



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPİGENETİK BİR BASKILAYICI OLAN RNF2 GENİNİ
HEDEFLEYEN miRNA' LARIN BELİRLENMESİ ve METASTAZ
ve İNVAZYONA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

CEYDA OKUDU

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Gaziantep

2018



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPİGENETİK BİR BASKILAYICI OLAN RNF2 GENİNİ
HEDEFLEYEN miRNA' LARIN BELİRLENMESİ ve METASTAZ
ve İNVAZYONA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

CEYDA OKUDU

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK DOKTORA PROGRAMI

DANIŞMAN

Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Gaziantep

2018

T. C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

EPİGENETİK BİR BASKILAYICI OLAN RNF2 GENİNİ HEDEFLEYEN
miRNA' LARIN BELİRLENMESİ ve METASTAZ ve İNVAZYONA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

CEYDA OKUDU

Tez Savunma Tarihi: 19.10.2018
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Prof.Dr. Muradiye NACAĞ

Dr.Öğr. Üyesi Mustafa Ertan AY

Dr. Öğr. Üyesi Elif PALA

Dr. Öğr. Üyesi Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

19.10.2018

CEYDA OKUDU

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI' ya, sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışma dönemimde her konuda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Dr. Öğr.Üyesi Abu Shameem Md Saadat KHANDAKAR' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her anımda yanımda olan değerli arkadaşım Seçil EROĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yine sevgili arkadaşlarım Zeynep ULUKÜTÜK, Seçil DEMİRAL, Murat KORKMAZ, İbrahim ÇİTÇİ, Işıl YÜCEL ve Meltem ÖZER' e desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Tanıdığım ilk günden benden desteklerini esirgemeyen ve öz kızlarından ayırmayan sevgili ailem Ahmet OKUDU ve Meral OKUDU' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Akademik alanda attığım her adımda benden hiçbir zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen kıymetli annem Müjgan UYAR' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bütün varlığıyla beni destekleyen, bu yolda ilerlerken duyduğum heyecan ve mutluluğu tüm olumsuzluklara rağmen benimle birlikte yaşayan, bu yolda benim için büyük fedakarlıklar yapan en kıymetlim sevgili eşim Bünyamin OKUDU' ya ve tabii bu dönemde huzur ve enerji kaynağım canım kızım Sare OKUDU' ya sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGE ve KISALTMALAR.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser.....	2
2.2. Metastaz.....	2
2.3. Meme Bezi Yapısı ve Biyolojisi.....	5
2.3.1. Meme gelişimini etkileyen hormonlar ve diğer düzenleyici Faktörler.....	6
2.4. Meme Kanseri.....	7
2.4.1. Meme kanseri epidemiyolojisi ve etiolojisi.....	7
2.4.2. Meme kanseri sınıflaması.....	8
2.4.2.1. Morfolojik ve histolojik sınıflama.....	8
2.4.2.2. Moleküler sınıflama.....	8
2.5. Polycomb Grup.....	9
2.5.1. Ring Finger Protein 2 (RNF2).....	11
2.6. MikroRNA' lar.....	13
2.6.1. Meme Kanseri ile İlişkili miRNA' lar.....	15
2.6.2. miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p.....	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
3.1. Gereç.....	18
3.1.1. Çalışmada Kullanılan hücre hatları ve özellikleri.....	18
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar, sarf malzemeler ve kimyasal maddeler.....	18
3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler.....	21
3.2. Yöntem.....	22

3.2.1. Hücre hatları ve kültür aşaması.....	22
3.2.2. RNF2 genini hedefleyen mirna' ların seçimi.....	23
3.2.3. RNF2 Genini Hedefleyen miRNA' ların Biyoinformatik Analizi.....	23
3.2.4. Hücre hatlarına mimik transfeksiyonu.....	24
3.2.5. Hücre hatlarından total RNA izolasyonu.....	25
3.2.6. İzole edilen RNA' ların kalite ve miktar tayini.....	26
3.2.7. RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	27
3.2.8. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gen ifade analizi.....	28
3.2.8.1. Primer tasarımı.....	29
3.2.8.2. PCR bileşenleri.....	30
3.2.8.2.A. miRNA ifadenme düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri ve koşulları.....	30
3.2.8.2.B. RNF2 ifadenme düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri ve koşulları.....	31
3.2.9. Hücre hatlarından protein izolasyonu	31
3.2.10. İzole edilen proteinlerin kalite ve miktar tayini.....	32
3.2.11. Western blotlama ile protein analizi.....	33
3.2.11.1. Protein konsantrasyonlarının eşitlenmesi ve denatürasyonu.....	33
3.2.11.2. Jel elektroforezi.....	34
3.2.11.3. Proteinlerin membrana transferi.....	34
3.2.11.4. İmmün blotlama (antikor inkübasyonu).....	35
3.2.11.5. Görüntüleme ve analiz.....	36
3.2.12. Metastaz ve invazyon testi.....	36
3.2.13. Yara iyileşme deneyi.....	38
3.2.14. Verilerin İstatiksel Analizi.....	38
4. BULGULAR.....	40
4.1. Hücre Hatlarında miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p İfade Analizi Sonuçları.....	40
4.1.1. MCF-7 hücre hattında miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p ifade analizi sonuçları.....	40
4.1.2. MDA-MB-231 hücre hattında miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p gen ifade analizi sonuçları.....	41

4.1.3. SK-BR-3 hücre hattında miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p gen ifade analizi sonuçları.....	42
4.1.4. ZR-75-1 hücre hattında miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p gen ifade analizi sonuçları.....	43
4.2. Hücre Hatlarında RNF2 Geninin İfade Analizi Sonuçları.....	45
4.3. Mimik Transfeksiyonu Sonrası miRNA Seviyelerindeki Değişim.....	46
4.4. Mimik Transfeksiyonu Sonrası RNF2 İfadelenme Seviyesindeki Değişim.....	47
4.4.1. MCF-7 Hücre Hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 ifadenme seviyesindeki değişim.....	47
4.4.2. MDA-MB-231 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 ifadenme seviyesindeki değişim.....	48
4.4.3. SK-BR-3 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 ifadenme seviyesindeki değişim.....	49
4.4.4. ZR-75-1 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 ifadenme seviyesindeki değişim.....	50
4.5. miRNA Transfeksiyonu Sonrası RNF2 Protein Seviyesindeki Değişim.....	51
4.5.1. MCF-7 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 protein seviyesindeki değişim.....	51
4.5.2. MDA-MB-231 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 protein seviyesindeki değişim.....	52
4.5.3. SK-BR-3 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 protein seviyesindeki değişim.....	53
4.5.4. ZR-75-1 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 protein seviyesindeki değişim.....	54
4.6. miRNA Transfeksiyonu Sonrası Metastaz ve İnvazyon Analizi Sonuçları.....	56
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	60
6. KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	73

SİMGE ve KISALTMALAR

Ac:Bis	Akrilamid:bisakrilamid
AIB1	Meme kanserinde amplifiye gen 1
Ago	Argonat protein
AMBRA1	Otofaji ve beclin 1 regülatör 1
APS	Amonyum persülfat
ATG7	Otofaji ilişkili gen 7
AU	Adenin urasil
BCA	Bisinkoninik asit
bç	Baz çifti
BRCA1	Meme kanseri 1
BTG3	Antproliferasyon faktör 3
BSA	Bovin serum albümin
CBX2	chromobox homolog 2
CDKN2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
DCIS	Duktal karsinoma in situ
DGCR8	Mikroışleyici kompleks altünite 8
dH₂O	Distile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E2F	Transkripsiyon faktör 1
ECL	Artırılmış kemilüminesan
EED	Embriyonik ektoderm gelişimi
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ER	Östrojen reseptör
EZH1	Zeste homolog artırıcı 1
FAK	Fokal adezyon kinaz
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
Fut6	Fukoziltransferaz 6
GAPDH	Gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz
HBSS	Hank's Dengeleme Tuz Solüsyonu
HDAC9	Histon deasetilaz 9
HER2	İnsan epidermal büyüme faktör reseptör 2
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HMGA2	Yükse mobilite grubu AT-Hook 2
HRP	At turpu peroksidazı
IDC	İnvaziv duktal karsinom
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
ILC	İnvaziv lobüler karsinom
ISG	İnterferon uyarıcı gen
JARID1A	Jumonji/ARID domain-içeren protein 1A
KIF26B	Kinezin ailesi 26B
LCIS	Lobüler karsinoma in situ
MAPK	Mitojen aktifleyen protein kinaz
MDM2	Fare çift dakika 2 homolog
MEK1/2	MAP kinaz/ERK kinaz 1/2
miRNA	Mikro ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü

ODZ1	Tenurin transmembran protein 1
p53	Protein 53
PBS	Fosfat tuz tamponu
PcG	Polycomb grup
PHC1	Polihomeotik homolog 1
PI3K	Fosfatidil inositol 3 kinaz
PR	Progesteron reseptör
PRC1	Polycomb baskılayıcı kompleks 1
PRE	Polycomb cevap elementi
PTEN	Fosfataz ve tensin homolog
PVDF	Polivinilidenflorit
RBBP4	retinoblastoma bağlanma proteini 4
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon assay
RISC	RNA indüklenmiş susturma kompleksi
RNF2	Ring parmak protein 2
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu
RUNX	Runt ilişkili transkripsiyon faktörü
RYBP	RING1 ve YY1 bağlanma proteini
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SETD2	SET domaini içeren protein 1
SIK1	Tuz indükleyici kinaz 1
siRNA	Small interfering RNA
SRC-3	Steroid reseptör koaktivatör-3
STAT3	Sinyal çevirici ve transkripsiyon aktivatör 3
SUZ12	Zeste homolog baskılayıcı 12
TBS	Tris- tuz tamponu
TBST	Tris- tuz tamponu –Tween 20
TDLU	Terminal kanal (dukt) lobüler birim
TEMED	Tetrametiletildiamin
TGFβ	Transforme edici büyüme faktörü-β
THSK	Türk Halk Sağlığı Kurumu
TNM	Tümör-Nod-Metastaz
UTR	Kodlanmayan bölge

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Metastaz süreci aşamaları.....	4
Şekil 2.2. Meme anatomik yapısı.....	5
Şekil 2.3. Polycomb baskılayıcı kompleksler etki mekanizması.....	10
Şekil 2.4. RNF2 kromozom yerleşimi ve protein yapısı.....	14
Şekil 2.5. miRNA biyogenezi ve işleyişi.....	16
Şekil 3.1. Transfer kasetlerine membran ve jelin yerleştirilme modeli.....	35
Şekil 4.1. MCF-7 hücre hattında göreceli miRNA ifadenme sonuçları.....	41
Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücre hattında göreceli miRNA ifadenme Sonuçları.....	42
Şekil 4.3. SK-BR-3 hücre hattında göreceli miRNA ifadenme sonuçları.....	43
Şekil 4.4. SK-BR-3 hücre hattında göreceli miRNA ifadenme sonuçları.....	44
Şekil 4.5. miRNA seviyelerinin meme kanseri hücre hatları arasında karşılaştırılması.....	45
Şekil 4.6. RNF2 gen seviyesinin meme kanseri hücre hatları arasında karşılaştırılması.....	46
Şekil 4.7. Mimik transfeksiyonu sonrası miRNA ifade seviyelerindeki Değişim.....	47
Şekil 4.8. MCF-7 hücre hattında mimik transfeksiyonu sonrası RNF2 gen ifade analizi.....	48
Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücre hattında mimik transfeksiyonu sonrası RNF2 gen ifade analizi.....	49
Şekil 4.10. SK-BR-3 hücre hattında mimik transfeksiyonu sonrası RNF2 gen ifadenme seviyeleri.....	50
Şekil 4.11. ZR-75-1 hücre hattında mimik transfeksiyonu sonrası RNF2 gen ifadenme seviyeleri.....	51
Şekil 4.12. MCF-7 hücre hattında transfeksiyon sonrası RNF2 protein seviyesindeki değişim.....	52
Şekil 4.13. MDA-MB-231 hücre hattında transfeksiyon sonrası RNF2 protein seviyesindeki değişim.....	53
Şekil 4.14. SK-BR-3 hücre hattında transfeksiyon sonrası RNF2	

protein seviyesindeki değişim.....	54
Şekil 4.15. ZR-75-1 hücre hattında transfeksiyon sonrası RNF2	
protein seviyesindeki değişim.....	55
Şekil 4.16. miRNA mimik transfeksiyonlarının metastaza etkileri.....	56
Şekil 4.17. miRNA mimik transfeksiyonlarının invazyona etkileri.....	57
Şekil 4.18. miRNA mimik transfeksiyonlarının hücre göçüne etkileri.....	58



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1. Hücre hatlarının moleküler ve histopatolojik özellikleri.....	18
Tablo 3.2. RNF2 hedefleyen miRNA' ların özellikleri.....	24
Tablo 3.3. Transfeksiyon bileşenleri ve miktarları.....	25
Tablo 3.4. Elde edilen RNA konsantrasyonları.....	27
Tablo 3.5. Ters Transkriptaz PCR bileşenleri.....	28
Tablo 3.6. cDNA sentezi için PCR koşulları.....	28
Tablo 3.7. Tasarımı yapılan primerlerin özellikleri.....	29
Tablo 3.8. miRNA ifadenme seviyesi ölçümü için PCR bileşenleri.....	30
Tablo 3.9. miRNA ifadenmesi için RT-PCR koşulları.....	30
Tablo 3.10. RNF2 ifadenme seviyesi ölçümü için PCR bileşenleri.....	31
Tablo 3.11. RNF2 ifadenmesi için RT-PCR koşulları.....	31
Tablo 3.12. BSA standartlarının hazırlanışı ve son konsantrasyonları.....	32
Tablo 3.13. Elde edilen total proteinlerin konsantrasyonu.....	33

ÖZET

EPİGENETİK BİR BASKILAYICI OLAN RNF2 GENİNİ HEDEFLEYEN miRNA' LARIN BELİRLENMESİ ve METASTAZ ve İNVAZYONA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ceyda OKUDU

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Ekim 2018, 73 Sayfa

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen ve yüksek mortaliteye sahip bir kanser türüdür. Histopatolojik çeşitliliğinin yanı sıra karmaşık moleküler alt yapısı nedeniyle meme kanserinde tedavi hedefleri için moleküler çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. RNF2, polycomb baskılayıcı kompleks içerisinde yer alan bağlandığı proteini ubiquitinleyerek baskılayan bir proteindir. Embriyonik ve yetişkin evrede önemli rol oynayan RNF2' nin, bir çok metastatik kanser türünde ifadesinin artması ile beraber tümör baskılayıcı genleri susturması RNF2' ye onkojenik bir rol kazanmıştır. Bu çalışmada meme kanseri hücre hatlarında RNF2 gen ifade düzeyindeki değişimler ve bu genin miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p tarafından baskılanıp baskılanmadığı analiz edilmiştir. Ayrıca bu miRNA' ların transfekte edilmesi ile metastaz ve invazyon üzerine etkisi incelenmiştir. Bunun için MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3 ve ZR-75-1 meme kanseri hücre hatlarında miRNA transfeksiyonu öncesi ve sonrasında RNF2 gen ifade düzeyleri RT-PCR; protein ifade düzeyleri ise western blot ile analiz edilmiştir. Metastaz ve invazyon üzerine etkisi ise yara iyileşme ve boyden chamber yöntemleri kullanılarak saptanmıştır. RNF2' nin, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatlarında sırasıyla 4,1 ve 7,1 kat ifadesinin arttığı tespit edildi (sırasıyla $p=0,048$ ve $0,045$). miR-17-5p ve miR-20a-5p miRNA transfeksiyonu sonrasında MDA-MB-231 hücre hattında RNF2 gen ifade düzeyinde anlamlı bir azalış saptandı (sırasıyla 3,5 ve 7,3 kat) (sırasıyla $p=0,045$ ve $0,039$). Protein düzeyinde ise MDA-MB-231 hücre hattında her üç miRNA' nın da RNF2 proteinini azalttığı saptandı. Ayrıca miR-17-5p ve miR-20a-5p metastaz ve invazyonu baskımlarken miR-106b-5p' nin baskılamadığı saptandı. Sonuç olarak, metastatik yeteneği fazla olan meme kanseri hücrelerinde RNF2' nin ifadesi artmıştır. miR-17-5p ve miR-20a-5p, RNF2 aracılığı ile metastaz ve invazyonu baskılamaktadır. RNF2 meme kanseri için prognostik bir belirteç olmaya aday bir gen olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, metastaz, miRNA, polycomb, RNF2.

ABSTRACT

IDENTIFICATION of miRNAs THAT TARGET AN EPIGENETIC SUPPRESSOR RNF2 GENE and ITS EFFECT ON METASTASIS AND INVASION

Ceyda OKUDU

PHD Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Prof.Dr. Sibel OGUZKAN BALCI

October 2018, 73 pages

Breast cancer is the most common type of cancer among women and has a high mortality rate. In addition to its histopathological diversity, new molecular and molecular investigations are needed in the treatment of breast cancer due to its complex molecular background. RNF2 is a protein that is repressed by ubiquitin binding of the protein bound in the polycomb repressor complex. RNF2, which plays an important role in a number of biological processes in embryonic development and adult stage, has acquired an oncogenic role due to overexpression in several types of metastatic cancers, as well as silencing tumor suppressor genes. In this study, changes in the level of RNF2 gene expression in breast cancer cell lines were analyzed and whether this gene was suppressed by miR-17-5p, miR-20a-5p and miR-106b-5p. Furthermore, the effect of transfection of these miRNAs on metastasis and invasion has been investigated. For this reason, RNF2 gene expression levels before and after miRNA transfection in MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3 and ZR-75-1 breast cancer cell lines were analyzed by qRT-PCR and western blot analysis of protein expression levels. The effect on metastasis and invasion was observed using wound healing and dyed chamber methods. RNF2 was overexpressed 4.1 and 7.1fold in the MDA-MB-231 and SK-BR-3 cell lines, respectively ($p=0,048$ ve $0,045$ respectively). A significant decrease in gene expression after miRNA transfection was observed in miR-17-5p and miR-20a-5p (3.5 and 7.3 fold, respectively) ($p= 0,045$ ve $0,039$ respectively) at MDA-MB-231 cell line. At the protein level, it was observed that all three miRNAs decreased RNF2 protein at MDA-MB-231 cell line. It was also observed that miR-17-5p and miR-20a-5p suppressed metastasis and invasion and miR-106b-5p could not suppress it. As a result, RNF2 is overexpressed in breast cancer cells with more metastatic ability. miR-17-5p and miR-20a-5p suppress RNF2 targeting and suppress metastasis and invasion in this direction. RNF2 may be considered as a candidate gene to be a prognostic marker for breast cancer.

Key Words: Breast cancer, metastasis, miRNA, polycomb, RNF2.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüz teknolojisiyle birlikte kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılması, kanserden korunmada ve kanser tedavisinde kayda değer gelişmeler sağlamış olsa da gelişmiş ülkelerde kanser nedenli ölümler halen yüksek düzeylerde bulunmakta ve toplumdaki tüm ölümlerin % 25' ini oluşturmaktadır. Kanserden ölümlerin % 90'ından ise metastaz gelişimi sorumludur (1). En sık metastatik gelişim gösteren kanser türlerinden olan meme kanseri ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülmektedir.

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen ve mortaliteye sebep olan kanser türüdür. Meme kanserinin genetik, epigenetik ve transkriptomik değişiklikler nedeniyle çok farklı histolojik ve moleküler özelliklere sahip, klinik bulguları farklı olan ve tedaviye cevapları farklılık gösteren, beraberinde çeşitli oluşumları içeren heterojen bir hastalık olduğu görülmektedir. Bu fenotipik farklılık, meme kanserinde tanı, tedavi ve prognozu etkilemektedir (2).

Embriyonik dönemde hücre farklılaşmasının ve yetişkin dönemde ise doku sürekliliğinin epigenetik düzenleyicisi olan polycomb grubu (PcG) transkripsiyonel baskılayıcı olarak görev yapmaktadır (3). Polycomb grup genleri tarafından kontrol edilen birçok gelişimsel süreç bulunmaktadır. Epigenetik baskılayıcı olarak görev yapan polycomb grubuna ait RNF2 (Ring Finger Protein 2) proteini E3 ligaz aktivitesi göstererek histon ubiquitinasyonunda rol oynamaktadır (4). Metastatik melanoma (5), prostat (6), mesane (7), duktal meme kanseri (8), pankreatik duktal adenokarsinom (9), yumurtalık (10) ve karaciğer kanseri (11) gibi çeşitli kanser türlerinde RNF2 geninin ifadesinin arttığı bildirilmiştir. Aynı zamanda RNF2' nin epigenetik olarak susturduğu genlerin biyolojik süreçte tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı bildirilmiştir. Dolayısıyla RNF2, hem ubiquitinleyerek sessizleştirdiği genler açısından hem de birçok metastatik tümörde ifadesinin artması açısından onkogenik bir protein olarak anılmaktadır.

Bir diğer epigenetik düzenleyiciler olan mikroRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA

genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir. MikroRNA, fonksiyon olarak gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli bir RNA molekül çeşididir (12). Olgun mikroRNA'lar hedef genlerin ifadesini azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. miRNA'lar kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın moleküler patogenezinde önemli rol oynamalarının yanısıra insan kanserlerinin patogenezinde ve terapi ajanlarının klinik uygulamalarında ana role sahiptirler (13). Bir kanser hücresinde miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı özellik kazanabilmektedir (12). Bu doğrultuda miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p mikroRNA'larının dokuya özgü olarak hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik rol aldıkları bildirilmiştir. Örneğin, miR-17-5p meme kanseri için çok önemlidir. AIB1 ve siklin D1 ifadenmesini inhibe ederek meme kanserinde tümör baskılayıcı olarak rol oynamaktadır. Ayrıca TGF β ve hipoksi yollarını içeren birçok pro-metastatik geni hedeflemektedir (14). miR-20a-5p ise onkogenik bir miRNA olarak fonksiyon göstermektedir. Örneğin; nasofarinjeal karsinomda PTEN/PI3K/Akt yolağını aktive ederek radyoterapiye direnci indüklediği bildirilmiştir (15). miR-106b-5p'nin PTEN'i hedefleyip SETD2 gibi tümör baskılayıcı geni inhibe ederek ve WNT yolağını indükleyerek kanser tetikleyici onkomir olarak rol oynadığı yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (16-18).

Araştırmamızda meme kanserinde, RNF2'nin miRNA ile hedeflendiğinde gen ifadesinde meydana gelen değişimler ve bunun metastaz üzerindeki etkisinin ortaya konması hedeflenmiştir. Metastatik tümör hücrelerinde ifadesinin arttığı bilinen RNF2 geninin miRNA'lar ile ilişkisine dair bilgilerimiz dahilinde literatürde tek bir çalışma bulunmaktadır (19). Moleküler işleyişi tam aydınlatılamamış olan RNF2 geninin kanserleşme sürecindeki olası rolünün ortaya konmasına katkı sağlamak amaçlanmıştır. Aynı zamanda RNF2 geni ile bu miRNA'lar arasındaki ilişkinin aydınlatılması ile meme kanserinin karmaşık moleküler alt yapısına yeni bir veri kazandırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

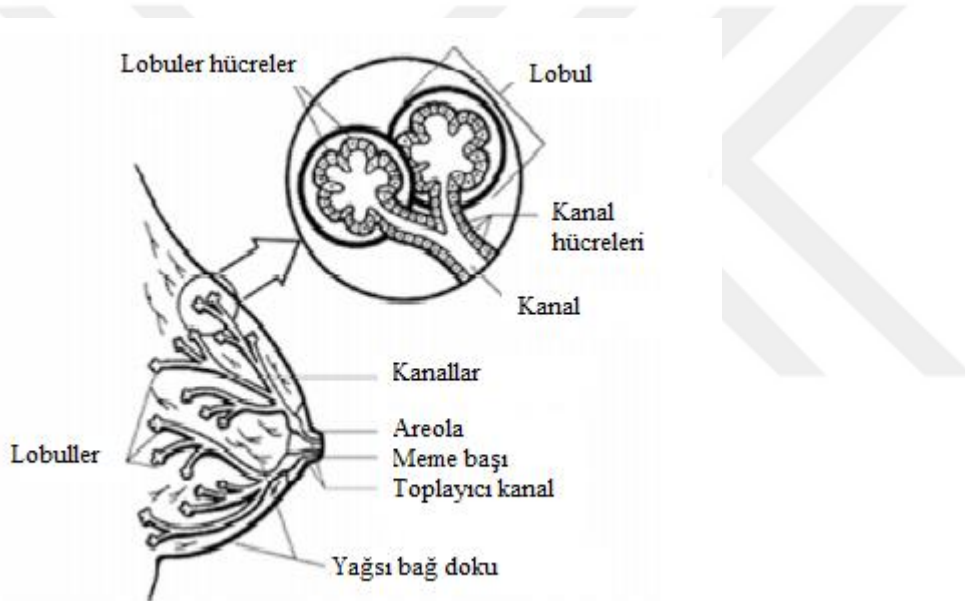
Kanser vücuttaki bir hücre ya da hücre grubunun iç ve dış etkenlerle farklılaşarak aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu meydana gelen multifaktöriyel bir hastalıktır. Dünya genelinde yaygın olarak görülüp kardiyak rahatsızlıklardan sonra en sık görülen ölüm sebebidir. Kanseri hücreleri farklı doku ve organlardan köken alsa da tümörleşme sürecinde kazandığı ortak karakteristik özellikleri vardır. Bunların başında, sınırsız büyüme, kontakt inhibisyonun ortadan kalkması, apoptoza direnme, anjiyogenezin uyarılması, doku ve organ istilası ile uzak dokulara metastaz sıralanabilir (20). Hücrelerin anormal büyümesi ve aşırı çoğalması ile karakterize olan hücreler çevre dokuları istila etme ve sonuçta uzak doku ve organlara göç etme eğilimindedirler (21).

