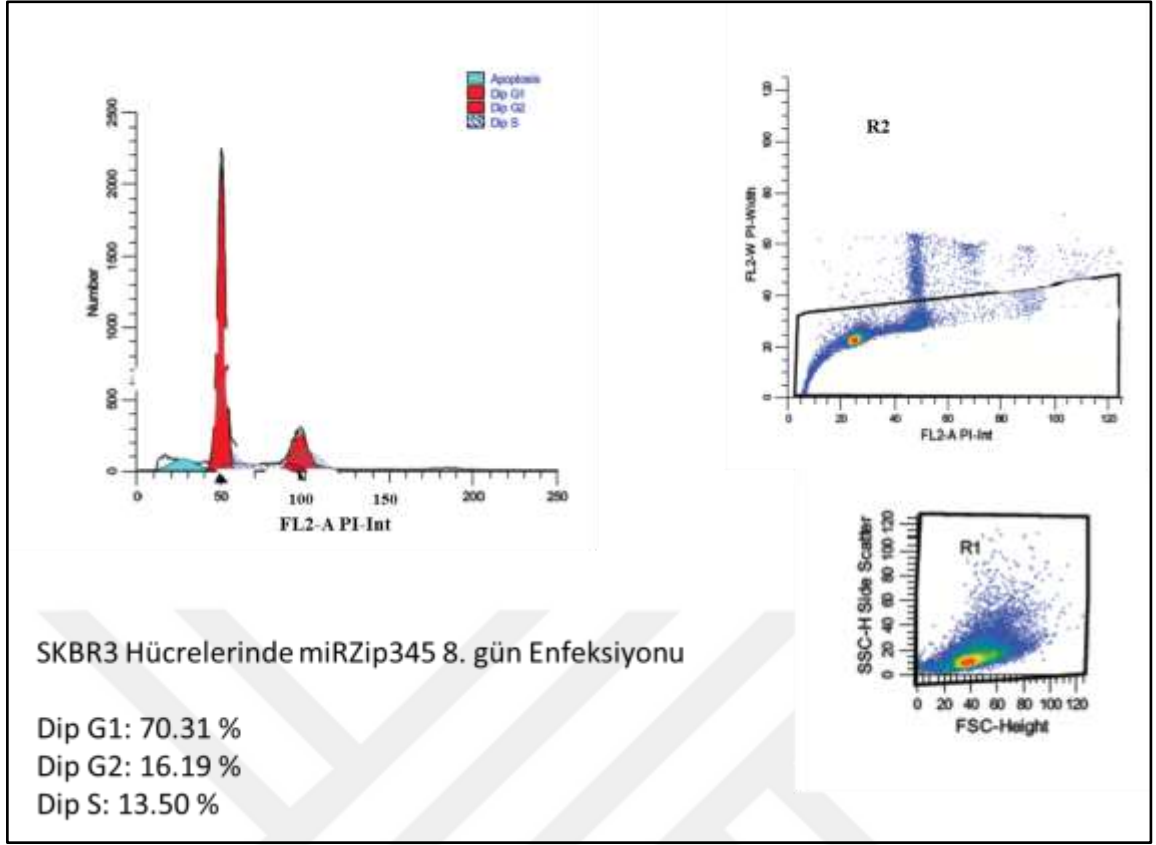
Daha önce, miRZip345 ve miRZip449a ile yapılan enfeksiyonlarda SKBR3 hücrelerinin proliferasyonunda azalma gözlenmiştir. Hücre çoğalmasında oluşan bu etkinin hücre siklusunu kontrolü ile bağlantısı olup olmadığının anlaşılması için ilgili test gerçekleştirilmiştir. Buna göre enfeksiyonun 8. günü yapılan test ile G0/G1, S, G2/M fazları ölçülmüş ve siklus içindeki dağılımları kontrol hücreleri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda, enfekte hücrelerin fazları arasında kontrol hücrelerine göre belirgin değişiklik gözlemlenmiştir. Analiz sırasında duplike olan hücreler elenmiş, sadece tek başına olan hücreler analize dâhil edilmiştir. Hücre siklusunu testinin ModFit programında elde edilen histogram analiz sonuçları Şekil 5.45’de; Şekil 5.46’da; Şekil 5.47’de; Şekil 5.48’de ve Şekil 5.49’da gösterilmiştir.



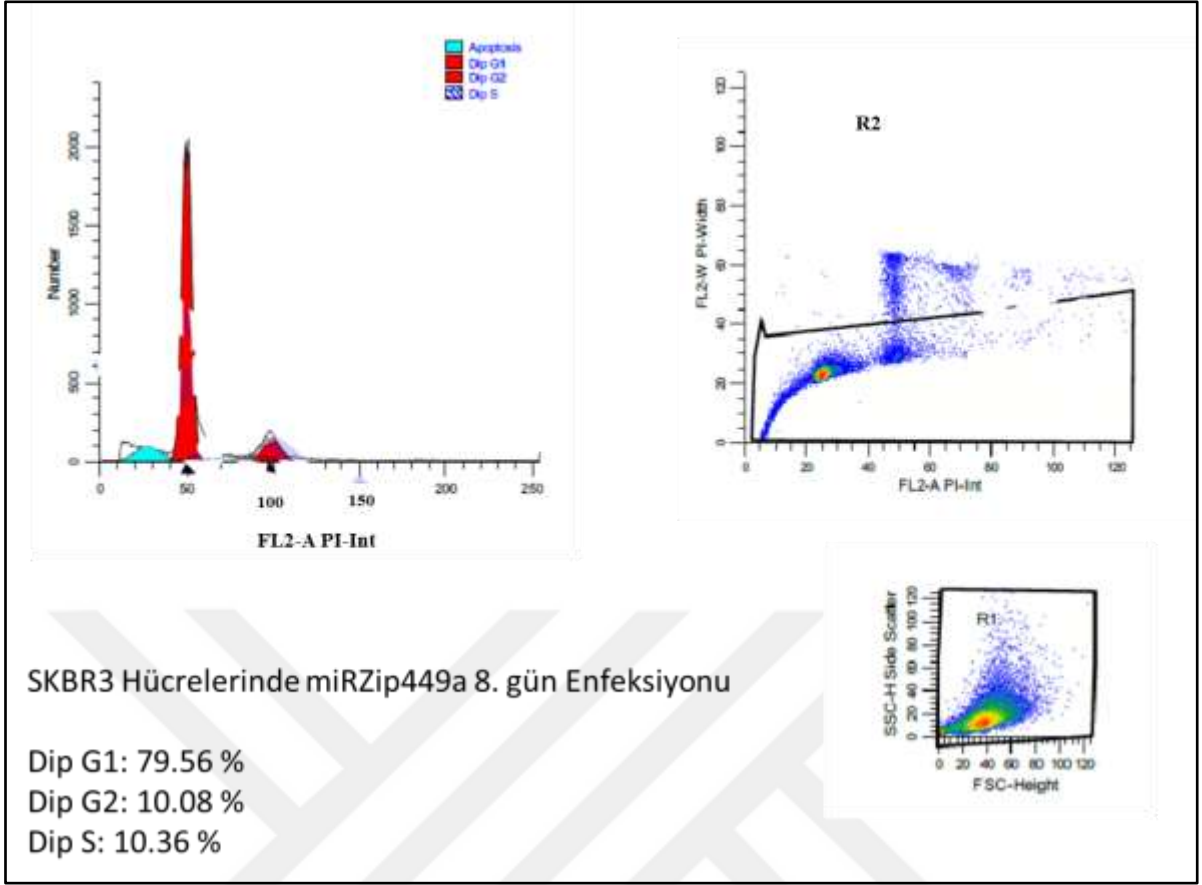
Şekil 5.45 SKBR3 hücrelerinde hücre siklusu testi ve hücre kontrol analizi. Kontrol hücrelerinde yapılan analize dahil edilen hücreler R2 grafiğinde; analizdeki tüm hücreler R1 grafiğinde gösterilmiştir. Analiz sonucu G1 oranı %80.79; G2 oranı %8.95 ve S faz oranı %10.26 olarak bulunmuştur



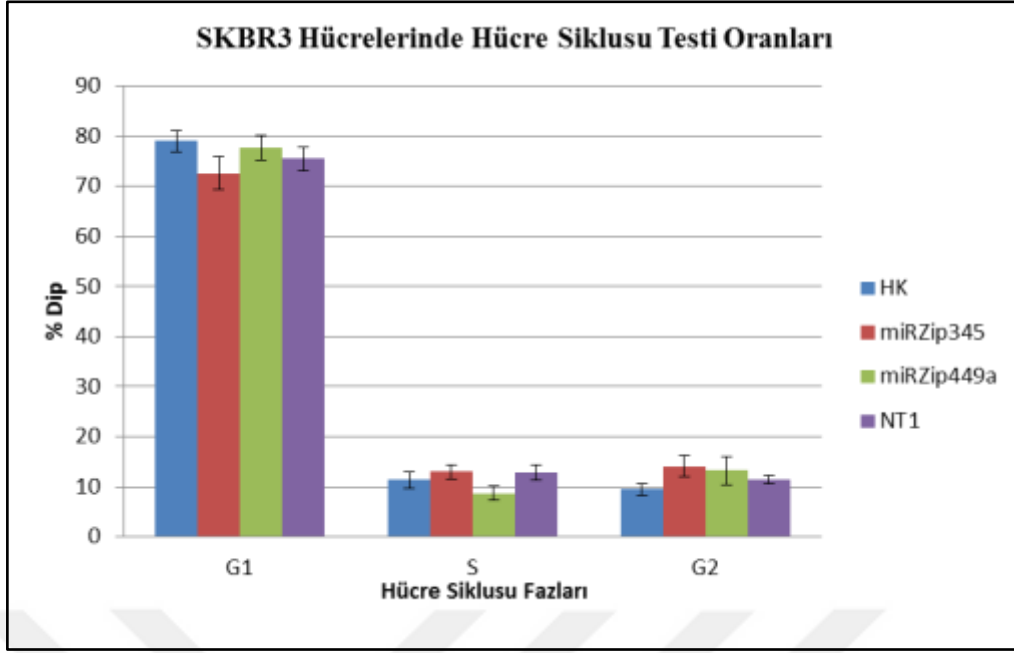
Şekil 5.46 SKBR3 hücrelerinde hücre siklusu testi ve NT1 kontrol analizi. NT1 kontrol hücrelerinde yapılan analize dahil edilen hücreler R2 grafiğinde; analizdeki tüm hücreler R1 grafiğinde gösterilmiştir. Analiz sonucu G1 oranı %75.58; G2 oranı %12.23 ve S faz oranı %12.09 olarak bulunmuştur



Şekil 5.47 SKBR3 hücrelerinde hücre siklusu testi ve NT1 kontrol analizi. NT1 kontrol hücrelerinde yapılan analize dahil edilen hücreler R2 grafiğinde; analizdeki tüm hücreler R1 grafiğinde gösterilmiştir. Analiz sonucu G1 oranı %70.31; G2 oranı %16.19 ve S faz oranı %13.50 olarak bulunmuştur



Şekil 5.48 SKBR3 hücrelerinde hücre siklusu testi ve NT1 kontrol analizi. NT1 kontrol hücrelerinde yapılan analize dahil edilen hücreler R2 grafiğinde; analizdeki tüm hücreler R1 grafiğinde gösterilmiştir. Analiz sonucu G1 oranı %79.56; G2 oranı %10.08 ve S faz oranı %10.36 olarak bulunmuştur

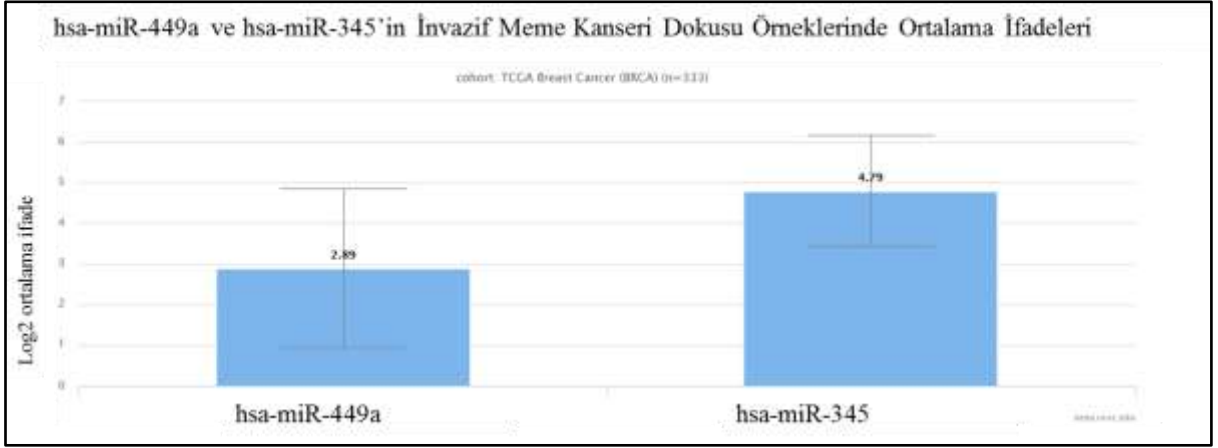


Şekil 5.49 SKBR3 hücrelerinde hücre siklusu testi sonrası faz oranları. Farklı zamanlarda yapılan 3 biyolojik tekrarın ortalamaları alınmıştır.

Hücre siklusu testi sonucunda hücre kontrol, NT1 (negatif kontrol) miRZip449a ve miRZip345 enfeksiyonları sonrası G1, G2 ve S fazları arasında gözle görünür bir değişiklik saptanmamıştır.

5.12. HSA-MİR-449A VE HSA-MİR-345 İFADESİNİN MEME KANSERİ DOKULARINDA ARAŞTIRILMASI

SKBR3 hücrelerinde fonksiyonel karakterizasyonu yapılan ve ifadeleri azaldığında hücre ölümüne, migrasyonun azalmasına, proliferasyonun gerilemesine yol açtıkları gözlenen hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 ifadeleri TCGA (The Cancer Genomic Atlas) meme kanseri datası kullanılarak araştırılmıştır. Data 333 adet invazif meme kanseri dokusu örneğini içermektedir ve miRNA-seq ekspresyon datası şeklinde Xena UCSC veritabanında erişime sunulmuştur. İlgili ekspresyon datası kullanılarak miRNA'ların ortalama ifadesi bulunmuş ve meme kanserinde normal dokuya göre log2 tabanında 2 katı ve üzeri artış gösterdikleri gözlenmiştir. İfade analizi sonuçları Şekil 5.50'de gösterilmiştir.



Şekil 5.50 hsa-miR-449a ve hsa-miR-345'in TCGA (The Cancer Genomic Atlas) meme kanseri miRNA-seq ekspresyon datasında bulunan ortalama ifadeleri

5.13. MİRZİP345, MİRZİP449A VE NT1 ENFEKSİYONU ARDINDAN SKBR3 HÜCRELERİNDE AGO2-IP UYGULAMASI

AGO2-IP uygulamasının gerçekleştirilmesi için ilk olarak meme kanseri hücrelerinde ilgili miRNA'ların tamamen ifadelerinin değişmesi ve susturulmaları sağlanmıştır. Daha öncede bahsedildiği gibi, ilgili miRNA'ların susturulmasının hücre proliferasyonuna negatif etki etmesi ve bazal miRNA ifadesinin eş zamanlı PZR ile yüksek olduğunun tespit edilmesi nedeniyle, bunlarla beraber TCGA verilerinden elde edilen sonuçlarda meme tümörlerinde bu miRNA'ların ifadesinin artmış bulunması sebebiyle miRZip vektörlerinin kullanılmasına karar verilmiştir. miRZip vektörleri kullanılarak gerçekleştirilen susturma işlemi için en az %85 ve üzeri GFP+ hücre oranı hedeflenmiştir. SKBR3 hücreleri miRZip449a, miRZip345 ve NT1 kullanılarak enfekte edilmişlerdir. AGO2-IP metodu uygulanırken ayrıca hücre kontrol hücreleri kullanılmış ve enfekte olmayan bu hücrelerle hem AGO2 hem de kontrol olarak IgG immunopresipitasyonu gerçekleştirilmiştir.

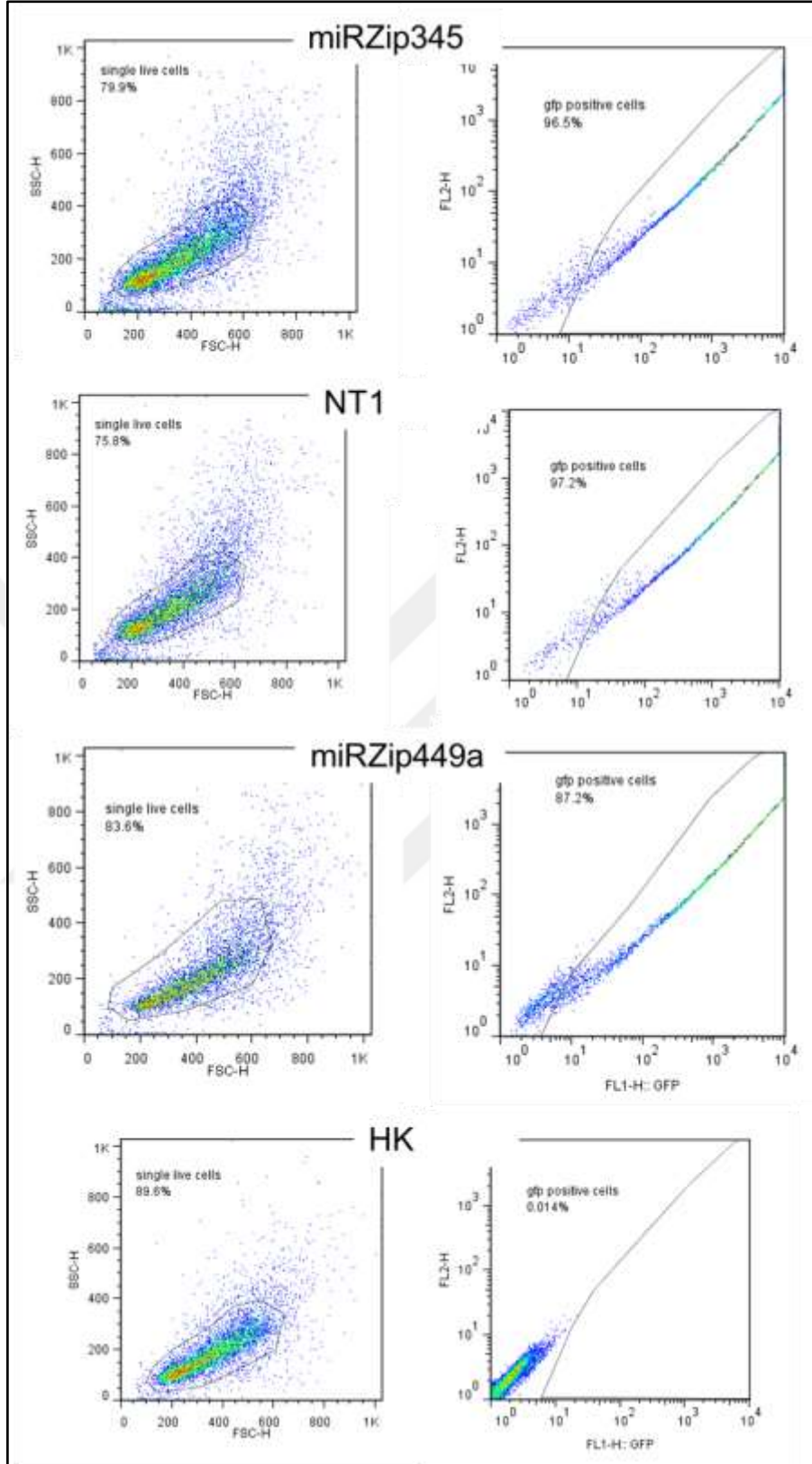
miRZip449a vektörü ile enfeksiyon yapıldıktan sonra hücrelerin çoğalmasının etkilenmeye başladığı 5. gün peletler toplanmıştır. miRZip449a enfeksiyonu için 4.5 milyon hücre ile deneye başlanmış, 750 µL virüs kullanılmıştır. 5. gün hücreler 18 milyon sayısına ulaştığında FACS cihazında GFP oranları kontrol edilip pelet olarak toplanmışlardır.

miRZip345 ile enfeksiyon sırasında ilk olarak 8×10^5 SKBR3 hücresi enfekte edilmiştir, kontrol (NT1) ve miRZip345 enfeksiyonu 750 µL virüs ile gerçekleştirilmiştir. Ardından

sayıları 10 milyona ulaştığında “sorting” yapılmıştır ve %90 ve üzeri GFP+ hücre oranı elde edilmiştir. “Sorting” işlemi ardından hücreler yaklaşık 18 milyon sayıya ulaşana kadar büyütülmüşlerdir. Tripsinle kaldırılıp toplama sırasında tekrar GFP oranları kontrol edilerek %90 ve üzeri bulunmuştur. AGO2-IP için toplanan hücrelerin GFP oranları ve hücre sayıları ise Çizelge 5.18’de gösterilmiştir. miRZip449a, miRZip345 ve NT1 ile AGO2-IP uygulaması öncesi SKBR3 hücrelerinin enfeksiyonu ve elde edilen FACS sonuçları Şekil 5.51’de verilmiştir.

Çizelge 5.18 AGO2-IP uygulamasında kullanılan hücrelerin GFP oranları ve hücre sayıları

Vektör	GFP %	Hücre Sayısı
miRZip449a	87.2	18 milyon
miRZip345	96.5	18 milyon
NT1	97.2	18 milyon
Hücre kontrol (HK)	-	10 milyon (pelet ikiye bölünmüştür)



Şekil 5.51 SKBR3 hücrelerinde AGO2-IP uygulaması öncesi miRZip345, miRZip449a ve NT1 enfeksiyonları ardından FACS sonuçları

5.13.1. AGO2-IP UYGULAMASI İÇİN RNA İZOLASYONU

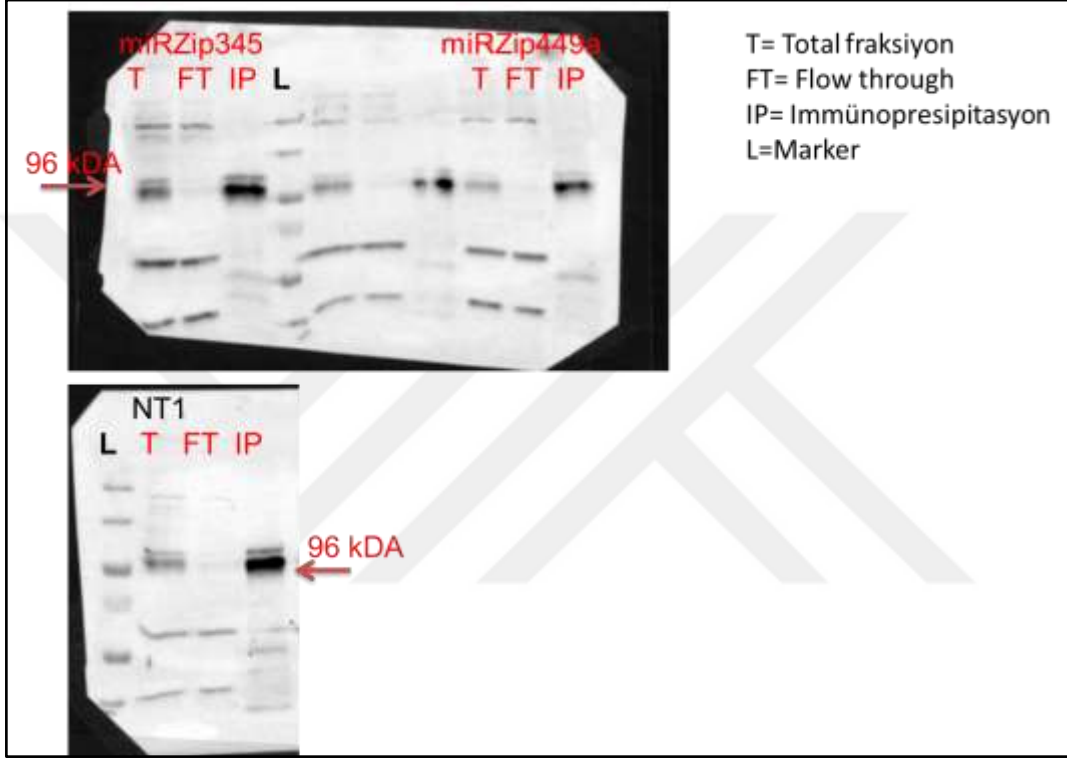
AGO2-IP sonrası total, flow through (FT) ve IP fraksiyonlarına ait örneklerden Qiagen miRNeasy Kit kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından nanodrop ölçümleri yapılarak analizde kullanılacak RNA'ların konsantrasyonları tespit edilmiştir. Konsantrasyonlar mikrodizin analizinde ve ilerleyen analizlerde kullanılacak düzeyde bulunmuştur. İlgili nanodrop ölçüm sonuçları Çizelge 5.19'da verilmiştir.

Çizelge 5.19 AGO2-IP uygulaması için kullanılan örneklerden RNA izolasyonu sonrası ölçülen konsantrasyonlar

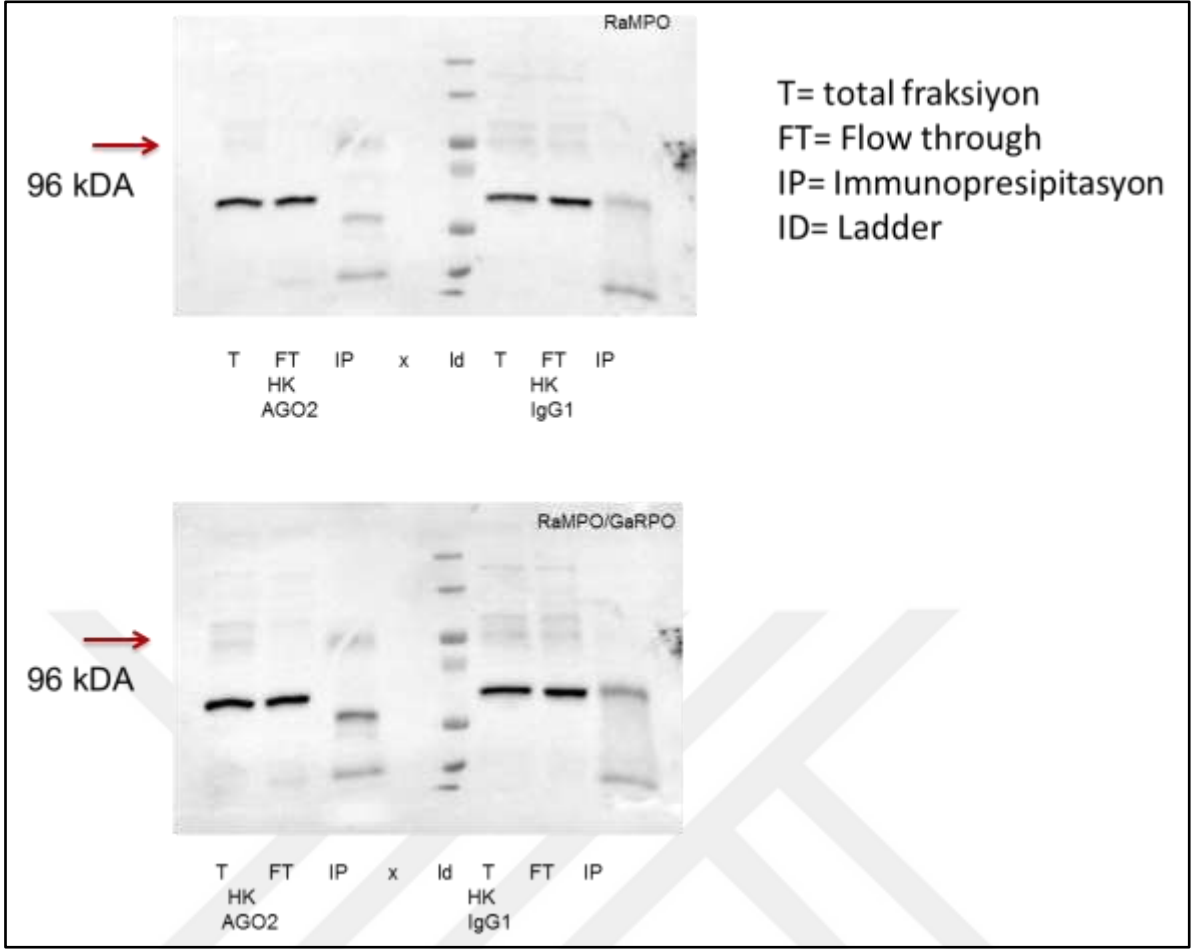
Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/ µL)	260/280	260/230
miRZip449a total	1047.46	2.39	1.84
miRZip449a FT	613.03	2.36	1.96
miRZip449a IP	22.41	2.45	1.72
miRZip345 total	1527.47	2.36	1.98
miRZip345 FT	1261.49	2.40	1.97
miRZip345 IP	32.58	2.30	1.12
NT1 total	1118.42	2.39	1.98
NT1 FT	1151.90	2.37	1.83
NT1 IP	35.28	2.67	1.49
HK AGO2 total	91.59	2.39	0.39
HK AGO2 FT	68.73	2.36	0.65
HK AGO2 IP	33.56	2.81	0.22
HK IgG Total	70.83	2.53	0.21
HK IgG FT	54.12	2.62	0.25
HK IgG IP	27.96	2.09	0.81

5.13.2. AGO2-IP UYGULAMASI İÇİN WESTERN BLOT YAPILMASI

AGO2 proteininin immunopresipitasyon sonrası IP fraksiyonunda zenginleştiğini kontrol etmek için miRZip345, miRZip449a, NT1 ve hücre kontrol örnekleri kullanılarak western blot ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme sonrası AGO2 proteininin ilgili fraksiyonda daha fazla zenginleştiği gözlenmiş ve AGO2-IP işleminin başarıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir. Görüntüler Şekil 5.52’de ve Şekil 5.53’te verilmiştir.



