



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MEME KANSER HÜCRELERİNDE SIK1 VE SIK2
BAĞLAMINDA METFORMİNİN ANTİKANSER ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eser YENEN

**Samsun
Temmuz – 2016**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MEME KANSER HÜCRELERİNDE SIK1 VE SIK2
BAĞLAMINDA METFORMİNİN ANTİKANSER ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eser YENEN

**Danışman
Prof. Dr. Abdulkerim BEDİR**

**Samsun
Temmuz – 2016**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

..... tarafından Yrd. Doç. Dr. /Doç. Dr. /Prof. Dr.
..... Danışmanlığında hazırlanan
..... başlıklı bu
çalışma jürimiz tarafından /..... /..... tarihinde yapılan sınav ile
..... Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS / DOKTORA Tezi olarak
kabul edilmiştir.

Başkan :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....

(İmza Boşluğu, 2 satır)
Unvanı Adı SOYADI
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince biyokimyasal tekniklerin yanı sıra hipotez kurmayı, öğrendiğim bilgileri hayata uygulamayı öğreten, hayatımın zorlu anlarında bana yol gösteren, tez dönemi süresince her türlü desteğini esirgemeyen ve hakkını ödeyemem diyebileceğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. Abdülkerim BEDİR'e teşekkür ederim.

İşe başladığım ilk günden itibaren manevi desteğini esirgemeyip moral veren, engin tecrübelerinden ve bilgisinden her daim faydalandığım değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali OKUYUCU'ya teşekkür ederim.

Laboratuvarda çalışırken her zaman güzel enerjisiyle beni teşvik eden, engin tecrübelerinden ve bilgisinden her daim faydalandığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Osman SALIŞ'a teşekkür ederim.

Çok değerli hocalarım Prof. Dr. Nermin KILIÇ'a ve Doç. Dr. Nagah A. A. MOHAMMED'e teşekkür ederim.

Laboratuvar ve tez yazım sürecinde desteğini asla esirgemeyen, onlarla birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım, Araş. Gör. Sinan ÜRKMEZ, Dr. Yasemin SEZİKLİ ve Doktora Öğr. Dilara ALİYEVA'ya teşekkür ederim.

Bana sorumluluk bilincini aşıl原因an, disiplinli ve özverili davranmayı öğreten her zaman yanımda olduğunu hissettiğim merhum babama, tüm zorluklara birlikte göğüs gerdiğimiz, her koşulda yanımda olan anne ve baba olmanın yanı sıra benim en yakın arkadaşım olan canımdan çok sevdiğim anneme, birlikte gülüp, birlikte ağladığım benden ve ailemden hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, her anımda yanımda olup, yanımda olacağını bildiğim çok sevdiğim hayat arkadaşım Kenan ÇAKMAK'a, eğitim-öğretim hayatım boyunca mesleği olan öğretmenliği bana aşıl原因an, bana yol gösteren ikinci annem diyebileceğim canım ablama, bir baba, abi yerine koyduğum çok sevdiğim enişteme, tez dönemi süresince benden başarı öpücüklerini esirgemeyen biricik yeğenim Serra'ya teşekkür ederim.

ÖZET

MEME KANSER HÜCRELERİNDE SIK1 VE SIK2 BAĞLAMINDA METFORMİNİN ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Meme kanseri, kadınlarda kanserden ölüm nedenleri arasında önemli bir yere sahiptir. Metformin kullanımının düşük kanser riski ile ilişkisi epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Metforminin bu etkisini LKB1 üzerinden AMPK aktivasyonunu düzenleyerek gösterdiği düşünülmektedir. SIK1 ve SIK2 enzimleri de AMPK-ilişkili kinazlar grubunda yer alıp LKB1 tarafından fosforilasyon yoluyla aktive edilmektedirler. Bu genlerin ürünleri TGF- β -smad sinyal yolunu negatif olarak etkilemektedir. Biz de metforminin LKB1 üzerinden SIK1 ve SIK2 gen ekspresyonunu artırmak suretiyle CREB aktivitesini baskılayarak ve/veya TGF- β -Smad sinyal yolunu etkilediğini düşünmekteyiz. Bu nedenle, invaziv ve non-invaziv MCF-7 hücrelerinde metforminin SIK1 ve SIK2 genleri üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metot: Uygun ortamda kültüre edilen MCF-7 hücrelerine 1.25 mM, 2.5 mM ve 20 mM metformin ve invaziv MCF-7 hücreleri oluşturmak için bu dozların TGF- β ile kombinasyonları uygulandı. 24 saat sonra hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. GAPDH referans gen olmak üzere SIK1 ve SIK2 genleri için Q-PCR yapıldı.

Bulgular: Non-invaziv MCF-7 hücrelerine 1,25 mM, 2,5 mM, ve 20 mM Metformin uygulandığında SIK1 gen ekspresyonunda sırasıyla 1,359 (P=0,237), 1,772 (P=0,011) ve 3,375 (P=0,001) kat artış görüldü. Bu dozlar SIK2 gen ekspresyonunda ise sırasıyla 1,485 (P=0,079), 1,561 (P=0,017), 3,260 (P=0,001) kat artışa neden oldu. İnvaziv MCF-7 hücrelerinde ise bu dozlar SIK1 gen ekspresyonunda sırasıyla 3,470 (P=0,004), 3,655 (P=0,001), 3,965 (P=0,001) kat, SIK2 gen ekspresyonunda ise sırasıyla 1,860 (P=0,006), 2,358(P=0,006), 3,488 (P=0,007) kat anlamlı bir artışa neden oldu.

Sonuç: SIK gen ekspresyonu TGF- β reseptör sinyalinin bir negatif regülatörü olarak artış göstermektedir. Metformin hem non-invaziv hem de invaziv MCF-7 hücrelerinde doza bağımlı olarak SIK1 ve SIK2 gen ekspresyonunu artırmıştır. Ancak her iki hücrede de SIK1 geni SIK2'ye göre metforminden daha fazla etkilenmiştir. Bu sonuçlar ışığında TGF- β sensitif farklı kanser türlerinde metforminin SIK1 ve SIK2 genleri üzerine etkisinin araştırılması kanser tedavisi için yeni kapılar açacaktır.

Anahtar Kelimeler: MCF-7; TGF- β ; metformin; SIK1; SIK2

Eser YENEN, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Temmuz-2016

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTICANCER EFFECT OF METFORMIN IN BREAST CANCER CELLS IN RELATION TO SIK1 AND SIK2

Aim: Breast cancer has a significant place among the causes of death in cancer diagnosed women. The relationship between Metformin usage and low cancer risk has been shown in epidemiological studies. This effect of Metformin is considered via regulating the activation of AMPK through LKB1. AMPK-related kinase enzymes SIK1 and SIK2 are activated via phosphorylation by LKB1. These gene products negatively affect the TGF- β -Smad signaling pathway. We consider that metformin suppresses activity of CREB through LKB1 by increasing the SIK1 and SIK2 gene expression and/or affecting TGF- β -Smad signaling pathway. Therefore, we aimed to investigate the effects of metformin on SIK1 and SIK2 genes in invasive and non-invasive MCF-7 cells.

Material and Method: 1.25 mM, 2.5 mM and 20 mM Metformin and TGF- β combination of these doses to form invasive formation, were administered to properly cultured MCF-7 cells. After 24 hours, RNA was isolated from cells and then cDNA synthesis was performed. Q-PCR was performed for SIK1 and SIK2 genes with GAPDH reference gene.

Results: After 1.25 mM, 2.5 mM, and 20 mM Metformin administration to non-invasive MCF-7 cells, SIK1 gene expression respectively 1.359 (P=0.237), 1.772 (P=0.011) and 3.375 (P=0.001) fold increase was observed. For SIK2 gene expression, respectively 1.485 (P=0.079), 1.561 (P=0.017), 3.260 (P=0.001) fold increase was observed. That dose in invasive MCF-7 cells for SIK1 gene expression respectively 3.470 (P=0.004), 3.655 (P=0.001), 3.965 (P=0.001) fold, for SIK2 gene expression respectively 1.860 (P=0.006), 2.358(P=0.006), 3.488 (P=0.007) fold significant increase was detected.

Conclusion: SIK gene has showed increase as a negative regulator of TGF- β receptor signaling. Metformin has increased to SIK1 and SIK2 gene expression in dose-dependent manner in both non-invasive and invasive MCF-7 cells. However, the SIK1 gene is influenced more than SIK2 by metformin in each cell. According these results, investigation of the effects of metformin on SIK1 and SIK2 genes in different types of TGF- β sensitive cancer will open new ways for treating cancer.

Keywords: MCF-7; TGF- β ; metformin; SIK1; SIK2

Eser YENEN, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, July-2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre
µm	: mikrometre
aa	: aminoasit
ACACB	: acetyl-CoA carboxylase beta
ADP	: adenosine diphosphate
ALK5	: activin A receptor type II-like kinase
AMPK	: 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase/ 5' AMP-activated protein kinase
ATP	: adenosine triphosphate
BCL-2	: B-cell lymphoma 2
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bp	: Base pair
BRSK	: brain selective kinase
BRSK1	: brain selective kinase 1
BRSK2	: brain selective kinase 2
C.I.	: Confidens İntervale, Güven Aralığı
C	: Sitozin
CAB39/MO25	: Calcium Binding Protein 39
CaMK1	: Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase I
CAMKK1	: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
CDK	: Cyclin-dependent kinase
cDNA	: Komplementer DNA
COX-2	: Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2/Cyclooxygenase 2
CP	: Crossing point
CREB	: cAMP response element-binding protein
CRTC1	: CREB Regulated Transcription Coactivator 2
Ct	: Crossing threshold
DAP3	: Death associated protein 3

dH₂O	: distile su
DMSO	: Dimethylsulfoxid
EMT	: Epitelyal mezenkimal transisyon
FBS	: Fetal Bovine Serum
g	: gram
G	: Guanin
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GSK3-beta	: Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
HDAC4	: Histone Deacetylase 4
HDAC5	: Histone Deacetylase 5
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2
HIF-1	: Hypoxia inducible factor 1
IRS1	: Insulin receptor substrate 1
kDa	: kilodalton
LKB1/STK11	: Serine/Threonine Kinase 11
m	: kütle
M	: Molarite
M_a	: moleküler ağırlık
MAP3K7	: Mitogen-activated protein 3 kinase 7
MARK	: Microtubule affinity regulating kinase'ların
MARK1	: Microtubule affinity regulating kinase 1
MARK2	: Microtubule affinity regulating kinase 2
MARK3	: Microtubule affinity regulating kinase 3
MARK4	: Microtubule affinity regulating kinase 4
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7
MELK	: Maternal embryonic leucine zipper kinase
mg	: miligram
ml	: mililitre
mM	: milimolar
mRNA	: Messenger RNA
MSK	: Myocardial SNF1-like kinase
mTOR	: Mammalian Target Of Rapamycin

mTORC1	: Mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1
N	: mol
ng	: nanogram
NSF	: N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor
NUAK1	: NUAKE family SNF1-like kinase 1
NUAK2	: NUAKE Family, SNF1-Like Kinase, 2
P	: Anlamlılık değeri
p21	: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1/ CDK-interacting protein 1
p53/TP53	: Tümör protein 53
p85	: Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit
Par1	: Partitioning defective gene 1
PBS	: Phosphat Buffer Salin
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PGC-1α	: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α
PKA	: Protein kinase A
PP2A	: Protein fosfataz 2A
PPME1	: Protein Phosphatase Methylesterase 1
PRKACA	: Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha
qPCR	: Quantitative PCR
REST	: Relative expression software tool
RNA	: Ribonkleik asit
R-Smad	: Receptor-regulated SMAD
RT-PCR	: Real Time-Polymerase Chain Reaction
SADK	: Synapses of amphids-deficient kinase
Ser15	: Serin 15
Ser-186	: Serin 186
Ser392	: Serin 392
SIK	: Salt inducible kinase
SIK1	: Salt-inducible kinase 1
SIK2	: Salt-inducible kinase 2
SIK3	: Salt-inducible kinase 3
Smad2	: SMAD Family Member 2

Smad3	: SMAD Family Member 3
Smad4	: SMAD Family Member 4
Smad7	: SMAD Family Member 7
Smurf2	: SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 2
Snail1	: Snail Family Zinc Finger 1
snf1lk	: Sucrose non-fermenting like kinase 1
SNRK	: Sucrose non-fermenting protein-related kinase
SREBF1	: Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1
STRADA	: STE20-related adapter-alpha
STRADB	: STE20-bağımlı kinaz adaptör beta
TAB2	: TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2
tER	: Transisyonel endoplazmik retikulum
TGFR1	: Transforming growth factor, beta receptor I
TGFR2	: Transforming growth factor, beta receptor II
TGF-β	: Transforming Growth Factor-Beta
Thr-175	: Treonin 175
Thr-182	: Treonin 182
Tm	: Erime derecesi
TORC/ CRTC	: CREB Regulated Transcription Coactivator
TORC2/ CRTC2	: CREB Regulated Transcription Coactivator 2
TSC2	: Tuberous sclerosis complex 2
Twist	: Twist Family BHLH Transcription Factor
UBA	: Ubiquitin-associated domain
UP	: Upregülasyon
UPL	: Universal Probe Library
V	: hacim
YWHAQ	: Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide
Zeb1	: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
Zeb2	: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2

İÇİNDEKİLER	
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser.....	4
2.1.1 Meme Kanseri	4
2.2. TGF- β Smad Sinyal Yolağı ve Karsinogenez İlişkisi	6
2.3. LKB1 Sinyal Yolağı.....	8
2.3.1. LKB1'in Fonksiyonları	9
2.3.2. LKB1–SIK Sinyal Yolağı.....	12
2.4. Salt Inducible Kinase (SIK)	13
2.4.1. Salt Inducible Kinase 1 (SIK1)	13
2.4.2. Salt Inducible Kinase 2 (SIK2)	22
2.5.1. Metformin ve Klinikteki Rolü	32
2.6.2. Metforminin Kanser Tedavisindeki Yeri	34
3. MATERYAL – METOT	36
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	36
3.2. Kullanılan Kimyasallar	37
3.3. MCF-7 Hücre Kültürü.....	38
3.3.1. Hücre Kültür Solüsyonları.....	38
3.3.2. MCF-7 Hücre Kültür Protokolleri.....	41
3.4. MCF-7 hücrelerinde RNA izolasyonu.....	42
3.5. Gen Ekspresyon Çalışması	47
3.5.1. MCF-7 Hücre RNA izolatlarından cDNA sentezi	47
3.5.2. Biyoinformatik analiz.....	48
3.5.3. Q-PCR Çalışması	51
3.6. Komparatif Ct Metodu ile Gen Ekspresyon Analizi	55
4. BULGULAR	57
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	74
KAYNAKLAR	75

ÖZGEÇMİŞ 89



1. GİRİŞ

Kanser dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur ve erken ölümlerin önemli bir sebebidir (Ferlay ve ark., 2008). Meme kanserleri, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kadınların kanserden ölüm nedenleri arasında önemli bir yere sahiptir (Anderson ve ark., 2009). Kadın ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan meme kanserlerinde kullanılan antikanser ilaçlara karşı oldukça fazla direnç görülmektedir (Satpati ve ark., 2014). Mamografik taramalar meme kanserlerinde erken tanı koymak için etkili araçlar olmasına rağmen, morbidite ve mortalite oranı giderek artmaktadır (Jemal ve ark., 2008). Bu yüzden kanser oluşum mekanizmaları ve ilaç etkileri konusunda *in vitro* hücre çalışmaları yaygın olarak kullanılmaktadır. MCF-7 hücre serisi *in vitro* meme kanser çalışmalarında sıklıkla kullanılan insan meme karsinom hücreleridir. (<http://www.atcc.org>).

Hücre büyümesi ve proliferasyonunda önemli yollardan birisi Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) sinyal yolağıdır. TGF- β sinyalleri, embriyonik gelişim, hücre büyümesinin düzenlenmesi, diferansiasyon ve apoptozda önemli bir rol oynarken TGF- β sinyallerindeki mutasyon veya bozulma kanser ve fibrozisi de içine alan çok sayıda hastalık ile ilişkili bulunmuş ve özellikle tümörün ilerleyen evrelerinde büyüme hızlandırıcı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Caestecker ve ark., 2000; Deryn ve ark., 2001). TGF- β normal epitelyal, endotelyal ve hematopoetik hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder ve bu yüzden çeşitli dokuların homeostazisinde kritik öneme sahiptir (Roberts ve ark., 1990). Karsinogenez sırasında, normal epitelyal hücrelerdeki diferansiasyon ve proliferasyon arasındaki denge kaybına karşı, TGF- β sinyalleri karsinogenezin erken evrelerinde normal doku yapısının sürdürülmesi ve kanserin önlenmesinde rol almaktadır (Bellam ve Pasche, 2010). Kanser oluştuğunda ise TGF- β sinyal yolağının mutasyonu sonucunda sitotoksik aktivitesi inhibe olmaktadır. TGF- β sinyal moleküllerinin genetik inaktivasyonu kanserlerin bir kısmında görülürken, çoğu kanserlerde bilinen bir mutasyon olmaksızın büyümenin durdurulmasına karşı direnç tesbit edilmiştir (Moustakas ve Heldin, 2005). Smad'lar, TGF- β reseptörlerinden nükleusa sinyal taşınmasında merkezi mediatörlerdir (Massague 1998). Hücre sinyal yollarında, çeşitli transkripsiyon faktörleri, kinazlar tarafından bazı bölgelerinden fosforillenmektedir. Aktif hale gelen TGF- β Type I Receptor (TGFBR1), Smad3/2'yi de içeren Receptor Activated Smad (R-smad)'ları karboksil uç bölgedeki serin rezidülden

fosforillerken (Wrana, 2000), mitojenik sinyaller ise spesifik linker bölgelerinden fosforillemektedirler (Matsuzaki ve ark., 2009). Fosforillenen Smad3/2, Smad4 ile heterotrimer bir kompleks oluşturarak nükleusa transloke olmaktadır. Oluşan kompleks nükleusta birikmekte ve spesifik genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için aktivatör veya supressör transkripsiyonel faktörler ile etkileşmektedirler (Matsuzaki ve ark., 2009). SIK geni TGF- β /Smad sinyalinin doğrudan bir hedef geni olup TGFBR1'i down regüle eden protein komplekslerine katılmaktadır. Ayrıca, SIK'in kinaz aktivitesi ve Smurf2'nin ubiquitin ligaz aktivitesi Smad7'yi içeren protein komplekslerinin dinamiğini etkilediği ve bunların her ikisinin de optimal TGFBR1 down regülasyonu için gerekli oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Löhn ve ark., 2012).

SIK, yüksek tuz diyeti ile beslenen sıçanların böbrek üstü bezlerinden izole edilen AMPK ailesine ait olan bir serin/treonin protein kinazdır (Horike ve ark., 2003). SIK'in kinaz aktivitesi gösterebilmesi için tümör supresör bir gen olan LKB1 tarafından fosforile edilmesi gerekmektedir (Hashimoto ve ark., 2008). LKB1 ve onun downstream sinyal yolağının kanser hücre büyümesini baskılaması ve hücre ölümünü indüklemesi yanında metastazını da inhibe ettiği bilinmektedir (Gan ve Li, 2014).

SIK'ler arasında üzerinde en çok çalışma yapılan SIK1 genidir (Ruiz ve ark., 1994). İnsanlarda, SIK1 geni kromozom 21'de lokalize iken SIK2 ve SIK3 kromozom 11'de lokalizedir (Katoh ve ark., 2004). SIK1, hücre döngüsü regülasyonu, glukoneogenezin ve lipogenezin regülasyonu, kas büyümesi ve differansiyasyonu ve tümör baskılanması gibi birçok farklı süreçte yer almaktadır. Bu süreçler içinde, özellikle CREB Regulated Transcription Coactivator 1 (CRTC1/TORC1) ve CRTC2/TORC2'yi fosforillemesi ve p53/TP53 bağımlı anoikiste rol alması tümör supresyonu açısından önemlidir (<http://www.uniprot.org>).

SIK2, insulinle uyarılan adipositlerde, insulin receptor substrate 1 (IRS1)'i Serin 794'den fosforile etmekte ve insülin sinyalinin transdüksiyon etkinliğini potansiyel olarak modüle etmektedir. CREB-spesifik koaktivatör olan CRTC'yi fosforile ederek CREB aktivitesini inhibe etmektedir (<http://www.uniprot.org>). SIK2 ile ilişkili yollar arasında glukoz/enerji metabolizması ve LKB1'in sinyal yolları yer almaktadır (<http://www.genecards.org>).

1,1-dimethylbiguanide (metformin) tip II diabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan antidiyabetik bir ajandır (Alexander ve ark., 2008). Metformin metabolik olarak bir yandan karaciğerde glukoneogenezi inhibe ederek (Dailey ve ark., 1995), endojen glukoz üretimini baskılamak, diğer yandan ise periferik insülin duyarlılığını artırmaktadır (Kirpichnikov ve ark., 2002). Son zamanlarda yapılan klinik çalışmalarda metformin kullanan Tip II diyabet hastalarında, kanser riskinin düşük olduğu bulunmuştur (Alessi ve ark., 2005). *In vitro* kanser hücre çalışmalarında, metforminin antikanser etkisini hücre proliferasyonunu ve apoptozisi etkileyerek sağladığı gösterilmiştir (Salis ve ark., 2014). Metforminin, apoptotik ve antiproliferatif etkisini temel olarak AMP Activated Protein Kinase (AMPK) aktivasyonunu etkileyerek gösterdiği düşünülmektedir (Chen ve ark., 2001). LKB1, AMPK aktivasyonu için gerekli bir serin treonin protein kinazdır (Shaw ve ark., 2005). MCF-7 hücreleriyle yapılan bir çalışmada metforminin LKB1 üzerinden AMPK fosforilasyonunu doza bağımlı olarak artırdığı gösterilmiştir (Dowling ve ark., 2007). AMPK'nın da CRTC2'yi fosforilleyerek mTOR'un inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir (Inoki ve ark., 2003). Ayrıca CRTC2'nin yokluğu, tümör progresyonunda kritik rol oynayan anjiyogenezi artırmaktadır (Bjornsti ve Houghton, 2004). LKB1 aynı zamanda SIK1'i de Thr182 ve Ser186 bölgelerinden fosforilasyon yoluyla aktive etmektedir. Yapılan birçok çalışmada, SIK1'in CRTC'i fosforile ederek bir transkripsiyon faktörü olan CREB aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (Screaton ve ark., 2004; Takemori ve Okamoto, 2008). Benzer olarak, SIK2 de cAMP-response element bağımlı transkripsiyonu baskılamaktadır; fakat bu baskılama derecesi SIK1'e nazaran daha zayıf olduğu düşünülmektedir (Horike ve ark., 2003). Bu bulgular; LKB1-SIK-CRTC sinyalinin CREB aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir.

Yaptığımız literatür araştırmaları sonucunda, MCF-7 hücrelerinde metforminin SIK1 ve SIK2 genleri üzerine etkisini gösteren herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Biz LKB1-AMPK-CRTC2 ile ilişkisinden yola çıkarak metforminin LKB1 üzerinden SIK1 ve SIK2 gen ekspresyonunu artırmak suretiyle CREB aktivitesini baskılayarak ve/veya TGF-beta-Smad sinyal yolunu etkileyerek invazyonu azalttığını düşünmekteyiz. Bu nedenle, invaziv ve non-invaziv MCF-7 hücrelerinde metforminin SIK1 ve SIK2 genleri üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, ciddi sağlık sorunlarına yol açar ve ölümün önde gelen sebeplerinden biridir (<http://www.who.int/en/>). Kanser, vücuttaki hücrelerin çeşitli etkilerle farklılaşarak aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla meydana gelmektedir. Normal hücrelerin bölünmesi bir süre sonra dururken kanser hücrelerinin bölünmesi durmamakta ve normal hücrelere göre daha hızlı çoğalarak yaşamlarını sürdürmektedirler. Kontrolsüz çoğalan bu hücreler buldukları yerden başka organ veya dokulara kan ya da lenf damarlarıyla taşınıp metastaza sebep olmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000). Vücudun değişik yerlerine taşınan kanserli hücreler tümör kolonileri oluşturularak çoğalmalarına devam etmektedirler (Ringer ve Schniper, 2000).

Meme, kolorektal, akciğer, rahim ve mide kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türleri iken; akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri erkeklerde en sık görülen kanser türleridir. Kanserde erken teşhis, doğru tanı ve etkili tedavi kanserli hastalarda ağrı duyumunun azalması ve sağkalım oranlarının artması açısından önemlidir (<http://www.who.int/en/>).

2.1.1 Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir (Jemal ve ark., 2011) ve akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerin en sık nedenidir (Jemal ve ark., 2006). Dünyada meme kanseri görülme oranı giderek artmakta ve batı toplumunda yaklaşık her 8 kadından biri bu hastalığa yakalanmaktadır (Jemal ve ark., 2011).

Meme, süt bezleri ve süt kanallarından oluşur. Meme kanseri, süt kanallarını veya lobülleri oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine metastazları sonucu invaziv oldukları organ ya da dokuda çoğalmaya devam etmeleriyle meydana gelmektedir. Meme kanseri lokalize olduğu yere göre; süt kanallarında lokalize olan kanser tipi duktal karsinom, lobüllerde lokalize olan ise lobüler karsinom olarak sınıflandırılmaktadır. Kanseri hücreleri lokalize oldukları yerde sınırlı kalırsa in situ, yayılma gösterirlerse invaziv meme kanseri olarak isimlendirilmektedir (Atlanta, 2007).