2.2. Metastaz

Kanserin en önemli özelliklerinden biri kendi doğal kökenlerinden uzaklaşan anormal hücrelerin hızlı bir şekilde oluşumudur. Vücutta komşu dokulara ve daha sonra farklı organlara yayılırlar. Bu süreç birçok kanserde ölümlerin ana sebebi olarak bilenen “metastaz” olarak adlandırılmaktadır. Metastaz tüm kanserden ölümlerin %90’ ına sebep olmakla birlikte farklı klinik karakteristikler sergilemektedir.

Metastatik sürecin başlamasında belirli proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin etkisinin olduğu bilindiği gibi adezyon proteinleri, motilite faktörleri, matriks-bozucu proteazlar da rol oynamaktadır. Primer tümörden ayrılıp uzak organlara taşınması için metastatik kanser hücrelerinin bitişik tümör hücrelere yapışma yeteneğinin ortadan kalkması ile göç ve istila kapasitesinin artması gerekmektedir. Bu süreç ise epitelyal belirteç olan bazı genlerin (E-kaderin, kludin, okludin gibi) ifadesinin azalması ve mezenkimal belirteç olan bazı genlerin (N-kaderin, vimentin, fibronektin gibi) ifadesinin artması ile gerçekleşmektedir (22). Hastalık gelişimi döneminde kanser hücreleri komşu stroma hücrelerini bölgesel makrofaj ve fibroblastlarla uyarır ve dolaşımdaki monosit ve plateletleri primer tümör ile meşgul eder. Stromayla ilişkili sitokinler, büyüme faktörleri, matriks metalloproteinazlar ve kemokinler kemik iliği

Her meme bezi 15-20 loba ayrılmış olup her lob çok sayıda küçük lobüller içermektedir. Meme bezinin en temel, küçük birimleri terminal kanal (dukt) lobüler birimlerdir (TDLUs) ve bunlar tek bir geniş kanal oluşturmak için birleşirler. Bu lobüler birimler yağlı süt üretirler ve bu süt doğum sonrası lobüllerden kanallar aracılığıyla areolaya doğru akar (25). Yağ ve bağ doku lobüller ve kanallar arasındaki boşluğu doldurur ve lenfatik doku ile birlikte meme bezini oluşturur (Şekil 2.2). Yağ doku meme büyüklüğünü oluşturan ana bileşendir. Meme bezleri subkutan olarak anterior ve lateral torasik duvarda lokalizedir. Meme ucundaki meme başlarını çevreleyen pigmentli alana “areola” denmektedir (25). Duktal meme epiteli, salgılayıcı lüminal epitelyal hücreler ve bazal membranda yer alan kasılabilen miyoepitelyal bazal hücreleri içeren bazı hücre soylarından oluşur. Meme epiteli multipotent meme kök hücrelerinden köken alır (21).



Şekil 2.2. Meme anatomik yapısı (26).

2.3.1. Meme gelişimini etkileyen hormonlar ve diğer düzenleyici faktörler

Meme gelişimini ve doğum sonrası süt salgılanmasını etkileyen en önemli hormonlar östrojen, progesteron, prolaktin ve oksitosindir. Östrojen kız çocuklarında meme de dahil olmak üzere ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişimini hızlandırır. Progesteron memeyi laktasyona hazırlar. Östrojen memede stromal dokunun ve duktal sistemin gelişimini sağlar ve yağ depolanmasına yardımcı olur. Progesteron ise memede lobüloalveolar farklılaşma için gereklidir. Bu steroid hormonlar hücrelerdeki reseptörlerine bağlanarak çeşitli sinyal mekanizmalarını tetikler (24).

Östrojen reseptörü (ER) intraselüler bir reseptördür ve ER- α ve ER- β olmak üzere 2 formu vardır. Normal insan meme dokusunda ER- α luminal epitelyal hücrelerde ve ER- β mioepitelyal hücrelerde ve stromal hücrelerde ifadelenmektedir. ER- α -östrojen kompleksi gen transkripsiyonunu aktive ederken, ER- β -östrojen kompleksi transkripsiyonu ya aktive eder ya da inhibe eder. Progesteron reseptörünün (PR) ise 2 isoformu vardır: Progesteron- α ve PR- β . Farelerde yapılan deneylerde PR- α 'nın hamilelikle indüklenen memedeki duktal dallanmada ve PR- β 'nin ise lobüloalveoler gelişme için gerekli olduğu ortaya konmuştur (27).

Nöral gelişimde rol oynayan "Neuregulin", parakrin bir etkiyle lobüloalveolar gelişmeyi de artırmaktadır. Over kaynaklı olmayan prolaktin ve oksitosin gibi nöroendokrin hormonlar da meme fonksiyonu için önemlidir (24). Prolaktin hem meme bezlerinin büyüme ve gelişmesini artırır, hem de sütün sentez ve salgılanmasını sağlayarak laktasyonun gerçekleşmesinde önemli bir hormondur (28). Hipotalamusta sentezlenen oksitosin hormonu ise doğum esnasında uterus kasılmalarını uyarır ve memedeki mioepitelyal hücrelere etki ederek sütün alveollerden kanallara geçişini sağlar. Yeni doğanın emme refleksi prolaktin ve oksitosin salgılanmasını uyarır (24).

Amfiregulin, HGF (hepatosit büyüme faktörü), EGF (epidermal büyüme faktörü), TGF- α (transforme edici büyüme faktörü- α), IGF (insülin benzeri büyüme faktörü) ve FGF-3 (fibroblast büyüme faktörü) gibi büyüme faktörlerinin hepsi östrojenin etkilerinin parakrin düzenleyicileridir. Amfiregulin ve HGF duktal dallanmayı artırmaktadır. İnsan meme stromal fibroblastlarında yapılan ve güçlü bir mitojen olan EGF meme duktal gelişimi ve dallanması için gereklidir. EGF ve HGF ile birlikte TGF- α lobülo alveolar gelişimi hızlandırmaktadır (24).

2.4. Meme Kanseri

Meme kanseri her biri farklı morfoloji, davranış ve klinik özelliklerle karakterize olmuş çeşitli tümör oluşumlarını kapsayan karmaşık bir hastalıktır (29). Özellikle kadınlar arasında meme kanseri en yaygın görülen kanser türüdür. Meme kanseri lobüller ve kanalları oluşturan epitelden köken alan karsinomdur. Meme kanserinin temelinde

bulunan birçok genetik ve çevresel etmen söz konusu olup bu doğrultuda heterojen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (29).

2.4.1. Meme kanseri epidemiyolojisi ve etiyolojisi

Meme kanseri özellikle gelişmiş ülkelerde kadınlar arasında en yaygın görülen neoplazm türüdür (29). 2018 yılında 266.120 (tüm kanserler içinde %15.3) yeni meme kanseri olgusu ve 40.920 (tüm kanserler arasında %6.7) meme kanseri kaynaklı ölüm meydana geleceği tahmin edilmektedir (30). Meme kanseri 20 yaş sonrası her dönemde ortaya çıkabileceği gibi orta yaşlı ve yaşlı bayanlarda (ortalama 62 yaş) yaygın olarak görülmektedir. Dünyada akciğerden sonra gelerek en çok yeni olgu tespit edilen ikinci kanser türüdür (%11.9) ve yaşam boyunca her 8 kadından birinin meme kanserine yakalanma riski vardır (31).

Meme kanseri riskini artıran birçok faktör söz konusudur. Bunlar arasında yaş en güçlü risk faktörü olarak görülmektedir ve 50-60 yaş arası kadınlarda meme kanseri görülme riski en fazladır (25). Demografik faktörler ve etnik köken de meme kanseri oluşumunda etkili olmaktadır. Gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha sık meme kanseri görülmektedir. Bunun sebepleri arasında doğum oranının azalması, yeterince emzirmeme gibi durumlar yer alabilmektedir (21, 24). Ayrıca doğum kontrol ilaçları, hormonal tedavi alınması meme kanseri riskini artırmaktadır. Bu faktörlerin yanı sıra vücut-kitle indeksi, alkol alımı, beslenme, fiziksel aktivite, medikal radyasyona maruz kalma, gece nöbetli çalışma hayatı gibi faktörlerin de meme kanseri riskini artırdığı saptanmıştır (32).

Ayrıca daha önce bir meme hastalığının yaşanmış olması meme kanseri riskini 3-4 kat artırmaktadır. Meme kanserinin aile öyküsü de etkilenen birey sayısına bağlı olarak meme kanseri riskini artırmaktadır. Birinci derece akrabalarda (anne, kız kardeş, kız çocuk gibi) meme kanseri gözlenmesi riski iki kat artırmaktadır (21). Meme kanserine yatkınlığı arttıran 6 gen ve gen bölgesi tanımlanmıştır (25). Bunlar BRCA1, BRCA2, p53, Cowden, AR (androjen reseptör geni) ve AT (ataksi talenjiyektazi geni)' dir. BRCA1 ve BRCA2 ailesel meme kanserlerinin büyük bir kısmından sorumludur (25).

2.4.2. Meme kanseri sınıflaması

2.4.2.1. Morfolojik ve histolojik sınıflama

Meme kansinimleri çok sayıda farklı fenotip ve özel prognostik ya da klinik özelliklere sahip histopatolojik türler gösterir. Meme tümörlerinin büyük çoğunluğu meme epitelinden köken alan adenokarsinomlardır (21). Geleneksel olarak patologlar tarafından klinik özellikleri ve anatomik bölgeleri dikkate alınarak histolojik görünümüne göre sınıflandırılmıştır. Anatomik yerleşim bölgelerine göre kanallarla sınırlanmış in situ kansinoma (duktal ve lobüler) ve bazal membranı aşarak çevre dokulara yayılan invaziv ya da infiltratif kansinoma (duktal ve lobüler) olmak üzere ikiye ayrılır. Histolojilerine göre Dünya Sağlık Örgütü tarafından en az 17 farklı histolojik özelleşmiş tür tespit edilmiştir (21). In situ kansinomların büyük çoğunluğunu duktal kansinoma in situ (DCIS) oluşturur. Meme kanallarından kaynaklanan bu kansinomlar tedavisiz bırakıldığında invaziv karakter kazanmaktadır (33). Meme kanserlerinin yaklaşık %8' i lobüler kansinoma in situ (LCIS) olup duktal kansinoma in sitüden daha az yaygındır ve meme lob ve bezleri ile sınırlanmıştır. En yaygın invaziv meme tümörü ise invaziv duktal kansinoma (IDC) olup süt kanallarında gelişir ve komşu adipöz dokuyu istila eder. İnvaziv lobüler kansinoma (ILC) ise daha az görülmekte ve meme lobları zarındaki hücrelerde başlayarak çevresindeki meme dokusuna yayılım gösterir. Bunların dışında medullar, musinöz, tübüler gibi nadir görülen histolojik alt türler de bulunmaktadır (21).

Meme kanserinde evreleme sistemi TNM (Tümör, Nod, Metastaz) sınıflamasına göre yapılmaktadır. TNM sınıflaması ilk teşhis konduğu zaman kanser yayılımının boyutu hakkında bilgi verir. Tümörlerin TNM sınıflaması tümör büyüklüğü ve meme ve yakın organlara ne kadar yayıldığı (T), lenf nodlarına invazyon (N) ve uzak metastazların varlığı ya da yokluğu (M) bilgisini kullanır (34).

2.4.2.2. Moleküler sınıflama

Geçtiğimiz yıllarda gen ifadenme profillemesinde mikroarray teknolojilerinin kullanımı meme tümörü heterojenitesinin daha iyi anlaşılmasına yol açmıştır (21). Meme kanserinin alttürlerinin tanımlanmasında histopatoloji önemli bir yer almaktadır. Onko-klinik karakterlerdeki bu çeşitlilik mikroskobik olarak benzer kanser kitleleri arasında farklı moleküler özelliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (26).

Moleküler sınıflama yapılırken hücre büyüme sinyallerine aracılık ettiği bilinen östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) ve insan epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER2) genlerinin ifadesine göre yapılmaktadır (2).

İmmünohistokimyasal belirteçler olan hormon ve büyüme faktör reseptörleri dışında, DNA tamiri ve hücre döngüsü kontrolünde görev alan tümör baskılayıcı BRCA1 (meme kanseri 1) ve BRCA2 genlerinde mutasyon taraması önemlidir.

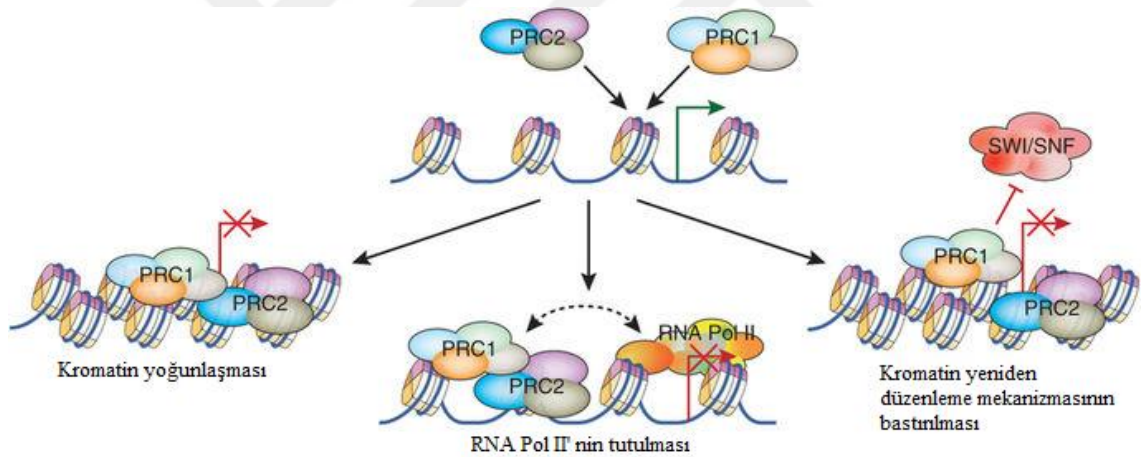
2.5. Polycomb Grup Genleri

Polycomb sistemi embriyonik dönemde hücre farklılaşmasının ve yetişkin dönemde doku sürekliliğinin epigenetik düzenleyicisidir (3). Polycomb grup (PcG) genleri ilk kez *Drosophila*' da yaklaşık 30 yıl kadar önce Hox genlerinin baskılanması yoluyla ön-arka vücut modelinin düzenleyicisi olarak keşfedilmiştir (4).

PcG genleri transkripsiyonel baskılayıcı olarak görev yapan proteinleri kodlar. PcG genleri tarafından kontrol edilen gelişimsel süreçler ön-arka eksen farklılaşmasını, damgalanmış genlerin monoallelik ifadelenmesini, embriyonik ve somatik kök hücrelerin yenilenmesini içerir (3). Bunun için kromatin dinamiklerini ve gen ifade özelliklerini düzenleyerek bir hücrenin gelişimsel programını korur (35). PcG proteinleri kromatinin transkripsiyonel olarak inaktif ya da tamamen kapatılmış duruma geçmesini sağlamaktadır (35). PcG proteinleri dişilerde X kromozomu inaktivasyonunda görev almaktadır. Susturulacak olan X kromozomu üzerinde Xist geni RNA ürünlerinin birikmesiyle bu kromozom üzerinde PcG proteinleri epigenetik değişimler yaparak bu kromozomun imprintlenmesini sağlar (36).

Polycomb grup proteinler iki ana gruba ayrılır ve bu gruplar polycomb baskılayıcı kompleks 1 (PRC1) ve 2 (PRC2) adını almaktadır (39). PRC1 proteinleri RNF1 (Ring Finger protein 1), RNF2, CBX2 (chromobox homolog 2), CBX4, CBX8, PHC1 (polihomeotik homolog 1), PHC2, PHC3 ve BMI1 proteinlerini içerirken; PRC2 proteinleri ise EZH1 (zeste homolog artırıcı 1), EZH2, EED (embriyonik ektoderm gelişimi), SUZ12 (zeste homolog baskılayıcı 12), RBBP4 (retinoblastoma bağlanma proteini 4) ve RBBP7 proteinlerinden oluşmaktadır (35). PRC1 grubu RNF2 proteini

aracılığıyla histon H2A' nın 119. lizinin monoubikitinasyonunu (H2AK119ub) gerçekleştirir. PRC2 grubu ise EZH2 aracılığıyla histon H3' ün 27. lizinin trimetilasyonunu (H3K27me3) gerçekleştirir (37). PRC proteinleri kromatin yoğunlaşması, RNA Pol II tutulumu veya kromatin yeniden şekillenmesinin baskılanması gibi mekanizmalarla etki ederek hedef genlerin transkripsiyonunu baskılamaktadır (Şekil 2.3) (38). PcG proteinlerin bir kromatini nasıl düzenlediği şu sırayla gerçekleşmektedir: transkripsiyon faktörleri ve bunlarla ilişkili sinyaller susturulacak hedef bölgeyi belirler ve PRC2 bu hedef bölgeyi histon H3' ü metilasyonunu gerçekleştirerek işaretler. H3K27me işareti PRC1 proteinlerinden CBX' lerin bu metillenmiş histonu tanıması ve buraya bağlanmasını sağlar. Bu arada PRC1 kompleksi içindeki E3 ligaz aktivitesi olan RNF2 proteini H2A' yı monoubikitinleyerek kromatini inaktif hale getirir (4; 35). PcG proteinleri Polycomb cevap elementleri (PREs) ile etkileşim kurarak genleri baskılar (39).

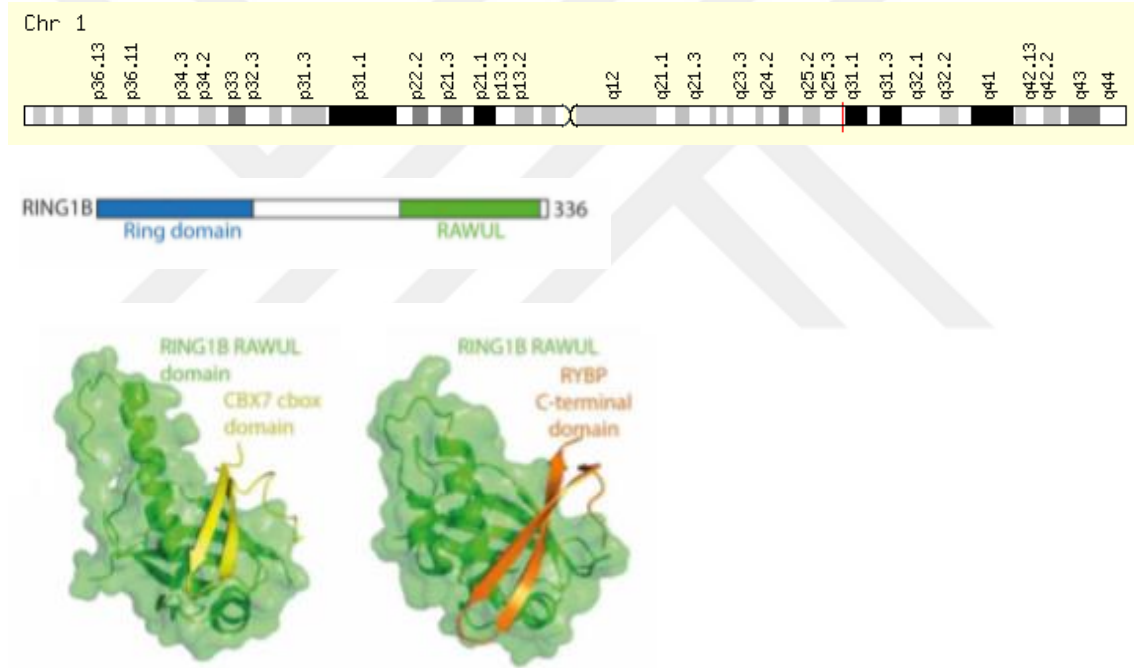


Şekil 2.3. Polycomb baskılayıcı kompleksler etki mekanizması (38).

PRC proteinleri hücrede apoptoz, hücre yaşlanma ve epitelyal-mezenkimal geçişi etkileyen transkripsiyonel programların düzenlenmesinde birlikte işlev görürler. Polycomb grup proteinler kanser hücrelerinde genel olarak apoptozu inhibe eder. Bir onkogen olan BMI1, CDKN2A lokusuna bağlanarak apoptozu inhibe eder. BMI1, MYC ile birlikte hücre yaşlanmadan kaçarak tümörleşme gelişimine destek sağladığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bir başka PRC proteini olan ve yine onkogenik karakter gösteren EZH2, E-kaderin transkripsiyonunu baskılayarak kanser hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçişe yol açıp metastazı uyarmaktadır (39).

2.5.1. Ring finger protein 2 (RNF2)

Polycomb baskılayıcı kompleks 1 içerisinde yer alan RNF2 ya da Ring1B geni 1. kromozom üzerinde 1q25.3 bölgesinde yer almaktadır (3). Bu gen 7 ekzona sahip olup 336 amino asitlik protein kodlar. RNF2 proteini N ucunda Ring finger domaini bulundurmakta ve bu ring domainleri aracılığı ile diğer PRC1 proteinleri ile heterodimerize olmaktadır. Ayrıca bu ring finger domaini E3 ligaz aktivitesinin karakteristik bir yapısıdır (50). C ucunda ise RAWUL (Ring finger And WD40 Ubiquitin-Like) domainleri yer almakta olup bu domainle CBX ya da RYBP proteinleri ile etkileşim kurmaktadır. RAWUL domaini geniş ölçüde β -tabaka yapıları içeren globüler bir şekil almıştır (40) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. RNF2 kromozom yerleşimi ve protein yapısı (40).

RNF2 proteini E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahiptir. Diğer PRC1 proteinleri ile birlikte histon H2A ubiquitinasyonundan sorumludur (41). RNF2 hedeflediği proteinler doğrultusunda birçok biyolojik süreçte rol oynamaktadır. RNF2'nin susturulması ya da ifadesinin artması birçok moleküler bozulmalara ve sonuçta kanser gibi multifaktöriyel hastalıklara sebep olmaktadır. RNF2 Ser⁴¹'de fosforillenmiş bir fosfoproteindir ve fosforillenmesinde p38-MAPK ve MEK1/2 yolları rol oynamaktadır. RNF2 fosforillenmesi ortadan kalktığında bir tümör baskılayıcı gen olan p15^{INK4b}'nin

baskılandığı embriyonik böbrek hücrelerinde gözlenmiştir (42). Choi ve Kang (2011) tarafından yapılan, insan böbrek hücrelerinde RNF2 cevap elementlerinin tanımlanması ve karakterizasyonunu içeren çalışmada 33 RNF2 cevap elementi bölgesi tespit edilmiş ve bu bölgelerin 26' sının RNF2 cevap elementine komşu promotörü olan genlerin susturulduğu tespit edilmiştir (43). Rasgele seçilen 5 bölgede çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynayan genlerin (nörofibromin 2, JARID1A, HDAC9, SLC29A2 ve ODZ1) RNF2 susturulduğunda ifadelenmesinin arttığı bildirilmiştir. Fare embriyonik fibroblast hücrelerinde RNF2 otofaji yolağı belirteçlerinden biri olan AMBRA1' i ubiquitinleyerek parçalanmasını tetiklemiş ve dolayısıyla otofajiyi baskılamıştır (44).

RNF2' nin birçok kanser türünde ifadesinin arttığı ve onkogenik rol oynadığı daha önceki yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. RNF2 ifadesi yüksek dereceli pankreatik intraepitelyal neoplazi ve pankreatik duktal adenokarsinomda önemli derecede ve sürekli olarak artmıştır (44). Yapılan başka bir çalışmada kolorektal kanser hücrelerinde, RNF2' nin susturulması bu hücrelerde apoptozun uyarılmasına yol açmıştır. Ayrıca RNF2; p53 ve MDM2' ye doğrudan bağlanarak MDM2 - aracılı p53 parçalanmasını uyarmıştır (45). Pankreatik kanser hücrelerinde RNF2' nin Snail ile E-kaderin promotöründe birikerek epitelyal-mezenkimal geçişi ve dolayısıyla metastazı uyardığı bildirilmiştir (46). RNF2' nin melanomada artışı metastaz ve invazyonu tetiklemektedir (5; 47). Ayrıca mesanenin ürotelyal karsinomunda (7) ve agresif yumurtalık kanserinde (10) RNF2 ifadesinin arttığı rapor edilmiştir. Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde RNF2 ifadesinin arttığı ve bir serin/treonin kinaz olan SIK1 genine doğrudan bağlanarak baskıladığı ve proliferasyonu uyardığı Qu ve Qu (2017) tarafından yapılan çalışma ile ortaya konmuştur (11). Benzer şekilde Wei ve ark. (2017) tarafından prostat kanser hücrelerinde yapılan çalışmada RNF2' nin ifadesinin arttığı ve RNF2 susturulduğunda hücre döngü tutulumunun ve apoptozun uyarıldığı bildirilmiştir (6). Yine bu çalışmada bir tümör baskılayıcı gen olan TXNIP (Tioredoksin etkileşim proteini) promotöründe RNF2 biriktiği ve RNF2 susturulduğunda bu genin ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Zhang ve ark., (2017) mide kanseri hücrelerinde RNF2' nin susturulmasının hücre canlılığını azaltıp hücre döngüsü tutulumunu uyardığını saptamışlardır (48). Özofagal kanserlerde RNF2 ifadesi artmakla beraber susturulduğunda bu kanser hücrelerinin radyoterapiye duyarlılığı artmıştır (49).

