

**WVOX ARACILI MİR-182 REGÜLASYONUNUN MEME
KANSERİ HÜCRELERİNDE CİSPLATİN
DİRENCİ İLE İLİŞKİSİNİN CRISPR/CAS9 KNOCKOUT YÖNTEMİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

**Hülya DÖNMEZ
1178209203**

**TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
Doktora Tezi**

**Danışman
Doç. Dr. Bahadır BATAR
Tez No: 146
2022-TEKİRDAĞ**

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**WVOX ARACILI MİR-182 REGÜLASYONUNUN
MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE CİSPLATİN
DİRENCİ İLE İLİŞKİSİNİN CRISPR/CAS9 KNOCKOUT
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Hülya DÖNMEZ
1178209203

**TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN
Doç. Dr. Bahadır BATAR

Tez No: 146
2022-TEKİRDAĞ

KABUL ve ONAY

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde
danışmanlığında
yürütülmüş bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak
kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

06/07/2022

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Üye

Üye

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Hülya DÖNMEZ'in "WVOX Aracılı miR-182 Regülasyonunun Meme Kanseri Hücrelerinde Cisplatin Direnci ile İlişkisinin Crispr/Cas9 Knockout Yöntemi ile Araştırılması" başlıklı tezi 06/07/2022 günü saat 10.30'da Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışma ve doktora dönemim boyunca bilgisiyle yolumu aydınlattığı, insani ve bilim insanı yönüyle daima örnek alacağım, desteğini her zaman hissettiğim ve iyi ki onun gibi bir hoca ile karşılaştım dediğim, bu yüzden kendimi her zaman şanslı hissedeceğim değerli hocam Sn. Prof. Dr. Burhan TURGUT'a,

Yine bana kendimi ikinci kez şanslı hissettiren bilgisiyle ufkumu açan, bilime olan hevesimi arttıran, çalışma ve disipliniyle her zaman örnek alacağım kıymetli hocam Sn. Doç. Dr. Bahadır BATAR'a,

Doktora tezim süresince sunumlarıma sabır ve anlayışıyla destek olan Sn. Dr. Öğr. Üyesi Murat MENGİ'ye,

Bana anlayışıyla destek olan Sn. Dr. Öğr. Üyesi Seval AKPINAR'a,

Benden hem bilgi hem de ekipman konusunda desteğini esirgemeyen Ph.D Şeyma DEMİRKESEN'e, deney ve analizlerimde destek olan MSc. Elif SERDAL'a ve Yüksek Lisans öğrencisi Yaren ŞİMŞEK'e,

Şu an hayatta olmasa da doktora başlamanın konusunda en büyük desteği gösteren, sevgiyle bakan gözlerini hep hatırlayacağım ve daima minnet duyacağım merhum amcam Zafer ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Doktora tezimi beni her zaman şefkati ve sevgisiyle besleyen kardeşlerim Pınar ERDOĞDU, Selin BAHÇEKAPILI, Şansen BAHÇEKAPILI ve Niyazi ÖZDEMİR'e; bu yolda bana en çok cesareti veren, destek, sabır, fedakarlıkları ve anlayışı ile yanımda olan sevgili eşim en yakın dostum Nadir Doğan DÖNMEZ'e; bir an önce işlerim bitse de onunla zaman geçirsem diye düşündüğüm, gülüşü yeter dediğim canım oğlum Kerem Tuna DÖNMEZ'e ve emeklerini bir ömür boyu ödeyemeyeceğim, bana her zaman güç veren ve tüm eğitim hayatım süresince ellerinden geleni fazlasıyla yapan ve yapmaya devam eden babacığım Tamer ÖZDEMİR ve anneciğim Ayşe ÖZDEMİR'e ithaf ediyorum.

ÖZET

Dönmez, H. WWOX Aracılı miR-182 Regülasyonunun Meme Kanseri Hücrelerinde Cisplatin Direnci ile İlişkinin Crispr/Cas9 Knockout Yöntemi ile Araştırılması, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Tekirdağ, 2022.

Tez projesinin amacı Wwox ifade etmeyen TNBC hücre hattında (MDA-MB-231) gelişen cisplatin direncinin miR-182 regülasyonuna bağlı olup olmadığını açıklığa kavuşturmasıdır. Bu amaçla bir onkomiR olduğu bilinen miR-182'nin CRISPR yöntemi ile knockout ya da alternatif bir yöntem olarak düşündüğümüz miRNA inhibitörleri ile knockdown edilmesiyle cisplatinin etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. miRNA knockout deneylerinde sıklıkla kullanılmayan fakat günümüzde gen tedavisi çalışmalarında sıklıkla kullanılan CRISPR knockout için miR-182 gen bölgesine spesifik rehberRNA'lar (gRNA) tasarlandı. Agaroz jelde knockout oluşumunu doğrulayacak bir indel (insersiyon/delesyon) gözlemlenmedi. Amacımızı gerçekleştirmek için alternatif bir yöntem olarak belirlediğimiz anti-miR (mikroRNA inhibitörü) kullanılarak knockdown yapılması kararlaştırıldı. Anti-miR182 inhibitörü MDA-MB-231 hücrelerine lipofektamin RNAimax ile transfekte edildi. cDNA sentezi ile Gerçek Zamanlı PZR yapılarak miR-182 geninin knockdown edildiği gösterildi. Anneksin V ile apoptoz testi gerçekleştirildi. Anti-miR182 ve cisplatin uygulanan hücrelerin %20,02'sinin apoptozda olduğunu %20,10'unun ise geç apoptozda olduğunu saptadık. Anti-miR182 ve cisplatin uygulanmayan hücrelerin %11,71'i apoptozda, %18,37'sinin geç apoptozda olduğunu saptadık. Ardından flow sitometri ile hücre döngüsü analizi çalışmaları yapıldı. miR-182 inhibitörü ve cisplatin uygulanan hücrelerde cisplatin ve anti-miR182 uygulanmayan MDA-MB-231 hücrelerine göre G2 fazında %12,23 oranında daha fazla artış saptandı. Sonuçlar, Wwox ifade etmeyen TNBC hücrelerindeki cisplatin direnci ve miR-182 arasındaki bu olası ilişkinin meme kanseri tedavisinde cisplatin direnci için yeni bir gen tedavisi stratejisinin geliştirilmesinde kullanabileceğini önermektedir.

Anahtar Kelimeler: Wwox, miR-182, üçlü negatif meme kanseri, cisplatin direnci.

ABSTRACT

Dönmez, H. Investigation of the Relationship of WWOX Mediated miR-182 Regulation with Cisplatin Resistance in Breast Cancer Cells by Crispr/Cas9 Knockout Method, Tekirdağ Namık Kemal University Institute of Health Sciences, Department of Tumor Biology and Immunology, Doctoral Thesis, Tekirdağ, 2022. The aim of the thesis project is to clarify whether cisplatin resistance developed in the TNBC cell line (MDA-MB-231) that does not express *Wwox* is due to miR-182 regulation. For this purpose, it was aimed to investigate the effect of cisplatin by knocking out miR-182, which is known to be an oncomiR, with the CRISPR method or knockdown with miRNA inhibitors, which we consider as an alternative method. For CRISPR knockout, which is not frequently used in miRNA knockout experiments but is frequently used in gene therapy studies today, guideRNAs specific to the miR-182 gene region were designed. No indel (insertion/deletion) was observed in the agarose gel, which would confirm knockout formation. In order to realize our aim, it was decided to knockdown using anti-miR (microRNA inhibitor), which we determined as an alternative method. Anti-miR182 inhibitor were transfected to MDA-MB-231 cells with lipofectamine RNAimax. It was shown that the miR-182 gene was knocked down by performing Real Time PCR with the cDNA synthesis. Apoptosis assay was performed by Annexin V. Analyzing the cells that were treated with anti-miR182 and cisplatin. Based on the data, 20.02% of the cells were in apoptosis and 20.10% were in late apoptosis. Analyzing the cells that were not treated with anti-miR182 and cisplatin. The data showed that 11.71% of cells were apoptosis and 18.37% of them are in late apoptosis. Then, cell cycle analysis studies were carried out by flow cytometry. Cells treated with miR-182 inhibitor and cisplatin had a 12.23% increase in G2 phase compared to MDA-MB-231 cells without cisplatin and anti-mir182 treatment. The results suggest that this link between cisplatin resistance and miR-182 in non-*Wwox*-expressing TNBC cells could be exploited in the development of a new gene therapy strategy for cisplatin resistance in breast cancer therapy.

Keywords: *Wwox*, miR-182, triple negative breast cancer, cisplatin resistance.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.2. Tümör Proliferasyonunu Regüle Eden Moleküler Yolaklar	6
2.2.1. Wnt/ β -Katenin Sinyali	6
2.2.2. Notch Sinyali	7
2.2.3. PI3K/Akt/mTOR Sinyali	8
2.2.4. NF- κ B Sinyali	9
2.2.5. Hedgehog (Hh) Sinyali	10
2.2.6. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) Sinyali	11
2.3. Kanser ve İmmün Sistem	12
2.4. Meme Kanseri	14
2.5. mikroRNA'lar ve Kanser İlişkisi	17

2.6. miRNA İfadesi Seviyelerini Etkileyen Durumlar	21
2.6.1. Epigenetik Mekanizmalar	21
2.6.2. Genetik Değişiklikler	22
2.6.3. miRNA Biyogenez Yolundaki Kusurlar	22
2.7. OnkomiR'ler	22
2.8. Meme Kanseri ile İlişkili Gen ve mirRNA'lar	26
2.9. miR-182 ve Kanser İlişkisi	29
2.10. miR-182 ve Meme Kanseri İlişkisi	29
2.11. Cisplatin	31
2.12. Wwox Geni ile Kanser İlişkisi	32
2.13. Wwox Geni ve Meme Kanseri	35
2.14. Gen Susturulması ve CRISPR	37
2.15. siRNA	42
2.16. miRNA Tedavileri	45
2.16.1. Replasman	46
2.16.2. miRNA İnhibitörleri	48
2.16.2.1. miRNA Antagonistleri (AntagomiRs)	50
2.16.2.2. miRNA Sponge	51
2.16.2.3. miRNA Maskeleye	52
2.16.2.4. Anti-miRNA Oligonükleotitleri (AMO'lar)	52
3. GEREÇ ve YÖNTEM	53
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	53

3.2. Rehber RNA Tasarımı ve px330 Cas9 Plazmidine Klonlanması	57
3.2.1. Oligonükleotitlerin 5' Ucunun Fosforlanması	60
3.2.2. Kesim ve Ligasyon	61
3.3. Bakteriyel Transformasyon	63
3.4. Luria Agar (LA) ve Luria Broth (LB) Hazırlanması	64
3.5. Gliserol Stok Hazırlanması	65
3.6. Plazmid DNA İzolasyonu	67
3.7. Plazmid DNA'lar PZR Reaksiyonu	68
3.8. PZR Pürifikasyonu	71
3.9. Agaroz Jel Elektroforezi	71
3.10. MDA-MB-231 Hücre Kültürü	75
3.11. Hücrelerin Pasajlanması	76
3.12. MDA-MB-231 Hücrelerinin Cas9 Plazmidini ile Transfeksiyonu	76
3.13. Tek Koloni Eldesi	78
3.14. Çoğaltılan Tek Kolonilerden DNA İzolasyonu ve PZR	87
3.15. miRNA İnhibitör/Transfeksiyon	95
3.16. RNA İzolasyonu	98
3.17. cDNA Sentezi	100
3.18. Gerçek Zamanlı PZR	101
3.19. Cisplatin Uygulaması	105
3.20. Anneksin V ile Hücreleri Boyama ve Akış Sitometrisi Analizi	105
3.21. Hücre Döngüsü Analizi	107

4. BULGULAR	109
4.1. Plazmid DNA'ların Agaroz Jel Görüntüsü	109
4.2. Plazmid DNA'ların Dizileme Sonuçları	112
4.3. Transfeksiyon, Koloni Seçimi ve Knockout Doğrulaması	114
4.4. Koloni DNA'ların PZR'si	116
4.5. Koloni Seçimi	116
4.6. Knockout Doğrulaması	118
4.7. miR-182 Knockdown Sonuçlarının Analizi	119
4.8. Akış Sitometrisi Analiz Sonuçları	124
4.9. Hücre Döngüsü Analizi	128
5. TARTIŞMA	131
KAYNAKLAR	144
ÖZGEÇMİŞ	159

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanserin ayırt edici özellikleri	5
Şekil 2.2. Wnt/ β -Katenin sinyalleşmesine genel bakış	6
Şekil 2.3. Notch sinyal yolu ve kanser metastazındaki rolleri	7
Şekil 2.4. PI3K/Akt/mTOR sinyal yoluna genel bakış	8
Şekil 2.5. NF- κ B sayısız uyarandan uyarıldığında yüzlerce geni transkripsiyonel olarak	9
Şekil 2.6. Hedgehog sinyal yolu	10
Şekil 2.7. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1 sinyal üretimi	11
Şekil 2.8. Tümör mikroçevresi	14
Şekil 2.9. Meme kanserinin moleküler alt tipleri	16
Şekil 2.10. miRNA biyogenez süreci	19
Şekil 2.11. miRNA biyogenez yolunun genellikle kanserde deregüle olan adımlarının şematik gösterimi	20
Şekil 2.12. miRNA biyogenez yolu ve kanserde onkomiR'leri inhibe etme yolları	24
Şekil 2.13. Kanserde onkogenik miRNA'lar	25
Şekil 2.14. Bir onkomiR, birçok geni hedef alarak düzenleyebilir, bir gen birçok onkomiR tarafından hedeflenebilir	26
Şekil 2.15. Meme kanserinde bağışıklık ve kemik metastazında rol oynayan miRNA'lar	27
Şekil 2.16. miRNA'ların kanserdeki rolü ve miRNA temelli tedavilere Yaklaşımlar	28
Şekil 2.17. miRNA biobelirteçleri ve meme kanserinde ayırt edici özellikleri	30
Şekil 2.18. Wwox'un ana antikanserojen moleküler fonksiyonları	34

Şekil 2.19. Wnt/ β -Katenin, TGF β 1, JAK2/STAT3, yollarının Wwox tarafından modülasyonu	34
Şekil 2.20. Meme kanserinde Wwox'un düzenleyici mekanizmaları	36
Şekil 2.21. Genom düzenlemede CRISPR/Cas9 sisteminin uygulanması	40
Şekil 2.22. Crispr/Cas9 tarafından oluşturulan DSB'lerin şematik gösterimi	41
Şekil 2.23. siRNA aracılı gen sessizleştirilmesi	43
Şekil 2.24. siRNA ve miRNA'nın RNAi mekanizması	44
Şekil 2.25. Kanser ilerlemesi ile ilişkili miRNA'ların kategorizasyonu	45
Şekil 2.26. miRNA biyogenezinin şematik diyagramı ve terapötik stratejileri	49
Şekil 2.27. Kanser tedavisinde çalışılan bazı miRNA'lar	50
Şekil 2.28. Kanser tedavisinde çalışılan bazı sponge miRNA'lar	51
Şekil 3.1. px330, bir insan kodonu optimize edilmiş SpCas9 ve kimerik rehber RNA ekspresyon plazmidi	58
Şekil 3.2. px330 BbSI enzim kesim bölgesi	61
Şekil 3.3. miR-182 gRNA1F ve gRNA1R oligodubleksleri ile yapılan transformasyonun 24 saatlik inkübasyon süresi görüntüsü	66
Şekil 3.4. miR-182 gRNA2F ve gRNA2R oligodubleksleri ile yapılan transformasyonun 24 saatlik inkübasyon sonrası görüntüsü	66
Şekil 3.5. miR-182 gRNA3F ve gRNA3R oligodubleksleri ile yapılan transformasyonun 24 saatlik inkübasyon sonrası görüntüsü	67
Şekil 3.6. Plazmid DNA'ların agaroj jelde yürütülmesi	72
Şekil 3.7. Dizilenen 500 bp'lik bölge	73
Şekil 3.8. px330 vektörüne ait klonlama hedef bölgesi	74
Şekil 3.9. MDA-MB-231 hücrelerinin 25'lik flask kültürü	75

Şekil 3.10. MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskop altında görünümü	75
Şekil 3.11. Transfeksiyon işleminin şematik gösterimi	77
Şekil 3.12. Hücre kültürü ve transfeksiyon aşamalarının şematik Gösterimi	77
Şekil 3.13. 96'lık plakalarda yapılan tek koloni elde etme çalışması	78
Şekil 3.14. Seri dilüsyon yöntem1; 96'lık plaka	79
Şekil 3.15. Seri dilüsyon yöntem2; 96'lık plaka	80
Şekil 3.16. Seri dilüsyon yapılan 96'lık plakaların inkübasyonu	80
Şekil 3.17. Seri dilüsyon MDA-MB-231 hücreleri; 10.gün	81
Şekil 3.18. Tek koloni elde aşamasında hücrelerin çoğaltılmasının şematik gösterimi	82
Şekil 3.19. Koloni 1C5 kültürde 6.gün	83
Şekil 3.20. Koloni 1D6 kültürde 10.gün	83
Şekil 3.21. Farklı noktalara düşen koloniler	84
Şekil 3.22. Koloni 3D5 kültürde 10.gün	84
Şekil 3.23. 96'lık plakanın kuyusunu kaplayan koloni	85
Şekil 3.24. 96'lık plakada çoğalan koloninin mikroskop altında Görünümü	85
Şekil 3.25. Koloni 3F3 kültürde 15.gün	86
Şekil 3.26. Farklı iki noktaya düşen hücrelerin kolonileşmesi	86
Şekil 3.27. Hücre kültüründe DNA izolasyonunun şematik gösterimi	87
Şekil 3.28. Gen knockout'un doğrulanması için kurulan PZR	89
Şekil 3.29. Koloni P3A8 kültürde 6.gün	90
Şekil 3.30. Koloni P2C7 kültürde 10.gün	91

Şekil 3.31. Koloni P1A10 kültürde 20.gün	91
Şekil 3.32. Farklı noktalara dağılan kolonilerin kültürdeki görüntüsü	92
Şekil 3.33. Tek koloni elde etme aşamasında kültür edilen hücreler	93
Şekil 3.34. Elde edilen kolonilerin 25'lik flaska pasajlanmış hali	93
Şekil 3.35. Elde edilen kolonilerin mikroskop altında görüntüsü	94
Şekil 3.36. 96'lık plakada çoğalan kolonilerin 25'lik flaskta inkübe edilmesi	94
Şekil 3.37. hsa-miR-182 inhibitörü ile MDA-MB-231 hücrelerinin transfeksiyonu	95
Şekil 3.38. hsa-miR-182 inhibitörü	96
Şekil 3.39. Transfeksiyon öncesi MDA-MB-231 hücre hattı	96
Şekil 3.40. 6'lık plakaya transfeksiyon öncesi ekimi yapılan MDA-MB-231 hücreleri	97
Şekil 3.41. Transfeksiyondan 24 saat sonra MDA-MB-231 hücre hattı	97
Şekil 3.42. Knockdown yapılan hücrelere ait RNA ölçümü	99
Şekil 3.43. Non-target RNA ölçümü	99
Şekil 3.44. Kontrol RNA ölçümü	100
Şekil 3.45. ROCHE, LightCycler 2.0 cihazı	104
Şekil 3.46. miR-182 ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile gösterimi	104
Şekil 3.47. Akış sitometrisi ile analiz edilen örneklerin hazırlanması	106
Şekil 3.48. Hücre döngüsü analizi için kullanılan CyFlow cihazı	108
Şekil 3.49. Hücre döngüsü analizi çalışması	108
Şekil 4.1. Plazmid DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü	109
Şekil 4.2. S1K1 kolonisi konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu	110

Şekil 4.3. S1K2 kolonisi konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu	110
Şekil 4.4. S1K3 kolonisi konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu	110
Şekil 4.5. S2K1 kolonisi konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu	111
Şekil 4.6. S2K2 kolonisi konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu	111
Şekil 4.7. S2K3 kolonisi konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu	111
Şekil 4.8. S3K1, S3K2, S3K3 kolonilerinin dizileme sonuçları	112
Şekil 4.9. S1K3 kolonilerinin dizileme sonuçları	112
Şekil 4.10. S1K2 kolonilerinin dizileme sonuçları	113
Şekil 4.11. S2K1, S2K2, S2K3 kolonilerinin dizileme sonuçları	113
Şekil 4.12. S1K1 kolonisi dizileme sonucu	113
Şekil 4.13. 2E6 koloni DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları	114
Şekil 4.14. 2D7 koloni DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları	114
Şekil 4.15. 2C7 koloni DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları	115
Şekil 4.16. 1G3 koloni DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları	115
Şekil 4.17. 1E8 koloni DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları	115
Şekil 4.18. Knockout uygulanan örneklerin jel görüntüsü	116
Şekil 4.19. P1A10 DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu	117
Şekil 4.20. P1E3 DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu	117
Şekil 4.21. P1E5 DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu	117
Şekil 4.22. P1F4 DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu	118
Şekil 4.23. Knockout kolonilerin agaroz jel sonuçları	118
Şekil 4.24. Knockout kolonilerin agaroz jel görüntüleri	119
Şekil 4.25. Non-target C _T sonucu	119
Şekil 4.26. Non-target referans gen (U6) C _T sonucu	120

Şekil 4.27. Kontrol C _T sonucu	120
Şekil 4.28. Kontrol referans gen (U6) C _T sonucu	121
Şekil 4.29. Knockdown (antimiR-182) C _T sonucu	121
Şekil 4.30. Knockdown referans gen (U6) (antimiR-182) C _T sonucu	122
Şekil 4.31. miR-182'nin C _T verilerine göre gen ifadesinin gösterimi	122
Şekil 4.32. antimiR-182 uygulanan MDA-MB-231 hücreleri	125
Şekil 4.33. antimiR-182 ve cisplatin uygulanan MDA-MB-231 hücreleri	126
Şekil 4.34. cisplatin uygulanan MDA-MB-231 hücreleri	127
Şekil 4.35. MDA-MB-231 hücreleri	128
Şekil 4.36. antimiR-182 ve cisplatin uygulanan hücrelerin hücre döngüsü analizi	129
Şekil 4.37. cisplatin uygulanan hücrelerin hücre döngüsü analizi	129
Şekil 4.38. antimiR-182 uygulanan hücrelerin hücre döngüsü analizi	130
Şekil 4.39. MDA-MB-231 hücreleri hücre döngüsü analizi	130

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. miRNA mimiklerinin kullanımı ve bu mimiklerin kanser gelişimine etkilerini içeren çalışmalar	47
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar	53
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar	55
Tablo 3.3. miR-182 knockout için tasarlanan gRNA'lar	59
Tablo 3.4. gRNA'ların sulandırma miktarları	59
Tablo 3.5. Oligonükleotitlerin fosforlama reaksiyon koşulları	60
Tablo 3.6. Fosforlama ve oligodubleks oluşumu için PZR reaksiyon koşulları	61
Tablo 3.7. Kesim ve ligasyon reaksiyon koşulları	62
Tablo 3.8. Kesim ve ligasyon PZR koşulları	62
Tablo 3.9. Luria Broth içerik	64
Tablo 3.10. Luria Agar içerik	65
Tablo 3.11. Plazmidlerin konsantrasyon ve saflık ölçümü	69
Tablo 3.12. Plazmid DNA PZR reaksiyonu	70
Tablo 3.13. Plazmid DNA PZR reaksiyonu koşulları	70
Tablo 3.14. 10X TBE hazırlanışı	72
Tablo 3.15. Dizi primerleri ve dizileri	74
Tablo 3.16. İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflık ölçümü	88
Tablo 3.17. Gen knockout doğrulaması için yapılan PZR'de kullanılan primerler	89
Tablo 3.18. cDNA PZR reaksiyonu	101

Tablo 3.19. cDNA PZR reaksiyonu koşulları	101
Tablo 3.20. Gerçek Zamanlı PZR reaksiyon karışımının içeriği	102
Tablo 3.21. Referans gen Gerçek Zamanlı PZR reaksiyon karışımının içeriği	102
Tablo 3.22. Gerçek Zamanlı PZR koşulları	103
Tablo 3.23. Gerçek Zamanlı PZR’de kullanılan primerler ve dizileri	103
Tablo 3.24. Akış sitometrisi ile analiz edilen örnekler	106
Tablo 4.1. Relatif ifade analizi için antimiR-182 ve non-target C _T verilerinin analizi	123
Tablo 4.2. Relatif ifade analizi için kontrol ve non-target C _T verilerinin analizi	123

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMO: Anti-miRNA oligonükleotitleri

Anti-miR: miRNA inhibitör

ATP: Adenozin trifosfat

Bp: baz çifti

BL1: Bazal-benzeri üçlü negatif meme kanseri alt tip1

BL2: Bazal-benzeri üçlü negatif meme kanseri alt tip2

Cas9: Crispr ilişkili protein 9

cDNA: Komplementer DNA

CpG: Sitozin-Guanin adası

CO₂: Karbondioksit

CSC: Kanser kök hücreleri

CRISPR: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri

C_T: Döngü eşiği

CTL : Sitotoksik T lenfosit

Cisplatin: cis-diamindikloroplatin (II)

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

dNTP Mix: Deoksi-Nükleotit trifosfat

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

DSB: Çift Zincir Kırığı

DTT: Ditiyotreitol

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

FBS: Fetal Sığır Serumumu

gRNA: Rehber RNA

Hh: Hedgehog

IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IL: İnterlökin

JAK: Janus kinaz

KASPAZ: Apoptosis Related Cysteine Peptidase

Kb: kilo baz

kDa: Kilodalton

LA: Luria Agar

LB: Luria Broth

LOH: Heterozigotluk kaybı

LAR: Lüminal androjen reseptör üçlü negatif meme kanseri alt tipi

MCF-7: İnsan meme kanseri hücre hattı

MDA-MB-231: İnsan meme kanseri hücre hattı

MiRNA: MikroRNA

ml: Mililitre

Mtor: Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase

NF- κ B: Nükleer faktör Kb

NHEJ: Homolog olmayan uç birleştirme

P53: Tümör baskılayıcı protein

PI: Propidyum iyodür

PI3K: Phosphoinositide 3-kinases

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RPM: Dakikadaki devir sayısı

SDR: Kısa zincirli dehidrogenaz/redüktaz

SPSS: Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı

STAT: Transkripsiyon proteinlerinin sinyal dönüştürücü ve aktivatörü

TBE: Tris Borat EDTA

TNBC: Üçlü negatif meme kanseri

Wwox: WW alanı içeren oksidoredüktaz

μ l: Mikrolitre

$^{\circ}$ C: Santigrat Derece

1. GİRİŞ

Meme kanseri en sık görülen kanser çeşididir ve dünya çapında kadınlar arasında önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. İstatistikler, her yıl 1,15 milyondan fazla kadına meme kanseri teşhisi konduğunu ve bunun da >502.000 ölümlerle sonuçlandığını göstermektedir (Khamisipour ve diğ. 2018).

WW alanı içeren oksidoredüktaz geni (WFOX) insan kanserlerinde sıklıkla değişen FRA16D kromozomal bölgedeki lokalizasyonu nedeniyle kanserdeki rolünü belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Tüm bu çalışmalar, WFOX'un çok sayıda molekül ile etkileşime girme yeteneğinden dolayı, tümör baskılayıcı aktivitesini, çoğunlukla hücreye özgü çok çeşitli moleküler eylemler yoluyla uyguladığını göstermektedir. İnsan tümörlerinde, WFOX ifadesinin çeşitli kanser türlerinde azaldığı veya kaybolduğu gösterilmiştir. Bu düşük ifadenin meme, ovaryum, mesane, karaciğer ve böbrek kanserlerinde kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Taouis ve diğ. 2021).

MikroRNA'lar (miRNA'lar), hedef mRNA'ların 3' UTR bölgesine bağlanarak ve translasyonu inhibe ederek veya bozulmalarını teşvik ederek genlerin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde yer alan küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfıdır. miRNA'lar, gelişim, farklılaşma, büyüme, metabolizma, hücre sinyali ve stres yanıtı dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte yer alırlar. Çalışmalar, düzensiz miRNA ifadesinin kanserin başlaması ve ilerlemesinde rol oynadığını ve miRNA'ların hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez, EMT ve tümör metastazı gibi temel onkojenik özellikleri düzenlediğini göstermektedir. miRNA'ların işlevleri karmaşıktır ve oluşumunu destekleyen veya tümör oluşumunu engelleyen aktivitelere sahiptirler (Cagle ve diğ. 2021).

miRNA'lar, doğrudan veya dolaylı olarak anjiyogenik sinyal yollarında yer alan hedef genlerin ifadesini baskılayarak onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak işlev görürler. Tümör gelişimi ve metastaz anjiyogeneze bağlıdır ve kanser hastalarının kötü prognozunun ana nedenidir (Hussen ve diğ. 2022).

mRNA'nın düzenleyicisi olarak miRNA'nın kendisi diğer düzenleyiciler tarafından düzenlenebilir. miRNA inhibitörü en önemlilerinden biridir. miRNA inhibitörleri, miRNA'ları sekestre eden ve onkojenik etkilerini azaltan veya hatta ortadan kaldıran doğal veya yapay RNA transkriptleridir. Yapay miRNA inhibitörleri, olgun miRNA'ları bağlayan ve bloke eden eksojen RNA dizileridir. Bugüne kadar, laboratuvarda anti-miRNA oligonükleotidleri (AMO) ve miRNA süngerleri dahil olmak üzere iki yapay miRNA inhibitörü kategorisi yaygın olarak kullanılmaktadır (Tang ve diğ. 2017).

Cisplatin, cis-diamindikloroplatin (II), antiproliferatif özelliklere sahip olan ve birçok hücre tipinde apoptozu indükleyen organometalik bir bileşiktir. 1978'de ilk platin bazlı antikanser ilacı olarak onaylandı ve bu, diğer platin (II) ve metal içeren antikanser ilaçların keşfedilmesine yol açtı. Cisplatinin çeşitli insan kanserlerine karşı etkili olduğu klinik olarak kanıtlanmıştır ve akciğer kanseri, ovaryum kanseri, meme kanseri, mesane, yemek borusu ve baş boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Velma ve diğ. 2016).

ER, PR ve HER2 ifadesi olmayan meme kanserlerine üçlü negatif meme kanserleri (TNBC'ler) denir. Anti-hormonal veya anti-HER2 tedavilerinden fayda görmezler ve invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'sini oluştururlar. Bu hasta grubu için kemoterapi dışında tedavinin etkili olduğu kanıtlanmamıştır. Genotoksik kemoterapötik ajanlar arasında, cisplatin gibi platin bazlı kemoterapötikler, TNBC hastaları için potansiyel tedavi seçenekleridir ve ağırlıklı olarak, altta yatan BRCA1/2 mutasyonları olan TNBC'lerde olumlu tepkiler göstermiştir fakat cisplatine karşı oluşan ilaç hassasiyetindeki farklılıklar ilacın etkin kullanılması önündeki engeldir (Hejjink ve diğ. 2019).

MicroRNA-182'nin (miR-182) birçok kanserde onkojenik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. TNBC dokularında ve hücre hatlarında miR-182'nin önemli ölçüde ifadesinin arttığı gösterilmiştir. miR-182'nin FOXF2'yi hedefleyerek TNBC'nin başlatılmasında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir (Zhang ve diğ. 2017).

Tüm bu veriler bir araya getirildiğinde miR-182'nin, TNBC hastalarında cisplatin direncinin azaltılması veya ortadan kaldırılması için bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir. Bu tezin amacı da WWOX ifade etmeyen TNBC hücrelerinde cisplatin direncinin miR-182 ile ilişkisini araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

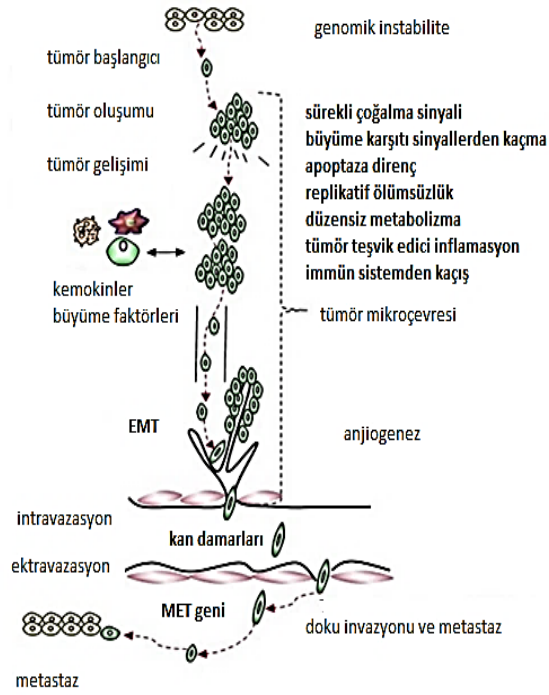
2.1. Kanser

Dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olan kanser, 2020'de dünya genelinde yaklaşık 10 milyon ölümlle ikinci önde gelen ölüm nedeni olmuştur (Wu and diğ. 2021). Her ne kadar cerrahi, kemoterapi, radyasyon tedavisi, hedefe yönelik biyolojik tedavi ve yeni entegre kombinasyon tedavisi dahil olmak üzere kanser tedavisi alanında çok sayıda başarı elde edilmiş olsa da; yüksek nüks olasılığı, kemo-/radyasyon direnci, zararlı yan etkiler ve toksisite yaşam kalitesinin sağlanmasının önündeki engellerdir. Bu nedenle, kanser tedavisi için daha fazla teknik ilerleme ve yeni terapötik yaklaşımlara ihtiyaç vardır (Yang ve diğ. 2017).

Kanser, genetik ve çevresel faktörlerden ve bu faktörlerin etkileşimlerini içeren karmaşık bir etiolojiden kaynaklanır (Mctiernan ve Friedenreich 2019).

Kanser, tümör hücrelerinin vücutta yayılmasıyla belirgin bir şekilde karakterize edilir. Birincil bir bölgeden tümör hücrelerinin vücudun diğer bölgelerine yayılma ve göç etme sürecine metastaz denir. Metastaz, kanser hücrelerinin kök aldığı bölgeden vücudun ikincil bölgelerine; genellikle kan dolaşımı veya lenfatik sistem yoluyla yayılma sürecidir. Metastaz, kanser ölümlerinin başlıca nedenidir ve kanser ölümlerinin %90'ından fazlasından sorumludur (Jiramongkol ve Lam 2020). Metastatik geçişin altında yatan biyolojik mekanizmalar hakkında artan bilgi, yeni terapötik hedeflerin keşfedilmesini ve metastaz riskini azaltmak için metastaz ve/veya birincil tümör üzerinde etkili olan daha etkili tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlar. Birincil tümör tarafından sentezlenen moleküller, belirli metastatik bölgelerin hazırlanmasında rol oynar. Bu kritik bir aşamadır, çünkü ikincil hücrelerin birincil tümör hücrelerini çağıran molekülleri ifade ettiği ve ayrıca onları göç lehine bir fenotip ifade etmeye teşvik ettiği uygun bir mikroçevresinde olduğu aşamadır. İmmün gözetim oldukça etkili olmasına rağmen, birincil ve metastaz yapan tümör hücreleri bu kontrolü ortadan kaldıran stratejiler geliştirir (Gomasca ve diğ. 2020). Kanserin sağlıklı hücrelere göre belirli ayırt edici özellikleri arasında Şekil 2.1.'de de yer alan genomik kararsızlık, sürekli çoğalma sinyalleşmesi, anti-büyüme sinyallerinden kaçma, apoptoza direnç, replikatif ölümsüzlük, tümör

mikroçevresinde kendi kendini güçlendiren düzensiz metabolizma, tümöre teşvik eden enflamasyon, immün sisteminden kaçma, anjiyogenez, doku invazyonu ve metastaz yer alır.

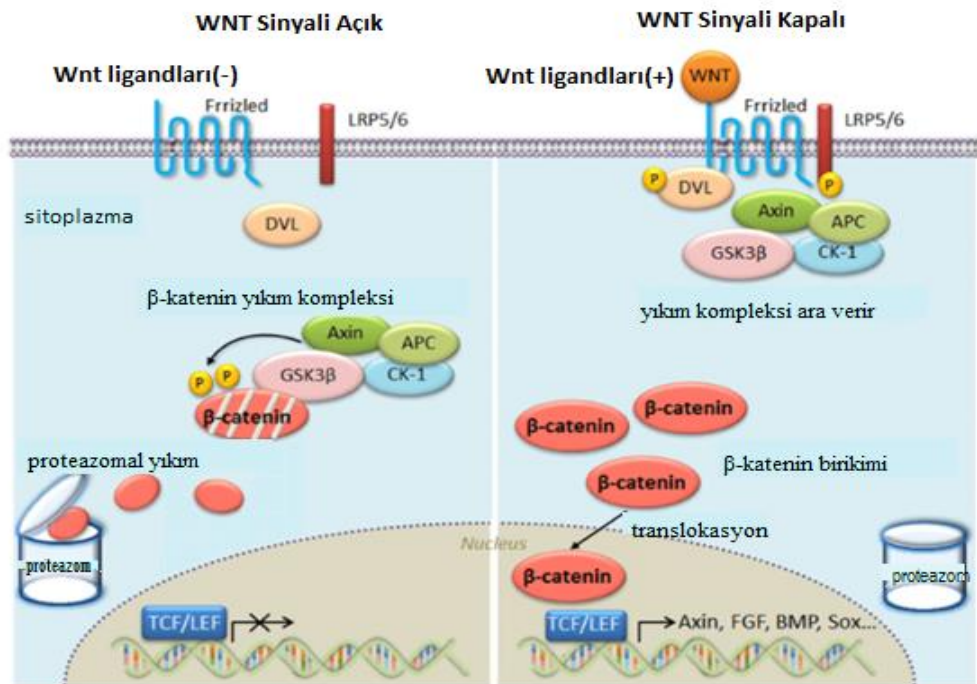


Şekil 2.1. Kanserın ayırt edici özellikleri. Block ve diğ. (2015)'nden alınmıştır.

2.2. Tümör Proliferasyonunu Regüle Eden Moleküler Yolaklar

2.2.1. Wnt/ β -Katenin Sinyali

Wnt/ β -katenin sinyali, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, göçünü, polaritesini ve asimetrik hücre bölünmesini düzenleyen gelişimsel bir sinyal yoludur. Embriyonik kök hücrelerde kritik roller oynar ve somatik hücrelerin uyarılmış pluripotent kök hücrelere yeniden programlanmasını sağlar. Anormal Wnt/ β -katenin sinyali, çok sayıda kanserde rol oynar. Bu sinyallerin çoğu, genellikle tümör agresifliği ile ilişkilendirilen β -katenin stabilizasyonu ile ilişkili mutasyonlardır. Şekil 2.2.'de yer alan anormal Wnt sinyali ise, ya Frizzled gibi Wnt sinyalleşme yolunun negatif düzenleyicilerinin inaktivasyonundan ya da pozitif düzenleyicilerinin yüksek ifadesinden kaynaklanır (Feitelson ve diğ. 2015).

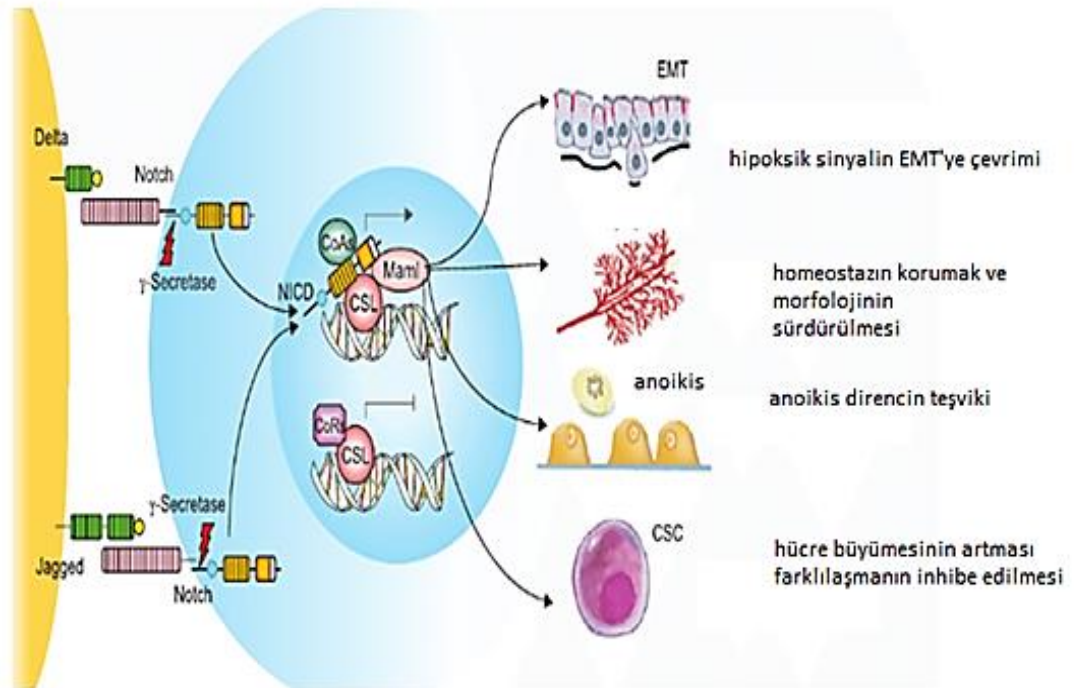


Şekil 2.2. WNT/ β -katenin sinyalleşmesine genel bir bakış: WNT sinyali olmayınca ("WNT OFF"), yıkım kompleksi sitozolik β -katenin'i fosforile eder ve fosforile edilmiş β -katenin, proteazomlar tarafından tanınarak degrade olur. WNT sinyali oluştuğunda ise ("WNT ON"), yıkım kompleksinin sitozolik β -katenin fosforile etmek için işlevi engellenir. Fosforile olmayan β -katenin sitozolde birikir, çekirdeğe geçerek transkripsiyon faktörleri olan T hücre faktörü ve lenfoid

güçlendirici faktör-1 (TCF/LEF1) ailesi gibi WNT hedef gen ifadesini aktive eder (Ota ve diğ. 2016).

2.2.2. Notch Sinyali

Notch, Şekil 2.3.'de de gösterildiği üzere zara bağlı ligandlar (JAG1, JAG2, delta benzeri 1-4) için memeli transmembran reseptörleri (Notch 1-4) ailesindedir. Bağlanma ile birlikte Notch reseptörleri yıkıma uğrar ve çekirdeğe göç eden ayrıca siklin D, p21CIP1, NF- κ B, c-myc gibi genleri hedef alan Notch hücre içi domainini serbest bırakır. Notch proteinleri anjiyogenez, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoza katkıda bulunur. Notch sinyali ayrıca embriyonik gelişimde hücre kaderine, yetişkin dokularda doku homeostazına da katkıda bulunur. Kök hücre farklılaşmasını düzenler (Feitelson ve diğ. 2015).

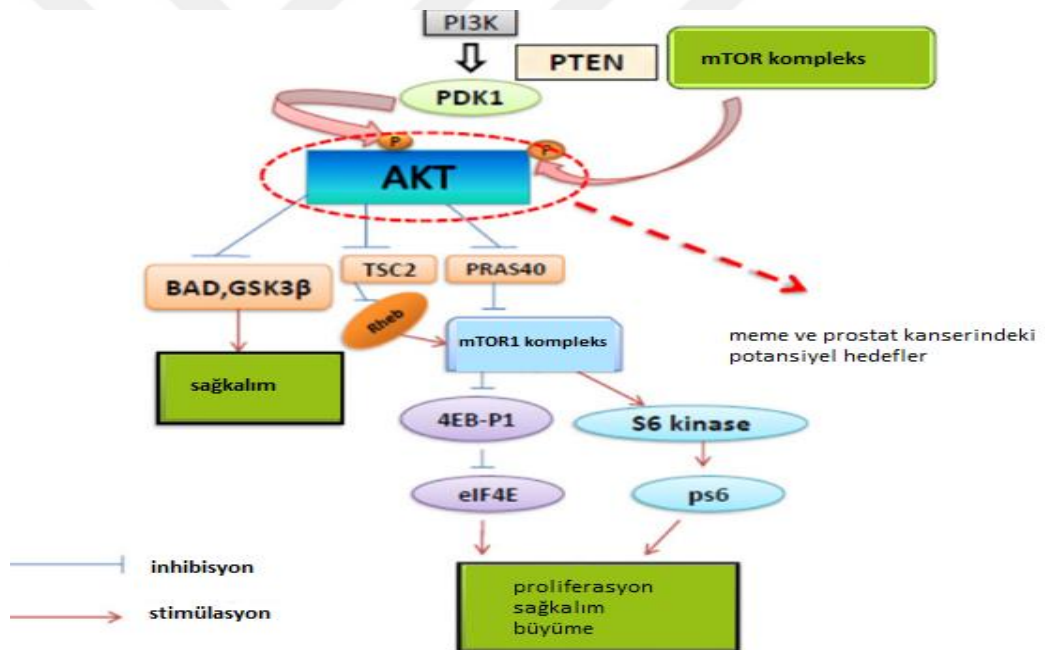


Şekil 2.3. Notch sinyal yolu ve kanser metastazındaki rolleri: Notch reseptörleri, bitişik hücrelerde eksprese edilen Delta benzeri ve Jagged ligand aileleri tarafından aktive edilir. γ -sekretaz aracılı proteoliz üzerine, NICD proteinleri çekirdeğe geçer ve koruyucuların (CoR'ler) yerini alarak DNA bağlayıcı protein CSL'ye bağlanır. NICD, DNA bağlayıcı protein CSL ve koaktivatörler (CoAs) ile bir kompleks oluşturarak Notch hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açar. Tümör

mikro-ortamında Notch sinyalinin aktivasyonu, epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT), tümör hücrelerinin anoikis direncini destekler (Eskander ve Tawani 2014).

2.2.3.PI3K/Akt/mTOR Sinyali

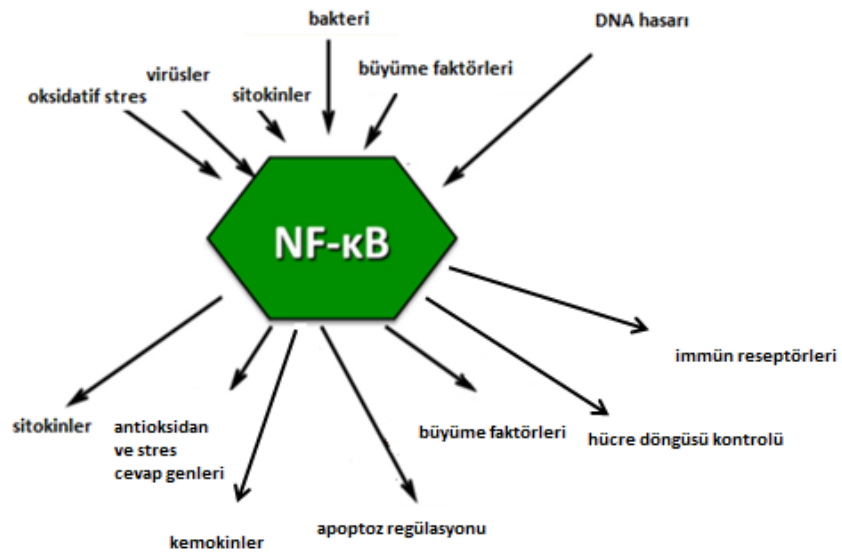
PI3K/Akt/mTOR yolu, Şekil 2.4.'de de gösterildiği üzere tümör hücresinde büyüme, çoğalma, hareketlilik, hayatta kalma ve anjiyogenezde merkezi bir rol oynar. mTOR, birçok kanser türünde PI3K/Akt'ın aşağı akış hedefi olan bir ser/thr kinazdır. Mutasyonlar veya gen amplifikasyonu ile mTOR'un anormal aktivasyonu, kanser hücresi proliferasyonunu, epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) ve antikanser ilaçlara karşı dirence neden olur. mTOR inhibisyonu kolorektal kanserde EMT ve kanser kök hücresi benzeri özellikleri de baskılar (Feitelson ve diğ. 2015).



Şekil 2.4. PI3K/AKT/mTOR sinyal yoluna genel bakış: AKT; PDK1 tarafından fosforilasyon yoluyla PI3K yolu aktive edilir. AKT aktivasyonu, protein sentezi, hücre proliferasyonu, büyümesi ve hayatta kalma dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri kontrol etmek için BAD, GSK3β, TSC2 ve PRAS40 gibi efektörlerini düzenler (Basnet ve diğ. 2020).

2.2.4.NF-kB Sinyali

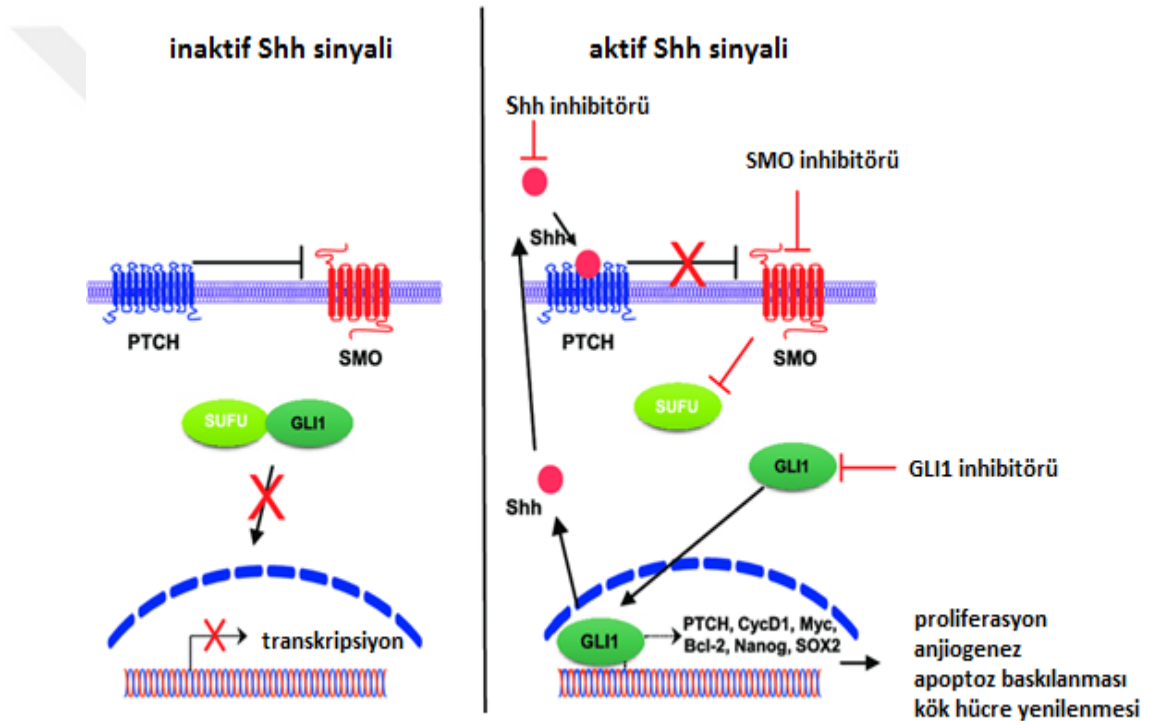
NF-kB transkripsiyon faktörleri, doğal ve adaptif bağışıklık, hücre proliferasyonu ve sağkalımı, lenfoid organ gelişimi için gerekli anahtar genlerin ifadesini düzenler. NF-kB; IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinler, epidermal büyüme faktörü (EGF), T- ve B-hücresi mitojenleri, bakteriler, lipopolisakkaritler, virüsler, viral proteinler, çift sarmallı RNA, fiziksel ve kimyasal stresörler gibi bir çok farklı uyarandan farklı kanser türlerinde aktive olur. Bu olaylar inflamasyon ve karsinogenez arasındaki bağlantıyı destekler. Bu nedenle, NF-kB, karsinogenezde önemli bir terapötik hedefdir. NF-KB Şekil 2.5.'de gösterildiği üzere pek çok uyarandan uyarılabilir ve yüzlerce geni transkripsiyonel olarak düzenleyebilir. (Feitelson ve diğ. 2015).



Şekil 2.5. NF-KB, sayısız uyarandan uyarıldığında yüzlerce geni transkripsiyonel olarak düzenler. Khan ve diğ. (2020)'nden alınmıştır.

2.2.5.Hedgehog (Hh) Sinyali

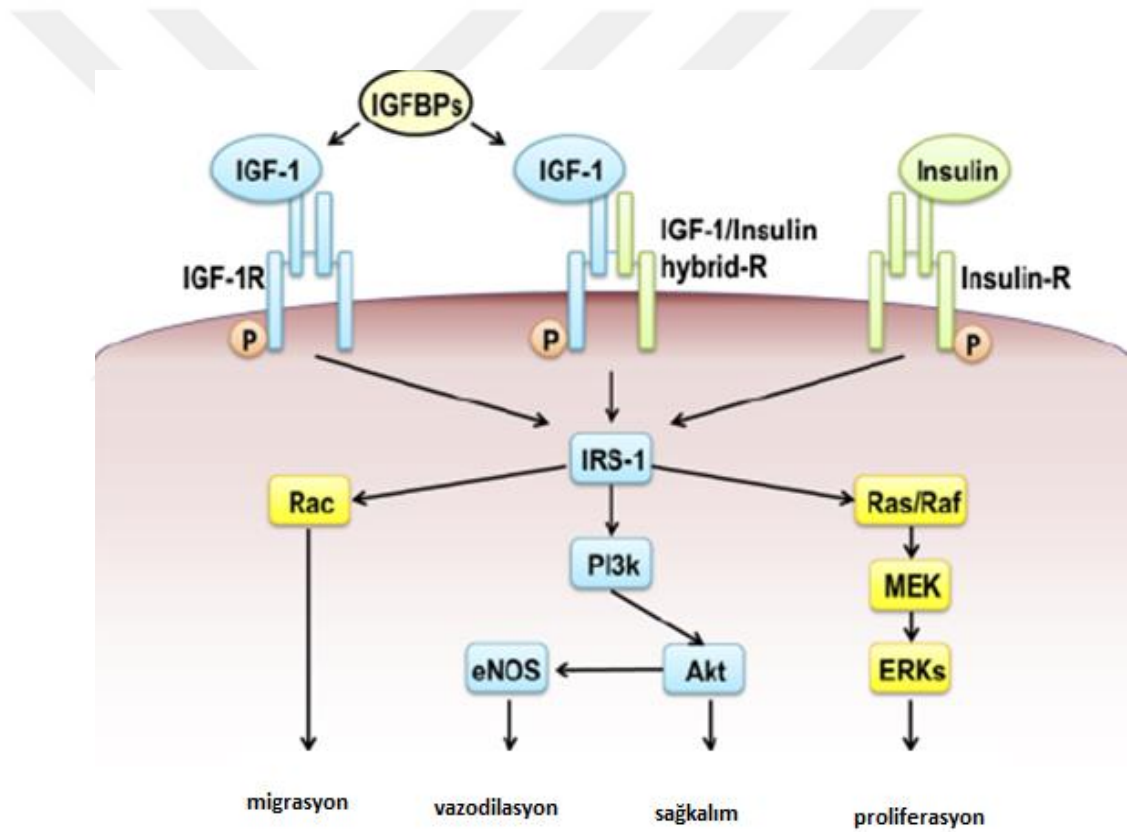
Hh sinyali, çeşitli dokularda doku polaritesini, yapısını ve kök hücre devamlılığının sağlanmasını kontrol eder. Omurgalılarda, üç Hh ligandı [Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog ve Indian Hedgehog] transmembran reseptörlerine [Patched (Ptch1 veya Ptch2)] bağlanır. Ligand bağlanması üzerine, Ptch içeren kompleks ve inhibitörü olan Smoothened (Smo) ayrılır. Şekil 2.6.'da yer alan Smo, çekirdeğe geçen ve kök hücrelerin özelliklerini regüle eden hedef genlerin transkripsiyonunu başlatan Gli transkripsiyon faktörünü aktive eder (Feitelson ve diğ. 2015).



Şekil 2.6. Hedgehog Sinyal Yolu: İnaktive edilmiş sinyalleşme (solda), Shh ligandlarının yokluğunda meydana gelir. PTCH; SMO'yu inhibe ederek SuFu tarafından sitoplazmada GLI1 ayrılmasını engeller. Shh (sağda) varlığında, SMO'nun PTCH baskılaması ortadan kalkar. SMO aktif olur. GLI1; SUFU'dan ayrılarak hücre nükleusuna bağlanır ve tümör hücrelerinde çeşitli onkojenik özellikleri destekleyen hedef genlerin aktivasyonuna neden olur. Lee ve diğ. (2017)'nden alınmıştır.

2.2.6.İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) Sinyali

IGF-1 reseptör/ligand sistemi, hematopoietik ve embriyonik kök hücrelerde kendini yenilemesi ile ilişkilidir. Bu sinyal, Şekil 2.7.'de de yer aldığı gibi PI3K/Akt ve Ras/Raf/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazın aktivasyonu ile hücre büyümesini ve hayatta kalmasını destekler. Nanog (Homeobox proteini)'un hepatoselüler karsinomda IGF-1 sinyallemesi yoluyla kanser kök hücrelerinin kendi kendini yenilemesini sürdürmede çok önemli bir rolü olduğu gösterildi. IGF-1 sinyali ayrıca Notch, EGFR, leptin gibi diğer yollarla çapraz iletişim kurar ve yetişkin kök hücrelerinin kanser kök hücrelerine geçişini destekler (Feitelson ve diğ. 2015).



Şekil 2.7. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1 sinyal iletimi: IGF-1; IGF-1R ve IGF-1/İnsülin hibrit reseptörüne bağlanırken, insülin sadece insülin reseptörüne (İnsülin-R) bağlanır ve birkaç sinyal yolunu tetikler. IGF bağlayıcı proteinler (IGFBPs), IGF-1'in reseptörlere bağlanmasını değiştirerek IGF-1 sinyalini modüle eder. IGF-1R, otofosforilasyona uğrayan ve insülin reseptör substratı (IRS) ailesinin

üyeleri de dahil olmak üzere birçok hücrenel proteinin fosforilasyonunu katalize eden bir tirozin kinazdır. Fosforilasyonda IRS'ler; Akt, Ras/Raf ve Rac dahil olmak üzere sinyal molekülleri ile etkileşime girer. Fosfoinositid 3-kinaz ve Akt yolunun aktivasyonu, hücrenin hayatta kalmasını destekler ve endotelial nitrik oksit sentaz aktivitesini artırır, böylece vazodilatasyonu indükler. Ras/Raf yolu, çoğalma tepkileri için kritiktir. Rac'ın aktivasyonu ise hücre göçü için önemlidir. Higashi ve diğ. (2012)'nden alınmıştır.