Meme kanserinin metastazları daha çok kemik, akciğer, lenf nodu ve beyinde olmaktadır (Atlanta, 2007). Meme kanserinin evrelendirilmesi tümör boyutu, lenf nodu tutulumu ve uzak mesafeli metastazlarına göre yapılmaktadır (Singletary ve Connolly,

2006). Meme kanserinin aşamasına göre ise prognoz tayini ve tedavi seçenekleri belirlenmektedir (Bland ve ark., 1998). Meme kanserleri menopoz (öncesi\sonrası), östrojen reseptörü (+\ -), progesteron reseptörü(+\ -) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER-2)'nin ekspresyonuna göre sınıflandırılmaktadır. Mamografi, meme kanseri teşhisinde 40-74 yaş aralığındaki kadınlar için yaygın olarak kullanılan somut verilere sahip bir tarama metodudur. Mamografi ile birlikte ultrasonografi, manyetik rezonans görüntüleme, tomosentez (3 Boyutlu Digital Mamografi) ve moleküler meme görüntüleme sistemleri de tanı koymak için mamografi ile değerlendirilmesi gereken yöntemlerdir (Nelson ve ark., 2009). Meme kanserinin teşhisi, yapılan bu değerlendirmelerin ardından doku biyopsisinden yapılan histolojik incelemelerle kesinleştirilmektedir. Hastanın tedavisi ise tümörün özelliklerine, hormon reseptörü bulundurup bulundurmamasına ve bulunduğu evreye göre değişmektedir. Tedavi ise cerrahi, adjuvan tedavisi (kemoterapi, tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) ve radyoterapi olmak üzere bunlardan biri ya da hepsinin uygulanması ile yapılmaktadır (<http://kanser.gov.tr>).

Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri menopozlu kadınlar arasında en sık tanısı konulan neoplastik hastalıktır ve sıklıkla günlük yaşamda kadınların yeteneklerinin önemli bir şekilde azalmasına yol açmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, meme kanseri insidansındaki artışın tümör oluşumu ile ilişkili risk faktörlerini belirlemek amacıyla çok yönlü çalışmalar yapılması gerektiğini göstermektedir. Bir kriter olarak bireylerde neoplastik dönüşüm sürecinin etkilenmesi dikkate alındığında süreci başlatan tüm risk faktörleri iki gruba ayrılabilir:

Birinci grup; meme bezinin benign proliferatif lezyonlarının ya da neoplastik hastalığın ailesel oluşumunu tetikleyen yaş, cinsiyet, ırk, genetik özellikler gibi doğal faktörleri içermektedir. Söz konusu faktörlerin tümü bağımsız parametreleri oluşturmakta ve kişinin yaşamındaki küçük değişikliklerden kaynaklanmamaktadır.

İkinci grup; yaşam tarzı, beslenme veya (oral hormonal kontraseptif ya da hormon replasman tedavisi gibi) uzun dönem tıbbi müdahale gibi dış faktörleri içermekte ve neoplastik süreç üzerindeki etkileri belli dereceye kadar modifiye edilebilmektedir.

Değiştirilebilir faktörlerin belirlenmesi meme kanseri insidansının azaltılmasında önleme stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilmektedir (Kamińska ve ark., 2015).

MCF-7 Hücre Hattı

MCF-7 1970 yılında 69 yaşında invaziv duktal karsinomlu beyaz ırktan bir kadının plevral efüzyonundan izole edilen hücre hattıdır (<http://www.mcf7.com>). Hücre hattı 1973 yılında Herbert Soule ve arkadaşları tarafından Detroit'te izole edilmiştir ve ismi enstitüye atıfta bulunularak MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) olarak konulmuştur (Nieves-Neira ve Pommier, 1999). Epitelyal morfolojiye sahiptir ve çoğalması adheren özellik taşımakta olup Doubling Time'ı 29 saattir (www.atcc.org).

MCF-7 hücre hattı, meme epitelinin birçok karakteristik özelliklerine sahip olduğundan in vitro meme kanseri çalışmaları için oldukça yararlıdır. MCF-7 östrojen ve sitokeratin duyarlılığına sahipken desmin, endotelin ve vimentin için duyarlılığa sahip değildir. İn vitro kültürde çoğaltıldıklarında ise monolayer bir görünüm sergilemektedirler. Hücrelerin büyümesi tumor necrosis factor alpha kullanılarak ya da anti-östrojenlerle muamele edilerek inhibe edilebilmektedir. Genetik olarak, MCF-7 hücre hattı tam olarak muhafaza edilememiştir. MCF-7 hücre hattı ilk olarak 85 kromozom içeren bir karyotip olarak tanımlanırken, bugün MCF-7 hücre hattı 69 kromozom içeren bir karyotip olarak tanımlanmaktadır (<http://www.mcf7.com>). MCF-7 hücre hattında kaspaz -6, -7 ve -9 ekspresyonu ve B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ekspresyonu oldukça yüksek seviyelerdedir. Tümör protein 53 (p53/TP53), cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21), HER-2 geninin ekspresyonu ve düzenlenmesi ise normal düzeydedir (Nieves-Neira ve Pommier, 1999).

MCF-7 hücreleri, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden satın alınmıştır.

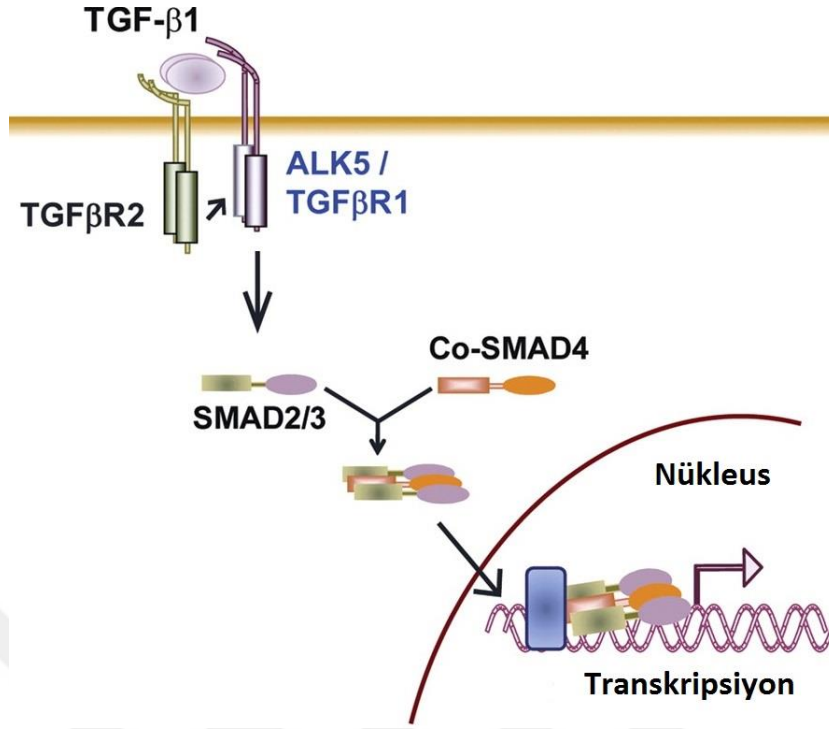
2.2. TGF- β Smad Sinyal Yolağı ve Karsinogenez İlişkisi

Hücre büyümesi ve proliferasyonunda önemli yollardan birisi Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) sinyal yolağıdır. TGF- β sinyalleri, embriyonik gelişim, hücre büyümesinin düzenlenmesi, diferansiyasyon ve apoptozda önemli bir rol oynarken (Deryn ve ark., 2001), TGF- β sinyallerindeki mutasyon veya bozulma kanser ve fibrozisi de içine alan çok sayıda hastalık ile ilişkili bulunmuş ve özellikle tümörün ilerleyen

evrelerinde büyümeyi hızlandırıcı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (De Caestecker ve ark., 2000; Deryn ve ark., 2001). TGF- β normal epitelyal, endotelyal ve hematopoetik hücrelerin proliferasyonunu inhibe etmekte ve bu yüzden çeşitli dokuların homeostazisinde kritik öneme sahiptir (Roberts ve ark., 1990).

Karsinogenez sırasında, normal epitelyal hücrelerdeki diferansiasyon ve proliferasyon arasındaki denge kaybına karşı, TGF- β sinyalleri karsinogenezin erken evrelerinde normal doku yapısının sürdürülmesi ve kanserin önlenmesinde rol almaktadır (Bellam ve Pasche, 2010). Kanser oluştuğunda ise TGF- β sinyal yolağının mutasyonu sonucunda sitotoksik aktivitesi inhibe olmaktadır. TGF- β sinyal moleküllerinin genetik inaktivasyonu kanserlerin bir kısmında görülürken, çoğu kanserlerde bilinen bir mutasyon olmaksızın büyümenin durdurulmasına karşı direnç tesbit edilmiştir (Moustakas ve Heldin, 2005).

Ekstraselüler dimerik TGF- β ligandı serin/threonin kinaz reseptörleri Transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) ve activin A receptor type II-like kinase (ALK5) olarak da bilinen Transforming growth factor beta receptor I (TGFB1) ile bağlantı kurduğunda TGF- β sinyali başlamaktadır. TGFB2, TGFB1'i transfosforile etmektedir. TGFB1 de reseptör regüle Smad'ları [receptor-regulated SMAD'lar (R-Smad), SMAD Family Member 2, 3 (Smad2 ve Smad3)] COOH-uç bölgedeki serin kalıntılardan fosforillemektedir (Wrana, 2000). Smad'lar TGF- β reseptörlerinden nükleusa sinyal taşınmasında merkezi mediatörlerdir (Massague, 1998) (Şekil 1). R-Smad fosforilasyonu, SMAD Family Member 4 (Smad4) ile bağlantı kurup transkripsiyon kompleksleri ile işbirliği içerisinde nükleusta birikip gen ifadesini düzenlemek için gereklidir (Feng ve Derynck, 2005).

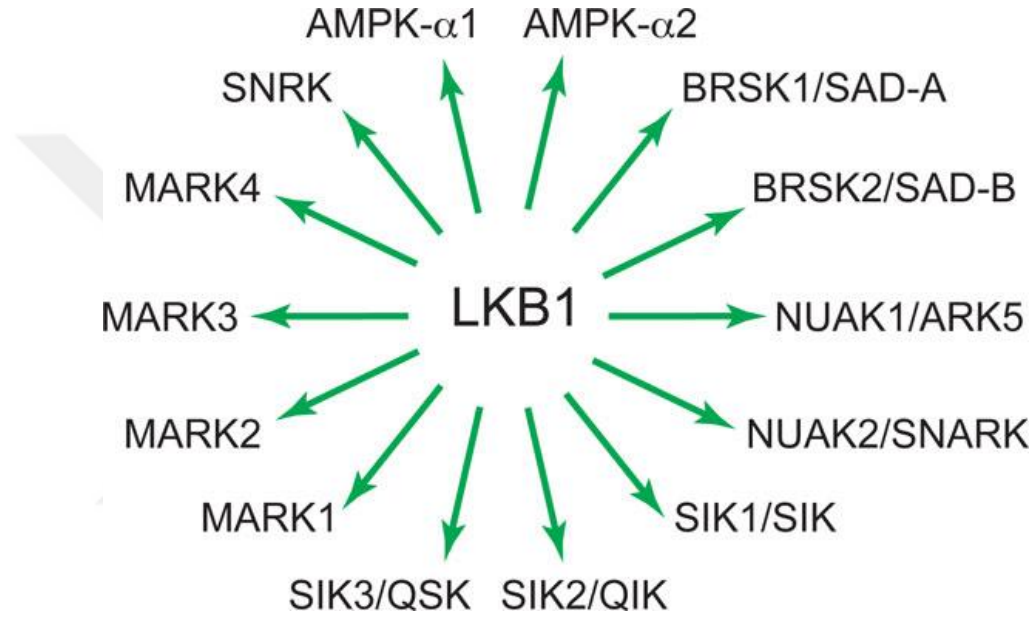


Şekil 1. TGF-β Smad Sinyal Yolağı (TGF-β: Transforming growth factor beta; TGFβR1 Transforming growth factor beta receptor I; TGFβR2: Transforming growth factor beta receptor II; SMAD Family Member 2/3; Co-Smad4: SMAD Family Member 4) (Serve ve ark., 2011)

2.3. LKB1 Sinyal Yolağı

Serine/Threonine Kinase 11 (LKB1/STK11); 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), NUA family SNF1-like kinase 1 (NUAK1), sucrose non-fermenting protein-related kinase (SNRK), brain selective kinase 1/2 (BRSK1 and BRSK2) ya da synapses of amphids-deficient kinase (SADK), Salt-inducible kinase1, 2, 3 (SIK1, SIK2 and SIK3), microtubule affinity regulating kinase 1, 2, 3, 4 (MARK1, MARK2, MARK3 and MARK4) ya da partitioning defective gene 1 (Par1) ve maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK)'i içeren AMPK ilişkili 13 protein kinazın başlıca bir kinazıdır (Şekil 2). LKB1, MELK hariç ailenin diğer üyelerinin T-looplarını fosforilleyebilmekte ve belirgin derecede kinaz aktivitelerini arttırmaktadır. Buna ek olarak LKB1 defektif hücrelerde endojen NUA Family, SNF1-Like Kinase, 2 (NUAK2), SIK, microtubule affinity regulating kinase'ların (MARK) aktivitesi belirgin derecede azalmıştır (Lizcano ve ark., 2004). SIK, MARK ve brain selective kinase

(BRSK) izoformları gibi birçok AMPK ilişkili kinazlar kinaz katalitik domainlerinin yakınındaki karboksil terminallerinde ubiquitin-associated domaine (UBA) sahiptir. Ancak UBA domaininin poliubikitin veya ubikitin benzeri diğer moleküllerle etkileşime girmediği bulunmuştur. Fakat UBA önemli bir yapısal role sahiptir ve UBA domainlerinin uzaklaştırılması veya mutasyonunu, LKB1 ilişkili fosforilasyonu ve katalitik aktiviteyi belirgin derecede olumsuz etkilemesinden dolayı, LKB1 ilişkili fosforilasyon ve kinaz aktivasyonu için gereklidir (Jaleel ve ark., 2006).



Şekil 2: AMPK ve AMPK bağlantılı kinaz ailesi üyeleri: Şekilde gösterilen tüm kinazlar LKB1 tarafından fosforillenerek aktive edilmektedir (Grahame ve Dario, 2013)

2.3.1. LKB1'in Fonksiyonları

LKB1 geni, birçok kanser hücresinde mutasyona uğramıştır ve daha ileri araştırmalar LKB1'in bir kanser supresör olduğunu göstermektedir. LKB1 ve onun downstream sinyal yolağının sadece kanser hücresinin büyümesini baskılamadığı ya da kanser hücre ölümünü indüklemediği aynı zamanda da kanser hücre metastazını inhibe edebildiği bildirilmiştir. LKB1'in birçok kanserde kanser supresör olduğu gösterildiğinden farmakolojik yaklaşımlar LKB1'in hedef bir gen olarak kanser tedavisi için kullanılabileceğini düşündürmektedir. Gerçekten de AMPK aktivatörleri,

mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) ve Cyclooxygenase 2 (COX-2) inhibitörlerini içeren LKB1 yolağı hedefli bazı ilaçların bazı kanserler için etkili olduğu bildirilmiştir (Gan ve Li, 2014).

Kanser Hücre Büyümesinin Baskılanması

LKB1'in kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Fakat normal hücrelerde bu durum geçerli değildir. Bu durum, kanser hücrelerinde metabolik stres ve hipoksi gibi çeşitli streslere kısmen bağlı olabilmektedir. Enerji yoksunluğu gibi metabolik stres altında kanser hücrelerinde, LKB1-AMPK sinyal yolağı aktive olabilmektedir (Hardie ve Alessi, 2013). AMPK aktivasyonu daha sonrasında anabolizmayı inhibe edebilmekte ve hücre döngüsü arrestini indüklemekte ve de kanser hücre gelişimini baskılamaktadır (Gan ve Li, 2014).

LKB1-AMPK sinyal yolağı, Acetyl-CoA carboxylase 1'in baskılanması üzerinden yağ asidi sentezini, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase'ın baskılanması üzerinden sterol sentezini ve mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 (mTORC1)'in baskılanması üzerinden protein sentezini inhibe edebilmektedir(Hardie ve Alessi 2013). Kanser hücre hatları üzerinde, metformin gibi AMPK aktivatörleri AMPK aktivasyonu üzerinden hücre döngüsü arrestinin indüklenmesi ile belirgin derecede hücre gelişimini inhibe edebilmektedir. Söz konusu etki, phosphorylating tuberous sclerosis 2 (CRTC2) tarafından mTOR'un inhibisyonu üzerinden anabolizmanın baskılanması ile ilişkili olabilmektedir(Xiang ve ark., 2004; Hardie, 2005; Zakikhani ve ark., 2006).

Ek olarak, LKB1, AMPK-selective COX-2 yolağı üzerinden de kanser hücre gelişimini inhibe edebilmektedir. COX-2'nin inhibisyonu kanser hücre döngüsü arrestini ve büyümenin inhibisyonunu indükleyebilmektedir (Hwang ve ark., 2006).

Bunun yanı sıra LKB1, p21 ve p53'e bağlı kanser hücrelerinin hücre döngülerinin durdurulmasını indükleyebilmektedir. LKB1 aracılı G1 hücre döngüsünün arrestine Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitör p21'in ekspresyonunun up-regülasyonu neden olmaktadır (Tiainen ve ark., 2002; Zeng ve Berger, 2006). Bu etkiler p53 bağımsızdır (Setogawa ve ark., 2006). Öte yandan, LKB1'in p53'ü stabilize etmek için nükleusta p53 ile fiziksel etkileşime girdiği bildirilmiştir. LKB1, LKB1 bağlı G1 hücre döngüsü arresti için gerekli olan p53, serin 15 (Ser15) ve serin 392 (Ser392)'yi

doğrudan ya da dolaylı olarak fosforile etmektedir (Zeng ve Berger, 2006). Bu sonuçlar, LKB1'in p21 geninin aktivasyonunda doğrudan role sahip olduğunu göstermektedir.

Buna ek olarak, LKB1 hipoksik koşullar altında hypoxia inducible factor 1 (HIF-1)'in regülasyonu üzerinden kanser hücrelerinin gelişimini inhibe edebilmektedir. Hipoksi çoğu kanserde görülen önemli bir özelliktir (Wilson ve Hay, 2011). Hipoksi, hipoksik koşullar altında up-regüle bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1'in ekspresyonunu indükleyebilmektedir. HIF-1 daha sonra hipoksik tümör çevresinde kanser hücrelerinin büyüyebilmeleri ve hayatta kalabilmeleri için bazı genleri aktive etmektedir (Powis ve Kirkpatrick, 2004). LKB1-AMPK sinyal yolağının mTORC1' i negatif olarak regüle ettiği tespit edilmiştir ve HIF-1 proteininin mTORC1 tarafından up-regüle olduğu bildirilmiştir (Thomas ve ark., 2006). Buna ek olarak, in vivo LKB1 defektif tümörlerde, mTORC1 ve HIF-1'in büyük ölçüde up-regüle olduğu bildirilmiştir (Shackelford ve ark., 2009). Bu sonuçlardan, LKB1'in HIF-1 ve HIF-1'in hücre yaşam kabiliyetinden sorumlu hedef genlerin ekspresyonunu baskılayabildiği ve nihayetinde hipoksik koşullar altında kanser hücresi gelişimini baskıladığı anlaşılmaktadır.

Son olarak, LKB1 diğer mekanizmalarla kanser hücresi gelişimini inhibe edebilmektedir. STE20-Related Adapter Protein, LKB1'in tümör supresör etkisinde önemli bir rol oynamaktadır (Baas ve ark., 2003). Ayrıca LKB1 daha sonradan hücre gelişiminin arrestini indükleyen ATP-dependent helicase SMARCA4 ile interaksiyona girip bu geni aktive edebilmektedir (Marignani ve ark., 2001).

Kanser Hücre Ölümünün İndüksiyonu

Peutz-Jeghers Sendromu hastalarından elde edilen poliplerde; P53 bağımlı hücre ölümünün bir mediatörü olan LKB1'in zayıf boyandığı ve apoptotik hücre sayılarının azaldığı bulunmuştur (Karuman ve ark., 2001). Bununla birlikte, AsPC-1 pankreatik hücre hattında, LKB1 ile indüklenen hücre apoptozunun, p53-bağımsız fakat tumor protein 73 bağımlı olduğu bildirilmiştir (Qanungo ve ark., 2003). Buna ek olarak, LKB1, c-Jun N-terminal kinase yolunun aktivasyonu üzerinden hücre apoptozunu indükleyebilmektedir (Lee ve ark., 2006). Bunun yanı sıra, osteosarkom hücrelerinde K78M LKB1, death associated protein 3 (DAP3) ilişkili hücre apoptozunu inhibe ederken, LKB1, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand ve DAP3-ilişkili hücre apoptozunda da kritik bir role sahiptir (Takeda ve ark., 2007).

Bununla birlikte, LKB1 kanser hücrelerinin akıbeti üzerinde zıt etkilere sahip olan otofajiyi de arttırabilmektedir. Diğer yandan otofaji, kanser hücrelerinin yaşamlarını sürdürmede baskın bir rol oynamaktadır. Ayrıca otofaji, bazı koşullar altında hücre ölümünü de indükleyebilmektedir. Hipoksi ve enerji yokluğu gibi metabolik stresler altında, LKB1-AMPK yolağı aktive olabilmekte ve otofajinin aktivasyonuna yol açan mTOR ve mTORC1'i inhibe eden, CRTC2'yi fosforilleyerek aktive etmektedir (Shaw, 2009). Kanser hücrelerinde LKB1 kontrollü otofaji, hücrenin hayatta kalmasını indükleyebilmekte fakat hücre ölümünü açıklayamamaktadır. Ayrıca bu durum, metabolik stres gibi tümör mikroçevre koşullarına ve hücre tipine bağlı olabilmektedir(Gan ve Li, 2014).

Kanser Hücre Metastazının İnhibisyonu

Araştırmacılar LKB1'in kanser hücre invazyonunu ve metastazını inhibe edebildiğini bulmuştur. LKB1 ekspresyonunun olmadığı, MDA-MB-435 meme kanseri hücrelerinde, LKB1'in over-ekspresyonu in vivo ve in vitro olarak kanser hücrelerinin metastazını ve invazyonunu önemli ölçüde inhibe edebilmektedir ve bu olgu vascular endothelial growth factor'ün yanı sıra matrix metalloproteinaz 2 ve 9'un down regülasyonuna katılmaktadır (Zhuang ve ark., 2006). Benzer olarak, LKB1 meme kanser hücrelerinin, invazyonunun ve migrasyonunun adiponektin aracılı inhibisyonu için gereklidir ve bu etki, AMPK aktivasyonuna ve Ribosomal Protein S6 Kinase I kinaz inhibisyonuna bağlıdır (Taliaferro-Smith ve ark., 2009).

2.3.2. LKB1-SIK Sinyal Yolağı

SIK1 ve SIK2, AMPK ilişkili kinazların bir üyesidir. SIK1, siklik adenozin monofosfat (cAMP) ilişkili gen ekspresyonunun feedback kaskadındaki bir regülatördür. SIK1, kinaz aktivitesi için LKB1 tarafından esansiyel olan Treonin 182 ve Serin 186'nın fosforilasyonu ile aktive edilmektedir (Hashimoto ve ark., 2008). LKB1-SIK-CRTC sinyali, Ser133'den fosforillendiğinde transkripsiyonu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olan cAMP response element-binding protein (CREB)'in aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. CREB Regulated Transcription Coactivator (CRTC), CREB'in transkripsiyonel bir koaktivatörüdür ve nükleusta CREB aktivitesini upregüle etmektedir. SIK'in CRTC üzerinden CREB aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. SIK, CRTC'yi

fosforilleyerek nükleustan uzaklaştırılmasına yol açar (Screaton ve ark., 2004; Katoh ve ark., 2006). Fakat LKB1 defektif HeLa hücrelerinde, SIK, CREB aktivitesinin yapısal aktivasyonuna neden olan CRTC'yi fosforile etme yeteneğinde değildir (Katoh ve ark., 2006). Benzer şekilde LKB1 defektif hepatositlerde, SIK tarafından CRTC2 defosforile edilmekte ve nükleusa girerek mitokondriyal biyogenezin başlıca koordinatörü olan peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) ekspresyonunu indüklemekte ve PGC-1 α sonrasında glukoneogeneze katılmaktadır. Ek olarak, CRTC2'nin knockdownu PGC-1 α ekspresyonunu azaltabilmekte ve CRTC2'nin glukoneogenezin regülasyonunda LKB1'in önemli bir hedefi olduğunu gösteren bir olay olan LKB1-knockout farelerde kan glukoz seviyelerini normalize edebilmektedir (Shaw ve ark., 2005). Söz konusu araştırmalar LKB1-SIK sinyal yolağının CRTC'nin nükleustan uzaklaştırılması ve fosforilasyonu vasıtasıyla CREB aktivitesinin durdurulmasında önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.

2.4. Salt Inducible Kinase (SIK)

Salt inducible kinase (SIK) yüksek tuz diyeti ile beslenen sıçanların böbrek üstü bezlerinden klonlanan AMPK ailesine ait olan bir serin/treonin protein kinazdır (Takemori ve ark., 2003). SIK'ler arasında üzerinde en çok çalışma yapılan SIK1 genidir. SIK1; sucrose non-fermenting like kinase 1 (snf1lk)'in homologudur ve fare kardiyogenezinin monitörizasyonu esnasında bulunmuştur (Ruiz ve ark., 1994).

İnsanlarda, SIK1 geni kromozom 21 de lokalize iken SIK2 ve SIK3 kromozom 11 de lokalizedir (Katoh ve ark., 2004). SIK1 ve onun iki izoformu sırasıyla 776, 931 ve 1263 aminoasit uzunluğundadır. Üç kinaz da N-terminalin sonunda yüksek derecede korunmuş serin/treonin kinaz domainine, ortada ise SNF-1 domainine ve C-terminalin sonunda da potansiyel serin fosforilasyon bölgesine sahiptir (Yoshiko ve ark., 2004).