Şekil 5.52 AGO2-IP sonrası miRZip449a, miRZip345 ve NT1 için western blot görüntülemeleri. AGO2 protein büyüklüğü 96 kDA olarak gösterilmiştir. 10 saniye görüntüleme yapılmıştır

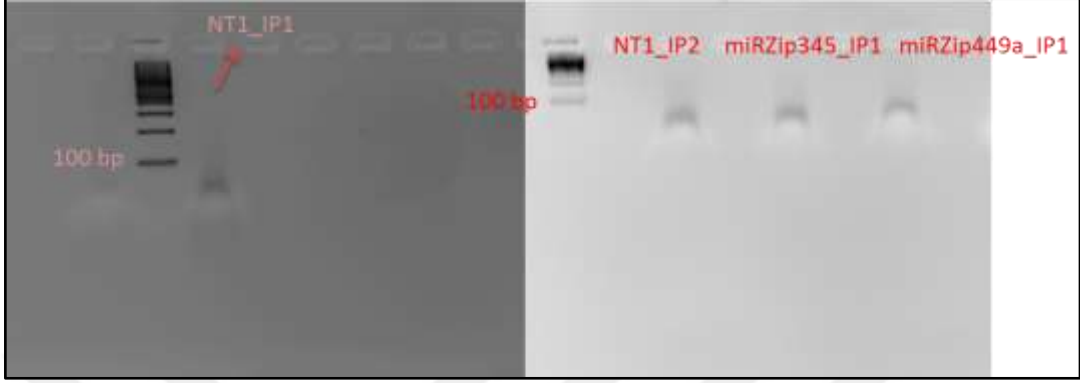


Şekil 5.53 AGO2-IP sonrası hücre kontrol AGO2 ve IgG örnekleri için western blot görüntülemeleri. AGO2 protein büyüklüğü 96 kDA olarak gösterilmiştir. 60 saniye görüntüleme yapılmıştır. Daha iyi görüntü elde edebilmek için örnekler iki kez sekonder antikor (RaMPO/GaRPO) ile muamele edilmiştir. Hücre sayısı 4-5 milyon civarı olduğu için elde edilen protein miktarı çok iyi olmamakla beraber AGO2 anti-antikorunun kullanıldığı IP fraksiyonunda zenginleşme gözlenirken, IgG IP fraksiyonunda zenginleşme bulunmamaktadır

5.13.3. MİRZİP345, MİRZİP449A VE NT1 İÇİN AGO2-IP SONRASI MİKRODİZİN UYGULAMASI

AGO2-IP uygulaması sonucu elde edilen RNA örneklerinden hsa-miR-345, hsa-miR- 449a ve NT1 (kontrol için) hedeflerinin tespit edilmesi için mikrodizin gerçekleştirilmiştir. Mikrodizin için Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 platformu kullanılmıştır. Hibridizasyon, yıkama, tarama işlemleri Affymetrix'in belirlediği protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için iki teknik tekrar kullanılmıştır. Hibridizasyon işleminde önce örnekler fragmente edilmiş ve nandrop ölçümü sonrası konsantrasyonlarının

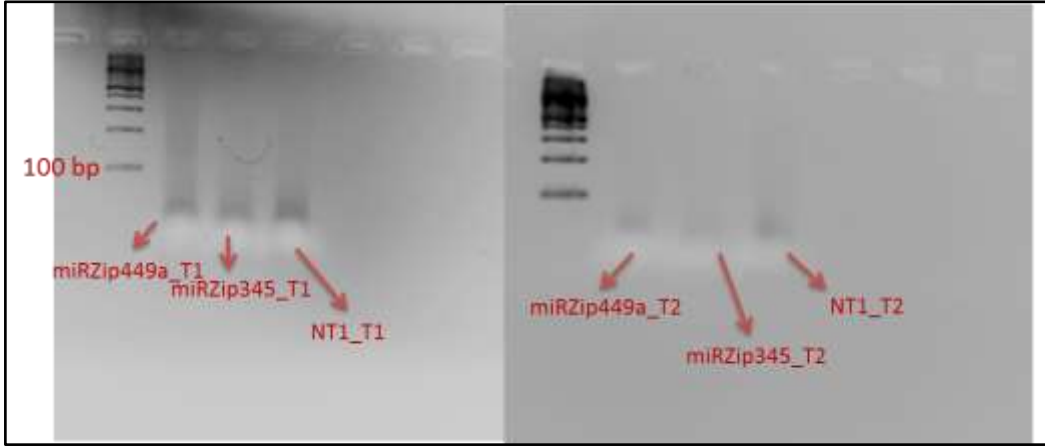
en az 500 ng/mL ve üzeri olduğu doğrulanmıştır. Ardından fragmente edilen cRNA'ların %3'lük agaroz jelde bütünlükleri kontrol edilmiş ve çipe yüklenmek için uygun oldukları doğrulanmıştır. cRNA'lara ait jel görüntüleri Şekil 5.54'de; Şekil 5.55'de ve Şekil 5.56'da verilmiştir.



Şekil 5.54 NT1 IP ilk ve ikinci tekrarları ile miRZip345 IP birinci teknik tekrar, miRZip449a IP birinci teknik tekrar örneklerine ait cRNA jel görüntüleri. Görüntü örneklerin %3'lük agaroz jelde 120 V 30 dakika yürütülmesinden sonra elde edilmiştir. 100 bp markır kullanılmıştır



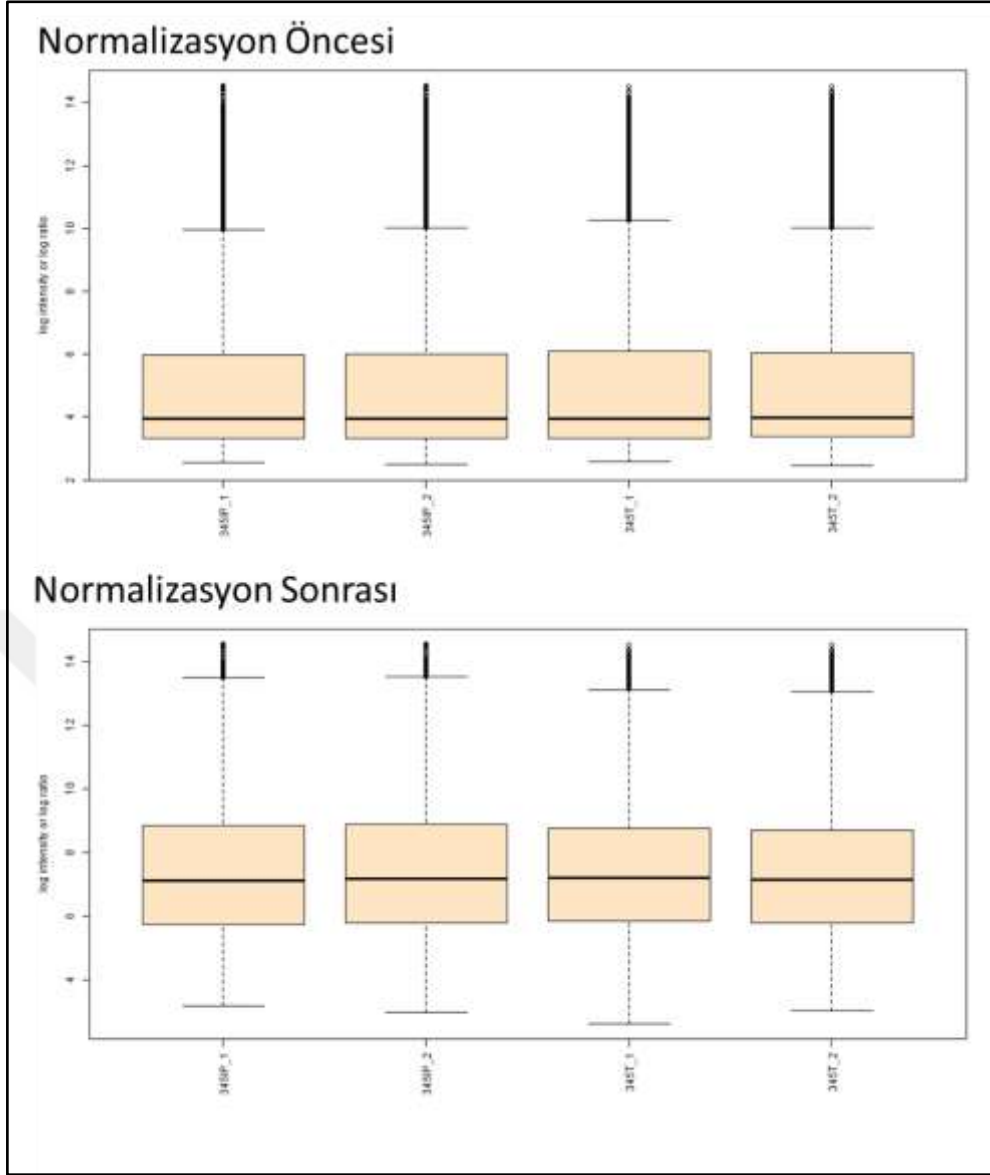
Şekil 5.55 miRZip345 IP ve miRZip449a IP ikinci teknik tekrar örneklerine ait cRNA jel görüntüleri. Görüntü örneklerin %3'lük agaroz jelde 120 V 30 dakika yürütülmesinden sonra elde edilmiştir. 100 bp markır kullanılmıştır



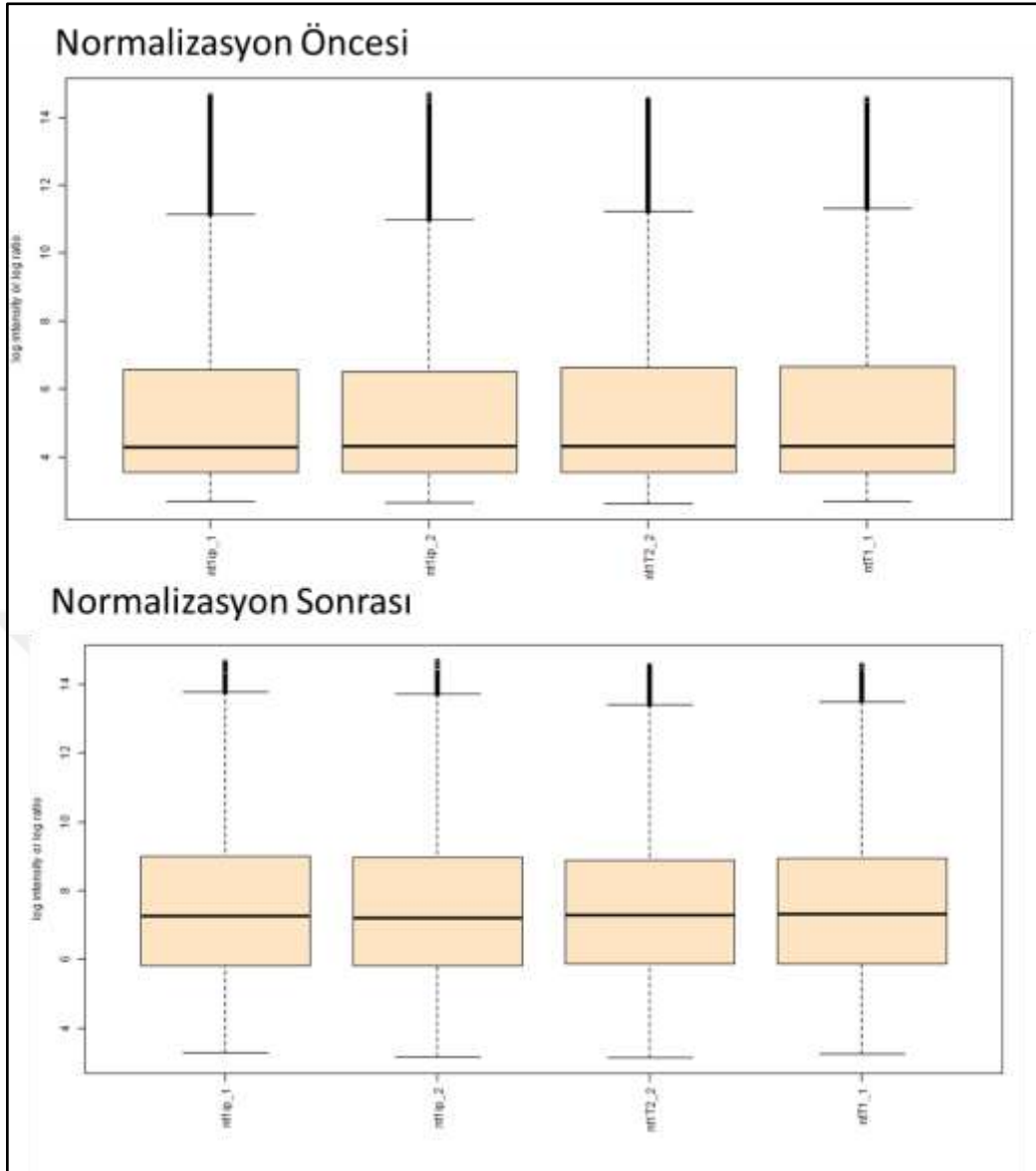
Şekil 5.56 miRZip345, NT1 ve miRZip449a total birinci ve ikinci teknik tekrar örneklerine ait cRNA jel görüntüleri. Görüntü örneklerin %3'lük agaroz jelde 120 V 30 dakika yürütülmesinden sonra elde edilmiştir. 100 bp markır kullanılmıştır

Mikrodizin uygulaması sonrası analiz GeneSpring programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. miRZip449a, NT1 ve miRZip345 uygulaması sonrası elde edilen IP ve total örnekleri karşılaştırılarak analiz tamamlanmıştır. Buna göre ilk olarak NT1 ve miRZip449a örnekleri kendi içlerinde analiz edilmiş, ardından miRZip345 ve NT1 analizi tamamlanmıştır. Yani analizler miRZip449a ve NT1; miRZip345 ve NT1 olmak üzere iki şekilde yapılmıştır, miRZip vektörleri ayrı ayrı NT1 ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. miRZip ve NT1 uygulamaları için IP fraksiyonunda total fraksiyonuna göre 2 kat ve daha fazla ifade değişikliği gösteren genler belirlenmiş, son olarak NT1 ve miRZip IP kısmında zenginleşmiş genler ile karşılaştırma yapılmıştır.

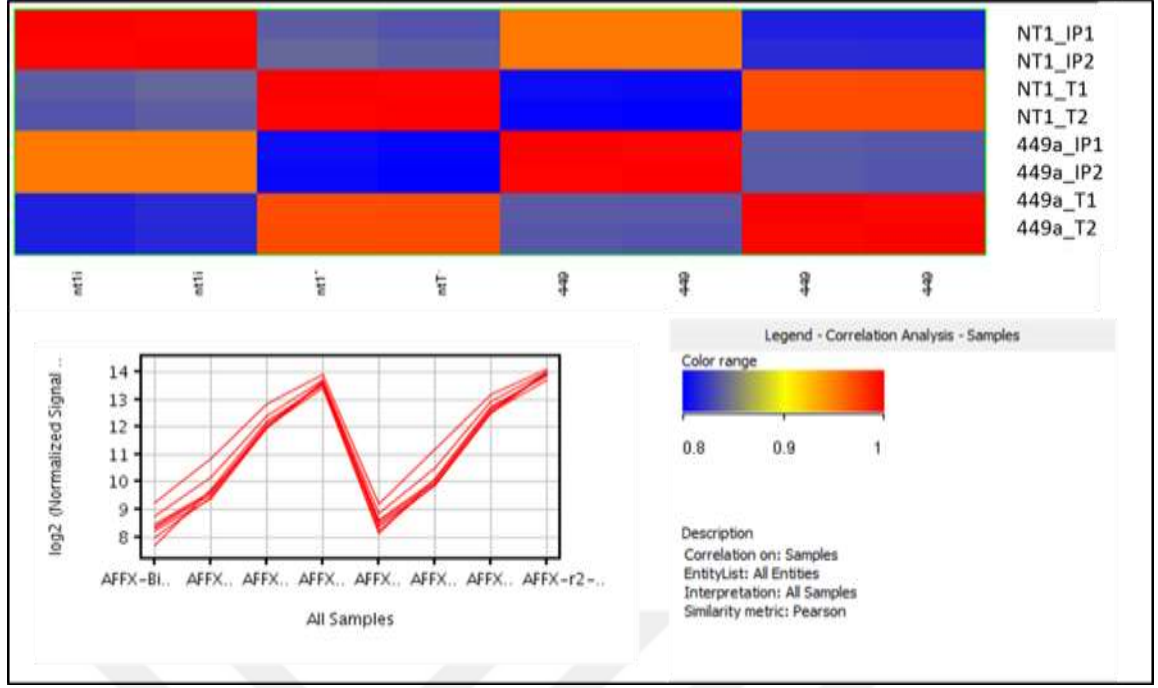
miRZip ve NT1 analizi için ilk olarak "RMA normalizasyon" yapılmıştır. Çip üzerinde toplam 54675 prob bulunmaktadır. Ardından kullanılan örnekler arasında teknik hatalardan kaynaklanan farklılıklar olup olmadığını kontrolü için korelasyon analizi yapılmış ve kalite kontrolü gerçekleştirilmiştir. miRZip345 ve NT1'e ait örnek normalizasyon sonuçları Şekil 5.57 ve Şekil 5.58'de; miRZip449a ve NT1 örneklerine ait korelasyon analiz sonuçları örnek olarak Şekil 5.59'da gösterilmiştir.



Şekil 5.57 miRZip345 örneklerine ait normalizasyon sonuçları

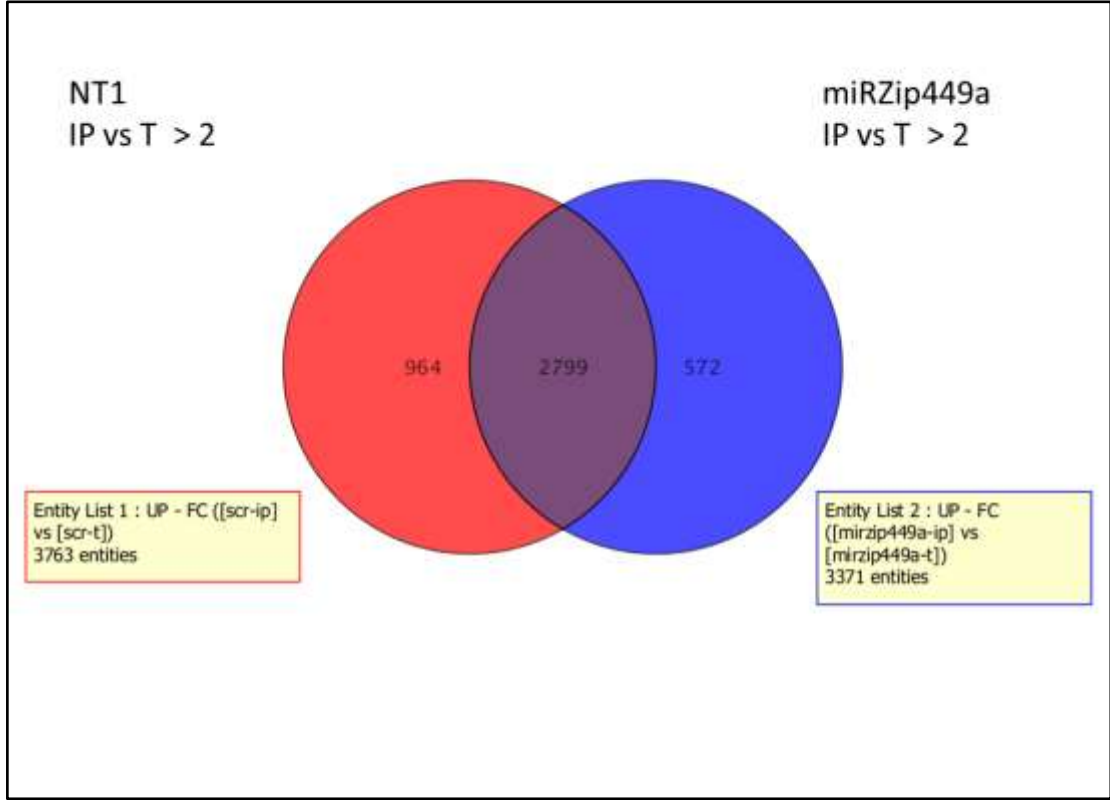


Şekil 5.58 NT1 örneklerine ait normalizasyon sonuçları

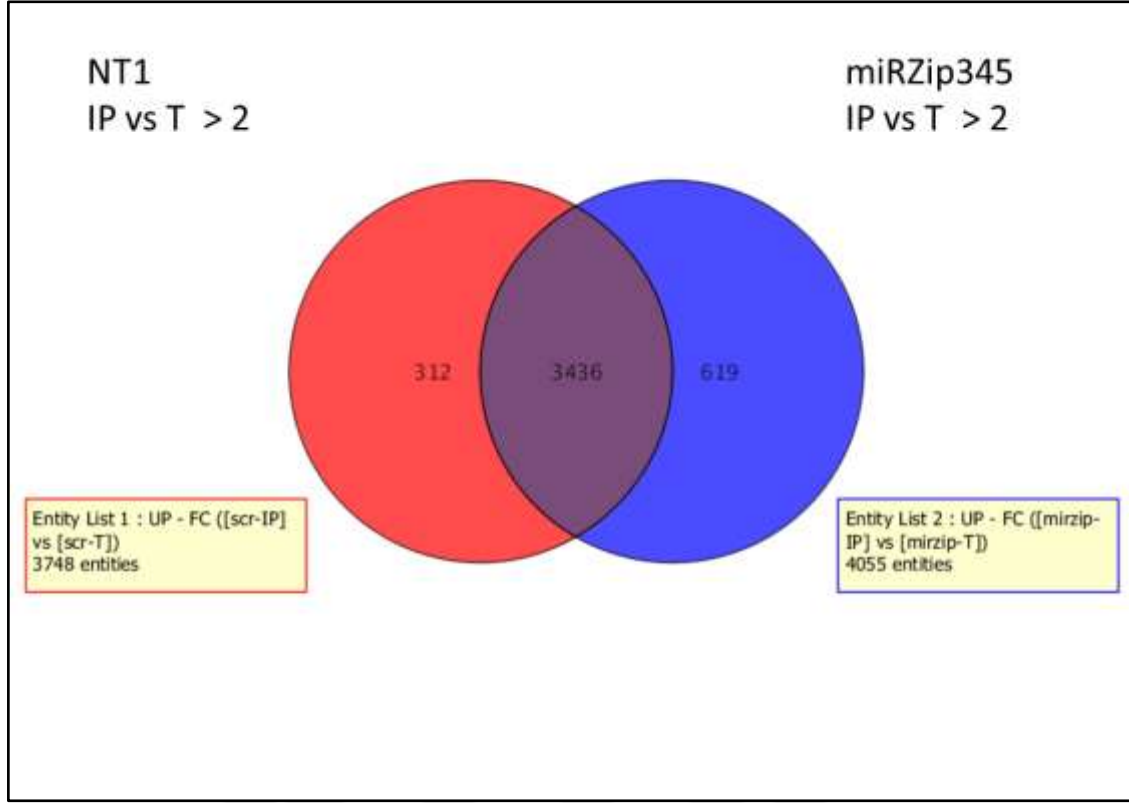


Şekil 5.59 miRZip449a ve NT1 örneklerine ait korelasyon sonuçları. Teknik tekrarlara ait örnekler birbirleri ile büyük oranda korelasyon göstermektedir

Kalite kontrolü ardından sinyal alınamayan, ifadesi tespit edilemeyen hatalı problemlerin elenmesi için filtrasyon işlemi yapılmıştır. Buna göre, normalize datada her iki teknik tekrarın birinde ya da total veya IP örneklerinin herhangi birinde log5 ve altı sinyal veren problemler elenmiştir. Filtre işlemi ardından miRZip449a analizinde toplam 20223 prob kalırken, miRZip345 analizinde 20025 prob kalmıştır. Teknik tekrarlar arasında filtrasyona ve normalizasyona rağmen hatalı olan problemlerin tespiti için IP1 ve IP2; T1 ve T2 örnekler kendi içerisinde karşılaştırılmıştır. Teknik tekrarlar için ortak olmayan bu problemler tüm filtreleri geçmiş problemlerden çıkarılmıştır. Bu karşılaştırma ardından miRZip345 analizi için kullanılan final listesinde 19963; miRZip449a içinse 20150 prob kalmıştır. Bu final listeleri kullanılarak ilk olarak NT1 örnekleri için IP ve total fraksiyonları (teknik tekrarların ortalamaları) karşılaştırılarak ifade değişimi analizi yapılmış ve IP fraksiyonunda 2 kat üzeri ifade değişikliği gösteren genler bulunmuştur. Aynı işlem miRZip vektörleri için de yapılmış ve sonuçlar ven diyagramı kullanılarak karşılaştırılmıştır. miRZip449a ve NT1 IP fraksiyonunda zenginleşen genlerin karşılaştırılması Şekil 5.60'da; miRZip345 ve NT1 karşılaştırması ise Şekil 5.61'de verilmiştir.



Şekil 5.60 NT1 ve miRZip449a IP fraksiyonunda zenginleşen genlerin karşılaştırılması. NT1 örneğinde zenginleşen 3763 proba ait ifade değişikliği daha sonra miRZip449a örneklerinde araştırılmıştır.



Şekil 5.61 NT1 ve miRZip345 IP fraksiyonunda zenginleşen genlerin karşılaştırılması. NT1 örneğinde zenginleşen 3748 proba ait ifade değişikliği daha sonra miRZip449a örneklerinde araştırılmıştır

İlgili miRNA'lara ait olası hedef gen profilleri incelenirken ilk olarak her bir vektör için NT1 örneğinde, IP fraksiyonunda zenginleşen genler incelenmiştir, en fazla kat değişimi gösteren genler tespit edilmeye çalışılmıştır. Ardından bu genlerin NT1 örneklerindeki ifadeleri, miRZip IP fraksiyonundaki ifadeleri ile karşılaştırılmıştır. Böylece ilgili miRNA'lar susturulduğunda, hedefler bağlanamayacağı için miRZip IP fraksiyonunda daha az zenginleşecek ve ifadeleri NT1 örneklerine göre daha az bulunmuş olacaktır. Bu şekilde iki farklı kıstas göz önüne alınarak, iki miRNA'ya spesifik olası gen hedefleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

5.13.4. NT1, MİRZİP449A VE MİRZİP345'E AİT IP FRAKSİYONUNDA ZENGİNLEŞMİŞ GENLER

Her bir miRZip vektörü için yapılan gen ifadesi analizi ardından NT1 örneklerinde IP fraksiyonunda zenginleşen genler incelenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi miRZip449a vektörü kullanılarak yapılan analizde, 3763 proba ait gen IP fraksiyonunda, total

fraksiyonuna göre en az 2 katı ve üzeri zenginleşmiş olarak bulunmuştur. Bunların içerisinde farklı problemlere ait aynı genlerden ifadeleri en küçük olanlar elenmiş ve tekrar ve en az 2 katı değişiklik gösteren 2667 gen elde edilmiştir. Genler, ifade değişikliklerine göre 2 kat, 4 kat, 8 kat olarak filtrelenmiş ve gruplanmıştır. Bu şekilde IP fraksiyonunda daha fazla zenginleşen ve hsa-miR-449a'nın hedefi olma ihtimali daha yüksek genler bulunmaya çalışılmıştır. 4 kat ve üzeri değişiklik gösteren gen sayısı 337 iken, 6 kat ve üzeri değişiklik gösteren gen sayısı 48 olarak bulunmuştur. hsa-miR-449a'ya ait ve 4 kat ifade değişikliği gösteren olası hedefler Çizelge 5.20'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.20 hsa-miR-449a ait olası hedef genlerden IP fraksiyonunda 4 kat ve üzeri zenginleşen genler

Probe ID	Set	Gen Adı	FC : 4 kat ve üzeri	Probe ID	Set	Gen Adı	FC : 4 kat ve üzeri
212094_at		PEG10	9.35	1553974_at		C22orf39	4.64
218465_at		TMEM33	9.12	225658_at		SPOPL	4.64
235088_at		C4orf46	9.10	212851_at		DCUN1D4	4.63
209999_x_at		SOCS1	9.07	221230_s_at		ARID4B	4.63
238856_s_at		PANK2	9.03	231832_at		GALNT4	4.61
205191_at		RP2	8.90	205763_s_at		DDX18	4.61
206734_at		JRKL	8.86	226316_at		RBM26	4.61
231120_x_at		PKIB	7.92	218065_s_at		TMEM9B	4.59
205739_x_at		ZNF107	7.87	201556_s_at		VAMP2	4.59
226155_at		FAM160B1	7.82	203414_at		MMD	4.59
227680_at		ZNF326	7.40	241730_at		MYNN	4.59
229533_x_at		ZNF680	7.24	225366_at		PGM2	4.58
234997_x_at		RP11-488L18.10	7.19	212709_at		NUP160	4.58
203276_at		LMNB1	7.17	225902_at		PPIG	4.58
228033_at		E2F7	7.14	203789_s_at		SEMA3C	4.58
227803_at		ENPP5	7.12	213647_at		DNA2	4.57

227040_at	NHLRC3	7.11	206359_at	SOCS3	4.56
235812_at	CNEP1R1	7.06	218438_s_at	MED28	4.56
202980_s_at	SIAH1	6.91	217843_s_at	MED4	4.56
209099_x_at	JAG1	6.86	229666_s_at	CSTF3	4.56
213146_at	KDM6B	6.83	204172_at	CPOX	4.56
204506_at	PPP3R1	6.83	225912_at	TP53INP1	4.55
225237_s_at	MSI2	6.83	203302_at	DCK	4.53
219421_at	TTC33	6.81	228789_at	MTMR6	4.53
203362_s_at	MAD2L1	6.73	226181_at	TUBE1	4.53
225922_at	FNIP2	6.67	203011_at	IMPA1	4.52
203765_at	GCA	6.61	212558_at	SPRY1	4.52
224875_at	C5orf24	6.58	204783_at	MLF1	4.52
224308_s_at	INTS2	6.58	223886_s_at	RNF146	4.51
204742_s_at	PDS5B	6.53	221193_s_at	ZCCHC10	4.51
219342_at	CASD1	6.43	225838_at	EPC2	4.51
223497_at	FAM135A	6.41	217811_at	SELT	4.50
226483_at	TMEM68	6.37	211760_s_at	VAMP4	4.50
228654_at	SPIN4	6.35	228974_at	ZNF677	4.50
226600_at	TMTC3	6.30	211208_s_at	CASK	4.49
225166_at	ARHGAP18	6.29	218656_s_at	LHFP	4.48
219487_at	BBS10	6.27	227934_at	KPNA5	4.48
208759_at	NCSTN	6.26	220144_s_at	ANKEF1	4.48
221213_s_at	ZNF280D	6.23	226797_at	MBTD1	4.47
240161_s_at	CDC20B	6.23	224801_at	NDFIP2	4.46
204732_s_at	TRIM23	6.21	225368_at	HIPK2	4.46
203987_at	FZD6	6.19	202557_at	HSPA13	4.46
219297_at	WDR44	6.15	209815_at	PTCH1	4.46

