T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA İNSÜLİN RESEPTÖRÜ SUBSTRATI 1 (IRS1) İNDÜKLÜ miRNA EKSPRESYON PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

Moleküler Biyolog Yılmaz ECER
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Gökhan GÖRGİŞEN

VAN-2021

T.C
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA İNSÜLİN RESEPTÖRÜ SUBSTRATI 1 (IRS1) İNDÜKLÜ miRNA EKSPRESYON PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

Moleküler Biyolog Yılmaz ECER
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Gökhan GÖRGİŞEN

VAN-2021

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2020-8842 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ETİK BEYAN

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum *"Meme Kanseri Hücre Hattında İnsülin Reseptörü Substratı 1 (IRS1) İndüklü miRNA Ekspresyon Profilinin Belirlenmesi"* başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Yılmaz ECER

Tarih: …/…/…

İmza:

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak, kendimi geliştirmem konusunda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Gökhan GÖRGİŞEN'e,

Yüksek lisans eğitim dönemimde değerli bilgilerini benimle paylaşan Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE ve Prof. Dr. Halil ÖZKOL'a,

Tez dönemimde bilgi, deneyim ve laboratuvar imkanlarından faydalanmama yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Zehra KAYA'ya ve Tıbbi Parazitoloji bölümünden değerli hocam Doç. Dr. Yunus Emre BEYHAN'a,

Yüksek lisans eğitim dönemimde birlikte çalıştığımız ve yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşım Aysun ARSLAN'a,

Yüksek lisans eğitim dönemimde tanıdığım ve birlikte güzel hatıralar biriktirdiğimiz arkadaşlarım Zafer YAREN, Uğur KARATAŞ, Elif Sena ŞAHİN, Seren DURAN, Müjdat ÇAMLI, Rıdvan DURGUN ve Sedat KÖSTEKCİ'ye,

Hayatım boyunca, benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olan canım aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

ECER Y, Meme Kanseri Hücre Hattında İnsülin Reseptörü Substratı 1 (IRS1) İndüklü miRNA Ekspresyon Profilinin Belirlenmesi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2021. Meme kanseri, moleküler seviyede heterojen bir yapı gösteren ve dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. İnsülin reseptörü substratı (IRS) proteinleri, insülin veya insülin benzeri büyüme faktörü reseptörlerinden aldığı sinyalleri hücre içi ortama ileten sitoplazmik adaptör moleküllerdir. IRS1 ekspresyonundaki artışların, meme kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynadığı iyi bilinmektedir. IRS1 proteinlerinin ekspresyonlarına ek olarak, meme kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde miRNA'ların da rol aldığı gösterilmiştir. MiRNA'lar, tipik olarak mRNA'ların 3′UTR'si ile eşleşerek hedef genlerini baskılayan endojen küçük (19–25 baz) kodlamayan tek sarmallı RNA nükleotidleridir. Genellikle onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak görev yapan miRNA'ların düzensiz ekspresyon profillerinin, meme kanserinde hücre proliferasyonu, tümörigenez ve metastaz gibi çeşitli hücresel süreçlerde yer aldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, meme kanseri hücre hattında insülin reseptörü substratı 1 (IRS1) indüklü miRNA ekspresyon profilinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmamızda, insan IRS1 geni ile transfekte edilmiş CRL4010 hücrelerinde ve insan IRS1 geni transfekte edilmemiş CRL4010 hücrelerinde (kontrol), insan IRS1 geni ile transfekte edilmiş MCF7 hücrelerinde ve insan IRS1 geni transfekte edilmemiş MCF7 hücrelerinde 47 miRNA'nın ekspresyon profilinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ektopik IRS1 ekspresyon seviyeleri, western blot yöntemiyle doğrulandı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre MCF7 (kontrol) hücrelerine kıyasla ektopik IRS1 ekspresyonlu MCF7 hücrelerinde miR-181d, miR-210, miR-661, miR-130a, miR-191, miR-212, miR-93, miR-193b, miR-214, miR-21, miR-96, miR-221, miR-222, miR-373 ve miR-155 miRNA'ların ekspresyonlarının anlamlı seviyelerde arttığı belirlendi. Sonuç olarak, ektopik IRS1 ekspresyonunun meme kanseri gelişimi ve ilerlemesinde, 15 miRNA'nın ekspresyon profillerinin düzenlenmesinde rol oynadığını gözlemledik. Bu aday miRNA'ların meme kanseri gelişimindeki fonksiyonel rollerinin açıklanması için ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, İnsülin sinyal yolağı, IRS1, MikroRNA profilleme

ABSTRACT

ECER Y, Determination of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) Induced miRNA Expression Profile in Breast Cancer Cell Line, Van Yüzüncü Yıl University, Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology, Master Thesis, Van, 2021. Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide, with a heterogeneous structure at the molecular level. Insulin receptor substrate (IRS) proteins are the cytoplasmic adapter proteins that transmit signals from insulin or insulin-like growth factor receptors to the intracellular environment. It is well established that overexpression of IRS1 plays a role in the development and progression of breast cancer. In addition to the expression of IRS1 proteins, miRNAs have also been shown to play a role in the development and progression of breast cancer. MiRNAs are endogenous small (19–25 bases) non-coding single-stranded RNA nucleotides that typically pair with the 3′UTR of mRNAs to repress their target genes. Abnormal expression profiles of miRNAs, which generally act as oncogenic or tumor suppressors, have been shown to be involved in various cellular processes such as cell proliferation, tumorigenesis and metastasis in breast cancer. In this study, it was aimed to determine the insulin receptor substrate 1 (IRS1) induced miRNA expression profile in breast cancer cell line. In our study, we tried to figure out the expression profile of 47 miRNAs in CRL4010 cells transfected with human IRS1 gene and untranfected CRL4010 cells used as control, MCF7 cells transfected with human IRS1 gene and untransfected MCF7 cells used as control. Ectopic IRS1 expression levels were confirmed by western blot method. Our results showed that expressions of miR-181d, miR-210, miR-661, miR-130a, miR-191, miR-212, miR-93, miR-193b, miR-214, miR-21, miR-96, miR-221, miR-222, miR-373 and miR-155 significantly increased in IRS1 overexpressed MCF7 cells compared to untransfected MCF7 cells. In conclusion, we observed that ectopic IRS1 expression is involved in the regulation of expression profiles of 15 miRNAs in breast cancer development and progression. Further studies should be performed to clarify the exact functional roles of these candidate miRNAs in breast cancer development.

Keywords: Breast cancer, Insulin signaling pathway, IRS1, MicroRNA profiling

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay II
Etik Beyan III
Teşekkür IV
Özet V
Abstract VI
İçindekiler VII
Simgeler ve Kısaltmalar X
Şekiller Listesi XII
Tablolar Listesi XIII
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Meme Kanseri 3
2.1.1. Tanım 3
2.1.2. İnsidans ve ölüm oranı 3
2.2. Türkiye'de Meme Kanseri 6
2.3. Meme Kanserinin Moleküler Patolojisi 7
2.3.1. İnvaziv duktal karsinom (IDC) 8
2.3.2. İnvaziv lobüler karsinom (ILC) 8
2.4. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri 9
2.5. Meme Kanseri Gelişiminde Glukoz Metabolizması 11
2.6. İnsülin Reseptör Substratı (IRS) Proteinleri 12
2.6.1. İnsülin reseptör substratı (IRS) protein ailesi 13
2.6.2. IRS proteinlerinin moleküler yapısı 14
2.6.3. IRS proteinlerinin kanserle ilişkisi 15
2.7. MikroRNA'lar (miRNA'lar) 17
2.7.1. Tanım 17
2.7.2. MiRNA'ların keşfi 17
2.7.3. MiRNA'ların biyogenezi 17
2.7.4. MiRNA'ların işlevleri 19
2.7.5. MiRNA'ların kanserle ilişkisi 19

2.7.6. Meme kanserinde miRNA'ların rolü 21
2.7.6.1. Meme kanserinde onkogenik miRNA'lar 21
2.7.6.2. Meme kanserinde tümör baskılayıcı miRNA'lar 22
2.7.7. Meme kanserinde tanısal biyobelirteçler olarak miRNA'lar 22
2.7.8. Meme kanserinde miRNA tabanlı terapötikler 25
3. GEREÇ VE YÖNTEM 27
3.1. E.Coli DH5α Suşuna Plazmid Transformasyonu 27
3.2. E.Coli Hücrelerinden Plazmid İzolasyonu 27
3.3. Hücre Kültürü 29
3.3.1. CRL4010 ve MCF7 hücrelerinin çözdürülmesi 29
3.3.2. CRL4010 ve MCF7 hücrelerinin beslenmesi 30
3.3.3. CRL4010 ve MCF7 hücrelerinin dondurulması 30
3.3.4. CRL4010 ve MCF7 hücrelerinin pasajlanması 31
3.4. CRL4010 ve MCF7 Hücrelerinin Sayımı 31
3.5. CRL4010 ve MCF7 Hücrelerine Plazmid Transfeksiyonu 32
3.6. Protein Lizatlarının Hazırlanması 33
3.7. Protein Miktar Tayini (Bradford Analizi) 33
3.8. Western Blot 34
3.8.1. Jel solüsyonlarının hazırlanması 34
3.8.2. Jelin hazırlanması 35
3.8.3. Protein lizatlarının hazırlanması 36
3.8.4. Örneklerin jele yüklenmesi ve jelde yürütülmesi 37
3.8.5. Proteinlerin jelden PVDF membrana transferi 37
3.8.6. PVDF membranın işaretlenmesi 38
3.8.7. Görüntüleme solüsyonlarının hazırlanması 39
3.8.8. PVDF membranın görüntülenmesi 40
3.9. CRL4010 ve MCF7 Hücrelerinden RNA İzolasyonu 40
3.10. cDNA Sentezi 42
3.11. SYBR Green Yöntemi ile Kantitatif Real-Time PCR Analizi 44
4. BULGULAR 45
4.1. Normal Meme ve Meme Kanseri Hücre Hatlarında Ektopik IRS1 Ekspresyonu 45

4.2. Normal Meme Hücre Hattında IRS1 İndüklü MiRNA Profili 45
4.3. Meme Kanseri Hücre Hattında IRS1 İndüklü MiRNA Profili 51
4.4. Meme Kanseri ve Normal Meme Hücrelerinde IRS1 İndüklü MiRNA Profili 56
4.5. Meme Kanseri ve Normal Meme Hücrelerinde MiRNA Profili 61
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 66
KAYNAKLAR 71
ÖZGEÇMİŞ 78
EKLER 79
EK1. Tez Orijinallik Raporu 79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ago : Argonaute
B-CLL : B hücreli Kronik Lenfositik Lösemi
BNS : Bing-Neel Sendromu
BRCA : Meme Kanseri Duyarlılık
cDNA : Tamamlayıcı DNA
CRISPR/Cas9 : Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri/Cas9
Ct : Eşik döngüsü
DGCR8 : Di George Sendromu Kritik Bölge 8
dk : Dakika
DNA : Deoksiribonükleik Asit
DOX : Doksorubisine
dsRNA : Çift zincirli RNA
EDTA : 2,2',2",2'"-(Etan-1,2-diildinitril) tetraasetik asit
EGFR : Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
ER : Östrojen Reseptörü
FGF2 : Fibrolast Büyüme Faktörü 2
GLOBOCAN : Küresel Kanser Gözlemevi
HER2 : İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IDC : İnvaziv Duktal Karsinom
IGF : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFR : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
ILC : İnvaziv Lobüler Karsinom
IR : İnsülin Reseptörü
IRS : İnsülin Reseptörü Substratı
kDa : Kilodalton
LNM : Lenf Nodu Metastazı
MAPK : Mitojenle Aktive olan Protein Kinazlar
miRNA : MikroRNA
µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

µM : Mikromolar

ng : Nanogram

OnkomiR : Onkogenik miRNA

ORF : Açık Okuma Çerçevesi

PAGE : Poliakrilamid Jel Elektroforezi

PH : Plekstrin Homoloji

pmol : Piko mol

PI3K : Fosfoinositid 3-Kinaz

PR : Progesteron Reseptörü

Pre-miRNA : Öncül mikroRNA

Pri-miRNA : Primer mikroRNA

PTB : Fosfotirozin Bağlama Bölgesi

PVDF : Poliviniliden Diflorid

RISC : RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi

RNA : Ribonükleik Asit

rpm : Dakikadaki dönüş sayısı

RTK : Reseptör Tirozin Kinaz

SDS : Sodyum Dodesil Sülfat

SH2 : Src-homoloji 2

snRNA : Küçük nükleer RNA

TEMED : N,N,N,N-tetrametiletilendiamin

TNBC : Üçlü Negatif Meme Kanseri

TP53 : Tümör Protein 53

TRBP : Trans-aktivasyon yanıtı RNA Bağlayıcı Protein

Ts-miR : Tümör baskılayıcı miRNA

UTR : Çevrilmemiş Bölge

VEGFA : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A

XPO-5 : Eksportin-5

°C : Santigrat derece (Celcius)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. 2020 yılında, kadınlarda dünya genelinde teşhis edilen tüm kanser vakalarının çeşitli kanser türlerine göre dağılımı 4
Şekil 1.2. 2020 yılında, kadınlarda dünya genelinde teşhis edilen kansere bağlı tüm ölümlerin çeşitli kanser türlerine göre dağılımı 4
Şekil 1.3. 2020 yılında, her iki cinsiyette dünya genelinde teşhis edilen tüm kanser vakalarının çeşitli kanser türlerine göre dağılımı 5
Şekil 1.4. 2020 yılında, her iki cinsiyette dünya genelinde teşhis edilen kansere bağlı tüm ölümlerin çeşitli kanser türlerine göre dağılımı 6
Şekil 2.1. 2020 yılında, kadınlarda Türkiye'de teşhis edilen tüm kanser vakalarının çeşitli kanser türlerine göre dağılımı 6
Şekil 2.2. 2020 yılında, kadınlarda Türkiye'de teşhis edilen kansere bağlı tüm ölümlerin çeşitli kanser türlerine göre dağılımı 7
Şekil 3. Meme kanserinin gelişim aşamaları 8
Şekil 4. Meme kanserinin moleküler alt tipleri ve göreceli prognostik sonuçları 10
Şekil 5. IRS proteinlerinin aracılık ettiği sinyaller ve sinyal yolakları 13
Şekil 6. İnsan IRS proteinlerinin yapıları 14
Şekil 7. IRS proteinlerinin hedef molekülleri ve hücresel etkileri 15
Şekil 8. IRS proteinlerinin farklı bazı reseptörlerle etkileşimi 16
Şekil 9. MiRNA biyogenezi ve miRNA aktivitesinin modülasyonu 18
Şekil 10. MiRNA'ların kanserdeki rolleri 20
Şekil 11. CRL4010 ve MCF7 hücrelerinde ektopik IRS1 ekspresyonları 45
Şekil 12. Normal meme hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili 50
Şekil 13. Meme kanseri hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili 55
Şekil 14. Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde miRNA profili 60
Şekil 15. Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde IRS1 indüklü miRNA profili .. 65

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Meme kanseri ile ilişkili bazı onkogenik miRNA'lar..... 22
Tablo 2. Meme kanseri ile ilişkili bazı tümör baskılayıcı miRNA'lar..... 22
Tablo 3. Western blot jel hazırlama protokolü..... 36
Tablo 4. cDNA sentezi için PCR termal döngü protokolü..... 44
Tablo 5. Normal meme hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili..... 46
Tablo 6. Meme kanseri hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili..... 51
Tablo 7. Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde miRNA profili 56
Tablo 8. Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde IRS1 indüklü miRNA profili... 61

1. GİRİŞ

Meme kanseri, moleküler seviyede heterojen bir yapı gösteren ve kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür (Harbeck ve ark., 2019). Meme kanserinin oluşmasında birçok çevresel ve genetik faktörün etkili olduğu bilinmektedir. Ancak günümüzde meme kanserine neden olan genetik faktörler halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu durum, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle daha etkili tanısal ve terapötik biyobelirteçlerin araştırılmasını gerekli kılmaktadır.

Glukoz metabolizması meme kanseri gelişiminde oldukça önemli bir role sahiptir. İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) sinyal yolakları glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar (Yee ve ark., 2020). Hücre içinde bu sinyal yolaklarına aracılık eden insülin reseptörü substratı (IRS) proteinlerinin ekspresyon artışları hücre çoğalması, hücre göçü, hücre sağkalımı ve hücre metastazı gibi onkogenik sinyalleri uyararak meme kanserinin başlaması ve ilerlemesi noktasında etkili rol oynarlar (Wu ve ark., 2019).

IRS proteinleri, hücresel yanıt oluşturmak için transmembran reseptörler aracılığıyla hücre dışı sinyallerin hücre içi ortama iletimine aracılık ederek adaptör işlevi gören ve bu sinyalleri düzenleyen sitoplazmik bir protein ailesidir. Altı üyesi bulunan IRS protein ailesinin (IRS1-6) tanımlanan ve klonlanan ilk üyesi IRS1 proteinidir (Machado-Neto ve ark., 2018). IRS1 proteinleri, insanda her dokuda eksprese edilir ve çoğu hücre tipinde insüline bağlı mitojenik aktivitenin ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesine aracılık ederler (Shaw, 2011).

İnsülin ve IGF1 ligandları reseptörleri aracılığıyla IRS proteinlerinin tirozin fosforilasyonunu sağlayarak PI3K / AKT ve Ras / ERK yolaklarını aktive eder. Bu sinyal yolaklarının artan aktivasyonları, meme kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde etkilidir (Shafei ve ark., 2020). Bu sinyal yolaklarının artan veya azalan aktivasyonları, meme kanseri gelişiminde rol oynayan miRNA'ların ekspresyon profillerindeki değişimler ile ilişkilendirilmiştir (Martin ve ark., 2012).

MikroRNA'lar, tipik olarak mRNA'ların 3′UTR'si ile eşleşerek hedef genlerini baskılayan endojen küçük (19–25 baz) kodlamayan tek sarmallı RNA nükleotidleridir. Kanser gelişiminin epigenetik düzenlenmesinde rol oynayan miRNA'lar, farklı kanserlerde farklı işlevler gösterirler. Genellikle onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak hareket eden miRNA'lar, hedef onkogenleri veya tümör baskılayıcı genleri düzenleyerek meme kanseri dahil birçok kanserin başlangıcı, hücre çoğalması, tümör oluşumu ve metastazı gibi hücresel süreçlerinde rol oynadığı bildirilmiştir (Xiao ve ark., 2019).

Tez projemizde; meme kanserinde ektopik IRS1 ekspresyonu ile değişen miRNA ekspresyon profili arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı ve aday miRNA'ları belirlemeyi amaçlamaktayız. Çalışmamız sonucunda elde edilecek sonuçlar, meme kanseri gelişiminde etkili bir şekilde rol oynayan IRS1 indüklü miRNA'lara ait bir ekspresyon profilini ortaya koyacaktır. Bu sonuçlar ayrıca, ilgili miRNA'ların meme kanserindeki fonksiyonel rollerini belirlemeye yönelik ileri çalışmalara da temel oluşturacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

2.1.1. Tanım

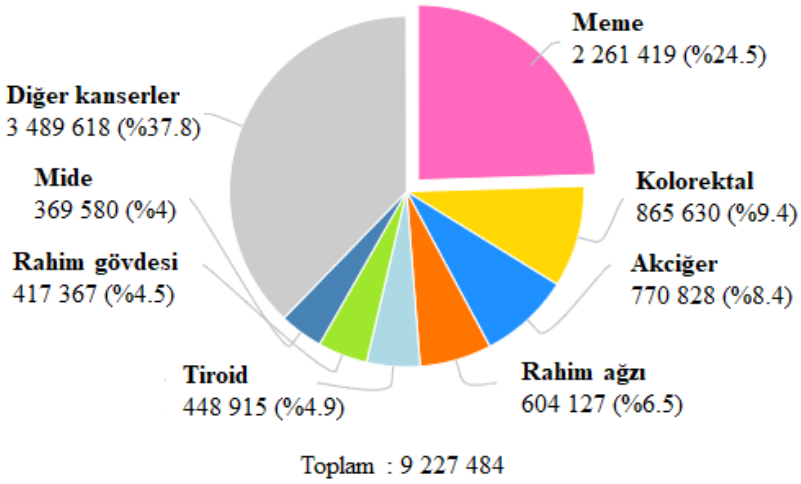
Meme kanseri, moleküler seviyede heterojen bir yapı gösteren ve dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür (Harbeck ve ark., 2019). Meme kanseri, genel olarak sporadik olarak gelişim gösterse de %5-10 oranında genetik nedenlerle ortaya çıkmaktadır (Hoang ve Gilks, 2018).

Meme kanserinin gelişiminde moleküler düzeyde onkogenler, tümör baskılayıcı genler, farklı sinyal yolakları, epigenetik ve enflamasyon, bağışıklık sistemi yetersizliği, genomik dengesizlik, Warburg etkisi gibi birçok risk faktörü rol oynamaktadır (Kormi ve ark., 2016).

Meme kanseri hastalarında, tümörün ileri evrelerinde geç tanı yüksek ölüm oranlarının ana nedenlerinden biridir (Moghbeli, 2019). Yeni terapötik hedefleri belirlemek ve daha etkin tedavi yaklaşımları geliştirmek üzere meme kanseri biyolojisinin ve altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

2.1.2. İnsidans ve ölüm oranı

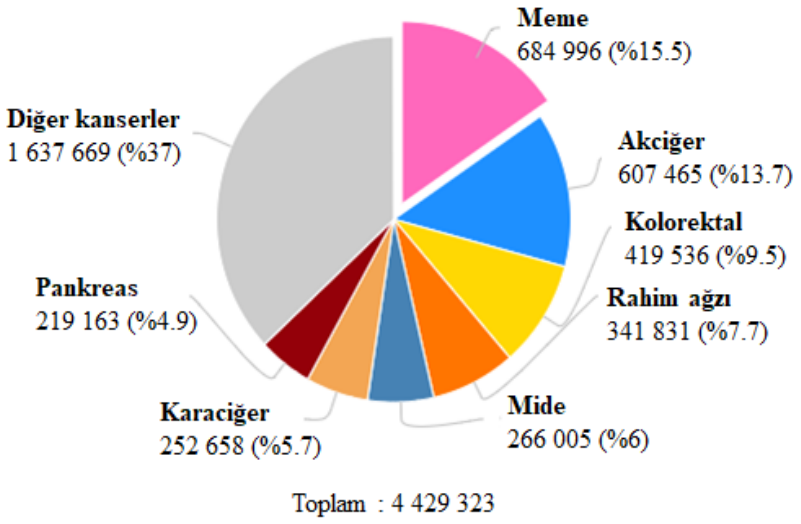
Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanser türüdür (Winters ve ark., 2017). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yürütülen küresel kanser gözlemevinin (GLOBOCAN) (2020), değerlendirmelerine göre dünya çapında meme kanserine ait yeni vaka ve ölüm sayılarının önceki yıllara göre arttığı belirtilmiştir. 2020 yılında, dünya genelinde 2.261.419 kadına ilk kez meme kanseri teşhisi konmuştur. Bu sayı, kadınlarda dünya genelinde teşhis edilen tüm kanser vakalarının yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır. 2040 yılında, dünya genelinde 3.025.471 kadına ilk kez meme kanseri teşhisi konulacağı tahmin edilmektedir (GLOBOCAN, 2020).



Şekil 1.1. 2020 yılında, kadınlarda dünya genelinde teşhis edilen tüm kanser vakalarının çeşitli kanser türlerine göre dağılımı (GLOBOCAN, 2020).

GLOBOCAN (2020), kadınlarda dünya genelinde teşhis edilen tüm meme kanseri vakalarının %45.4'ünün Asya, %23.5'inin Avrupa, %12.5'inin Kuzey Amerika, %9.3'ünün Latin Amerika ve Karayipler, %8.3'ünün Afrika ve %1.1'inin Okyanusya kıtalarında görüldüğünü belirtmiştir.

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedenidir (Winters ve ark., 2017). 2020 yılında, dünya genelinde 684.996 kadın meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir. 2040 yılında, dünya genelinde 1.037.723 kadının meme kanseri nedeniyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir (GLOBOCAN, 2020).

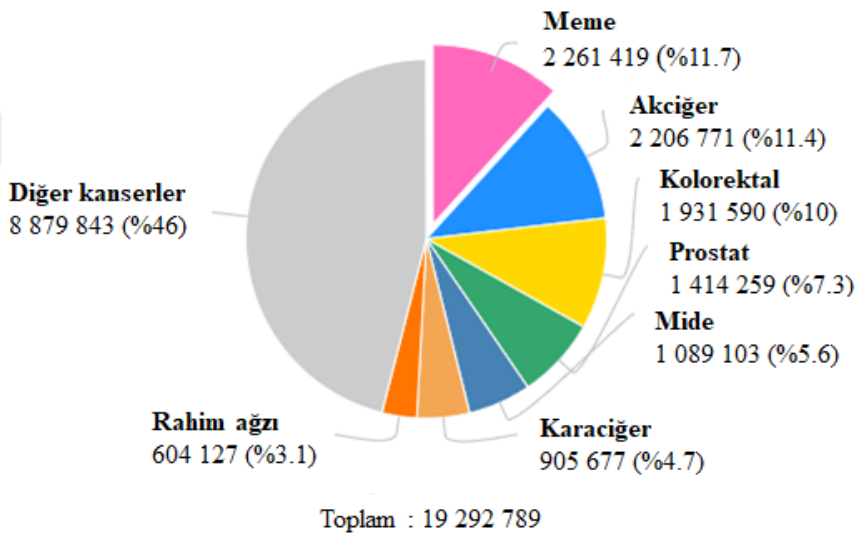


Şekil 1.2. 2020 yılında, kadınlarda dünya genelinde teşhis edilen kansere bağlı tüm ölümlerin çeşitli kanser türlerine göre dağılımı (GLOBOCAN, 2020).

Gelişmiş ülkelerde meme kanseri prevalansı daha yüksek olmakla birlikte, daha az gelişmiş bölgelerde daha yüksek ölüm oranları görülmektedir. Dünya genelinde kadınlarda meme kanserine bağlı ölümlerin %50.5'i Asya, %20.7'si Avrupa, %12.5'i Afrika, %8.5'i Latin Amerika ve Karayipler, %7.1'i Kuzey Amerika ve %0.74'ü Okyanusya kıtalarında görüldüğünü belirtilmiştir (GLOBOCAN, 2020).