2.3.Kanser ve İmmün Sistem

Meme kanseri, epitel hücrelerinde mutasyonların birikmesiyle ortaya çıkar ve karmaşık genomik ve biyolojik heterojeniteye sahip tümörlerle sonuçlanır (Dekkers ve diğ. 2019).

Tümör mikroçevresi; kanser hücreleri, stromal hücreler (fibroblastlar, mezenkimal kök hücreler, makrofajlar gibi), endotelial hücreler, immün hücreler, ayrıca, hücre dışı matriks ve çeşitli çözünür faktörler (sitokinler, kemokinler, metabolitler gibi) dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinden oluşan bir "ekosistemi" temsil eder. Tüm bu bileşenler dinamik ve karşılıklı etkileşim içindedir. Pozitif ve negatif sinyaller arasındaki denge, her hücre tipinin hem fenotipini hem de fonksiyonunu modüle eder. Ayrıca kanser hücresi proliferasyonu ve metastatik potansiyelinin kontrolüne veya kaçışına katkıda bulunur (Baxevanis ve diğ. 2021).

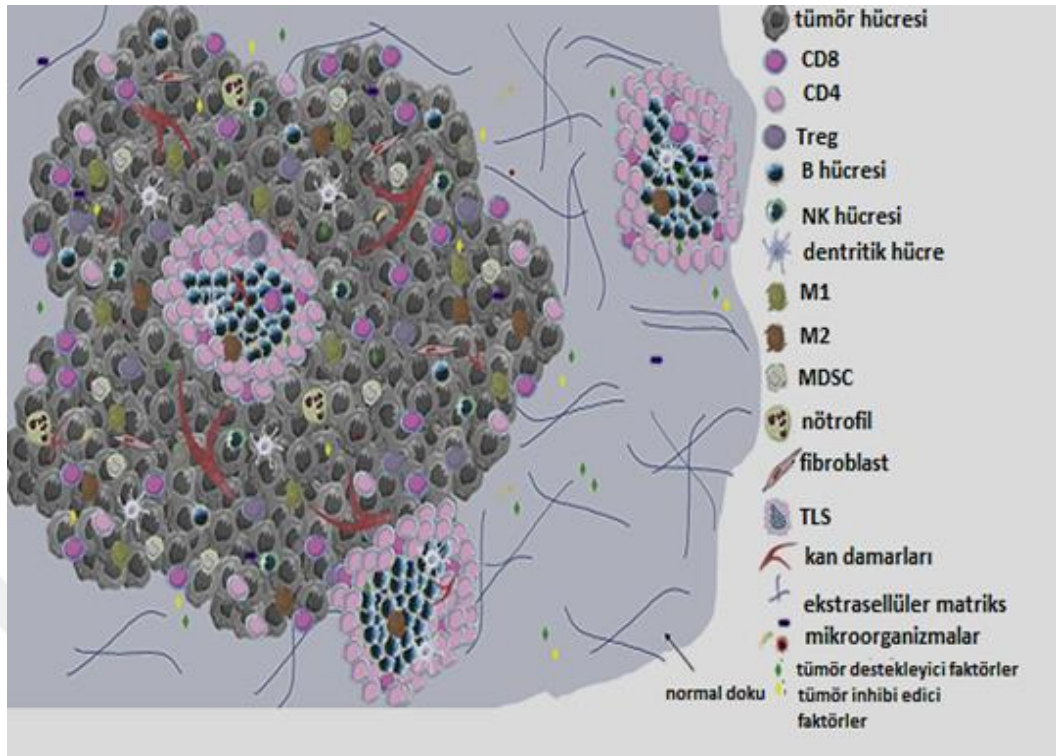
Kanser ve immün sistem arasındaki etkileşim, immün düzenleme adı altında özetlenmiştir. İmmün düzenleme süreci eleme, denge ve kaçış olmak üzere üç aşamadan oluşur. Eliminasyon ve denge, immün sistemin tümör büyümesini yok etme veya kontrol etme kapasitesine sahip olduğu aşamalardır. Öte yandan, tümör hücrelerinin immün yıkımdan kaçtığı kaçış fazı, tümör ilerlemesi ve metastazındaki rolü nedeniyle kanserin ayırt edici özelliği olarak kabul edilmiştir. Bu aşamada neoplastik hücreler; otonom modifikasyonlar nedeniyle, immün algılama ve yıkımdan kaçmanın yanı sıra efektör hücrelerin işlevini değiştiren bir immünosupresif mikroçevreyi indükler (Gomrasa ve diğ. 2020).

Tümör bölgelerinde artan sitotoksik T lenfosit (CTL) yoğunlukları mevcuttur ve tümörlerin CTL ile infiltrasyonunun, diğer prognostik klinikopatolojik

parametrelerden bağımsız olarak meme kanserinde oldukça uzun genel sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. CD4+ T lenfositlerinin prognostik rolü, CD8+'e kıyasla daha az değerlidir çünkü bu alt popülasyon, zıt işlevlere sahip Th1, Th2, Th17 ve FoxP3+ Treg olmak üzere en az dört farklı soydan oluşur. Th17 immün tepkisi gen kümesinin yüksek ifadesine sahip hastalar olumsuz bir prognoza sahipken, Th1 küme genlerinin yüksek ifadesine sahip hastalarda sağkalım artmıştır. Genel olarak, sağlıklı donörlere karşı kanser hastalarında Th1 hücrelerinin yoğunlukları azalırken Th2 hücrelerinin yoğunlukları artar. Th2 CD4+ T hücrelerinin meme kanseri gelişimini destekleyen tip II tümör mikroçevresine katkıda bulunduğunu gösteren veriler vardır (Baxevanis ve diğ. 2021). Tümör mikroçevresinin şematik gösterimi Şekil 2.8.'de yer almaktadır.

Fonksiyonel olarak doğal öldürücü hücreler (NK), tümör hücrelerinin hücre aracılı öldürülmesine doğrudan katılanlar ve inflamatuvar sitokinler salgılayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Doğal öldürücü hücreler dolaşımdaki tümör hücrelerini öldürmede oldukça etkilidir ve metastazı engelleyebilirler, ancak tümör mikroçevresi içinde tümör hücrelerini öldürme etkileri azdır (Anderson and diğ. 2020).

Dolaşımdaki monositlerden köken alan makrofajlar; tümör mikroçevresi için önemli bir immün hücresi türüdür. Genellikle proinflamatuvar polarizasyon (M1-polarize) ve anti-inflamatuvar polarizasyon (M2-polarize) olarak ikiye ayrılırlar. M1-polarize makrofajları; konak savunması ve tümör hücresi öldürme için çok önemli olan proinflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen/azot türleri üretir, bu nedenle 'iyi' makrofajlar olarak kabul edilir. Buna karşılık, M2-polarize makrofajlar sadece anti-inflamatuvar sitokinler üretilip tümör hücrelerine karşı immün gözetimi baskılamakla kalmaz, aynı zamanda tümör progresyonunu ve metastazı teşvik etmek için anjiyogenez ve matriks yeniden şekillenmesini teşvik eder (Lei and diğ. 2020)



Şekil 2.8. Tumor mikroçevresi. Baxevanis ve diğ. (2021)'nden alınmıştır.

2.4.Meme Kanseri

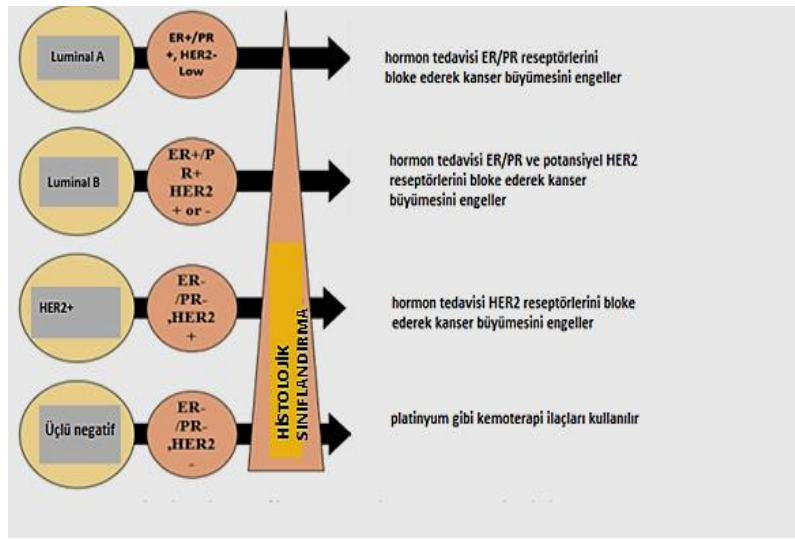
Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda sık görülen bir kanserdir ve 2018'de en yüksek (%11,6) yeni teşhis edilen kanser türü olup akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almıştır. Meme kanserinin hayatta kalma ve ölüm oranlarındaki eğilim coğrafi çeşitlilik göstermektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde meme kanseri mortalitesi azalırken, ölüm oranı 1990'lardan bu yana birçok Asya, Afrika ve Latin Amerika ülkesinde artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde meme kanseri insidansı neredeyse sabit bir eğilim gösterirken, ölüm oranı 1990'dan itibaren kademeli olarak azalmaya başlamıştır. Mortalite oranındaki bu azalma, daha erken kanser teşhisine ve iyileştirilmiş terapötik müdahaleye bağlanabilir (Rahman ve diğ. 2019).

Meme kanserini önlemeye yönelik çabalara rağmen önümüzdeki 20 yıl içinde daha da artması beklenmektedir. İnsidansın artmasına neden olan faktörler ise çoğu ülkede düşük menarş yaşı, ilk gebeliğin geç olması, gebeliğin azalması, daha kısa ya

da hiç emzirmeme olmak üzere öne çıkan riskler meme kanseri riski olan kadınların sayısında artışa neden olmuştur. Meme kanseri riskini artıran diğer faktörler ise obezite, alkol tüketimi, hareketsizlik ve hormon replasman tedavisidir. Meme Kanserinde Hormonal Faktörler İşbirliği Grubu gelişmiş ülkelerde meme kanserinin kümülatif insidansının, kadınların ortalama olarak daha fazla çocuğu olması durumunda 70 yaşına kadar her 100 kadında 6,3'ten 2,7'ye yarıdan fazla azalacağını tahmin etmiştir (Howell ve diğ. 2014).

Sigara içmek, özellikler adolesan ya da perimenarş döneminde sigaraya başlayan kadınlarda meme kanseri riskini orta düzeyde ve önemli ölçüde artırmaktadır. Ayrıca ailesinde meme kanseri öyküsü olan kadınlarda sigara ile hastalık ilişkisi daha fazladır (Jones ve diğ. 2017).

Meme kanseri çok heterojen bir hastalıktır, alt tiplerine ayırmanın birçok yolu vardır ve Şekil 2.9.'da moleküler alt tipleri yer almaktadır. Bununla birlikte, birincil tanı, östrojen (ER), progesteron (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) için hormon reseptörlerinin varlığını veya yokluğunu değerlendiren tümörün histopatoloji raporudur. Bu reseptörlerin ifadesi, hastaların Tamoxifen, Anastrozole ve Trastuzumab gibi endokrin tedavilere uygunluğunu belirlemek için gereklidir. Meme kanserlerinin çoğu reseptör pozitifdir (%77) ve hedefe yönelik tedavinin etkinliği kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, üç reseptörün tümü için negatif olan meme kanserleri durumunda (üçlü negatif meme kanserleri, TNBC), henüz hedefe yönelik bir tedavi mevcut değildir (Mathe ve diğ. 2015).



Şekil 2.9. Meme kanserinin moleküler alt tipleri. Houseman (2021)'ndan alınmıştır.

TNBC, tüm meme kanseri türlerinin yaklaşık %15-20'ini oluşturur (Singh ve diğ. 2021). TNBC tümörleri genellikle daha agresiftir ve tipik endokrin tedavilere daha az duyarlıdır. Ayrıca; kötü prognoza sahiptir ve diğer alt tiplere kıyasla daha yüksek bir nüks oranına sahiptir (Chang ve diğ. 2018).

TNBC alt tipinin diğer özellikleri, germ hattı BRCA1 mutasyonları (%10), yüksek mitotik sayımlar ve TP53 pozitifliğidir. TNBC'lerin yaklaşık %70'i bazal benzeri alt tiptendir ve bazal tip sitokeratin 5, sitokeratin 6'yı ayrıca epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) yüksek ifadesini ifade eder. Çoğu TNBC, invaziv duktal karsinom olarak sınıflandırılır, bununla birlikte metaplastik karsinomlar ve apokrin karsinomlar dahil olmak üzere diğer histoloji türlerinin yüksek bir oranı ER, PR ve HER2 negatiftir (Mathe ve diğ. 2015).

Birkaç çalışma, meme kanserinin her bir alt tipin immünolojik olarak da farklılık gösterdiğini bildirmiştir. Örneğin, yoğun bir bağışıklık infiltrasyonu (T ve B hücreleri, makrofajlar ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreler, MDSC) esas olarak yüksek dereceli histolojik alt tipler olan TNBC ve HER2+ meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir. ER- meme tümörleri ile karşılaştırıldığında, ER+ meme tümörleri, iyi bir prognozu destekleyen doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin kümelerinin varlığı ile pozitif olarak ilişkilidir. NK'lar; ER+ meme kanserlerinde

antitümör aktiviteye sahiptir, ancak sayıları ilerlemiş tümör evrelerinde azalmaktadır (Gomarasave diğ. 2020).

2.5.MikroRNA'lar ve Kanser İlişkisi

MikroRNA'lar (miRNA), transkripsiyon sonrası gen susturulmasına aracılık eden yaklaşık 18-25 nükleotid uzunluğunda bir grup kısa kodlamayan RNA (ncRNA)'dır. İlk miRNA, 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ta rapor edilmiştir, bununla birlikte miRNA'ların genel düzenleyici işlevi 2001 yılına kadar iyi anlaşılammıştır (Lin ve Gregory 2015).

Çoğu miRNA somatik dokuda küçük RNA'ların baskın sınıfını oluşturur. Hayvanlardaki diğer küçük RNA'lar arasında küçük interferans RNA'lar (siRNA'lar), germinal hücreler için tipik olan PIWI etkileşimli RNA'lar (piRNA'lar) ve kodlamayan mitokondriyal RNA'lar (ncmRNA'lar) bulunur (Bertoli ve diğ. 2015).

2001 yılında, miRNA'ların çeşitli hayvan ve bitki türlerinin her birinde en az düzinelerce temsilci ile geniş bir küçük RNA düzenleyicileri sınıfını içerdiği bulunmuştur. Bu keşifle birlikte, küçük RNA'ların iki kategorisi tanımlandı. Bunlar transpozonlar, transgenler ve virüsler gibi yabancı veya istilacı nükleik asitlere yanıt olarak genom bütünlüğünü koruyan siRNA'lar ve endojen genlerin düzenleyicileri miRNA'dır (Dana ve diğ. 2017).

Bazı miRNA'lar kanserin tespiti, teşhisi, sınıflandırılması ve tedavisi için biyobelirteçler olarak ortaya çıkmaktadır. Kansere dahil olmak üzere farklı insan patolojilerinde miRNA'ların düzensizliğinin meydana geldiği gösterilmiştir (Belvedere ve diğ. 2018).

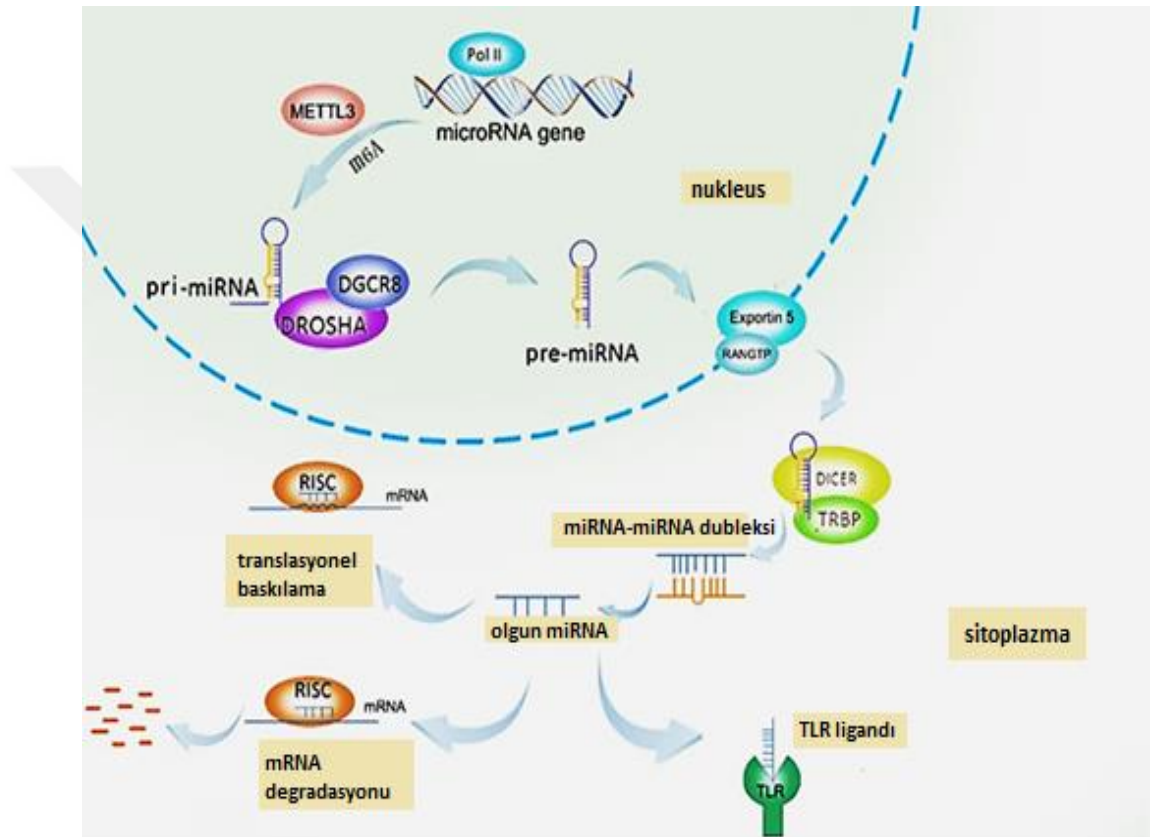
MiRNA'lar serum, plazma, tükürük, idrar ve amniyotik sıvı dahil olmak üzere çok sayıda vücut sıvısında da bulunmaktadır. Serumdaki miRNA'lar, hematolojik maligniteler ve katı tümörlerin varlığı ile ilişkilidir. Ayrıca çeşitli kanser türlerinin erken teşhisi için kullanılabilirler. Dolaşımdaki miRNA'lar; transkripsiyonel gen düzenlemesindeki klasik rollerinden tamamen bağımsız bir işlev olan reseptör aktivasyonu için sinyaller olarak hareket edebilirler (Leva ve diğ. 2014)

Drosha ve Dicer Şekil 2.10.'da belirtildiği gibi miRNA biyogenezini iki adımda katalize eder. Çoğu miRNA, sitoplazmik RNA kaynaklı susturma kompleksini (RISC) hedef mesajcı RNA (mRNA)'ların 3' kodlanmayan bölgesine (3'UTR) yönlendirerek mRNA translasyonunu baskılar (Zhang ve diğ. 2020).

miRNA'ların sentezi ilk olarak, pri-miRNA öncüsünün RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonunu ile başlar. Sonrası çekirdekte DROSHA ve DGCR8 gibi endonükleaz enzimleri tarafından işlenmesi ve yaklaşık 80-100 nükleotitten oluşan pre-miRNA dizisinin oluşumuyla devam eder. Exportin-5, pre-miRNA'ları sitoplazmik ribonükleaz Dicer tarafından çift sarmallı olgun miRNA'ya bölünmesi için çekirdekten sitoplazmaya taşır. Oluşan olgun miRNA duplexi, mRNA'nın translasyonunu düzenleyen RISC oluşturan Argonaute (Ago) proteinlerine bağlanır. Olgun miRNA, tamamlayıcı bölgesi aracılığıyla hedef mRNA'larının 3'UTR'deki tamamlayıcı dizilerini tanır. Düzenleme için yüksek tamamlayıcılık gerekli olmadığı için tek bir miRNA birkaç yüz mRNA'yı hedefleyebilir ve ortaya çıkan anormal miRNA ifadesi, kanserle ilgili sinyal yolları üzerinde derin etkisi olan çok sayıda transkripti etkileyebilir (Reddey 2015).

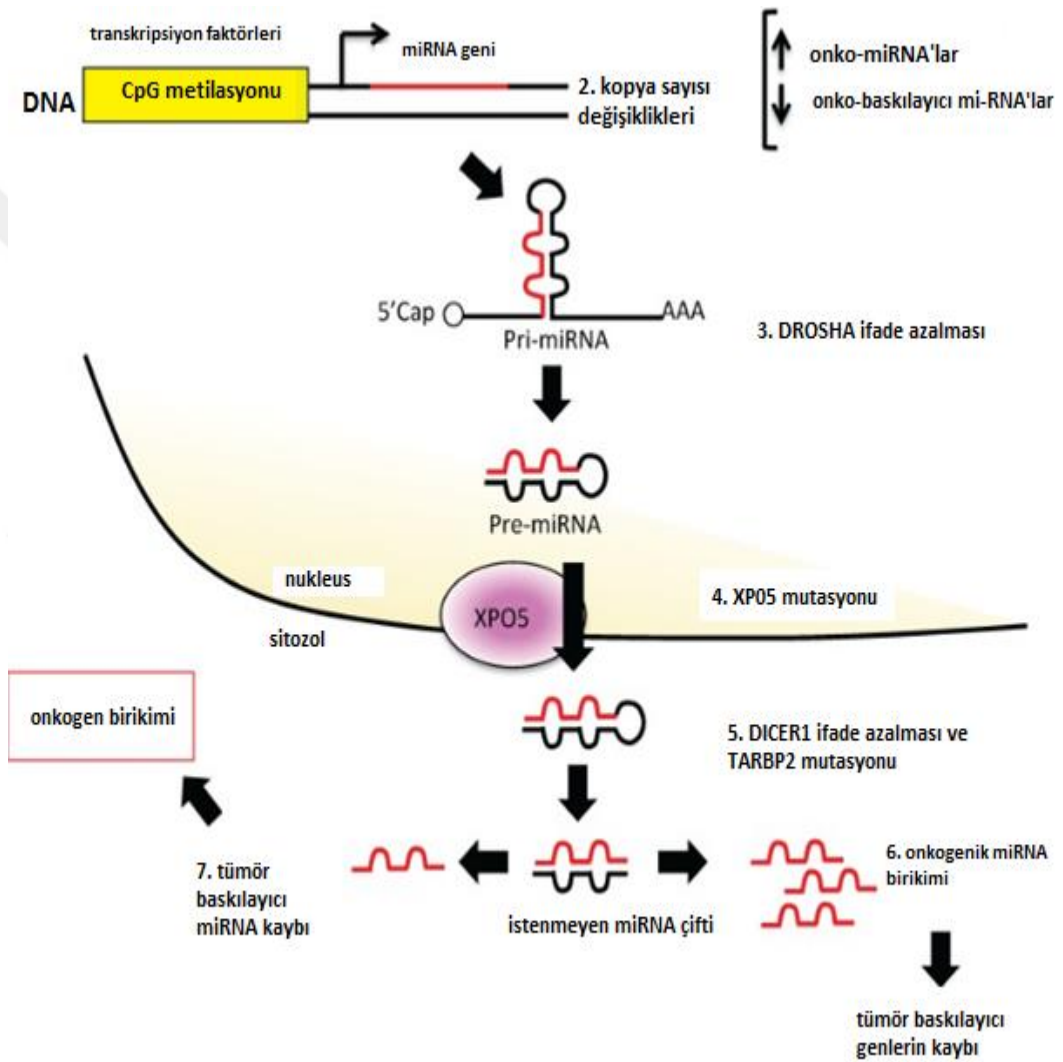
miRNA'lar, 3' UTR tamamlayıcı dizilere bağlanarak hedef mRNA'ların bozulmasını indükleyerek veya translasyonunu inhibe ederek gen ifadesini kontrol eder. Bu 3' bağlanma ribozom fonksiyonunu inhibe ederek, 5' ucunun açılmasına, poli(A) kuyruğunun deadenilasyonuna ve hedef mRNA'nın bozulmasına neden olur. Hücre döngüsü, apoptoz, proliferasyon veya invazyon gibi birçok biyolojik sürecin önemli düzenleyicileri olmanın yanı sıra miRNA'lar antikanser tedavilerinin etkinliğini de etkileyebilirler (Song ve Rossi 2014). miRNA'ların biyogenez süreci detaylarıyla Şekil 2.10.'da gösterilmiştir.

miR143 ve miR145, kolon kansinomlarında ifadesi azalır. Let-7, insan akciğer kansinomlarında ifadesi azalır ve ifadesinin restorasyonu, akciğer kanseri A549 hücrelerinde hücre büyümesinin inhibisyonunu indükler. miRNA'ların insan kanserinde rolü olduğuna dair bulgular, miRNA genlerinin %50'sinden fazlasının kırılğan bölgeler gibi kromozomal bölgelerde ve insan kanserinde genetik olarak değiştirilmiş silinme veya amplifikasyon bölgelerinde yer alması gerçeğiyle de desteklenmektedir (Iorio ve diğ. 2005).



Şekil 2.10. miRNA biyogenez süreci: miRNA genleri genellikle RNA bağlayıcı protein DGCR8 ve tip III RNase Drosha'dan oluşan bir mikroişlemci kompleksi tarafından pri-miRNA'lar olarak adlandırılan RNA polimeraz II tarafından kopyalanır. Ran/GTP/Exportin 5 kompleksi tarafından çekirdekten sitoplazmaya taşınmasının ardından, pre miRNA'lar başka bir RNase III enzimi Dicer tarafından ~20-22 nükleotid miRNA/miRNA dupleksine işlenir. Dupleks açıldıktan sonra, olgun miRNA, RISC adı verilen bir protein kompleksine dahil edilir. Bir miRNA yüklü RISC, mRNA bölünmesi ve degradasyonu yoluyla gen susturulmasına veya miRNA ile hedeflenen mRNA transkripti arasındaki tamamlayıcılığa bağlı olarak

translasyonel baskıya aracılık eder. Ek olarak, miRNA'lar, Toll benzeri reseptöre (TLR) doğrudan bağlanmak için ligandlar olarak işlev görebilir ve aşağı akış sinyal yollarını tetikleyebilir. Metiltransferaz 3'ün (METTL3); DGCR8 tarafından tanınıp işlenerek olgun miRNA oluşumu için pri-miRNA'ları metillediği gösterilmiştir. Peng and Croce (2016)'den alınmıştır.



Şekil 2.11. miRNA biyogenez yolunun, genellikle kanserde deregüle olan adımlarının şematik bir temsili (Bertoli ve diğ. 2015).

miRNA biyogenezinde değişen adımlar kansere yol açar. Bunlar şekil 2.11.'de gösterilmiştir. Bu özellikleri listelemek gerekirse;

- miRNA genleri, upstream düzenleyici elementler (enhancer/represör) ve promotör bölgeler içerir. Bu durum miRNA'ların CpG metilasyonuna tabi tutulduğunu gösterir.
- miRNA'nın kopya sayısındaki değişiklik (genomik amplifikasyon veya delesyon, aktive edici veya baskılayıcı mutasyon, epigenetik susturma ve transkripsiyonel aktivasyon nedeniyle) onkojenik miRNA'ların ifadesini arttırabilir veya tümör baskılayıcı miRNA'ların ifadesini azaltabilir.
- miRNA işleme sürecindeki değişiklik; örneğin Drosha'nın ifadesinin azalması, pri-miR'nin pre-miR'ye kırılmasını azaltabilir.
- XPO5 mutasyonu sitoplazmaya pre-miRNA taşınmasını önleyebilir.
- TARBP2'nin mutasyonu veya DICER1'in ifadesindeki azalma, olgun miRNA seviyelerini azaltır ve nihayetinde tümör baskılayıcı miRNA'larda bir kayba neden olur.
- Onkojenik miRNA'ların birikmesi veya tümör baskılayıcı miRNA'ların kaybı, sonunda kanser gelişimine yol açabilir (Bertoli ve diğ. 2015).

Bağışıklık hücreleri, Exportin 5, Dicer, Ago2 ve bazı RNA bağlayıcı proteinler (RBP'ler) gibi miRNA biyogenezinde yer alan anahtar enzimleri ve proteinleri düzenleyerek veya değiştirerek miRNA işlevini düzenlerler. Ayrıca miRNA'lar, farklı bağışıklık hücrelerinde miRNA tiplerine göre mRNA'ları seçici olarak hedefleyebilirler. miRNA aracılı hedefleme aynı zamanda rekabet eden endojen RNA (ceRNA'lar) tarafından da düzenlenebilir (Jia ve Wei 2020).

2.6.miRNA İfadesi Seviyelerini Etkileyen Durumlar

2.6.1.Epigenetik mekanizmalar

DNA metilasyonu, RNA modifikasyonu ve histon modifikasyonu epigenetik olarak miRNA'ların ifadesini düzenler. DNA metilasyonu yaygın olarak promotör CpG adalarında meydana gelir ve miRNA'ların ifadesini inhibe eder. Histon modifikasyonları, miRNA'ların transkripsiyonunu artırma ve susturma kabiliyeti kazandırır. Ayrıca, epigenetik ile ilgili enzimler miRNA'ların hedefi olabilir. miRNA'lar, epigenetik ile ilişkili enzimleri düzenleyerek DNA

metilasyonunun ve histon modifikasyonunun ifadesini modüle eder. Bazı miRNA'ların epigenetik düzenleyiciler tarafından düzenlendiği ve bu nedenle epigenetik mekanizmayı etkilediği bulunmuştur. 5-AZA, LBH589 ve GSK-J4 gibi miRNA-epigenetik döngüsünü düzenleyebilen epigenetik düzenleyici ilaçlar, çeşitli hastalıklar için olası güçlü bir terapötik strateji haline gelmiştir (Yao ve diğ. 2019).

2.6.2.Genetik Değişiklikler

Çerçeve kayması mutasyonları, mikrosatellit kararsızlığından kaynaklanır. Bu tür genetik değişimler birkaç mRNA'nın ifadesini etkileyebilir. Bunlardan biri de TARBP2 mRNA'sıdır. TARBP2, Dicer stabilize edici proteindir, kolorektal, mide kanserinde ve meme kanserinde bulunmuştur. Bilinen miRNA'ların yarısından fazlası kırılma bölgeleri, minimal heterozigotluk kaybı bölgeleri, minimal amplifikasyon bölgeleri (minimal ampikonlar) veya ortak kırılma noktası bölgeleri gibi kanserle ilişkili bölgelerde bulunur (Bertoli ve diğ. 2015).

2.6.3.miRNA Biyogenez Yolundaki Kusurlar

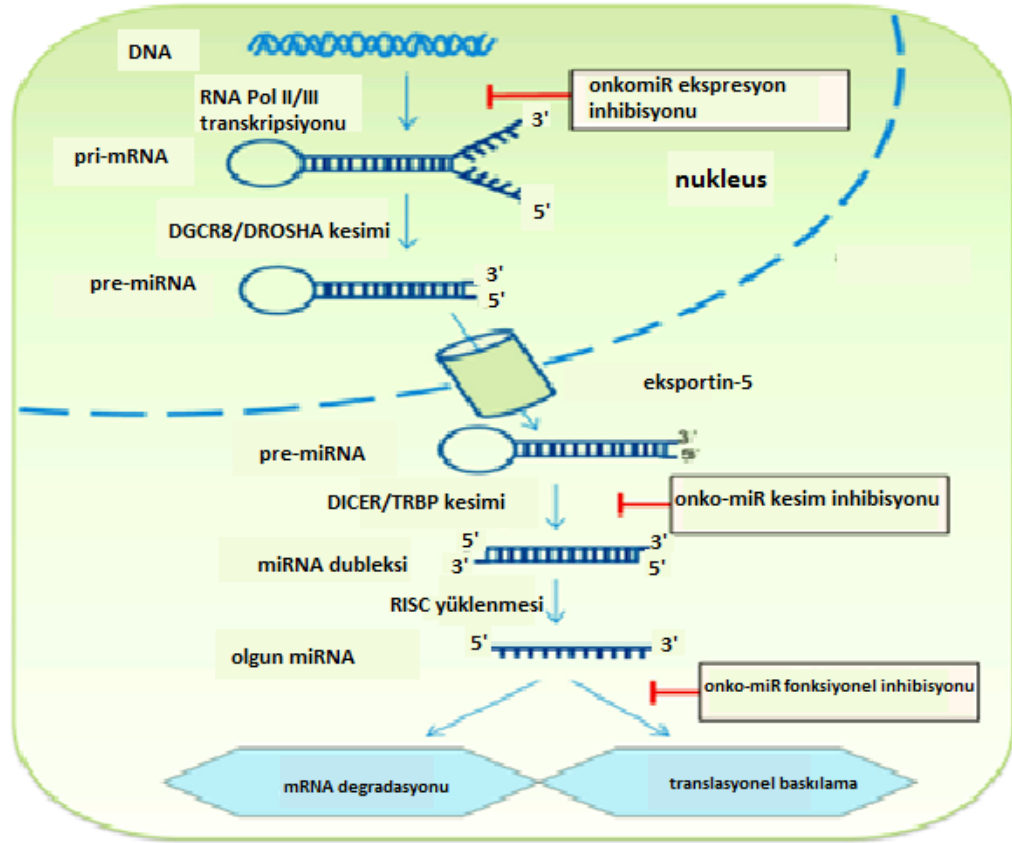
Drosha, DGCR8, Xpo5, Dicer1 ve TRBP gibi miRNA biyogenezinde yer alan enzimleri kodlayan genlerdeki çeşitli somatik ve germline mutasyonları, malign tümörlerde tanımlanmıştır. Epitelyal olmayan over kanserlerinde DICER1'in RNase IIIb alanını etkileyen somatik mutasyonlar gösterilmiştir. Argonaute proteinleri, miRNA ifadesinin ve fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Argonaute'nin, RNaz aktivitesinden bağımsız olarak, transkripsiyon sonrası olgun miRNA ifadesini artırdığı gösterilmiştir. Ek olarak, Argonaute proteinlerinin aşırı ifadesi, miRNA bozulmasını yavaşlattığı ve miRNA yarı ömrünü artırdığı gösterilmiştir (Gulyaeva ve Kushlinskiy 2016).

2.7.OnkomiR'ler

miRNA'ların, protein kodlayan genlerin %90'ından fazlasını düzenlediği ve böylece onları gen düzenleyicilerinin en büyük sınıfı haline getirdiği tahmin edilmektedir. Geniş düzenleyici rolleri ve çeşitli hedef mRNA'ları nedeniyle miRNA'lar, hücre döngüsü, tümör gelişimi, göç/invazyon ve anjiyogenez dahil olmak üzere çeşitli normal ve patojenik hücrel süreçleri düzenleyebilir, böylece

onkogenler (onkomiR) veya tümör baskılayıcılar (tsmiR) olarak işlev görebilirler (Hannafon ve diğ. 2019).

OnkomiR'ler, çok sayıda kanserle ilişkili geni modüle eden güçlü moleküler araçlardır. Kansere yol açan çok aşamalı ve çok genli sapmalar, miRNA'larla yakından bağlantılıdır. OncomiR'ler, kanser fenotiplerinin başlangıcında ve/veya sürdürülmesinde nedensel bir rolü olan miRNA onkogenleridir. Kanser, çeşitli biyolojik yollarda yer alan genlerde bulunan sayısız genetik ve epigenetik anormalliğin toplamını temsil eder. Bu karmaşıklığa rağmen, kanserler tek bir onkogene bağımlı olabilir, öyle ki, bu onkogenin ortadan kaldırılması, malign fenotipin kaybolmasına veya tersine çevrilmesine yol açar. miR-21 güçlü bir onkomiR'dir. Birkaç in vitro ve in vivo model, miR-21'in ektojik ifadesinin tümör gelişimi ve kanser ilerlemesi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Prostat kanseri hücrelerinin pre-miR-21 ile transfeksiyonunun anjiyogenezi desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca transgenik farelerde miR-21'in doğrudan ve koşullu aşırı ifadesinin agresif bir B-hücreli lenfoma fenotipini indüklemek için yeterli olduğu da gösterilmiştir (Cheng and Slack 2010). Şekil 2.12.'de miRNA biyogenez yolu ve kanserde oncomiR'leri inhibe etme yolları yer almaktadır.



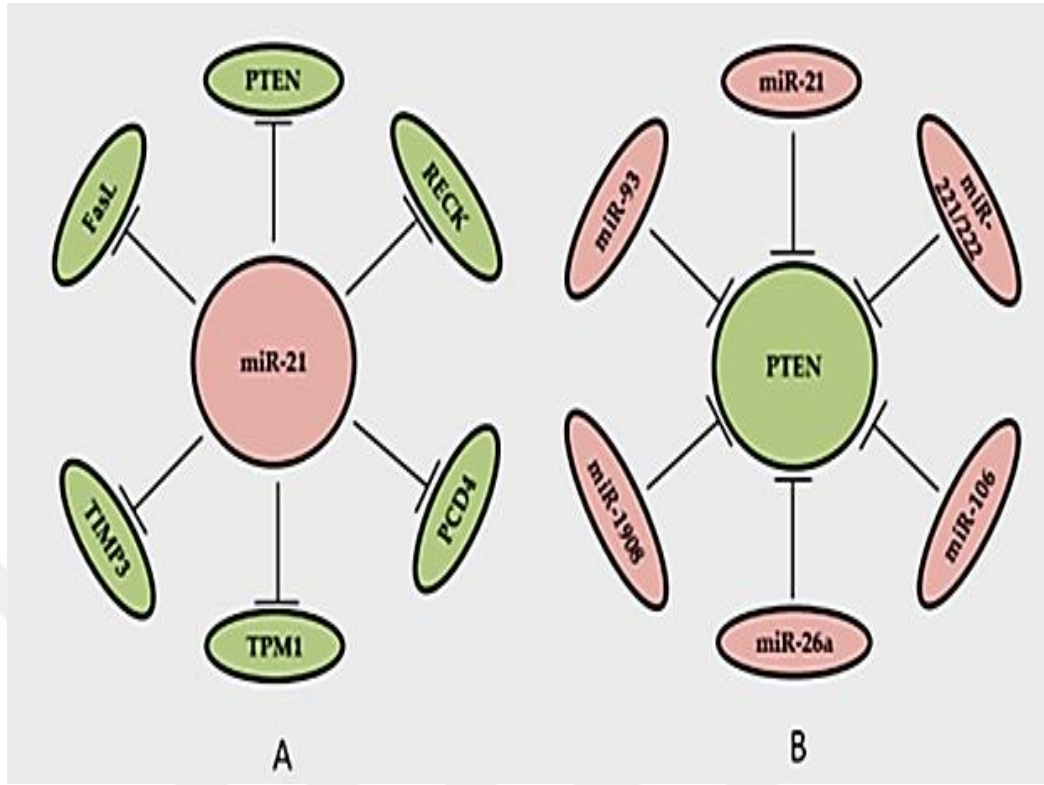
Şekil 2.12. miRNA biyogenez yolu ve kanserde oncomiR'leri inhibe etme yolları: miRNA düzensizliğinin hücre proliferasyonu, apoptoz, göç ve istilayı etkileyerek kanser gelişimini kontrol ettiği yaygın olarak kabul edilmektedir. Özellikle, tanımlanan kanserle ilişkili miRNA'lar çeşitlidir ve farklı dokular, kanser türleri için spesifiktir. Bu da onların teşhis ve terapötik hedefler için potansiyel biyobelirteçler olduklarını düşündürmektedir. Karsinogenezde miRNA'nın dengeli ifadesinin başarısızlığı, ifadesi artmış onkojenik miRNA'ları veya ifadesi azalmış tümör baskılayıcı miRNA'ları içerir. Bu önemli miRNA'lar, miRNA'ları araştırmak ve analiz etmek için çeşitli yaklaşımların geliştirilmesini hızlandırmıştır. Nguyen ve Chang (2020)'dan alınmıştır.

Kronik lenfositik lösemide, miRNA-15 ve miRNA-16'nın ifadesinin azalması 2002'de gösterilmiştir. miRNA'ların kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) kaderini düzenlediğini gösteren son kanıtlar da vardır. Örneğin, SOX2, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 ve miR-429 dahil miR-200 ailesi üyeleri tarafından hedeflenir. MiR-34a ifadesi, CSC farklılaşması ile negatif korelasyon gösterirken miR-34a, Notch1'i doğrudan hedefleyebilir. Bu genler pluripotens ve ilişkili kök hücre süreçleri için gerekli olduğundan kök hücre miRNA'larının düzensizliği, kendini

yenilemenin artmasına ve CSC'lerin apoptozunun azalmasına neden olur (Rahman ve diğ. 2019). **Şekil 2.13.**'de kanserlerde rol oynayan bilinen bazı onkogenik miRNA'lar ve hedef genleri gösterilmiştir. Ayrıca, Şekil 2.14.'de gösterildiği üzere bir oncomiR, birçok geni hedef olarak düzenleyebilirken, bir gen birçok oncomiR tarafından hedeflenebilir.

onko-miR	hedef genleri	kanser tipi
miR-9	E-kaderin, LIFR	meme kanseri
miR-10B	KLF4, HOXD10, TP53, FOXO3, CYLD, PAX6, PITCH1, NOTCH1	glioblastoma, meme kanseri, özofajiyal
miR-21	PTEN, PDCD4, RECK, TPM1	glioblastoma, meme kanseri, kolorektal, akciğer, pankreas, karaciğer, mide, servikal, homeopatik kanserleri
miR-106b/93	PTEN/Akt yolu	meme kanseri
miR-125b	P53	akciğer kanseri
miR-130a	CRMP4	akciğer kanseri
miR-155	SHIP1, PI3K, FADD, CDX1	B hücreli kanser, glioma
miR-181a	PRKCD, Bim	servikal, meme kanseri
miR-200s	ZEB1, ZEB2, SIP1	servikal, yumurtalık kanseri
miR-210-3p	SOCS1, TNIP1	pankreas kanseri
miR-221/222	PTEN	meme kanseri
miR-335	Rb1, Bcl-w	yumurtalık kanseri
miR-498	BRCA1	meme kanseri
miR-504	P53, CDK6	HSCC, nöroblastoma
miR-1810	PDCD4	kolorektal kanser
miR-224/452	DPYSL2, KRAS	glioblastoma
miR-181/340	KRAS, MECP2	mide kanseri

Şekil 2.13. Kanserde onkogenik miRNA'lar. Nguyen ve Chang (2020)'den alınmıştır.



Şekil 2.14. Bir oncomiR, birçok geni hedef olarak düzenleyebilirken, bir gen birçok oncomiR tarafından hedeflenebilir. miR-21, aynı anda birden fazla geni hedefleyen bir oncomiR olarak bilinir; tümör baskılayıcı PTEN, birkaç oncomiR tarafından negatif olarak düzenlenir. T çubukları, miRNA tarafından hedef ekspresyonunun baskılandığını gösterir. Nguyen ve chang (2020)'dan alınmıştır.

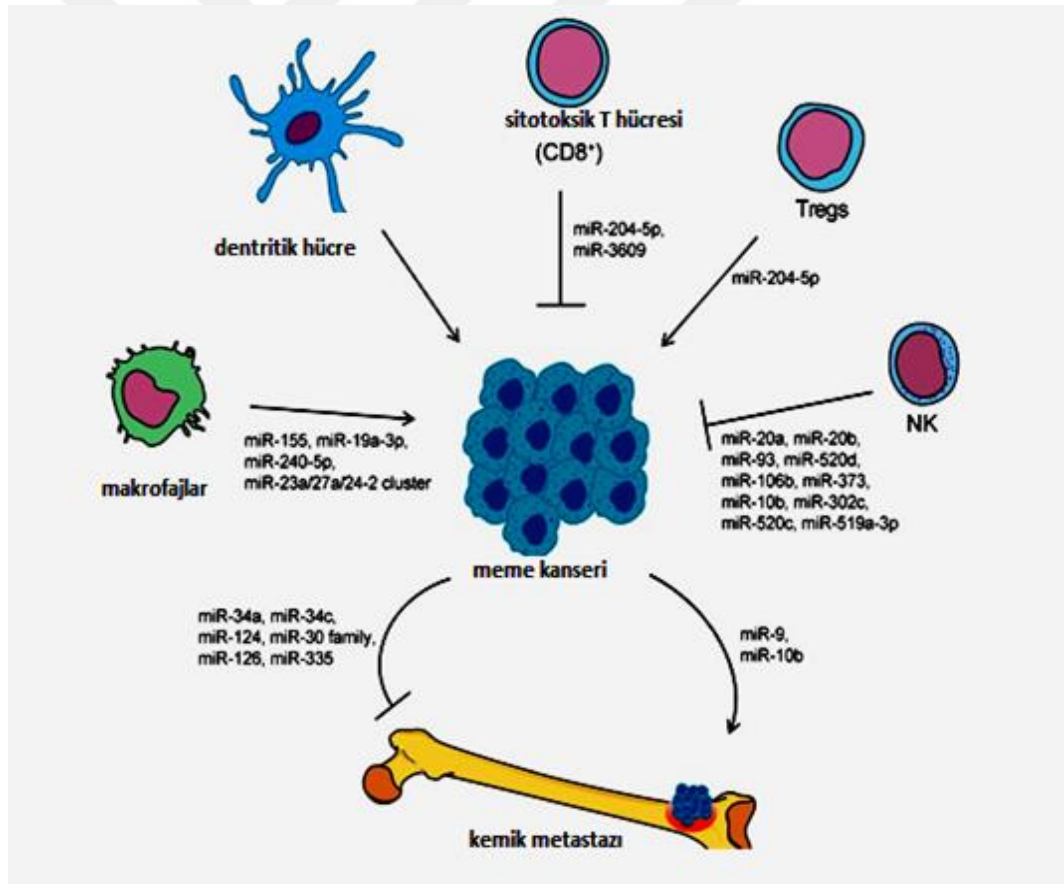
2.8.Meme Kanseri ile İlişkili Gen ve miRNA'lar

MikroRNA'ların düzensizliği, meme kanseri dahil olmak üzere birçok insan kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde rol oynar (Bertoli ve diğ. 2015).

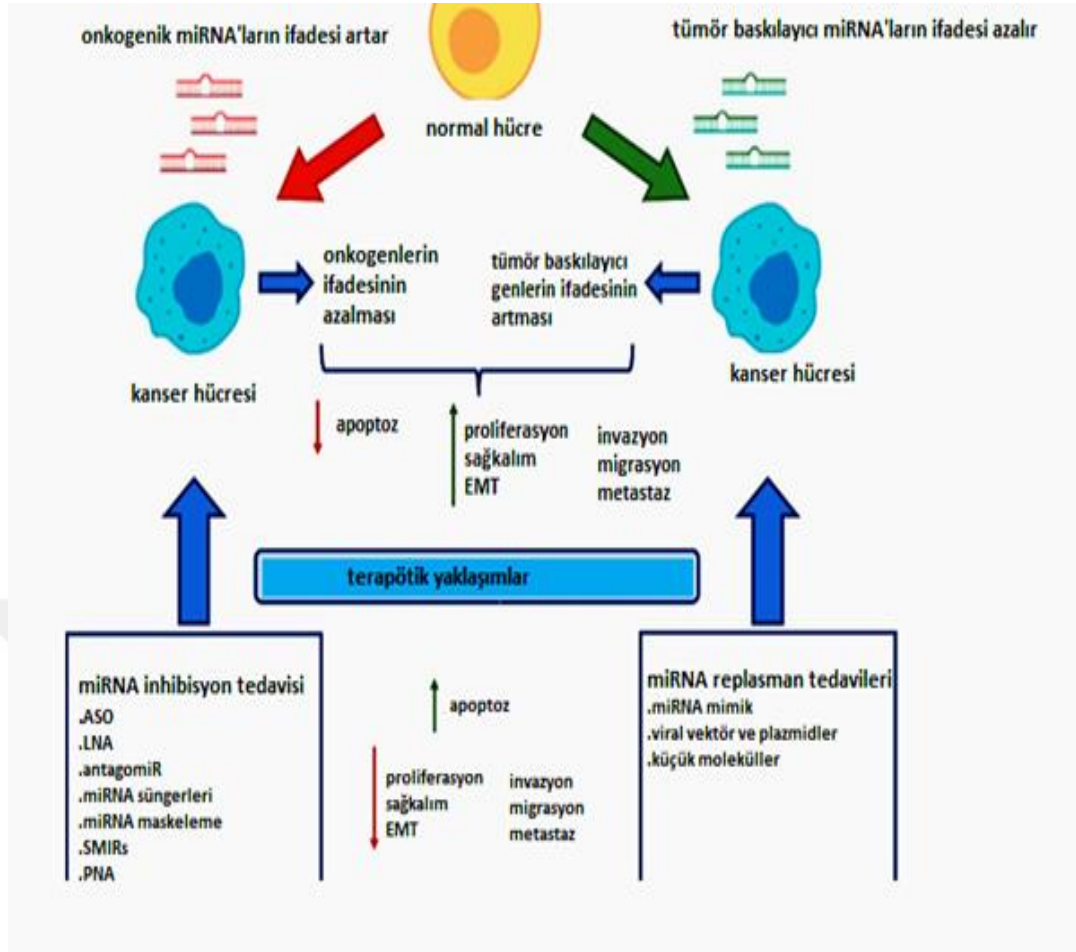
Meme kanseri patogeneğinde yer alan çeşitli hüresel ve moleküler hedefler arasında, miRNA'ların temel epigenetik düzenleyiciler olarak yer aldığı kanıtlanmıştır. Bu moleküller, büyüme, anjiyogenez, gelişme ve farklılaşma dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonlarda etkili rollere sahiptir. Çalışmalar, miRNA'ların düzensiz regülasyonunun, meme kanserinde anjiyogenez, tümör büyümesi, metastaz ve tedaviye yanıt gibi tümörigenezin çeşitli yönlerinin ortaya çıkmasıyla doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir (Pour ve diğ. 2019).

Meme kanserinin kesin nedeni belirsizdir. Endokrin bozuklukları, genetik mutasyonlar ve bağışıklık fonksiyonundaki azalmalar gibi birçok risk faktörü meme kanserine yakalanma riskini artırabilir. Bununla birlikte, gen mutasyonlarının birikmesi ayrıca düzensiz gen ifadesinin neden olduğu düzensiz meme epitel hücresi proliferasyonu ve apoptoz da meme kanserinin temel nedenidir. Çok sayıda genin miRNA tarafından düzenlendiği tahmin edildiği için meme tümör gelişimi ve metastazının birkaç dokuya özgü miRNA tarafından düzenlenmesi de muhtemeldir (Li ve diğ. 2014).

Meme kanserinde kansere bağlı bağışıklık ve kemik metastazında rol oynayan miRNA'lar Şekil 2.15.'de yer almaktadır. miRNA'ların kanserdeki rolü ve miRNA temelli tedavilere yaklaşımlardan ise Şekil 2.16.'da bahsedilmiştir.



Şekil 2.15. Meme kanserinde bağışıklık ve kemik metastazında rol oynayan miRNA'lar. Gomarasa ve diğ. (2020)'nden alınmıştır.



Şekil 2.16. miRNA'ların kanserdeki rolü ve miRNA temelli tedavilere yaklaşımlar: Yüksek miRNA ekspresyonu kanserde yaygın bir bulgudur. Onkojenik miRNA'ların yukarı regülasyonu, tümör baskılayıcı gen hedeflerinin genel bir aşağı regülasyonunu belirlerken, tümör baskılayıcı miRNA'ların aşağı regülasyonu, apoptozu bloke etmek ve proliferasyonu, EMT'yi, istilayı, göçü ve metastazı teşvik etmek için kanserli hücreyi tamamen destekleyerek hedef onkogenlerin yukarı regülasyonunu indükler. miRNA'ları hedef alan terapötik yaklaşımlar; miRNA inhibisyon tedavisi ve miRNA replasman tedavisidir. miRNA bazlı tedavilerin etkileri, hücre ölümünde bir artışa ve tümör gelişiminin önlenmesine katkıda bulunur. Gomarasa ve diğ. (2020)'nden alınmıştır.

2.9.miR182 ve Kanser İlişkisi

miR-182, farklı tümör tiplerinde bulunan onkogenik bir mikroRNA'dır. Kolorektal kanserde en fazla regüle edilen miRNA'lardan bir tanesidir. Bu miRNA, tümör gelişiminin ilk adımlarında ifade edilmesine rağmen, tümör gelişimini tetiklemedeki rolü belirsizdir (Perilli ve diğ. 2019).

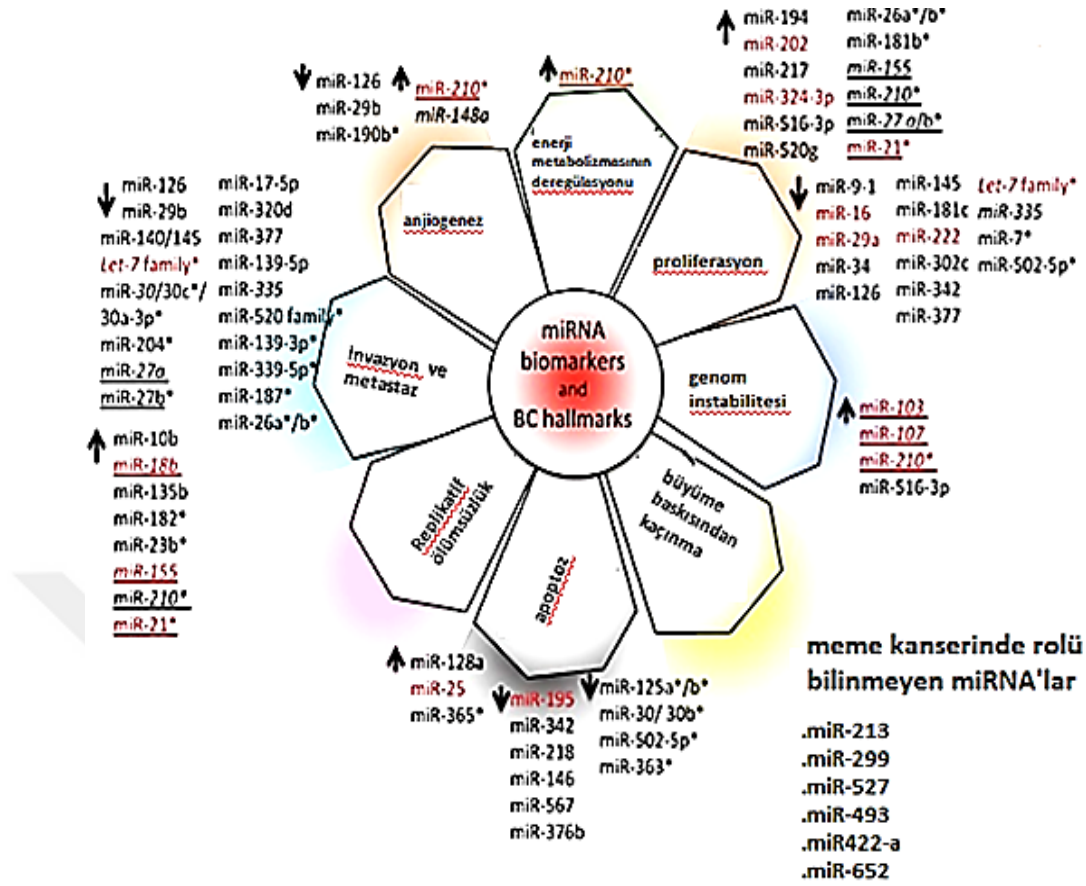
Yüksek seviyelerdeki miR-182, T hücre fonksiyonu, DNA onarımı ve kanserin birçok yönüyle ilişkilendirilmiştir (Pucella ve diğ. 2015).

miR-182'nin azalan seviyesi, mTOR ifadesini arttırmada ve renal karsinom patogenezi teşvik etmede rol oynar. miR-182'nin aşırı ifadesi, mTOR ifadesini inhibe eder ve hücre proliferasyonu ve invazyonunu zayıflatır (Yang ve diğ. 2018).

2.10.miR182 ve Meme Kanseri İlişkisi

Proteomik çalışmalar, son zamanlarda tek bir miRNA'nın yüzlerce hedef üzerindeki geniş etkisini ortaya çıkarmıştır. Birçok hücrel yol özellikle gelişimsel ve onkogenik süreçlerle ilgili olanlar, miRNA'ların düzenleyici işlevinden etkilenir (Winter ve diğ. 2009). Meme kanserinde rol oynadığı gösterilen bazı miRNA biyobelirteçleri ve meme kanserindeki ayırt edici özellikleri Şekil 2.17.'de gösterilmiştir.

miR-182, üçlü negatif meme kanserinde FOXF2'nin 3' UTR bölgesini hedefleyerek, FOXF2'yi baskılayarak potansiyel bir çoğalma ve metastaz indükleyicisi olarak rol oynar. MiR-182'nin aşırı ifadesinin, MDA-MB231 hücrelerinde artan bir proliferasyon ve istila oranı ile sonuçlandığı bulunmuştur. miR-182, PFN1 ifadesinin baskılanması yoluyla hücre canlılığının, çoğalmasının, istilasının ve ayrıca apoptozun desteklenmesini sağlar. Bir diğeri çalışmada, miR-182'nin PFN1 ifadesini etkileyerek hücre proliferasyonunu ve migrasyon hızını da etkilediği gösterilmiştir (Nurzadeh ve diğ. 2021).



Şekil 2.17. miRNA biyobelirteçleri ve meme kanserinde ayırt edici özellikleri. Bertoli ve diğ. (2015)'nden alınmıştır.