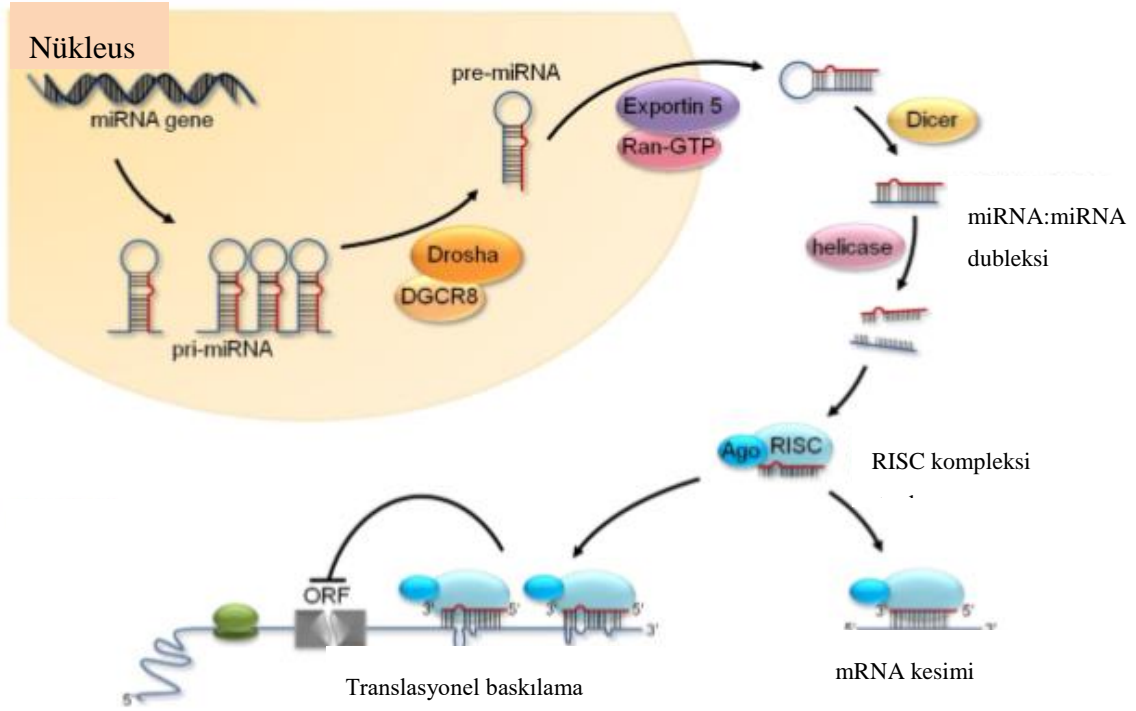
RNF2 ve meme kanseri ile ilişkili yapılan çalışmalara bakıldığında invaziv duktal meme kanserinde RNF2 ifadesindeki artış immünohistokimyasal olarak gösterilmiş olup metastatik bir yolak olan fokal adezyon kinaz (FAK) ifadenmesini uyardığı bildirilmiştir (8). Aksine 17q23 amplifikasyonu içeren meme kanseri hücre hatlarında RNF2 ifadenme seviyesi azalmıştır (50).

Birçok kanser türünde onkogenik rol aldığı gösterilen RNF2, farklı biyolojik süreçlerde de önemli role sahiptir. Nükleotid kesip çıkarma tamirinin çekirdekte düzenlenmesine aracılık etmektedir (51). DNA çift iplik kırıklarının tamirinde rol oynamaktadır (52). Spermatogenez sürecinde gerekli olan bazı germline genlerin aktivasyonunu sağlamaktadır (53). Ayrıca interferon uyarıcı gen (ISG) ifadenmesini baskılayarak interferon bağımlı antiviral yanıtı azaltma yoluyla inflamasyonda rol oynamaktadır (54).

2.6. MikroRNA lar

MikroRNA'lar (miRNA), genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir. miRNA, fonksiyon olarak gen ifadenmesinin düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık olarak 18-24 nükleotit uzunluğunda tek iplikçikli bir RNA molekül çeşididir (12). Olgun miRNA'lar hedef genlerin ifadenmesini azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. miRNA'lar kendi nükleotid dizilerini tamamlayıcı hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. miRNA'lar başlangıçta tek bir birim ya da birkaç miRNA'dan oluşan bir küme şeklinde RNA polimeraz II tarafından primer-miRNA (pri-miRNA) olarak transkript edilirler. Daha sonra pri-miRNA bir mikro işleyici kompleks olan Drosha-DGCR8 tarafından tanınarak öncü miRNA (pre-miRNA) olarak işlenir ve Ran-GTP bağımlı olan eksportin-5 ile sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada pre-miRNA bir RNaz III endonükleaz olan Dicer'a bağlanır ve sap-ilmigi kesilir. Böylece miRNA:miRNA dubleksi oluşur. Bir helikaz tarafından bu dubleks birbirinden ayrılarak olgun miRNA oluşur. Bu miRNA ipliklerinden biri argonat proteini (Ago) içeren RNA-indükleyici susturma kompleksi (RISC) içerisine alınır. Diğer iplik ise parçalanır. Bu olgun miRNA kompleks RISC içerisinde hedef mRNA'yı tanımak için kısmi baz çiftleşmesi yoluyla bir rehber görevi görür ve kompleks içinde miRNA hedef mRNA'

nın 3'UTR bölgesi ile etkileşime girerek bu mRNA' nın translasyonunun baskılanmasına ya da mRNA' nın parçalanmasına yol açar (55) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. miRNA biyogenezi ve işleyişi (55).

miRNA' nın hedefi tanınması miRNA ve mRNA arasında baz eşleşmesine bağlıdır. miRNA:mRNA arasındaki baz eşleşmesi %100 oluyorsa mRNA kesilip yıkıma gönderilir ancak bu eşleşme tam olmuyorsa translasyonel baskılama olur. Bunun dışında eşlenecek bazların 3'UTR' ye yakınlığı ve adenin-urasil içeriği de miRNA:mRNA eşleşmesini etkileyen faktörlerdendir (56). mRNA hedefleme miRNA ipliğinin 5' ucu ile gerçekleşir. Özellikle 5' uçtaki 2-8 nükleotid hedef mRNA' nın 3' UTR' sine dizi-spesifik bağlanmaya katkıda bulunur (56).

miRNAlar kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın moleküler patogenezinde önemli rol oynamalarının yanısıra insan kanserlerinin patogenezinde ve terapi ajanlarının klinik uygulamalarında ana role sahiptirler (13). Bir kanser hücresinde miRNA' lar, hedefledikleri mRNA' nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı özellik kazanabilir (12). Örneğin miR-17-5p ve miR-20a-5p' yi içeren miR17-92 miRNA kümesi E2F gibi tümör baskılayıcı genleri susturarak onkogenik özellik gösterirken SRC-3 gibi onkogenleri susturarak tümör baskılayıcı özellik de göstermektedir (57).

2.6.1. Meme kanseri ile ilişkili miRNA' lar

Meme kanseri genetik olarak hem lokus hem de allel içeriğine göre heterojen bir hastalıktır. Meme kanserindeki miRNA ifadenme çalışmaları hastalığın sınıflaması ve prognostik belirteç geliştirilmesi açısından miRNA' ların önemini ve potansiyel kullanım alanlarını ortaya koymuştur. Meme kanseri ve ilişkili miRNA' lar ile ilgili veri bankaları tarandığında yaklaşık 424 miRNA meme kanseri ile ilişkili bulunmuştur (mirancer.ecu.edu). Yapılan birçok çalışma ile çok sayıda miRNA' nın herhangi bir onkogeni ya da tümör baskılayıcı geni hedef alarak meme kanseri gelişimine katkı sağladığı ortaya konmuştur. Meme kanserlerinin moleküler sınıflamasında önemli bir belirteç olan HER2' yi hedefleyen miR25 ve miR125a meme kanserinde tümör baskılayıcı bir rol oynamaktadır (58). Yine meme kanseri hücrelerinde miR-17/20 kümesi siklinD1' i baskılayarak G1/S geçişini engelleyip proliferasyonu önlemiştir (59). miR200-c E-kaderin transkripsiyonel baskılayıcısı olan DeltaEF1' i baskılayarak meme kanserinde metastazı engeller. Meme kanseri hücre hatlarında bir E2F1 ve ER α aktivatörü olan AIB1 (amplified in breast cancer 1) miR-17-5p tarafından baskılanarak E2F1 ve ER α ' yı baskılar (60). Bunların dışında meme kanserinde miR206, let7, miR34a, miR31, miR335, miR126, miR101, miR145, miR146a/b ve miR205 tümör baskılayıcı özellik göstermektedir. Ayrıca meme kanserinde bu tümör baskılayıcı özellik kazanan miRNA' ların yanı sıra cdc/siklin B' nin aktifleşmesinde rol alan miR27a ve miR21, miR155, miR10b, miR373/520c, miR221/222 gibi onkogenik özellikte miRNA' lar da rol almaktadır (61).

2.6.2. Çalışmada Analiz Edilen miRNA' lar: miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p

miR-17-5p ve miR-20a-5p aynı miRNA kümesinin (miR-17~92) üyelerinden olup 13. kromozomun 13q13 lokusunda yer alan MIR17HG geninden kodlanmaktadır. miR-106b-5p ise bu gen kümesine paralog bir gen kümesinin (miR-106b~25) üyesidir ve 7q22.1' de yer alan MCM7 geni 13 ve 14. ekzonları arasındaki bölgeden kodlanır (62).

Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında bu miRNA' ların dokuya özgü olarak hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik rol aldıkları bildirilmiştir. Örneğin, miR-17-5p meme kanseri için oldukça önemli bir biyobelirteçtir. miR-17-5p' nin metastatik meme kanseri hücrelerinde daha fazla ifadelendiği ve meme kanseri hücre hatlarında tümör

baskılayıcı gen HBP1 (HMG box içeren protein1)' i inhibe ederek hücre göçünü ve invazyonu uyardığı bildirilmiştir (63). AIB1 ve siklin D1 ifadenmesini inhibe ederek bazal meme kanserinde tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı; ayrıca TGF β ve hipoksi yollarını içeren birçok pro-metastatik geni hedeflediği gözlenmiştir (64). Meme kanseri hücre hatlarında miR-17-5p' nin p21' i baskılayarak hücre proliferasyonunu uyardığı başka bir çalışma ile ortaya konmuştur (66). Hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini uarmakla beraber meme kanseri hastalarında miR-17-5p' nin ifade artışının kötü prognozla ilişkili olduğu gözlenmiştir (65). Liao ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada ise miR-17-5p' nin meme kanseri hücre hatlarında STAT3' ü baskılayarak apoptozu uyardığı rapor edilmiştir (66). Özellikle metastatik meme kanserlerinde ifadesinin arttığı gösterilen onkogenik özelliğe sahip miR-17-5p' nin hepatosellüler karsinom, akciğer karsinomu, mide karsinomu, kolorektal karsinom, osteosarkom, lösemi ve prostat kanserinde rol aldığı yapılan birçok çalışma ile ortaya konmuştur (67).

Yine miR-20a-5p' nin de meme kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünde rol oynadığı gösterilmiştir. Örneğin; hepatosellüler kanserde ifadesinin arttığı ve RUNX' i hedefleyerek metastaz ve invazyonu baskıladığı bildirilmiştir (68) Osteosarkomda kinesin ailesi üyesi KIF26B genini hedefleyerek çoklu ilaç direncini baskıladığı gösterilerek tümör baskılayıcı özelliği ortaya konmuştur (69). Bu çalışmalara zıt olarak Cheng ve ark., (2016) tarafından yapılan çalışmada miR-20a-5p' nin kolorektal kanserde Smad4' ü inhibe ederek metastaz ve invazyonu uyardığı bildirilmiştir (70). Özcan ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise kolorektal kanserde ifadesinin arttığı saptanmıştır (71). Bir başka çalışmada, nasofarinjeal karsinomda PTEN/PI3K/Akt yolağını aktive ederek radyoterapiye direnci indüklediği bildirilmiştir (72). Yine meme kanserinde yapılan bir çalışmada miR-20a-5p baskılandığı saptanmıştır ve bu miRNA' nın deneysel olarak ifade artışı sağlandığında meme karsinogenezinde önemli role sahip HMGA2 baskılanarak; hücre büyümesi, mobilitesi, invazivliğinin azaldığı ve apoptozun uyarıldığı tespit edilmiştir (73). Ayrıca skuamöz akciğer kanserinde (74) ve metastatik melanomada da (75) ifadesinin arttığı saptanmıştır. Yu ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada ise nöroblastom hücrelerinde miR-20a-5p' nin ATG7 (otofaji ilişkili gen-7) genini hedefleyerek tümör proliferasyonunu baskıladığı saptanmıştır (75).

miR-106b-5p' nin PTEN' i hedefleyip SETD2 gibi tümör baskılayıcı geni inhibe ederek ve WNT yolağını indükleyerek kanser tetikleyici onkomir olarak rol oynadığı bildirilmiştir (76-78). Meme kanserinde fukoziltransferaz 6 (Fut6)' yı baskılayarak metastaz ve invazyonu tetiklediği rapor edilmiştir (79). Li ve ark., (2017) meme kanserinde miR-106b-5p' nin ifadesinin arttığı ve PTEN' i baskılayarak hücre proliferasyonunu, metastaz ve invazyonu artırdığı bildirilmiştir (80). Akciğer kanserinde BTG3' ü hedefleyerek apoptozu inhibe etmiş ve proliferasyonu uyarmıştır (81). Dong ve ark. (2018), mide kanserinde miR-106b-5p' nin p21' i baskılayarak hücre yaşlanmada rol oynadığını bildirmiştir (82). Kanserde önemli role sahip olduğu gösterilen miR-106b-5p ayrıca adipogenez (83) gibi biyolojik süreçlerde rol oynadığı ve diyabet ve obezitede önemli bir belirteç olduğu bildirilmiştir (83, 84).

Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde RNF2' nin bir miRNA ile ilişkisinin ortaya konduğu ilk çalışma 2018 yılında Chen ve ark. tarafından yayınlanmıştır (19). Yumurtalık kanseri hücre hatlarında yapılan bu çalışmada; miR139-5p' nin ifadesi arttığında ve eş zamanlı olarak MAPK susturulduğunda RNF2' nin baskılandığı ve sisplatin direncinin azaldığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda; meme kanseri hücre hatlarında RNF2 geninin miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p ile olası ilişkisinin analiz edilmesi hedeflenmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Meme kanseri hücre hatlarında RNF2 genini hedefleyen miRNA' ların belirlenmesi ve bunların metastaz ve invazyona etkisini araştırmayı planladığımız bu çalışmaya dair tüm deneyler Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yapılmıştır. Bu tez çalışması Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından maddi olarak desteklenmiştir (Proje No: TF.DT.17.29). Deneyler in vitro koşullarda hücre hatları üzerinde yapıldığı için etik kurul onayı alınmamıştır.

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları ve Özellikleri

Bu çalışmada deneylerde kullanmayı hedeflediğimiz 4 farklı meme kanseri hücre hattı (MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3 ve ZR-75-1) ve kontrol olarak kullandığımız normal meme epitel hücre hattı (hTERT-HME1) ATCC (American Type Culture Collection, VA, Amerika) firmasından temin edilmiştir. Bu hücre hatlarının moleküler ve histopatolojik özellikleri ile ilgili bilgiler Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Hücre hatlarının moleküler ve histopatolojik özellikleri

Hücre Hattı	İmmünprofili	Sınıflama	Histopatoloji
MCF-7	ER+, PR+/-, HER2-	Luminal A	Adenokarsinom
MDA-MB-231	ER-, PR-, HER2-	Düşük Klaudin	Adenokarsinom
SK-BR-3	ER-, PR-, HER2+	HER2	Adenokarsinom
ZR-75-1	ER+, PR+/-, HER2+	Luminal B	İnvaziv duktal karsinom
hTERT-HME1	-	-	İnsan normal meme epiteli

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar, sarf malzemeler ve kimyasal maddeler

A. Çalışmada kullanılan cihazlar

- **Hücre kültürü çalışmaları için;**
 - Steril kabin (Thermo, Amerika)
 - CO₂ inkübatörü (Thermo, Amerika)
 - Hücre sayım cihazı (Eve NanoEntek, Kore)
 - Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
 - 80 soğutucu (Thermo, Amerika)

İnvert mikroskop (Leica, İngiltere)

Soğutmalı santrifüj (Thermo, Amerika)

- **RNA ve protein izolasyonu için;**

Soğutmalı mini santrifüj (Eppendorf, Almanya)

RNA ve protein konsantrasyon tayini için;

Spektrofotometre (Thermo, Amerika)

- **cDNA sentezi için;**

Termal Döngü Cihazı (Applied Biosystem, Amerika)

- **Gen ifade analizi için;**

RT-PCR cihazı (Qiagen, Almanya)

- **Protein ifade analizi için;**

Mini PROTEAN Tetra Cell tek boyutlu dikey elektroforez sistemi (BioRad, Almanya)

Orbital çalkalayıcı (Stuart, İngiltere)

Kemilüminesan görüntüleme cihazı (Vilmer Lourmat, Almanya)

- **Çözelti hazırlama aşaması için;**

pH metre (Hanna, İtalya)

Hassas terazi (Hanna, İtalya)

Manyetik karıştırıcı (Hanna, İtalya)

B. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve kimyasal maddeler

- **Hücre kültürü çalışmaları için;**

DMEM (Gibco, Amerika)

RPMI 1640 (Gibco, Amerika)

Fetal sığır serumu (Sigma, Almanya)

Penisilin/streptomisin (Sigma, Almanya)

Tripsin (Sigma, Almanya)

HBSS (Sigma, Almanya)

25 ve 75 cm²' lik hücre kültür flaskı (Corning, Amerika)

50 ve 15 ml lik tüp (Isolab, İtalya)

6 ve 12 kuyucuklu hücre kültür tabağı (Corning, Amerika)

1,5 ml lik ependorf tüp (Isolab, İtalya)

0,5 ml lik tüp (Isolab, İtalya)

0.2 lik PCR tüpü (Corning, Amerika)

10, 100, 1000 ul lik pipet seti (Eppendorf, Almanya)

- 10, 100, 1000 ul lik pipet uçları (Gilson, Amerika)
- Tripan mavisi (BioRad, Almanya)
- Transfeksiyon ajanı (Qiagen, Almanya)
- miRNA mimikleri (Qiagen, Almanya)
- Negatif kontrol siRNA (Qiagen, Almanya)
- Etanol (Merck, Almanya)
- **RNA ve protein izolasyonu için;**
Hücre parçalama ajanı (Qiagen, Almanya)
RNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya)
PBS (Sigma, Amerika)
RIPA buffer (BioRad, Almanya)
BCA Protein Tayini Kiti (Thermo, Amerika)
Proteaz inhibitör kokteyl (Thermo, Amerika)
Kloroform (Merck, Almanya)
 - **cDNA sentezi için;**
cDNA sentez kiti (Qiagen, Almanya)
 - **Gen ifade analizi için;**
Strip tüpler (Qiagen, Almanya)
miRNA primer assay (Qiagen, Almanya)
RNF2 ve GAPDH için ileri ve geri primerler (Invitrogen, Amerika)
RNU6B primer assay (Qiagen, Almanya)
miRNA RT-PCR kiti (Qiagen, Almanya)
Quantitect RT-PCR kit (Qiagen, Almanya)
 - **Protein ifade analizi için;**
PVDF membran (BioRad, Almanya)
Kurutma kağıdı (Isolab, İtalya)
Laemmli Buffer (BioRad, Almanya)
Protein Biomarker (Abcam, İngiltere)
Akrilamid:bisakrilamid (BioRad, Almanya)
ECL kemilüminesan görüntüleme kiti (BioRad, Almanya)
Primer antikör (Abcam, İngiltere)
Sekonder antikör (Abcam, İngiltere)
 - **Çözelti hazırlama aşaması için;**
Sodyum dodesil sülfat (Merck, Almanya)

Amonyum persülfat (Sigma, Amerika)
TEMED (Sigma, Amerika)
Tris (Sigma, Amerika)
Glisin (Merck, Almanya)
 β -merkaptotanol (Merck, Almanya)
Metanol (Merck, Almanya)
Tween 20 (Sigma, Amerika)
Yağsız süt tozu (Cell Signaling, Amerika)
Hidroklorik asit (Merck, Almanya)
EDTA (Merck, Almanya)
Sodyum klorür (Merck, Almanya)
Tris-HCl (Merck, Almanya)
Sodyum hidroksit (Merck, Almanya)
• **Metastaz ve invazyon analizi için;**
Hücre Migrasyon ve İnvazyon Testi (Cell Biolabs, Amerika)
Boyden chamber (Corning, Amerika)
Matrigel matriks (Corning, Amerika)

3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler

- %12' lik ayrıştırma jeli bileşenleri:
 - dH₂O.....3,3 ml
 - %30' luk Ac:Bis.....4 ml
 - 1.5 M Tris (pH8.8).....2,5 ml
 - %10 SDS.....0,1 ml
 - %10 APS.....0,1 ml
 - TEMED.....10 μ l
- Toplayıcı jel bileşenleri:
 - dH₂O.....2 ml
 - %30' luk Ac:Bis.....0,5 ml
 - 0.5 M Tris (pH 6.8).....0,8 ml
 - %10 SDS.....30 μ l
 - %10 APS.....20 μ l
 - TEMED.....3 μ l

- 10X yürütme tamponu bileşenleri:
 - Tris Base.....30,3 g
 - SDS (%10).....10 ml
 - Glisin.....144 g
 - dH₂O.....1 L

*pH 8.3' e ayarlanır.

- 10X Transfer tamponu bileşenleri:
 - Tris.....30,3 g
 - Glisin.....144 g
 - dH₂O.....1 L

- 1X Transfer tamponu bileşenleri:
 - 10X transfer tamponu.....100 ml
 - Metanol.....200 ml
 - dH₂O.....700 ml

- 10X TBS tampon çözelti bileşenleri:
 - Tris –HCl.....24,23 g
 - NaCl.....88 g
 - Tris.....5,6 g
 - dH₂O.....1 L

*pH 7.6' ya ayarlanır.

- TBST tampon çözelti bileşenleri:
 - 10x TBS.....100 ml
 - dH₂O.....900 ml
 - Tween 20.....1 ml

- Bloklama tamponu bileşenleri:
 - TBST.....1 L
 - Yağsız süt tozu.....25 g

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre hatları kültür aşaması

Hücre kültürü; canlı bir doku veya organdan alınan küçük bir parçanın in vitro ortamda büyütülmesi ve çoğaltılması işlemine verilen isimdir (85). Tek bir hücre tipi hakkında en iyi bilgiyi elde edebilmek için hücrenin bulunduğu dokudan ve diğer hücre

tiplerinden ayrılarak izole edilmesi gerekir. Bu izolasyon sonucunda oluşan homojen hücre popülasyonu doğrudan ya da kültür ortamında çoğaltıldıktan sonra analiz edilebilir (86). Hücre kültürünün amacı, bir grup hücreyi yaşatmak, ileri çalışmalar için çoğaltmak, gerektiğinde kullanmak için dondurarak saklamaktır. Hücrelerin çoğaltılması, yapılabilecek deneylerin sayısını arttırmayı; deney yapılan pasajdaki hücrelerin dondurulması ise ileride deneyin aynı pasajdaki hücrelerle tekrarlanabilmesini sağlar. Her aşamada üzerinde dikkatle durulan durum ise hücrelerin canlılığıdır (87). Hücre ve doku kültürü; aşı, monoklonal antikor, çeşitli enzimler ve hormonların üretimi, hücre içi aktivite ölçümü, çeşitli ilaçların hücre siklusuna etkisi, sinyal iletim mekanizması ve hücre haberleşmesi, hücrenin beslenme özellikleri, enfeksiyon araştırmaları, viral transformasyon, kimyasal transformasyon, özel ürünlerin sentezlenip salgılanması, embriyonik araştırmalar, hücre popülasyon kinetiği, adezyon, sitogenetik analiz gibi çeşitli amaçlarla yapılmaktadır (85).

Hücre hatları sıvı azottan alınarak %10 serum ve %1 antibiyotik içeren besiyerlerinde; %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklığın sağlandığı koşullarda kültüre edildi. Serum olarak fetal sıgır serumu ve antibiyotik olarak penisilin/streptomisin kullanıldı. MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3 ve hTERT-HME1 hücre hatları için DMEM besiyeri kullanılırken ZR-75-1 hücre hattı için RPMI 1640 besiyeri kullanıldı.

3.2.2. RNF2 genini hedefleyen miRNA' ların seçimi

RNF2 genini hedefleyen miRNA' ların biyoinformatik olarak taranması internet ortamında yapıp bunun için TargetScan, miRBase ve miRDB veri tabanları kullanıldı. RNF2' yi hedefleyen miRNA' lar seçilirken hedef gen mRNA' sı ile 8 mer' lik merkez eşleşmesine, AU içeriğine, 3' tamamlayıcılığına, 3' UTR uçlarına yakınlığına ve yüksek oranda korunmuş olmasına dikkat edildi.

3.2.3. RNF2 Genini Hedefleyen miRNA' ların Biyoinformatik Analizi

TargetScan, miRBase ve miRDB veri tabanlarından yapılan taramaya göre RNF2 genini hedefleyen ve tamamlayıcılığı en yüksek olan miRNA' lar arasından miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p seçildi. Bu miRNA' ların özellikleri ve hedef gene bağlanma duyarlılığı Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.2. RNF2 hedefleyen miRNA' ların özellikleri (www.targetsan.org).

	miR-17-5p	miR-20a-5p	miR-106b-5p
Baz eşleşme uyumu	8 mer	8 mer	8 mer
Tamamlayıcılık (%)	97	98	98
RNF2 3'UTR hedef bölgesi	863-870 bç		
RNF2 ile eşleşme dizisi	5' ...UAAUGGAGAUUUUUGCACUUUA... 3' UAGACGUGACAGUCGUGAAAU		

3.2.4. Hücre hatlarına mimik transfeksiyonu

Nükleik asitlerin memeli hücrelerine viral olmayan yöntemler kullanılarak aktarılması işlemine “transfeksiyon” denir. DNA veya RNA gibi büyük ve polar moleküller hücre zarından basit difüzyon ile geçemezler. Nükleik asit transferi sırasında bu problemi ortadan kaldırmak için kalsiyum fosfat transfeksiyonu, elektroporasyon, mikroenjeksiyon, lipid-kasyon bazlı ajanlar gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Günümüzde en yaygın kullanılan ve ticari olarak da yaygın üretilen yöntem lipid-kasyon bazlı ajanlardır. Bu yöntem, DNA'nın iyonik etkileşimine ve kültüre edilmiş hücrelerde DNA'yı fonksiyonel olarak koruyabilen lipozom adı verilen yapılara dayanmaktadır (88). Kasyonik lipid ajanlar, sulu çözeltilerde küçük unilamellar yani lipozomlar (pozitif yüklü hidrofilik baş dışta hidrofobik kuyruk içte kalır) oluştururlar. Pozitif yüklü olan kasyonik lipidler negatif yüklü DNA ile etkileşime girerek DNA'nın endositozla hücre içine girmesini sağlamaktadır. Bu çalışmada kullanılan transfeksiyon ajanı da lipid-kasyon bazlı bir ajandır.