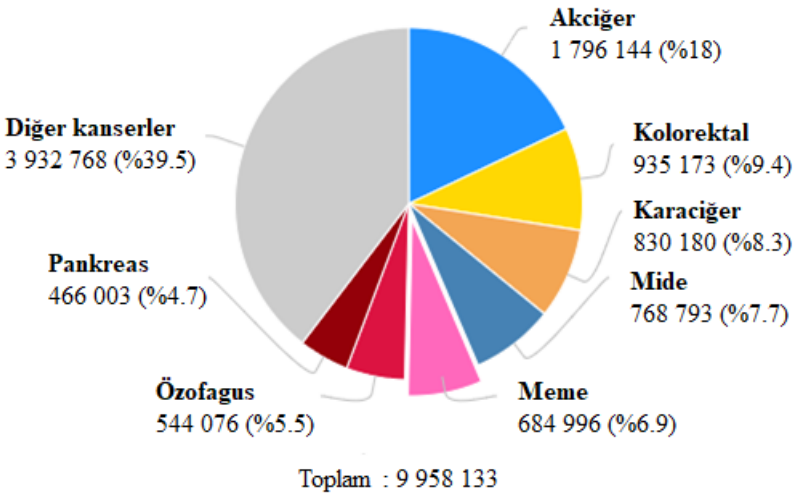
Meme kanseri, erkekler arasında çok düşük bir insidansa sahiptir. Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %1'i erkeklerden oluşmaktadır. Meme kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %0,2'sini oluşturmaktadır (Gucalp ve ark., 2019).

GLOBOCAN (2020), her iki cinsiyette dünya genelinde teşhis edilen tüm kanser vakalarının %11.7'sinin meme kanseri vakalarından oluştuğunu hesaplamış ve bu veriler doğrultusunda meme kanserinin dünyada en sık teşhis edilen kanser türü olduğunu belirtmiştir.



Şekil 1.3. 2020 yılında, her iki cinsiyette dünya genelinde teşhis edilen tüm kanser vakalarının çeşitli kanser türlerine göre dağılımı (GLOBOCAN, 2020).

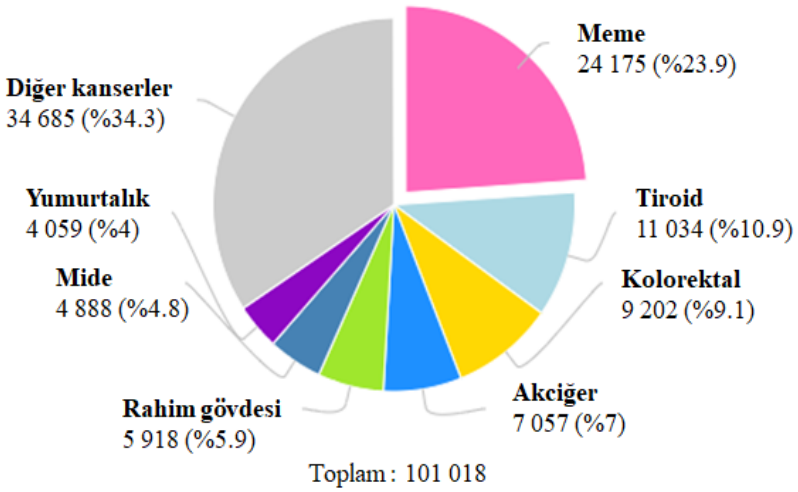
GLOBOCAN (2020), her iki cinsiyette dünya genelinde kansere bağlı tüm ölümlerin %6.9'unun meme kanserine bağlı olarak gerçekleştiğini hesaplamış ve bu veriler doğrultusunda meme kanserinin, kansere bağlı ölümlerde tüm kanser türleri içinde beşinci sırada yer aldığını belirtmiştir.



Şekil 1.4. 2020 yılında, her iki cinsiyette dünya genelinde teşhis edilen kansere bağlı tüm ölümlerin çeşitli kanser türlerine göre dağılımı (GLOBOCAN, 2020).

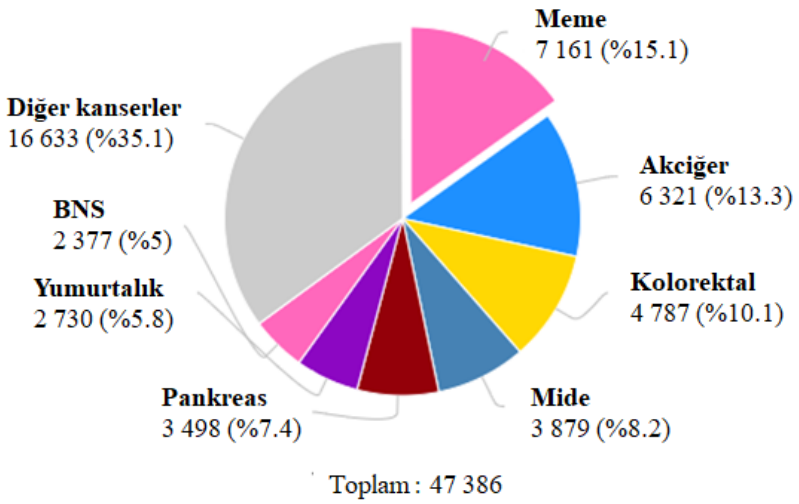
2.2. Türkiye'de Meme Kanseri

Meme kanseri, Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. GLOBOCAN (2020) verilerine göre Türkiye'de 24.175 kadına ilk kez meme kanseri teşhisi konuldu. 2040 yılında Türkiye'de 33.457 kadına ilk kez meme kanseri teşhisi konulacağı tahmin edilmektedir.



Şekil 2.1. 2020 yılında, kadınlarda Türkiye'de teşhis edilen tüm kanser vakalarının çeşitli kanser türlerine göre dağılımı (GLOBOCAN, 2020).

2020 yılında, Türkiye'de 7.161 kadın meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir. 2040 yılında, Türkiye'de 11.362 kadının meme kanseri nedeniyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir (GLOBOCAN, 2020).



Şekil 2.2. 2020 yılında, kadınlarda Türkiye'de teşhis edilen kansere bağlı tüm ölümlerin çeşitli kanser türlerine göre dağılımı (GLOBOCAN, 2020).

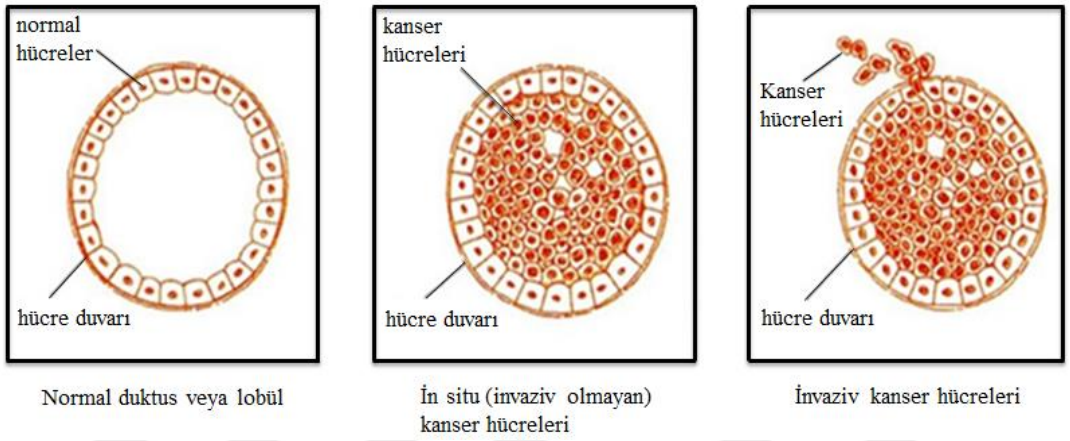
2.3. Meme Kanserinin Moleküler Patolojisi

Meme gelişimi embriyonik dönemde başlar. Duktal morfogenez, tomurcuk benzeri yapıların dallanması, uzaması ve kanalize olması ile gelişim gösterir. Miyoepitelyal ve luminal salgı hücreleri, yetişkin bir insanın meme dokusunda bulunan ve kolayca ayırt edilebilen temel iki hücre tipidir. Klinik ve histopatolojik olarak, iyi huylu tümörün kötü huylu tümöre dönüşmesi sürecinde çeşitli aşamalar bulunmaktadır (Kenemans ve ark., 2008).

Genellikle patolojik sürecin ilk aşamasını oluşturan duktal hiperplazi, değişik şekil ve kromatin yapıdaki çekirdekleri içeren, eşit biçimde dağılım göstermeyen epitelyum hücrelerinin çoğalması ile karakterizedir. Hücreler, nispeten az sitoplazmaya sahiptir ve net hücre sınırları yoktur. Sitolojik olarak hücreler iyi huyludur. Hiperplaziden atipik hiperplaziye geçiş klinik olarak meme kanseri riskinin artması ile ilişkilidir (Kenemans ve ark., 2008).

Bir sonraki aşama, in situ duktal ya da lobüler karsinomun gelişmesidir. Bu aşamada, sitolojik olarak kötü huylu hücrelerde artış görülmesine rağmen, henüz bazal membrandan stromaya invazyon gerçekleşmemiştir (Kenemans ve ark., 2008).

Son aşamada ise, hücreler bazal membrandan ayrılır, stromayı işgal edip invaziv hale gelir. İnvaziv hücrelerin, kan ve lenf damarları yoluyla yayılması ile bölgesel lenf nodu ya da uzak organ metastazları gelişebilir. Meme kanseri gelişim aşamalarının şematik gösterimi şekil 3'te gösterilmiştir (Kenemans ve ark., 2008).



Şekil 3. Meme kanserinin gelişim aşamaları (Kenemans ve ark., 2008).

2.3.1. İnvaziv duktal karsinom (IDC)

Her 10 meme kanserinin 8'inde görülen en yaygın meme kanseri türüdür. İnvaziv duktal karsinom (IDC) memenin süt kanallarını döşeyen hücrelerde başlar ve memenin içindeki yağ dokusuna doğru yayılım gösterir. Bu noktada, kan veya lenf yolu ile vücudun diğer bölgelerine yayılma (metastaz yapma) potansiyeli taşır (Özdoğan, 2020).

2.3.2. İnvaziv lobüler karsinom (ILC)

İnvaziv lobüler karsinom (ILC), bildirilen tüm meme kanseri vakalarının %5-15'ini oluşturur. İnvaziv duktal karsinoma (IDC) kıyasla genellikle hastalığın ilerleyen aşamalarında teşhis edilir. Genellikle taşlı yüzük hücre morfolojisine sahip küçük, yuvarlak, diskozif hücreler ile karakterizedir. Farklı gelişim modeliyle kendisini çevreleyen meme dokusu içerisinde stroma boyunca doğrusal şeritler halinde büyüyen

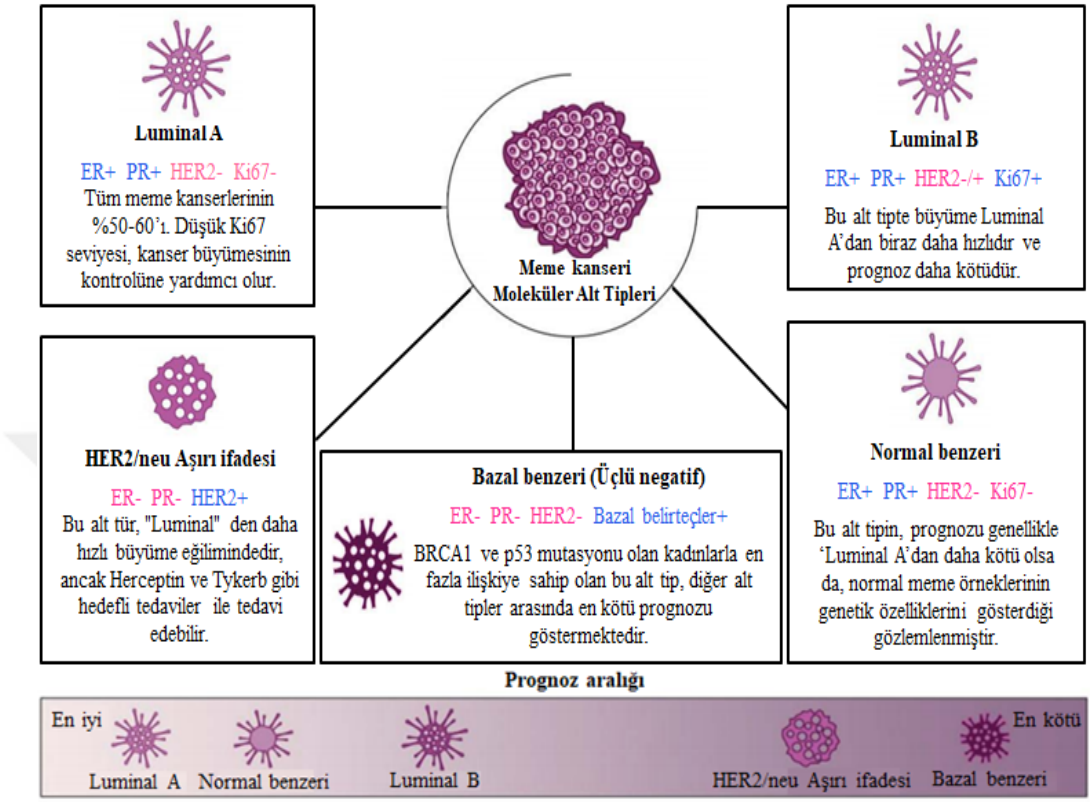
hücreleri içerir. ILC, genellikle iyi bir prognozla ilişkili olan vakaların %95'i östrojen reseptörünün (ER) ve vakaların %70'i progesteron reseptörünün (PR) ifadesini gerçekleştirir. ILC'nin karakteristik özelliği, E-kaderin ekspresyonunun kaybı veya eksikliğidir. E-kaderin, hücre canlılığını korumak için hücre-hücre yapışmasına aracılık eden temel bir moleküldür ve düzensizliği, ILC'de gözlenen ayırt edici diskozif büyüme modeli ile sonuçlanır. Genellikle sınırlı klinik belirtileri ve her zaman palpe edilebilir bir meme kitlesinin olmayışı fiziki muayene ile teşhisini zorlaştırır. Mamografi ve ultrason gibi geleneksel tarama yöntemlerinin diğer invaziv meme tümörlerine kıyasla ILC'yi saptamak için düşük bir duyarlılığa sahip olması nedeniyle, ILC'nin kapsamını ölçmeyi zorlaştırır (Wilson ve ark., 2020).

2.4. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri

Meme kanseri, kapsamlı şekilde araştırılan ilk kanserlerden biridir ve klinik davranışları oldukça değişken olan heterojen bir hastalık grubunu ifade eder. Erken histopatolojik bulgular, araştırmacılara duktal ve lobüler özellikler arasındaki ayrımlar veya metastazların lenf düğümlerine infiltrasyonu dahil olmak üzere farklı fizyolojik anlayışlar sağlamıştır. Dizi tabanlı teknolojilerin ortaya çıkışı, DNA kopya sayı değişikliklerinin ölçülmesini ve onbinlerce gen ifade profilinin ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. DNA dizi ve gen ekspresyon analizleri sonucunda farklı şekilde eksprese edilen genlerin hiyerarşik kümelenmesine bağlı olarak meme kanserinde 5 moleküler alt tip tanımlanmıştır; Luminal A, Luminal B, HER2/neu aşırı ifadesi, normal benzeri ve bazal benzeri. Bu moleküler alt tipler, tümör dereceleri ve östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), HER2 ve Ki67 proteininin varlığı (yani pozitif veya negatif) açısından farklılık gösterir (Provenzano ve ark., 2018; Sasmita ve Wong, 2018).

İlerleyen çalışmalarda, gruplama sistemlerini mikroarray analizi yoluyla çoğaltan benzer moleküler sınıflandırmalar yapılmıştır. Örneğin Hu ve ark., genel sağkalımda gözlenen önemli farklılıklarla ilişkili moleküler alt tipleri ayırt edebilen ve 306 gen içeren bir profil ortaya koymuştur. Parker ve ark., meme tümörleri üzerinde önemli prognostik değerlere sahip olan ve klinikte yaygın olarak uygulanabilen, çoğunlukla hormon reseptörü ve hücre çoğalmasıyla ilgili genler ile miyoepitelyal ve bazal özellikler gösteren genleri içeren 50 gen bildirmiştir (Dai ve ark., 2015). Meme

kanserinin moleküler alt tipleri ve göreceli prognostik sonuçları, şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Meme kanserinin moleküler alt tipleri ve göreceli prognostik sonuçları (Sasmita ve Wong, 2018).

Luminal tümörler, meme kanserinde en sık teşhis edilen alt türlerdir ve lüminal A, lüminal tümörlerin büyük çoğunluğu oluşturur. Genel olarak, lümen alt tipleri iyi bir prognoza sahiptir ve lümen B tümörleri, lümen A tümörlerinden anlamlı derecede daha kötü prognoza sahiptir. (Dai ve ark., 2015).

Yüksek HER2 ekspresyonu söz konusu olan tümörler, GRB7 ve PGAP3 gibi HER2 amplikonundaki diğer genlerin de aşırı eksprese edilmesiyle karakterize edilir. Bu tümörlerin %40-80'i TP53 mutasyonunu barındırır. Yüksek HER2 ekspresyonu olan tümörlerin üçüncü derece olma olasılığı daha yüksektir ve kötü prognoza sahiptir (Dai ve ark., 2015).

Bazal tümörlerin %60-90'ı üçlü negatif moleküler imzaya sahiptir. Bu tümörler agresif klinik özellikte olup şu anda herhangi bir standart hedefli sistemik tedaviden yoksundurlar. Diğer alt tiplerle karşılaştırıldığında, bu tümörler daha genç hasta yaşı ve

düşük sağkalım oranı ile ilişkilidir. Genel olarak bazal tümörlerin boyutu diğer alt tiplerden daha büyüktür ve hızlı büyüme gösterme eğilimindedir. (Dai ve ark., 2015).

2.5. Meme Kanseri Gelişiminde Glukoz Metabolizması

Hücre enerjisinin düzenlenmesi ve enerji metabolizmasının yeniden programlanması, kanserin ayırt edici özelliğidir. Kanser hücreleri, yeterli oksijen (Warburg etkisi) varlığında bile glikolizi arttırarak, kilit rol oynayan hücresel fonksiyonları sürdürmek için temel besin olarak glikoza olan ihtiyacı arttırırlar (Varghese ve ark., 2019). Yüksek glikoz kullanımı ise hücre çoğalmasını, hücre sağkalımını, hücre göçünü ve hücre metastazını uyararak meme kanserinin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Sun ve ark., 2019).

İnsülin, insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1), insülin reseptörü (IR), insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF1R) ve insülin reseptörü substratı (IRS) proteinleri, glikoz metabolizmasının anahtar düzenleyicileridir (Rachdaoui, 2020). Çok sayıda klinik, deneysel ve epidemiyolojik veri, insülin ve IGF1 sinyal yolakları aktivasyonlarının meme kanserinin ilerlemesi için kritik bir öneme sahip olduğu görüşünü desteklemektedir (Sarfstein ve ark., 2019).

İnsülin ve IGF1; büyüme, farklılaşma, metabolizma ve yaşam süresinin düzenlenmesi dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçleri kontrol eden ve yüksek homolojiye sahip protein yapılı hormonlardır. Memelilerde, insülinin birincil etkisinin bir öğüne yanıt olarak besin kullanımını düzenlemek olduğu, IGF1'in birincil etkisinin ise yapısal büyümeyi teşvik etmek olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Bu birincil etkilere rağmen insülin ve IGF1, metabolizma ve büyüme üzerinde önemli ortak etkiler göstermektedir (Kineman ve ark., 2018; Rabiee ve ark., 2018).

İnsülin ve IGF1, pleiotropik etkilerini reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesinin üyeleri olan IR'ye ve IGF1R'ye bağlandıktan sonra gösterirler. Birçok büyüme faktörü, reseptörün dimer oluşumunu uyararak RTK'lere bağlanarak aktive eder. IR, IGF1R ve IR / IGF1R hibritleri, ligandın bağlanmasına gerek olmaksızın homodimer veya heterodimer olarak ifade edilen tek reseptör tirozin kinazlardır. Her bir dimer, ‘‘yarı reseptör’’ olarak da adlandırılan iki disülfit bağı ile bağlı polipeptit zincirinden oluşur.

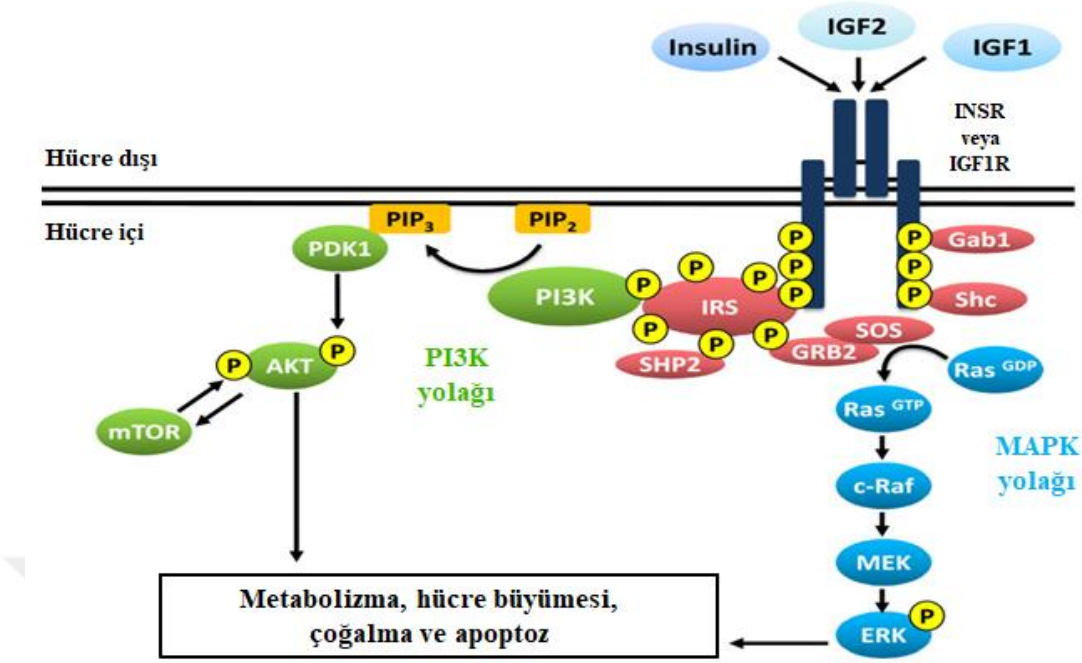
Her bir yarı reseptör, ligand bağlama alanını içeren hücre dışı bir α-zincirinden ve tirozin kinaz aktivitelerine sahip bir hücre içi β-zincirinden oluşur. Önceki çalışmalar, IGF1R ve IR'nin hem ligand bağlama alanlarında hem de kinaz alanlarında yüksek benzerliği paylaştığını ortaya çıkarmıştır (Cao ve Yee, 2021). Bu nedenle, yüksek konsantrasyonlardaki insülin, IGF1R'yi aktive ederek proliferatif aktivitelere yol açabilirken IGF1 de IR'yi uyararak metabolik yolakların aktive edebilir (Sarfstein ve ark., 2019).

IR ve IGF1R, insülinin veya IGF1'in bağlanması üzerine β alt birimleri üzerinde bulunan hücre içi tirozin kinaz motiflerinin otofosforilasyonuna izin veren konformasyonel değişikliklere uğrarlar. Fosforile tirozin motifleri, çeşitli hücre içi substratlar için bağlanma motifleri oluştururlar. Bunlar arasında yer alan insülin reseptörü substratı (IRS) protein ailesi, bu sinyallere aracılık ederek çok sayıda hücresel sürecin yönetilmesinde önemli roller üstlenirler (Cao ve Yee, 2021).

2.6. İnsülin Reseptörü Substratı (IRS) Proteinleri

İnsülin reseptörü substratı (IRS) proteinleri, transmembran reseptörler aracılığıyla hücre dışından gelen sinyallerin hücre içi ortama aktarılmasına aracılık eden sitoplazmik adaptör protein ailesidir (Farabaugh ve ark., 2016). IRS proteinlerinin transmembran reseptörleri tarafından tirozin fosforilasyonu, bu proteinler üzerinde, Src homoloji 2 (SH2) alanı içeren çeşitli sinyal taşıyıcı proteinler için bağlanma bölgeleri oluşturur. Bu hücre içi etkileşimler, çeşitli sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açarlar (Peng ve He, 2018). Dolayısıyla sinyal yolaklarının başlatıldığı ve karışık sinyal ağlarının düzenlendiği bir kesişim noktası oluştururlar.

IRS proteinleri, insülin veya insülin benzeri büyüme faktörü reseptörlerinden gelen sinyallere aracılık ederek iki temel sinyal yolağının aktivasyonuna yol açarlar. Bunlardan biri olan PI3K / AKT yolağı, IRS proteinlerinin daha çok metabolik aktivitelerinden sorumludur. Bir diğeri MAPK / ERK yolağı ise, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi aktivitelerden sorumludur. Bu sinyal yolakları birlikte mitojenik aktivite, gen ekspresyonu, glikozun taşınması ve glikojen sentezi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri düzenler (Griffeth ve ark., 2014).



Şekil 5. IRS proteinlerinin aracılık ettiği sinyaller ve sinyal yolakları (Griffeth ve ark., 2014).

2.6.1. İnsülin reseptörü substratı (IRS) protein ailesi

IRS protein ailesinin altı üyesi (IRS1-6) bulunmaktadır (Machado-Neto ve ark., 2018). Ailenin tanımlanan ve klonlanan ilk üyesi olan IRS1, insülin uyarımına yanıt olarak 185 kD ağırlığında bir fosfoprotein olarak tanımlanmıştır (Shaw, 2011). IRS1, hücrelerin çoğalmasında, hayatta kalmasında ve farklılaşmasında önemli bir rol oynar (Wei ve ark., 2017).

IRS2, IRS1 geni inaktif edilmiş farelerden elde edilen hücrelerde, insülin uyarımına yanıt olarak aktive olan ve başlangıçta 4PS olarak adlandırılan alternatif bir insülin reseptörü substratı olarak keşfedilmiştir. IRS1 ve IRS2, her dokuda eksprese edilen ve çoğu hücre tipinde insülin uyarımına bağlı mitojenik aktivitenin ve glikoz metabolizmasının düzenlenmesinin temel aracılarıdır. Ayrıca IRS2'nin, tümör ilerlemesi ve metastazında önemli rol oynayabileceği belirtilmiştir (Shaw, 2011).