Meme kanseri trastuzumab dirençli hücrelerde miR-182 aşırı ifadesinin MET'yi hedefleyerek ve downstream PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu inhibe ederek trastuzumab direncini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle miR-182'nin artmış ifadesi veya hedef geninin ifadesinin azalmasını, meme kanseri trastuzumab dirençli hücrelerde trastuzumab direncinin üstesinden gelmek için potansiyel bir strateji olarak kullanılabilirliği ileri sürülmektedir (Yue ve Qin 2019).

miR-182 birçok kanser türünde onkogenik bir rol oynar. TGF- β sinyalinin downstream efektörüdür. Silindirindromatoz (CYLD), hücre adezyon molekülü 1 (CADM1) ve SMAD7'yi hedefleyerek TGF- β ile indüklenen EMT'yi ve metastazı güçlendirir. FOXF2, miR-182-5p'nin bilinen bir hedefidir ve miR-182 tarafından düzenlenen kanser ilerlemesine aracılık eder. miR-182'nin hem FOXF2 hem de SMAD3'ün doğrudan transkripsiyonel hedefi olduğu bazal benzeri meme kanserinde

(BLBC) gösterilmiştir. Bu ilişki aracılığı ile miR-182, BLBC agresifliğini kontrol eder (Lu ve diğ. 2020).

2.11.Cisplatin

Cisplatin (sisdiamindikloroplatin II), son kırk yılda birçok kanserin tedavisi için yaygın olarak kullanılan metal bazlı bir anti-kanser ilacıdır (Praphakaran ve diğ. 2013).

Cisplatin, DNA üzerindeki pürin kalıntılarına bağlanma ve buna göre zincir içi eklentiler oluşturma yeteneğini gösteren ve DNA'ya zarar veren bir ajandır. Ayrıca, hücrelerin DNA onarım mekanizmalarına müdahale ederek DNA'da ölümcül hasarlara ve nihayetinde çeşitli mekanizmalar yoluyla hücre ölümüne yol açar (Papadopoulos ve Scorilas 2015).

DNA'yı çapraz bağlayan ve RNA transkripsiyonu ve DNA replikasyon aktiviteleri ile etkileşime neden olan bir DNA-interkalasyon ajanıdır. DNA lezyonları tamir edilmezse, DNA hasarına bağlı hücre döngüsü durması ve apoptoz tetiklenir. Hücreler, cisplatine karşı, ilacın hücrelerdeki birikimindeki değişiklik, ya inhibe edilmiş alım veya arttırılmış akış yoluyla, ilacın redoks mekanizmalarıyla detoksifikasyonu, eksizyon onarım mekanizmalarıyla DNA'nın onarımı veya apoptotik mekanizmaların negatif düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla dirençli hale gelebilir (Hill ve diğ. 2019).

Cisplatin, platin-DNA eklentilerinin oluşumu yoluyla DNA'yı alkilleyerek DNA hasarına yol açar, hücre döngüsünün G1/S fazında kalmasını sağlayarak apoptoza neden olur. Diğer tüm platin ilaçları gibi, cisplatin de başlangıçta kanser hücrelerini öldürmede etkilidir, ancak sonunda direnç gelişir. Yan etkileri olsa bile cisplatin halen kullanılmaktadır. Başlangıç klinik tedavileri ve tekrarlayan ve/veya metastatik kanser hastalarına uygulanır. Kemirgen meme tümörlerinin cisplatin ile tedavisinin başlangıçta tümör büyümesini baskıladığını, ancak uzun süreli ilaca maruz kaldıktan sonra ilaç direncinin meydana geldiğini ve kontrolsüz tümör nüksü ve büyümesine yol açtığını gözlemlenmiştir (Wang ve diğ. 2021).

2.11.Wwox Geni ve Kanser İlişkisi

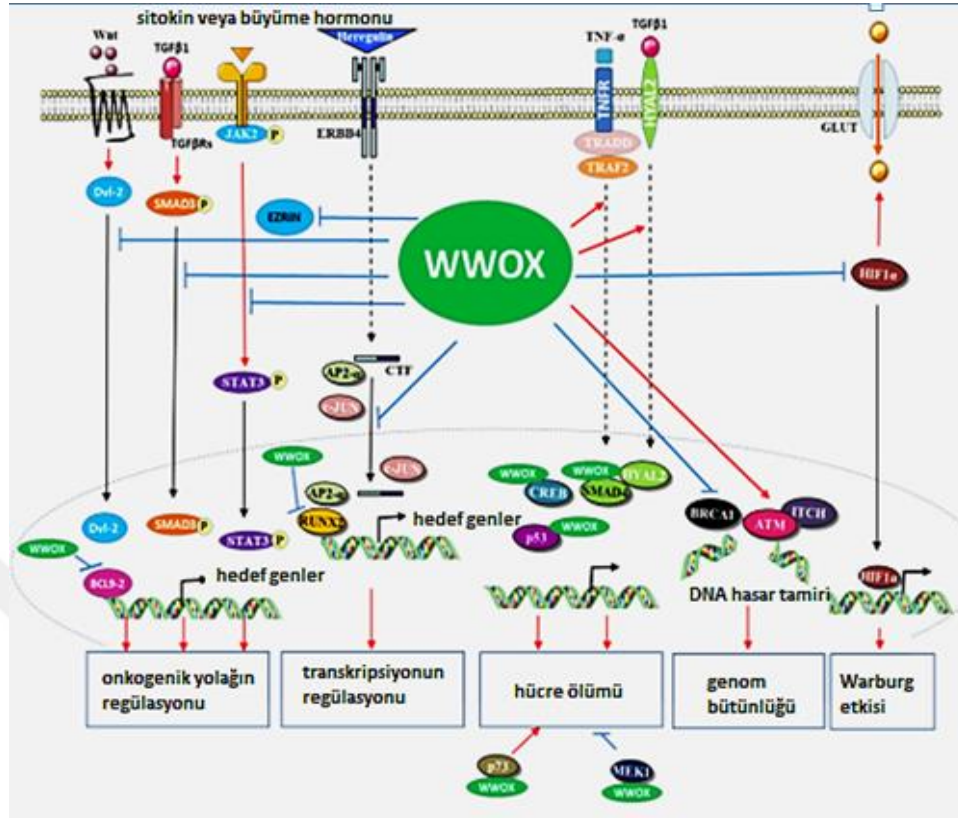
WW alanı içeren oksidoredüktaz (WWOX), iki N-terminal WW alanından ve bir C-terminal SDR alanından oluşur. Katlanmış bir konformasyonda, WW alanları SDR alanını bağlar. Stres koşulu altında WWOX, Tyr33 fosforile olur ve protein açılır. SDR alanındaki bir NSYK motifi östrojen veya androjeni bağlar. C-terminal D3 kuyruğu proapoptotiktir. D3, Alzheimer hastalığı gibi beyin korteksinde kümelenmeyi önlemek için TRAPPC6AΔ'yi (TPC6AΔ) bağlar. Bununla birlikte, etkinleştikten sonra, katlanmamış WWOX, TPC6AΔ'yi bağlamak için ilk WW alanını kullanır (Huang ve Chang 2018).

WWOX geni yaygın kromozomal kırılma bölgesi (CFS) FRA16D'yi de kapsar. "Kırılma bölgesi" terimi ilk olarak replikasyon stresini takiben kültürde kromozomlarda görülen boşlukları tanımlamak için kullanılmıştır. Kırılma bölgeleri, popülasyon içindeki sıklıklarına bağlı olarak nadir veya yaygın olarak sınıflandırılırlar. CFS'ler tüm bireylerde tanımlanabilirken, nadir kırılma bölgeleri %5'ten azında görülür. En sık aktive olan ve iyi durumda olan lenfositlerde çalışılan CFS'ler, 3p14.2'de FHIT'i kodlayan FRA3B ve WWOX'u kodlayan FRA16D'dir. WWOX lokusunda genetik değişiklikler, heterozigotluk kaybı (LOH), homozigot delesyonlar ve translokasyonlar yoluyla meydana gelir. LOH veya WWOX geninin bir alelinin veya bir alelinin bir kısmının kaybı, hepatoselüler karsinomların %52'si, prostat karsinomlarının %53'ü, akciğer ve mide kanserinin yanı sıra meme karsinomlarının %67'si için rapor edilmiştir (Schrock ve Huebner 2015).

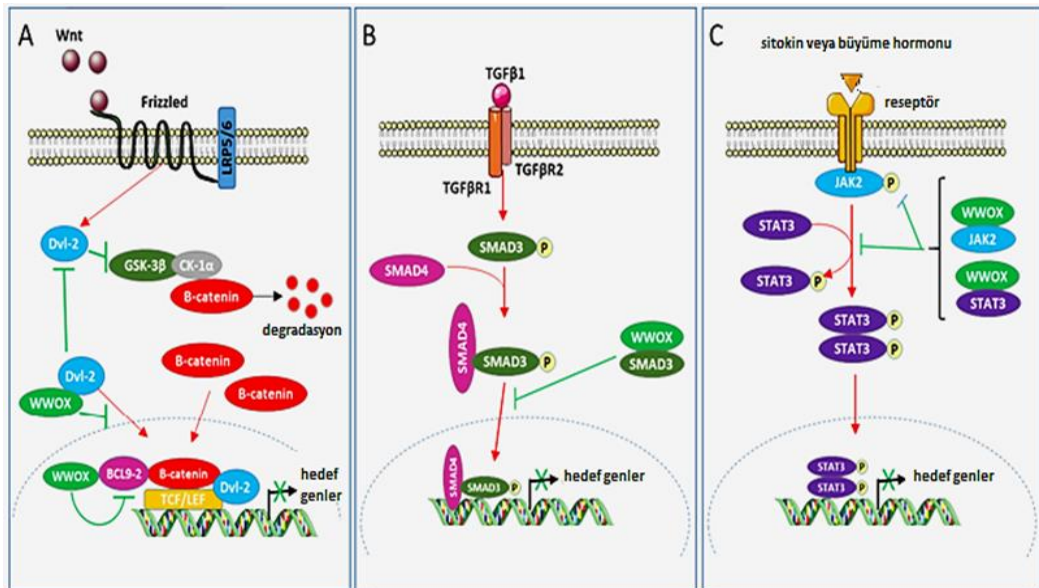
Kırılma bölgesindeki konumunun yanı sıra, promotörünün hipermetilasyonu, miRNA'lar tarafından düzenlenmesi ve translasyon sonrası modifikasyonlar WWOX'un değiştirilmiş ifadesine neden olur (Tanna ve Aqeilan 2018).

WWOX'un başlıca antikanserojen moleküler fonksiyonları şekil 2.18'de ve bu fonksiyonları hangi yollar üzerinden gerçekleştirdiği şekil 2.19'da gösterilmiştir.

WFOX, kanser ilişkili transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel aktivitelerini inhibe eder. Dvl-2 ve Bcl9-2 proteinlerine bağlanarak Wnt/b katenin yolağını inhibe eder. SMAD yolağında SMAD3'e bağlanarak TGFB1/SMAD yolağını inhibe eder. JAK2/STAT3 yolağında ise STAT3'e bağlanarak transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder. WFOX kaybı hipoksi ile indüklenebilir Transkripsiyon Faktörü 1 α 'nın (HIF1 α) ifadesini uyarır ve anaerobik glikolize teşviki sağlayarak Warburg etkisini destekler. Genom caretaker olması nedeniyle kaybı genomik kararsızlığa yol açarak kansere neden olur. Endozom, golgi, lizozomlardaki protein trafiğinin düzenlenmesi gibi görevlerde yer alır. Fare modelleri ayrıca WFOX'un tümör baskılayıcı aktivitesine de ışık tutmuştur. WFOX, çekirdekte p53'ü bağlayarak hareket eden proapoptotik bir proteindir. Bununla birlikte, WFOX'un p53 eksikliği olan insan akciğer kanseri NCI-H1299 hücrelerinde apoptozu indüklediği de bildirilmiştir, bu nedenle WFOX ayrıca p53'ten bağımsız olarak programlanmış hücre ölümünü uyarabilmektedir (Taouis ve diğ. 2021).



Şekil 2.18. WWOX'un ana antikanserojen moleküler fonksiyonları. (Taouis ve diğ. (2021)'den alınmıştır.



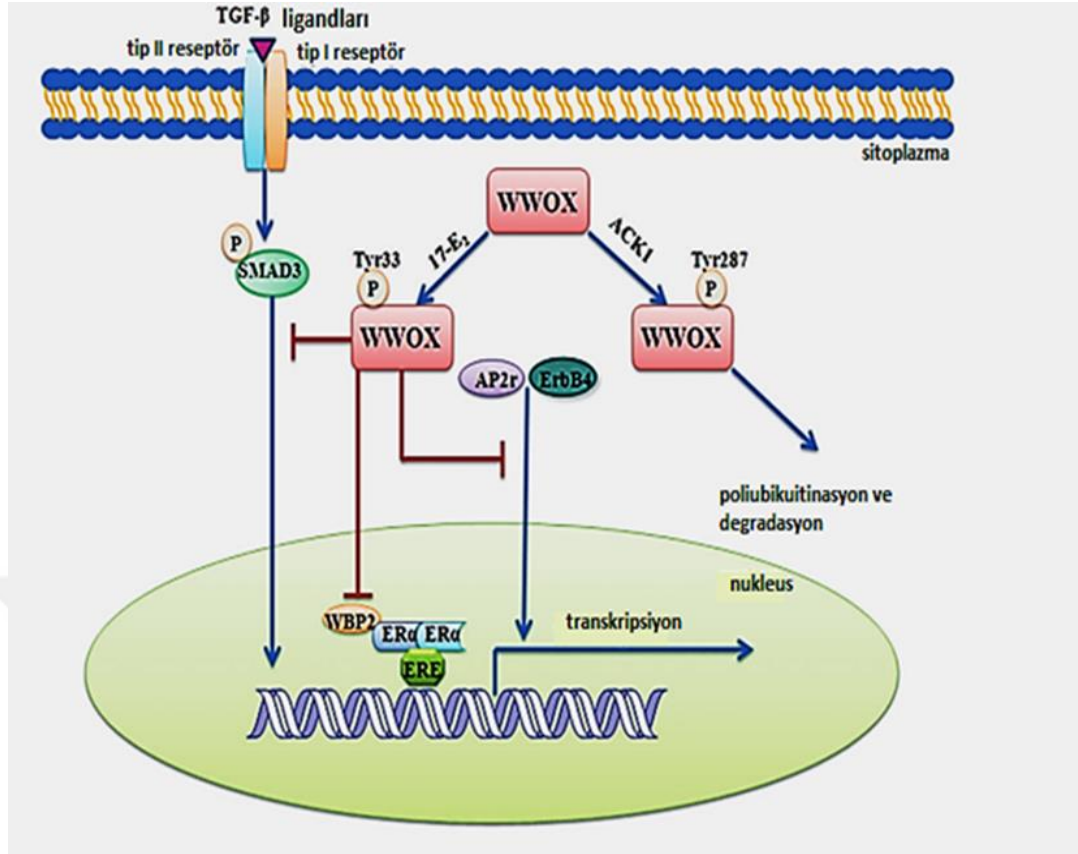
Şekil 2.19. (A) Wnt/ β -katenin, (B) TGF β 1 ve (C) JAK2/STAT3 yollarının WWOX tarafından modülasyonu. (Taouis ve diğ. (2021)'den alınmıştır.

2.13.Wwox Geni ve Meme Kanseri

Wwox, 46 kDa bir proteindir. Kansere ile ilişkili en aktif yaygın kırılma bölgesidir. Wwox proteini kodlayan genin genomik lokusu heterozigotluk kaybına ve homozigot delesyonlara karşı duyarlıdır, bunların her ikisi de gen ifadesinin azalmasına neden olur. Wwox heterozigotluk kaybı, meme kanserinin invaziv öncesi evrelerinin %70'inde veya daha fazlasında gözlemlenmiştir. Wwox ifadesi seviyesinin ER ve PR durumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir, öyle ki Wwox ifadesi ER- ve PR- pozitif tümörlerde bu reseptörler için negatif olan tümörlere göre daha yüksektir (Chang ve diğ. 2018).

Meme kanseri hücrelerinde eksojen Wwox'un aşırı ifadesi veya endojen Wwox protein ifadesinin restorasyonu, kanser hücresi büyümesini baskılar ve in vitro apoptozu ve ksenograft tümör büyümesinin baskılanmasını indükler, bu da meme kanserlerinde Wwox sinyal yolunun yeniden aktivasyonunun terapötik potansiyele sahip olduğunu düşündürür. Wwox ifadesi, invaziv meme karsinomlarının %63'ünde azalır ve bu durum östrojen reseptör α seviyeleri ile ilişkilidir. Birçok tümör baskılayıcı genin ifadesi, kanserde epigenetik mekanizmalar tarafından azaltılır ve CpG açısından zengin gen promotör bölgeleri kanserlerde sıklıkla metillenir (Lliopoulos ve diğ. 2007). Şekil 2.20.'de Meme kanserinde WWOX'un düzenleyici mekanizmaları yer almaktadır.

Meme kanserinde WWOX ifadesi ile ER durumu arasında pozitif bir korelasyon gözlenir. Öte yandan, azalmış WWOX ifadesi, meme kanseri hastalarında daha kötü prognoz, daha yüksek relaps ve mortalite oranları ile ilişkilendirilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde, WWOX'un ayrıca HIF1 α düzenlemesi yoluyla glikoliz yolu genlerinin ifadesini modüle ettiği de bulunmuştur. FRA16D içindeki meme kanseri delesyonları %80'den fazla vakada gözlenir ve bu da WWOX kodlama bölgesindeki değişiklikleri meme kanserinde en yaygın genetik değişim haline getirir. Bununla birlikte, LOH, WWOX ifadesinin azalmasından sorumlu olan tek mekanizma değildir, hipermetilasyon ve WWOX'un kodlama bölgesindeki bazı nadir nokta mutasyonlarının da meme karsinogenezinde ve kanser ilerlemesinde rol oynadığı bulunmuştur (Pospiech ve diğ. 2018).



Şekil 2.20. Meme kanserinde WWOX'un düzenleyici mekanizmaları: WWOX, PPxY alanı içeren proteinleri bağlar ve bunları sitoplazmada sekestre ederek ErbB4, AP-2g, SMAD3 ve WBP2 dahil olmak üzere transkripsiyonel işlevlerini baskılar. WWOX'un Tyr33 fosforilasyonu, WW-PPxY etkileşimini destekler. Tyr287 fosforilasyon işlemi, WWOX çoklu-onarım ve bozunma ile ilişkilidir. WWOX ifadesinin kaybı veya azalması meme kanseri ile ilişkilidir. İmmünohistokimyasal boyama, normal insan meme dokusunda güçlü WWOX ekspresyonu gösterir. WWOX ekspresyonu, meme kanseri dokularının %55–63.2'sinde azalır ve meme kanseri dokularının %29'unda kaybolur. WWOX SDR alanının çoğunluğundan yoksun olan FORIII transkripti, meme tümörlerinin %50'sinde ve meme kanseri hücre hatlarının %90'ında eksprese edilir. Li and diğ. (2015)'den alınmıştır.

WWOX inaktivasyonunun, genom instabilitesine ve p53 kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Hem WWOX hem de p53 değişikliklerini barındıran hücrelerin, hücre büyümesi ve transformasyonuna katkı sağladığı ve dolayısıyla daha hızlı tümör oluşumuna sahip olduğu düşünülmektedir (Abdeen ve diğ. 2018).

İmmünohistokimya çalışmaları, WWOX protein düzeylerinin tümör alt tiplerine bağlı olarak değişebileceğini göstermiştir. Örneğin meme kanserinde, WWOX östrojenle regüle edilen bir gen olduğu için lümen tümörlerinde daha yüksek oranda ifade edilir. WWOX ifadesinin kaybı, ER-negatif meme tümörlerinde kötü bir prognoz ile ilişkilidir, ancak ER-pozitif meme kanserlerinde olduğu kadar değildir. Genomik kayıplar, WWOX ifadesinin inhibisyonuna yol açan ana mekanizma gibi görünmektedir. Bu nedenle meme ve ovaryum kanserlerinin yarısından fazlasının WWOX geni içinde heterozigot delesyonları vardır (Taouis ve diğ. 2021).

Meme kanserinde kromozom 16'nın uzun kolunu etkileyen genomik ve kromozomal anormallikler yıllar içinde sıklıkla rapor edilmiştir. Ayrıca, 16q'nun çeşitli bölgelerini etkileyen alelik kayıpların, karsinom gelişiminin invaziv öncesi aşamalarında meydana geldiği gözlemlenmiştir. Meme, ovaryum, karaciğer ve diğer karsinomlar ve lösemiler dahil olmak üzere çok sayıda neoplazide WWOX'u genomik ve ifade düzeyinde etkileyen anormallikler rapor edilmiştir. Ayrıca ektoptik WWOX ifadesinin, oldukça agresif meme karsinomu hatlarının ankrajdan bağımsız büyümesini ve in vivo tümörijenitesini inhibe ettiği gösterilmiştir ve bu protein için varsayılan bir tümör baskılayıcı rolü vurgulanmıştır (Nunez ve diğ. 2005).

WWOX'un, miRNA ifadesinin kontrolü yoluyla hem epitel hem de mezenkimal belirteçlerin seviyelerini düzenleyerek hücrel fenotipi kontrol ettiği bulunmuştur. WWOX, c-MYC ifadesinin negatif düzenlenmesi yoluyla, fibronektini hedefleyen miR-146a'nın birikmesini destekler. Bu yeni öngörülemez bulgular, WWOX kaybının, miRNA gen ifadesinin modülasyonu yoluyla üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin invazyonunu ve metastazını arttırdığını göstermektedir (Khawaled ve diğ. 2019).

2.14.Gen Susturulması ve Crispr

Gen düzenlemesi, hücrelere benzersiz kimlik ve işlev kazandırmak için gereklidir. Vücudumuzda birçok hücre tipi vardır, bu hücreler aynı zigottan geldikleri için aynı genoma sahiptir. Hücreleri birbirinden ayrı kılan şey, genlerin nasıl düzenlendiğidir. Gen düzenlemesini anlamak, hücrelerin hem kimliklerine hem

de işlevlerine ışık tutar. Çeşitli düzenleyici ve epigenetik mekanizmalar kısmen farklı kimlikleri ve işlevleri mümkün kılar (Das ve diğ. 2015).

CRISPR (düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrarlar), rehber RNA'lar (gRNA'lar) ve Cas9'un yardımıyla güçlü bir gen düzenleme aracıdır (Jin ve diğ. 2019).

Bir genin işlevini öğrenmek için yaygın bir yaklaşım, o genin ortadan kaldırıldığı bir hücre veya organizmanın fenotipini araştırmaktır. CRISPR teknolojisinin gelişmesine kadar bu yaklaşımı memeli hücrelerine uygulamak son derece zordu. Gen aktivitesini baskılamak için daha önceki yöntemler, her ikisi de FokI nükleaz temelli, bir DNA bağlama alanı içeren çinko parmak nükleazları (ZFN'ler) ve transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazları (TALEN'ler) içeriyordu. Bu yaklaşımlar belirli bir lokusta bir çift zincirli DNA kırık (DSB) oluşturma yeteneğine sahipken, hem ZFN'ler hem de TALEN'ler, farklı DNA dizilerini hedeflemek için DNA bağlanma alanlarının karmaşık yeniden yapılandırılmasını gerektirdi. Bu nedenle, çok yönlülükleri ve kullanışlılıkları son derece sınırlıydı (Giuliano ve diğ. 2019).

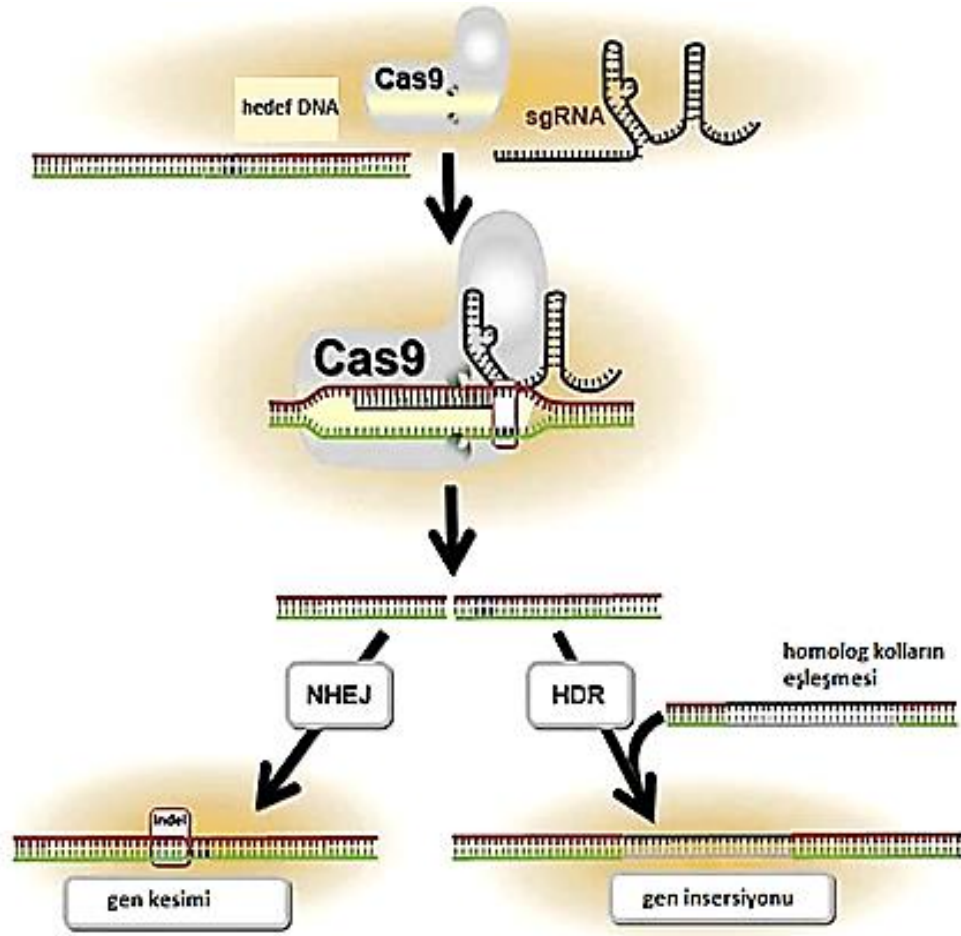
1987 gibi erken bir tarihte, CRISPR ilk olarak *Escherichia coli* K12'de bulundu. Geçen yirmi yılda, bu palindromik tekrarlar %40'tan fazla bakteride ve %90 arke'de tanımlanmıştır. CRISPR, istilacı virüs veya plazmitlerden gelen eksojen nükleotitler parçalarının boşluk bırakarak oluşturan tekrar dizilerini içerir ve lokusları genellikle cas gibi bazı endonükleazlarla çevrilidir. İlk olarak CRISPR RNA'ları (pre-crRNA'lar) kopyalanır ve daha sonra hedef DNA dizilerini tetikleyebilen ve parçalayabilen bir kompleks oluşturmak için Cas (CRISPR ile ilişkili protein) proteini ile birleşerek crRNA'lara işlenir (Chang ve diğ. 2016).

CRISPR ile ilişkili protein 9 (Cas9), Cas proteinleri arasında en yaygın kullanılanıdır. DNA'nın Cas9 aracılı bölünmesi iki RNA ile çalışır. İlk olarak; yabancı DNA'yı proto-aralayıcı bitişik motif (PAM) olarak adlandırılan 20 baz çifti uzunluğunda tamamlayıcı bir bölge aracılığıyla tanıyan crRNA, ve ikinci olarak crRNA ile hibridize olan trans-aktive edici CRISPR-RNA (tracrRNA). Bu sistemi kolaylaştırmak için, crRNA-tracrRNA füzyonu kimerik bir tek kılavuzlu RNA

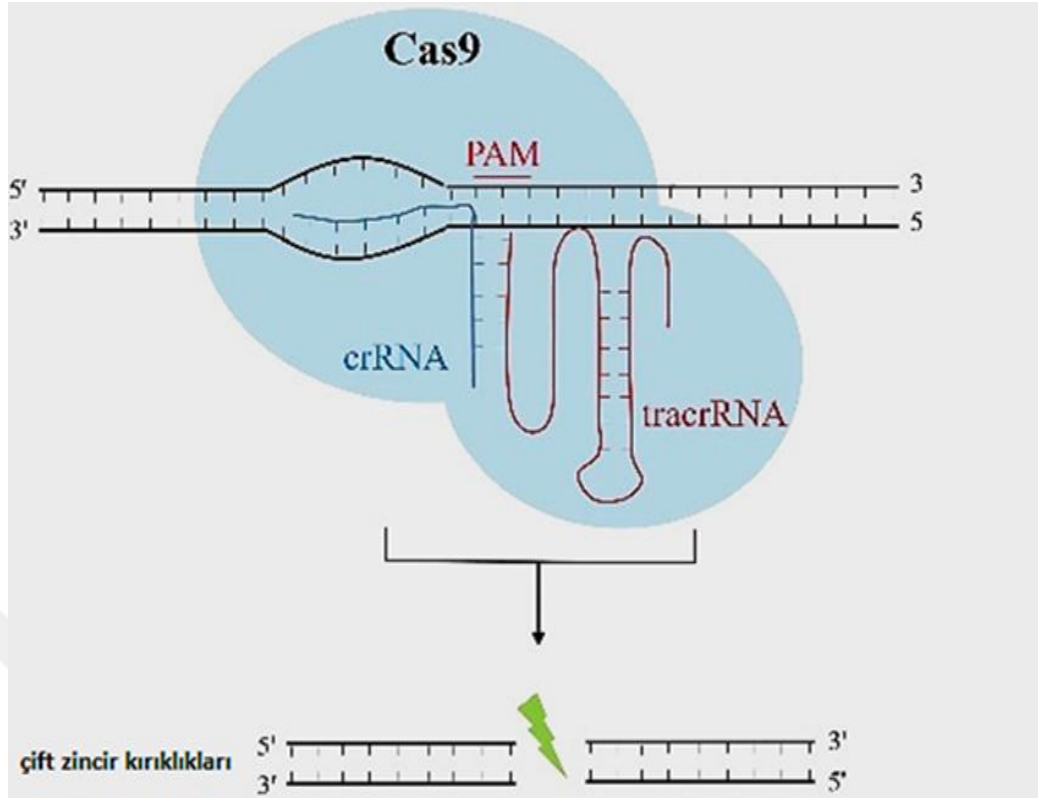
(sgRNA) halinde birleştirilir. Cas9, sgRNA'da ilgili bir DNA dizisine tamamlayıcı 20 nükleotitik bir bölge oluşturarak, uygun bir PAM dizisi ile herhangi bir genomik lokusa hedeflenebilir. DNA kesiminden sonra, DNA onarım mekanizmaları, bir knockout nedeni olabilen insersiyonları ve delesyonları (indels) tetikleyebilir (Lentsch ve diğ. 2019).

Bakteri genomlarında CRISPR dizilerinin tanımlanması daha sonra CRISPR olarak adlandırılan bir dizi homolog genin ve birlikte CRISPR lokusunu oluşturan ilişkili (cas) genlerin tanımlanmasına yol açtı. CRISPR-Cas'ın virüsle enfekte olmuş bakterilerin genomlarına eklenmesi, CRISPR-Cas'ın fajlara karşı direnç sağlayabileceğini ve enfeksiyona direncin aralayıcı-faj dizisinin eklenmesi veya silinmesiyle artırılabilir veya azaltılabileceğini ortaya koydu. Daha sonraki yıllarda CRISPR-Cas sisteminin, birlikte iki RNA hibrit bir yapı oluşturan olgun bir CRISPR RNA (crRNA) ve baz çiftli trans-aktive edici crRNA (tracrRNA) üretebileceği gösterildi. Bu iki RNA yapısı, CRISPR ile ilişkili protein Cas9'u spesifik DNA dizilerine yönlendirebilir ve hedef DNA'da DSB oluşturabileceği gözlemlendi (Yang ve diğ. 2019).

CRISPR/Cas9'un ortaya çıkmasından önce, RNAi, protein kodlayan genlerin ifadesini baskılamak için yaygın olarak kullanılıyordu. Bununla birlikte, RNAi'nin, ncRNA'ların interferansı için kullanıldığında verimsiz bir yaklaşım olduğu kanıtlanmıştır. Birincil ncRNA'lardan biri olarak miRNA'lar, CRISPR/Cas9 ile ilgili alanda geniş çapta araştırılmıştır. CRISPR/Cas9, ilgili miRNA'ların biyogenez işleme bölgelerini spesifik olarak hedefleyen sgRNA'larla yapılır. Birincil miRNA'ların yapısı üzerinde CRISPR/Cas9 tarafından oluşturulan değişikliklerin, bu olgun miRNA'ların hem in vivo hem de in vitro ifadesinde azalmalara yol açabileceği gösterilmiştir. Hepatoselüler karsinom (HCC) hücre dizilerinde miR-3188'i başarılı bir şekilde knockout etmek için CRISPR/Cas9 sistemi kullanılmış ve miR-3188 KO'nun hücre büyümesini, invazyonunu ve göçünü etkili bir şekilde bastırıldığını ve ksenograft tümör büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur (Yang ve diğ. 2017). Şekil 2.21.'de genom düzenlemede CRISPR/Cas9 sisteminin uygulanması yer almaktadır. CRISPR-Cas9 sistemi tarafından oluşturulan DSB'lerin şematik gösterimi ise şekil 2.22.'de yer almaktadır.



Şekil 2.21. Genom düzenlemede CRISPR/Cas9 Sisteminin uygulanması. Mckee ve diğ. (2019)'nden alınmıştır.



Şekil 2.22. CRISPR-Cas9 tarafından oluşturulan DSB'lerin şematik gösterimi. crRNA ve tracrRNA ile birlikte Cas9, DNA çift sarmallarını spesifik olarak kesebilir ve DSB'lere neden olabilir. Yang ve diğ. (2017)'nden alınmıştır.

CRISPR/Cas9'un belirli bir miRNA'ya uygulanması, terapötik inhibisyona yönelik yeni bir yaklaşımdır. CRISPR/Cas9 düzenlemesinin neden olduğu miRNA yıkım fenotipi, hem in vitro hem de in vivo modellerde 30 güne kadar stabil bir şekilde muhafaza edilebilir. CRISPR/Cas9 sisteminin uygulamalarının, kodlamayan RNA etkileşimi ile ilişkili kanseri tedavi etmek için bir yol sağlayabilir (Nguyen ve Chang 2017).

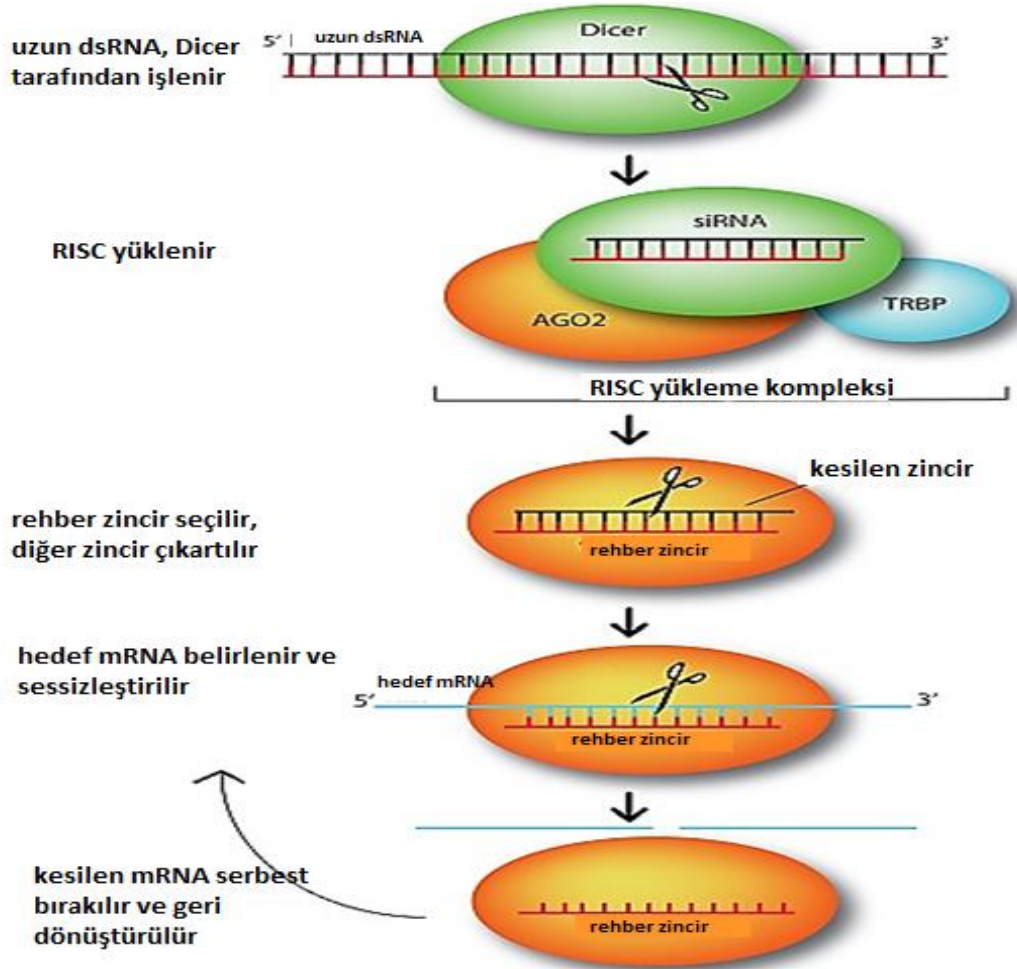
CRISPR'ın kullanılabileceği pek çok alan mevcuttur. CRISPR, DNA dizilerindeki bazı mutasyonların neden olduğu genetik hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. Örneğin, Huntington hastalığına genomda yanlış nükleotid çiftlerine sahip olarak görülebilen HTT genlerindeki mutasyon neden olur. HTT genindeki yanlış nükleotidleri doğru olanlarla değiştirmek için CRISPR kullanılabilirse Huntington hastalığı kolaylıkla tedavi edilebilir. CRISPR'nin sonsuz uygulamaları olmasına rağmen, hala iki zorlukla karşı karşıyadır. İlk zorluk, hedef dışı problemdir. İkincisi ise CRISPR'ın etik sorunlarıdır. Organizmaların tarımsal veya biyolojik

kullanım için düzenlenmesine izin verilse bile, insan genomunun düzenlenmesi hala çok tartışmalıdır. Genetik düzenleme sırasında hatalar veya hedef dışı etki meydana gelirse, hastalar ciddi genetik mutasyona neden olabilir, bu da sadece hastaların sağlık durumunu değil aynı zamanda gelecek nesilleri de etkileyebilir (Shen ve diğ. 2017).

2.15.siRNA

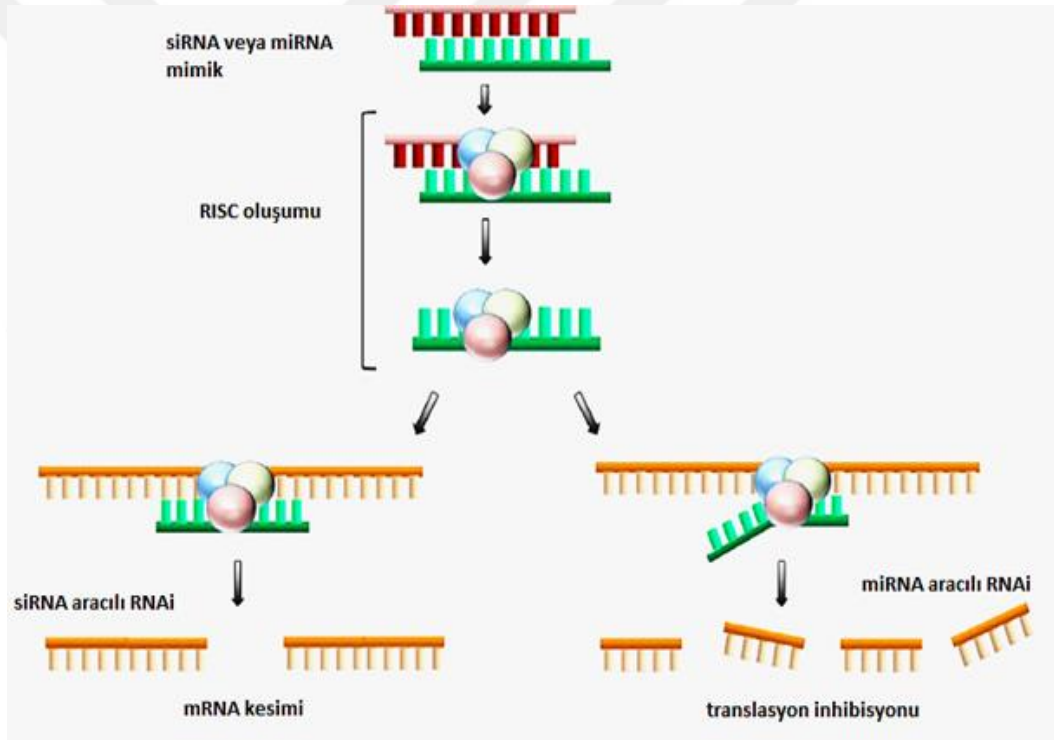
RNA interferans teknolojisi son on yılda ortaya çıkmıştır. Kodlamayan RNA'lar, onkogenik mRNA'ların ilgili proteinlerine translasyonunu önlemek için kullanılır (Barsoum ve diğ. 2020).

RNA interferans yolu, degradasyonu artırarak ve böylece istenmeyen mRNA dizilerinin translasyonunu azaltarak çalışır. siRNA, hücre sitoplazmasına ulaşmak için tasarlanmış 19-23-baz çiftli bir nükleotit dizisidir ve RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) ile bağlanır. RISC ile bağlanma, sens zincirinin bozulmasına yol açarken, antisens dizisi RISC'ye dahil olmaya devam eder. RISC daha sonra tek gen ifadesini azaltmak etmek için çoklu mRNA'yı kırpar. Bu terapötik mekanizma, mevcut tedavilerin bağışıklık sistemini baskılayarak, hedef dışı organlara zarar vererek veya bağışıklık reaksiyonlarını indükleyerek vücudu çok geniş ölçüde etkileyen hastalıklar için umut vericidir. Terapötik amaçlar için siRNA, hatalı proteinleri, proinflamatuvar sitokinleri, vb. kodlayan mRNA dizilerini hedeflemek üzere tasarlanabilir (Chevalier 2019). siRNA aracılı gen sessizleştirilmesi Şekil 2.23.'de detayları ile gösterilmiştir.



Şekil 2.23. siRNA aracılı gen sessizleştirilmesi: siRNA, hedef mRNA'larının diziyeye bağlı dilimlenmesine rehberlik ederek hedef genlerin susturulmasına aracılık eder. Bu kodlamayan, susturucu RNA'lar, endonükleaz Dicer tarafından kısa, aktif ~21-25 nt yapılara işlenen uzun dsRNA molekülleri olarak başlar. Bir siRNA dupleksini oluşturulduktan sonra, RNA bağlayıcı protein TRBP'nin yardımıyla Dicer tarafından RNA kaynaklı susturma kompleksinin (burada sadece AGO2 ile temsil edilen) kalbi olan Argonaute (AGO2) üzerine yüklenir. yükleme üzerine, AGO2 siRNA kılavuz dizisini seçer, ardından yolcu dizisini böler ve çıkarır. AGO2'ye bağlıyken, kılavuz iplik daha sonra AGO2'nin hedefi dilimlemesine yetecek kadar uzun olan tamamlayıcı hedef mRNA'ları ile eşleşir. Dilimlemeden sonra, bölünmüş hedef mRNA serbest bırakılır ve RISC, birkaç tur daha dilimleme için aynı yüklü kılavuz iplik kullanılarak geri dönüştürülür (Dana ve diğ. 2017).

miRNA ve siRNA, 2 tip küçük RNA molekülünü temsil eder. Her iki küçük RNA tipinin işlenmesi hemen hemen aynıdır. Temel fark, onların etki mekanizmasıdır. Genel olarak, siRNA, mRNA ile mükemmel tamamlayıcılık gerektirir, ancak miRNA'nın transkriptlerini hedeflemesi için daha az mükemmellik gerekir. Bir miRNA, birkaç farklı transkripti hedefleyebilir. Diğer bir temel fark, siRNA'ların tipik olarak mRNA degradasyonu yoluyla transkripsiyon sonrası bir seviyede gen ekspresyonunu inhibe etmesidir. miRNA'lar ise hedef genlerini esas olarak translasyonel baskı yoluyla susturur (Subhan ve Torchilin 2019). siRNA ve miRNA'nın RNAi mekanizmasının ortak şematik gösterimi Şekil 2.24.'de yer almaktadır.

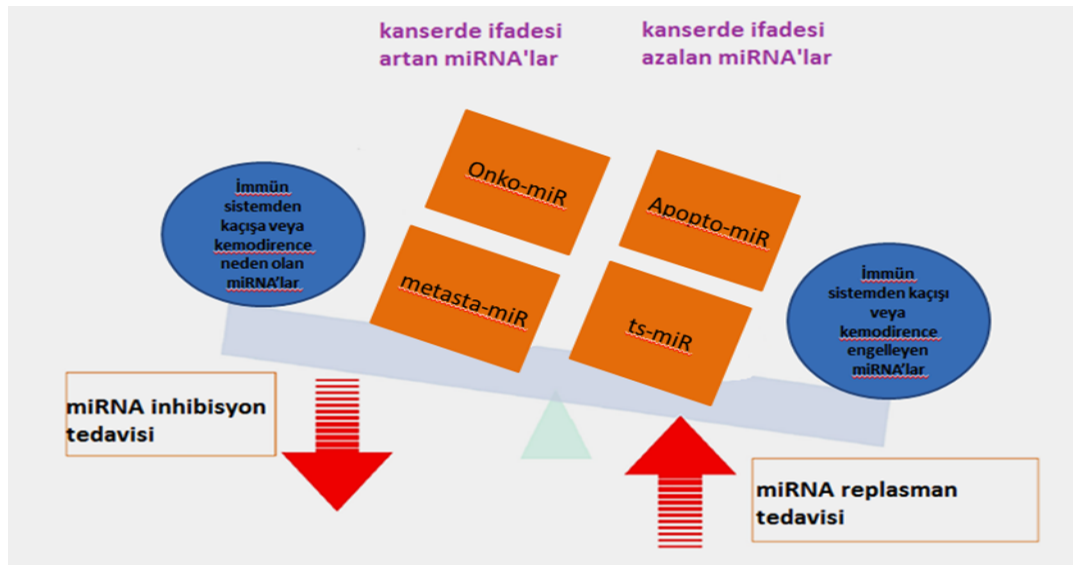


Şekil 2.24. siRNA ve miRNA'nın RNAi mekanizması. Solda siRNA ile, antisens ve hedef mRNA (sarı) arasındaki tam homoloji, mRNA'nın bölgeye özgü yıkımına ve degradasyonuna yol açar. Buna karşılık, aktif miRNA zinciri ve mRNA hedefi arasındaki kısmi dizi özdeşliği; translasyonun inhibisyonuna, decapping ve ardından mRNA degradasyonuna yol açar (sağda). Subhan ve torchilin (2019)'den alınmıştır.

siRNA'ların bağışıklık algılamayı atladığı ve memeliler gibi daha yüksek organizmalarda gen yıkımı için kullanılabileceği bulunduğu bir farkındalık oluşturmuştur. Temel araştırmalarda geniş kullanımın yanı sıra, siRNA'lar artık terapi için genleri hedeflemek üzere geliştirilmektedir (Neumeier ve Meister 2021).

2.16.miRNA tedavileri

miRNA'lar degradasyon veya translasyon baskılanması için spesifik mRNA'ları hedefleyerek RNA susturma ve gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde önemli bir düzenleyici rol oynar. miRNA'lar geleneksel kemoterapötiklere karşı kemosenitiviteyi de arttırabilir. miRNA tabanlı gen tedavisi olasılığı ne kadar ilginç olsa da, miRNA'ların tümör bölgelerine güvenli ve verimli bir şekilde iletilmesini sağlamada büyük zorluklar vardır. Bunlardan bir tanesi sentetik oligonükleotitlerin vücutta her zaman mevcut olan nükleazlara karşı savunmasızlığıdır. İkincisi ise, miRNA terapötik ajanlarının kanserli hücreleri hedefleyebildiği etkinlikle ilgilidir (Roy ve diğ. 2021). Kanser ilerlemesi ile ilişkili miRNA'ların artmış ya da azalmış ifadelerinin isimlendirilmesi Şekil 2.25.'de yer almaktadır.



Şekil 2.25. Kanser ilerlemesi ile ilişkili miRNA'ların kategorizasyonu. Tümör dokularında; genellikle oncomiR'ler ve metastamiR'ler yukarı regüle edildiği için

yüksek ekspresyona, apoptomiR'ler ve tümör baskılayıcı tsmiR'ler aşağı regüle edildiği için düşük ekspresyona sahiptir. Roy ve diğ. (2021)'nden alınmıştır.

2.16.1.Replasman

miRNA bazlı terapötikler geliştirmek için iki genel yaklaşım vardır. Birincisi, ifadesi azalan spesifik proteinlerin ifadesini arttırmak için miRNA antagonistlerinin veya inhibitörlerinin geliştirilmesine dayanır. İkinci yaklaşım ise, anormal şekilde indüklenen proteinlerin ifadesini azaltmak için miRNA mimic kullanılmasından oluşur (hum ve loiselle 2021).

Tümör baskılayıcı miRNA'lar'ın genellikle kanser hücrelerinde ifadesi azalır ve sonuç olarak hedef onkogenlerin artması ve tümörigenezin desteklenmesine yol açar. miRNA replasman tedavisi, kaybolan işlevi geri kazanmak için tümör baskılayıcı miRNA'nın yeniden verilmesinden oluşur. Bu amaçla, birkaç ajan kullanılabilir. Bunlar, küçük moleküller, miRNA mimic ve miRNA'nın endojen ifadesini epigenetik olarak değiştiren bir miRNA genini kodlayan DNA plazmidleri olabilir. miRNA fonksiyonunun restorasyonu için kullanılan küçük moleküller, miRNA sentezini ve işlenmesini artırarak miRNA ifadesini spesifik olmayan bir şekilde indükleyen hipometile edici ajanlardan oluşur (Gomaras ve diğ. 2020).

Hastalığın gelişmesi veya ilerlemesi nedeniyle seviyesi düşen bir miRNA'nın seviyesini arttırmak için miRNA mimicleri kullanılır. miRNA mimic, yetersiz ifade edilen endojen miRNA ile aynı diziyeye sahip olan sentetik olarak üretilmiş RNA molekülleridir. Bunlar, ilgilenilen miRNA'nın normal ifadesini ve işlevini yeniden oluşturabilir. Kısa heteronuklear RNA'ları (shRNA'lar), miRNA değiştirme aracı olarak da kullanılabilir. Bu sentetik RNA molekülleri, miRNA yolunun endojen işleme mekanizmaları tarafından olgun hale getirilir. Kanserde, miRNA'ların çoğu, sağlıklı dokuya kıyasla daha düşük bir seviyede ifade edilir. Bu nedenle, anti-tümör terapötikleri olarak miRNA'ların geliştirilmesine büyük yatırım var. Birçok miRNA hücre döngüsünü düzenler ve tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahip olduğu düşünülür. Bu miRNA'ların değiştirilmesi, mevcut kanser tedavilerini tamamlayabilir veya arttırabilir (Bajan ve Hutvagner 2020).

miRNA mimik uygulanması çok umut verici olsa da, klinik uygulamaları için en büyük zorluklardan biri, etkili, verimli ve spesifik bir transfer sağlamak için en uygun dağıtım sisteminin geliştirilmesidir (Gomaras ve diğ. 2020). miRNA mimiklerinin kullanımını ve bu taklitlerin kanser gelişimine etkilerini içeren çalışmalar Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. miRNA mimiklerinin kullanımını ve bu mimiklerin kanser gelişimine etkilerini içeren çalışmalar. Kumoğlu ve diğ. (2019)'nden alınmıştır.

miRNA mimik	Kanser tipi	Etkisi
Let-7 ailesi	meme	Büyüme ve migrasyonu inhibe eder, metastazı azaltır
	mide	Multiilaç direncini tersine çevirir
miR-1	mide	Hücre proliferasyon, invazyon ve migrasyonu inhibe eder, MET'i hedefleyerek apoptozu destekler
miR-21	meme	STAT3'ü hedefleyerek, hücre proliferasyonunu uyarır
	mide	Kanser büyüme ve invazyonunu uyarır
	endometrial	Hücre proliferasyonunu destekler
miR-34a	akciğer	Farede Bcl-2'yi hedefleyerek akciğer tümörünü inhibe eder
	prostat	Kanser kök hücrelerini ve metastazı inhibe eder
	pankreas	Farede pankreatik kanser büyümesini inhibe eder
miR-125b	meme	EPO ve reseptörü EPOR'u hedefler
	retinoblastoma	Tümör büyümesi ve apoptoz baskılanmasını destekler
miR-143	mide	DNMT3A'yı hedefleyerek hücre invazyon ve proliferasyonunu inhibe eder
miR-145	akciğer	FSCN1 tarafından ifadesinin azaltılması, migrasyon ve invazyonu inhibe eder
	kolon	Pim-1'i hedefleyerek tümör proliferasyonunu azaltır, apoptozu artırır
	prostat	Radyasyona karşı tümör hassasiyetini modüle eder

Tablo 2.1. (Devam) miRNA mimiklerinin kullanımını ve bu mimiklerin kanser gelişimine etkilerini içeren çalışmalar. Kumoğlu ve diğ. (2019)'nden alınmıştır.

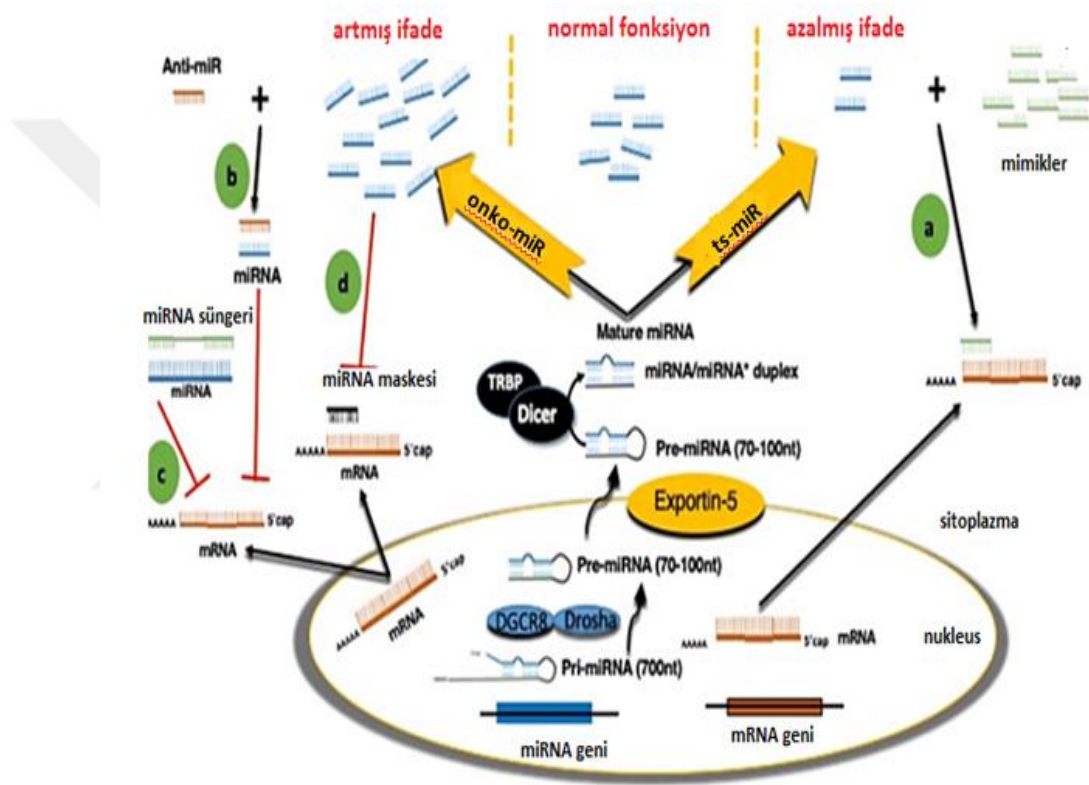
miR-155	ovaryum	Apoptozu destekler
miR-181b/217	prostat	Kemo hassasiyeti artırır
miR-199a	ovaryum	mTOR'u inhibe ederek, cisplatin direncini tersine çevirir
miR-203	servikal	Proliferasyon ve migrasyonu azaltır
	endometrial	SOX4 geninin ifadesini azalttırarak, hücre proliferasyon ve migrasyonu ile ilişkili gen ifadesini düzenler
	glioblastoma	PLD2'yi hedefleyerek proliferasyon ve invazyonu inhibe eder
miR-221/222	prostat	Büyüme ve invazyonu destekler
	hepatosellüler karsinom	Büyüme ve invazyonu destekler
miR-340	akciğer	Hücre proliferasyonunu baskılar, apoptozu uyarır
	meme	Kanser gelişimini inhibe eder
miR-452	meme	Docetaxel direncini destekler, apoptotik hızı azaltır

2.16.2.miRNA İnhibitörleri

Onkogenik miRNA'lar kanserde aşırı ifade edilir ve bunların inhibisyonu, hedef tümör baskılayıcı genlerin normal ifadesinin ve fonksiyonunun restorasyonuna katkıda bulunabilir. miRNA inhibitörleri genellikle onkogenik miRNA dizisini tamamlayan ve tamamlayıcı miRNA ile afiniteyi arttırmak için kimyasal olarak modifiye edilen tek sarmallı oligonükleotitlerdir. miRNA inhibitörleri arasında antisens anti-miRNA oligonükleotitleri (AMO'lar), kilitli nükleik asit (LNA) anti-miR'ler, antagomiR'ler, miRNA sponge, miRNA maskeleri ve miRNA'ların küçük molekül inhibitörleri (SMIR'ler) bulunur (Guo ve diğ. 2018).

miRNA'ların fonksiyonel rolleri, miRNA fonksiyonunu baskılayan nükleik asit bazlı moleküller olan inhibitörler kullanılarak araştırılabilir. Sentetik miRNA

inhibitör tasarımları, olgun miRNA'nın (hedef bölge) ters tamamlayıcısını içerir ve RISC'nin neden olduğu bölünmeyi önlemek, bağlanma afinitesini arttırmak ve nükleolitik bozunmaya karşı direnç sağlamak için kimyasal olarak modifiye edilir. Bir hücreye verildiğinde, endojen olgun miRNA'ların bu tamamlayıcı sentetik hedef bölgelerine bağlanmasının geri döndürülemez olduğu düşünülür, bu nedenle bu inhibitörlerin endojen miRNA'yı baskıladığı ve onu normal işlev için kullanılamaz hale getirdiği varsayılır (Robertson ve diğ. 2010). miRNA biyogenezinin şematik diyagramı ve terapötik stratejiler Şekil 2.26.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.26. miRNA biyogenezinin şematik diyagramı ve terapötik stratejiler. Bu şekilde; oncomiR ve tsmiR'ler için miRNA bazlı moleküler kanser tedavisi ürünleri miRNA mimikleri (a), anti-miRNA oligonükleotitleri (anti-miR'ler) (b), miRNA süngerleri (c) ve miRNA maskeleyesi (d) yer almaktadır. Kumoğlu ve diğ. (2019)'nden alınmıştır.

