

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MIR-216b'NİN MEME KANSERİNDE TRASTUZUMAB TEDAVİSİ VE
GELİŞEN DİRENÇ SÜRECİNDE ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İştar Burcu Dolapçı

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Ocak

2021

ETİK BEYAN

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

İştar Burcu Dolapçı

İmzası

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

miR-216b'nin Meme Kanserinde Trastuzumab Tedavisi ve Gelişen Direnç Sürecindeki Rollerinin Araştırılması

İştar Burcu Dolapçı

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni olan meme kanseri birden fazla alt tipe sahiptir ve etkin tedavi yöntemi belirlemede alt tipin bilinmesi önem taşımaktadır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ifadesinin arttığı HER2+ meme kanserleri agresif bir fenotipe sahiptir ve nüksetme oranları yüksektir. Bu alt tipin tedavisinde yaygınlıkla kullanılan bir monoklonal antikor olan trastuzumab (Herceptin) HER2 sinyal artışını ve yol açtığı birtakım sinyal yolağı aktivasyonlarını bloke etmek için kullanılır. Ancak hastaların büyük bir kısmında belirli bir süre sonra ilaca karşı direnç gelişimi görülür. MikroRNA'lar (miRNA'lar) yaklaşık 19-23 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan ancak gen ifadesini düzenlemede fonksiyonel rolü olan RNA molekülleridir. Meme kanserinde ve ilaç cevabında etkili miRNA profillerinin tanımlanması miRNA'ların kanser ve direnç tedavisinde terapatik hedef olarak kullanılabileceği fikrini doğurmuştur. Laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalarda iki adet HER2+ hücre hattı (BT-474, SK-BR-3) kullanılarak önceden trastuzumab cevabında kilit noktada olduğu belirlenmiş iki adet miRNA'nın (miR-29b-2-5p, miR-216b-5p) trastuzumaba duyarlı ve dirençli hücrelerin proliferasyon, motilite ve invazyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. En belirgin antikanser etkinliği miR-216b-5p'nin dirençli SK-BR-3 hücrelerinde göstermesi ile çalışmaya duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücreleri ve miR-216b-5p ile devam edilmiştir. Tez kapsamında miR-216b-5p'nin dirençli hücrelerde gösterdiği antikanser etkinliğin altındaki moleküler mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmıştır. miR-216b-5p mimik ve scrambled kontrol (scr) ile transfekte edilen duyarlı ve dirençli hücreler ile yapılan mikrodizin deneylerinin sonucunda yapılan yolak analizleri bu miRNA'nın dirençli hücreler üzerindeki etkisinde nekroptoz yolağının rolüne dikkat çekmiştir ve bu yolaktaki *STAT1*, *IRF9* ve *PKR (EIF2AK2)* genlerinin ifade artışı mRNA düzeyinde doğrulanmıştır. Mikrodizin sonuçlarıyla miR-216b-5p'nin olası hedefleri birlikte değerlendirildiğinde öne çıkan *JUN* geninin 3' translasyonu yapılmayan bölgesinin (UTR) miR-216b-5p tarafından hedeflendiği biyoinformatik olarak doğrulandıktan sonra mimik transfekte dirençli hücrelerdeki Jun mRNA ve protein ifadesindeki düşüş gösterilmiştir. MiR-216b-5p'nin dirençli SK-BR-3 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin de gösterilmesiyle bu miRNA'nın dirençli hücrelerde neden olduğu hücre ölümünü Jun üzerinden gerçekleştirebileceği sonucuna varılmıştır.

2021, 84 sayfa

Anahtar Kelimeler: HER2+ meme kanseri, trastuzumab, direnç, miR-216b-5p, nekroptoz

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Investigation of the Role of miR-216b in Trastuzumab Treatment and Resistance Development Process in Breast Cancer

İştar Burcu Dolapçı

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Bala Gür Dedeoğlu

Breast cancer which is the most common cause of cancer-related death in women has several subtypes and it is important to know the subtype to apply an effective treatment. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is overexpressed in HER2+ subtype and it has an aggressive phenotype and a high recurrence rate. Trastuzumab (Herceptin) is a commonly used monoclonal antibody used for the treatment of this subtype and it blocks the increase in HER2 signaling and related activation of some signaling pathways. However most of the patients suffer from resistance to the drug after some time. MicroRNAs (miRNAs) are approximately 19-23 nucleotide long non-coding RNA molecules having functional roles in gene regulation. Identification of miRNA profiles having roles in breast cancer and drug response has led to the idea that miRNAs could be used as therapeutic targets in cancer and drug resistance cases. In the previous studies performed in our laboratory, the effects of two miRNAs (miR-29b-2-5p, miR-216b-5p) which were previously identified as hub miRNAs in trastuzumab response on the proliferation, motility, and invasion capacities of trastuzumab sensitive and resistant cells were investigated by using two HER2+ cell lines (BT-474, SK-BR-3). The most evident effect was seen when miR-216b-5p was transfected to resistant SK-BR-3 cells therefore, it is decided to continue to the study with trastuzumab sensitive and resistant SK-BR-3 cells and miR-216b-5p. In this thesis, the aim is to enlighten the molecular mechanisms underlying the anticancer effect of miR-216b-5p on the resistant SK-BR-3 cells. The pathway enrichment analyses performed as a result of microarray experiments of miR-216b-5p mimic and scrambled control (scr) transfected sensitive and resistant SK-BR-3 cells show the role of necroptosis pathway in the anticancer effect of this miRNA on resistant cells. The overexpression of *STAT1*, *IRF9* and *PKR (EIF2AK2)* genes which have roles in necroptosis pathway is verified on mRNA level. When the microarray results and the predictive targets of miR-216b-5p are evaluated together, *JUN* stands out and after bioinformatically verifying that its 3' untranslated region (UTR) is targeted by miR-216b-5p, the downregulation of *JUN* in mimic transfected resistant cells is verified on both mRNA and protein level. In addition, the apoptotic effect of miR-216b-5p on resistant SK-BR-3 cells is determined by apoptosis assay. When all these findings are taken together, it is concluded that miR-216b-5p might cause the death of resistant cells by regulating Jun.

2021, 84 pages

Keywords: HER2 + breast cancer, trastuzumab, resistance, miR-216b-5p, necroptosis

TEŞEKKÜR

Tüm süreç boyunca bana sadece bilimsel yönde değil her anlamda yol gösterici olan, bana ve içimdeki potansiyele inanan, bana karşı sonsuz bir anlayış gösteren, her zaman arkamda desteğini hissettiğim canım hocam Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na,

Bilgi birikimi ve çalışma tarzı konusunda örnek aldığım, bana nasıl deney yapılacağından nasıl güzel kahve yapılacağına kadar birçok şeyi büyük bir sabırla öğreten, sadece bir ekip arkadaşı değil benim için manevi bir abla olan Dr. Senem Noyan'a,

Çalışma sürecindeki bilimsel katkı ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. Hakan Gürdal'a,

Tez çalışmamı 217S442 numaralı proje kapsamında desteklediği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK),

Tez çalışmanın çıkış noktası olan çalışmayı gerçekleştirdiği için Dr. Emine Ezel Çilek'e, hem tezin ön verisinin oluşmasını sağlayan bilimsel çalışmaları ve katkıları için, hem de bana öğrettikleri, yardımları ve destekleri için Dr. Funda Kaya Demirsoy'a ve Blm. Uzm. Ayşegül Yücel Polat'a,

Bana benden daha çok inandığı için ve sevgisi ve desteğiyle her zaman yanımda olduğu için Dersu Giritlioğlu'na ve en mutlu olduğum anımdan en bunaldığım anıma kadar tüm süreçte dostlukları ile destek olan Nehir Dorukkaya ve Mahir Can Ganioğlu'na,

BGD Lab üyesi olmanın güzelliğini hem bilimsel hem sosyal yönden tüm içtenlikleriyle bana gösteren, Dr. Alp Aydos ve Dr. Yasemin Öztemur Islakoğlu'na,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım BGD Lab üyelerine ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ailesine,

Doğduğum andan bugüne kadar her konuda arkamda olan ve beni ben yapan aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

İştar Burcu DOLAPÇI

Ocak, 2021

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TESEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
2.1. MEME KANSERİ	2
2.1.1. MEME KANSERİNİN SINIFLANDIRILMASI	2
2.1.2. HER2+ MEME KANSERİ	4
2.1.3. HER2+ MEME KANSERİNDE GÜNCEL MOLEKÜLER TEDAVİ HEDEFLERİ	5
2.1.4. TRASTUZUMAB DİRENCİ	6
2.2. MİRNA	8
2.2.1. MEME KANSERİNDE MİRNA'LAR	9
2.2.2. TRASTUZUMAB DİRENCİNDE ROL OYNAYAN MİRNA'LAR	10
2.2.3. MİR-216B-5P	12
3. GEREKÇE VE AMAC	14

4. MATERYAL VE YÖNTEM **16**

4.1. MATERYAL	16
4.1.1. MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI	16
4.1.2. HÜCRELERİN İDAMESİ VE TRANSFEKSİYONU VE HÜCRE DENEYLERİ İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR	16
4.1.3. WESTERN BLOT İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR VE SOLÜSYONLAR	17
4.1.4. RNA İZOLASYONU, CDNA SENTEZİ, EŞ ZAMANLI PZR KİTLERİ	17
4.1.5. MİKRODİZİN ÇİPLERİ VE KİTLERİ	18
4.1.6. APOPTOZ DENEYİ İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR	18
4.2. YÖNTEM	19
4.2.1. MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI VE İDAMESİ	19
4.2.2. MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN MİRNA MİMİK İLE TRANSFEKSİYONU	20
4.2.3. TRANSFEKSİYON VERİMİNİN EŞ ZAMANLI PZR İLE BELİRLENMESİ	20
4.2.4. MRNA MİKRODİZİN ÇALIŞMASI	22
4.2.5. MİKRODİZİN VERİLERİNİN EŞ ZAMANLI PZR İLE DOĞRULANMASI	25
4.2.6. APOPTOZ DENEYİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ	27
4.2.7. WESTERN BLOT ANALİZİ	28
4.2.8. BİYOBİYOİNFORMATİK VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	30

5. ARAŞTIRMA BULGULARI **32**

5.1. ÖN VERİ	32
5.2. MİR-216B-5P'NİN MEME TUMÖRLERİNDE İFADE DURUMUNUN ANALİZİ	33
5.3. MİR-216B-5P'NİN TRASTUZUMAB DUYARLI VE DİRENÇLİ SK-BR-3 HÜCRELERİNDEKİ İFADE DURUMU	34
5.4. SK-BR-3 HÜCRELERİNİN MİRNA MİMİK İLE TRANSFEKSİYON VERİMİ	35
5.5. MİR-216B-5P İLE TRANSFEKTE EDİLMİŞ SK-BR-3 HÜCRELERİNİN MİKRODİZİN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ	36
5.5.1. MİR-216B-5P TRANSFEKSİYONU SONRASI SK-BR-3 HÜCRELERİNDE İFADE DEĞİŞİKLİĞİ GÖSTEREN GEN SETLERİ VE DİRENÇLİ HÜCRELERDE ETKİLENEN SİNYAL YOLAKLARI	37
5.5.2. EŞ ZAMANLI PZR İLE DOĞRULAMA	41
5.5.3. WESTERN BLOT İLE DOĞRULAMA	45

5.6. APOPTOZ ANALİZİ	46
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
6.1. TARTIŞMA	48
6.2. SONUÇ	52
7. KAYNAKLAR	54
8. EKLER	64
EK 1. miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde (R_{216b}) scr kontrol ile transfekte edilmiş dirençli hücrelere (R_{scr}) göre ifade değişikliği gösteren genler	64
EK 2. miR-216b-5p ile transfekte edilmiş duyarlı hücrelerde (W_{216b}) scr kontrol ile transfekte edilmiş duyarlı hücrelere (W_{scr}) göre ifade değişikliği gösteren genler	65
9. ÖZGEÇMİŞ	66
10. TEZDEN CIKAN YAYINLAR	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. miRNA biyogenezi	9
Şekil 4.1. Çalışmanın genel iş akış şeması.....	19
Şekil 5.1. miR-216b-5p'nin tümör dokusu ve normal dokudaki ifade durumu.	34
Şekil 5.2. miR-216b-5p'nin trastuzumab duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerindeki ifade durumu	35
Şekil 5.3. miR-216b-5p'nin miRNA mimik transfeksiyonundan sonra duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerindeki ifadesinin kontrolü	36
Şekil 5.4. Nekroptoz yolağını gösteren KEGG figürü	39
Şekil 5.5. miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli ve duyarlı hücrelerde ifade farklılığı gösteren genler (R216vsW216), miR-216b-5p ve scr kontrol ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde ifade farklılığı gösteren genler (R216vsRscr) ve miR-216b-5p'nin TargetScan'den elde edilmiş hedef genleri ile çizilmiş küme grafiği.	40
Şekil 5.6. Nekroptoz yolağında yer alan STAT1, IRF9 ve PKR (EIF2AK2) genlerinin ve hedef genlerle kesiştirme sonucunda seçilen JUN'un mRNA düzeyinde ifade profilleri...	43
Şekil 5.7. miR-216b-5p'nin JUN mRNA'sının 3'UTR bölgesinde bağlandığı kısmı gösteren TargetScan figürü.	45
Şekil 5.8. miR-216b-5p'nin duyarlı ve dirençli hücrelerde Jun protein ifadesi üzerine olan etkisi	46
Şekil 5.9. miR-216b-5p varlığında duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerinde görülen apoptotik etki.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Hücre hattı, kullanılan besiyeri ve içerikleri.....	16
Çizelge 4.2. Western blot analizleri için kullanılan antikorlar.....	17
Çizelge 4.3. miRNA cDNA sentez reaksiyonu.....	21
Çizelge 4.4. miRNA qRT-PCR reaksiyonu	22
Çizelge 4.5. miScript Primer Assay	22
Çizelge 4.6. First Strand cDNA sentezi	23
Çizelge 4.7. Second Strand cDNA sentezi.....	23
Çizelge 4.8. IVT karışımı.....	24
Çizelge 4.9. Hibridizasyon karışımı.....	25
Çizelge 4.10. mRNA cDNA sentez reaksiyonu	26
Çizelge 4.11. mRNA qRT-PCR reaksiyonu	27
Çizelge 4.12. qRT-PCR için kullanılan primer dizileri.....	27
Çizelge 4.13. Ayırıştırıcı ve sıkıştırıcı jel yüzdeleri ve içerikleri.	29
Çizelge 5.1. miR-216b-5p ve miR-29b-2-5p'nin duyarlı ve trastuzumab-dirençli BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinin proliferasyonlarına olan etkileri. +T olarak ifade edilen hücreler trastuzumab ile muamele edilmiş hücreleri temsil etmektedir.....	32
Çizelge 5.2. miR-29b-2-5p ve miR-216b-5p'nin hücre motilitesi ve invazyonuna olan etkisi.	33
Çizelge 5.3. R _{216b} / R _{Scr} karşılaştırma analizinden çıkan gen setleri ile yapılan yolak analizi sonuçları. En anlamlı olan ve en dikkat çeken yolaklar seçilmiştir.	38

Çizelge 5.4. R_{216b} / W_{216b} karşılaştırma analizinden çıkan gen setleri ile yapılan yolak analizi sonuçları. En anlamlı olan ve en dikkat çeken yollar seçilmiştir.	38
Çizelge 5.5. miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde mimik transfekte duyarlı hücrelere (R_{216b} / W_{216b}) ve scr kontrol transfekte dirençli hücrelere (R_{216b} / R_{scr}) göre ortak olarak ifade farklılığı gösteren genler ile olası hedef genler kesiştirildiğinde elde edilen 6 adet genin mikrodizin sonuçları	41
Çizelge 5.6. Eş-zamanlı PZR ile doğrulanan genlerin mikrodizin sonuçları.	44



SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ADCC	Antikora bağı hücre aracılı sitotoksiste
AGO	Argonat
ATCC	American Type Culture Collection
BL	Bazal benzeri
BSA	Bovine serum albumin
bp	Baz çifti
CDK	Sikline bağı kinaz
DGCR8	DiGeorge sendromu kritik bölgesi 8
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	Epitelyal-mezenkimal geçiş
ER	Östrojen reseptörü
ER+	Östrojen reseptörü pozitif
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2
HER2+	HER2-pozitif
IFN- γ	İnterferon gamma
IGF1R	İnsülin benzeri büyüme faktörü tip 1 reseptörü
IM	İmmünmodüler
IVT	İn vitro transkripsiyon
LAR	Luminal androjen reseptörü
miRNA	MikroRNA
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MSL	Mezenkimal kök hücre benzeri
MUC4	Mucin4
ng	Nanogram
°C	Santigrat derece
PBS	Phosphate buffered saline
Pol II	RNA polimeraz II
PR	Progesteron reseptörü
PTEN	Fosfataz ve tensin homoluğu
qRT-PZR	Eş zamanlı PZR
RISC	RNA tarafından tetiklenen susturulmuş kompleks
Scr	Scrambled kontrol

TBST	TBS-Tween
TGF	Transforming büyüme faktörü
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge
XPO5	Exportin 5



1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan kanser türüdür ve pek çok alt tipi bulunmaktadır. EGFR ailesinin üyelerinden olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ifadesinin artış gösterdiği bir alt tip olan HER2+ meme kanserleri belirli hormonal tedavilere karşı direnç ve beyin metastazına karşı eğilim artışı göstermeleri ile diğer alt tiplerden ayrılır. HER2+ meme kanserlerinin tedavisinde yaygınlıkla kullanılan bir monoklonal antikor olan trastuzumab (Herceptin) HER2 sinyal artışını ve yol açtığı birtakım sinyal yolağı aktivasyonlarını bloke etmek için kullanılır ancak HER2+ meme kanseri hastalarının büyük bir kısmında yaklaşık 1 yıl süren trastuzumab tedavisini takiben ilaca karşı direnç gelişimi görülür. Direnç gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması HER2+ meme kanserine karşı daha etkin tedavi yöntemleri geliştirilebilmesi açısından önem taşır.

MikroRNA'lar (miRNA'lar) protein kodlamayan ancak gen ifadesini düzenlemede fonksiyonel rolü olan küçük RNA molekülleridir ve kanser başlangıcında, gelişiminde ve metastazda kilit rolleri olduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Günümüzde meme kanseri oluşumunda ve ilaç cevabında rol oynayan miRNA ifade profilleri tanımlanmaya devam etmektedir ve bu durum HER2+ meme kanseri tedavisinde de sıklıkla karşılaşılan trastuzumab direnci sorununu ortadan kaldıracak yeni ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve miRNA'ya dayalı tedavi seçeneklerinin önünün açılması açısından önem taşır. Ancak ifade değişikliği gösteren miRNA'ların hangi mekanizmalar üzerinden etki gösterdikleri konusu hala tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu nedenle direnç durumunda miRNA'ların etkiledikleri moleküler mekanizmaların araştırılacağı çalışmalara hala ihtiyaç vardır.

Laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalarda trastuzumab cevabında kilit rol oynadığı belirlenen miR-216b-5p'nin trastuzumaba duyarlı ve dirençli HER2+ hücre hatlarında proliferasyon, motilite ve invazyonu ve trastuzumab etkinliğini ne yönde etkilediği araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda miR-216b-5p'nin özellikle trastuzumab dirençli SK-BR-3 hücreleri üzerinde daha belirgin bir etkisinin olduğu, motilite ve invazyonu yavaşlatırken ilaç etkinliğini potansiye ettiği gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında, bu tez kapsamında miR-216b-5p'nin trastuzumab duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerini hangi moleküler mekanizmalar üzerinden etkileyerek etkinlik gösterdiği araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. MEME KANSERİ

Meme kanseri, akciğer ve kolon kanseri ile beraber dünyada en sık görülen üç kanser çeşidinden biri olmakla birlikte kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (1). Görülme sıklığının artması yaşlı popülasyonun artışı, çevresel değişiklikler ve tanı tekniklerinin gelişmesi ile ilişkilendirilmektedir (2). Çalışmalar erken tanının ve etkin terapi yönteminin meme kanseri kaynaklı ölüm oranlarında azalma sağlayabileceğini belirtmektedir (3). Meme kanserinin alt tiplerinin bilinmesi etkin terapi yöntemi geliştirmek adına büyük önem taşır.