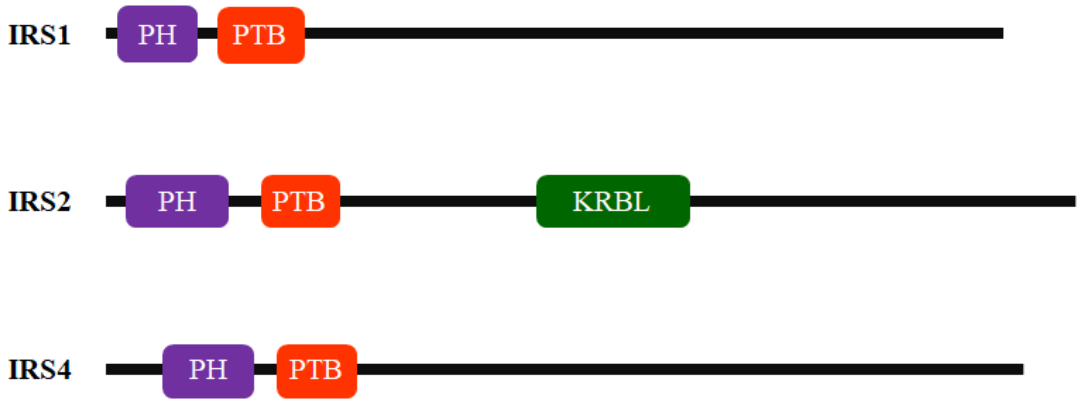
İnsanlarda, IRS3 geni bir psödogendir ve bu nedenle protein üretemez. Genellikle kemirgenlerde bulunan IRS3, kemirgenlerin adipoz, karaciğer ve akciğer dokularında yüksek miktarda üretilir. IRS4 proteini, insanda sınırlı ekspresyon gösteren

ve genellikle beyin, böbrek, timüs, karaciğer ve iskelet kası gibi insülinin hedef dokuları olan organlarda üretilir (Boucher ve ark., 2014).

DOK4 ve DOK5 olarak da bilinen IRS5 ve IRS6, ailenin diğer üyeleriyle N-terminal bölgelerinde yüksek benzerlik gösteren uzak akrabalar olarak kabul edilirler (Machado-Neto ve ark., 2018). İnsanlarda, IRS5 ve IRS6 proteinleri sınırlı doku ekspresyonuna sahip olan zayıf insülin reseptör substratlarıdır (Boucher ve ark., 2014).

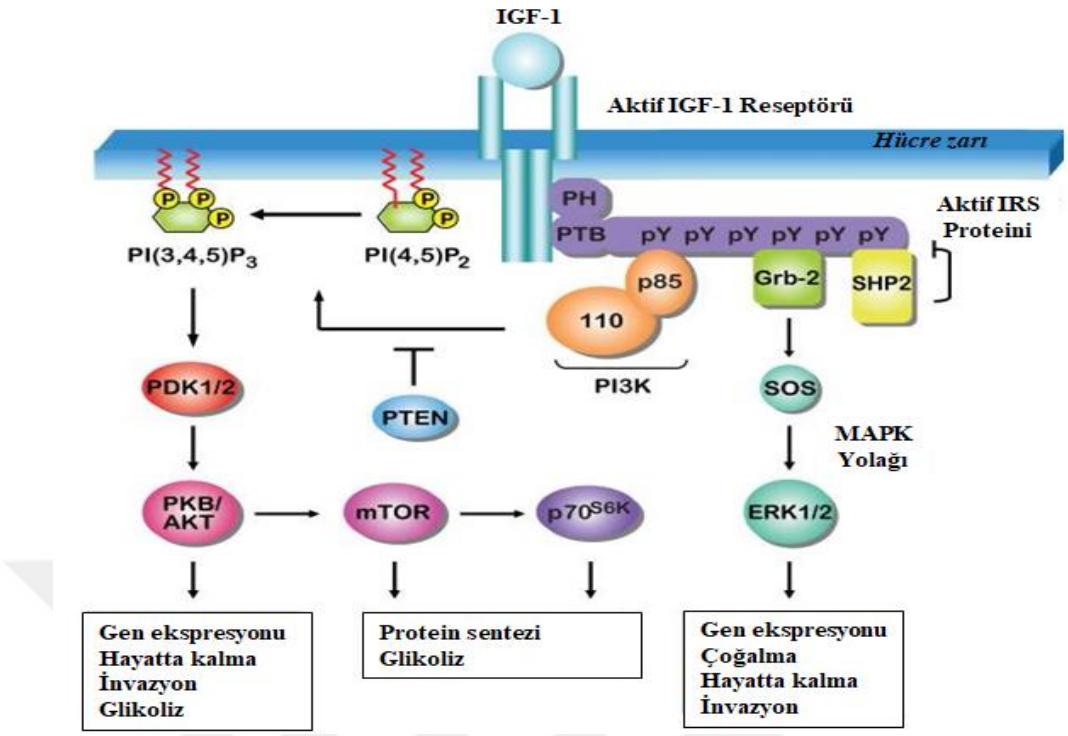
2.6.2. IRS proteinlerinin moleküler yapısı

Tüm IRS proteinleri, N-terminal bölgelerinde yüksek seviyelerde benzerlik gösteren ve evrimsel süreçte iyi korunmuş pleckstrin homoloji (PH) ve fosfotirozin bağlanma (PTB) alanlarını içerir (Machado-Neto ve ark., 2018).



Şekil 6. İnsan IRS proteinlerinin yapıları (Machado-Neto ve ark., 2018).

IRS proteinlerinin aktivasyonu, yirmiden fazla tirozin bölgesi içeren C-terminal bölgesindeki tirozin motiflerinin fosforilasyonundan sonra gerçekleşir. Bu bölgeler tirozin motiflerinden fosforile olduğunda, Src-homoloji 2 (SH2) domeyn içeren hücre içi moleküller için bağlanma alanları oluşturur (Machado-Neto ve ark., 2018).

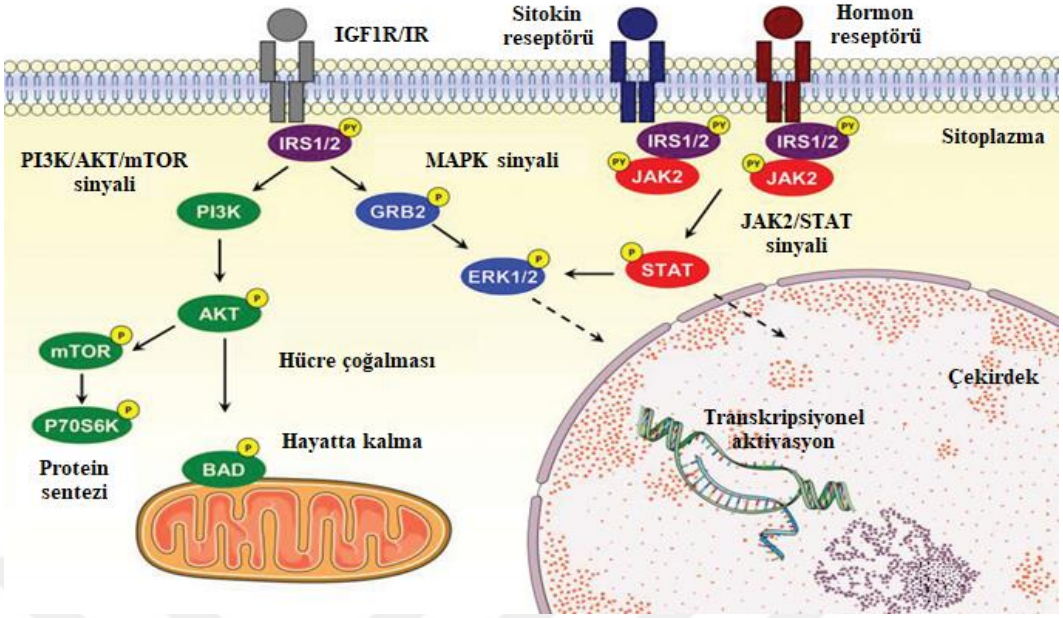


Şekil 7. IRS proteinlerinin hedef molekülleri ve hücresel etkileri (Mardilovich ve ark., 2009).

2.6.3. IRS proteinlerinin kanserle ilişkisi

IRS proteinleri, çoğu kanserle ilişkili olan adaptör proteinlerdir. Bu proteinler gerek kanserin başlangıcı gerekse de kanserin metastatik ilerlemesine kadar birçok aşamada etkili oldukları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Machado-Neto ve ark., 2018).

IRS proteinlerinin IGF reseptörü, leptin, vasküler endotelyal büyüme faktörleri, büyüme hormonu, prolaktin, integrin, sitokin ve interferon reseptörleri ile etkileşime girebilmesi ve çeşitli kanser türlerinde IRS1 ve IRS2 ekspresyonlarının aşırı artması, kanser gelişiminde önemli rol oynadıklarını göstermektedir (Gorgisen ve ark., 2020).



Şekil 8. IRS proteinlerinin farklı bazı reseptörlerle etkileşimi (Machado-Neto ve ark., 2018).

IRS geni susturulmuş fare modelleri üzerinde yapılan araştırmalar, bu proteinlerin kanserle olan ilişkileri hakkında ipuçları vermiştir. IRS1 geni susturulmuş fareler, normal farelerden %30 daha küçük doğmaktadırlar ve yaşamlarını kısa boylu olarak sürdürürler. Bu durum IRS1'in farelerde büyümeyi indüklediğini göstermektedir. Fare meme dokusunda, IRS1 veya IRS2'nin aşırı ekspresyonu ve yapısal tirozin fosforilasyonu, Akt ve Erk1 / 2'nin aktivasyonu ile ilişkili olan meme hiperplazisi ve tümörigenezi ile sonuçlanmıştır. Bu süreç, IRS1'in hücre çoğalması ve tümör büyümesi ile ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır (Shaw, 2011).

İnsülin reseptör substratı (IRS) proteinleri, meme kanseri hücrelerinde reseptör tirozin kinaz (RTK) aktivitesine aracılık etmede kritik ve farklı bir rol oynar (Becker ve ark., 2016). Önceki çalışmalar, IRS proteinlerinin meme kanserinde aşırı eksprese edildiğini göstermiştir. Porter ve ark., insan meme kanseri örneklerinde IRS1 ve IRS2 ekspresyonlarını analiz etmiş ve IRS1 ekspresyonunun meme tümörlerinde lokalize olarak arttığını bulmuştur. Koda ve ark., IRS1 ekspresyonunun insan meme kanseri hücrelerinde ve lenf düğümü metastazlarında arttığını göstermiştir (Gorgisen ve ark., 2017). IRS1'in artan ekspresyonunun, Ras/Raf/ERK yolağını aktive ederek meme kanseri MCF7 hücrelerinin çoğalmasını ve istilasını desteklediği gösterilmiştir (Wei ve ark., 2017).

2.7. MikroRNA'lar (miRNA'lar)

2.7.1. Tanım

MikroRNA'lar (miRNA'lar), transkripsiyon sonrası seviyede hedef mRNA'ların translasyonel baskılanmasını veya parçalanmalarını sağlayarak gen ekspresyonunu düzenleyen ve türler arasında yüksek oranda korunan 19-25 nükleotid uzunluğundaki kodlamayan küçük RNA molekülleridir (Lu ve Rothenberg, 2018; Correia de Sousa ve ark., 2019). MiRNA'lar, kök hücre çoğalması ve farklılaşması, organ gelişimi, çeşitli kanserler, otoimmün hastalıklar, metabolik bozukluklar ve genetik hastalıklar olmak üzere daha birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynarlar. Günümüzde insanlarda tanımlanan 2000'den fazla miRNA'nın insan genlerinin %30'unu düzenlediği tahmin edilmektedir (Conti ve ark., 2020).

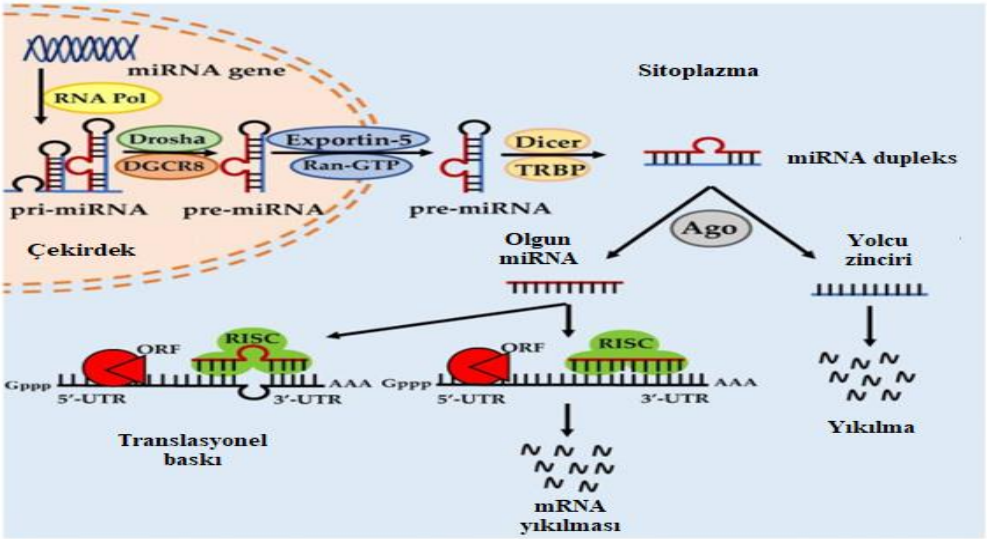
2.7.2. MiRNA'ların keşfi

MiRNA'lar ilk olarak 1993 yılında, nematod türü *Caenorhabditis elegans* solucanlarının gelişimsel süreçleri üzerine yapılan genetik çalışmalar sırasında tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda, *lin-4* geninin protein kodlamadığı ve *lin-14* geninin transkripsiyon sonrası seviyede ekspresyonunu baskılayan 22 nükleotid uzunluğunda bir RNA'yı kodladığı keşfedilmiştir. Benzer bir yaklaşımla, yedi yıl sonra, *C. elegans*'ın gelişimsel zamanlamasını kontrol eden genlerden biri olan *let-7*'nin 21 nükleotid uzunluğunda bir RNA kodladığı ve bu RNA'nın larva gelişiminde etkili olan *lin-41* geninin transkripsiyon sonrası seviyede ekspresyonunu baskıladığı tespit edilmiştir. Sayılarının fazlalığı, ifade kalıpları ve evrimsel korunmaları nedeniyle, *lin-4* ve *let-7* RNA'ları, miRNA'lar adı verilen 18-24 nükleotid uzunluğundaki kodlamayan RNA'ların oluşturduğu sınıfın üyeleri olarak dahil edilmiştir. MiRNA'lar, 2001 yılının sonlarında kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olarak resmen tanınmıştır (Conti ve ark., 2020).

2.7.3. MiRNA'ların biyogenezi

MiRNA'lar, genom içinde geniş çapta dağılmış çeşitli genlerin hem intronlarından hem de eksonlarından üretilir. MiRNA biyogenezi, çekirdekteki RNA polimeraz II tarafından primer miRNA'nın (pri-miRNA) transkripsiyonu ile başlar. Pri-

miRNA’lar, genellikle 5' guanozin başlığı (cap) ve bir 3' poliadenil (poli-A) kuyruğu olan saç tokası (hairpin) yapısında birkaç yüz nükleotit uzunluğundadır. Bu uzun dizi sonra, Mikroişlemci kompleksi adı verilen, iki DGCR8 molekülünden (Di George Sendromu Kritik Bölge 8), Pasha olarak da bilinen çift iplikli bir RNA (dsRNA) - bağlayıcı protein ve Drosha adı verilen RNAse III enziminin bir molekülünden oluşan çoklu protein kompleksi tarafından 70-120 nükleotid uzunluğundaki öncül RNA’ya (pre-miRNA) dönüştürülür. Pre-miRNA’lar, nükleer taşıma reseptör proteini Exportin 5 (XPO-5) / Ran-GTP kompleksi tarafından çekirdekten sitoplazmaya aktarılır. Daha sonra Dicer enzimi, Trans-aktivasyon yanıtı RNA bağlayıcı protein (TRBP) ko-faktörü ile birlikte pre-miRNA’ların saç tokası (hairpin) yapılarını keserek onları çift zincirli 18-23 nükleotid uzunluğunda miRNA’lara (dupleks miRNA’lara) dönüştürür (Conti ve ark., 2020; Fridrichova ve Zmetakova, 2019; Wong ve Cheah, 2020). Dupleks miRNA’lar daha sonra Argonaute (Ago) protein alt ailesinin bir üyesine dahil edilir ve RNA kaynaklı susturma kompleksinin (RISC) oluşumuyla sonuçlanır. Dupleks miRNA’lar, RNA helikazları ile iki tek sarmal halinde açılır. Bir zincir yıkılmaya maruz kalırken, kılavuz iplik (miRNA olgun iplik) RISC’ye bağlı kalır. Ago proteinine bağlı olgun miRNA, daha sonra miRNA içeren RNA kaynaklı susturma kompleksi (miRISC) olarak bilinen bir efektör kompleksinde birleştirilir. MiRNA’lar, RISC (RNA kaynaklı susturma kompleksi) kompleksine entegre olarak, ya mRNA’nin yıkılmasına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olarak işlev görürler (Loh ve ark., 2019).



Şekil 9. MiRNA biyogenezi ve miRNA aktivitesinin modülasyonu (Loh ve ark., 2019).

2.7.4. MiRNA'ların işlevleri

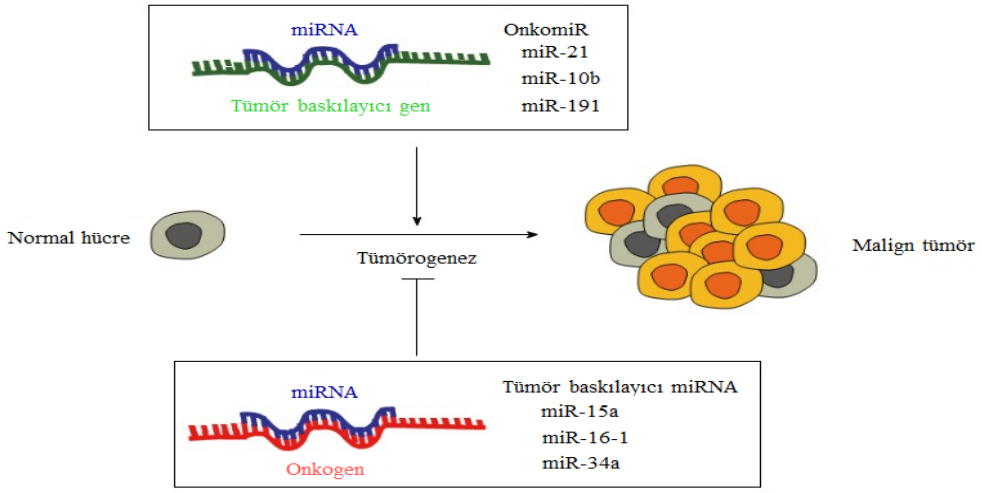
MiRNA'lar fonksiyonlarını kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliği sayesinde gerçekleştirirler. MiRNA'nın yapıya eklenmesi ile oluşan RISC kompleksi baz eşleşme özelliği ile hedef mRNA'nın ya 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgesine (untranslated region-UTR-kodlanmayan bölge) ya da ORF (open reading frame- açık okuma çerçevesi) bölgesine bağlanır ve ilgili gende protein translasyonunun baskılanmasına veya mRNA'nın yıkılmasına sebep olur. Bu bağlanma mRNA ile gerçekleşen tamamlayıcılığa bağlıdır ve bağlanma bölgesine göre ortaya çıkan yanıt değişkenlik gösterir. 3' UTR bölgesine bağlanma, tam olmayan-kusurlu bir bağlanmayı içerir ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. ORF bölgesi içine bağlanma ise tam-kusursuz bağlanmayı içerir ve Argonaute 2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır. Bununla birlikte, miRNA'lar birden fazla mRNA'ya bağlanabilir ve aynı şekilde bir mRNA birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir (Stavast ve Erkeland, 2019).

2.7.5. MiRNA'ların kanserle ilişkisi

MiRNA'ların proliferasyon, apoptoz, doku invazyonu, metastaz ve anjiyogenez dahil olmak üzere kanser biyolojisinin hemen hemen tüm aşamalarında önemli roller oynadığı yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2019). İnsan genomunda, miRNA kodlayan genlerin yaklaşık %50'si kanserle ilişkili bölgelerde veya kırılgan kromozomal bölgelerde bulunur (Loh ve ark., 2019). MiRNA'ların kanserdeki rollerine ilişkin ilk kanıt, B hücreli kronik lenfositik lösemi (B-CLL) üzerine yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Croce ve ark., iki miRNA'nın (miR-15a ve miR-16-1) B-CLL'de sıklıkla silinmiş bulunan kromozom 13q14 bölgesinden kopyalanan aynı polisistronik RNA'dan türediğini keşfettiler. B-CLL'de 13q14 bölgesinin silinmesine bağlı olarak miR-15a ve miR-16-1'in ekspresyonlarının azaldığı ya da hiç yapılmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, bu miRNA'ların B-CLL'de tümör baskılayıcı rollerine işaret etmiştir. Bu rollerine yönelik fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, miR-15a ve miR-16-1'den yoksun farelerde B-CLL benzeri hastalık geliştiği gösterilmiştir (Oliveto ve ark., 2017; Kim J ve ark., 2018; Conti ve ark., 2020). Bu önemli keşiften sonra, normal dokular ve birincil tümör dokuları arasındaki farklı miRNA ekspresyon

profilleri kapsamlı bir şekilde belgelenmiştir. Lu ve ark., meme, akciğer, kolon, prostat, rahim, böbrek dahil olmak üzere farklı dokulara ait 334 normal ve tümör örneğinde 217 miRNA'nın ekspresyon profilini çıkarıp kanserde ekspresyonu artan ve azalan miRNA'ları belirlemiştir (Kim J ve ark., 2018). Volinia ve ark. bir başka çalışmada, meme, akciğer, mide, prostat, kolon ve pankreas tümörleri dahil olmak üzere 540 katı tümör örneğinde miRNA'ların ekspresyon profilini çıkarıp bu miRNA'ların ekspresyon profillerindeki spesifik değişiklikleri belirlemiştir (Ali Syeda ve ark., 2020).

Kanser sürecinde rol oynayan miRNA'ların anormal ekspresyon profilleri, onların kanserin ilerlemesindeki fonksiyonel rollerini keşfetmek için uygun bir başlangıç noktası sağlar. Kanserle ilişkili miRNA'lar genellikle iki kategoriye ayrılır: İlk kategorideki onkogenik miRNA'lar (onkomiR), genellikle yüksek oranda eksprese edilirler. Tümörün ilerlemesine katkıda bulunurlar ve tümör fenotipinin korunmasında önemlidirler. İkinci kategori ise hücre büyümesini, apoptozu, immün hücre gelişimini ve diğer kanserle ilişkili olayları düzenleyerek tümör oluşumunu baskılayan tümör baskılayıcı miRNA'ları (ts-miR) içerir ve bunlar, çeşitli kanserlerde sıklıkla düşük oranda eksprese edilirler. Bazı kanserle ilişkili miRNA'lar, dokuya özgü bir şekilde hareket edebilirler, böylece bazı miRNA'lar farklı kanserlerde onkogenik veya tümör baskılayıcı rollere sahip olabilirler (Fridrichova ve Zmetakova, 2019). OncomiR'lerin veya tümör baskılayıcı miRNA'ların baskılanması veya uyarılması, kanser hücresinin çoğalmasını, tümör büyümesini, metastaz oluşumunu ve hücrenin hayatta kalmasını düzenler (Oliveto ve ark., 2017).



Şekil 10. MiRNA'ların kanserdeki rolleri (Oliveto ve ark., 2017).

2.7.6. Meme kanserinde miRNA'ların rolü

MiRNA'ların kanserdeki önemi, ekspresyon profillerindeki değişikliklerle vurgulanmıştır. Meme kanserinde miRNA düzensizliğinin rolüyle ilgili çalışmalar ilk kez 2005 yılında rapor edilmiş ve bu tarihten sonra bu alandaki çalışmalar katlanarak çoğalmıştır (Rahman ve ark., 2019). Iorio ve ark. 2005 yılında, normal ve tümörlü 86 meme dokusunda yaptıkları bir miRNA ekspresyon profili çalışmasıyla meme kanserinde düzensiz çok sayıda miRNA'yı tanımladılar. Bu miRNA'lar, normal ve tümörlü meme dokularının ayırt edilebilmesini sağlayan bir profil oluşturdu (Asiaf ve ark., 2018). Blenkiron ve ark. 2007 yılında, normal ve tümörlü birincil meme dokusunda 309 miRNA'nın ekspresyon profilini tanımlayıp normal ve kanserli meme dokusunda ekspresyonu artan ve azalan 133 miRNA'yı belirlediler. Ayrıca bu miRNA'ların farklı ekspresyon profilleri, meme kanserinin moleküler meme tümörü alt tiplerine göre kategorize edilmesine de olanak sağlamıştır. (Rahman ve ark., 2019).

Dizileme ve moleküler biyoloji tekniklerinin hızlı gelişimi ile ekspresyonları artmış veya azalmış miRNA'lar kolayca tespit edilebilir ve fonksiyonel miRNA'lar kolayca tanımlanabilir. Ekspresyonları artmış onkogenik miRNA'lar, potansiyel tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu baskılar. Buna karşın ekspresyonları azalmış tümör baskılayıcı miRNA'lar, tümör gelişiminden sorumlu sinyal yolaklarının aktivasyonlarında artışa neden olurlar. Her iki miRNA grubu da kanserin gelişmesini ve ilerlemesini destekleyebilir. Bu iki miRNA grubu, karmaşık bir düzenleyici ağ içinde aynı veya farklı molekülleri hedefleyerek patojenik yollara katılabilir. Böylece proliferasyon ve ilerleme yoluyla metastaza ilerleyen tümörogenezden başlayarak, meme kanserinin her evresindeki ilerlemede önemli rol oynarlar. (Wang ve Luo, 2015).