2.4.1. Salt Inducible Kinase 1 (SIK1)

SIK1'in isimleri ve taksonomisi

SIK1'in isimleri ve taksonomisi Tablo 1'de gösterilmektedir.

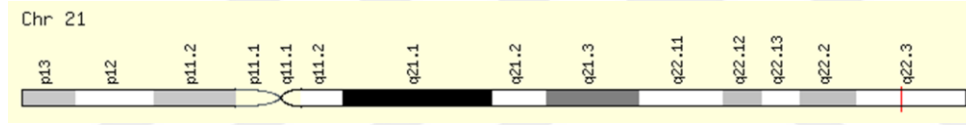
Tablo 1. SIK1'in isimleri ve taksonomisi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Protein İsimleri	Önerilen isim: Serine/threonine-protein kinase (SIK1) Alternatif isimler: Salt-inducible kinase 1 (SIK1) Serine/threonine-protein kinase SNF1-like kinase 1 (SNF1LK) Myocardial SNF1-like kinase (MSK)
Gen isimleri	Adı: SIK1 Sinonimler: SIK, SNF1LK, EIEE30, MSK
Organizma	Homo sapiens (insan)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Genomik Lokalizasyonu

21. Kromozomun uzun kolunun 22,3 bölgesinde yer almaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. SIK1 kromozomal lokalizasyon (<http://www.genecards.org>)

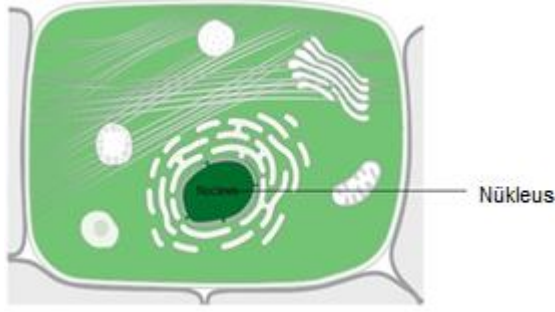
Aşağıda Tablo 2'de SIK1'in gen özellikleri verilmiştir.

Tablo 2. SIK1 gen özellikleri (<http://www.genecards.org>)

Tip	Fonksiyonel
Büyüklik	12,614 baz çifti
Oryantasyon	Negatif zincir
Ekzon sayısı	14
Kromozomdaki pozisyonu	43,414,515 - 43,427,128
Sitogenetik band	21q22,3

(<http://www.genecards.org>) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Subselüler Lokalizasyonu



Şekil 4. SIK1'in subselüler lokalizasyonu (<http://www.genecards.org>)

SIK1, yoğun olduğu bölgeden az olduğu bölgeye doğru sıralaması; nükleus, sitoplazma, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı şeklinde olmaktadır (Şekil 4) (<http://www.genecards.org>).

Enzim Sınıflaması

EC 2.7.11.1 (<http://www.uniprot.org>)

- EC 2.-.-.- Transferazlar
 - EC 2.7.-.- Fosfor grubunu transfer eden transferazlar
 - EC 2.7.11.- Serin/treonin protein kinazlar
 - EC 2.7.11.1 Non-spesifik serin/treonin protein kinaz

Reaksiyonu



Kofaktör olarak Mg^{2+} iyonunu kullanmaktadır. Treonin 182 (Thr-182) ve Treonin fosforilasyonu ile aktive olmaktadır (<http://www.uniprot.org>).

Genel Fonksiyonları

Serin/treonin protein kinaz; hücre döngüsü regülasyonu, glukoneogenezin ve lipogenezin regülasyonu, kas büyümesi ve differansiyasyonu ve tümör baskılanması gibi birçok farklı süreçte yer almaktadır. SIK1; Histone Deacetylase 4 (HDAC4), Histone Deacetylase 5 (HDAC5), Protein Phosphatase Methylesterase 1 (PPME1), Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1(SREBF1), CREB Regulated

Transcription Coactivator 1 (CRTC1/TORC1) ve CRTC2/TORC2' yi fosforillemektedir. Tümör supresör olarak rol oynamakta ve p53/TP53 bağımlı anoikiste anahtar role sahiptir.

PPME1'in fosforilasyonuna aracılık ederek sodyum duyarlı sinyalizasyonun bir parçası olmaktadır. Hücre içi sodyum artışını takiben, SIK1, Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase I (CaMK1) tarafından aktive olmakta ve protein fosfataz 2A (PP2A)'nın PPME1 subunitini fosforilleyerek sodyum/potasyum-transporting ATPaz ATP synthase subunit alpha 1'in defosforilasyonuna yol açmakta ve daha sonra Sodium-Potassium ATPase Catalytic Subunit Alpha-1'in aktivitesini arttırmaktadır. SIK1, fosforilasyonla HDAC4 ve HDAC5'i inhibe ederek kas hücrelerinde regülatör olarak rol oynamakta ve miyositlerde Myocyte Enhancer Factor 2A hedef geninin ekspresyonunun artışına yol açmaktadır. Ayrıca Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P57'nin down regülasyonu üzerinden hücre döngüsünden kardiomyoblastların çıkışını regüle ettiği için kardiyomiyogenez sırasında gereklidir. Fosforilasyonla, CREB spesifik koaktivatörleri CRTC1 ve CRTC2'yi baskılayarak hepatik glukoneogenezin regülatörü olarak ta rol oynamakta ve CREB aktivitesini inhibe etmektedir. Ayrıca fosforilasyonla SREBF1'i inhibe ederek hepatik lipogenezini regüle etmektedir (<http://www.uniprot.org>).

Moleküler Fonksiyonları

1. 14-3-3 proteini bağlama: SIK1, 14-3-3 proteini ile selektif ve non-kovalent bir etkileşim içindedir. 14-3-3 proteini, tüm ökaryotik hücreler içerisinde homo ve heterodimer olarak var olan yaklaşık 30 kDa ağırlığında asidik proteinlerin ailesinin bir üyesidir ve de birçok farklı hedef proteinlerine bağlanma özelliğiyle farklı birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde görev almaktadır.
2. Adenosine triphosphate (ATP) bağlama: SIK1, önemli bir evrensel koenzim ve enzim regülatörü olan ATP ile selektif ve non-kovalent etkileşimde bulunmaktadır.
3. CREB bağlama: SIK1, CREB ile selektif ve non-kovalent etkileşimde bulunmaktadır.
4. Magnezyum iyonu bağlama: SIK1, Mg iyonlarıyla selektif ve non-kovalent etkileşimde bulunmaktadır.

5. Protein kinaz bağlama: SIK1, genellikle ATP'den protein substratlara fosfat gruplarının transferini katalizleyen enzimler olan protein kinazlarla, selektif ve non-kovalent etkileşimde bulunmaktadır.
6. Protein serin/treonin kinaz aktivitesi: SIK1, $ATP + \text{protein serin} = ADP + \text{serin fosfat}$ ve $ATP + \text{protein treonin} = ADP + \text{treonin fosfat}$ reaksiyonlarını katalizlemektedir.

(<http://www.uniprot.org>)

Biyolojik Fonksiyonları

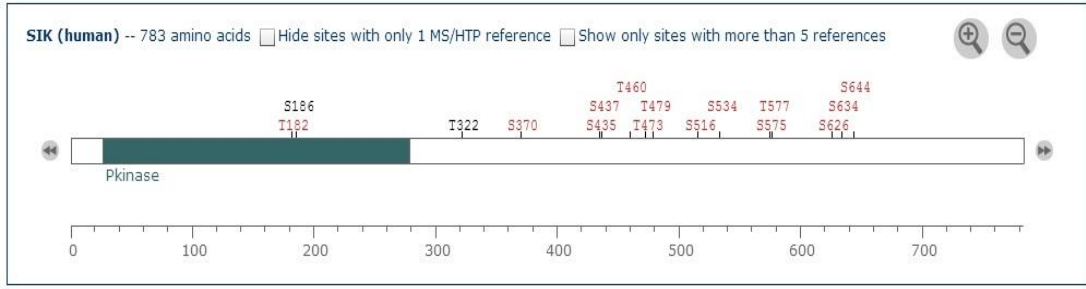
SIK1'in biyolojik fonksiyonları aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Miyokard hücre farklılaşması
- Hücre döngüsü
- Hücre içi sinyal aktarımı
- CREB transkripsiyon faktörü aktivitesinin negatif regülasyonu
- Glukoneogenezin negatif regülasyonu
- Trigliserid biyosentezinin negatif regülasyonu
- Anoikisin regülasyonu
- Protein otofosforilasyonu
- Protein fosforilasyonu
- Hücre farklılaşmasının regülasyonu
- Mitotik hücre siklusunun regülasyonu
- Sodyum iyonu transportunun regülasyonunda görev almaktadır.

(<http://www.uniprot.org>)

Fosforillenme Bölgeleri

Aşağıdaki Şekil 5'te yer alan serin ve treonin aminoasit rezidülerinden fosforillenmektedir.



Şekil 5. SIK1'in fosforillenme bölgeleri (<http://www.phosphosite.org>)

Post Translasyonel Modifikasyonu

STK11/LKB1; STE20-related adapter-alpha (STRADA) pseudo kinaz ve Calcium Binding Protein 39 (CAB39)'la kompleks kurarak SIK'i Thr-182'den fosforilleyerek aktive edebilmektedir. Thr-182'nin fosforilasyonu aktivasyon için gerekli olan Serin-186 (Ser-186) otoposforilasyonunu tetiklemektedir. Ser-186'nın otoposforilasyonu, Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (GSK3-beta) tarafından Thr-182'nin ardışık fosforilasyonu ile yapılmaktadır. GSK3-beta, Thr-182'den fosforilasyonu başlatamamaktadır. Protein kinase A (PKA) tarafından Serin 575'in fosforilasyonu, sitoplazmaya translokasyonu teşvik etmektedir. CaMK1 tarafından Treonin 322'nin fosforilasyonunu takiben intraselüler sodyum konsantrasyonu, SIK1'in aktivasyonuna yol açmaktadır (<http://www.uniprot.org>).

Mutasyonları

SIK1 genindeki olası mutasyonlar Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. SIK1 geninde meydana gelebilecek mutasyonlar

Pozisyon	Uzunluk	Sonuç
56	1	Lizin→Metiyonin: Kinaz aktivitesinin kaybı
135	1	Serin→Alanin: Otoposforilasyon durumunu fazla etkilemeden kinaz aktivitesinde azalma
182	1	Treonin→Alanin: STK11/LKB1 kompleksi tarafından fosforilasyon ve aktivasyonun önlenmesi
186	1	Serin→Alanin, Aspartik asit, Sistein ya da Glisin: Bozulmuş otoposforilasyon ve kinaz aktivitesi
186	1	Serin→Treonin: Otoposforilasyon ve kinaz aktivitesi yapamaz

CAMKK1; calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha; Calcium/calmodulin-bağımlı protein kinaz; birçok hücresel süreçte yer alan, kalsiyum tarafından tetiklenen bir sinyalizasyon kaskadıdır. Hücre apoptozunun düzenlenmesinde yer almaktadır. Hücrenin hayatta kalmasını, hücre ölümü antagonisti olan pro-apoptatik Bcl-2 genlerini inhibe eden Protein Kinase B'yi fosforilleyerek sağlamaktadır (520 aa).

STRADB; STE20-bağımlı kinaz adaptör beta; CAB39/MO25 (CAB39/MO25alpha veya CAB39L/MO25beta) ile kompleks oluşturan pseudokinaz, STK11/LKB1'e bağlanmakta ve aktive etmektedir. STRADB, aktif protein kinazların tipik kapalı konformasyonunu benimsemekte ve aktif bir konformasyon içinde STK11/LKB1 konformasyonel değişimlerini sağlayan bir pseudosubstrat olarak STK11/LKB1'e bağlanmaktadır (418 aa).

HDAC5; Histon deacetylase 5; kor histonlarının (H2A, H2B, H3 ve H4) N-terminal bölgesinde lizin kalıntılarının deasetilasyonundan sorumludur. Histon deasetilasyonu transkripsiyonel regülasyonda, hücre siklusunda ve gelişimsel olaylarda önemli bir role sahiptir (1123 aa).

PRKAB1; protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit; AMPK'nın non-katalitik alt birimi, bir enerji sensör protein kinazdır ve hücrenin enerji metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. İntraselüler ATP seviyelerinin azalmasına yanıt olarak AMPK, enerji üreten yolları aktive etmekte ve protein, karbohidrat, lipit biyosentezi, hücre büyümesi ve proliferasyonu gibi enerji tüketimi gerektiren süreçleri inhibe etmektedir (270 aa).

PRKAG3; protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit; of AMP-activated protein kinase (AMPK)'nın AMP/ATP bağlayan alt birimi bir enerji sensör protein kinazdır ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. İntraselüler ATP seviyelerinin azalmasına yanıt olarak AMPK, enerji üreten yolları aktive etmekte ve protein, karbohidrat, lipit biyosentezi, hücre büyümesi ve proliferasyonu gibi enerji tüketimi gerektiren süreçleri inhibe etmektedir (489 aa).

PRKAB2; protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit (272 aa).

CAB39; calcium binding protein 39; bir kompleks bileşeni olarak bağlanmakta ve STK11/LKB1'i aktive etmektedir. Kompleks içinde CAB39/MO25 (CAB39/MO25alpha ya da CAB39L/MO25beta) ve STK11/LKB1 arasındaki etkileşimi stabilize etmek için gereklidir (341 aa).

YWHAE; tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide (255 aa).

TP53; tumor protein p53; birçok tümör çeşidi içinde tümör supresör olarak rol oynamaktadır. Fizyolojik şartlar ve hücre tipine bağlı olarak hücre proliferasyonunu durdurmakta veya apoptozu indüklemektedir. Hücre döngüsünün regülasyonunda trans-aktivatör olarak bulunmakta ve bu süreç için gerekli olan genleri kontrol ederek hücre bölünmesinin negatif olarak regüle edilmesinde görev almaktadır. Apoptoz indüksiyonu ya Bcl-2-like protein 4 ve TNF Receptor Superfamily Member 6 antijen ekspresyonunun uyarılmasıyla ya da Bcl-2 ekspresyonunun baskılanmasıyla görülmektedir (393 aa).

TAB2; TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2; mitogen-activated protein 3 kinase 7 (MAP3K7) ve E3 Ubiquitin Protein Ligase bağlayan adaptördür. Interleukin 1 sinyal yolunda MAP3K7 aktivasyonunu arttırmaktadır. MAP3K7'ye 'Lys-63' bağlı poliubikitin zincirlerinin bağlanması Treonin 187'den, MAP3K7'nin otofosforilasyonunu arttırmaktadır. Ayrıca kalbin gelişiminde yer almaktadır (693 aa).

PRKAG2; protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit; AMP-activated protein kinase (AMPK)'nın AMP/ATP bağlayan subuniti; bir enerji sensör protein kinazdır ve hücrel enerji metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. İntraselüler ATP seviyelerinin azalmasına yanıt olarak AMPK, enerji üreten yolları aktive etmekte ve protein, karbohidrat, lipid biyosentezi, hücre büyümesi ve proliferasyonu gibi enerji tüketimi gerektiren süreçleri inhibe etmektedir (569 aa).

YWHAZ; tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (245 aa).

PRKACA; protein kinase cAMP-dependent catalytic alpha, sitoplazma ve nükleus içinde çok sayıda substratı fosforile etmektedir. PRKACA, glukoz aracılı adipojenik diferansiyasyonun artması ve osteoblastların osteogenik diferansiyasyonu için gereklidir (351 aa).

CAMKK2; calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta (588 aa).

PRKAG1; protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit; protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit; AMP-activated protein kinase (AMPK)'nın; AMP/ATP bağlayan alt birimi bir enerji sensör protein kinazdır ve

hücresel enerji metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. İntraselüler ATP seviyelerinin azalmasına yanıt olarak AMPK, enerji üreten yolları aktive etmekte ve protein, karbohidrat, lipid biyosentezi, hücre büyümesi ve proliferasyonu gibi enerji tüketimi gerektiren süreçleri inhibe etmektedir (340 aa).

STK11; serine/threonine kinase 11; tümör supresör olan serin treonin kinaz AMP-activated protein kinase (AMPK) ailesi üyelerinin aktivitesini kontrol etmektedir. Böylece hücre metabolizması, hücre polaritesi, apoptoz ve DNA hasarına cevap gibi çeşitli süreçlerde rol oynamaktadır. STK11; AMPK ailesi üyeleri olan AMPK, BRSK1, BRSK2, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4, NUA1, NUA2, SIK1, SIK2, SIK3 ve SNRK'yi fosforile ederek aktivitelerinin artışına neden olmaktadır. Ayrıca STRADA ve p53 gibi AMPK ailesinden olmayan proteinleri de fosforilemektedir (433 aa).

STRADA; STE20-related kinase adaptor alpha (431 aa).

ACACB; acetyl-CoA carboxylase beta; ACACB yağ asidi biyosentezinin yerine yağ asidi oksidasyonunun regülasyonunda ya da malonil-CoA'nın oluşumunda etkilidir. Biotin karboksilaz ve karboksiltransferaz gibi fonksiyonları yürütmektedir (2458 aa).

ACACA; acetyl-CoA carboxylase alpha (2383 aa).

UBC; ubiquitin C (685 aa).

VAPA; VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A, 33kDa; vezikül transportunda rol oynayabilmektedir (294 aa).

MAP3K7; mitogen-activated protein 3 kinase 7 (606 aa).

BTF3L4; basic transcription factor 3-like 4 (158 aa).

PPP3CA; protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyyme; kalsiyum bağımlı calmodulin stimule protein fosfatazıdır. Bu subunit kalsineurinin, kalmodulin içindeki aktivasyonunda görev almaktadır (521 aa).

CCNC; cyclin C; Component of the Mediator complex, neredeyse bütün RNA polimeraz II bağımlı genlerin gen transkripsiyonunun regüle edilmesinde görev yapan bir koaktivatördür (283 aa) (<http://stringdb.org>).

2.4.2. Salt Inducible Kinase 2 (SIK2)

SIK2'in isimleri ve taksonomisi

SIK2'nin isimleri ve taksonomisi Tablo 5'de gösterilmektedir.

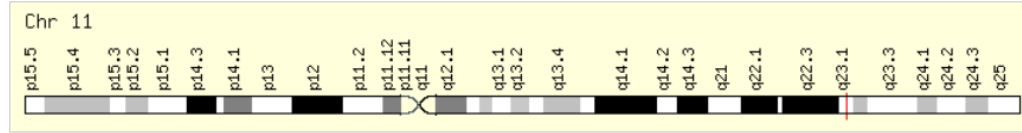
Tablo 5. SIK2'nin isimleri ve taksonomisi

Protein İsimleri	Önerilen isim: serine/threonine-protein kinase (SIK2) Alternatif isimler: Salt-inducible kinase 2 (SIK2) Serine/threonine-protein kinase SNF1-like kinase 2 qin-induced kinase
Gen isimleri	Adı: SIK2 Sinonimler: QIK, SNF1LK2, SIK-2, LOH11CR11
Organizma	Homo sapiens (insan)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Genomik Lokalizasyonu

11. Kromozomun uzun kolunun 23.1 bölgesinde yer almaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. SIK2 kromozomal lokalizasyonu (<http://www.genecards.org>)

Aşağıda Tablo 6'de SIK2'nin gen özellikleri verilmiştir.

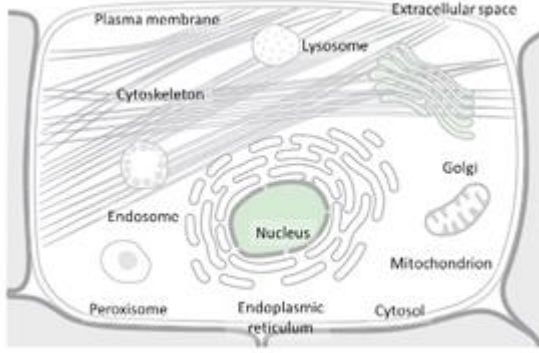
Tablo 6. SIK2 gen özellikleri

Tip	Fonksiyonel
Büyükölük	128,463 baz çifti
Oryantasyon	Pozitif zincir
Ekzon sayısı	17
Kromozomdaki pozisyonu	111,602,391- 111,730,853
Sitogenetik band	11q23.1

(<http://www.genecards.org>)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23235>)

Subselüler Lokalizasyonu



Şekil 8. SIK2'nin subselüler lokalizasyonu (<http://www.genecards.org>)

SIK2, yoğun olduğu bölgeden az olduğu bölgeye doğru sıralanırsa sırasıyla golgi, sitoplazma, nükleus, mitokondri ve plazma membranında lokalize olmaktadır. (Şekil 8) (<http://www.genecards.org>).

Enzim Sınıflaması

EC 2.7.11.1 (<http://www.uniprot.org>)

- EC 2.-.-.- Transferazlar
 - EC 2.7.-.- Fosfor grubunu transfer eden transferazlar
 - EC 2.7.11.- Serin/treonin protein kinazlar
 - EC 2.7.11.1 Non-spesifik serin/treonin protein kinaz

Reaksiyonu



Kofaktör olarak Mg^{2+} iyonunu kullanmaktadır. Thr-175'den fosforilasyon ile aktive olmaktadır (<http://www.uniprot.org>).

Genel Fonksiyonları

SIK2, insulinle uyarılan adipositlerde, insulin receptor substrate 1 (IRS1)'i Serin 794'den fosforile etmekte ve insülin sinyalinin transdüksiyon etkinliğini potansiyel olarak modüle etmektedir. CREB-spesifik koaktivatör olan CRTC'i fosforile ve repress ederek CREB aktivitesini inhibe etmektedir (<http://www.uniprot.org>).

SIK2, protein kodlayan bir gendir. SIK2 ile ilişkili yollar arasında glukoz/enerji metabolizması ve LKB1'in sinyal yolları yer almaktadır. Bu gen, protein serin/treonin kinaz aktivitesiyle birlikte magnezyum iyonu bağlama özelliğine de sahiptir. Bu genin önemli paraloğu MARK4'tür (<http://www.genecards.org>).

Moleküler Fonksiyonları

1. ATP bağlama: Önemli bir evrensel koenzim ve enzim regülatörü olan ATP ile selektif ve non-kovalent bir etkileşimde bulunmaktadır.

2. Magnezyum iyonu bağlama: Mg iyonlarıyla selektif ve non-kovalent etkileşimde bulunmaktadır.

3. Protein serine/threonine kinase aktivitesi: $ATP + \text{protein serin} = ADP + \text{serin fosfat}$ ve $ATP + \text{protein treonin} = ADP + \text{treonin fosfat}$ reaksiyonlarını katalizlemektedir.

(<http://www.uniprot.org>)

Biyolojik Fonksiyonları

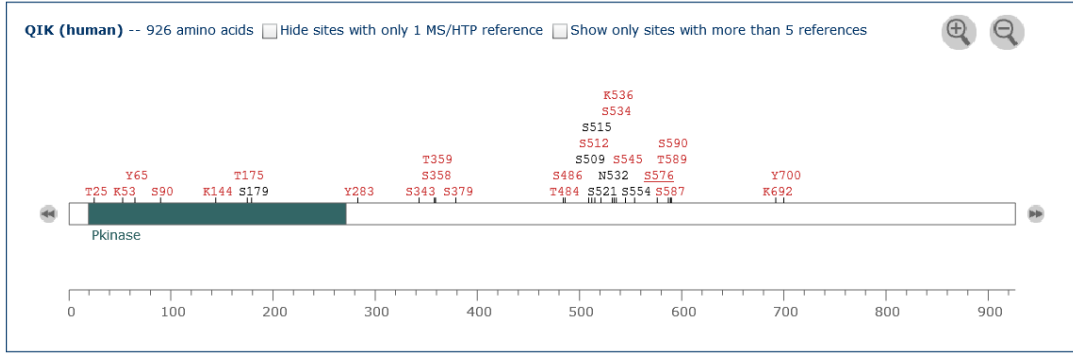
SIK2'nin biyolojik fonksiyonları aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- İnsulin reseptör sinyal yolağı
- İntraselüler sinyal transdüksiyonu
- Protein otofosforilasyonu
- Protein fosforilasyonu
- İnsulin reseptör sinyal yolağının regülasyonunda görev alır.

(<http://www.uniprot.org>)

Fosforillenme Bölgeleri

Aşağıda Şekil 9'da yer alan serin, treonin ve tirozin aminoasit rezidülerinden fosforillenmektedir.



Şekil 9. SIK2'nin fosforillenme bölgeleri (<http://www.phosphosite.org>)

Post Translasyonel Modifikasyonu

STK11/LKB1; STE20-related adapter-alpha (STRADA) pseudo kinaz ve CAB39 ile kompleks kurarak SIK2'yi Thr-175 rezidüsünden fosforile etmekte ve SIK2'nin aktivasyonuna yol açmaktadır. SIK2'nin Lizin 53'ten asetilasyonu kinaz aktivitesini inhibisyonuna neden olmaktadır. SIK2, HDAC6 tarafından deasetilasyona uğramaktadır (<http://www.uniprot.org>)

Mutasyonları

SIK2 genindeki olası mutasyonlar Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. SIK2 geninde meydana gelebilecek mutasyonlar

Pozisyon	Uzunluk	Sonuç
175	1	Treonin→Alanin: STK11 / LKB1 kompleksi tarafından fosforilasyonu ve aktivasyonunu önler.
175	1	Treonin→Glutamik asit: Yapısal olarak aktif.

(<http://www.uniprot.org>)

düzenlemektedir. NSF'nin ATPaz aktivitesini stimule etmekte ve otofajide rol oynamaktadır (117 aa).

CAMKK1; calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha; Calcium/calmodulin-bağımlı protein kinaz; birçok hücresel süreçte yer alan, kalsiyum tarafından tetiklenen bir sinyalizasyon kaskadıdır. Hücre apoptozunun düzenlenmesinde yer almaktadır. Hücrenin hayatta kalmasını, hücre ölümü antagonisti olan pro-apoptatik Bcl-2 genlerini inhibe eden Protein Kinase B'yi fosforilleyerek sağlamaktadır (520 aa).