Hücreler, 75 cm²' lik kültür kabının tüm yüzeyini kaplayacak yoğunluğa ulaştığında transfeksiyon için tripsinizasyon ile kaldırıldı. Bunun için her flaska 4 ml tripsin eklenip 37 °C' de inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletildi. Tripsin ile kalkan hücrelere tripsin aktivitesini sonlandırmak için 8 ml serumlu besiyeri eklenip 4000 rpm' de 4 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pelet durumunda çöken hücreler 2 ml besiyerinde sulandırılıp tripan mavisi kullanılarak otomatik hücre sayım cihazında sayıldı. Her kuyucukta 200.000 hücre olacak şekilde antibiyotik içermeyen serumlu besiyeri ile hücreler 12 kuyucuklu hücre kültür tabaklarına ekildi.

miRNA transfeksiyonu için kullanılacak olan miR-17-5p (katalog no: MSY0000070), miR-20a-5p (katalog no: MSY0000075) ve miR-106b-5p (katalog no: MSY0000680) mimikleri (Qiagen, Almanya) ve transfeksiyon ajanı (HiPerFect Transfection Reagent, katalog no: 301705 Qiagen, Almanya) ticari olarak temin edilmiş olup geçici transfeksiyon yapılmıştır. Transfeksiyon sırasında negatif kontrol olarak, bilinen herhangi bir memeli geni ile homoloji oluşturmayan ve dolayısıyla sessizleştirmeyen siRNA - scramble (AllStars Negative Control siRNA, katalog no: 1027280 Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Transfeksiyon ajanı ve mimiklerin hangi konsantrasyonda hazırlandığı üretici firmanın önerisi doğrultusunda Tablo 3.3' de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.3. Transfeksiyon bileşenleri ve miktarları

Bileşen Adı	Miktarı (her kuyucuk için)	Final Konsantrasyon
HiPerFect Transfeksiyon Ajanı	4 µl	-
miRNA mimik*	0,6 µl	5 nM
DMEM (antibiyotik ve serum yok)	100 µl	-

*Negatif kontrol siRNA mimiklerle aynı miktarda hazırlanmıştır.

Hazırlanan transfeksiyon bileşeni oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 12 kuyucuklu kültür tabaklarında ekilmiş olan hücrelere damla damla bırakıldı ve 48-72 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.5. Hücre hatlarından total RNA izolasyonu

48-72 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerden miRNeasy Mini Kit (katalog no: 217004 Qiagen, Almanya) kullanılarak miRNA' yı da içeren total RNA izolasyonu yapıldı. Çalışma sırasında aşağıdaki protokol uygulandı:

- Hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edildi ve 300 µl tripsin eklenerek kaldırıldı. Tripsinin inaktivasyonu için 600 µl serumlu besiyeri eklenerek hücreler 2 ml lik tüplere alındı ve 13.000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp pellete 700 µl Qiazol parçalama ajanı eklendi.
- 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Daha sonra 140 µl kloroform eklendi ve 15 sn elde yukarı aşağı çalkalandı.
- Oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi.
- 12,000xg' de, 4 °C sıcaklıkta 15 dakika santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrası tüpte 3 faz görüldü. Üst aköz faz, ara fazdan alınmamaya dikkat edilerek yeni bir tüpe transfer edildi.
- Üst fazın 1,5 katı kadar (yaklaşık 525 µl) absolüt etanol eklendi ve pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı.
- Örnekten 700 µl alınıp 2 ml toplama tüpünün içindeki RNeasy mini kolonun içine bırakıldı. 8,000xg' de 15 sn oda sıcaklığında santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı. (Eğer toplama tüpünde hala örnek kalmışsa bu basamak tekrar edilir.)
- Mini kolona 700 µl RWT tamponu eklendi ve 8,000xg' de 15 sn santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı.
- Mini kolona 500 µl RPE tamponu eklendi ve 8,000xg' de 15 sn santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı.
- Mini kolona 500 µl RPE tamponu eklendi ve 8,000xg' de 2 dakika santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı.
- Tam kurumasını sağlamak için kolon yeni bir 2 ml lik toplama tüpüne alındı ve en yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolon 1,5 ml' lik yeni tüpe transfer edildi. 25µl RNaz içermeyen su doğrudan membran üzerine konarak 8,000xg' de 1 dakika santrifüj edildi.
- Elde edilen RNA' lar konsantrasyon ölçümleri yapıp daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -80 °C' ye kaldırıldı.

3.2.6. İzole edilen RNA' ların kalite ve miktar tayini

İzole edilen RNA' ların kalite ve miktar tayini spektrofotometrede ölçülerek elde edildi. RNA' ların konsantrasyon miktarları Tablo 3.4 'de verilmiş olup tüm RNA' ların konsantrasyonları 100 ng/µl' ye ayarlandı.

Tablo 3.4. Elde edilen RNA konsantrasyonları

Örnek adı	Konsantrasyon (ng/μl)
MCF-7	326,98
MCF-7 + Sc	92,47
MCF-7 + mimik 17-5p	201,8
MCF-7 + mimik 20a-5p	127,13
MCF-7 + mimik 106b-5p	153,88
MDA-MB-231	273,1
MDA-MB-231 + Sc	348,16
MDA-MB-231 + mimik 17-5p	344,47
MDA-MB-231 + mimik 20a-5p	378,51
MDA-MB-231 + mimik 106b-5p	292,94
SK-BR-3	951,92
SK-BR-3 + Sc	344,47
SK-BR-3 + mimik 17-5p	386,27
SK-BR-3 + mimik 20a-5p	268,39
SK-BR-3 + mimik 106b-5p	324,15
ZR-75-1	204,71
ZR-75-1 + Sc	274,43
ZR-75-1 + mimik 17-5p	178,98
ZR-75-1 + mimik 20a-5p	258,51
ZR-75-1 + mimik 106b-5p	197,1
hTERT-HME1	148,71

3.2.7. RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sentezi

Konsantrasyon miktarları 100 ng/μl' ye ayarlanan total RNA içindeki miRNA ve mRNA' nın cDNA' ya çevrilmesi için miScript II RT Kit (katalog no: 218161 Qiagen, Almanya) kullanıldı. Hem miRNA hem de cDNA için aynı kit kullanılabilir. Kit içeriğindeki HiFlex tamponu hem miRNA' yı hem de mRNA' yı cDNA' ya çevirebilir. Bu sebeple hem miRNA ifadenmesi hem de RNF2 geni ifadenmesi analizi için kullanılan cDNA tek bir kitten elde edilmiştir.

Elde edilen RNA buz üzerinde ve kit içeriği oda sıcaklığında çözdürüldü. Tablo 3.5' de verilen oranlarda çözeltiler karıştırılarak RNA eklendi ve iyice karıştırılıp kısa bir santrifüj edildi. Tüm karışımın buz üzerinde hazırlanmasına dikkat edildi.

Tablo 3.5. Ters Transkriptaz PCR Bileşenleri

Bileşen	Reaksiyon Hacmi (µl)	Final Konsantrasyon
5x miScript HiFlex Tamponu	4	1X
10x miScript Nucleics Karışımı	2	1X
miScript Ters Transkriptaz Enzim Karışımı	2	-
RNaz içermeyen su	2	-
Kalıp RNA	10	1 µg
Toplam Hacim	20	-

cDNA sentezi için bileşenler hazırlandıktan sonra termal döngü Tablo 3.6' da verilen koşullar uygulandı. PCR koşulları tamamlandıktan sonra cDNA' lar doğrudan buz üzerine alınarak -20 °C' ye kaldırıldı.

Tablo 3.6. cDNA sentezi için PCR koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)
37	60
95	5

3.2.8. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time-PCR) ile gen ifade analizi

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), DNA' ya bağlanan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı olarak takibini sağlayan bir yöntemdir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okuma aynı tüp içinde gerçekleşmektedir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. RT-PCR'da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanması çeşitli şekillerde yapılabilmektedir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı özgül olmayan bir yöntem olan çift zincirli DNA boyalarının kullanılmasıdır. Bu amaçla en sık kullanılan boya SYBR Green I'dir. SYBR Green sadece çift iplikli DNA' ya bağlanan bir boyadır. Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen polimerizasyon aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan boya miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan ışımaya miktarında artış gözlenir. SYBR Green boyasından alınan ışımaya sınır değeri aştığı noktaya "Ct değeri" denilmektedir (89). Bu noktada hedef DNA çoğalmaya başlamıştır. Elde edilen floresanın istenen hedef bölgenin amplifikasyonu mu gerçekleştiği, yoksa non-spesifik bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için "melting

curve” (erime eğrisi) analizi yapılır. Çünkü SYBR Green belirli bir DNA molekülüne bağlanan özgül bir boya değildir ve primer dimerleri gibi tüm çift iplikli DNA moleküllerine bağlanabilmektedir (90).

3.2.8.1. Primer tasarımı

Gen ifadesi için tasarlanan primerler hedef genin ifade edilip edilmediğini anlamak için genin kodlanan bölgesinin herhangi bir kısmından alınabilir. Ancak kodlanan bir RNA söz konusu olduğu için ilgili RNA ürününden başka bir ürün (DNA kirliliği gibi) çoğaltmamak için primer tasarımı yaparken ekzon-ekzon kesişim bölgesi içermesine de dikkat edilmelidir.

Çalışmada hedef gen RNF2 ve “housekeeping” gen GAPDH için primer seçimi NCBI veritabanından “Gene” arayüzü (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) kullanılarak yapılmıştır. RNF2 ve GAPDH ileri ve geri primer dizilimleri, bağlanma sıcaklıkları, ürün büyüklüğü, %GC oranları Tablo 3.7’ de verilmiştir.

Tablo 3.7. Tasarımı yapılan primerlerin özellikleri

Primer Adı	Ürün Büyüklüğü (bp)	İleri ve Geri Primer Dizileri (5'-3')		%GC içeriği	Bağlanma sıcaklığı (°C)
RNF2	140	İleri (F)	GTCTCAGGCTGTGCAGACAA	55	62
		Geri (R)	CACTGTGTAGACTTCGAGGTGA	50	66
GAPDH	168	İleri (F)	AATGGGCAGCCGTTAGGAAA	50	60
		Geri (R)	GCGCCCAATACGACCAAATC	55	60

miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR10b-5p mikroRNA’ larının ifadenme analizi için primerler hazır olarak satın alınmıştır. miR-17-5p için miR17 miScript Primer Assay (katalog no: MS00029274), miR-20a-5p için miR-20a-5p miScript Primer Assay (katalog no: MS00003199) ve miR-106b-5p için miR106b miScript Primer Assay (katalog no: MS00003402) kullanılmıştır. miRNA ifadenme seviyesinin ölçümünde normalizasyon için miRNA “housekeeping” gen olan küçük nükleer RNA; RNU6B kullanılmıştır. Yine bu genin de primeri, RNU6B_13 miScript Primer Assay (katalog no: MS00033740 Qiagen, Almanya) olarak temin edilmiştir.

3.2.8.2. PCR bileşenleri

Hücre hatlarında miRNA transfeksiyonu öncesi ve sonrasında RNF2 geni ifadenme seviyesini tespit etmek için yapılan RT-PCR analizi Rotor Gene 6000 Real-Time PCR cihazı kullanılarak yapıldı. Elde edilen örneklerde miRNA'ların ifadenme düzeyinin belirlenmesi için miScript SYBR Green PCR Kit (katalog no: 218073 Qiagen, Almanya) kullanılırken, transfeksiyon öncesi ve sonrası RNF2 ifadenme seviyesinin belirlenmesi için QuantiTect SYBR Green PCR Kit (katalog no: 204143 Qiagen, Almanya) kullanılmıştır.

3.2.7.2.A. miRNA ifadenme düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri ve koşulları

miRNA ifadenme seviyesinin analizi için kullanılan kit içeriğindeki bileşenler buz üzerinde Tablo 3.8' de verilen oranlarda karıştırılıp cDNA eklenerek hazırlandı.

Tablo 3.8. miRNA ifadenme seviyesi ölçümü için PCR bileşenleri

Bileşenler	Hacim (µl)	Final Konsantrasyon
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12,5	1X
10x miScript Universal Primer	2,5	1X
10x miScript Primer Assay (ilgili miRNA primeri)	2,5	1X
RNaz içermeyen su	6,5	-
cDNA	1	0,05 µg
Toplam Hacim	25	

Tüm karışım hazırlandıktan sonra tüplere cDNA' lar eklendi, yavaşça karıştırıldı ve örnekler cihaza yerleştirildi. Tablo 3.9' de verilen PCR koşulları uygulandı.

Tablo 3.9. miRNA ifadenmesi için RT-PCR koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)	
İlk Denatürasyon	95	15 dak	
Denatürasyon	94	15	45 döngü
Primer Bağlanması	55	30	
Uzama	70	30	
Erime Eğrisi	55 → 90	5	

3.2.8.2.B. RNF2 ifadenme düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri ve koşulları

RNF2 ifadenme seviyesinin analizi için kullanılan kit içeriğindeki bileşenler buz üzerinde Tablo 3.10' da verilen oranlarda hazırlanıp cDNA eklendi.

Tablo 3.10. RNF2 ifadenme seviyesi ölçümü için PCR bileşenleri

Bileşenler	Hacim (µl)	Final Konsantrasyon
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12,5	1X
10 µM ileri primer	1	0,4 µM
10 µM geri primer	1	0,4 µM
RNaz içermeyen su	8,5	-
cDNA	1	0,05 µg
Toplam Hacim	25	

Tüm karışım hazırlandıktan sonra tüplere cDNA' lar eklendi, yavaşça karıştırıldı ve örnekler cihaza yerleştirildi. Tablo 3.11' de verilen PCR koşulları uygulandı.

Tablo 3.11. RNF2 ifadenmesi için RT-PCR koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)	
İlk Denatürasyon	95	15 dak	
Denatürasyon	94	15	40 döngü
Primer Bağlanması	60	30	
Uzama	72	30	
Erime Eğrisi	55 → 90	5	

3.2.9. Hücre hatlarından protein izolasyonu

48-72 saatlik transfeksiyonun ardından hücrelerden protein elde etmek için aşağıdaki yöntem kullanılmıştır:

- Mimik transfeksiyonunu takiben 48-72 saat sonra hücrelerin ekili olduğu hücre kültür tabağı buz üzerine konarak besiyeri aspire edildi.
- Hücreler 2 kez 1 ml soğuk 1X PBS ile yıkandı ve 1 ml PBS içinde hücre kazıyıcı ile iyice kazınarak 1,5 ml lik tüplere alındı.
- 13000 rpm' de 4 °C' de 4 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı, yavaşça birkaç kez vurularak pelletin homojen dağılımı sağlandı.

- 200 µl RIPA tamponu eklendi. RIPA parçalama tamponu olup hazır olarak temin edilmiştir (Thermo, Amerika). Her kullanımdan önce RIPA içerisine taze hazırlanmış proteaz inhibitör kokteyl eklendi (RIPA tamponunun %1' i kadar inhibitör kokteyl eklenir).
- 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Bu süreçte her 10 dakikada bir örnekler vortekslendi.
- 14000 rpm' de 4 °C' de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant her tüpte 100 µl olacak şekilde alıktlandı ve sonraki aşamalar için kullanılmak üzere -80 °C' de muhafaza edildi.

3.2.10. İzole edilen proteinlerin kalite ve miktar tayini

Elde edilen proteinlerin kalite ve miktar tayini Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo, Amerika) kullanılarak yapıldı. Bu yöntem total proteinin kolorimetrik tespiti ve miktar tayini için bisikoninik asite (BCA) dayanan bir yöntemdir.

Protein miktar tayin yöntemi için aşağıdaki aşamalar izlendi:

- Albümin (BSA) stoğundan belirli konsantrasyonlarda 10 adet standart Tablo 3.12' de verilmiş olan oranlarda karıştırılarak hazırlandı.

Tablo 3.12. BSA standartlarının hazırlanışı ve son konsantrasyonları

Standart adı	Karışım miktarları	Son BSA Konsantrasyonu (µg/ml)
A	300 µl stok + 0 µl su	2000
B	375 µl stok + 125 µl su	1500
C	325 µl stok + 325 µl su	1000
D	175 µl B + 175 µl su	750
E	325 µl C + 325 µl su	500
F	325 µl E + 325 µl su	250
G	325 µl F + 325 µl su	125
H	100 µl G + 400 µl su	25
I	100 µl H + 400 µl su	5
J	0 µl stok + 400 µl su	0

- Standartların hazırlanmasını takiben çalışma ajanları A ve B sırasıyla 50:1 oranında karıştırıldı ve 96 kuyucuklu pleytin her kuyucuğuna 200 µl eklendi. Bu

çalışma ajanının miktarı standartları da kapsmalıdır yani ölçüm yapmak istediğimiz örnek sayısı + 10 (standart sayısı) kadar olmalıdır.

- Kuyucuklardaki çalışma ajanı üzerine her standart ve örnekten 25 µl eklendi ve pleyt çalkalayıcıda 30 sn çalkalandı.
- 37 °C’ de 30 dakika inkübasyonun ardından 562 nm’ de absorbands değeri ölçüldü. Elde edilen total protein konsantrasyonları Tablo 3.13’ de verilmiştir.

Tablo 3.13. Elde edilen total proteinlerin konsantrasyonu

Örnek Adı	Protein Konsantrasyonu (µg/ µl)
MCF-7 + Sc	2,18
MCF-7 + mimik 17-5p	1,59
MCF-7 + mimik 20a-5p	2,65
MCF-7 + mimik 106b-5p	1,78
MDA-MB-231 + Sc	1,89
MDA-MB-231 + mimik 17-5p	2,18
MDA-MB-231 + mimik 20a-5p	1,69
MDA-MB-231 + mimik 106b-5p	1,72
SK-BR-3 + Sc	1,75
SK-BR-3 + mimik 17-5p	2,29
SK-BR-3 + mimik 20a-5p	2,05
SK-BR-3 + mimik 106b-5p	2,12
ZR-75-1 + Sc	1,95
ZR-75-1 + mimik 17-5p	2,19
ZR-75-1 + mimik 20a-5p	2,43
ZR-75-1 + mimik 106b-5p	2,52

3.2.11. Western blotlama ile protein analizi

İmmün blot olarak da bilinen western blot yöntemi proteinlerin tespiti ve analizinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem bir antikor:protein kompleksi oluşumuna dayanmaktadır. Bir membran üzerine sabitlenmiş proteine spesifik bağlanan antikor ve bu antikorun işaretli ikinci bir antikorla tespitine dayanan bir yöntemdir (90).

3.2.11.1. Protein konsantrasyonlarının eşitlenmesi ve denatürasyonu

Total protein konsantrasyonları belirlendikten sonra western blot analizi için jele yüklenecek her proteinin 20 µg olması sağlandı ve RIPA tamponu ile 15 µl’ ye

tamamlandı. Yükleme tamponu olarak 2X Laemmli tampon kullanıldı. Proteinlerin üçüncül ve dördüncül yapısından kurtulması için sistein birikintileri arasındaki disülfid bağlarını kesen β -merkaptoetanol (yükleme tamponunun %5' i kadar) yükleme tamponuna eklenerek 95 °C' de kaynatılıp denatüre edildi.

Yükleme tamponu ve protein örnekleri 1:1 oranında karıştırıldı. Bunun için aşağıdaki oranlarda karışım hazırlandı:

15 μ l 20 μ g protein + 15 μ l 2X Laemmli tampon

Elde edilen karışım 95 °C' de 5 dakika denatüre edildi.

3.2.11.2. Jel elektroforezi

Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrışmasını sağlamak için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanıldı. SDS-PAGE yöntemi güçlü bir anyonik deterjan olan SDS ile farklı elektriksel yüklere sahip olan proteinlerin negatif yüklenmesine dayanmaktadır. RNF2 proteini ve "housekeeping" protein olarak kullanılan GAPDH proteinlerinin moleküler ağırlığı aynı olup 37 kDa' dur ve moleküler ağırlıklarına göre %12' lik jel hazırlanmıştır. Moleküler ağırlıkları aynı olduğundan daha sonraki aşamalarda (antikorla inkübasyon aşamasında) problemle karşılaşmamak için RNF2 ve GAPDH için ayrı jel hazırlanıp aynı anda yürütülüp transfer edilmiştir.

SDS-PAGE elektroforezi için Mini PROTEAN Tetra Cell tek boyutlu dikey elektroforez sistemi kullanılmıştır. Alt kısımda ayrıştırma jeli ve üstte toplayıcı jel olacak şekilde elektroforez camları arasına hazırlanan jeller döküldü ve polimerleşmesi için beklendi. Yürütme yapılacak tankın içerisine 1X Yürütme Tamponu (Running Buffer) belirtilen hacme kadar eklendi. 1X yürütme tamponu 10X stok yürütme tamponundan seyreltilerek elde edildi.

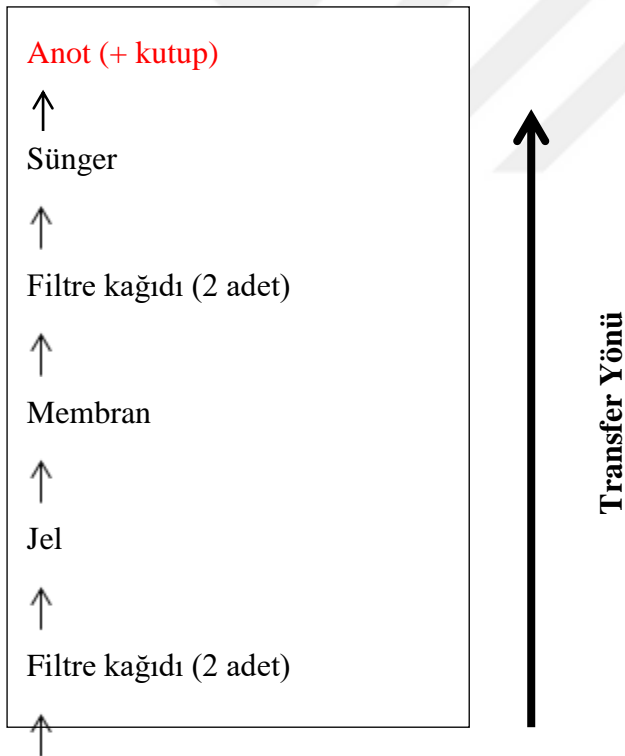
Polimerleşen jel tankın içerisine alınarak kuyucuklara 30 μ l denatüre edilmiş protein örnekleri ve protein belirteci (Prism Ultra Protein Ladder, Abcam, İngiltere) yüklendi. Toplayıcı jeli geçene kadar 60 voltta 1 saat 40 dakika; ayrıştırma jeline geçince 100 voltta 2,5 saat yürütüldü.

3.2.11.3. Proteinlerin membrana transferi

Moleküler ağırlıklarına göre jelde ayrıştırılan proteinler bir membrana aktarıldı. Proteinlerin membrana transferi için “ıslak transfer” yöntemi kullanıldı. Membran olarak polivinilidenflorit (PVDF) membran kullanıldı. Aktarma işlemi, proteinlerin jelden ayrılıp bir membran üzerine taşınmasına neden olan jel yüzeyine dik olarak yönlendirilmiş bir elektrik alanı kullanarak gerçekleştirildi. Jelde yürütme işleminin bitmesine yakın transfer işlemi için hazırlıklar yapıldı.

Membranlar jel büyüklüğünde kesilip 2-3 dakika metanolde bekletildi. Daha sonra soğuk 1X transfer tamponunda 5 dakika bekletildi.

Islak transfer için gereken filtre kağıtları ve süngerler de soğuk 1X transfer tamponunda iyice ıslatıldı. Jel yürütme işlemi bitince transfer kasetleri arasında membran, jel ve filtre kağıtları Şekil 3.1’ de gösterildiği gibi yerleştirilip transfer tankının içerisine konuldu. Transfer tankına yine soğuk 1X transfer tamponu belirtilen hacme kadar (yaklaşık 1 L) eklendi ve 20 voltta 4 °C’ de bir gece (yaklaşık 16 saat) transfere bırakıldı.



Şekil 3.1. Transfer kasetlerine membran ve jelin yerleştirilme modeli.

3.2.11.4. İmmün blotlama (antikor inkübasyonu)

Proteinlerin jelden membrana transferi gerçekleştirildikten sonra bloklama işlemleri için gereken TBST ve bloklama tamponları hazırlandı.

Membranlar küçük plastik kaplara alınarak bloklama tamponunda orbital çalkalayıcı üzerinde 70 rpm hızda yaklaşık 2 saat bloklandı. Bloklama işleminin amacı primer ve sekonder antikorlarla muamele edildiğinde arka zemindeki spesifik olmayan bağlanmaları önlemektir. Bloklamanın ardından 5 dakika TBST ile yıkandı.

RNF2 ve GAPDH için primer antikorlar üretici firmanın önerisi doğrultusunda (Abcam, İngiltere) aşağıda verilen miktarlarda bloklama tamponu ile karıştırıldı. Her iki primer için dilüsyon oranı 1:2000 olarak alındı. Her membran ayrı primer antikorla orbital çalkalayıcı üzerinde 1,5 saat inkübe edildi. Primer antikor için dilüsyon miktarı aşağıdaki gibidir:

7,5 µl primer antikor + 15 ml bloklama tamponu

Primer antikor inkübasyonu bitince 3 kez 15' er dakika bloklama tamponunda inkübe edildi. Daha sonra yeniden 5 dakika TBST ile yıkandı. Yıkamayı takiben membran 30 dakika 1:2000 oranında dilüe edilen sekonder antikor (Keçi anti-tavşan IgG HRP, Abcam, İngiltere) ile muamele edildi. Sekonder antikor için dilüsyon miktarı aşağıdaki gibidir:

3 µl sekonder antikor + 6 ml bloklama tamponu

İnkübasyonu takiben membranlar tekrar TBST ile 2 kez yıkandı. 3 kez 15' er dakika bloklama tamponu ile inkübe edildi. İnkübasyonun ardından görüntüleme aşamasına geçildi.