231039_at	NAA30	6.13	226310_at	RICTOR	4.45
238002_at	GOLIM4	6.12	201579_at	FAT1	4.45
212622_at	TMEM41B	6.07	222201_s_at	CASP8AP2	4.45
225074_at	RAB2B	6.05	212900_at	SEC24A	4.44
200071_at	SMNDC1	6.04	226370_at	KLHL15	4.44
203810_at	DNAJB4	6.01	208939_at	SEPHS1	4.43
205668_at	LY75	6.00	218196_at	OSTM1	4.43
229073_at	PRTG	5.97	214683_s_at	CLK1	4.43
219303_at	RNF219	5.94	219334_s_at	NABP1	4.42
226609_at	DCBLD1	5.94	203909_at	SLC9A6	4.42
222870_s_at	B3GNT2	5.92	228941_at	ALG10B	4.42
238739_at	IPMK	5.91	219540_at	ZNF267	4.42
225992_at	MLLT10	5.88	226520_at	LCOR	4.42
226208_at	ZSWIM6	5.87	226394_at	MARCH6	4.41
205773_at	CPEB3	5.85	225111_s_at	NAPB	4.41
205034_at	CCNE2	5.81	208249_s_at	TGDS	4.40
232272_at	ZNF624	5.78	212450_at	SECISBP2L	4.40
228188_at	FOSL2	5.73	227973_at	C2orf69	4.39
213694_at	RSBN1	5.69	204108_at	NFYA	4.39
209894_at	LEPR	5.68	218588_s_at	FAM114A2	4.39
227111_at	ZBTB34	5.64	205087_at	RWDD3	4.39
225222_at	HIAT1	5.64	218498_s_at	ERO1L	4.39
219017_at	ETNK1	5.63	223270_at	CTDSPL2	4.39
226756_at	CCDC71L	5.61	240592_at	LCORL	4.37
201582_at	SEC23B	5.60	206108_s_at	SRSF6	4.37
222108_at	AMIGO2	5.58	201151_s_at	MBNL1	4.36
209657_s_at	HSF2	5.57	210092_at	MAGOH	4.35

206928_at	ZNF124	5.56	203690_at	TUBGCP3	4.35
228961_at	MIER3	5.56	204285_s_at	PMAIP1	4.34
235520_at	ZNF280C	5.56	226109_at	C21orf91	4.34
235798_at	TMEM170B	5.55	218326_s_at	LGR4	4.33
219263_at	RNF128	5.54	221958_s_at	WLS	4.32
212930_at	ATP2B1	5.54	1556121_at	NAP1L1	4.32
236856_x_at	RP4-791M13.3	5.54	226341_at	LOC100506365	4.32
228328_at	KLHL28	5.52	204753_s_at	HLF	4.31
218513_at	TMA16	5.52	204956_at	MTAP	4.31
212731_at	ANKRD46	5.51	226768_at	GIGYF1	4.31
222471_s_at	KCMF1	5.50	224524_s_at	ASB3	4.30
218541_s_at	C8orf4	5.49	228220_at	FCHO2	4.30
227203_at	FBXL17	5.45	244008_at	PARP8	4.30
209681_at	SLC19A2	5.45	226140_s_at	OTUD1	4.29
225956_at	CREBRF	5.42	209838_at	COPS2	4.29
218319_at	PELI1	5.42	225406_at	TWSG1	4.29
217743_s_at	TMEM30A	5.40	205198_s_at	ATP7A	4.28
235387_at	GSTCD	5.40	231871_at	GPR180	4.27
204435_at	NUPL1	5.40	212635_at	TNPO1	4.27
226853_at	BMP2K	5.39	223255_at	G2E3	4.27
1558794_at	NUTM2A-AS1	5.38	218923_at	CTBS	4.26
226339_at	TRUB1	5.34	1558256_at	LINC00662	4.26
210649_s_at	ARID1A	5.32	226337_at	GORAB	4.26
202084_s_at	SEC14L1	5.32	212984_at	ATF2	4.26
226077_at	RNF145	5.32	230534_at	ZNF678	4.26
225475_at	MIER1	5.30	219793_at	SNX16	4.26

218311_at	MAP4K3	5.29	219023_at	AP1AR	4.25
212437_at	CENPB	5.29	222572_at	PDP1	4.24
224827_at	UBTD2	5.29	221823_at	C5orf30	4.24
222783_s_at	SMOC1	5.26	227551_at	ABHD17B	4.24
225438_at	NUDCD1	5.25	215172_at	PTPN20A	4.23
201636_at	FXR1	5.25	212887_at	SEC23A	4.23
227180_at	ELOVL7	5.25	209250_at	DEGS1	4.22
229129_at	HNRNPD	5.23	213424_at	KIAA0895	4.22
224704_at	TNRC6A	5.22	219105_x_a t	ORC6	4.21
205003_at	DOCK4	5.19	225433_at	GTF2A1	4.21
205122_at	TMEFF1	5.18	238609_at	FAM200A	4.21
241808_at	ZC2HC1A	5.17	223540_at	PVRL4	4.20
225978_at	RIMKLB	5.15	226541_at	FBXO30	4.20
209455_at	FBXW11	5.12	225302_at	TMX3	4.20
218401_s_at	ZNF281	5.09	227696_at	EXOSC6	4.19
226939_at	CPEB2	5.08	213761_at	MDM1	4.19
202903_at	LSM5	5.04	218432_at	FBXO3	4.19
223358_s_at	PDE7A	5.04	212149_at	EFR3A	4.18
224894_at	YAP1	5.03	205761_s_at	DUS4L	4.17
227701_at	C10orf118	5.03	223391_at	SGPP1	4.17
241364_at	TMEM57	5.02	224823_at	MYLK	4.17
225717_at	KIAA1715	5.00	213923_at	RAP2B	4.16
201518_at	CBX1	4.99	203748_x_a t	RBMS1	4.16
230083_at	USP53	4.99	200727_s_at	ACTR2	4.16
208876_s_at	PAK2	4.98	202536_at	CHMP2B	4.16
225904_at	CCSAP	4.97	214098_at	KIAA1107	4.16

218668_s_at	RAP2C	4.95	236104_at	HNRNPLL	4.16
213110_s_at	COL4A5	4.95	235763_at	SLC44A5	4.15
220123_at	SLC35F5	4.95	218370_s_at	S100PBP	4.15
212418_at	ELF1	4.92	211137_s_at	ATP2C1	4.14
223324_s_at	TRPM7	4.91	203310_at	STXBP3	4.14
203080_s_at	BAZ2B	4.90	220952_s_at	PLEKHA5	4.14
218446_s_at	TVP23B	4.90	207068_at	ZFP37	4.13
209101_at	CTGF	4.90	232044_at	RBBP6	4.13
205476_at	CCL20	4.86	238496_at	WHSC1L1	4.13
225455_at	TADA1	4.86	209291_at	ID4	4.13
218604_at	LEMD3	4.85	235429_at	EIF3E	4.13
220992_s_at	TRMT1L	4.85	221750_at	HMGCS1	4.13
213618_at	ARAP2	4.85	219062_s_at	ZCCHC2	4.12
203429_s_at	SUCO	4.85	218228_s_at	TNKS2	4.12
212262_at	QKI	4.84	228479_at	SOAT1	4.12
218041_x_at	SLC38A2	4.84	212631_at	STX7	4.11
228964_at	PRDM1	4.83	204651_at	NRF1	4.11
226753_at	FAM76B	4.82	225444_at	UBN2	4.10
206102_at	GINS1	4.82	218478_s_at	ZCCHC8	4.10
220926_s_at	EDEM3	4.82	218817_at	SPCS3	4.09
228680_at	KIF3A	4.81	212633_at	UFL1	4.09
225176_at	LNPEP	4.80	225578_at	MZT1	4.09
203024_s_at	C5orf15	4.79	204433_s_at	SPATA2	4.09
227446_s_at	DHRS4-AS1	4.79	212533_at	WEE1	4.08
203595_s_at	IFIT5	4.77	235170_at	ZNF92	4.08
220104_at	ZC3HAV1	4.77	203432_at	TMPO	4.08
212695_at	CRY2	4.77	204720_s_at	DNAJC6	4.07

212597_s_at	HMGXB4	4.77	201435_s_at	EIF4E	4.07
213552_at	GLCE	4.76	204881_s_at	UGCG	4.06
226719_at	DERL2	4.75	221050_s_at	GTPBP2	4.05
229309_at	ADRB1	4.75	227442_at	COX18	4.05
204363_at	F3	4.74	220387_s_at	HHLA3	4.04
225919_s_at	C9orf72	4.74	1570623_at	RP11-96K19.4	4.04
223197_s_at	SMARCAD1	4.74	213795_s_at	PTPRA	4.04
218733_at	MSL2	4.73	218696_at	EIF2AK3	4.03
226003_at	KIF21A	4.71	226046_at	MAPK8	4.03
235165_at	PARD6B	4.71	229498_at	MBNL3	4.03
227191_at	ITFG1	4.70	221821_s_at	KANSL2	4.03
235048_at	FAM169A	4.67	219990_at	E2F8	4.03
241734_at	SRFBP1	4.65	223444_at	SENP7	4.03
212800_at	STX6	4.65	212907_at	SLC30A1	4.02
219653_at	LSM14B	4.64	222771_s_at	MYEF2	4.02
202543_s_at	GMFB	4.64	206003_at	CEP135	4.02
202820_at	AHR	4.64	209112_at	CDKN1B	4.02
214785_at	VPS13A	4.64	235143_at	SLC10A7	4.01
228697_at	HINT3	4.64	227471_at	HACE1	4.00
225989_at	HERC4	4.64			

miRZip449a vektörü için yapılan analiz, miRZip345 için de aynı şekilde tekrarlanmıştır. Buna göre ilk olarak NT1 IP fraksiyonunda 2 kat ve üzeri zenginleşen proplar bulunmuş, ardından tekrarlayan genler çıkarılmış ve 2657 gen elde edilmiştir. IP fraksiyonunda 4 kat ve üzeri zenginleşen 356 gen; 6 kat ve üzeri zenginleşen 16 gen bulunmuştur. hsa-miR-345'e ait olma ihtimali yüksek, 4 kat ve üzeri değişiklik gösteren genler Çizelge 5.21'de verilmiştir.

Çizelge 5.21 hsa-miR-345 ait olası hedef genlerden IP fraksiyonunda 4 kat ve üzeri zenginleşen genler

Probe Set ID	Gen Adı	FC : 4 kat ve üzeri	Probe Set ID	Gen Adı	FC : 4 kat ve üzeri
238856_s_at	PANK2	9.35	226109_at	C21orf91	4.63
235088_at	C4orf46	8.97	226596_x_at	LOC729852	4.62
206734_at	JRKL	8.91	226181_at	TUBE1	4.61
218465_at	TMEM33	8.83	218588_s_at	FAM114A2	4.61
234509_at	AC005592.3	8.70	212851_at	DCUN1D4	4.60
205191_at	RP2	8.70	217811_at	SELT	4.59
212094_at	PEG10	8.63	211760_s_at	VAMP4	4.58
226155_at	FAM160B1	7.79	225919_s_at	C9orf72	4.58
229533_x_at	ZNF680	7.73	226003_at	KIF21A	4.58
231120_x_at	PKIB	7.70	213424_at	KIAA0895	4.58
209999_x_at	SOCS1	7.56	226394_at	MARCH6	4.57
227803_at	ENPP5	7.54	223324_s_at	TRPM7	4.57
227040_at	NHLRC3	7.14	218196_at	OSTM1	4.57
225922_at	FNIP2	7.07	228220_at	FCHO2	4.57
204506_at	PPP3R1	7.07	204363_at	F3	4.55
227680_at	ZNF326	7.06	235798_at	TMEM170B	4.55
203765_at	GCA	6.98	217743_s_at	TMEM30A	4.55
203276_at	LMNB1	6.92	225366_at	PGM2	4.55
234997_x_at	RP11-488L18.10	6.92	225838_at	EPC2	4.54
219421_at	TTC33	6.92	203011_at	IMPA1	4.53
202980_s_at	SIAH1	6.79	228974_at	ZNF677	4.53
225166_at	ARHGAP18	6.78	208939_at	SEPHS1	4.52
235812_at	CNEP1R1	6.76	226140_s_at	OTUD1	4.52

213146_at	KDM6B	6.74	228106_at	DCAF16	4.52
203362_s_at	MAD2L1	6.69	230534_at	ZNF678	4.49
223497_at	FAM135A	6.64	206102_at	GIN51	4.48
224875_at	C5orf24	6.52	214785_at	VPS13A	4.48
205739_x_at	ZNF107	6.50	226370_at	KLHL15	4.48
208759_at	NCSTN	6.45	244811_at	PHIP	4.48
219263_at	RNF128	6.37	213618_at	ARAP2	4.47
226483_at	TMEM68	6.37	212262_at	QKI	4.47
225237_s_at	MSI2	6.32	211208_s_at	CASK	4.47
228961_at	MIER3	6.30	222572_at	PDP1	4.47
212622_at	TMEM41B	6.27	221193_s_at	ZCCHC10	4.47
225074_at	RAB2B	6.25	218498_s_at	ERO1L	4.46
205668_at	LY75	6.23	220144_s_at	ANKEF1	4.45
203987_at	FZD6	6.19	202228_s_at	NPTN	4.44
226600_at	TMTC3	6.18	231871_at	GPR180	4.44
204732_s_at	TRIM23	6.17	209815_at	PTCH1	4.44
228654_at	SPIN4	6.15	212900_at	SEC24A	4.43
204742_s_at	PDS5B	6.13	203414_at	MMD	4.43
200071_at	SMNDC1	6.13	202557_at	HSPA13	4.43
228033_at	E2F7	6.09	218656_s_at	LHFP	4.42
238002_at	GOLIM4	6.08	241730_at	MYNN	4.42
225222_at	HIAT1	6.00	212984_at	ATF2	4.41
219342_at	CASD1	5.96	225368_at	HIPK2	4.41
219487_at	BBS10	5.94	203024_s_at	C5orf15	4.41
225956_at	CREBRF	5.93	228697_at	HINT3	4.41
205034_at	CCNE2	5.92	204433_s_at	SPATA2	4.41
224308_s_at	INTS2	5.92	212709_at	NUP160	4.41

219297_at	WDR44	5.88	226797_at	MBTD1	4.40
209099_x_at	JAG1	5.87	227973_at	C2orf69	4.40
239650_at	NCKAP5	5.86	212800_at	STX6	4.39
238739_at	IPMK	5.84	218733_at	MSL2	4.39
209657_s_at	HSF2	5.83	201579_at	FAT1	4.38
235520_at	ZNF280C	5.80	204172_at	CPOX	4.37
201582_at	SEC23B	5.79	201151_s_at	MBNL1	4.37
203810_at	DNAJB4	5.76	209838_at	COPS2	4.37
231039_at	NAA30	5.76	223270_at	CTDSPL2	4.36
219303_at	RNF219	5.75	218940_at	METTL21D	4.35
225992_at	MLLT10	5.70	226541_at	FBXO30	4.35
213694_at	RSBN1	5.68	204258_at	CHD1	4.35
205773_at	CPEB3	5.68	226341_at	LOC100506365	4.35
212731_at	ANKRD46	5.67	204783_at	MLF1	4.34
240161_s_at	CDC20B	5.66	219334_s_at	NABP1	4.34
219017_at	ETNK1	5.62	222201_s_at	CASP8AP2	4.34
1558794_at	NUTM2A-AS1	5.60	203690_at	TUBGCP3	4.33
212437_at	CENPB	5.59	204194_at	BACH1	4.33
226756_at	CCDC71L	5.58	228941_at	ALG10B	4.32
228328_at	KLHL28	5.57	226719_at	DERL2	4.32
241808_at	ZC2HC1A	5.57	212907_at	SLC30A1	4.32
235387_at	GSTCD	5.56	227701_at	C10orf118	4.31
234340_at	RP4-614O4.12	5.55	223391_at	SGPP1	4.31
222870_s_at	B3GNT2	5.54	205763_s_at	DDX18	4.30
238732_at	COL24A1	5.54	204285_s_at	PMAIP1	4.30
209894_at	LEPR	5.50	210092_at	MAGOH	4.30

227111_at	ZBTB34	5.46	219105_x_at	ORC6	4.30
226208_at	ZSWIM6	5.44	211137_s_at	ATP2C1	4.30
227203_at	FBXL17	5.44	202536_at	CHMP2B	4.29
220926_s_at	EDEM3	5.40	238609_at	FAM200A	4.29
218311_at	MAP4K3	5.40	204956_at	MTAP	4.29
236856_x_at	RP4-791M13.3	5.39	212633_at	UFL1	4.29
226609_at	DCBLD1	5.38	206108_s_at	SRSF6	4.28
241364_at	TMEM57	5.34	218264_at	BCCIP	4.27
218513_at	TMA16	5.34	220387_s_at	HHLA3	4.27
226339_at	TRUB1	5.32	205087_at	RWDD3	4.26
203909_at	SLC9A6	5.32	222765_x_at	ESF1	4.25
229073_at	PRTG	5.31	218340_s_at	UBA6	4.25
212930_at	ATP2B1	5.31	228789_at	MTMR6	4.24
224827_at	UBTD2	5.31	226768_at	GIGYF1	4.24
202084_s_at	SEC14L1	5.28	235143_at	SLC10A7	4.24
218319_at	PELI1	5.27	208249_s_at	TGDS	4.24
201556_s_at	VAMP2	5.25	217843_s_at	MED4	4.24
215172_at	PTPN20A	5.25	204753_s_at	HLF	4.24
223358_s_at	PDE7A	5.24	220104_at	ZC3HAV1	4.23
226853_at	BMP2K	5.24	200056_s_at	C1D	4.23
225438_at	NUDCD1	5.23	209291_at	ID4	4.23
235165_at	PARD6B	5.21	228039_at	DDX46	4.22
209681_at	SLC19A2	5.20	209112_at	CDKN1B	4.22
204435_at	NUPL1	5.19	218923_at	CTBS	4.22
225475_at	MIER1	5.19	227934_at	KPNA5	4.21
214012_at	ERAP1	5.19	228479_at	SOAT1	4.20

201518_at	CBX1	5.19	225494_at	DYNLL2	4.20
201636_at	FXR1	5.17	205761_s_at	DUS4L	4.20
209455_at	FBXW11	5.17	213761_at	MDM1	4.20
222108_at	AMIGO2	5.15	218478_s_at	ZCCHC8	4.20
218041_x_at	SLC38A2	5.15	225444_at	UBN2	4.20
210649_s_at	ARID1A	5.14	212450_at	SECISBP2L	4.20
218401_s_at	ZNF281	5.12	225658_at	SPOPL	4.20
209101_at	CTGF	5.11	213647_at	DNA2	4.19
224894_at	YAP1	5.11	221958_s_at	WLS	4.19
223197_s_at	SMARCAD1	5.08	218228_s_at	TNKS2	4.19
225176_at	LNPEP	5.08	223255_at	G2E3	4.18
203080_s_at	BAZ2B	5.07	212635_at	TNPO1	4.18
203789_s_at	SEMA3C	5.05	227191_at	ITFG1	4.17
222783_s_at	SMOC1	5.02	214683_s_at	CLK1	4.17
221213_s_at	ZNF280D	5.00	218370_s_at	S100PBP	4.16
205003_at	DOCK4	4.98	206359_at	SOCS3	4.16
222471_s_at	KCMF1	4.98	225406_at	TWSG1	4.16
213552_at	GLCE	4.98	219540_at	ZNF267	4.15
202903_at	LSM5	4.97	1570623_at	RP11-96K19.4	4.14
225978_at	RIMKLB	4.97	223249_at	CLDN12	4.14
212418_at	ELF1	4.96	223444_at	SENP7	4.13
228188_at	FOSL2	4.95	218326_s_at	LGR4	4.12
225717_at	KIAA1715	4.95	226779_at	LMBRD2	4.12
228680_at	KIF3A	4.94	208103_s_at	ANP32E	4.12
213110_s_at	COL4A5	4.94	1568807_a_a t	RBM26-AS1	4.12
227180_at	ELOVL7	4.94	227446_s_at	DHRS4-AS1	4.12

232272_at	ZNF624	4.90	235170_at	ZNF92	4.12
218446_s_at	TVP23B	4.90	212533_at	WEE1	4.12
220992_s_at	TRMT1L	4.90	225070_at	NUS1	4.11
241745_at	LOC100507557	4.88	219467_at	GIN1	4.11
1558256_at	LINC00662	4.88	227696_at	EXOSC6	4.11
229828_at	CDC73	4.87	203310_at	STXBP3	4.11
231832_at	GALNT4	4.86	226520_at	LCOR	4.11
226077_at	RNF145	4.86	213795_s_at	PTPRA	4.10
225902_at	PPIG	4.85	222807_at	C11orf30	4.10
1553974_at	C22orf39	4.85	208891_at	DUSP6	4.10
224704_at	TNRC6A	4.83	219023_at	AP1AR	4.09
218668_s_at	RAP2C	4.83	221823_at	C5orf30	4.09
220123_at	SLC35F5	4.81	218817_at	SPCS3	4.09
225455_at	TADA1	4.80	212149_at	EFR3A	4.09
212597_s_at	HMGXB4	4.80	227551_at	ABHD17B	4.09
218438_s_at	MED28	4.79	223089_at	VEZT	4.09
212695_at	CRY2	4.79	204720_s_at	DNAJC6	4.09
241734_at	SRFBP1	4.77	212230_at	PPAP2B	4.09
230083_at	USP53	4.77	225433_at	GTF2A1	4.08
203595_s_at	IFIT5	4.76	221750_at	HMGCS1	4.08
222825_at	OTUD6B	4.75	235763_at	SLC44A5	4.08
224801_at	NDFIP2	4.74	238496_at	WHSC1L1	4.08
208876_s_at	PAK2	4.74	200727_s_at	ACTR2	4.08
228964_at	PRDM1	4.73	213923_at	RAP2B	4.08
203429_s_at	SUCO	4.72	232044_at	RBBP6	4.07
235048_at	FAM169A	4.72	244008_at	PARP8	4.07

218604_at	LEMD3	4.72	228149_at	C7orf60	4.07
202543_s_at	GMFB	4.71	226580_at	BRMS1L	4.07
221230_s_at	ARID4B	4.71	223540_at	PVRL4	4.07
225989_at	HERC4	4.70	205198_s_at	ATP7A	4.06
205122_at	TMEFF1	4.70	218696_at	EIF2AK3	4.06
226753_at	FAM76B	4.69	226120_at	TTC8	4.06
203302_at	DCK	4.68	220952_s_at	PLEKHA5	4.06
212558_at	SPRY1	4.67	223259_at	ORMDL3	4.05
226939_at	CPEB2	4.66	225091_at	ZCCHC3	4.04
205476_at	CCL20	4.66	219062_s_at	ZCCHC2	4.04
204108_at	NFYA	4.65	219793_at	SNX16	4.04
229309_at	ADRB1	4.65	218541_s_at	C8orf4	4.04
223886_s_at	RNF146	4.65	236104_at	HNRNPLL	4.04
219653_at	LSM14B	4.65	207068_at	ZFP37	4.03
203748_x_at	RBMS1	4.64	202922_at	GCLC	4.02
1556121_at	NAP1L1	4.64	227442_at	COX18	4.02
225904_at	CCSAP	4.64	209774_x_at	CXCL2	4.01
218065_s_at	TMEM9B	4.63	218432_at	FBXO3	4.01
229666_s_at	CSTF3	4.63	203432_at	TMPO	4.00

Buna göre hsa-miR-345 için IP total karşılaştırması sonrası IP kısmında en fazla ifade artışı gösteren gen PANK1 (Pantothenate Kinase 1); hsa-miR-449a içinse PEG10 (Paternaly Expressed 10) olarak bulunmuştur. NT1 IP fraksiyonunda en fazla ifade değişikliği gösteren genler, miRZip vektörlerindeki ifadeleri ile de karşılaştırılmıştır. Her iki miRNA için NT1 örneklerine ait IP fraksiyonunda miRZip vektörlerine göre en az 1.2 ve/veya 1.5 kat fazla farklılığa sahip olan genler yolak analizi için kullanılmıştır. miRZip345 ile yapılan karşılaştırmada, NT1 örneklerinde 1.5 kat ve üzeri farklılık gösteren 32 gen bulunurken 1.2 kat ve üzeri farklı olan 220 adet gen gözlenmiş; miRZip449a kullanılarak yapılan analizde ise 260 gen ve 1.2 kat eşiği kullanıldığında 1062 gen

bulunmuştur. NT1 ve miRZip345 IP 1.5 kat ve üzeri karşılaştırma sonuçları Çizelge 5.22'de; NT1 ve miRZip449a 1.5 kat ve üzeri karşılaştırma sonuçları Çizelge 5.23'de verilmiştir.

Çizelge 5.22 NT1 ve miRZip345 IP (1.5 kat ve üzeri) karşılaştırma sonuçları

Gen Adı	FC :2 kat ve üzeri NT1	FC : 2 kat ve üzeri miRZip345	NT1/miRZip345
ITPR1	2.98	1.38	2.16
MAN2A1	2.34	1.11	2.11
QKI	4.47	2.19	2.04
RGPD3	3.08	1.54	2.00
CALCOCO1	2.58	1.29	2.00
SSFA2	2.90	1.47	1.97
CA11	2.55	1.34	1.90
CXCL2	4.01	2.17	1.85
RP4-61404.12	5.55	3.19	1.74
ACVR2A	3.03	1.76	1.72
DNAJC27	3.38	2.00	1.69
EMC1	3.14	1.86	1.68
TMEM209	2.92	1.73	1.68
TCEAL1	2.06	1.23	1.68
AC005592.3	8.70	5.19	1.67
CERCAM	2.62	1.57	1.67
WDR44	5.88	3.55	1.66
TFAP2C	2.01	1.23	1.64
TMEM182	3.84	2.36	1.62
RABL3	3.02	1.86	1.62
PRDM1	4.73	2.95	1.61

HMMR	2.64	1.67	1.58
SEPSECS	2.31	1.48	1.57
USP38	3.42	2.18	1.57
ZWILCH	2.05	1.32	1.55
SOCS1	7.56	4.91	1.54
RHOB	2.26	1.47	1.54
LOC729852	4.62	3.02	1.53
EGFR	2.07	1.36	1.52
GLS	2.54	1.68	1.51
DDX6	3.42	2.27	1.50

Çizelge 5.23 NT1 ve miRZip449a (1.5 kat ve üzeri) karşılaştırma sonuçları

Gene Adı	FC: 2 kat ve üzeri NT1	FC: 2 kat ve üzeri miRZip449a	NT1/miRZip449a
CDC20B	6.23	1.05	5.91
CXCL2	3.80	1.36	2.80
C8orf4	5.49	2.12	2.58
GTPBP2	4.05	1.69	2.40
ZNF124	5.56	2.37	2.35
TICAM2	3.34	1.45	2.30
RP11-92G12.3	3.61	1.67	2.16
ZMYM5	2.64	1.22	2.16
RECQL	2.85	1.36	2.09
CCDC160	2.25	1.08	2.09
TMTC3	6.30	3.08	2.04
AHR	4.64	2.28	2.03
TMEM209	2.96	1.47	2.01

RYBP	2.82	1.41	2.00
RSBN1L-AS1	3.61	1.82	1.98
SLC30A7	2.65	1.34	1.98
PRTG	5.97	3.02	1.98
HINT3	4.64	2.36	1.97
C5orf24	6.58	3.35	1.97
RP2	8.90	4.54	1.96
NR4A3	2.53	1.30	1.95
GNPDA2	2.88	1.48	1.94
TMEM55A	3.52	1.82	1.94
ACTR2	4.16	2.16	1.93
TRIP12	2.07	1.08	1.92
RCN2	2.31	1.21	1.92
OCIAD1	2.27	1.19	1.91
PEG10	9.35	4.92	1.90
TRIM23	6.21	3.27	1.90
FAM200A	4.21	2.22	1.89
ITPR1	2.78	1.47	1.89
QKI	4.84	2.57	1.88
SRFBP1	4.65	2.47	1.88
PRDM1	4.83	2.57	1.88
DEPDC1	2.36	1.27	1.86
C2orf69	4.39	2.38	1.85
SMAD5	2.34	1.27	1.85
UGCG	4.06	2.20	1.85
MMAA	2.65	1.43	1.85
SEMA3C	4.58	2.50	1.83

ATP6AP1L	3.98	2.17	1.83
JPX	2.29	1.26	1.83
DEGS1	4.22	2.31	1.83
GPN3	3.14	1.72	1.82
FYTTD1	2.11	1.17	1.81
UCHL5	2.41	1.33	1.81
SSFA2	3.12	1.72	1.81
SLC35D1	2.59	1.44	1.80
KLF2	2.25	1.25	1.80
SVIP	2.33	1.30	1.79
ARIH2	3.76	2.10	1.79
PSMD12	2.87	1.60	1.79
ZNF22	2.07	1.16	1.78
SLC16A6	2.50	1.40	1.78
TMBIM4	2.05	1.15	1.78
LOC550643	3.98	2.24	1.77
ZNF280D	6.23	3.52	1.77
ATE1	3.77	2.13	1.77
NFKBIZ	2.52	1.43	1.76
IPO5	2.77	1.57	1.76
LOC100505876	2.63	1.49	1.76
TMEM56	3.27	1.86	1.76
DCUN1D5	2.10	1.20	1.76
SCAMP1	3.09	1.76	1.75
SPIN1	2.88	1.65	1.75
RRM2	3.48	2.00	1.75
STAG3L4	2.33	1.34	1.74

LOC100134361	2.37	1.36	1.74
FAM102B	2.04	1.17	1.74
MYLK	4.17	2.41	1.73
GOLGA8I	2.11	1.22	1.73
MIER1	5.30	3.07	1.73
TDO2	2.03	1.17	1.73
LINC00467	2.78	1.61	1.72
KIAA0101	3.18	1.85	1.72
SCARB2	2.29	1.34	1.72
SOCS1	9.07	5.28	1.72
PUS7L	2.37	1.38	1.72
CMBL	2.14	1.25	1.71
MATR3	2.51	1.47	1.71
USP38	3.47	2.03	1.71
EMC1	2.98	1.75	1.71
CHORDC1	3.74	2.20	1.70
MITF	3.24	1.91	1.69
RNF11	2.29	1.35	1.69
CDK2AP1	2.69	1.59	1.69
DHRS4-AS1	4.79	2.83	1.69
C4orf46	9.10	5.38	1.69
EIF4E	4.07	2.41	1.69
UBE3A	2.15	1.27	1.69
RABL3	3.20	1.90	1.69
ATAD2	2.52	1.49	1.69
BLOC1S6	2.20	1.30	1.69
TDRD1	2.64	1.57	1.68

WIBG	3.67	2.18	1.68
PLSCR1	3.79	2.25	1.68
IDE	2.06	1.22	1.68
COCH	2.60	1.55	1.68
ZC3H6	2.62	1.56	1.68
COX11	2.62	1.56	1.68
GIN51	4.82	2.88	1.67
PIK3CA	2.12	1.27	1.67
CTBS	4.26	2.55	1.67
NUP160	4.58	2.74	1.67
RBM41	2.01	1.21	1.67
MTMR6	4.53	2.71	1.67
ZCCHC10	4.51	2.70	1.67
NUS1	3.97	2.38	1.67
SLC35A3	2.72	1.63	1.66
OSGIN2	3.76	2.26	1.66
GEM	2.25	1.36	1.66
KLHL7	2.83	1.70	1.66
SEC62	2.25	1.36	1.66
MYNN	4.59	2.77	1.66
CMTM6	3.74	2.26	1.65
COQ2	3.23	1.95	1.65
C6orf57	2.83	1.72	1.65
BUB3	3.87	2.35	1.65
MAN2A1	2.22	1.35	1.65
MIS18BP1	2.21	1.34	1.64
DNAJB14	2.51	1.53	1.64