STRADB; STE20-bağımlı kinaz adaptör beta; CAB39/MO25 (CAB39/MO25alpha veya CAB39L/MO25beta) ile kompleks oluşturan pseudokinaz, STK11/LKB1'e bağlanmakta ve aktive etmektedir. STRADB, aktif protein kinazların tipik kapalı konformasyonunu benimsemekte ve aktif bir konformasyon içinde STK11/LKB1 konformasyonel değişimlerini sağlayan bir pseudosubstrat olarak STK11/LKB1'e bağlanmaktadır (418 aa).

HDAC5; Histon deacetylase 5; kor histonlarının (H2A, H2B, H3 ve H4) N-terminal bölgesinde lizin kalıntılarının deasetilasyonundan sorumludur. Histon deasetilasyonu transkripsiyonel regülasyonda, hücre siklusunda ve gelişimsel olaylarda önemli bir role sahiptir (1123 aa).

PRKAB1; protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit; AMPK'nın non-katalitik alt birimi, bir enerji sensör protein kinazdır ve hücrenin enerji metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. İntraselüler ATP seviyelerinin azalmasına yanıt olarak AMPK, enerji üreten yolları aktive etmekte ve protein, karbohidrat, lipid biyosentezi, hücre büyümesi ve proliferasyonu gibi enerji tüketimi gerektiren süreçleri inhibe etmektedir (270 aa).

YWHAQ; tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide; adaptör protein olan YWHAQ, hem genel hem de özel sinyal yollarının geniş spektrumlu regülasyonunda yer almaktadır. Genellikle fosfoserin ya da fosfotreonin motiflerinin bağlanmasıyla çok sayıda yardımcı moleküle bağlanmakta ve 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1'in kinaz aktivitesini negatif olarak düzenlemektedir (245 aa).

PRKAB2; protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit (272 aa).

CAB39; calcium binding protein 39; bir kompleks bileşeni olarak STK11/LKB1'i aktive etmektedir. Kompleks içinde CAB39/MO25 (CAB39/MO25alpha ya da CAB39L/MO25beta) ve STK11/LKB1 arasındaki etkileşimi stabilize etmek için gereklidir (341 aa).

YWHAЕ; tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide (255 aa).

CETN3; centrin EF-hand protein 3; mikrotübül merkezi yapısının düzenlenmesinde ve fonksiyonlarında temel bir rol oynamaktadır (167 aa).

PRKAG2; protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit; AMP-activated protein kinase (AMPK)'nın AMP/ATP bağlayan subuniti; bir enerji sensör protein kinazdır ve hücrel enerji metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. İntraselüler ATP seviyelerinin azalmasına yanıt olarak AMPK, enerji üreten yolları aktive etmekte ve protein, karbohidrat, lipid biyosentezi, hücre büyümesi ve proliferasyonu gibi enerji tüketimi gerektiren süreçleri inhibe etmektedir (569 aa).

HSPA4; heat shock 70kDa protein 4 (840 aa).

IRS1; insulin receptor substrate 1; insülin ile birlikte birçok hücrel sürecin kontrolüne aracılık etmektedir. İnsülin reseptörü tarafından fosforile edildiğinde, fosfatidil inozitol 3-kinaz Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit (p85) subuniti gibi çeşitli hücrel proteinlere bağlanmaktadır. Düzenleyici p85 subunitine, bağlandığı zaman fosfatidilinozitol 3-kinazı aktive etmektedir (1242 aa).

YWHAZ; tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (245 aa).

CAMKK2; calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta (588 aa).

PRKAG1; protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit; protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit; AMP-activated protein kinase (AMPK)'nın; AMP/ATP bağlayan alt birimi bir enerji sensör protein kinazdır ve hücrel enerji metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. İntraselüler ATP seviyelerinin azalmasına yanıt olarak AMPK, enerji üreten yolları aktive etmekte ve protein, karbohidrat, lipid biyosentezi, hücre büyümesi ve proliferasyonu gibi enerji tüketimi gerektiren süreçleri inhibe etmektedir (340 aa).

STRADA; STE20-related kinase adaptor alpha (431 aa).

ACACB; acetyl-CoA carboxylase beta; ACACB yağ asidi biyosentezinin yerine yağ asidi oksidasyonunun regülasyonunda ya da malonil-CoA'nın oluşumunda etkilidir. Biotin karboksilaz ve karboksiltransferaz gibi fonksiyonları yürütmektedir (2458 aa).

ACACA; acetyl-CoA carboxylase alpha (2383 aa).

UBC; ubiquitin C (685 aa).

CRTC1; CREB regulated transcription coactivator 1 (650 aa).

VCP; valosin containing protein; mitoz sırasında golginin fragmentlere ayrılması ve mitoz sonrası birleşmesi için gereklidir. Transisyonel endoplazmik retikulum (tER) oluşumuna sebep olmaktadır. Endoplazmik retikulumdan, golgiyi meydana getirecek membranların transferi 50-70 nm boyutundaki geçiş vezikülleriyle meydana gelmektedir. tER'den vezikül oluşması ATP-bağımlı bir süreçtir (806 aa).

CRTC2; CREB regulated transcription coactivator 2; cAMP response element varyantlarıyla etkileşerek transkripsiyonu aktive eden CREB, için transkripsiyonel koaktivatördür. SIK/TORC sinyal yolağında koaktivatör olarak rol oynamaktadır. Defosforile olduğunda aktive forma geçmekte ve TAF4 RNA Polymerase II ile CREB'in etkileşimini arttırmaktadır. LKB1/AMPK/CRTC2 sinyal yolağının bir bileşeni olarak glukoneogenezi düzenlemektedir (693 aa).

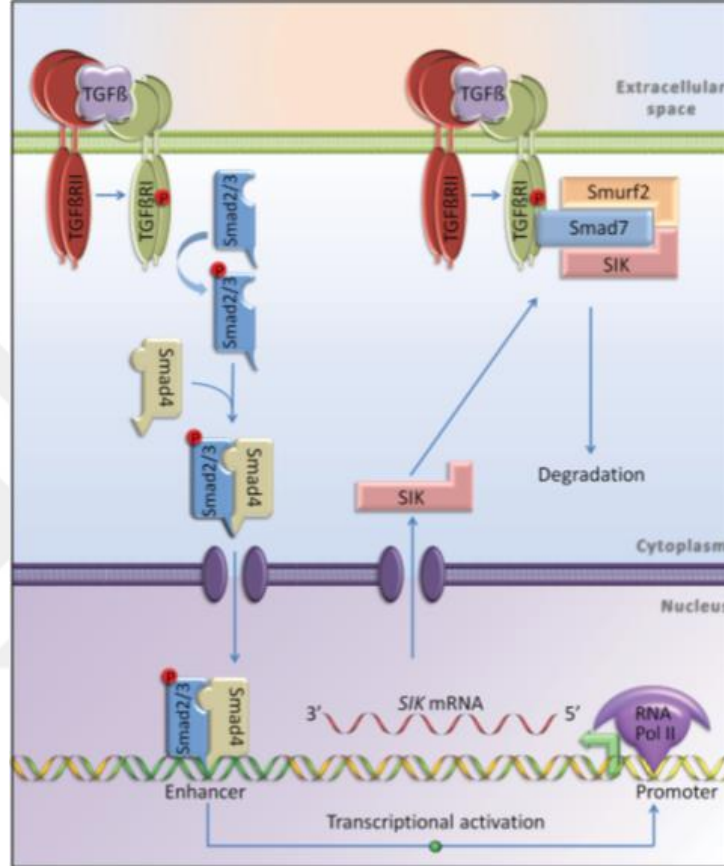
CEP250; centrosomal protein 250 kDa; hücre siklusunun interfaz safhasında sentrozomların birleşmesinde önemli bir role sahiptir (2442 aa).

PPP2CA; protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme; PP2A mikrotubule-associated proteinler için önemli bir fosfatazdır (309 aa) (<http://stringdb.org>).

TGF- β -SMAD-SIK İlişkisi

TGF- β sinyalinin negatif regülatörleri arasında hem negatif feedback mekanizması içerisinde çalışan hem de sinyal transdüksiyonun etki süresini ve şiddetini kontrol eden inhibitör SMAD Family Member 7 (Smad7) ve SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 2 (Smurf2) bulunmaktadır. TGFBR1 tarafından Smad2 ve Smad3 fosforilasyonunun yarışmalı inhibisyonuna yol açan Smad7, TGFBR1'e doğrudan bağlanmaktadır (Nakao ve ark., 1997; Hayashi ve ark., 1997) .

Aynı zamanda Smad7, Smurf2'ye ve onun homoloğu olan SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1'e doğrudan bağlanmakta ve böylece TGFBR1'in ubiquitinasyonuna ve de down regülasyonuna yol açmaktadır (Kavsak ve Rasmussen, 2000; Ebisawa ve ark., 2001)



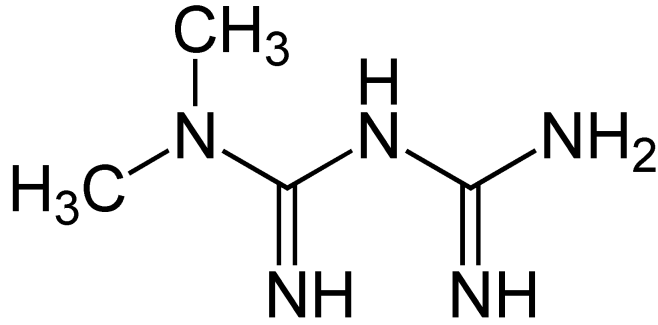
Şekil 11. TGF-β sinyali sürecinde SIK'in rolü

Şekil 11'de SIK, Smad7, Smurf2 ve TGFBR1/ALK5'i içeren bir protein kompleksinin oluşumu ve nükleusta SIK geninin transkripsiyonel indüklenmesine yol açan TGF-β reseptör-Smad yolağının grafiksel bir sunumu gösterilmektedir. Heterotetramerik TGFBR2/TGFBR1 reseptör kompleksinin ekstraselüler TGF-β'ya bağlı olduğu gösterilmektedir. Kırmızı daire içinde gösterilen P fosforilasyonu göstermektedir. Smad2 ve Smad3 proteinleri sade bir tanımlama için Smad2/3 şeklinde gösterilmektedir. DNA çift sarmalı üzerinde promoter ve hızlandırıcı (enhancer) sekanslar farklı renklendirmeye gösterilmiştir. RNA polimeraz II'nin promoter bölgede yer aldığı gösterilmektedir ve transkripsiyon yönü yeşil okla gösterilmektedir (Lönn ve ark., 2012).

SIK geni de TGF- β /Smad sinyalinin doğrudan bir hedef geni olup TGFBR1'i down regüle eden protein komplekslerine katılmaktadır. SIK geni TGF- β reseptör sinyalinin bir negatif regülatörü olarak gösterilmektedir (Kowenetz ve ark., 2008). TGF- β 'ya yanıt olarak yolaktaki tüm Smad'lar (Smad2,Smad3,Smad4) Smad7 ve SIK'in transkripsiyonel aktivasyonuna ve birikmesine neden olur. SIK'in kinaz aktivitesi ve Smurf2'nin ubiquitin ligaz aktivitesi Smad7'yi içeren protein komplekslerinin dinamiğini etkiler ve bir kompleks oluşturarak TGFBR1'in down regülasyonuna neden olurlar (Lönn ve ark., 2012).

2.5.1. Metformin ve Klinikteki Rolü

Metformin, tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan insülin duyarlı bir biguaniddir ve monoterapide kullanıldığında insülin ya da sülfonil üre gibi etkili olduğu gösterilmiştir (Hermann ve ark., 1994; DeFronzo ve Goodman, 1995; UKPDS, 1995; 1998; Johansen, 1999). Metforminin moleküler formülü Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. Metforminin moleküler formülü

Diyetle birlikte metformin, açlık kan glukoz konsantrasyonunu azaltmakta ve hemoglobin A1c değerlerinin %1,3-2,0 azalmasını sağlamaktadır (Hermann ve ark., 1994; DeFronzo ve Goodman, 1995; Garber ve ark., 1997; Davidson ve Peters, 1997; Johansen, 1999; Selby ve ark., 1999).

Metformin monoterapisinin etkinliğinin yaş, vücut ağırlığı, etnik köken, diyabet süresi, insülin ve C-peptid seviyelerinden bağımsız olduğu gösterilmiştir (Hermann ve ark., 1994; DeFronzo ve Goodman, 1995). Metformin, tip 2 diyabetli aşırı kilolu hastalarda özel faydalar sağlayabilmektedir. Sülfonil üre, insülin ve thiazolidinedionun aksine metformin vücut kütle indeksini etkilememektedir (Hermann ve ark., 1994). Diyabetli olan (Haupt ve ark., 1991; Johansen, 1999) ya da olmayan (Glueck ve ark., 1999; Pasquali ve ark., 2000) obez hastalarda vücut ağırlığını azaltmaktadır. Metforminle tedavi edilen abdominal ve viseral obeziteli kadınlarda, total vücut yağında ve viseral yağ miktarında önemli azalmalar gözlenmiştir (Pasquali ve ark., 2000). Paraintestinal bölgede lokalize olan aşırı yağ, kardiovasküler metabolik sendrom patogenezine kritik bir olumsuz katkı sağlamakta (Sowers, 1998; McFarlane ve ark., 2001). ve Metformin ile tedavi gören insüline dirençli kişilerde viseral yağ miktarında azalma (kilo kaybı ya da yağ redistribüsyonuna ikincil olarak) kardiyovasküler sistem açısından da fayda sağlayabilmektedir (Sowers, 1998; McFarlane ve ark., 2001). Kilo kaybı, muhtemelen metforminin gastrointestinal etkilerinden (örneğin, mide bulantısı ve ishal gibi) büyük ölçüde bağımsız olarak iştahın baskılanmasıyla (Haupt ve ark., 1991) net kalori alınımı azaltılması yoluyla gerçekleşmektedir (Yki-Ja ve ark., 1999). Azalmış insülin direnci ile ilişkili olarak hiperinsülinemideki bir azalma, insüline dirençli obez kişilerin kilo vermeleri üzerinde aditif bir etki sağlayabilmektedir (Sowers, 1998; McFarlane ve ark., 2001). 500-1500 mg dozlarında metformin, %50-60 arasında oral biyoyararlanıma sahiptir (Scheen, 1996). İlaç proteine bağlanmaya gereksinim duymamaktadır, bu nedenle ince bağırsak duvarında ki maksimal birikiminden sonraki dağılımı geniş bir hacime sahiptir (Wilcock ve Bailey, 1994). Metformin vücutta hiçbir modifikasyona uğramaz ve böbrek ekskresyonu ile hızlı bir şekilde (glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon yoluyla) değişmeden sekrete edilmektedir (Davidson ve Peters, 1997). Bozulmuş böbrek fonksiyonu ilacın eliminasyonunu yavaşlatmakta dolayısıyla metformin birikimine neden olabilmektedir (Lalau ve ark., 1989). H2-blokörü simetidin, özellikle renal klirensi azaltıp, biyoyararlanımı arttırarak kompetitasyonla metforminin renal tübüler sekresyonunu inhibe etmektedir (Scheen, 1996; Somogyi ve ark., 1987).

2.6.2. Metforminin Kanser Tedavisindeki Yeri

Metformin, yaygın olarak tip 2 diyabet tedavisi için reçete edilen bir ilaçtır. Son zamanlarda metformin, kanser tedavisi için potansiyel olarak yararlı bir tedavi edici madde olarak dikkat çekmektedir. Araştırmalar metforminle tedavi gören tip 2 diyabet hastalarının metformin kullanmayanlara göre kansere yakalanma risklerinin ve mortalitelerinin daha düşük olduğunu göstermektedir (Evans ve ark., 2005; Bowker ve ark., 2006; Libby ve ark., 2009). Meme kanserli diyabetik olgularda, metformin kullanan hastaların kullanmayanlara göre neoadjuvan kemoterapiye cevabının önemli ölçüde daha iyi olduğu gösterilmiştir (Jiralerspong ve ark., 2009). Preklinik hayvan modellerinde yapılan çalışmalar; kolon (Buzzai ve ark., 2007; Ben Sahra ve ark., 2008) meme (Hirsch ve ark., 2009; Liu ve ark., 2009; Anisimov ve ark., 2005) pankreas (Kisfalvi ve ark., 2009) ve akciğer (Algire ve ark., 2008) kanserlerinde metformin kullanımının tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir. Kimyasal kaynaklı meme karsinogenezinin fare modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada tümör büyümesi üzerine metforminin önemli bir etkisi bulunamamıştır (Bojkova, 2009). Melanoma kaynaklı olduğu düşünülen insan MDA-MB-435 hücre hattı ksenogreftlerinin kullanıldığı başka bir çalışmada metforminle muamelenin tümör büyümesini arttırdığı gözlenmiştir (Rae ve ark., 2007).

Metforminin kanser gelişimi ve tümör büyümesi üzerine inhibitör etkisinin mekanizmaları tamamen anlaşılamamıştır. Bu olay sistemik insülin ya da glukoz düzeyleri üzerine indirek bir etki ile (Goodwin ve ark., 2008; Pollak, 2008) ya da tümör hücresi büyümesi ve hayatta kalma yetenekleri üzerine doğrudan bir etki yoluyla gerçekleşebilmektedir. Kanser hücreleri üzerinde metforminin doğrudan etkileri hücre proliferasyonunun inhibisyonunu (Zakikhani ve ark., 2006; Dowling ve ark., 2007; İsakovic ve ark., 2007; Ben Sahra ve ark., 2008; Gotlieb ve ark. 2008; Zhuang ve Miskimins, 2006; Liu ve ark., 2009; Kisfalvi ve ark., 2009; Alimova ve ark., 2009; Phoenix ve ark., 2009) ve hücre ölümünün indüksiyonunu içermektedir (Buzzai ve ark., 2007; İsakovic ve ark., 2007; Gotlieb ve ark. 2008; Hirsch ve ark., 2009; Liu ve ark., 2009; Saito ve ark., 2009). Metforminle kanser hücre proliferasyonunun inhibisyonuna yanıt olarak AMPK aktivasyonu (Zakikhani ve ark., 2006; Dowling ve ark., 2007; İsakovic ve ark., 2007; Ben Sahra ve ark., 2008; Gotlieb ve ark. 2008; Zhuang ve Miskimins, 2008; Liu ve ark., 2009; Kisfalvi ve ark., 2009), mTOR ve protein translasyonunun inhibisyonu (Dowling ve ark., 2007) hücre siklusunun G fazında arreste neden olan siklin D1'in down regülasyonu

meydana gelmektedir (Ben Sahra ve ark., 2008; Liu ve ark., 2009; Alimova ve ark., 2009; Zhuang ve Miskimins, 2008). Bu çalışmalarda, metforminin apoptotik yolları aktive ederek hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Kefas ve ark., 2004; Buzzai ve ark., 2007; İsakovic ve ark., 2007; Liu ve ark., 2009;). LKB1, AMPK aktivasyonu için gerekli bir serin treonin protein kinazdır (Shaw ve ark., 2004; 2005). MCF-7 hücreleriyle yapılan bir çalışmada metforminin LKB1 üzerinden AMPK fosforilasyonunu doza bağımlı olarak arttırdığı gösterilmiştir (Dowling ve ark., 2007).

Kolon kanseri modelinde; metforminle stimüle apoptozun özellikle p53 bağımlı otofaji gelişimi ve glikolizin azalmasıyla ilişkili olduğu ve de nutrient yokluğu tarafından uyarıldığı gösterilmiştir (Buzzai ve ark., 2007). Diğer kültür sistemlerinde metformin, glukoz yoksunluğu (Dykens ve ark., 2008; Saito ve ark., 2009), sisplatin (Gotlieb ve ark. 2008), doksorubisin (Bae ve ark., 2007; Hirsch ve ark., 2009) ya da butiyonin sülfoksimin (Bae ve ark., 2007) ile kombine edildiğinde gelişmiş bir sitotoksosite göstermiştir. Son epidemiyolojik, klinik ve prelinik verilere dayanarak kanser tedavisi için metforminin potansiyel kullanımına artan bir ilgi görülmektedir (Goodwin ve ark., 2009). Bu bağlamda, hücre siklusunun arresti ve kanser hücrelerinin hücre ölümünü teşvik eden metforminin sinyal yollarının ve moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

3. MATERYAL – METOT

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

1. Santrifüj (MSE, MISTRAL 3000I, seri no: 5691/02/075, U.K.)
2. Santrifüj (Jouan, C4i, seri no: 30411037, France)
3. Mikropipetler Eppendorff 20, 100, 200, 1000, Germany).
4. Mikrosantrifüj (SIGMA 3K30, seri no: 76262, USA)
5. Mikrosantrifüj (Jouan A-14, seri no: 39903105, France)
6. 1,5 ml nükleaz içermeyen eppendorff (Cat No.616201 Grenier Bio-one, USA)
7. 0,2 ml PCR tüp (Cat No.683201 Grenier Bio-one, USA)
8. Derin dondurucu -70°C, (NUAIRE, Seri no: 9394248, USA)
9. Derin dondurucu -80°C, (NUAIRE, Seri no: Z17N-205195-ZN, USA)
10. Benmari (ASTEL, TIP J18 BAIN UNIVERSAL, N seri: 3940517, Jouan, France)
11. Benmari (Termal Lab. Aletleri, seri no: 821911, Türkiye)
12. Vorteks VM3, (Windaus, 3392, Germany)
13. LightCycler 480 II, (seri no: 28218, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
14. Laminar-flow (Nuair, Model no: Nu-425-400E, seri no: 116026070307, USA)
15. LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, (04729692001 white, lot: 09016400, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) Ultrasonic Cleaner, (seri no: 030607, Germany)
16. Ultrasonic Cleaner, (seri no: 030604, Germany)
17. Elektronik terazi (Chyo Balanced Corporation, JL-180, seri no: 300258, Japan)
18. Cellstar Tissue Culture Flask (25 cm²) kırmızı kapak (Cat No.690175 Grenier bio-one, Austria)
19. Cellstar Tissue Culture Flask (75 cm²) red filter cap, steril (Cat No.658175 Greiner bio-one)

20. 10 µl (cat. no. 765288), 20 µl (cat. no.774288) 100 µl (cat. no.772288), 200 µl, 1000 µl (cat. no.740288) pipet uçları, steril, (Grenier bio-one, Austria)
21. Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)
22. CO₂ inkübatör, (Sanyo MCO-17AIC, seri no: 00605796, Japan)
23. İnvvert mikroskop, (Nikon eclipse TS100, seri no: 0101743, Japan)
24. pH metre, (Microprocessor pH meter, EDT Instruments RE 357, 702 U.K.)
25. 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)
26. Pasteur pipet (LP Italiana SPA Milano, Italy)
27. 2 ml'lik kriyo tüp (greiner bio-one, LOT: 084901-94)
28. 1,5 ml'lik vial (Corning 430909, polypropylene, steril)
29. 50 ml'lik falkon tüp (Corning 430291, RNase/DNase free, polypropylene, steril)
30. 15 ml'lik falkon tüp (Corning 430766, RNase/DNase free, polypropylene, steril)

3.2. Kullanılan Kimyasallar

1. RPMI Medium, 1640, with L-Glutamin, with HEPES 25 mM 500 ml, (Cat. 01-106-1A, Biological Industries İsrail)
2. Metformin(Met), 1,1-Dimethylbiguanide Hydrochloride, %97, MW: 165,62, Sigma, D15,095-9
3. Fetal Bovine Serum (FBS), Heat inactivated, Sterile filtered, (Cat No: F7678 Sigma Aldrich, USA)
4. Tripsin-EDTA (%0.25 Tripsin, %0.02 EDTA) (Cat No; 03052-1B Biological Industries Kibbutz Beit Haemek, ISRAEL)
5. 10.000 Ü. Penisilin/10 mg Streptomisin 100X (Cat No; P0781, 100 ml, Sigma-Aldrich, USA)
6. 100 mM Sodium Pyruvate Solution (REF: 03-042-1B, 100 ml, Biological Industries)
7. Dimethylsulfoxid (DMSO) (MERCK-Schuchardt, Cat. No: 802912, Germany)
8. Phosphat Buffer Salin (PBS), 10 mM, pH 7.4

- NaCl, 136 mM (Merck, Cat. No: 6400) MW: 58,44 Germany)
- KCl, 2.7 mM (Merck, Cat. No: 4935) MW: 74,56 Germany)
- Na₂HPO₄, 10 mM (Merck, Cat. No: 6586) MW: 141,96 Germany)
- KH₂PO₄, 10 mM (Merck, Cat. No: 4871) MW: 136,09 Germany)
- 9. pH 4, pH 7, pH 10 kalibratörler (Orion Application Solution 910104, 910107, 910110 CAS Reg. No 7732-18-5, GmBh)
- 10. High-pure RNA isolation kit (Cat. No.11 828 665 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
- 11. Transcriptor first strand complementary DNA (cDNA) synthesis kit (Cat no. 04 379 012 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
- 12. LightCycler 480 Probe Master (04 707 494 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- 13. Human Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) forward-reverse (19/19 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL60, Cat No.04688589001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- 14. Human SIK1 forward-reverse (21/18) primer çifti-LNA Taqman probe seti (UPL77, Cat No. 04689003001 Roche Diagnostics GmbH, Berlin, Germany)
- 15. Human SIK2 forward reverse (20/20) primer çifti- LNA Taqman probe seti UPL18 Cat No. 04686918001 Roche Diagnostics GmbH, Berlin, Germany)

3.3. MCF-7 Hücre Kültürü

3.3.1. Hücre Kültür Solüsyonları

RPMI 1640 Medyum

- Biological Industries ISRAEL Beit Haemek LTD.
 - REF: 01-106-1A
 - Lot: 1550636
 - L-Glutamin ile 25 mM HEPES içerir
 - Likit, kullanıma hazır, 2-8 °C’de son kullanım tarihine kadar saklanabilir.
- Fetal Bovin Serum (FBS)
- Sigma Aldrich, 500 ml, USA

- Katalog No: F7678
- Isı ile inaktive edilmiş, steril filtre edilmiş, Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alikotlanarak -80 °C'de saklandı.