2.7.6.1. Meme kanserinde onkogenik miRNA'lar

Önceki çalışmalar, onkomiR'lerin meme kanserinde sıklıkla ekspresyonlarının arttığını ve hücre döngüsü, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, göç, istila ve metastazda yer alan tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu baskılayarak hareket ettiklerini bildirmiştir (Khordadmehr ve ark., 2019). Kapsamlı bir şekilde çalışılmış bazı onkomiR'lerin meme kanseri gelişimindeki rolleri tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Meme kanseri ile ilişkili bazı onkogenik miRNA'lar

miRNA	Hedef gen/protein	Fonksiyon	Referans
miR-9	E-kaderin, FOXO1	Hücre hareketliliği, göçü, istilası ve metastaz	Li ve ark., 2020
miR-10b	HOXD10	Damarlanma ve metastaz	Liu ve ark., 2017
miR-21	LZTFL1	Hücre çoğalması ve metastaz	Wang ve ark., 2019
miR-27a	GSK-3β	Hücre çoğalması ve istilası	Chen ve ark., 2020
miR-155	SOCS1, MMP16	Hücre çoğalması ve göçü	Zhang ve ark., 2018
miR-182	FOXF2	Hücre çoğalması ve metastaz	Zhang ve ark., 2017

2.7.6.2. Meme kanserinde tümör baskılayıcı miRNA'lar

Tümör baskılayıcı miRNA'lar, kanser hücrelerinde düşük seviyelerde eksprese edilirler ve onkogenlerin ekspresyonlarını baskılayarak farklılaşma, çoğalma, göç, istila gibi hücresel süreçleri kontrol ederler (Asiaf ve ark., 2018). Kapsamlı bir şekilde çalışılmış bazı tümör baskılayıcı miRNA'ların meme kanseri gelişimindeki rolleri tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Meme kanseri ile ilişkili bazı tümör baskılayıcı miRNA'lar

miRNA	Hedef gen/protein	Fonksiyon	Referans
let-7a	MAGE-A1	Hücre çoğalmasını, göçünü ve istilasını baskılama	Mi ve ark., 2019
miR-126	VEGF-A	Hücre çoğalmasını ve damarlanmayı baskılama	Alhasan, 2019
miR-145	HBXIP	Hücre çoğalmasını baskılama	Jiang ve ark., 2019
miR-204-5p	PIK3CB	Hücre çoğalmasını, göçünü ve metastazı baskılama	Hong ve ark., 2019
miRNA-335	EphA4	Hücre çoğalmasını, göçünü ve istilasını baskılama	Dong ve ark., 2018
miR-488	FSCN1	Hücre çoğalmasını, göçünü ve istilasını baskılama	Wu ve ark., 2020

2.7.7. Meme kanseri için tanısal biyobelirteçler olarak miRNA'lar

Düzensiz ekspresyon profiline sahip miRNA'ların belirlenmesi, ilişkili oldukları biyolojik süreçlerin ve hastalıkların özgül tanısı için önemli bir yere sahiptir. Çok sayıda

çalışma, miRNA'ların neredeyse tüm biyolojik süreçlerde önemli roller oynadığını ve anormal ekspresyonlarının meme kanseri dahil diğer kanserlerle ve farklı birçok hastalıkla ilişkili olduğunu göstermiştir. Meme kanserinde, miRNA'ların farklı ekspresyon profillerini ve onların tanımlayıcı rollerini araştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, normal meme dokularına kıyasla tümörlü meme dokularında önemli ölçüde farklı ekspresyon profillere sahip beş miRNA; miR-127- 3p, miR- 133a- 3p, miR- 155- 5p, miR- 199b- 5p ve miR- 342- 5p tanımlanmıştır. Normal meme dokularına kıyasla tümörlü meme dokularda miR- 127-3p, miR- 133a- 3p, miR- 199b- 5p ve miR- 342- 5p ekspresyonlarının önemli ölçüde azalmasına karşın miR- 155- 5p ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Çalışmada, bu miRNA'ların meme kanserinin teşhisi için potansiyel önemi vurgulanmıştır (Bitaraf ve ark., 2020). Başka bir çalışmada, miR-141-3p ve miR-181b1-5p'nin iyi huylu meme fibroadenomları ile karşılaştırıldığında meme kanseri dokularında ekspresyonlarının büyük oranda arttığı ve yüksek miR-141-3p ve miR-181b1-5p ekspresyon seviyelerinin oldukça agresif meme kanserleri ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Taha ve ark., 2020).

Meme kanseri heterojen bir hastalıktır ve tümörlerin klinik olarak ilgili alt gruplara doğru sınıflandırılması, prognoz ve tedavi seçimi için kritik öneme sahiptir. Meme kanserinde, mir-99a / let-7c / mir-125b-2 miRNA kümesinin Luminal B tümörlerine kıyasla Luminal A tümörlerinde ekspresyonlarının önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA kümesinin düşük ekspresyon profiline sahip Luminal A hastaları, önemli ölçüde daha düşük sağkalıma sahip olduğu gösterilmiştir. Luminal B tipi kanserli hastalar arasında bu miRNA kümesindeki farklı ekspresyon profillerinin sağkalım üzerine önemli bir etkisi henüz belirlenmemiştir. Birlikte, bu sonuçlar mir-99a / let-7c / mir-125b-2 ekspresyon profilinin Luminal A ve B tümörlerini ayırmak için önemli tanısal rolünü göstermiştir (Søkilde ve ark., 2019).

Metastaz, kötü huylu tümörlerin en önemli özelliğidir ve meme kanserine bağlı ölümlerin ana nedenini oluşturur. Meme kanseri hastalarında çoğu zaman nüks riskini arttıran lenf nodu metastazı (LNM) görülür. LN metastatik ve birincil meme kanseri dokusu arasında farklı ekspresyon profiline sahip 40 miRNA tespit edilmiştir. Bu

miRNA'lar arasından hsa-miR-205-5p ve hsa-miR-214-3p ekspresyonlarının LNM dokularında yüksek oranda azaldığı bildirilmiştir. Bu miRNA'ların düşük seviyelerde ifade edildiği yüksek oranda metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında arttırılmış ekspresyon seviyelerinin meme kanseri hücrelerinin hücre çoğalmasını, koloni oluşumunu ve hücre göçünü önemli ölçüde baskılayarak bu miRNA'ların meme kanseri metastazını yönlendirmedeki rolü gösterilmiştir (Elango ve ark., 2020). Meme kanserinde LNM ile ilişkili başka bir çalışmada, LNM olan ve LNM olmayan dokular arasında önemli ölçüde farklı ekspresyon profiline sahip dört miRNA tanımlanmıştır. LNM olmayan dokulara kıyasla LNM olan dokularda miR-214-3p, miR-451a ve miR-489 ekspresyonları önemli ölçüde azalırken miR-191-5p ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. MDA-MB-231 and MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında, miR-191-5p'nin arttırılmış ekspresyonu hücre çoğalmasını, göçünü ve istilasını arttırırken miR-214-3p, miR-451a ve miR-489 artrılmış ekspresyonları ise hücre çoğalmasını, göçünü ve istilasını büyük oranda baskıladığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2018).

Kemoterapi direnci, meme kanseri tedavisi için önemli bir kısıtlamadır. Kemoterapiye cevap vermeyenleri kemoterapiye cevap verecek olanlardan ayırmak, kemoterapinin istenmeyen yan etkilerini önlemek ve tedavi sonucunu optimize etmek için hastaları sınıflandırmak önemli bir gerekliliktir. Meme kanseri hastalarında yüksek miR-205 seviyelerinin TAC (dosetaksol, doksorubisin ve siklofosfamid) rejimine duyarlılığı düzenlediği gösterilmiştir. MiR-205 ekspresyonu, MCF7 ve Cal51 hücrelerinin kemoterapiye dirençli türevlerinde büyük oranda azaldığı tespit edilmiştir. Bu hücrelerde, miR-205'in arttırılmış ekspresyonu kemoterapiye dirençli hücreleri doksorubisine ve taksole yeniden duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir. MiR-205'in vasküler endotelyal büyüme faktörü A'yı (VEGFA) ve fibroblast büyüme faktörü-2'yi (FGF2) hedefleyerek fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) / Akt sinyal yolu aktivitesinin azalmasına ve kemoterapi üzerine apoptozun artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle miR-205, TAC rejimi için öngörücü bir biyobelireç olarak önerilmiştir (Hu ve ark., 2016). Başka bir çalışma, doksorubisine (DOX) dirençli meme kanseri dokularında miR-202-5p'nin yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir. miR-202-5p, PTEN / PI3K / AKT sinyal yolağı aracılığıyla meme tümör hücresi çoğalmasını ve DOX direncininin artmasını sağladığı ortaya çıkarılmıştır (Liu ve ark., 2019).

2.7.8. Meme kanserinde miRNA tabanlı terapötikler

Meme kanserinin erken teşhisi, hastaları iyileştirmek için çok önemlidir. Son zamanlarda, tanı sürecini ve daha etkili tedavi yaklaşımlarını geliştirmek için miRNA biyobelirteçlerini tanımlamaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır (Liu ve ark., 2019). MiRNA terapötiklerine yönelik iki strateji vardır: Birincisi, ekspresyonlarını azalttığı veya durdurduğu bilinen miRNA'ları veya miRNA olmayan hedefleri regüle eden spesifik onkomiR'leri dolaylı veya doğrudan baskılayan miRNA antagonistlerini kullanmaya yönelik olan stratejidir. İkinci stratejiyse ts-miRNA'ların işlev kaybını geri kazandırmak için ts-miRNA'ları taklit ederek kullanmaya yönelik bir stratejidir (Wong ve Cheah, 2020).

MiR-23b ve miR-27b, aynı kromozom üzerinden intragenik olarak eksprese edilen ve iki paralog olan bir miRNA kümesidir. miR-23b ve miR-27b'nin meme kanserindeki rolünü inceleyen çalışmalar, onkogenik veya tümör baskılayıcı olmak üzere zıt sonuçlar göstermiştir. Birkaç çalışma, miR-23b ve miR-27b'nin baskılanan ekspresyonlarının, meme kanserinde hücre çoğalmasını, kolonileşmeyi, göçü, istilayı ve metastazı azalttığını belirtmiştir. Buna karşılık, diğer çalışmalarsa meme kanserinde miR-23b ve miR-27b'nin baskılanan ekspresyonlarının hücre göçünü, istilasını, metastazını ve tamoksifen direncini arttırdığını bildirmiştir. Önceki çalışmalarda, miR-23b ve miR-27b'nin ekspresyonlarını azaltmak için miRNA antagonistleri başarılı bir şekilde kullanılmış olsa da yıkımın etkinliği genellikle eksik ve geçicidir. Hannafon ve ark., farklı bir yaklaşımla CRISPR / Cas9 gen düzenleme sistemini kullanarak miR-23b ve miR-27b'nin susturulması ile meme kanserinin ilerlemesi üzerindeki spesifik rollerini ve sonuçlarını belirlemeye yönelik bir çalışma yapmıştır. Çalışmada, MCF7 hücre hattında miR-23b ve miR-27b'nin susturulması ile durdurulan ekspresyonlarının hücre çoğalmasını, kolonileşmeyi, göçü, istilayı ve metastazı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 23b ve miR-27b'nin meme kanserinde onkogenik miRNA'lar olduğunu göstermiş ve buna benzer terapötik potansiyele sahip miRNA'ların gen nakavtı ile hedeflenmelerinin daha etkili ve kalıcı bir tedavi yaklaşımı sunabileceği belirtilmiştir (Hannafon ve ark., 2019).

Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) veya insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'yi (Her2) eksprese

etmeyen invaziv bir meme kanseridir. *Slug* geni, çinko parmak proteini Slug'ı kodlar. *Slug* geni, insan kanserlerinde geniş ölçüde eksprese edilir ve invazivlik, ilaç direnci ile ilişkilidir. Slug proteini, TNBC hücrelerinin istilası ve metastazı ile ilişkilendirilmiştir. TNBC sıklıkla adjuvan veya neo-adjuvan kemoterapi ve radyoterapi ile kombinasyon tedavisi gerektirir. Bununla birlikte, bazı durumlarda tedavi yanıtı, genel sağkalım ile ilişkili değildir. Tedavi yanıtı ile sağkalım arasında iyi bir korelasyon eksikliği, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Bu amaçla, TNBC'yi tedavi etmek için yeni fonksiyonel miRNA lipozomları geliştirilmiştir. Transkripsiyon sonrası, *Slug* genini susturmak için 25 nükleotidlik özel fonksiyonel bir miRNA dizisi tasarlanmış ve tLyp-1 peptidi ile modifiye edilmiş fonksiyonel lipozomlara kapsüllenmiştir. TNBC hücrelerinde, fonksiyonel lipozomlar ile *Slug* geninin susturulması ve TGF-21 / Smad yolağının baskılanması, tümör büyümesinin ve istilasının baskılanması ile sonuçlanmıştır. Bu çalışmanın, miRNA aracılı TNBC'nin tedavisi için yeni strateji sunduğu belirtilmiştir (Yan ve ark., 2019).

Sonuç olarak, miRNA tabanlı terapötiklerdeki ilerleme, meme kanserinde daha etkili tedavi stratejilerini ve kişisel tedavi yaklaşımlarını geliştirmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Bu nedenle, meme kanserinde terapötik potansiyele sahip miRNA'ların belirlenmesi ve ilişkili oldukları biyolojik süreçlerin daha derinlemesine aydınlatılması gereklidir. Bu kapsamda, tez projemizde; meme kanseri gelişiminde önemli olduğu kanıtlanan IRS1 proteinin ektopik artışı ile değişen miRNA ekspresyon profili arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı ve aday miRNA'ları belirlemeyi amaçlamaktayız.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. E.Coli DH5α Suşuna Plazmid Transformasyonu

Kullanılan solüsyonlar:

LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri: %2'lik olacak şekilde 4 gram (g) LB (Merck 1. 10285.0500) toz 200 ml distile su içerisinde çözdürülüp otoklavlandı.

Uygulama

- -80 ^{o}C'de, içinde yaklaşık 200 µl kompetent hücre bulunan ependorf tüpü buza yerleştirildi.
- Buza içi boş steril bir ependorf tüpü yerleştirildi. Buzda erimeye başlayan kompetent hücrelerden 95 µl alınarak içi boş ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 15 µl vektörden (pcDNA3.1 Flag tagged insan IRS1 ekpresyon vektörü) alınarak eklendi. Tüpün içinde iyice pipetaj yapıldı.
- Karışım, buzun içinde 30 dk bekletildi.
- Sürenin sonunda karışım, 42 ⁰ C'de 1 dk boyunca kuru blok ısıtıcıda bekletildikten sonra alınarak 1 dk buzun içinde bekletildi.
- Sonra, ispirto ocağı eşliğinde karışımın üzerine 500 µl antibiyotiksiz sıvı LB besiyeri eklendi ve karışımın bulunduğu ependorf tüpü, 37 ⁰ C etüvün içindeki çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi.
- İspirto ocağı eşliğinde, 15 ml'lik steril bir falkon tüpün içine 5 ml sıvı LB besiyeri ve 5 µl (50 mg/ml) amfisilin eklendi.
- İnkübasyon sonunda karışım, yine ispirto ocağı eşliğinde falkon tüpteki amfisilinli sıvı LB besiyerinin üzerine aktarıldı. Sonra, falkon tüpü gece boyunca 37 ⁰ C etüvün içindeki çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı.

3.2. E.Coli Hücrelerinden Plazmid İzolasyonu

Kullanılan solüsyonlar:

- Resüspansiyon Solüsyonu
- Lizis Solüsyonu
- Nötralizasyon Solüsyonu
- Yıkama Solüsyonu (35 ml %96'lık etanol eklendi)

- Elüsyon Solüsyonu (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)

Plazmid izolasyonu, Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit ile aşağıdaki protokole göre yapıldı;

- 50 mg/ml amfisilin içeren 5 ml LB besiyerinde gece boyunca 37 ^{o}C'de inkübe edilen ve başarılı bir şekilde çoğalan transforme bakterilerin bulunduğu falkon tüp, 4.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant kısımı uzaklaştırıldı.
- Falkon tüpün altındaki bakteri çökeltisinin üzerine 500 µl resüspansiyon solüsyonu eklendi ve iyice vortekslenerek karışımın homojenize olması sağlandı.
- Homojenize edilen bakteriler, 1.5 ml'lik steril bir ependorf tüpe aktarıldı.
- Üzerine 250 µl lizis solüsyonu eklendi ve solüsyon viskoz hale gelene kadar 4-6 kez alt üst edildi.
- Ardından, karışımın üzerine 350 µl nötralizasyon solüsyonu eklendi ve karışım hemen 4-6 kez iyice alt üst edildi.
- Ardından, 13.000 gravite (g)'de 5 dk santrifüj edildi.
- Sürenin sonunda, süpernatant spin kolona aktarıldı.
- Spin kolon, 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve spin kolonun altında biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- Ardından, spin kolona 500 µl yıkama solüsyonu 1 eklenerek 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve kolonun altında biriken sıvı uzaklaştırıldı.
- Sonra, spin kolona 500 µl yıkama solüsyonu 2 eklenerek 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve kolonun altında biriken sıvı uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi, bir kez daha tekrarlandı.
- Plazmid DNA'nın bulunduğu spin kolonun üst kısmı steril yeni bir ependorf tüpe yerleştirildi.
- Plazmid DNA'ları silika membrandan sökmek için 50 µl elüsyon tamponu spin kolona aktarıldı ve 2 dk bekletildi.
- 13.000 g'de 2 dk santrifüj edilerek plazmid DNA'nın silika membrandan ayrılarak ependorf tüpe geçmesi sağlandı.

- İzole edilen plazmid DNA'larının miktar ve saflık değerleri nanodrop aracılığıyla belirlendi.
- Sonra, ependorf tüpün ağzı parafilmlenerek -80 ^{o}C'ye kaldırıldı.

3.3. Hücre Kültürü

Çalışmamızda, stoklarımızda mevcut olan normal meme hücresine ait CRL4010 ve meme kanseri modeli MCF7 hücre hatları kullanıldı. Hücrelerin tamamı %1 L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum prüvat, %10 Fetal Bovin serum (FBS-biowest Cat. no: S1810-100) ve %1 PSA (Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin, BI-03 033 1B) eklenmiş DMEM (Dulbecco's modified eagle medium-biowest Cat. no: L0064-500) içinde; %5 CO_2'lik atmosfer, %95 nem ve 37 ^{o}C'lik inkübatörde (Memmert) monolayer kültür olarak çoğaltıldı.

3.3.1. CRL4010 ve MCF7 hücrelerinin çözdürülmesi

- Güvenlik kabini (MetiSafe) içinde 15 ml'lik steril iki falkon tüpü ilgili hücre hatları için etiketlendi ve her birinin içine 5 ml besiyeri aktarıldı.
- Azot tankından CRL4010 ve MCF7 hücrelerinin bulunduğu iki kriyo tüp çıkarıldı ve alkollenerek (%70'lik etanol) güvenlik kabinine alındı.
- Kriyo tüp içerisindeki hücreler taze besiyeri aracılığıyla tüp çevresini bırakacak kadar eritildi.
- Tüplerin iç yüzeyinden ayrılan hücreler, ilgili 15 ml'lik falkon tüplerin içinde bulunan besiyerleri üzerine aktarıldı ve 3-4 kez alt üst edilerek hücrelerin besiyerleri içinde çözülmesi sağlandı.
- Besiyerlerinde çözülen hücreler, 2.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- 100 mm çapında steril iki petri kabı, ilgili hücre hatları için etiketlendi ve her birinin içine 10 ml besiyeri aktarıldı.
- Santrifüj sonrasında, falkon tüplerdeki süpernatant kısımları uzaklaştırıldı ve her falkon tüpün dibindeki hücre çökeltilerinin üzerine petriden bir miktar besiyeri alınarak eklendi.

- Hücreler, iyice pipetaj yapıldıktan sonra falkon tüplerden alınarak ilgili petri kaplarının içinde bulunan besiyerlerinin üzerine aktarıldı.
- Ardından, petri kapları %5 CO_2'li inkübatöre kaldırıldı.

3.3.2. CRL4010 ve MCF7 hücrelerinin beslenmesi

Hücreler, %10 FBS ve %1 PSA içeren DMEM besiyeri ile inverted mikroskopta morfolojik olarak incelendikten sonra hücrelerin yoğunlaşma durumlarına göre iki gün aralıklarla beslendi. Bunun için;

- Petrilerde bulunan besiyerleri pipetörle dikkatli bir şekilde çekilerek uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin üzerine 1X-PBS (Fosfat Tuz Tamponu) izotonik tampon çözeltisi eklendi ve çözelti, hücrelerin yüzeyinde kısa bir süre ve yavaşça gezdirildikten sonra pipetörle çekilerek uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin üzerine 10 ml yeni besiyeri eklenerek inkübatöre kaldırıldı.

3.3.3. CRL4010 ve MCF7 hücrelerinin dondurulması

%10 DMSO (Dimetil Sülfoksit): Dondurma solüsyonu 9 ml FBS ve 1 ml DMSO olacak şekilde 15 ml'lik steril bir falkon tüpün içinde karıştırılarak hazırlandı.

Uygulama

- Petrilerde bulunan besiyerleri pipetörle dikkatli bir şekilde çekilerek uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin üzerine 1X-PBS izotonik tampon çözeltisi eklendi ve çözelti, hücrelerin yüzeyinde kısa bir süre ve yavaşça gezdirildikten sonra pipetörle çekilerek uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin üzerine 500 µl tripsin eklendi ve 37 ^{o}C'de inkübatörde 2 dk bekletildi.
- Bekleme sırasında, 15 ml'lik steril iki falkon tüpü ilgili hücre hatları için etiketlendi ve her birinin içine 5 ml besiyeri aktarıldı.

- İnkübatörden çıkarılan hücreler, tripsinle petri kabının yüzeyinden kaldırılarak homojenize edildikten sonra ilgili falkon tüplerin içine aktarıldı.
- Hücreler, 2.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı. İçerisine pipetör ile daha önce hazırlanan % 10'luk 10 ml (FBS-DMSO karışımı) dondurma solüsyonundan her bir falkon tüpe 5 ml eklendi ve ilgili hücre çökeltileri iyice pipetaj yapılarak solüsyonda homojenize olması sağlandı.
- Hücreler dondurma solüsyonu ile homojenize edildi ve kriyo tüplere bölündü.
- Tüpler, -80 ^{o}C'ye kaldırıldı ve bir gün sonra -80 ^{o}C'den alınarak azot tankına aktarıldı.

3.3.4 CRL4010 ve MCF7 hücrelerinin pasajlanması

İnverted mikroskopta incelenen hücrelerin yoğunluğu yaklaşık %80'e ulaştığında hücreler pasajlandı. Bunun için;

- Besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1X-PBS ile yıkandı.
- Hücrelerin üzerine 500 µl tripsin eklendi ve 37 ^{o}C'de inkübatörde 5 dk bekletildi.
- 100 mm çapında steril iki petri kabı, ilgili hücre hatları için etiketlendi ve her birinin içine 10 ml besiyeri aktarıldı.
- Tabana yapışmış olan hücreler, tripsinle petri kabının yüzeyinden kaldırılarak homojenize edildi ve her hücre hattı için 100 µl alınarak ilgili yeni petri kaplarındaki besiyerleri üzerine aktarılarak petri kapları inkübatöre kaldırıldı.

3.4. CRL4010 ve MCF7 Hücrelerinin Sayımı

Hücre sayımı için hematositometre metodu kullanıldı. Bunun için;

- Besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1X-PBS ile yıkandı Hücrelerin üzerine 500 µl tripsin eklendi ve 37 ^{o}C'de inkübatörde 2 dk bekletildi.

- Bekleme sırasında, 15 ml'lik steril iki falkon tüpü ilgili hücre hatları için etiketlendi ve her birinin içine 5 ml besiyeri aktarıldı.
- İnkübatörden çıkarılan hücreler, tripsinle petri kabının yüzeyinden kaldırılarak homojenize edildikten sonra ilgili falkon tüplerin içine aktarıldı.
- Stoktan alınan hücreler 1/10 sulandırıldı.
- Seyreltilmiş hücre Thoma lamının üzerindeki ilgili alanına aktarıldı ve üzerine lamel camı yavaşça bırakıldı.
- İnverted mikroskopta merkez alana düşen hücreler sayılarak stoktaki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle belirlendi.

$$\text{Hücre Sayımı (ml)} = \frac{A \times SF \times 10^4}{\text{Lam üzerinde sayılan alan sayısı}}$$

A : Bir karede sayılan hücre adedi

SF : Seyreltme faktörü

10^4 : Standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmez.

- 2 adet steril 6 kuyucuklu plaklar, güvenlik kabininde her birinin birinci kuyucuğu CRL4010 ve ikinci kuyucuğu MCF7 hücreleri için etiketlendi.
- İlgili kuyucukların her birine 2 ml besiyeri içinde ilgili hücre hatlarının 3.10^5 hücresi olacak şekilde hesaplanarak ekildi.
- Hücreler, kuyucukların tabanına yapışması ve çoğalması için inkübatöre kaldırıldı.

3.5. CRL4010 ve MCF7 Hücrelerine Plazmid Transfeksiyonu

6 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler, inverted mikroskopta incelendi ve hücrelerin %70 oranında çoğaldığı ve transfeksiyon için uygun olduğu belirlendi.

- Transfeksiyon işlemi için transfeksiyon solüsyonu hazırlandı.
- Her ependorf tüpünün içine 20 µl plazmid DNA (önceki aşamada izole edilen ve -80 ^oC'de saklanan), 380 µl serumsuz besiyeri ve 5 µl transfeksiyon reaktifi

(Thermo Scientific TurboFect) eklendi ve iyice pipetaj yapılarak birbirlerine karışmaları sağlandı.

- Bu karışımlar, 20 dk bekletildi.
- İlk ependorf tüpteki karışımın tümü pipetle alınarak 6 kuyucuklu plakanın birinci kuyucuğunda bulunan CRL4010 hücrelerinin üzerine 10-15 cm yükseklikten damlatıldı.
- İkinci ependorf tüpteki karışımın tümü pipetle alınarak 6 kuyucuklu plakanın ikinci kuyucuğunda bulunan MCF7 hücrelerinin üzerine 10-15 cm yükseklikten damlatıldı.
- Bu işlemlerden sonra, hücreler inkübasyona bırakıldı.