2.1.1. MEME KANSERİNİN SINIFLANDIRILMASI

Meme kanserinin biyolojik özelliklerinin belirlenmesi farklı histolojik tipteki tümörlerin karakterizasyonunu, hastalığın prognozunu anlaşılmaması ve sistematik bir tedavi yöntemi belirlemeyi kolaylaştırması açısından önem taşır. Hücre içindeki veya hücre yüzeyindeki kanser ile alakalı proteinlerin ifadesini belirlemek için genellikle immünohistokimyasal yöntemler kullanılmaktadır ve meme kanserinin alt tipleri başlıca immünohistokimya ve gen ifade profillemesi gibi tekniklerle belirlenmektedir. Günümüzde hastaların durumu değerlendirilirken tümörün morfolojisi ve derecesi, tümör büyüklüğü ve lenf nodu metastazlarının varlığı ile östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2) ifade profilleri birlikte baz alınmaktadır. ER, PR ve HER2 immünohistokimya ile değerlendirilen standart biyobelirteçler haline gelmişlerdir ancak proliferasyon belirteçlerinin ifade durumu gibi başka faktörlerin değerlendirilmesinin de önemli olduğu açıktır (4). Buna örnek olarak bir hücre bölünmesi markerı olan Ki67 verilebilir. St. Gallen 2013 sınıflandırması meme kanserinin moleküler alt tiplerine Ki67'nin değerlendirmesini de dahil etmiştir (5).

Östrojen reseptörü meme kanserinin en önemli prognostik biyobelirteçlerinden birisidir. ER pozitif olan hastalar bu reseptörü hedefleyen hormonal terapilerden yararlanabilirken bu tip meme kanserleri sitotoksik kemoterapiye aynı oranda cevap vermezler (4). Progesteron reseptörü ER sinyalizasyonunda rol oynar ve en çok post-menopozal kadınlarda olmak üzere meme kanserinin gelişimine katkı sağlar (6). Çoğu vakada ER ifadesi ile PR ifadesi bağlantılıdır ve hem ER hem PR pozitif vakaların tedaviye cevap açısından en iyi sonuçlanan

vakalar olduğu görülmüştür. ER+/PR+ kanserler ER+/PR- kanserlere göre hormonal terapiye daha olumlu cevap verebilirler (7,8). HER2 bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür ve hücre büyümesi, proliferasyonu ve hayatta kalımı gibi fonksiyonları regüle eder. *HER2* geninin amplifikasyonu agresif bir fenotipi gösteren güçlü bir belirteçtir ve invaziv meme kanserlerinde standart olarak HER2 proteini test edilir. Ki67 ise bir nükleer proliferasyon belirteçidir ve yüksek Ki67 ifadesi gösteren meme kanserleri genellikle daha kötü sonuçlanır (4).

Gen ifade profillerine bakılarak moleküler düzeyde bir analiz yapıldığında meme kanseri başlıca luminal, ER pozitif (luminal A ve luminal B), HER2 ifadesi artmış (HER2+) ve bazal benzeri (BL) olmak üzere sınıflandırılmıştır (9,10). Luminal A alt tipi invaziv meme kanserlerinin %30-40'ının oluşturur ve olumlu bir prognozla ilişkilendirilir. Luminal A meme kanserleri ER+, HER2- olur ve PR ifadeleri yüksek, Ki67 ifadeleri düşüktür. Lenf nodlarının dahil olduğu senaryolar daha az sıklıktadır ve hormon reseptörlerinin pozitif olması hormonal tedaviye olumlu cevap ile ilişkilendirilir. İnvaziv meme kanserlerinin %20-30'u ise luminal B alt tipindedir. Luminal B meme kanseri luminal A ile kıyaslandığında daha orta düzey prognoz ile seyreder. Bu alt tip luminal A gibi ER+, HER2- olur ancak daha düşük PR ve daha yüksek Ki67 ifadesi gösterir. İnvaziv meme kanserlerinin %12-20'sini HER2+ moleküler alt tipi oluşturur ve HER2 ifadesindeki artış bu alt tipin en belirgin özelliğidir. Hormon reseptörlerinin ifade durumu hayatta kalım, metastatik yayılım ve tedaviye cevap gibi unsurları etkilediği için HER2+ meme kanserleri de hormon reseptörü ifade durumlarına göre alt gruplara ayrılabilir. ER ve/ya PR negatif / HER2 pozitif ve ER ve/ya PR pozitif / HER2 pozitif olarak iki gruba ayrılabilirdiği gibi PR ifadesinde göre de ER+/PR+/HER2+ ve ER+/PR-/HER2+ olarak ayrılabilir. Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) üç reseptörün de (ER, PR, HER2) ifadesinin olmadığı meme kanseri alt tipidir ve invaziv meme kanserlerinin %15-20'sini oluşturur. Gen ifadesi profillemeye göre bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), immünmodüler (IM), mezenkimal (M) ve mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) ve luminal androjen reseptörü (LAR) moleküler alt tipleri olan TNBC diğer meme kanseri moleküler alt tiplerine göre daha olumsuz prognozla ilişkilendirilir (4). Bu alt tipe ait tümörler teşhis edildiklerinde diğer alt tiplere oranla daha büyük olurlar, lenf bezlerinin dahil olduğu durumlar daha sıktır ve genellikle yüksek dereceli tümörlerdir (11).

2.1.2. HER2+ MEME KANSERİ

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesinin üyelerinden olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), *ERBB2* geni tarafından kodlanan bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. Bu reseptör ailesi HER2 ile birlikte HER1 (EGFR), HER3 ve HER4 reseptörlerini de barındırır. Bu ailedeki reseptörlerin ligandın bağlandığı bir hücre dışı bölgesi, hücre membranının içinden geçen bölgesi ve hücre içi tirozin kinaz bölgesi olmak üzere 3 ana bölgesi vardır. HER2 dışındaki diğer tüm reseptörler hücre dışı bölgelerine ligand bağlandıktan sonra konformasyon değiştirerek dimerizasyon gerçekleştirirler ve tirozin kinaz aktivasyonu gerçekleşir. Bunun sonucunda ise PI3K/Akt, Ras/MAPK, JAK/STAT gibi kanser oluşumuna yol açan sinyal yolları aktifleşir. HER2'nin ise bilinen bir ligandı yoktur, hücre dışı bölgesi liganda bağlı olarak konformasyon değiştirmez ve devamlı aktif şekildedir. Bu nedenle dimerizasyon için diğer reseptör tirozin kinazlar tarafından tercih edilir (12,13).

HER2 ifade artışı meme ve over kanserlerinin yaklaşık %25'inde görülür ve kötü prognozu işaret eder. Meme kanserlerinde *HER2* geni kopya sayısı 25-50 aralığına kadar çıkabilir ve HER2 protein ifadesinde 40-100 kata kadar artış görülebilir. Bu artışın sonucunda tümör hücrelerinin yüzeyinde ifade olan reseptör sayısı 2 milyona kadar çıkabilir (13,14). Belirli hormonal tedavilere karşı direnç ve beyin metastazına karşı eğilim artışı HER2 ifade artışı gösteren meme kanserini diğer alt tiplerden ayıran özellikler arasındadır (15). HER2 ifade artışı HER2'nin kendisiyle homodimerizasyon yapması ve ligand olmadan HER1 veya HER3 ile heterodimerizasyon yapması ile sonuçlanır. Bu dimerizasyonlar tirozinlerin otofosforilasyonuna neden olarak birçok yolağın ligand varlığından bağımsız olarak aktive olmasına yol açar (16). HER2 homodimerizasyonu RAS-ERK sinyal yolağının aktivasyonunda rol oynarken HER2-HER3 heterodimerizasyonu PI3K/Akt sinyal yolağını aktive ederek en güçlü onkogenik etkilerden birine sebep olur. PI3K/Akt sinyalizasyonu HER3 fosforilasyonu aracılığıyla aktive olur. Akt'nin tümör hücreleri için önem taşıyan pek çok hücresel aktiviteyi regüle eden sinyal yollarının kesişiminde rol alması bu aktivasyonun tümör oluşumu için kritik olmasının sebebidir (13,17). HER2'nin deneysel olarak homodimerizasyonu ve aktivasyonu sağlandığında hücreler arasındaki sıkı bağlantıların bozulduğu ve hücre polaritesinin kaybolduğu görülmüştür. HER2'nin EGFR ile heterodimerizasyonunun ise PI3K ve Ras gibi yollar aracılığıyla invaziv bir fenotipe

yol açtığı gösterilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak HER2 ifade artışının HER2 homodimerleri ve HER2-EGFR heterodimerleri aracılığıyla hücrenin polaritesinin kaybolmasına ve adhezyon regülasyonunun bozulmasına neden olduğu sonucuna varılmıştır (18). Siklin D1 ve p27 molekülleri aracılığıyla hücre döngüsünün regülasyonunun bozulması ise HER2 ifade artışının bir başka sonucudur. Bir sikline bağlı kinaz (Cdk) inhibitörü olan p27'nin siklinE/CDK2'ye bağlanmasıyla bu kompleksi baskılaması hücre döngüsünün G1/S kontrol noktası için kritiktir ve p27 regülasyonundaki en önemli sinyal yolağı PI3K/Akt yolağıdır (19). HER2+ meme kanserinde aktive olan Akt'nin p27'yi fosforile edip çekirdekten çıkararak inhibe etmesi hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasının regülasyonunun bozulmasına ve hücrenin kontrolsüz proliferasyonuna yol açar (13).

2.1.3. HER2+ MEME KANSERİNDE GÜNCEL MOLEKÜLER TEDAVİ HEDEFLERİ

2006'da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan trastuzumab (Herceptin), HER2'nin hücre dışı bölümüne karşı geliştirilmiş hümanize bir monoklonal antikordur ve HER2+ meme kanseri tedavisinde yaygınlıkla kullanılır (20). Trastuzumab HER2 sinyal artışını ve yol açtığı birtakım sinyal yolağı aktivasyonlarını çeşitli etki mekanizmaları aracılığıyla bloke etmek için kullanılır. Bu etki mekanizmaları hücre bölünmesini ve sinyalizasyonu inhibe edici şekilde olabilirken immün sistemi tetikleyici şekilde de olabilir (12).

Hücre bölünmesini durdurucu ve sinyal yolaklarını inhibe edici etkilerini reseptöre bağlanıp homodimerizasyon ve heterodimerizasyon oluşumunu bozarak gerçekleştirir (12). Trastuzumab bir tümör baskılayıcı gen olan fosfataz ve tensin homoluğunun (PTEN) membran üzerindeki ifadesini arttırarak PI3K/Akt sinyalizasyonunu baskılar (21). İlacın etki edemediği durumlarda Src tirozin kinaz fosforilasyona sebep olarak PTEN'in hücre membranındaki lokalizasyonunu engelleyip aktivasyonunu inhibe eder (22). Trastuzumab ise PTEN aktivasyonunu Src ile HER2'nin etkileşimini bozarak gerçekleştirir. Aktive olan PTEN etkisi ile Akt'nin defosforile olması proliferasyonu baskılar (21). Hücre bölünmesini durdurucu etki ise hücre döngüsünün G1 fazında durmasından kaynaklanır ve p27'nin ifadesinin artmasıyla ilişkilidir (23). Antikor ile muamele, p27 proteininin yarılanma ömrünü arttırmakla birlikte proteinin fosforilasyonunu regüle ederek post-translasyonel olarak

ifadesini arttırır. p27 siklin E/CDK2 kompleksine bağlanarak hücre döngüsünü kontrol eder ve p27 ifade artışı ile CDK2 ifadesi düşüşü hücre döngüsünün G1 fazında durmasına sebep olur. G1 fazındaki durmanın ve meme kanseri hücrelerinin büyüme inhibisyonunun büyüklüğü indüklenen p27 seviyesi ile doğrudan bağlantılıdır (24).

Trastuzumabın bir diğer etki mekanizması olan immün sistem aktivasyonu ise antikorun immün efektör hücrelerinin Fcγ reseptörüne bağlanması ve bu bağlanmanın antikora bağlı hücre aracılı sitotoksositeyi (ADCC) tetiklemesi ile gerçekleşir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda HER2 ifadesi artmış hücrelerin NK hücreleri tarafından parçalandığı görülmüştür (25). Bununla birlikte immün efektör hücrelerinin HER2'nin ifadesini transkripsiyon aşamasında düşürdüğü de gösterilmiştir. Yapılan çalışmada immün hücrelerinin trastuzumab ile etkileşime geçmesiyle ortaya çıkan interferon gamma (IFN-γ) üretimindeki artış STAT1'i aktive etmiş ve bunun sonucunda HER2 ifadesi düşmüştür (26).

Trastuzumab farklı etki mekanizmaları ile HER2 sinyalizasyonunu bastırmaya yardımcı olsa da tek başına yeterli olamadığı durumlar vardır ve bir başka monoklonal antikor ile birlikte kullanımı da görülmektedir. Trastuzumab ligand varlığı durumunda tetiklenen HER2 heterodimerlerini baskılamamaktadır ve EGF ailesi üyelerinin ligandlarında ifade artışı gösteren veya HER3 ifadesi artmış meme kanserlerinde trastuzumab direnci görülebilir (22). Pertuzumab bir başka hümanize monoklonal antikordur ve HER2'nin trastuzumabın bağlandığı yerin karşısındaki hücre dışı dimerizasyon bölgesine bağlanır. Pertuzumab ligand varlığıyla tetiklenen HER2/HER3 dimerizasyonunu engelleyerek altındaki sinyal yollarını baskılar. Ancak trastuzumabtan farklı olarak, dirençte rol alan HER2'nin bir başka formu p95HER2'nin oluşmasını engelleyemez. İki antikorun birbirini tamamlayıcı şekilde etki göstermesinden dolayı kombine kullanımları ligand aktivasyonunun yüksek olduğu durumlarda sadece birinin kullanımına göre daha etkilidir (27).

2.1.4. TRASTUZUMAB DİRENCİ

Metastaz durumunda sıklıkla görülmekle birlikte HER2+ meme kanseri hastalarının büyük bir kısmında yaklaşık 1 yıl süren trastuzumab tedavisini takiben ilaca karşı direnç gelişimi görülür. Direnç oluşumunun altında birden fazla mekanizma yatmaktadır (28).

HER2'nin hücre dışı kısmının eksik olduğu ancak kinaz aktivitesinin devam ettiği p95HER2 adı verilen başka bir aktif formunun varlığı trastuzumab direnci ile ilişkilendirilmiştir (29). Trastuzumab HER2'nin hücre dışı bölümüne bağlanan bir antikor olduğu için bu bölgenin eksikliği antikorun bağlanacağı yerin ortadan kalkması anlamına gelir ve bu durum ilacın etkinlik gösterememesi ile sonuçlanır.

Antikor tarafından tanınan bölümün maskelenmesi de trastuzumab direncine sebep olan faktörler arasında yer alır ve trastuzumabın bağlanacağı bölümün maskelenmesinden Mucin 4 (MUC4) glikoproteini sorumlu tutulmaktadır (28).

Hyaluronanın reseptörü olan CD44'e bağlanmasının over kanseri hücrelerinde RAS ve PI3K gibi CD44 bağlantılı sinyal yollarını aktive ettiği bilinmektedir (30). CD44 ve hyaluronanın MUC4 gibi HER2'nin epitop bölgesini maskeleyerek trastuzumabın bağlanmasını engellediği düşünülmektedir (28).

HER2'nin altında yer alan sinyal yollarının regülasyonlarının bozularak aktive olması trastuzumab etkinliğini baskılayan nedenlerden biridir. PTEN ifadesi eksikliği, PI3K mutasyonları gibi durumlar HER2'nin altındaki sinyal yollarının normal durumlar dışında da aktive olmasına sebep olur. PTEN, PI3K aktivasyonunu baskılayan bir tümör baskılayıcıdır ve PTEN'in fonksiyonunun kaybolması PI3K/Akt sinyal yolağının devamlı olarak aktif kalmasına yol açar (31). Bununla birlikte *PIK3R1* ve/ya *PIK3CA* genlerinde oluşan mutasyonlar da PI3K/Akt sinyal yolağının devamlı aktivasyonuna sebep olur (28). Bu durumda trastuzumab her ne kadar hücre membranında HER2'ye bağlansa da altındaki yolların sinyalizasyonunu baskılayamamış olur.

HER2 ve altındaki yolların trastuzumab tarafından inhibe edilmesine rağmen alternatif reseptör yolları ile karşılıklı etkileşim (crosstalk) olabilir ve bu yolların sinyalizasyonu trastuzumab direncine sebep olan bir başka unsurdur. İnsülin benzeri büyüme faktörü tip 1 reseptörü (IGF1R) hücre proliferasyonunu indükleyen bir başka tirozin kinaz reseptörüdür ve trastuzumaba dirençli hücre hatlarında HER2 ile etkileşime girdiği görülmüştür. HER2+ olan SK-BR-3 hücrelerinde IGF1R sinyalizasyonu artışının trastuzumab tarafından engellenen HER2 bağlantılı sinyalizasyona alternatif olabildiği ve böylece trastuzumab direncine sebep olabildiği gösterilmiştir (32).

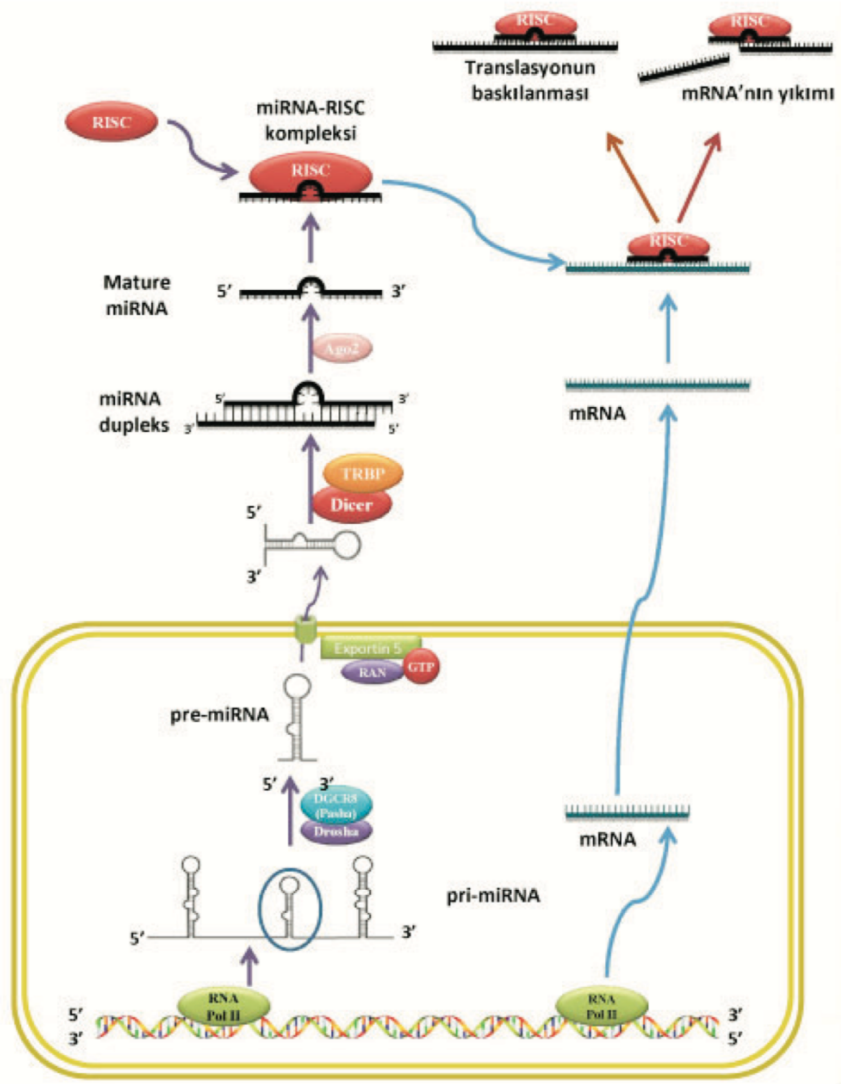
Bir başka alternatif yolak ile karşılıklı etkileşim de c-Met reseptörü aracılığıyla olur. c-Met Akt aktivasyonunun devamlılığını sağlayarak trastuzumab direncine katkıda bulunur (28). HER2+ meme kanseri hücrelerinin trastuzumab muamelesini takiben c-Met reseptörünün ifadesini arttırmaları hücrelerin kendilerini ilaca karşı korumak için geliştirdikleri bir mekanizmadır (33).