3.2.11.5. Görüntüleme ve analiz

Membranda proteinlerin görüntülenmesi için Pierce ECL Western Blotting Substrate kiti (Thermo, Amerika) kullanıldı. Kit içeriğinde bulunan tespitleme ajanı 1 ve 2; 1:1 oranında karıştırılarak 500 µl membran üzerine bırakıldı. Karanlıkta 5 dakika bekletildi ve membranlar kemilüminesan görüntüleme cihazında (Vilmer Lourmat, Almanya) görüntülendi.

3.2.12. Metastaz ve invazyon testi

Metastaz tümör hücrelerinin kendi bölgelerinden ayrılıp uzak doku ve organlarda kolonize olmasını sağlayan çok aşamalı karmaşık bir süreçtir. (20). miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p mikroRNA' larının meme kanseri hücre hatları üzerinde metastatik etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla metastaz analiz yöntemleri kullanılmıştır.

Kanser hücrelerinin metastaz analizi için kullanılan yöntemlerden biri "Boyden Chamber" yöntemidir. 24 kuyucuklu hücre kültür tabağına sığacak büyüklükte, 8 mm por genişliğine sahip insörtler kullanılmaktadır. Yöntemin gerçekleştirilmesi için CytoSelect 24-Well Cell Migration and Invasion Assay (katalog no: CBA-100-C Cell Biolabs, Amerika) kiti kullanılmıştır. Üretici firmanın önerdiği doğrultuda aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

- 12 kuyucuklu hücre kültür tabağına 200.000 hücre ekilmiş ve mimik transfeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak bir kuyucukta ise negatif kontrol siRNA (scramble) transfeksiyonu yapılmıştır.
- Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırılıp serum içermeyen besiyerinde $0.5-1.0 \times 10^6$ hücre olacak şekilde bir hücre süspansiyonu hazırlandı.
- 24 kuyucuklu hücre kültür tabağına kemoatraktan olarak (hücrenin bu besiyerine doğru göçünü sağlamak için) 500 µl %10 serum içeren besiyeri eklendi.
- Her insörte ise hazırlanan hücre süspansiyonundan 300 µl eklenerek serumlu besiyeri içeren kuyucukların içine yerleştirildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından insört içindeki besiyeri aspire edildi. Islatılmış pamuk uçlu çubuklarla nazik bir şekilde membranın üstünde kalan, göç etmeyen hücreler temizlendi.
- İnsörtler 400 µl hücre boyama çözeltisi içeren temiz kuyucuklara transfer edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnsörtler birkaç defa su neherlerinde yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kurumanın ardından ışık mikroskopunda 10X büyütme ile göç eden hücreler sayıldı.
- Her insört 200 µl ekstraksiyon çözeltisi içeren temiz kuyucuklara transfer edilerek orbital çalkalayıcı üzerinde 10 dakika inkübe edildi.

- İnkübasyon sonunda her örnekten 100 µl alınarak 96 kuyucuklu tabağa eklendi ve 560 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Thermo, Amerika) ölçüm yapıldı.

Hücre invazyon analizi metastaza benzemektedir ancak hücrelerin hücre dışı matriks gibi bir bariyeri enzimleri aracılığıyla parçalayıp aşarak bir diğer alana doğru hareket etmesi gerekmektedir. İnvazyon analizinde yine metastaz analizinde kullanılan yöntem ve kitin aynısı uygulanmıştır. Farklı olarak, hücreler ekilmeden önce insörtler Matrigel Matrix (katalog no: 354248 Corning, Amerika) ile kaplanmıştır. Bunun için 1:30 oranında DMEM ile sulandırılan matrijel her insörtü kaplayacak şekilde eklenmiş ve oda sıcaklığında 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben bu solüsyon aspire edilip yukarıdaki aşamalar aynen uygulanmıştır.

3.2.13. Yara iyileşme deneyi

Bir diğer hücre göçü/metastaz analiz yöntemlerinden biri olan yara iyileşme deneyi kültürdeki hücrelerin göç karakteristiklerini ölçmede güçlü bir yöntemdir. Bu yöntem bütün hücre kütlelerinin göçünü ölçmemizde yarar sağlamaktadır. Bu yöntemin temeli; tabak yüzeyine tamamıyla kaplamış hücrelere bir çizik atılarak bu oluşan aralığın ne kadar sürede ne kadar kapandığının test edilmesi şeklindedir. Yara iyileşme deneyi için izlenen protokol aşağıdaki gibidir:

- 12 kuyucuklu hücre kültür tabağına her kuyucukta 200.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-106b-5p ve kontrol amaçlı scramble mimikleri her kuyucuğa transfekte edildi.
- Hücreler kültür tabağı üzerinde %80-90 yoğunluğa ulaşınca kadar inkübasyona bırakıldı.
- Hücreler bu yoğunluğa ulaşınca 100 µl' lik pipet ucu kullanarak tabağın tam ortasında dikey bir çizik atılarak yara oluşturuldu.
- Kültür tabakları HBSS ile iki kez yıkandı ve bu çözelti aspire edilerek mikroskopta 4X büyütmede resim çekildi.
- Resim çekimini takiben besiyeri eklenerek hücreler inkübatöre kaldırıldı. Bu şekilde 0. saat ve 24. saat olmak üzere 2 farklı zamanlarda resim alınarak yaranın zamana göre kapanma miktarı analiz edildi.

3.2.14. Verilerin istatistiksel analizi

Hücre hatlarında gen ifadenme seviyelerinin karşılaştırılmasında Qiagen ara yüzü kullanılarak Student's t-testi kullanılmıştır. İstatistiksel çözümlenelerde $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

Protein analiz yönteminde ise bant yoğunlukları Image J programında analiz edilip ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak SPSS versiyon 22 paket programı kullanılarak Student's t-testi çalışılmıştır. Tüm çalışmalar üç kez tekrar edilmiştir.



4. BULGULAR

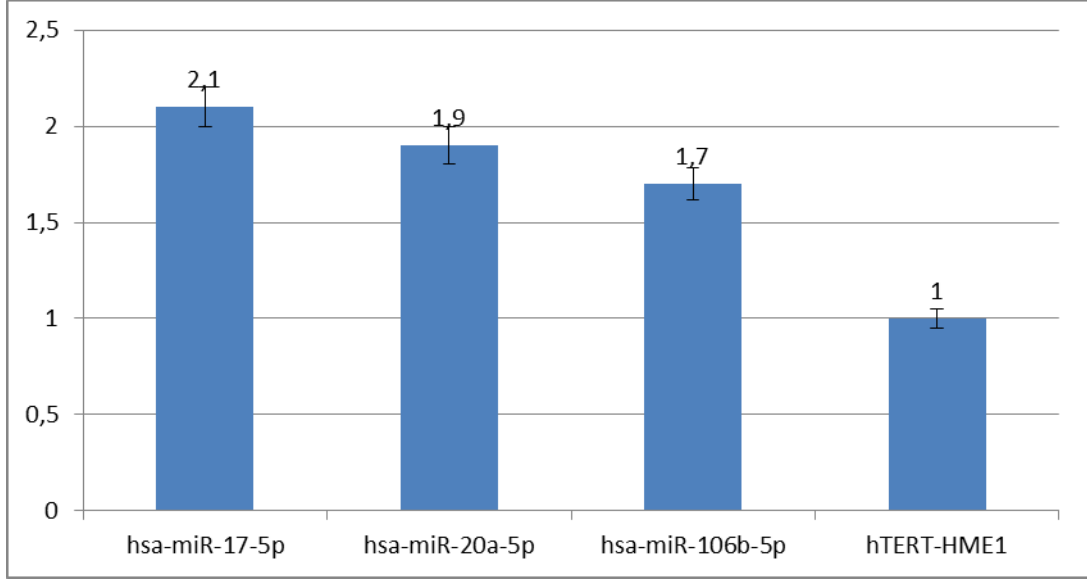
4.1. Hücre Hatlarında miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p İfade Analizi Sonuçları

Araştırmamızda çalışmayı hedeflediğimiz MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3 ve ZR-75-1 meme kanseri hücre hatlarından ve kontrol olarak normal meme epitel hücresi hTERT-HME1 hücre hattından miRNA' yı da içerecek şekilde total RNA izolasyonu yapılmış olup elde edilen RNA miktarları kantitatif olarak ölçülerek tümü 100 ng/µl' ye eşitlenmiştir. RNA konsantrasyonları eşitlenen örnekler, ters transkriptaz PCR kullanılarak komplementer DNA (cDNA)' ya çevrilmiştir. Elde edilen cDNA örneklerinden miRNA ifadenmesi gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu miRNA' ların normalizasyonu yapılırken miRNA için "housekeeping" gen olan RNU6B_13 kullanılmıştır.

Sonuçlar yorumlanırken kat değişim oranları ve istatistiksel olarak anlamlılık dikkate alınmıştır. İfade artışı hesaplanırken 2 katın üstü ve ifade azalırken -2 katın altı değişimler anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca Student t testi kullanılarak yapılan istatistiksel analizde p değeri 0,05' in altında olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

4.1.1. MCF-7 hücre hattında miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p gen ifade analizi sonuçları

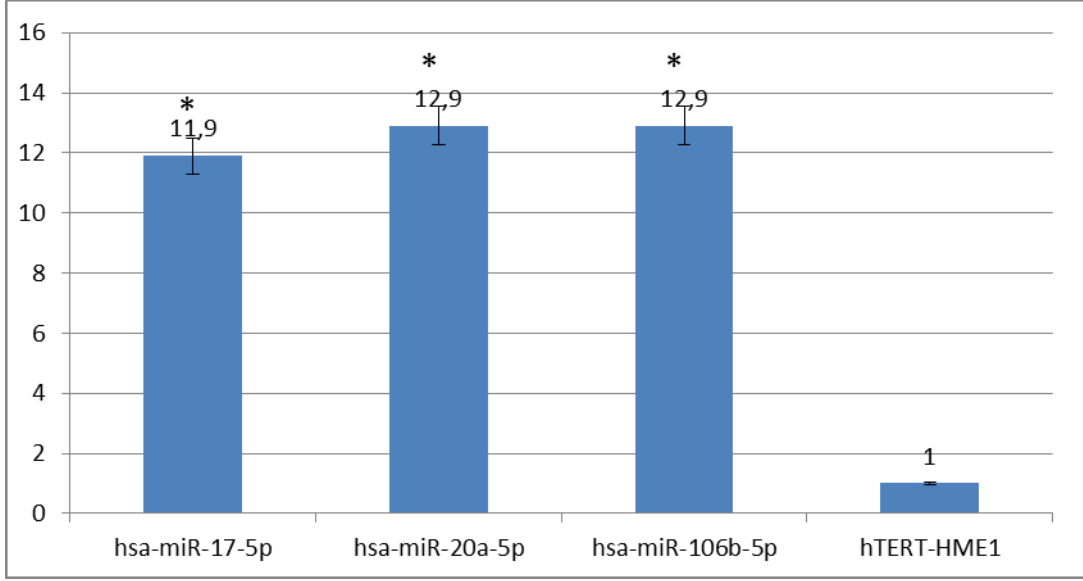
miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p miRNA' larının MCF-7 hücre hattındaki ifadenme seviyesi hTERT-HME1 hücre hattındaki ifadenme seviyeleri ile karşılaştırılmıştır. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan kat değişim değerleri Şekil 4.1' de verilmiştir. Grafiğe göre miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p seviyeleri normal meme epitel hücresi ile karşılaştırıldığında sırasıyla 2,1, 1,9 ve 1,7 kat artmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir değişim bulunamamıştır (p değerleri sırasıyla 0,394, 0,407 ve 0,404 olarak hesaplanmıştır.).



Şekil 4.1. MCF-7 hücre hattında göreceli miRNA ifadenme sonuçları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

4.1.2. MDA-MB-231 hücre hattında miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p gen ifade analizi sonuçları

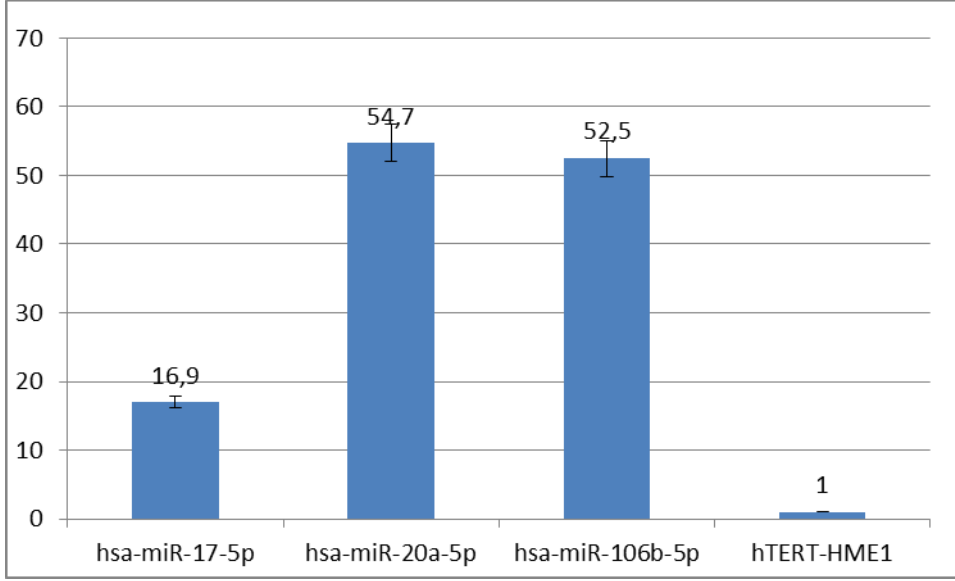
miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p miRNA'larının MDA-MD-231 hücre hattındaki ifadenme seviyeleri hTERT-HME1 hücre hattındaki ifadenme seviyeleri ile karşılaştırılmıştır. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan kat değişim değerleri Şekil 4.2' de verilmiştir. Grafiğe göre miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p seviyeleri normal meme epitel hücresi ile karşılaştırıldığında sırasıyla 11,9, 12,9 ve 12,9 kat fazladır. Bu sonuçlara göre miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p mikroRNA'ları metastatik MDA-MB-231 hücre hattında ifadesinin arttığı saptanmıştır. Ayrıca bu ifade seviyesindeki artış oranları istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0,047, 0,041 ve 0,049 olarak hesaplanmıştır.).



Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücre hattında göreceli miRNA ifadenme sonuçları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

4.1.3. SK-BR-3 hücre hattında miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p gen ifade analizi sonuçları

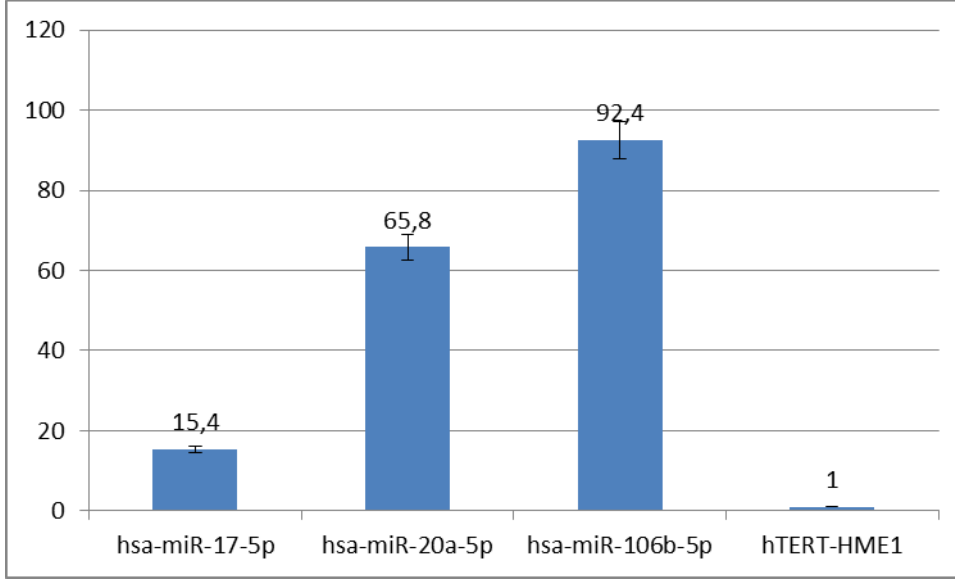
SK-BR-3 hücre hattında hTERT-HME1 hücre hattı ile karşılaştırmalı olarak ifadenme seviyeleri verilen miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p miRNA'larının $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan kat değişim değerleri Şekil 4.3' de verilmiştir. Grafiğe göre miR-17-5p (16,9 kat), miR-20a-5p (54,7 kat) ve miR-106b-5p (52,5 kat) seviyelerinin normal meme epitel hücresi ile karşılaştırıldığında meme kanseri hücre hatlarında ifadelerinin arttığı saptanmıştır. Kat değişim oranları istatistiksel olarak analiz edildiğinde anlamlı bir değişim bulunamamıştır (p değerleri sırasıyla 0,357, 0,124 ve 0,224 olarak hesaplanmıştır.)



Şekil 4.3. SK-BR-3 hücre hattında göreceli miRNA ifadenme sonuçları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

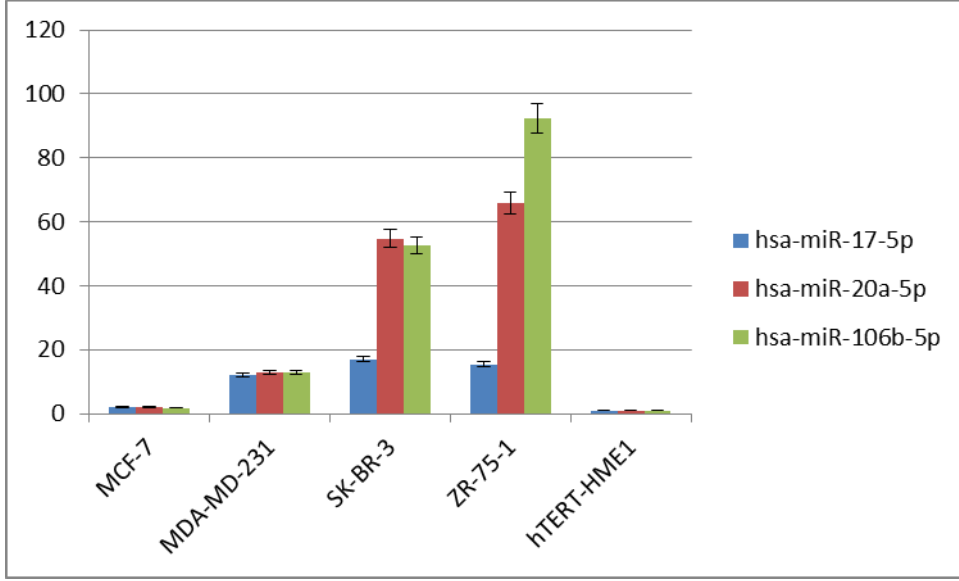
4.1.4. ZR-75-1 hücre hattında miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p gen ifade analizi sonuçları

İnvaziv duktal meme kansinomu olan ZR-75-1 hücre hattında çalıştığımız bu miRNA'ların ifadenme seviyesi normal meme epiteli ile karşılaştırıldığında arttığı gözlenmiştir. miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p miRNA'larının $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan kat değişim değerleri Şekil 4.4' de verilmiştir. Grafiğe göre miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p seviyeleri normal meme epitel hücresi ile karşılaştırıldığında sırasıyla 15,4, 65,8 ve 92,4 kat fazladır. Kat değişim formülüne göre ifade artışı bulunan bu miRNA'ların istatistiksel analizi yapıldığında bu değişim anlamlı bulunamamıştır (p değerleri sırasıyla 0,333, 0,354 ve 0,337 bulunmuştur.).



Şekil 4.4. ZR-75-1 hücre hattında göreceli miRNA ifadenme sonuçları ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Tüm meme kanseri hücre hatlarındaki miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p miRNA' larının ifadenme seviyeleri karşılaştırıldığında en fazla invaziv duktal meme kanseri hücre hattında ifadelerinin arttığı bulunmuştur (Şekil 4.5). Metastatik özelliği diğer hücre hatlarına göre daha az olan MCF-7 hücre hattında ise en az ifadenme seviyesi gösterdikleri tespit edilmiştir. Bununla beraber istatikselsel olarak anlamlı artışı MDA-MB-231 hücre hattında vermiştir. MDA-MB-231 metastatik özelliği en fazla olan hücre hattıdır. Sonuç olarak bu miRNA' lar meme kanserinin normal karsinomdan metastatik evreye geçişte biyobelirteç olarak kullanılmaya aday miRNA' lar olarak gösterilebilir ve meme kanseri prognozu ile güçlü bir ilişki içinde olabilirler.

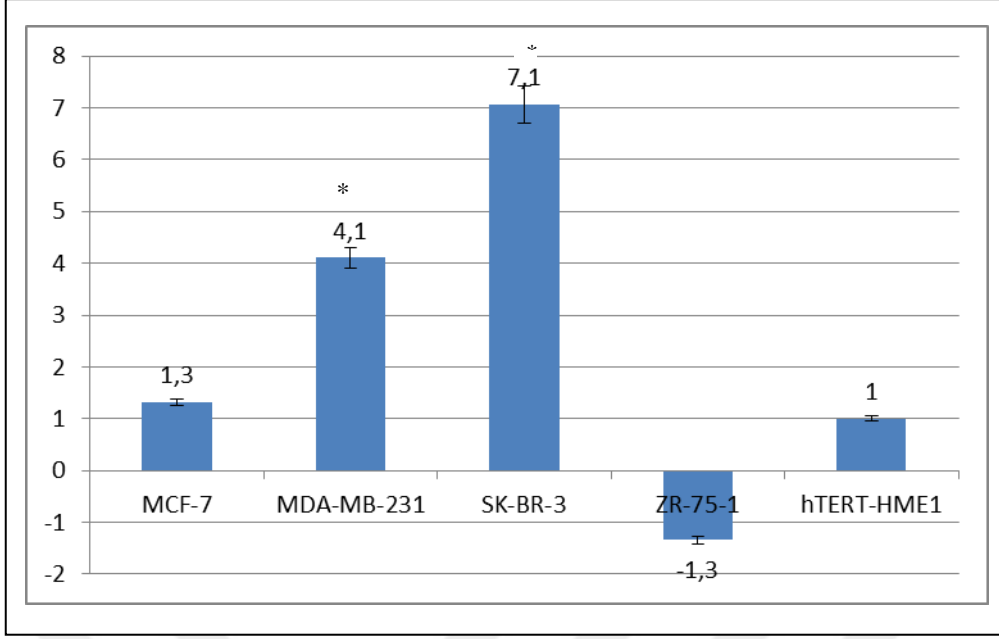


Şekil 4.5. miRNA seviyelerinin meme kanseri hücre hatları arasında karşılaştırılması ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

4.2. Hücre Hatlarında RNF2 Geninin İfade Analizi Sonuçları

MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3 ve ZR-75-1 meme kanseri hücre hatlarından ve hTERT-HME1 normal meme epiteli hücre hattından elde edilen total RNA'nın cDNA'ya dönüşümü gerçekleştirildikten sonra RT-PCR yöntemi kullanılarak RNF2 gen seviyesi analiz edilmiştir. RNF2 gen normalizasyonu için "housekeeping" gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Bu meme kanseri hücre hatlarındaki $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan kat RNF2 gen ifadenin seviyesi Şekil 4.6' da gösterilmiştir. Her hücre hattında RNF2 geni farklı bir ifadenin seviyesi göstermiştir. MCF-7, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatlarında sırasıyla 1,3, 4,1 ve 7,1 kat fazla ifadeninirken ZR-75-1 hücre hattında bu gen ifadesinin 1,3 kat azaldığı tespit edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde ise MDA-MB-231 ($p=0,048$) ve SK-BR-3 ($p=0,045$) hücre hattında anlamlı bir değişim bulunmuştur.

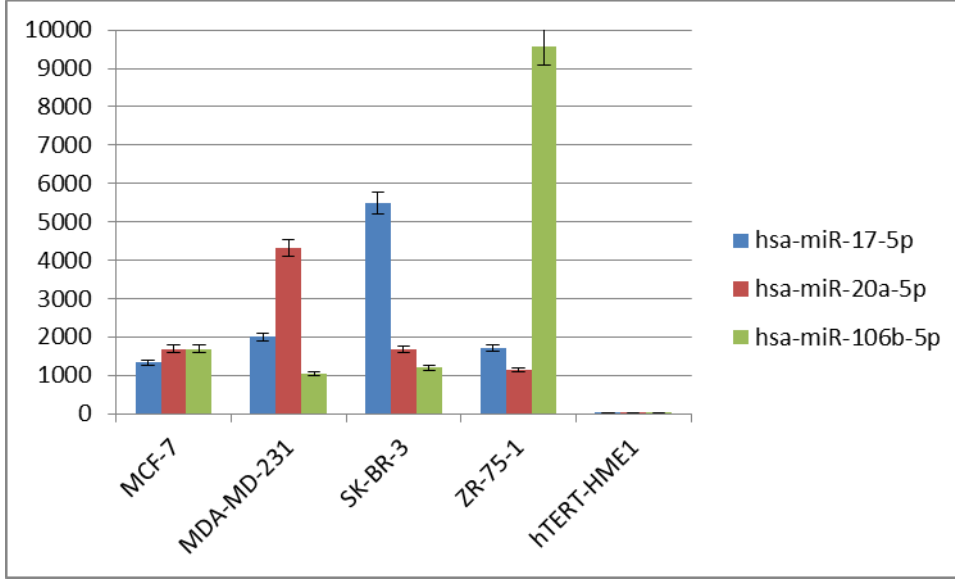
RNF2 geninin MDA-MB-231 ve SK-BR-3 gibi metastatik hücre hatlarında ifadesinin arttığı bulunmuştur. Agresifliği diğer hücre hatlarından daha az olan MCF-7 hücre hattında ise bazal seviyede bulunmuştur.