BTG3	3.28	2.00	1.64
APOL1	2.47	1.51	1.64
PLOD2	2.65	1.62	1.64
BAG4	2.06	1.26	1.64
DDX6	3.41	2.08	1.64
MED21	3.28	2.01	1.63
ARL6IP6	3.07	1.88	1.63
CSNK2A1	2.63	1.61	1.63
NAPB	4.41	2.70	1.63
TMED4	2.49	1.53	1.63
GSTA1	2.94	1.81	1.62
ZNF77	2.58	1.59	1.62
FAM172A	2.02	1.24	1.62
MARCH6	3.25	2.01	1.62
MAD2L1	6.73	4.16	1.62
MBNL1	4.36	2.70	1.62
TAF13	2.11	1.31	1.62
MDFIC	2.87	1.77	1.62
CDCA4	3.86	2.39	1.61
STRADB	2.51	1.56	1.61
SENP7	4.03	2.50	1.61
LEPROTL1	2.67	1.66	1.61
ZMAT3	2.24	1.39	1.61
HMMR	2.46	1.53	1.60
DDX46	3.95	2.46	1.60
SNX6	2.04	1.27	1.60
MRPS36	2.44	1.52	1.60

ACVR2A	2.87	1.79	1.60
CLIC4	2.38	1.49	1.60
COA1	3.49	2.19	1.60
RFX3	2.94	1.84	1.60
MSI2	6.83	4.28	1.60
DNAJA2	3.25	2.04	1.60
PDS5B	6.53	4.09	1.60
FPGT	3.10	1.95	1.59
MTRF1	3.04	1.91	1.59
KIAA1107	4.16	2.61	1.59
TMEM33	9.12	5.74	1.59
LIPA	2.95	1.85	1.59
WTAP	2.66	1.67	1.59
POLK	2.93	1.84	1.59
TAF1B	2.19	1.38	1.59
PMAIP1	4.34	2.74	1.59
SELT	4.50	2.84	1.58
AP1AR	4.25	2.69	1.58
GOLGA7	2.08	1.32	1.58
TMOD3	2.37	1.50	1.58
ARL15	3.29	2.08	1.58
INIP	2.44	1.54	1.58
NAA38	3.14	1.99	1.58
MOSPD1	2.00	1.27	1.58
ALCAM	2.63	1.67	1.58
PCGF5	3.06	1.94	1.58
FAM122B	3.07	1.95	1.58

LRRC40	2.86	1.82	1.57
CERCAM	2.69	1.71	1.57
NHLRC2	2.84	1.81	1.57
LLPH	2.48	1.58	1.57
CLASP2	2.82	1.80	1.57
ZCCHC11	2.35	1.49	1.57
C5orf15	4.79	3.06	1.57
MZT1	4.09	2.61	1.57
NAA15	2.10	1.34	1.56
PIGA	2.58	1.65	1.56
ZNF706	3.29	2.11	1.56
SCYL2	3.01	1.93	1.56
CFL2	3.11	2.00	1.56
ABHD17B	4.24	2.72	1.56
TCEB1P3	2.29	1.47	1.56
RBM39	2.98	1.92	1.56
FAM198B	3.09	1.99	1.55
SLC30A1	4.02	2.59	1.55
LINC00657	2.88	1.85	1.55
SSX2IP	3.79	2.44	1.55
MRPL42	3.62	2.33	1.55
SNAI1	2.20	1.42	1.55
LOC100506365	4.32	2.79	1.55
C16orf87	3.44	2.22	1.55
ARL5A	2.46	1.59	1.55
TWSG1	4.29	2.77	1.55
NDUFS1	2.85	1.84	1.55

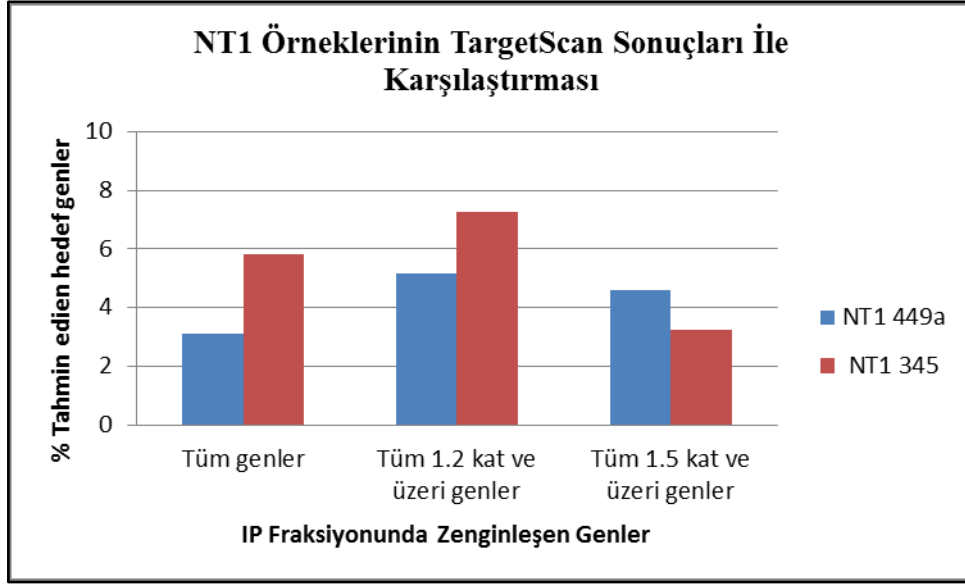
PBRM1	2.85	1.84	1.55
LOC284023	2.68	1.74	1.55
NDFIP2	4.46	2.89	1.54
TMEM245	2.59	1.68	1.54
SLAIN1	2.38	1.55	1.54
CNTN1	3.25	2.11	1.54
APOL3	2.51	1.63	1.54
ITFG1	4.70	3.06	1.54
SKP2	2.05	1.34	1.53
ZBTB47	2.06	1.34	1.53
RICTOR	4.45	2.91	1.53
LOC401397	2.81	1.83	1.53
NOC3L	2.21	1.44	1.53
RP11-350F4.2	2.59	1.69	1.53
KRR1	2.62	1.71	1.53
ATP7A	4.28	2.80	1.53
CSNK1G3	3.05	2.00	1.53
TMCO1	3.19	2.09	1.53
ZFR	2.43	1.60	1.53
NEDD1	2.90	1.90	1.53
RP11-488L18.10	7.19	4.72	1.53
ZNF326	7.40	4.85	1.52
ATP8A1	2.96	1.95	1.52
DCK	4.53	2.98	1.52
PPP1CB	3.01	1.97	1.52
DYNC1LI2	2.59	1.70	1.52

CNST	2.76	1.81	1.52
CLK1	4.43	2.91	1.52
HNMT	2.18	1.43	1.52
SEPHS1	4.43	2.92	1.52
RAB4A	2.26	1.49	1.52
UGGT2	3.07	2.02	1.52
COG6	2.01	1.33	1.52
EMB	2.20	1.45	1.52
GPR180	4.27	2.82	1.52
TMX3	4.20	2.77	1.52
RB1	3.33	2.20	1.52
PJA2	3.86	2.55	1.52
MMGT1	2.41	1.59	1.51
GRPEL2	2.22	1.47	1.51
HDDC2	2.23	1.47	1.51
ELOVL7	5.25	3.47	1.51
GPATCH2L	2.67	1.77	1.51
SKA2	3.24	2.15	1.51
GULP1	3.87	2.56	1.51
CCSER2	2.08	1.38	1.51
DHFR	2.73	1.81	1.51
C2orf49	2.75	1.83	1.51
EIF4G3	3.39	2.25	1.51
GAS2L3	2.93	1.95	1.51
ELOVL5	3.58	2.38	1.51
TBL1XR1	2.16	1.44	1.50
UBE2J1	2.45	1.63	1.50

MTBP	2.27	1.51	1.50
PALLD	2.79	1.86	1.50
SPIN4	6.35	4.23	1.50
ANGPT1	2.91	1.94	1.50
SOCS3	4.56	3.04	1.50

Buna göre hsa-miR-345 için NT1 IP fraksiyonunda en fazla farklılık gösteren gen ITPR1 (Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1); hsa-miR-449a içinse CDC20B (Cell Division Cycle 20B) olarak bulunmuştur. Her iki miRNA için de daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen onaylanmış hedef genler araştırılmıştır. Bilinen hedef genlerin araştırılması için miRWalk veritabanı kullanılmıştır. hsa-miR-449a için farklı dokularda tanımlanmış 114 gen bulunmuştur. Bunlardan PEG10 ve ITPR1 1.5 kat ve üzeri farklılık gösteren liste ile ortaktır. hsa-miR-345 için 113 gen bulunmuştur. Bunlardan hiçbiri 1.5 kat ve üzeri farklılık gösteren listeyele ortak bulunmamıştır. 1.2 kat eşik değeri kullanıldığında ise 6 adet gen (C1D, CLDN12, EIF4E, MFSD9, SCARB2, SIX1) daha önce hedef olarak bulunan listenin içinde gözlenmiştir. Her iki miRNA için de ortak olan genlerin varlığı da araştırılmıştır. 15 adet gen (ITPR1, MAN2A1, QKI, SSFA2, CXCL2, ACVR2A, EMC1, TMEM209, CERCAM, RABL3, PRDM1, HMMR, USP38, SOCS1, DDX6) 1.5 kat ve üzeri listeler için her iki miRNA'da ortak bulunmuştur.

NT1 ve miRZip örnekleri karşılaştırmasında en fazla farklılık gösteren genlerin miRNA bağlanma alanlarını araştırdığımızda ise hsa-miR-449a'ya ait olası hedeflerden TMEM55A; hsa-miR-345 için PRDM1 ilgili miRNA'ların bağlanma alanlarına (7mer-8m; miRNA'ya ait 2-8 seed bölgesi ile tam uyum) sahip olarak gözlenmiştir. 1.2 kat ve üzeri liste ile karşılatırmada hsa-miR-449a için 55 miRNA TargetScan hedef tahminleri ile ortak bulunurken, hsa-miR-345 için 32 ortak gen vardır. Farklı kat eşiklerinin TargetScan sonuçları ile karşılaştırması Şekil 5.62'de verilmiştir. Buna göre 1.2 kat ve üzeri liste ile daha iyi sonuçlar alınmıştır.



Şekil 5.62 NT1 örneklerine ait gen ifadelerinin TargetScan sonuçları ile karşılaştırması. İfade olan bütün genler, IP fraksiyonunda miRZip örneklerine göre 1.2 ve 1.5 kat değişim gösteren genler oranlama için kullanılmıştır

5.13.5. HSA-MİR-449A VE HSA-MİR-345'E AİT OLASI HEDEF GENLER İÇİN YOLAK ANALİZİ

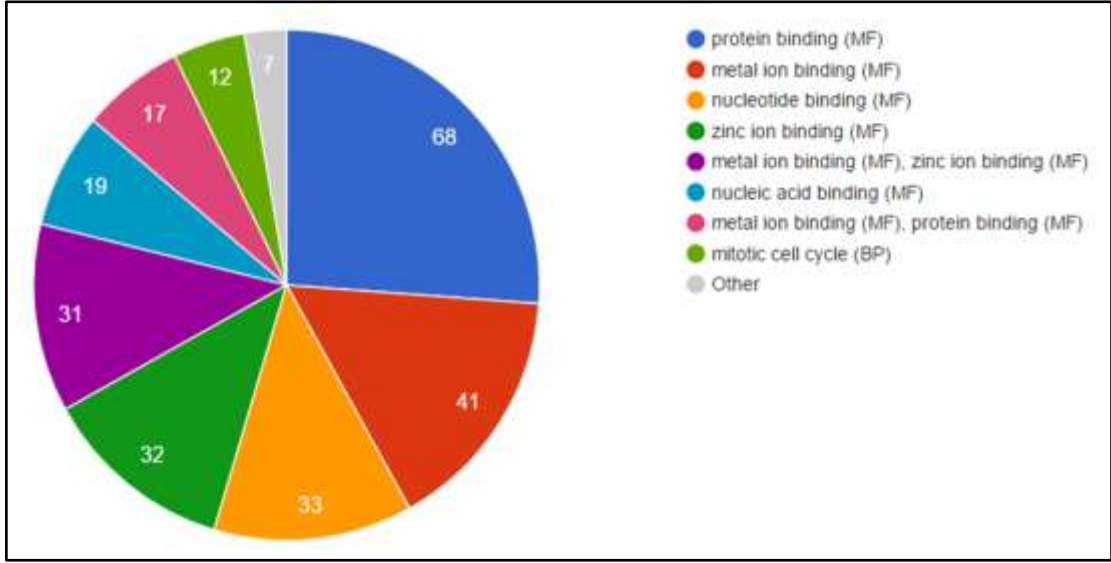
miRNA'ların olası hedefleri olarak analiz sonucu NT1 IP fraksiyonunda miRZip örneklerine göre 1.5 kat ve/veya üzeri farklılık gösteren genler seçilmiştir. Genlerin en fazla zenginleştiği yolların tespit edilmesi için WebGestalt arayüzü kullanılarak KEGGPathway veritabanı araştırılmıştır. Meme kanseri hücrelerindeki moleküler fonksiyonlarının belirlenmesi için ise GeneCodis arayüzünden faydalanılmıştır. Buna göre hsa-miR-449a'ya ait olası hedeflerin en anlamlı şekilde ubiquitin aracılı proteoliz yolağı, insülin sinyal yolağı, hücre siklusu, mTOR sinyal yolağında zenginleştiği bulunurken; en fazla gözelenen gen moleküler fonksiyonları arasında protein bağlanması, mitotik hücre siklusu bulunmaktadır. Hsa-miR-449a için yapılan 1.2 kat ve üzeri farklılık gösteren genlere ilişkin sonuçlar Çizelge 5.24'de; 1.5 kat ve üzeri fark göstermiş genler ile elde edilen yolak analiz sonuçları Çizelge 5.25'de; moleküler fonksiyonlara ilişkin sonuçlar ise Şekil 5.62'de verilmiştir.

Çizelge 5.24 Hsa-miR-449a'ya ait 1.2 kat ve üzeri fark gösteren olası hedefler kullanılarak yapılan yolak analizi

Yolak Adı	Gen Sayısı	p-değeri
Ubiquitin aracılı proteolizis	21	9.71E-10
Metabolik yollar	65	2.60E-09
Endoplazmik retikulumda protein işlenmesi	21	1.55E-08
Hücre Siklusu	17	1.74E-07
Kanser yolları	27	4.77E-07
TGF-beta sinyal yolağı	12	1.30E-05
RNA degradasyonu	11	1.42E-05
p53 sinyal yolağı	10	5.72E-05
Küçük hücreli akciğer kanseri	11	6.17E-05

Çizelge 5.25 Hsa-miR-449a'ya ait 1.5 kat ve üzeri fark gösteren olası hedefler kullanılarak yapılan yolak analizi

Yolak Adı	Gen Sayısı	p-değeri
Ubiquitin aracılı proteoliz	6	0.0106
Endoplazmik retikulumda protein işlenmesi	6	0.0132
İnsülin sinyal yolağı	5	0.0247
mTOR sinyal yolağı	3	0.0318
Metabolik yollar	15	0.0318
Hücre Siklusu	4	0.0406
Melanoma	3	0.0406
Adherens bağlanma	3	0.0406



Şekil 5.63 hsa-miR-449a ait 1.5 kat ve üzeri fark gösteren olası hedefler kullanılarak yapılan gen ontolojisi analizi. Analiz için p-değeri <0.001 olarak alınmıştır.

Hsa-miR-345 için yapılan analiz sonucu elde edilen yolaklar arasında sitokin-sitokin reseptör etkileşim yolağı, kalsiyum sinyal yolağı bulunmaktadır. Gen ontolojisi analizi sonucunda ise nükleotid bağlanması, GTP bağlanması en fazla zenginleşen fonksiyonlar olarak gözlenmiştir. Hsa-miR-345'e ait 1.5 kat ve üzeri fark gösteren olası hedefleri için yapılan yolak analiz sonuçları Çizelge 5.27'de; moleküler fonksiyonlara ilişkin sonuçlar ise Şekil 5.63'de verilmiştir

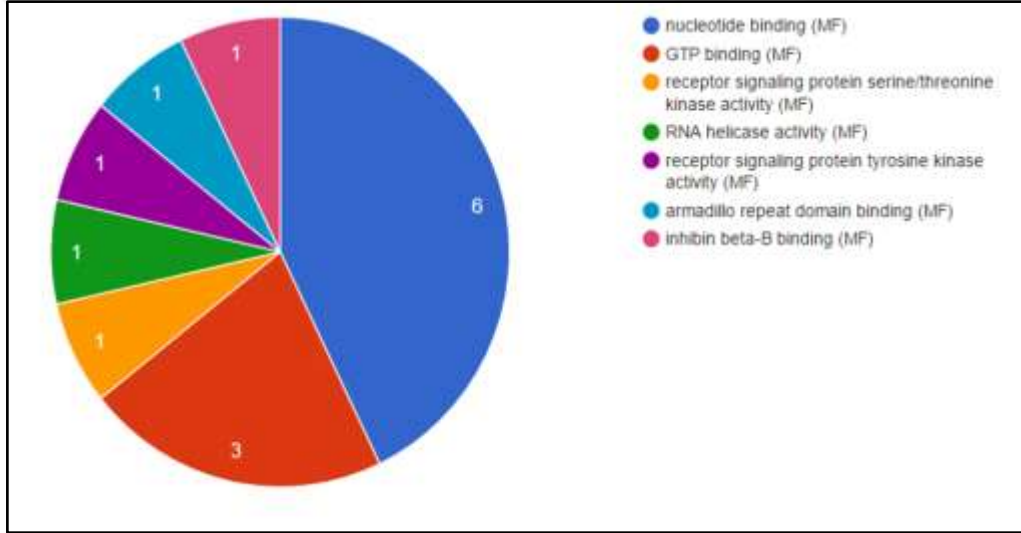
Çizelge 5.26 Hsa-miR-345 1.2 kat ve üzeri fark gösteren olası hedefleri kullanılarak yapılan yolak analizi

Yolak Adı	Gen Sayısı	p-değeri
Melanoma	4	0.0104
Prostat kanseri	4	0.0156
Ubiquitin aracılı proteolizis	4	0.0208
Kanser yolakları	6	0.0208
Kronik myeloid leukemia	3	0.0208
Glioma	3	0.0208
Pankreatik kanser	3	0.0208

Metabolik yollar	13	0.0208
------------------	----	--------

Çizelge 5.27 Hsa-miR-345 1.5 kat ve üzeri fark gösteren olası hedefleri kullanılarak yapılan yolak analizi

Yolak Adı	Gen Sayısı	p-değeri
Sitokin-sitokin etkileşim yolağı	3	0.0035
Gap junction	2	0.0035
GnRH sinyal yolağı	2	0.0035
Kalsiyum sinyal yolağı	2	0.0079



Şekil 5.64 hsa-miR-345'e ait 1.5 kat ve üzeri olası hedefler kullanılarak yapılan gen ontolojisi analizi. Analiz için p-değeri <0.035 olarak alınmıştır

5.13.6. NT1 VE MİRZİP VEKTÖRLERİNE AİT IP FRAKSİYONLARINDA İLGİLİ MİRNA ZENGİNLEŞMESİNİN KONTROLÜ

NT1 ve miRZip vektörleri ile hazırlanan IP örneklerinde olası hsa-miR-345 ve hsa-miR-449a zenginleşmesinin karşılaştırması için GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)'den faydalanılmıştır. Bu analizin amacı miRZip vektörleri ve AGO2-IP uygulamasının etkinliği hakkında fikir sahip olmaktır. Bu amaçla GSEA analizinde sunulan miRNA hedef motif veritabanları kullanılarak miRZip ve NT1 IP kısımlarında zenginleşmiş olan genleri

hedefleyen miRNA'lar araştırılmıştır. Analiz miRNA'lara ait bağlanma alanları ile gen hedefleri arasındaki motifleri karşılaştırarak gerçekleştirilmektedir ve analiz sonucunda miRNA'lar en çok zenginleşenden en az hedefe sahip olana doğru, numaralı şekilde sıralanmaktadır. Örneğin; miRZip449a vektörüne ait IP örneklerinden elde edilmiş ve bu fraksiyonda en az 2 kat ve üzeri artış göstermiş genler kullanılarak hsa-miR-449a'nın olası hedeflerine bakılıp, ilgili miRNA'nın kaçınıcı sırada zenginleştiği bulunabilmektedir. GSEA sonuçları ES (zenginleşme skoru) ve NES (normalize zenginleşme skoru) değerleri ile birlikte Çizelge 5.26'da verilmiştir.

Çizelge 5.28 miRZip449a, miRZip345 ve NT1'a ait IP fraksiyonlarından elde edilen GSEA sonuçları

Sıra	NT1 (hsa-miR-449a) IP	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
7	CACTGCC,MIR-34A,MIR-34C,MIR-449	0.29	1.92	0	0.029
Sıra	miRZip449a IP	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
21	CACTGCC,MIR-34A,MIR-34C,MIR-449	0.29	1.6	0.022	0.235
Sıra	NT1 (hsa-miR-345) IP	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
139	AGTCAGC,MIR-345	0.22	0.93	0.558	0.708
Sıra	miRZip345 IP	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
145	AGTCAGC,MIR-345	0.23	0.94	0.545	0.687

Her iki miRZip vektörü için de ilgili miRNA'lar, NT1 örneklerine daha düşük sırada zenginleşmişlerdir. Bu sonuç, NT1 IP fraksiyonlarının ilgili miRNA'ların hedef genleri ile daha fazla zenginleştiğinin kanıtı olabilir.

5.14. TRASTUZUMABA DUYARLI MİRNA'LAR KULLANILARAK NETWORK ANALİZİ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Tez çalışmasının bu bölümünde, miRNA aracılı mekanizmaların ilaç uygulaması sırasındaki kompleks rolleri sistemik düzeyde açıklanmaya çalışılmıştır. Bunun için ilaca duyarlı miRNA'lar kullanılarak homojen network modelleri yaratılmış ve miRNA çiftleri (miRNA-miRNA) arasındaki etkileşim hedef alınan ortak yollar üzerinden açıklanmıştır. Böylece fonksiyonel olarak birbirine benzer miRNA grupları araştırılmış, trastuzumab uygulaması sırasında etkinlik gösteren miRNA aracılı mekanizmalar açıklanmaya çalışılmıştır. Bunun için mikrodizin analizi sonucu elde edilen trastuzumaba duyarlı miRNA'lar kullanılmıştır. Her iki hücre hattı için de ayrı ayrı network analizi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak duyarlı miRNA'ların iki farklı (TargetScan ve Diana MicroT) veritabanı kullanılarak olası hedef genleri elde edilmiştir. Her iki veritabanında da ortak hedeflere sahip olmayan miRNA'lar çalışmaya dâhil edilmemiştir. BT474 hücre hattına ait miRNA'lardan 57 adet; SKBR3'den 49 adet ortak hedef genlere sahip olmadığı için datadan çıkarılmıştır. Ardından WebGestalt arayüzü kullanılarak ilgili hedef genler ile yollar analizi yapılmış, her bir miRNA'nın hedeflediği yollar bulunmuştur. Son olarak network görüntülemesi gerçekleştirilmeden önce hipergeometrik dağılım analizi ile istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) etkileşim gösteren miRNA çiftleri bulunmuş ve network analizinde kullanılmışlardır. İfadesi azalan ve artan miRNA'lar birlikte incelenmiştir. Analizde kullanılan toplam yollar sayısı, miRNA çiftlerinin sayısı ve gen sayısı Çizelge 5.29'de verilmiştir.

Çizelge 5.29 Network analizi için kullanılan son dataya ilişkin bilgiler

Data	Etkileşim gösteren miRNA çiftlerinin toplam sayısı	Hedeflenen/paylaşılan toplam yollar sayısı	Hedeflenen genlerin toplam sayısı
BT474	112	152	4140
SKBR3	59	146	2433

5.14.1. TRASTUZUMABA DUYARLI MİRNA'LAR TARAFINDAN EN ÇOK HEDEFLENEN GENLER

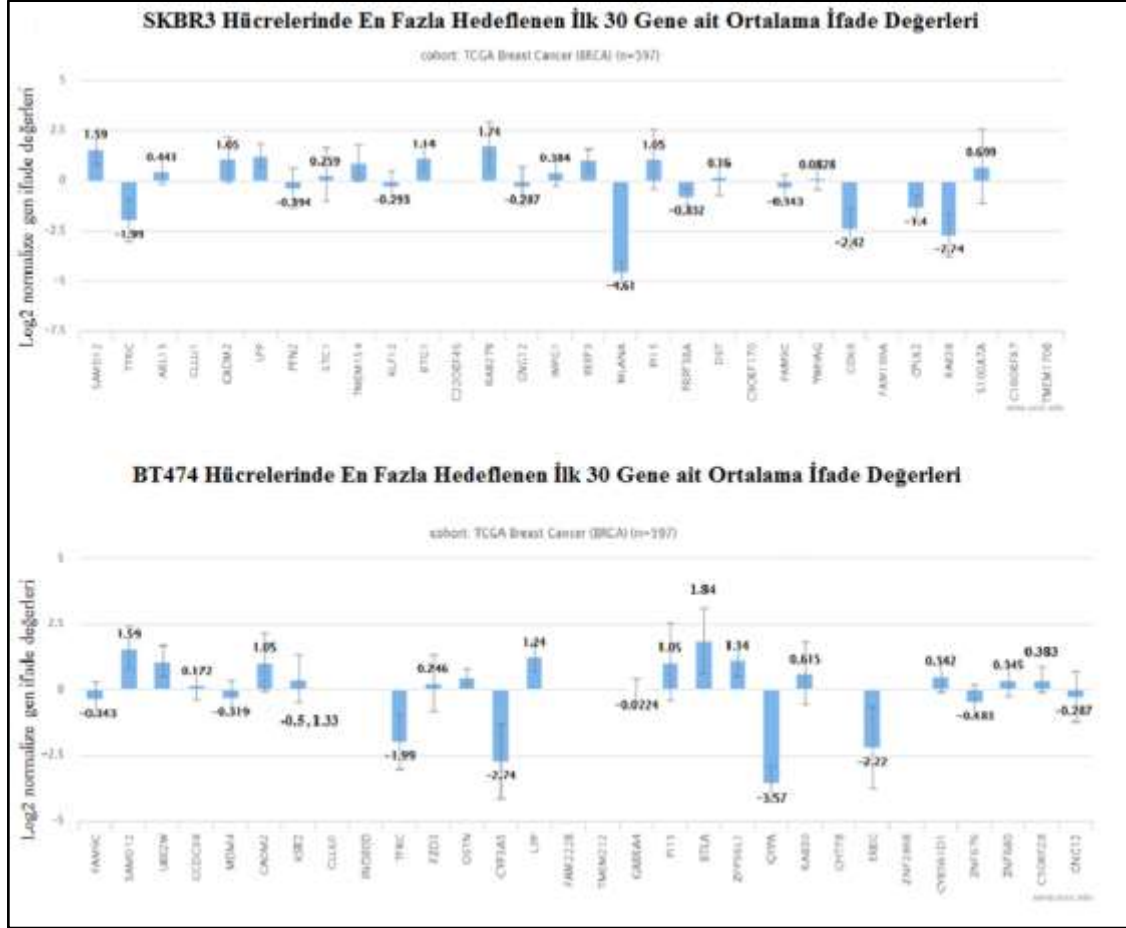
En fazla oranda hedeflenen olası genler networkdeki görülme frekanslarına göre sıralanmıştır. Buna göre BT474 hücrelerinde miRNA çiftleri tarafından paylaşılmış 4140 gen vardır. BT474 hücrelerinde FAM9C, 19 miRNA tarafından hedef olarak paylaşılarak en fazla hedeflenen gen olmuştur. Onu, 16 miRNA tarafından hedeflenen SAMD12 ve UBE2W takip etmiştir. SKBR3 hücrelerinde SAMD12 en çok hedeflenen gen olarak bulunmuştur ve 12 miRNA tarafından paylaşılmıştır. ARL15 ve TFRC 10 miRNA tarafından hedeflenerek onu takip etmiştir. Network içerisinde görülme frekansları temel alındığında en çok hedeflenen ilk 30 gen Çizelge 5.30'de verilmiştir.

Çizelge 5.30 BT474 ve SKBR3 networklerinde trastuzumab duyarlı miRNA'lar tarafından en fazla hedeflenen ilk 30 gen

Gene Adı	BT474'de gen frekansı	Gene Adı	SKBr3'de gen frekansı
FAM9C	19	SAMD12	12
SAMD12	16	TFRC	10
UBE2W	15	ARL15	10
CCDC38	13	CLLU1	9
MDM4	13	CADM2	9
CADM2	13	LPP	9
KSR2	13	PFN2	8
CLLU1	13	STC1	8
INO80D	13	TMEM154	8

TFRC	12	KLF12	8
FZD3	12	BTG1	8
OSTN	12	C22ORF46	8
CYP3A5	12	RAB27B	8
LPP	12	GNG12	8
FAM222B	11	IMPG1	8
TMEM212	11	REEP3	7
GABRA4	11	MLANA	7
PI15	11	PI15	7
BTLA	11	PRPF38A	7
ZFP36L1	11	DST	7
GYPA	11	C9ORF170	7
RAB30	11	FAM9C	7
CHTF8	10	YWHAG	7
EREG	10	CDK6	7
ZNF286B	10	FAM169A	7
CYB561D1	10	CPLX2	7
ZNF676	10	RAB3B	7
ZNF680	10	S100A7A	7
C5ORF28	10	C16ORF87	7
GNG12	9	TMEM170B	7

İlk 30 gen meme kanseri örneklerindeki ifadeleri açısından da araştırılmıştır. Meme kanseri örneklerinin araştırılması için TCGA (The Cancer Genome Atlas)'da bulunan invazif meme kanseri datası kullanılmıştır. BT474 hücrelerinde 23 gen meme kanseri ile ilişkili ve ifadesi değişken bulunmuşken, SKBR3 hücrelerinde bu sayı 24'tür.