2.2. MİRNA

MikroRNA'lar (miRNA'lar) protein kodlamayan ancak gen ifadesini düzenlemede fonksiyonel rolü olan yaklaşık 19-23 nükleotid uzunluğundaki RNA molekülleridir. mRNA'nın 3' transkripsiyonu yapılmayan bölgesindeki (UTR) komplementer kısma bağlanarak degrade olmalarını sağlarlar ya da transkripsiyonu baskırlarlar.

Şekil 2.1'de gösterildiği üzere miRNA genleri RNA polimeraz II (Pol II) tarafından primer miRNA (pri-miRNA) olarak çekirdekte transkribe olur. Uzun haldeki bu pri-miRNA'lar çift zincirli RNaz III enzimi olan DROSHA ve kofaktörü DiGeorge sendromu kritik bölgesi 8 (DGCR8) proteininden oluşan mikropresör tarafından kesilir. Bunun sonucunda 60-70 nükleotid uzunluğundaki precursor miRNA'lar (pre-miRNA) oluşur. Exportin 5 (XPO5) ile çekirdekten sitoplazmaya taşınan pre-miRNA'lar sitoplazmada bir RNaz III enzimi olan DICER1 tarafından işlenir ve olgun miRNA haline gelir. Olgun miRNA'nın bir zinciri DICER1 ve Argonat (AGO) proteinlerini içeren RNA tarafından tetiklenen susturulmuş kompleks (RISC) ile birleşerek hedef mRNA'nın komplementer dizisine bağlanır. Bu bağlanma mRNA'nın degradasyonuna ya da transkripsiyonunun baskılanmasına sebep olarak gen ifadesinin baskılanmasını sağlar (34).

miRNA'ların kanser başlangıcında, gelişiminde ve metastazda kilit rolleri olduğu insan kanseri hücreleriyle ve fare modelleriyle yapılan fonksiyonel çalışmalarla gösterilmiştir. miRNA'lar proliferasyon, farklılaşma, hayatta kalım, metabolizma, enflamasyon, invazyon gibi pek çok hücresel olayın kontrolünde rol oynayarak tümör gelişimini etkilerler (35,36).



Şekil 2.1. miRNA biyogenezi (37)

2.2.1. MEME KANSERİNDE MİRNA'LAR

Meme kanserindeki miRNA ifadelerinde normale göre farklılıklar olduğu saptandıktan sonra, tümör ve normal doku arasında farklılık gösteren miRNA'ların belirlenmesinin meme kanserini sınıflandırma ve terapi cevabını belirleme gibi noktalarda önem taşıdığı görülmüştür. Kanserlerde ifade değişikliği gösteren ve kilit roller oynayan miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA'lar olabildikleri gibi onkomiR'ler de olabilirler. miRNA'lar bu iki kategoriye hedefledikleri genlerin tümör baskılayıcı genler ya da onkogenler olmasına göre

ayrılır. Tümör baskılayıcı miRNA'lar onkogenleri hedef alarak inhibisyonlarına sebep olur ve bu nedenle tümör oluşumuna karşıt özellik gösterirler. OnkomiR'lerin hedefleri ise tümör baskılayıcı genlerdir ve bu genlerin onkomiR'ler tarafından inhibisyonu tümör gelişimini destekler. miRNA'ya dayalı terapi yöntemlerinin belirlenmesinde hedeflenen miRNA'nın onkomiR ya da tümör baskılayıcı miRNA olması izlenilen yolu belirler. Tümör gelişimini baskılayıcı yönde bir etki oluşturmak için antisense oligonükleotidler kullanılarak onkomiR'ler inhibe edilebileceği gibi miRNA mimikleri kullanılarak tümör baskılayıcı miRNA'ların ifadesi arttırılabilir (16).

Meme kanserinde regülasyonu bozulan miRNA'ların belirlenmesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır ve bu alanda birtakım miRNA'lar öne çıkmıştır. miR-21, miR-221/222 ve miR-9 meme kanserinde ifade değişikliği gösteren onkomiR'ler olarak göze çarparken miR-30, miR-30a, miR-93, miR-200 ve let-7 meme kanserinde ifade durumu değişen tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak öne çıkmaktadır (38).

2.2.2. TRASTUZUMAB DİRENCİNDE ROL OYNAYAN MİRNA'LAR

Meme kanserinde ifade değişikliği gösteren miRNA'ların yanı sıra ilaç cevabında rol oynayan miRNA ifade profilleri de tanımlanmıştır. Kötü prognozla seyreden alt tipler olan TNBC ve HER2+ meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoxifen ve trastuzumab ilaçlarına cevabı etkileyen miRNA profilleri çalışılmıştır (39,40). HER2+ meme kanseri tedavisinde sıklıkla karşılaşılan trastuzumab direnci sorununu ortadan kaldıracak yeni ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için dirençte rol oynayan miRNA'ların bilinmesi miRNA'ya dayalı tedavi seçeneklerinin önünün açılması açısından önem taşır. Trastuzumab direnci durumunda ifadesi değişen birtakım miRNA'lar ve etkili oldukları yollar bilinmektedir.

miR-21 ve miR-221'in PTEN sinyal yolağı üzerinden trastuzumab direncini desteklediği bilinmektedir. Her iki miRNA da bir tümör baskılayıcı gen olan PTEN'i hedeflediği için onkomiR olarak öne çıkar. miR-21 ifade artışının HER2+ meme kanseri hücrelerinin ilaca duyarlılığını değiştirdiğinin yanı sıra kemoterapi tedavisinden sonra miR-21 ifadesinde artış olduğu da gösterilmiştir. Kemoterapi tedavisinin ilerleyen dönemlerinde trastuzumab direnci geliştiğinin bilinmesi tedavi sonrası miR-21 ifade artışının direnç gelişimindeki rolünün ne olduğunun araştırılması için gerekli ortamı hazırlamıştır (41,42). Bir başka çalışmada ise miR-221 ifadesinin baskılanmasının da PTEN ifadesinin arttırılmasının da dirençli

hücrelerde ilaç etkinliğini geri getirdiği ve proliferasyonu durdurduğu gözlenmiştir. miR-221 ifadesinin baskılanmasının dirençli hücrelerin ilaca duyarlılığını geri getirmesi bu miRNA'nın trastuzumab direncini destekleyici bir onkomiR olarak rol oynadığını kanıtlarken miR-221 ve PTEN ifadelerinin ters  alışması PTEN'in miR-221'in bir hedefi olduğunu doğrulamıştır (43).

TGF-  sinyal yolağı kanser sürecinde onkogenik bir yolak olarak öne çıkar. TGF-  epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) sürecinde rol oynayarak tümör hücrelerinin migrasyonu ve invazyonu kolay hale getirir ve böylece metastazı destekler. Bununla birlikte mitojenik büyüme faktörlerinin üretimi için aracı olması da bir başka onkogenik özelliğidir (44). miR-200c'nin bu yolağın parçası olan *ZNF217* ve *ZEB1* genlerini hedeflediği ve bu şekilde bu onkogenik yolağı inhibe ettiği görülmüştür. Tümör baskılayıcı görevi olan bu miRNA'nın trastuzumab dirençli hücrelerde en çok ifadesi azalan miRNA'lardan biri olması ve ifadesini arttırmanın trastuzumab etkinliğini arttırması direnç mekanizmasında da etkili olduğunu ortaya koymuştur (45).

miR-542-3p'nin PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden trastuzumab direncinde etki gösterdiği görülmüştür. Ma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miR-542-3p'nin knockdown edilmesinin ilaç ile muamele edilmiş meme kanseri hücrelerinin proliferasyon hızının ilaç almadan önceki haline geri dönmesine sebep olduğu gösterilmiştir. Meme kanseri hücrelerinin trastuzumab muamelesine rağmen düşük miR-542-3p ifadesinde eski proliferasyon hızına dönmeleri bu miRNA'nın varlığının trastuzumab etkinliğini desteklediğini ortaya koymuştur (46).

miR-375'in *IGF1R* genini hedeflediği ve trastuzumab dirençli hücrelerde bu miRNA'nın ifadesinin azaldığı gösterildiği gibi bu miRNA'nın ifadesi arttırılınca ilaç etkinliğinin geri geldiği, ifadesi baskılanınca ise hücrelerin direnç kazandığı da ispatlanmıştır (47). Bu sonuçlar doğrultusunda miR-375'in direnç oluşumunda tümör baskılayıcı olmasının yanı sıra trastuzumab direncinde etkili olan *IGF1R* geni ile direkt ilişki kurarak bu mekanizmada görev aldığı görülmüştür.

2.2.3. MİR-216B-5P

MİR-216b kromozomun 2p16.1 bölgesinde bulunan ve birçok kanserde tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı gösterilmiş olan bir miRNA'dır. Olgun miR-216b, pre-miR-216b'nin 5' ucundan oluşan 22 baz çifti uzunluğundaki miR-216b-5p ve 3' ucundan oluşan 24 baz çifti uzunluğundaki miR-216b-3p olmak üzere iki olgun miRNA'dan oluşur. Birçok kanser türünde miR-216b-5p'ye diğerine göre daha sık rastlansa da her iki miRNA'nın da tümör oluşumda rol oynadığı bilinmektedir. Bu miRNA'nın kanser oluşumu sırasında hücre fizyolojisini regüle etmede kilit noktalarda rol aldığı pek çok farklı kanser türünde farklı moleküler mekanizmalar üzerinden gösterilmiştir (48). MiR-216b'nin tümör dokusunda normal dokuya göre daha düşük ifade gösterdiği meme kanseri, serviks kanseri, kolon kanseri, glioblastoma, karaciğer kanseri, akciğer kanseri, melanom, nazofarenks kanseri, pankreas kanseri ve böbrek hücreli karsinom gibi pek çok kanser türünde gösterilmiştir.

Meme kanserinde miR-216b'nin rolünü aydınlatan farklı çalışmalarda bu miRNA'nın tümör baskılayıcı özellikleri farklı moleküler mekanizmalar üzerinden aydınlatılmıştır. P2X7 reseptörünü hedefleyerek hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği, SDCBP üzerinden metastazı baskıladığı, HDAC8'i hedef alarak ise proliferasyonun engellediği görülürken düşük miR-216b ifadesinin tümör büyüklüğü ve lenf nodu metastazıyla doğrudan ilişkili olduğu da belirtilmiştir (49–51).

miR-216b'nin bir transkripsiyon faktörü olan FOXM1'i hedefleyerek proliferasyonu baskıladığı serviks kanserinde, glioblastomada, akciğer kanserinde ve melanomda gösterilmiştir (52–55). Bunların yanı sıra düşük miR-216b ifadesinin serviks kanserinde apoptozu inhibe ettiği, glioblastomada metastazı desteklediği, nazofarenks kanserinde lenfatik metastaz ve ileri klinik seviyeyle ilişkili olduğu, pankreas kanserinde ise tümör agresifliği ve düşük hastalıksız hayatta kalım oranı ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (56–59). Birden fazla kanser türünde miR-216b tarafından regüle edilen bir başka gen ise KRAS'tır. Hem nazofarenks, hem pankreas, hem de böbrek hücreli karsinomda KRAS'ın miR-216b tarafından regüle edilmesiyle proliferasyon, invazyon ve tümör büyümesinin inhibe olduğu, apoptozun ise desteklendiği görülmüştür (59–61).

miR-216b'nin ilaç hassasiyetine olan etkileri de yine birden fazla kanser türünde çalışılmıştır ve elde edilen sonuçlar ilaca karşı duyarlılığı arttırdığı yönündedir. Kolorektal kanserde

artan miR-216b ifadesinin oxaliplatine karşı duyarlılığı arttırdığı gösterilirken, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde miR-216b ifade artışının apoptozu indükleyerek cisplatin etkisini arttırdığı belirtilmiştir (62,63). Bununla birlikte yapılan diğer çalışmalar miR-216b'nin dirençli melanom hücrelerini ilaç tedavisine duyarlı hale getirdiğini ve vemurafenib etkinliğini arttırdığını, miR-216b'nin ifade düşüklüğünün de pankreas kanserinde radyoterapiye cevabı negatif yönde etkilediğini göstermiştir (58,64).



3. GEREKÇE VE AMAÇ

Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanılan kanser türüdür ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni olarak geçer. 2000’li yıllarda moleküler biyoloji alanında gerçekleşen gelişmelerle birlikte tümörler histolojik özelliklerin yanı sıra belirli biyomarkerların ifade durumlarına göre de analiz edilmeye başlanmıştır. Bunun üzerine meme kanseri luminal A, luminal B, HER2 ifade artışı gösteren (HER2+), bazal-benzeri ve normal-benzeri olmak üzere beş farklı alt tipe ayrılmıştır. Sınıflandırma işlemi östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ifade durumlarına göre yapılmıştır ve en sık karşılaşılan alt tipler HER2+ ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olarak belirtilmiştir.

Agresif bir fenotipe sahip olan ve nüksetme oranı yüksek olan HER2+ meme kanseri tedavisinde HER2 sinyal artışı blokaj etmek için HER2’nin hücre dışı bölümüne karşı geliştirilen hümanize bir monoklonal antikor olan trastuzumab (Herceptin) yaygınlıkla kullanılmaktadır. Ancak hastaların çoğunda belli bir süre trastuzumab tedavisi aldıktan sonra ilaca karşı direnç gelişimi görülür.

Gen ifadesini düzenleyen küçük fonksiyonel RNA molekülleri olan mikroRNA’ların profillemelerinin hem meme kanserini sınıflandırmada hem de terapiye cevabı belirlemede yardımcı olduğu görülmüştür. Meme kanserinde miRNA ifadelerinde beklenmedik değişikliklerin saptanması ve tamoksifen ve trastuzumab gibi meme kanserinde sıklıkla kullanılan ilaçlara cevabı tahmin eden miRNA ifade profillerinin tanımlanması miRNA’ların antikanser etkinlik gösterebileceğine ve ilaç etkinliğini düzenleyici yönde rol oynayabileceğine dikkat çekmektedir. Ancak miRNA profillemeye çalışmaları tek başına etkin tedavi yöntemi belirlemede yetersiz kalmaktadır. Halen meme kanserinde ve ilaç etkinliğinde rol oynayan miRNA’ların hangi mekanizmalar üzerinden etki ettiğinin aydınlatılmasına ihtiyaç vardır. Altta yatan moleküler mekanizmaların bilinmesi etkin tedavi için hedef belirlemek adına önem taşır.

Tez kapsamında, laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda trastuzumab dirençli HER2+ meme kanseri hücrelerinde antikanser etkinlik gösterdiği belirlenen miR-216b-5p’nin hangi moleküler mekanizmalar üzerinden etki ettiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. miR-216b-5p’nin direnci tersine çevirebilecek bir etkiye sahip olduğunun

gösterilmesinin ve bu etkiyi hangi moleküler mekanizmalar üzerinden gösterdiğinin aydınlatılmasının bu miRNA'nın bir terapatik hedef olarak öne çıkmasını sağlayacağı düşünülmektedir.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI

Meme kanseri hücre hattı ATCC 'den alınmıştır. Hücrenin ismi, kullanılan besiyeri ve içerikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücre hattı, kullanılan besiyeri ve içerikleri.

Hücre hattı	Kullanılan besiyeri katalog numaraları	İçerik
SK-BR-3	Lonza (BE12-688F)	Mc Coy's + L-Glutamin + %10FBS + %1Penisilin/Streptomisin

4.1.2. HÜCRELERİN İDAMESİ VE TRANSFEKSİYONU VE HÜCRE DENEYLERİ İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR

Hücrelerin besiyerlerine L-Glutamin (HyClone, C838R53), Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone, SH30071.03) ve Penicillin/Streptomycin (Lonza, DE17-602E) eklenmiştir.

Hücreleri yıkamak için Phosphate Buffered Saline (PBS) (Hyclone, SH30256.01), kaldırmak için Tripsin (Hyclone, SH30042.01), dondurmak için DMSO (Merck, D8418) kullanılmıştır.

Trastuzumab dirençli hücreler düzenli olarak Trastuzumab (Roche, Genentech) ile muamele edilmiştir.

Transfeksiyon işlemi Hi-perfect Transfection Reagent (Qiagen, 301705), Allstar scrambled mimic negatif kontrol (Qiagen, SI03650318) ve miR-216b-5p mimic (Qiagen, MSY0004959) ile gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. WESTERN BLOT İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR VE SOLÜSYONLAR

Western blot deneylerinde kullanılacak proteinler Complete Lysis-M (Roche, 4719956001) ile izole edilmiş ve protein konsantrasyon ölçümleri Coomassie Plus Bradford Assay (Thermo Scientific, 23209) ile yapılmıştır. Proteinlerin poliakrilamid jele yüklenmesi 2X protein loading dye (Advansta, R-03019-B50) ile 1:1 oranında karıştırılarak yapılmıştır.

SDS jel; Acrylamide/bisacrylamide (Sigma, A3574), 1.5 M Tris (Serva, 37190.02), SDS (Sigma, L4390), Ammonium per sulfate (APS) (Sigma, A3678) ve TEMED (Sigma, T7024) kullanılarak hazırlanmıştır. Protein ladder olarak Protein ladder (New England Biolabs, P7712S) kullanılmıştır.

Transfer işlemi için, Methanol (Merck, 1.06007.2500), PDVF membran 1 roll, 0.22 um (Advansta, L-08008-001) kullanılmıştır. Kullanılan antikorlar Çizelge 4.2’de verilmiştir. Görüntüleme için membran WesternBright Sirius HRP Detection Kit (Advansta, K-12043-D10) ile kaplanmıştır ve LI-COR cihazına yerleştirilerek görüntü alınmıştır.

Çizelge 4.2. Western blot analizleri için kullanılan antikorlar

Antikor	Katalog No	Sulandırım Oranı
Beta-actin	Biologend, 643802	1:1000
cJUN	Cell Signaling, 60A8	1:1000
HRP-conjugated Anti-Mouse	Biologend, 405306	1:5000
HRP-conjugated Anti-Rabbit	Cell Signaling, 7074S	1:10000

4.1.4. RNA İZOLASYONU, CDNA SENTEZİ, EŞ ZAMANLI PZR KİTLERİ

RNA izolasyonu için QIAzol (Qiagen, 79306), Kloroform (Sigma, C2432), İzopropanol (Sigma, I9516), Ethanol (Merck, 1.00983.2511) ve Molecular Biology Grade Water (Hyclone, 01-869-1A) kullanılmıştır.