L- Na-pürivat, 100 mM

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Cat no: 03-042-1B
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 2'şer ml alikotlanarak -80 °C'de saklandı.

Tripsin-EDTA (% 0,25 tripsin, % 0,02 EDTA) 100 ml

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Katalog No: 03052-1B
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alikotlanarak -80 °C'de saklandı.

10.000 U Penisilin/10 mg Streptomisin

- Biological Industries 20 ml, ISRAEL Beit Haemek LTD.
- REF: 03-031-1C
- LOT: 1531284
- 1,5 ml'lik viallere 1'er ml olacak şekilde alikotlanarak -70 °C'ye kaldırıldı.

Fosfat Buffer Salin (PBS) 10 mM pH;7,4 1 L

PBS solüsyonu hazırlığında kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. PBS solüsyon hazırlığı

Madde	Miktar	Firma
NaCl 136 mM	8 g	Merck, cat. no.6400, S-12, Germany
KCl 2,7 mM	0,2 g	Merck, cat. no 4935, P-11, Germany
Na₂HPO₄, 10 mM	1,44 g	Merck, cat. no 6586, S-7a, Germany
KH₂PO₄, 2 mM	0,24 g	Merck, A997671 851, P-3, Germany
dH₂O	800 ml	

- 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ tartılarak 800 ml dH₂O ile çözünmesi sağlandı.
- pH 7,4'e ayarlanarak dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.
- 0.22 µm'lik filtre ile filtre edildi. Otoklavda sterilizasyonu yapıldı ve 2-8°C'de saklandı.

MCF-7 Hücre Kültür Komplet Medyum (KM) Hazırlığı

- FBS, -80°C'den 37°C'ye alınarak çözülmesi sağlandı.
- Penisilin/streptomisin stok solüsyonu, -80°C'den oda ısısına alınarak çözüldü.
- Na-Pürivat, 100 mM, -80°C'den 37°C'ye alınarak çözülmesi sağlandı.
- 40 ml RPMI 1640 KM hazırlanması için Tablo 10'daki miktarlardaki solüsyonlar laminer flow kabininde steril şartlara dikkat edilerek karıştırıldı.
- 0,22 µm'lik filtre ile steril 50 ml'lik falkon tüpe konuldu ve ışıktan koruyarak 2-8°C'de saklandı.

RPMI 1640 KM hazırlığında kullanılan kimyasallar ve volümleri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. MCF-7 RPMI 1640 KM hazırlığı

Madde	Volüm	Final konsantrasyon
FBS (fetal calf serum)	4 ml	% 10
Penisilin/Streptomisin, 100x	400 µl	% 1 (1x)
Na-Pürivat, 100 Mm	400 µl	% 1 (1 mM)
RPMI 1640	35200 µl	

- Belirtilen miktarlar steril 50 ml'lik falkon tüpe pipetlendi ve 0,22 µm'lik filtre ile filtre edildi.

RPMI 1640 Freeze-Medyum Hazırlığı, 10 ml

- RPMI 1640 KM benmaride 37°C sıcaklığa getirildi.
- Kültür şartlarında, hücreler dondurulmadan önce %10 DMSO olacak şekilde DMSO eklendi.

- Freeze-medyum sadece dondurulacak hücreler için kullanıldı.
- Taze hazırlandı.

RPMI 1640 Freeze-Medyum hazırlığında kullanılan kimyasallar, kimyasalların volümleri ve final konsantrasyonu Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. Freeze medyum

	Volüm	Final konsantrasyonu
RPMI 1640 KM	9 ml	% 90
DMSO	1 ml	% 10

3.3.2. MCF-7 Hücre Kültür Protokolleri

-80°C’de Dondurularak Saklanan Hücrelerin Çözülmesi

- -80°C’den çıkarılan vialdeki hücreler benmaride 37°C’de hızla çözüldü. 3 ml RPMI-1640 komplet medyum eklenip 200 xg’de, oda ısısında 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. Üzerine yaklaşık 2 ml komplet RPMI 1640 medyum eklenip, karıştırıldı.
- Hücreler pasteur pipeti ile 25 cm² flask’a pipetlendi ve üzerine RPMI 1640 KM eklenerek 5 ml’ye tamamlandı.
- CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

MCF-7 Hücrelerinin Pasajlanması

- Flasktaki hücreler %70-80 konflüe olduğunda pasajlama yapıldı.
- Flasktaki RPMI 1640 KM uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml steril PBS alınarak flaskaya aktarıldı ve yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile flaskı kaplayacak kadar Tripsin-EDTA flaskaya ilave edildi ve 3 dk süreyle CO₂ inkübatörde bekletildi.
- Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra pasteur pipeti ile Tripsin-EDTA’nın üzerine ~ 3-4 ml RPMI 1640 KM ilave edildi ve karıştırıldı.
- 15’lik falkon tüpe alındı.
- 200 xg’de, oda ısısında, 5 dk santrifüj edildi.

- Süpernatant atılarak 4 ml RPMI 1640 KM ile resüspanse edildi.
- 4 flaska ~1'er ml dağıtıldı ve RPMI 1640 KM ile 5 ml'ye tamamlandı.
- CO₂ inkübatöre alındı.
- 2 günde 1 medyum değişimi yapıldı

MCF-7 hücrelerinin dondurulması

- 25 cm²'lik flastaki MCF-7 hücreleri %80-90 konflü olduklarında flastın medyumunu uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml PBS eklenerek yıkandı.
- Pasteur pipeti ile yüzeyi kaplayacak kadar Tripsin-EDTA eklenerek 3 dk CO₂ inkübatörde bekletildi.
- Mikroskopta hücre ayrılması izlendikten sonra ~2-3 ml RPMI-1640 KM eklenerek hücreler 15'lik falkonda toplandı.
- 200 xg'de, oda ısısında 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp üzerine 3 ml RPMI 1640 Freeze-Medyum eklendi. Al/ver yapılarak homojenite sağlandı ve 3 tane 2 ml'lik kriyo tüpe bölündü.
- 5 dakika buz üzerinde bekletilip, ardından 2 saat -20⁰C'de bekletildi. Ardından ise sıvı azota kaldırıldı.

3.4. MCF-7 hücrelerinde RNA izolasyonu

Hücrelerin Flastlara Ekilmesi

1. Konflü olan (75 cm²'lik flast) MCF-7 (Pasaj 30) kültür hücrelerine ait flasttaki medyum boşatılır.
2. Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml steril PBS alınarak flastka aktarılır ve yıkanır. PBS uzaklaştırılır.
3. Pasteur pipeti ile flastı kaplayacak kadar tripsin-EDTA (%0,25-0,02) konulur.
4. 3 dakika CO₂ inkübatörde bekletilir.
5. Üzerine yaklaşık 8 ml RPMI KM medyum konulur.
6. Pasteur pipet ile bir-kaç kez al/ver yapılır.

7. Komplet RPMI 1640-hücre karışımı 15 ml'lik falkon tüpe pastör pipetle alınır.
8. 200 xg'de, oda ısısında, 5 dk santrifüj edilir.
9. Süpernatant atılarak 8 ml RPMI 1640 KM ile resüspanse edilir.
10. Yavaşça al-ver yapılarak hücrelerin eşit dağılımı sağlanır.
11. 8 ayrı 25 cm²'lik flaska her flaskta eşit hücre olacak şekilde ~1'er ml dağıtılır ve RPMI 1640 KM ile 5 ml'ye tamamlanır.
12. 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilir.
13. Hücreler yaklaşık olarak %60-70 konflüe olunca KM uzaklaştırıldıktan sonra 1X konsantrasyonda 5 ml hazırlanmış olan kimyasallar uygulanır.
14. 24. saat sonunda RNA izolasyon protokolü uygulanarak RNA izolasyonuna geçilir.

MCF-7 Hücreleri İçin Çalışma Medyumlarının Hazırlanması

Çalışma grupları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Çalışma grupları

1.Flask	2.Flask	3.Flask	4.Flask	5.Flask	6.Flask	7.Flask	8.Flask
Kontrol (RPMI-1640 KM)	10 ng/ml TGFβ-1	20mM Met	2,5mM Met	1,25 mM Met	20mM Met + 10 ng/ml TGFβ-1	2,5mM Met+ 10 ng/ml TGFβ-1	1,25 mM Met+ 10 ng/ml TGFβ-1

- **Kontrol:** 5ml RPMI-1640 KM 1 numaralı flaska eklendi.
 - **10 ng/ml TGFβ-1 İçeren RPMI 1640 KM hazırlama:** 25 ml KM içine 10 µg/ml TGFβ-1 stok solüsyondan 25 µl eklendiğinde 10 ng/ml TGFβ-1 içeren KM hazırlanmış oldu. Bu solüsyondan 5 ml 2 numaralı flaska eklendi.
 - **20 mM Metformin içeren KM Hazırlama**
- Molarite (M)= Mol (n) / Hacim (V)**
- Mol= kütle (m) / moleküler ağırlık (m_a)** formüller dikkate alınarak aşağıdaki hesaplama yapılmıştır.

$$20 \times 10^{-3} \text{ M} = n / 10 \times 10^{-3} \text{ L}, n = 200 \times 10^{-6} \text{ mol} = m / 165,62 \text{ g} \quad m = 33,124 \text{ mg}$$

33,124 mg Metformin tartıldı ve 10 ml KM içinde çözüldü. 20 mM metformin içeren stok solüsyon hazırlanmış oldu. Ardından 0,22'lik filtre ile filtre edildi. Bu solüsyondan 5 ml 3 numaralı flaska eklendi.

- **2,5 mM Metformin içeren KM Hazırlama**

20 mM'lık KM'dan 1,25 ml alınarak üzeri 10 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan 5 ml 4 numaralı flaska eklendi.

- **1,25 mM Metformin içeren KM Hazırlama**

2,5 mM'lık KM'dan 2,5 ml alınarak üzeri 5 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan 5 ml 5 numaralı flaska eklendi.

- **20 mM Metformin +10 ng/ml TGFβ-1 içeren KM hazırlama**

$$20 \times 10^{-3} \text{ M} = n / 10 \times 10^{-3} \text{ L} \quad n = 200 \times 10^{-6} \text{ mol} = m / 165,62 \text{ g} \quad m = 33,12 \text{ mg}$$

33,12 mg Metformin tartıldı ve 10 ml 10 ng/ml TGFβ-1 içeren KM içinde çözüldüğünde 20 mM metformin + 10 ng/ml TGFβ-1 içeren solüsyon hazırlanmış oldu ve filtre edildi. Bu solüsyondan 5 ml 6 numaralı flaska eklendi.

- **2,5 mM metformin + 10 ng/ml TGFβ-1 içeren KM hazırlama**

20 mM metformin + 10 ng/ml TGFβ-1 içeren KM'dan 1 ml alındı ve üzerine 10 ng/ml TGFβ-1 içeren RPMI 1640 KM ile 8 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan 5 ml 7 numaralı flaska eklendi.

- **1,25 mM metformin + 10 ng/ml TGFβ-1 içeren KM hazırlama**

2,5 mM metformin + 10 ng/ml TGFβ-1 içeren KM'dan 2,5 ml alındı ve üzerine 10 ng/ml TGFβ-1 içeren RPMI 1640 KM ile 5 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan 5 ml 8 numaralı flaska eklendi.

İlaç dozlarının uygulanmasının ardından takip edilecek olan gen ekspresyon çalışması Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13. Gen Ekspresyon Çalışma Planı

FLASK 25cm ²			
RNA izolasyonu 100 µl			
RT (cDNA) 50 µl		RT(cDNA) 50 µl	
PCR	PCR	PCR	PCR

RNA İzolasyon Protokolü

High Pure RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolatları elde edildi.

RNA izolasyon protokolü Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo 14. RNA izolasyon protokolü

High Pure RNA izolasyon protokolü	
	Protokol MCF-7 hücre kültüründen elde edilen örneklere uygulanacaktır.
1.	Flasklardaki medyum pasteur pipet ile tabana değmeden uzaklaştırılır.
2.	Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml 37 °C’ye ısıtılmış steril PBS alınarak flaska aktarılır ve 1 kez yıkanır. PBS uzaklaştırılır.
3.	Pasteur pipeti ile flaskı kaplayacak kadar Tripsin-EDTA flaska ilave edilir
4.	Flask 3 dakika CO ₂ inkübatörde bekletilir.
5.	Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra pasteur pipeti ile Tripsin-EDTA’nın üzerine ~ 1 ml RPMI 1640 komplet medyum ilave edilir ve karıştırılır.
6.	Hücre medyum karışımı 2 ml’ lik eppendorfa alınır.
7.	Eppendorflar 600 g’ de 5 dakika 8 °C’de santrifüj edilir.
8.	Süpernatant atılır.
9.	Hücreler, 200 µl PBS ile resüspanse edilir.
10.	Lysis/-Binding Buffer’dan 400 µl (yeşil kapak) eklenir ve 15 s. vortekslenir.
11.	Numuneyi High Pure filtrelili tüpe transfer etmek için: <ul style="list-style-type: none">• High filtrelili tüp, toplayıcı tüpe yerleştirilir.• Numunenin tamamı filtrelili tüpe pipetlenir (maksimum 700 µl).
12.	<ul style="list-style-type: none">• Numuneler oda sıcaklığında, 1 dakika, 14000 rpm’de santrifüj edilir.
13.	Santrifüj sonrası: <ul style="list-style-type: none">• Toplayıcı tüpten artık uzaklaştırılır ve filtrelili tüp tekrar yerleştirilir.
14.	Filtrelili tüp yerleştirildikten sonra: <ul style="list-style-type: none">• Steril bir reaksiyon tüpüne her numune için 90 µl DNase Incubation Buffer (beyaz kapak) pipetlenir, üzerine 10 µl DNase I eklenerek karıştırılır. Solüsyon filtrelili tüpe transfer edilir.• 15 dakika, +15 +25°C’de inkübe edilir.
15.	<ul style="list-style-type: none">• Filtrelili tüpe 500 µl Wash Buffer I pipelenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm’de santrifüj edilir.• Artık uzaklaştırılır ve filtrelili tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.

16.	<ul style="list-style-type: none"> Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm’de santrifüj edilir. Artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.
17.	<ul style="list-style-type: none"> Filtreli tüpe 200 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlenir ve oda sıcaklığında 2 dakika maksimum hızda (~14000 rpm) santrifüj edilerek gerideki Wash buffer’ın uzaklaşması sağlanır. ✓ Ekstra santrifügasyon ile rezidü wash bufferın uzaklaşması sağlanır.
18.	<ul style="list-style-type: none"> Toplayıcı tüp atılarak filtreli tüp temiz, steril 1,5 ml’lik mikro-santrifüj tüpüne yerleştirilir.
19.	<p>RNA’yı elüe etmek için:</p> <ul style="list-style-type: none"> Filtreli tüpe 100 µl Elution Buffer pipetlenir. Oda sıcaklığında 1 dakika, 14000 rpm’de santrifüj edilir.
20.	<ul style="list-style-type: none"> Mikrosantrifüj tüpte biriken elüe RNA’dır. Elüe RNA direk RT-PCR için kullanılır ya da –80°C’de daha sonra analiz edilmek üzere saklanır.

RNA izolasyon çalışmasında kullanılan solüsyonların hazırlığı Tablo 15’te verilmiştir.

Tablo 15. RNA izolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlığı

İçerik	Rekonstitüsyon/Hazırlama	Saklama /Stabilite	Kullanım alanı
DNase 1	DNase I, 0,55 ml Elüsyon Buffer içinde çözülür.	Alikotlanır ve –15 –25 °C’de saklanır. 12 ay stabildir.	DNA kontaminasyonunu engellemek için kullanılır.
Wash Buffer 1	20 ml absöüt etanol, Wash Buffer I üzerine eklenir ve iyice karıştırılır. Etanol eklendiği tarih şişenin üzerine not edilmelidir.	15 –25 °C’de saklanır. Kitin üzerindeki son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.
Wash Buffer II	40 ml absöüt etanol, Wash Buffer II üzerine eklenir ve iyice karıştırılır. Etanol eklendiği tarih şişenin üzerine not edilmelidir.	15–25 °C’de saklanır. Kitin üzerindeki son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.

3.5. Gen Ekspresyon Çalışması

3.5.1. MCF-7 Hücre RNA izolatlarından cDNA sentezi

Transcriptor first strand cDNA synthesis kiti (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak Thermal Cycler cihazında Tablo 16’da gösterilen protokol ile cDNA sentezi yapıldı.

Her bir RNA izolatından Revers Transkriptaz ile 2’şer tane cDNA elde edildi.

Tablo 16. cDNA sentez protokolü

Thermal Cycler’da cDNA sentez Protokolü																							
1.	<ul style="list-style-type: none">Kullanmadan önce tüm reaktifler çözölmelidir.Protokol uygulamadan önce tüm reaktifler kısa süreli santrifüj edilmelidir.Reaksiyon düzenlenirken tüm reaktifler buz üzerinde tutulmalıdır.																						
2.	<ul style="list-style-type: none">Buz üzerinde ya da soğuk kolon üzerinde tutulan steril, nuclease-free, thin-walled PCR tüpte, aşağıdaki sırada pipetleme yapılarak template-primer karışımı reaksiyon başına 50 µl olacak şekilde hazırlanır.<ul style="list-style-type: none">➤ RNA numunesine daima eldiven ile temas edilmelidir. <p>Template-primer miks (1 reaksiyon için)</p> <p>Her bir örnek için kullanılan total RNA ve PCR-grade distile su miktarları final konsantrasyonu 1 µg total RNA olacak şekilde düzenlenir.</p> <table border="1"><thead><tr><th></th><th>Komponent</th><th>Hacim</th><th>Final konsantrasyonu</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>PCR-grade distile su</td><td>25 µl</td><td>Total hacmi oluşturmak için = 32,5 µl</td></tr><tr><td>2</td><td>Total RNA</td><td>5 µl</td><td>1 µg total RNA</td></tr><tr><td>3</td><td>Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl</td><td>2,5 µl</td><td>2,5 µM</td></tr><tr><td></td><td>Total Hacim</td><td>32,5 µl</td><td></td></tr></tbody></table>		Komponent	Hacim	Final konsantrasyonu	1	PCR-grade distile su	25 µl	Total hacmi oluşturmak için = 32,5 µl	2	Total RNA	5 µl	1 µg total RNA	3	Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl	2,5 µl	2,5 µM		Total Hacim	32,5 µl			
	Komponent	Hacim	Final konsantrasyonu																				
1	PCR-grade distile su	25 µl	Total hacmi oluşturmak için = 32,5 µl																				
2	Total RNA	5 µl	1 µg total RNA																				
3	Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl	2,5 µl	2,5 µM																				
	Total Hacim	32,5 µl																					
3.	<ul style="list-style-type: none">Template-primer karışımı içeren tüp 10 dakika 65 °C’de termal cycluser cihazında tutularak denatürasyon sağlanır.Bu basamak RNA sekonder yapısının denatürasyonunu sağlar.Bu amaçla GeneAmp 9700 Thermal Cycler, ‘cdna1’ programı kullanıldı.Tüp daha sonra acele olarak soğutulmuş alüminyum bloğa alınır																						

4.	Template-primer karışımını içeren tüpe sırasıyla aşağıdaki maddeler pipetlenir.																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Komponent</th> <th>Hacim (1 reaksiyonluk)</th> <th>Final kons.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Transkriptör Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer, 5×kons.</td> <td>10 µl</td> <td>1×(8mM MgCl₂)</td> </tr> <tr> <td>Protektör RNaz İnhibitör, 40 U/µl</td> <td>1,25 µl</td> <td>20 U</td> </tr> <tr> <td>Deoksinükleotid Miks, 10 mM her biri</td> <td>5 µl</td> <td>1 mM her biri</td> </tr> <tr> <td>Transkriptör Revers Transkriptaz 20 U/µl</td> <td>1,25 µl</td> <td>10 U (reaks başına)</td> </tr> <tr> <td>Total Hacim</td> <td>17,5 µl</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Final Hacim</td> <td>50 µl</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Komponent	Hacim (1 reaksiyonluk)	Final kons.	Transkriptör Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer, 5×kons.	10 µl	1×(8mM MgCl ₂)	Protektör RNaz İnhibitör, 40 U/µl	1,25 µl	20 U	Deoksinükleotid Miks, 10 mM her biri	5 µl	1 mM her biri	Transkriptör Revers Transkriptaz 20 U/µl	1,25 µl	10 U (reaks başına)	Total Hacim	17,5 µl		Final Hacim	50 µl	
Komponent	Hacim (1 reaksiyonluk)	Final kons.																				
Transkriptör Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer, 5×kons.	10 µl	1×(8mM MgCl ₂)																				
Protektör RNaz İnhibitör, 40 U/µl	1,25 µl	20 U																				
Deoksinükleotid Miks, 10 mM her biri	5 µl	1 mM her biri																				
Transkriptör Revers Transkriptaz 20 U/µl	1,25 µl	10 U (reaks başına)																				
Total Hacim	17,5 µl																					
Final Hacim	50 µl																					
5.	<ul style="list-style-type: none"> Tüpteki reaktifler iyice karıştırılır. Vorteks yapılmamalıdır! Tüp termal Cycler cihazına yerleştirilir. 																					
6.	<ul style="list-style-type: none"> 60 dakika, 50°C'de inkübasyona bırakılır. Transcriptor Reverse Transcriptase inaktivasyonu için tüp, 85°C'de 5 dakika bekletilir. GeneAmp 9700 Thermal Cycler cihazında 'cdna-oligo-trans' programı kullanıldı. 																					
7.	<ul style="list-style-type: none"> Tüp buz üzerine alınarak reaksiyon durdurulur. Bu noktada reaksiyon tüpü +2 +8°C'de 1-2 saat ya da -15 -25°C'de daha uzun süre saklanabilir. 																					
8.	<ul style="list-style-type: none"> cDNA purifikasyona gerek olmadan PCR için kullanılabilir. PCR için bir LightCycler® aleti için 20 µl reaksiyon hacmi içinde 2-5 µl cDNA kullanılmalıdır. 																					

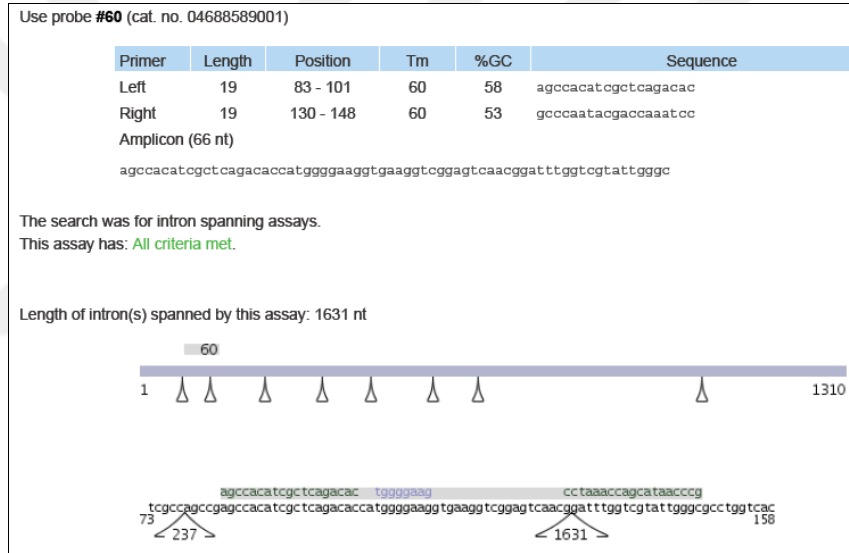
3.5.2. Biyoinformatik analiz

İyi düzenlenmiş primerler ve prob lar doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon sağlamakta ve genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilmektedirler. Primer ve prob ların düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır. Primer ve prob dizaynında dikkat edilecek başlıca noktalar şunlardır.

- Tm dereceleri, primer için 58-60°C, prob için 68-70°C olmalı.
- G-C içerikleri % 30-80 aralığında olmalı.
- Primerler 15-30 baz uzunluğunda olmalı.
- Primerin 3' ucundaki son 5 nükleotitteki total G-C içeriği 2'yi aşmamalı.

- Maksimum amplikon büyüklüğü 400 bp’i aşmamalı (ideali 50-150 bp).
- Problar ardışık benzer nükleotit içermemeli (özellikle 4 veya daha fazla G).
- Problardaki %30-80 aralığındaki G-C içeriğinde C, G’den fazla olmalı.
- Probların 5' ucunda G olmamalı

Çalışmada Referans gen olarak Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. GAPDH ekspresyonunun belirlenmesi için primer-prob dizaynı, Roche Universal Probe Library (UPL) programı kullanılarak yapıldı. BLAST (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Aşağıdaki şekillerde primer-prop dizaynları görülmektedir (Şekil 13, 14, 15).