2.16.2.1.miRNA Antagonistleri (Antagomirs)

AntagomiR'ler, 23-nt uzunluğunda, ilgilenilen miRNA'yı tamamlayıcı ve hem kimyasal olarak modifiye edilmiş hem de kolesterol konjuge edilmiş tek sarmallı RNA molekülleridir. LNA'lar, miRNA fonksiyonel çalışmaları için in vitro çalışmalarda yaygın olarak kullanılmış ve miRNA inhibitörleri olarak potansiyellerini ortaya çıkarmıştır (Gomarasu ve diğ. 2020).

AntagomiR'ler, oncomiR'leri bağlayarak ve bloke ederek miRNA ile ilgili yolları etkiler. Bu nükleik asit antagonistleri, oncomiR'leri inhibe etmenin bilinen yollarından biridir ve bu nedenle kanseri tedavi etmenin etkili bir yolu olabilirler. AntagomiR'ler, riboz kalıntılarının 2-O-metilasyonunu, 3-konjuge kolesterol kalıntılarını ve fosfodiester bağlarının fosforotioat bağları yoluyla kısmen değiştirilmesini içeren, kimyasal olarak tasarlanmış antisens oligonükleotitlerdir (Kaboli ve diğ. 2015). Kanser tedavisinde çalışılan bazı anti-miRNA'lar Şekil 2.27.'de yer almaktadır.

anti-miRNA	kanser tipi	etkisi
miR-10b	meme kanseri	Hoxd10'u hedefleyerek metastazı azaltır
miR-21	meme kanseri retinoblastoma kolorektal kanser	tümör büyümesinin inhibisyonu ve kemo-hassasiyetinin artırılması malignant ilerlemeyi inhibe eder hücre büyümesi ve invazyonunu inhibe eder hücre büyümesini baskılar
miR-96	akciğer kanseri	LMO7'yi hedefleyerek tümör baskılayıcı rol oynar
miR-133b	ovaryum kanseri	MDR1'i hedefler ve ilaç direncini azaltır
miR-155	meme ve prostat kanseri	kanser ilerleyişini inhibe eder ANX7'yi hedefleyerek hücre döngüsünü durdurur
miR-182	ovaryum ve meme kanseri	BRCA1, FOXO3 ve HMGA2'yi hedefler ve ilerleyişi azaltır tümör oluşum eğilimini ortadan kaldırır
miR-191	meme kanseri	kemo-hassasiyeti artırır
miR-200	endometrial kanser	kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eder

Şekil 2.27. Kanser tedavisinde çalışılan bazı anti-miRNA'lar. Kumoğlu ve diğ. (2019)'nden alınmıştır.

2.16.2.2.miRNA Sponge

miRNA sponge, DNA vektörlerindeki güçlü promotörden kopyalanan, çoklu ve tandem miRNA bağlanma bölgeleri aracılığıyla ilgili hedef miRNA'ya rekabetçi bir şekilde bağlanan, RNA transkriptidir. RNA polimeraz II'den ifade edilen bu RNA transkriptleri, genellikle iyi izlenip sıralanabilmek için bir floresan raportör gene bağlanmak üzere tasarlanmıştır. Bir kez transfekte edildikten ve hücrelerde istikrarlı bir şekilde ifade edildikten sonra miRNA sponge, hedef bireysel miRNA'ya veya tüm miRNA ailesine karşı uzun süreli veya kalıcı baskılama uygulayabilir. Bu avantajlarla miRNA sponge uygulanması ve araştırılması, anti-miRNA oligonükleotitlerini (AMO) geride bırakmaktadır (Chen ve diğ. 2017). Kanser tedavisinde çalışılan bazı sponge miRNA'lar ve bunların etki mekanizması Şekil 2.28.'de yer almaktadır.

süngerler	kanser tipi	etkisi
miR-9	meme kanseri	metastaz oluşumunu inhibe eder
miR-10b	meme kanseri	hücrelerin invazyon ve migrasyonunu inhibe eder
miR-19/ miR-155	hematopietik kanser	hücre büyüme ve invazyon inhibisyonunu destekler
miR-21	melanoma KHDAK böbrek kanseri karaciğer kanseri	anti-kanser aktivitelerde rol oynar PDCD4 ekspresyonunu arttırarak invazyon migrasyon ve proliferasyonu azaltır proliferasyon, invazyon ve migrasyonu inhibe eder MAP2K3'ün regülasyonunu arttırarak hücre proliferasyonunu baskılar
miR-221	melanoma	anti-kanser tedavilerde rol oynar

Şekil 2.28. Kanser tedavisinde çalışılan bazı sponge miRNA'lar. Kumoğlu ve diğ. (2019)'nden alınmıştır.

Sponge RNA'lar, ilgilenilen miRNA'lara tamamlayıcı bağlanma bölgeleri içerir. miRNA sponge transgenik hücrelerden oluşur ve aynı aileden diğer tüm miRNA'ları bloke eder. İki-yedi spesifik ardışık nükleotit içeren belirli miRNA'ların dizilerine bağlanır. miRNA sponge birden fazla bağlanma yeri vardır (genellikle 4-16). Hem RNA polimeraz II hem de III promotörleri, miRNA sponge kopyalamak için kullanılmıştır, bununla birlikte, RNA polimeraz II promotörlerinin transkriptleri 5' cap ve 3' poliadenillenmiş kuyrukları nedeniyle daha stabildir (Kaboli ve diğ. 2015).

2.16.2.3.miRNA Maskeleye

miRNA-maskeleye (miR maskesi), antisens oligonükleotit teknolojisine dayanan başka bir yöntemdir. miRNA sponge'dan farklı olarak miR maskeleri, spesifik bir hedef mRNA'nın 3'-UTR'sindeki öngörülen miRNA bağlanma bölgelerini tamamen tamamlar. Böylece miR maskesi, miRNA'nın, inhibitör işlevi bozmak için hedef mRNA üzerindeki bağlanma bölgesine erişmesini önler. miRNA maskeleye yaklaşımının sonuçlarının öngörülemezliği, eksiklikleri ve dezavantajları, onu umut verici bir terapötik yaklaşımdan uzak kılmaktadır. Bu nedenle son yıllarda bu yöntemle yapılmış tutarlı çalışmalar bulunmamaktadır (Kumoğlu ve diğ. 2019).

2.16.2.4.Anti-miRNA Oligonükleotitleri (AMO'lar)

Anti-miRNA Oligonükleotitleri (AMO'lar) hedeflenen miRNA'yı tamamlayan, olgun miRNA'yı bağlayan ve rekabetçi inhibitörler olarak hareket eden, böylece spesifik hedef mRNA ile etkileşimi engelleyen 17-22 nükleotit uzunluğunda tek sarmallı, kimyasal olarak modifiye edilmiş antisens oligonükleotitlerdir. Terapötik bir perspektiften miRNA'yı modüle etmek için iki yaklaşım kullanılmıştır. Bir tanesi, miRNA mimic olarak adlandırılan sentetik RNA dupleksleri tarafından miRNA aktivitesinin restorasyonudur. Diğer yaklaşım, miRNA'nın antagomir olarak bilinen AMO'lar tarafından inhibisyonudur. Antagomir, kimyasal olarak modifiye edilmiş bir AMO'dur. Antagomir gelişimi ilerlemesine rağmen, antagomiri hedef dokulara ileten taşıyıcılar olmadan antagomirin etkinliği sınırlı kalmaktadır (Guo ve diğ. 2018).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Bu tez çalışması Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan cihazlar **Tablo 3.1.**'de, çalışmada kullanılan kimyasallar **Tablo 3.2.**'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka
Analitik Hassas Terazî	RADWAG, AS 220.R2
İnkübatör	Heal Force
Soğutmalı Santrifüj Micro 200R	Hettich
Güç Kaynağı	Bio-RAD
Agaroz jel tankı	Bio-RAD
Vorteks	Isolab
Farklı Hacimlerde Otomatik Mikro Pipetler	Eppendorf
Manyetik Isıtıcı	Scilogex, MS-H-S
Nano-100 Micro-Spektrofotometre	AllSheng
Biyogüvenlik Kabini	Biobase

Tablo 3.1. (Devam) Çalışmada kullanılan cihazlar

Su Banyosu	Nüve
Akış Hücre Sitometrisi	Beckman Coulter, Navios
Jel görüntüleme cihazı	Bio-Rad
Buzdolabı	Bosch
Real Time PZR cihazı	Roche, LightCycler 2.0
PZR cihazı	Bio-Rad, T100 Thermal Cycler
İnvert ışık mikroskobu	Olympus CKx53
Işık mikroskobu	Olympus
CO ₂ 'li inkübatör	Heal Force/HF90 Smart Cell

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Marka ve Katalog Numarası
Opti-MEM (1X) Glutamax	GIBCO 51985-026
Lipofectamin RNAiMAX	INVITROGEN 13778-030
Alexa Flour 488 Annexin V/Dead Cell Apoptoz kit	INVITROGEN V13245
Trypan Blue Stain (%0,4)	GIBCO 15250-061
Tripsin/EDTA	MULTICELL 325-043-EL
PenStrep (Pencillin-Streptomycin)	GIBCO 15140-122
PeqGOLD Universal Agaroz	peqLAB HD00020
Borik Asit	MERCK 1.00165.1000
Sodyum Chloride	MERCK 1.06404.1000
Tris (hidroksimetil)	MERCK 1.08382.0500
DNAase/RNAase içermeyen su	QIAGEN 157033234
Cisplatin	MCE CS-1122
E.D.T.A. disodium	MULTICELL 625-060-CG
MDA-MB-231 (ATCC HTB-26)	Prof. Dr. Cenk ARAL'ın hediyesidir.

Tablo 3.2. (Devam) Çalışmada kullanılan kimyasallar

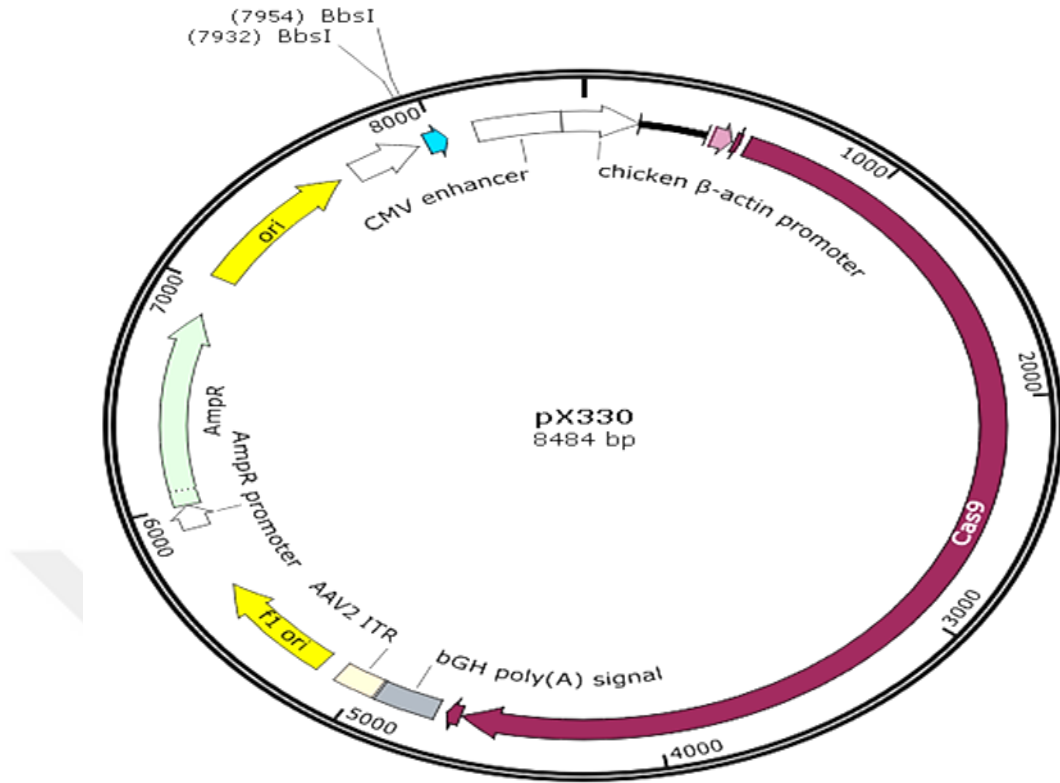
DMEM HIGH GLUCOSE, PYRUVATE	GIBCO D6429
T4 DNA Ligase Buffer (10X)	THERMO B69
Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity	THERMO 12532016
QIAprep Spin Miniprep Kit (50)	QIAGEN 27104
Competent cells (TOP10 One Shots)	INVITROGEN C404010
T4 PNK Kinaz Buffer	NEB B0201S 10X
T4 PNK	NEB M0201S 500 UNITS
10X FastDigest Buffer	FERMENTAS B64
Lipofectamine 2000, 0.75ml	INVITROGEN <u>11668027</u>
miRNeasy Mini Kit	QIAGEN 217004
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	APPLIED BIOSYSTEMS BY LIFE TECHNOLOGİES 4868814
Primer 200 baz 50 nmol desalted	SENTEBIOLAB
LightCycler kapiller	ROCHE 04929292001
ATP	INVITROGEN 18330019

Tablo 3.2. (Devam) Çalışmada kullanılan kimyasallar

DTT	INVITROGEN R0861
Quick Ligation Kit	NEB M2200S
High Pure Template Preparation Kit	ROCHE 11796828001
FBS (Fetal Bovine Serum)	GIBCO 10500-064
T4 PNK Kinaz Bufer	NEB B0201S 10X

3.2. Rehber RNA Tasarımı ve pX330 Cas9 Plazmide Klonlanması

Öncelikli olarak, miR-182 gen lokusunun birinci ekzonuna özgül, protospacer bitişik motif (PAM, NGG) dizisi ile sınırlandırılmış 20 baz çiftlik bir rehber RNA (gRNA) tasarlandı. gRNA tasarımı <http://crispr.mit.edu/> online veritabanında yer alan Benchling programı üzerinden gerçekleştirildi. Tasarlanan gRNA'lar Tablo 3.3.'de yer almaktadır. gRNA'ların klonlanması için Şekil 3.1.'de yer alan pX330, bir insan kodunu optimize edilmiş SpCas9 ve kimerik rehber RNA ekspresyon plazmidi, temin edildi.



Şekil 3.1. pX330, bir insan kodunu optimize edilmiş SpCas9 ve kimerik rehber RNA ekspresyon plazmididir. NOVOPRO (2022)'dan alınmıştır.

CRISPR-Cas9 sisteminde Cas9 proteini NGG PAM motifini tanır. PAM'ı tanıdığı anda, bitişik dizi, gRNA'nın 20bp'lik tanıma bölgesi ile eşleşebilir. Baz eşleşmesi başarılı olursa, Cas9 proteini genomik DNA'da çift zincirli bir kırık oluşturur. Baz eşleşmesi ve PAM tanıma her zaman hedeflendiği gibi gerçekleşmeyebilir. Hedef bölgede çift zincir kırığı gerçekleştirmek için ve düşük olasılıklı hedef dışı durumlar için 3 farklı gRNA çift zinciri dizayn edildi. Tasarlanan gRNA oligonükleotitleri 50nmol olarak dizayn edildi. 100 μ M'lık stok hazırlamak için nükleaz içermeyen iki kez distile edilmiş su (ddH₂O) ile sulandırıldı. Tablo 3.4.'de sulandırma miktarları yer almaktadır.

Tablo 3.3. miR-182 CRISPR knockout için tasarlanan klonlama gRNA'ları

Dizayn edilen klonlama gRNA'ların isimleri	Dizayn edilen klonlama gRNA'ların dizileri (5'-3')
miR-182 gRNA1 F (25bp)	CACCGCCATTGCCAAAAACGGGGGG
miR-182 gRNA1 R (25bp)	AAACCCCCCGTTTTTGGCAATGGC
miR-182 gRNA2 F (25bp)	CACCGCTACCATTGCCAAAAACGGG
miR-182 gRNA2 R (25bp)	AAACCCCGTTTTTGGCAATGGTAGC
miR-182 gRNA3 F (25bp)	CACCGTCTACCATTGCCAAAAACGG
miR-182 gRNA3 R (25bp)	AAACCCGTTTTTGGCAATGGTAGAC

Tablo 3.4. gRNA'ların sulandırma miktarları

Dizayn edilen rehber RNA'ların isimleri	100 μ M'lık stok için liyofilize oligonükleotitlere eklenen ddH ₂ O miktarı
miR-182 gRNA1 F	504,8 μ l
miR-182 gRNA1 R	442,3 μ l
miR-182 gRNA2 F	391,2 μ l
miR-182 gRNA2 R	450,9 μ l
miR-182 gRNA3 F	421,1 μ l
miR-182 gRNA3 R	427,1 μ l

3.2.1. Oligonükleotitlerin 5'Ucunun Fosforlanması

Oligonükleotitler Tablo 3.5.'de yer alan koşullara göre fosforlandı. Bu işlem tasarlanan her 3 çift oligonükleotit için uygulandı. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra **Tablo 3.6.**'de yer alan koşullara göre Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yapıldı.

Tablo 3.5. Oligonükleotitlerin fosforlanma reaksiyon koşulları

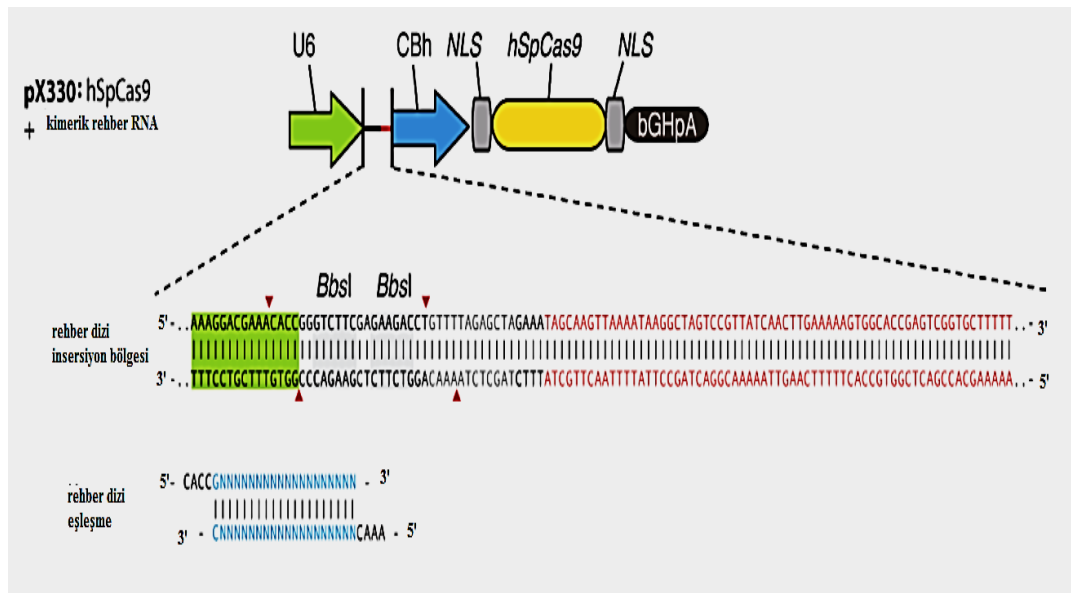
Reaksiyon	Miktar
ddH ₂ O	5,5 µl
mir-182 gRNA1 F (100 µM)	1 µl
mir-182 gRNA1 R (100 µM)	1 µl
10X T4 ligasyon bufer	1 µl
T4 Polinükleotit Kinaz Bufer	1 µl
T4 Polinükleotit Kinaz	0,5 µl
Toplam Hacim	10 µl

Tablo 3.6. Fosforlama ve oligodubleks oluşumu için PZR reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Süre
37°C	30 Dakika
95°C	5 Dakika

3.2.2. Kesim ve Ligasyon

Fosforlama ve oligonükleotitlerin birbirine annealing işlemleri gerçekleştirildikten sonra elde edilen oligodubleksler 1:125 oranında sulandırıldı. pX330 BbsI enzim kesim bölgesi Şekil 3.2.'de yer almaktadır. Kesim ve ligasyon işlemi **Tablo 3.7.**'de yer alan protokole göre gerçekleştirildi. pX330 vektörünün BbsI enzim kesim bölgesi Şekil 3.2.'de gösterilmiştir. Ligasyon karışımı hazırlandıktan sonra **Tablo 3.8.**'de yer alan koşullara göre PZR reaksiyonu yapıldı.

**Şekil 3.2.** pX330 BbsI enzim kesim bölgesi. ADDGENE (2021)'nden alınmıştır.

Tablo 3.7. Kesim ve ligasyon reaksiyon koşulları

Reaksiyon	Miktar
ddH ₂ O	6 µl
Px330 plazmid vektör DNA (100 ng)	1 µl
Oligodubleks (1:125 sulandırılmış)	2 µl
10X Tango Buffer	2 µl
Ditiotretol (DTT)	1 µl
Adenozin Trifosfat (ATP)	1 µl
BbsI Kesim Enzimi	1 µl
Ligasyon Buffer	5 µl
Ligasyon Enzimi	1 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 3.8. Kesim ve ligasyon PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
37°C	5 Dakika	6 döngü
23°C	5 Dakika	

3.3. Bakteriyel Transformasyon

Kesim ve ligasyon işlemi sonucu elde edilen ürünler gRNA ligasyon1, gRNA ligasyon2, gRNA ligasyon3 olarak isimlendirildi ve transformasyon için kullanıldı. Bakteriyel transformasyon, *One Shot Top 10* kompetent *Escherichia coli* kullanılarak gerçekleştirildi. Bakteri hücreleri 2µl ligasyon ürünü ile transforme edildi. Transformasyon aşamaları:

1. Buz içine 4 adet 1,5 ml'lik tüp yerleştirildi.
2. Her bir tüpe 50 µl kompetent *Escherichia coli* eklendi.
3. Tüplerin içerisine sırasıyla 2 µl gRNA ligasyon1, 2 µl gRNA ligasyon2, 2 µl gRNA ligasyon3 ve 0,66 µl puc19 eklendi.
4. Hafifçe karıştırıldı ve buz üstünde 30 dakika bekletildi.
5. Ardından 30 saniye 42°C'lik su banyosunda bekletildi ve tekrar buz üstüne bırakıldı.
6. Her tüpe 250 µl önceden 37 °C'de ısıtılmış SOC besiyeri eklendi.
7. Tüpler 37 °C ve 225 RPM'de 1 saat bekletildi.
8. 1 saat sonunda her bir tüpten 50 µl alınarak 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar platalere ekim yapıldı ve 37 °C'de 24 saat bekletildi.
9. 24 saat sonunda Şekil 3.3., Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.'de yer alan her bir plate'den 3'er adet koloni seçildi. miR-182 gRNA1 F ve mir-182 gRNA1 R oligodublekslerinin transformasyonu ile elde edilen 3 koloni; sg1k1, sg1k2, sg1k3 olarak isimlendirildi. 'k' harfi koloni kelimesini temsil etmektedir. Diğer kolonilerde baz aldıkları rehber RNA oligodublekslerine göre benzer şekilde isimlendirildi. İsimlendirme işleminin ardından koloniler steril pipet ucuyla alınarak içinde 5ml LB Broth ve 100 µg/ml ampisilin içeren 50 ml'lik tüplere ekim yapıldı. Tüpler 37 °C'de ve 225 RPM'de 24 saat bekletildi.

3.4. Luria Agar (LA) ve Luria Broth (LB) Hazırlanması

Transformasyon sonrası hem koloni kültürü yapabilmek için LA ve sonrasında elde edilen kolonilerin büyütülmesi için LB kullanıldı. LB hazırlanırken **Tablo 3.9**'da yer alan içerikler hassas terazide tartılarak balon joje içine aktarıldı. Hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.

Tablo 3.9. Luria Broth içerik

İçerik	Miktar
NaCl (Sodyum Klorür)	5 gr
Triptofan	5 gr
Yeast Ekstrakt (Maya Özü)	2,5 gr
Distile su	500 ml

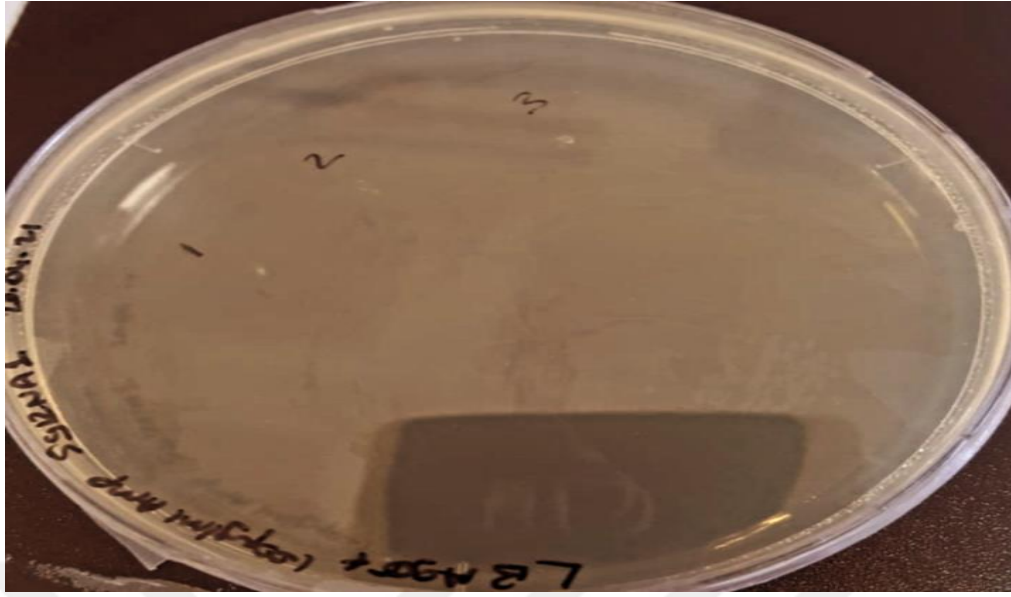
LA hazırlarken **Tablo 3.10.**'daki içerikler hassas terazide tartılarak balon joje içine alındı ve hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 20 dk otoklavlandıktan sonra sıcaklık 50-55°C civarına düştüğünde bunzen beki yanında 100 mg/ml ampisilin stoktan 500 µl eklendi. Hafifçe karıştırıldıktan sonra yine bek başında petrilere yaklaşık 20 ml olacak şekilde dağıtıldı. LA'nın katılması beklendi ve ardından cam öze ile transformasyon ürünleri petrilere yayıldı. Petrilerin kapakları kapatılıp etiketleme yapıldı ve ters çevrilerek inkübatöre kaldırıldı.

Tablo 3.10. Luria Agar içerik

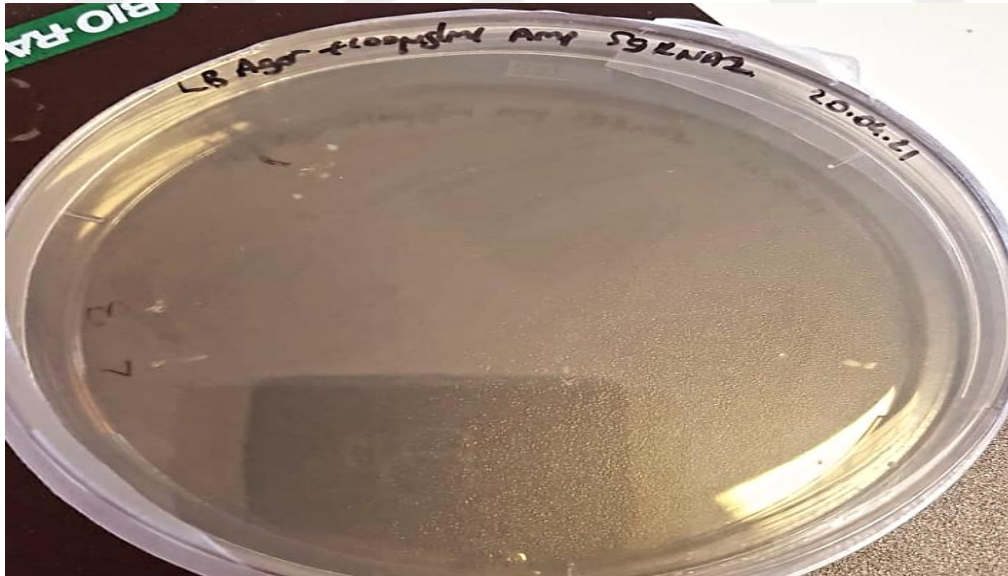
İçerik	Miktar
NaCl (Sodyum Klorür)	5 gr
Triptofan	5 gr
Yeast Ekstrakt (Maya Özü)	2,5 gr
Agar	7.5 gr
Distile su	500 ml

3.5. Gliserol Stok Hazırlanması

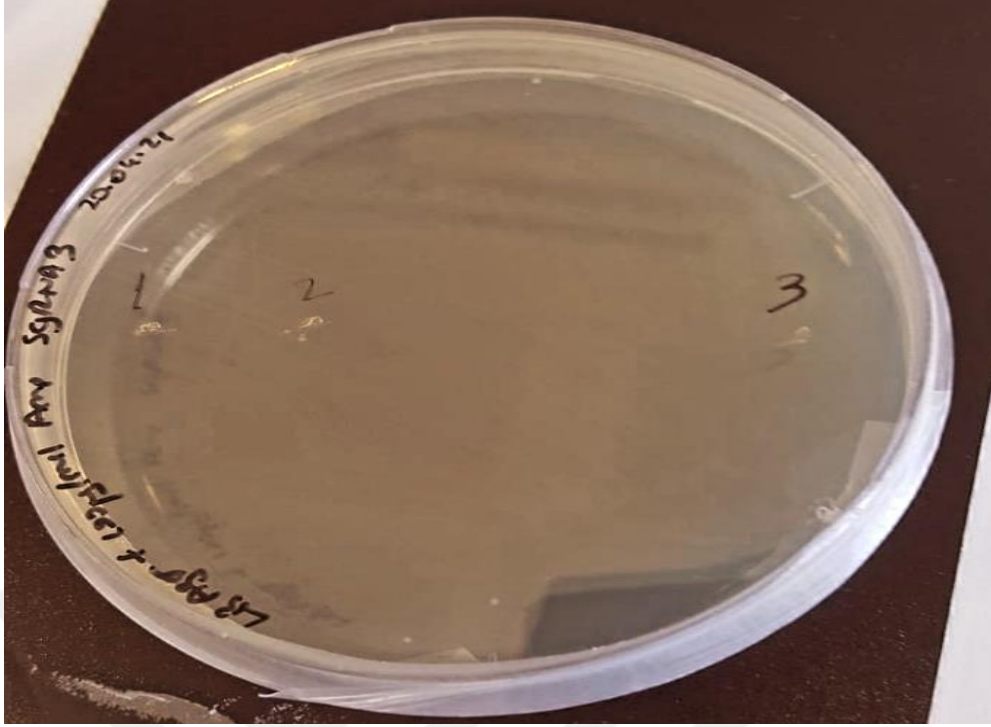
Transformasyonu yapılan bakteri kültürünün bir kısmı plazmid izolasyonunda kullanılırken bir kısımda tekrarlanabilecek deneylerde transfeksiyon için yeterli plazmid DNA'sı kalmaması durumunda tekrar kültür yapıp plazmid DNA elde etmek amacıyla gliserol stok hazırlandı. İlk olarak cryo tüpler etiketlendi. Ardından, 5 ml'lik hücre süspansiyonundan 500 µl alındı ve 500 µl %86'lık gliserol ile kriyo tüplerde karıştırıldı. Tüpler -80C°'ye kaldırıldı.



Şekil 3.3. miR-182 gRNA1 F ve gRNA1 R oligodubleksleri ile yapılan transformasyonun 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası görüntüsü



Şekil 3.4. miR-182 gRNA2 F ve gRNA2 R oligodubleksleri ile yapılan transformasyonun 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası görüntüsü



Şekil 3.5. miR-182 gRNA3 F ve gRNA3 R oligodubleksleri ile yapılan transformasyonun 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası görüntüsü

3.6. Plazmid DNA İzolasyonu

5 ml'lik (24 saat inübe edilen kültürün 500 µl'si gliserol stok için ayrıldı ve kalan 4,5 ml'lik kültür 10000 Revolutions Per Minute'de (RPM) 5 dakika santrüfuj edildi. Sonrasında plazmid izolasyonu için QIAGEN, Spin Miniprep kitinde yer alan protokol dikkate alınarak aşağıdaki aşamalar izlendi:

1. Pelletler 250 µl buffer ile homojenize edildi ve santrüfuj tüplerine aktarıldı.
2. Her bir tüpe 250 µl P2 buferi eklendi ve tüpler 4-6 kez ters düz edilerek yavaşça karıştırıldı.
3. Her bir tüpe 350 µl N3 buferi eklendi ve 4-6 kez yavaşça ters düz edildi.
4. Tüpler 10 dakika 13000 RPM'de santrüfuj edildi. Süpernatant QIAprep kolonuna pipetle aktarıldı.
5. 1 dakika, 13000 RPM'de santrüfuj yapıldı ve supernatant atılarak 500 µl bufer PB eklendi.

6. 1 dakika, 13000 RPM’de santrüfuj yapıldı. 0,75 ml PE bufer eklenerek yıkama yapıldı.
7. 1 dakika, 13000 RPM’de santrüfuj yapıldı ve QIAprep kolonu; 1,5 ml’lik santrüfuj tüpüne yerleştirildi.
8. 50 µl elution bufer eklendi; 1 dakika, 13000 RPM’de santrüfuj yapıldı.

3.7.Plazmid DNA’lardan PZR Reaksiyonu

Elde edilen plazmidlerin ilk olarak konsantrasyon ve saflık ölçümü yapıldı. Konsantrasyon ölçümleri Tablo 3.11’de yer almaktadır. Bu konsantrasyonlara göre PZR’de kullanılacak miktar tayin edilmiştir. Plazmid DNA’lar için PZR reaksiyonu Tablo 3.12.’de ve PZR reaksiyon koşulları Tablo 3.13.’de yer almaktadır.

Tablo 3.11. Plazmidlerin konsantrasyon ve saflık ölçümü

Plazmid DNA	Konsantrasyon (ng/μl)
sg1k1	664,32
sg1k2	1080,81
sg1k3	666,19
sg2k1	761,68
sg2k2	508,79
sg2k3	610,74
sg3k1	519,98
sg3k2	649,75
sg3k3	830,19

Tablo 3.12. Plazmid DNA PZR reaksiyon

Reaksiyon	Miktar
Platinum high fidelity SuperMix	45 µl
U6 F1 (10 µM)	1 µl
U6 R1 (10 µM)	1 µl
DNA (100 ng)	1 µl
ddH ₂ O	2 µl

Tablo 3.13. Plazmid DNA PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
94°C	5 Dakika	1
94°C	30 saniye	30
54°C	30 saniye	
68°C	1 dakika	

3.8. PZR Pürifikasyonu

PZR pürifikasyonu QIAGEN, QIAquick PCR Pürifikasyon kiti içinde yer alan protokole göre yapılmıştır. PZR pürifikasyonunun amacı örneklerin dizileme işlemine göndermeden önce PZR'de kullanılan ve dizileme işlemi olumsuz etkileme ihtimali olan bileşenlerin uzaklaştırılması, PZR ürününün olabildiğince saf bir şekilde dizilenmesidir. PZR pürifikasyon işlem basamakları:

1. PZR ürünleri, 0,2 ml'lik tüpe alındı.
2. 4 kat B2 eklenir, pipetaj yapılır ve kit içinden çıkan column tüplerine alındı.
3. 13000 RPM'de 1 dakika santrüfjü yapıldı. Süpernatant atıldı.
4. 650 µl yıkama buffer (W1) eklendi. 13000 RPM'de 1 dakika santrüfjü yapıldı.
5. Süpernatant atıldı ve tekrar maksimum devirde 2 dakika santrüfjü yapıldı.
6. Filtreli tüp 1,5 ml'lik tüpe alındı ve filtrenin ortasına gelecek şekilde 50 µl elution bufer eklendi.
7. 13000 RPM'de 1 dakika santrüfjü yapıldı. Elüsyonu gerçekleşen plazmid DNA örneği -20C°'ye kaldırıldı.

3.9. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektrofrezinde pürifiye edilen örneklerin yürütülmesi amacıyla 1X TBE (Tris-Borat-EDTA) ve agaroz jel hazırlandı. 10X TBE hazırlanışı Tablo 3.14.'de verilmiştir. 10X TBE'den 50 ml alınarak distile su ile hacim 500 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan 1X TBE'den 100 ml alınarak içine 1gram agar agar eklendi. Mikrodalga cihazı kullanılarak agarozun çözünmesi ve homojen bir karışım elde için 2 dakika bekletildi. Ardından çeker ocakta 3 µl etidyum bromür (1 gr/100 ml) eklendi ve agaroz jel kalıplarına döküldü. Jel katılaştıktan sonra tanka yerleştirildi ve üstünü kaplayacak şekilde 1X TBE eklendi. Yükleme boyası 1 µL, örnek 5 µL olmak üzere karıştırılarak kuyulara yüklendi. 1 kilo bazlık (KB) marker kullanıldı ve Şekil 3.6.'da da gösterildiği üzere 100 voltta 40 dakika örnekler yürütüldü.

Tablo 3.14. 10X TBE Hazırlanışı

İçerik	Konsantrasyon
Tris	1M
Borik Asit	1M
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	0,02M
Distile su	250 ml

**Şekil 3.6.** Plazmid DNA'ların agaroz jelde yürütülmesi

gRNA'lar dizayn edilirken hedefdışı etki (off target) oluşması ya da knockout'un hedef bölgede gerçekleşmemesine yönelik rehber RNA dizaynı ile

ilişkili olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için üç farklı rehber RNA dizayn edilmiştir ve her üç rehber RNA da ayrı ayrı plazmide klonlanmıştır. Hem jel görüntüsü hem de 25 µl pürifiye örnek, Tablo 3.15.'de yer alan her bir plazmide klonlanan üç farklı rehber RNA'nın dizileme primerleriyle beraber dizilemeye gönderildi. Dizileme için hedef bölgeye ait forward (F) primer kullanıldı. Dizilemesi yapılacak bölge Şekil 3.7.'de vektöre ait klonlama bölgesi ise Şekil 3.8.'de yer almaktadır. 9 adet klonun, tasarlanan gRNA'ları içerdiği dizileme ile doğrulandıktan sonra S3K1 klonu ile transfeksiyon yapıldı.



Şekil 3.7. Dizilenen 500bp'lik bölge

```

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCAATTTGCA TATACGATAACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAA
TTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTA
GTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTGAT
TTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGGTCTTCGAGAAGACCTGTTTTAGAGCTAG
AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTG
TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGAC
AAATGGCTCTAGAGGTACCCGTTACATAACTTACGTAAATGCCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCC
CCGCCATTG

```

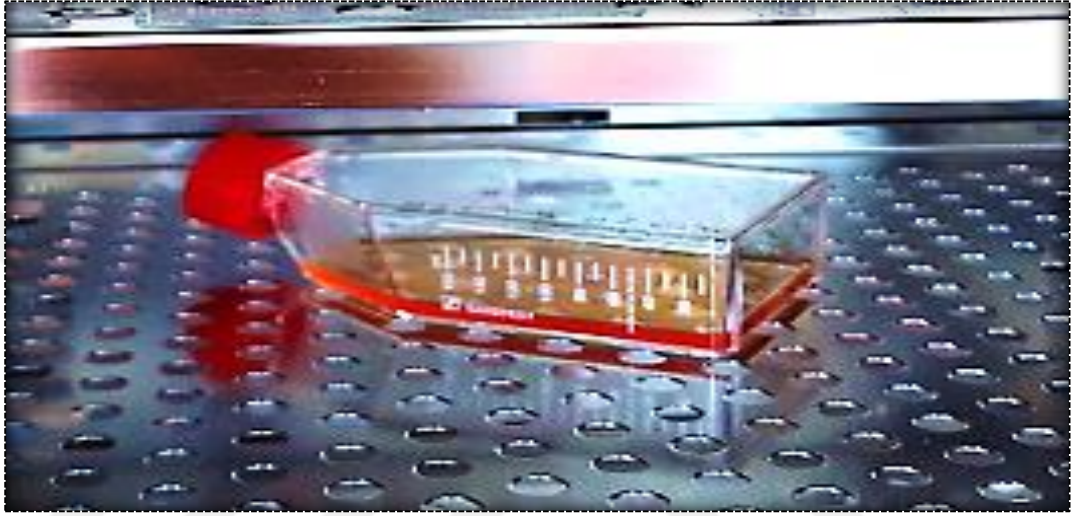
Şekil 3.8. pX330 vektörüne ait klonlama hedef bölgesi

Tablo 3.15. Dizi primerleri ve dizileri

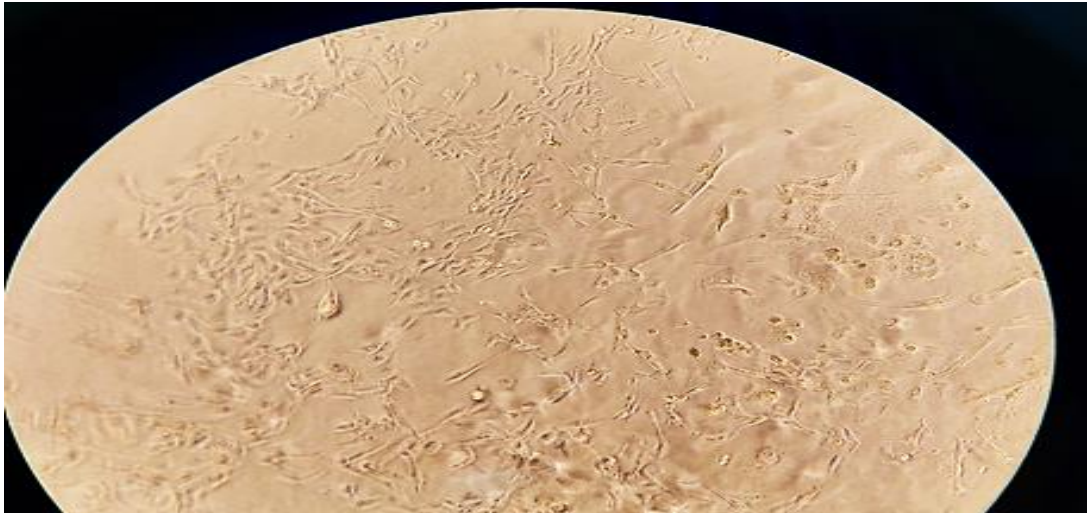
Sekans primeri ismi	Sekans primer dizisi
gRNA1F	5' CAC CGC CAT TGC CAA AAA CGG GGG G 3'
gRNA2F	5' CAC CGC TAC CAT TGC CAA AAA CGG G 3'
gRNA3F	5' CAC CGT CTA CCA TTG CCA AAA ACG G 3'
U6F1	5' GAG GGC CTA TTT CCC ATG ATT C 3'
U6R1	5' GGG CCA TTT ACC GTA AGT TAT G 3'

3.10. MDA-MB-231 HÜCRE KÜLTÜRÜ

MDA-MB-231 insan üçlü negatif meme kanseri hücre hatları (TNBC) %10 inaktive edilmiş Fetal Sığır Serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin (10,000 U/mL) antibiyotiği eklenen Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) tam besiyerinde, %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de inkübasyonu Şekil 3.9. ve mikroskop altındaki görüntüsü de Şekil 3.10.'da yer almaktadır.



Şekil 3.9. MDA-MB-231 hücreleri 25'lik flask kültürü



Şekil 3.10. MDA-MB-231 hücrelerinin mikroskop altında görünümü

3.11. Hücrelerin Pasajlanması

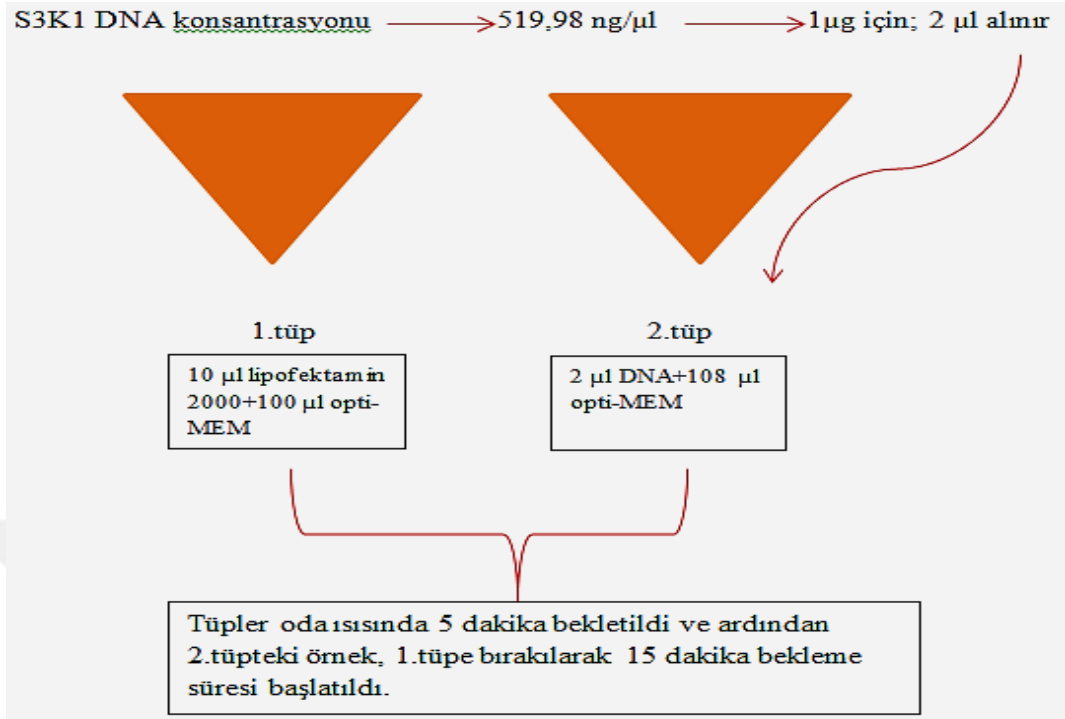
25'lik flaska ekilen hücreler 3 gün sonra yeterli yoğunluğa ulaşır. Ardından hücreler pasaj yapılarak 75'lik flaska aktarıldı. 75'lik flask yüzeyi hücreler tarafından kaplandıktan sonra hücreler pasajlanarak 6 kuyucuklu plakalara aktarıldı. Pasaj işleminin aşamaları:

- İlk olarak flastaki besiyeri alındı.
- Flaska 2 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) eklenerek hücreler yıkandı ve DPBS flasktan alındı.
- Flaska 1 ml Tripsin/EDTA konuldu.
- 3 dakika inkübatörde bekletildi ve ardından 3ml besiyeri eklenerek hücreler hafifçe karıştırıldı ve sayım yapıldı.
- Sayım sonucuna göre her kuyuda yaklaşık $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ve %30-%70 yoğunluğu aşmayacak şekilde 6'lık plağın kuyucuklarına ekim yapıldı.

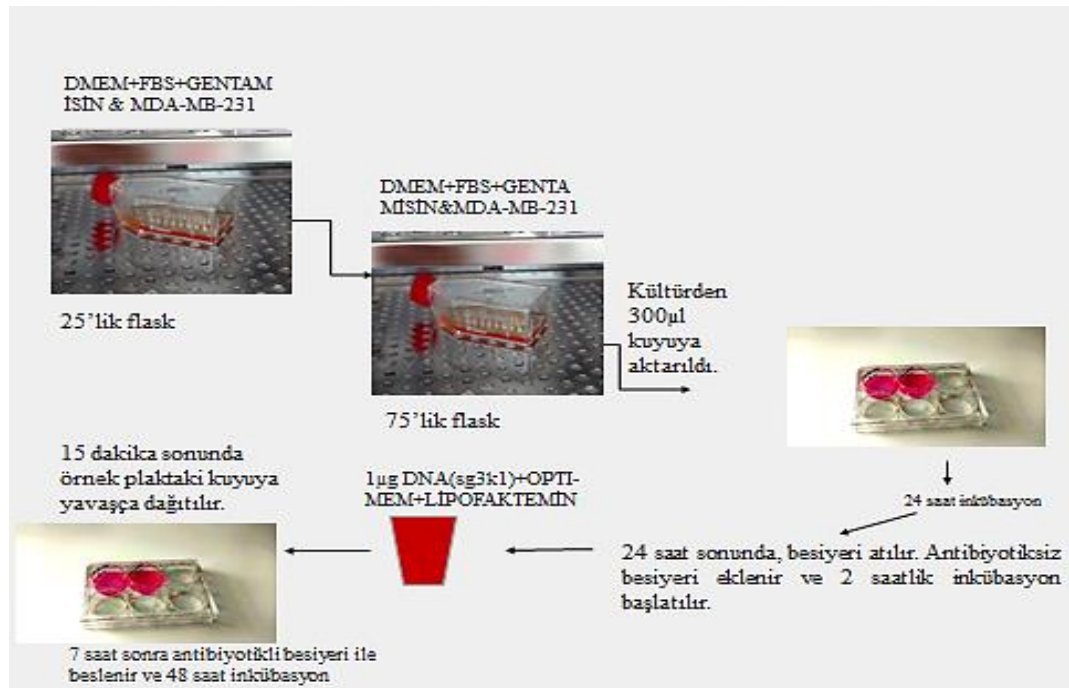
3.12. MDA-MB-231 Hücrelerinin Cas9 Plazmidi ile Transfeksiyonu

6 kuyucuklu plakalarda bulunan besiyeri 24 saat sonra Opti-Mem ile değiştirildi. Besiyeri değişimini takiben 2 saat sonra lipofektamin ile transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyon işleminin basamakları Şekil 3.11. ve Şekil 3.12.'de gösterilmiştir.

S3K1 klonu DNA'sının Lipofectamine 2000 ile MDA-MB-231 hücre hattına transfeksiyon işlemi Şekil 3.11.'de gösterilmiştir. DNA ve lipofektamin 15 dakika bekletildikten sonra 6 kuyucuklu plaka bulunan MDA-MB-231 hücre hattı üzerine damla damla ve yavaşça bırakıldı. 6 kuyucuklu plaka inkübatöre kaldırıldı. 7 saat sonra kuyucuktaki opti-MEM besiyeri tam besiyeri ile değiştirildi. Transfeksiyon sonrası; hücre içine giren plazmidin hedefe yönelik knockout gerçekleştirmesini sağlamak için 48 saatlik inkübasyon süresi tamamlandı.



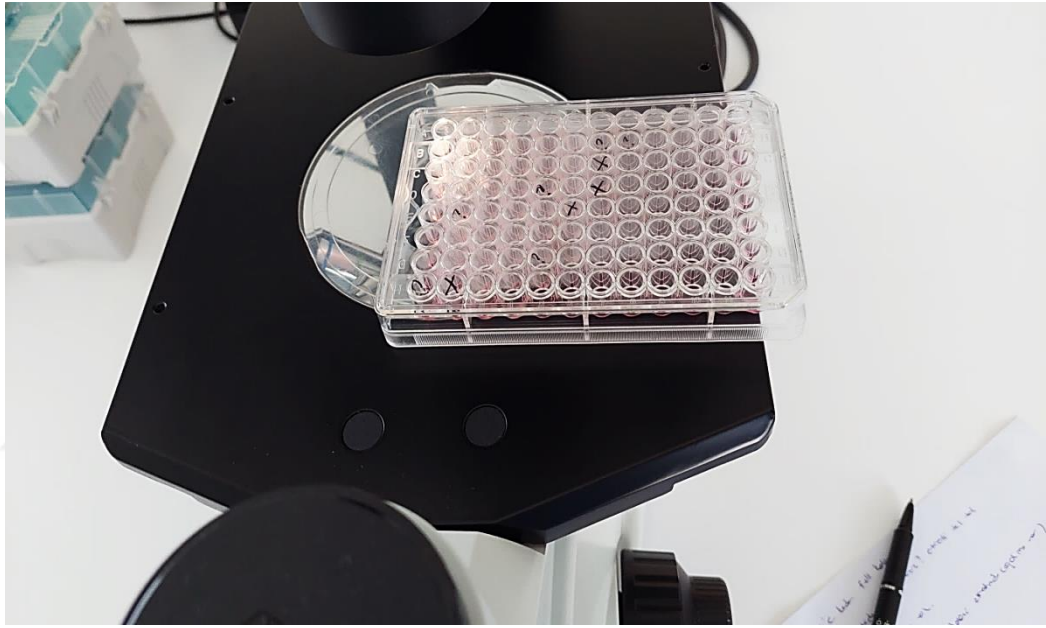
Şekil 3.11. Transfeksiyon işleminin şematik gösterimi



Şekil 3.12. Hücre kültürü ve transfeksiyon aşamalarının şematik gösterimi

3.13. Tek koloni eldesi

48 saat inkubasyon sonunda plazmidi içine alan ve miR-182'nin susturulduğu hücreyi belirlemek için single cell colony assay (tek hücre düşürme ve kolonileştirme) çalışması yapıldı. 6'lı plaktaki hücreler transfeksiyondan 48 saat sonra toplandı ve sayıldı. Hücre sayımı, thoma lamı ile gerçekleştirildi ve toplam hücre sayısı, 600.000 olarak hesaplandı. Tek koloni düşürmek amacıyla Şekil 3.13.'de yer alan 96 kuyucuklu plaka kullanılarak iki farklı yöntemle seri dilüsyon yapıldı.



Şekil 3.13. 96'lık plakalarda yapılan tek koloni elde etme çalışması

Şekil 3.14.'de seri dilüsyon yöntem 1, **Şekil 3.15.**'de seri dilüsyon yöntem 2 gösterilmiştir. . CORNING (2021)'nden alınmıştır .Seri dilüsyon yöntem 1'in basamakları:

1. Seri dilüsyon yöntem 1'de ilk olarak A1 hariç her bir kuyucuğa 100 µl besiyeri eklendi.
2. Ardından 1. sütuna 200 µl 2×10^4 olacak şekilde hücre eklendi.
3. A1'den H1'e kadar 1.sütun boyunca A1'deki hücreler dilue edilerek H1'e kadar gelindi.

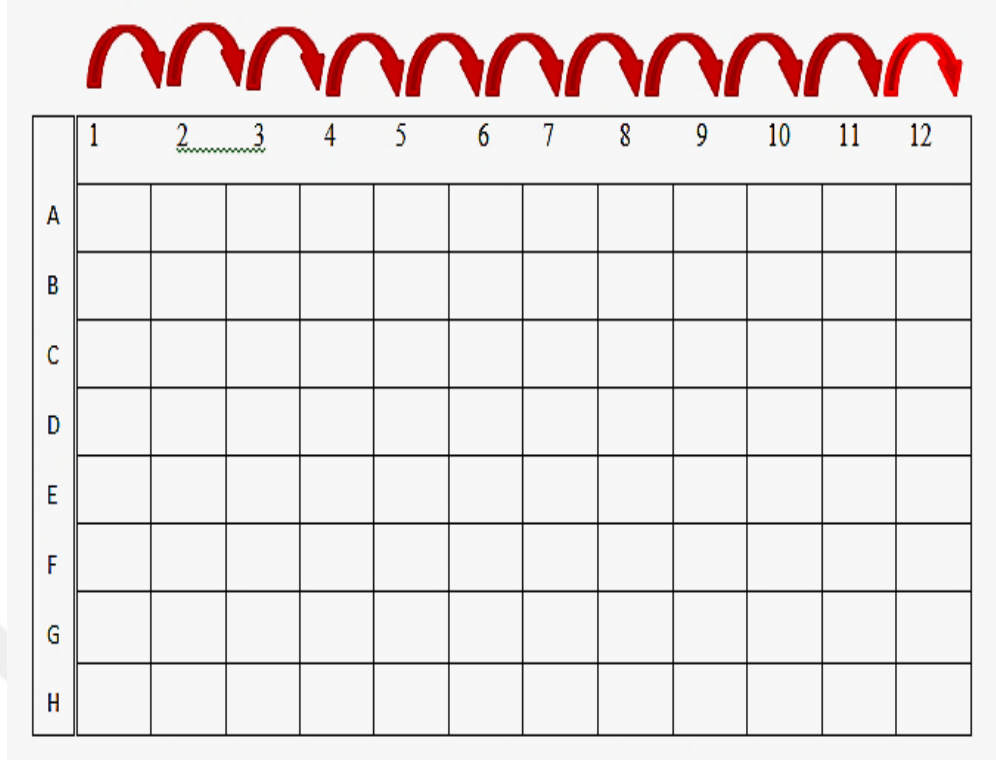
4. Çoklu pipet ile 100'er μl besiyeri alarak 1.sütüne eklendi ve al-ver işlemi yapıldı. Alınan 100'er μl örnekler 2.sütuna ve sonrasında aynı işlemler 12.sütuna kadar devam ettirildi. En son pipette kalan 100 mikrolitre atıldı.