İzole edilen RNA'ların kontrolü için, Agaroza (Lonza, 50004) ve Ethidium bromide (SNPBiotech, SNPEB-5) kullanılarak jel hazırlanmıştır. Örnekler 6X gel loading dye (New England Biolabs, B7021S) ile karıştırılarak yüklenmiştir. Büyüklük referansı için Gene Ruler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific, SM0321) kullanılmıştır.

mRNA'lardan cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, 04896866001), miRNA'lardan cDNA sentezi için miScript II RT Kit (Qiagen, 218161) kullanılmıştır.

mRNA cDNA'ları ile eş zamanlı PCR, LightCycler 480 Syber Green Master (Roche, 4707516001) ile gerçekleştirilmiştir. miRNA cDNA'ları ile gerçekleştirilen eş zamanlı PCR için miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, 218073) kullanılmıştır.

4.1.5. MİKRODİZİN ÇİPLERİ VE KİTLERİ

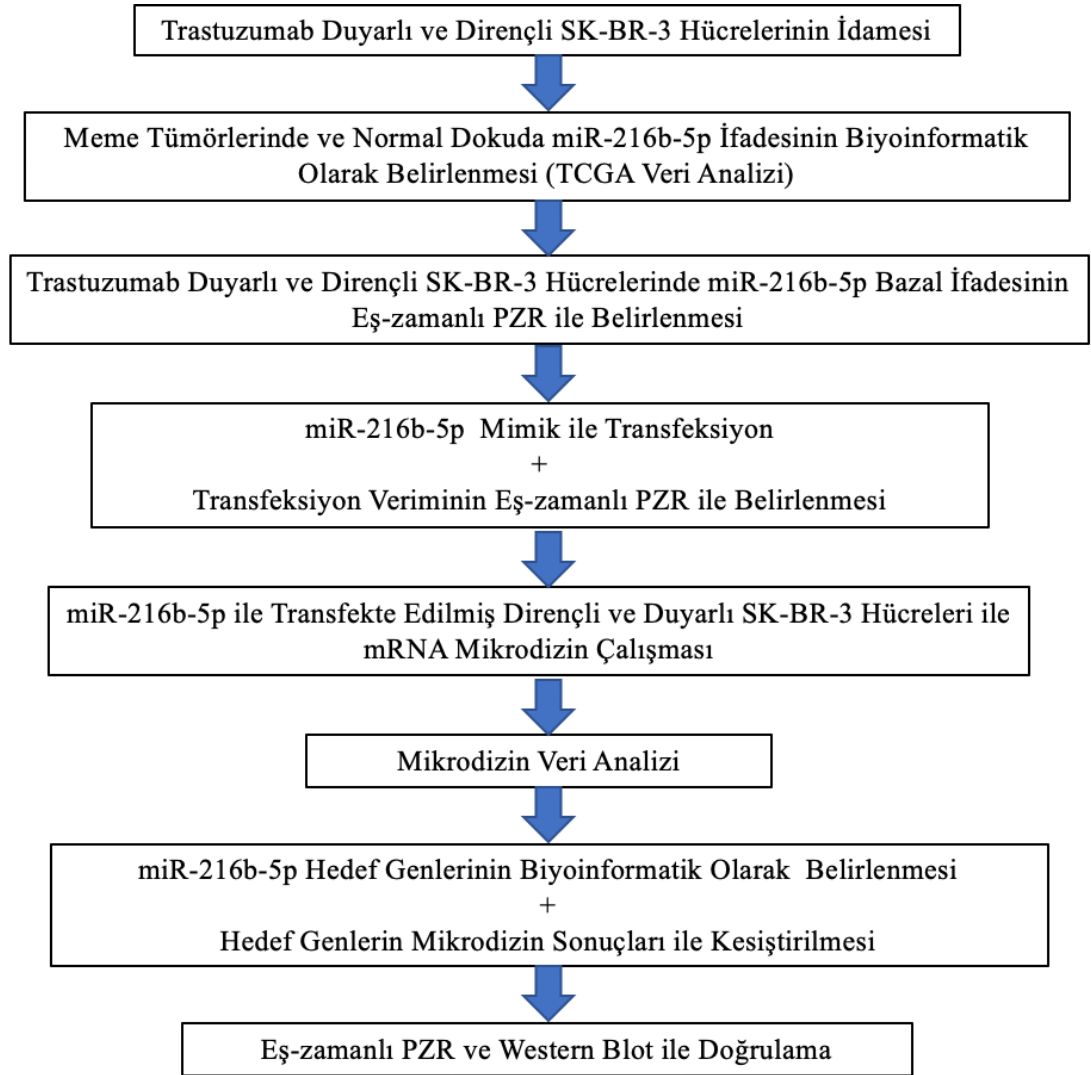
Mikrodizin çalışması Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix) çipleri ile GeneChip™ 3' IVT PLUS Reagent Kit (Applied Biosystems, 902415) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.1.6. APOPTOZ DENEYİ İÇİN KULLANILAN KİMYASALLAR

Apoptotik hücrelerin analizi için FITC Annexin V (BioLegend, 640905) ve DNA boyası olarak da Propidium Iodide Solution (BioLegend, 421301) kullanılmıştır. Annexin Binding Buffer; NaCl (Merck, 7647-14-5), Hepes (Millipore, 391340) ve CaCl₂ (Merck Millipore, 102378) kullanılarak hazırlanmıştır. Apoptoz analizi NovoCyte® Flow Cytometer (ACEA Biosciences, USA) cihazı ile yapılmıştır.

4.2. YÖNTEM

Tez kapsamında yapılan işlerin genel akış şeması Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışmanın genel iş akış şeması

4.2.1. MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI VE İDAMESİ

Çalışmada HER2+ meme kanseri hücre hattı olan SK-BR-3 kullanılmıştır. SK-BR-3 hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren McCoy's 5A besiyerinde 37°C ve %5 CO₂ ortamı sağlayan inkübatörde kültür edilmiştir. Trastuzumab dirençli hücrelerin besiyerlerine ek olarak 10µg/ml konsantrasyonunda trastuzumab eklenmiştir. Hücrelerin yoğunluğuna ve büyüme hızına göre T-25 veya T-75 flasklar kullanılmış ve hücre yoğunluğu %90 oranına ulaştığı zaman hücreler tripsin enzimi yardımı

ile kaldırılarak pasajlanmıştır. Stok olarak saklanan hücreler %10 DMSO ve %90 FBS içeren kriyoviallere alınarak sıvı nitrojene konulmuştur.

4.2.2. MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN MİRNA MİMİK İLE TRANSFEKSİYONU

Transfekte edilecek hücreler kuyu başına 25×10^4 hücre ve kuyu başına 2 ml besiyeri olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekilmiştir. Hücrelerin sayımı Thoma lamı ile yapılmıştır. Ekimden 24 saat sonra kuyuların içindeki besiyeri aspire edilip yeni 2 ml besiyeri konulmuştur. Transfeksiyon işlemi için kuyu başına 400 µl FBS içermeyen besiyeri, 12 µl Hi-perfect Transfection Reagent ve 3 µl Allstar scrambled mimic negatif kontrol veya miR-216b-5p mimic karışımı damla damla eklenmiştir. RNA eldesi için transfeksiyon işleminden 48 saat sonra, protein eldesi için işlemden 72 saat sonra kuyulardan hücre pelleti alınmıştır.

4.2.3. TRANSFEKSİYON VERİMİNİN EŞ ZAMANLI PZR İLE BELİRLENMESİ

4.2.3.1. Hücrelerden RNA izolasyonu

RNA eldesi için hücreler transfeksiyon işleminden 48 saat sonra soğuk PBS ile iki kez yıkayıp, kazıyıcı kullanılarak kaldırılmış ve 15 ml'lik falconlara aktarılmıştır. +4°C'de 2000 g'de 5 dk santrifüj edilerek pellet elde edilmiştir. Pelletlerin üzerine 1 mL QIAzol eklendikten sonra pellet – QIAzol karışımı ince üçlü enjektörden geçirilip 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Karışımın üzerine 200 µl kloroform eklendikten sonra tüpler sertçe çalkalanıp 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında 4°C'de 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. En üst tabakadaki berrak faz orta tabakaya değmeden pipet kullanılarak toplanıp yeni 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Temiz tüplere aktarılan berrak fazın üzerinde 500 µl izopropanol eklenip pipetaj yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. 4°C'de 13.000 rpm'de 15 dk santrifüjden sonra süpernatant pellete dikkat edilerek boşaltılmıştır. Pellet üzerine işlemin başında taze olarak hazırlanmış %70 Ethanol 1 mL miktarında eklendikten sonra 4°C'de 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Ethanol yine pellete dikkat edilerek boşaltılmıştır ve ethanol ile yıkama işlemi tekrarlanmıştır. İkinci yıkama işleminden sonra pelletin kuruması beklenmiştir ve sonrasında pellet 20 µl su içerisinde çözündürülmüştür. Buz üzerine alınan örnekler ile Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) kullanılarak RNA

kantifikasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA kalitesini görmek için örnekler %1'lik agaroz jelde 100V'da 30 dk boyunca yürütülmüştür.

4.2.3.2. miRNA cDNA sentezi

miR-216b-5p ve scrambled kontrol (scr) ile transfekte edilen hücrelerden izole edilen total RNA'lardan miRNA cDNA sentezi yapılmıştır. Bunun için "miScript II RT Kit (Qiagen)" kullanılmıştır. RNA örnekleri 1000 ng olacak şekilde sulandırıldıktan sonra Çizelge 4.3'te belirtilen miktarlar kullanılarak karışım hazırlanmıştır.

Çizelge 4.3. miRNA cDNA sentez reaksiyonu

Reaktif	Miktar (µl)
5X miScript HiSpec Buffer	4
10X Nucleics Mix	2
miScript RT Mix	2
Moleküler grade su	değişken
RNA (1000 ng)	değişken
Toplam	20

İşleme başlamadan önce RNA örnekleri buzda, 10X Nucleics Mix ve 5X miScript HiSpec Buffer oda sıcaklığında çözündürülmüştür. 5X miScript HiSpec Buffer, 10X Nucleics Mix ve miScript RT Mix karışımı buz üzerinde hazırlandıktan sonra her örnek için ayrı tüplerde RNA örneği ile karıştırılmıştır. Karışım 37°C'de 60 dk inkübe edildikten sonra miScript RT Mix'in inaktive olması için 95°C'de 5 dk daha inkübe edilmiştir ve buz üzerine alınmıştır. Örnekler qRT-PCR deneyinde kullanılmak üzere 5 ng/µL olacak şekilde sulandırılmıştır.

4.2.3.3. qRT-PCR deneylerinin gerçekleştirilmesi

miR-216b-5p ve scrambled kontrol (scr) ile transfekte edilen hücrelerin miRNA cDNA'ları kullanılarak qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için "miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen)" kullanılmıştır. Çizelge 4.4'te verilen miktarlar kullanılarak karışım hazırlanmış ve 384-kuyulu plate ile deney gerçekleştirilmiştir. Plate Light Cycler 480 (Roche) cihazına yerleştirilmiş ve program yürütülmüştür. Spesifik miR-216b-5p primerleri (Çizelge 4.5) 550 µL TE ile sulandırılmıştır. Referans miRNA ifadesi için *RNU6* kullanılmıştır. Elde edilen Ct değerlerin analizi $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 4.4. miRNA qRT-PCR reaksiyonu

Reaktif	Miktar (µl)
SYBR Green Mix	5
10X UP	1
10X Primer Assay	1
cDNA (5ng/ul)	1
Moleküler grade su	2
Toplam	10

Çizelge 4.5. miScript Primer Assay

Ürün Adı	Katalog No
Hs_miR_216b_1 miScript Primer Assay	MS00009107

4.2.4. MRNA MİKRODİZİN ÇALIŞMASI

Bu işlem için GeneChip™ 3' IVT PLUS Reagent Kit kullanılmıştır ve Affymetrix U133 Plus 2.0 arraylerine uygun protokol gerçekleştirilmiştir. Scrambled kontrol ve miR-216b mimik ile transfekte edilmiş trastuzumab duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerinden Kısım 4.2.5.1.'de anlatılan şekilde izole edilen RNA örnekleri kullanılmıştır. İşlemin basamakları aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

4.2.4.1. First-Strand cDNA sentezi

Öncelikle her bir RNA örneği moleküler grade su ile sulandırılarak 500 ng konsantrasyonda olacak hale getirilmiştir. Aşağıda belirtilen miktarlar (Çizelge 4.6) kullanılarak hazırlanan karışım tüplere dağıtıldıktan sonra 42°C'de 120 dk ve 4 °C 'de 2 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından tüpler buz üzerine alınıp santrifüj edilmiş ve bir sonraki adıma geçilmiştir.

Çizelge 4.6. First Strand cDNA sentezi

Reaktif	Miktar (µl)
First-Strand Buffer	4
First-Strand Enzim	1
Diluted Poly-A RNA Controls (4th Dilution)	2
Total RNA	3
Toplam	10

4.2.4.2. Second-Strand cDNA sentezi

Bir önceki basamakta sentezlenen tek iplikli cDNA örneklerini çift iplikli cDNA'ya çevirmek üzere Çizelge 4.7'de gösterilen karışım hazırlanmıştır ve first-strand cDNA karışımı üzerine eklenmiştir. Elde edilen yeni karışım vortekslendikten ve kısa süreli santrifüjlendikten sonra 16°C'de 60 dk, 65°C'de 10 dk ve 4 °C 'de 2 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından tüpler buz üzerine alınıp santrifüj edilmiş ve bir sonraki adıma geçilmiştir.

Çizelge 4.7. Second Strand cDNA sentezi

Reaktif	Miktar (µl)
Second-Strand Buffer	5
Second-Strand Enzim	2
Nükleaz içermeyen su	13
Toplam	20

4.2.4.3. In Vitro Transkripsiyon ile biyotin işaretlenmiş cRNA sentezi

In vitro transkripsiyon (IVT) karışımı aşağıda belirtilen miktarlarda oda sıcaklığında hazırlanmıştır ve bir önceki aşamada elde edilen çift iplikli cDNA örneklerinin üzerine 30 µL olacak şekilde eklenmiştir (Çizelge 4.8). Elde edilen total karışım vorteklendikten ve kısa santrifüj yapıldıktan sonra 40°C'de 16 saat ardından 4 °C 'de 2 dk inkübe edilmiştir.

Çizelge 4.8. IVT karışımı

Reaktif	Miktar (µl)
IVT Biotin Label	4
IVT Buffer	20
IVT Enzim	6
Toplam	30

4.2.4.4. cRNA Pürifikasyonu

Bu işlem oda sıcaklığında purification bead kullanılarak yapılmıştır. Örnekler ile 100 µL purification bead karıştırılmış ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tüpler “magnetic stand” üzerine yerleştirilip 5 dk beklendikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 200 µL %80 etanol eklenerek 30 saniye bekletildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp önceki basamak iki kez daha tekrarlanmıştır ve tüm tekrarların sonunda etanolün tamamen uzaklaşması için 5 dk bekletilmiştir. Pellet kuruduktan sonra her bir örneğin üzerine 27 µL önceden 65 °C’ye ısıtılmış nükleaz bulundurmayan su eklenerek pipetaj yapılmış ve tüpler tekrar “magnetic stand” üzerine yerleştirilip 5 dk bekletilmiştir. Son olarak süpernatant temiz 0.2 ml PCR tüplerine alınmış ve miktar Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür.

4.2.4.5. İşaretlenmiş cRNA Fragmentasyonu

Bir önceki aşamada pürifiye edilmiş cRNA örneklerinin fragmentasyonu için öncelikle örnekler 15 µg olacak şekilde sulandırılmıştır. Ardından üzerlerine 8 µl fragmentasyon buffer eklenmiş ve 94°C’de 35 dk, 4 °C ‘de 2 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından tüpler buz üzerine alınıp santrifüj edilmiş ve bir sonraki adıma geçilmiştir.

4.2.4.6. Hibridizasyon ve Tarama

Hibridizasyon, yıkama-boyama ve tarama işlemi için Hybridization, Wash and Scan kit kullanılmıştır. 49 format için uygun hibridizasyon karışımı Çizelge 4.9’da gösterilen miktarlar kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 4.9. Hibridizasyon karışımı

Reaktif	Miktar (µL)
Control Oligo B2 (3 nM)	3.7 µL
20X Hybridization Controls (<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>cre</i>)	11 µL
2X Hybridization Mix	110 µL
DMSO	22 µL
Nükleaz içermeyen su	43.9 µL
Toplam	190.6 µL

Human Genome U133 Plus 2.0 Array'lerine 200 µL pre-hibridizasyon karışımı yüklenmiş her biri hibridizasyon fırınında 45°C'de 60 rpm'de 30 dk inkübe edilmiştir. Bu süreçte 49 format için gereken miktarda hibridizasyon karışımı yine istenilen miktarda fragmente edilmiş ve biyotin ile işaretlenmiş cRNA örnekleri ile karıştırılarak hibridizasyon kokteyli elde edilmiş ve 99°C'de 5 dk ardından 45 °C 'de 5 dk inkübe edilmiştir. Array'ler fırından alındıktan sonra içeride bulunan pre-hibridizasyon karışımı çıkartılmış ve 200 µL hibridizasyon kokteyli ile doldurulmuştur. Her örnek hibridizasyon fırını içinde 45 °C 'de 60 rpm'de 16 saat bekletilmiştir. Array'ler hibridizasyon fırınından çıkartıldıktan sonra Affymetrix Fluidics Station 450'de FS450_0001 protokolü ile yıkanmış ve Affymetrix Scanner 7G kullanılarak taratılmıştır. Mikroizin sonucunda çıkan veriler .CEL uzantılı dosyalarda ham olarak elde edilmiştir. Elde edilen ham veriler Affymetrix Expression Console (version 1.2) programı kullanılarak .chp uzantılı dosyalar haline getirilmiş ve ön analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.5. MİKRODİZİN VERİLERİNİN EŞ ZAMANLI PZR İLE DOĞRULANMASI

4.2.5.1. mRNA cDNA sentezi

miR-216b ve scrambled kontrol (scr) ile transfekte edilen duyarlı ve trastuzumab dirençli SK-BR-3 hücrelerinden izole edilen total RNA'lardan mRNA cDNA sentezi yapılmıştır. Bunun için "Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche)" kullanılmıştır. RNA örnekleri 1000 ng olacak şekilde sulandırıldıktan sonra Çizelge 4.10'da belirtilen miktarlar kullanılarak karışım hazırlanmıştır.

Çizelge 4.10. mRNA cDNA sentez reaksiyonu

Reaktif	Miktar (µl)
5X Buffer	4
RNase Inhibitor	0,5
dNTP	2
Anchored-oligo(dT) ₁₈ Primer	1
Reverse Transcriptase	1,1
DTT	1
Moleküler grade su	değişken
Total RNA (1000 ng)	değişken
Toplam	20

Öncelikle her bir örnek için 0.2 ml PCR tüplerinde 1 µL primer ve RNA-su karışımı totalde 11.4 µL olacak şekilde hazırlanmış ve 65 °C ‘de 10 dk inkübe edilmiştir. Bu süreçte 5X buffer, RNase inhibitörü, dNTP, DTT ve reverse transkriptazı içeren karışım hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler buz üzerine alınmış ve hazırlanan karışım her bir örneğe eklenmiştir. Örnekler 50 °C ‘de 30 dk, 85 °C ‘de 5 dk inkübe edildikten sonra buz üzerine alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Örnekler qRT-PCR deneyinde kullanılmak üzere 10 ng/µL olacak şekilde sulandırılmıştır.