Şekil 4.6. RNF2 gen seviyesinin meme kanseri hücre hatları arasında karşılaştırılması ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

4.3. Mimik Transfeksiyonu Sonrası miRNA Seviyelerindeki Değişim

Biyoinformatik olarak RNF2 genini hedeflediğini tespit ettiğimiz miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p miRNA' larının RNF2 genini transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede baskılayıp baskılamadığını araştırmak için tasarladığımız çalışmada bu miRNA' ların sentetik mimikleri meme kanseri hücre hatlarına verilmiştir. Transfeksiyondan 48-72 saat sonra transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini tespit etmek için miRNA' ların ifade analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre transfeksiyonlar başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. miRNA seviyelerinin ifadelerinin arttığı tespit edilmiş olup en az artış MDA-MB-231 hücre hattında miR-106b-5p' de gözlenirken (1036 kat) en fazla artış ise ZR-75-1 hücre hattında miR-106b-5p miRNA' sında (9553 kat) gözlenmiştir (Şekil 4.7). Ancak mimik transfeksiyonu sonrası miRNA seviyelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).



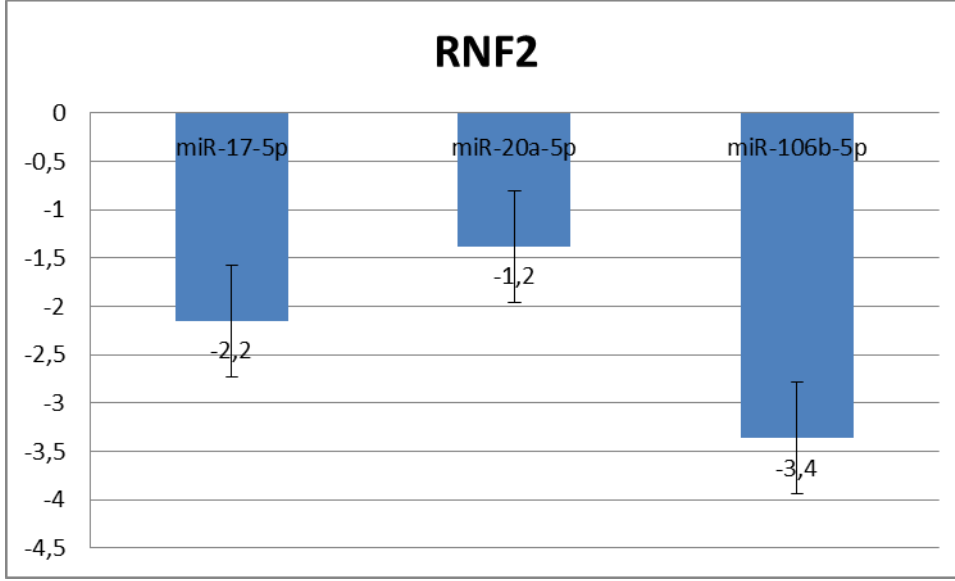
Şekil 4.7. Mimik transfeksiyonu sonrası miRNA ifade seviyelerindeki değişim ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

4.4. Mimik Transfeksiyonu Sonrası RNF2 İfadelenme Seviyesindeki Değişim

Transfeksiyon sonrası meme kanseri hücre hatlarında normal meme epitel hücre hattı ile karşılaştırıldığında RNF2 gen seviyesindeki değişim hesaplanmıştır. RT-PCR analizinde normalizasyon için “housekeeping” gen olarak GAPDH alınmıştır. Karşılaştırma yapılan kontrol grubunu ise negatif kontrol siRNA (scramble) transfekte edilen hücreler oluşturmaktadır.

4.4.1. MCF-7 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 ifadenme seviyesindeki değişim

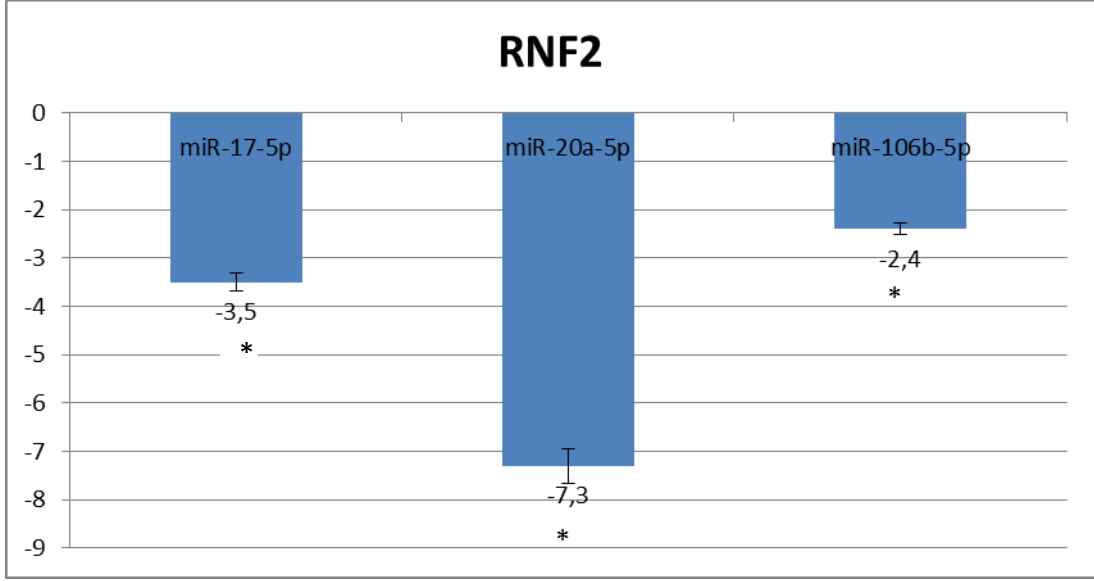
Mimik transfeksiyonu sonrası MCF-7 hücre hattındaki RNF2 gen seviyeleri Şekil 4.8’ de gösterilmiştir. Her üç mimiğin de transfeksiyonu sonrası transkripsiyonel seviyede istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilememiştir ($p > 0,05$). miR-17-5p RNF2 gen seviyesini 2,2 kat ($p = 0,422$), miR-20a-5p’ nin 1,2 kat ($p = 0,446$) ve miR-106b-5p’ nin ise 3,4 kat ($p = 0,410$) azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. MCF-7 hücre hattında mimik transfeksiyonu sonrası RNF2 gen ifade analizi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

4.4.2. MDA-MB-231 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 ifadenin seviyesindeki değişim

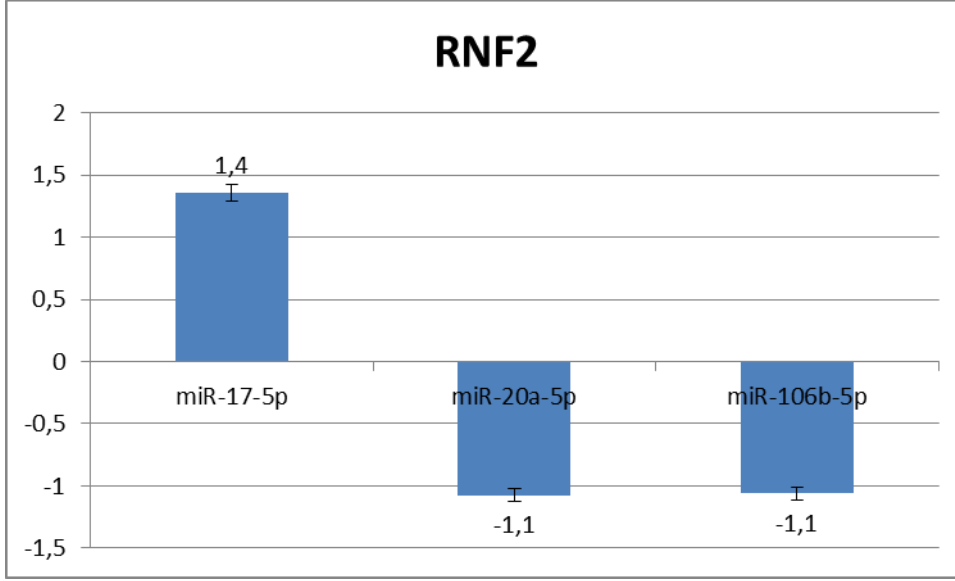
Mimik transfeksiyonu sonrası MDA-MB-231 hücre hattındaki RNF2 gen seviyeleri Şekil 4.9' da gösterilmiştir. miR-17-5p' nin RNF2 gen seviyesini 3,5 kat ($p=0,045$), miR-20a-5p' nin 7,3 kat ($p=0,039$) ve miR-106b-5p' nin ise 2,4 kat ($p=0,049$) azalttığı tespit edilmiştir. miR-20a-5p başta olmak üzere her üç mimik transfeksiyonunun da RNF2 gen seviyesini anlamlı derecede azalttığı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücre hattında mimik transfeksiyonu sonrası RNF2 gen ifade analizi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

4.4.3. SK-BR-3 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 ifadenme seviyesindeki değişim

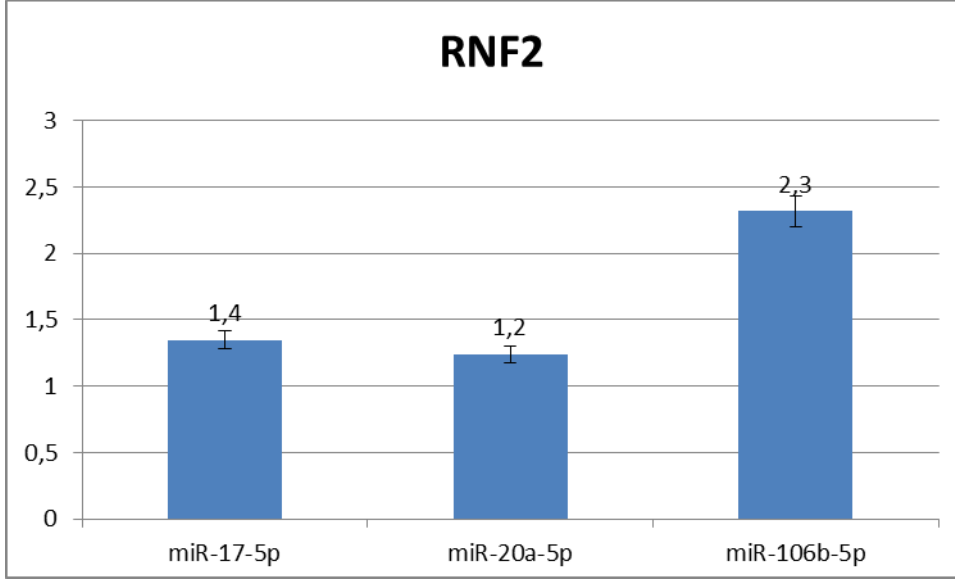
Mimik transfeksiyonu sonrası SK-BR-3 hücre hattındaki RNF2 gen seviyeleri Şekil 4.10' da gösterilmiştir. Her üç mimiğinde transfeksiyonu sonrası transkripsiyonel seviyede istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalış bulunamamıştır ($p > 0,05$). miR-17-5p RNF2 gen seviyesini 1,4 kat ($p = 0,153$) artırırken, miR-20a-5p' nin ve miR-106b-5p' nin ise 1,1 kat ($p = 0,763$) azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. SK-BR-3 hücre hattında mimik transfeksiyonu sonrası RNF2 gen ifadenme seviyeleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

4.4.4. ZR-75-1 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 ifadenme seviyesindeki değişim

Mimik transfeksiyonu sonrası ZR-75-1 hücre hattında RNF2 gen seviyeleri Şekil 4.11’ de gösterilmiştir. Her üç mimiğin de transfeksiyonu sonrası transkripsiyonel seviyede istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunamamış ($p > 0,05$); hatta oluşturduğumuz hipotezin aksine RNF2 gen seviyesinde artış gözlenmiştir. miR-17-5p RNF2 gen seviyesini 1,4 kat ($p=0,586$), miR-20a-5p’ nin 1,2 kat ($p=0,546$) ve miR-106b-5p’ nin ise 2,3 kat ($p=0,420$) artırdığı tespit edilmiştir.



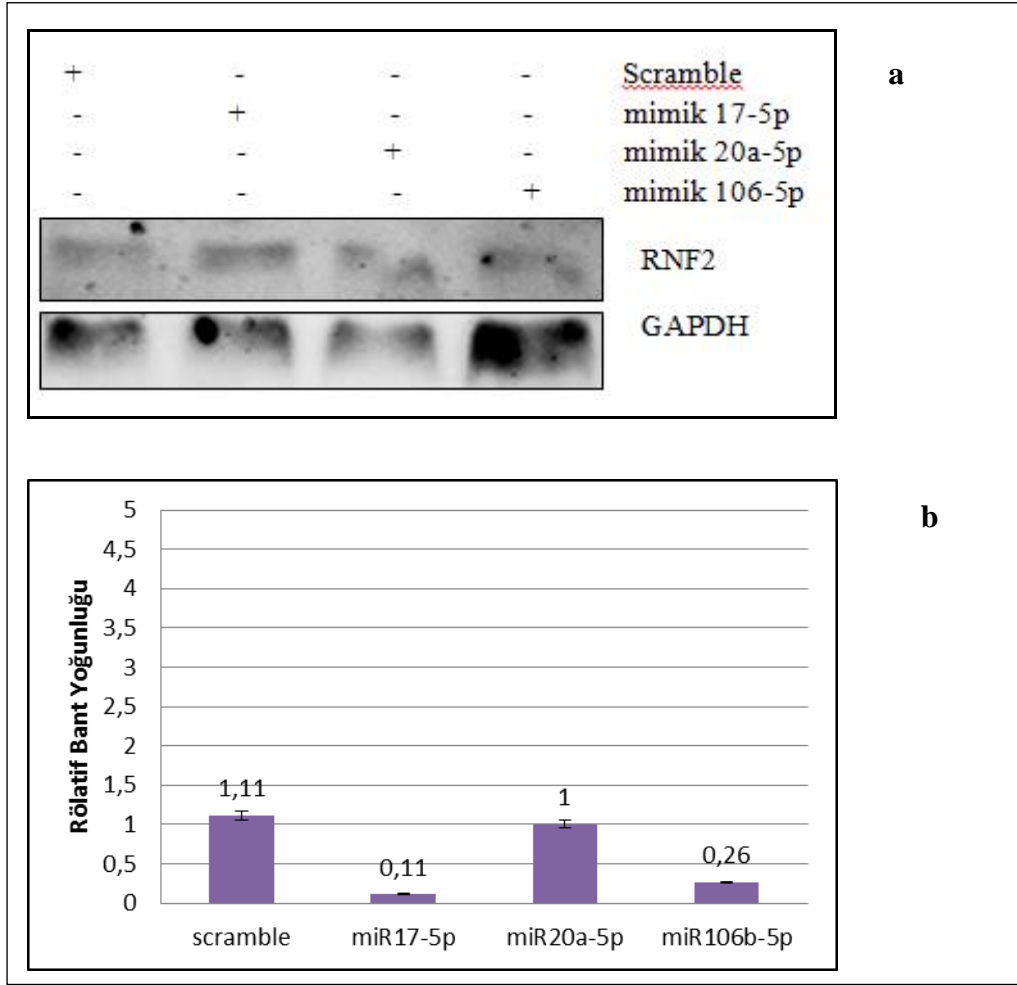
Şekil 4.11. ZR-75-1 hücre hattında mimik transfeksiyonu sonrası RNF2 gen ifadenme seviyeleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

4.5. miRNA Transfeksiyonu Sonrası RNF2 Protein Seviyesindeki Değişim

MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3, ZR-75-1 hücre hatlarına mimik transfeksiyonu sonrası RNF2 geninin transkripsiyonel seviyede gösterdiği değişiklik MDA-MB-231 hücre hattı dışında anlamlı bir sonuç vermemiştir. Bu sebeple muhtemel transkripsiyon sonrası translasyonun baskılanması ile oluşabilecek değişimleri gözlemlemek için aynı hücre hatlarında protein analizi yapılmıştır. Western blotlama yöntemi kullanılarak mimik verilen hücre hatlarında RNF2 protein miktarı analiz edilmiştir. Protein analizi sırasında “housekeeping” protein olarak GAPDH kullanılmıştır. Western Blot analizi sonucu elde edilen veriler ImageJ programıyla densitometre analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Yapılan densitometre analizi sonucu elde edilen bant yoğunlukları GAPDH ile normalize edilmiştir.

4.5.1. MCF-7 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 protein seviyesindeki değişim

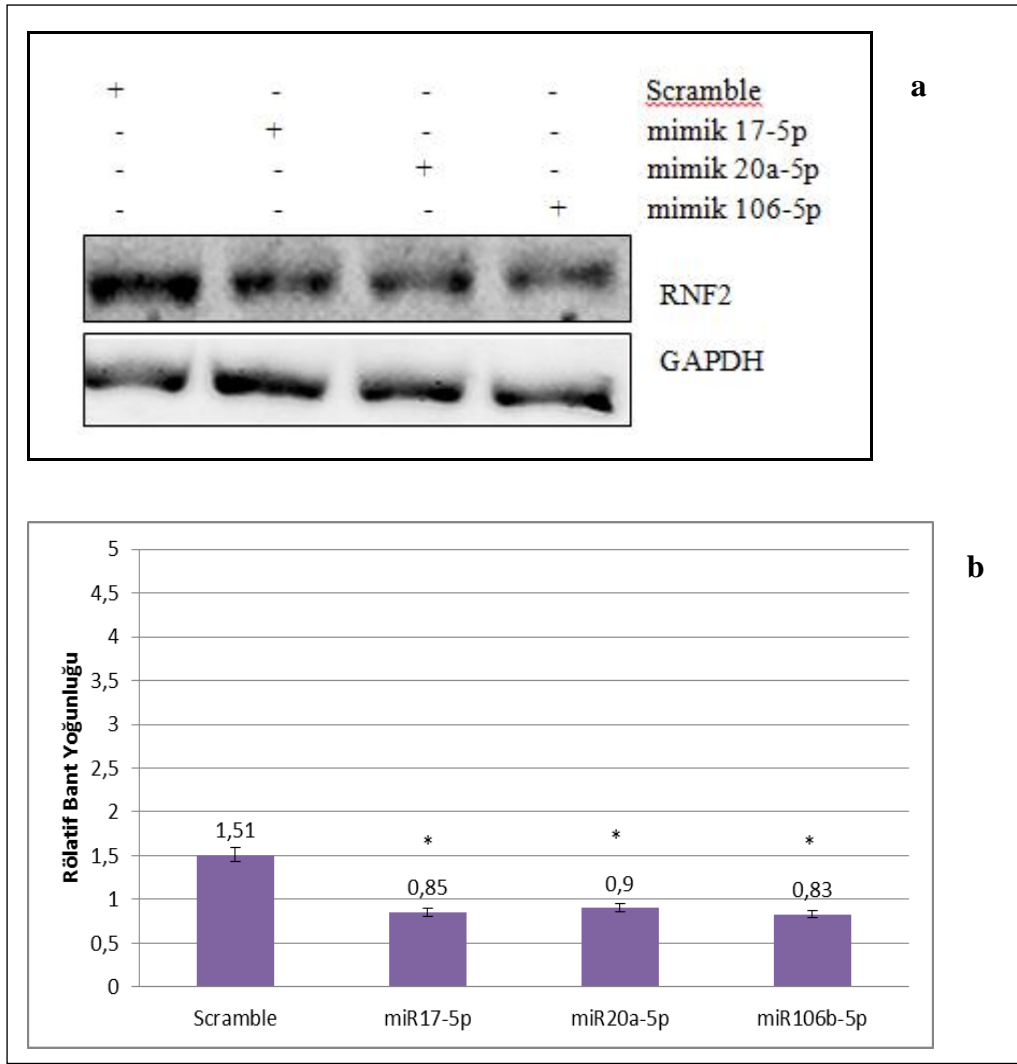
MCF-7 hücre hattında kontrolle karşılaştırıldığında miR-17-5p ve miR-106b-5p mimikleri verilen hücrelerde RNF2 protein seviyesinde azalma gözlenmekle beraber miR-20a-5p mimiği verilen hücrelerde azalma gözlenmemiştir (Şekil 4.12.a ve b). İstatiksel olarak anlamlı bir değişim bulunamamıştır ($p > 0,05$). miR-17-5p için p değeri 0,071, miR-20a-5p için 0,077 ve miR-106b-5p için p değeri 0,062 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.12. MCF-7 hücre hattında transfeksiyon sonrası RNF2 protein seviyesindeki değişim. (a) protein seviyesinin western blot görüntüleri, (b) Image J analizi ile proteinlerin bant yoğunluğu grafiği.

4.5.2. MDA-MB-231 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 protein seviyesindeki değişim

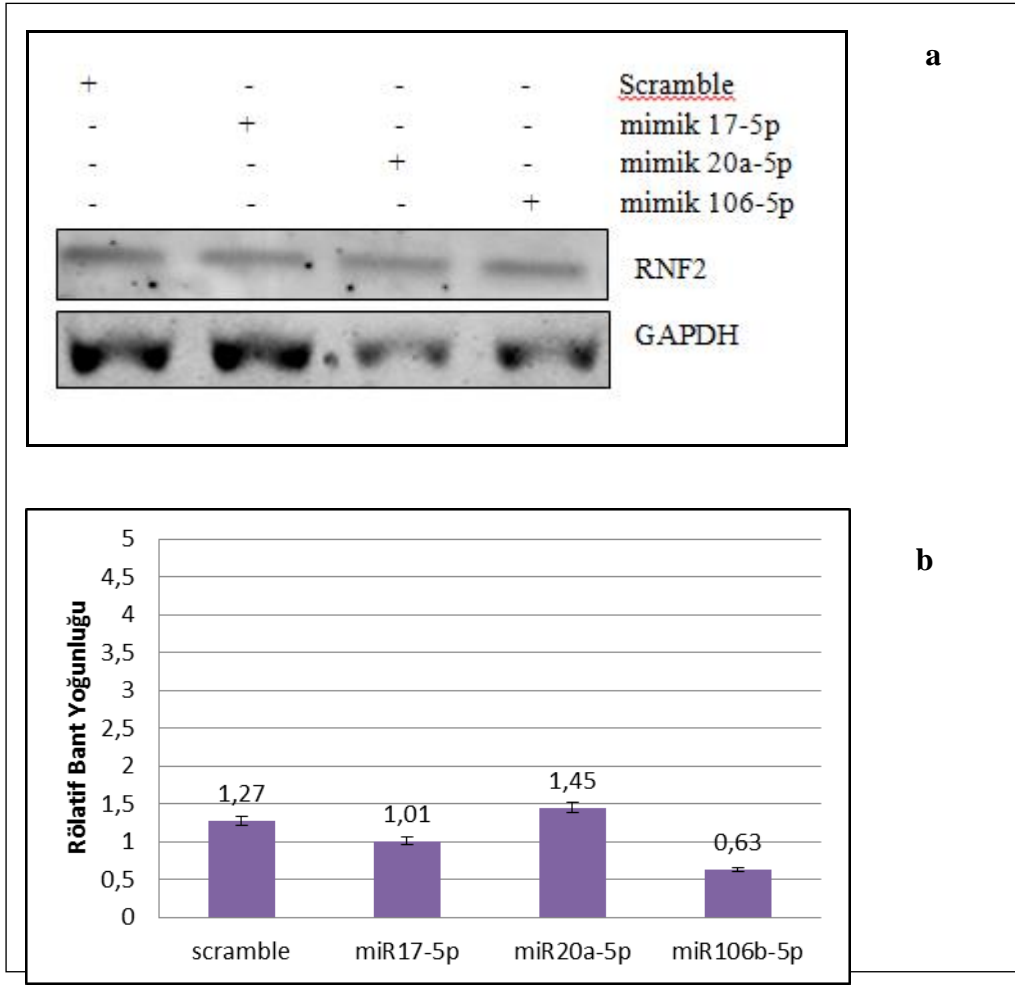
MDA-MB-231 hücre hattında kontrole kıyasla her üç mimik verildiğinde de RNF2 protein seviyesinde azalma gözlenmiştir. Çalışma hipotezine göre beklendiği gibi bu miRNA' lar hedef protein RNF2' yi transkripsiyon sonrası aşamada baskıladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.13. a ve b). İstatiksel olarak analiz edildiğinde her üç mimiğin de anlamlı seviyede RNF2 protein seviyesini azalttığı gözlenmiştir ($p=0,044$).



Şekil 4.13. MDA-MB-231 hücre hattında transfeksiyon sonrası RNF2 protein seviyesindeki değişim. (a) protein seviyesinin western blot görüntüleri, (b) Image J analizi ile proteinlerin bant yoğunluğu grafiği.