Şekil 13. GAPDH primer-prob dizaynı (GAPDH UPL prob 60:tggggaag)

Use probe #77 (cat. no. 04689003001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	21	853 - 873	60	48	catcccccttcttcgatgtctca
Right	18	926 - 943	59	56	gattctggggcgatgggtgat
Amplicon (91 nt)					
catcccccttcttcgatgtctcaagactgtgagagcctgatccgccgatgctgggtgggacccccgccaggcgcatcaccatcgcccagata					

The search was for intron spanning assays.
This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 550 nt



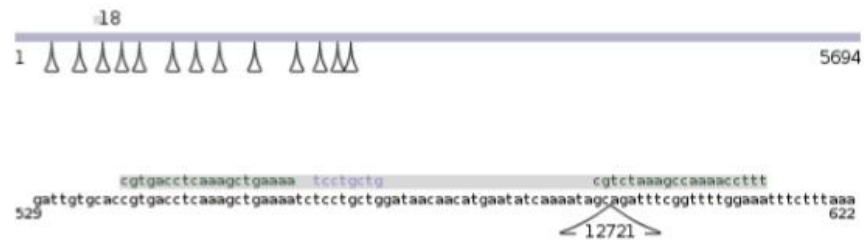
Şekil 14. SIK1 primer-prob dizaynı (SIK1 UPL prob 77)

Use probe #18 (cat. no. 04686918001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	539 - 558	59	45	cgtgacctcaaaagctgaaaa
Right	20	593 - 612	60	40	tttccaaaaccgaaatctgc
Amplicon (74 nt)					
cgtgacctcaaaagctgaaaaatctcctgctggataaacaacatgaatatcaaaatagcagatttcggttttgaaaa					

The search was for intron spanning assays.
This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 12721 nt



Şekil 15. SIK2 primer-prob dizaynı (SIK2 UPL prob 18: cagcagga)

3.5.3. Q-PCR Çalışması

Quantitative (Q-PCR) çalışmasında relatif gen ekspresyon analizi yapılırken dikkat edilmesi gereken konular:

1. RNA izolasyonu High Pure RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmalı ve elüsyon hacmi hücre sayısı az ise RNA dilüsyonunu önlemek amacıyla düşük volümlerle yapılmalı (~ 50 µl)
2. İzolasyon sonrası RNA'lar nanospektrofotometre ile ölçülerek cDNA sırasında kullanılacak RNA miktarı belirlenmeli. Eğer düşük miktarda RNA izole edilmişse cDNA sentezi sırasında olabildiğince yüksek RNA kullanılmalı.
3. cDNA sentezi için kullanılacak RNA konsantrasyonları, farklı gruplar arasında birbirine yakın olmalıdır. Gerekirse RNA dilüsyonu yapılarak yakın konsantrasyonlara getirilebilir.
4. cDNA sentezi Transkriptör First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak yapılmalı.
5. cDNA sentezi oligod(T) primer kullanılarak, her bir mRNA'ya ait tek bir cDNA sentezi sağlanarak daha spesifik yapılabilir. (Random heksamer ile bir mRNA'dan birkaç cDNA oluşabilir).
6. Düşük konsantrasyondaki RNA kullanılarak yapılan cDNA sentezinde Random heksamer kullanılarak verim artırılabilir.
7. Quantitative PCR (QPCR)'da kullanılacak primer ve probler Roche UPL programı kullanılarak dizayn edilebilir.
8. Kullanılacak primerler sipariş edilmeden önce mutlaka biyoinformatik analize tabi tutulmalı.
9. Primerler 100 pmol/µl olacak şekilde sulandırıldıktan sonra alikotlanarak saklanmalı. PCR çalışılacağı zaman alikot 10 pmol/µl'e dilüe edilerek kullanılmalı.
10. Problar tekrarlayan dondur-çözümlerden kaçınmak için alikotlanarak saklanmalı.
11. Normalizasyon için kullanılacak referans genin ekspresyonu, hücrenin maruz kaldığı koşullardan etkilenmeden eksprese olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan 'housekeeping gen'lerden en sık kullanılanları GAPDH, β-actin, siklofilin ve 28S ribozomal RNA'dır.
12. Seçilen referans gen, çalışılacak genin ekspresyon düzeyine yakın olmalıdır. Örneğin yüksek oranda eksprese olan bir gen için düşük düzeylerde ekspresyonu olan bir referans gen uygun değildir.

13. Yapılan çalışmada numuneler standart deviasyonun hesaplanabilmesi için en az 3 tekrarlı olarak çalışılmalı.
 14. Çalışılacak olan her bir gen background hesabında yanlışlığa yol açmaması için mutlaka ayrı pleytte çalışılmalı veya aynı pleytte çalışılacaksa ayrı ayrı subsetler tanımlanarak çalışılmalı.
 15. QPCR relative kantitasyon komparatif crossing point (CP) Metodu ($\Delta\Delta CP$ metodu) ile çalışılacaksa Efficiency mutlaka 2'ye ayarlanmalı.
 16. 15 CP'nin altı ve 40 CP'nin üzeri analizde değerlendirmeye alınmamalıdır. 35-40 CP gri zondur gen ekspresyonu çok düşük düzeydedir ve "0" kabul edilebilir.
- Yapılan çalışmada her bir cDNA'dan 2'şer tane QPCR çalışılarak her bir ilaç grubu 4 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

GAPDH için Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 μ l olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo 17).

Tablo 17. GAPDH Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim (1 numune için)	Hacim (34 numune için)	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su	5,8 μ l	197,2 μ l		
GAPDH Forward Primer	1 μ l	34 μ l	10 μ M	0,5 μM
GAPDH Reverse Primer	1 μ l	34 μ l	10 μ M	0,5 μM
LNA Hidroliz Prob (LNA 60)	0,2 μ l	6,8 μ l	10 μ M	0,1 μM
LC 480 Prob Master	10 μ l	340 μ l	2X	1X
Toplam Hacim	18 μl			

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er μ L master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 2'şer μ L cDNA Template pipetlendi.
- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

GAPDH Q-PCR programı aşamaları Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18. GAPDH Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 °C	10 dk	None
Amplifikasyon	45	95 °C	10 sn.	Quantification
		55 °C	15 sn	
		72 °C	1 sn	
Soğutma	1	40 °C	10 sn.	None

SIK1 için Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo 19).

Tablo 19. SIK1 Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim (1 numune için)	Hacim (34 numune için)	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su	5,8 µl	197,2 µl		
SIK1 Forward Primer	1 µl	34 µl	10 µM	0,5 µM
SIK1 Reverse Primer	1 µl	34 µl	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (Prob 77)	0,2 µl	6,8 µl	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µl	340 µl	2X	1X
Toplam Hacim	18 µl			

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18’er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 2’şer µL cDNA Template pipetlendi.
- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg’de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

SIK1 Q-PCR programı aşamaları Tablo 20’de verilmiştir.

Tablo 20. SIK1 Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 °C	10 dk	None
Amplifikasyon	45	95 °C	10 sn.	Quantification
		55 °C	15 sn	
		72 °C	1 sn	
Soğutma	1	40 °C	10 sn.	None

SIK2 için Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo 21).

Tablo 21. SIK2 Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim (1 numune için)	Hacim (34 numune için)	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su	5,8 µl	197,2 µl		
SIK2 Forward Primer	1 µl	34 µl	10 µM	0,5 µM
SIK2 Reverse Primer	1 µl	34 µl	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (prob 18)	0,2 µl	6,8 µl	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µl	340 µl	2X	1X
Toplam Hacim	18 µl			

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 2'şer µL cDNA Template pipetlendi.
- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

SIK2 Q-PCR programı aşamaları Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22. SIK2 Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 °C	10 dk	None
Amplifikasyon	45	95 °C	10 sn.	Quantification
		55 °C	15 sn	

		72 °C	1 sn	
Soğutma	1	40 °C	10 sn.	None

Çalışma gruplarının relatif gen ekspresyon analizi, GAPDH geni referans gen ve kontrol grubu da kalibratör olarak kabul edilerek, komparatif crossing threshold (Ct) metodunu esas alan QIAGEN 2009 relative expression software (REST) programı kullanılarak yapıldı.

3.6. Komparatif Ct Metodu ile Gen Ekspresyon Analizi

Relatif kantitasyon

Gen ekspresyonunun relatif kantitasyonu, farklı dokulardaki spesifik genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıkları belirlemeye izin verir. Bu farklılık, absölu kantitasyonda olduğu gibi bir değer olarak değil, n-katı şeklinde ifade edilir. Real-time PCR kantitasyonunda hedef numunenin başlangıç miktarındaki küçük farklılıklar, amplifikasyon ürününe katlanarak yansır. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlanan reaksiyonlarda izlenir. Bu relatif kantitasyonda yanlış sonuçlara sebep olur. Bir internal kontrol kullanılarak bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek bu yüzden çok faydalıdır. İdeal bir internal kontrol tüm dokulardan ekspresse olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan ‘housekeeping gen’ler ökaryotlarda çok çeşitli olmakla birlikte en sık GAPDH, β actin, Asidik ribozomal fosfoprotein (36B4) ve rRNA kullanılmaktadır(Bernard ve ark., 1999). Bu genler referans gen olarak da isimlendirilmektedir. Çalışmamızda referans gen olarak GAPDH kullanıldı.

Komparatif Ct (Threshold Siklus) Metodu

$\Delta\Delta Ct$ metodu olarak da isimlendirilen bu metot, standart eğri metoduna benzer ancak konsantrasyonların yerine Ct değerleri kullanılır. Hedef genin Ct değeri bir referans genin Ct değerine oranlarak normalize edilir. Daha sonra normalize Ct değerleri kalibratöre oranlanır. Sonuçlar kalibratörün n-katı şeklinde verilir. Komparatif Ct metodu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile ifade edilir. Burada:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{hedef gen}) - \Delta Ct(\text{kalibratör})$$

$$\Delta Ct(\text{hedef gen}) = Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen})$$

$$\Delta Ct(\text{kalibratör}) = Ct(\text{kalibratör}) - Ct(\text{referans gen})$$

Karşılaştırmalı Ct metodunun uygulanabilirliği validasyon (relatif verimlilik) çalışması ile değerlendirilir. Bunun için iki şart gereklidir: Birincisi, hedef gen amplifikasyonunun verimliliği ile referansın gen amplifikasyon verimliliğinin yaklaşık eşit ve %100'e yakın olmasıdır. İkincisi de farklı başlangıç konsantrasyonlarında ΔCt değerinin değişmemesi yani logaritmik konsantrasyona karşı ΔCt grafiğinde slope değerinin sıfıra yakın ($<0,1$) olmasıdır (Wong ve Medrano, 2005).



4. BULGULAR

MCF-7 Hücrelerinde RNA Konsantrasyon Ölçümü

MCF-7 hücrelerinden RNA izole edildi, nanofotometre ile ölçüm yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo 23' de gösterilmiştir.

Tablo 23. MCF-7 hücrelerinin RNA kantitasyonu

MCF-7 RNA	Konsantrasyon µg/ml	A 260	A 280	A 260/280	A 260/230
KONTROL	97,9	2,447	1,200	2,04	1,94
10 ng/ml TGF-β	67	1,676	0,923	1,82	0,99
1.25 mM Metformin	43,1	1,076	0,615	1,75	0,87
2.5 mM Metformin	54,3	1,356	0,647	2,10	1,88
20 mM Metformin	23,7	0,593	0,514	1,15	0,31
1.25 mM Metformin+10 ng/ml TGF-β	30,8	0,769	0,484	1,59	0,63
2.5 mM Metformin+10 ng/ml TGF-β	31,1	0,776	0,429	1,81	0,96
20 mM Metformin+10 ng/ml TGF-β	23,4	0,586	0,357	1,64	0,66

Kantitatif Real Time-PCR Sonuçları

Farklı çalışma gruplarındaki GAPDH, SIK1 ve SIK2 gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için MCF-7 hücreleri ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri Tablo 24'de gösterilmiştir.

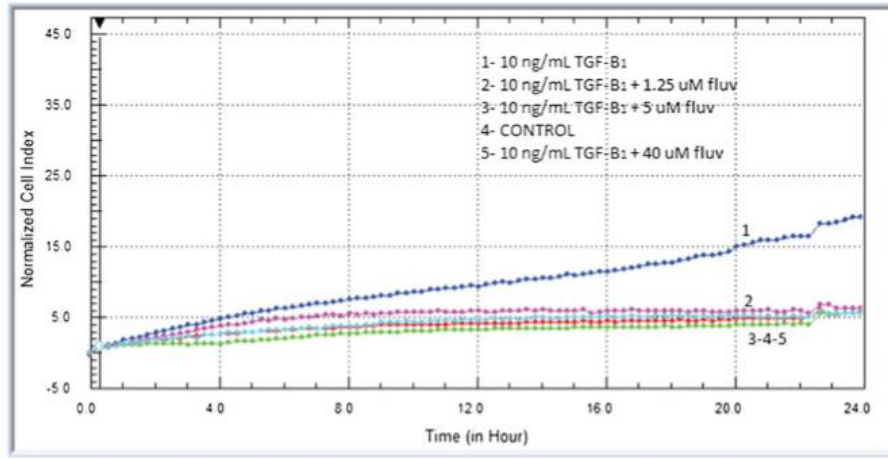
Tablo 24. MCF-7 ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri

	GAPDH	SIK1	SIK2
KONTROL	22,78	23,6	27,9
KONTROL	23,31	23,64	27,82
KONTROL	23,1	23,6	27,87
KONTROL	23,91	23,63	27,92
10 ng/ml TGF-β	23,43	23,29	27,87
10 ng/ml TGF-β	23,76	23,32	27,9
10 ng/ml TGF-β	23,55	23,2	27,82
10 ng/ml TGF-β	23,64	23,19	27,89
1.25 mM Metformin	24,34	24,77	28,5
1.25 mM Metformin	24,31	24,11	28,35
1.25 mM Metformin	24,6	24,34	28,57
1.25 mM Metformin	24,59	24,22	28,55

2.5 mM Metformin	23,86	23,4	27,87
2.5 mM Metformin	23,8	23,47	27,87
2.5 mM Metformin	23,97	23,33	27,76
2.5 mM Metformin	23,89	23,39	27,86
20 mM Metformin	25,27	24,02	28,48
20 mM Metformin	25,62	23,97	28,34
20 mM Metformin	25,8	24,14	28,25
20 mM Metformin	25,15	24,06	28,36
1.25 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	24,71	23,27	28,43
1.25 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	24,82	23,28	28,34
1.25 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	24,71	23,31	28,54
1.25 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	24,67	23,24	28,43
2.5 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	24,58	22,98	27,85
2.5 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	24,49	22,93	27,79
2.5 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	24,56	22,94	27,87
2.5 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	24,31	22,98	27,89
20 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	24,9	23,48	27,8
20 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	25,14	23,47	27,87
20 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	25,12	23,36	27,91
20 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	25,09	23,36	27,87

Çalışma gruplarının relatif gen ekspresyon analizi, GAPDH geni referans gen ve kontrol grupları da kalibratör olarak kabul edilerek, QIAGEN 2009 relative expression software (REST) programı kullanılarak yapıldı.

Çalışmamızda MCF-7 hücrelerini invaziv hale getirmek için daha önceki çalışmalardaki tecrübelerimizden yararlanarak TGF- β kullandık (Şekil 16) (Salis ve ark., 2014).



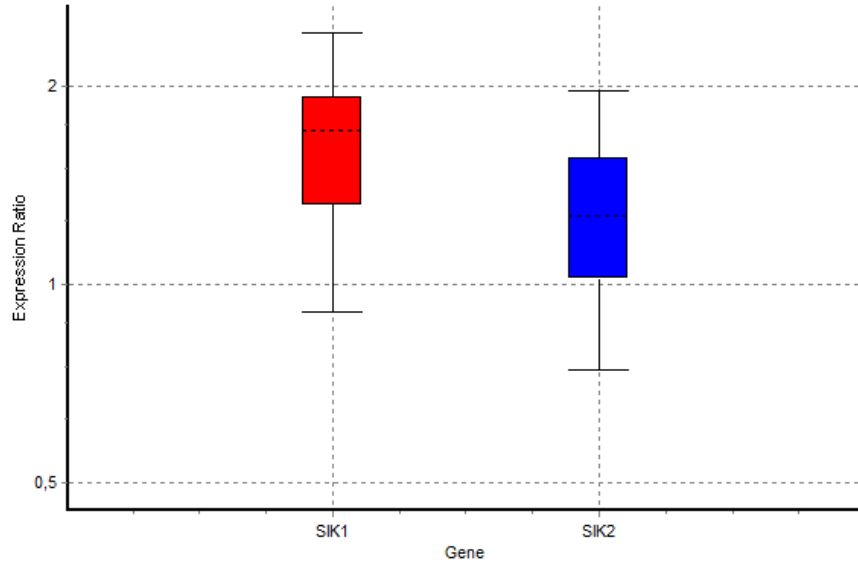
Şekil 16. MCF-7 hücrelerinde TGF- β tarafından migrasyonun indüksiyonu. (RTCA migrasyon grafiğinde 4 numara kontrol grubunu, 1 numara ise TGF- β uygulanarak migratif özellik kazanan MCF-7 hücrelerini göstermektedir.) (Salis ve ark., 2014).

24 saat boyunca 10 ng/ml TGF- β uygulanan MCF-7 hücrelerinde çalışılan SIK1 ve SIK2 gen ekspresyon analizi sonuçları Tablo 25 ve Şekil 17’de gösterilmiştir. SIK1 geninin anlamlı bir şekilde ($P=0,037$) upregüle olduğu, SIK2 geninde kontrol grubuna kıyasla bir artış olduğu fakat anlamlı bir artış olmadığı ($P=0,220$) görülmüştür.

Tablo 25. MCF-7 hücrelerinde 10 ng/ml TGF- β uygulama sonrası REST analizi sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
SIK1	1,0	1,610	1,120 - 2,133	0,961 - 2,405	0,037	UP
SIK2	1,0	1,255	0,873 - 1,725	0,777 - 1,918	0,220	

P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale, Güven Aralığı)



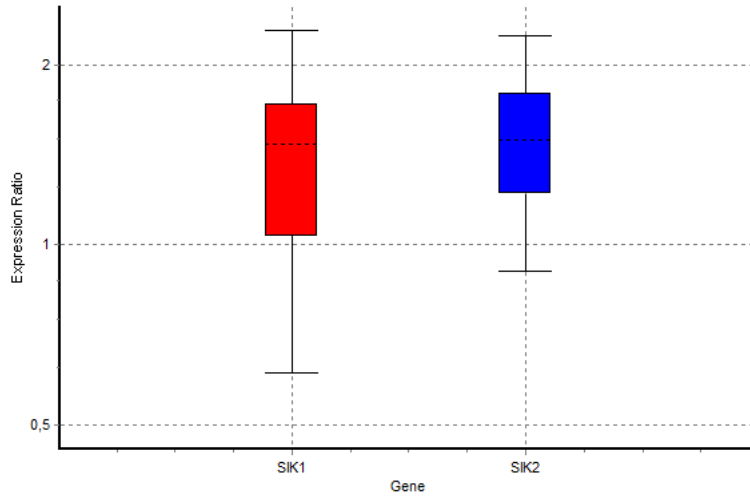
Şekil 17. MCF-7 hücrelerine 10 ng/ml TGF- β 1 uygulama sonrası REST analiz sonuçları

24 saat boyunca 1,25 mM Metformin uygulanan MCF-7 hücrelerinde de SIK1 (P=0,237) ve SIK2 (P=0,079) genlerinde kontrole kıyasla bir artış olduğu fakat anlamlı bir artış olmadığı görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları da Tablo 26 ve Şekil 18’de gösterilmiştir.

Tablo 26. MCF-7 hücrelerinde 1,25 mM Metformin uygulama sonrası REST analizi sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
SIK1	1,0	1,359	0,962 - 1,951	0,732 - 2,219	0,237	
SIK2	1,0	1,485	1,031 - 2,049	0,931 - 2,229	0,079	

P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale, Güven Aralığı)



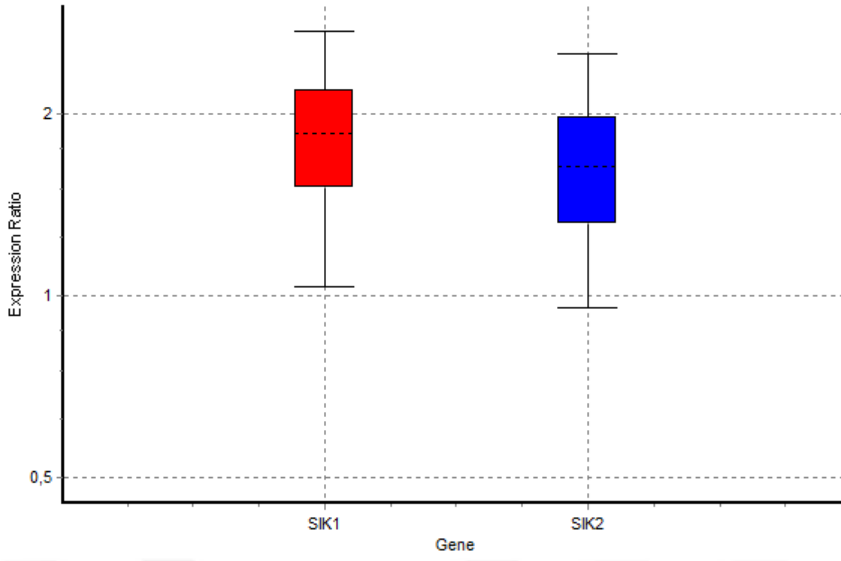
Şekil 18: MCF-7 hücrelerine 1,25 mM Metformin uygulama sonrası REST analiz sonuçları

24 saat boyunca 2,5 mM Metformin uygulanan MCF-7 hücrelerinde de SIK1 (P=0,011) ve SIK2 (P=0,017) genlerinin anlamlı bir şekilde upregüle olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları da Tablo 27 ve Şekil 19’da gösterilmiştir.

Tablo 27. MCF-7 hücrelerinde 2,5 mM Metformin uygulama sonrası REST analizi sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
SIK1	1,0	1,772	1,210 - 2,348	1,072 - 2,656	0,011	UP
SIK2	1,0	1,561	1,081 - 2,125	0,975 - 2,403	0,027	UP

P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale, Güven Aralığı)



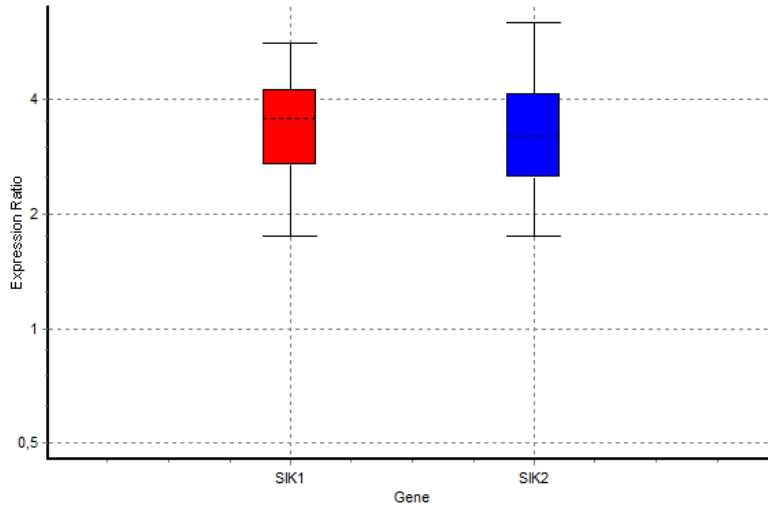
Şekil 19. MCF-7 hücrelerine 2,5 mM Metformin uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Aynı şekilde 24 saat boyunca 20 mM Metformin uygulanan MCF-7 hücrelerinde de SIK1 ve SIK2 genlerinin anlamlı bir şekilde ($P=0,001$) upregüle olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları da Tablo 28 ve Şekil 20’de gösterilmiştir.

Tablo 28. MCF-7 hücrelerinde 20 mM Metformin uygulama sonrası REST analizi sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
SIK1	1,0	3,375	2,592 - 4,457	1,830 - 5,565	0,001	UP
SIK2	1,0	3,260	2,452 - 4,676	1,741 - 5,957	0,001	UP

P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale, Güven Aralığı)



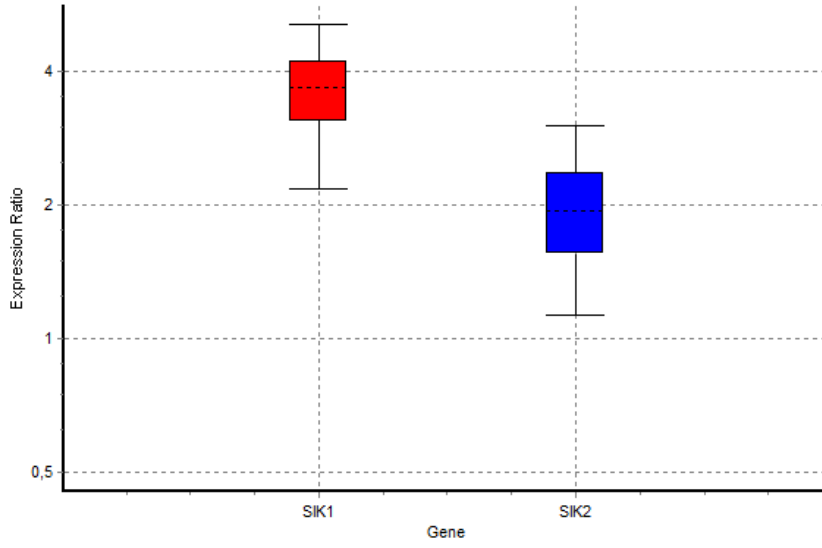
Şekil 20. MCF-7 hücrelerine 20 mM Metformin uygulama sonrası REST analiz sonuçları

Benzer olarak, 24 saat boyunca 1,25 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β uygulanan MCF-7 hücrelerinde de SIK1 (P=0,004) ve SIK2 (P=0,006) genlerinin anlamlı bir şekilde upregüle olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları da Tablo 29 ve Şekil 21’de gösterilmiştir.