4.2.5.2. qRT-PCR deneylerinin gerçekleştirilmesi

Mikrodizin deneylerinin gerçekleştirildiği miR-216b ve scrambled kontrol (scr) ile transfekte edilmiş trastuzumab duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerinin mRNA cDNA’ları qRT-PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. Bu işlem için “LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche)” kullanılmıştır. Çizelge 4.11’de verilen miktarlar kullanılarak karışım hazırlanmış ve 384-kuyulu plate ile deney gerçekleştirilmiştir. Plate Light Cycler 480 (Roche) cihazına yerleştirilmiş ve program yürütülmüştür. mRNA hedef genleri için uygun primerler “Primer-BLAST” programı kullanılarak tasarlanmıştır ve 10 pmol olacak şekilde sulandırılmış halde kullanılmıştır (Çizelge 4.12). Referans mRNA ifadesi için *GAPDH* geni kullanılmıştır. Elde edilen Ct değerlerin analizi $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 4.11. mRNA qRT-PCR reaksiyonu

Reaktif	Miktar (µl)
SYBR Green Mix	5
Forward Primer (FP)	0,4
Reverse Primer (RP)	0,4
cDNA (10 ng/µL)	1
Moleküler grade su	3,2
Toplam	10

Çizelge 4.12. qRT-PCR için kullanılan primer dizileri.

Primer Adı	5' – 3' Dizisi
EIF2AK2/PKR_F	CAGTTTGCCTTCCTGGATTGT
EIF2AK2/PKR_R	TACTCCCTGCTTCTGACGGT
IRF9_F	ACCAGGATGCTGCCTTCTTC
IRF9_R	CCTGGTGGCAGCAACTGATA
STAT1_F	GTGGTACGAACTTCAGCAGC
STAT1_R	CAGCTGTGACAGGAGGTCAT
JUN_F	GGAGACAAGTGGCAGAGTCC
JUN_R	CCAAGTTCAACAACCGGTGC

4.2.6. APOPTOZ DENEYİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

miR-216b-5p'nin duyarlı ve trastuzumab dirençli SK-BR-3 hücrelerinde hücre ölümüne sebep olup olmadıklarının belirlenmesi için hücreler öncelikle 6-kuyulu hücrelere kuyu başına 25×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve ekimden 24 saat sonra hem duyarlı hem de dirençli hücreler miR-216b-5p ve scrambled kontrol ile transfekte edilmiştir. Her bir deney

ikili biyolojik tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler transfeksiyondan 48 saat sonra toplanmış ve PBS ile yıkanmıştır. Yıkanan hücreler 1X Annexin V binding buffer içinde 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde (10 mM Hepes/NaOH; pH: 7.4; 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) süspanse edilmiştir. Daha sonra hücrelerin üzerine 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI (0.5 µg/ µl) eklenip oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası hücrelerin üzerine 400 µl Annexin V binding buffer eklenmiş ve bir saat içinde okumaları NovoCyte® Flow Cytometer (ACEA Biosciences, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.7. WESTERN BLOT ANALİZİ

4.2.7.1. Hücrelerden protein izolasyonu

Protein eldesi için hücreler transfeksiyon işleminden 72 saat sonra soğuk PBS ile iki kez yıkanıp, kazıyıcı kullanılarak kaldırılmış ve 15 ml'lik falconlara aktarılmıştır ve 2000 g'de 5 dk santrifüj edilerek pellet alınmıştır. Pelletlerin üzerine 50 µl *Lysis Buffer* eklenip pipetaj yapıldıktan sonra falconlar 5 dk orbital çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Ardından falconlardaki karışım 1.5 ml'lik tüplere alınarak 14.000 g'de 8 dk santrifüj edilmiştir ve supernatan temiz 1.5 ml'lik tüplere alınmıştır. Elde edilen proteinlerin absorbans değeri ölçümü Coomassie Plus Bradford Assay (Thermo Scientific) solüsyonu kullanılarak TECAN cihazı yardımıyla yapılmıştır. 96 kuyulu plakalara üçlü tekrarlar olacak şekilde 2.5 µl protein örneği, 197.5 µl Coomassie Plus Bradford Assay solüsyonu konulmuş, TECAN cihazında 595 nm'de okuma yapılmıştır. Protein miktarını hesaplamak için değişen konsantrasyonlarda BSA ile standard eğri çizilmiştir.

4.2.7.2. Western blot deneylerinin gerçekleştirilmesi

Poliakrilamid jele yüklenecek protein miktarları her örnek 15 µg olacak şekilde ayarlandıktan sonra 2X protein loading dye (Advansta) ile 1:1 oranında karıştırılarak 99 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. SDS-page için %10'luk ayrıştırıcı jel ve % 5'lik sıkıştırıcı jel Çizelge 4.13'te yer alan miktarlar kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 4.13. Ayırıştırıcı ve sıkıştırıcı jel yüzdeleri ve içerikleri.

%10 (Ayırıştırıcı Jel)	5 ml	% 5 (Sıkıştırıcı Jel)	3 ml
ddH ₂ O (ml)	1.9	ddH ₂ O (ml)	2.10
%30 Ac/BisAc (ml)	1.7	%30 Ac/BisAc (ml)	0.50
1.5 M Tris (ph=8.8) (ml)	1.3	1.5 M Tris (ph=6.8) (ml)	0.38
%10 SDS (µl)	50	%10 SDS (µl)	30
%10 APS (µl)	50	%10 APS (µl)	30
TEMED (µl)	2	TEMED (µl)	3

Yükleme boyası ile karıştırılmış ve 99 °C’de denatüre edilmiş proteinler yüklendikten sonra jel 100V’da yürütülmüştür. Yürütme süresi görüntülenecek proteinin ağırlığına (kDa) göre ladder takip edilerek belirlenmiştir.

Jelden membrana transfer işlemi için öncelikle PVDF membran uygun boyutlarda kesilmiştir ve sırasıyla metanol, ddH₂O ve Wet Transfer tampon çözeltisi içerisine alınmıştır. Bu sürede transfer sandviçi hazırlamak için kullanılan süngerler ve wattman kağıtları da Wet Transfer tampon çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Transfer sandviçi pozitif tarafta membran negatif tarafta jel olacak şekilde hazırlanmıştır ve transfer işlemi 70V’da 90 dk gerçekleştirilmiştir.

Transfer işlemi bittikten sonra membran %5’lik bloklama solüsyonu (10 ml 1X TBS-T, 0.5g süt tozu) içinde 1 saat boyunca çalkalayıcıda bırakıldıktan sonra 1X TBS-T ile yıkanmış ardından sulandırılmış primer antikor içerisinde gece boyu +4 °C’de çalkalayıcıda bırakılmıştır. Bu işlemin ardından membran 3 kez 5’er dk 1X TBS-T ile yıkanırken sekonder antikor sulandırılmıştır. Membran üzerine sekonder antikor eklendikten sonra membran 1 saat çalkalanmıştır ve ardından 3 kez 5’er dakika 1X TBS-T ile tekrar yıkanmıştır. Bu işlemin ardından HRP substratı olan görüntüleme kiti kullanılarak LI-COR cihazı yardımıyla görüntü alınmıştır.

4.2.8. BİYOİNFORMATİK VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

4.2.8.1. Mikrodizin veri analizi

Mikrodizin deneyleri sonucunda .CEL uzantılı dosyalarda ham olarak elde edilen veriler BRB-ArrayTools programı kullanılarak analiz edilmiştir. Ham veriler programa yüklendikten sonra teknik sorunlardan kaynaklanabilecek farklılıkları ortadan kaldırmak ve sonuçları kıyaslanabilir hale getirmek için öncelikle RMA (Robust Multiarray Average) normalizasyon metodu ile normalize edilmiştir. Normalizasyon işleminden sonra gruplar arasında ifade farklılığı gösteren mRNA'ları bulmak için öncelikle gruplar tanımlanmıştır. Scr kontrol ile transfekte edilmiş trastuzumab duyarlı örnekler bir grup olarak, miR-216b-5p ile transfekte edilmiş trastuzumab duyarlı örnekler ise ikinci bir grup olarak ayrılmış ve bu iki grup program içindeki sınıf karşılaştırması (Class Comparison) komutu (t-test) ile kıyaslanmıştır. 1.5 kat ve üzeri değişiklik gösteren ($p < 0,05$) mRNA'ların tespit edilmesi ile miR-216b-5p'nin trastuzumab duyarlı hücrelerde yarattığı değişiklik mRNA düzeyinde ortaya konmuştur. miR-216b-5p ile transfekte edilmiş trastuzumab dirençli hücreler ile scr kontrol ile transfekte edilmiş dirençli hücreler arasındaki ifade değişikliği gösteren mRNA'ların belirlenmesi için ise aynı işlem bu sefer bu iki grup için yapılmıştır ve yine 1.5 kat ve üzeri değişiklik gösteren ($p < 0,05$) mRNA'lar tespit edilmiştir.

4.2.8.2. miRNA hedef gen analizleri

miR-216b'nin hem doğrulanmış hem de varsayılan hedefleri biyoinformatik olarak belirlenmiştir. Bunun için miRwalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>) veritabanı kullanılmıştır. miRNA'nın mRNA'yı hangi bölgeden hedeflediğinin analizi ise TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/) veritabanı kullanılarak yapılmıştır.

4.2.8.3. Venny analizi

Hedefleri biyoinformatik olarak doğrulamak için mikrodizin veri analizi sonucunda elde edilen gen setleri ile biyoinformatik olarak elde edilen hedef gen setleri VENNY (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) web programı aracılığıyla kesiştirilmiştir.

Trastuzumab duyarlı hücrelerde miR-216b-5p transfeksiyonu sonrası 2 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren mRNA'lar ile trastuzumab dirençli hücrelerde miR-216b-5p

transfeksiyonu sonrası 2 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren mRNA'lar VENNY (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) web programı kullanılarak kesiştirilmiştir ve sadece trastuzumab dirençli hücrelerde değişiklik gösteren mRNA'lar yolak analizinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu sayede miR-216b-5p'nin direnç durumunda nasıl bir etki mekanizması olduğunun aydınlatılması amaçlanmıştır.

4.2.8.4. Yolak zenginleştirme analizleri

Venny analizi sonucunda elde edilen gen listesi ile WebGestalt (WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit) (<http://www.webgestalt.org>) internet sitesi üzerinden yolak zenginleştirme analizi yapılmıştır. Analiz için KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veritabanı kullanılmıştır.

4.2.8.5. TCGA veri analizi

miR-216b-5p'nin tümör dokularındaki ifade seviyeleri UCSC XenaBrowser kullanılarak biyoinformatik olarak belirlenmiştir. Analiz için TCGA Breast Cancer BRCA (n=1247) veri seti kullanılmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. ÖN VERİ

Laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalarda HER2+ meme kanseri hücre hatları olan BT-474 ve SK-BR-3 hücreleri ve daha önceden aday olarak belirlenmiş olan iki adet miRNA (miR-29b-2-5p ve miR-216b-5p) ile yola çıkılmıştır. Her iki hücre hattı da önce trastuzumaba dirençli hale getirildikten sonra bu iki miRNA ile transfekte edilmiş ve bu miRNA'ların hücrelerin proliferasyon, motilite ve invazyon kapasitelerine ve trastuzumab etkinliğine olan etkileri araştırılmıştır.

Trastuzumaba duyarlı ve dirençli BT-474 ve SK-BR-3 hücreleri ve miR-29b-2-5p ve miR-216b-5p ile gerçekleştirilen proliferasyon deneyleri sonucunda; duyarlı BT-474 hücrelerinde sadece miR-216b-5p'nin proliferasyonu yavaşlattığı belirlenmiştir. Dirençli BT-474 hücrelerinde ise her iki miRNA'nın da hücre proliferasyonuna ve/ya trastuzumab etkinliğine bir etkisi olmamıştır. SK-BR-3 hücrelerinde ise miR-29b-2-5p ve miR-216b-5p'nin özellikle dirençli hücrelerde trastuzumab etkinliğini potansiye ederek hücrelerin proliferasyonlarını yavaşlattığı görülmüştür. Bu miRNA'lar tek başlarına hücreye transfekte edildiğinde ise dirençli hücreler üzerinde proliferasyonu yavaşlatarak etkinlik gösterdiği gösterilmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. miR-216b-5p ve miR-29b-2-5p'nin duyarlı ve trastuzumab-dirençli BT-474 ve SK-BR-3 hücrelerinin proliferasyonlarına olan etkileri. +T olarak ifade edilen hücreler trastuzumab ile muamele edilmiş hücreleri temsil etmektedir.

	BT-474	BT-474-Dirençli	SK-BR-3	SK-BR-3-Dirençli
miR-29b-2-5p	-	-	-	+
miR-29b-2-5p + T		-	+	+
miR-216b-5p	+	-	-	+
miR-216b-5p + T		-	-	+

Gerçekleştirilen motilite ve invazyon deneyleri sonucunda her iki miRNA'nın da duyarlı ya da dirençli BT-474 hücrelerinin motilite kapasitelerini etkilemediği görülmüştür. Duyarlı hücrelerde miR-29b-2-5p'nin kısıtlı etkisi göze çarpmakla birlikte anlamlı bulunmamıştır.

SK-BR-3 hücrelerindeki durum değerlendirildiğinde ise miR-29b-2-5p'nin özellikle duyarlı SK-BR-3 hücrelerinin hareketliliğini yavaşlattığı ve miR-216b-5p'nin ise özellikle dirençli SK-BR-3 hücrelerinin motilite ve invazyonunu durdurduğu gözlenmiştir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. miR-29b-2-5p ve miR-216b-5p'nin hücre motilitesi ve invazyonuna olan etkisi.

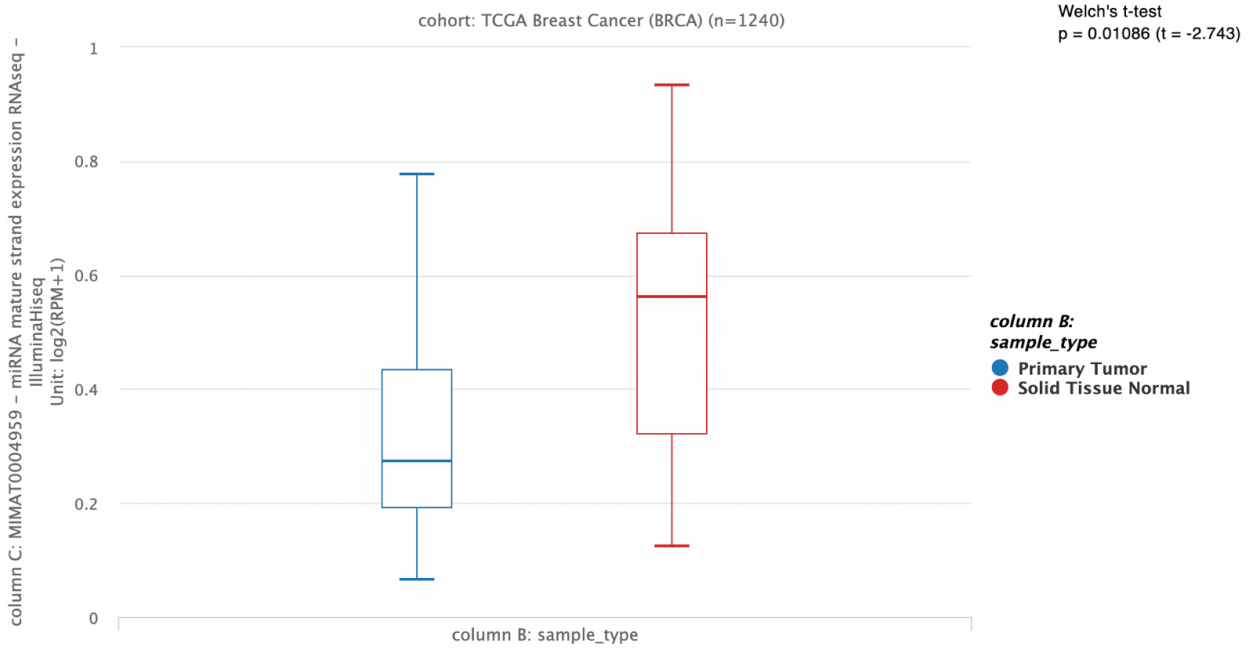
	BT-474	BT-474-Dirençli	SK-BR-3	SK-BR-3-Dirençli
Motilite				
miR-29b-2-5p	+	-	+	-
miR-216b-5p	-	-	+	+++
İnvazyon				
miR-29b-2-5p		+	+	-
miR-216b-5p		-	-	+++

Tüm bu veriler göz önüne alındığında bu tez çalışması kapsamında trastuzumab duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerinde en fazla etkinlik gösteren miRNA olarak öne çıkan miR-216b-5p'nin antikanser etkisinin moleküler olarak aydınlatılması amaçlanmıştır.

5.2. MİR-216B-5P'NİN MEME TÜMÖRLERİNDE İFADE DURUMUNUN ANALİZİ

Yapılan önceki çalışmalardan miR-216b-5p'nin SK-BR-3 hücrelerinde antikanser etkinlik gösterebileceği sonucu ortaya çıkmıştır. Bunun üzerine öncelikle bu miRNA'nın klinik öneminin saptanması için meme tümörlerindeki ifadesi biyoinformatik olarak araştırılmıştır. UCSC XenaBrowser programı ile TCGA Breast Cancer (BRCA) (n=1240) veri seti kullanılarak miR-216b-5p'nin tümör dokusu ve normal doku arasındaki ifade seviyesi

karşılaştırılmıştır ve tümör dokusunda normal dokuya göre anlamlı derecede düşük miR-216b-5p ifadesi olduğu görülmüştür (Şekil 5.1).

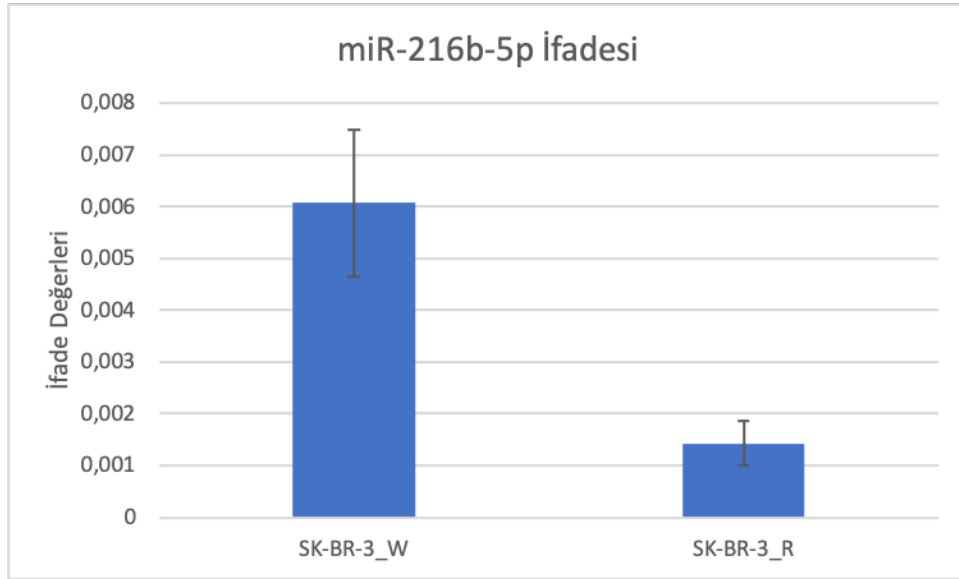


Şekil 5.1. miR-216b-5p'nin tümör dokusu ve normal dokudaki ifade durumu. TCGA meme kanseri veriseti (n=1240; tümör=1101, normal=139) kullanılarak miR-216b-5p'nin tümör normal arasındaki ifade durumu araştırılmıştır. miR-216b-5p ifadesinin tümör örneklerinde normal örneklerle göre anlamlı olarak düştüğü görülmüştür (p=0.01086).

Tümör dokusunda normal dokuya göre düşük miR-216b-5p ifadesinin olması bu miRNA'nın ifadesi artırıldığında antikanser etkinlik görülmesini klinik olarak doğrular niteliktedir.