Şekil 5.65 En çok hedeflenen ilk 30 genin TCGA meme kanseri mikrodizin datasında ifade analizi. İfade değerleri log2 tabanında her bir gen için sinyaller lowess normalizasyon kullanılarak referans sinyale oranlandıktan sonra bulunmuştur

İlgili genlerin 3'UTR kısmına ait uzunluklar, trastuzumab uygulamasında miRNA aracılı regülasyon için anahtar olabilecekleri göz önüne alınarak araştırılmıştır. 3'UTR kısımlarının kontrolü için TargetScan veritabanından yararlanılmıştır. Network içinde yüksek frekansa sahip ve en fazla hedeflenen genlerin gerçekten normalde daha uzun 3'UTR kısımlarına sahip olduğu ve daha fazla miRNA bağlanma alanı içerebileceği gözlenmiştir. İlk 5 gene ait 3'UTR uzunlukları Çizelge 5.31'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.31 Networkde en fazla hedeflenen genler ve 3'UTR uzunlukları

Gen Adı	BT474'de gen frekansı	Hedef bölge uzunluğu (3'UTR)
SAMD12	19	8254 nükleotid
FAM9C	16	5260 nükleotid
UBE2W	15	7882 nükleotid
CCDC38	13	2341 nükleotid
MDM4	13	9420 nükleotid
CADM2	13	7664 nükleotid
Gen Adı	SKBR3'de gen frekansı	Hedef bölge uzunluğu (3'UTR)
SAMD12	12	8254 nükleotid
ARL15	10	2650 nükleotid
TFRC	10	4699 nükleotid
CLLU1	9	2809 nükleotid
CADM2	9	7664 nükleotid
LPP	9	16193 nükleotid

5.14.2. TRASTUZUMAB UYGULAMASI SONRASI FONKSİYONEL OLARAK BAĞLANTILI MİRNA ÇİFTLERİ

Network yapılandırması gerçekleştirildikten sonra görüntüleme Cytoscape programı ile sağlanmış ve Network Anlayzer eklentisi kullanılarak node'lara ait sentralite dereceleri hesaplanmıştır. Sentralite derecesi (degree centrality) basit bir şekilde bir node'un ne kadar komşusu olduğunu ve diğer node'lar ile ne derecede etkileşim içinde olduğunu ölçer, en çok kullanılan network sentralite ölçümlerinden biridir. Buna göre sentralite derecesi

yüksek olan node'lar daha fazla etkileşim içinde olan, network için anahtar role sahip olabilecek moleküllerdir.

Trastuzumab ile muamele edilmiş SKBR3 hücrelerinde 146 yolağın en az iki miRNA tarafından paylaşıldığı gözlenmiştir. Bu yolaklar toplam 69 miRNA'yı birbirine bağlamıştır. hsa-miR-3976 sentralite derecesi 9 bulunarak network içindeki en “merkezi” (sentral) node olarak tanımlanmıştır. Onu 8 sentralite derecesine sahip hsa-miR-548b-5p ve hsa-miR-3194-5p izlemiştir. Network içinde en yüksek sentralite skorlarına sahip miRNA'lardan hsa-miR-3976, hsa-miR-190a ve hsa-miR-10b-5p trastuzumab uygulanan hücrelerde en fazla ifadesi değişen ve Ek-2'de gösterilen miRNA'lar arasında da yer almaktadır.

BT474 hücrelerinde 152 yolak iki miRNA tarafından paylaşılmıştır. Network içinde 112 miRNA birbiri ile etkileşim halindedir. İfadesi azalan miRNA'ların çoğalan miRNA'lara göre network'e daha fazla katkı sağladığı gözlenmiştir. hsa-miR-3671, sentralite derecesi 19 olarak bulunarak network'deki en merkezi node olmuştur. Onu hsa-miR-4474-5p 16 sentralite skoru; hsa-miR-559a 15 sentralite skoru ile takip etmiştir. Yine en yüksek sentraliteye sahip olan hsa-miR-3671 Ek-1'de görülebileceği gibi yüksek oranda ifade değişikliğine sahiptir.

BT474 ve SKBR3 networklerinde en yüksek sentralite derecesine sahip ilk 15 miRNA Çizelge 5.32'de gösterilmiştir. SKBR3 ve BT474'e ait network görüntüleri Ek-7'de verilmiştir.

Çizelge 5.32 En yüksek sentralite derecesine sahip olan ilk 15 miRNA

Node adı	SKBR3 sentralite derecesi	Node adı	BT474 sentralite derecesi
hsa-miR-3976	9	hsa-miR-3671	19
hsa-miR-548b-5p	9	hsa-miR-4474-5p	16
hsa-miR-4480	9	hsa-miR-559	15
hsa-miR-548d-5p	8	hsa-miR-4517	15

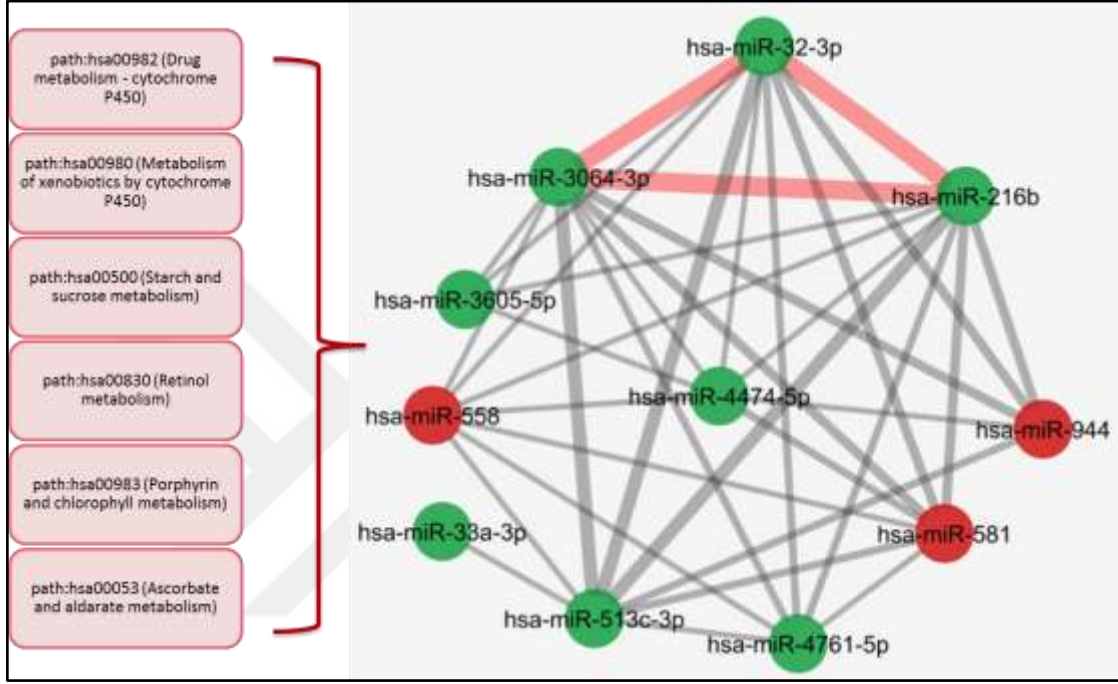
hsa-miR-3194-5p	8	hsa-miR-485-5p	14
hsa-miR-4259	8	hsa-miR-558	13
hsa-miR-519e-5p	8	hsa-miR-29b-2-5p	13
hsa-miR-4478	8	hsa-miR-150-3p	12
hsa-miR-4496	7	hsa-miR-411-3p	12
hsa-miR-4635	7	hsa-miR-526b-3p	12
hsa-miR-581	7	hsa-miR-93-3p	11
hsa-miR-10b-5p	7	hsa-miR-551b-5p	10
hsa-miR-769-5p	6	hsa-miR-5579-3p	10
hsa-miR-190a-5p	6	hsa-miR-146b-5p	10
hsa-miR-216b	6	hsa-miR-3121-3p	10

5.14.3. MİRNA-MİRNA NETWORKLERİ İÇİN KÜMELEŞME ANALİZİ

SKBR3 ve BT474 networkleri elde edildikten sonra birbirileri ile sıkı şekilde etkileşim içinde olabilecek miRNA gruplarının varlığının araştırması için kümeleşme analizi (cluster) yapılmıştır. Burada amaç networke hakim olan grupların ve onları bir arada tutan ortak etkileşim çeşitlerinin (yolakların) ortaya çıkarılmasıdır. Bu amaçla edge'lerin değerini, yani doe'ları bir araya getiren yolakları, temel alan MCL cluster algoritması kullanılmıştır.

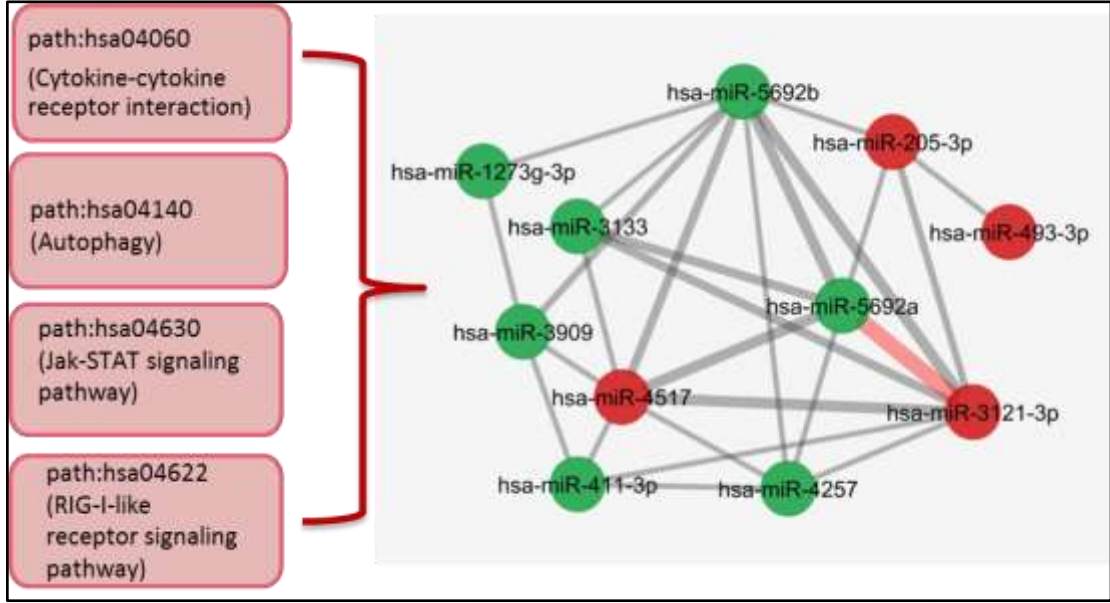
BT474 miRNA-miRNA network analizinde 2.9, kümeleşme analizi için kullanılan miRNA çiftlerin minimum edge değeri olarak belirlenmiştir. Detaylı değerlendirme için ilk üç küme seçilmiştir. Kümeler ifadesi azalan ve artan miRNA'ların etkileşimde oluşmaktadır. en büyük küme içerisinde miRNA'ların çoğunluğu hsa-miR-216b ve hsa-miR-3064-3p

etrafında toplanmıştır. hsa-miR-216b, hsa-miR-3064-3p ve hsa-miR-32-3p arasında güçlü bağlantı saptanmıştır. Küme içerisindeki diğer etkileşimler de bu miRNA'ları bir araya getiren yollar tarafından sağlanmıştır. Yollar; path:hsa00982 (Drug metabolism - cytochrome P450), path:hsa00980 (Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450), path:hsa00500 (Starch and sucrose metabolism), path:hsa00830 (Retinol metabolism) olarak bulunmuştur. Bu küme için görüntü Şekil 5.66'da verilmiştir.



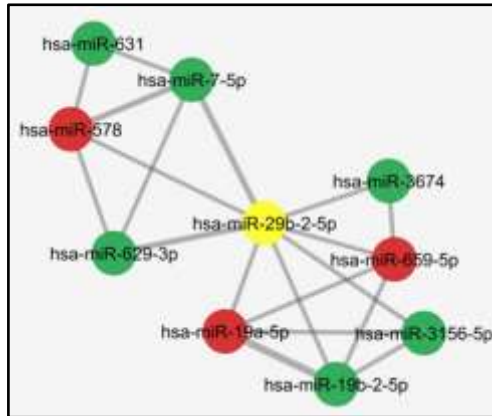
Şekil 5.66 BT474 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan en büyük küme. Kümenin metabolik yollar tarafından düzenlendiği görülmektedir. Kırmızı ile işaretli edge en kuvvetli etkileşimi göstermektedir. Yeşil node'lar ifadesi azalan, kırmızı node'lar ifadesi artan miRNA'ları göstermektedir

İkinci büyük kümede hsa-miR-4517 merkezi konumdadır ve hsa-iR-3121-3p ile hsa-miR-5692a arasında güçlü etkileşim vardır. Bu küme için hâkim olan yollar; path:hsa04060 (Cytokine-cytokine receptor interaction), path:hsa04140 (Autophagy), path:hsa04630 (Jak-STAT signaling pathway), path:hsa04622 (RIG-I-like receptor signaling pathway) şeklindedir. Küme görüntüsü Şekil 5.67'de verilmiştir.



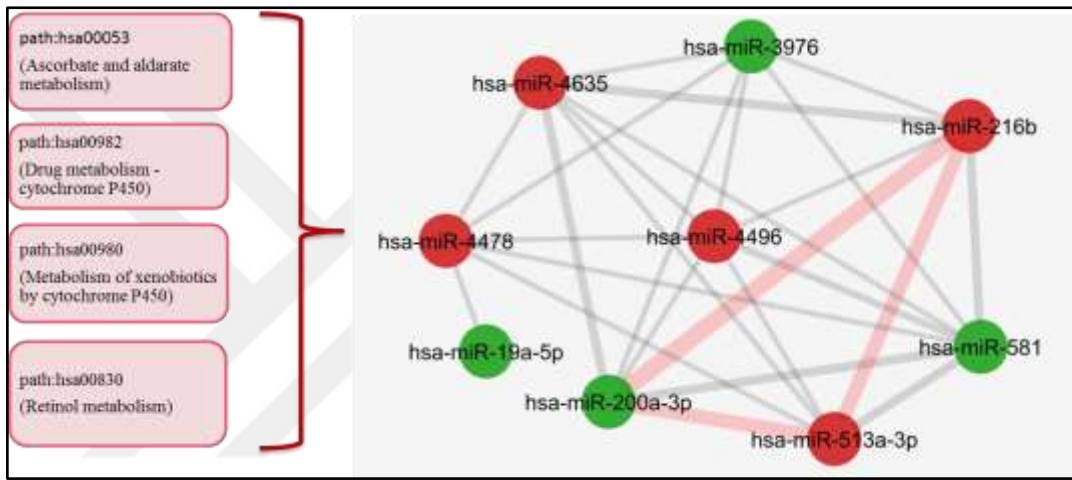
Şekil 5.67 BT474 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan ikinci büyük küme. Kümenin kanser yolları tarafından düzenlendiği görülmektedir. Kırmızı ile işaretli edge en kuvvetli etkileşimi göstermektedir. Yeşil node'lar ifadesi azalan, kırmızı node'lar ifadesi artan miRNA'ları göstermektedir

Son kümede ise hsa-miR-26b-2-5p'nin iki farklı grubu birbirine bağladığı görülmüştür. Bu gruplardan ilki path:hsa05220 (Chronic myeloid leukemia), path:hsa04010 (MAPK signaling pathway) grupları içerirken, ikinci grup path:hsa04060 (Cytokine-cytokine receptor interaction), path:hsa04630 (Jak-STAT signaling pathway) yollarını içerir. Küme görüntüsü Şekil 5.68'de verilmiştir.



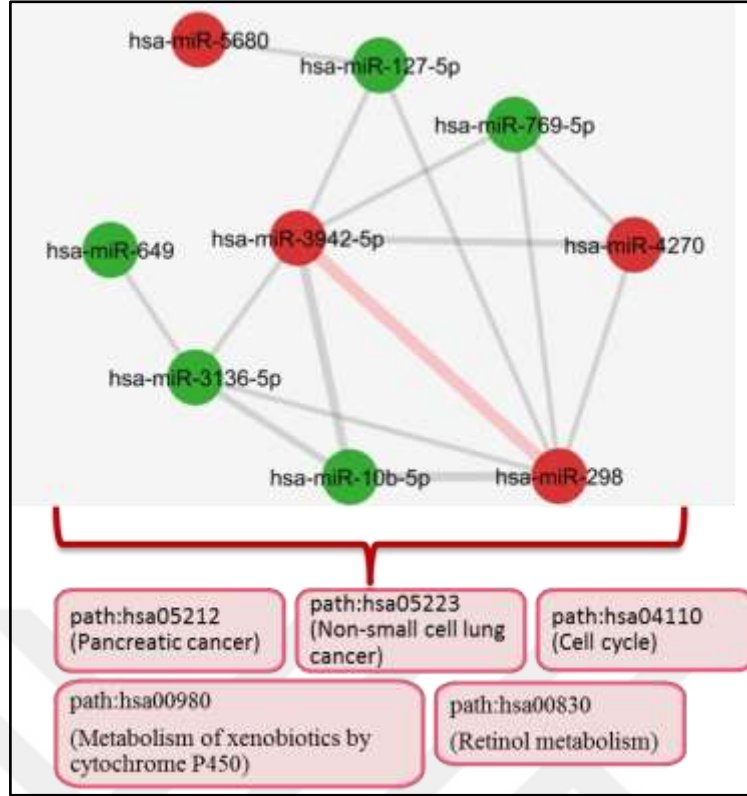
Şekil 5.68 BT474 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan son büyük küme. hsa-miR-29b-2-5p (sarı ile işaretli) iki grubu birbirine bağlıyor. Yeşil node'lar ifadesi azalan, kırmızı node'lar ifadesi artan miRNA'ları göstermektedir

SKBR3 miRNA-miRNA network analizinde kümeleme yapılırken edge eşiği yine 2.9 olarak belirlenmiştir. İlk üç küme gözlemlendiğinde, en büyük kümede yine hsa-miR-216b'in önemli rolü olduğu gözlemlenmiştir. Fakat bu kez ilgili miRNA'nın ifadesi artmış bulunmaktadır. hsa-miR-216b, hsa-miR-200a-3p ve hsa-miR-513a-3p arasında kuvvetli etkileşim gözlemlenmiş, bu etkileşim ve kümenin geri kalanı path:hsa00053 (Ascorbate and aldarate metabolism), path:hsa00982 (Drug metabolism - cytochrome P450), path:hsa00980 (Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450), path:hsa00830 (Retinol metabolism) yolları tarafından düzenlendiği bulunmuştur. Küme Şekil 5.69'da gösterilmiştir.



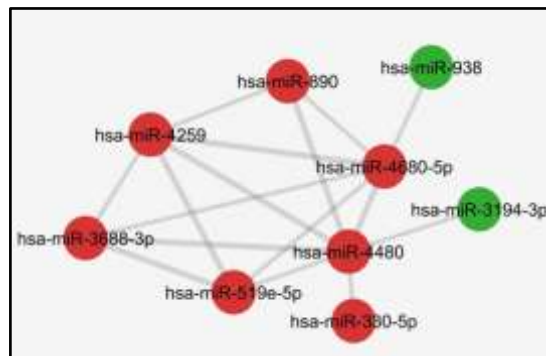
Şekil 5.69 SKBR3 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan en büyük küme. Kümenin metabolik yollar tarafından düzenlendiği görülmektedir. Kırmızı ile işaretli edge en kuvvetli etkileşimi göstermektedir. Yeşil node'lar ifadesi azalan, kırmızı node'lar ifadesi artan miRNA'ları göstermektedir

İkinci kümede hsa-miR-3942 anahtar node'lardan biri olarak bulunmuştur. hsa-miR-298 ve hsa-miR-10b'ye kanser yolları ile bağlanmıştır. Kümenin geri kalanı yine kanser yolları olan path:hsa05212 (Pancreatic cancer), path:hsa05223 (Non-small cell lung cancer), path:hsa04110 (Cell cycle), path:hsa4520 (Adherens junction) ile düzenlenmiştir. Küme Şekil 5.67'de verilmiştir.



Şekil 5.70 SKBR3 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan ikinci büyük küme. Kümenin kanser yolları tarafından düzenlendiği görülmektedir. Kırmızı ile işaretli edge en kuvvetli etkileşimi göstermektedir. Yeşil node'lar ifadesi azalan, kırmızı node'lar ifadesi artan miRNA'ları göstermektedir

Son küme çoğunlukla ifadesi artan miRNA'lar tarafından oluşmaktadır ve path:hsa04810 (Regulation of actin cytoskeleton) ile path:hsa05200 (pathways in cancer) etkileşim içindedir. Küme Şekil 5.71'de verilmiştir.



Şekil 5.71 SKBR3 miRNA-miRNA network içerisinde bulunan ikinci büyük küme. Kümenin kanser yolları tarafından düzenlendiği görülmektedir. Yeşil node'lar ifadesi azalan, kırmızı node'lar ifadesi artan miRNA'ları göstermektedir

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında EGFR odaklı terapilerde miRNA mekanizmalarının daha iyi aydınlatılması için terapiye duyarlı miRNA'ların ifadeleri araştırılmış, hedef gen profilleri elde edilmiş ve miRNA-miRNA network modelleri oluşturularak birbirleri ile ilişkileri gözlenmiştir.

Bunun için; HER2+ meme kanseri hücreleri olan SKBR3 ve BT474'de lapatinib ile trastuzumab muamelesi ardından ilaç uygulamasına duyarlı miRNA ifadeleri bulunmuştur. İfade sonuçları mikrodizin uygulaması yapılarak elde edilmiştir ve ardından duyarlı miRNA'ların potansiyel hedeflerinin, bu hedefler doğrultusunda olası karakterlerinin araştırılması için biyoinformatik analiz yapılmıştır. Biyoinformatik analiz sonucu ilk olarak seçilen miRNA'ların eş-zamanlı PZR metodu kullanılarak ifadeleri doğrulanmıştır. Sonuç olarak hsa-miR-345 SKBR3 hücrelerinde hem lapatinibe hem de trastuzumaba, hsa-miR-449a ise lapatinibe duyarlı miRNA'lar olarak tespit edilmiş ve hücrelerde ifadeleri susturulduğunda hücre proliferasyonunun gerilediği gözlenmiştir. Hücreler üzerindeki etkilerinin daha detaylı araştırılması için lentiviral vektörler kullanılarak kalıcı şekilde hücrelerde susturulmaları sağlanmıştır. Ardından apoptozis testi, hücre yara iyileşme testi, GFP competition assay yapılmıştır. Bu testler sonucunda susturulduklarında hücre ölümüne neden oldukları, hücre migrasyonunu geciktirdikleri ve apoptozisi tetikledikleri gözlenmiştir. Hedef gen profillerinin belirlenmesi için AGO2-IP uygulaması yapılmıştır. Yine olası hedefleri içinde ortak olan genler bulunduğu gibi, apoptotik ve hücre adezyonu ile ilişkili olanlar tespit edilmiştir.

Ek olarak trastuzumaba duyarlı miRNA'lar kullanılarak miRNA-miRNA network modelleri oluşturulmuştur. miRNA'lar hedefledikleri yolaklar üzerinden birbirleriyle ilişkilendirilmiş ve fonksiyonel olarak birbirine yakın miRNA çiftleri bulunmuştur. miRNA'ların en fazla hedeflediği genler tespit edilmiş ve trastuzumab uygulamasında en kilit etkiyi gösterebilecek miRNA'lar detaylı olarak araştırılmıştır. miRNA'ların özellikle metabolik yolaklar ve kanser ilişkili yolaklar olmak üzere iki farklı grup üzerinden etkinlik gösterebileceği, bunu aynı grup içerisinde birbirleriyle etkileşerek yaptıkları gözlenmiştir.

6.1.1. TRASTUZUMAB VE LAPATİNİB UYGULAMASI ARDINDAN MİRNA İFADE ANALİZİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

miRNA'ların ilaca olan duyarlılığını tespit etmek için iki HER2+ hücre hattı (SKBR3, BT474) ayrı ayrı olarak lapatinib ve trastuzumab ile muamele edilmiştir. Kontrol hücreleri olarak ilaçların çözücülerini kullanılmış ve mikrodizin uygulaması ardından karşılaştırma kontrol hücrelerine göre yapılmıştır. Ardından 2 kat ve daha fazla ifade değişikliği gösteren miRNA'lar ile hiyerarşik kümeleme analizi yapılmış ve kontrol ile ilaçla muamele edilen örnekler arasında miRNA'ların güçlü şekilde farklı profil gösterdiği gözlenmiştir. Gözlenen bu fark daha önceki çalışmalar ile paraleldir. Bununla birlikte trastuzumab uygulaması için daha önce yapılan çalışmalar bizim çalışmamız ile aynı koşulları taşımamaktadır. Örneğin; Ichikawa ve arkadaşları trastuzumaba duyarlı miRNA'ları tespit ederken miRNA ifadelerinin normalizasyonu için HER2 negatif meme kanseri hücreleri olan MCF7 ve MD-MBA-231 hücrelerinden faydalanmıştır. Bu iki hücre hattını da trastuzumab ile muamele edip HER2+ hücre profillemesi ile kıyaslayarak duyarlı miRNA'ları sunmuştur (75). Le ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışma ise hsa-miR-194'ün trastuzumaba duyarlı miRNA olarak tanımlanmış, profillemeye çalışmasını trastuzumaba dirençli ve duyarlı hücreleri karşılaştırarak yapmıştır (74). Çalışmalardaki farklılıklara rağmen, çalışmamızla paralel olarak miR-200 ailesi, miR-520 ailesi, hsa-miR-26b gibi miRNA'ların ortak olacak şekilde farklılık gösterdiği gözlenmiştir.

Lapatinib ile yapılan çalışmalar tez çalışmasına başlandıktan sonra ortaya konulmuştur. Nie ve arkadaşlarına ait çalışma SKBR3 ve BT474 hücrelerinde miRNA yanıtını araştırarak hsa-miR-1470'in fonksiyonlarını tanımlanmıştır, fakat ilgili miRNA bize ait mikrodizin çalışmasında ifade değişikliği gösteren miRNA'lar arasında bulunmamıştır (90).

6.1.2. EŞ ZAMANLI PZR İLE DOĞRULANAN MİRNA'LAR

Mikrodizin analizi ardından biyoinformatik analiz ile seçilen aday miRNA'lar arasından 5 adeti istatistiksel olarak anlamlı şekilde ifade değişikliği göstererek eş zamanlı PZR ile doğrulanmıştır. Bunlardan hsa-miR-580 ve hsa-miR-613 BT474 hücrelerinde trastuzumaba duyarlı olarak bulunmuştur. hsa-miR-935, hsa-miR-449a ise SKBR3 hücrelerinde

lapatinibe duyarlıdır. hsa-miR-345 SKBR3 hücrelerinde hem lapatinibe hem de trastuzumaba duyarlıdır. Her birinin farklı kanser türlerinde daha önce tanımlanmış fonksiyonları bulunmaktadır. Örneğin; yapılan son çalışmalar ile hsa-miR-613'ün osteosarkoma hücrelerinde migrasyonu ve çoğalmayı durdurduğu gözlenmiştir (91).

Lapatinibe ve/veya trastuzumaba duyarlılık gösteren iki miRNA; hsa-miR449a ve hsa-miR-345 ilerki çalışmalar için meme kanserindeki fonksiyonları araştırılmak üzere seçilmiştir. Bunlardan hsa-miR-449a, miR-34 ailesine benzer sekanslara sahip olan, daha önceki çalışmalar ile hücre ölümünün belirlenmesinde önemli rollere sahip olduğu kanıtlanmış bir miRNA'dır. miR-34 ailesine dahil olan miRNA'ların p53 aracılı apoptozisin tetiklenmesinde etkinlik gösterdiği bilinmektedir. Bununla beraber miR-449 ailesinin p53 statüsünden bağımsız olarak birçok farklı tümör hücrelesinde apoptozisi tetikleyebildiği gözlenmiştir. miR-449 ailesi CDC20B geni ile aynı promotor bölgesine sahiptir ve beraber ifade olmaktadır. CDC20B'nin mitozisin kontrolünde etkin olduğu bilinmektedir. Yine miR-449 ve ilgili gen ile yapılan akciğer epitel dokusu çalışmalarında ikisinin beraber ifade oldukları, miR-449a'nın tümör baskılayıcı etki gösterdiği ve CDC20B geninin de benzer etkiye sahip olabileceği önerilmektedir (92). Yine yapılan son bir çalışma ile nazofarengeal tümör hücrelerinde hsa-miR-29c ifade artışının hsa-miR-449a ifadesinde de artışa da neden olduğu, ifadesinin farklı miRNA'lar tarafından düzenlenebildiği gözlenmiştir (93). Tez projesinin son dönemine denk gelen meme kanseri çalışması ise hsa-miR-449a ifadesinin durdurulmasının üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde hücre ölümüne yol açtığını işaret etmektedir ve bu açıdan bizim çalışmamızla paraleldir. İfade artışının ise tümör baskılayıcı olmak yerine meme kanseri gelişimine katkı sağladığını göstermektedir (94). Bu yüzden ilgili miRNA'nın farklı tümör hücrelerinde farklı fonksiyonları olabileceği gibi, ifade artışı ve azalışının her ikisinin birden etkinliği de bulunabilir. Hsa-miR-345 ile yapılan çalışmalara bakıldığında daha önce MCF7 hücrelerinde cisplatin etkinliğine karşı duyarlılığı artırdığı, pankreas kanseri hücrelerinde ise apoptozisi tetiklediği gözlenmiştir (95,96).

6.1.3. HSA-MİR-345'İN VE HSA-MİR-449A'IN SKBR3 HÜCRELERİNDE ETKİNLİĞİ

hsa-miR-449a ve hsa-miR-345 fonksiyonun SKBR3 hücrelerinde araştırılması için ilgili miRNA'ların ifade artışı ve azalışı sağlanarak hücre ölümü, çoğalması, apoptozis gibi durumlardaki etkinliği araştırılmıştır. İlgili miRNA'ların miRZip vektörleri kullanılarak kalıcı şekilde ifadesi azaltılmış ve GFP pozitif hücre oranları yaklaşık 35 günlük bir süre içerisinde takip edilmiştir. Bu süre boyunca miRNA'ların susturulduğu hücrelerin sayıca azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar ilk olarak hücrelerde mimic ve inhibitörler kullanılıp kısa zamanlı ifade değişikliği yapılarak saptanmıştır. Transfeksiyondan 48 saat sonra yapılan hücre proliferasyon testi, yaklaşık %25 oranında hücre proliferasyonunun durduğunu göstermiştir. Bununla birlikte GFP competition assay sonucunda hücre proliferasyonunun %60 kadar gerilediği ve etkinin miRZip enfeksiyonunun ilerleyen dönemlerinde ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu yüzden her iki miRNA'nın susturulmasının hücre proliferasyonunda gerileme sağladığı ve antiproliferatif olduğu, susturulma sonrası oluşan etkinin zaman içinde arttığı söylenebilir. Her iki miRNA'nın da apoptozis üzerine etkinliği araştırılmış ve susturulmaları ile apoptotik hücrelerin arttığı gözlenmiştir. Ek olarak hücre motilitesi üzerindeki etkinlikleri yara iyileşme deneyi ile doğrulanmıştır. hsa-miR-449a susturulması daha fazla olmak üzere, her iki miRNA da hücre motilitesini durdurma özelliğine sahiptir. Yapılan hücre siklusu deneyi sonucunda ise, ilgili miRNA'ların susturulması ardından siklus üzerinde direkt bir değişim gözlenmemiştir. Bu durum kullanılan hücre hattının p53 gen mutasyonuna sahip olması ve ilgili mutant genin (mP53) apoptotik aktivasyona neden olmak yerine kanserli hücre gelişimine katkı sağlaması ile alakalı olabilir (97). AGO2-IP uygulaması sonrası elde edilen olası hedef genler ve zenginleştiği yollar incelendiğinde özellikle hsa-miR-449a'ya ait olan hedeflerin ubiquitin aracılı proteolizis, endoplazmik retikulum (ER) stres gibi yollarda zenginleştiği gözlenmiştir. hsa-miR-345 ile ilgili olarak ise yine ubiquitin aracılı proteolizis ve kalsiyum sinyal yolağı etkinliği saptanmıştır. Bu durum bize miRNA'ların susturulması ardından ortaya çıkan apoptotik etkinin ER stresi kaynaklı olabileceğini işaret etmektedir. Yine zenginleşen yollar arasında bulunan adherens bağlanma ve gap junction yolları miRNA'ların susturulması ardından gözlenen motilite azalmasını açıklamada yardımcı olabilir. Clarke ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışma ile ER stres ile alakalı

genlerin daha önce meme kanseri hücrelerinin kaderinin belirlenmesinde önemli rollere sahip olduklarını, kanser hücrelerinin ER stres ile bağlantılı olan katlanmamış protein cevabı ile ilişkili olduğu detaylı şekilde göstermişlerdir. Buna göre kanser hücreleri apoptozisten kaçmak için bu mekanizmayı kullanabilmekte ya da ER stres durumunda apoptozis veya otofaji uyarılarak hücrelerin ölümü sağlanabilmektedir (98). Yine 2012 yılında yapılan bir başka çalışma ile Cruickshanks ve arkadaşları lapatinibin meme kanseri hücrelerinde ER stres kaynaklı otofajik etki ile hücre ölümüne neden olabildiğini belirtmiştir (99). Daha önce ER stres ile ilişkili genler ve hsa-miR-449a'ya ait hedef gen profili incelendiğinde SEC23B, EMC1, ERO1L, TMTC3, UBE2J1, DERL2, SEL1L, COL4A2, NUS1, MARCH6, MAPK8 gibi endoplazmik retikulum fonksiyonu ile ilişkili genler ortak olarak bulunmuştur. Örneğin bunlardan MAPK8 (JNK1) etkinliğinin apoptozise neden olduğu Chen ve arkadaşları tarafından 1996 yılında gösterilmiştir (100). Hedef gen bulguları literatür ile birlikte incelendiğinde hsa-miR-449a'nın meme kanseri sürecindeki işlevini ER stres yolları üzerinden sürdürebileceğini göstermektedir.