Seri dilüsyon yöntem 2'nin basamakları:

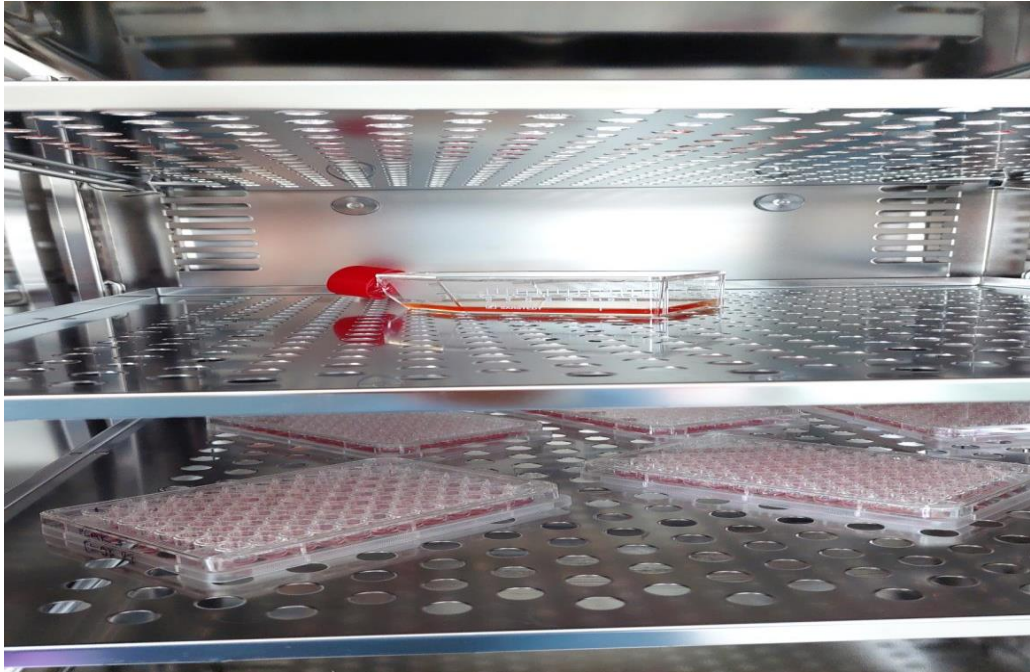
1. Her kuyuya 100'er μl besiyeri eklendi
2. 1.sütunun her kuyusuna 100 μl 'de 100 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu eklendi, ardından 1.sütundaki kuyularda çoklu pipet ile 100'er μl hücre süspansiyonu alınarak, 2. sütuna konuldu ve bu işlem son sütuna kadar devam ettirildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2×10^4											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

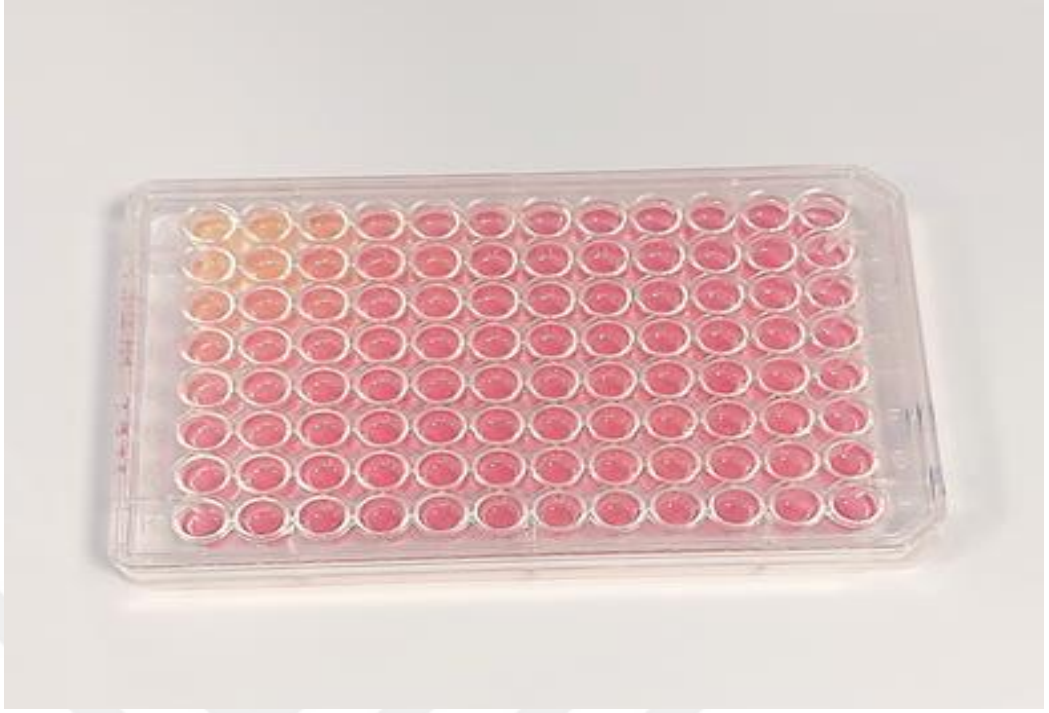
Şekil 3.14. Seri dilüsyon yöntem 1; 96'lık plaka



Şekil 3.15. Seri dilüsyon yöntem 2; 96'lık plaka



Şekil 3.16. Seri dilüsyon yapılan 96'lık plakaların inkübasyonu



Şekil 3.17. Seri dilüsyon MDA-MB-231 hücreleri, 10.gün

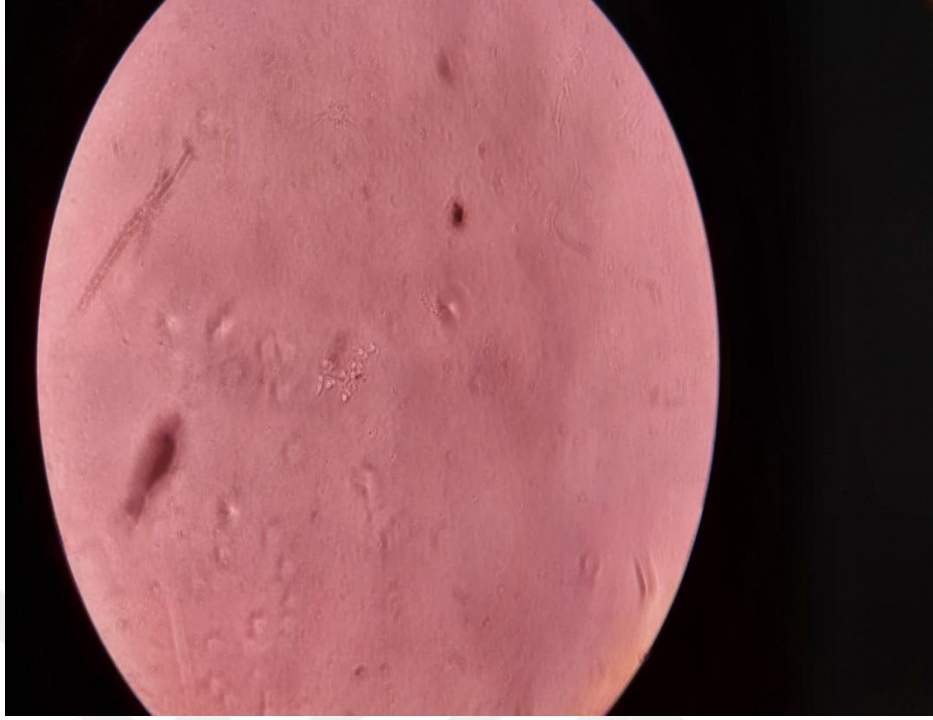
Dilüsyon işlemleri tamamlandıktan sonra Şekil 3.16’de de gösterildiği gibi plakalar inkübatöre bırakıldı. Ertesi gün ve sonrasında her gün plateler tek koloni için tarandı. Şekil 3.17’de 96’lık plakanın seri dilüsyon sonrası 10. Günü göstermektedir.

Belirlenen tek koloniler takibe alındı ve kuyuyu kapladıktan sonra 24’lük plağa aktarıldı, buradaki kuyuları kapladıktan sonra ise 25’lik flaska ve son olarak 75’lik flaksa aktarıldı. Tek koloni elde etme ve bu kolonilerin çoğaltılması aşamaları Şekil 3.18.’de gösterilmiştir. 75’lik flaskı kaplayan hücrelerin bir kısmı DNA izolasyonu için pasajlandı, bir kısmı ise bu pasajlama işlemi esnasında kültürün devamını sağlamak amacıyla 25’lik flaska ekildi.

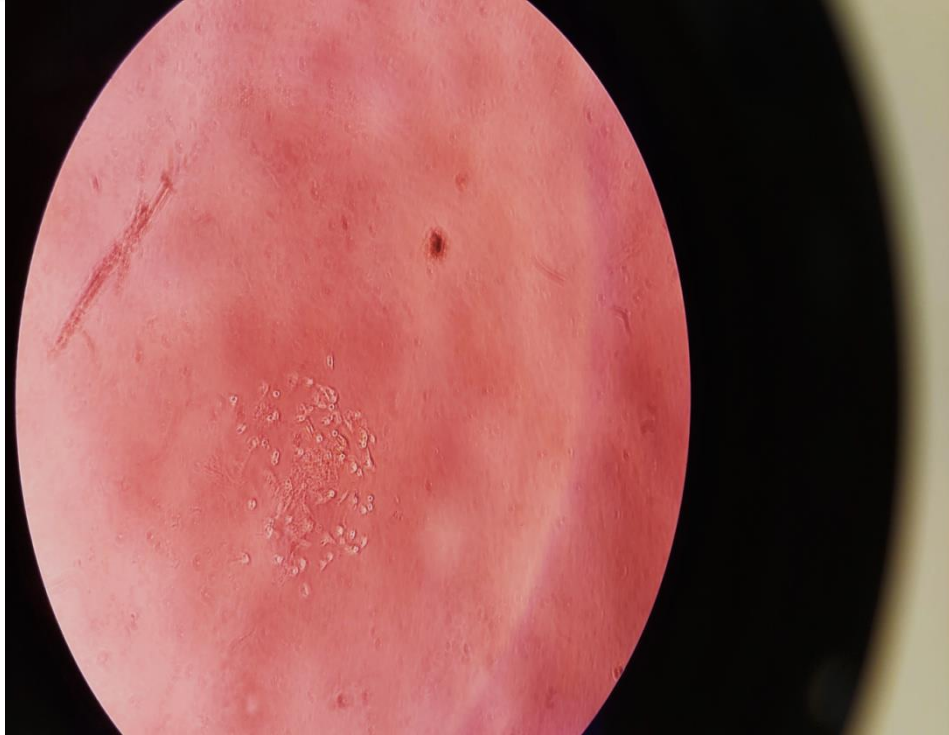


Şekil 3.18. Tek koloni elde aşamasında hücrelerin çoğaltılmasının şematik gösterimi

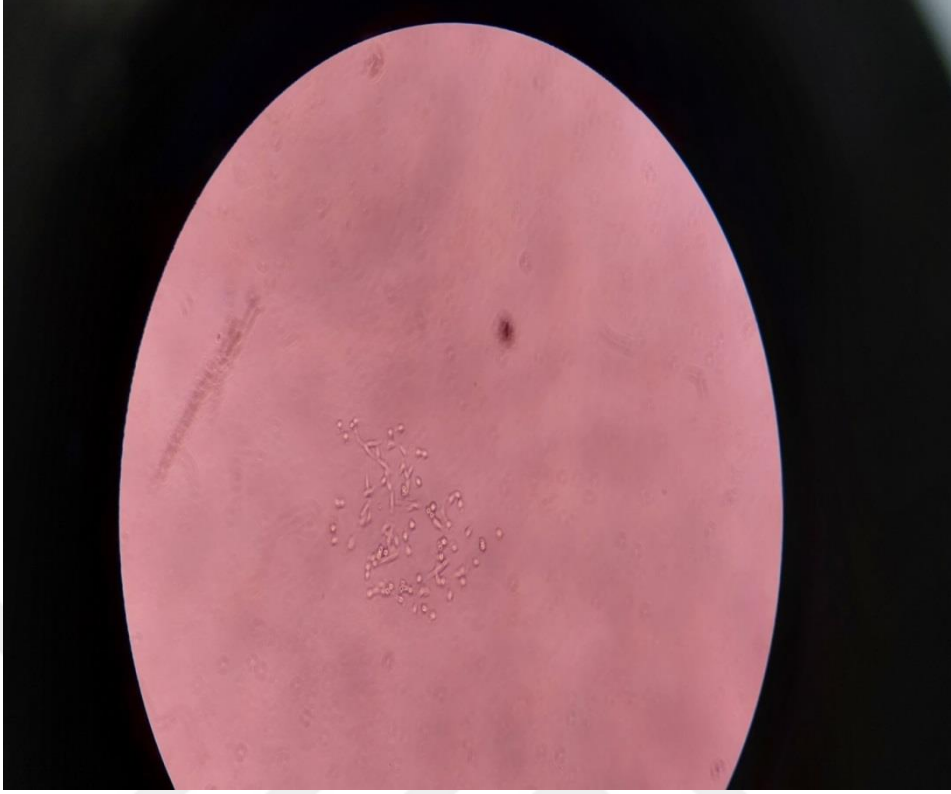
Elde edilen kolonilerin belirli gün sayılarına göre hücre hacminin mikroskop altındaki fotoğrafları şekil Şekil 3.19., Şekil 3.20., Şekil 3.21., Şekil 3.22., Şekil 3.23. ve Şekil 3.24.'de gösterilmiştir..



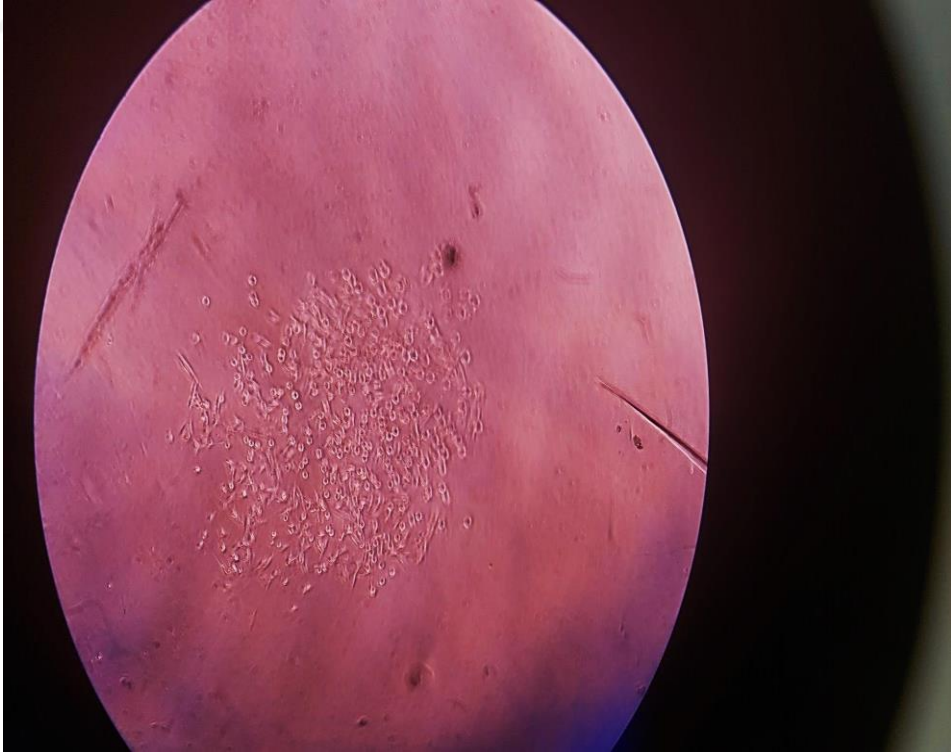
Şekil 3.19. Koloni 1C5 kültürde 6.gün



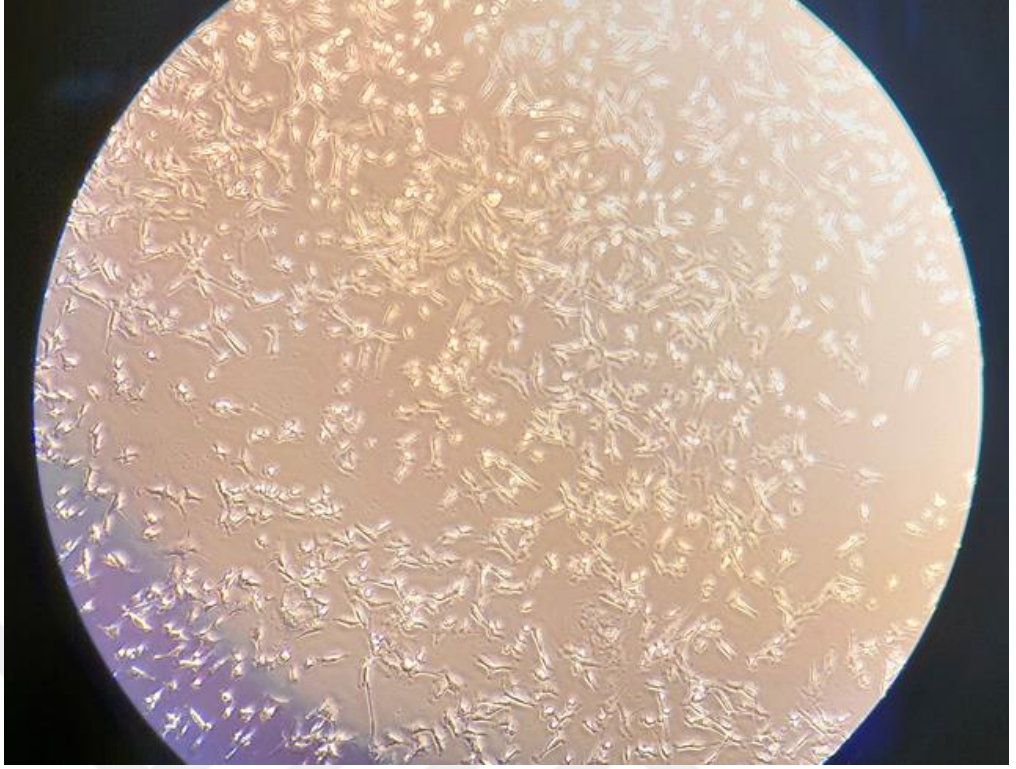
Şekil 3.20. Koloni 1D6 kültürde 10.gün



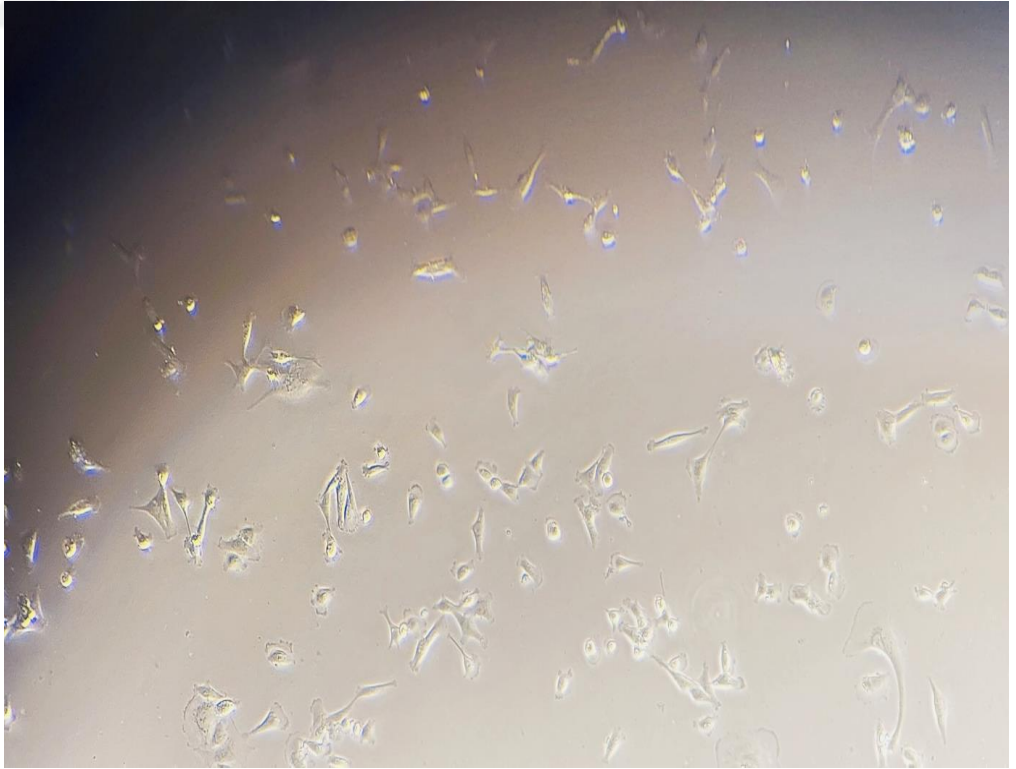
Şekil 3.21. Farklı noktalara düşen koloniler



Şekil 3.22. Koloni 3D5 kültürde 10.gün

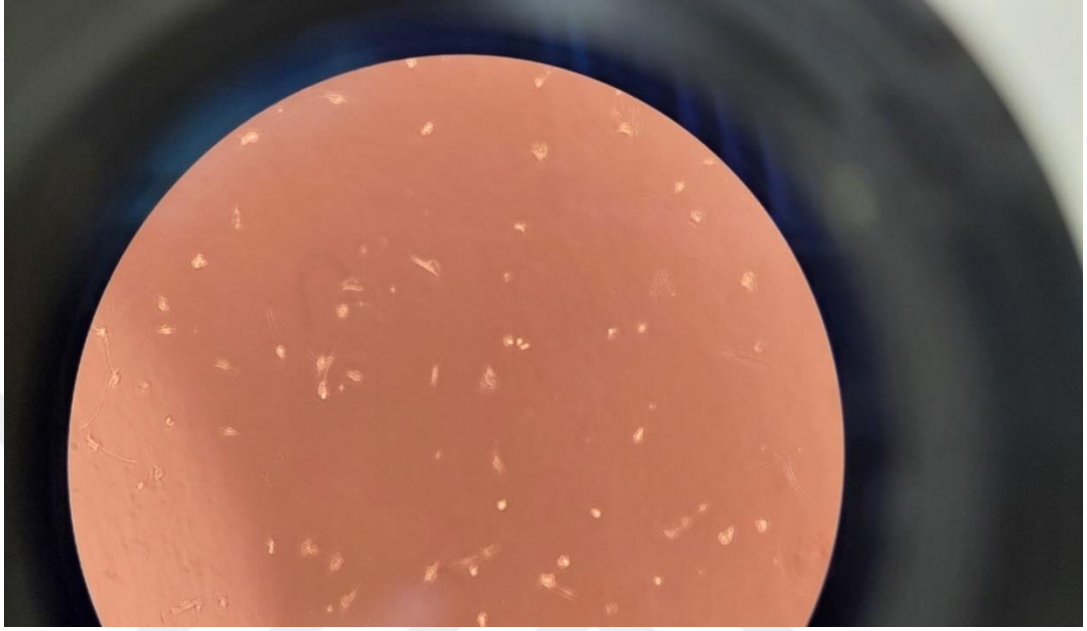


Şekil 3.23. 96'lık plakanın kuyusunu kaplayan koloni

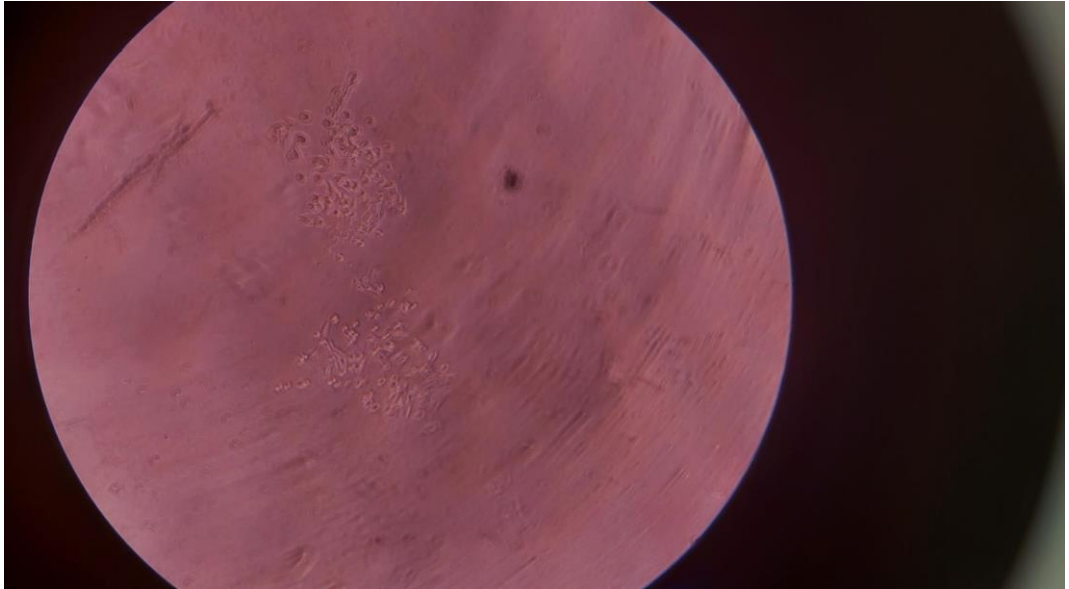


Şekil 3.24. 96'lık plakada çoğalan koloninin mikroskop altında görünümü

Plakalara tek koloni eldesi için ekim yapıldığında birden fazla hücrenin yer aldığı kuyular da gözlemlenmiştir ve bu hücrelerin fotoğrafları şekil 3.25. ve şekil 3.26.'de gösterilmiştir.



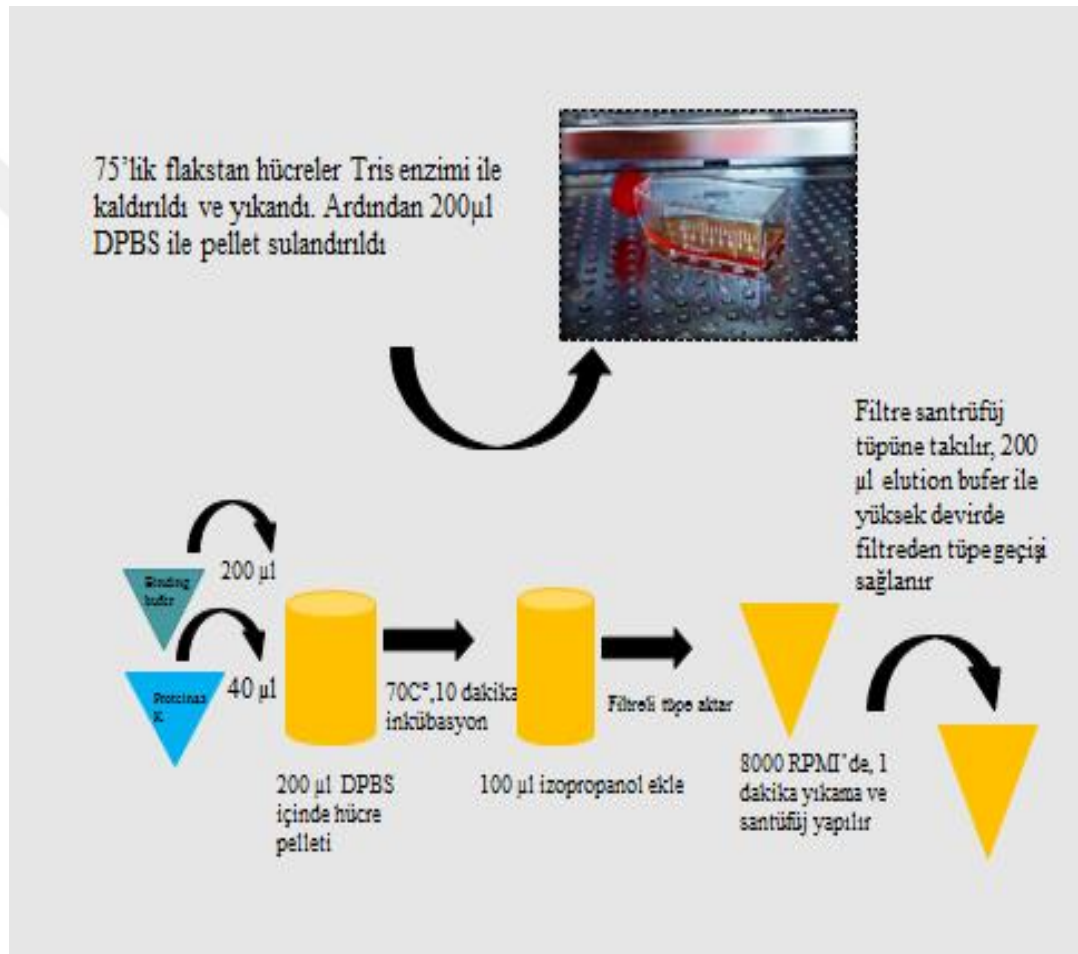
Şekil 3.25. Koloni 3F3 kültürde 15.gün



Şekil 3.26. Farklı iki noktaya düşen hücrelerin kolonileşmesi

3.14. Çoğaltılan Tek Kolonilerden DNA İzolasyonu ve PZR

Elde edilen tek koloniler yaklaşık 4 haftalık kùltür işleminin ardından olası knockout gösterilmek üzere DNA izolasyonu ve PZR yapıldı. DNA izolasyonunda Roche, High Pure PCR Template Preparation Kit içindeki protokolda yer alan adımlar izlendi. Aşamaların şematik gösterimi Şekil 3.27.'de yer almaktadır. Elde edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları da Tablo 3.16.'da yer almaktadır.



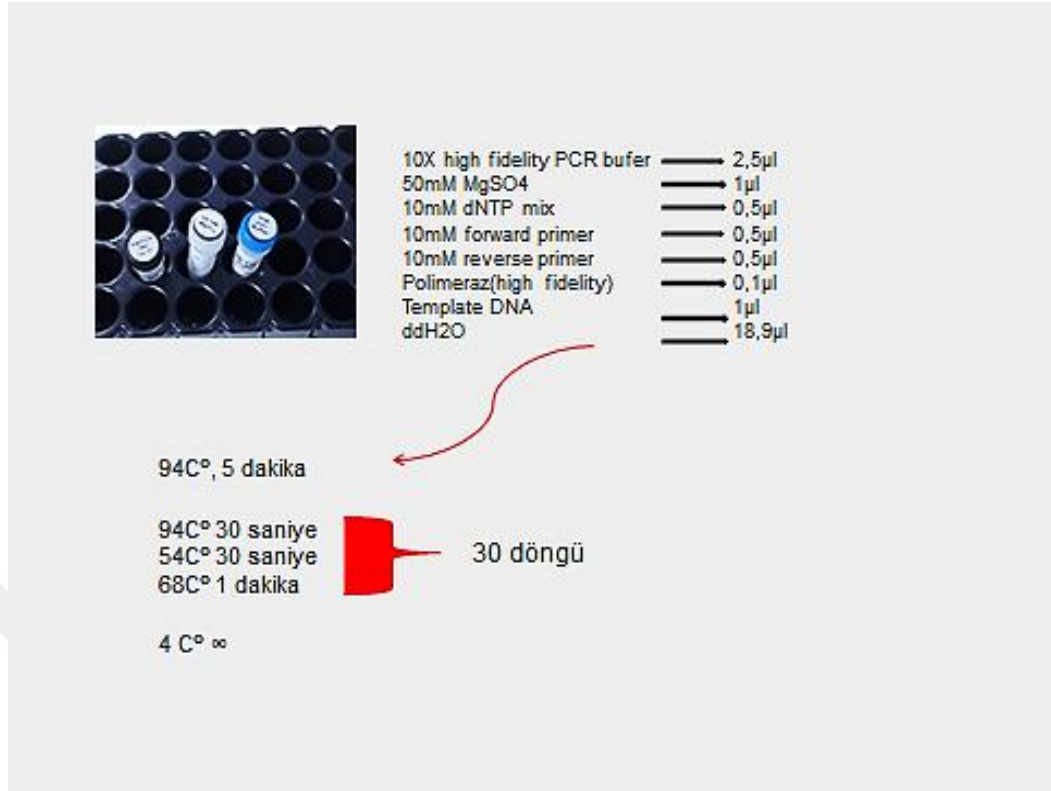
Şekil 3.27. Hücre kùltüründen DNA izolasyonu şematik gösterimi

Tablo 3.16. İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflık ölçümü

Klon adı	Optik Yoğunluk (260/280)	Konsantrasyon(ng/μl)
1C5	1,75	52,8
1C6	1,81	127,8
1D5	1,72	48,9
1D6	1,75	45,7
1E8	1,79	107,6
1G3	1,79	95,5
2B7	1,75	73,6
2C5	1,75	61,2
2C7	1,72	66,9
2D7	1,70	75,1
2E6	1,80	77,4
3A7	1,70	33,1
3D5	1,77	72,76
3D6	1,70	57,7
3E3	1,86	695,0
3F3	1,81	80,9

DNA'ların saflık ve konsantrasyonu ölçümleri belirlendikten sonra İnvitrogen, Platinum Taq Polimeraz High Fidelity kiti kullanılarak knockout'un doğrulanması için PZR yapıldı. PZR koşulları Şekil 3.28.'de, kullanılan primerler ise Tablo 3.17.'de yer almaktadır.

PZR işleminin ardından örnekler %2 lik agaroz jele yüklendi. 120 voltta, 30 dakika yürütüldükten sonra Jel görüntüleme cihazında UV altında görüntü alındı.



Şekil 3.28. Gen knockout'un doğrulanması için kurulan PZR reaksiyonu

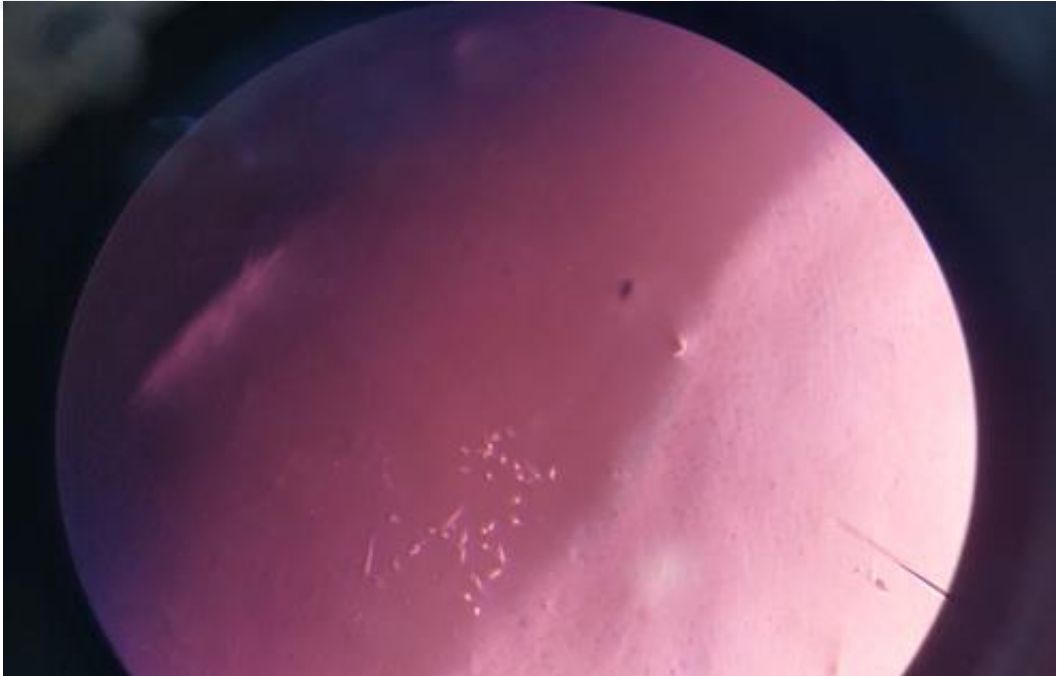
Tablo 3.17. Gen knockout'un doğrulanması için yapılan PZR'de kullanılan primerler

PRİMER İSMİ	PRİMER DİZİSİ (5'-3')
miR-182 F3	TCTGGCCTGGCTTGTGCTG
miR-182 R3	GGCTTCCCAGCTGACTTGAG

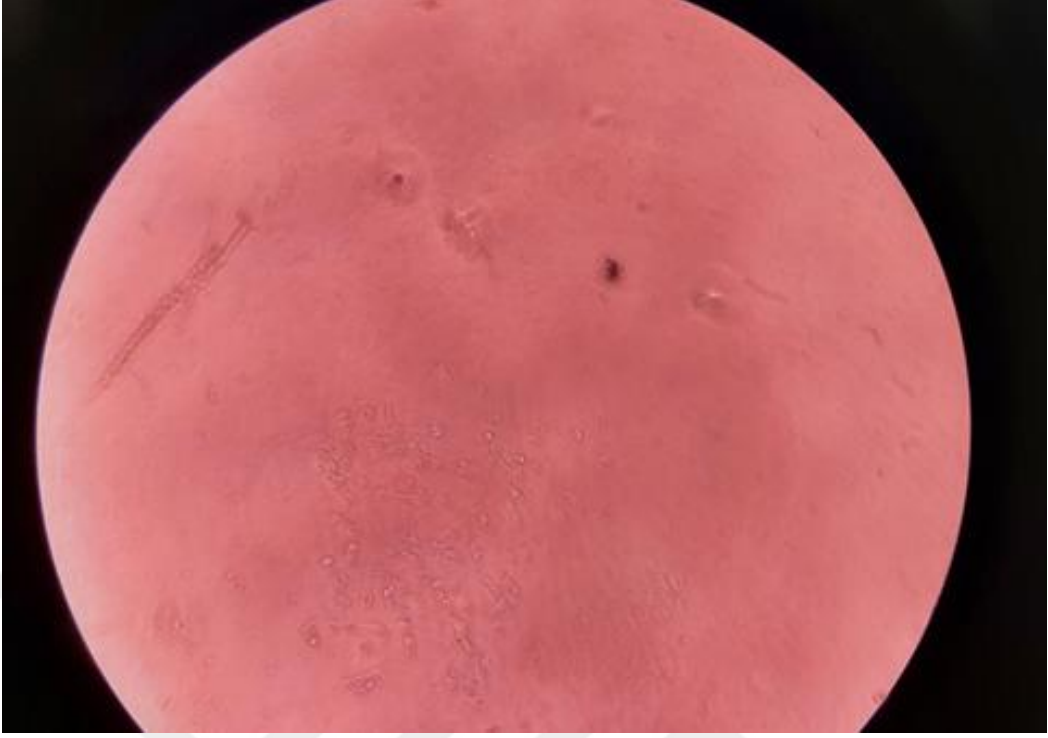
İlk knockout denemesinde istenilen sonuca ulaşamadığı için uygulanan yöntemlerde değişiklikler yapılarak deneyler tekrarlandı. Yapılan değişiklikler şu şekildedir:

1. Üç farklı rehber RNA dizayn edilmiş ve her birinden üçer klon elde edilmişti. Transfeksiyon için s3k1 (3. rehber RNA'nın 1.klonu) seçilmişti. Tekrar kurulan transfeksiyon reaksiyonunda her 3 farklı rehber RNA'nın 3 farklı klonu da dizileme ile doğrulandığı için diğer klonlardan da en az yanlış baz eşleşmesi olanlar (s1k2, s2k2,s3k1) seçildi. Amaç; Her DNA parçasının hücre içine girebilme kabiliyeti farklı olduğu için farklı DNA'lar kullanılarak transfeksiyon ihtimalini artırmak.
2. DNA miktarı 1 ng'dan, 2 ng'a çıkarıldı. Amaç düşük DNA konsantrasyonunun transfeksiyonu engellemesini önlemek.
3. Lipofaktemin ile bekleme süresi 15 dakikadan 20 dakikaya çıkarıldı. Amaç DNA'nın hücreden içeri geçişini sağlamak için zaman kazandırmak.

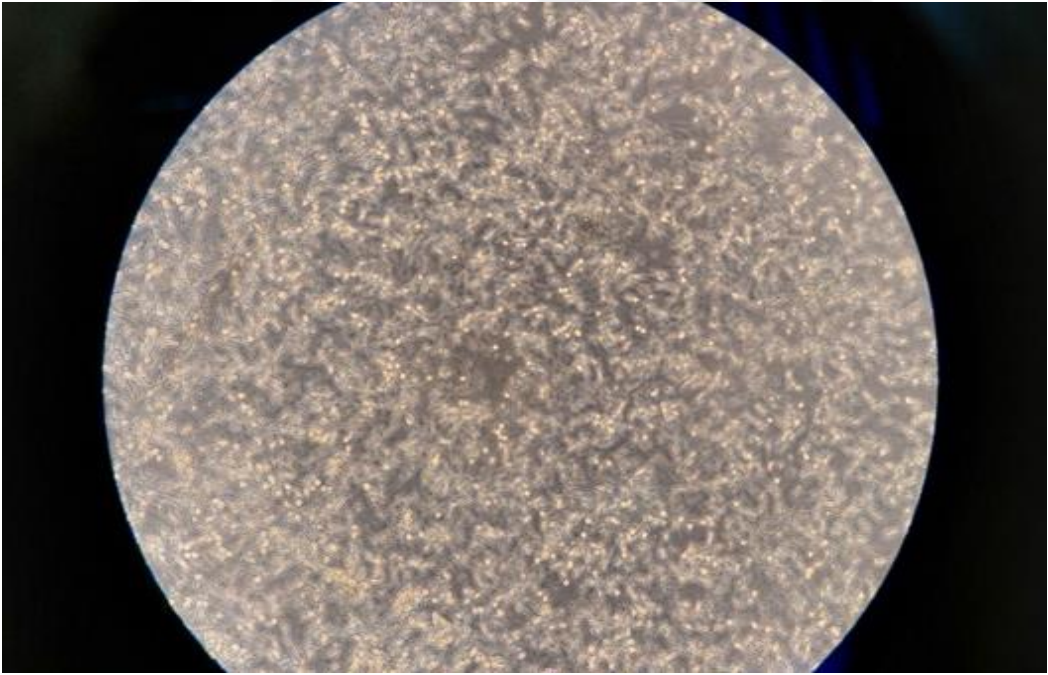
Yukarıdaki değişiklikler yapılarak deneyler tekrarlandı. Hücre kültürü, transfeksiyon, tek koloni eldesi, knockout doğrulanması için PZR yapılırken yukarıdaki protokoller uygulandı. Elde edilen tek kolonilerin kültür görüntüleri şekil 3.29., şekil 3.30., şekil 3.31.'da ve Şekil 3.32.'da yer almaktadır.



Şekil 3.29. Koloni P3A8 kültürde 6.gün



Şekil 3.30. Koloni P2C7 kültürde 10.gün



Şekil 3.31. Koloni P1A10 kültürde 20.gün; 96'lık plakta çoğalan tek koloninin 24'lük plağa aktarıldıktan 1 hafta sonraki görüntüsü



Şekil 3.32. Farklı noktalara dağılan kolonilerin kültürdeki görüntüsü

Tek koloni elde etme aşamasında kültür edilen hücreler Şekil 3.33.'de ve Şekil 3.36.'da, Elde edilen kolonilerin 24'lük flaska pasajlanmış hali Şekil 3.34'de ve mikroskop altında incelenme görüntüsü Şekil 3.35.'de yer almaktadır.

İkinci kez yapılan knockout işleminden beklenen sonuç alınmadığı için knockdown işlemi için miRNA inhibitörü kullanılması kararlaştırıldı.



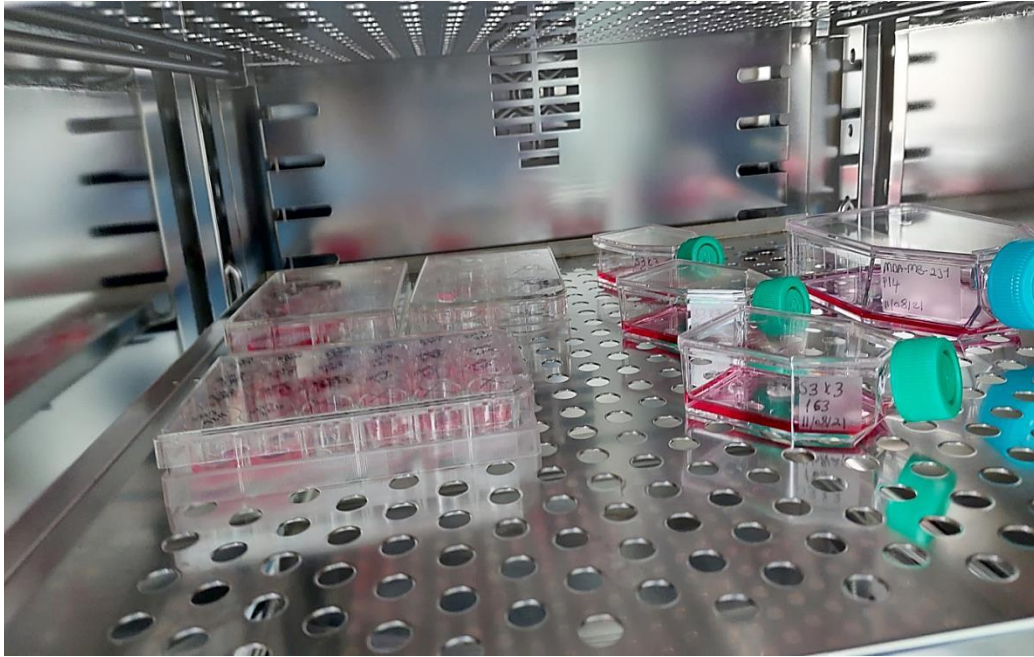
Şekil 3.33. Tek koloni elde etme aşamasında kültür edilen hücreler



Şekil 3.34. Elde edilen kolonilerin 24'lük flaska pasajlanmış hali



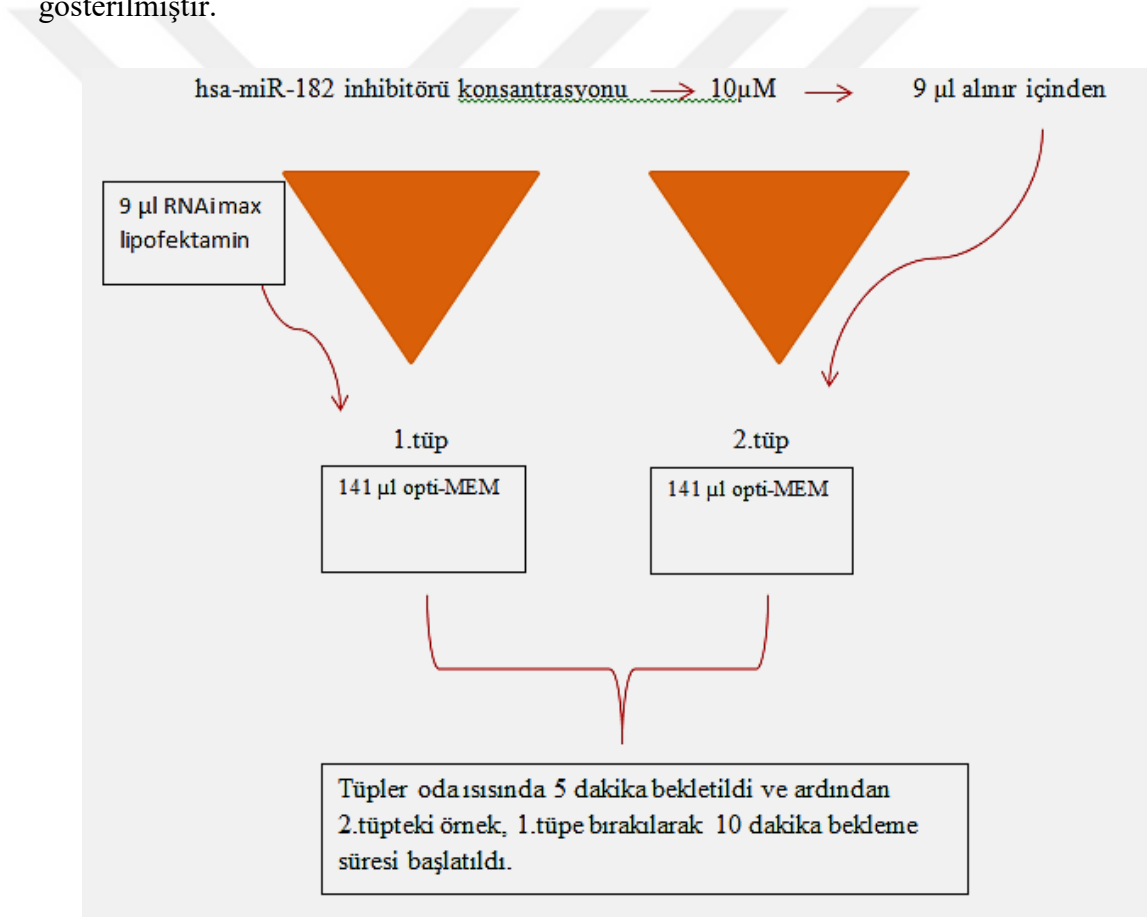
Şekil 3.35. Elde edilen kolonilerin mikroskop altında görüntülenmesi



Şekil 3.36. 96'lık plakada çoğalan kolonilerin 25'lik flaskta inkübe edilmesi

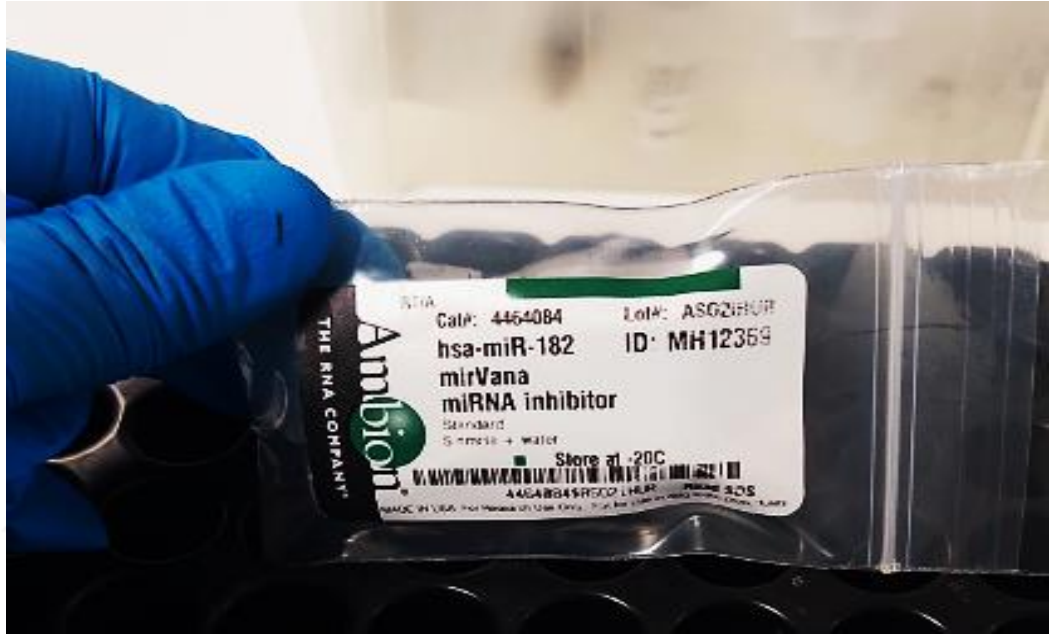
3.15.miRNA İnhibitör/Transfeksiyon

İnhibitör ile miRNA-182'nin knockdown'ı için hücre kültürü işlemleri yapıldı. MDA-MB-231 hücreleri önce 25'lik flaska ekildi. Ardından 75'lik flaska sonrasında ise sayım yapılarak her kuyucuğa $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde 6'lık plaktaki kuyulara (3 adet) pasajlandı. Hücreler 22 saat inkübe edildi ve bu süre sonunda besiyeri $3 \mu\text{l}$ Opti-MEM besiyeri ile değiştirildi. Bu işlemden 2 saat sonra transfeksiyon işlemine başlandı. Transfeksiyon işleminde Thermo Fisher, hsa-miR-182 inhibitörü (Şekil 3.38.) ve lipofektamin RNAiMAX (Thermo Fisher) kullanıldı. hsa-miR-182 inhibitörü ile MDA-MB-231 hücrelerinin transfeksiyonu Şekil 3.37.'de gösterilmiştir.

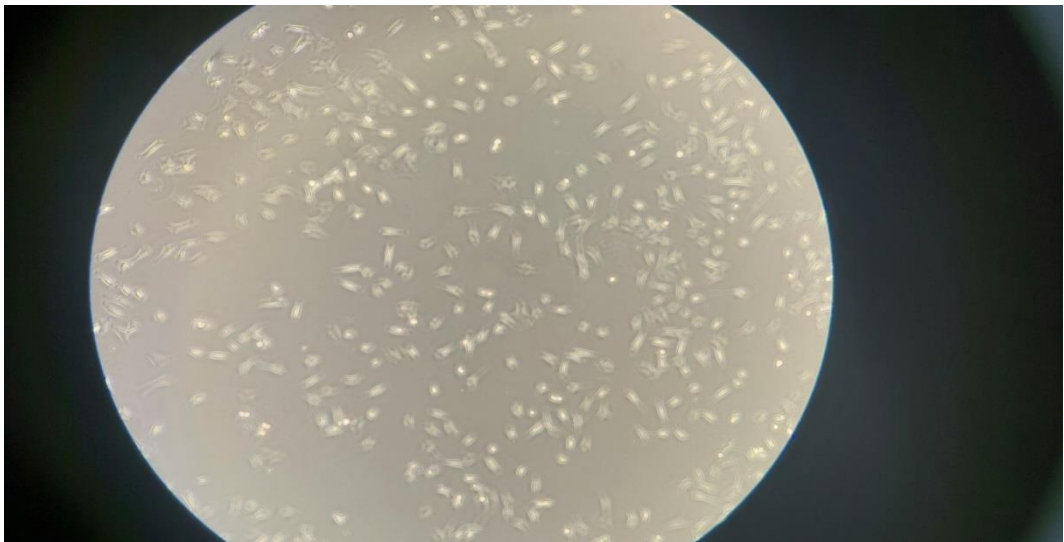


Şekil 3.37. hsa-miR-182 inhibitörü ile MDA-MB-231 hücrelerinin transfeksiyonu

10 dakika sonunda Şekil 3.40.'da gösterilen 6'lık plakada bulunan MDA-MB-231 hücrelerine ve Şekil 3.39.'de gösterilen MDA-MB-231 hücrelerini içeren kuyulardan 1.'sine 300 µl olarak dağıtıldı. 2.kuyuya ise hsa-miR-182 yerine non-target ile hazırlanan lipofektamin karışımı eklendi. 3.kuyuya ise hiçbir işlem uygulanmadı. 12 saat sonunda Opti-MEM besiyeri DMEM tam besiyeri ile değiştirildi. Transfeksiyonun başlangıç ssatinden itibaren 48 saat inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.38. hsa-miR-182 inhibitörü

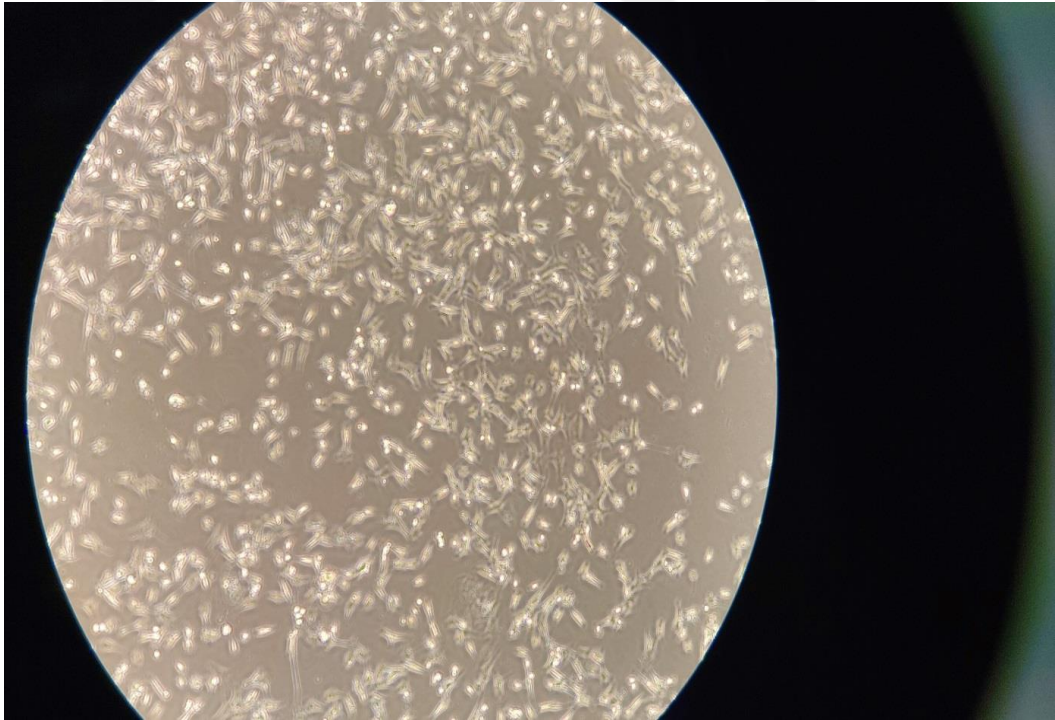


Şekil 3.39. Transfeksiyon öncesi MDA-MB-231 hücre hattı



Şekil 3.40. 6'lık plakaya transfeksiyon öncesi ekimi yapılan MDA-MB-231 hücreleri

Transfeksiyonun 48. Saatinde hücreler mikroskop altında fotoğraflanmış ve Şekil 3.41.'da gösterilmiştir.