4.5.3. SK-BR-3 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 protein seviyesindeki değişim

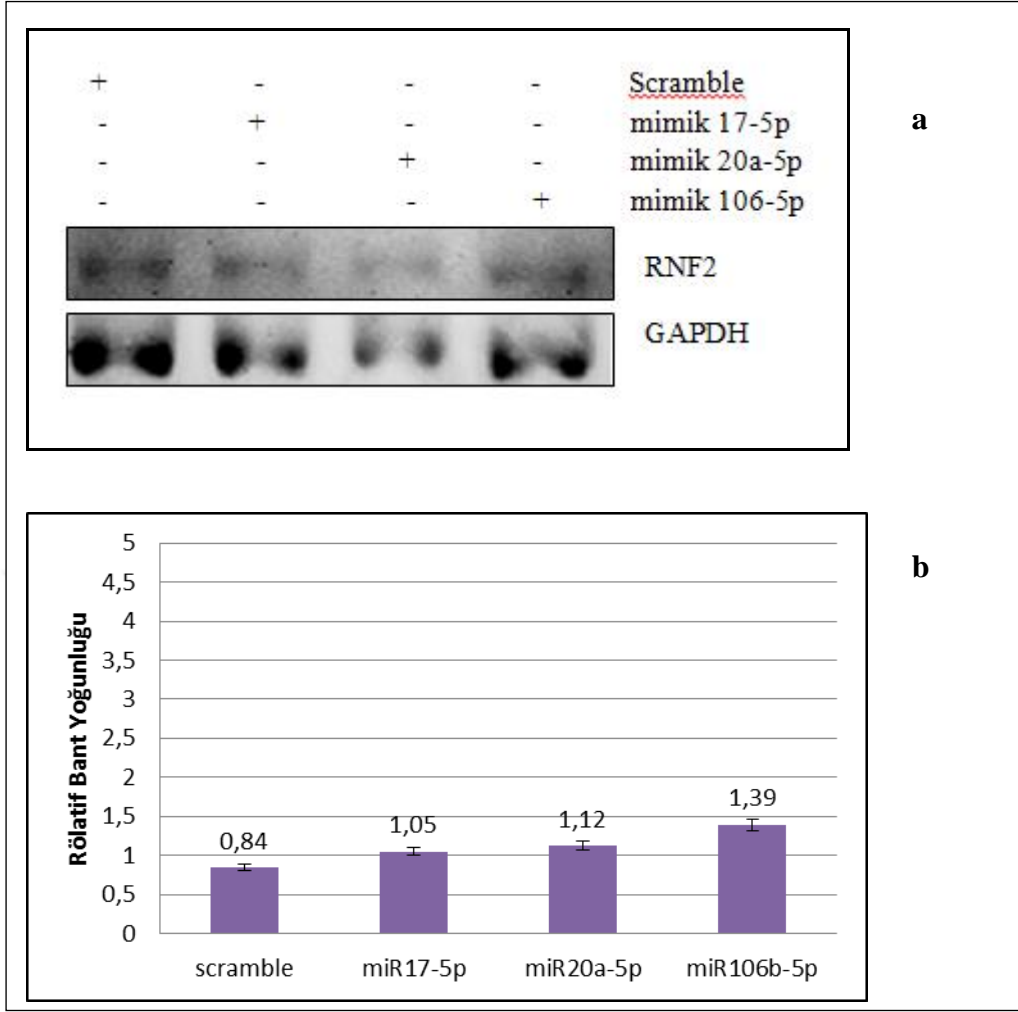
SK-BR-3 hücre hattında kontrolle karşılaştırıldığında miR-17-5p ve miR-106b-5p mimikleri verilen hücrelerde RNF2 protein seviyesinde azalma gözlenmesine rağmen miR-20a-5p mimiği verilen hücrelerde RNF2 protein seviyesi artmıştır (Şekil 4.14.a ve b). Bant yoğunluğu dikkate alınarak yapılan istatistiksel analizde ise anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p=0,087$).



Şekil 4.14. SK-BR-3 hücre hattında transfeksiyon sonrası RNF2 protein seviyesindeki değişim. (a) protein seviyesinin western blot görüntüleri, (b) Image J analizi ile proteinlerin bant yoğunluğu grafiği.

4.5.4. ZR-75-1 hücre hattında miRNA transfeksiyonu sonucu RNF2 protein seviyesindeki değişim

ZR-75-1 hücre hattında ise kontrolle karşılaştırıldığında her üç mimik verildiğinde de RNF2 protein miktarının arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.15.a ve b). İstatiksel olarak anlamlı bir değişim tespit edilememiştir ($p=0,746$).



Şekil 4.15. ZR-75-1 hücre hattında transfeksiyon sonrası RNF2 protein seviyesindeki değişim. (a) protein seviyesinin western blot görüntüleri, (b) Image J analizi ile proteinlerin bant yoğunluğu grafiği.

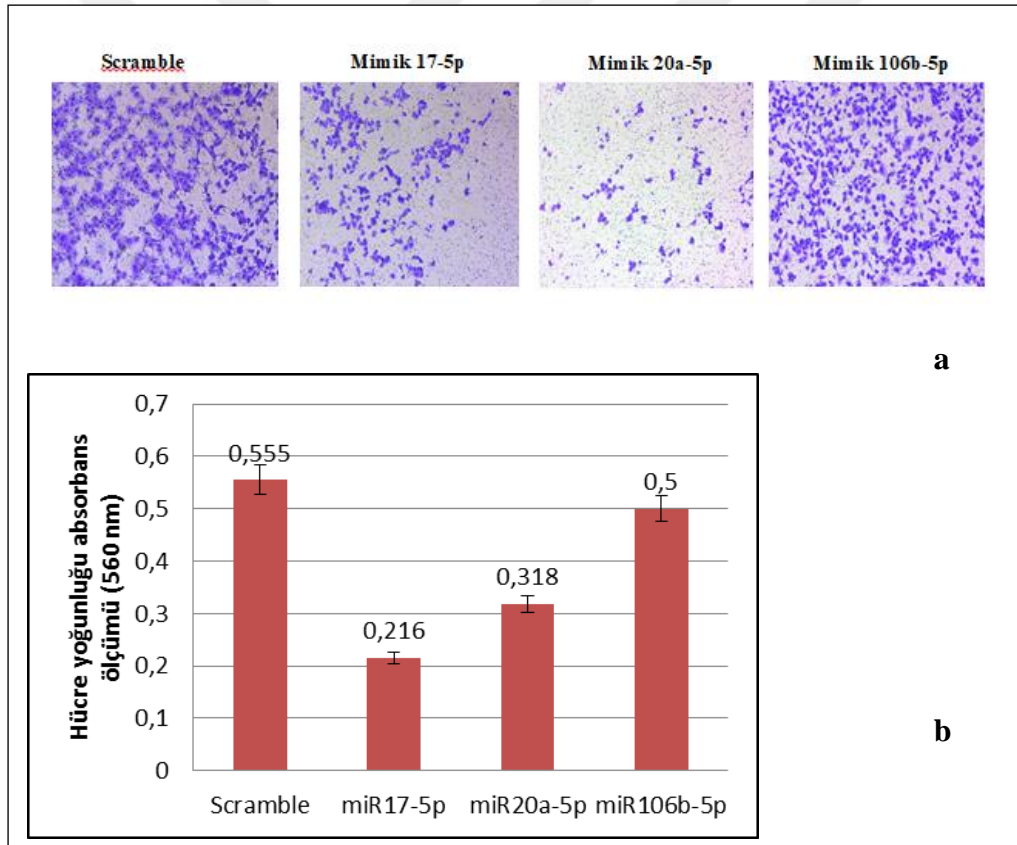
miRNA transfeksiyonu sonrası protein seviyelerindeki değişim incelendiğinde RNF2 seviyesinde bir azalma (ZR-75-1 hücre hattı hariç) söz konusu olmuştur. Hem gen seviyesinde hem de protein seviyesinde azalma görülen MDA-MB-231 hücre hattında bu miRNA'ların RNF2'ye tam bağlanarak yıkıma gönderdiği tahmin edilmektedir.

Gen ifade analizi ve protein seviyesindeki değişim analizine göre en anlamlı sonucu veren ve aynı zamanda RNF2'nin ifadesinin arttığı hücre hattı MDA-MD-231 olduğu için daha sonraki aşamalarda sadece bu hücre hattından devam edilmiştir.

4.6. miRNA Transfeksiyonu Sonrası Metastaz ve İnvazyon Analizi Sonuçları

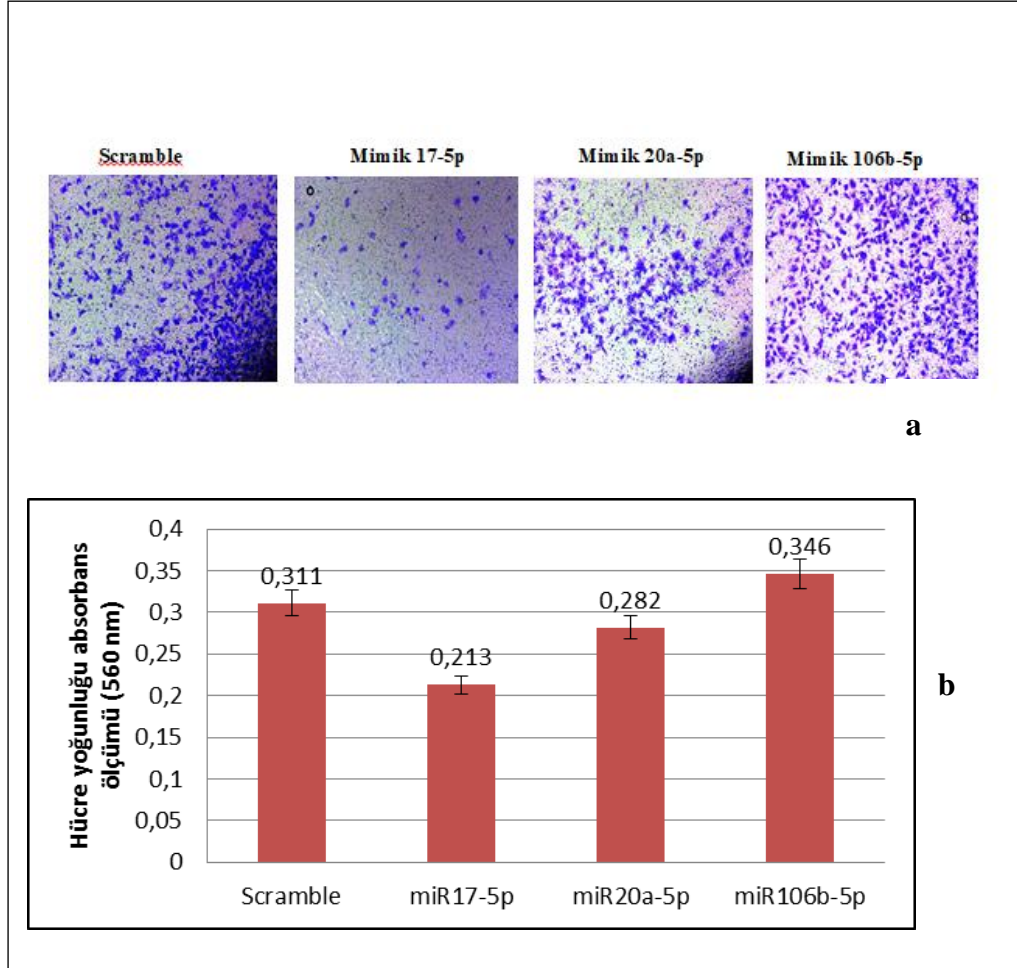
MDA-MB-231 hücre hattına miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p mimik transfeksiyonu gerçekleştirildikten sonra bu mimiklerin metastaz ve invazyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Metastaz ya da hücre göçünü araştırmak için “Boyden chamber” ve yara iyileşme deneyleri yapılmıştır.

“Boyden chamber” deneyi ile metastaz analizinin görüntüleri Şekil.4.16’ da verilmiş olup hücre yoğunluk sonuçları verilmiştir. Bu deneyin sonucuna göre miR-17-5p ve miR-20a-5p metastazı baskılamıştır. Ancak miR-106b-5p’ nin mikroskopik sonuçlara ve absorbans değerlerine göre metastazı baskılamadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.16. miRNA mimik transfeksiyonlarının metastaza etkileri. (a) Boyden chamber’ da göç yapan hücrelerin görüntüleri. (b) Boyden chamber’ daki hücre yoğunluğunun absorbans değerleri.

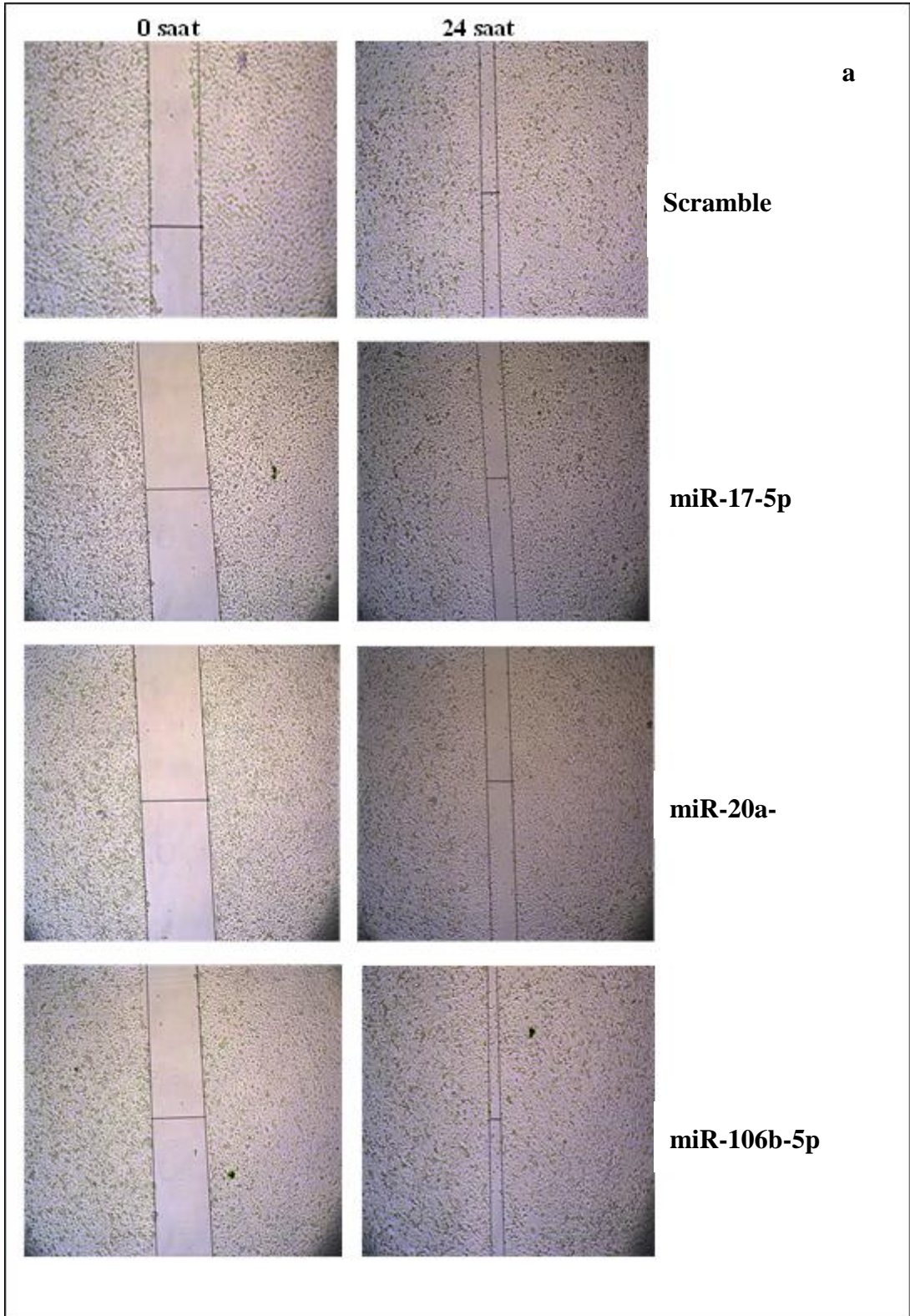
”Boyden chamber” deneyi ile invazyon analizi sonuçları ise Şekil 4.17’ de verilmiştir. Hücrelerin matrijeli enzimleri ile parçalayıp göç etmesine dayanan bu deneyde miR-17-5p ve miR-20a-5p invazyonu baskılamıştır. miR-106b-5p’nin ise invazyonu baskılamadığı tespit edilmiştir.

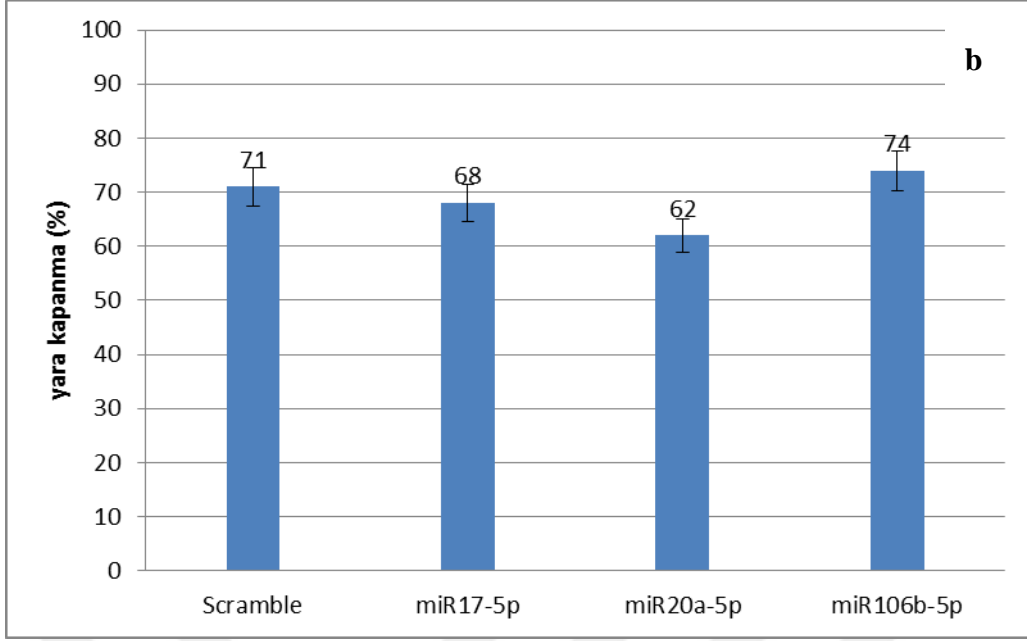


Şekil 4.17. miRNA mimik transfeksiyonlarının invazyona etkileri. (a) Boyden chamber’da kristal viyole ile boyanan hücrelerin görüntüleri. (b) Boyden chamber’deki hücre yoğunluğunun absorbanans değerleri.

Hücre göçünün bir diğer analiz yöntemi olan yara iyileşme deneyinin sonuçlarına bakıldığında ise kontrolle karşılaştırıldığında miR-17-5p ve miR-20a-5p mimiklerinin verildiği hücrelerde yaranın kapanma miktarı daha azdır. miR-106b-5p mimik transfeksiyonu yapılan hücrelerde ise kontrole yakın miktarda kapanma oranı gözlenmiştir (Şekil 4.18. a ve b). Burdan yola çıkarak metastatik MDA-MB-231

hücrelerinde miR-17-5p ve miR-20a-5p' nin metastazı baskıladığı ancak miR-106b-5p' nin metastazı baskılamadığı gözlenmiştir.





Şekil 4.18. miRNA mimik transfeksiyonlarının hücre göçüne etkileri. (a) MDA-MB-231 hücrelerinde 0 ve 24. saatlerde yara iyileşme görüntüleri. (b) Mimik transfeksiyonu sonrası 24 saatte yara kapanma yüzdesi.

Sonuç olarak, MDA-MB-231 hücre hattında miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p, RNF2' yi hedefleyerek gen ve protein seviyesini azaltmıştır. Bu durumun metastaz ve invazyon üzerindeki etkisi araştırıldığında miR-17-5p ve miR-20a-5p' nin metastaz ve invazyonu azalttığı ancak miR-106b-5p' nin ise etkilemediği ya da az miktarda artırdığı tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

RNF2, polycomb baskılayıcı kompleksin katalitik aktiviteye sahip merkez proteinlerindedir. Sahip olduğu E3 ligaz aktivitesi ile histon H2A' nın 119. lizin ubikitinasyonunu gerçekleştirerek post-translasyonel baskılama yapmaktadır (35). RNF2 geninin pankreas, prostat, karaciğer, yumurtalık, mesane, özofagal kanserlerde ve melanoma gibi birçok kanser türünde ifadesinin arttığı ve hücre döngüsünde kritik rol oynayan bazı tümör baskılayıcı genleri ubikitinleyerek baskıladığı daha önceki yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (47). Birçok kanser türünde ifadesinin artmasıyla onkogenik rol kazanan RNF2 geninin meme kanserinde de ifadesinin arttığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (8,92).

Araştırmamızda biyoinformatik analiz sonucu RNF2' yi hedeflediğini belirttiğimiz miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p' nin meme kanserinde ifade artışı gösterdiği daha önce yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. miRNA gen ifade seviyesinin meme kanserinin histolojik ve moleküler alt yapısına göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (58, 59, 80). Çalışmamızda her üç miRNA' nın gen ifadesinin MDA-MB-231, SK-BR-3 ve ZR-75-1 hücre hatlarında ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. En fazla ZR-75-1 hücre hattında bu miRNA' ların gen ifadelerinin arttığı tespit edilmiştir. MCF-7 hücre hattında ise herhangi bir artış ya da azalış gözlenmemiştir. Benzer şekilde Li ve ark., (2017) tarafından yapılan çalışmada miR-106b-5p' nin hem meme kanserli hastalardan alınan dokularda hem de MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında ifadelerinin arttığı bildirilmiştir (80). Ancak MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları arasında önemli derecede fark olduğuna; metastatik yeteneği daha az olan MCF-7' de MDA-MB-231' e kıyasla ifade düzeyinde azalma olduğuna dikkat çekilmiştir. Yine miR-17-5p gen ifade seviyesine bakıldığında Yang ve ark., (2017) tarafından yapılan çalışmada MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları arasında önemli derecede fark olduğu gösterilmiş olup MDA-MB-231' de MCF-7 ile karşılaştırıldığında ifade seviyesinde artış olduğu tespit edilmiştir (65). Liao ve ark. (2017) ise miR-17-5p seviyesinin meme kanseri dokularında normal meme dokularına göre ifade seviyesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir (66). Leung ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada ZR-75-1 ile aynı moleküler sınıflamaya giren ancak adenokarsinom olan MDA-MB-361 hücre hattında miR-17-5p ve miR-20a-5p' nin ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (91). Yapılan çalışmalar dikkate alındığında bu miRNA' ların gen ifade seviyelerinin, farklı

moleküler ve histolojik alt yapılarından dolayı hücreden hücreye farklılık gösterdiği görülmektedir. Ayrıca bu çalışmada da görüldüğü gibi metastatik yetenek ve agresifliğin daha fazla olduğu hücre hatlarında bu miRNA' ların ifade seviyesinde artış olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada farklı morfolojik ve moleküler özelliklere sahip meme kanseri hücre hatlarında RNF2 geninin ifadenme seviyesi araştırılmıştır. Birçok kanser türünde gen ifade seviyesi arttığı için onkogenik davranan RNF2' nin, çalışmamızda kullandığımız dört farklı meme kanseri hücre hattının her birinde ifadenme seviyeleri saptanmıştır. Metastatik ve üçlü negatif meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 ve HER2 pozitif metastatik SK-BR-3 hücre hattında RNF2 geninin ifadesinin arttığı saptanmıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak RNF2' nin metastatik ve kötü prognozlu meme kanserlerinde daha fazla ifadelendiği sonucu çıkarılabilmektedir. Diğer hücre hatlarına göre daha az metastatik ve agresif olan MCF-7 ve histolojik özelliği ile diğerlerinden ayrılan ve invaziv olan ZR-75-1 hücre hattında ise bazal seviyede kalarak artış ya da azalış saptanmamıştır. Bosch ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada invaziv duktal karsinom dokularında histokimyasal yöntemlerle analiz edildiğinde ise RNF2' nin ifadesinin arttığı bildirilmiştir (8). Literatürle çelişen bu bulgunun ZR-75-1 hücre hattının histolojik olarak aynı olsa da insan dokuları ile farklı moleküler özellik taşıyabilme ihtimalinden kaynaklanabileceği yönünde değerlendirildi.

Birçok metastatik tümörde gen ifadesi artan ve tümör baskılayıcı genleri hedef alarak susturan epigenetik düzenleyici RNF2' nin bu çalışmada miRNA' lar ile hedeflenerek baskılanması durumunda gen ve protein ifade seviyesindeki değişimin araştırılması amaçlanmıştır. RNF2' yi hedeflediği bilinen miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p mimikleri hücre hatlarına transfekte edildiğinde RNF2 gen ifadesindeki değişim her hücre hattında farklı seviyede gözlenmiştir. miR-17-5p, MCF-7, SK-BR-3 ve ZR-75-1 hücre hatlarında RNF2 seviyesinde herhangi bir etki göstermemiştir. MDA-MB-231 hücre hattında ise 3,5 kat azaltmıştır. miR-20a-5p, MCF-7, SK-BR-3 ve ZR-75-1 hücre hatlarında RNF2 gen seviyesinde herhangi bir artış ya da azalış göstermemiştir. Bununla birlikte MDA-MB-231 hücre hattında ise RNF2 gen ifade seviyesini 7,3 kat azaltmıştır. miR-106b-5p ise SK-BR-3 ve ZR-75-1 hücre hatlarında RNF2 gen seviyesinde herhangi bir artış ya da azalış göstermezken; MCF-7 hücre hattında RNF2 gen seviyesinde 3,4 kat azalma ve MDA-MB-231 hücre hattında 2,4 kat azalma

göstermiştir. miRNA transfeksiyonu sonrası gen ifade seviyelerindeki değişimi değerlendirdiğimizde miR-17-5p ve miR-20a-5p' nin, RNF2 gen ifade seviyesini anlamlı bir şekilde azalttığı gözlenmiştir.

Protein seviyesindeki değişimlere bakıldığında ise miR-17-5p' nin MCF-7, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hattında RNF2 protein seviyesini azalttığı; ZR-75-1' de ise aksine artırdığı tespit edilmiştir. 20a-5p 'nin MCF-7' de etkilemediği, MDA-MB-231 hücre hattında azalttığı ve SK-BR-3 ve ZR-75-1' de ise aksine artırdığı tespit edilmiştir. 106b-5p' nin MCF-7, MDA-MB-231 ve SK-BR-3 hücre hatlarında RNF2 protein seviyesini azalttığı, ZR-75-1' de ise artırdığı bulundu.