3.6. Protein Lizatlarının Hazırlanması

Uygulama

- Triton-X lizis tamponu, -20 ^{o}C'den çıkarılarak buzun içinde erimeye bırakıldı.
- 48-72 saat boyunca inkübe edilen kontrol ve transfekte hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1X-PBS ile yıkandı.
- Ardından, her kuyuya 300 µl lizis tamponu eklendi.
- Dört adet steril 1.5 ml'lik ependorf tüpü ilgili iki hücre hattına ait protein lizatlarının kontrol ve transfekte gurupları için etiketlendi.
- Hücre kazıyıcısı ile tabana yapışmış olan hücreler kaldırıldı ve iyice pipetaj yapıldıktan sonra ilgili ependorf tüplere aktarıldı.
- 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları ilgili yeni ependorf tüplere aktarıldı.
- Lizatların bulunduğu ependorf tüplerin ağzı parafilmlenerek Bradford analizi yapılmak üzere -80 ^{o}C'ye kaldırıldı

3.7. Protein Miktar Tayini (Bradford Analizi)

Stok BSA (BioShop CAS. 9048-46-8) (10 mg/ml): 50 mg BSA, 5 ml enjeksiyonluk suda iyice çözüldü ve stok olarak -20°C'ye kaldırıldı.

Bradford Reaktifi (BioRad 500-0006): Bradford reaktifi enjeksiyonluk su ile 1/5 oranında sulandırıldı.

Uygulama

- 10 mg/ml stok BSA solüsyonu, 1 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı.
- 1 mg/ml BSA, 0.2, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 11 µl miktarlarında olacak şekilde 96 kuyucuklu steril bir plakaya aktarıldı.
- Eriyen protein lizatları iyice vortekslendikten sonra, her protein lizatından 1µl alınarak 96 kuyucuklu plakanın ilgili kuyularına aktarıldı.
- Kuyucuklara aktarılan BSA örneklerinin ve protein lizatı örneklerinin her birinin üzerine 100 µl Bradford Reaktifi eklendi.
- Ardından, örnekler florometre cihazında 595 nm dalga boyunda okutularak protein lizatlarının konsantrasyon değerleri belirlendi.
- Bu işlemlerin sonunda, buzdaki protein lizatları -80 ^{o}C'ye kaldırıldı.

3.8. Western Blot

3.8.1. Jel solüsyonlarının hazırlanması

Resolving (Ayrıştırma) Tamponu: 1,5 M TrisBase ve pH: 8.8 olucak şekilde 500 ml hazırlandı. Bunun için; 90,82 g TrisBase tartıldı. 300 ml distile H_2O'da çözüldü ve son hacim distile H_2O ile 500 ml'ye tamamlandı. Solüsyonun pH: 8.8 olarak ayarlandı.

Stacking (Yükleme) Tamponu: 0,5 M TrisBase ve pH: 6.8 olacak şekilde 500 ml hazırlandı. Bunun için; 30,25 g TrisBase tartıldı. 200 ml distile H_2O'da çözüldü ve son hacim distile H_2O ile 500 ml'ye tamamlandı. Solüsyonun pH: 6.8 olarak ayarlandı.

Running Buffer (10X): 15 g TrisBase, 94 g Glisin (Vivantis PR0608), 50 ml %10 SDS karışımı 800 ml distile H_2O'da çözüldü ve son hacim distile H_2O ile 1.000 ml'ye tamamlandı. Solüsyon pH ayarı gerektirmemektedir.

Running Buffer (1X): 100 ml 10X Running Buffer üzerine 900 ml distile su eklendi ve karıştırıldı.

10X-PBS (pH: 7.4): 80 g NaCl, 2 g KCI, 14,4 g Na_2HPO_4, 2,4 g KH_2PO4 tartıldı. 800 ml distile H_2O içerisinde çözüldü. Solüsyonun pH: 7.4 olarak ayarlandıktan sonra son hacim distile H_2O ile 1.000 ml'ye tamamlandı.

1X-PBST (500 ml için): 10X PBS'ten 50 ml ve distile sudan 450 ml alınarak karıştırıldı. Bu çözelti üzerine 500 µl Tween-20 (Merck 8.22184.1000) eklendi.

SDS Yükleme Tamponu: 1 ml gliserol, 3 ml %10 SDS (Merck 8.22050.1000), 1,25 ml (1M) Tris-HCl pH: 6,7, 1-2 µg bromofenol mavisi eklendi. Filtreden geçirilerek kullanıldı. Kullanmadan önce 950 µl'sine 50 µl β-merkaptoetanol (Sigma M3148) ilave edildi.

%10 Amonyum persülfat (APS): 0,1 g APS (Sigma A3678) 1.5 ml'lik bir ependorf tüpü içerisine aktarıldı. Üzerine 1.000 µl distile su eklendi. İyice vortekslenerek çözünmesi sağlandı ve 4 ^oC'de kaldırıldı.

Transfer Tamponu: 3,75 g Glisin ve 7,25 g TrisBase 1.000 ml distile suda çözülerek karışıma 250 ml metanol eklendi.

Akrilamid/Bisakrilamid (100 ml için 29/0.8): 500 ml hazırlandı. Bunun için; 145 g Akrilamid (Merck 8.00830.1000) ve 4 g Bisakrilamid (Merck 2610) tartıldı. Üzerine 200 ml distile su eklenerek karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlandı. Son hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

3.8.2. Jelin hazırlanması

- %7'lik SDS-PAGE jeli hazırlandı.
- Resolving jeli için 50 ml'lik bir falkon tüpün içine tablo 3'te yer alan materyaller belirtilen oranlarda eklenerek 2-3 kere yavaşça alt-üst edildi.
- Ardından, 5 ml'lik bir serolojik pipet aracılığıyla camlar arasına tarak alt sınırına 1-2 cm kalacak şekilde döküldü ve üzerine izopropanol alkol ilave edildi.
- Jel, iyice donması için 10-30 dk bekletildi.
- Jel donduktan sonra üzerindeki izopropanol alkol tamamen uzaklaştırıldı.
- Stacking jeli için aynı şekilde 50 ml'lik bir falkon tüpün içine tablo 3'te yer alan materyaller belirtilen oranlarda eklenerek 2-3 kere yavaşça alt-üst edildi.

- Ardından, 5 ml'lik bir serolojik pipet aracılığıyla camlar arasında donmuş resolving jelin üzerine camların üst sınırına gelecek şekilde döküldü ve hemen ardından, tarak dikkatli bir şekilde camların arasına yerleştirildi.
- Jel, iyice donması için 10-30 dk bekletildi.
- Jel donduktan sonra, tarak yavaş ve dikkatli bir şekilde çıkarıldı

Tablo 3. Western blot jel hazırlama protokolü

Resolving	**%7**	**%10**	**%12**	**%15**	**Stacking**	**5ml'lik**	**10ml'lik**
Su	15ml	11.55ml	10.5ml	7.05ml	**Su**	3ml	6ml
Resolving Buffer	7.5ml	7.5ml	7.5ml	7.5ml	**Stacking Buffer**	1.25ml	2.5ml
Acr(29:08)	7.05ml	10.5ml	12ml	15ml	**Acr(29:08)**	0.625ml	1.25ml
%10SDS	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	**%10SDS**	50µl	100µl
%APS	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	**%APS**	50µl	100µl
Temed	30µl	30µl	30µl	30µl	**Temed**	5µl	10µl
Toplam	30ml	30ml	30ml	30ml	**Toplam**	5ml	10ml

3.8.3. Protein lizatlarının hazırlanması

- CRL4010 ve MCF7 hücrelerine ait protein lizatları -80 ^{o}C'den çıkarılarak buzda erimeye bırakıldı.
- İlgili protein lizatları için etiketlenen 500 µl'lik ependorf tüpleri (Axygen), tüp standına yerleştirildi.
- Buzda eriyen protein lizatları ve β-merkaptoetanol içeren SDS yükleme tamponu iyice vortekslendi.
- Bradford analizi sonuçlarına göre kullanılacak protein lizatlarının ve SDS yükleme tamponunun miktarları hesaplanarak belirlendi.
- İlgili ependorf tüplerde belirlenen miktarlarda ilgili protein lizatları ve SDS yükleme tamponu karıştırılarak hazırlandı.

- Tüpler, öncesinden 95 ^{o}C'ye ayarlanan kuru blok ısıtıcıda 5 dk bekletildi.
- Sürenin sonunda, ısıtıcıdan alınan örnekler kısa süreli olarak vortekslendikten sonra tüp standına yerleştirildi.

3.8.4. Örneklerin jele yüklenmesi ve jelde yürütülmesi

- Jel, yürütme tankına alınarak üzerine yürütme solüsyonu (1X Running buffer) eklendi.
- Yükleme pipet uçları aracılığıyla ilk kuyucuğa marker, sonraki kuyucuklara belirlenen bir sıraya göre hazırlanan örnekler yüklendi.
- Jele yüklenen örnekler, güç kaynağı (Biorad Power supply) aracılığıyla stacking jelinde 60 voltta, resolving jelinde ise 80 voltta yürütüldü.
- Yürütme işlemi sonunda, proteinlerin PVDF membrana transfer aşamasına geçildi.

3.8.5. Proteinlerin jelden PVDF membrana transferi

- Transfer aşamasında ilk olarak transfer solüsyonu hazırlandı.
- Bu solüsyonun içerisine transfer için kullanılacak olan süngerler ve whatman kağıtları konularak bir süre bekletildi.
- Yürütme işlemi sonucunda, örneklerin yürütüldüğü jelin bulunduğu cam yürütme tankından çıkarıldı ve bir süre soğuk suyun altında tutuldu.
- Ardından, cam düz bir zemin üzerine alınarak bir ayırıcı yardımıyla kalın ve ince camlar birbirinden ayrıldı ve jelin stacking kısmı kesilerek uzaklaştırıldı.
- Transfer kasetinin siyah kısmına sırasıyla transfer solüsyonunda ıslatılmış bir sünger, bir whatman kağıdı (Sigma Z691011), örneklerin yürütüldüğü jel, saf metanolde ıslatılmış PVDF membran (Millipore IPVH00010) yerleştirildi. Bunun üzerine tekrar bir whatman kağıdı ve bir sünger yerleştirilerek kasetin uçları birleştirilip ağzı kapatıldı.
- Transfer tankının içine yeterli miktarda transfer solüsyonu eklendi. Tank, buz banyosu içerisine yerleştirilerek gece boyunca 40 voltta transfere bırakıldı.

3.8.6. PVDF membranın işaretlenmesi

- Protein örneklerinin geçtiği PVDF membranın bulunduğu kaset transfer tankından çıkarıldı.
- Blotlama işlemi için PVDF membran jelden ayrıldı ve proteinlerin geçtiği yüzü yukarı bakacak şekilde saf metanol içerisinde fiksasyon yapıldı..
- Metanolden çıkarılan membran, steril küçük bir kabın içine yerleştirildi ve üzerine yeni hazırlanan 10 ml 1X-PBST-BSA (1X-PBS, %0.1 Tween-20, %2 BSA) solüsyonu eklenerek çalkalayıcı üzerinde 90 dk bloklama işlemi uygulandı.
- 15 ml'lik steril bir falkon tüpünün içine 10 ml 1X-PBST-BSA solüsyonu aktarıldı ve üzerine 5 µl IRS1 primer antikoru eklenerek 1/2000 oranına sahip primer antikor solüsyonu hazırlandı. Aynı şekilde 1/2000 oranına sahip β-actin primer antikor solüsyonu hazırlandı.
- Sürenin sonunda, membranın üzerindeki 1X-PBST-BSA solüsyonu uzaklaştırıldı ve membran, üzerindeki marker bantları referans alınarak 70 kD'lik marker bandı üzerinden kesildi.
- Membranın üst kısmı steril küçük bir kabın içine yerleştirilip üzerine hazırlanan IRS1 primer antikor solüsyonu eklendi. Membranın alt kısmı ise başka steril küçük bir kabın içine yerleştirilerek üzerine hazırlanan β-actin primer antikor solüsyonu eklendi.
- Membranlar, kapların ağızları kapatılarak çalkalayıcı üzerinde ve +4 ^{o}C'de bir gün boyunca primer antikor işaretlenmesine bırakıldı.
- Sürenin sonunda, membranların üzerindeki primer antikor solüsyonları uzaklaştırıldı ve membranların üzerine 10 ml 1X-PBST (1X-PBS, %0.1 Tween-20) solüsyonu eklenerek çalkalayıcı üzerinde ve oda sıcaklığında 15 dk yıkanmaları sağlandı. Sürenin sonunda, membranlar üzerindeki 1X-PBST solüsyonları uzaklaştırılarak ikinci kez aynı şekilde yıkandı.
- Membranları yıkama arasında, 15 ml'lik steril bir falkon tüpünün içine 10 ml 1X-PBST-BSA solüsyonu aktarıldı ve üzerine 5 µl anti-rabbit sekonder antikoru eklenerek 1/2000 oranına sahip sekonder antikor solüsyonu hazırlandı. Aynı şekilde 1/2000 oranına sahip anti-mouse sekonder antikor solüsyonu hazırlandı.

- Yıkama işleminin sonunda, membranların üzerindeki 1X-PBST-BSA solüsyonu uzaklaştırıldı ve IRS1 primer antikoru ile işaretlenen membranın üzerine hazırlanan 10 ml anti-rabbit sekonder antikor solüsyonu, β-aktin primer antikoru ile işaretlenen membranın üzerine ise hazırlanan 10 ml anti-mouse sekonder antikor solüsyonu eklenerek çalkalayıcı üzerinde ve oda sıcaklığında 90 dk sekonder antikor işaretlemesine bırakıldı.
- Sürenin sonunda, membranların üzerindeki sekonder antikor solüsyonları uzaklaştırıldı ve membranların üzerine 10 ml 1X-PBST (1X-PBS, %0.1 Tween-20) solüsyonu eklenerek çalkalayıcı üzerinde ve oda sıcaklığında 15 dk yıkanmaları sağlandı. Sürenin sonunda, membranlar üzerindeki 1X-PBST solüsyonları uzaklaştırılarak ikinci kez aynı şekilde yıkandı.
- Yıkama işlemi bittikten sonra görüntüleme işlemine geçildi.

3.8.7. Görüntüleme solüsyonlarının hazırlanması

Western ECL reaktifi solüsyonu (BIO-RAD)

Peroxide solution (Cont no. 102030888)
Luminol/enhancer solution (Cont no. 102030889)
2 ml'lik steril bir ependorf tüpün içine 500 µl peroksit solüsyonu ve 500 µl luminol/enhancer solüsyonu aktarıldı ve iyice vortekslenerek hazırlandı.

Developer röntgen banyo solüsyonu (Naturel)

Solüsyon A (pH: 10-13): Hidrokinon 112 g/L (litre), Potasyum hidroksit 205 g/L, Sodium Metabisulphite
Solüsyon B (pH: 2-5): Fenidon 24 g/L, Dietilenglucol 800 g/L, Benzotriazol 8 g/L, Asetik asit 84 g/L
Solüsyon C (pH: 4-7): Gluteraldehid 156 g/L, Sodyum metabisülfid 153 g/L

2 L'lik temiz bir şişenin içine 700 ml distile su, 250 ml solüsyon A, 25 ml solüsyon B ve 25 ml solüsyon C eklenerek iyice karıştırılarak hazırlandı.

Fixer röntgen banyo solüsyonu (Naturel)

Solüsyon A (pH. 5-7): Amonyumtiosulfat 720 g/L, Sodyum metabisülfid 40 g/L, Asetik Asit 55 g/L

Solüsyon B (pH. 0-2): Asetik asit 30 g/L, Alimünyum sulfat 350 g/L

2 L'lik temiz bir şişenin içine 700 ml distile su, 250 ml solüsyon A, 50 ml solüsyon B eklenerek iyice karıştırılarak hazırlandı.

3.8.8. PVDF membranın görüntülenmesi

- Hazırlanan ECL reaktifi solüsyonu, membranın üzerini tamamen kaplayacak şekilde pipet aracılığıyla dağıtıldı ve 5 dk bekletildi. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler karanlık odada gerçekleştirildi.
- Bekleme arasında, hazırlanan developer ve fixer röntgen solüsyonları belli miktarda farklı kaplara eklendi ve ayrıca iki farklı kapa belli miktarda su eklendi. Bu kaplar, sırasıyla; developer, su, fixer, su olacak şekilde yan yana yerleştirildi.
- Sürenin sonunda, membran üzerindeki ECL reaktifi solüsyonu uzaklaştırıldı ve poşet dosya, bir X-ray film kasetinin arasına yerleştirildi.
- Kemilüminas ışımasına duyarlı bir X-ray film (Kodak Medical X-ray Film), arasında membranın bulunduğu poşet dosya üzerine bırakılarak X-ray film kasetinin uçları birleştirilerek kapatıldı.
- Yaklaşık 2 dk sonra X-ray film, X-ray film kasetinin arasından alındı
- X-ray film, önce developer solüsyonunun içine konularak bekletildi ve kısa bir süre sonra bantların oluştuğu görüldü. Hemen ardından, X-ray film developer solüsyonundan çıkarılarak suyun içine konuldu ve yaklaşık 2 dk suda bekletildi.
- Ardından, X-ray film suyun içinden çıkarılarak sırasıyla önce yaklaşık 2 dk fixer solüsyonunda, sonra yaklaşık 2 dk suda bekletildikten sonra çıkarılarak kurumaları sağlandı.

3.9. CRL4010 ve MCF7 Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

<u>Kullanılan solüsyonlar:</u>

- Kolon Yıkama Çözeltisi
- Tiyogliserol (TG)
- DNase I (liyofilize)
- Nükleaz İçermeyen Su

- $MnCl_2$
- RNA Lizis Tamponu
- RNA Yıkama Solüsyonu
- DNA Sindirim Tamponu

Önceki aşamalarda belirtildiği şekilde 2 adet steril 6 kuyucuklu plakalara hücre sayımı işlemi ile ekilen ve bir plakadaki hücrelere transfeksiyon işleminin uygulandığı CRL4010 ve MCF7 hücreleri için inkübasyonun 48-72 saat aralığında kit ile total RNA izolasyonu işlemi yapıldı.

Uygulama

- Besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1X-PBS ile yıkandı.
- Her kuyucuğa 250 µl RNA lizis tamponu + TG eklendi ve tüm hücre yüzeyine dağılması için 6 kuyucuklu plakalar yavaşça sallandı.
- Pipet aracılığıyla hücre yüzeyindeki tampon çözelti kuyucuğun tabanında 7-10 kez yukarıdan aşağıya doğru pipetlenerek oluşan hücre lizatları toplandı.
- Toplanan hücre lizatları, öncesinde ilgili hücre hatları için etiketlenen ve buza yerleştirilen ilgili 500 µl'lik steril ependorf tüplere aktarıldı.
- Her ependorf tüpteki hücre lizatlarının üzerine 85 µl %100 isopropanol eklendi ve 5 saniye (s) vorteklendi.
- Ardından, hücre süspansiyonları ilgili etiketlemelerin yapıldığı spin kolonlara aktarıldı.
- Hücre süspansiyonları, 13.000 g'de 30 s santrifüj edildi ve spin kolonun altında biriken sıvı kısımları uzaklaştırıldı.
- Her spin kolona 500 µl RNA yıkama tamponu eklenerek 13.000 g'de 30 s santrifüj edildi ve spin kolonun altında biriken sıvı kısımları uzaklaştırıldı.
- DNaz I inkübasyon karışımı hazırlandı. Bunun için; buza yerleştirilen 500 µl'lik steril bir ependorf tüpün içine 96 µl DNA sindirim tamponu, 12 µl $MnCl_2$ ve 12 µl DNaz I solüsyonu eklenerek iyice pipetaj yapıldı.

- Taze hazırlanan DNaz I inkübasyon karışımı, her spin kolona 30 µl olacak şekilde spin kolonlardaki membranların üzerine doğrudan eklendi ve oda koşullarında (15-25 ^{o}C) 15 dk bekletildi.
- Sürenin sonunda, her spin kolona 200 µl yıkama tamponu (etanol eklenmiş) eklendi ve 13.000 g'de 15 s santrifüj edildi ve spin kolonların altında biriken sıvı kısımları uzaklaştırıldı.
- Her spin kolona 500 µl RNA yıkama tamponu (etanol eklenmiş) eklendi ve 13.000 g'de 30 s santrifüj edildi ve spin kolonların altında biriken sıvı kısımları uzaklaştırıldı.
- Her spin kolona 300 µl RNA yıkama tamponu eklendi ve 13.000 g' de 2 dk santrifüj edildikten sonra spin kolonların alt kısımları içlerinde biriken sıvı kısımlarla birlikte uzaklaştırıldı.
- Spin kolonların üst kısımları, ilgili etiketlemelerin yapıldığı 500 µl'lik steril ependorf tüplere aktarıldı.
- Her spin kolondaki membranın üzerine 50 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve oda koşullarında 2 dk bekletildi.
- Sürenin sonunda, 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra spin kolonlar tüplerden ayrılarak uzaklaştırıldı.
- İzole edilen RNA'lar, miktar ve saflık değerleri nanodrop aracılığıyla belirlendi.
- Sonra, ependorf tüplerin ağızları parafilmlenerek -80 ^{o}C'ye kaldırıldı.

3.10. cDNA Sentezi

Bir önceki aşamada CRL4010 ve MCF7 monolayer hücre hatlarından izole edilen ve -80 ^{o}C'de bulunan RNA'lar ile cDNA sentezi yapıldı.

- Sistem Bileşen Miktarı Oligo $(dT)_{20}$
- Rastgele heksamerler (50 ng/µl)
- 10X RT (Reverse Transkriptaz) Tamponu
- 25 mM $MgCl_2$
- 0,1 M DTT
- 10 mM dNTP karışımı
- SuperScript® III RT (Reverse Transkriptaz) (200 U/µl)

- RNaseOUT™ (40 U/µl)
- E. coli RNase H (2 U/µl)
- DEPC ile arıtılmış su
- Toplam MCF7 veya CRL4010 RNA (10 ng/µl)
- Sense Kontrol Primer (10 µM)
- Antisens Kontrol Primer(10 µM)

Uygulama

Steril güvenlik kabininde ve buzun üzerinde ilk primer/RNA karışımı hazırlandı. Bunun için;

- İlgili etiketlemelerin yapıldığı 4 tane 200 µl'lik steril ependorf tüpü buza yerleştirildi ve her birinin içerisine;

  0,5 µl rastgele heksamer primerleri

  0,5 µl oligo (dT) primerleri

  1µl dNTP karışımı

  8 µl ilgili RNA (1µg) + DEPC H_2O

  eklendi ve her tüpün içinde yavaşça 3-5 kez pipetaj yapıldı.

- Hazırlanan karışımlar, 95 ^oC'de 5 dk kuru blok ısıtıcıda bekletildi.
- Bekleme sırasında, steril güvenlik kabininde ve buzun üzerinde tampon / enzim karışımı hazırlandı. Bunun için;

  4 tane 200 µl'lik steril ependorf tüpü buza yerleştirildi ve her birinin içerisine sırasıyla;

  2 µl 10x cDNA sentez tamponu

  4 µl MgCl2

  2 µl 0,1 M DTT

  1 µl RNaseOut

  1 µl Superscript III

  eklenerek her tüpün içinde yavaşça 3-5 kez pipetaj yapıldı.

- Hazırlanan tampon / enzim karışımları, pipet aracılığıyla kuru blok ısıtıcıda süresi tamamlanan ilgili ilk primer/RNA karışımlarının üzerine eklenerek her tüpün içinde yavaşça 3-5 kez pipetaj yapıldı.
- Tüpler, termal cyclera yerleştirildi ve tablo 4'te gösterildiği gibi proglamlanarak çalıştırıldı.

Tablo 4. cDNA sentezi için PCR termal döngü protokolü

Basamak	Sıcaklık	Süre
I	25 °C	10 dk
II	50 °C	50 dk
III	85 °C	5 dk

- Sürenin sonunda, her tüpün içerisine 1 µl RNase H eklenerek her tüpün içinde yavaşça 3-5 kez pipetaj yapıldı.
- Tüpler, 37 °C'de 20 dk, 95 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra -20 °C'ye kaldırıldı.

3.11. SYBR Green Yöntemi ile Kantitatif Real-Time PCR Analizi

Bir önceki aşamada, sentezlenen ve -20 ^{o}C'de bulunan cDNA'ları kullanılarak hedeflenen 47 miRNA'nın ekspresyon profilleri SYBR Green teknolojisi ile belirlendi. Bu kapsamda Atlas Biyoteknoloji şirketinin hazırlamış olduğu miRNA array sistemi kullanıldı ve hizmet satın alması gerçekleştirildi.

- Analiz edilen hedef miRNA'lar ve referans gen için ortalama Threshold cycle (Ct) değerleri hesaplandı ve elde edilen miRNA'ların ortalama Ct değerleri, referans genin ortalama Ct değeri kullanılarak normalizasyon değerleri hesaplandı. Normalizasyon değerleri her bir miRNA için aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\Delta Ct = \text{miRNA ortalama Ct} - \text{Referans gen ortalama Ct}$$

- Gruplar arasındaki miRNA ekspresyon farklılıklarının hesaplanması amacıyla, ΔΔCt (comparative Ct) değerleri aşağıdaki formülle hesaplandı.