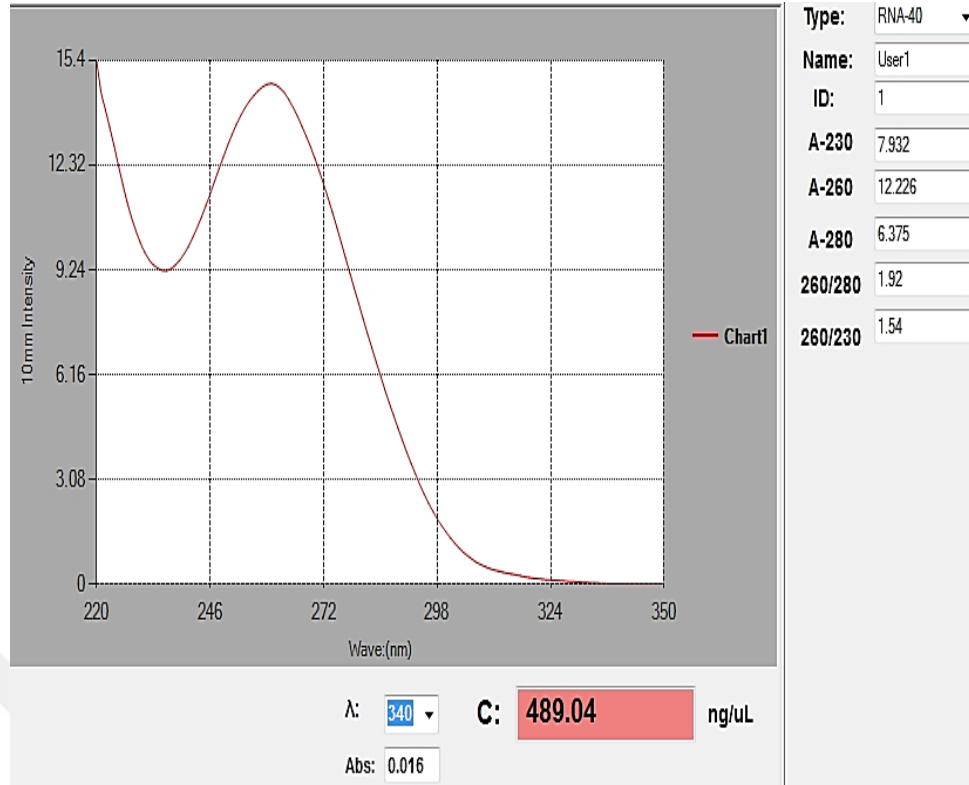


Şekil 3.41. Transfeksiyondan 24 saat sonra MDA-MB-231 hücre hattı

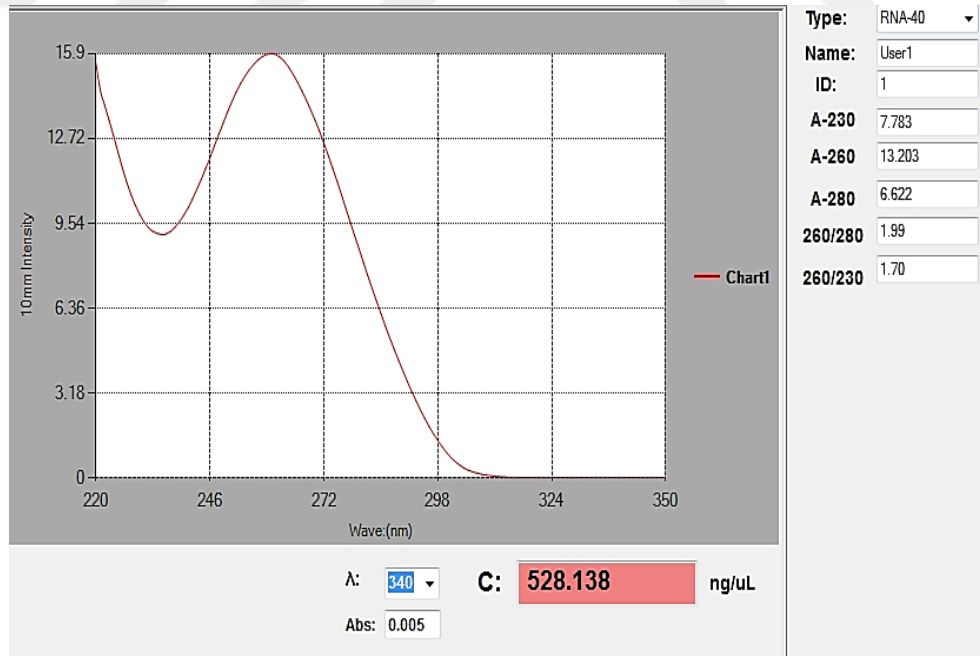
3.16. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonunda QIAGEN, miRNeasy mini kit kullanıldı (Katalog Numarası: 217004). Kit içerisinde yer alan protokol direkt uygulandı:

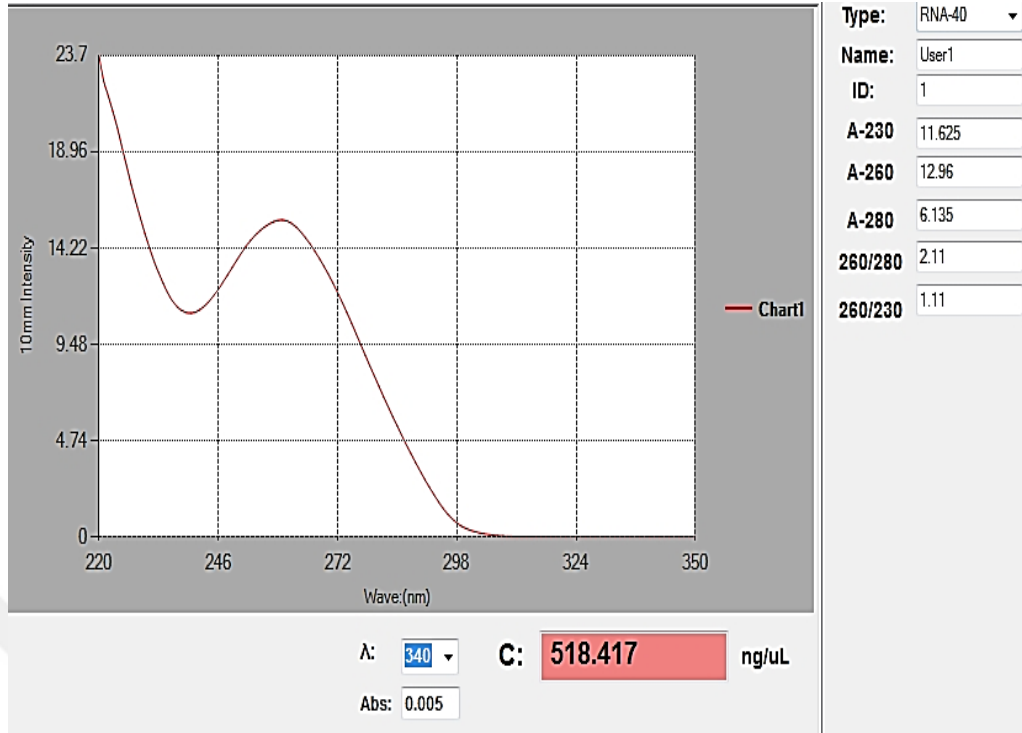
1. 6'lık plaktaki 3 farklı kuyuda bulunan hücreler pasajlanarak 15 ml'lik falkona alındı.
2. Santrüfuj yapıldı. DPBS eklendi ve yıkama yapıldı.
3. DPBS atıldı. Pellet üzerine 700 µl liziz solüsyonu eklendi. Pipetaj yapıldı. Homojenizasyon sağlandıktan sonra oda ısısında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. 140 µl mikrolitre kloroform eklendi. 15 saniye güçlü bir şekilde çalkalandı. Oda ısısında 2 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. 12000 RPM'de 15 dakika, 4 C°'de santrüfuj yapıldı.
6. Üst faz 1,5 luk ependorfa aktarıldı. 525 µl %100 etanol eklendi. İyice karıştırıldı.
7. 700 µl örnek filtreli tüpe aktarıldı. 8000 RPM'de 25 saniye santrüfuj yapıldı. Toplama tüpü değiştirildi.
8. 700 µl RWT bufer eklendi. 8000 RPM'de 25 saniye oda ısısında santrüfuj yapıldı.
9. 500 µl RPE eklendi. 8000 RPM'de 25 saniye oda ısısında santrüfuj yapıldı.
10. Tekrar RPE eklendi; 2dakika, 8000 RPM'de santrüfuj yapıldı.
11. Toplama tüpü değiştirildi. 12000 RPM'de, 1dakika santrüfuj yapıldı.
12. Filtreli tüp 1,5 ml'lik ependorfa yerleştirildi. 30 µl RNase içermeyen su eklendi. 10000 RPM'de, 1dakika santrüfuj yapıldı. RNA konsantrasyonları (ng/µl) ve 280/260 saflık oranları nanodrop spektrofotometre kullanılarak ölçüldü (Şekil 3.42., Şekil 3.43. ve Şekil 3.44.).



Şekil 3.42. Knockdown yapılan hücelere ait RNA ölçümü



Şekil 3.43. Non-target RNA ölçümü



Şekil 3.44. Kontrol RNA ölçümü

3.17.cDNA sentezi

RNA'ların konsantrasyonları ölçüldükten sonra son konsantrasyonları 10 µl'de 1 µg olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile sulandırıldı.

cDNA sentezi için Applied Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Sci.) kullanıldı. Kitin içinde yer alan protokol uygulandı. Tablo 3.18.'de cDNA sentezi için kurulan PZR reaksiyonu ve Tablo 3.19.'de cDNA sentezi için kurulan PZR reaksiyonu koşulları yer almaktadır.

10 µl'lik PZR karışımı 0,2 ml'lik tüplere aktarıldı. 1µg RNA içeren 10 µl'lik RNA-su karışımı da ilgili tüpe aktarıldı ve PZR için cihaza örnekler yerleştirildi.

Tablo 3.18. cDNA PZR reaksiyonu

İçerik	Miktar (1 reaksiyon)	MİKTAR (3 reaksiyon)
10X RT bufer	2 µl	6 µl
25X dNTP mix	0,8 µl	2,4 µl
10X RT random primers	2 µl	6 µl
Multiscribe reverse transcriptase	1 µl	3 µl
Nükleaz içermeyen su	4,2 µl	12,6 µl
Total volüm	10 µl	30 µl

Tablo 3.19. cDNA PZR reaksiyonu koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
25 C°	10 dakika	1
37 C°	120 dakika	1
85 C°	5 dakika	1

3.18.Gerçek Zamanlı PZR

Elde edilen DNA'lar ile Gerçek Zamanlı PZR reaksiyonu hazırlandı. Reaksiyon kurulurken evrensel primer ve referans geni U6 baz alındığı için U6 primerleri kullanıldı (Zhu ve diğ. 2021; Turgut ve diğ.2016).

Reaksiyon karışımının içeriği Tablo 3.20. ve Tablo 3.21.'e göre hazırlandıktan sonra her bir tüpe ilgili DNA (1µg) örneğinde (knockdown örnek, non-target ve kontrol) 3'er µl eklendi. Reaksiyon koşulları Tablo 3.22.'de ve primer dizileri Tablo 3.23.'de yer almaktadır.

Tablo 3.20. Gerçek Zamanlı PZR reaksiyon karışımının içeriği

İçerik	Miktar	3 örnek için miktar
Sybergreen miks	5 µl	15 µl
F primer 10µM	1 µl	3 µl
Universal reverse primer 10µM	1 µl	3 µl
Toplam Hacim	7 µl	21 µl

Tablo 3.21. Referans Gen Gerçek Zamanlı PZR reaksiyon karışımının içeriği

İçerik	Miktar	3 örnek için miktar
Sybergreen miks	5 µl	15 µl
U6 Reverse primer 10µM	1 µl	3 µl
U6 Forward primer 10µM	1 µl	3 µl
Toplam Hacim	7 µl	21 µl

Tablo 3.22. Gerçek Zamanlı PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Analiz modu	Döngü sayısı
denatürasyon	95 C°	2 dakika	None	1
uzama	95 C° → 10 saniye → None 56 C° → 1 dakika → Single 72 C° → 1 saniye → None		Quantification	45
soğutma	40 C°	30	None	1

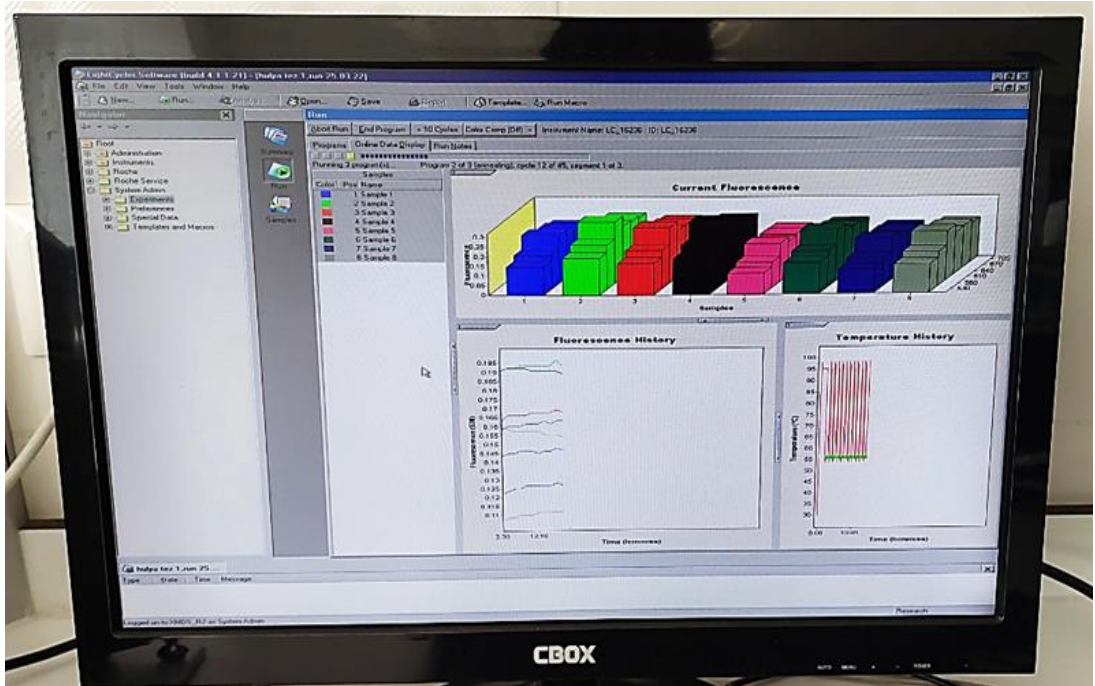
Tablo 3.23. Gerçek Zamanlı PZR’de kullanılan primerler ve dizileri

Primer adı	Dizisi (5’-3’)
hsa-miR-182-5p SYBR Forward	TTGGCAATGGTAGAACTCACA
Universal Reverse	GTGTAACACGTCTATACGCCCA
U6 F	CGCTTCGGCAGCACATATACTAA
U6 R	GCTGTCAACGATACGCTACCTA

Gerçek Zamanlı PZR Şekil 3.45.’de yer alan ROCHE, LightCycler 2.0 cihazında yapıldı. İşlem gerçekleşirken cihaz ekranındaki miR-182’nin ifadesinin gösterimi Şekil 3.46.’de yer almaktadır.



Şekil 3.45. ROCHE, LightCycler 2.0 cihazı



Şekil 3.46. miR-182'nin ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR cihazında gösterimi

3.19. Cisplatin Uygulaması

miR-182 knockdown'ı için uygulanacak olan miR inhibitör oranı AMBION, anti-miR182 inhibitör kataloğunda yer alan protokol dikkate alınmıştır. Gerçek Zamanlı PZR ile analiz edildikten sonra aynı koşullar tekrar oluşturuldu. İlk olarak MDA-MB-231 hücrelerinin kültürü başlatıldı. 6 kuyucuklu plakanın 4 kuyusuna (Bkz. Şekil 3.38.) ve her kuyuda 2 ml'de $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde hücreler aktarıldı. 90 nmol anti-miR182 inhibitörü 1. ve 2. kuyuya uygulandı. 3. ve 4. kuyuya ise kontrol olarak kullanılacağı için hiçbir işlem uygulanmadı. 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 0,5 µg/ml cisplatin stoğunda 120'şer µl alınarak 1. ve 3. kuyulara damla damla dağıtıldı. 24 saat inkübasyon sonunda İnvitrogen, Alexa fluor 488 annexin v/dead Cell Apoptosis Kit kullanılarak ve kitle yer alan protokole bağlı kalarak akış sitometri analizi yapıldı. Örnekler çift olarak çalışıldı.

3.20. Anneksin V ile Hücreleri Boyama ve Apoptoz Analizi

1. 24 saat sonunda hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldı.
2. 1200 RPM'de 3 dakika santrüfuj yapıldı ve 2 ml DPBS eklendi.
3. Hücre sayımı yapıldı.
4. Her 100 µL (100 µL/1X10⁵ hücre) hücre süspansiyonu için 100 mikrolitre anneksin binding bufer eklendi.
5. Her 100 µL örneğe 5 µL annexin V ve 1 mikrolitre 100 mikrogram/ml PI eklendi.
6. Oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.
7. 400 µL 1X anneksin binding bufer eklendi.
8. İyice karıştırıldı.

Ardından akış sitometrisi analizi çift örnek çalışılarak yapıldı. Analiz edilen örneklerin tüp numaraları ve tüp içeriği Tablo 3.24.'de yer almaktadır. Akış sitometrisi ile analiz edilen örneklerin hazırlanması Şekil 3.47.'de yer almaktadır.

Tablo 3.24. Akış sitometrisi ile analiz edilen örnekler

Tüp numarası	miR-182 Knockdown
1.TÜP	+antimiR-182 +Cisplatin
2. TÜP	+antimiR-182 +Cisplatin
3. TÜP	+antimiR-182 -Cisplatin
4. TÜP	+antimiR-182 -Cisplatin
5. TÜP	-antimiR-182 +Cisplatin
6. TÜP	-antimiR-182 +Cisplatin
7. TÜP	-antimiR-182 -Cisplatin
8. TÜP	-antimiR-182 -Cisplatin

**Şekil 3.47.** Akış sitometrisi ile analiz edilen örneklerin hazırlanması

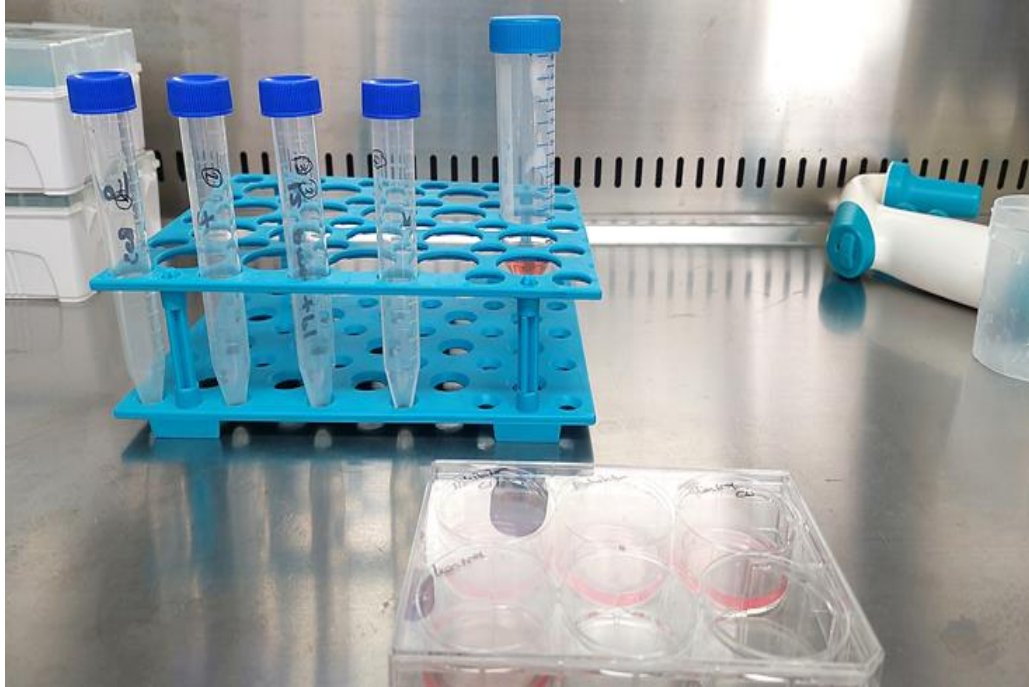
3.21.Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü analizi için ilk olarak MDA-MB-231 hücrelerinin kültürü başlatıldı. 25'lik flaksta büyütülen hücreler 6'luk plağa her bir kuyucukta $2,5 \times 10^5$ olacak şekilde dağıtıldı. Bir günlük inkübasyonun ardından besiyeri Opti-MEM ile değiştirildi ve değişimi takiben 2 saat sonra anti-miR182 ile transfeksiyon yapıldı. 48 saatlik bekleme süresinin ardından hücrelere sisplatin uygulaması yapıldı ve 24 saat sonra hücreler toplanarak hücre döngüsü analizi protokolü uygulandı:

1. Şekil 3.49.'da gösterilen plakadaki hücreler pasajlanarak kaldırıldı. 1200 RPM'de 3 dakika santrüfjü yapıldı. Süpernatant atıldı ve DPBS eklendi.
2. Tekrar 1200 RPM'de 3 dakika santrüfjü yapıldı. Süpernatant atıldı. Pelletler üzerine 1'er ml DPBS eklendi ve hücreler süspanse edildi.
3. -20°C 'den çıkarılan 5ml'lik %70 etanol vorteks cihazı üzerine konularak; 1 ml'lik hücre süspansiyonu etanol üzerine damla damla bırakıldı.
4. Süspanse hücreler etanol içinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece bekletildi.
5. Bir gece bekleyen hücreler 1200 RPM'de 5 dakika santrüfjü yapıldı. Süpernatant atıldı.
6. Pellete 1 ml DPBS eklendi. Hafifçe karıştırılarak homojenize edildi ve tekrar santrüfjü yapıldı. Süpernatant atıldı.
7. Her bir tüpe 1ml DPBS eklendi. Ardından; 5 μl %20 TritonX deterjanı eklendi. Hafifçe vurularak karıştırıldı ve 3 dakika boyunca yavaşça alt üst edildi.
8. 1700 RPM'de 5 dakika santrüfjü yapıldı. Süpernatant atıldı.
9. Her bir pellete 500 μl DPBS ve 3,3 μl RNase (1mg/ml) eklendi. Hafifçe vurularak karıştırıldı. 30 dakika 37°C 'de inkübe edildi.
10. Karanlıkta 10 μl PI (10mg/ml) eklendi ve 1 saat boyunca oda ısısında karanlıkta inkübe edildi.
11. Örnekler akış sitometrisi tüplerine aktarıldı ve Şekil 3.48.'de yer alan CyFlow cihazında okutma yapıldı.



Şekil 3.48. Hücre döngüsü analizi için kullanılan CyFlow cihazı

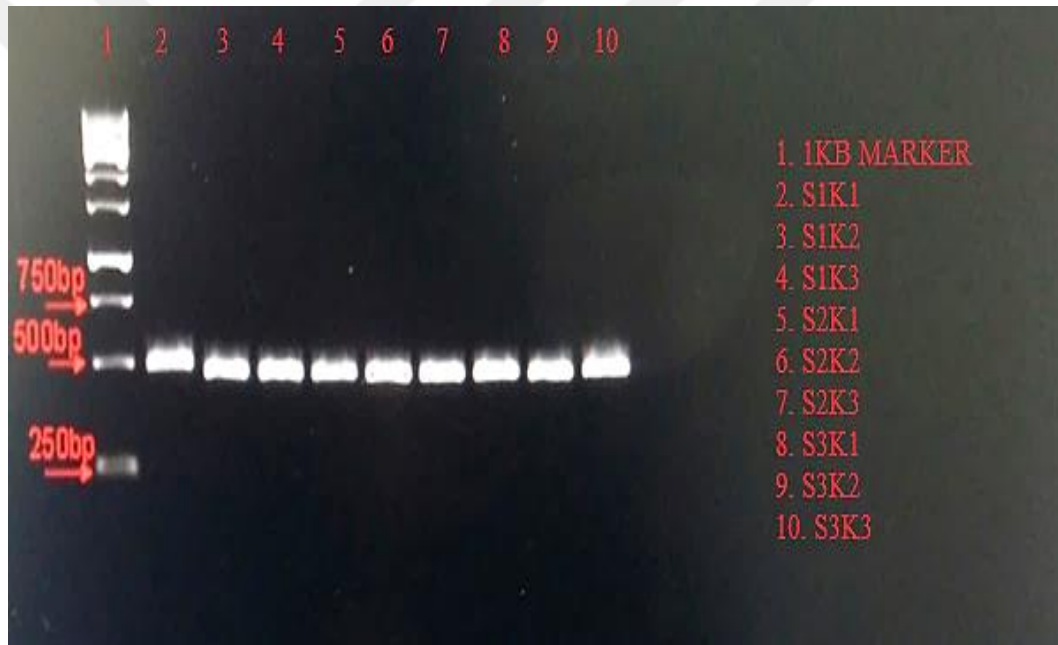


Şekil 3.49. Hücre döngüsü analizi çalışması

4. BULGULAR

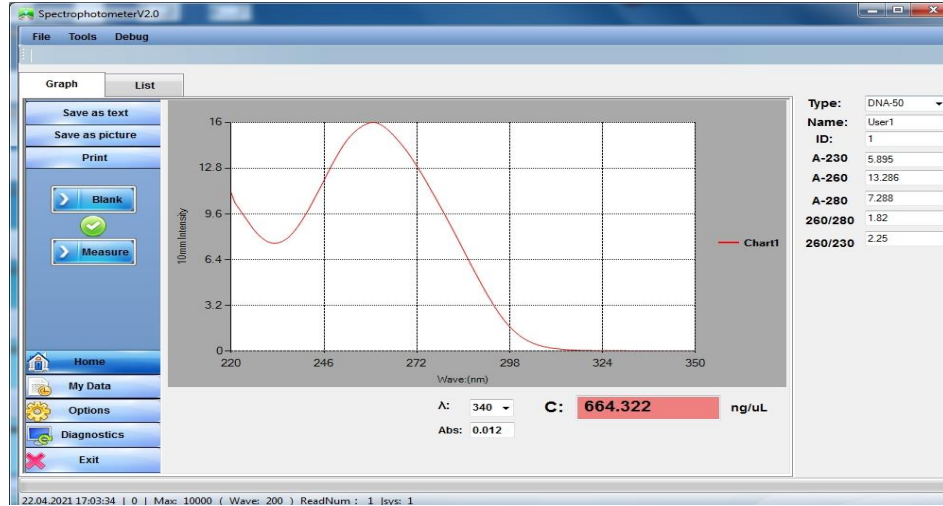
4.1. Plazmid DNA'ların Agaroz Jel Görüntüsü

Knockout için alternatif de olmak üzere üç farklı rehber RNA dizayn edildi. Bu gRNA'ların klonlarının her birinden bakteri transformasyonu sonrası 3'er adet koloni seçildi. Koloniler S1K1, S1K2, S1K3, S2K1, S2K2, S2K3, S3K1, S3K2, S3K3 olarak isimlendirildi. gRNA'ların plazmid içine klonlanması işlemi ardından agaroz jel elektroforezi yapıldı. Ürün 478 bazçiftidir ve Şekil 4.1.'de agaroz jelde gösterilmiştir.

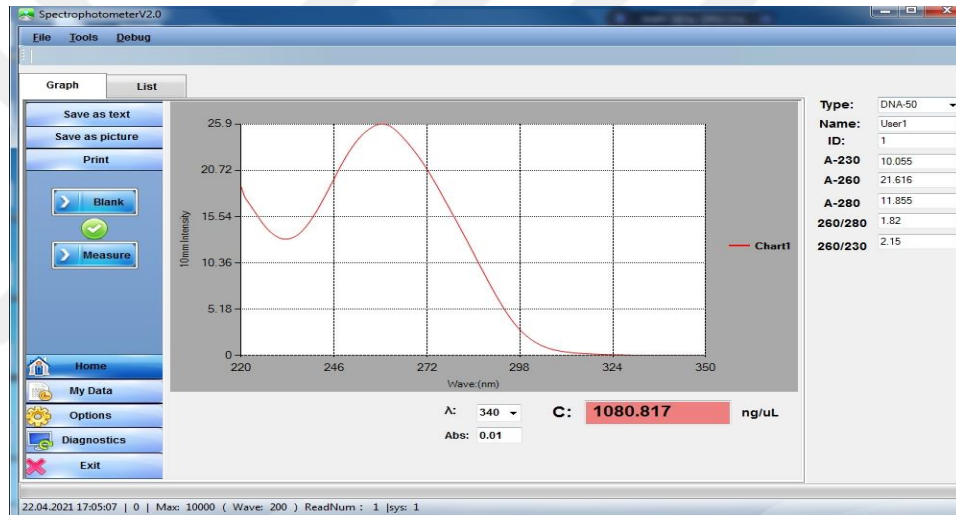


Şekil 4.1. Plazmid DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

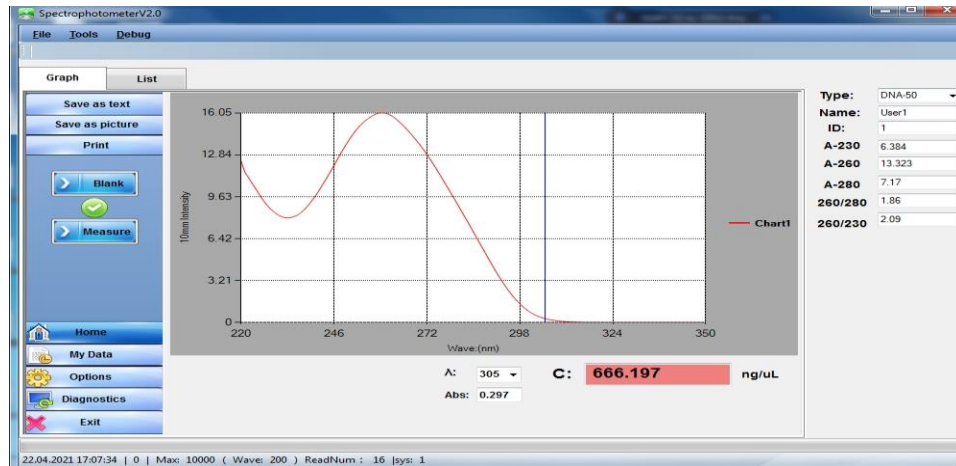
Plazmid DNA'ların spektrofotometrede konsantrasyon ve saflık ölçümleri yapıldı. Plazmid DNA'lara ait bu ölçüm sonuçları Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7.'de yer almaktadır.



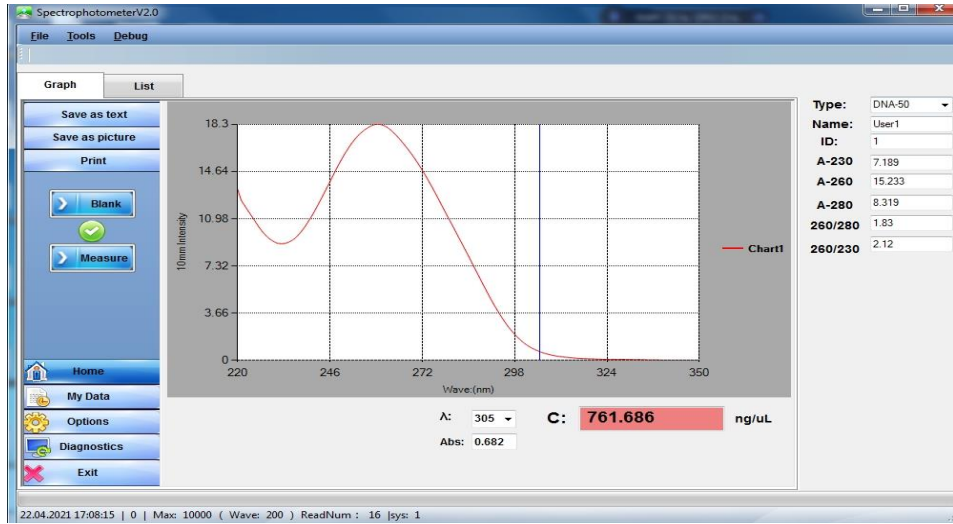
Şekil 4.2.S1K1 kolonisi konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu



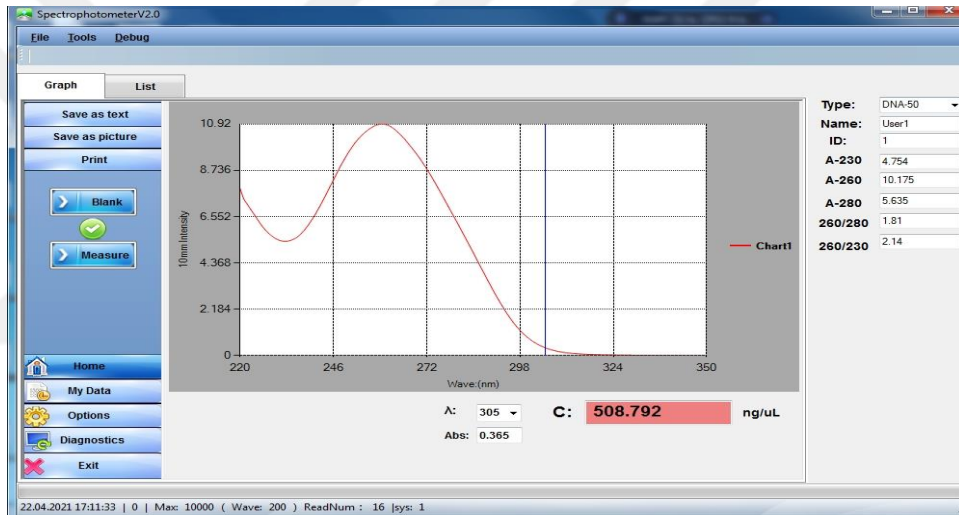
Şekil 4.3.S1K2 kolonisine ait konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu



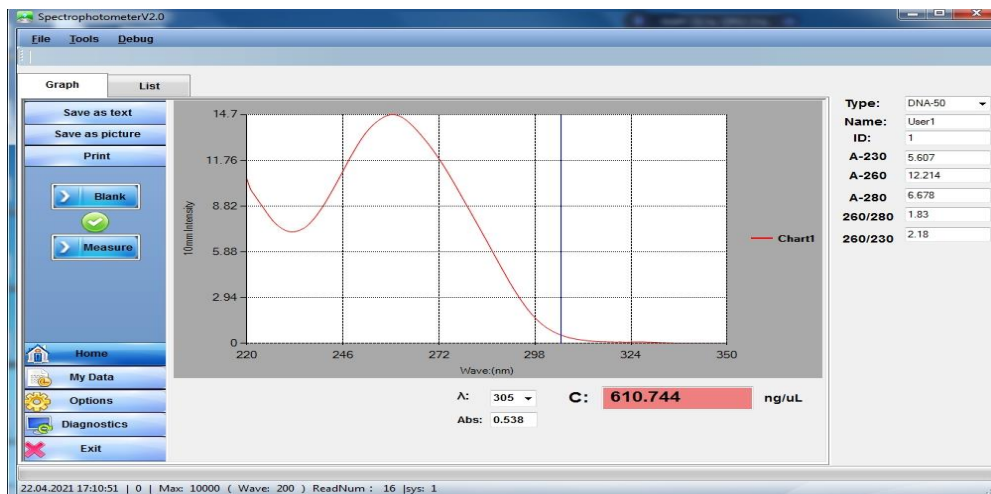
Şekil 4.4.S1K3 kolonisi konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu



Şekil 4.5.S2K1 kolonisine ait konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuc



Şekil 4.6.S2K2 kolonisi Konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu



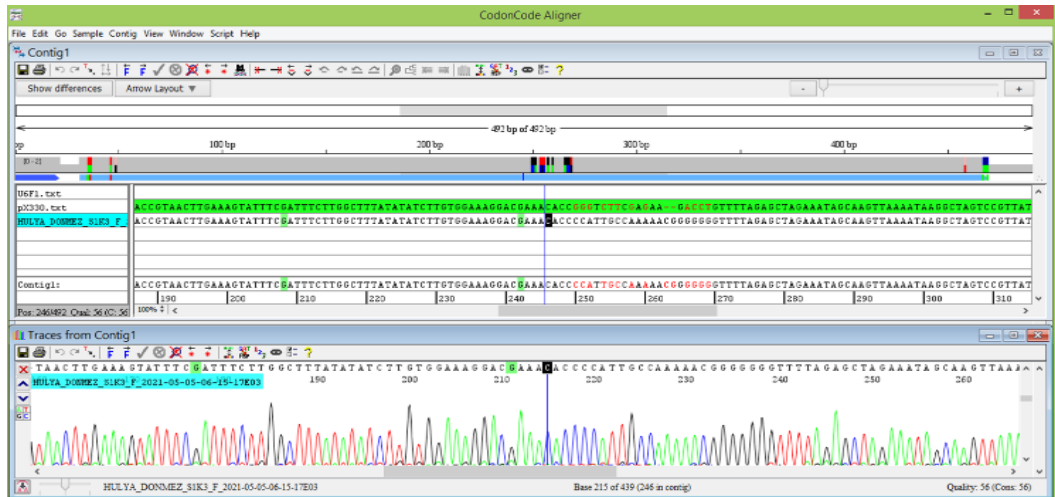
Şekil 4.7.S2K3 kolonisi konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu

4.2. Plazmid DNA'ların Dizileme Sonuçları

Klonlama sonrası elde edilen plazmid DNA'ların dizileme işlemi için Medsantek firmasından hizmet alımı yapıldı. Sekans sonuçları CodonCode Aligner programı kullanılarak analiz edildi. Plazmid DNA'ların dizileme görüntüleri Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12.'de yer almaktadır. Dizileme sonuçlarında klonlanan plazmid DNA'ların miR-182 gen bölgesine özgü tasarlanan gRNA'ların başarıyla plazmid kesim bölgesine yerleştirildiği gözlemlendi.



Şekil 4.8. S3K1,S3K2,S3K3 kolonileri dizileme sonuçları



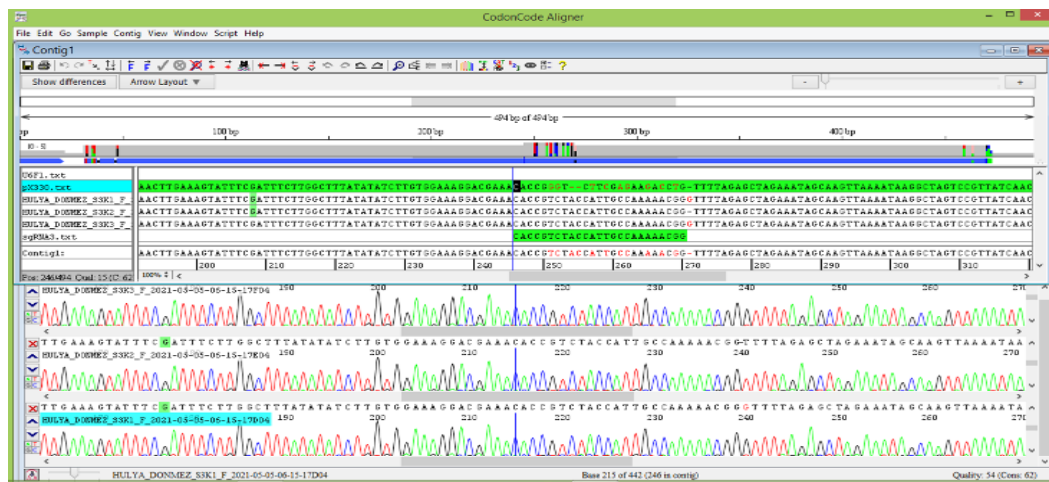
Şekil 4.9. S1K3 kolonisi dizileme sonucu



Şekil 4.10. S1K2 kolonisi dizileme sonucu



Şekil 4.11. S2K1, S2K2, S2K3 kolonileri dizileme sonucu

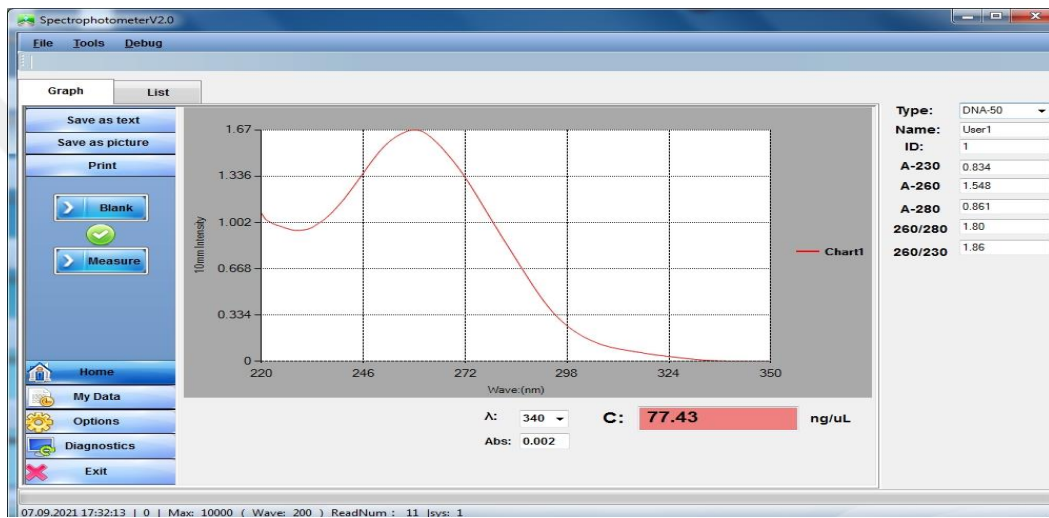


Şekil 4.12. S1K1 kolonisi dizileme sonucu

Dizilemesi yapılan örnekler CodonCode Aligner programı ile analiz edildiğinde klonlama işleminin olumlu bir şekilde tamamlandığı görüldü.

4.3. Transfeksiyon, Koloni Seçimi ve Knockout Doğrulanması

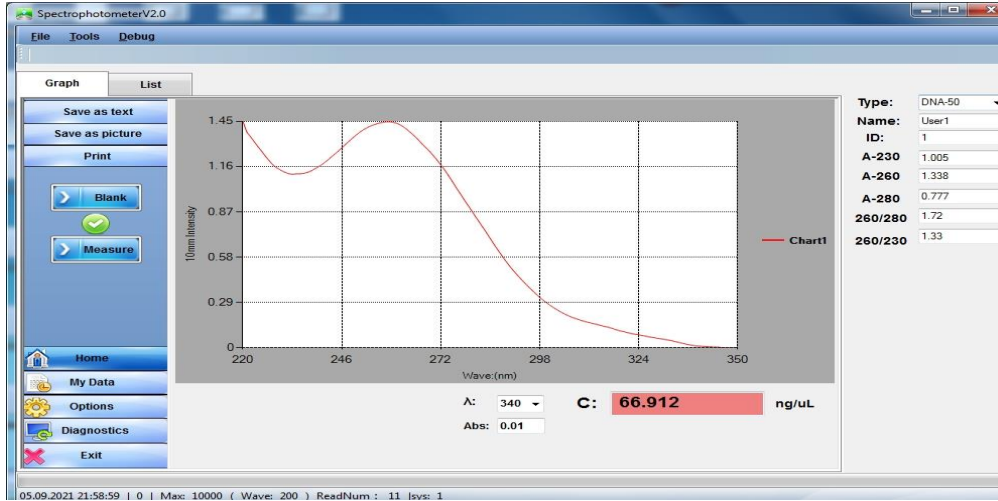
Transfeksiyon işlemi ardından tek koloni elde etme çalışması ile 16 koloni saptandı. Kolonileri hücre kültüründe çoğaltılarak DNA izolasyonu yapıldı. Bu örneklerden bir kısmının konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16., Şekil 4.17.'de yer almaktadır.



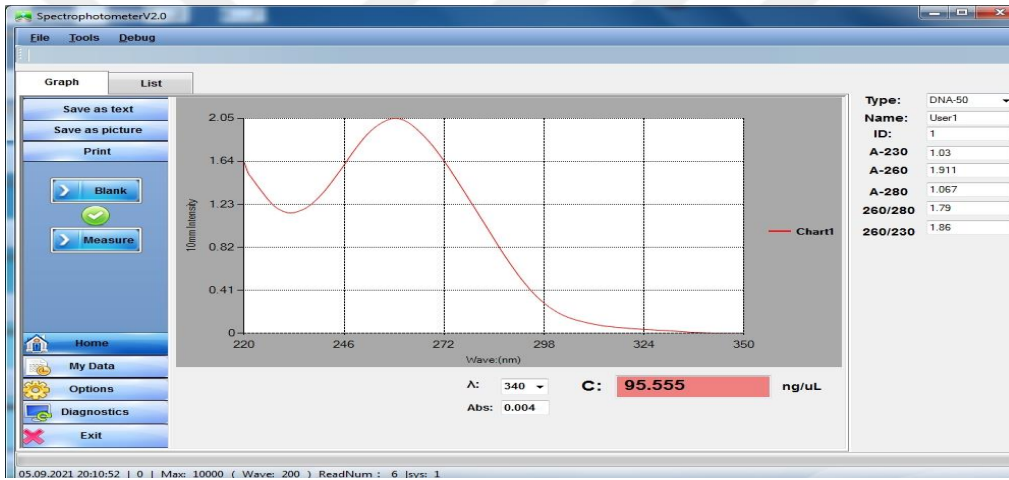
Şekil 4.13. 2E6 koloni DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları



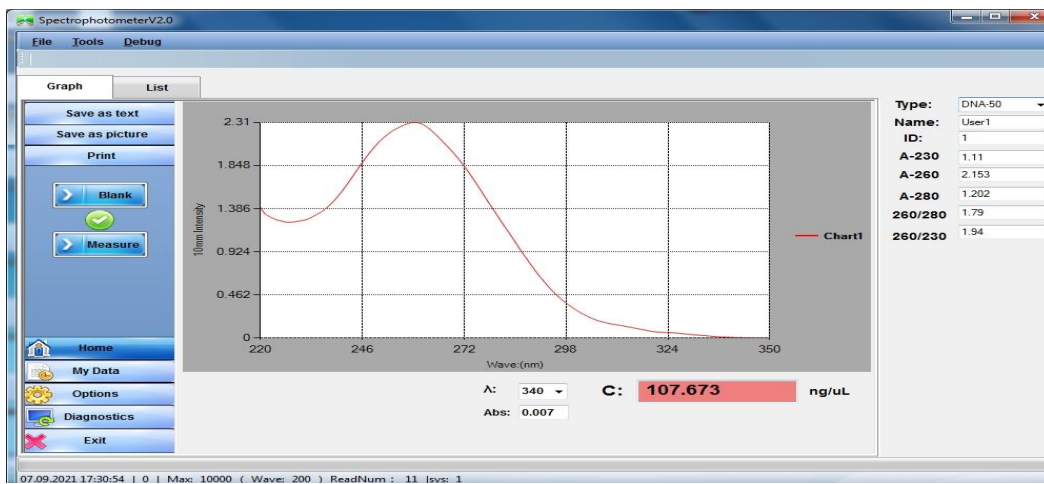
Şekil 4.14. 2D7 koloni DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları



Şekil 4.15. 2C7 koloni DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları



Şekil 4.16. 1G3 koloni DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları



Şekil 4.17. 1E8 koloni DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları

4.4. Koloni DNA'larının PZR'si

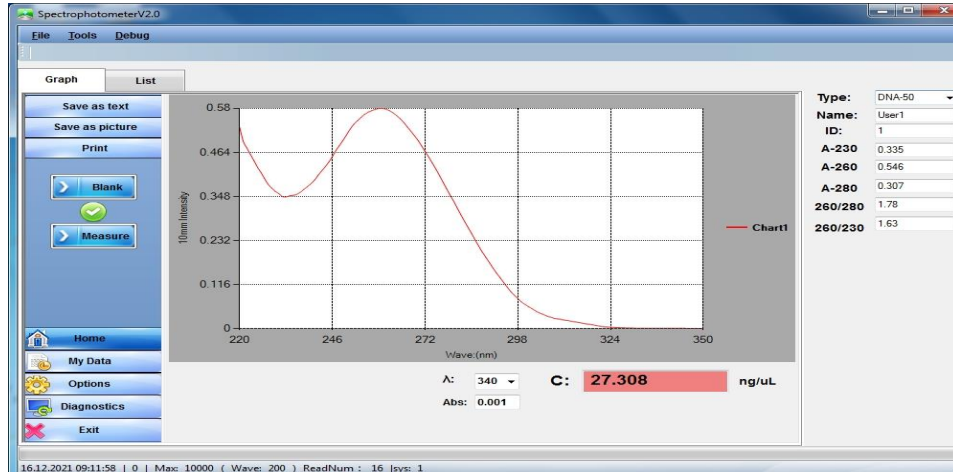
Elde edilen DNA'lar ile PZR yapıldı ve örnekler agaroz jele yüklenerek yürütme işlemi tamamlandı. Kontrol olarak MDA-MB-231 hücresinden elde edilen miR-182 DNA'sına ait PZR ürünü kullanıldı. Yürütme işleminin ardından jel UV görüntüleyici altında görüntülendi ve oluşan bantların 750 bp yakınında olduğu saptandı. Knockout işleminde indel oluşumu bekleniyordu. DNA'lara ait bantlar Şekil 4.18.'de incelendiğinde kontrol DNA'sı ile aynı hizada olmayan farklı bp uzunluğunda DNA saptanmadı ve knockout'un gerçekleşmediği görüldü. Deneyler aynı protokol ile tekrarlandı.



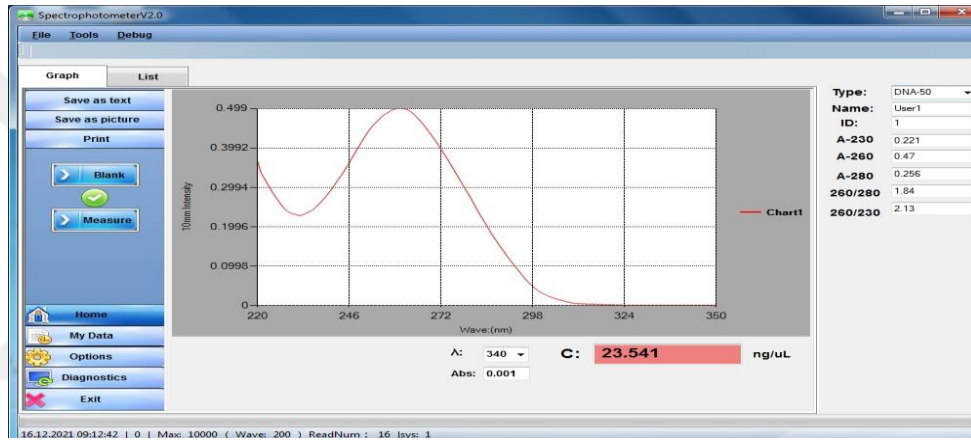
Şekil 4.18. Knockout uygulanan örneklerin jel görüntüsü

4.5. Koloni Seçimi

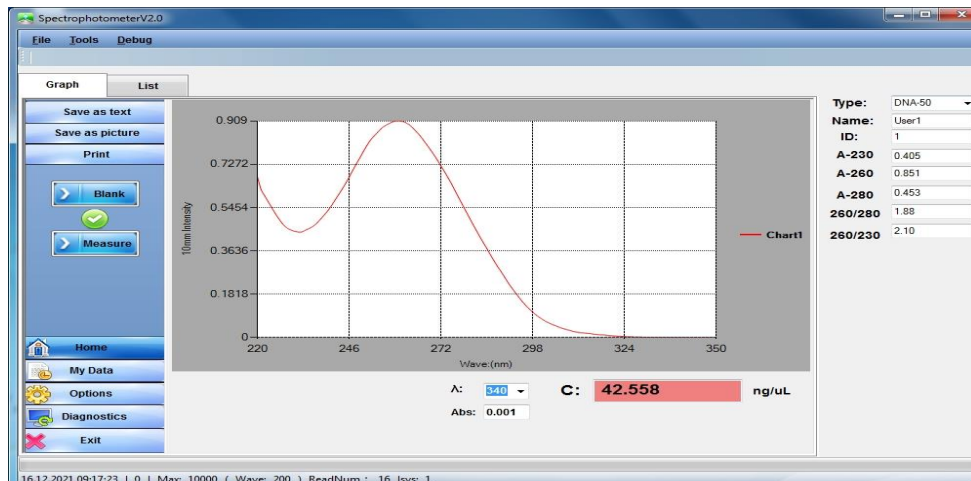
gRNA transfeksiyon işlemi ardından tek koloni elde aşamasında 51 adet koloni saptadık. Tüm bu tek kolonilerin büyütülmesi, DNA izolasyonu deneyleri üç ay sürede tamamlandı. Bu kolonilerin bir kısmına ait konsantrasyon ve saflık ölçüm sonuçları Şekil 4.19., Şekil 4.20., Şekil 4.21., Şekil 4.22.'de yer almaktadır.



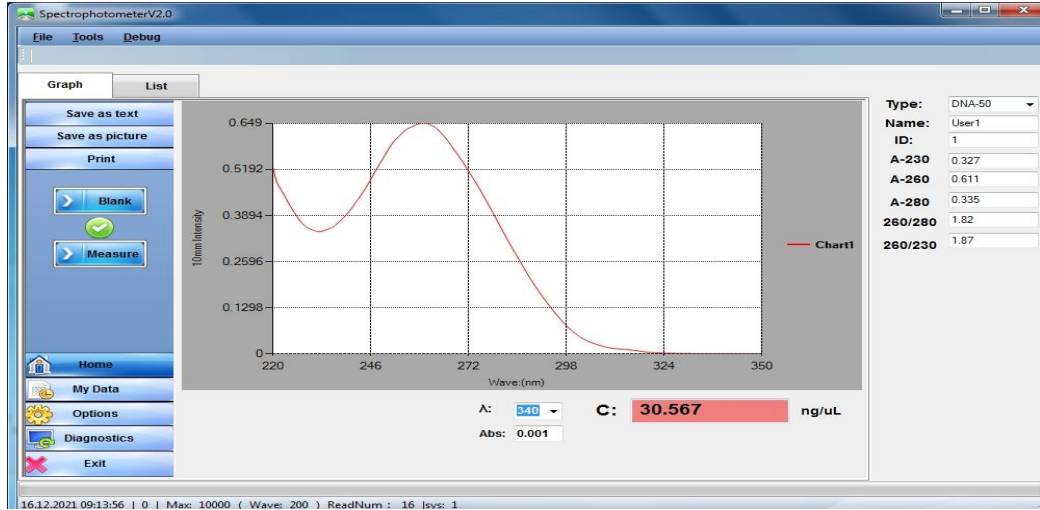
Şekil 4.19. P1A10 DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu



Şekil 4.20. P1E3 DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu



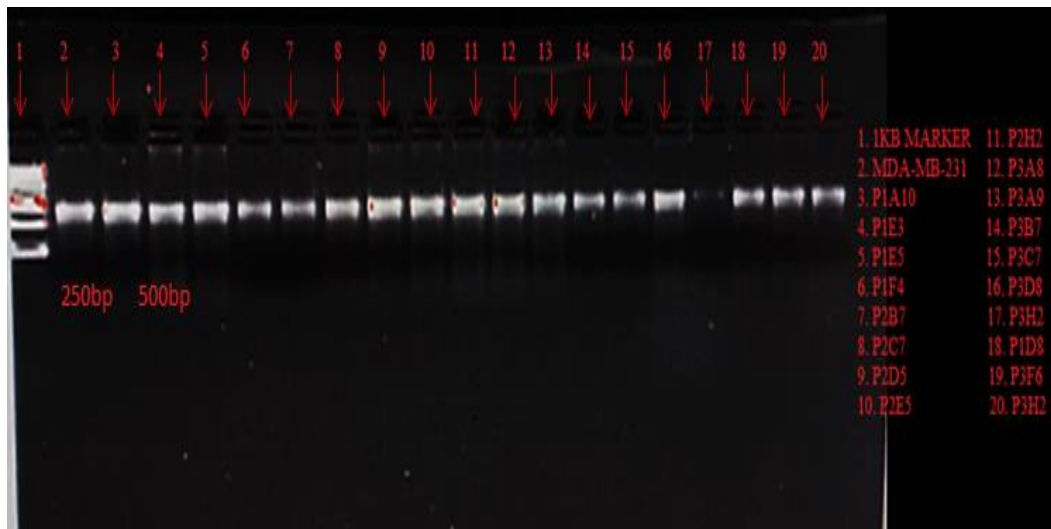
Şekil 4.21. P1E5 DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu



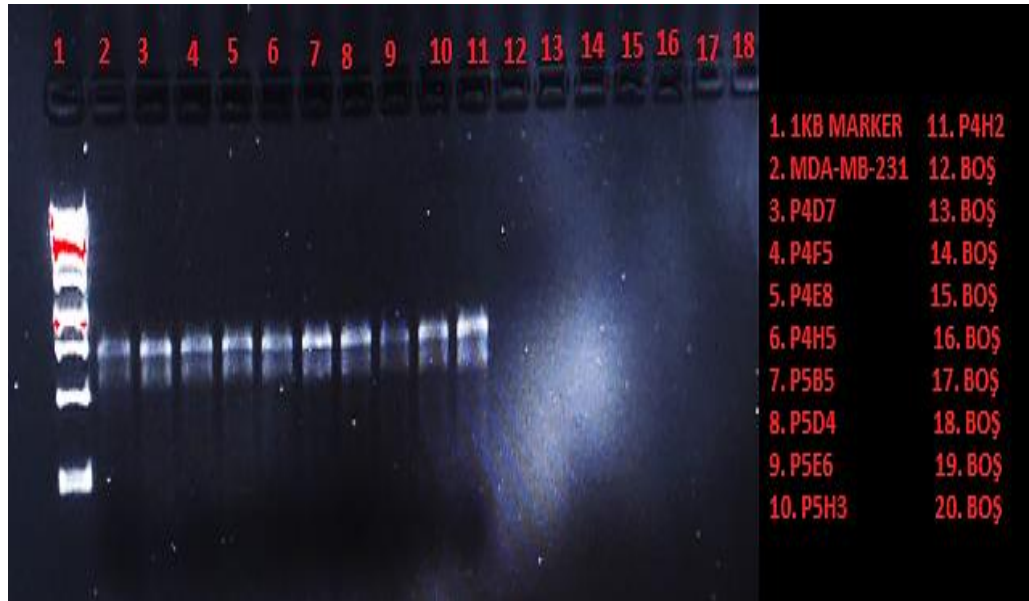
Şekil 4.22. P1F4 DNA'sı konsantrasyon ve saflık ölçüm sonucu

4.6. Knockout Doğrulaması

Kolonilere ait DNA'lar PZR ile çoğaltıldıktan sonra agaroz jele yüklendi ve yürütme işleminin ardından jel UV görüntüleyici altında görüntülendi. Oluşan bantlar Şekil 4.23. ve Şekil 4.24.'de incelendiğinde 750 bp yakınında olduğu saptandı. miR-182 gen bölgesinin knockout doğrulamasında indel oluşumu bekleniyordu. DNA'lara ait bantlar incelendiğinde kontrol DNA'sı ile aynı hizada olmayan farklı bp uzunluğunda DNA saptanmadı. Indel gözlemlenmedi, bu da knockout işleminin gerçekleşmediğini göstermektedir.