Tablo 29. MCF-7 hücrelerinde 1,25 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β uygulama sonrası REST analizi sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
SIK1	1,0	3,470	2,296 - 4,719	2,191 - 5,005	0,004	UP
SIK2	1,0	1,860	1,293 - 2,520	1,154 - 2,884	0,006	UP

P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale, Güven Aralığı)



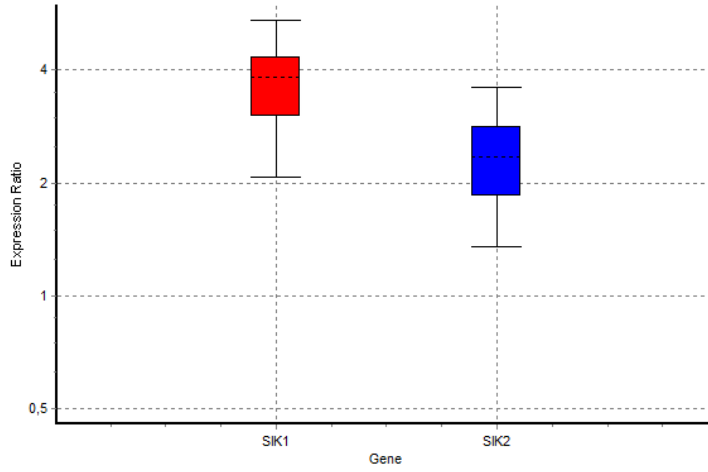
Şekil 21. MCF-7 hücrelerine 1,25 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β uygulama sonrası REST analiz sonuçları

24 saat boyunca 2,5 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β uygulanan MCF-7 hücrelerinde de SIK1 (P=0,001) ve SIK2 (P=0,006) genlerinin anlamlı bir şekilde upregüle olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları da Tablo 30 ve Şekil 22’de gösterilmiştir.

Tablo 30. MCF-7 hücrelerinde 2,5 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β uygulama sonrası REST analizi sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
SIK1	1,0	3,655	2,510 - 4,910	2,205 - 5,398	0,001	UP
SIK2	1,0	2,358	1,649 - 3,276	1,451 - 3,577	0,006	UP

P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale, Güven Aralığı)



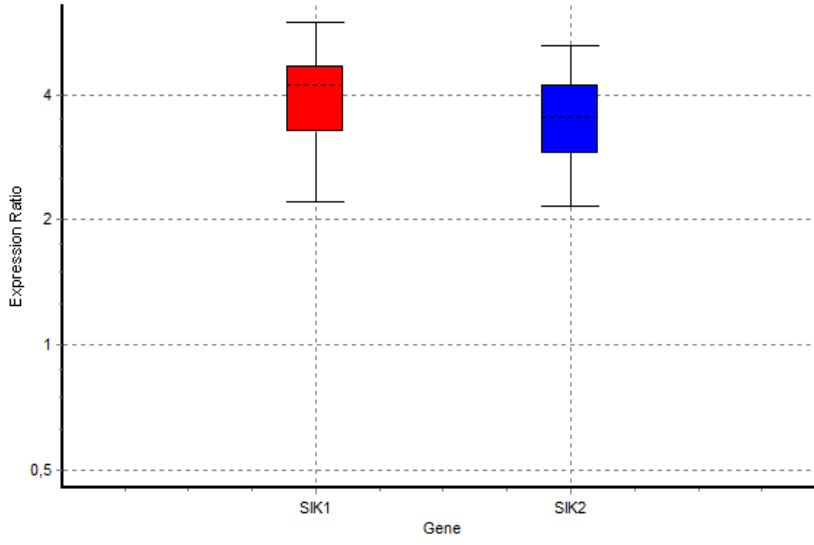
Şekil 22. MCF-7 hücrelerine 2,5 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β uygulama sonrası REST analiz sonuçları

24 saat boyunca 20 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β uygulanan MCF-7 hücrelerinde de SIK1 (P=0,001) ve SIK2 (P=0,007) genlerinin anlamlı bir şekilde upregüle olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları da Tablo 31 ve Şekil 23’de gösterilmiştir.

Tablo 31. MCF-7 hücrelerinde 20 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β uygulama sonrası REST analizi sonuçları

Gen	Verimlilik	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,0	1,000				
SIK1	1,0	3,965	2,754 - 5,299	2,360 - 5,933	0,001	UP
SIK2	1,0	3,488	2,378 - 4,886	2,223 - 5,175	0,007	UP

P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale, Güven Aralığı)

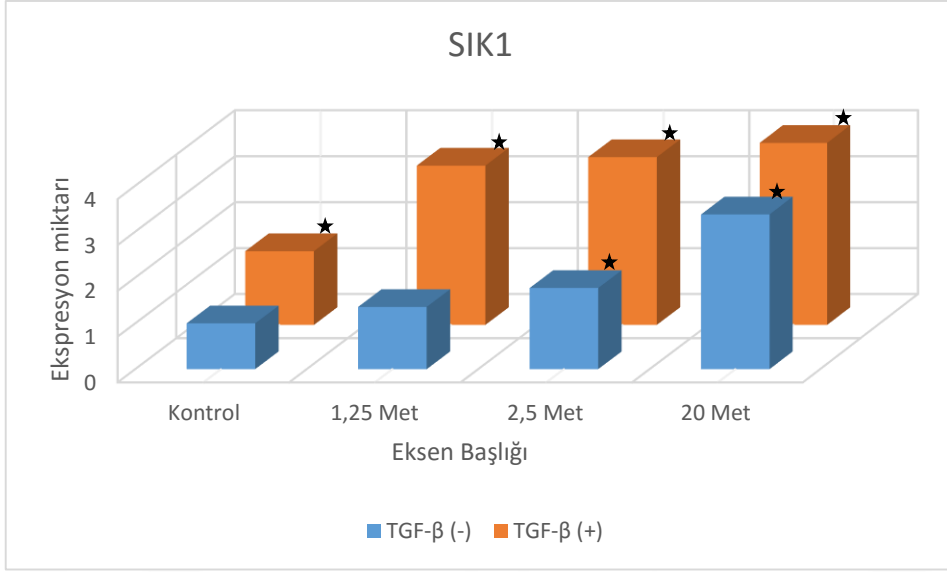


Şekil 23. MCF-7 hücrelerine 20 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β uygulama sonrası REST analiz sonuçları

MCF-7 hücrelerinde uygulanan metformin dozları kontrol ile kıyaslandığında SIK1 ve SIK2 geni için doza bağımlı olarak gen ekspresyonlarında artış olduğu görülmüştür. Aynı şekilde metforminin TGF- β ile kombinasyonlarında kontrol grubuna kıyasla metforminin doza bağımlı olarak SIK1 ve SIK2 genlerinin ekspresyonlarını arttırdığı görülmüştür. Ayrıca, TGF- β ve metforminin kombinasyonlarının SIK1 ve SIK2 gen ekspresyonları üzerine doza bağımlı sinerjistik etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Tablo 32, Şekil 24, Şekil 25).

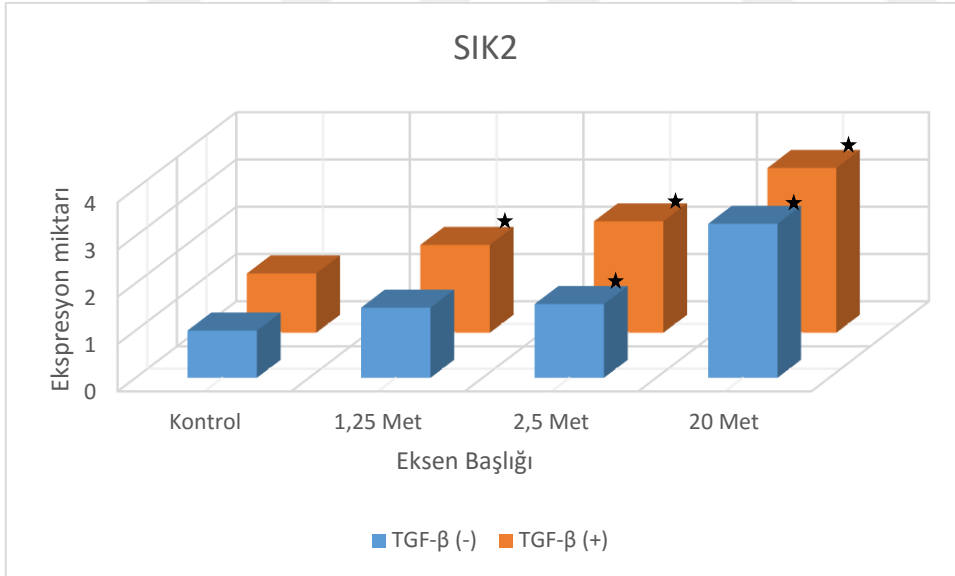
Tablo 32. MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyonu analiz sonuçları

KULLANILAN MADDELER	Gen Ekspresyonu Artış Miktarı*	
	SIK1	SIK2
10 ng/ml TGF- β	1,610	1,255
1,25 mM Metformin	1,359	1,485
2,5 mM Metformin	1,772	1,561
20 mM Metformin	3,375	3,260
1,25 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	3,470	1,860
2,5 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	3,655	2,358
20 mM Metformin+10 ng/ml TGF- β	3,965	3,488
* Artış miktarı kontrol grubunun katı olarak ifade edilmektedir.		



Şekil 24. MCF-7 hücrelerinde SIK1 gen ekspresyon düzeyleri

Kontrol: RPMI-1640 KM, 1,25 Met: 1,25 mM Metformin, 2,5 Met: 2,5 mM Metformin, 20 Met: 20 mM Metformin, TGF-β (-):TGF-β ilavesiz, TGF-β (+):TGF-β ile kombinasyon, ★ : istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ($P < 0,05$) ifade etmektedir



Şekil 25. MCF-7 hücrelerinde SIK2 gen ekspresyon düzeyleri

Kontrol: RPMI-1640 KM, 1,25 Met: 1,25 mM Metformin, 2,5 Met: 2,5 mM Metformin, 20 Met: 20 mM Metformin, TGF-β (-):TGF-β ilavesiz, TGF-β (+):TGF-β ile kombinasyonu, ★ : istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ($P < 0,05$) ifade etmektedir

4. TARTIŞMA

SIK, yüksek tuz diyeti ile beslenen sıçanların böbrek üstü bezlerinden klonlanan AMPK ailesine ait olan bir serin/treonin protein kinazdır (Horike ve ark., 2003). SIK'in karsinogenezdeki rolü henüz tam olarak açıklanamamasına rağmen over ve akciğer kanseri gibi birkaç spesifik kanser tipinde aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir (Ahmed ve ark., 2010; Charoenfuprasert ve ark., 2011; Imielinski ve ark., 2012).

SIK1'in kinaz aktivitesi gösterebilmesi için tümör supresör bir gen olan LKB1 tarafından fosforile edilmesi gerekmektedir (Hashimoto ve ark., 2008). Bu bilgi SIK1 ekspresyon artışının tümör supresyonuna katkı sağladığını düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar da LKB1 ve onun downstream sinyal yolağının kanser hücre büyümesini baskılaması ve hücre ölümünü indüklemesi yanında metastazını da inhibe ettiğini göstermektedir (Gan ve Li, 2014).

Gastrik adenokarsinom hücreleriyle yapılan bir çalışmada Gastrinin kolesistokinin B reseptörüne bağlanarak LKB1-SIK1 sinyal yolağını aktive ettiği ve fosforile SIK1'in de nükleusa transloke olarak HDAC'yi fosforilediği ve böylece migrasyonu sınırladığı gösterilmiştir (Selvik ve ark., 2014). NSCLC hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise atenüe LKB1-SIK1 sinyalinin Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 (Zeb1)'in upregülasyonu üzerinden **epitelyal mezenkimal transisyon (EMT)**'yi ve radyorezistansı artırdığı gözlemlenmiştir (Yao ve ark., 2016). EMT, tümör hücrelerine invaziv ve metastatik özellikler kazandırmaktadır. Bu olaylar, bir hücre-hücre adezyon molekülü olan E-cadherin'in azalması ve vimentin, N-cadherin ve düz kas aktini gibi proteinlerin upregülasyonu ve bazal membranın bütünlüğünü kaybetmesi ile meydana gelmektedir (Yang ve ark., 2013). MLE-12 ve HK-2 hücreleri ile yapılan bir çalışmada SIK1 geninin susturulması sonucu Snail Family Zinc Finger 2 (Snail2), Zeb1, Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2 (Zeb2), Twist Family BHLH Transcription Factor (Twist) genlerinde anlamlı artışlar gözlenmiştir. SIK1 geninin defektif olması E-cadherin azalmasına sebep olurken hücreler arası bağlantıların da zayıflamasına neden olmaktadır (Eneling ve ark., 2012). Snail Family Zinc Finger 1 (Snail1), Snail2, Zeb1, Zeb2, Twist genleri EMT ile indüklenebilir transkripsiyon faktörleridir. Bu transkripsiyon faktörleri direk ya da indirek olarak E-cadherin ekspresyonunu baskılayabilmektedir (Khan ve ark., 2013).

SIK1 ekspresyon düzeyinin primer meme tümörlerinde normal meme dokusuna göre anlamlı ölçüde daha düşük olduğu iki farklı çalışma ile gösterilmiştir (Richardson ve ark., 2006; Chin ve ark., 2006). Ayrıca bu sonuçlar üç farklı merkezde yapılan çalışmalarda, insan meme kanserlerinde SIK1 ekspresyon düşüklüğünün distal metastaz ile korele olduğu gösterilerek desteklenmiştir (Wang ve ark., 2005; Chin ve ark., 2006; Lue ve ark., 2008). Buna paralel olarak, SIK1 geninin susturulması, fare akciğerlerinde metastazı uyardığı gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2009). Ayrıca, SIK1'in p53 bağımlı anoikiste anahtar role sahip olduğu ve bu sayede metastazı baskılamada önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2009). SIK1'in yüksek ekspresyon düzeylerinin akciğer ve meme tümörlerindeki baskılayıcı etkisinin yanısıra diğer başka tümörlerde SIK1 ekspresyon düzeyi ile tümör arasında pozitif korelasyon olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Farelerde ACTH tarafından stimüle edilen adrenokortikal tümör hücrelerinde SIK1'in ekspresyonunun yüksek olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. (Wang ve ark., 1999; Lin ve ark., 2001).

Güncel çalışmalarda SIK1'in aksine SIK2 geninin kanser hücrelerinin gelişimi için avantaj sağlayan onkogenlerden biri olduğunu ve over kanser hastalarının patogeneziyle korelasyon gösterdiği öne sürülmüştür (Charoenfuprasert ve ark., 2011). SIK2 geninin hücre döngüsünün ilerlemesinde görev aldığı ve SIK2'nin susturulmasının hücre siklusunun G1 evresinde durmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. (Ahmed ve ark., 2010). Başka bir çalışmada da SIK2'nin yokluğu over kanserlerinde paklitaksel sensitivitesine destek olurken SIK2'nin varlığı ileri derecede over kanseri hastalarının prognozuyla korelasyon göstermiştir. Diğer yandan ise SIK2'nin CRT1'i baskılayarak melanogenezi inhibe ettiğinden de söz edilmektedir (Kumagai ve ark., 2011). Tüm bu bulgular, SIK1 ve SIK2'nin ekspresyonlarının her kanser türü için farklı olduğunu ve tedavi için hedef genler olabileceğini düşündürmektedir.

Metformin, yaygın olarak tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmakta olup son yıllarda da kanser tedavisi için potansiyel tedavi edici bir madde olarak dikkat çekmektedir (Jiralerspong ve ark., 2009). Tip 2 diyabetli hastalarda metformin kullanımının düşük kanser riskiyle ilişkisi epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (Evans ve ark., 2005). Metforminin antikanser etkisini hücre proliferasyonunu ve apoptozisi etkileyerek gösterdiği düşünülmektedir (Ben Sahra ve ark., 2010; Rocha ve ark., 2011). Antiproliferatif etkisinden ise AMPK aktivasyonu ve mTOR inhibisyonu

sorumlu tutulmaktadır (Zakikhani ve ark., 2010). LKB1, AMPK aktivasyonu için gerekli bir serin treonin protein kinazdır (Shaw ve ark., 2004; 2005). MCF-7 hücreleriyle yapılan bir çalışmada metforminin LKB1 üzerinden AMPK fosforilasyonunu doza bağımlı olarak arttırdığı gösterilmiştir (Dowling ve ark., 2007). AMPK'nın da CRTC2'yi fosforilleyerek mTOR'un inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir (Inoki ve ark., 2003). Ayrıca CRTC2'nin yokluğu, tümör progresyonunda kritik rol oynayan anjiyogenez arttırmaktadır (Bjornsti ve Houghton, 2004). LKB1 aynı zamanda SIK1'i de Thr182 ve Ser186 bölgelerinden fosforilasyon yoluyla aktive etmektedir. Yapılan birçok çalışmada, SIK1'in CRTC'i fosforile ederek bir transkripsiyon faktörü olan CREB aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (Screaton ve ark., 2004; Takemori ve Okamoto, 2008). Benzer olarak, SIK2 de cAMP-response element bağımlı transkripsiyonu baskılamaktadır; fakat bu baskılama derecesi SIK1'e nazaran daha zayıf olduğu düşünülmektedir (Horike ve ark., 2003).

Tüm bu bulgu ve bilgilerden yola çıkarak, çalışmamızda invaziv ve non-invaziv MCF-7 hücrelerinde antikanser etkisi olduğu düşünülen metforminin SIK1 ve SIK2 genleri üzerine etkisini araştırdık. MCF-7 hücrelerini invaziv hale getirmek için daha önceki çalışmalardaki tecrübelerimizden yararlanarak TGF- β kullandık (Salis ve ark., 2014). TGF- β normal epitelyal, endotelyal ve hematopoetik hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder ve bu yüzden çeşitli dokuların homeostazisinde kritik öneme sahiptir (Roberts ve ark., 1990). Karsinogenez sırasında, normal epitelyal hücrelerdeki diferansiasyon ve proliferasyon arasındaki denge kaybına karşı, TGF- β sinyalleri karsinogenezin erken evrelerinde normal doku yapısının sürdürülmesi ve kanserin önlenmesinde rol almaktadır (Bellam ve Pasche, 2010). Kanser oluştuğunda ise TGF- β sinyal yolağının mutasyonu sonucunda sitotoksik aktivitesi inhibe olmaktadır. TGF- β sinyal moleküllerinin genetik inaktivasyonu kanserlerin bir kısmında görülürken, çoğu kanserlerde bilinen bir mutasyon olmaksızın büyümenin durdurulmasına karşı direnç tesbit edilmiştir (Moustakas ve Heldin, 2005).

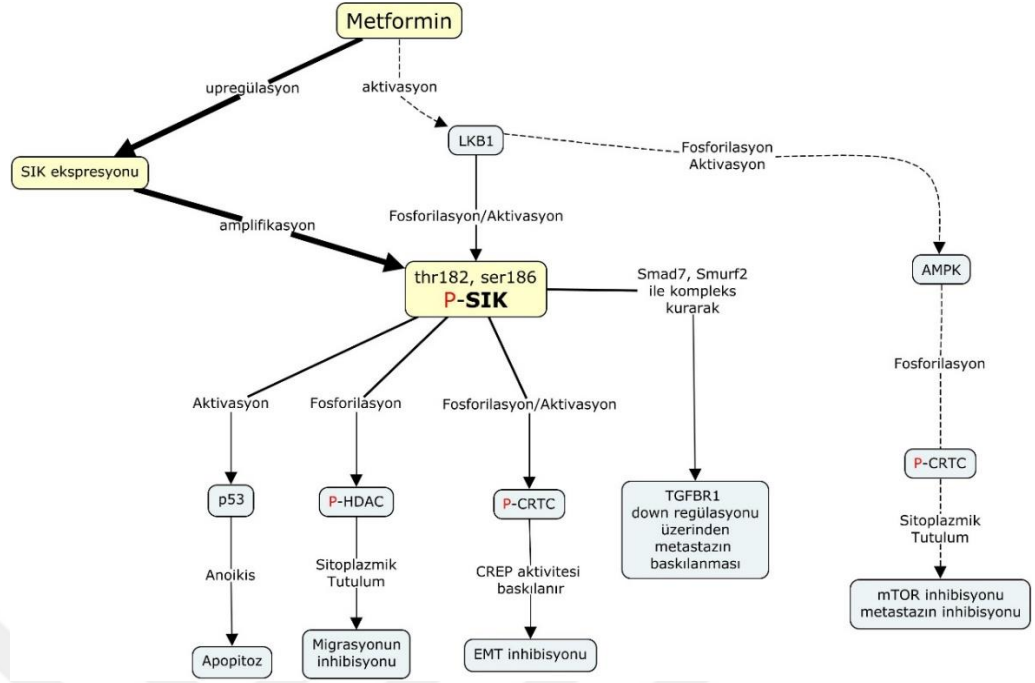
TGF- β uygulanan MCF-7 hücrelerinde SIK1 gen ekspresyonunda 1,6 kat ($P=0,037$) anlamlı bir artış olduğu, SIK2 gen ekspresyonunda ise anlamlı olmayan 1,255 kat ($P=0,220$) artış olduğunu bulduk. SIK geni TGF- β /Smad sinyalinin doğrudan bir hedef geni olup TGF β R1'i down regüle eden protein komplekslerine katılmaktadır. Ayrıca, SIK'in kinaz aktivitesi ve Smurf2'nin ubiquitin ligaz aktivitesi Smad7'yi içeren

protein komplekslerinin dinamiğini etkilediği ve bunların her ikisinin de optimal TGFBR1 down regülasyonu için gerekli oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Löhn ve ark., 2012).

Daha önceki bir çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde metforminin 48. saatte IC50/EC50 değerini 4.27×10^{-6} M olarak bulduk (Salis ve ark., 2014). Bu çalışmanın bulgularından faydalanarak MCF-7 hücrelerine uygulanacak olan metformin dozlarını belirledik.

Non-invaziv MCF-7 hücrelerine 1,25 mM, 2,5 mM, ve 20 mM Metformin uygulandığında SIK1 gen ekspresyonunda sırasıyla 1,359 (P=0,237), 1,772 (P=0,011) ve 3,375 (P=0,001) kat artış görüldü. Bu dozlar SIK2 gen ekspresyonunda ise sırasıyla 1,485 (P=0,079), 1,561 (P=0,017), 3,260 (P=0,001) kat artışa neden oldu. Bu sonuçlara göre, non-invaziv MCF-7 hücrelerinde metforminin doza bağımlı olarak SIK1 ve SIK2'yi upregüle ettiğini söyleyebiliriz. Ancak SIK1 geninin SIK2'ye göre metforminden daha fazla etkilendiği görülmektedir.

İnvaziv MCF-7 hücrelerine 1,25 mM, 2,5 mM, ve 20 mM Metformin uygulandığında SIK1 gen ekspresyonunda sırasıyla 3,470(P=0,004), 3,655(P=0,001), 3,965(P=0,001) kat anlamlı bir artış görüldü. Bu dozlar SIK2 gen ekspresyonunda ise sırasıyla 1,860 (P=0,006), 2,358(P=0,006), 3,488 (P=0,007) kat anlamlı bir artışa neden oldu. Bu sonuçlar, metforminin invaziv MCF-7 hücrelerinde de doza bağımlı olarak SIK1 ve SIK2'yi upregüle ettiğini göstermektedir. Ancak non-invazivde olduğu gibi invaziv MCF-7 hücrelerinde de SIK1 geni SIK2'ye göre metforminden daha fazla etkilenmektedir. Bununla birlikte, invaziv MCF-7 hücrelerinde SIK1 ve SIK2 genlerinin upregülasyonu üzerine metforminin çok daha etkili olduğunu görmekteyiz.



Şekil 26. Metforminin LKB1-SIK sinyal yolağı üzerine etkisi (Kesikli çizgilerle gösterilen oklar metforminin LKB1 üzerinden AMPK fosforilasyonunu arttırdığını ve AMPK'nın da CRTC2'yi fosforilleyerek mTOR'un inhibisyonuna neden olduğunu göstermektedir. Kalın çizgilerle gösterilen yola ise çalışmamızın bulgularını göstermektedir. Metformin, doza bağımlı olarak SIK1 ve SIK2 gen ekspresyonunu arttırmaktadır. Diğer mekanizmalar ise metforminin LKB1-SIK sinyal yolağı üzerinden apoptoz, migrasyon ve EMT üzerine muhtemel etkilerini göstermektedir. LKB1/STK11: Serine/Threonine Kinase 11; SIK: Salt Inducible Kinase; P-SIK: fosforile Salt Inducible Kinase; p53: Tümör protein 53; P-HDAC: Histone Deacetylase; P-CRTC: fosforile CREB Regulated Transcription Coactivator; TGFBR1: Transforming growth factor, beta receptor I; AMPK: 5' AMP-activated protein kinase)

MCF-7 hücreleriyle yapılan bir çalışmada metforminin LKB1 üzerinden AMPK fosforilasyonunu doza bağımlı olarak arttırdığı gösterilmiştir (Dowling ve ark., 2007). AMPK'nın da CRTC2'yi fosforilleyerek mTOR'un inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir (Inoki ve ark., 2003).

Non-invaziv ve invaziv MCF-7 hücreleriyle yaptığımız bu çalışmada SIK1 ve SIK2 gen ekspresyonundaki artış göz önüne alınarak; metforminin LKB1-SIK-CRTC sinyal yolağı üzerinden CREB aktivitesini inhibe ederek metastazı engelleyebileceğini söyleyebiliriz. Diğer bir ihtimal; SIK1 ve SIK2'nin upregülasyonunun TGFBR1'in down regülasyonuna neden olarak metastazı inhibe edebileceğidir. SIK'lerdeki ekspresyon artışı HDAC'ler üzerinden de migrasyonu engelleyebilir. Ayrıca LKB1-SIK1 sinyalinin

Zeb1'i baskılayarak EMT'yi engellediği bilindiğinden metforminin migrasyonu inhibe edici etkisini bu yolak üzerinden de gerçekleştirebileceğini aklımıza getirmektedir. MCF-7 hucresinde yapmış olduğumuz bu çalışmada metforminin antikanser etkisinin incelenmesinde SIK1 ve SIK2 genlerinin ekspresyon analizlerinin yanı sıra varsayılan bu mekanizmaların da araştırılması çalışmamızın değerini daha da artıracaktır. Bununla birlikte, SIK1 ve SIK2 genleri için Western blot tekniğiyle protein ve fosfoprotein analizlerinin yapılması ve loss of function deneyi ile siRNA kullanılarak SIK1 ve SIK2 genlerinin susturulması çalışmamızın eksik kalmış yönleri olmakla birlikte çalışmamızın bir sonraki adımları olacaktır.