5.3. MİR-216B-5P'NİN TRASTUZUMAB DUYARLI VE DİRENÇLİ SK-BR-3 HÜCRELERİNDEKİ İFADE DURUMU

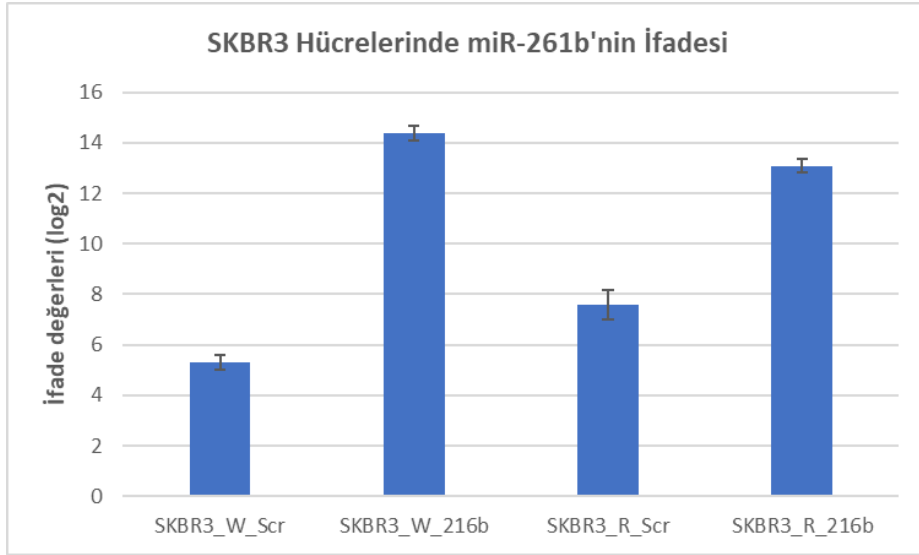
Yapılan ön çalışmalarda miR-216b-5p'nin özellikle trastuzumaba dirençli SK-BR-3 hücrelerinde etkinlik göstermesi üzerine hem duyarlı hem de dirençli hücrelerde miR-216b-5p'nin bazal ifadesine eş-zamanlı PZR ile bakılmıştır (Şekil 5.2). Trastuzumaba direnç kazanmış hücrelerin miR-216b-5p ifadesinde belirgin bir azalma görülmüştür. Direnç durumunda miR-216b-5p ifadesinin düşmesi bu miRNA'nın direnç mekanizmasına ters yönde çalışması yönünde yorumlanabilir.



Şekil 5.2. miR-216b-5p'nin trastuzumab duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerindeki ifade durumu. Hücreler direnç kazandıkça miR-216b-5p'nin ifadesinin azaldığı görülmüştür. Deney ikili teknik ve ikili biyolojik tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

5.4. SK-BR-3 HÜCRELERİNİN MİRNA MİMİK İLE TRANSFEKSİYON VERİMİ

Duyarlı ve dirençli hücreler miR-216b-5p ile transfekte edildikten sonra transfeksiyonun başarılı olup olmadığı eş-zamanlı PZR deneyi ile kontrol edilmiştir. Şekil 5.3'te görüldüğü üzere, transfeksiyondan sonra alınan hücre pelletlerinden elde edilen RNA ve miRNA cDNA'ları ile gerçekleştirilen deneyin sonucunda hem duyarlı hem de dirençli hücrelerde miRNA mimik ile transfekte edilmiş örneklerde scrambled kontrol ile transfekte edilmiş örneklere göre anlamlı derecede yüksek miR-216b-5p ifadesi saptanmıştır. Transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür.



Şekil 5.3. miR-216b-5p'nin miRNA mimik transfeksiyonundan sonra duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerindeki ifadesinin kontrolü. Transfeksiyon işleminin başarılı olduğu görülmüştür. miR-216b-5p ile transfekte edilen duyarlı SK-BR-3 (SK-BR-3_W) hücrelerinde miR-216b-5p'nin ifade seviyesi 29 kat (t-test; $p=0.0021$), dirençli hücrelerde ise (SK-BR-3_R) 25.5 kat (t-test; $p=0.013$) artmıştır. Deneyler ikili teknik ve üçlü biyolojik tekrar olacak şekilde tasarlanmıştır.

5.5. MİR-216B-5P İLE TRANSFEKTE EDİLMİŞ SK-BR-3 HÜCRELERİNİN MİKRODİZİN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Yapılan ön çalışmalarda miR-216b-5p'nin özellikle dirençli SK-BR-3 hücrelerinde proliferasyon, motilite ve invazyonu büyük ölçüde yavaşlatarak antikanser etkinlik gösterdiğinin görülmesi ve hücreler direnç kazandıkça miR-216b-5p ifadesinin düşmesi bu miRNA'nın direnç mekanizması üzerinde etkisi olduğu yönünde yorumlanmıştır. miR-216b-5p'nin özellikle trastuzumab direncinde rol aldığı moleküler yolların aydınlatılabilmesi için ilk olarak mikrodizin deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği gösterildikten sonra scrambled kontrol ve miR-216b-5p mimik ile transfekte edilmiş duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerinden elde edilen RNA örnekleri kullanılarak mikrodizin deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneylerin sonucunda veriler .CEL uzantılı dosyalar olarak elde edilmiştir ve bu verilerin analizleri BRB-ArrayTools programı kullanılarak yapılmıştır.

5.5.1. MİR-216B-5P TRANSFEKSİYONU SONRASI SK-BR-3 HÜCRELERİNDE İFADE DEĞİŞİKLİĞİ GÖSTEREN GEN SETLERİ VE DİRENÇLİ HÜCRELERDE ETKİLENEN SİNYAL YOLAKLARI

Mikrodizin deneyleri, scr kontrol ile transfecte edilmiş duyarlı hücreler (W_{scr}), miR-216b-5p mimik ile transfecte edilmiş duyarlı hücreler (W_{216b}), scr kontrol ile transfecte edilmiş dirençli hücreler (R_{scr}) ve miR-216b-5p mimik ile transfecte edilmiş dirençli hücreler (R_{216b}) olmak üzere toplamda 4 grup ile yapılmıştır. miR-216b-5p ile transfecte edilmiş dirençli hücrelerde scr kontrol ile transfecte edilmiş dirençli hücelere göre ifade değışikliği gösteren genleri belirlemek için R_{216b} ve R_{scr} grupları karşılaştırılmıştır ve toplamda ifade değışikliği gösteren 167 gen belirlenmiştir (EK 1). Aynı karşılaştırma duyarlı hücrelerle yapıldığında (W_{216b} ve W_{scr}) ifade değışikliği gösteren 168 gen bulunmuştur (EK 2). Bu zamana kadar elde edilen verilerden yola çıkarak miR-216b-5p'nin direnç mekanizması üzerinde etkisi olduğu düşünüldüğü için duyarlı hücrelerden farklı olarak rol aldığı dirençle alakalı moleküler yolları aydınlatmak adına R_{216b} ve W_{216b} gruplarının karşılaştırma analizi de yapılmıştır. Bu analizler sonucunda miR-216b-5p mimik ile transfecte edilmiş dirençli hücrelerde bu miRNA ile transfecte edilmiş duyarlı hücelere göre 1790 gen ifade değışimi göstermiştir. miR-216b-5p'nin spesifik olarak dirençli hücrelerde direnç mekanizması üzerine olan etkilerinin aydınlatılması için R_{216b} ve R_{scr} gruplarının karşılaştırma analizinden çıkan gen setleri ile (Çizelge 5.3) ve R_{216b} ve W_{216b} gruplarının karşılaştırma analizinden çıkan gen setleri ile (Çizelge 5.4) iki ayrı yolak analizi yapılmıştır.

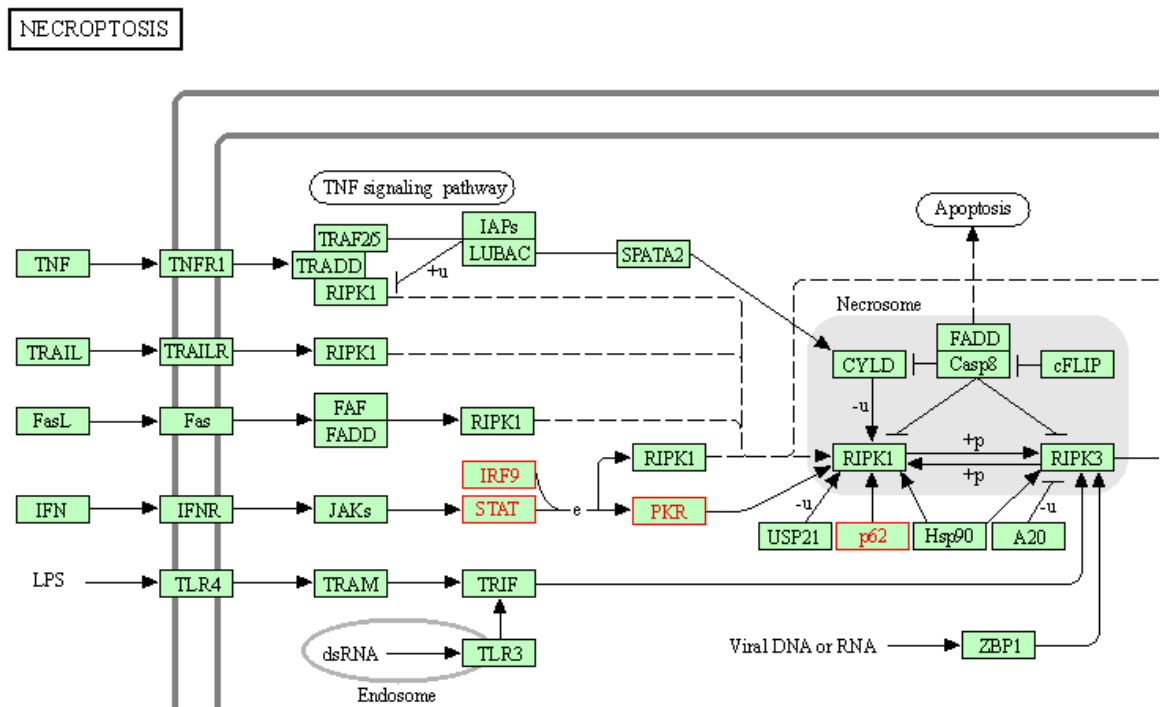
Çizelge 5.3. R_{216b} / R_{Scr} karşılaştırma analizinden çıkan gen setleri ile yapılan yolak analizi sonuçları. En anlamlı olan ve en dikkat çeken yolaklar seçilmiştir.

Yolak Adı	P Değeri
Herpes simplex enfeksiyonu	$2,0937e^{-10}$
Epstein-Barr virus enfeksiyonu	$6,5251e^{-9}$
Influenza A	$7,0825e^{-9}$
Kızamık	$2,8533e^{-8}$
Viral karsinogenez	0,0069
Nekroptoz	0,0351
TNF sinyal yolağı	0,0392

Çizelge 5.4. R_{216b} / W_{216b} karşılaştırma analizinden çıkan gen setleri ile yapılan yolak analizi sonuçları. En anlamlı olan ve en dikkat çeken yolaklar seçilmiştir.

Yolak Adı	P Değeri
Herpes simplex enfeksiyonu	0.0000086278
Hücre döngüsü	0.0000092159
Hepatit C	0.000018437
Viral karsinogenez	0.000029168
Epstein-Barr virus enfeksiyonu	0.000031343
Hücre yaşlanma	0.00013463
TNF sinyal yolağı	0.0021565

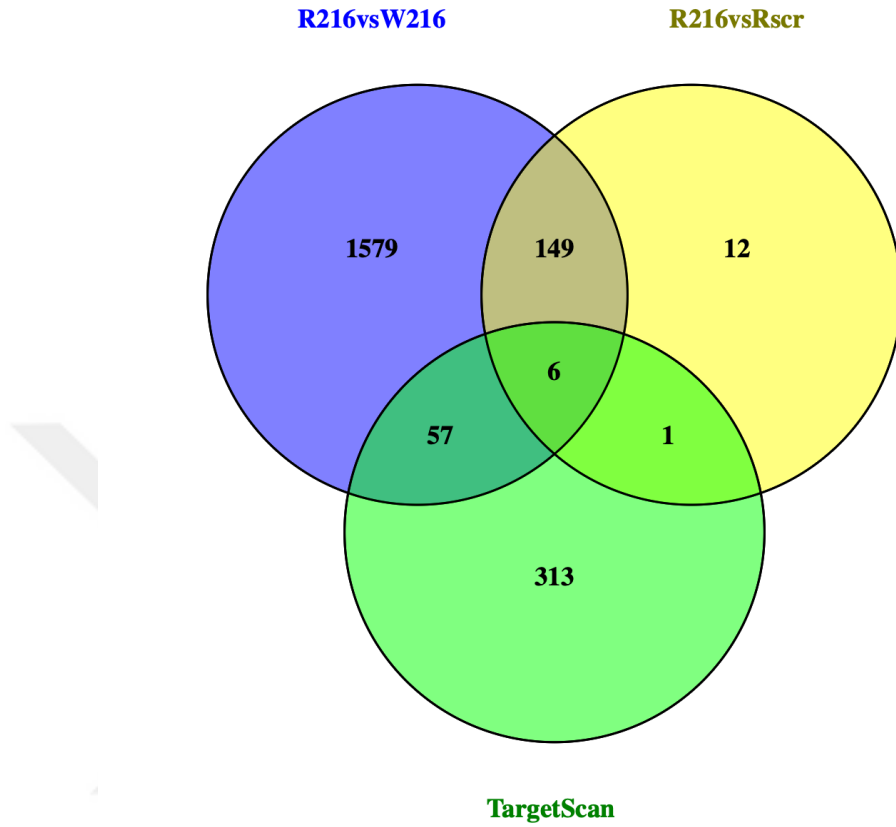
En anlamlı yollar arasında viral yolların çıkmasının beklenmedik bir sonuç olmasının yanı sıra hücre deneyleri sırasında miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde gözlemlenen hücre ölümünden dolayı nekroptoz, hücre döngüsü ve hücre yaşlanma yolları sonuçlar arasında dikkat çekmiştir. Yollarla zenginleşen genlere bakıldığında *STAT1*, *IRF9*, *PKR (EIF2AK2)* ve *JUN* genlerinin birçok yolda ortak olarak çıkması bu genler üzerine yoğunlaşmamıza sebep olmuştur. Ayrıca, *STAT1*, *IRF9* ve *PKR (EIF2AK2)* genlerinin nekroptoz yolağında nekrozom oluşumunda kilit noktalarda olması ve mimik ile transfekte dirençli hücrelerdeki gözle görülür hücre ölümü, nekroptoz yolağına odaklanmamıza sebep olmuştur (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. Nekroptoz yolağını gösteren KEGG figürü. Mikro dizin verisinden elde edilen genler kırmızı ile işaretlidir.

miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde hem bu miRNA'yla transfekte edilen duyarlı hücrelere göre (R_{216b} / W_{216b}) hem de scr kontrol ile transfekte edilen dirençli hücrelere göre (R_{216b} / R_{Scr}) ortak olarak ifade farklılığı gösteren genler (155 gen) miR-216b-5p'nin TargetScan'den elde edilmiş olası hedef genleri ile Venny aracılığıyla kesiştirildiğinde 6 gen bulunmuştur (Şekil 5.5). *ITPRIPL2*, *SPATS2L*, *EXOSC3*, *ANKFY1*, *FOXD1* ve *JUN* ortak olan genlerdir ve bu gen seti içerisinde bilinen bir onkogen olmasından dolayı en dikkat çeken gen *JUN* olmuştur. Mikro dizin deneylerinden çıkan sonuçlara

bakıldığında Jun seviyesinin en fazla miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde azalması da *JUN*'u öne çıkarmıştır (Çizelge 5.5).



Şekil 5.5. miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli ve duyarlı hücrelerde ifade farklılığı gösteren genler (R216vsW216), miR-216b-5p ve scr kontrol ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde ifade farklılığı gösteren genler (R216vsRscr) ve miR-216b-5p'nin TargetScan'den elde edilmiş hedef genleri ile çizilmiş küme grafiği. miR-216b-5p'nin spesifik olarak dirençte etkilediği genler ile biyoinformatik olarak belirlenmiş hedef genler arasında 6 ortak gen bulunmuştur.

Çizelge 5.5. miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde mimik transfekte duyarlı hücrelere (R_{216b} / W_{216b}) ve scr kontrol transfekte dirençli hücrelere (R_{216b} / R_{Scr}) göre ortak olarak ifade farklılığı gösteren genler ile olası hedef genler kesiştirildiğinde elde edilen 6 adet genin mikrodizin sonuçları

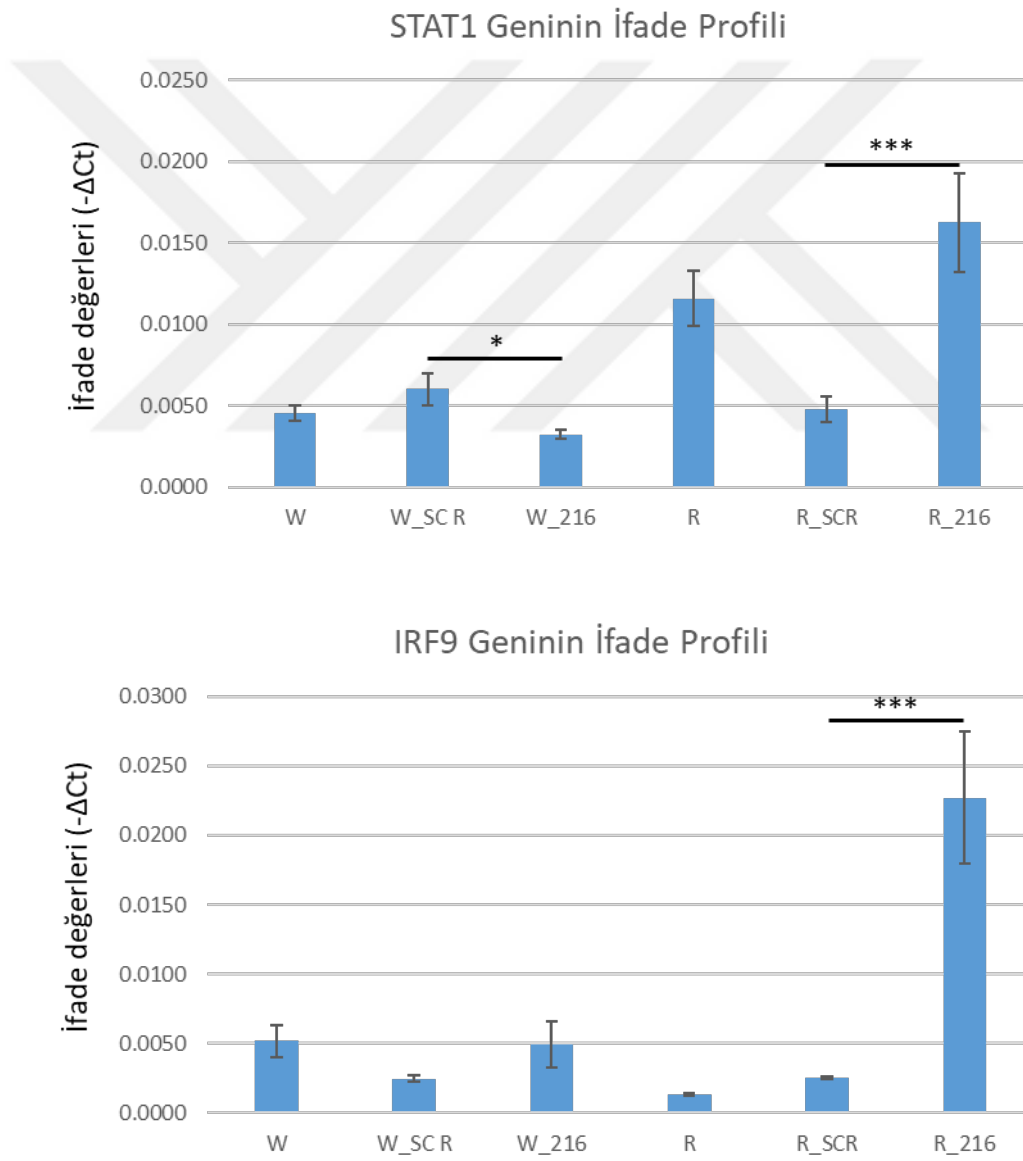
Gen İsmi	Gruplar	Kat Değişimi
<i>ITPRIPL2</i>	R_{216b} / W_{216b}	0,44
	R_{216b} / R_{Scr}	1,27
<i>SPATS2L</i>	R_{216b} / W_{216b}	2,2
	R_{216b} / R_{Scr}	1,27
<i>EXOSC3</i>	R_{216b} / W_{216b}	2,43
	R_{216b} / R_{Scr}	1,25
<i>ANKFY1</i>	R_{216b} / W_{216b}	1,98
	R_{216b} / R_{Scr}	1,52
<i>FOXD1</i>	R_{216b} / W_{216b}	0,64
	R_{216b} / R_{Scr}	1,44
<i>JUN</i>	R_{216b} / W_{216b}	0,22
	R_{216b} / R_{Scr}	0,67