6.1.4. AGO2-IP SONRASI ELDE EDİLEN HEDEF GEN PROFİLİNİN ANALİZİ

Hedef gen profili analiz edilirken ilk olarak iki kriterden faydalanılmıştır. Bunlardan ilk kriter IP ve total fraksiyonları karşılaştırılarak, IP kısmında ifade artışı gösteren genlerin tespit edilmesidir. İkinci kriter olarak hem miRZip IP, hem de NT1 IP fraksiyonlarında zenginleşmiş genler elde edildikten sonra iki vektör arasında karşılaştırmaya gidilmiştir. Burada ilk olarak tespit edilmek istenen, NT1 örneğinde hsa-miR-449a veya hsa-miR-345'e ait olma olasılığı daha yüksek olan, miRZip örneğine göre daha fazla zenginleşmiş genlerin araştırılmasıdır. NT1 örneğinde 2 katı ve daha fazla zenginleşen genler gözlenmesine rağmen, üst sıralarda yer alan genlerin bazıları için ilgili miRNA'nın bağlanma alanları saptanamamıştır. Bu yüzden eşik değer 1.5 ve 1.2 olarak belirlenmiş, elde edilen liste ile daha önce literatürde onaylanmış hedef olarak sunulan genler karşılaştırılmıştır. Örneğin; PEG10 hsa-miR-449a'ya ait onaylanmış hedeflerden biridir. Yine bize ait çalışmada IP kısmında zenginleştiği saptanmış ve ifade artışı 9.35 olarak saptanmıştır. Bununla beraber miRZip449a örneğinde de ifade artışı 4.92 olarak gözlenmiştir. Aradaki kat farkı 2'den küçük olduğu için ilerleyen aşamalarda olası hedef genler seçilirken fark eşiğinin 1.5 ya da 1.2 olarak belirlenmesinin daha iyi sonuç verebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle AGO2-IP uygulaması ardından potansiyel

hedefler seçilirken, NT1 örneğinde IP fraksiyonunda zenginleşme oranlarına; miRZip örneği ile olan fark değişimine, miRNA bağlanma alanlarının varlığına odaklanılabılır.

6.1.5. TRASTUZUMAB DUYARLI MİRNA'LAR KULLANILARAK OLUŞTURULAN MİRNA-MİRNA NETWORK MODELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yapılan son çalışmalar ile birlikte hücre kültüründe sürdürülen trastuzumab uygulamasına karşı miRNA'ların cevap verdiği ve ifade değişikliği gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, çalışmaların sınırlı olması ve sadece bireysel olarak bazı miRNA'ların hücre kültüründeki etkilerine odaklanması nedeniyle trastuzumab muamelesi sırasında etkinlik gösteren miRNA aracılı mekanizmalara dair bilgi sunulmamıştır (74–76).

Network analiz yaklaşımları özellikle moleküller arasındaki kompleks etkileşimlerin açıklanması için kullanılmaktadır. Birçok sinerjik miRNA network modeli bulunmasına rağmen şu ana kadar ilaç uygulamalarında analiz için kullanılmamışlardır ve homojen network modeli kullanan bir miRNA çalışması yapılmamıştır. Bu çalışmada homojen network tercih etmemizin nedeni, özellikle tek tip moleküller arasındaki ilişkinin açıklanmasında daha verimli olmalarıdır. Network modelimizde node'lar miRNA'lardan oluşurken; onları bağlayan edge'ler paylaşılan yollardan oluşmaktadır. Network modelimiz miRNA'lar arasındaki ilişkiyi 3 farklı basamakta açıklamıştır: Network içinde trastuzumaba duyarlı miRNA'lar tarafından en çok hedeflenen potansiyel genler bulunmuştur; miRNA-miRNA networkleri paylaşılan hedef yollar üzerinden bir araya getirilmiştir; ortak fonksiyonel özelliklere sahip miRNA etkinlik grupları araştırılmıştır. Böylece 3 farklı analiz şekli uygulanarak miRNA'lar arasındaki sinerjestik ilişkilerin daha anlamlı sunulması için çalışılmıştır.

6.1.5.1. Trastuzumaba Duyarlı miRNA'lar Tarafından En çok Hedeflenen Genler

Network analizi sırasında ilaca duyarlı miRNA'lar tarafından en fazla oranda hedef olarak seçilen genler ortaya çıkarılmıştır. Bu genlerin 3'UTR bölgeleri incelendiğinde normale oranla daha uzun oldukları ve daha fazla bağlanma alanı içerdikleri bulunmuştur. Ek olarak büyük çoğunluğunun (en çok hedeflenen ilk 30 genden 24 tanesi SKBR3 hücrelerinde; 23 tanesi BT474 hücrelerinde) invazif meme kanseri dokularında ifade değişikliği gösterdiği

gözlenmiştir. Yapılan yeni bir çalışmada Cheng ve arkadaşları, hücrelerde miRNA regülasyonu ile genlerin 3'UTR uzunlukları arasında bağlantı olduğunu göstermiştir. Buna göre 3'UTR kısmı daha uzun olan genler ayrıca miRNA'larla birlikte evrimsel olarak da korunmaktadır (101). Bu yüzden, bulduğumuz olası hedef genlerdeki potansiyel bağlanma alanlarını düşündüğümüzde, bu genlerin meme kanseri gelişimi yanı sıra trastuzumab uygulaması sırasında miRNA aracılı mekanizmalar için de kilit rol oynayabileceğini söyleyebiliriz. Yine fonksiyonların araştırdığında pek çoğunun tümör gelişimi ile ilgili olduğu gözlenmiştir. Örneğin; MDM4 (p53 regülatör), CAMD2 (cell adhesion molecule), KSR2 (kinase suppressor 2 of RAS) ve EREG (epiregulin) BT474 hücrelerinde en çok hedeflenen genler arasındadır. Bununla beraber, her iki hücre hattında da en çok hedeflenen genlerden biri olan SAMD12, daha önce kanserle ilişkili olarak tanımlanmamıştır. Buna rağmen, içinde bulunduğu gen topluluğu düşünüldüğünde meme kanserinde ve/veya trastuzumab etkinliğinde önemli fonksiyonlara sahip olabileceği göz önüne alınabilir.

6.1.5.2. Trastuzumaba Duyarlı ve Fonksiyonel Olarak İlişkili miRNA-miRNA Çiftleri

Her iki hücre hattında da oluşturulan miRNA-miRNA networklerinde node'ların (ilaca duyarlı miRNA'ların) sentralite dereceleri araştırılarak birbirleri ile etkileşimi gözlenmiştir. Bu sayede fonksiyonel olarak ilişkili miRNA çiftlerinin tanımlanması, trastuzumab uygulaması sırasında ön plana çıkan, anahtar role sahip miRNA'ların araştırılması hedeflenmiştir. SKBR3 hücrelerinden elde edilen network içerisinde hsa-miR-3976 en yüksek dereceye sahip node olarak bulunmuştur, fakat literatür araştırması sonrası kanser ile ilişkisine rastlanmamıştır. Bununla beraber yüksek sentralite derecesine sahip hsa-miR-10b ve hsa-miR-190a gibi miRNA'ların daha önce yapılan çalışmalar ile meme kanseri gelişimi ile metastazında önemli rollere sahip olduğu tanımlanmıştır (102,103). Ma ve arkadaşları tarafında yapılan çalışmada hsa-miR-10b ifadesinin metastatik üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde daha fazla olduğu ve hücrelerin invazyon özelliğine katkı sağladığı gözlenmiştir (102). Yine Volinia ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, normal meme dokusu ve invazif ile duktal olmak üzere farklı meme kanseri örneklerinde miRNA ifadeleri araştırılmıştır. Bu sonuçlara göre hsa-miR-10b invazyon ile ilişkili bulunurken, hsa-miR-190a, Luminal B meme kanserinde ifadesi artmış olarak

gözlenmiş ve bu alt tip ile bağlantılı bulunmuştur (92). hsa-miR-3976, hsa-miR-10b ve hsa-miR-190a aynı zamanda trastuzumaba cevap veren mikrodizin profili içerisinde yüksek ifade değişikliği gösteren miRNA'lar arasındadır. Yine BT474 hücrelerine ait network içinde hsa-miR-146b en yüksek sentralite derecesine sahip miRNA'lar arasındadır ve daha önce meme kanseri ile ilişkili biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (104). Bu sonuçlar bize network modelimizin trastuzumab uygulanan hücrelerde öne çıkan ve meme kanseri ile ilişkili olan miRNA'ları ayırt etmekte başarılı olduğunu göstermiştir. Sentralitesi yüksek miRNA'ların, aynı zamanda ifadesi en fazla değişen ilk 20 miRNA arasında olması trastuzumab uygulamasında düzenleyici adaylar olarak güvenilir olduklarını göstermektedir. Yine sentralite derecesi yüksek olan ama daha önce meme kanserinde çalışılmayan miRNA'ların network içindeki diğer miRNA'lar ile etkileşimine bakılarak olası fonksiyonları hakkında bilgi elde edilebilir.

6.1.5.3. miRNA-miRNA Networkleri İçin Kümeleşme Analizi

Her ki hücre hattında da elde edilen networkler kullanılarak kümeleme (cluster) analizi yapılmıştır. Kümeleme analizi birbiri ile yüksek oranda ilişkili olan miRNA'ların ortak biyolojik işlevler ile bir araya geldiklerini kanıtlamıştır. Her iki network için de bu biyolojik işlevler içerisinde ön plana çıkan iki grup bulunmuştur. İlk üç küme incelendiğinde en geniş, en fazla etkileşim görünen kümenin metabolik yollar tarafından kontrol edildiği gözlenirken; ikinci küme daha çok kanserle ilişkili yollar üzerinden bir araya gelmektedir. Bu durum bize trastuzumaba duyarlı miRNA'ların etkinlik gösterirken iki farklı biyolojik işlev üzerinden hareket ettiğini ve kanser yollarının yanı sıra, metabolik yolların da bu etkinlikte önemli role sahip olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte hsa-miR-216b örneğinde olduğu gibi kümelerde ön plana çıkan, fazla etkileşim gösteren miRNA'ların fonksiyonel etkinliği deneysel olarak detaylı şekilde araştırılarak trastuzumab uygulamasında miRNA aracılı cevap için daha fazla bilgi elde edilebilir. hsa-miR-216b hem BT474 hem de SKBR3 hücrelerinde ilk kümelerde, kümenin geri kalanını domine eden etkileşimler içerisinde önemli rol oynamaktadır. miR-216 ailesi ile daha önce yapılan çalışmalar, hastalardan alınan örneklerde hsa-miR-216 ifadesinin düşük olduğunu göstermiştir. Fare modellerinde yapılan deneylerle, miR-216 ifadesi artışı sağlandığında akciğer metastazı oranının azaldığı kanıtlanmıştır (105). Bu yüzden hsa-miR-216b ve onunla aynı küme içerisinde etkileşimde olan diğer miRNA'ların

fonksiyonları benzer olabilmekle beraber, trastuzumab etkinliği için de önem gösterebilir. Bununla beraber iki farklı hücre hattında aynı ifade değişikliğinin gözlenmesi (ifade artışı-azalışı) BT474 ve SKBR3 hücrelerindeki genetik, moleküler ve hücre yüzeyi reseptörlerine ilişkin farklılıklardan kaynaklanabilir (106,107).

Elde ettiğimiz miRNA'ların fonksiyonlarına ait örnekler bize, network modelinde deneğimiz kümeleme analizinin meme kanseri ile ilişkili miRNA'ları gruplamak konusunda yüksek oranda etkili olduğunu da göstermiştir. Özellikle metabolik yollarla ilişkili miRNA'ların araştırılması, trastuzumaba karşı direnç gelişiminde rolü olduğu bilinen ve hedeflenmesi için çalışmalar yapılmaya başlanan kanser metabolizmasının düzenlenmesini daha iyi açıklayabilir (108).



6.2. SONUÇ

Yapılan çalışma sonucunda ilaç uygulamalarının meme kanseri mikroRNA profili üzerine etkisi gözlenmiştir. Buna göre;

1. Lapatinib ve trastuzumab uygulaması HER2+ meme kanseri hücre hatlarında mikroRNA ifadesini değiştirmektedir ve bunlar ilaca duyarlı miRNA'lardır.
2. İlaça duyarlı miRNA'lar hücre hatlarında transfeksiyon ile ifadeleri değiştirildiklerinde hücre çoğalmasına etki etmekte ve meme kanserinin gelişimini etkileyebilmektedirler.
3. AGO2-IP işlemi ile başarılı bir şekilde hedef gen profilinin elde edilmesi gerçekleştirilebilmiştir. Hedef genler içerisinde meme kanseri ile ilişkili olanlar bulunmakla beraber, iki farklı miRNA için ortak olabilecek genler de bulunmaktadır.
4. Yapılan network analizi sayesinde trastuzumaba duyarlı miRNA'ların birbirleri ile olan iletişiminin metabolik ve kanser bağlantılı yollar üzerinden olabileceği gözlenmiştir. Trastuzumaba duyarlı miRNA'lar tarafından en fazla oranda tercih edilen olası kilit hedefler belirlenmiştir.
5. Tüm bu bulgular göz önüne alındığında miRNA'ların ilaç etkinliğinin ortaya çıkmasında etkili olabilecekleri, tedaviye alternatif sunma imkânları göz önüne alınmalıdır. Özellikle yüksek işlem hacimli metodların kullanımını ve network analizi gibi biyoinformatik yollardan faydalanılarak miRNA aracılı regülasyonun daha iyi aydınlatılabileceği gözlenmiştir.

7. GELECEK ÇALIŞMALAR

Tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular hsa-miR-449a ve hsa-miR-345'in SKBR3 meme kanseri hücrelerinde susturulduklarında antiproliferatif, antikanserojen etkiye neden olduklarını göstermektedir.

Elde edilen bulgulara dayanarak ilerleyen çalışmalarda ilk olarak ilgili miRNA'ların ilaç uygulaması ile birlikte meme kanseri hücre hatlarında susturulması ve farklı konsantrasyonlardaki ilaç uygulamasına katkısının araştırılması planlanmıştır. miRNA'lar mimic ve inhibitörler kullanılarak meme kanseri hücre hatlarında ifade değişikliği sağlanacak daha sonra daha önce IC50 değeri hesaplanırken belirlenen konsantrasyonlarda ilaç uygulaması yapılacaktır. miRNA mimic ve inhibitörlerinin kullanıldığı ilaç uygulamaları ile negatif kontrol ve sadece ilaç uygulaması olan gözler hücre çoğalması açısından karşılaştırılacaktır. Bunun için de yine WST-1 uygulaması yapılarak proliferasyon takip edilecektir.

Ek olarak ileriki çalışmalarda her iki miRNA için elde edilen hedef gen profillerine odaklanılmasına karar verilmiştir. IP fraksiyonunda en fazla kat değişimi gösteren, ilgili miRNA'lar için bağlanma alanlarına sahip genlerin gerçekten hedef olup olmadıkları araştırılacak ve doğrulanacaktır. Bunun için western blotlama ile ifadesi susturulan hücre hatlarında ilgili genlerin ifadelerine bakılacağı gibi, lüsiferaz testi kullanılarak doğrulamalarının yapılması da planlanmıştır. Lüsiferaz testi için seçilen olası hedef genlerin 3'UTR kısmı plazmidlere klonlanacak ardından miRNA ifadesi artışı sağlanıp biyoluminesans etkide bir azalma olup olmadığı gözlenebilecektir.

Yine özellikle hsa-miR-449a'nın daha önceki çalışmalarda farklı meme kanseri hatlarında gösterilen etkileri göz önüne alındığında, ilgili miRNA'ların başta BT474 hücreleri olmak üzere diğer meme kanseri hücre hatlarında etkisine bakılması planlanmaktadır. Farklı meme kanseri hücre hatları hsa-miR-449a ve hsa-miR-345'e ait mimic ve inhibitörler ile transfekte edilip hücre proliferasyon testi, apoptozis testi, yara iyileşme deneyleri yapılarak etkilerinin belirlenmesinin sağlanması düşünülmüştür.

Tüm bu çalışmaların sonucunda ilgili miRNA'ların meme kanserinde ve tedavisindeki etkilerinin daha iyi ortaya çıkarılması planlanmaktadır.

8. KAYNAKLAR

1. Hanahan D, Weinberg RA, Francisco S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. 2000;100: 57–70.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2016;66: 7–30. doi:10.3322/caac.21332.
3. Tirona MT, Sehgal R, Ballester O. Prevention of breast cancer (part I): epidemiology, risk factors, and risk assessment tools. *Cancer Invest.* 2010;28: 743–50. doi:10.3109/07357907.2010.494321
4. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 1: x207-10. doi:10.1093/annonc/mds326
5. Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat.* 2013;26: 29–48. doi:10.1002/ca.22165
6. Sternlicht MD. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res.* 2006;8: 201. doi:10.1186/bcr1368
7. Ali S, Coombes RC. Endocrine-Responsive Breast Cancer and Strategies for Combating Resistance. *Nat Rev Cancer.* 2002;2: 101–112. doi:10.1038/nrc721
8. Ali S, Coombes RC. Endocrine-Responsive Breast Cancer and Strategies for Combating Resistance. *Nat Rev Cancer.* 2002;2: 101–112. doi:10.1038/nrc721
9. WHO T, Group W. CHAPTER 1 WHO histological classification of tumours of the breast.
10. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406: 747–52. doi:10.1038/35021093
11. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene

- expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98: 10869–10874. doi:10.1073/pnas.191367098
12. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. 2003;100: 8418–8423.
 13. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98: 10869–10874. doi:10.1073/pnas.191367098
 14. Brenton JD, Carey LA, Ahmed A, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? *J Clin Oncol*. 2005;23: 7350–7360. doi:10.1200/JCO.2005.03.3845
 15. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer : from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*. Nature Publishing Group; 2010;23: S60–S64. doi:10.1038/modpathol.2010.33
 16. Blume-jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. 2001;2: 355–365.
 17. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21: 177–84. doi:10.1016/j.ceb.2008.12.010
 18. Hynes NE, Lane HA, Miescher F. ERBB RECEPTORS AND CANCER : 2005;5. doi:10.1038/nrc1609
 19. Lupu R, Cardillo M, Harris L, Hijazi M, Rosenberg K. Interaction between erbB-receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance [Internet]. *Seminars in Cancer Biology*. 1995. pp. 135–145. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X85700168>
 20. Nahta R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol*. 2012;2012: 428062.

doi:10.5402/2012/428062

21. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2009;9: 463–75. doi:10.1038/nrc2656
22. Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, et al. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene*. 1995;10: 1813–21. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7538656>
23. Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W, Ullrich A. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J*. 1995;14: 4267–75. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394510&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*. 1997;16: 1647–55. doi:10.1093/emboj/16.7.1647
25. Harris R. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*. 2003;284: 2–13. doi:10.1016/S0014-4827(02)00105-2
26. Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2012;9: 16–32. doi:10.1038/nrclinonc.2011.177
27. Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44: 195–217. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440
28. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 2006;366: 2–

16. doi:10.1016/j.gene.2005.10.018
29. DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton SM, Whalen SG, Moore D, Thor AD. Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2005;23: 1152–1160. doi:10.1200/JCO.2005.09.055
30. Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2005;118: 4325–4326. doi:10.1242/jcs.02552
31. Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;136: 331–45. doi:10.1007/s10549-012-2289-9
32. Lenferink AEG, Pinkas-Kramarski R, Van De Poll MLM, Van Vugt MJH, Klapper LN, Tzahar E, et al. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J.* 1998;17: 3385–3397. doi:10.1093/emboj/17.12.3385
33. Dua R, Zhang J, Nhonthachit P, Penuel E, Petropoulos C, Parry G. EGFR over-expression and activation in high HER2, ER negative breast cancer cell line induces trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122: 685–97. doi:10.1007/s10549-009-0592-x
34. Appert-Collin A, Hubert P, Crémel G, Bennisroune A. Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. *Front Pharmacol.* 2015;6: 1–10. doi:10.3389/fphar.2015.00283
35. DeFazio-Eli L, Strommen K, Dao-Pick T, Parry G, Goodman L, Winslow J. Quantitative assays for the measurement of HER1-HER2 heterodimerization and phosphorylation in cell lines and breast tumors: applications for diagnostics and targeted drug mechanism of action. *Breast Cancer Res.* BioMed Central Ltd; 2011;13: R44. doi:10.1186/bcr2866
36. Higgins MJ, Baselga J. Review series Targeted therapies for breast cancer. *J Clin*

Invest. 2011;121: 3797–3803. doi:10.1172/JCI57152.with

37. Howe LR, Brown PH. Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4: 1149–57. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0334
38. Agus DB, Akita RW, Fox WD, Lewis GD, Higgins B, Pisacane PI, et al. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell*. 2002;2: 127–37. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204533>
39. Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL. Herceptin-induced Inhibition of Phosphatidylinositol-3 Kinase and Akt Is Required for Antibody-mediated Effects on p27, Cyclin D1, and Antitumor Action Herceptin-induced Inhibition of Phosphatidylinositol-3 Kinase and Akt Is Required. 2002; 4132–4141.
40. Clynes R a, Towers TL, Presta LG, Ravetch J V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000;6: 443–446. doi:10.1038/74704
41. D J Slamon, B Leyland-Jones, S Shak, H Fuchs, V Paton, A Bajamonde, T Fleming, W Eiermann, J Wolter, M Pegram, J Baselga LN. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. 2001;344: 783–792. doi:10.1056/NEJM200103153441101
42. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: The M77001 study group. *J Clin Oncol*. 2005;23: 4265–4274. doi:10.1200/JCO.2005.04.173
43. Alexander PB, Chen R, Gong C, Yuan L, Jasper JS, Ding Y, et al. Distinct receptor tyrosine kinase subsets mediate anti-HER2 drug resistance in breast cancer. *J Biol Chem*. 2016; doi:10.1074/jbc.M116.754960

44. Segovia-Mendoza M, González-González ME, Barrera D, Díaz L, García-Becerra R. Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of HER2-positive breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Am J Cancer Res.* 2015;5: 2531–61. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4633889&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
45. Rana P, Sridhar SS. Efficacy and tolerability of lapatinib in the management of breast cancer. *Breast Cancer (Auckl).* 2012;6: 67–77. doi:10.4137/BCBCR.S6374
46. Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66: 1630–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1182
47. Hegde PS, Rusnak D, Bertiaux M, Alligood K, Strum J, Gagnon R, et al. Delineation of molecular mechanisms of sensitivity to lapatinib in breast cancer cell lines using global gene expression profiles. *Mol Cancer Ther.* 2007;6: 1629–40. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0399
48. Zhu X, Wu L, Qiao H, Han T, Chen S, Liu X, et al. Autophagy stimulates apoptosis in HER2-overexpressing breast cancers treated by lapatinib. *J Cell Biochem.* 2013;114: 2643–53. doi:10.1002/jcb.24611
49. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75: 843–54. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621>
50. Moss EG, Poethig RS. MicroRNAs: something new under the sun. *Curr Biol.* 2002;12: R688-90. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401184>
51. Almeida MI, Reis RM, Calin G a. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res.* Elsevier B.V.; 2011;717: 1–8. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009

52. Bartel DP, Lee R, Feinbaum R. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function Genomics : The miRNA Genes. 2004;116: 281–297.
53. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34: D140-4. doi:10.1093/nar/gkj112
54. Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell.* Elsevier Inc.; 2010;38: 323–32. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.013
55. Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol.* 2008;18: 113–21. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00121.x
56. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10: 126–139. doi:10.1038/nrm2632
57. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Publ Gr.* Nature Publishing Group; 2014;15: 509–524. doi:10.1038/nrm3838
58. Kim Y, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA , Exportin 5 , and DICER in microRNA biogenesis. 2016; 1–9. doi:10.1073/pnas.1602532113
59. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA.* 2005;11: 1753–61. doi:10.1261/rna.2248605
60. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature.* Nature Publishing Group; 2013;495: 384–388. doi:10.1038/nature11993
61. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101: 2999–3004. doi:10.1073/pnas.0307323101
62. Iorio M V, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis.*

2012;33: 1126–33. doi:10.1093/carcin/bgs140

63. Garzon R, Calin G a, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* 2009;60: 167–79. doi:10.1146/annurev.med.59.053006.104707
64. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008;283: 1026–1033. doi:10.1074/jbc.M707224200
65. Iorio M V, 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: 7065–70. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1783
66. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009;11: R27. doi:10.1186/bcr2257
67. 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: 147–52. doi:10.1038/nature06487
68. Riaz M, van Jaarsveld MT, Hollestelle A, Prager-van der Smissen WJ, Heine AA, Boersma AW, et al. miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. *Breast Cancer Res.* 2013;15: R33. doi:10.1186/bcr3415
69. Cascione L, Gasparini P, Lovat F, Carasi S, Pulvirenti A, Ferro A, et al. Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PLoS One.* 2013;8: e55910. doi:10.1371/journal.pone.0055910
70. Jiang S, Zhang H-W, Lu M-H, He X-H, Li Y, Gu H, et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res.* 2010;70: 3119–27. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4250

71. Du WW, Fang L, Li M, Yang X, Liang Y, Peng C, et al. MicroRNA miR-24 enhances tumor invasion and metastasis by targeting PTPN9 and PTPRF to promote EGF signaling. *J Cell Sci.* 2013;126: 1440–53. doi:10.1242/jcs.118299
72. Fang C, Zhao Y, Guo B. MiR-199b-5p targets HER2 in breast cancer cells. *J Cell Biochem.* 2013;114: 1457–63. doi:10.1002/jcb.24487
73. Siu MK, Abou-Kheir W, Yin JJ, Chang Y-S, Barrett B, Suau F, et al. Loss of EGFR signaling regulated miR-203 promotes prostate cancer bone metastasis and tyrosine kinase inhibitors resistance. *Oncotarget.* 2014;5: 3770–84. doi:10.18632/oncotarget.1994
74. Le X-F, Almeida MI, Mao W, Spizzo R, Rossi S, Nicoloso MS, et al. Modulation of MicroRNA-194 and cell migration by HER2-targeting trastuzumab in breast cancer. *PLoS One.* 2012;7: e41170. doi:10.1371/journal.pone.0041170
75. Ichikawa T, Sato F, Terasawa K, Tsuchiya S, Toi M, Tsujimoto G, et al. Trastuzumab produces therapeutic actions by upregulating miR-26a and miR-30b in breast cancer cells. *PLoS One.* 2012;7: e31422. doi:10.1371/journal.pone.0031422
76. Müller V, Gade S, Steinbach B, Loibl S, von Minckwitz G, Untch M, et al. Changes in serum levels of miR-21, miR-210, and miR-373 in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy: a translational research project within the Geparquinto trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;147: 61–8. doi:10.1007/s10549-014-3079-3
77. Tu CY, Chen CH, Hsia TC, Hsu MH, Wei YL, Yu MC, et al. Trichostatin A suppresses EGFR expression through induction of microRNA-7 in an HDAC-independent manner in lapatinib-treated cells. *Biomed Res Int.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/168949
78. Bracken CP, Scott HS, Goodall GJ. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nat Rev Genet.* Nature Publishing Group; 2016;17: 719–732. doi:10.1038/nrg.2016.134

79. Keene JD, Komisarow JM, Friedersdorf MB. RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts. *Nat Protoc.* 2006;1: 302–7. doi:10.1038/nprot.2006.47
80. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011;13: 215. doi:10.1186/bcr2889
81. López-Romero P, González M a, Callejas S, Dopazo A, Irizarry R a. Processing of Agilent microRNA array data. *BMC Res Notes.* 2010;3: 18. doi:10.1186/1756-0500-3-18
82. Rowan CC, Iliana A-C, Hamid B, Benno S, Mark A, Ryan K, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Am Assoc Cancer Res Educ B.* 2005; 12–16. doi:10.1101/gr.1239303.metabolite
83. Morris JH, Apeltsin L, Newman AM, Baumbach J, Wittkop T, Su G, et al. clusterMaker: a multi-algorithm clustering plugin for Cytoscape. *BMC Bioinformatics.* 2011;12: 436. doi:10.1186/1471-2105-12-436
84. Van Dongen S, Abreu-Goodger C. Using MCL to extract clusters from networks. *Methods Mol Biol.* 2012;804: 281–295. doi:10.1007/978-1-61779-361-5_15
85. Apeltsin L, Morris JH, Babbitt PC, Ferrin TE. Improving the quality of protein similarity network clustering algorithms using the network edge weight distribution. *Bioinformatics.* 2011;27: 326–333. doi:10.1093/bioinformatics/btq655
86. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490: 61–70. doi:10.1038/nature11412
87. Tan LP, Seinen E, Duns G, de Jong D, Sibon OCM, Poppema S, et al. A high throughput experimental approach to identify miRNA targets in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2009;37: e137. doi:10.1093/nar/gkp715
88. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35: 495–516. doi:10.1080/01926230701320337

89. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2: 329–333. doi:nprot.2007.30 [pii]\r10.1038/nprot.2007.30
90. Nie W, Song W, Zhang W, Wang Y, Zhu A, Shao J, et al. miR-1470 mediates lapatinib induced p27 upregulation by targeting c-jun. *J Cell Physiol.* 2015;230: 1630–1639. doi:10.1002/jcp.24910
91. Li X, Sun X, Wu J, Li Z. MicroRNA-613 suppresses proliferation, migration and invasion of osteosarcoma by targeting c-MET. *Am J Cancer Res.* 2016;6: 2869–2879.
92. Liz?? M, Klimke A, Dobbstein M. MicroRNA-449 in cell fate determination. *Cell Cycle.* 2011;10: 2874–2882. doi:10.4161/cc.10.17.17181
93. Niu M, Gao D, Wen Q, Wei P, Pan S, Shuai C, et al. MiR-29c regulates the expression of miR-34c and miR-449a by targeting DNA methyltransferase 3a and 3b in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer.* BMC Cancer; 2016;16: 218. doi:10.1186/s12885-016-2253-x
94. Shi W, Bruce J, Lee M, Yue S, Rowe M, Pintilie M, et al. MiR-449a promotes breast cancer progression by targeting STATEMENT OF TRANSLATIONAL. 2016;7.
95. Srivastava SK, Bhardwaj A, Arora S, Tyagi N, Singh S, Andrews J, et al. MicroRNA-345 induces apoptosis in pancreatic cancer cells through potentiation of caspase-dependent and -independent pathways. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 2015;113: 660–668. doi:10.1038/bjc.2015.252
96. Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpyleva SI, Kovalchuk O. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer.* 2010;127: 1785–1794. doi:10.1002/ijc.25191
97. Bossi G, Lapi E, Strano S, Rinaldo C, Blandino G, Sacchi A. Mutant p53 gain of

- function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. *Oncogene*. 2006;25: 304–309. doi:10.1038/sj.onc.1209026
98. Clarke R, Cook KL, Hu R, Facey COB, Tavassoly I, Schwartz JL, et al. NIH Public Access. 2013;72: 1321–1331. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3213.Endoplasmic
 99. Cruickshanks N, Tang Y, Booth L, Hamed H, Grant S, Dent P. Lapatinib and Obatoclox Kill Breast Cancer Cells through Reactive Oxygen Species-Dependent Endoplasmic Reticulum. 2012;
 100. Chen Y, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan T. The Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in Apoptosis Induced by Ultraviolet C and γ Radiation. 1996;271: 31929–31936.
 101. Cheng C, Bhardwaj N, Gerstein M. The relationship between the evolution of microRNA targets and the length of their UTRs. *BMC Genomics*. 2009;10: 6. doi:10.1186/1471-2164-10-431
 102. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R a. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007;449: 682–8. doi:10.1038/nature06174
 103. Volinia S, Galasso M, Sana ME, Wise TF, Palatini J, Huebner K, et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109: 3024–9. doi:10.1073/pnas.1200010109
 104. van Schooneveld E, Wildiers H, Vergote I, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Res*. 2015;17: 21. doi:10.1186/s13058-015-0526-y
 105. Zhang Y, Yang P, Sun T, Li D, Xu X, Rui Y, et al. miR-126 and miR-126* repress recruitment of mesenchymal stem cells and inflammatory monocytes to inhibit

- breast cancer metastasis. *Nat Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2013;15: 284–94. doi:10.1038/ncb2690
106. Rondón-Lagos M, Verdun Di Cantogno L, Marchiò C, Rangel N, Payan-Gomez C, Gugliotta P, et al. Differences and homologies of chromosomal alterations within and between breast cancer cell lines: a clustering analysis. *Mol Cytogenet.* 2014;7: 8. doi:10.1186/1755-8166-7-8
107. Kroll T, Odyvanova L, Clement J, Platzer C, Naumann A, Marr N, et al. Molecular characterization of breast cancer cell lines by expression profiling. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;128: 125–134. doi:10.1007/s00432-001-0308-z
108. Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis.* Nature Publishing Group; 2013;4: e532. doi:10.1038/cddis.2013.60

9. EKLER

EK-1

Trastuzumab uygulaması arından BT474 hücrelerinde ifade değişikliği gösteren miRNA'lar

miRNA ID	P-Değeri	Kat Değişimi
hsa-miR-466	0.0004952	0.11
hsa-miR-5692a	0.007352	0.12
hsa-miR-99a-3p	0.0069146	0.15
hsa-miR-379-3p	0.0299497	0.15
hsa-miR-3671	0.0012644	0.18
hsa-miR-937-3p	0.0047439	0.18
hsa-miR-876-5p	0.0013843	0.19
hsa-miR-300	0.0034848	0.2
hsa-miR-6502-3p	0.0039473	0.2
hsa-miR-567	0.0044409	0.2
hsa-miR-1228-5p	0.0135896	0.2
hsa-miR-545-5p	0.0079419	0.21
hsa-miR-4434	0.0212975	0.21
hsa-miR-4290	0.0026422	0.22
hsa-miR-422a	0.0112678	0.22
hsa-miR-885-5p	0.0146517	0.22
hsa-miR-5692b	0.0310015	0.22
hsa-miR-3151	0.0040036	0.23
hsa-miR-1255b-5p	0.0104221	0.23
hsa-miR-296-3p	0.0221598	0.23

hsa-miR-4748	0.0277603	0.23
hsa-miR-6720-3p	0.017295	0.24
hsa-miR-943	0.0327177	0.24
hsa-miR-485-5p	0.0090752	0.25
hsa-miR-2052	0.0294035	0.25
hsa-miR-3674	0.0331645	0.25
hsa-miR-4671-5p	0.0058339	0.26
hsa-miR-3184-3p	0.0081874	0.26
hsa-miR-526b-3p	0.0122688	0.26
hsa-miR-483-3p	0.0132005	0.26
hsa-miR-3678-3p	0.0400632	0.27
hsa-miR-4728-3p	0.0111647	0.28
hsa-miR-615-3p	0.0112228	0.28
hsa-miR-3591-3p	0.0240649	0.28
hsa-miR-6503-3p	0.0066831	0.29
hsa-miR-4730	0.0114225	0.29
hsa-miR-5196-3p	0.0131247	0.29
hsa-miR-27a-5p	0.0194459	0.29
hsa-miR-4428	0.0106803	0.3
hsa-miR-4539	0.0322147	0.3
hsa-miR-497-3p	0.0475643	0.3
hsa-miR-4316	0.0105877	0.31
hsa-miR-4777-5p	0.0112238	0.31
hsa-miR-1185-5p	0.0143566	0.31
hsa-miR-606	0.0187031	0.31
hsa-miR-4763-5p	0.0217242	0.31
hsa-miR-4746-5p	0.0254426	0.31

hsa-miR-647	0.0094015	0.32
hsa-miR-4642	0.0110033	0.32
hsa-miR-596	0.0123278	0.32
hsa-miR-3064-5p	0.0192445	0.32
hsa-miR-3909	0.0220528	0.32
hsa-miR-4793-5p	0.0338519	0.32
hsa-miR-32-3p	0.0375697	0.32
hsa-miR-4426	0.0448441	0.32
hsa-miR-3622a-5p	0.0128364	0.33
hsa-miR-490-5p	0.0230238	0.33
hsa-miR-130b-5p	0.0245657	0.33
hsa-miR-19b-2-5p	0.0252793	0.33
hsa-miR-4526	0.0161647	0.34
hsa-miR-185-3p	0.0248966	0.34
hsa-miR-3133	0.0444599	0.34
hsa-miR-1287	0.0458195	0.34
hsa-miR-548aq-5p	0.0464526	0.34
hsa-miR-658	0.0176313	0.35
hsa-miR-3064-3p	0.026775	0.35
hsa-miR-1302	0.0193679	0.36
hsa-miR-4525	0.0243322	0.36
hsa-miR-2276	0.0285337	0.36
hsa-miR-5700	0.0293985	0.36
hsa-miR-365b-5p	0.030063	0.36
hsa-miR-335-3p	0.0315976	0.36
hsa-miR-3148	0.0360545	0.36
hsa-miR-1247-3p	0.0436788	0.36

hsa-miR-513c-3p	0.0459936	0.36
hsa-miR-1296	0.017903	0.37
hsa-miR-1825	0.0194932	0.37
hsa-miR-150-3p	0.0219531	0.37
hsa-miR-6716-3p	0.0271763	0.37
hsa-miR-33a-3p	0.0298384	0.37
hsa-miR-200a-5p	0.0481489	0.37
hsa-miR-302f	0.018649	0.38
hsa-miR-653	0.0225223	0.38
hsa-miR-629-3p	0.0271382	0.38
hsa-miR-665	0.0331121	0.38
hsa-miR-4659a-5p	0.0372608	0.38
hsa-miR-3605-5p	0.0375177	0.38
hsa-miR-3678-5p	0.0449678	0.38
hsa-miR-4764-5p	0.0215541	0.39
hsa-miR-651	0.0304208	0.39
hsa-miR-1910	0.0334615	0.39
hsa-miR-4474-5p	0.0363566	0.39
hsa-miR-4645-3p	0.0492751	0.39
hsa-miR-1260b	0.0244649	0.4
hsa-miR-146b-3p	0.0258481	0.4
hsa-miR-4257	0.0258715	0.4
hsa-miR-1227-3p	0.0300698	0.4
hsa-miR-4436b-5p	0.0337215	0.4
hsa-miR-18a-3p	0.0345647	0.4
hsa-miR-3691-3p	0.0404707	0.4
hsa-miR-3662	0.0450344	0.4

hsa-miR-1468	0.0456357	0.4
hsa-miR-100-3p	0.0471776	0.4
hsa-miR-3149	0.028	0.41
hsa-miR-4761-5p	0.0326109	0.41
hsa-miR-138-2-3p	0.0327977	0.41
hsa-miR-4658	0.0386838	0.41
hsa-miR-1245a	0.0473303	0.41
hsa-miR-5004-5p	0.0489469	0.41
hsa-miR-3190-3p	0.0393691	0.42
hsa-miR-5582-5p	0.0395609	0.42
hsa-miR-411-3p	0.0444517	0.42
hsa-miR-5100	0.0356866	0.43
hsa-miR-4767	0.0370891	0.43
hsa-miR-579	0.0391188	0.43
hsa-miR-4657	0.0416741	0.43
hsa-miR-1273g-3p	0.042696	0.43
hsa-miR-4536-3p	0.0446313	0.43
hsa-miR-4664-5p	0.0447249	0.43
hsa-miR-30d-3p	0.0458414	0.43
hsa-miR-3156-5p	0.0466493	0.43
hsa-miR-93-3p	0.0478115	0.43
hsa-miR-6506-3p	0.0393073	0.44
hsa-miR-3688-5p	0.0404558	0.44
hsa-miR-631	0.0411589	0.44
hsa-miR-6499-3p	0.0424248	0.44
hsa-miR-194-3p	0.0432786	0.44
hsa-miR-5739	0.0428773	0.45

hsa-miR-7-5p	0.0440447	0.45
hsa-miR-378f	0.044336	0.45
hsa-miR-4773	0.0446996	0.45
hsa-miR-4694-3p	0.0448622	0.45
hsa-miR-4780	0.0449203	0.45
hsa-miR-216b	0.0495969	0.45
hsa-miR-3676-5p	0.0470094	0.46
hsa-miR-194-5p	0.0495861	2.15
hsa-miR-3656	0.0421986	2.21
hsa-miR-4669	0.0460268	2.21
hsa-miR-4712-5p	0.0461138	2.23
hsa-miR-5091	0.0466784	2.23
hsa-miR-503-5p	0.039505	2.24
hsa-miR-4790-3p	0.0483136	2.26
hsa-miR-514b-5p	0.0444159	2.27
hsa-miR-26a-2-3p	0.0407235	2.28
hsa-miR-4285	0.0373672	2.29
hsa-miR-4689	0.0347144	2.3
hsa-miR-126-5p	0.0385031	2.3
hsa-miR-1827	0.0412444	2.31
hsa-miR-1268a	0.0340529	2.33
hsa-miR-363-3p	0.0396449	2.34
hsa-miR-5571-3p	0.0397718	2.34
hsa-miR-5006-5p	0.0432462	2.34
hsa-miR-548at-3p	0.0437055	2.35
hsa-miR-101-3p	0.0454152	2.35
hsa-miR-601	0.0338262	2.36

hsa-miR-561-3p	0.0453794	2.36
hsa-miR-205-3p	0.0315901	2.37
hsa-miR-181d	0.0398194	2.37
hsa-miR-548ay-3p	0.0331175	2.38
hsa-miR-3121-3p	0.032512	2.39
hsa-miR-30a-5p	0.0319136	2.4
hsa-miR-5191	0.0398904	2.4
hsa-miR-4690-3p	0.028698	2.41
hsa-miR-3127-5p	0.0439468	2.41
hsa-miR-512-5p	0.031405	2.43
hsa-miR-3201	0.0368195	2.43
hsa-miR-548an	0.0433208	2.43
hsa-miR-127-5p	0.033832	2.45
hsa-miR-661	0.0436862	2.48
hsa-miR-4538	0.0256661	2.49
hsa-miR-3165	0.0458365	2.51
hsa-miR-4536-5p	0.0225334	2.54
hsa-miR-148a-5p	0.0383422	2.54
hsa-miR-5090	0.0483493	2.56
hsa-miR-519e-3p	0.0302709	2.57
hsa-miR-636	0.022025	2.59
hsa-miR-3127-3p	0.0257542	2.6
hsa-miR-6071	0.0208679	2.62
hsa-miR-378h	0.0367366	2.63
hsa-miR-4655-3p	0.0285489	2.64
hsa-miR-659-5p	0.0383175	2.64
hsa-miR-548ac	0.0293663	2.65

hsa-miR-1914-5p	0.0488707	2.65
hsa-miR-32-5p	0.0425868	2.66
hsa-miR-124-5p	0.0324717	2.67
hsa-miR-944	0.0345773	2.69
hsa-miR-3653	0.0256544	2.71
hsa-miR-181c-3p	0.0271299	2.72
hsa-miR-589-3p	0.0335676	2.73
hsa-miR-1263	0.021045	2.74
hsa-miR-4481	0.0195027	2.75
hsa-miR-3147	0.0386816	2.75
hsa-miR-4476	0.0217607	2.76
hsa-miR-1237-5p	0.0222565	2.76
hsa-miR-623	0.0243095	2.76
hsa-miR-4703-5p	0.0429846	2.78
hsa-miR-6502-5p	0.0201164	2.81
hsa-miR-3175	0.037685	2.81
hsa-miR-3191-5p	0.0177612	2.83
hsa-miR-181a-2-3p	0.0369684	2.84
hsa-miR-371a-5p	0.0194027	2.85
hsa-miR-586	0.0333646	2.85
hsa-miR-6083	0.0285612	2.88
hsa-miR-345-3p	0.0332717	2.92
hsa-miR-3145-5p	0.0139513	2.93
hsa-miR-3189-3p	0.031948	2.93
hsa-miR-578	0.0153884	2.95
hsa-miR-3689f	0.0150303	2.98
hsa-miR-548au-5p	0.0124857	3.03

hsa-miR-3922-3p	0.0406882	3.03
hsa-miR-153	0.0117838	3.05
hsa-miR-1247-5p	0.0315123	3.08
hsa-miR-3116	0.0326677	3.13
hsa-miR-581	0.0106609	3.17
hsa-miR-382-3p	0.0162142	3.18
hsa-miR-323b-5p	0.0298895	3.19
hsa-miR-3140-3p	0.0177114	3.21
hsa-miR-655	0.0213592	3.22
hsa-miR-3065-3p	0.0391592	3.22
hsa-miR-4794	0.0148646	3.23
hsa-miR-146b-5p	0.0153374	3.24
hsa-miR-613	0.0096497	3.29
hsa-miR-10a-3p	0.0126349	3.3
hsa-miR-626	0.0101057	3.31
hsa-miR-29b-2-5p	0.0106147	3.34
hsa-miR-612	0.0330173	3.36
hsa-miR-4472	0.0090176	3.37
hsa-miR-3615	0.0131148	3.37
hsa-miR-26a-1-3p	0.0312461	3.38
hsa-miR-558	0.0150355	3.39
hsa-miR-4634	0.0081396	3.45
hsa-miR-33b-5p	0.0089694	3.46
hsa-miR-19a-5p	0.0288498	3.57
hsa-miR-4450	0.0100613	3.58
hsa-miR-2392	0.0149213	3.58
hsa-miR-7-2-3p	0.0243815	3.6

hsa-miR-559	0.011919	3.67
hsa-miR-135a-3p	0.0064201	3.7
hsa-miR-302d-5p	0.0058038	3.73
hsa-miR-5009-3p	0.0396833	3.73
hsa-miR-25-5p	0.0084336	3.79
hsa-miR-4750-5p	0.0051319	3.81
hsa-miR-576-3p	0.0262989	3.81
hsa-miR-5579-3p	0.0058513	3.93
hsa-miR-892a	0.006282	3.95
hsa-miR-4447	0.0117179	3.99
hsa-miR-382-5p	0.0235197	4.1
hsa-miR-4517	0.0159402	4.29
hsa-miR-4726-5p	0.0226726	4.29
hsa-miR-222-5p	0.0025952	4.35
hsa-miR-3137	0.017978	4.37
hsa-miR-3680-3p	0.0072642	4.45
hsa-miR-96-3p	0.039648	4.74
hsa-miR-4789-5p	0.0053838	4.76
hsa-miR-589-5p	0.0048072	4.77
hsa-miR-551b-5p	0.0017209	4.79
hsa-miR-493-3p	0.0201837	4.95
hsa-miR-541-5p	0.036925	5.08
hsa-miR-5088	0.004397	5.46
hsa-miR-3124-3p	0.0023436	5.59
hsa-miR-616-3p	0.0145014	5.74
hsa-miR-374a-3p	0.002031	5.88
hsa-miR-580	0.001392	5.89

hsa-miR-588	0.0025896	5.96
hsa-miR-34c-3p	0.0035619	7.69

EK-2

Trastuzumab uygulaması arından SKBR3 hücrelerinde ifade değişikliği gösteren miRNA'lar

miRNA-ID	P-değeri	Kat Değişimi
hsa-miR-5196-5p	0.00041	8.86
hsa-miR-345-5p	0.001076	0.064
hsa-miR-514a-5p	0.001464	0.15
hsa-miR-2392	0.001512	6.07
hsa-miR-4754	0.001553	7.33
hsa-miR-5090	0.001562	6.16
hsa-miR-4768-3p	0.001565	7.68
hsa-miR-1587	0.00205	5.73
hsa-miR-3923	0.002068	5.59
hsa-miR-3684	0.002313	0.13
hsa-miR-4707-5p	0.003535	4.87
hsa-miR-580	0.003577	16.18
hsa-miR-92b-5p	0.004378	7.39
hsa-miR-339-3p	0.004607	0.057
hsa-miR-890	0.004637	6.76
hsa-miR-3136-5p	0.004746	4.42
hsa-miR-744-3p	0.004813	5
hsa-miR-330-5p	0.005154	5.12
hsa-miR-514b-3p	0.005241	0.24
hsa-miR-338-5p	0.005305	10.54

hsa-miR-567	0.005738	0.24
hsa-miR-4483	0.005883	4.48
hsa-miR-4750-5p	0.006078	4.69
hsa-miR-3192	0.006339	4.77
hsa-miR-545-3p	0.006497	0.23
hsa-miR-875-3p	0.006712	4.42
hsa-miR-581	0.007349	0.2
hsa-miR-627	0.007483	0.23
hsa-miR-4472	0.007672	3.92
hsa-miR-4481	0.00784	3.86
hsa-miR-10b-5p	0.008059	0.16
hsa-miR-6716-5p	0.008135	6.27
hsa-miR-520d-3p	0.008829	4.48
hsa-miR-4259	0.00893	3.71
hsa-miR-181d	0.00896	3.59
hsa-miR-744-5p	0.009318	0.26
hsa-miR-942	0.009318	4.45
hsa-miR-513a-3p	0.009753	3.53
hsa-miR-4447	0.009784	3.59
hsa-miR-642a-5p	0.009933	0.22
hsa-miR-615-3p	0.010013	0.21
hsa-miR-33a-3p	0.010023	4.53
hsa-miR-4680-5p	0.010043	4.06
hsa-miR-501-5p	0.010111	0.22
hsa-miR-105-3p	0.010578	3.51
hsa-miR-585	0.011409	3.95
hsa-miR-4738-3p	0.01159	0.29

hsa-miR-380-5p	0.011821	3.46
hsa-miR-5195-5p	0.013191	0.3
hsa-miR-4729	0.013471	3.8
hsa-miR-654-5p	0.013557	3.59
hsa-miR-668	0.01368	3.31
hsa-miR-671-3p	0.014289	0.3
hsa-miR-143-3p	0.014335	3.23
hsa-miR-4789-5p	0.014354	0.29
hsa-miR-1273f	0.014693	5.72
hsa-miR-3688-3p	0.015039	3.66
hsa-miR-5692a	0.015151	0.31
hsa-miR-548ah-5p	0.015168	0.31
hsa-miR-518e-3p	0.01537	3.35
hsa-miR-1915-5p	0.015434	0.28
hsa-miR-4701-3p	0.015921	3.13
hsa-miR-544a	0.016123	3.13
hsa-miR-432-5p	0.016529	3.14
hsa-miR-623	0.016828	5.61
hsa-miR-593-5p	0.017043	3.17
hsa-miR-607	0.017152	3.19
hsa-miR-578	0.017373	0.28
hsa-miR-296-3p	0.018052	0.21
hsa-miR-506-5p	0.018718	0.33
hsa-miR-3193	0.018885	0.32
hsa-miR-548a-5p	0.019055	0.33
hsa-miR-219-1-3p	0.019138	0.34

hsa-miR-195-3p	0.019282	0.33
hsa-miR-511	0.019592	0.3
hsa-miR-943	0.020213	0.31
hsa-miR-4791	0.020652	0.29
hsa-miR-6133	0.020794	3.11
hsa-miR-4760-5p	0.021372	0.11
hsa-miR-4496	0.022118	3.29
hsa-miR-1245b-3p	0.022185	0.33
hsa-miR-4270	0.022505	3.43
hsa-miR-1268b	0.022805	3.3
hsa-miR-4420	0.023127	2.88
hsa-miR-4714-3p	0.023676	0.35
hsa-miR-3127-5p	0.023729	3.6
hsa-miR-593-3p	0.024089	0.24
hsa-miR-641	0.024407	5.2
hsa-miR-216b	0.024543	3.08
hsa-miR-1292-3p	0.024662	0.36
hsa-miR-1268a	0.024958	3.04
hsa-miR-624-5p	0.02567	3.64
hsa-miR-367-5p	0.026003	3.15
hsa-miR-3188	0.026367	2.97
hsa-miR-4746-5p	0.026801	0.33
hsa-miR-3160-5p	0.027097	2.87
hsa-miR-139-5p	0.027105	0.35
hsa-miR-3194-3p	0.027134	0.33
hsa-miR-18a-3p	0.027284	0.36

hsa-miR-4322	0.027519	2.81
hsa-miR-548d-5p	0.028012	2.77
hsa-miR-3976	0.028377	0.16
hsa-miR-5591-5p	0.028547	0.28
hsa-miR-887	0.028869	0.27
hsa-miR-4441	0.028911	0.36
hsa-miR-4804-5p	0.029068	2.91
hsa-miR-1226-3p	0.029222	3.05
hsa-miR-4666a-5p	0.029711	0.18
hsa-miR-1224-3p	0.029728	3.01
hsa-miR-3194-5p	0.030067	3.03
hsa-miR-4635	0.030226	2.84
hsa-miR-647	0.030473	0.34
hsa-miR-3612	0.030643	0.35
hsa-miR-3116	0.030785	0.35
hsa-miR-19a-5p	0.030978	0.1
hsa-miR-182-3p	0.031132	0.35
hsa-miR-2467-5p	0.031417	0.31
hsa-miR-2052	0.0317	0.3
hsa-miR-188-3p	0.03222	2.66
hsa-miR-921	0.032568	3.61
hsa-miR-649	0.033143	0.36
hsa-miR-1273d	0.033167	2.76
hsa-miR-4644	0.033259	3.86
hsa-miR-3942-5p	0.033263	2.72
hsa-miR-185-3p	0.03341	0.34

hsa-miR-6510-5p	0.033462	2.63
hsa-miR-208b	0.033967	0.37
hsa-miR-572	0.033972	0.38
hsa-miR-4480	0.034063	2.67
hsa-miR-298	0.034165	2.68
hsa-miR-4272	0.034187	0.34
hsa-miR-365b-5p	0.034341	0.35
hsa-miR-217	0.034346	4.25
hsa-miR-545-5p	0.034522	0.33
hsa-miR-613	0.035063	6.24
hsa-miR-4713-5p	0.035361	0.37
hsa-miR-26a-1-3p	0.035473	2.71
hsa-miR-382-3p	0.035553	0.34
hsa-miR-4417	0.035622	2.66
hsa-miR-664a-5p	0.035638	2.7
hsa-miR-615-5p	0.035685	0.37
hsa-miR-3621	0.035879	0.34
hsa-miR-24-2-5p	0.036476	0.33
hsa-miR-1247-3p	0.036682	0.18
hsa-miR-301b	0.03674	2.75
hsa-miR-101-5p	0.037233	2.75
hsa-miR-4745-5p	0.037377	0.38
hsa-miR-3187-3p	0.03832	0.32
hsa-miR-4802-3p	0.038405	2.84
hsa-miR-3691-3p	0.038554	0.33
hsa-miR-5680	0.038674	2.72
hsa-miR-1537	0.038744	2.76

hsa-miR-548ap-3p	0.039111	0.39
hsa-miR-371a-5p	0.039179	2.67
hsa-miR-541-3p	0.039253	0.29
hsa-miR-138-2-3p	0.039339	3.01
hsa-miR-302d-3p	0.039633	0.33
hsa-miR-3656	0.039873	2.8
hsa-miR-600	0.039917	2.63
hsa-miR-4478	0.039958	2.64
hsa-miR-34c-3p	0.040274	0.35
hsa-miR-4257	0.040378	0.33
hsa-miR-519e-5p	0.040384	4.61
hsa-miR-938	0.040424	0.39
hsa-miR-493-3p	0.04107	2.69
hsa-miR-449a	0.041141	2.65
hsa-miR-127-5p	0.041185	0.36
hsa-miR-5693	0.041213	0.39
hsa-miR-200a-3p	0.041457	0.048
hsa-miR-4757-5p	0.041513	2.5
hsa-miR-4704-5p	0.041676	0.4
hsa-miR-4501	0.042019	0.34
hsa-miR-455-3p	0.042792	0.39
hsa-miR-4694-5p	0.042816	2.48
hsa-miR-146b-3p	0.043094	0.37
hsa-miR-619	0.043105	2.75
hsa-miR-873-5p	0.043163	0.37
hsa-miR-624-3p	0.043913	2.69

hsa-miR-190a	0.043939	0.13
hsa-miR-548b-3p	0.044087	2.59
hsa-miR-4753-5p	0.045372	0.4
hsa-miR-3074-5p	0.045759	0.41
hsa-miR-519e-3p	0.046126	0.36
hsa-miR-4319	0.046141	2.98
hsa-miR-548aq-5p	0.046183	0.35
hsa-miR-769-5p	0.046224	0.38
hsa-miR-601	0.046344	3.32
hsa-miR-130b-5p	0.046418	3.17
hsa-miR-5708	0.046446	0.42
hsa-miR-589-5p	0.046579	2.48
hsa-miR-509-5p	0.046896	2.47
hsa-miR-568	0.047061	0.41
hsa-miR-99a-3p	0.047169	0.41
hsa-miR-4783-5p	0.047265	0.4
hsa-miR-3161	0.047384	0.36
hsa-miR-3115	0.047434	2.91
hsa-miR-151a-3p	0.047925	0.36
hsa-miR-888-3p	0.048065	0.4
hsa-miR-106a-3p	0.048368	2.89
hsa-miR-655	0.048513	0.25
hsa-miR-452-3p	0.048538	0.36
hsa-miR-147b	0.048965	0.36