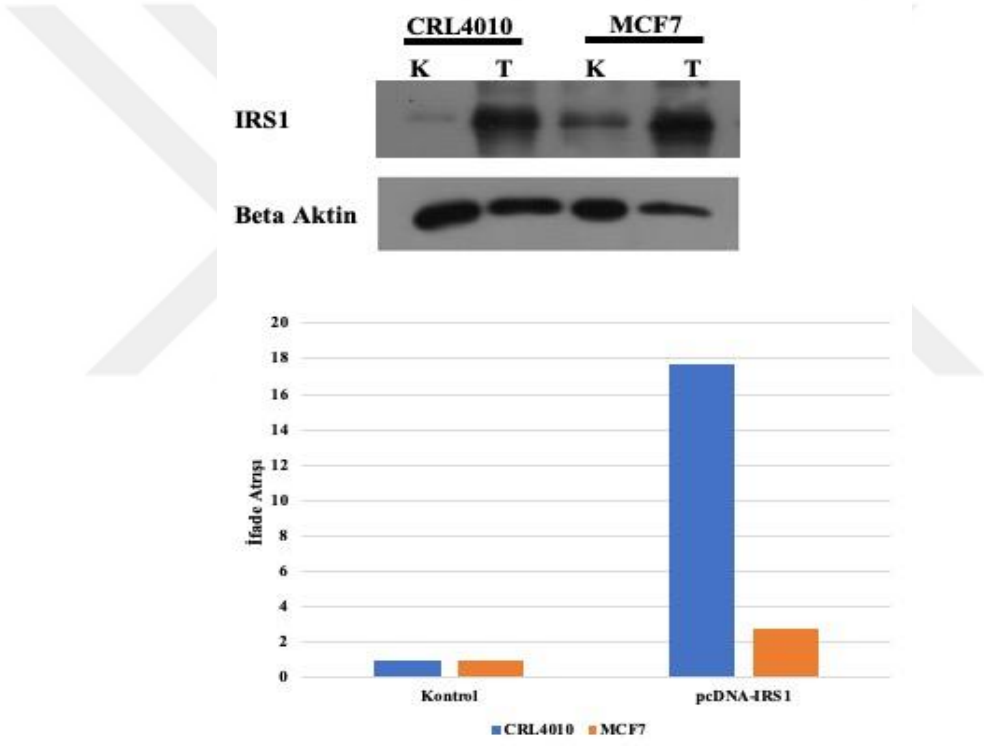
$$\Delta\Delta Ct = \text{Deney grubu miRNA } \Delta Ct - \text{Kontrol grubu miRNA } \Delta Ct$$

$$\text{Ekspresyon artışı} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4. BULGULAR

4.1. Normal Meme ve Meme Kanseri Hücre Hatlarında Ektopik IRS1 Ekspresyonu

Ektopik IRS1 indüklü meme kanseriyle ilişkili miRNA'ların ekspresyonlarındaki değişiklikleri belirlemek amacıyla pcDNA3.1 flag tagged insan IRS1 ekspresyon vektörü, CRL4010 ve MCF7 hücrelerine transfekte edildi. Geçici ektopik IRS1 artışı western blot yöntemi ile belirlendi ve CRL4010 hücrelerinde 17 kat, MCF7 hücrelerinde ise 2 kattan fazla ektopik IRS1 ekspresyonu saptanmıştır (Şekil 11)



Şekil 11. CRL4010 ve MCF7 hücrelerinde ektopik IRS1 ekspresyonları

4.2. Normal Meme Hücre Hattında IRS1 İndüklü MiRNA Profili

IRS1 ektopik ekspresyonunun normal meme hücrelerinde ekspresyon profillerini etkileyebileceği aday miRNA'ları belirlemek amacıyla insan IRS1 geni transfekte edilmiş CRL4010 hücre hattı ile transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmemiş CRL4010 hücre hatları (kontrol) karşılaştırılmıştır. Bu kapsamda, gen ifadelerinin normalizayonunda miRNA ekspresyonu profilleme çalışmalarında kontrol gen olarak

yaygın kullanılan küçük nükleer RNA **(**snRNA) U6 ifadesi temel alınmıştır. Çalışma kapsamında, miRNA ifadelerinin belirlenmesine yönelik meme kanseri ile ilişkisi gösterilmiş 47 miRNA hedef alınmıştır.

Normal meme hücrelerine geçici IRS1 transfeksiyonu sonrasında 5 miRNA ifadesinde artış olduğu saptanırken, 42'sinde negatif regülasyonun söz konusu olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol hücrelerine göre ifade artışı gözlemlenen miRNA'lar, miR-15a, miR-93, miR-140, miR-203 ve miR-125b'dir. MiR-206 artışı ise kontrole göre anlamlı gözükmemektedir (Tablo 5, Şekil 12).

Normal meme hücrelerinde geçici IRS1 transfeksiyonu sonrasında negatif regülasyonu en çok görülen miR-132 ve miR-let7f'dir. Ancak bu değişimler anlamlı bir değişiklik olarak değerlendirilememektedir (Tablo 5, Şekil 12).

Tablo 5. Normal meme hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili

Hedef miRNA	**CRL4010 IRS1 Ct**	**CRL4010 IRS1 Ct Ortalama**	**CRL4010 IRS1 ΔCt**	**CRL4010 Kontrol Ct**	**CRL4010 Kontrol Ct Ortalama**	**CRL4010 Kontrol ΔCt**	**CRL4010 ΔΔCt**	**İfade Artışı**
RNU6	22.32	21.73	0.00	22.06	21.88	0.00	*	*
RNU6	21.13			21.70				
miR-31	22.56	22.68	0.95	22.52	22.42	0.55	0.41	0.75
miR-31	22.79			22.33				
miR-128	26.60	26.28	4.56	25.72	26.06	4.18	0.38	0.77
miR-128	25.96			26.40				
miR-181d	18.74	18.95	-2.78	19.00	18.72	-3.15	0.38	0.77
miR-181d	19.16			18.44				
miR-210	18.25	18.86	-2.87	17.95	18.93	-2.95	0.08	0.95
miR-210	19.46			19.92				
miR-661	31.61	31.17	9.44	31.31	31.05	9.17	0.27	0.83
miR-661	30.73			30.79				
miR-15a	14.88	15.40	-6.32	15.66	15.63	-6.25	-0.07	1.05
miR-15a	15.92			15.59				
miR-34a	21.67	22.09	0.36	21.45	21.92	0.04	0.32	0.80
miR-34a	22.50			22.38				

Tablo 5'in devamı arka sayfadadır.

Tablo 5 (devamı). Normal meme hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili

miR-130a	21.26	24.27	2.54	23.37	23.90	2.02	0.52	0.70
miR-130a	27.28			24.43				
miR-191	27.05	26.85	5.13	26.25	26.94	5.06	0.07	0.96
miR-191	26.65			27.63				
miR-212	25.92	25.81	4.09	25.65	25.86	3.98	0.10	0.93
miR-212	25.70			26.08				
miR-663a	22.36	22.64	0.92	20.10	22.51	0.63	0.28	0.82
miR-663a	22.92			24.92				
miR-16	18.56	18.89	-2.84	18.92	19.05	-2.83	-0.01	1.01
miR-16	19.22			19.18				
miR-93	21.28	23.13	1.41	24.69	23.37	1.49	-0.09	1.06
miR-93	24.98			22.05				
miR-132	21.12	22.63	0.90	20.28	22.11	0.23	0.67	0.63
miR-132	24.13			23.94				
miR-193b	17.62	18.27	-3.45	16.93	18.24	-3.63	0.18	0.88
miR-193b	18.92			19.55				
miR-214	23.15	23.80	2.07	23.42	23.81	1.93	0.15	0.90
miR-214	24.45			24.19				
miR-let7a	22.96	22.73	1.01	22.24	22.44	0.56	0.45	0.73
miR-let7a	22.50			22.63				
miR-21	16.87	17.57	-4.16	17.52	17.69	-4.18	0.03	0.98
miR-21	18.27			17.87				
miR-96	30.55	30.76	9.04	29.41	30.48	8.60	0.43	0.74
miR-96	30.98			31.56				
miR-140	28.83	28.94	7.22	27.65	29.30	7.42	-0.20	1.15
miR-140	29.06			30.94				
miR-195	23.65	22.38	0.66	21.33	22.38	0.50	0.16	0.89
miR-195	21.11			23.42				
miR-221	23.72	24.65	2.93	23.83	24.37	2.50	0.43	0.74
miR-221	25.58			24.92				
miR-let7d	16.03	16.19	-5.54	16.47	16.26	-5.62	0.08	0.94
miR-let7d	16.35			16.05				
miR-22	21.06	22.04	0.31	21.65	21.70	-0.18	0.49	0.71
miR-22	23.01			21.76				

Tablo 5'in devamı arka sayfadadır.

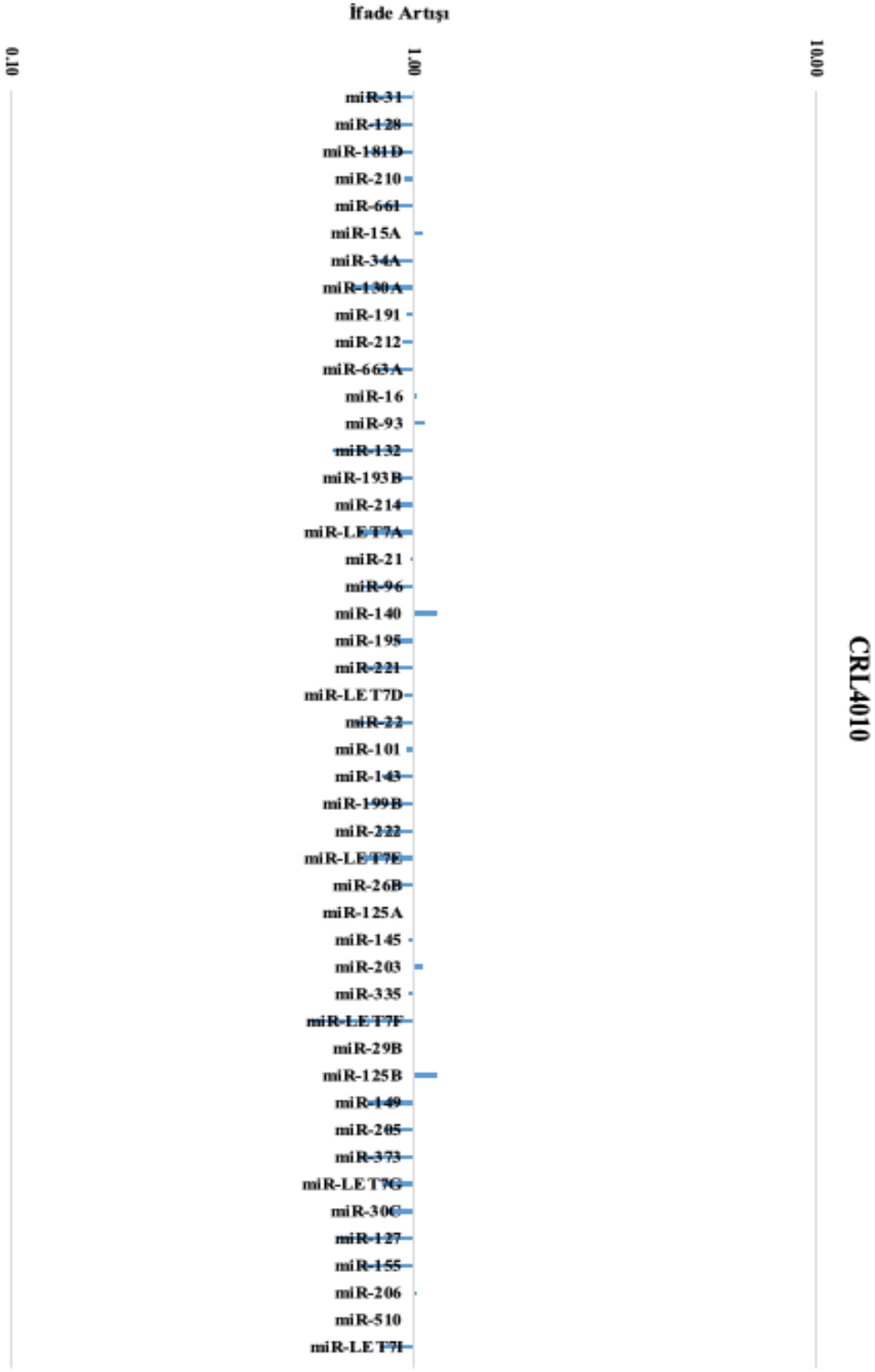
Tablo 5 (devamı). Normal meme hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili

miR-101	22.92	22.80	1.08	22.35	22.90	1.02	0.06	0.96
miR-101	22.69			23.44				
miR-143	24.64	24.61	2.89	23.42	24.49	2.62	0.27	0.83
miR-143	24.59			25.57				
miR-199b	19.99	21.14	-0.59	21.61	20.91	-0.97	0.38	0.77
miR-199b	22.29			20.21				
miR-222	28.09	28.03	6.31	27.88	27.89	6.02	0.29	0.82
miR-222	27.98			27.90				
miR-let7e	24.96	23.33	1.60	23.38	23.05	1.17	0.43	0.74
miR-let7e	21.69			22.72				
miR-26b	15.50	14.69	-7.04	13.77	14.68	-7.20	0.16	0.89
miR-26b	13.88			15.58				
miR-125a	24.57	24.23	2.51	23.43	24.38	2.50	0.01	1.00
miR-125a	23.89			25.33				
miR-145	27.28	26.56	4.83	26.11	26.67	4.79	0.04	0.97
miR-145	25.83			27.23				
miR-203	18.91	19.85	-1.87	21.22	20.08	-1.79	-0.08	1.05
miR-203	20.80			18.95				
miR-335	26.28	26.54	4.82	25.77	26.65	4.77	0.04	0.97
miR-335	26.80			27.53				
miR-let7f	20.27	20.92	-0.81	18.55	20.19	-1.69	0.88	0.54
miR-let7f	21.57			21.83				
miR-29b	19.33	20.14	-1.59	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
miR-29b	20.94							
miR-125b	26.89	26.51	4.78	27.33	26.84	4.97	-0.18	1.14
miR-125b	26.13			26.36				
miR-149	18.03	19.84	-1.89	19.18	19.61	-2.27	0.38	0.77
miR-149	21.64			20.03				
miR-205	25.18	25.21	3.48	25.26	25.11	3.24	0.25	0.84
miR-205	25.24			24.97				
miR-373	26.57	26.47	4.75	25.59	26.16	4.28	0.47	0.72
miR-373	26.38			26.73				

Tablo 5'in devamı arka sayfadadır.

Tablo 5 (devamı). Normal meme hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili

miR-let7g	14.90	15.30	-6.43	14.92	15.18	-6.70	0.27	0.83
miR-let7g	15.70			15.44				
miR-30c	24.29	24.56	2.83	24.45	24.47	2.60	0.24	0.85
miR-30c	24.82			24.50				
miR-127	20.47	20.58	-1.15	19.27	20.09	-1.79	0.64	0.64
miR-127	20.68			20.91				
miR-155	25.81	26.09	4.37	25.12	25.82	3.94	0.43	0.74
miR-155	26.38			26.51				
miR-206	21.43	21.28	-0.45	23.02	21.45	-0.42	-0.02	1.02
miR-206	21.13			19.89				
miR-510	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	15.65	15.74	-6.14	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
miR-510	Belirlenmemiş			15.83				
miR-let7ı	21.82	20.99	-0.74	19.87	20.85	-1.03	0.29	0.82
miR-let7ı	20.16			21.84				



Şekil 12. Normal meme hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili

4.3. Meme Kanseri Hücre Hattında IRS1 İndüklü MiRNA Profili

MCF7 hücrelerinde ektopik IRS1 ekspresyonunun regülasyonunu etkilediği miRNA adaylarını bulmak amacıyla geçici IRS1 transfeksiyonu gerçekleştirilmiş hücrelerle, transfeksiyon yapılmamış MCF7 (kontrol) hücreleri karşılaştırılmıştır.

MCF7 hücrelerine geçici IRS1 transfeksiyonu gerçekleştirilerek sağlanan ektopik IRS1 ekspresyonu artışı sonucunda miRNA panelinde bulunan bazı miRNA'ların ifadelerinde belirgin artış olduğu saptanmıştır (Şekil 13).

Geçici ektopik IRS1 ekspresyon artışı sağlanan MCF7 hücrelerinde, transfeksiyon gerçekleştirilmemiş MCF7 hücrelerine kıyasla miR-181d 3.05 kat, miR-210 3.34 kat, miR-661 2.22 kat, miR-130a 2.29 kat, miR-191 2.55 kat, miR-212 3.16 kat, miR-93 4.11 kat, miR-193b 1.76 kat, miR-214 2.10 kat, miR-21 3.30 kat, miR-96 3.80 kat, miR-221 2.83 kat, miR-222 2.86 kat, miR-373 2.98 kat ve miR-155 2.36 kat ifadelerinde artış belirlenmiştir (Tablo 6, Şekil 13).

Geçici ektopik IRS1 ekspresyon artışı sağlanan MCF7 hücrelerinde, transfeksiyon gerçekleştirilmemiş MCF7 hücrelerine kıyasla anlamlı negatif regülasyonunun gerçekleştiği miRNA saptanmamıştır (Tablo 6, Şekil 13).

Tablo 6. Meme kanseri hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili

Hedef miRNA	MCF7 IRS1 Ct	MCF7 IRS1 Ct Ortalama	MCF7 IRS1 ΔCt	MCF7 Kontrol Ct	MCF7 Kontrol Ct Ortalama	MCF7 Kontrol ΔCt	MCF7 ΔΔCt	İfade Artışı
RNU6	22.00	21.68	0.00	21.73	21.75	0.00	*	*
RNU6	21.36			21.76				
miR-31	24.64	25.19	3.50	23.10	23.59	1.84	1.67	0.31
miR-31	25.73			24.08				
miR-128	30.55	31.25	9.57	28.46	28.26	6.51	3.06	0.12
miR-128	31.96			28.05				
miR-181d	15.48	15.16	-6.52	17.57	16.84	-4.91	-1.61	3.05
miR-181d	14.84			16.10				
miR-210	14.56	15.60	-6.09	18.19	17.40	-4.35	-1.74	3.34
miR-210	16.63			16.61				

Tablo 6'nın devamı arka sayfadadır.

Tablo 6 (devamı). Meme kanseri hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili

miR-661	28.51	28.39	6.71	29.99	29.60	7.86	-1.15	2.22
miR-661	28.26			29.22				
miR-15a	18.32	18.69	-2.99	17.40	17.81	-3.94	0.94	0.52
miR-15a	19.06			18.22				
miR-34a	25.16	25.11	3.43	23.31	24.01	2.26	1.17	0.44
miR-34a	25.07			24.70				
miR-130a	21.40	23.24	1.56	23.52	24.50	2.75	-1.19	2.29
miR-130a	25.07			25.47				
miR-191	24.98	25.16	3.48	25.93	26.58	4.84	-1.35	2.55
miR-191	25.35			27.24				
miR-212	21.99	22.31	0.63	23.07	24.03	2.29	-1.66	3.16
miR-212	22.62			25.00				
miR-663a	26.54	27.75	6.07	25.18	25.01	3.26	2.81	0.14
miR-663a	28.97			24.83				
miR-16	24.24	24.89	3.21	21.00	20.34	-1.41	4.62	0.04
miR-16	25.54			19.68				
miR-93	20.17	20.05	-1.63	21.36	22.16	0.41	-2.04	4.11
miR-93	19.94			22.96				
miR-132	27.46	27.70	6.02	25.62	25.23	3.48	2.54	0.17
miR-132	27.94			24.85				
miR-193b	15.45	15.31	-6.37	18.14	16.20	-5.55	-0.82	1.76
miR-193b	15.18			14.26				
miR-214	21.17	21.59	-0.09	22.56	22.73	0.98	-1.07	2.10
miR-214	22.02			22.90				
miR-let7a	25.64	25.91	4.23	25.27	24.76	3.01	1.22	0.43
miR-let7a	26.18			24.26				
miR-21	15.55	15.05	-6.64	16.51	16.84	-4.91	-1.72	3.30
miR-21	14.54			17.16				
miR-96	28.37	28.25	6.57	29.13	30.25	8.50	-1.93	3.80
miR-96	28.14			31.36				
miR-140	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	28.39	27.79	6.04	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
miR-140				27.18				
miR-195	25.94	25.85	4.17	23.11	23.84	2.09	2.08	0.24
miR-195	25.76			24.58				

Tablo 6'nın devamı arka sayfadadır.

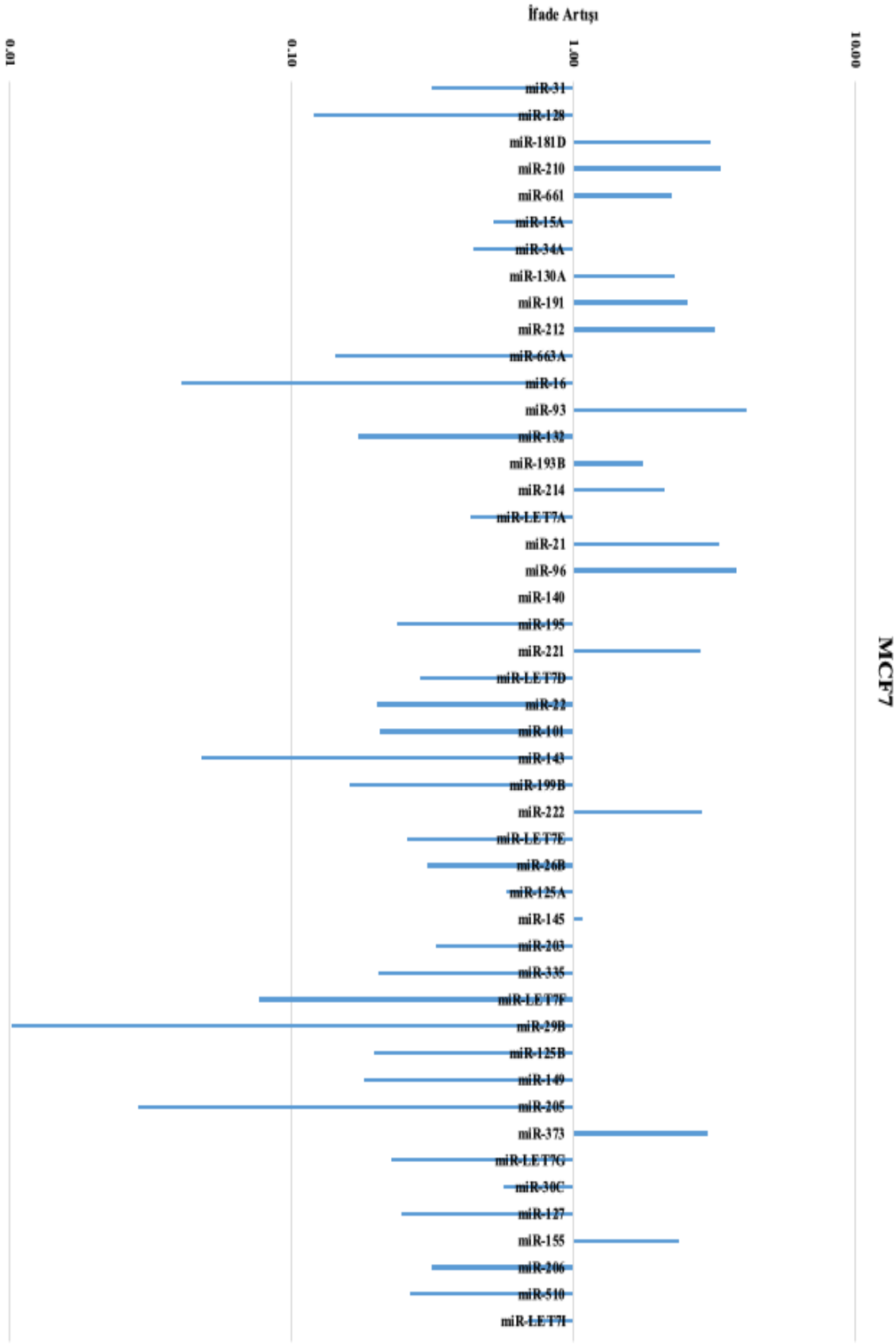
Tablo 6 (devamı). Meme kanseri hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili

miR-221	21.40	21.13	-0.55	21.94	22.70	0.96	-1.50	2.83
miR-221	20.87			23.46				
miR-let7d	20.85	19.89	-1.79	18.83	18.15	-3.60	1.81	0.29
miR-let7d	18.93			17.47				
miR-22	26.86	27.39	5.71	24.42	25.14	3.39	2.32	0.20
miR-22	27.91			25.86				
miR-101	26.93	27.33	5.65	24.81	25.12	3.37	2.28	0.21
miR-101	27.73			25.43				
miR-143	31.96	32.45	10.77	27.24	28.14	6.39	4.38	0.05
miR-143	32.95			29.03				
miR-199b	26.17	27.04	5.36	23.43	24.46	2.71	2.65	0.16
miR-199b	27.90			25.49				
miR-222	26.25	25.11	3.43	26.76	26.70	4.95	-1.52	2.86
miR-222	23.98			26.64				
miR-let7e	27.92	27.59	5.91	25.63	25.69	3.94	1.97	0.26
miR-let7e	27.26			25.74				
miR-26b	17.87	18.40	-3.29	17.12	16.73	-5.01	1.73	0.30
miR-26b	18.92			16.35				
miR-125a	27.26	27.09	5.41	26.35	26.37	4.62	0.79	0.58
miR-125a	26.92			26.39				
miR-145	23.37	25.73	4.04	26.53	25.90	4.15	-0.11	1.08
miR-145	28.08			25.27				
miR-203	23.90	23.68	2.00	20.21	22.12	0.38	1.63	0.32
miR-203	23.46			24.04				
miR-335	29.74	31.34	9.65	29.50	29.10	7.35	2.30	0.20
miR-335	32.93			28.70				
miR-let7f	26.72	25.83	4.15	22.82	22.19	0.44	3.71	0.08
miR-let7f	24.94			21.56				
miR-29b	30.72	31.37	9.69	24.34	24.82	3.08	6.61	0.01
miR-29b	32.02			25.31				
miR-125b	29.12	29.53	7.85	26.97	27.25	5.50	2.36	0.20
miR-125b	29.95			27.52				
miR-149	26.93	24.45	2.76	24.35	22.05	0.30	2.47	0.18
miR-149	21.96			19.74				

Tablo 6'nın devamı arka sayfadadır.

Tablo 6 (devamı). Meme kanseri hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili

miR-205	32.94	33.82	12.14	28.62	28.76	7.01	5.13	0.03
miR-205	34.70			28.90				
miR-373	22.81	23.74	2.06	23.83	25.38	3.64	-1.57	2.98
miR-373	24.67			26.94				
miR-let7g	18.93	18.81	-2.87	16.43	16.73	-5.02	2.15	0.23
miR-let7g	18.69			17.02				
miR-30c	26.70	26.35	4.67	25.62	25.59	3.85	0.83	0.56
miR-30c	26.01			25.57				
miR-127	24.92	24.81	3.13	22.44	22.85	1.10	2.03	0.25
miR-127	24.71			23.26				
miR-155	23.31	23.00	1.31	24.92	24.30	2.55	-1.24	2.36
miR-155	22.68			23.67				
miR-206	25.92	25.52	3.84	22.93	23.91	2.16	1.67	0.31
miR-206	25.11			24.89				
miR-510	19.15	19.79	-1.89	17.51	17.93	-3.82	1.93	0.26
miR-510	20.43			18.34				
miR-let7ı	24.83	23.44	1.76	23.65	22.98	1.23	0.53	0.69
miR-let7ı	22.05			22.30				



Şekil 13. Meme kanseri hücre hattında IRS1 indüklü miRNA profili

4.4. Meme Kanseri ve Normal Meme Hücrelerinde MiRNA Profili

IRS1 ektopik ekspresyonundan bağımsız olarak CRL4010 ve MCF7 hücreleri arasında miRNA ekspresyon farklılığını belirlemek amacıyla normal meme hücre hattı ile meme kanseri hücre hattı arasındaki aday miRNA profilleri karşılaştırılmıştır.