Sonuç olarak, literatür araştırmalarında görüldüğü üzere SIK1 ve SIK2 gen ekspresyonları her kanser türü için farklılık arz etmektedir ve tedavi için potansiyel hedef genler olabilme özelliği taşımaktadır. Bu bağlamda, TGF-β sensitif farklı kanser türlerinde metforminin SIK1 ve SIK2 genleri üzerine etkisinin araştırılması kanser tedavisi için yeni kapılar açacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. TGF- β , MCF-7 hücrelerinde SIK1 gen ekspresyonunda anlamlı bir artışa SIK2 gen ekspresyonunda ise anlamlı olmayan bir artışa neden oldu.
2. Metformin non-invaziv MCF-7 hücrelerinde SIK1 gen ekspresyonunda doza bağlı artışa neden oldu.
3. Metformin non-invaziv MCF-7 hücrelerinde SIK2 gen ekspresyonunda doza bağlı artışa neden oldu.
4. Non-invaziv MCF-7 hücrelerinde metforminin etkisi SIK2'ye göre SIK1 geninde daha belirgindi.
5. Metformin invaziv MCF-7 hücrelerinde SIK2 gen ekspresyonunda doza bağlı artışa neden oldu.
6. Metformin non-invaziv MCF-7 hücrelerinde SIK2 gen ekspresyonunda doza bağlı artışa neden oldu.
7. İnvaziv MCF-7 hücrelerinde metforminin etkisi SIK2'ye göre SIK1 geninde daha belirgindi.
8. Metforminin SIK1 ve SIK2 gen ekspresyonu üzerine etkisi invaziv MCF-7 hücrelerinde daha belirgindi.

SIK1 ve SIK2 gen ekspresyon düzeylerinin kanser türü ve derecesine göre farklılık gösterdiği ve metforminin etkisinin invaziv hücrelerde daha belirgin olduğu göz önüne alınarak TGF- β sensitif farklı invaziv kanser türlerinde metforminin bu genler üzerine etkisinin araştırılması kanser tedavisi için yeni kapılar açacaktır.

KAYNAKLAR

- Ahmed AA, Lu Z, Jennings NB, et al. SIK2 is a centrosome kinase required for bipolar mitotic spindle formation that provides a potential target for therapy in ovarian cancer. *Cancer Cell*. 2010;18 (2):109–121.
- Ahmed AA, Lu Z, Jennings NB, et al. SIK2 is a centrosome kinase required for bipolar mitotic spindle formation that provides a potential target for therapy in ovarian cancer. *Cancer Cell*. 2010;18 (2):109–121.
- Alessi DR, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Evans JM, Morris AD. “Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients”, *Brit. Med. J.* 2005; 330, 1304–1305.
- Alexander GC, Moloney RM, Sehgal NL, Stafford RS. “National trends in treatment of type 2 diabetes mellitus”, *Arch Intern Med*. 2008; 168, 2088–2094.
- Algire C, Zakikhani M, Blouin MJ, Shuai JH, Pollak M. Metformin attenuates the stimulatory effect of a high-energy diet on in vivo LLC1 carcinoma growth. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15:833–9.
- Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE, et al. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle* 2009;8:909–15.
- Andersson M, Chatterji S, Hsieh CC, Johansson AL, Lambe M. “Increasing incidence of pregnancy-associated breast cancer in Sweden”, *Obstet Gynecol*. 2009; 114, 568–572.
- Anisimov VN, Berstein LM, Egorin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Zabezhinski MA, et al. Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Exp Gerontol* 2005;40:685–93.
- Baas AF, Boudeau J, Sapkota GP, Smit L, Medema R, Morrice NA, Alessi DR, Clevers HC. Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO J*. 2003, 22, 3062–3072.
- Bae EJ, Cho MJ, Kim SG. Metformin prevents an adaptive increase in GSH and induces apoptosis under the conditions of GSH deficiency in H4IIE cells. *J Toxicol Environ Health A* 2007;70:1371–80.

- Bellam N, Pasche B. “TGF- β signaling alterations and colon cancer”. *Cancer Treat. Res.* 2010; 155, 85–103.
- Ben Sahra I, Bost F, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. “Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug?”, *Mol Cancer Ther.* 2010; 9, 1092–1099.
- Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auberger P, et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect invitro and invivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* 2008;27:3576–86.
- Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JP, Wittwer CT. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am J Pathol.* 1998 Oct;153(4):1055-61.
- Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:335–48.
- Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:335–48.
- Bland KI, Menck HR, Scott-Conner CE, Morrow M, Winchester DJ, Winchester DP. The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States. *Cancer.* 1998; 83(6), 1262-1273.
- Bojkova B, Orendas P, Garajova M, Kassayova M, Kutna V, Ahlersova E, et al. Metformin chemically-induced mammary carcinogenesis in rats. *Neoplasma* 2009; 56:269–74.
- Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, Johnson JA. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* 2006;29:254–8.
- Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res* 2007;67:6745–52.
- Carvalho JB, Dias MM, Osorio-Costa F, Rocha GZ, Ropelle ER, Rossato FA, Saad M J, Vercesi AE. “Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth”, *Clin. Cancer Res.* 2011; 17, 3993–4005.

- Charoenfuprasert S, Yang YY, Lee YC, et al. Identification of salt-inducible kinase 3 as a novel tumor antigen associated with tumorigenesis of ovarian cancer. *Oncogene*. 2011;30(33):3570–3584.
- Chen Y, Doebber T, Hirshman MF, Goodyear LJ, Fenyk-Melody J, Fujii N, Li Y, Moller DE, Musi N, Myers R, Shen X, Ventre J, Wu M, Zhou G. “Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action”, *J Clin Invest*, 2001; 108, 1167–74.
- Cheng H, Liu P, Wang ZC, et al. SIK1 couples LKB1 to p53-dependent anoikis and suppresses metastasis. *Sci Signal*. 2009;2(80):ra35.
- Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, Lapuk A, Neve RM, Qian Z, Ryder T, Chen F, Feiler H, Tokuyasu T, Kingsley C, Dairkee S, Meng Z, Chew K, Pinkel D, Jain A, Ljung BM, Esserman L, Albertson DG, Waldman FM, Gray JW. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell* 2006;10:529–541. [PubMed: 17157792]
- Dailey G, Gerich J. E., Nurjhan, N., Perriello, G., Stumvoll, M. 1995. “Metabolic effects of metformin in non-insulindependent diabetes mellitus”, *N. Engl. J. Med.*, 333, 550–554.
- Davidson MB, Peters AL. An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med*. 1997;102:99-110. [PMID: 9209206]
- De Caestecker MP, Piek E, Roberts AB. “Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer”. *J Natl Cancer Inst*. 2000; Sep 6;92(17):1388-402.
- DeFronzo RA, Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333:541-9. [PMID: 7623902]
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. “TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression” *Nat Genet*. 2001; 29(2):117-29.
- Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer research*. 2007; 67(22), 10804-10812.
- Dykens JA, Jamieson J, Marroquin L, Nadanaciva S, Billis PA, Will Y. Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity

- of aerobically-poised HepG2 cells and human hepatocytes in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233:203–10.
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K. Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. 2001;*J.Biol.Chem.* **276**,12477–12480 9.
- Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352:854-65. [PMID: 9742977].
- Eneling K, Brion L, Pinto V, Pinho MJ, Sznajder JI, Mochizuki N, Bertorello AM. Salt-inducible kinase 1 regulates E-cadherin expression and intercellular junction stability. 2012; *The FASEB Journal*, 26(8), 3230-3239.
- Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *Brit Med J* 2005; 330: 13041305.
- Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu.Rev.CellDev.Biol.* 2005; 21,659–693.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. “Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008”. 2010.; *Int J Cancer* 127(12): 2893–2917.
- Gan, RY, Li, HB. Recent progress on liver kinase B1 (LKB1): expression, regulation, downstream signaling and cancer suppressive function.*International journal of molecular sciences.* 2014;*15*(9), 16698-16718.
- Garber AJ, Duncan TG, Goodman AM, Mills DJ, Rohlf JL. Efficacy of metformin in type II diabetes: results of a double-blind, placebo-controlled, doseresponse trial. *Am J Med.* 1997;103:491-7. [PMID: 9428832]
- Glueck CJ, Wang P, Fontaine R, Tracy T, Sieve-Smith L. Metformin induced resumption of normal menses in 39 of 43 (91%) previously amenorrheic women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism.* 1999;48:511-9. [PMID: 10206447]
- Goodwin PJ, Ligibel JA, Stambolic V. Metformin in breast cancer: time for action. *J Clin Oncol* 2009;27:3271–3.

- Goodwin PJ, Pritchard KI, Ennis M, Clemons M, Graham M, Fantus IG. Insulin-lowering effects of metformin in women with early breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2008;8:501–5.
- Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, Gu J, Lau S, Pollak MN, et al. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110:246–50.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70
- Hardie DG, Alessi DR. LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link—Ten years after. *BMC Biol*. 2013, 11, 36.
- Hardie DG. New roles for the LKB1–AMPK pathway. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2005, 17, 167–173. 101.
- Hashimoto YK, Satoh T, Okamoto M, Takemori H. Importance of autophosphorylation at Ser186 in the A-loop of salt inducible kinase 1 for its sustained kinase activity. *J. Cell. Biochem*. 2008; 104, 1724–1739.
- Hashimoto, Y.K.; Satoh, T.; Okamoto, M.; Takemori, H. Importance of autophosphorylation at Ser186 in the A-loop of salt inducible kinase 1 for its sustained kinase activity. *J. Cell. Biochem*. 2008, 104, 1724–1739.
- Haupt E, Knick B, Koschinsky T, Liebermeister H, Schneider J, Hirche H. Oral antidiabetic combination therapy with sulphonylureas and metformin. *Diabetes Metab*. 1991;17:224-31. [PMID: 1936481]
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Jr Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. 1997; *Cell* **89**,1165–1173.
- Hermann LS, Scherstén B, Bitzén PO, Kjellström T, Lindgärde F, Melander A. Therapeutic comparison of metformin and sulfonylurea, alone and in various combinations: a double-blind controlled study. 1994; *Diabetes care*, 17(10), 1100-1109.
- Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsihchlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells and acts to get her with chemo therapyto block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res* 2009;69:7507–11.

- Horike N, Takemori H, Katoh Y, Doi J, Min L, Asano T, Nonaka Y. Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(20), 18440-18447.
- Horike N, Takemori H, Katoh Y, et al. Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2. *J Biol Chem*. 2003;278(20):18440–18447.
- Hwang JT, Kim YM, Surh YJ, Baik HW, Lee SY, Ha J, Park OJ. Selenium regulates cyclooxygenase-2 and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways by activating AMP-activated protein kinase in colon cancer cells. *Cancer Res*. 2006, 66, 10057–10063.
- Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*. 2012;150(6):1107–1120.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115:577–90.
- Isakovic A, Harhaji L, Stevanovic D, Markovic Z, Sumarac-Dumanovic M, Starcevic V, et al. Dual antiglioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1290–302.
- Jaleel M, Villa F, Deak M, Toth R, Prescott AR, van Aalten DMF, Alessi DR. The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochem. J*. 2006, 394, 545–555.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69-90
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. “Cancer statistics”. *CA Cancer J Clin*. 2014; 58:71–96.
- Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM, et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:3297–302.
- Johansen K. Efficacy of metformin in the treatment of NIDDM. Meta-analysis. *Diabetes Care*. 1999;22:33-7. [PMID: 10333900]

- Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny* 2015; 14(3): 196-202.
- Karuman P, Gozani O, Odze RD, Zhou XC, Zhu H, Shaw R, Brien TP, Bozzuto CD, Ooi D, Cantley LC, et al. The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death. *Mol. Cell* 2001, 7, 1307–1319.
- Katoh Y, Takemori H, Horike N, Doi J, Muraoka M, Min L, Okamoto M. Salt-inducible kinase (SIK) isoforms: their involvement in steroidogenesis and adipogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004; 217(1), 109-112.
- Katoh Y, Takemori H, Lin X, Tamura M, Muraoka M, Satoh T, Tsuchiya Y, Min L, Doi J, Miyauchi A, et al. Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1–SIK signaling cascade. *FEBS J*. 2006, 273, 2730–2748.
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. 2000; *Mol. Cell* 6, 1365–1375.
- Kefas BA, Cai Y, Kerckhofs K, Ling Z, Martens G, Heimbart H, et al. Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2004;68:409–16.
- Khan MA, Chen HC, Zhang D, Fu J. Twist: a molecular target in cancer therapeutics. 2013; *Tumor Biology*, 34(5), 2497-2506.
- Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. “Metformin: an update”, *Ann Intern Med*. 2002; 137, 25–33.
- Kisfalvi K, Eibl G, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth. *Cancer Res* 2009; 69:6539–45.
- Kowanetz M, Lönn P, Vanlandewijck M, Kowanetz K, Heldin CH, Moustakas A. TGF- β induces SIK to negatively regulate type I receptor kinase signaling. 2008; *J. Cell Biol.* 182, 655–662.
- Kumagai A, Horike N, Satoh Y, et al. A potent inhibitor of SIK2, 3, 3', 7-trihydroxy-4'-methoxyflavon (4'-O-methylfisetin), promotes melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *PLoS One*. 2011;6(10): e26148.
- Lalau JD, Andrejak M, Morinère P, Coevoet B, Debussche X, Westeel PF, et al. Hemodialysis in the treatment of lactic acidosis in diabetics treated by

- metformin: a study of metformin elimination. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1989;27:285-8. [PMID: 2500402].
- Lee JH, Koh H, Kim M, Park J, Lee SY, Lee S, Chung J. JNK pathway mediates apoptotic cell death induced by tumor suppressor LKB1 in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 2006, 13, 1110–1122.
- Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32: 1620–5.
- Lin X, Takemori H, Katoh Y, et al. Saltinducible kinase is involved in the ACTH/ cAMP-dependent protein kinase signaling in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Mol Endocrinol.* 2001;15(8):1264–1276.
- Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Deng XS, Alimova IN, Lind SE, et al. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle* 2009;8:2031–40.
- Lizcano JM, Goransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, Hawley SA, Udd L, Makela TP, Hardie DG, et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 2004, 23, 833–843.
- Lönn P, Vanlandewijck M, Raja E, Kowanetz M, Watanabe Y, Kowanetz K, Moustakas A. Transcriptional induction of salt-inducible kinase 1 by transforming growth factor β leads to negative regulation of type I receptor signaling in cooperation with the Smurf2 ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 2012; 287(16), 12867-12878.
- Lu X, Wang ZC, Iglehart JD, Zhang X, Richardson AL. Predicting features of breast cancer with gene expression patterns. *Breast Cancer Res Treat* 2008;108:191–201. [PubMed: 18297396].
- Marignani PA, Kanai F, Carpenter CL. LKB1 associates with Brg1 and is necessary for Brg1-induced growth arrest. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 32415–32418.
- Massague J. “TGF- β signal transduction”. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67,753–791.
- Matsuzaki K, Kitano C, Murata M, Sekimoto G, Yoshida K, Uemura Y, Seki T, Taketani S, Fujisawa J, Okazaki K. “Smad2 and Smad3 phosphorylated at both linker and

- COOH-terminal regions transmit malignant TGF- β signal in later stages of human colorectal cancer". *Cancer Res.* 2009; 69, 5321–5330.
- McFarlane SI, Banerji M, Sowers JR. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:713-8. [PMID: 11158035]
- Moustakas A, Heldin CH. “ Non-Smad TGF- β signals”. *J. Cell Sci.* 2005; 118, 3573–3584.
- Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF β signaling. 1997; *Nature* **389**,631–635.
- Nelson HD, Tyne K, Naik A, Bougatsos C, Chan BK, Humphrey L. Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Me.* 2009; 151(10), 727-737, w237-742. doi: 10.7326/0003-4819-151-10200911170-00009.
- Nieves-Neira W, Pommier Y. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: Multifactorial relationships with topoisomerase i, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. *International journal of cancer.* 1999; 82(3), 396-404.
- Olieslagers S, Pardali E, Tchaikovski V, ten Dijke P, Waltenberger J. TGF- β 1/ALK5-induced monocyte migration involves PI3K and p38 pathways and is not negatively affected by diabetes mellitus. *Cardiovascular research*, 2011; cvr100.
- Pasquali R, Gambineri A, Biscotti D, Vicennati V, Gagliardi L, Colitta D, et al. Effect of long-term treatment with metformin added to hypocaloric diet on body composition, fat distribution, and androgen and insulin levels in abdominally obese women with and without the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:2767-74. [PMID: 10946879].
- Phoenix KN, Vumbaca F, Claffey KP. Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ERalpha negative MDA-MB-435 breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 2009;113:101–11.
- Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2008;8:915–28.

- Powis G, Kirkpatrick L. Hypoxia inducible factor-1 α as a cancer drug target. *Mol. Cancer Ther.* 2004, 3, 647–654.
- Qanungo S, Haldar S, Basu A. Restoration of silenced Peutz-Jeghers syndrome gene, LKB1 induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells. *Neoplasia* 2003, 5, 367–374.
- Rae JM, Creighton CJ, Meck JM, Haddad BR, Johnson MD. MDAMB-435 cells are derived from M14 melanoma cells—a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Res Treat* 2007;104:13–9.
- Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, Lu X, Brown M, Miron A, Liao X, Iglehart JD, Livingston DM, Ganesan S. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 2006;9:121–132. [PubMed: 16473279].
- Ringer DP, Schniper L. Principles of Cancer Biology. RC Bast, DW Kufe, RE Pollock, RR Weischselbaum, JF Holland & E. Frei, Cancer medicine. BC Decker Inc., Hamilton, Ontario. 2000: 25-30.
- Roberts AB, Heine UI, Flanders KC, Sporn MB. Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 580, 225-32.
- Roberts AB, Heine UI, Flanders KC, Sporn MB. Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 580, 225-32.
- Rocha GZ, Dias MM, Ropelle ER, Osorio-Costa F, Rossato FA, Vercesi AE, Saad MJ, Carneiro JB. Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. *Clin Cancer Res* 2011;17:3993-4005.
- Ruiz JC, Conlon FL, Robertson EJ. Identification of novel protein kinases expressed in the myocardium of the developing mouse heart. *Mechanisms of development.* 1994;48(3), 153-164.
- Saito S, Furuno A, Sakurai J, Sakamoto A, Park HR, Shin-Ya K, et al. Chemical genomics identifies the unfolded protein response as a target for selective cancer cell killing during glucose deprivation. *Cancer Res* 2009;69:4225–34.
- Salis O, Bedir A, Ozdemir T, Okuyucu A, Alacam H. “The relationship between anticancer effect of metformin and the transcriptional regulation of certain genes (CHOP, CAV-1, HO-1, SGK-1 and Par-4) on MCF-7 cell line”. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2014; 18, 1602-1609.

- Salis O, Okuyucu A, Bedir A, Gör U, Kulcu C, Yenen E, Kılıç N. Antimetastatic effect of fluvastatin on breast and hepatocellular carcinoma cells in relation to SGK1 and NDRG1 genes. 2015; *Tumor Biology*, 1-8.
- Satpati, D, Korde A, Sarma HD, Banerjee S. Radiosynthesis and Biological Evaluation of ⁶⁸Ga-Labeled Colchicine Conjugates. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2014; 29(6), 251-256.
- Scheen AJ. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 1996;30:359-71. [PMID: 8743335].
- Screaton RA, Conkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, Guzman E, Niessen S, Yates JR, Takemori H, et al. The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* 2004, 119, 61–74. 90.
- Selby JV, Ettinger B, Swain BE, Brown JB. First 20 months' experience with use of metformin for type 2 diabetes in a large health maintenance organization. *Diabetes Care*. 1999;22:38-44. [PMID: 10333901].
- Selvik LKM, Rao S, Steigedal TS, Haltbakk I, Misund K, Bruland T, Thommesen L. Salt-inducible kinase 1 (SIK1) is induced by gastrin and inhibits migration of gastric adenocarcinoma cells. 2014; *PloS one*, 9(11), e112485.
- Setogawa T, Shinozaki-Yabana S, Masuda T, Matsuura K, Akiyama T. The tumor suppressor LKB1 induces p21 expression in collaboration with LMO4, GATA-6, and Ldb1. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006, 343, 1186–1190.
- Shackelford DB, Vasquez DS, Corbeil J, Wu SL, Leblanc M, Wu CL, Vera DR, Shaw RJ. mTOR and HIF-1 α -mediated tumor metabolism in an LKB1 mouse model of Peutz-Jeghers syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 11137–11142.
- Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3329–35.
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005;310: 1642–6.

- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, DePinho RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005, 310, 1642–1646.1
- Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol.* 2009, 196, 65–80.
- Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56(1), 37-47; quiz 50-31.
- Society AC. *Breast Cancer Facts & Figures 2007-2008.* Atlanta, 2007.
- Somogyi A, Stockley C, Keal J, Rolan P, Bochner F. Reduction of metformin renal tubular secretion by cimetidine in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1987; 23:545-51. [PMID: 3593625]
- Sowers JR. Obesity and cardiovascular disease. *Clin Chem.* 1998;44:1821-5. [PMID: 9702991]
- Takeda S, Iwai A, Nakashima M, Fujikura D, Chiba S, Li HM, Uehara J, Kawaguchi S, Kaya M, Nagoya S, et al. LKB1 is crucial for TRAIL-mediated apoptosis induction in osteosarcoma. *Anticancer Res.* 2007, 27, 761–768.
- Takemori H, Okamoto M. Regulation of CREB-mediated gene expression by salt inducible kinase. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;108(3–5):287–291.
- Taliaferro-Smith L, Nagalingam A, Zhong D, Zhou W, Saxena NK, Sharma D. LKB1 is required for adiponectin-mediated modulation of AMPK-S6K axis and inhibition of migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 2009, 28, 2621–2633.
- Thomas GV, Tran C, Mellingshoff IK, Welsbie DS, Chan E, Fueger B, Czernin J, Sawyers CL. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat. Med.* 2006, 12, 122–127.
- Tiainen M, Vaahtomeri K, Ylikorkala A, Makela TP. Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: Induction of p21 (WAF1/CIP1). *Hum. Mol. Genet.* 2002, 11, 1497–1504. 106.
- United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS). 13: Relative efficacy of randomly allocated diet, sulphonylurea, insulin, or metformin in patients with

- newly diagnosed non-insulin dependent diabetes followed for three years. *BMJ*. 1995;310:83-8. [PMID: 7833731]
- Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, Talantov D, Timmermans M, Meijervan Gelder ME, Yu J, Jatko T, Berns EM, Atkins D, Foekens JA. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365:671–679. [PubMed: 15721472]
- Wang Z, Takemori H, Halder SK, et al. Cloning of a novel kinase (SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal. *FEBS Lett*. 1999;453(1–2):135–139
- Wilcock C, Bailey CJ. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica*. 1994;24:49-57. [PMID: 8165821]
- Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2011, 11, 393–410.
- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005; 39(1):75-85.
- Wrana JL. "Regulation of Smad activity" *Cell*. 2000; 100, 189–192.
- Xiang XQ, Saha AK, Wen R, Ruderman NB, Luo ZJ. AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004, 321, 161–167. 100.
- Yang G, Yuan J, Li K. EMT transcription factors: implication in osteosarcoma. 2013; *Medical Oncology*, 30(4), 1-5.
- Yao YH, Cui Y, Qiu XN, Zhang LZ, Zhang W, Li H, Yu JM. Attenuated LKB1-SIK1 signaling promotes epithelial-mesenchymal transition and radioresistance of non-small cell lung cancer cells. 2016; *Chinese journal of cancer*, 35(1), 1.
- Yki-Järvinen H, Nikkila K, Mäkimattila S. Metformin prevents weight gain by reducing dietary intake during insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 1999;58 Suppl 1:53-4; discussion 75-82. [PMID: 10576526]
- Zakikhani M, Blouin MJ, Piura E, Pollak MN. Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 123: 271279.

Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006, 66, 10269–10273, 10269–73. 99.

Zeng PY, Berger SL. LKB1 is recruited to the p21/WAF1 promoter by p53 to mediate transcriptional activation. *Cancer Res.* 2006, 66, 10701–10708.

Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259(3):523-6.

Zhuang Y, Miskimins WK. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, down regulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1. *J Mol Signal* 2008;3:18.

Zhuang ZG, Di GH, Shen ZZ, Ding J, Shao ZM. Enhanced expression of LKB1 in breast cancer cells attenuates angiogenesis, invasion, and metastatic potential. *Mol. Cancer Res.* 2006, 4, 843–849.

<http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/49-meme-kanseri.html>, 2016

http://stringdb.org/version_10/newstring.cgi, 2016

<http://www.atcc.org>, 2016

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SIK1&keywords=SIK1>, 2016

<http://www.mcf7.com/>, 2016

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/150094>, 2016

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23235>, 2016

<http://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=2105&showAllSites=true>, 2016

<http://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=3764&showAllSites=true>, 2016

<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=sik&sort=score#enzymesViewBy>, 2016

<http://www.uniprot.org/uniprot/P57059>, 2016

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H0K1>, 2016

<http://www.who.int/en/>, 2016

www.atcc.org, 2016

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H0K1>, 2016

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/150094>, 2016

<http://www.uniprot.org/uniprot/P57059>, 2016

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Eser YENEN

Doğum Yeri: SAMSUN

Doğum Tarihi: 27.02.1990

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Ege Üniversite, Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü
Lisans Mezunu 2012

OMÜ, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD. Yüksek
Lisans 2012-

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi
Biyokimya AD. (2012)

E-posta: yeneser@hotmail.com