EK-3

Lapatinib uygulaması ardından BT474 hücrelerinde ifade değişikliği gösteren miRNA'lar

miRNA ID	P-Değeri	Kat değişimi
hsa-miR-516a-3p	0.0000933	0.023
hsa-miR-1297	0.0003543	0.054
hsa-miR-217	0.0006503	0.074
hsa-miR-769-3p	0.0237291	0.074
hsa-miR-490-5p	0.0071992	0.087
hsa-miR-668-3p	0.006049	0.11
hsa-miR-509-5p	0.0101982	0.11
hsa-miR-10a-3p	0.0126413	0.11
hsa-miR-5686_v19.0	0.0014138	0.12
hsa-miR-452-3p	0.0071855	0.12
hsa-miR-505-5p	0.0253852	0.13
hsa-miR-514a-3p	0.0021023	0.14
hsa-miR-5703	0.0045336	0.15
hsa-miR-135b-5p	0.0125945	0.15
hsa-miR-4486	0.0029227	0.16
hsa-miR-548aj-3p	0.0111569	0.16
hsa-miR-559	0.0148036	0.16
hsa-miR-943	0.0235571	0.16
hsa-miR-186-3p	0.0244425	0.16
hsa-miR-4529-5p	0.0280284	0.16
hsa-miR-759	0.0497701	0.16
hsa-miR-105-5p	0.0057108	0.17
hsa-miR-371b-3p	0.0089045	0.17

hsa-miR-548aq-5p	0.0247095	0.17
hsa-miR-4659a-3p	0.0054556	0.18
hsa-miR-33b-5p	0.0073214	0.18
hsa-miR-6716-3p	0.0224017	0.19
hsa-miR-34c-3p	0.0071126	0.2
hsa-miR-150-3p	0.01761	0.2
hsa-miR-1295b-3p	0.0089602	0.21
hsa-miR-411-5p	0.0115231	0.21
hsa-miR-130b-5p	0.0123768	0.21
hsa-miR-378j	0.0337324	0.21
hsa-miR-548aa	0.015824	0.22
hsa-miR-4738-3p	0.0170273	0.22
hsa-miR-4473	0.0238432	0.22
hsa-miR-1289	0.0383443	0.22
hsa-miR-637	0.0083484	0.23
hsa-miR-3662	0.0087598	0.23
hsa-miR-4445-5p	0.0107539	0.23
hsa-miR-4655-5p	0.0157217	0.23
hsa-miR-4476	0.0226561	0.23
hsa-miR-4297	0.0087913	0.24
hsa-miR-935	0.0114829	0.24
hsa-miR-4778-5p	0.014646	0.24
hsa-miR-138-2-3p	0.0230871	0.24
hsa-miR-556-3p	0.0477168	0.24
hsa-miR-593-5p	0.0149008	0.25
hsa-miR-4689	0.0155872	0.25
hsa-miR-146a-5p	0.0219971	0.25

hsa-miR-4441	0.0408935	0.25
hsa-miR-586	0.0464286	0.25
hsa-miR-4761-3p	0.0215668	0.26
hsa-miR-4259	0.0385671	0.26
hsa-miR-550a-3-5p	0.0389993	0.26
hsa-miR-5008-3p	0.0204132	0.27
hsa-miR-520f-3p	0.021937	0.27
hsa-miR-631	0.0233268	0.27
hsa-miR-185-3p	0.0350819	0.27
hsa-miR-4712-3p	0.0367234	0.27
hsa-miR-378h	0.049208	0.27
hsa-miR-924	0.0319864	0.28
hsa-miR-3133	0.0350272	0.28
hsa-miR-3688-5p	0.0482229	0.28
hsa-miR-876-3p	0.0482975	0.28
hsa-miR-520c-3p	0.0164665	0.29
hsa-miR-4769-5p	0.0185972	0.29
hsa-miR-4301	0.0186522	0.29
hsa-miR-5095	0.0213624	0.29
hsa-miR-338-5p	0.0224895	0.29
hsa-miR-4419a	0.0274115	0.29
hsa-miR-150-5p	0.0179707	0.3
hsa-miR-379-5p	0.0189821	0.3
hsa-miR-4645-5p	0.021691	0.3
hsa-miR-187-5p	0.0234958	0.3
hsa-miR-641	0.0235383	0.3
hsa-miR-646	0.0258052	0.3

hsa-miR-1255a	0.0275697	0.3
hsa-miR-2682-3p	0.0310151	0.3
hsa-miR-411-3p	0.0346933	0.3
hsa-miR-4324	0.0444608	0.3
hsa-miR-4445-3p	0.0243247	0.31
hsa-miR-26a-1-3p	0.0265481	0.31
hsa-miR-1293	0.0283546	0.31
hsa-miR-3150b-3p	0.032951	0.31
hsa-miR-4740-3p	0.0413677	0.31
hsa-miR-4498	0.0258905	0.32
hsa-miR-5581-5p	0.0296613	0.32
hsa-miR-636	0.0353142	0.32
hsa-miR-4756-3p	0.0450294	0.32
hsa-miR-570-3p	0.0245283	0.33
hsa-miR-4258	0.0253442	0.33
hsa-miR-6076	0.029225	0.33
hsa-miR-548at-3p	0.0358352	0.33
hsa-miR-5011-3p	0.0408632	0.33
hsa-miR-502-5p	0.0413188	0.33
hsa-miR-363-3p	0.0358429	0.34
hsa-miR-4752	0.0379818	0.34
hsa-miR-6722-5p	0.0409559	0.34
hsa-miR-3605-5p	0.0410619	0.34
hsa-miR-4676-3p	0.0413784	0.34
hsa-miR-103a-2-5p	0.0416438	0.34
hsa-miR-942-5p	0.0294506	0.35
hsa-miR-3917	0.0371007	0.35

hsa-miR-199a-3p	0.0422507	0.35
hsa-miR-4699-5p	0.0352529	0.36
hsa-miR-1236-3p	0.0372061	0.36
hsa-miR-513c-3p	0.0373382	0.36
hsa-miR-579-3p	0.0362873	0.37
hsa-miR-5579-3p	0.0413338	0.37
hsa-miR-4539	0.0394072	0.38
hsa-miR-1343-3p	0.0499889	0.39
hsa-miR-4420	0.0475373	0.4
hsa-miR-3074-5p	0.0474115	2.51
hsa-miR-4666a-5p	0.0482183	2.51
hsa-miR-671-3p	0.0387827	2.65
hsa-miR-4759	0.0414428	2.65
hsa-miR-4467	0.0472452	2.65
hsa-miR-649	0.0477518	2.65
hsa-miR-339-5p	0.0440882	2.69
hsa-miR-875-3p	0.0370454	2.7
hsa-miR-708-3p	0.0472364	2.7
hsa-miR-598-3p	0.0399868	2.71
hsa-miR-3150a-3p	0.0474896	2.71
hsa-miR-550a-5p	0.0444079	2.73
hsa-miR-3618	0.0351931	2.74
hsa-miR-199a-5p	0.0344369	2.76
hsa-miR-6082	0.0362772	2.76
hsa-miR-4495	0.0386644	2.83
hsa-miR-1279	0.0404736	2.84
hsa-miR-499b-5p	0.036221	2.85

hsa-miR-20b-3p	0.0403982	2.85
hsa-miR-576-3p	0.0484043	2.91
hsa-miR-1237-3p	0.0300084	2.92
hsa-miR-4524a-3p	0.0292471	2.93
hsa-miR-4768-3p	0.0487201	2.95
hsa-miR-3617-5p	0.0460935	2.98
hsa-miR-513b-5p	0.0477782	2.98
hsa-miR-2113	0.0284401	3.05
hsa-miR-4496	0.0359119	3.05
hsa-miR-342-5p	0.049107	3.1
hsa-miR-548x-3p	0.0221271	3.11
hsa-miR-4800-5p	0.0363381	3.11
hsa-miR-16-2-3p	0.0275294	3.12
hsa-miR-19b-1-5p	0.030334	3.13
hsa-miR-4462	0.0423422	3.16
hsa-miR-486-3p	0.0218435	3.21
hsa-miR-621	0.0330755	3.26
hsa-miR-216b-5p	0.0193426	3.27
hsa-miR-661	0.0203034	3.4
hsa-miR-1273d	0.0168458	3.41
hsa-miR-4707-3p	0.0380765	3.41
hsa-miR-892b	0.0283692	3.48
hsa-miR-222-3p	0.0499936	3.48
hsa-miR-3685	0.0184364	3.51
hsa-miR-181b-3p	0.0182356	3.52
hsa-miR-3678-3p	0.0384353	3.53
hsa-miR-5009-3p	0.022548	3.54

hsa-miR-4648	0.0305957	3.6
hsa-miR-4753-3p	0.0488193	3.66
hsa-miR-758-5p	0.0127996	3.67
hsa-miR-658	0.0165712	3.67
hsa-miR-769-5p	0.0266577	3.69
hsa-miR-3129-5p	0.0173481	3.75
hsa-miR-339-3p	0.0155882	3.76
hsa-miR-4633-5p	0.0139492	3.78
hsa-miR-190a-5p	0.0261367	3.88
hsa-miR-29b-1-5p	0.0407451	3.9
hsa-miR-6077	0.0125207	3.92
hsa-miR-585-3p	0.0105107	4.01
hsa-miR-1283	0.0460936	4.02
hsa-miR-3927-5p	0.0126461	4.03
hsa-miR-302f	0.0092123	4.19
hsa-miR-5188	0.0451348	4.19
hsa-miR-655-3p	0.009024	4.37
hsa-miR-663b	0.0324123	4.39
hsa-miR-28-3p	0.007031	4.44
hsa-miR-496	0.0181278	4.44
hsa-miR-4795-5p	0.0167565	4.52
hsa-miR-378g	0.0147477	4.53
hsa-miR-424-3p	0.0387908	4.57
hsa-miR-4775	0.0066005	4.65
hsa-miR-4760-3p	0.0207116	4.71
hsa-miR-4681	0.0211544	4.76
hsa-miR-4475	0.0151045	4.81

hsa-miR-4743-3p	0.0268139	4.92
hsa-miR-3658	0.0068488	4.99
hsa-miR-3181	0.0127053	5.01
hsa-miR-512-3p	0.0063445	5.05
hsa-miR-454-5p	0.0335019	5.05
hsa-miR-499a-3p	0.0049509	5.08
hsa-miR-4718	0.0126649	5.18
hsa-miR-147b	0.0182108	5.29
hsa-miR-23a-5p	0.0350096	5.32
hsa-miR-149-3p	0.0458277	5.55
hsa-miR-4803	0.030992	5.57
hsa-miR-125b-1-3p	0.0043777	5.79
hsa-miR-371a-5p	0.0087925	6.03
hsa-miR-892c-5p	0.012066	6.06
hsa-miR-3929	0.0195699	6.12
hsa-miR-6079	0.0189584	6.21
hsa-miR-3529-5p	0.0031395	6.33
hsa-miR-31-5p	0.0265808	6.34
hsa-miR-4647	0.0053432	6.64
hsa-miR-507	0.0041523	7
hsa-miR-206	0.0092056	7.45
hsa-miR-4749-5p	0.0027754	7.9
hsa-miR-1262	0.0018146	7.98
hsa-miR-548i	0.0029249	7.98
hsa-miR-556-5p	0.0443427	8.56
hsa-miR-449a	0.0042273	8.85
hsa-miR-581	0.002554	10.26

hsa-miR-938	0.0050742	10.55
hsa-miR-3680-3p	0.0066811	11.21
hsa-miR-3944-3p	0.007509	14.12

EK-4

Lapatinib uygulaması ardından SKBR3 hücrelerinde ifade değişikliği gösteren miRNA'lar

miRNA ID	P-değeri	Kat Değişimi
hsa-miR-302f	0.0011234	19.33
hsa-miR-662	0.0036626	13.95
hsa-miR-181a-2-3p	0.004339	9.51
hsa-miR-3183	0.048018	8.14
hsa-miR-6501-3p	0.0073912	8.05
hsa-miR-1251-5p	0.0019563	7.87
hsa-miR-574-3p	0.0133975	7.27
hsa-miR-3181	0.0044865	7.05
hsa-miR-4699-5p	0.0448839	6.88
hsa-miR-570-3p	0.0394342	6.56
hsa-miR-4784	0.0281642	6.41
hsa-miR-5586-3p	0.028596	6.24
hsa-miR-4750-5p	0.039997	5.88
hsa-miR-548ar-3p	0.0265703	5.78
hsa-miR-5000-5p	0.0187513	5.37
hsa-miR-500a-5p	0.0069827	5.35
hsa-miR-642a-5p	0.0459165	5.33
hsa-miR-4684-5p	0.0053028	5.32
hsa-miR-548at-5p	0.0142152	4.99

hsa-miR-3685	0.0048051	4.93
hsa-miR-6715b-5p	0.0298838	4.87
hsa-miR-4321	0.0165277	4.78
hsa-miR-581	0.0455131	4.76
hsa-miR-4658	0.0104288	4.72
hsa-miR-888-3p	0.0299467	4.54
hsa-miR-1257	0.0128673	4.45
hsa-miR-19b-1-5p	0.0445013	4.37
hsa-miR-593-3p	0.0226332	4.15
hsa-miR-4776-5p	0.0424907	4.09
hsa-miR-296-3p	0.0085148	3.99
hsa-miR-6717-5p	0.022278	3.89
hsa-miR-5579-5p	0.0096051	3.82
hsa-miR-6500-3p	0.0203699	3.81
hsa-miR-5008-3p	0.0128734	3.8
hsa-miR-4316	0.0109398	3.75
hsa-miR-4264	0.0165005	3.71
hsa-miR-452-3p	0.0187347	3.71
hsa-miR-635	0.0134039	3.69
hsa-miR-449c-3p	0.0154443	3.68
hsa-miR-567	0.0258981	3.66
hsa-miR-127-5p	0.0396419	3.61
hsa-miR-106b-3p	0.0160803	3.59
hsa-miR-590-3p	0.0386288	3.59
hsa-miR-3065-5p	0.0449002	3.57
hsa-miR-623	0.0375884	3.48
hsa-miR-544a	0.0498843	3.48

hsa-miR-4490	0.0334166	3.43
hsa-miR-4662a-3p	0.0193456	3.38
hsa-miR-186-3p	0.027389	3.36
hsa-miR-589-3p	0.0198574	3.34
hsa-miR-4798-5p	0.0240642	3.34
hsa-miR-591	0.034033	3.34
hsa-miR-6072	0.0161298	3.26
hsa-miR-3591-3p	0.0376972	3.23
hsa-miR-380-3p	0.0417389	3.12
hsa-miR-4277	0.0447644	3.11
hsa-miR-4795-3p	0.0249281	3.07
hsa-miR-4486	0.0488079	3.07
hsa-miR-4715-5p	0.0263558	3.04
hsa-miR-1305	0.0339453	2.96
hsa-miR-18a-3p	0.0280774	2.89
hsa-miR-6131	0.0319465	2.86
hsa-miR-3692-3p	0.0304869	2.83
hsa-miR-605-5p	0.0430796	2.83
hsa-miR-302b-3p	0.0451237	2.82
hsa-miR-4716-3p	0.0284543	2.79
hsa-miR-449a	0.0476983	2.78
hsa-miR-4720-5p	0.0420152	2.77
hsa-miR-337-5p	0.0463053	2.75
hsa-miR-653-5p	0.0395567	2.73
hsa-miR-3927-5p	0.0381989	2.72
hsa-miR-3607-3p	0.0471327	2.72
hsa-miR-4756-5p	0.0380514	2.7

hsa-miR-708-5p	0.047722	2.65
hsa-miR-6124	0.0373636	2.62
hsa-miR-574-5p	0.0420223	2.61
hsa-miR-1205	0.0483468	2.58
hsa-miR-5195-5p	0.041865	2.57
hsa-miR-550b-2-5p	0.0494892	2.57
hsa-miR-5706	0.0416836	2.55
hsa-miR-4274	0.0438516	2.54
hsa-miR-412-3p	0.0427144	2.51
hsa-miR-4676-5p	0.0431411	2.51
hsa-miR-3121-5p	0.043963	2.49
hsa-miR-626	0.0456967	2.47
hsa-miR-541-5p	0.0498764	2.4
hsa-miR-4266	0.0495582	0.41
hsa-miR-4319	0.0410746	0.4
hsa-miR-5692c	0.042335	0.4
hsa-miR-4800-5p	0.0485977	0.4
hsa-miR-26a-1-3p	0.0496053	0.39
hsa-miR-4293	0.0390098	0.38
hsa-miR-150-5p	0.0404574	0.38
hsa-miR-4435	0.0435731	0.38
hsa-miR-1306-3p	0.0462541	0.38
hsa-miR-614	0.0401658	0.37
hsa-miR-601	0.0427165	0.37
hsa-miR-374c-5p	0.0323053	0.36
hsa-miR-4652-5p	0.0441309	0.36
hsa-miR-3157-5p	0.0312582	0.35

hsa-miR-548t-5p	0.0334444	0.35
hsa-miR-520b	0.0413241	0.35
hsa-miR-4295	0.0446124	0.35
hsa-miR-5688	0.0489843	0.35
hsa-miR-4538	0.0290364	0.34
hsa-miR-4760-5p	0.0354407	0.34
hsa-miR-548ac	0.0395642	0.34
hsa-miR-935	0.0456317	0.34
hsa-miR-485-3p	0.0493509	0.34
hsa-miR-365b-5p	0.0233101	0.33
hsa-miR-216a-5p	0.0303226	0.33
hsa-miR-548b-3p	0.0382396	0.33
hsa-miR-4792	0.044362	0.33
hsa-miR-338-5p	0.0469992	0.33
hsa-miR-1294	0.0193819	0.32
hsa-miR-3131	0.0256119	0.32
hsa-miR-3673_v20.0	0.0333676	0.32
hsa-miR-4298	0.0438248	0.32
hsa-miR-642b-5p	0.046826	0.32
hsa-miR-323b-5p	0.0214928	0.31
hsa-miR-4675	0.0249749	0.31
hsa-let-7a-3p	0.0257963	0.31
hsa-miR-609	0.0418508	0.31
hsa-miR-555	0.0447041	0.31
hsa-miR-182-3p	0.045315	0.31
hsa-miR-5006-3p	0.0165646	0.3
hsa-miR-4487	0.0293091	0.3

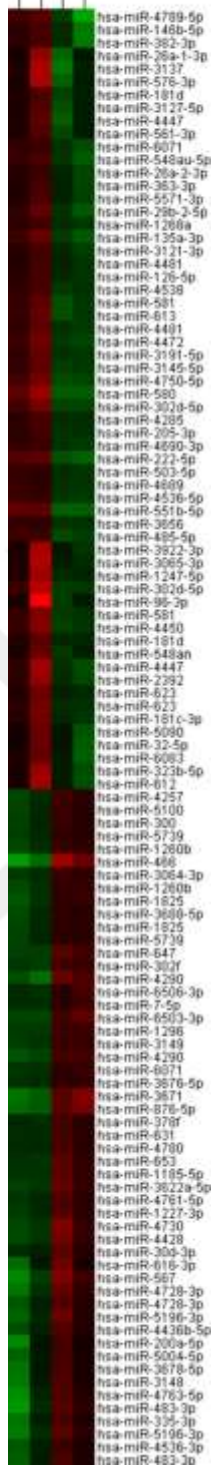
hsa-miR-371b-5p	0.0181534	0.29
hsa-miR-548aj-5p	0.0190939	0.29
hsa-miR-371a-5p	0.0258661	0.29
hsa-miR-3170	0.021623	0.28
hsa-miR-345-5p	0.026465	0.28
hsa-miR-4794	0.0360083	0.28
hsa-miR-3152-3p	0.0271396	0.27
hsa-miR-3926	0.0121019	0.26
hsa-miR-3689a-3p	0.0142693	0.26
hsa-miR-3944-5p	0.0307602	0.26
hsa-miR-185-3p	0.049672	0.26
hsa-miR-520d-3p	0.0078397	0.25
hsa-miR-1253	0.0090547	0.25
hsa-miR-1245a	0.0123069	0.25
hsa-miR-4670-3p	0.0256626	0.25
hsa-miR-325	0.0332526	0.25
hsa-miR-541-3p	0.0078022	0.24
hsa-miR-216b-5p	0.0236523	0.24
hsa-miR-16-1-3p	0.0064477	0.23
hsa-miR-599	0.0076615	0.23
hsa-miR-200a-5p	0.0247548	0.23
hsa-miR-617	0.0407829	0.23
hsa-miR-576-5p	0.0168726	0.22
hsa-miR-517-5p	0.0245499	0.22
hsa-miR-4696	0.035622	0.22
hsa-miR-875-3p	0.0382157	0.22
hsa-miR-517a-3p	0.0088039	0.21

hsa-miR-3137	0.0153719	0.21
hsa-miR-3167	0.0415772	0.21
hsa-miR-1226-5p	0.0073996	0.2
hsa-miR-5093	0.0074168	0.2
hsa-miR-4474-3p	0.0288282	0.2
hsa-miR-4300	0.049014	0.2
hsa-miR-4798-3p	0.0042304	0.19
hsa-miR-3151-5p	0.0039552	0.18
hsa-miR-938	0.0067209	0.18
hsa-miR-3122	0.0091217	0.18
hsa-miR-4524b-3p	0.0101869	0.18
hsa-miR-448	0.0030238	0.17
hsa-miR-516a-5p	0.0292231	0.17
hsa-miR-566	0.0468455	0.17
hsa-miR-612	0.018101	0.16
hsa-miR-493-3p	0.0198856	0.16
hsa-miR-4708-5p	0.0319933	0.16
hsa-miR-4789-3p	0.0319854	0.15
hsa-miR-622	0.0370113	0.15
hsa-miR-1276	0.0076865	0.14
hsa-miR-648	0.0228511	0.14
hsa-miR-194-3p	0.0015584	0.12
hsa-miR-421	0.0027768	0.12
hsa-miR-663b	0.0388995	0.12
hsa-miR-454-5p	0.0355297	0.11
hsa-miR-3178	0.0050821	0.1
hsa-miR-4782-5p	0.0005797	0.094

hsa-miR-649	0.0000697	0.03
-------------	-----------	------

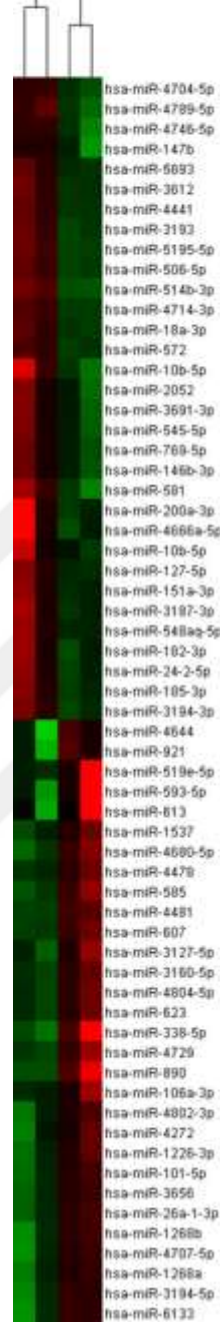


Lap1 Lap2 K1 K2



BT474

Lap1 Lap2 K1 K2



SKBR3

EK-5

1. tekrar	GFP Oranları (%)			
Enfeksiyon Günü	mirzip345 50 ul	mirzip449a 50 ul	nt1 50 ul	nt2 50 ul
4	66.1	38.9	51.6	65.2
6	74.3	40.2	63.9	67.5
9	70.6	31.7	61.2	65.9
11	70	30	61.2	65.4
13	67.2	25	61	66.3
16	60.2	20.6	60.8	65
18	58.6	19.1	61.6	65.9
20	58.8	20.9	63.5	66.7
23	55	19.8	61.8	66.1
25	51.7	18.8	60.6	65.6
27	48.7	18.2	60.1	64.8
29	45.3	17.9	60.1	64.5
31	45.4	17.3	61.1	63.7
34	43.6	17.9	61.2	64.8
37	41.1	17.4	59	61.6
40	41.5	18.2	62	65.7

	1. tekrar	Canlı Hücre		
--	------------------	--------------------	--	--

	Oranları (%)			
Enfeksiyon Günü	mirzip345 50 ul	mirzip449a 50 ul	nt1 50 ul	nt2 50 ul
4	78.5	83.9	72.8	75.6
6	81.5	81.5	78.4	80.2
9	81.5	81.5	80.1	82.5
11	85.8	86.1	87.4	84.9
13	81.6	82.2	79.5	81.9
16	81.2	85.7	85.2	86.4
21	87.1	88.3	87.1	88.5
23	88.7	89.6	89.4	90.2
27	89	91.5	90.8	90.5
29	89.7	90.9	91.1	91
31	87.8	86.7	86.3	88.5
34	83.9	87.6	89.2	86.2
37	85.5	88.8	87.1	86.3

2.tekrar	GFP Oranları (%)			
Enfeksiyon Günü	mirzip345 40 ul	mirzip449a 60 ul	nt1 40 ul	nt2 40 ul
4	53	31.1	42.3	45
6	53.4	28.2	43.5	44.9
9	48.3	22.9	40.2	43.5
11	47.5	17.9	40.2	44
13	44.8	18.9	39.5	43.1
16	42.9	15.9	39.3	43.4
21	39.7	14.2	39.4	42.4

23	37.8	13.7	39.3	42.4
25	35.2	13.3	38	42.7
27	33.4	13.2	37.7	41.8
29	31.1	12.8	36	41.1
31	29.7	12.6	35.5	39.9
34	27.7	12	35	39
37	26.2	12.2	33.6	39.1

	2. tekrar	Canlı Hücre Oranları		
Enfeksiyon Günü	nt1 80 ul	nt2 80 ul	mirzip345 80 ul	mirzip449a 100 ul
4	89.9	89.5	90	89.3
6	88.3	87.6	86.8	84.4
9	83.4	85	84.2	80.9
11	86.3	86.9	86.4	84.6
13	83.1	87.1	86.4	89
16	87.1	84.7	87.3	87.8
21	92.7	93.2	92.5	93.3
23	91.8	91.9	92.1	90.9
27	87	88.7	86.9	84.7
29	89.4	90.8	87.5	89.7
31	88.9	91.7	-	91.6
34	87.8	88.7	88	83.9
37	79.9	-	78.4	80.4

	3. tekrar	GFP Oranları (%)				
	Enfeksiyon Günü	mirzip345 80 ul	mirzip449a 100 ul	nt1 80 ul	nt2 80 ul	
	4	65.8	43.9	60.9	58.8	
	6	69.4	41.8	56.1	61.1	
	9	60.3	32.2	54.8	57.1	
	11	59.1	29.9	55.5	58	
	13	56.3	27.2	55.7	57.6	
	16	54.9	22.1	57.8	54	
	21	50.4	20.3	54.4	56.6	
	23	49.4	19.8	55	56.9	
	25	46.4	19.2	54.3	56	
	27	43.6	17.7	52.9	56	
	29	40.8	17	52.1	54.9	
	31	yok	16.4	51.1	53.9	
	34	35.7	16.2	49.6	52.9	
	37	33.2	15.5	47.5	yok	
	3. tekrar	Canlı Hücre Oranları (%)				
Enfeksiyon Günü	nt1 40 ul	nt2 40 ul	mirzip345 40 ul	mirzip449a 60 ul	hücre kontrol	
	4	88.4	87.9	90.4	89.4	90.4
	6	86.5	85.7	86.4	87	92.1
	9	85.5	85.6	85.4	82.7	88.3
	11	88	86.1	86.9	82.6	85.2
	13	85.5	87.4	87.7	89	90.1
	16	88.8	87	87.3	85.8	88

21	92.5	92.3	91.5	92.4	93
23	92.3	93.3	91.7	91.8	92.7
27	88.4	86.5	88.9	89.1	88.6
29	89.8	90.4	89.3	91.5	90.1
31	91.2	92.3	92.1	93.1	90.4
34	85.8	89.4	88.4	87.4	87.6
37	87.9	79.2	83.6	81.7	86.5

Normalize GFP oranları				
Enfeksiyon Günü	mirzip345 50 ul	mirzip449a 50 ul	nt1 50 ul	nt2 50 ul
4	1	1	1	1
6	1.062104293	0.964111815	1.062641	1.024056499
9	0.965270932	0.761576541	1.012079	0.982830433
11	0.95113474	0.675954774	1.01591	0.98907994
13	0.905849191	0.623326847	1.010197	0.984746927
16	0.851507256	0.514744619	1.018823	0.959914769
18	0.800516534	0.47000293	1.006169	0.971847818
20	0.784509565	0.47627153	1.020939	0.977638477
23	0.765346681	0.458002598	0.995882	0.974570993
25	0.691650307	0.436972285	0.978103	0.96246827
27	0.647871908	0.422228541	0.957098	0.946957278
29	0.647871908	0.422228541	0.957098	0.946957278
31	0.622851312	0.412958415	0.947684	0.930865712
34	0.584010942	0.399867556	0.941994	0.914440132
37	0.552835183	0.401837457	0.920113	0.93137696

10. ÖZGEÇMİŞ

Emine Ezel Çilek

Doğum Tarihi ve Yeri: 1986 – Osmancık

E-mail: ezelcil@gmail.com ecilek@ankara.edu.tr

EĞİTİM

2016 – halen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doktora Programı

2015 - 2016 University of Groningen (RUG)

University Medical Center Groningen

2012 – 2015 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doktora Programı

2004 – 2009 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Veteriner Hekimliği

GPA : 3.72/4.00

AKADEMİK TECRÜBE

University Medical Center Groningen, Groningen-Hollanda – Araştırmacı, 06.2016 - 09.2016 (3 ay)

University Medical Center Groningen, Groningen-Hollanda – Araştırmacı, 06.2015 - 02.2016 (8 ay)

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı- Veteriner Hekim, 01.2010 - 09.2011 (1 yıl, 8 ay)

ÖĞRETİM TECRÜBESİ

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı- Veteriner Hekim, 01.2010 - 09.2011 (1 yıl, 8 ay)

STAJLAR

Hannover Veterinary School, Institute of Biochemistry, Hannover, Almanya (2 hafta)

Friedrich Loeffler Institute, Institute of Emerging Novel Diseases, Greifswald, Almanya (3 ay)

The Free University of Berlin, Faculty of Veterinary Medicine, Small Animal Clinic, Berlin, Almanya (2 ay)

Başkent Hayvan Hastanesi (2.5 ay)

WORKSHOPLAR

Ankara Üniversitesi Laboratuar Hayvanları Uygulama Kursu, 25 Eylül-5 Ekim 2016, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye

EMBO (Avrupa Moleküler Biyoloji Organizasyonu) Uygulama Kursu: Non-coding RNAs; From discovery to function, 6-13 Haziran 2014, University of Galway, Galway, İrlanda

BURSLAR

2214-TÜBİTAK-BİDEB Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu (2015 -2016)

EMBO (Avrupa Moleküler Biyoloji Organizasyonu) Seyahat Bursu (2014)

2211-TÜBİTAK-BİDEB Yurt İçi Doktora Bursu (2011- 2015)

ERASMUS Staj Bursu (2011)

Başbakanlık Bursu (2004 – 2009)

ÖDÜLLER

EACR-ESMO Toplantı Katılım Ödülü (2017)

Prof. Dr. Selahattin Yalkı - Klinikler Bilimler Başarı Ödülü (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi)

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dönem Birinciliği Ödülü

ÜYELİKLER

The European Association for Cancer Research (EACR)

DiĞER BİLGİLER

Dil Becerileri;

İngilizce (İleri), Fransızca (Başlangıç), Almanca (Başlangıç)

YDS: 90 (İngilizce)

Bilgisayar Becerileri;

Cytoscape network analiz programı, Graphpad Prism 6, R programming (başlangıç seviyesi)

11. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Tezden Çıkan Yayınlar

Çilek EE., Rutgers, B., Koerts, J., Kluiver J., Van Den Berg A., Gur-Dedeoglu B., “ miRNA expression profiling and targetome analysis implicate the therapeutic effects of the responsive miRNAs in lapatinib treated SKBR3 cell line” (Manuskript)

Çilek EE., Ozturk H., Gur-Dedeoglu B., “ Construction of novel miRNA-miRNA network models revealing the miRNA-mediated mechanisms in trastuzumab treated breast cancer cell lines” (Manuskript)

Daha Önceki Yayınlar

Ergunay K, Aydogan S, Ozcebe O, Cilek EE, Hacıoglu S, Karakaya J, Ozkul A, Us D. "Toscana Virus (TOSV) exposure is confirmed in blood donors from Central, North and South/Southeast Anatolia, Turkey". Zoonoses and Public Health. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2011.01436.x

Kongre-Toplantı Bildirileri

1. Çilek EE., Ozturk H., Gur-Dedeoglu B., “A miRNA-mediated network analysis reveals trastuzumab responsive key players in breast cancer”, 41th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS), 3-8 Eylül 2016, Efes/Kusadasi.
2. Çilek EE., Öztumur Y., Bekmez T., Gur-Dedeoglu B., “Meta-Analysis of Gene Expression in Canine Mammary Tumors Reveals Novel Clinical Biomarkers and Biological Mechanisms”, The 32nd World Veterinary Congress, 12-15 Eylül 2015, İstanbul.
3. Çilek EE., Gur-Dedeoglu B., “miRNA-mediated Mechanisms of Trastuzumab and Lapatinib Treatment in Breast Cancer”, 40th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS), 4-9 Temmuz 2015, Berlin.
4. Çilek EE., Noyan S., Gur-Dedeoglu B., “Integration of two different high throughput technologies revealing trastuzumab responsive microRNAs”, EMBO

Conference: Functional Genomics and System Biology, 8-11 Kasım 2014, Heidelberg,

5. Noyan S., Çilek EE., Gur-Dedeoglu B., “Revealing the trastuzumab responsive miRNAs in breast cancer cell lines by qPCR-based array”, The 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 10-12 Eylül 2014, İzmir