Bu kapsamda 12 miRNA'nın normal meme hücresine göre kanser meme hücre hattında ifadelerinde artış olduğu saptanmıştır. Bu miRNA ve ifade artışları sırasıyla; miR-181d'de 3.37 kat, miR-210'da 2.64 kat, miR-661'de 2.49 kat, miR-212'de 3.24 kat, miR-93'te 2.12 kat, miR-193b'de 3.77 kat, miR-214'de 1.92 kt, miR-140'da 2.60 kat, miR-222'de 2.09 kat, miR-145'de 1.56 kat, miR-373'de 1.56 kat ve miR-155'de 2.62 kat şeklindedir (Tablo 7, Şekil 14)

Tablo 7. Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde miRNA profili

Hedef miRNA	MCF7 Kontrol Ct	MCF7 Kontrol Ct Ortalama	MCF7 Kontrol ΔCt	CRL4010 Kontrol Ct	CRL4010 Kontrol Ct Ortalama	CRL4010 Kontrol ΔCt	CRL4010 ΔΔCt	İfade Artışı
RNU6	21.73	21.75	0.00	22.06	21.88	0.00	0.00	*
RNU6	21.76			21.70				
miR-31	23.10	23.59	1.84	22.52	22.42	0.55	1.29	0.41
miR-31	24.08			22.33				
miR-128	28.46	28.26	6.51	25.72	26.06	4.18	2.33	0.20
miR-128	28.05			26.40				
miR-181d	17.57	16.84	-4.91	19.00	18.72	-3.15	-1.75	3.37
miR-181d	16.10			18.44				
miR-210	18.19	17.40	-4.35	17.95	18.93	-2.95	-1.40	2.64
miR-210	16.61			19.92				
miR-661	29.99	29.60	7.86	31.31	31.05	9.17	-1.32	2.49
miR-661	29.22			30.79				
miR-15a	17.40	17.81	-3.94	15.66	15.63	-6.25	2.31	0.20
miR-15a	18.22			15.59				
miR-34a	23.31	24.01	2.26	21.45	21.92	0.04	2.22	0.21
miR-34a	24.70			22.38				

Tablo 7'nin devamı arka sayfadadır.

Tablo 7 (devamı). Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde miRNA profili

miR-130a	23.52	24.50	2.75	23.37	23.90	2.02	0.73	0.60
miR-130a	25.47			24.43				
miR-191	25.93	26.58	4.84	26.25	26.94	5.06	-0.23	1.17
miR-191	27.24			27.63				
miR-212	23.07	24.03	2.29	25.65	25.86	3.98	-1.70	3.24
miR-212	25.00			26.08				
miR-663a	25.18	25.01	3.26	20.10	22.51	0.63	2.63	0.16
miR-663a	24.83			24.92				
miR-16	21.00	20.34	-1.41	18.92	19.05	-2.83	1.41	0.38
miR-16	19.68			19.18				
miR-93	21.36	22.16	0.41	24.69	23.37	1.49	-1.08	2.12
miR-93	22.96			22.05				
miR-132	25.62	25.23	3.48	20.28	22.11	0.23	3.25	0.11
miR-132	24.85			23.94				
miR-193b	18.14	16.20	-5.55	16.93	18.24	-3.63	-1.91	3.77
miR-193b	14.26			19.55				
miR-214	22.56	22.73	0.98	23.42	23.81	1.93	-0.94	1.92
miR-214	22.90			24.19				
miR-let7a	25.27	24.76	3.01	22.24	22.44	0.56	2.46	0.18
miR-let7a	24.26			22.63				
miR-21	16.51	16.84	-4.91	17.52	17.69	-4.18	-0.73	1.66
miR-21	17.16			17.87				
miR-96	29.13	30.25	8.50	29.41	30.48	8.60	-0.11	1.08
miR-96	31.36			31.56				
miR-140	28.39	27.79	6.04	27.65	29.30	7.42	-1.38	2.60
miR-140	27.18			30.94				
miR-195	23.11	23.84	2.09	21.33	22.38	0.50	1.59	0.33
miR-195	24.58			23.42				
miR-221	21.94	22.70	0.96	23.83	24.37	2.50	-1.54	2.91
miR-221	23.46			24.92				
miR-let7d	18.83	18.15	-3.60	16.47	16.26	-5.62	2.02	0.25
miR-let7d	17.47			16.05				
miR-22	24.42	25.14	3.39	21.65	21.70	-0.18	3.57	0.08
miR-22	25.86			21.76				

Tablo 7'nin devamı arka sayfadadır.

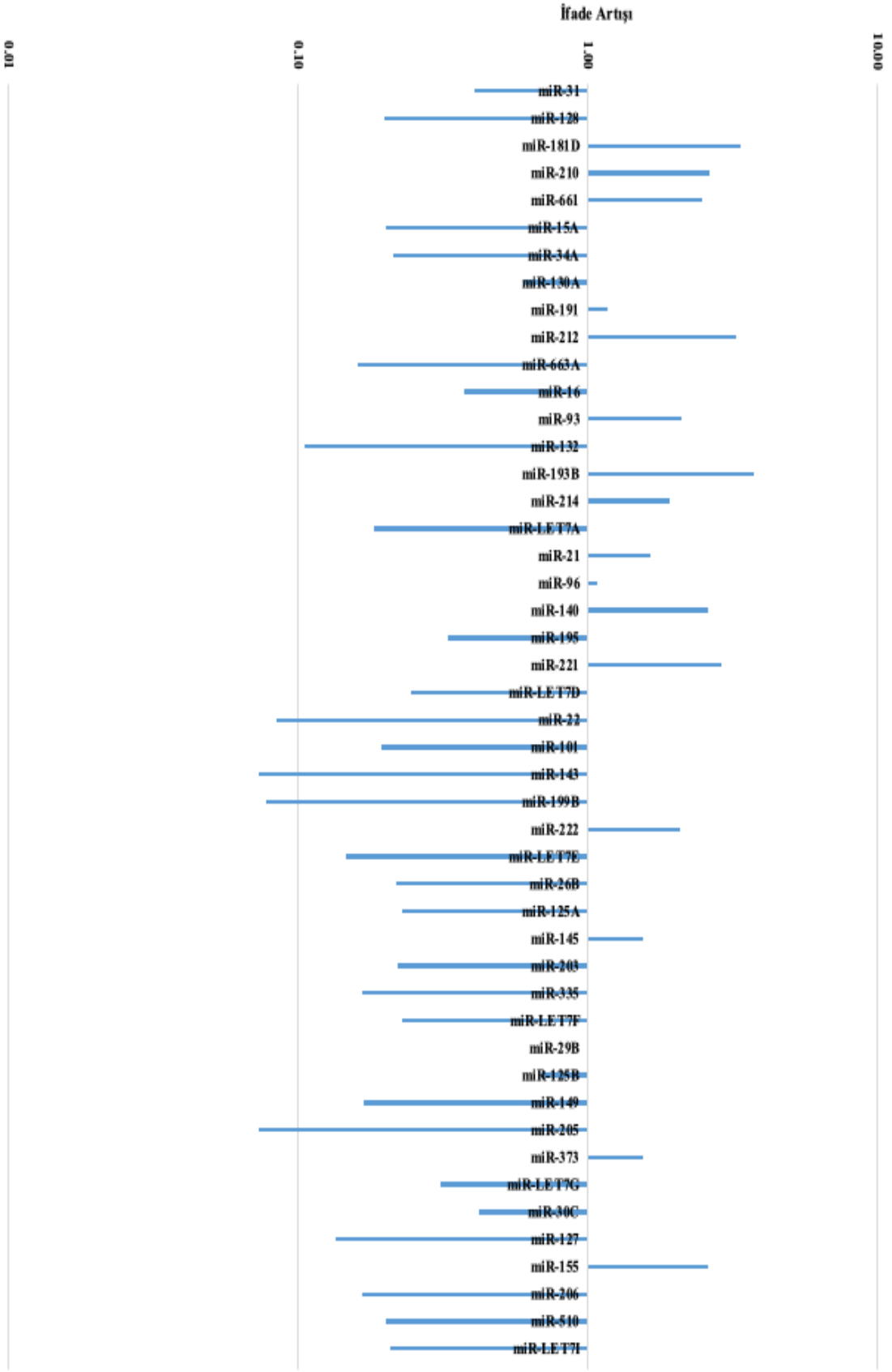
Tablo 7 (devamı). Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde miRNA profili

miR-101	24.81	25.12	3.37	22.35	22.90	1.02	2.36	0.20
miR-101	25.43			23.44				
miR-143	27.24	28.14	6.39	23.42	24.49	2.62	3.77	0.07
miR-143	29.03			25.57				
miR-199b	23.43	24.46	2.71	21.61	20.91	-0.97	3.68	0.08
miR-199b	25.49			20.21				
miR-222	26.76	26.70	4.95	27.88	27.89	6.02	-1.07	2.09
miR-222	26.64			27.90				
miR-let7e	25.63	25.69	3.94	23.38	23.05	1.17	2.76	0.15
miR-let7e	25.74			22.72				
miR-26b	17.12	16.73	-5.01	13.77	14.68	-7.20	2.19	0.22
miR-26b	16.35			15.58				
miR-125a	26.35	26.37	4.62	23.43	24.38	2.50	2.12	0.23
miR-125a	26.39			25.33				
miR-145	26.53	25.90	4.15	26.11	26.67	4.79	-0.64	1.56
miR-145	25.27			27.23				
miR-203	20.21	22.12	0.38	21.22	20.08	-1.79	2.17	0.22
miR-203	24.04			18.95				
miR-335	29.50	29.10	7.35	25.77	26.65	4.77	2.58	0.17
miR-335	28.70			27.53				
miR-let7f	22.82	22.19	0.44	18.55	20.19	-1.69	2.13	0.23
miR-let7f	21.56			21.83				
miR-29b	24.34	24.82	3.08	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
miR-29b	25.31							
miR-125b	26.97	27.25	5.50	27.33	26.84	4.97	0.53	0.69
miR-125b	27.52			26.36				
miR-149	24.35	22.05	0.30	19.18	19.61	-2.27	2.57	0.17
miR-149	19.74			20.03				
miR-205	28.62	28.76	7.01	25.26	25.11	3.24	3.78	0.07
miR-205	28.90			24.97				
miR-373	23.83	25.38	3.64	25.59	26.16	4.28	-0.64	1.56
miR-373	26.94			26.73				

Tablo 7'nin devamı arka sayfadadır.

Tablo 7 (devamı). Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde miRNA profili

miR-let7g	16.43	16.73	-5.02	14.92	15.18	-6.70	1.68	0.31
miR-let7g	17.02			15.44				
miR-30c	25.62	25.59	3.85	24.45	24.47	2.60	1.25	0.42
miR-30c	25.57			24.50				
miR-127	22.44	22.85	1.10	19.27	20.09	-1.79	2.89	0.13
miR-127	23.26			20.91				
miR-155	24.92	24.30	2.55	25.12	25.82	3.94	-1.39	2.62
miR-155	23.67			26.51				
miR-206	22.93	23.91	2.16	23.02	21.45	-0.42	2.59	0.17
miR-206	24.89			19.89				
miR-510	17.51	17.93	-3.82	15.65	15.74	-6.14	2.32	0.20
miR-510	18.34			15.83				
miR-let7ı	23.65	22.98	1.23	19.87	20.85	-1.03	2.26	0.21
miR-let7ı	22.30			21.84				



Şekil 14. Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde miRNA profili

4.5. Meme Kanseri ve Normal Meme Hücrelerinde IRS1 İndüklü MiRNA Profili

Geçici IRS1 ektopik ekspresyonu sağlanan CRL4010 ve MCF7 hücreleri arasında miRNA ifadelerindeki farklılıkları belirlemek amacıyla IRS1 transfekte MCF7 hücreleri ile IRS1 transfekte CRL4010 hücreleri karşılaştırılmıştır.

Bu kapsamda IRS1 tansfekte CRL4010 hücrelerinde göre IRS1 transfekte MCF7 hücrelerinde 16 adet miRNA'nın ifadesinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu artışlar miR-181d'de 13,38 kat, miR-210'da 9.30 kat, miR-661'de 6.66 kat, miR-130a'da 1.98 kat, miR-191'de 3.13 kat, miR-212'de 11 kat, miR-93'te 8.20 kat, miR-193b' de 7.54 kat, miR-214'te 4.47 kat, miR-21'de 5.58 kat, miR-96'da 5.53 kat, miR-221'de 11.10 kat, miR-222'de 7.34 kat, miR-145'de 1.73 kat, miR-373'te 6.44 kat ve miR-155'de 8.30 kat oranlarında gerçekleşmiştir (Tablo 8, Şekil 15).

Ektopik IRS1 ekspresyonuna bağlı olarak anlamlı bir negatif regülasyonun söz konusu olduğu miRNA saptanmamıştır.

Tablo 8. Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde IRS1 indüklü miRNA profili

Hedef miRNA	MCF7 IRS1 Ct	MCF7 IRS1 Ct Ortalama	MCF7 IRS1 ΔCt	CRL4010 IRS1 Ct	CRL4010 IRS1 Ct Ortalama	CRL4010 IRS1 ΔCt	ΔΔCt	İfade Artışı
RNU6	22.00	21.68	0.00	22.32	21.73	0.00	*	*
RNU6	21.36			21.13				
miR-31	24.64	25.19	3.50	22.56	22.68	0.95	2.55	0.17
miR-31	25.73			22.79				
miR-128	30.55	31.25	9.57	26.60	26.28	4.56	5.01	0.03
miR-128	31.96			25.96				
miR-181d	15.48	15.16	-6.52	18.74	18.95	-2.78	-3.74	13.38
miR-181d	14.84			19.16				
miR-210	14.56	15.60	-6.09	18.25	18.86	-2.87	-3.22	9.30
miR-210	16.63			19.46				
miR-661	28.51	28.39	6.71	31.61	31.17	9.44	-2.74	6.66
miR-661	28.26			30.73				

Tablo 8'in devamı arka sayfadadır.

Tablo 8 (devamı). Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde IRS1 indüklü miRNA profili

miR-15a	18.32	18.69	-2.99	14.88	15.40	-6.32	3.33	0.10
miR-15a	19.06			15.92				
miR-34a	25.16	25.11	3.43	21.67	22.09	0.36	3.07	0.12
miR-34a	25.07			22.50				
miR-130a	21.40	23.24	1.56	21.26	24.27	2.54	-0.99	1.98
miR-130a	25.07			27.28				
miR-191	24.98	25.16	3.48	27.05	26.85	5.13	-1.64	3.13
miR-191	25.35			26.65				
miR-212	21.99	22.31	0.63	25.92	25.81	4.09	-3.46	11.00
miR-212	22.62			25.70				
miR-663a	26.54	27.75	6.07	22.36	22.64	0.92	5.16	0.03
miR-663a	28.97			22.92				
miR-16	24.24	24.89	3.21	18.56	18.89	-2.84	6.04	0.02
miR-16	25.54			19.22				
miR-93	20.17	20.05	-1.63	21.28	23.13	1.41	-3.04	8.20
miR-93	19.94			24.98				
miR-132	27.46	27.70	6.02	21.12	22.63	0.90	5.12	0.03
miR-132	27.94			24.13				
miR-193b	15.45	15.31	-6.37	17.62	18.27	-3.45	-2.91	7.54
miR-193b	15.18			18.92				
miR-214	21.17	21.59	-0.09	23.15	23.80	2.07	-2.16	4.47
miR-214	22.02			24.45				
miR-let7a	25.64	25.91	4.23	22.96	22.73	1.01	3.22	0.11
miR-let7a	26.18			22.50				
miR-21	15.55	15.05	-6.64	16.87	17.57	-4.16	-2.48	5.58
miR-21	14.54			18.27				
miR-96	28.37	28.25	6.57	30.55	30.76	9.04	-2.47	5.53
miR-96	28.14			30.98				
miR-140	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	28.83	28.94	7.22	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
miR-140				29.06				
miR-195	25.94	25.85	4.17	23.65	22.38	0.66	3.51	0.09
miR-195	25.76			21.11				

Tablo 8'in devamı arka sayfadadır.

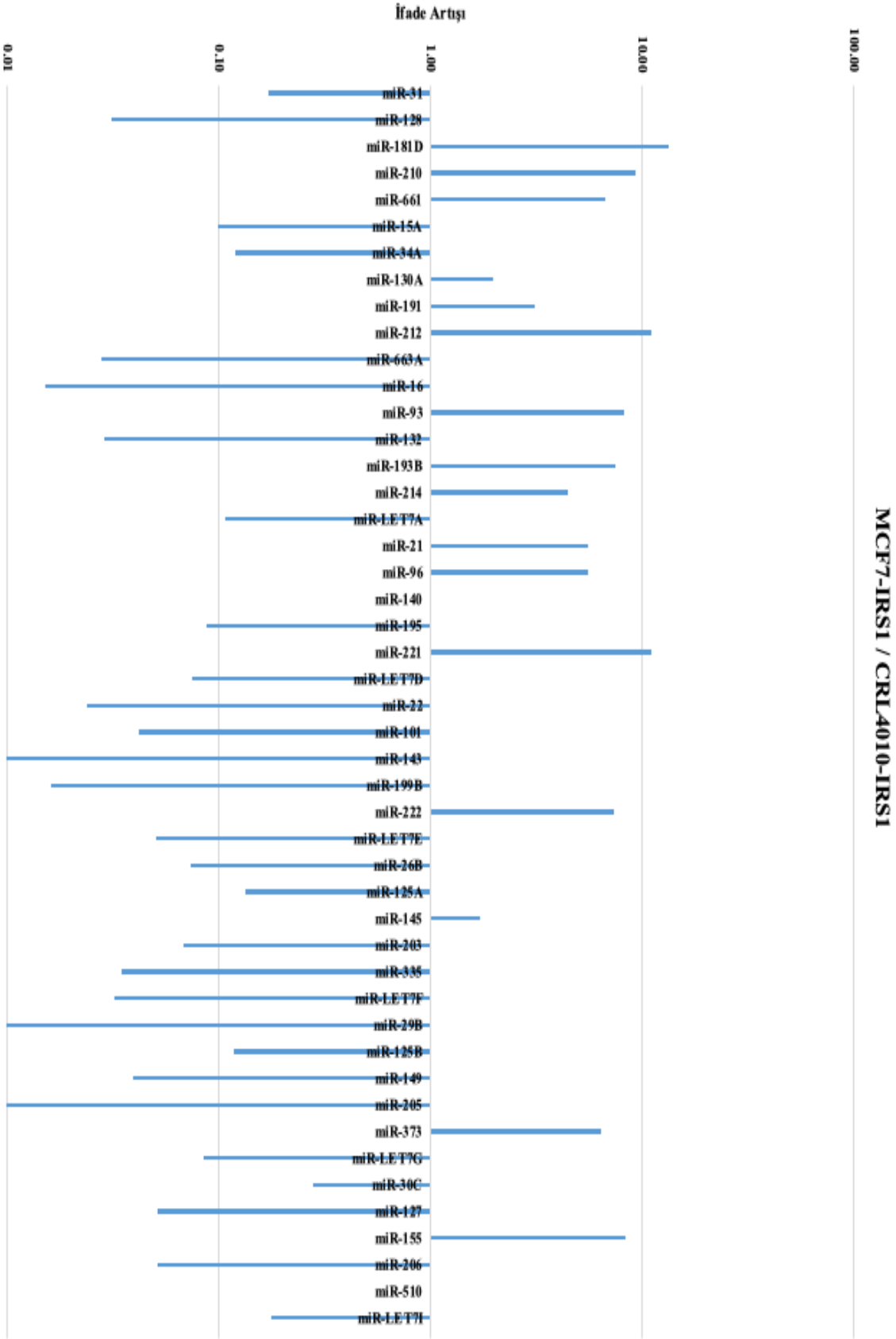
Tablo 8 (devamı). Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde IRS1 indüklü miRNA profili

miR-221	21.40	21.13	-0.55	23.72	24.65	2.93	-3.47	11.10
miR-221	20.87			25.58				
miR-let7d	20.85	19.89	-1.79	16.03	16.19	-5.54	3.74	0.07
miR-let7d	18.93			16.35				
miR-22	26.86	27.39	5.71	21.06	22.04	0.31	5.39	0.02
miR-22	27.91			23.01				
miR-101	26.93	27.33	5.65	22.92	22.80	1.08	4.57	0.04
miR-101	27.73			22.69				
miR-143	31.96	32.45	10.77	24.64	24.61	2.89	7.88	0.00
miR-143	32.95			24.59				
miR-199b	26.17	27.04	5.36	19.99	21.14	-0.59	5.94	0.02
miR-199b	27.90			22.29				
miR-222	26.25	25.11	3.43	28.09	28.03	6.31	-2.87	7.34
miR-222	23.98			27.98				
miR-let7e	27.92	27.59	5.91	24.96	23.33	1.60	4.31	0.05
miR-let7e	27.26			21.69				
miR-26b	17.87	18.40	-3.29	15.50	14.69	-7.04	3.75	0.07
miR-26b	18.92			13.88				
miR-125a	27.26	27.09	5.41	24.57	24.23	2.51	2.90	0.13
miR-125a	26.92			23.89				
miR-145	23.37	25.73	4.04	27.28	26.56	4.83	-0.79	1.73
miR-145	28.08			25.83				
miR-203	23.90	23.68	2.00	18.91	19.85	-1.87	3.87	0.07
miR-203	23.46			20.80				
miR-335	29.74	31.34	9.65	26.28	26.54	4.82	4.84	0.03
miR-335	32.93			26.80				
miR-let7f	26.72	25.83	4.15	20.27	20.92	-0.81	4.96	0.03
miR-let7f	24.94			21.57				
miR-29b	30.72	31.37	9.69	19.33	20.14	-1.59	11.28	0.00
miR-29b	32.02			20.94				
miR-125b	29.12	29.53	7.85	26.89	26.51	4.78	3.07	0.12
miR-125b	29.95			26.13				

Tablo 8'in devamı arka sayfadadır.

Tablo 8 (devamı). Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde IRS1 indüklü miRNA profili

miR-149	26.93	24.45	2.76	18.03	19.84	-1.89	4.65	0.04
miR-149	21.96			21.64				
miR-205	32.94	33.82	12.14	25.18	25.21	3.48	8.65	0.00
miR-205	34.70			25.24				
miR-373	22.81	23.74	2.06	26.57	26.47	4.75	-2.69	6.44
miR-373	24.67			26.38				
miR-let7g	18.93	18.81	-2.87	14.90	15.30	-6.43	3.56	0.09
miR-let7g	18.69			15.70				
miR-30c	26.70	26.35	4.67	24.29	24.56	2.83	1.84	0.28
miR-30c	26.01			24.82				
miR-127	24.92	24.81	3.13	20.47	20.58	-1.15	4.28	0.05
miR-127	24.71			20.68				
miR-155	23.31	23.00	1.31	25.81	26.09	4.37	-3.05	8.30
miR-155	22.68			26.38				
miR-206	25.92	25.52	3.84	21.43	21.28	-0.45	4.28	0.05
miR-206	25.11			21.13				
miR-510	19.15	19.79	-1.89	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
miR-510	20.43							
miR-let7ı	24.83	23.44	1.76	21.82	20.99	-0.74	2.49	0.18
miR-let7ı	22.05			20.16				



Şekil 15. Meme kanseri ve normal meme hücrelerinde IRS1 indüklü miRNA profili

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, moleküler seviyede heterojen bir yapı gösteren ve dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür (Harbeck ve ark., 2019). 2020 yılında, dünya genelinde 2.261.419 kadına ilk kez meme kanseri teşhisi konulurken 684.996 kadın meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir (GLOBOCAN, 2020). Meme kanseri genetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı heterojen bir hastalıktır (Barzaman ve ark., 2020). Kanser hücreleri, temel hücresel fonksiyonlarını sürdürmek için temel besin olarak glikoza olan ihtiyacı arttırırlar (Varghese ve ark., 2019). İnsülin sinyal yolağı, glikoz metabolizmasının anahtar düzenleyicisidir (Rachdaoui N, 2020). İnsülin ve IGF1, pleiotropik etkilerini reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesinin üyeleri olan IR'ye ve IGF1R'ye bağlandıktan sonra gösterirler (Cao ve Yee, 2021). İnsülin reseptörü substratı (IRS) proteinleri, transmembran reseptörleri aracılığıyla hücre dışından gelen sinyallerin hücre içi ortama aktarılmasına aracılık eden sitoplazmik bir adaptör protein ailesidir (Farabaugh ve ark., 2016). IRS1 proteinleri, insanda her dokuda eksprese edilen ve çoğu hücre tipinde insüline bağlı mitojenik aktivitenin ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesine aracılık ederler (Shaw, 2011).

IRS proteinleri, insülin veya insülin benzeri büyüme faktörü reseptörlerinden gelen sinyallere aracılık ederek iki temel sinyal yolağının aktivasyonuna yol açarlar: Bunlardan biri olan PI3K / AKT yolağı, IRS proteinlerinin daha çok metabolik aktivitelerinden sorumludur. Diğer yolak ise MAPK / ERK sinyali, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi aktivitelerden sorumludur (Griffeth ve ark., 2014).

Meme kanserinde, IRS1'in aşırı ekspresyonu ve yapısal tirozin fosforilasyonu, Akt ve Erk1 / 2'nin aktivasyonu ile ilişkili olan hücre çoğalmasında ve tümör büyümesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Shaw, 2011). IRS1'in artan ekspresyonunun, Ras/Raf/ERK yolağını aktive ederek meme kanseri MCF7 hücrelerinin çoğalmasını ve istilasını desteklediği gösterilmiştir (Wei ve ark., 2017). IRS1 proteinlerine ek olarak, meme kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde miRNA'ların da kritik rol oynadığı gösterilmiştir (Wang ve Luo, 2015).