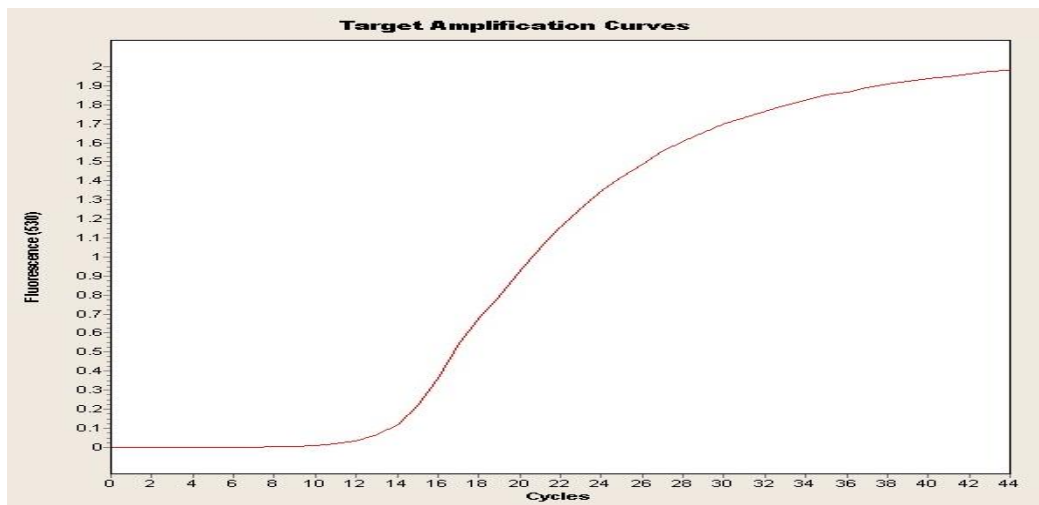
Şekil 4.23. Knockout kolonilerin agaroz jel sonuçları



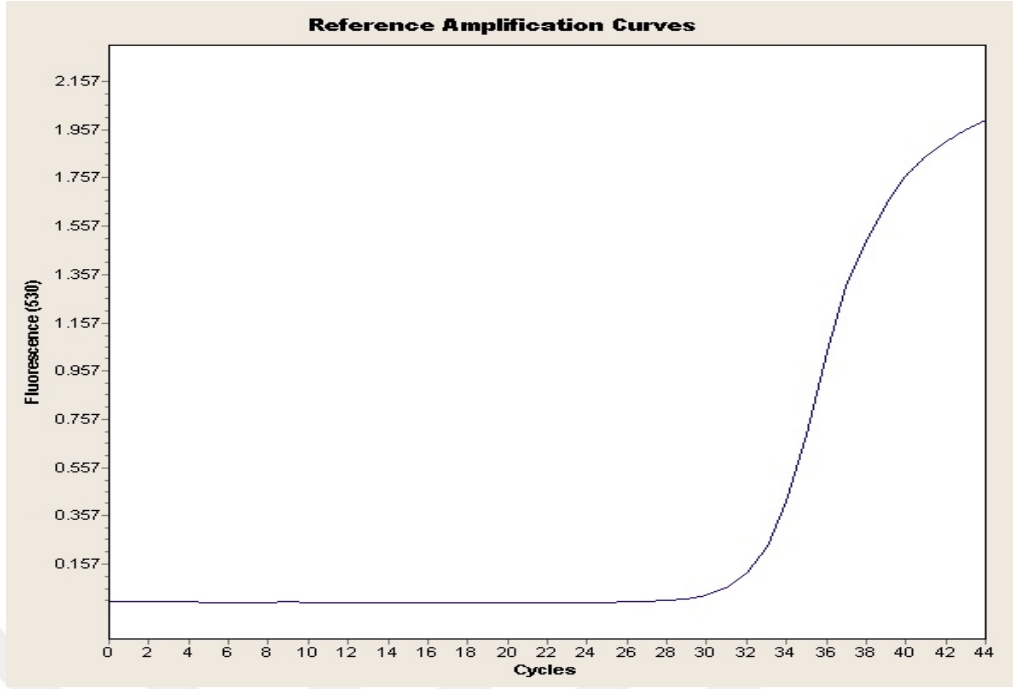
Şekil 4.24. Knockout kolonilerin agaroz jel görüntüleri

4.7.miR-182 Knockdown Sonuçlarının Analizi

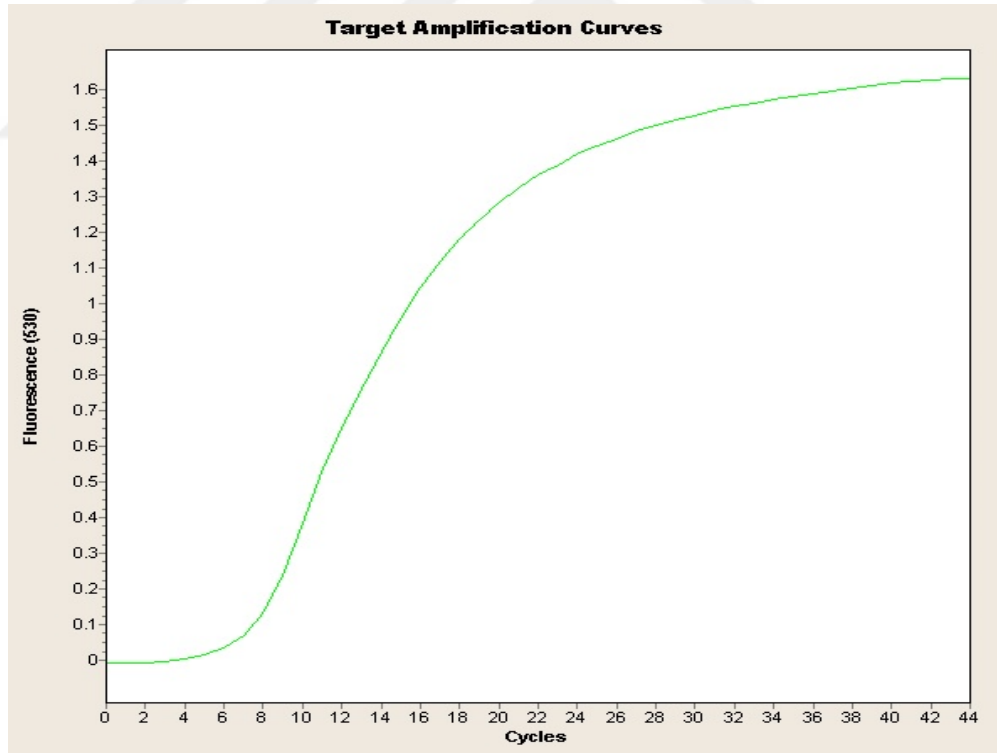
Anti-miR182 ile knockdown yapılan hücrelere ait Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarının CT grafiği Şekil 4.25., Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28., Şekil 4.29. ve Şekil 4.30.'de gösterilmiştir. Knockdown yapılan hücrelerin CT değeri ile referans geni olarak kullanılan U6'nın CT değeri arasında fark gözlemlendi. Ayrıca knockdown edilen hücreler ile non-target ve kontrole ait CT değerleri incelendiğinde miR-182'nin ekspresyonunun baskılandığı ve knockdown deneyinin başarıyla gerçekleştiğini gördük.



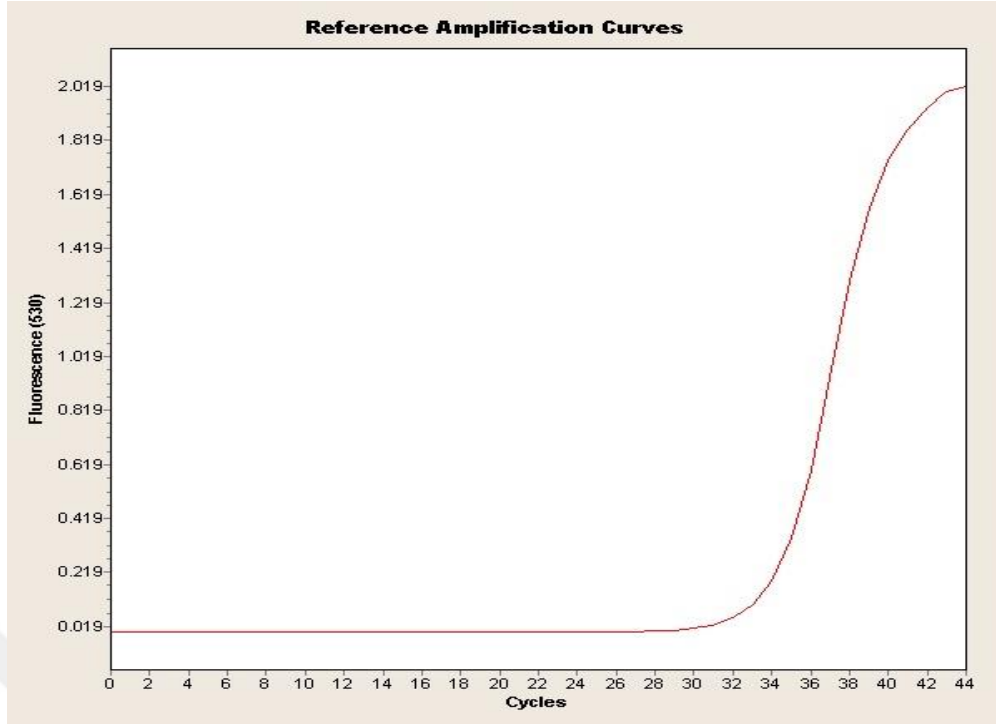
Şekil 4.25. Non-target C_T sonucu



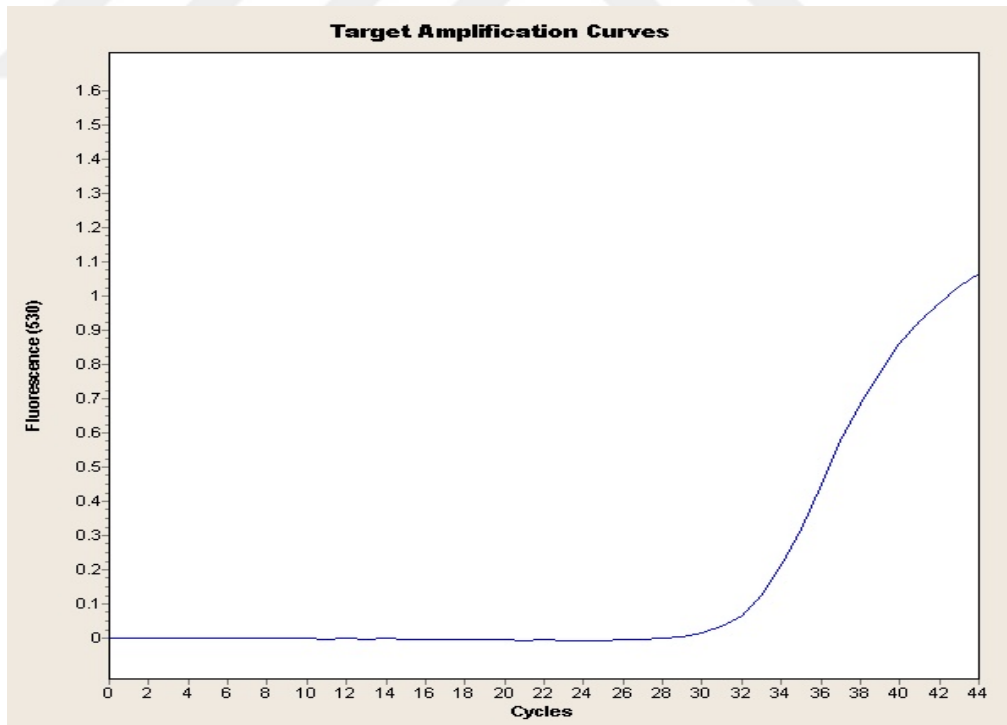
Şekil 4.26. Non-target referans gen (U6) C_T sonucu



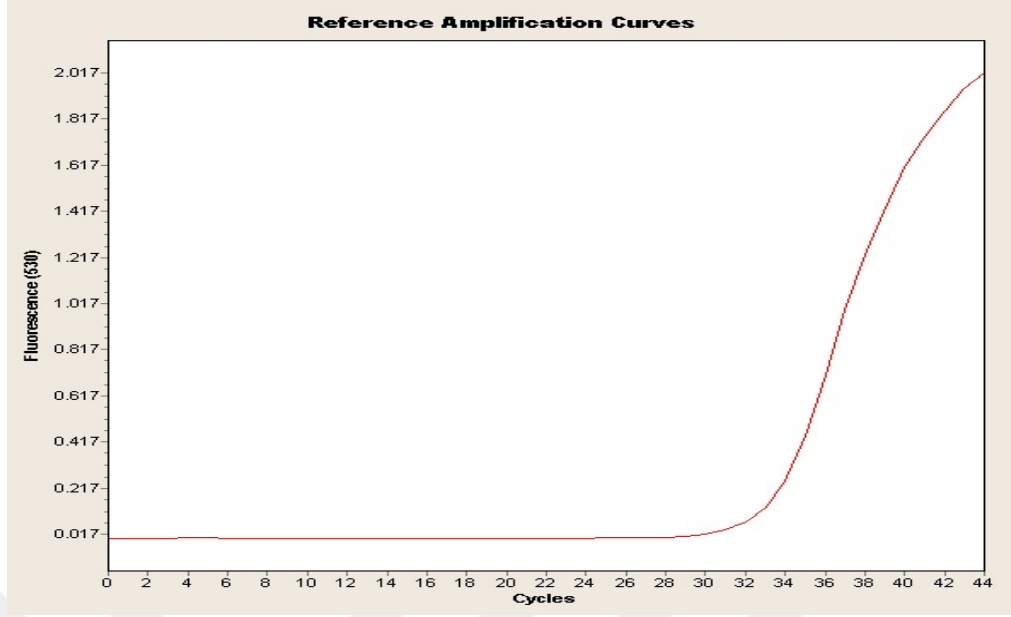
Şekil 4.27. Kontrol C_T sonucu



Şekil 4.28. Kontrol referans gen (U6) C_T sonucu

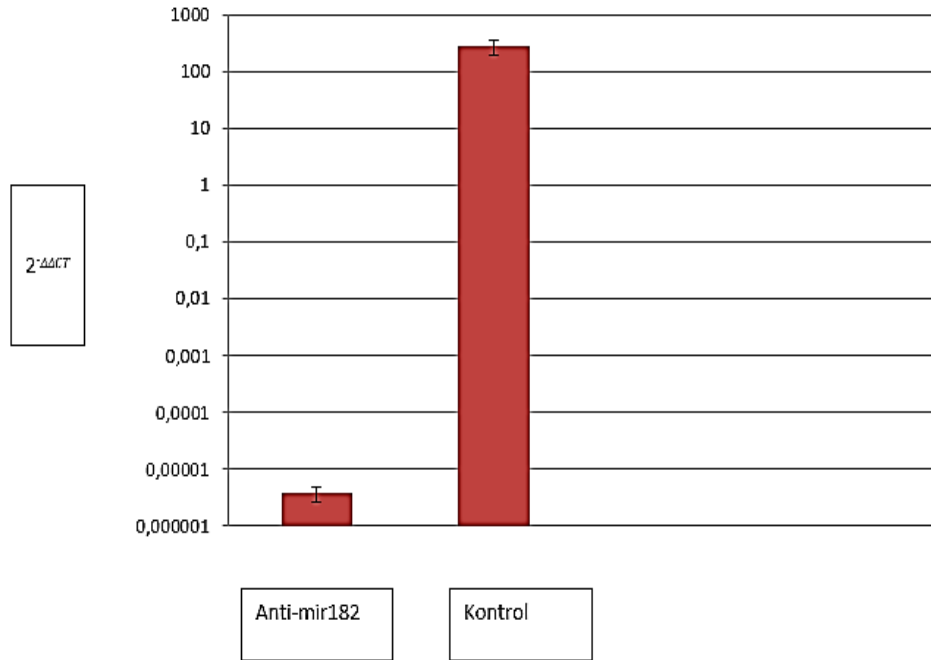


Şekil 4.29. Knockdown (anti-miR182) C_T sonucu



Şekil 4.30. Knockdown (anti-miR182) referans gen (U6) C_T sonucu

Gerçek Zamanlı PZR C_T değerleri kullanılarak ekspresyon analizi yapıldı ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü kullanılarak relatif ekspresyon grafiği Şekil 4.31.'de gösterildi. Grafiği oluştururken yapılan hesaplar Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Grafikte miR-182 geninin knockdown edildiğini gösterdik.



Şekil 4.31. miR-182'nin C_T verilerine göre gen ifadesinin gösterimi

Tablo 4.1. Relatif ifade analizi için antimiR-182 ve non-taġet C_T verilerinin analizi

Örnek	C _T (TARGET/REFERANS)	ΔC _T	ΔΔC _T	2 ^{-ΔΔC_T}
Anti-miR182	32,48(TARGET) 33,26(REFERANS,U6)	-0,78	18,02	3,76x10 ⁻⁶
NON-TARGET	13,65(TARGET); 32,45(REFERANS,U6)	-18,8		

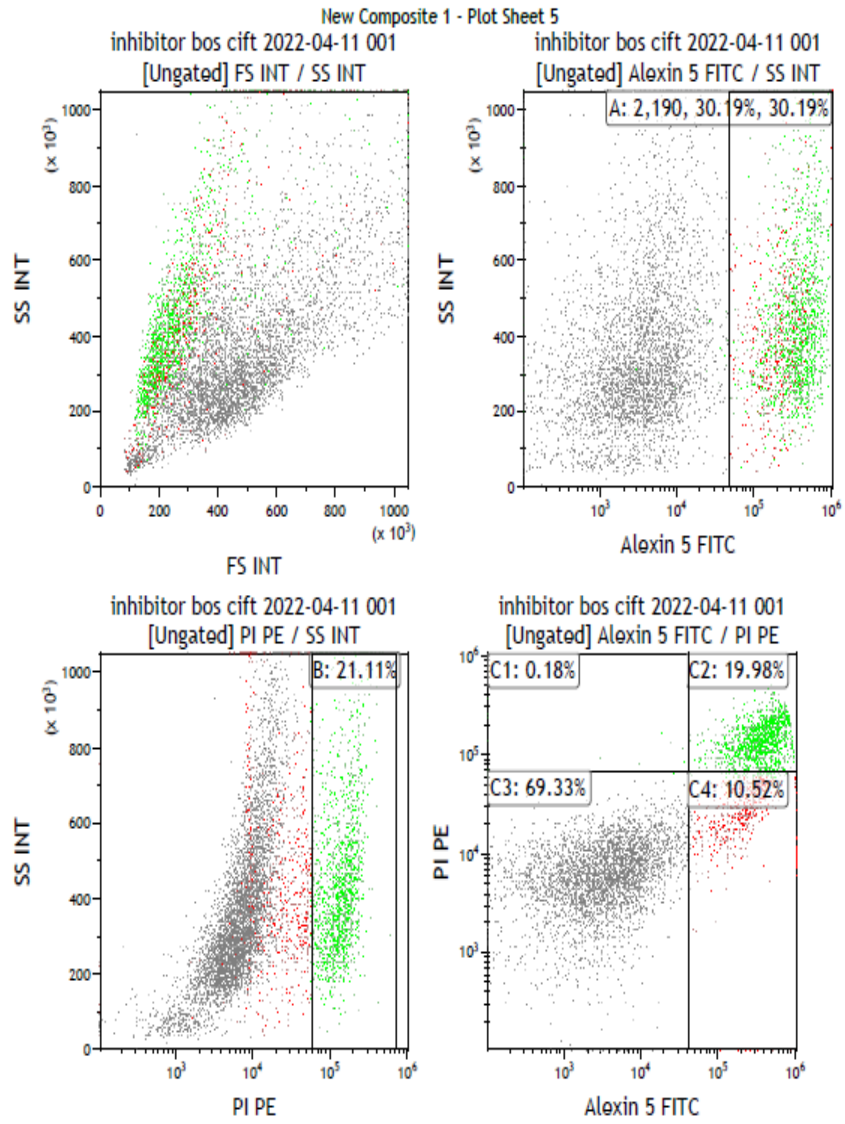
Tablo 4.2. Relatif ifade analizi için kontrol ve non-target C_T verilerinin analizi

Örnek	C _T (TARGET/REFERANS)	ΔC _T	ΔΔC _T	2 ^{-ΔΔC_T}
Kontrol	7,24(TARGET); 34,15(REFERANS,U6)	-26,91	-8,11	2,76X10 ²
NON-TARGET	13,65(TARGET); 32,45(REFERANS,U6)	-18,8		

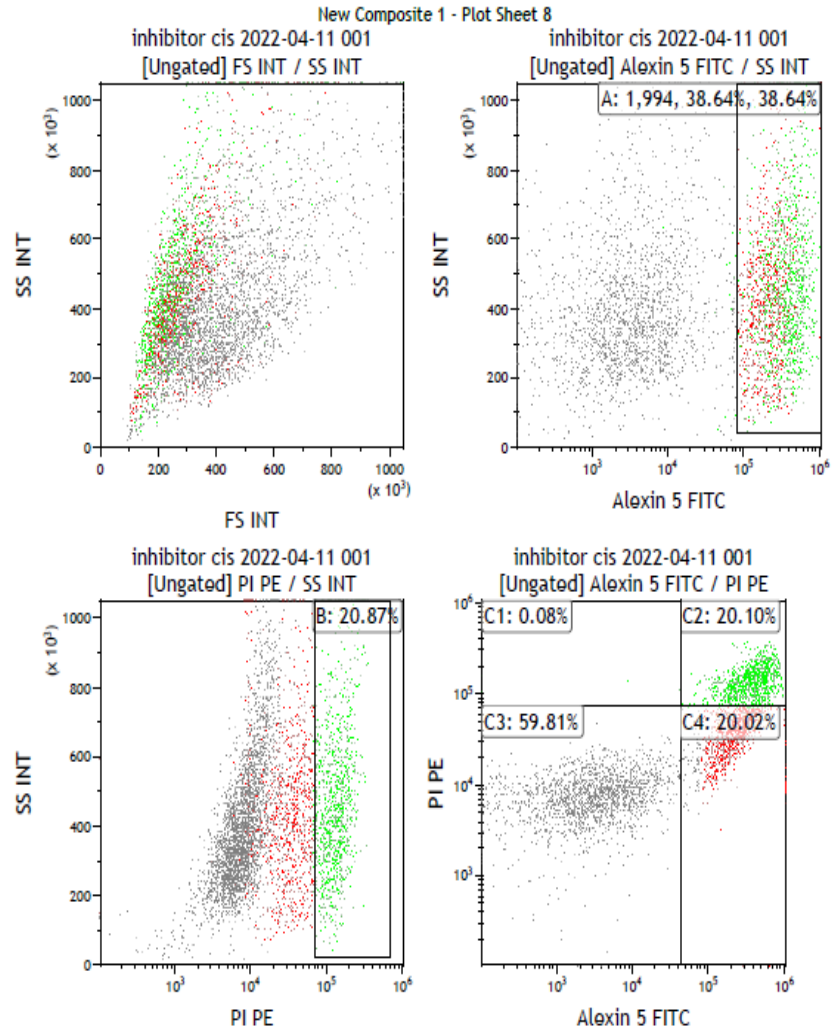
Analiz sonuçları Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de incelendiğinde anti-miR182 uygulanan hücreler ile non-target grubunda yer alan hücrelerin fold change değeri 3,76x10⁻⁶ olarak saptandı. Kontrol hücreler ve non-target grubunda yer alan hücrelerin fold change değeri ise 2,76X10² olarak saptandı. Referans geni U6 ifadesi ile anti-miR182 uygulanan hücrelerdeki miR-182 ifadesi kıyaslandığında; miR-182'nin ifadesinin azaldığı görüldü. Ayrıca anti-miR182 uygulanan hücrelerdeki miR-182 ifadesi ile kontrol ve non-target miR-182 gen ifadesi kıyaslandığında; miR-182'nin ifadesinin azaldığı ve baskılandığı görüldü. Veriler 2^{-ΔΔC_T} formülasyonu ile analiz edildiğinde knockdown'un başarılı bir şekilde gerçekleştiği bulundu.

4.8.Apoptoz Analiz Sonuçları

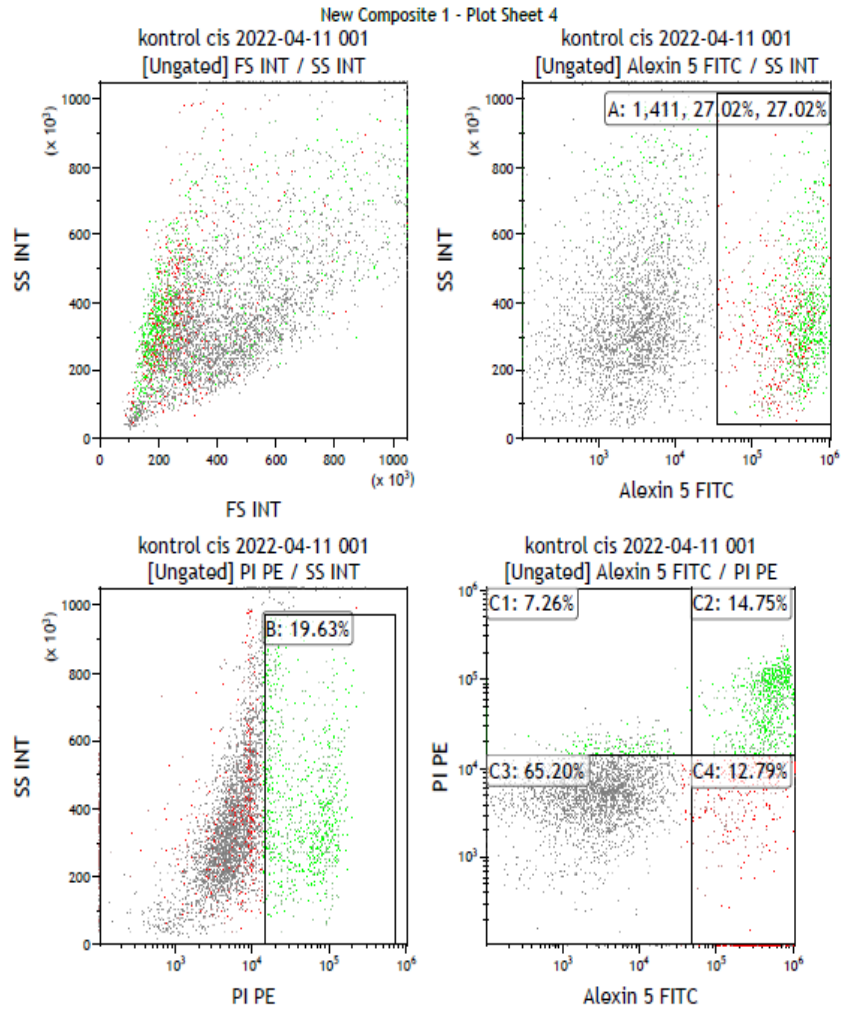
Akış sitometrisi ile ölü/canlı hücre analizi sonuçları Şekil 4.32., Şekil 4.33., Şekil 4.34., Şekil 4.35.'da yer almaktadır. Normal hücrelerde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin membranın iç yüzeyinde yer alırken apoptotik hücrelerde bu lipidler hücre zarının dış yüzeyine geçer fakat membran bütünlüğü bozulmaz. FITC (floresan bir boya) ile işaretlenen Anneksin V bu fosfodilserinlere bağlanarak hücrenin görünür olmasını sağlar. Bu işlemler akış sitometrisi cihazı ile yapılarak hücrelerin hangi aşamada olduğu saptanır. Yanı sıra apoptozun ilerleyen evrelerinde geç apoptoz ya da nekrozda fosfodilserinlerin membran dışına çıkmasına ek olarak membran bütünlüğü de bozulur; propidium iyodür (PI) kullanılmasının amacı da bu hücrelerin saptanmasıdır. Şekil 4.32. incelendiğinde anti-miR182 uygulanan fakat cisplatin uygulanmayan hücrelere bakıldığında; hücrelerin %10,52'sinin Anneksin V ile boyandığı, %19,98'inin de hem PI hem de Anneksin V ile boyandığı görülüyor. Bu veriler ele alındığında; hücrelerin %10,52'sinin apoptozda olduğu; %19,98'inin ise geç apoptoz/nekrozda olduğunu saptadık. Şekil 4.33. antimiR-182 ve cisplatin uygulanan hücrelerin %20,02'sinin aneksin; %20,10'unun hem aneksin hem de PI ile boyandığı görülmektedir. Bu veriler baz alındığında hücrelerin %20,02'sinin apoptozda olduğu %20,10'unun ise geç apoptozda olduğu saptadık. Şekil 4.34.'de cisplatin uygulanan hücrelerin %12,79'unun aneksin; %14,75'inin hem aneksin hem PI ile boyandığı görülmektedir. Bu veriler baz alındığında hücrelerin %12,79'unun apoptoz; %14,75'inin ise geç apoptozda olduğu görülmektedir. Şekil 4.35. incelendiğinde antimiR-182 ve cisplatin uygulanmayan hücrelerin %11,71'inin aneksin; %18,37'sinin ise hem aneksin hem PI ile boyandığı görülüyor. Bu veriler incelendiğinde hücrelerin %11,71'inin apoptoz; %18,37'sinin geç apoptozda olduğu saptandı.



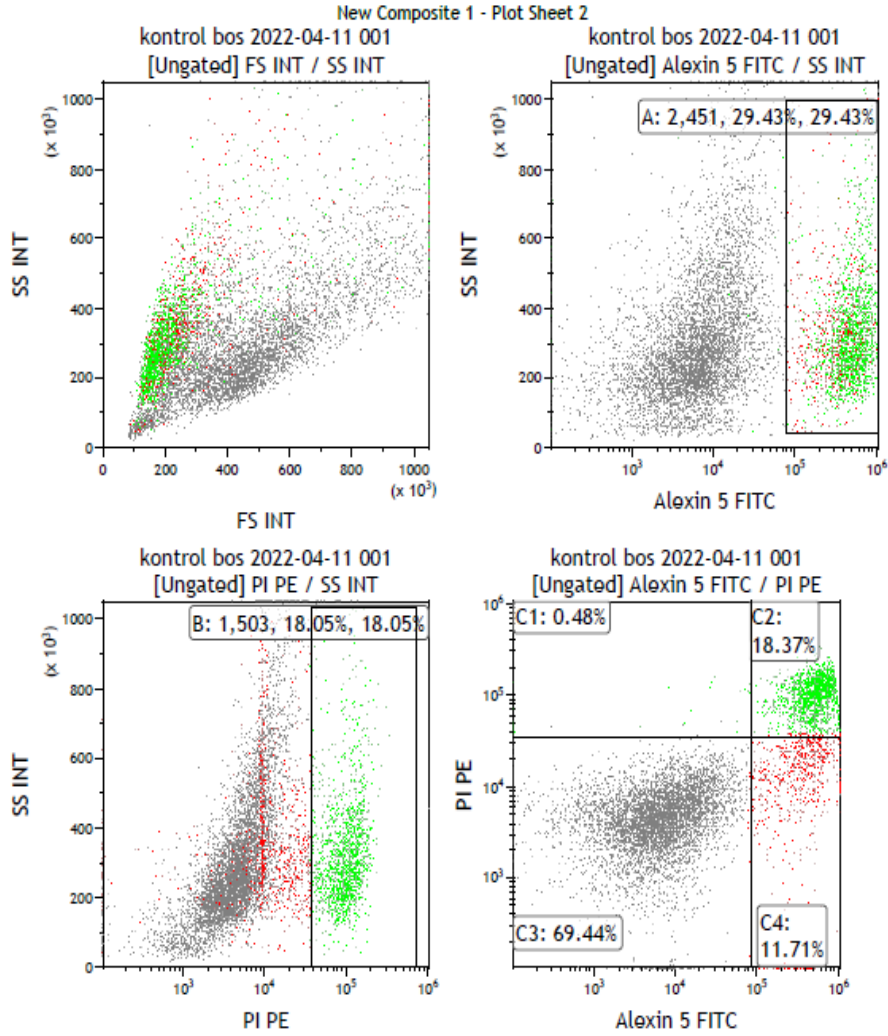
Şekil 4.32. anti-miR182 uygulanan MDA-MB-231 hücreleri



Şekil 4.33. anti-miR182 ve cisplatin uygulanan MDA-MB-231 hücreleri



Şekil 4.34. Cisplatin uygulanan MDA-MB-231 hücreleri



Şekil 4.35. anti-miR182 ve cisplatin uygulanmayan MDA-MB-231 hücreleri

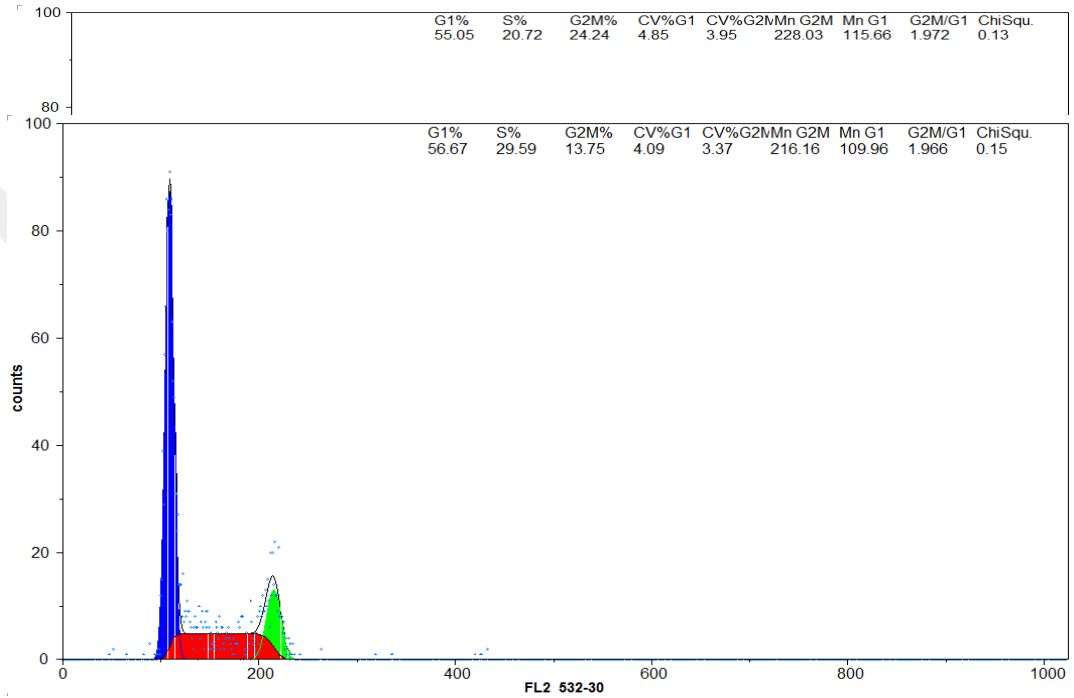
Tüm bu veriler incelendiğinde; anti-miR182 ve cisplatin uygulanan hücreler ile (Bkz. Şekil 4.33.), anti-miR182 uygulanmayan fakat cisplatin uygulanan hücreler (Bkz. Şekil 4.34.) karşılaştırıldığında knockdown yapılan hücrelerde apoptozun %12,58 arttığı görülmektedir. Ayrıca knockdown hücrelerde hücrelerin cisplatin uygulaması ile direkt ölümü tercih etmeleri yerine programlı hücre ölümü olan apoptoza yöneldiği görülmektedir.

4.9.Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü dağılım grafiği sonuçları Şekil 4.36., Şekil 4.37., Şekil 4.38. ve Şekil 4.39.'de yer almaktadır. Sonuçlar analiz edildiğinde miR-182 inhibitörü ve cisplatin uygulanan hücrelerde cisplatin ve anti-mir182 uygulanmayan MDA-MB-

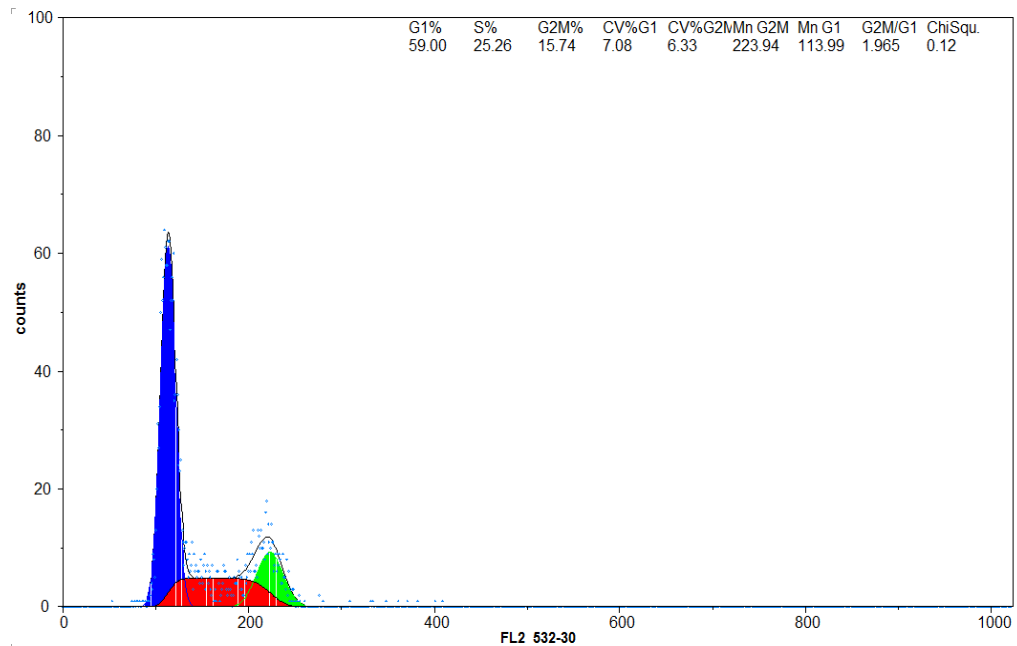
231 hücrelerine göre G2 fazında %12,23 oranında daha fazla artış saptandı. S fazında ise %14,94 oranında azalma saptandı. Hem inhibitör hem de cisplatin uygulanan hücreler ile sadece cisplatin uygulanan hücreler kıyaslandığında ise G2 fazında %10,49 oranında artış gözlemlendi. Aynı hücreler sadece antimiR-182 uygulanan hücreler ile kıyaslandığında ise G2 fazında %8,5 oranında artış saptandı. S fazında ise %4,54 oranında azalma olduğu görüldü

Şekil 4.36. antimiR-182 ve cisplatin uygulanan hücrelerin hücre

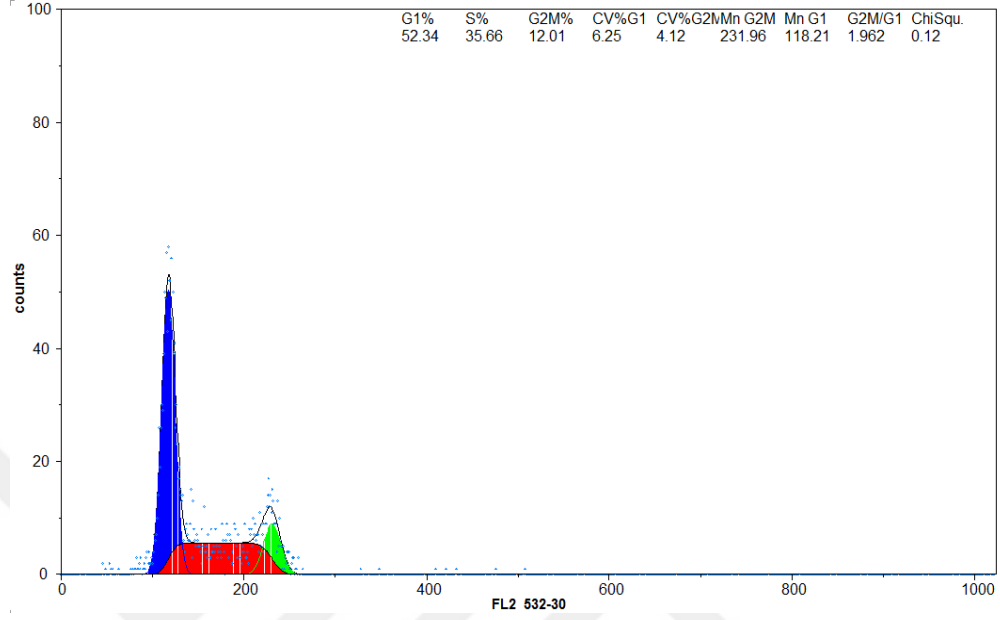


döngüsü analizi

Şekil 4.37. cisplatin uygulanan hücrelerin hücre döngüsü analizi



Şekil 4.38. antimiR-182 uygulanan hücrelerinin hücre döngüsü analizi



Şekil 4.39. MDA-MB-231 hücrelerinin hücre döngüsü analizi

5.TARTIŞMA

Kanser, uzun yıllardır dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Temel olarak, kontrol dışı hücre çoğalmasından kaynaklanır. Genel olarak, birkaç anahtar protein tanımlanmış ve çeşitli kanser türlerinde hücre döngüsü ilerlemesini, apoptozu ve gen transkripsiyonunu düzenleyen sinyal yollarını etkilediği bulunmuştur. Bu nedenle, araştırmacılar yıllardır kanser tedavileri için hedef olarak bu tür proteinlere odaklanmıştır. Son zamanlarda, kanser ilişkili genlerinin ifadesinin düzenlenmesine yönelik alternatif yaklaşımlardan biri olan miRNA'lar geniş ilgi uyandırmaktadır (Nguyen ve Chang 2018). MiRNA'lar gelişme, çoğalma ve apoptoz dahil olmak üzere sayısız hücresel süreçte önemli rollere sahiptirler. Kanser gelişimi de miRNA ifadesindeki değişikliklerle bağlantılıdır. (Place ve diğ. 2007) Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık teşhis edilen ve kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biri olarak bilinmektedir. (Pour ve diğ. 2019) Meme kanserine bağlı miRNA'lar onkogenik miRNA'lar (oncomiR'ler) ve tümör baskılayıcı miRNA'lar (tsmiR'ler) olarak iki gruba ayrılırlar. Çeşitli kanser vakalarında oncomiR'lerin ifadesi artarken tsmiR'lerin ise ifadesi azalır. Meme kanserini tedavi etmek için öncelikle miRNA'ların onkogenik veya tümör baskılayıcı rolünü ve nasıl olduğunun anlaşılması gerekir. OncomiR'leri bloke etme ve ifadesini azaltma meme kanseri tedavisinde önemli bir rol üstlenirken, tsmiR'lerin ifadesini artırma meme kanseri için olumlu tedavi edici etkiler sağlayabilir. (Kaboli ve diğ. 2015)

İnsan meme kanseri hücre hatlarında miR-10b'nin aşırı ifadesinin ortotopik ksenograft modellerinde akciğer metastazını desteklediği bulunmuştur ve miR-10b'nin susturulması, 4T1 hücre hattı tarafından oluşturulan meme tümörlerini taşıyan farelerde akciğer metastazını inhibe ettiği belirtilmiştir. Ayrıca; miR-10b'nin, metastatik meme kanseri, pankreas kanseri ve glioblastoma dahil olmak üzere yüksek oranda artmış ifadesi gösterilmiştir. miR-10b antisens inhibitörlerinin düşük doz doksorubisin ile birleştirilmesinin, primer memenin cerrahi olarak çıkarılmasından sonra kombinasyon tedavisinin verildiği prelinik metastatik meme kanseri modellerinde, mevcut lenf nodu metastazlarının ve uzak metastazların kalıcı gerilemesini sağladığı gösterilmiştir (Kim ve diğ. 2018).

Düşük miR-34a seviyeleri, meme kanseri hücrelerini radyoterapiye daha dirençli hale getirdiği gösterilmiştir. Ayrıca; miR-34a'nın normal ve meme kanseri hücre hatlarında radyasyona yanıt olarak p53 tarafından artmış ifadesi bulunmuştur (Schooneveld ve diğ. 2015).

miR-148b; integrin $\alpha 5$, fosfatidilinositol-4,5 bifosfat 3-kinaz, katalitik alt birim içeren Rho ile ilişkili protein kinaz 1 (ROCK1) hedefleyerek meme kanseri ilerlemesine neden olan ana koordinatörlerinden biridir. miR-335'in meme kanseri hücrelerinde Paired Box6'yı (PAX6) hedefleyerek çoğalmayı, hücre döngüsü ilerlemesini, koloni oluşumunu ve istilayı engellediği gözlemlenmiştir. miR-185, üçlü negatif meme kanserinde E2F transkripsiyon faktörü 6'yı (E2F6) doğrudan hedefleyerek tümör proliferasyonunu baskılamaktadır (Zheng ve diğ. 2016).

miR-99a, meme kanserinde FGFR3'ü, doğrudan 3' UTR'sini bağlanarak hedefler. Meme kanserinde FGFR3'ün susturulmasının, meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu engellediği gösterilmiştir (Long ve diğ. 2020). Çalışmamızda meme kanseri ile ilişkisi bazı çalışmalarda gösterilmiş olan ve bir oncomiR olduğu düşünülen miR-182'yi hedefledik. MiR-182'nin cisplatin direnciyle ilişkili olduğunu; hem akış sitometrisi analizi ile hem de hücre döngüsü analizleri ile gösterdik. AntimiR-182 ve cisplatin uygulanan hücreler ile sadece cisplatin uygulanan hücreler kıyaslandığında apoptozun arttığını belirledik.

miR-182'nin artmış ekspresyonu; FOXO3, MITF, MTSS1 veya PDCD4 gibi çok sayıda hedefin baskılanması yoluyla invazyon, hayatta kalma ve kemodirenç artışına güçlü bir şekilde katkıda bulunur. miR-182'nin, tümörün ilerlemesinin belirlenmesi için biyobelirteç olarak kullanılması önerilmektedir. Tiroid kanserinde, artmış miR-182 ifadesi papiller ve foliküler tiroid karsinomlarında rapor edilmiştir. miR-182 ifadesinin medüller tiroid karsinomunun malign progresyonunda rol oynadığı da gösterilmiştir (Spitschak ve diğ. 2017).

miR-19b'nin, meme kanserinin prognostik bir biyobelirteç olarak rol oynayan fosfatidilinositid 3-kinaz (PI3K) ve serin-treonin kinaz (Akt) yollarına aracılık ederek hücre proliferasyonu ve invazyonuna katkıda bulunduğu bulunmuştur. Ayrıca miR-30 ailesi üyelerinin, meme kanserinde hücre invazyonunda çok önemli bir rol

oynadığı gösterilmiştir. Bu miRNA'ların dışında, serum miR-1915-3p ve miR-455-3p de hücre proliferasyonunu ve migrasyon kabiliyetini düzenleyerek meme kanseri ilerlemesinde rol oynadığı bulunmuştur (Zhao ve diğ. 2019).

Serviks kanserinde, miR-182'nin, anti-miR182 ile knockdown edilmesiyle servikal karsinomun ilerlemesininin fare ksenograft modelinde, HeLa ksenograftını önemli ölçüde küçülttüğü gösterilmiştir. Bu nedenle, miR-182'nin rahim ağzı kanserinde onkojenik bir rol oynadığını ileri sürülmektedir (Tang ve diğ. 2013).

miR-182'nin prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasına ve migrasyonuna katıldığı; prognostik ve tanısal bir biyobelirteç olarak araştırılması önerilmektedir. miR182/FOXO3a, mesane kanserinin progresyonu ve prognozu ile ilişkilidir. Mesane kanserinde miR-182'nin artan ifadesi ve FOXO3a'nın azalan ifadesi , mesane kanserli hastaların prognozu ile ilişkilendirilmiştir. miR-182 ekspresyonunun azalmış ifadesi FOXO3a ifadesini artırır, mesane kanseri hücre proliferasyonunu inhibe eder ve apoptoz indüklenir (Yu ve diğ. 2022) miR-182 ifadesi; bitişik normal dokularla karşılaştırıldığında insan gastrointestinal stromal tümörlerinde (GISTs) önemli ölçüde artar. miR-182'nin artan ekspresyonu , artan proliferasyon ve azalmış apoptoz ile birlikte GIST-T1 hücre büyümesini artırır. Ek olarak, cylindromatosis (CYLD), miR-182'nin doğrudan hedefi olarak tanımlanmıştır. miR-182'nin aşırı ifadesi, CYLD ifadesini bastırır ve nükleer faktör (NF)-κB aktivasyonunu artırır. Sonuç olarak; miR-182'nin CYLD ifadesini negatif olarak düzenleyerek GIST hücre büyümesini desteklediğini gösterilmiştir. Bu bulgular, miR-182 antagonistinin insan GIST'inin tedavisi için umut verici bir terapötik strateji olabileceğini göstermektedir (Ling ve diğ. 2018).

Araştırmalar, miR-182'nin mide kanseri hücrelerinde sıçan sarkomu (RAS) ile ilişkili bağlanma 27a'yı (RAB27A) düzenleyerek hücre canlılığını, göçünü ve invazyonunu koruduğunu göstermiştir. Ek olarak; miR-182'nin, FOXF2, RECK ve metastaz baskılayıcı 1'e (MTSS1)'e aracılık ederek prostat kanserinde hücre invazyonu ve proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir. miR-182'nin inhibisyonunun, meme kanserinde Kaspaz 9 ekspresyonunu düzenleyerek pro-apoptozis ve antiproliferasyon etkileri ortaya çıkardığı bulunmuştur (Zhao ve diğ. 2019).

Meme kanseri trastuzumab dirençli hücrelerde yapılan çalışmada miR-182 artmış ifadesinin MET'yi hedefleyerek ve downstream PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu inhibe ederek trastuzumab direncini azalttığı gösterilmiştir. Bu nedenle miR-182'nin upstream regülasyonu veya hedef geninin downstream regülasyonu, meme kanseri trastuzumab dirençli hücrelerde trastuzumab direncinin üstesinden gelmek için potansiyel tedavi yöntemi olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir. (Yue ve Qin 2019). Çalışmamızda ise üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde miR-182 knockdown edildiğinde cisplatin direncinin azalarak apoptozun arttığı gösterilmiştir. Bu da miR-182'nin meme kanserinde ilaç direnci ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

WFOX ifadesinin kaybı veya azalması meme kanseri ile ilişkilidir. İmmünohistokimyasal boyama, normal insan meme dokusunda güçlü WFOX ifadesini gösterir. WFOX ifadesi, meme kanseri dokularının %55–63.2'sinde azalır ve meme kanseri dokularının %29'unda kaybolur. WFOX varyantları, normal meme dokularıyla karşılaştırıldığında. WFOX SDR alanının çoğunluğundan yoksun olan FORIII transkripti, meme tümörlerinin %50'sinde ve meme kanseri hücre dizilerinin %90'ında eksprese edilir. Bu sonuçlar, WFOX geninin, meme kanseri progresyonunda rol aldığını göstermektedir (Li ve diğ. 2015)

Bir başka çalışmada stres koşulları altında WFOX'un p53 ile iş birliği yaptığını apoptozu desteklediğini ve bunun da tümör oluşumu için bir bariyer oluşturduğunu göstermektedir (Abdeen ve diğ. 2018). Üçlü negatif meme kanserinde miR-182'nin, FOXF2'yi baskılayarak potansiyel bir çoğalma ve metastaz indükleyicisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca miR-182, meme kanseri progresyonu üzerinde destekleyici bir etki ortaya çıkarırken; delesyonu meme kanserinde PTEN ifadesini teşvik ederek hücre çoğalmasını ve invazyonunu baskılamada rol oynadığı görülmüştür (Lu ve diğ. 2020). Bu çalışmalar ve yaptığımız çalışmalar göz önüne alındığında miR-182'nin meme kanserinde önemli bir rol oynadığı söylenebilir.

WFOX ifadesinin downstream regülasyonunun, meme kanserinde hastalığın agresif seyretmesi ve hasta sağkalımını kısalttığı bulunmuştur. Bu da WFOX'un meme kanseri için tümör baskılayıcı rolünü ortaya koymaktadır (Pospiech ve diğ 2018) Başka bir çalışmada da yine WFOX'un bir tümör baskılayıcı olduğu ayrıca

kaybının pek çok kanserle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Azalmış WWOX ifadesinin yüksek ölçüde üçlü negatif meme kanserinde klinikopatolojik faktörlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Schrock ve Huebner 2015). WWOX tümör baskılıyıcı rolünü STAT3 aktivitesini baskılayarak gerçekleştirir ve tümör büyümesini inhibe eder. Bunu yapmak için de JAK2 fosforilasyonunu inhibe eder ve JAK2; STAT3'e bağlanamaz. Üçlü negatif meme kanserinde düşük WWOX ifadesinin yüksek STAT3 aktivitesine neden olduğu gözlemlenmiştir (Chang ve diğ. 2018). WWOX kodlama bölgesindeki delesyonlar meme kanseri vakalarının neredeyse %80'inde görülür. Brca1 ile etkileşime giren MRN kompleksinin bir bileşeni olan Rad50 proteinine dayalı bir modelde WWOX, BRCA1'e bağlanmak için Rad50 ile rekabet eder ve sonuç olarak uç rezeksiyonunu bozar. Bu nedenle, WWOX eksikliği sergileyen kanserli hücrelerde, hücrelerin DNA hasarı indükleyen sitotoksik tedavilerde hayatta kalmasına izin verilir. WWOX protein ekspresyonu kaybının, fare embriyonik fibroblastlarında (MEF'ler) ve insan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde radyasyon ve cisplatin direncine katkıda bulunduğu ve bunun da kanser nüksü ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Hem insan meme MCF10A hem de WWOX içermeyen fare MEF hücreleri, iyonlaştırıcı radyasyon ve bleomisin tedavisi yoluyla çift zincir kırıklarının uyarılması üzerine önemli ölçüde sağkalım sergilemiştir. Ayrıca WWOX eksikliği olan MDA-MB-231 hücreleri, WWOX eksprese eden hücrelerden daha kısa sürede nüks etmiştir (Pospiech ve diğ. 2018). Çalışmamızda WWOX eksprese etmeyen MDA-MB-231 hücre hatlarının hedeflenmesinin nedeni budur. Yapılan çalışmalarda da gösterildiği gibi WWOX eksikliği üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde cisplatine direnç gelişimine neden olabilmektedir. Bu direncin tedavi edici ajanlar ile kırılması meme kanseri için yeni tedavi olanakları sağlayabilir.

Cisplatin DNA'ya bağlanarak RNA transkripsiyon ve DNA replikasyon aktivitesini engeller. DNA'da oluşan lezyonlar tamir edilmediğinde apoptoz devreye girer. Üçlü meme kanseri hastaları farklı alt tiplere bağlı olarak kemotörapi ajan olan cisplatine farklı cevap oluşturur. Hücreler cisplatinin alımını inhibe ederek ya da hücreden çıkışını artırarak, redoks mekanizmasıyla ilacın detoksifikasyonunu sağlayarak, apoptotik mekanizmanın negatif regülasyonu ile cisplatine dirençli hale gelebilir. Üçlü meme kanserinin BL1 ve BL2 alt tiplerinde sıklıkla BRCA gen

mutasyonları bulunur dolayısıyla DNA tamir sorunu mevcuttur, bu da LM ve LAR alt tiplerine kıyasla neden cisplatine karşı daha hassa olduklarını ortaya koyar (Hill ve diğ. 2019).