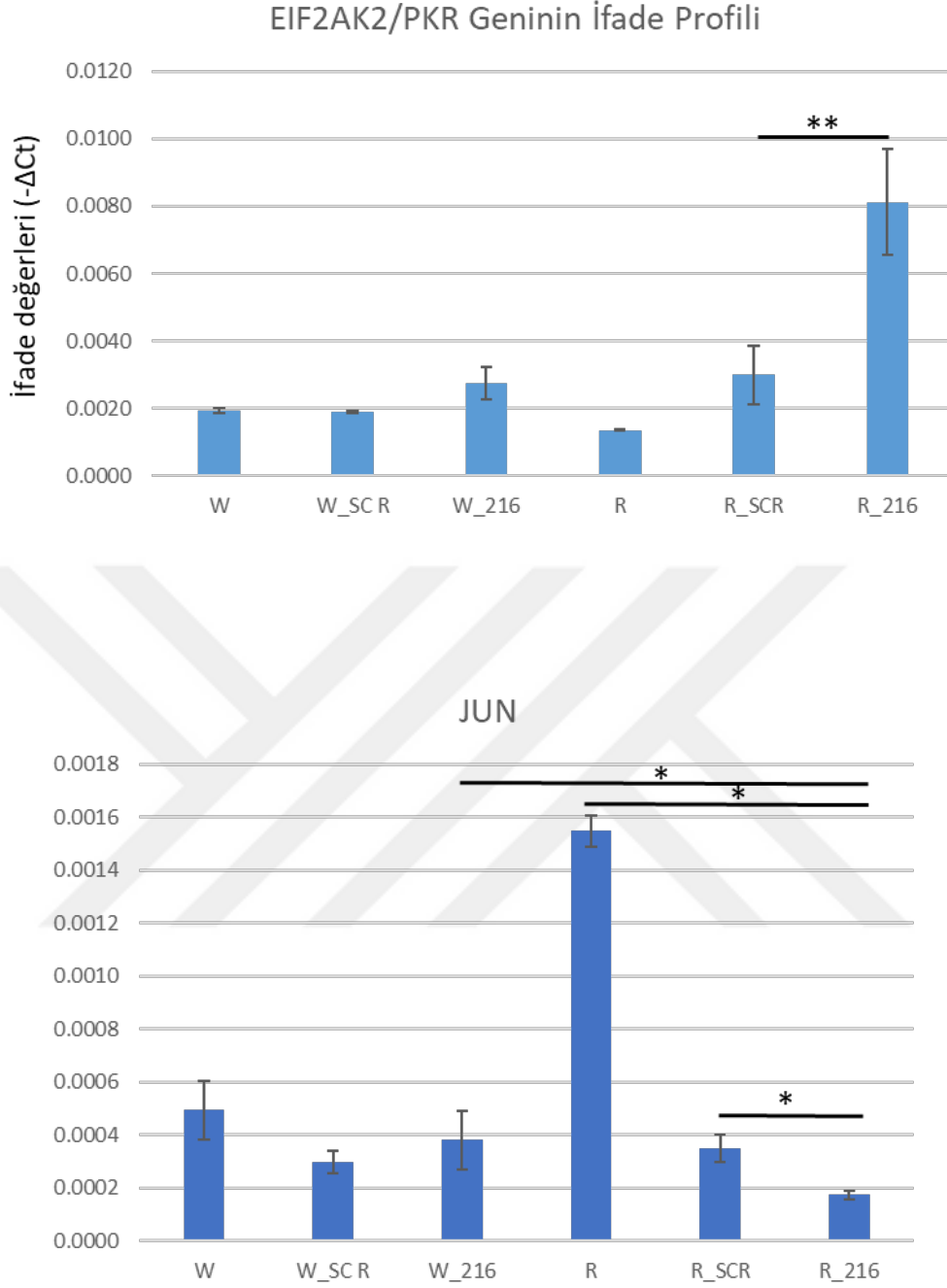
Bu sonuçlardan yola çıkarak mikrodizin verilerini eş-zamanlı PZR ile doğrulamak için *STAT1*, *IRF9* ve *PKR (EIF2AK2)* ve *JUN* genleri seçilmiştir.

5.5.2. EŞ ZAMANLI PZR İLE DOĞRULAMA

STAT1, *IRF9*, *PKR (EIF2AK2)* ve *JUN* genlerinin ifade düzeyleri eş-zamanlı PZR ile kontrol edildiğinde mikrodizin sonuçları ile paralel sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 5.6, Çizelge 5.6). *STAT1* ifadesi dirençli hücrelerde miR-216b-5p transfeksiyonu sonrası anlamlı bir artış

gösterirken duyarlı hücrelerde tam tersi miRNA transfeksiyonu sonrası ifadede azalma görülmüştür. IRF9 ve PKR (EIF2AK2) ifadeleri ise dirençli hücrelerde miRNA transfeksiyonu sonrası mikrodizin sonuçlarıyla paralel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Ayrıca bu iki genin ifadelerinin hücreler direnç kazandığında azalırken direnç durumunda miRNA transfeksiyonu sonrası tekrar artış göstermesi direnç mekanizmasına ters yönde bir etki olarak yorumlanabilir. Son olarak JUN ifadesine bakıldığında dirençli hücrelerde miR-216b-5p transfeksiyonu sonrası mikrodizin sonuçlarını doğrulayacak şekilde bir ifade azalması görülürken hücreler direnç kazandığında ifadenin anlamlı bir şekilde artması da dikkat çekmektedir.





Şekil 5.6. Nekroptoz yolağında yer alan *STAT1*, *IRF9* ve *PKR (EIF2AK2)* genlerinin ve hedef genlerle kesişirme sonucunda seçilen *JUN*'un mRNA düzeyinde ifade profilleri. Eş-zamanlı PZR deneyleri 3 biyolojik tekrar ve 2 teknik tekrar olacak şekilde tasarlanmıştır. *STAT1*, *IRF9* ve *PKR (EIF2AK2)* dirençli hücrelerde miR-216b-5p transfeksiyonundan sonra anlamlı derecede artış gösterirken *JUN* transfeksiyon sonrası anlamlı bir azalma göstermektedir (ANOVA; $p < 0.05$).

Çizelge 5.6. Eş-zamanlı PZR ile doğrulanan genlerin mikrodizin sonuçları.

Gen İsmi	Gruplar	Kat Değişimi
<i>STAT1</i>	R_{Scr} / W_{Scr}	1,55
	R_{216b} / W_{216b}	3,49
	R_{216b} / R_{Scr}	2,74
	W_{216b} / W_{Scr}	1,29
<i>IRF9</i>	R_{Scr} / W_{Scr}	0,46
	R_{216b} / W_{216b}	2,6
	R_{216b} / R_{Scr}	9,49
	W_{216b} / W_{Scr}	1,67
<i>PKR (EIF2AK2)</i>	R_{Scr} / W_{Scr}	-
	R_{216b} / W_{216b}	2,23
	R_{216b} / R_{Scr}	2
	W_{216b} / W_{Scr}	-
<i>JUN</i>	R_{Scr} / W_{Scr}	0,22
	R_{216b} / W_{216b}	0,22
	R_{216b} / R_{Scr}	0,67
	W_{216b} / W_{Scr}	0,81

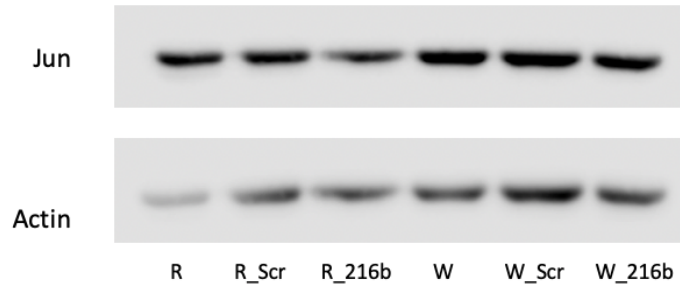
5.5.3. WESTERN BLOT İLE DOĞRULAMA

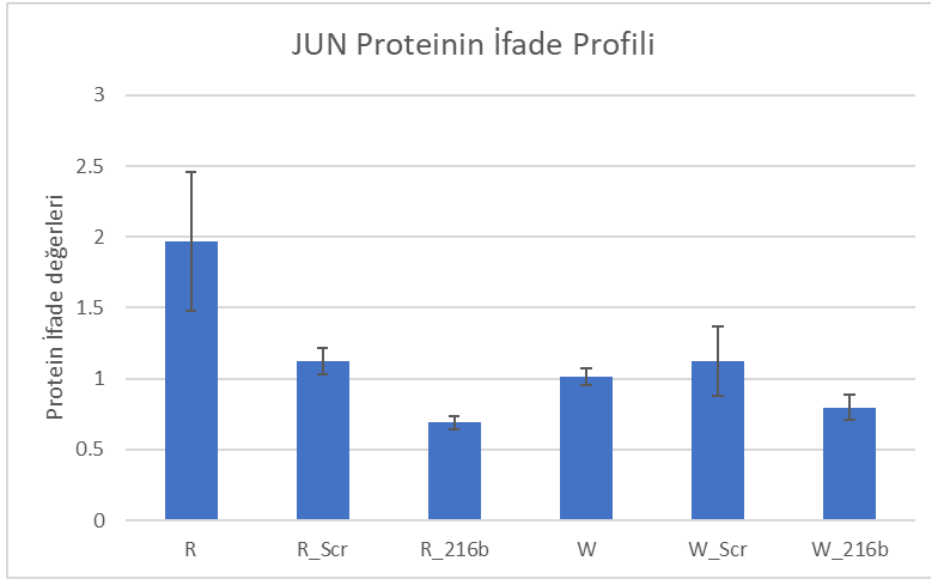
Eş-zamanlı PZR sonuçlarında mikrodizin sonuçlarıyla paralel olarak Jun ifadesinde görülen azalma ve bu gene miR-216b-5p'nin hedef genleriyle mikrodizin sonuçlarının kesiştirilmesiyle ulaşılması sonucunda miR-216b-5p-JUN ilişkisi TargetScan veritabanı aracılığıyla analiz edilmiştir ve miR-216b-5p'nin JUN'un 3'UTR bölgesine bağlandığı görülmüştür (Şekil 5.7).

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 638-644 of JUN 3' UTR	5' . . . UGUUGUUUGUAAAUAAGAGAUUU . . .
hsa-miR-216b-5p	3' AGUGUAAACGGACG-UCUCUAAA

Şekil 5.7. miR-216b-5p'nin JUN mRNA'sının 3'UTR bölgesinde bağlandığı kısmı gösteren TargetScan figürü.

JUN'un mRNA ifadesinin miR-216b-5p varlığında azaldığının görülmesi ve bu genin miR-216b-5p'nin doğrudan hedefinin olduğunun gösterilmesi üzerine miR-216b-5p varlığında duyarlı ve dirençli hücrelerde Jun protein ifadesine de bakılmıştır. Scr kontrol ve miR-216b-5p ile transfekte edilmiş duyarlı ve dirençli hücrelerden elde edilen proteinlerle yapılan western blot deneyleri sonucunda protein ifadesindeki değişimlerin de mikrodizin ve eş-zamanlı PZR deneyleri ile paralel olduğu görülmüştür. Şekil 5.8'de görüldüğü üzere, hücrelerin direnç kazanması Jun protein ifadesinde artışa sebep olurken dirençli hücreler miR-216b-5p ile transfekte edildiğinde protein ifadesinde düşüş görülmüştür. Duyarlı hücrelerde ise miRNA'nın belirgin bir etkisi gözlenmemiştir.

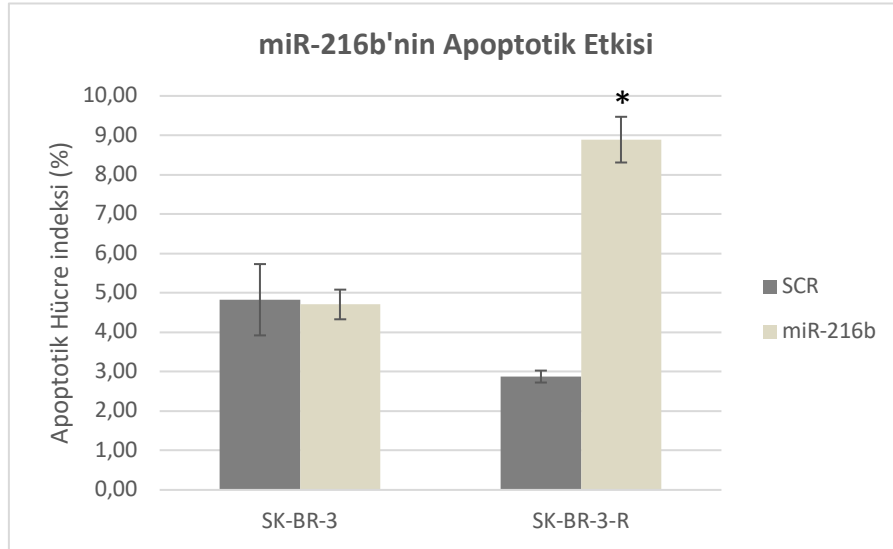
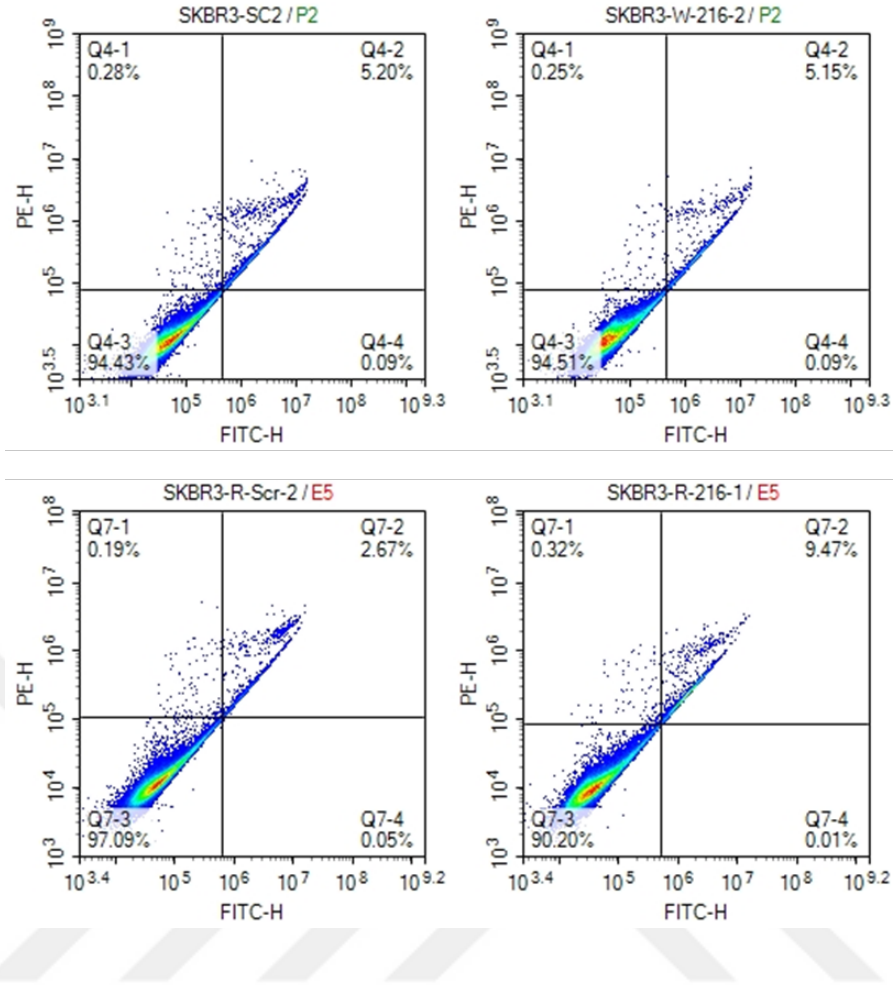




Şekil 5.8. miR-216b-5p'nin duyarlı ve dirençli hücrelerde Jun protein ifadesi üzerine olan etkisi. Scr kontrol ve miRNA mimik ile transfekte edilen hücrelerle yapılan western blot deneyleri sonucunda mimik ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde Jun protein ifadesinde azalma görülürken duyarlı hücrelerde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Deneyler ikili biyolojik tekrarlarla yapılmıştır.

5.6. APOPTOZ ANALİZİ

Yolak analizi sonrası nekroptoz sinyal yolağının öne çıkması, hücre deneyleri sırasında miR-216b-5p ile transfekte edilen dirençli hücrelerde gözle görülür bir biçimde hücre ölümü artışının gözlemlenmesi ve ifadesinin azaldığını hem mRNA hem de protein düzeyinde gösterdiğimiz Jun'un apoptoz ile ilişkisinin bilinmesi sonucunda mimik ve scr kontrol ile transfekte edilmiş duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücreleri ile apoptoz analizi yapılmıştır. Deney sonucunda gözlemlerimizi doğrulayacak şekilde miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerin diğer hücreler ile kıyaslandığında anlamlı olarak geç apoptoz/nekroz evresinde yer aldığı gözlenmiştir (t-test; $p=0.0009$) (Şekil 5.9). Dirençli hücrelerde görülen bu apoptotik etkinin duyarlı hücrelerde görülmemesi miR-216b-5p'nin spesifik olarak direnç mekanizmasına ters yönde bir etkisi olarak yorumlanabilir.