MikroRNA'lar (miRNA'lar), transkripsiyon sonrası seviyede hedef mRNA'ların translasyonel baskılanmasını veya yıkılmalarını uyararak gen ekspresyonunu

düzenleyen ve türler arasında yüksek oranda korunan 19-25 nükleotid uzunluğundaki kodlamayan küçük RNA molekülleridir (Lu ve Rothenberg, 2018; Correia de Sousa ve ark., 2019). Genellikle onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak hareket eden miRNA'lar, hedef onkogenleri veya tümör baskılayıcı genleri düzenleyerek meme kanseri dahil birçok kanserin başlangıcı, hücre çoğalması, tümör oluşumu ve metastazı gibi hücresel süreçlerinde rol oynadığı bildirilmiştir (Xiao ve ark., 2019). MiRNA'ların ekspresyon profillerindeki düzensizlik, meme kanseri de dahil olmak üzere hemen hemen tüm kanserlerde gösterilmiştir (Chang ve ark., 2016).

Meme kanserinde, PI3K ve MAPK sinyal yolaklarının miRNA'ların ekspresyon profilleri üzerindeki düzenleyici rolleri gösterilmiştir (Martin ve ark., 2012). Ancak, önceki çalışmalarda bu sinyal yolaklarının temel düzenleyicilerinden biri olan IRS1 proteinlerinin indüksiyonuyla ilişkili olarak değişen miRNA'ların ekspresyon profilleri gösterilmemiştir. IRS1'in ve miRNA'ların bütün hücrelerde ifade edildiği ve biyolojik süreçlerde tanımlanan rolleri düşünüldüğünde, meme kanserinde IRS1'in ekspresyon artışına bağlı olarak miRNA'ların değişen ekspresyon profillerinin tanımlanması, rol aldıkları biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasını ve meme kanserinde daha etkili tanısal ve terapötik biyobelirteçlerin keşfedilmelerini sağlayabilir.

Çalışmamız kapsamında, insan IRS1 geni ile transfekte edilmiş CRL4010 hücrelerinde ve insan IRS1 geni transfekte edilmemiş CRL4010 hücrelerinde (kontrol), insan IRS1 geni ile transfekte edilmiş MCF7 hücrelerinde ve insan IRS1 geni transfekte edilmemiş MCF7 hücrelerinde 47 miRNA'nın ekspresyon profilinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, kontrol gurubu CRL4010 hücrelerine kıyasla ektopik IRS1 ekspresyonuna sahip CRL4010 hücrelerinde miR-15a, miR-93, miR-140, miR-203 ve miR-125b'nin ekspresyonu artarken miR-132 ve miR-let7f'nin ekspresyonunun azaldığı belirlendi. Ancak, bu ekspresyon farklarının anlamlı seviyelerde olmadığı saptandı. Buna karşın, kontrol gurubu MCF7 hücrelerine kıyasla ektopik IRS1 ekspresyonlu MCF7 hücrelerinde miR-181d, miR-210, miR-661, miR-130a, miR-191, miR-212, miR-93, miR-193b, miR-214, miR-21, miR-96, miR-221, miR-222, miR-373 ve miR-155'in ekspresyonlarının önemli ölçüde arttığı tespit edildi.

Meme dokusunda, miR-21 ve miR-210'nun ekspresyon profillerini araştıran önceki çalışmalar, bu miRNA'ların normal meme hücrelerine kıyasla kanserli meme hücrelerinde ekspresyonlarının önemli ölçüde arttığını belirtmiştir. Bu miRNA'ların tümör hücrelerinin büyümesi, istilası ve metastazı ile ilişkili onkogenik rolleri belirtilmiş ve aşırı ekspresyonlarının meme kanseri hastalarının daha kısa genel sağkalımıyla sonuçlandığı gösterilmiştir (Wu, 2020). MiR-155, esas olarak lösemide keşfedilen ancak aynı zamanda meme kanserinin ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı bilinen onkojenik bir miRNA'dır. Meme kanserinde, miR-155 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı ve miR-155'in aşırı ekspresyonunun, ileri tümör evresi, yüksek tümör derecesi ve lenf nodu metastazı ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Raeisi ve ark., 2020). miR-93'ün aşırı ekspresyonu, onkogen olarak görev yaptığı hepatoselüler, mide ve meme kanserinin yanı sıra glioma ve endometriyal karsinom dahil olmak üzere birçok kanser türünde tanımlanmıştır. MiR-93'ün ekspresyon seviyelerinin TNBC dokusunda TNBC olmayan dokuya kıyasla belirgin şekilde arttığı gösterilmiş ve artmış lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilmiştir (An ve ark., 2021). miR-214'ün meme kanseri dahil birçok kanser türünde ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı ve hücrelerin canlılığını, çoğalmayı, göçü ve istilayı desteklediği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2019). MiR-96'nın hepatoselüler karsinom, prostat kanseri, medulloblastom, pankreas kanseri, kolorektal karsinom ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde iyi tanımlanan bir onkojenik miRNA'dır. Meme kanserinde aşırı eksprese edilen miR-96'nın hücre çoğalması, göçü ve istilasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir (Xie ve ark., 2018). miR-373 ilk olarak meme kanserinde metastazı teşvik eden bir miRNA olarak tanımlanmıştır. Bugüne kadar, miR-373'ün meme kanserindeki işlevleri tartışmalıdır. İn vitro ve in vivo deneylerden elde edilen sonuçlara dayanarak miR-373, hücreye özgü bir şekilde işlev görerek meme kanseri hücrelerinin metastazını hem teşvik ettiği hem de engellediği bildirilmiştir. İnvaziv olmayan insan meme kanseri hücre hattı MCF7'de, miR-373'ün aşırı ekspresyonu hücre göçünü ve istilasını desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca, endojen miR-373'ü eksprese eden insan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-435'te, miR-373'ün düşük ekspresyonu, kanser hücresi göçünü ve istilasını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Ancak, agresif biçimde invaziv bir ER negatif meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231'de, miR-520c/373'ün aşırı ekspresyonu kanser hücrelerinin invaziv kapasitesini azalttığı

gösterilmiştir (Wei ve ark., 2015). Meme kanserinde, miR-214'ün yüksek ekspresyon seviyeleri tespit edilmiş ve miR-214'ün aşırı ekspresyonunun hücre çoğalmasını, göçü ve istilayı belirgin şekilde arttırdığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2019). Meme dokusunda, miR-191'in ekspresyonunun normal meme hücrelerine kıyasla kanserli meme hücrelerinde yüksek oranda arttığı gösterilmiştir (Waters ve ark., 2014). MiR-181d ekspresyonunun normal komşu tümör dokularına kıyasla birincil meme kanserinde iki kattan daha fazla arttığı bildirilmiştir (Le, 2015). Slug ile düzenlenmiş miR-221'in artan ekspresyonu E-kadherini hedef alarak ekspresyonunu azaltır ve meme kanseri ilerlemesini destekler (Pan ve ark., 2016). MiR-222'nin, lenf nodu metastazı hastalarının meme kanseri dokusunda yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir (Chernyy ve ark., 2018). MiR-212'nin meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili olarak literatürde farklı rolleri bildirilmiştir. Bununla ilgili olarak Damavandi ve ark. (2016), meme tümörü örneklerinde miR-212 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını ve tümör baskılayıcı rolünü tanımlamıştır. Ancak, evre III meme tümörlerinde miR-212 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada, Xie ve ark. (2018), miRNA-212'nin, in vitro ilaca dirençli meme kanserinde aşırı eksprese edildiğini göstermiştir.

Bir tümör baskılayıcı olan miR-661'in, mide kanseri, glioma, osteosarkom ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. TNBC dokularında miR-661 ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı ve miR-661 ekspresyonu düşük olan hastaların olumsuz bir prognoz sergilediği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2018). MiR-130a'nın ve miR-193b'nin ekspresyonlarının normal meme hücrelerine kıyasla kanserli meme hücrelerinde yüksek oranda azaldığı tespit edilmiştir. Meme kanserinde, miR-130a'nın ve miR-193b'nin aşırı ekspresyonlarının hücre çoğalmasını, istilayı ve göçü önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2018; Tahiri ve ark., 2014).

Literatürdeki çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, çalışmamız sonucunda, IRS1 indüksiyonu ile ekspresyonlarının önemli ölçüde arttığı tespit edilen onkogenik miR-181d, miR-210, miR-191, miR-212, miR-93, miR-214, miR-21, miR-96, miR-221, miR-222, miR-373 ve miR-155'in literatürdeki çalışmalarların sonuçlarıyla uyumlu bir şekilde meme kanserinin gelişimine ve ilerlemesine katkıda

bulunduğu saptanmıştır. Ancak, miR-130a, miR-193b ve miR-661 literatürdeki çalışmalarda tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak tanımlanmalarına karşın çalışmamızın sonucunda ekspresyonları önemli ölçüde artmıştır. Bunun nedeni, kullandığımız kanserli meme hücre hattıyla veya meme kanseri moleküler alt tipiyle ilişkili olabilir. Bu kapsamda, önceki çalışmalarda birçok miRNA'nın meme kanserinin farklı hücre hatlarında ve farklı moleküler alt tipinde farklı ekspresyon profillerine sahip oldukları gösterilmiştir. Meme kanseri hücre hatlarında, miR-210 ekspresyonu ile ilgili olarak Shi ve ark. (2017), MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin transkriptomunu karşılaştırmış ve üçlü negatif MDA-MB-231 hücre hattında miR-210 ekspresyonunun luminal MCF7'den dört kat daha yüksek olabileceğini göstermiştir. Calvano Filho ve ark. (2014), meme kanserinin farklı morfolojik alt tiplerinde miR-20a ekspresyon seviyelerinde, luminal alt tip ile karşılaştırıldığında üçlü negatif meme kanserinde miR-20a ekspresyonunda ortalama dört kat artış olduğunu bildirmiştir.

Elde ettiğimiz veriler kapsamında IRS1 sinyalinin özellikle onkogenik role sahip miRNA ekspresyonlarını arttırdığı söylenebilir. Bu durum IRS1 proteinin meme kanseri gelişimindekini rolünü ortaya koyan literatürdeki diğer çalışmaları da doğrular niteliktedir. Aday miRNA kapsamında belirlediğimiz miRNA'ların fonksiyonel rollerine yönelik ileri düzey çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu miRNA'ların fonksiyonel rollerinin tanımlanması, sonraki çalışmalara temel oluşturarak meme kanserini daha erken tespit etmek ve tedavi etmek için farklı stratejiler geliştirilmesine imkan sağlayacak, yüksek potansiyele sahip tedavi hedeflerini belirlemeye ve öncelik vermeye de yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

Alhasan L. MiR-126 Modulates Angiogenesis in Breast Cancer by Targeting VEGF-A –mRNA. Asian Pac J Cancer Prev. 2019;20(1):193–97.

Ali Syeda Z, Langden SSS, Munkhzul C, Lee M, Song SJ. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. Int J Mol Sci. 2020;21(5):1723.

An G, Lu F, Huang S, Bai J, He L, Liu Y ve ark. Effects of miR-93 on epithelial-to-mesenchymal transition and vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer cells. Mol Med Rep. 2021;23(1):30.

Asiaf A, Ahmad ST, Arjumand W, Zargar MA. MicroRNAs in Breast Cancer: Diagnostic and Therapeutic Potential. Methods Mol Biol. 2018;1699:23-43.

Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S ve ark. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. Int Immunopharmacol. 2020;84:106535.

Becker MA, Ibrahim YH, Oh AS, Fagan DH, Byron SA, Sarver AL ve ark. Insulin Receptor Substrate Adaptor Proteins Mediate Prognostic Gene Expression Profiles in Breast Cancer. PLoS One. 2016;11(3):e0150564.

Bitaraf A, Babashah S, Garshasbi M. Aberrant expression of a five- microRNA signature in breast carcinoma as a promising biomarker for diagnosis. J Clin Lab Anal. 2020;34(2):e23063.

Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(1):a009191.

Calvano Filho CM, Calvano-Mendes DC, Carvalho KC, Maciel GA, Ricci MD, Torres AP ve ark. Triple-negative and luminal A breast tumors: differential expression of miR-18a-5p, miR-17-5p, and miR-20a-5p. Tumour Biol. 2014;35(8):7733-41.

Cao J, Yee D. Disrupting Insulin and IGF Receptor Function in Cancer. Int J Mol Sci. 2021;22(2):555.

Chang JT, Wang F, Chapin W, Huang RS. Identification of MicroRNAs as Breast Cancer Prognosis Markers through the Cancer Genome Atlas. PLoS One. 2016;11(12):e0168284.

Chen B, Li J, Chi D, Sahnoune I, Calin S, Girnita L ve ark. Non-Coding RNAs in IGF-1R Signaling Regulation: The Underlying Pathophysiological Link between Diabetes and Cancer. Cells. 2019;8(12):1638.

Chen H, Zhang Y, Cao X, Mou P. MiR-27a Facilitates Breast Cancer Progression via GSK-3β. Technol Cancer Res Treat. 2020;19:1533033820965576.

Chen X, Wang YW, Zhu WJ, Li Y, Liu L, Yin G ve ark. A 4-microRNA signature predicts lymph node metastasis and prognosis in breast cancer. Hum Pathol. 2018;76:122-32.

Chen X, Zhao M, Huang J, Li Y, Wang S, Harrington CA ve ark. microRNA-130a suppresses breast cancer cell migration and invasion by targeting FOSL1 and upregulating ZO-1. J Cell Biochem. 2018;119(6):4945-56.

Chernyy V, Pustylnyak V, Kozlov V, Gulyaeva L. Increased expression of miR-155 and miR-222 is associated with lymph node positive status. J Cancer. 2018;9(1):135-40.

Conti I, Varano G, Simioni C, Laface I, Milani D, Rimondi E ve ark. miRNAs as Influencers of Cell–Cell Communication in Tumor Microenvironment. Cells. 2020;9(1):220.

Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. Int J Mol Sci. 2019;20(24):6249.

Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J ve ark. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. Am J Cancer Res. 2015;5(10):2929–43.

Damavandi Z, Torkashvand S, Vasei M, Soltani BM, Tavalaei M, Mowla SJ. Aberrant Expression of Breast Development-Related MicroRNAs, miR-22, miR-132, and miR-212, in Breast Tumor Tissues. J Breast Cancer. 2016;19(2):148–55.

Dong Y, Liu Y, Jiang A, Li R, Yin M, Wang Y. MicroRNA-335 suppresses the proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells by targeting EphA4. Mol Cell Biochem. 2018;439(1-2):95-104.

Dupont J, Scaramuzzi RJ. Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. Biochem J. 2016;473(11):1483–501.

Elango R, Alsaleh KA, Vishnubalaji R, Manikandan M, Ali AM, Abd El-Aziz N ve ark. MicroRNA Expression Profiling on Paired Primary and Lymph Node Metastatic Breast Cancer Revealed Distinct microRNA Profile Associated With LNM. Front Oncol. 2020;10:756.

Farabaugh SM, Chan BT, Cui X, Dearth RK, Lee AV. Lack of interaction between ErbB2 and insulin receptor substrate signaling in breast cancer. Cell Commun Signal. 2016;14:25.

Fridrichova I, Zmetakova I. MicroRNAs Contribute to Breast Cancer Invasiveness. Cells. 2019;8(11):1361.

Global Cancer Observatory. Cancer today [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 25 Mayıs 2020]. Erişim adresi: https://gco.iarc.fr/

Gorgisen G, Gulacar IM, Ozes ON. The role of insulin receptor substrate (IRS) proteins in oncogenic transformation. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2017;63(1):1-5.

Gorgisen G, Karatas U, Ates C, Oksuz M, Gulacar IM. Association of IRS1 Gly972Arg and IRS2 Gly1057Asp polymorphisms with gastric cancer in Turkish subjects. Oncol Lett. 2020;20(2):2016-20.

Griffeth RJ, Bianda V, Nef S. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. Basic Clin Androl. 2014;24:12.

Gucalp A, Traina TA, Eisner JR, Parker JS, Selitsky SR, Park BH ve ark. Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2019;173(1):37–48.

Hannafon BN, Cai A, Calloway CL, Xu YF, Zhang R, Fung KM ve ark. miR-23b and miR-27b are oncogenic microRNAs in breast cancer: evidence from a CRISPR/Cas9 deletion study. BMC Cancer. 2019;19(1):642.

Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P ve ark. Breast cancer. Nat Rev Dis Primers. 2019;23;5(1):66.

Hoang LN, Gilks BC. Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome: Moving Beyond BRCA1 and BRCA2. Adv Anat Pathol. 2018;25(2):85-95.

Hong BS, Ryu HS, Kim N, Kim J, Lee E, Moon H. Tumor Suppressor miRNA-204-5p Regulates Growth, Metastasis, and Immune Microenvironment Remodeling in Breast Cancer. Cancer Res. 2019;79(7):1520-34.

Hu Y, Qiu Y, Yagüe E, Liu J, Zhang J. miRNA-205 targets VEGFA and FGF2 and regulates resistance to chemotherapeutics in breast cancer. Cell Death Dis. 2016;7(6):e2291.

Jiang Y, Wang D, Ren H, Shi Y, Gao Y. MiR- 145- targeted HBXIP modulates human breast cancer cell proliferation. Thorac Cancer. 2019;10(1):71–7.

Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RH. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. Maturitas. 2008;61(1-2):141-50.

Kim J, Yao F, Xiao Z, Sun Y, Ma L. MicroRNAs and metastasis: small RNAs play big roles. Cancer Metastasis Rev. 2018;37(1):5–15.

Kineman RD, Del Rio-Moreno M, Sarmento-Cabral A. Understanding the tissue-specific roles of IGF1/IGF1R in regulating metabolism using the Cre/LoxP system. J Mol Endocrinol. 2018;61(1):T187–98.

Koc G, Gulen-Savas H, Ergol S, Yildirim-Cetinkaya M, Aydin N. Female university students' knowledge and practice of breast self-examination in Turkey. Niger J Clin Pract. 2019;22(3):410-15.

Kormi SMA, Shima M, Azizi A, Martins LS, Pordel A, Nezhad MB. Molecular Genetics in Breast Cancer: Signaling Pathways and Tumor Biology. The Cancer Press. 2016;2(4):67-70.

Le DH. Network-based ranking methods for prediction of novel disease associated microRNAs. Comput Biol Chem. 2015;58:139-48.

Li X, Zeng Z, Wang J, Wu Y, Chen W, Zheng L ve ark. MicroRNA-9 and breast cancer. Biomed Pharmacother. 2020;122:109687.

Li ZH, Xiong QY, Xu L, Duan P, Yang QO, Zhou P ve ark. miR-29a regulated ER-positive breast cancer cell growth and invasion and is involved in the insulin signaling pathway. Oncotarget. 2017;8(20):32566–75.

Liu T, Guo J, Zhang X. MiR-202-5p/ PTEN mediates doxorubicin-resistance of breast cancer cells via PI3K/Akt signaling pathway. Cancer Biol Ther. 2019;20(7):989-98.

Liu X, Guan Y, Wang L, Niu Y. MicroRNA-10b expression in node-negative breast cancer-correlation with metastasis and angiogenesis. Oncol Lett. 2017;14(5):5845–52.

Loh HY, Norman BP, Lai KS, Rahman NMANA, Alitheen NBM, Osman MA. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. Int J Mol Sci. 2019;20(19):4940.

Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. J Allergy Clin Immunol. 2018;141(4):1202-07.

Machado-Neto JA, Fenerich BA, Rodrigues Alves APN, Fernandes JC, Scopim-Ribeiro R, Coelho-Silva JL ve ark. Insulin Substrate Receptor (IRS) proteins in normal and malignant hematopoiesis. Clinics (Sao Paulo). 2018;11;73(suppl 1):e566s.

Martin EC, Bratton MR, Zhu Y, Rhodes LV, Tilghman SL, Collins-Burow BM ve ark. Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling Regulates miRNA Expression in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. PLoS One. 2012;7(11):e49067.

Mercado-Matos J, Clark JL, Piper AJ, Janusis J, Shaw LM. Differential involvement of the microtubule cytoskeleton in insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 signaling to AKT determines the response to microtubule disruption in breast carcinoma cells. J Biol Chem. 2017;292(19):7806–16.

Mi Y, Liu F, Liang X, Liu S, Huang X, Sang M. Tumor suppressor let-7a inhibits breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting MAGE-A1. Neoplasma. 2019;66(1):54-62.

Moghbeli M. Genetic and molecular biology of breast cancer among Iranian patients. J Transl Med. 2019;17:218.

Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. Breast Cancer (Dove Med Press). 2019;11:151–64.

Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. World J Biol Chem. 2017;8(1):45–56.

Özdoğan M. Meme kanseri çeşitleri nelerdir? [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 19 Ekim 2020]. Erişim adresi: https://www.drozdogan.com/meme-kanseri-cesitleri-nelerdir/

Pan Y, Li J, Zhang Y, Wang N, Liang H, Liu Y ve ark. Slug-upregulated miR-221 promotes breast cancer progression through suppressing E-cadherin expression. Sci Rep. 2016;6:25798.

Peng J, He L. IRS Posttranslational Modifications in Regulating Insulin Signaling. J Mol Endocrinol. 2018;60(1):R1–8.

Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular Classification of Breast Cancer. PET Clin. 2018; 13(3):325-338. Rachdaoui N. Insulin: The Friend and the Foe in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. Int J Mol Sci. 2020;21(5):1770.

Rachdaoui N. Insulin: The Friend and the Foe in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. Int J Mol Sci. 2020;21(5):1770.

Raeisi F, Mahmoudi E, Dehghani-Samani M, Hosseini SSE, Ghahfarrokhi AM, Arshi A ve ark. Differential Expression Profile of miR-27b, miR-29a, and miR-155 in Chronic Lymphocytic Leukemia and Breast Cancer Patients. Mol Ther Oncolytics. 2020;16:230–7.

Rahman MM, Brane AC, Tollefsbol TO. MicroRNAs and Epigenetics Strategies to Reverse Breast Cancer. Cells. 2019;8(10):1214.

Sarfstein R, Nagaraj K, LeRoith D, Werner H. Differential Effects of Insulin and IGF1 Receptors on ERK and AKT Subcellular Distribution in Breast Cancer Cells. Cells. 2019;8(12):1499.

Sasmita AO, Wong YP. Organoids as reliable breast cancer study models: an update. Int J Oncol Res, 2018 - pdfs.semanticscholar.org

Shafei MA, Forshaw T, Davis J, Flemban A, Qualtrough D, Dean S ve ark. BCATc modulates crosstalk between the PI3K/Akt and the Ras/ERK pathway regulating proliferation in triple negative breast cancer. Oncotarget. 2020;11(21):1971–87.

Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins. Cell Cycle. 2011;10(11):1750–56.

Shi Y, Ye P, Uzun X. Differential Expression Profiles of the Transcriptome in Breast Cancer Cell Lines Revealed by Next Generation Sequencing. Cell Physiol Biochem. 2017;44(2):804-16.

Stavast CJ, Erkeland SJ. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. Cells. 2019;8(11):1465.

Sun S, Sun Y, Rong X, Bai L. High glucose promotes breast cancer proliferation and metastasis by impairing angiotensinogen expression. Biosci Rep. 2019;39(6):BSR20190436.

Søkilde R, Persson H, Ehinger A, Pirona AC, Fernö M, Hegardt C ve ark. Refinement of breast cancer molecular classification by miRNA expression profiles. BMC Genomics. 2019;20:503.

Taha M, Mitwally N, Soliman AS, Yousef E. Potential Diagnostic and Prognostic Utility of miR-141, miR-181b1, and miR-23b in Breast Cancer. Int J Mol Sci. 2020;21(22):8589.

Tahiri A, Leivonen SK, Lüders T, Steinfeld I, Ragle Aure M, Geisler J ve ark. Deregulation of cancer-related miRNAs is a common event in both benign and malignant human breast tumors. Carcinogenesis. 2014;35(1):76-85.

Tracz AF, Szczylik C, Porta C, Czarnecka AM. Insulin-like growth factor-1 signaling in renal cell carcinoma. BMC Cancer. 2016;16:453.

Varghese S, Samuel SM, Varghese E, Kubatka P, Büsselberg D. High Glucose Represses the Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effect of Metformin in Triple Negative Breast Cancer Cells. Biomolecules. 2019;9(1):16.

Vella V, Milluzzo A, Scalisi NM, Vigneri P, Sciacca L. Insulin Receptor Isoforms in Cancer. Int J Mol Sci. 2018;19(11):3615.

Wang H, Tan Z, Hu H, Liu H, Wu T, Zheng C ve ark. microRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1. BMC Cancer. 2019;19(1):738.

Wang S, Li Q, Wang Y, Li X, Wang R, Kang Y ve ark. Upregulation of circ-UBAP2 predicts poor prognosis and promotes triple-negative breast cancer progression through the miR-661/MTA1 pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2018;505(4):996-1002.

Wang W, Luo YP. MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential. J Zhejiang Univ Sci B. 2015;16(1):18–31.

Waters PS, Dwyer RM, Brougham C, Glynn CL, Wall D, Hyland P ve ark. Impact of Tumour Epithelial Subtype on Circulating microRNAs in Breast Cancer Patients. PLoS One. 2014;9(3):e90605.

Zhang Y, Zhao Z, Li S, Dong L, Li Y, Mao Y ve ark. Inhibition of miR-214 attenuates the migration and invasion of triple-negative breast cancer cells. Mol Med Rep. 2019;19(5):4035–42.

Zujewski JA, Dvaladze AL, Ilbawi A, Anderson BO, Luciani S, Stevens L ve ark. Knowledge Summaries for Comprehensive Breast Cancer Control. J Glob Oncol. 2018;4:1-7.

EKLER

EK1. Tez Orijinallik Raporu

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

YÜKSEK LİSANS TEZİ ORİJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA İNSÜLİN RESEPTÖRÜ SUBSTRATI 1 (IRS1) İNDÜKLÜ miRNA EKSPRESYON PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları				
Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
1	**III-V-VI/1-2**	**3-26**	**45-70**	**60**

İntihal taraması yapılan program	Taramanın yapıldığı tarih	Benzerlik oranı %
Turnitin	**05/07/ 2021**	**%5**

***Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:**	
- Kabul ve onay sayfası hariç,	- Gereç ve yöntemler hariç,
- Teşekkür hariç,	- Kaynakça hariç,
- İçindekiler hariç,	- Alıntılar hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,	-Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)	

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Yılmaz ECER

İmza:

Öğrencinin Adı Soyadı	Yılmaz ECER
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji
Öğrenci No	18930002008
Programı	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora

DANIŞMAN ONAYI	**ENSTİTÜ ONAYI**
UYGUNDUR	UYGUNDUR
Doç. Dr. Gökhan Görgişen	**Doç. Dr. Hamit Hakan ALP**
	Sağlık Bilimleri Enstitü Müdür Yardımcısı