RNF2' nin seçilen miRNA' larca hedeflenip gen ve protein düzeyinde azalmasını beklediğimiz bu çalışmada istatistiksel analizler dikkate alındığında hipotezimizi destekler yönde en anlamlı sonucu, MDA-MB-231 hücre hattında miR-20a-5p vermiştir. Bu miRNA' nın, MDA-MB-231 metastatik meme kanseri hücre hattında ifadesi artmıştır. RNF2 genini gen ve protein düzeyinde baskıladığı tespit edilmiştir. Nitekim yine meme kanserinde yapılan bir çalışmada miR-20a-5p' nin kanserleşmeyi tetikleyen HMGA2 genini hedefleyerek tümör baskılayıcı bir rol oynadığı bildirilmiştir (73). Yine Yu ve ark., (2018) tarafından yapılan çalışmada otofaji ilişkili gen ATG7' yi baskılayarak tümör proliferasyonunu baskılamıştır (75). Aksine Chen ve ark., (2016) tarafından yapılan çalışmada ise bir tümör baskılayıcı olan Smad4' ü baskılayarak invazyon ve metastazı uyardığı rapor edilmiştir (68). miRNA' lar kontrol ettiği genin tümör baskılayıcı ya da onkogenik özelliğine göre, tümör baskılayıcı ya da onkogenik özellik kazanmaktadırlar.

RNF2' yi hedefleyerek hipotezimizi destekleyen diğer miRNA ise miR-17-5p olmuştur. RNF2' yi gen ve protein seviyesinde baskıladığı gözlenen miR-17-5p' nin Fan ve ark., (2014) tarafından bazal-benzeri meme kanserinde yapılan çalışmada birçok pro-metastatik geni baskılayarak metastaz baskılayıcı rol oynadığı bildirilmiştir (64).

miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p mimiklerinin metastatik MDA-MB-231 hücre hatlarına verildiğinde RNF2' deki değişimler dikkate alınarak metastaz ve invazyon analizleri yapılmıştır. Boyden chamber ve yara iyileşme deneylerinin sonucuna göre miR-17-5p ve miR-20a-5p metastaz ve invazyonu baskımlarken; miR-106b-5p aksine

metastaz ve invazyonu baskılamadığı gözlenmiştir. miR-17-5p' nin bazal meme kanserinde metastatik baskılayıcı olarak rol aldığı Fan ve ark., (2014); miR-20a-5p' nin ise meme kanseri hücre hatlarında metastazı baskıladığı Zhao ve ark., (2018) tarafından yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (64, 73). miR-106b-5p ise MDA-MB-231 hücre hattında RNF2 gen seviyesinde anlamlı bir artış ya da azalmaya sebep olmamasına rağmen protein seviyesinde azalmaya sebep olduğu saptanmıştır. Bununla beraber metastaz ve invazyonu baskılamamıştır. Bu sonuçlar neticesinde miR-106b-5p' nin RNF2 mRNA' sını baskılayarak proteine çevirimini engellediği ve farklı yollara etki ederek metastaz ve invazyonu baskılamadığı sonucuna ulaşılabilir. Nitekim literatür bulguları da sonucumuzu desteklemekle birlikte miR-106b-5p' nin metastazı uyarıcı etkiye sahip olduğu birçok kanser hücre hattında gösterilmiştir. Willemijne ve ark., (2017) tarafından yapılan çalışmada akciğere metastaz yapan meme kanseri olgularında miR-106b-5p' nin ifadelene seviyesinde artış olduğu bildirilmiştir. Yine Shi ve ark., (2016) tarafından yapılan çalışmada hepatosellüler karsinomda miR-106b-5p' nin metastaz ve invazyonu tetikleyip kök hücre benzeri özelliklerin uyarılmasına ve epitelial-mezenkimal geçişin tetiklenmesine yol açtığı rapor edilmiştir (83).

E3 ligaz aktivitesi ile ubiquitinasyondan sorumlu epigenetik baskılayıcı olan RNF2' nin birçok metastatik kanser türünde ifadesinin arttığı ve tümör baskılayıcı genleri hedefleyip susturması ile onkogenik karakter kazandığı yapılan birçok çalışma ile ortaya konmuştur (6, 8, 11). Metastatik meme kanseri hücre hatlarında RNF2 gen ifade seviyesinin belirlenmesi, bu genin miRNA' lar ile hedeflenmesi ve baskılanması sonucu metastaz ve invazyona etkisinin araştırılması çalışmamızın amacını oluşturmuştur. Bu amaç doğrultusunda RNF2 genini hedeflediğini biyoinformatik olarak tespit ettiğimiz miR-17-5p, miR-20a-5p ve miR-106b-5p' nin bu geni baskılayacağı yönde hipotezinden yola çıkılmıştır.

Özet olarak elde edilen sonuçlar neticesinde;

- i. RNF2' nin metastatik meme kanseri hücre hattında ifade seviyesinin arttığı,
- ii. Metastatik meme kanseri hücre hattında miR-20a-5p ve miR-17-5p' nin RNF2' yi hedefleyerek gen ve protein düzeyinde ifade seviyesini azalttığı,
- iii. RNF2 seviyesindeki azalışla ilişkili olarak bu miRNA' ların metastaz ve invazyonu baskıladığı tespit edilmiştir.

Bu çalışma ile işleyiş mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olan RNF2' nin meme kanserindeki rolü ortaya konmaya çalışılmıştır. Aynı zamanda karmaşık moleküler alt yapıya sahip meme kanseri ile ilgili verilere yeni bir bilgi kazandırılmış olup; hastaların yaşam kalitesinin artırılması ve kişiye özel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi yönünde ilerleyen klinik çalışmalara yeni bir veri sunulmuştur.

Çalışmada analiz edilmiş olan miRNA' lar ile RNF2 arasındaki etkileşimin daha ayrıntılı inceleneceği, RNF2' nin hangi yolları etkilediğinin araştırılacağı, RNF2' nin hangi kanserde bir biyobelirteç olarak rol alıp almadığının araştırılacağı yönünde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



6. KAYNAKLAR

1. Güllü İH ve Akalın İ. Metastaz Biyolojisi. Üroonkoloji Bülteni. 2005;4, 16-19.
2. Eliyatkin N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk. J Breast Health 2015;11: 59-66.
3. Vidal M. Role of polycomb proteins Ring1A and Ring1B in the epigenetic regulation of gene expression. Int J Dev Biol. 2009;53(2-3):355-70.
4. Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. Cell Stem Cell. 2010;3;7(3):299-313.
5. Rai K, Akdemir KC, Kwong LN, Fiziev P, Wu CJ, Keung EZ, Sharma S, Samant NS, Williams M, Axelrad JB, Shah A, Yang D, Grimm EA, Barton MC, Milton DR, Heffernan TP, Horner JW, Ekmekcioglu S, Lazar AJ, Ernst J, Chin L. Dual Roles of RNF2 in Melanoma Progression. Cancer Discov. 2015;5(12):1314-27.
6. Wei M, Jiao D, Han D, Wu J, Wei F, Zheng G, Guo Z, Xi W, Yang F, Xie P, Zhang L, Yang AG, Wang H, Qin W, Wen W. Knockdown of RNF2 induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells through the upregulation of TXNIP. Oncotarget. 2017;8(3):5323-5338.
7. Li XD, Chen SL, Dong P, Chen JW, Wang FW, Guo SJ, Jiang LJ, Zhou FJ, Xie D, Liu ZW. Overexpression of RNF2 Is an Independent Predictor of Outcome in Patients with Urothelial Carcinoma of the Bladder Undergoing Radical Cystectomy. Sci Rep. 2016;12;6:20894.
8. Bosch A, Panoutsopoulou K, Corominas JM, Gimeno R, Moreno-Bueno G, Martín-Caballero J, Morales S, Lobato T, Martínez-Romero C, Farias EF, Mayol X, Cano A, Hernández-Muñoz I. The Polycomb group protein RING1B is overexpressed in ductal breast carcinoma and is required to sustain FAK steady state levels in breast cancer epithelial cells. Oncotarget. 2014;30;5(8):2065-76.
9. Chen S, Chen J, Zhan Q, Zhu Y, Chen H, Deng X, Hou Z, Shen B, Chen Y, Peng C. H2AK119Ub1 and H3K27Me3 in molecular staging for survival prediction of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. Oncotarget. 2014;5(21):10421-33.
10. Li XQ, He WP, Hou WH, Chen JW, Fan RR, Yuan LJ, Yang GP, Cai MY, Chen L, Li J, He SY, Xie D, Yang GF, You ZS. Overexpression of RNF2 is positively

- associated with ovarian carcinoma aggressiveness and indicative of poor patient survival. *Oncotarget*. 2016; doi: 10.18632/oncotarget.8975.
11. Qu C, Qu Y. Down-regulation of salt-inducible kinase 1 (SIK1) is mediated by RNF2 in hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*. 2017;10;8(2):3144-3155.
 12. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*. 2010; 38, No 1, 113-120.
 13. Bayraktar R, Pichler M, Kanlikilicer P, Ivan C, Bayraktar E, Kahraman N, Aslan B, Oguztuzun S, Ulasli M, Arslan A, Calin G, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. MicroRNA 603 acts as a tumor suppressor and inhibits triple-negative breast cancer tumorigenesis by targeting elongation factor 2 kinase. *Oncotarget*. 2017;doi: 10.18632/oncotarget.14264.
 14. Fan M, Sethuraman A, Brown M, Sun W, Pfeiffer LM. Systematic analysis of metastasis-associated genes identifies miR-17-5p as a metastatic suppressor of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;146(3):487-502.
 15. Huang D, Bian G, Pan Y, Han X, Sun Y, Wang Y, Shen G, Cheng M, Fang X, Hu S. MiR-20a-5p promotes radio-resistance by targeting Rab27B in nasopharyngeal cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2017;17:32.
 16. Lu J, Wei JH, Feng ZH, Chen ZH, Wang YQ, Huang Y, Fang Y, Liang YP, Cen JJ, Pan YH, Liao B, Chen WF, Chen W, Luo JH. miR-106b-5p promotes renal cell carcinoma aggressiveness and stem-cell-like phenotype by activating Wnt/ β -catenin signalling. *Oncotarget*. 2017;8(13):21461-21471.
 17. Xiang W, He J, Huang C, Chen L, Tao D, Wu X, Wang M, Luo G, Xiao X, Zeng F, Jiang G. miR-106b-5p targets tumor suppressor gene SETD2 to inactivate its function in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(6):4066-79.
 18. Zhang J, Li SF, Chen H, Song JX. MiR-106b-5p Inhibits Tumor Necrosis Factor- α -induced Apoptosis by Targeting Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10 in Vascular Endothelial Cells. *Chin Med J (Engl)*. 2016;129(12):1406-12.
 19. Chen Y, Cao XY, Li YN, Qiu YY, Li YN, Li W, Wang H2. Reversal of cisplatin resistance by microRNA-139-5p-independent RNF2 downregulation and MAPK inhibition in ovarian cancer. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2018;doi: 10.1152/ajpcell.00283.2017.
 20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

21. Tanic M. MicroRNA expression profiles in hereditary breast cancer. 2012, Autonomous University of Madrid, Faculty of Medicine, Doctoral thesis, 217 pages, Spain, (Dr. Javier Benítez Ortiz and Dr. Beatriz Martínez-Delgado).
22. Hunter KW, Crawford NPS and Alsarraj J. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Research* 2008; doi:10.1186/bcr1988.
23. Alizadeh AM, Shiri S and Farsineja S. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumor Biol.* 2014; doi 10.1007/s13277-014-2421-z.s
24. Özmen V, Cantürk Z, Çelik V, Güler N, Kapkaç M, Koyuncu A (Ed.). *Meme Hastalıkları Kitabı*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2012: s. 3-10.
25. Kuzey GM (Ed.). *Temel Patoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi; 2007: s. 705-708.
26. Sarkar S and Mandal M (Ed.). *Breast Cancer: Classification Based on Molecular Etiology Influencing Prognosis and Prediction*. In: Gündüz M. *Breast cancer*. China: IntechOpen; 2011; p. 70-84.
27. Aupperlee M and Haslam SZ. Differential Hormonal Regulation and Function of Progesterone Receptor Isoforms in Normal Adult Mouse Mammary Gland. *Endocrinology*. 2007;148(5):2290–2300.
28. Nitze LM, Galsgaard ED, Din N, Lund VL, Rasmussen BB, Berchtold MW, Christensen L, Panina S. Reevaluation of the proposed autocrine proliferative function of prolactin in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 142(1):31-44.
29. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of cancer*. 2016; (7):1281-1294.
30. National Cancer Institute. 2018. <https://www.cancer.gov/>.
31. Türk Halk Sağlığı Kurumu. 2018. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/>.
32. Yılmaz S ve Atak N. Meme kanseri riskinin beslenme ile ilişkili faktörler açısından değerlendirilmesi. *Turk J Public Health.* 2014;12(1):51-60.
33. Hortobagyi GN. *Breast*. American Joint Committee on Cancer. 2014;589-636.
34. Holliday DL and Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research.* 2011;13:215.
35. Xiao L, Tao YG, Li L, Cao Y. Polycomb group proteins and their roles in carcinogenesis. *Chinese Science Bulletin.* 2012; 57(18):2259-2264.
36. Brockdorff N. Polycomb complexes in X chromosome inactivation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017;5;372(1733).
37. Illingworth RS, Moffat M, Mann A. The E3 ubiquitin ligase activity of RING1B is not essential for early mouse development. *Genes Dev.* 2016;29:1897-1902.

38. Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(10):1147-55.
39. Xiao X, Li Z, Liu H, Su J, Wang F, Wu X, Liu H, Wu Q, Zhang Y. Genome-wide identification of Polycomb target genes in human embryonic stem cells. *Gene.* 2013;518(2):425-30.
40. Chittock EC, Latwiel S, Miller T and Müller CW. Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochemical Society Transactions.* 2017; 45 193–205.
41. Wang W, Qin JJ, Voruganti S, Nag S, Zhou J, Zhang R. Polycomb Group (PcG) Proteins and Human Cancers: Multifaceted Functions and Therapeutic Implications. *Med Res Rev.* 2015;35(6):1220-67.
42. Rao PS, Satelli A, Zhang S, Srivastava SK, Srivenugopal KS, Rao US. RNF2 is the target for phosphorylation by the p38 MAPK and ERK signaling pathways. *Proteomics.* 2009;9(10):2776-87.
43. Choi D and Kang S. Identification and characterization of RNF2 response elements in human kidney cells. *Mol Cells.* 2011;31(3):247-53.
44. Xia P, Wang S, Huang G, Du Y, Zhu P, Li M, Fan Z. RNF2 is recruited by WASH to ubiquitinate AMBRA1 leading to downregulation of autophagy. *Cell Res.* 2014;24(8):943-58.
45. Wen W, Peng C, Kim MO, Ho Jeong C, Zhu F, Yao K, Zykova T, Ma W, Carper A, Langfald A, Bode AM, Dong Z. Knockdown of RNF2 induces apoptosis by regulating MDM2 and p53 stability. *Oncogene.* 2014;23;33(4):421-8.
46. Chen J, Xu H, Zou X, Wang J, Zhu Y, Chen H, Shen B, Deng X, Zhou A, Chin YE, Rauscher FJ, Peng C, Hou Z. Snail recruits Ring1B to mediate transcriptional repression and cell migration in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2014;15;74(16):4353-63.
47. Black JC, Whetstone JR. RNF2 E3 or Not to E3: Dual Roles of RNF2 Overexpression in Melanoma. *Cancer Discov.* 2015;5(12):1241-3.
48. Zhang J, Sun Z, Han Y, Yao R, Yue L, Xu Y, Zhang J. Rnf2 knockdown reduces cell viability and promotes cell cycle arrest in gastric cancer cells. *Oncol Lett.* 2017;13(5):3817-3822.
49. Yang XX, Ma M, Sang MX, Wang XX, Song H, Liu ZK, Zhu SC. Radiosensitization of esophageal carcinoma cells by knockdown of RNF2 expression. *Int J Oncol.* 2016;48(5):1985-96.

50. Bhatnagar S, Gazin C, Chamberlain L, Ou J, Zhu X, Tushir JS, Virbasius CM, Lin L, Zhu LJ, Wajapeyee N, Green MR. TRIM37 is a new histone H2A ubiquitin ligase and breast cancer oncoprotein. *Nature*. 2014;4:516(7529):116-20.
51. Chitale S, Richly H. Nuclear organization of nucleotide excision repair is mediated by RING1B dependent H2A-ubiquitylation. *Oncotarget*. 2017;9;8(19):30870-30887.
52. Ismail IH, McDonald D, Strickfaden H, Xu Z, Hendzel MJ. A small molecule inhibitor of polycomb repressive complex 1 inhibits ubiquitin signaling at DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*. 2013;13;288(37):26944-54.
53. Maezawa S, Hasegawa K, Yukawa M, Sakashita A, Alavattam KG, Andreassen PR, Vidal M, Koseki H, Barski A, Namekawa SH. Polycomb directs timely activation of germline genes in spermatogenesis. *Genes Dev*. 2017;15;31(16):1693-1703.
54. Liu S, Jiang M, Wang W, Liu W, Song X, Ma Z, Zhang S, Liu L, Liu Y, Cao X. Nuclear RNF2 inhibits interferon function by promoting K33-linked STAT1 disassociation from DNA. *Nat Immunol*. 2018;19(1):41-52.
55. Bischoff A. miRNAs in control of oncogenic signaling in breast cancer cells. 2014. Stuttgart University, Institute of Cell Biology and Immunology Doctoral Thesis. p.136 Germany (Prof. Dr. Monilola Olayioye).
56. Bartel DP. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009; 136(2): 215–233.
57. MacFarlane AN and Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*. 2010; 11, 537-561 537.
58. Lehmann TP, Korski K, Gryczka R, Ibbs M, Thieleman A, Grodecka-Gazdecka S, Jagodziński PP. Relative levels of let-7a, miR-17, miR-27b, miR-125a, miR-125b and miR-206 as potential molecular markers to evaluate grade, receptor status and molecular type in breast cancer. *Mol Med Rep*. 2015;12(3):4692-702.
59. Yu Z, Xu Z, Disante G, Wright J, Wang M, Li Y, Zhao Q, Ren T, Ju X, Gutman E, Wang G, Addya S, Li T, Xiang Z, Wang C, Yang X, Yang X, Pestell R. miR-17/20 sensitization of breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis requires Akt1. *Oncotarget*. 2014; 28;5(4):1083-90.
60. Küçük hüseyin Ö ve Öztürk O. miRNAlar ve Meme Kanserindeki Etkileri. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2013;3(5):13-24.7

61. Fu SW, Chen L, Man YG. miRNA Biomarkers in Breast Cancer Detection and Management. *J Cancer*. 2011;24;2:116-22.
62. Concepcion CP, Bonetti C, Ventura A. The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer J*. 2012;18(3):262-7.
63. Li H, Bian C, Liao L, Li J, Zhao RC. miR-17-5p promotes human breast cancer cell migration and invasion through suppression of HBP1. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126:565–575.
64. Fan M, Sethuraman A, Brown M. Systematic analysis of metastasis-associated genes identifies miR- 17-5p as a metastatic suppressor of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 146(3): 487–502.
65. Yang F, Li Y, Xu L, Zhu Y, Gao H, Zhen L, Fang L. miR-17 as a diagnostic biomarker regulates cell proliferation in breast cancer. *Onco Targets and Therapy*. 2017;10 543-550.
66. Liao XH, Xiang Y, Yu C, Li JP, Li H, Nie Q, Hu P, Zhou J, Zhang C. STAT3 is required for MiR-17-5p-mediated sensitization to chemotherapy-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8, (No. 9), pp: 15763-15774.
67. Bobbili MR, Mader RM, Grillari J, Dellago H. OncomiR-17-5p: alarm signal in cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(41):71206-71222.
68. Chen Y, Wang X, Cheng J, Wang Z, Jiang T, Hou N, Liu N, Song T, Huang C. MicroRNA-20a-5p targets RUNX3 to regulate proliferation and migration of human hepatocellular cancer cells. *Oncol Rep*. 2016;36(6):3379-3386.
69. Pu Y, Yi Q, Zhao F, Wang H, Cai W, Cai S. MiR-20a-5p represses multi-drug resistance in osteosarcoma by targeting the KIF26B gene. *Cancer Cell Int*. 2016;5;16:64.
70. Cheng D, Zhao S, Tang H, Zhang D, Sun H, Yu F, Jiang W, Yue B, Wang J, Zhang M, Yu Y, Liu X, Sun X, Zhou Z, Qin X, Zhang X, Yan D, Wen Y, Peng Z. MicroRNA-20a-5p promotes colorectal cancer invasion and metastasis by downregulating Smad4. *Oncotarget*. 2016;19;7(29):45199-45213.
71. Ozcan O, Kara M, Yumrutas O, Bozgeyik E, Bozgeyik I, Celik OI. MTUS1 and its targeting miRNAs in colorectal carcinoma: significant associations. *Tumor Biol*. 2016; 37:6637-6645.
72. Huang D, Bian G, Pan Y, Han X, Sun Y, Wang Y, Shen G, Cheng M, Fang X, Hu S. MiR-20a-5p promotes radio-resistance by targeting Rab27B in nasopharyngeal cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2017; 1;17:32.

73. Zhao W, Geng D, Li S, Chen Z, Sun M. LncRNA HOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer. *Cancer Med.* 2018;7(3):842-855.
74. Zhang L, Shan X, Wang J, Zhu J, Huang Z, Zhang H, Zhou X, Cheng W, Shu Y, Zhu W, Liu P. A three-microRNA signature for lung squamous cell carcinoma diagnosis in Chinese male patients. *Oncotarget.* 2017;28;8(49):86897-86907.
75. Yu Y, Zhang J, Jin Y, Yang Y, Shi J, Chen F, Han S, Chu P, Lu J, Wang H, Guo Y, Ni X. MiR-20a-5p suppresses tumor proliferation by targeting autophagy-related gene 7 in neuroblastoma. *Cancer Cell Int.* 2018 ;4;18:5.
76. Lu J, Wei JH, Feng ZH, Chen ZH, Wang YQ, Huang Y, Fang Y, Liang YP, Cen JJ, Pan YH, Liao B, Chen WF, Chen W, Luo JH. miR-106b-5p promotes renal cell carcinoma aggressiveness and stem-cell-like phenotype by activating Wnt/ β -catenin signalling. *Oncotarget.* 2017;28;8(13):21461-21471.
77. Xiang W, He J, Huang C, Chen L, Tao D, Wu X, Wang M, Luo G, Xiao X, Zeng F, Jiang G. miR-106b-5p targets tumor suppressor gene SETD2 to inactive its function in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2015;28;6(6):4066-79.
78. Zhang J, Li SF, Chen H, Song JX. MiR-106b-5p Inhibits Tumor Necrosis Factor- α -induced Apoptosis by Targeting Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10 in Vascular Endothelial Cells. *Chin Med J (Engl).* 2016;129(12):1406-12.
79. Li N, Liu Y, Miao Y, Zhao L, Zhou H, Jia L. MicroRNA-106b Targets FUT6 to Promote Cell Migration, Invasion, and Proliferation in Human Breast Cancer. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology.* 2016;68,9:764–775.
80. Li N, Miao Y, Shan Y, Liu B, Li Y, Zhao L, Jia L. miR106b and miR-93 regulate cell progression by suppression of PTEN via PI3K/Akt pathway in breast cancer. *Cell Death and Disease.* 2017;8:1-11.
81. Wei K, Pana C, Yaob G, Liuc B, Mac T, Xia Y, Jianga W, Chen L, Chen Y. MiR-106b-5p Promotes Proliferation and Inhibits Apoptosis by Regulating BTG3 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017;44:1545-1558.
82. Dong X, Hu X, Chen J, Hu D, Chen LF. BRD4 regulates cellular senescence in gastric cancer cells via E2F/miR-106b/p21 axis. *Cell Death and Disease.* 2018; 9:203.

83. Shi C, Huang F, Gu X, Zhang M, Wen J, Wang X, You L, Cui X, Ji C, Guo X. Adipogenic miRNA and meta-signature miRNAs involved in human adipocyte differentiation and obesity. *Oncotarget*. 2016;7(26):40830-40845.
84. Esteves JV, Enguita FJ, Machado UF. MicroRNAs-Mediated Regulation of Skeletal Muscle GLUT4 Expression and Translocation in Insulin Resistance. *Journal of Diabetes Research*. 2017; ID 7267910, 11 pages.
85. Baysal K, Serhatlı M, Adıgüzel Z, ve ark. İleri moleküler hücre biyolojisi teknikleri eğitimi, TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli, 12-16 Mayıs 2008; 5-14.
86. Ovalı E, Uçar F. Hematolojide uygulamalı hücre teknikleri kurs kitabı. Trabzon, 2003; 217: 7-16 .
87. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Isolating cells and growing them in culture, Walter P. (Eds.). *Molecular Biology of the Cell*, New York Garland Science, 2002; 32-50.
88. Attar A. Gen terapisi yöntemleri: fiziksel ve kimyasal metotlar. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2017; 74(1): 103-112.
89. Stephenson FH. *Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory*. 2nd Ed. 2010, London; Elsevier.
90. Buckingham L. *Molecular Diagnostics*. 2nd Ed. 2007, Oxford.
91. Leung CM, Chen TW, Li SC, Ho MR, Hu LY, Liu WS, Wu TT, Hsu PC, Chang HT, Tsai KW. MicroRNA expression profiles in human breast cancer cells after multifraction and single-dose radiation treatment. *Oncol Rep*. 2014;31(5):2147-56.
92. Chan HL, Beckedorff F, Zhang Y, Huidobro J, Jiang H. Polycomb complexes associate with enhancers and promote oncogenic transcriptional programs in cancer through multiple mechanisms. *Nature communications*. 2018; 9:3377.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Gaziantep’te doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gaziantep’te tamamladı. Lisans eğitimini 2005 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Bölümü’nde, yüksek lisans eğitimini 2014 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde tamamlamıştır. Yine 2014 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda doktora öğrenimine başlamıştır. İngilizce bilmektedir.