Cisplatine tedavinin ilk zamanlarında cevap veren hastalar, homolog rekombinasyon DNA tamir mekanizmasının devreye girmesiyle sıklıkla cisplatine direnç gösterir. RAD51'in MDA-MB-231 hücre hattında siRNA ile knockdown edilmesi hücreleri cisplatine hassas hale getirmiştir (Lee ve diğ. 2022).

miRNA'lar, gen ifadesinin önemli bir transkripsiyon sonrası düzenlemesini oluşturur ayrıca normal doku gelişimi ve işlevlerinde olduğu kadar, hastalıkların patogenezinde de önemli roller oynadığı kanıtlanmıştır. İşlevlerini in vivo geliştirmek veya azaltmak için çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. (McClellan ve diğ. 2021) CRISPR, öncelikle bulaşıcı istilacı virüslere ve fajlara karşı çalışan ve in vitro DNA'yı spesifik olarak parçalamak için kullanılan, prokaryotların kalıtsal ve adaptif bir antiviral bağışıklık sistemidir. CRISPR/Cas9 sistemini kodlamayan genlere (mirna, lncrna, circrna) uygulamanın sınırlamalarından biri, off-tağet etkidir. Bazen cas9 uygunsuz bir şekilde hedefe bağlanır ve hedef bölgenin dışındaki dizide mutasyon oluşturur. Bir diğer kısıtlama da küçük indellerin belirli bir kodlamayan genin işlevsel kaybına neden olmamasıdır. Bu engelin üstesinden gelmek için Ho ve diğerleri, marker genleri genoma entegre etmek için özel bir seçim sistemi olan homolog rekombinasyonu baz aldılar ve CRISPR-Cas9 sisteminin yardımıyla lncRNA-21A başarıyla MCF-7 hücrelerinde knockout edildi (Yang ve diğ. 2018). Başka bir çalışmada da rehber RNA lentiviral-CRISPR/cas9 vektörü kullanılarak hepatosellüler karsinom (HCC) hücrelerinde miR-3188'de indel oluşturularak knockout edilmiş bu hücrelerde büyüme ve koloni oluşumu önemli ölçüde inhibe edilmiştir (Zhou ve diğ. 2017).

miRNA baskılanması için CRISPRi tabanlı stratejinin, çalışma tasarımı adımında dikkate alınması gereken birkaç dezavantajı vardır. CRISPRi, kanonik olmayan biyogenez yollarında yer alan miRNA'lar için optimal bir seçim olmayabilir. Örneğin, kendi transkripsiyon başlama bölgesi olmayan intronik miRNA'lar dCas9-KRAB kompleksi tarafından hedeflenemez. Ayrıca, yakın zamanda gösterildiği gibi, pri-miRNA'lar lncRNA'lar olarak işlev görebilir ve

oluşturdukları olgun miRNA'lardan bağımsız olarak kendi biyolojik rollerini yerine getirebilirler. Bu gibi durumlarda, CRISPRi kullanılarak genomik seviyede miRNA'ların inhibisyonu, lnc-pri-miRNA'ların bozulmasıyla ilgili beklenmedik olaylara neden olabilir. Ayrıca, miRNA'ların transkripsiyon başlama bölgesi genomik lokusları transkripsiyon arttırıcılar gibi düzenleyici elementler içerebilir. Bu gibi durumlarda, CRISPRi aracılı inhibisyon, potansiyel olarak enhancer ile ilişkili genlerin ifadesi üzerinde of-target etkiyle sonuçlanabilir (Sledzinska ve diğ. 2022). CRISPR/Cas9 sistemlerinin kısıtlamalarından bir diğeri hedef dizinin özgüllüğünü arttırmak için, hedef sekans için spesifik rehber RNA'lar tanımlamaya olanak sağlamak amacıyla binlerce rehber RNA analiz edilmesidir. Bununla birlikte, gRNA etkinliğinin artması için altta yatan moleküler mekanizmalar iyi bilinmemekle birlikte, hedef genlere özgü rehber RNA aktivitesi için bazı tahmin değerleri vardır. PAM dizileri tarafından hedef bölgenin tanınmasında da bazı engeller mevcuttur. crisprRNA'nın taşınması da knockout etkisini etkileyen bir durumdur. Nanopartüküllerin, viral vektör ve organik yağ moleküllerine göre transfeksiyon veriminin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Singh ve diğ. 2021). Çalışmamızda MDA-MB-231 hücrelerine tasarlanan gRNA'ları transfekte etmek için lipofektamin kullandık. Nanopartüküller transfeksiyon verimi için daha etkili olabilir. Bir başka çalışmada lentivirüsler uygun gRNA ile kullanılarak gastrik kanser hücre hatlarında RhoA, Gli1 ve Gal3 genleri knockout edilmiştir (Jin ve diğ. 2020). CRISPR/Cas9 sistemi ile yapılan çoğu çalışma protein kodlayan genler in knockout edilmesi ile ilgilidir ve kodlanmayan RNA bölgeleri üzerindeki çalışmalar oldukça azdır. Yapılan bir çalışmada mir-23b ve mir-27b rehber RNA oligonükleotitleri lentiCRISPR/Cas9 V2 vektör ile ligate edildikten sonra MCF7 hücreleri enfekte edildi. Knockout sonucunda hücre büyümesi ve koloni oluşumu önemli ölçüde azaldı. Bu sonuçlar her iki miRNA'nın meme kanseri için onkojenik miRNA olduğunu göstermektedir (Hannafon ve diğ. 2019). Çalışmamızın ilk aşamasında miR-182 ifadesini azaltmak için CRISPR-CAS9 yöntemi kullanıldı fakat tüm aşamalar başarıyla tamamlanmasına rağmen knockout belirlenmedi. miRNA'lar üzerinde CRISPR-CAS9 knockout yönteminin çok sınırlı kullanılması ve genellikle bunun içinde lentiviral vektörlerin tercih edilmesi yanı sıra kodlanmayan RNA

bölgeleri üzerinde yapılan çalışmaların oldukça sınırlı olması göz önüne alındığında miRNA inhibitörü kullanılması kararlaştırıldı.

RNAi, gen ifadesini baskılamada nispeten çok yüksek bir etkinliğe sahiptir. Optimal olarak tasarlanmış RNAi araçları, hedef hücrelere iletdikten sonra amaçlanan hedef mRNA'ların $>70\%$ oranında yıkılmasını sağlar. CRISPR/Cas9'un memeli genlerini düzenleme yeteneği büyük ölçüde farklılık gösterir ve bazı çalışmalarda 1% ila 79% arasında değişen verimlilik rapor edilmiştir. CRISPR/Cas9 sisteminin bir diğer önemli sınırlaması, hedeflenen hücrelerde belirli bir genin tüm alellerini aynı anda hedefleyememesidir. CRISPR/Cas9, DNA elementini hedef aldığından, bir genin ifadesini tamamen değiştirebilmesi için genlerin tüm alellerinin modifiye edilmesi gerekebilir. Yaygın olarak kullanılan ölümsüz insan hücre hatlarının çoğu, triploid veya daha fazla kromozom tamamlayıcısı olan anöploiddir ve gen silme işlemi karmaşık hale getirir. Bunun aksine, RNAi, transkriptleri hedeflediği için verimli ve tek tip gen baskısına neden olur (Unniyampurath ve diğ. 2016).

Yapılan bir çalışmada T ve B lenfosit kültürleri kullanılarak miRNA inhibisyonu antimiR'ler ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar belirli bir miRNA inhibisyonu için en uygun metodun antimiR'ler olduğunu ortaya koymuştur. AntimiR'ler hem yüksek verimlidir hem de tekrar tekrar üretilebilir (Haftmann ve diğ. 2015).

Bir çalışmada anti-miR21 kullanılarak mir-21 inhibe edilmiştir, miR-21'in inhibisyonunun kolon kanserinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Song ve Rossi 2013). Bu tarz çalışmalar anti-miR'lerin tedavi edici olarak da etkinliklerine ışık tutmaktadır.

Anti-miRNA oligonükleotitleri (AMO'lar), 17 ila 22 nükleotit uzunluğunda ve seçilen bir miRNA'yı tamamlayıcı olacak şekilde tasarlanmış, tek sarmallı, kimyasal olarak modifiye edilmiş DNA benzeri molekülleri temsil eder. İlgili genin ifadesini spesifik olarak inhibe ederler. Mekanik olarak, AMO'lar Watson-Crick bağlanması yoluyla bir ASO-miRNA dubleksi üreterek hedef miRNA geninin RNase-H aracılı bölünmesine yol açar. Antagomirler miRNA'ları inhibe etmek için

tasarlanmış RNA terapötik moleküllerini temsil eder. Bunlar, kimyasal olarak modifiye edilmiş ve hedeflenen miRNA'ları tamamlayıcı kolesterol konjuge tek sarmallı 23 nükleotit uzunluğunda RNA molekülleridir (Souckova ve diğ. 2020).

Bazal-benzeri meme kanseri hücreleri, komşu hücreleri, TGF- β sinyal yolunu değiştirerek FOXF2 ifadesini değiştirir. Altta yatan mekanizmayı araştırmak için yapılan deneylerden biri TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 ile sürekli uyarımın FOXF2 mRNA ifadesini önemli ölçüde değiştirmediğini, ancak MDA-MB-231 hücrelerinde FOXF2 protein ifadesini azalttığını göstermiştir, bu da TGF- β 'nın transkripsiyon sonrası seviyede FOXF2 ifadesini negatif olarak düzenlediğini göstermektedir. Potansiyel olarak FOXF2'yi hedefleyen, TGF- β 1, TGF- β 2 veya TGF- β 3 tarafından upstream regüle edilen miRNA'lardan biri miR-182'dir ve ifadesi, MDA-MB-231 hücrelerinde TGF- β stimülasyonu ile upstream düzenlenmiştir. miR-182'nin, Bazal-benzeri meme kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde EMT'yi ve metastazı desteklediğini göz önünde bulundurarak, miR-182'nin TGF- β yoluyla FOXF2 susturulmasına aracılık etmedeki rolü MDA-MB-231 hücrelerinde miR-182 mimik transfeksiyon ile önemli ölçüde azaltılmıştır. Tutarlı bir şekilde, FOXF2'nin protein seviyeleri, mRNA seviyeleri değil, miR-182 mimik transfeksiyon ile azaldı ve miR-182 inhibitör tedavisi ile artmıştır. Bu veriler, FOXF2 ve TGF-p'nin Basal-like meme kanseri hücrelerinde karşılıklı baskıya maruz kaldığını ve miR-182'nin, TGF- β 'a yanıt olarak FOXF2 ifadesinin susturulmasına aracılık ettiğini gösterir (Lu ve diğ. 2020).

Bizim verilerimizde anti-miR182 ve cisplatin uygulanan hücreler ile anti-miR182 uygulanmayan fakat cisplatin uygulanan hücreler karşılaştığında knockdown yapılan hücrelerde apoptozun %12,58 arttığı görülmektedir. Ayrıca knockdown hücrelerde hücrelerin cisplatin uygulaması ile direkt ölümü tercih etmeleri yerine programlı hücre ölümü olan apoptoza yöneldiği görülmektedir. Bu çalışmayı benzer şekilde koleraktal kanser hücre hatları (MICOL-14^{h-tert} ve MICOL-14^{tum}) ile yapan bir çalışmada; mir-182 benzer şekilde anti-mir182 ile 72 saat süreyle inkübe edilmiş ve knockdown edilmiş olup, analizler $\Delta\Delta C_t$ kullanılarak yapılmıştır. Knockdown doğrulandıktan sonra kanser hücre hatlarında apoptozun arttığı bulunmuştur. Hücre döngüsü analizlerinde ise knockdown edilen hücrelerden MICOL-14^{h-tert} 'de hücre

döngüsü profilinde minimal değişiklikler olurken, MICOL-14^{tum} hücre hattında G0/G1 daki hücre fraksiyonu artmış bu da S ve G2 fazlarındaki azalmanın nedeni olarak belirtilmiştir. Bu sonuçlar miR-182 inhibisyonunu MICOL-14^{tum} hücrelerince apoptozu uyardığını ve hücre proliferasyonunu modüle edebileceğini göstermiştir (Perilli ve diğ. 2019).

Bundan sonraki aşamada knockdown üçlü meme kanseri hücrelerinde meme kanseri ilişkili genlerin ekspresyon profilleri incelenerek miR-182'nin apoptoz artışını hangi gen veya yollar üzerinden etkilediği araştırılabilir. Ayrıca miR-182; miR-183 kümesinin üyelerinden biridir. miR-183 kümesi, paralog miRs-183, -96 ve -182'den oluşur. Genellikle kümeler, kopyalanmış 2-3 miRNA dizisinden oluşan ortak bir faktör veya sinyal yolları tarafından kopyalanır. Bu küme iyi huylu dokulara kıyasla prostat, meme ve yumurtalık kanserlerinde yüksek seviyelerde eksprese edilir. Hasta prostat tümörlerinde artmış miR-182 seviyeleri, kötü sağkalım ile ilişkilidir. Artmış miR-182 seviyeleri ; proliferasyonu artırmak için doğrudan metastaz baskılayıcı 1'i (MIM) hedeflediği için prostat tümör hücrelerinde proliferasyonu destekler (Dambal ve diğ. 2015). Bu çalışma baz alındığında miR-182; ani-miR ile knockdown yapılması gen kümesiyle beraber yapılarak apoptoz ve hücre döngüsü analizleri yapılabilir ve aralarındaki etkileşimin MDA-MB 231 knockdown hücre hattında nasıl sonuçlanacağı araştırılabilir.

Örneğin, insan meme kanseri hücrelerinde miR-17/20 küme ekspresyonu, heterotipik salgılanan sinyaller yoluyla azaltılır. Doğrudan interlökin-8 (IL-8) ekspresyonunu azaltır ve siklin D1 yoluyla sitokeratin 8'i inhibe eder. miR-183/182 kümesi ve PI3K/AKT/mTOR eksenini medulloblastomda metastaz açısından önemlidir. Ayrıca, hücrelerin rapamisin ile muamele edilmesi, miRNA kümesi ile PI3K/AKT/mTOR sinyali arasındaki potansiyel çapraz etkileşimi gösteren metastatik miR-183/182 kümesinin ekspresyonunu inhibe etmiştir. Benzer şekilde, TGF-β1, EMT'nin uyarılmasıyla akciğer kanserinde miR-376/656 kümesinden miR-134/487b/655 üyelerini upstream düzenleyebilir. miR-134/487b/655 kümesi upstream regülasyonu, doğrudan zarla ilişkili guanilat kinazı ters çevrilmiş 2'yi (MAGI2) hedefleyerek EMT'nin neden olduğu gefitinib direncine yol açar. miR-143/145 kümesinin downstream regülasyonu, bir dizi kanserde rapor edilmiştir ve

kanser hücrelerinin çoğalmasını, istilasını ve göçünü düzenlediği bildirilmektedir (Kabekkodu ve diğ. 2018).

Bir başka çalışmada miR-96-182-183'ün, BRMS1L (meme kanseri metastazı baskılayıcı 1-benzeri) gen ekspresyonunu doğrudan baskılayarak EMT'yi ve invazyonu desteklediğini göstermiştir (Zhang ve diğ. 2015).

Krüppel benzeri faktör 4'ün (KLF4), insan embriyonik kök hücrelerinde (hESC'ler) ve melanom tümörlerinde miR-182 kümesini direkt olarak regüle ettiği ve miR-182'nin bu hücrelerde yüksek oranda eksprese edildiği, metastatik bir role sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, melanom hücrelerinde artmış KLF4 ekspresyonunun metastatik ilerleme ve kötü hasta prognozu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Segura ve diğ. 2017).

Yapılan bir çalışmada mezotelyomada, miR-1 ve miR-214 gibi downstream regüle edilen miRNA'lar ve miR-182 ve miR-183 gibi upstream regüle edilmiş miRNA'lar belirlendi. Tümör baskılayıcı mikroRNA'lar, yani miR-1 ve miR-214, PIM1'i hedefleyerek mezotelyoma hücre proliferasyonunu teşvik etmede rol oynar. Bu çalışmada, miR-182 ve miR-183'ün mezotelyoma hücre dizilerinde onko-mikroRNA'lar olarak rol aldığı görülmüştür. miR-182 ve miR-183'ün mezotelyoma hücrelerinin proliferasyonları ile ilişki olduğu, ayrıca miR-182 ve miR-183'ün mezotelyoma hücrelerinin invazyonu, metastazı ve adezyonu ile ilişkisi olduğu belirlendi (Suzuki ve diğ. 2018).

Mikrodizi ekspresyon verileri gibi ileri teknolojiler, meme kanserinde anormal miRNA ifadesinin istisnadan ziyade kural olduğunu göstermiştir. miRNA'ların fizyolojik yapıya sıkı entegrasyonu, az sayıda miRNA'nın düzensizliğinin hücrelerin ekspresyon profilini derinden etkileyebilir, onları transformasyona doğru yönlendirebilir. Hastalığın patofizyolojisinde önemli bir rolü olan meme kanseri miRNA'ları, invazyon, metastaz, epitelyalden mezenkimal geçiş (EMT) ve meme kanseri kök hücrelerinde önemli bir role sahip olduğu için , meme kanserinde önemli bir yere sahiptir (Bertoli ve diğ. 2015). miRNA'ların ifadesinin düzenlenmesi birçok mekanizma ile kontrol edilebilir. Sahip olduğu avantajlar göz önüne alındığında, kanser ilaçlarının hücre duyarlılığını artırmak ve ilaç direncini

yenmek için miRNA'ların kullanılması mümkündür. Uygulanacak yöntemin başarılı olabilmesi için kanserli hücelere etkili bir şekilde ulaşabilmesi çok önemlidir. Bu nedenle, özellikle miRNA iletimi için nanoparçacık ve lipozom aracılı iletim gibi farklı iletim stratejilerinin optimize edilmesi gerekmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan diğer ilaçlarda olduğu gibi miRNA'ların hem normal hem de kanser hücrelerinde birçok moleküler hedefi vardır. Bu nedenle miRNA'nın etkinliği ve güvenilirliğinin daha fazla araştırılması gerekmektedir (Kumoğlu ve diğ. 2019). GIST-T1 hücre hatları miR-182 inhibitörü ve RNAimax kullanılarak transfekite edildi ve miR-182 knockdown edilerek inhibe edildi. Bu hücelere TNF α ile 24 saatlik muamele sonunda PI ve Annexin V boyaması yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre miR-182 hem erken hem de geç apoptozu arttırdı (Ling ve diğ. 2018). Çalışmamızda üçlü negatif meme kanseri hücre hatları için aynı inhibitör kullanıldı. Knockdown işlemi sonunda yapılan cisplatin uygulaması ardından akış sitometrisi analizi PI/Annexin boyaması ile yapıldı ve apoptozun arttığı gözlemlendi. Her iki çalışmanın korelasyonu miR-182'nin sadece üçlü negatif meme kanserinde değil farklı kanser türlerinde de tedavi edici bir ajan olabileceğini göstermektedir. Bu amaçla farklı hücre hatlarında anti-miR-182 knockdown sonrası apoptoz analizi ve miR-182 ilişkili genlerin regülasyonu araştırılabilir.

Güçlü antitümör ajanlardan biri olan cisplatinin, çeşitli katı tümörlere karşı önemli klinik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir ve bu nedenle, bazı kanser tedavileri için standart rejim olarak listelenmiştir. Cisplatinin, G0/G1'de hücre döngüsü durması ve apoptoz indüksiyonu yoluyla prostat kanseri büyümesini in vitro baskılamak için güçlü bir ilaç olduğu gösterilmiştir (Chiang ve diğ. 2014).

Başka bir çalışmada ise HL-60 hücreleri üzerinde farklı cisplatin konsantrasyonları 24, 48, 72 ve 96 saat uygulanmış, cisplatin dozu ve zamanı arttıkça G1 fazındaki yığılmanın arttığı bunun da nedeninin hücrelerin apoptoz veya nekrozda olabileceğinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Velma ve diğ. 2016).

Cisplatine dirençli hücre hattı MDA-MB-231'deki G3BP2 ifadesinin azalması, mezenkimal hücre morfolojisini azaltarak, cisplatin kaynaklı uzun süreli G2 hücre döngüsü durmasına neden olduğu ve cisplatine duyarlılığın artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Hücre kaderini belirlemede, tedaviden önce sinyal

moleküllerinin statik durumlarından ziyade sinyalleşmede cisplatin kaynaklı değişikliklerin önemli olduğu belirtilmiştir (Heijink ve diğ. 2019).

Yapılan bir çalışmada cisplatine dirençli yumurtalık kanseri hücre hatlarında, EF24 ile indüklenerek PTEN ifadesinin artışı, p53 ve p21 gibi G2/M kontrol noktası proteinlerin ifadesini arttırdığı ve G2/M hücre döngüsü tutuklu kalması ayrıca apoptozun artması ile sonuçlandığını gözlemlenmiştir (Selvendiran ve diğ. 2007).

Bizim çalışmamızda ise anti-miR182 ve cisplatin uygulanan hücreler ile sadece anti-miR182; sadece cisplatin veya hiçbir işlem uygulanmayan MDA-MB-231 hücreleri kıyaslandığında G2 fazındaki hücrelerin arttığı gözlemlenmiştir. miR-182 knockdown hücrelerdeki G2 fazındaki bu tutulma cisplatinin DNA hasarına yol açarak apoptozu indüklediğini göstermektedir. Cisplatinin farklı kanser türlerinde apoptozu tetiklediği pek çok çalışmada gösterilse de miR-182 inhibitörü ile beraber uygulandığında bu oranlarda artış saptanması bizim gözlemlediğimiz sonuçlardan biridir.

Sonuç olarak miR-182'nin TNBC hastalarında cisplatin direncinde rol oynadığı belirlenmiş ve bu direncin engellenmesi için gen terapisi alanında anlamlı bir terapötik ajan olabileceği, bu amaçla daha fazla çalışma ile bunun desteklenmesi gerektiğini ileri sürmekteyiz. Cisplatin tedavisinin gen terapisi ile desteklenmesi yönünde uygulanabilir tedavilerin geliştirilmesi ve miR-182'nin cisplatin direncini azaltarak TNBC hücrelerini cisplatine karşı daha hassas hale dönüştürmesini hangi yollar üzerinden hangi hücre döngüsü ilişkili proteinlerin ifadesinde nasıl değişimler yaptığı veya apoptoz ilişkili proteinleri etkileyerek gerçekleştirdiğine yönelik çalışmaların artırılmasını önermekteyiz.

KAYNAKLAR

ABDEEN S.K., DAVID U.B., SHWEIKI A., MALY B., AQEILAN R.I. 2018. Somatic loss of WWOX is associated with TP53 perturbation in basal-like breast cancer. *Cell death & disease*9: 832.

ADDGENE. pX330 BbsI enzim kesim bölgesi. <https://www.addgene.org/>. 03.08.2021.

ANDERSON N.M., SIMON M.C. THE TUMOR MICROENVIRONMENT. 2020. *CURRENT BIOLOGY MAGAZINE*30: R921-R925.

BAI L., LUO L., GAO W., BU C., HUANG. J. 2021. miR-182 modulates cell proliferation and invasion in prostate cancer via targeting ST6GALNAC5. *Brazilian journal of medical and biological research*54: e9695

BAJAN S., HUTVAGNER G. 2020. RNA-based therapeutics: From antisense oligonucleotides to miRNAs. *Cells*9: 137

BARSOUM F.S., AWAD A.S., HUSSEIN N.H., EISSA A. 2020. MALAT-1: LncRNA ruling miR-182/PIG-C/mesothelin triad in triple negative breast cancer. *Pathology, research and practice*216:153274.

BASNET R., BASNET B.B. 2020. Overview of Protein Kinase B Enzyme: A Potential Target for Breast and Prostate Cancer. *Current Molecular Pharmacology*14: 527-536.

BELVEDERE R., SAGGESE P., PESSOLANO E., MEMOLI D., BIZZARRO V., RIZZO F., PARENTE L., WEÍSZ A., PETRELLA A. 2018. miR-196a is able to restore the aggressive phenotype of annexin A1 knock-out in pancreatic cancer cells by CRISPR/Cas9 genome editing. *International journal of molecular sciences*19: 1967.

BERTOLI G., CAVA C., CASTIGLIONI I. 2015. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*5: 1122-43

BLOCK K.I., GYLLENHAAL C., LOWE L., AMEDEI A., RUHUL AMIN A.R., AMIN A., AQUILANO K., ARBISER J., ARREOLA A., ARZUMANYAN A., ASHRAF S., AZMI A.S., BENENCIA F., BHAKTA D., BILSLAND A., YEE AB., BLAIN S.W., BLOCK P.B., BOOSANI C.S., CAREY T.E., CARNERO A., CAROTENUTO M., CASEY S.C., CHAKRABARTI M., VEDI R.C., CHEN G.Z., CHEN H., CHEN S., CHEN Y.C., CHOI B.K., CIRIOLO M.R., COLEY H.M., COLLINS A.R., CONNELL M., CRAWFORD S., CURRAN C.S., DABROSIN C., DAMIA G., DASGUPTA S., DEBERARDINI S.R.J., DECKER W., DHAWAN P., DIEHL A., DONG J.T., DOU Q.P., DREW J.E., ELKORD E., RAYES B.E., FEITELSON M.A., FELSHER D.W., FERGUSON L.R., FIMOGRARI C., FIRESTONE G.L., FREZZA C., FUJII H., FUSTER M.M., GENERALI D., GEORGAKILA A.G., GIESELER F., GILBERTSON M., GREEN M.F., GRUE B., GUHA G., HALICKA D., HELFERICH W.G., HENEBERG P., HENTOSH P., HIRSHEY M.D., HOFSETH L.J., HOLCOMBE R.F., HONOKI K., HSU H.Y., HUANG G.S., JENSEN L.D., JIANG W.G., JONES L.W., KARPOWICZ P.A., KEITH W.N., KERKAR S.P., KHAN G.N., KHATAMI M., KO Y.H., KUCUK O., KULATHINAL R.J., KUMAR N.B., KUMARA S., KWON B.S., LE A., LEA M.A., LEE H.Y., LICHTOR T.Y., LIN L.T., LOCASALE J.W., LOKESHWAR B.L., LONGO V.D., LYSSIOTIS C.A., MACKENZIE K.L., MALHOTRA M., MARINO M., MARTINEZ-CHANTAR M.L., MATHEU A., MAXWELL C., MCDONNELL E., MEEKER A.K., MEHRMOHAMADI M., MEHTA K., MICHELOTTI G.A., MOHAMMAD R.M., MOHAMMED S.I., MORRE D.J., MUQBIL I., MURALIDHAR V., MURPHY M.P., NAGARAJU G.P., NAHTA R., NICCOLAI E., NOWSHEEN S., PANIS C., PANTANO F., PARSLOW V.R., PAWELEC G., PEDERSEN P.L., POORE B., POUDYAL D., PRAKASH S., PRINCE M., RAFFAGHELLO L., RATHMELL J.C., RATHMELL W.K., RAY S., REICHRATH J., REZAZADEH S., RIBATTI D., RICCIARDIELLO L., ROBEY B., RODIER F., RUPASINGHE H.P., LUIGI RUSSO G., RYAN E.P., SAMADI A.K., SANCHEZ-GARCIA I., SANDERS A.J., SANTINI D., SARKAR M., SASADA T., SAXENA N.K., SHACKELFORD R., SHARMA D., SHIN D.M., SIDRANSKY D., SIEGELIN M.D., SIGNORI E., SINGH N., SIVANAND S., SLIVA D., SMYTHE C., SPAGNUOLO C., STAFFORINI D.M., STAGG J.,

SUBBARAYAN P.R., SUNDIN T., TALIB W.H., THOMPSON S.K., TRAN P.T., UNGEFROREN H., HEIDEN W.G., VENKATESWARAN V., VINAY D.S., VLACHOSTERGIOS P.J., WANG Z., WELLEN K.E., WHELAN R.L., YANG ES., YANG H., YANG X., YASWEN P., YEDJOU C., YIN X., ZHU J., ZOLLO M. 2015. A Broad-Spectrum Integrative Design for Cancer Prevention and Therapy. *Semin Cancer Biology*35: 276-304.

Cagle P., Smith N., Adekoya T.O., LiY., Kim S., Rios-Colon L., Deep G., Niture S., Albanese C., Suy S., Collins S.P., Kumar D. 2021. Knockdown of microRNA-214-3p Promotes Tumor Growth and Epithelial-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer. *Cancers*13(23): 5875.

CHANG H., YI B., MA R., ZHANG X., ZHAO H., XI Y. 2016. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. *Scientific Reports*6: 22312.

CHANG R., SONG L., XU Y., WU Y., DAI C., WANG X., SUN X., HOU Y., LI W., ZHAN X., ZHANL. 2018. Loss of Wwox drives metastasis in triple-negative breast cancer by JAK2/STAT3 axis. *Nature Communications*9: 3486

CHENG C.J., SLACK F.J. 2012. The duality of oncomiR addiction in the maintenance and treatment of cancer. *The cancer journal*18: 232-7.

CHEVALIER R. 2019. siRNA Targeting and Treatment of Gastrointestinal Diseases. *Clinical and translational science*12: 573–585.

CHIANG K.C., TSUI K.H., CHUNG L.C., YEH C.N., FENG T.H., CHEN W.T., CHANG P.L., CHIANG H.Y., JUANG H.H. 2014. Cisplatin modulates B-cell translocation gene 2 to attenuate cell proliferation of prostate carcinoma cells in both p53-dependent and p53-independent pathways. *Scientific Reports*4: 5511.

CORNING. Cell cloning by serial dilution in 96 well plates protocol. https://www.corning.com/catalog/cls/documents/protocols/Single_cell_cloning_protocol.pdf. 02.05.2021.

DAMBAL S., SHAH M., MIHELICH B., NONN L. 2015. The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together. *Nucleic acids research*43(15): 7173–7188.

DANA H., CHALBATANI G.M., MAHMOODZADEH H., KARIMLOO R., REZAIEAN O., MORADZADEH A., MEHMANDOOST N., MOAZZEN F., MAZRAEH A., MARMARI V., EBRAHIMI M., RASHNO M.M., ABADI S.J., GHARAGOZLO E. 2017. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International journal of biomedical science*13: 48–57.

DAS N., TRIPATHI N., KHURANA S. 2015. Micro RNA Mimics And Antagonists. *International journal of scientific & technology research*4: 2277-8616.

DEKKERS J.F., WHITTLE J.R., VAILLANT F., CHEN H.R., DAWSON C., LIU K., GEURTS M.H., HEROLD M.J., CLEVERS H., LINDEMAN G.J., VISVADER J.E. 2019. Modeling Breast Cancer Using CRISPR-Cas9-Mediated Engineering of Human Breast Organoids. *Journal of the National Cancer Institute*112:540-544.

ESKANDER R.N., TEWARI K.S. 2014. Beyond angiogenesis blockade: targeted therapy for advanced cervical cancer. *Journal of gynecologic oncology*25: 249–259.

FEITELSON M.A., ARZUMANYA A., KULATHINAL R.J., BLAIN S.W., HOLCOMBE R.F., MAHAJNA J., MARINO M., MARTINEZ-CHANTAR M.L., NAWROTH R., SANCHEZ-GARCIA I., SHARMA D., SAXENA N.K., SINGH N., VLACHOSTERGIOS P.J., GUO S., HONOKI K., FUJII H., GEORGAKILAS A.G., AMEDEI A., NICCOLAI E., AMIN A., ASHRAF S.S., BOOSANI C.S., GUHA G., CIRIOLO M.R., AQUILANO K., CHEN S., MOHAMMED S.I., AZMI A.S., BHAKTA D., HALICKA D., NOWSHEEN S. 2015. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in cancer biology*35: 25-54.

FU J.H., YANG S., NAN C.J., ZHOU C.C., LU D.Q., LI S., MU H.Q. 2018. MiR-182 affects renal cancer cell proliferation, apoptosis, and invasion by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*22: 351-357

GIULIANO C.J., LIN A., SHELTZER J.M. 2019. Generating single cell-derived knockout clones in mammalian cells with CRISPR/Cas9. *Current protocol molecular biology*128: e100.

GOMARASCA M., MARONI P., BANFI G., LOMBARDI G. 2020. microRNAs in the Antitumor Immune Response and in Bone Metastasis of Breast Cancer: From Biological Mechanisms to Therapeutics. *International journal of molecular sciences*21: 2805

GULYAEVA L.F., KUSHLINSKIY N.E. 2016. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *Journal of translational medicine*14: 143.

GUO H., YOSHIOKA K., KUNIEDA T., ASAMI Y., MIYATA H., TANAKA K.Y., NAGATA T., YOKOTA T. 2018. Efficacy of microRNA silencing by lipid-conjugated double-stranded antisense oligonucleotides. *Journal of Medical and Dental Sciences* 65: 83 – 88

HAFTMANN C., RIEDEL R., PORSTNER M., WITTMANN J., CHANG H.D., RADBRUCH A., MASHREGHI M.F. 2015. Direct uptake of Antagomirs and efficient knockdown of miRNA in primary B and T lymphocytes. *Journal of immunological methods*426: 128–133.

HANNAFON B.N., CAI A., CALLOWAY C.L., XU Y.F., ZHANG R., FUNG K.M., DING W.Q. 2019. miR-23b and miR-27b are oncogenic microRNAs in breast cancer: evidence from a CRISPR/Cas9 deletion study. *BMC cancer*19: 642.

Heijink A.M., Everts M., Honeywell M.E., Richards R., Kok Y.P., Vries E.G., Lee M.J., Vugt M.A. 2019. Modeling of Cisplatin-Induced Signaling Dynamics in Triple-Negative Breast Cancer Cells Reveals Mediators of Sensitivity. *Cell reports*28(9): 2345-2357.

HIGASHI Y., SUKHANOV S., ANWAR A., SHAI S.Y., DELAFONTAINE P. 2012. Aging, atherosclerosis, and IGF-1. *The journals of gerontology*67(6): 626-39.

HILL D.P., HARPER A., MALCOLM J., MCANDREWS M.S., MOCKUS S.M., PATTERSON S.E., REYNOLDS T., BAKER E.J., BULT C.J., CHESLER E.J.,

BLAKE JA. 2019. Cisplatin-resistant triple-negative breast cancer subtypes: multiple mechanisms of resistance. *BMC Cancer*19: 1039.

HOUSEMAN A. 2021. The potential pathology of breast cancer: Ductal Carcinoma in Situ to Invasive Breast Carcinoma No Special Type.

HOWELL A., ANDERSON A.S., CLARKE R.B., DUFFY S.W., EVANS D.G., CLOSAS M.G., GESCHER A.J., KEY T.J., SAXTON J.M., HARVIE M.N. 2014. Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast cancer research*16: 446

HUANG S.S., CHANG N.S. 2018. Phosphorylation/de-phosphorylation in specific sites of tumor suppressor WWOX and control of distinct biological events. *Experimental biology and medicine*243: 137–147.

HUM C., LOISELLE J., AHMED N., SHAW T.A., TOUDIC C., PEZACKI J.P. 2021. MicroRNA Mimics or Inhibitors as Antiviral Therapeutic Approaches Against COVID-19. *Drugs*81: 517-531.

HUSSEN B.M., SALIHI A., ABDULLAH S.T., RASUL M.F., HIDAYAT H.J., HAJIESMAEILI M., GHAFOURI-FARD S. Signaling pathways modulated by miRNAs in breast cancer angiogenesis and new therapeutics. 2022. *Pathology, research and practice*230: 153764.

IORIO M.V., FERRACIN M., LIU C.G., VERONESE A., SPIZZO R., SABBIONI S., MAGRI E., PEDRIALI M., FABBRI M., CAMPIGLIO M., MENARD S., PALAZZO J.P., ROSENBERG A., MUSIANI P., VOLINIA S., NENCI I., CALIN G.A., QUERZOLI P., NEGRINI M., CROCE C.M. 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*65:7065-70.

JIA Y., WEI Y. 2020. Modulators of MicroRNA Function in the Immune System. *International journal of molecular sciences*21: 2357.

JIN J., XU Y., HUO L., MA L., SCOTT A.W., PIZZI M.P., LI Y., WANG Y., YAO X., SONG S., AJANI J.A. 2020. An improved strategy for CRISPR/Cas9 gene knockout and subsequent wildtype and mutant gene rescue. *Public Library of Science one*15: e0228910.

JIRAMONGKOL Y., LAM E.W. 2020. Foxo transcription factor family in cancer and metastasis. *Cancer and metastasis reviews*39: 681-709.

JONES M.E., SCHOEMAKE M.J., WRIGHT L.B., ASHWORTH A., SWERDLOW A.J. 2017. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Research*19: 118

KABEKKODU S.P., SHUKLA V., VARGHESE V.K., D' SOUZA J., CHAKRABARTY S., SATYAMOORTHY K. 2018. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biol. Rev.*93: 1955 – 1986.

KABOLI P.J., RAHMAT A., ISMAIL P., LING K.H. 2015. MicroRNA-based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment. *Pharmacological research*97: 104-21.

KHAMISIPOUR G., MANSOURABADI E., NAEIMI B., MOAZZENI A., TAHMASEBI R., HASANPOUR M., MOHAMMADI M.M., MANSOURABADI Z., SHAMSIAN S. 2017. Knockdown of microRNA-29a regulates the expression of apoptosis-related genes in MCF-7 breast carcinoma cells. *Molecular and clinical oncology*8: 362-369.

KHAN H., ULLAH H., CASTILHO C.M., GOMILA A.S., D'ONOFRIÓ G, FILOSA R., WANG F., NABAVI S.M., DAGLIA M., SILVA A.S., RENGASAMY K.R., OU J., ZOU X., XIAO J., CAO H. 2020. Targeting NF- κ B signaling pathway in cancer by dietary polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*60: 2790-2800

KHAWALED S., SUH S.S., ABDEEN S.K., MONIN J., DISTEFANO R., NIGITA G., CROCE C.M., AQEILAN R.I. 2019. WWOX Inhibits Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer Cells via Modulation of miRNAs. *Cancer research*79:1784-1798.

KIM J., YAO F., XIAO Z., SUN Y., MA L.I. 2018. MicroRNAs and metastasis: small RNAs play big roles. *Cancer metastasis reviews*37: 5-15.

LEE D.H., LEE S.Y., OH S.C. 2017. Hedgehog signaling pathway as a potential target in the treatment of advanced gastric cancer. *Tumour Biology*39(6): 1010428317692266.

LEE JO., KANG MJ., BYUN W.S., KIM S.A., SEO H., HAN J.A., MOON J.W., KIM J.H., KIM S.J., LEE E.J., PARK S.H., KIM H.S. 2022. Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51. *Breast cancer research*21: 115.

LEI X., LEI Y., LI J.K., DU W.X., LI R.G., YANG J., LI J., LI F., TAN H.B. 2020. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer letters*470: 126-133.

LENTSCH E., LI L., PFEFFER S., EKICI A.B., TAHER L., PILARSKY C., GRUTZMANN R. 2019. CRISPR/Cas9-Mediated Knock-Out of Kras G12D Mutated Pancreatic Cancer Cell Lines. *International journal of molecular sciences*20:5706.

LEVA G.D., GAROFALO M., CROCE C.M. 2014. microRNAs in cancer. *Annual review of pathology*9: 287–314.

LI J., LIU J., REN Y., LIU P. 2015. Roles of the WWOX in pathogenesis and endocrine therapy of breast cancer. *Experimental biology and medicine*240: 324-328.

LIN S., GREGORY R.I. 2015. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews cancer*15: 321–333.

LING T., YU F., CAO H. 2018. miR-182 controls cell growth in gastrointestinal stromal tumors by negatively regulating CYLD expression. *ONCOLOGY REPORTS*40: 3705-3713.

LLIOPOULOS D., FABBRI M., DRUCK T. 2007. INHIBITION OF BREASTS CANCER CELL GROWTH IN VITRO AND IN VIVO: EFFECT OF RESTORATION OF WWOX EXPRESSION. *CLINICAL CANCER RESEARCH*13: 268-274.

LONG X., SHI Y., YE P., GUO J., ZHOU Q., TANG Y. 2020. MicroRNA-99a Suppresses Breast Cancer Progression by Targeting FGFR3. *Frontiers in oncology*9: 1473.

LU J.T., TAN C.C., WU X.R., HE R, ZHANG X, WANG Q.S., LI X.Q., ZHANG R., FENG Y.M. 2020. FOXF2 deficiency accelerates the visceral metastasis of basal-like breast cancer by unrestrictedly increasing TGF- β and miR-182-5p. *Cell Death and Differentiation* volume27: 2973–2987.

MATHE A., SCOTT R., AVERY-KIEJDA K. 2015. miRNAs and Other Epigenetic Changes as Biomarkers in Triple Negative Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*16: 28347-28376

MCCLELLAN S., PITCHAIKANNU A., WRIGHT R., BESSERT D., IULIANELLI M., HAZLETT L.D., XU S. 2021. Prophylactic Knockdown of the miR-183/96/182 Cluster Ameliorates *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Keratitis. *Investigative ophthalmology & visual science*62: 14.

MCKEE J.S., KONG W., GLADNEY W.L., JADLOWSKY J.K., GABRIELA P., DAVIS M.M., FRAIETTA J.A. 2019. Human vaccines and immunotherapeutics15:1126-1132.

NEUMEIER J., MEISTER G. 2021. siRNA Specificity: RNAi Mechanisms and Strategies to Reduce Off-Target Effects. *Frontiers in plant science*11: 526455

NGUYEN D.D., CHANG S. 2018. Development of Novel Therapeutic Agents by Inhibition of Oncogenic MicroRNAs. *International journal of molecular sciences*19: 65.

NOVOPRO. hSpCas9 kimerik rehber RNA ekspresyon plazmidi. <https://www.novopro.cn/plasmid/V11044>. 02.01.2022.

NUNEZ M.I., MEYERS J.L., ABBA M.C., KIL H., ABBEY N.W., PAGE R.E., SAHIN A., KLEIN-SZANTO A.J., ALDAZ C.M. 2005. Frequent loss of WWOX expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor status. *Breast cancer research and treatment*89: 99–105.

NURZADEH M., NAEMI M., HASANI S.S. 2021. A comprehensive review on oncogenic miRNAs in breast cancer. *Journal of Genetics*100: 15.

ORS-KUMOĞLU G., GULCE-IZ S., BİRAY-AVCI C. 2019. Therapeutic microRNAs in human cancer. *Cytotechnology*71: 411–425.

OTA C., BAARSMA H.A., WAGNER D.E., HILGENDORFF A., KONIGSHOFF M. 2016. Linking bronchopulmonary dysplasia to adult chronic lung diseases: role of WNT signaling. *Molecular and cellular pediatrics*3: 33.

PAPADOPOULOS E.I., SCORILAS A. 2015. Cisplatin and Paclitaxel Alter the Expression Pattern of miR-143/145 and miR-183/96/182 Clusters in T24 Bladder Cancer Cells. *Clinical and translational science*8: 668–675.

PENG Y., CROCE C.M. 2016. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*1: 15004.

PERILLI L., TESSAROLLO S., ALBERTONI L., CURTARELLO M., PASTO A., BRUNETTI E., FASSAN M., RUGGE M., INDRACCOLO S., AMADORI A., BORTOLUZZI S., ZANOVELLO P. 2019. Silencing of miR-182 is associated with modulation of tumorigenesis through apoptosis induction in an experimental model of colorectal cancer. *BMC cancer*19: 821.

PLACE R.F., LI L.C., POOKOT D., NOONAN E.J., DAHIYA R. 2007. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequenceS. *BIOLOGICAL SCIENCES*105: 1608-1613.

POSPIECH K., PLUCIENNIK E., BEDNAREK A.K. 2018. WWOX Tumor Suppressor Gene in Breast Cancer, a Historical Perspective and Future Directions. *Frontiers in oncology*8: 345.

POUR Z.B., NOURBAKHS M., MOUSAVIZADEH K., MADJD Z., GHORBANHOSSEINI S.S., ABDOLVAHABI Z., HESARI Z., MOBASSER S.E. 2019. Suppression of nicotinamide phosphoribosyltransferase expression by miR-154 reduces the viability of breast cancer cells and increases their susceptibility to doxorubicin. *BMC Cancer*19: 1027.

- PRABHAKARAN P., HASSIOTOU F., BLANCAFORT P., FILGUEIRA L. 2013. Cisplatin induces differentiation of breast cancer cells. *Frontiers in oncology*3: 134
- PUCELLA J.N., YEN W.F., KIM M.V., VEEKEN J.V., SOCCI N.D., NAITO Y., LI M.O., IWAI N., CHAUDHURI J. 2015. miR-182 is largely dispensable for adaptive immunity: lack of correlation between expression and function. *Journal of immunology*194:2635-42.
- RAHMAN M.M., BRANE A.C., TOLLEFSBOL T.O. 2019. MicroRNAs and Epigenetics Strategies to Reverse Breast Cancer. *Cells*8: 1214.
- REDDY K.B. 2015. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer cell international*15: 38.
- ROBERTSON B., DALBY A.B., KARPILOW J., KHVOROVA A., LEAKE D., VERMEULEN A. 2010. Specificity and functionality of microRNA inhibitors. *Silence* 1: 10.
- ROY B., GHOSE S., BISWAS S. 2021. Therapeutic strategies for miRNA delivery to reduce hepatocellular carcinoma. *Seminars in cell and developmental biology*124:134-144.
- SARVER A.L., SARVER A.E., YUAN C., SUBRAMANIAN S. 2018. OMCD: OncomiR cancer database. *BMC Cancer*18: 1223.
- SCHOONEVELD E.V., WILDIERS H., VERGOTE I., VERMEULEN P.B., DIRIX L.Y., LAERE S.J. 2015. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Research*17: 21.
- SCHROCK M.S., HUEBNER K. 2015. WWOX: A fragile tumor suppressor. *Experimental biology and medicine*240: 296–304.
- SEGURA M.F., JUBIERRE L., LI S., SORIANO A., KOETZ L., SOVRAN A.G., MASANAS M., KLEFFMAN K., DANKERT J.F., WALSH M.J., HERNANDO E. 2017. Krüppel-like factor 4 (KLF4) regulates the miR-183~96~182 cluster under physiologic and pathologic conditions. *Oncotarget*8(16): 26298-26311.
- Selvendiran K., Tong L., Vishwanath S., Bratasz A., Trigg N.J., Kutala V.K., Hideg K., Kuppusamy P. 2007. EF24 Induces G2/M Arrest and Apoptosis in Cisplatin-

resistant Human Ovarian Cancer Cells by Increasing PTEN Expression. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*282: 28609–28618.

SHEN S., LOH T.J., SHEN H., ZHENG X., SHEN H. 2016. CRISPR as a strong gene editing tool. *BMB Reports*50: 20-24.

SHENG P.C., HUANG L., ZHANG H., HUANG L., CHENG Z., ZHU Q. 2014. MiR-183/-96/-182 cluster is up-regulated in most breast cancers and increases cell proliferation and migration. *Breast cancer research*16: 473.

SINGH D., HAN I., CHOI E., YADAV D. 2021. CRISPR/Cas9 based genome editing for targeted transcriptional control in triple-negative breast cancer. *Computational and structural biotechnology*19: 2384–2397

SLEDZINSKA M.D., MASLAK N.M., JAKSIK R., DABEK P., WITT M., DAWIDOWSKA M. 2022. CRISPRi for specific inhibition of miRNA clusters and miRNAs with high sequence homology *Scientific Reports*12: 6297.

SONG M.S., ROSSI J.J. 2013. The anti-miR21 antagomir, a therapeutic tool for colorectal cancer, has a potential synergistic effect by perturbing an angiogenesis-associated miR30. *Frontiers in genetics*4: 301.

SOUCKOVA K., IVKOVIC T.C., SLABY O. 2020. Non-coding RNA therapy in cancer. *Precision Medicine for Investigators. In Practitioners and Providers*, pp. 211-220. ScienceDirect.

SPITSCHAK A., MEIER C., KOWTHARAPU B., ENGELMANN D., PUTZER B.M. 2017. MiR-182 promotes cancer invasion by linking RET oncogene activated NF- κ B to loss of the HES1/Notch1 regulatory circuit. *Molecular cancer*16: 24.

STANDISH L.J., SWEET E.S., NOVACK J., WENNER C.A., BRIDGE C., NELSON A., MARTZEN M., TORKELSON C. 2008. BREAST CANCER AND THE IMMUN SYSTEM. *Journal of the Society for Integrative Oncology*6: 158-68.

SUBHAN M.A., TORCHILIN V.P. 2019. Efficient nanocarriers of siRNA therapeutics for cancer treatment. *Translational research*214: 62-91

SUZUKI R., AMATYA V.J., KUSHITANI K., KAI Y., KAMBARA T., TAKISHIMA Y. 2018. miR-182 and miR-183 Promote Cell Proliferation and Invasion by Targeting FOXO1 in Mesothelioma. *Frontiers in Oncology*8: 446.

TANG L., CHEN H.Y., HAO N.B., TANG B., GUO H., YONG X., DONG H., YANG S.M. 2017. microRNA inhibitors: Natural and artificial sequestration of microRNA. *Cancer letters*407:139-147.

TANG T., WONG H.K., GU W., YU M.Y., TO K.F., WANG C.C., WONG Y.F., CHEUNG T.H., CHUNG T.K., CHOY K.W. 2013. MicroRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer. *Gynecologic oncology*129: 199-208.

TANNA M., AQEILAN R.I. 2018. Modeling wwox loss of function in vivo: what Have we learned. *Frontiers in oncology*8: 420.

TAOUI K., DRIOUCH K., LIDEREAU R., LALLEMAND F. 2021. Molecular Functions of WWOX Potentially Involved in Cancer Development. *Cells*10: 1051.

TIERNAN M.A., FRIEDENREICH C.M., KATZMARZK P.T., POWELL K.E., MACKO R., BUCHNER D., PESCATELLO L.S., BLOODGOOD B., TENNANT B., BJERKE A.V., GEORGE S.M., TROIANO R.P., PIERCY K.L. 2018. Physical Activity in Cancer Prevention and Survival: A Systematic Review. *Medicine and science in sports and exercise*51: 1252-1261.

TURGUT C.D., ONER C., MUTLU Ş.F. 2016. Micro RNA-126 Coordinates Cell Behavior and Signaling Cascades According to Characteristics of Breast Cancer Cells. *Bratisl Medicine Journal*(11): 639-647.

UNNIYAMPURATH U., PILANKATTA R., KRISHNAN M. 2016. RNA Interference in the Age of CRISPR: Will CRISPR Interfere with RNAi? *Int. J. Mol. Sci*17(3): 291.

VELMA V., DASARI S.R., TCHOUNWOU P.B. 2016. Low Doses of Cisplatin Induce Gene Alterations, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cells. *Biomarker Insights*11: 113–121.

WALLACE J., HU R., MOSBRUGER T.L., DAHLEM T.J., STEPHENS W.Z., RAO D.S., ROUND J.L., O'CONNEL R.M. 2016. Genome-Wide CRISPR-Cas9

Screen Identifies MicroRNAs That Regulate Myeloid Leukemia Cell Growth. *Public Library of Science one11*: e0153689.

WANG H., GUO S., KIM S.J., SHAO F., HO J.W., WONG K.U., MIAO Z., HAO D., ZHAO M., XU J., ZENG J., WONG K.H., DI L., WONG A.H., XU X., DENG C.X. 2021. Cisplatin prevents breast cancer metastasis through blocking early EMT and retards cancer growth together with paclitaxel. *Theranostics11*: 2442-2459.

WINTER J., JUNG S., KELLER S., GREGORY R.I., DIEDERICH S. 2009. *Frontiers in oncology. Nature Cell Biology11*: 228–234.

WU F., YANG J., LIU J., WANG Y., MU J., ZENG Q., DENG S., ZHOU H. 2021. Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer. *Signal transduction and targeted therapy6*: 218.

YANG H., BAILEY P., PILARSKY C. 2019. CRISPR Cas9 in Pancreatic Cancer Research. *Frontiers in cell and developmental biology17*: 239.

YANG J., MENG X., PAN J., JIANG N., ZHOU C., WU Z., GONG Z. 2018. CRISPR/Cas9-mediated noncoding RNA editing in human cancers. *RNA biology15*: 35–43.

YAO Q., CHEN Y., ZHOU X. 2019. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Current opinion in chemical biology 51*: 11-17.

YU X.Y., MA C.Q., SHENG Y.H. 2022. circRNA CRIM1 regulates the migration and invasion of bladder cancer by targeting miR182/Foxo3a axis. *Clinical and translational oncology24*:1195-1203.

YUE D., QIN X. 2019. miR-182 regulates trastuzumab resistance by targeting MET in breast cancer cells. *Cancer Gene Therapy26*: 1–10.

ZHANG Y., LIU W., CHEN Y., LIU J., WU K., SU L., ZHANG W., JIANG Y., ZHANG X., ZHANG Y., LIU C., TAO L., LIU B., ZHANG H. 2018. A cellular microRNA facilitates regulatory T lymphocyte development by targeting the FOXP3 Promoter TATA-Box Motif. *The journal of immunology200*:1053-1063.

ZHANG W., QIAN P., ZHANG X., ZHANG M., WANG H., WU M., KONG X., TAN S., DING K., PERRY J.K., WU Z., CAO Y., LOBIE P.E., ZHU T. 2015. Autocrine/Paracrine Human Growth Hormone-stimulated MicroRNA 96-182-183 Cluster Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasion in Breast Cancer. *Journal of Biological Chemistry*290: 13812-13829.

Zhang X., Ma G., Liu J., Zhang Y. MicroRNA-182 promotes proliferation and metastasis by targeting FOXF2 in triple-negative breast cancer. 2017. *Oncology letters*14(4): 4805–4811.

ZHAO Y.S., YANG W.C., XIN H.W., HAN J.X., MA S.G. 2019. MiR-182-5p knockdown targeting PTEN inhibits cell proliferation and invasion of breast cancer cells. *Yonsei Medical*60:148-157.

ZHENG T., ZHANG X., WANG Y., YU X. 2016. Predicting associations between microRNAs and target genes in breast cancer by bioinformatics analyses. *ONCOLOGY LETTERS*12: 1067-1073.

ZHOU S.J., DENG Y.L., LIANG H.F., JAOUDE J.C., LIU F.Y. 2017. Hepatitis B virus X protein promotes CREB-mediated activation of miR-3188 and Notch signaling in hepatocellular carcinoma. *Cell death and differentiation*24(9): 1577–1587.

ZHU L., ZHANG K., ZHANG C., YU H., ZHU L. 2021. Low miR-1231 expression predicts poor prognosis in non-small-cell lung cancer and accelerates cell proliferation, migration and invasion. *Future Medicine*15: 11.

ÖZGEÇMİŞ

Hülya Dönmez

Eğitim:

- İstanbul Üniversitesi 2011 Eylül - 2014 Haziran

Yüksek Lisans, Moleküler Tıp bölümü

- İstanbul Teknik Üniversitesi 2006 Eylül - 2011 Haziran

Lisans, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

- Bayrampaşa Anadolu Lisesi 2002 Eylül - 2006 Haziran
- Ali Ülker İlköğretim Okulu 1994 Eylül - 2002 Haziran

Proje:

- BAG-1L izoformunun pET28-GST-LIC vektörü kullanılarak klonlanması böylece proteinin pürifikasyon ve lokalizasyonu kolaylaştırmak. (Lisans Tez Çalışması)
- TIMP3, FBN-EDA and FBN-EDB Gen Ekspresyon Seviyelerinin Torasik Aort Anevrizması Hastalarında Araştırılması. (Yüksek Lisans Tez Çalışması)
- Primer Beyin Tümörleri Olan Hastalarda CASP8 D302H Gen Varyantlarının Analizi (Yardımcı Araştırmacı)

- Wwox aracılı miR-182 regülasyonunun meme kanseri hücrelerinde cisplatin direnci ile ilişkisinin CRISPR/Cas9 knockout yöntemi ile araştırılması (Doktora Tez Çalışması)

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

- **Hülya Özdemir**, Sadrettin Pençe , Burcu Çaykara, Hani Alsaadoni, Ender Coşkunpınar, Halime Hanım Pençe and Mehmet Yanartaş, FBN-1, FN-1 and TIMP-3 gene expression levels in patients with thoracic aortic aneurysm. July 19, 2019. **Turkish Journal of Biochemistry**, DOI:[10.1515/tjb-2018-0305](https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0305)
- Cacina C, Pence S, Turan S, Genc F, **Ozdemir H**, Kafadar A, Kaynar MY, Yaylim I., Analysis of CASP8 D302H Gene Variants in Patients with Primary Brain Tumors. In Vivo. 2015 Sep-Oct;29(5):601-4. PubMed PMID: 26359420.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler:

- **Hülya Özdemir**, Engin Aynacı, Yasemin Müşteri Oltulu, Kadriye Kahraman, Farangiz Ghodrti, Delal AlGassem, İlhan Yaylım, Ender Coşkunpınar, Pınar Yıldız. Survivin Geni 3' UTR Bölgesi Gen Polimorfizminin (rs17878624) Küçük Hücreli

Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) Oluşumundaki Rolünün Araştırılması. Sayfa 62. 4. DETAE Günleri. 14-15 Kasım 2012, İstanbul.

- Engin Aynacı, **Hülya Özdemir**, Pınar Yıldız, Kadriye Kahraman, Yasemin Müşteri Oltulu, Ender Coşkunpınar, Onur Kum, Farangiz Ghodrati, İlhan Yaylım. P305 Survivin Geni 3' UTR Bölgesi Gen Polimorfizminin (rs17878624) KHDAK Oluşumundaki Rolünün Araştırılması

ÖDÜLLER:

- Türk Toraks Derneği 16. Yıllık Kongresi, Akciğer ve Plevra Maligniteleri En İyi 2. Bildiri Ödülü. 3-7 Nisan, 2013, Antalya.

Staj:

Amerikan Hastanesi Genetik Merkezi

2009 Haziran-2009

Ağustos

- FISH, Sitogenetik ve Moleküler Genetik lablarında aktif olarak görev alınmıştır.

Deneyim

2013 Nisan-2016 Mart

BİOT Kök Hücre Genetik Biyoteknolojik Aşı Tedavi ve Teşhis (Ar-Ge)

- **Laboratuvar Sorumlusu** pozisyonunda görev alınmıştır. Proje Sorumlusu olarak yer aldığım projelerde aşağıdaki uygulamalarda aktif olarak görev aldım.

Laboratuvar deneyimi:

- Hücre kültürü
- Doku kültürü (Fare Tübül&Kemik İliği ve Kornea)
- Bakteri Kültürü
- Kök Hücre Kültürü
- İmmünoterapi
- Hibridoma teknolojisi
- Füzyon
- Klonlama (Rekombinant Protein Üretimi, KKK Aşısı ve İnterferon α)
- Protein Pürifikasyonu
- Kromatografi (GE AKTA Prime Liquid Chromatography System)
- Elisa
- SDS-PAGE
- Western Blot
- Hücre Boyama
- DNA&RNA izolasyonu, cDNA Sentezi, Real-time PCR
- DNA Sekanslama (Beckman Coulter Cihazı, 8 Kapiller)
- PCR alanlarında çalışmalar yapılmış ve bu konular ile ilgili projelerde görev alınmıştır.

Katıldığım Eğitim ve Seminerler:

- Kök Hücre Semineri- Kasım 2009 (KOGEM)
- Horizons in Molecular Biology and Genetics Symposium- Mayıs 2009 (Bilkent Üniversitesi)

- Giriřimci Sohbetler: Sosyal Medya-Aralık 2010 (İ.T.Ü.)
- Beden Dili Semineri-Ekim 2010 (İTÜ)
- Istanbul Technical University Third National Molecular Biology and Genetics Student Congress- Eylül 2010 (İTÜ)
- EMBO Young Scientists' Forum, 14-16 June 2012 (Yeditepe Üniversitesi)
- 2nd Symposium of the Proteomics Society, May3, 2012 (Acıbadem Üniversitesi)
- 4. DETAE Günleri, 14-15 Kasım 2012 (İstanbul Üniversitesi, **Sözlü Sunum**)

Yabancı Dil:

- İngilizce: İyi
- Almanca: Başlangıç

Sınavlar

- Dil Puanı: 86,25
- Ales: 84,60