Şekil 5.9. miR-216b-5p varlığında duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerinde görülen apoptotik etki. Dirençli hücrelerde miR-216b-5p transfeksiyonu sonucunda geç apoptotik/nekrotik hücre indeksinde anlamlı bir artış görülürken duyarlı hücrelerde anlamlı bir değişim olmamıştır (t-test; $p < 0.05$).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Laboratuvarımızda yapılan ön çalışmalarda daha önceden trastuzumab cevabında rol oynamaları açısından aday miRNA'lar olarak belirlenmiş miR-29b-2-5p ve miR-216b-5p'nin trastuzumaba duyarlı ve dirençli SK-BR-3 ve BT-474 hücreleri üzerinde antikanser etkinlik gösterip göstermedikleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda miR-216b-5p'nin özellikle dirençli SK-BR-3 hücrelerinin proliferasyon, motilite ve invazyonunu yavaşlattığının görülmesi üzerine çalışmaya miR-216b-5p ve SK-BR-3 hücre hattı ile devam edilmesine karar verilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarla miR-216b-5p'nin trastuzumab dirençli hücelere hangi moleküler mekanizmalar üzerinden etki ettiğinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

miR-216b-5p'nin meme kanseri tümörlerindeki ifade durumuna bakıldığında tümör dokusunda normal dokuya göre daha düşük ifade göstermesi literatürle uyumludur. miR-216b-5p ile farklı kanserlerde yapılmış çalışmalarda bu miRNA'nın ifadesinin kanser durumunda düştüğü ve miRNA'nın tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı gösterilmiştir (65). 2011'de Deng ve arkadaşları çalışmalarında miR-216b ifadesinin nazofarenks kanserinde düştüğünü ve bu ifade düşüklüğünün kötü prognoz ve metastazla direkt olarak ilişkili olduğunu söylemişlerdir ve ilk defa miR-216b'nin tümör baskılayıcı bir görev üstlendiğine dair veri elde etmişlerdir (59). Daha sonrasında yapılan birçok çalışmada kolon ve akciğer kanserinde proliferasyon, invazyon ve migrasyonu baskılaması, serviks kanserinde iyi prognozla ilişkilendirilmesi, pankreas kanserinde kanser hücrelerinin koloni oluşturmasını önlemesi gibi farklı kanserlerdeki tümör baskılayıcı rolleri aydınlatılmıştır (54,66–68). Meme kanseri özelinde bakıldığında ise miR-216b-5p'nin meme kanserinde de proliferasyonu ve metastazı baskılamak gibi tümör baskılayıcı roller oynadığını gösteren çalışmalar vardır (51,69). Bu miRNA'nın tümör baskılayıcı yönlerinin farklı kanserlerde aydınlatılmış olması ve meme tümörlerindeki ifade durumu analiz edildiğinde tümörde ifadesinin daha düşük olması miR-216b-5p mimik transfeksiyonu ile ifade artışı sağlanmasının antikanser etkinlik gösterme potansiyelini desteklemektedir. MiR-216b-5p'nin antikanser etkinliklerini gösteren çalışmaların yanısıra farklı kanserlerde farklı ilaçlara karşı hassasiyeti arttırdığına yönelik çalışmalar da mevcuttur. Pankreas kanserinde

düşük miR-216b ifadesinin radyoterapiye olan cevabı kötü yönde etkilemesi (70), kolon kanserinde miR-216b'nin oxaliplationa karşı duyarlılığı arttırması (62) ve over kanserinde cisplatin direnci durumunda miR-216b ifadesi düşükken ifade arttırıldığında hücrelerin cisplatine daha duyarlı hale gelmesi (71) trastuzumaba dirençli SK-BR-3 hücrelerinde miR-216b-5p ifadesinin düşmesi üzerine direnci tersine çevirmek için mimik verilmesini destekler niteliktedir.

Mimik transfeksiyonu sonrası dirençli hücrelerde antikanser etkinlik görülmesi yapılan bu çalışmalarla uyumlu bir bulgu olmuştur. MiR-216b-5p'nin neden olduğu bu antikanser etkinliklerin altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmak amacıyla yapılan mikrodizin deneyleri sonucunda elde edilen gen setleriyle yapılan yolak analizlerinin en anlamlı olarak viral yollara yönelmesi beklenmedik bir sonuç olmuştur. Ancak bu viral yolların yanı sıra nekroptoz, hücre döngüsü ve hücre yaşlanma yolları da dikkat çeken yollar arasında yer almıştır. Hücre deneyleri sırasında miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde gözlemlenen hücre ölümü bu miRNA'nın özellikle dirençli hücrelerde hücre ölümünü tetikleyebileceği ihtimalini düşündürmüştür. Yollar arasında nekroptoz, hücre döngüsü ve hücre yaşlanma yollarının bulunması miR-216b-5p'nin hücre ölümüne neden olabileceğine işaret etmiştir. Sonuçlarda çıkan viral yollar da dahil olmak üzere tüm yollarda zenginleşen genlere bakıldığında *STAT1*, *IRF9*, *PKR (EIF2AK2)* ve *JUN* genlerinin birçok yolda ortak olarak çıkması bu genler üzerine yoğunlaşmamıza sebep olmuştur. Nekrozom oluşumunda *STAT1*, *IRF9* ve *PKR (EIF2AK2)* genlerinin kilit rol oynadığının görülmesi mimik ile transfekte dirençli hücrelerdeki gözle görülür hücre ölümü ile bir arada değerlendirildiğinde nekroptoz yolağı öne çıkmıştır.

Duyarlı ve dirençli SK-BR-3 hücrelerinin mimik ve scr kontrol ile transfeksiyonundan sonra miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde gözle görülür bir hücre ölümü gerçekleşmesi mikrodizin veri analizinden çıkan nekroptoz yolağına odaklanmamıza yol açmıştır. Gözlenen hücre ölümünün nekroptoz kaynaklı olup olmadığını belirlemek amacıyla nekroptoz yolağında yer alan *STAT1*, *IRF9* ve *PKR (EIF2AK2)* genleri eş-zamanlı PZR ile doğrulanmak üzere seçilmiştir. Bu genlerin mimik ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde anlamlı olarak artması mikrodizin sonuçlarını desteklemekle beraber bu genlerin ifade artışının nekroptozu indüklemesi de literatür ile uyumludur. Thapa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IFN- γ 'ya bağlı nekrozom oluşumunda STAT1'in ve PKR'nin önemi

vurgulanmıştır. IFN- γ 'nın nekrozu tetiklemek için Jak/STAT sinyal yolağını kullandığını göstermekle beraber PKR inhibitörü varlığında hücrelerin IFN- γ tarafından tetiklenen nekroza karşı direnç gösterdiğini ortaya koymuşlardır (72). Yaptıkları bir çalışmada da STAT1 aktivasyonunun IFN- γ bağımlı nekroptoz için gerekli olduğunu HeLa hücreleri üzerinden göstermişlerdir (73). Makrofajların IFN- β tarafından tetiklenen nekroptozunu konu edinen bir başka çalışmada ise STAT1, STAT2 ve IRF9'dan oluşan bir kompleks olan ISGF3'ün nekroptotik hücre ölümünü desteklediği gösterilmiştir ve özellikle IRF9'un önemi vurgulanmıştır (74). Bu bilgiler doğrultusunda miR-216b-5p ile transfekte edilen dirençli hücrelerde *STAT1*, *IRF9* ve *PKR (EIF2AK2)* genlerinin ifadelerinde artış görülmesi spesifik olarak mimik transfekte dirençli hücrelerde görülen hücre ölümünün nekroptoz kaynaklı olma ihtimalini kuvvetlendirmektedir.

Mikrodizin, eş-zamanlı PZR ve western blot deneyleri sonucunda hücreler mimik ile transfekte edildiği zaman Jun ifadesinin düştüğünün görülmesi miR-216b-5p'nin hedefleri arasında *JUN*'un bulunması ile tutarlıdır. Mikrodizin ve western blot sonuçlarına bakıldığında hem duyarlı hem de dirençli hücrelerde mimik transfeksiyonu sonrası Jun ifadesindeki düşüş bu genin miR-216b-5p'nin hedefi olması ile açıklanabilirken dirençli hücrelerde duyarlı hücrelere göre daha fazla düşüş görülmesi bu durumun direnç mekanizmasının aleyhine olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte hücreler direnç geliştirdiğinde Jun ifadesinin hem mRNA hem de protein düzeyinde duyarlı hücrelere göre arttığının görülmesi de miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde görülen ifade düşüşünü anlamlı hale getirmektedir. Yapılan apoptoz deneyleri sonucunda miR-216b-5p mimik ile transfekte edilen dirençli hücrelerde geç apoptoz görülmesi bu hücrelerin Jun ifadesindeki düşüşle açıklanabilir. Meme kanserinde miR-216b-5p – Jun – apoptoz ilişkisini aydınlatan herhangi bir çalışma olmamakla birlikte yapılan çeşitli çalışmalarda bu miRNA'nın Jun'u hedefleyerek apoptoza sebep olduğu gösterilmiştir. Jun'un birçok kanserde ifade artışı gösterdiği bilinmektedir ve farelerle yapılan bir çalışmada Jun'un apoptoza yol açan sinyal yolaklarını engellediği gösterilmiştir. Katiyar ve arkadaşları *JUN* geninin delesyonunun apoptotik genlerin ifadesini arttırırken anti-apoptotik genlerin ifadesini düşürdüğünü göstermişlerdir (75). Bir başka çalışmada ise miR-216b'nin ER stres sırasında Jun ifadesini düzenlediği gösterilirken Jun varlığının hücreleri TNF- α tarafından desteklenen apoptoza karşı koruduğu belirtilmiştir. MiR-216b'nin ER strese bağlı apoptozu Jun'u regüle ederek kontrol edebildiğini gösterirlerken Jun kaybının apoptozu tetiklediğini

de ortaya koymuşlardır (76). Kanseri özelinde bakıldığında ise miR-216b-5p – Jun – apoptoz ilişkisi küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde gösterilmiştir. Huang ve arkadaşları küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde miR-216b ifadesi arttırıldığında hücrelerin cisplatine olan duyarlılığının arttığını göstermişlerdir ve cisplatinin etki artışının Jun ifadesinin azalması üzerine gerçekleşen apoptozdan kaynaklı olduğunu ortaya koymuşlardır (63). Bu bilgiler ışığında değerlendirildiği zaman trastuzumaba dirençli SK-BR-3 hücrelerinin büyük çoğunluğunun miR-216b-5p transfeksiyonu sonrası geç apoptoz evresinde bulunmasının Jun ifadesinin düşmesinden kaynaklı olduğu yorumu yapılabilir.

Apoptozun yine miR-216b tarafından ancak başka genler üzerinden tetiklendiği durumlar da mevcuttur ve çeşitli kanserlerde gösterilmiştir. Pankreas kanserinde miR-216b'nin KRAS ifadesini düşürerek apoptozu tetiklediği gösterilirken over kanserinde miR-216b'nin cisplatine olan duyarlılığı PARP1 üzerinden apoptozu tetikleyerek gerçekleştirdiği bulunmuştur (60,71). Meme kanserinde ise miR-216b'nin P2X7R ifadesini düşürdüğü ve P2X7R ifade azalmasının apoptozu desteklediği bulunmuştur (49). Tez kapsamında miR-216b-5p'nin apoptotik etki göstermesi ve bunu Jun üzerinden yapması literatür ile uyumlu olmakla birlikte meme kanserinde ve trastuzumab direnci durumunda miR-216b-5p – Jun – hücre ölümü ilişkisi ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir.

Yolak analizleri ve apoptoz deney sonuçları bir arada değerlendirildiğinde miR-216b-5p temelli hücre ölümünün yolak analizlerine göre nekroptoz yolağı apoptoz deney sonuçlarına göre geç apoptoz/nekroz süreci üzerinden gerçekleştiği görülmüştür. Apoptoz bir non-inflamatuar programlanmış hücre ölümüdür ve hücrenin küçülmesi, çekirdeğin yoğunlaşması ve hücre zarında kabarcık oluşumu gibi morfolojik değişikliklerle karakterizedir. Nekroz ise apoptozdan farklı olarak inflammatuar bir hücre ölümüdür ve nekroz durumunda hücre zarı geçirgenliğini kaybeder ve hücre dışı ortama sitozolik madde salınımı gerçekleşir. Nekrozun apoptozdan bir başka farklılığı da hücre ölümünün kaspaz kontrolünden bağımsız gerçekleşmesidir ve bu nedenle başlangıçta nekrozun regüle edilmeyen rastgele bir hücre ölümü olduğu düşünülmüştür. Ancak son yıllarda nekrozun bir alt türü olarak gündeme gelen nekroptozun sıkı bir şekilde kontrol edildiği, inflammatuar birtakım uyaranlara ve patojenlerle karşılaşmaya bağlı olarak aktive olduğu bilinmektedir. Apoptozun bağışıklık baskılayıcı bir yönü varken nekroptoz bunun tam tersi olarak son derece inflammatuardır (77). Yolak analizlerinde en anlamlı yolaklar arasında birçok viral

yolağın olması inflamatuvar uyaranlara bağı olarak aktive olan nekroptoz yolağının sonuçlar arasında olmasını desteklemektedir. Her ne kadar doğrudan kanserle ilgili olmadığı için yolak analizi sonuçları arasında viral yolakların ağır basması şaşırtıcı bir sonuç gibi gözükse de miR-216b-5p bir takım immünolojik yolakları aktive ederek dirençli hücrelerin nekroptoz kaynaklı ölümüne sebep oluyor olabilir. Bazı durumlarda spesifik bir uyaran özel olarak yalnızca bir çeşit programlanmış hücre ölümüne yol açarken, bir uyaranın birden fazla hücre ölümü yolağını aktive ettiği durumlar da vardır. Hücre içinde birden fazla hücre ölümü mekanizması bir arada rol alıp birbirleriyle karşılıklı etkileşim içerisinde de olabilir (78). Bu durum miR-216b-5b mimik ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerinde iki farklı hücre ölümü mekanizmasını bir arada görmemizi açıklayabilir. miR-216b-5p'nin Jun ifadesinde yarattığı değişimler hücreleri apoptoza yönlendirirken STAT1, IRF9 ve PKR (EIF2AK2) ifadelerindeki değişim nekroptoz ile sonuçlanmış olabilir.

6.2. SONUÇ

Tez kapsamında elde edilen tüm bulgular ele alındığında;

- TGCA verilerinde tümör dokusunda normale göre düşük miR-216b-5p ifadesi görülmesi ve hücreler direnç kazandığında miR-216b-5p ifadesinin anlamlı bir şekilde düşmesi bu miRNA'nın meme kanserinde tümör baskılayıcı rol oynadığına işaret etmiştir.
- Yapılan ön çalışmalarda miR-216b-5p'nin özellikle dirençli hücrelerde antikanser etkinlik gösterdiğinin görülmesi üzerine duyarlı ve dirençli hücrelerle yapılan mikrodizin deneyleri sonucunda bu miRNA'nın dirençli hücreler üzerindeki etkisini nekroptoz yolağı üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmüştür. **Mikrodizin veri analizi sonucunda çıkan nekroptoz yolağındaki genlerin ifade artışının eş-zamanlı PZR ile doğrulanabilmesi ve hücre deneyleri sırasında mimik ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde gözle görülen hücre ölümü etki mekanizması olarak bu yolağı öne çıkarmıştır.**
- Yapılan apoptoz deneyleri sonucunda spesifik olarak miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde geç apoptoz/nekroz evresi öne çıkmıştır. **Mimik ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde hücre ölümü gözlenirken duyarlı**

hücrelerde ölüm görülmemesi yine miR-216b-5p'nin dirençli hücreler üzerindeki etkisini hücre ölümü üzerinden yaptığını göstermiştir.

- Mikrodizin deneylerinden çıkan sonuçlarla miR-216b-5p'nin biyoinformatik olarak elde edilen hedefleri bir arada değerlendirildiğinde bir onkogen olduğu bilinen Jun göze çarpmıştır. Bu zamana kadar meme kanserinde miR-216b-5p – jun – apoptoz ilişkisi gösterilmemiştir ancak Jun kaynaklı apoptozu ele alan çalışmalar bulunmaktadır. Eş-zamanlı PZR ve western blot sonuçları ile de doğrulanan miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerdeki Jun ifade düşüşü görülen apoptotik etki ile ilişkilendirilmiştir ve **miR-216b-5p'nin dirençli hücrelerde neden olduğu hücre ölümünü Jun üzerinden gerçekleştirebileceği sonucuna varılmıştır.**

İlerde yapılması düşünülen çalışmalar;

- Ön bulgulardan yola çıkarak miR-216b-5p'nin diğer antikanser etkinliklerinin moleküler olarak aydınlatılması.
- miR-216b-5p'nin TNBC hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması.

7. KAYNAKLAR

1. Trop I, Leblanc SM, David J, Lalonde L, Tran-Thanh D, Labelle M, et al. Molecular classification of infiltrating breast cancer: Toward personalized therapy. *Radiographics*. 2014;34(5):1178–95.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;
3. Marcom PK. Breast Cancer. *Genomic Precis Med Prim Care Third Ed* [Internet]. 2017;389(10074):181–94. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
4. Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* [Internet]. 2018 Jan;27(1):95–120. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055320717300807>
5. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;
6. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, et al. Influence of Estrogen Plus Progestin on Breast Cancer and Mammography in Healthy Postmenopausal Women: The Women’s Health Initiative Randomized Trial. *J Am Med Assoc*. 2003;
7. Pichon MF, Milgrom E, Pallud C, Brunet M. Relationship of Presence of Progesterone Receptors to Prognosis in Early Breast Cancer. *Cancer Res*. 1980;
8. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*. 2003;

9. Perou CM, Sørile T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Renshaw MW, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;
10. Sørle T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;
11. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;
12. Menyhárt O, Santarpia L, Györfy B. A Comprehensive Outline of Trastuzumab Resistance Biomarkers in HER2 Overexpressing Breast Cancer. *Curr Cancer Drug Targets* [Internet]. 2015;15(8):665–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26452383>
13. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* [Internet]. 2007 Oct 30;26(45):6469–87. Available from: <http://www.nature.com/articles/1210477>
14. Slamon D, Godolphin W, Jones L, Holt J, Wong S, Keith D, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* (80-) [Internet]. 1989 May 12;244(4905):707–12. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.2470152>
15. Gabos Z, Sinha R, Hanson J, Chauhan N, Hugh J, Mackey JR, et al. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;
16. Nagini S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer Agents Med Chem* [Internet]. 2017;17(2):152–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27137076>
17. Ghosh R, Narasanna A, Wang SE, Liu S, Chakrabarty A, Balko JM, et al. Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by HER2

- homodimers. *Cancer Res.* 2011;
18. Muthuswamy SK, Li D, Lelievre S, Bissell MJ, Brugge JS. ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat Cell Biol.* 2001;
 19. Abbastabar M, Kheyrollah M, Azizian K, Bagherlou N. Multiple functions of p27 in cell cycle , apoptosis , epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth : A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 2018;69(July):63–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.07.008>
 20. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012. *Cancer.* 2011;
 21. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 2004;
 22. Muthuswamy SK. Trastuzumab resistance : all roads lead to SRC. *Nat Publ Gr.* 2011;17(4):416–8.
 23. Baselga J, Albanell J. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol.* 2001;
 24. Le XF, Claret FX, Lammayot A, Tian L, Deshpande D, LaPushin R, et al. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition. *J Biol Chem.* 2003;278(26):23441–50.
 25. Carson WE, Parihar R, Lindemann MJ, Personeni N, Dierksheide J, Meropol NJ, et al. Interleukin-2 enhances the natural killer cell response to Herceptin-coated Her2/neu-positive breast cancer cells. *Eur J Immunol.* 2001;
 26. Shi Y, Fan X, Meng W, Deng H, Zhang N, An Z. Engagement of immune effector cells by trastuzumab induces HER2/ERBB2 downregulation in cancer cells through STAT1 activation. *Breast Cancer Res.* 2014;16(2):1–11.
 27. RICHARD S, SELLE F, LOTZ J-P, KHALIL A, GLIGOROV J, SOARES DG.

- Pertuzumab and trastuzumab: the rationale way to synergy. *An Acad Bras Cienc* [Internet]. 2016 Apr 11;88(suppl 1):565–77. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652016000200565&lng=en&tlng=en
28. Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to trastuzumab in breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2009.
 29. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to Anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007;
 30. Bourguignon LYW, Zhu H, Zhou B, Diedrich F, Singleton PA, Hung MC. Hyaluronan Promotes CD44v3-Vav2 Interaction with Grb2-p185HER2 and Induces Rac1 and Ras Signaling during Ovarian Tumor Cell Migration and Growth. *J Biol Chem*. 2001;
 31. Pandolfi PP. Breast cancer - Loss of PTEN predicts resistance to treatment. *N Engl J Med*. 2004;
 32. Lu Y, Zi X, Pollak M. Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (herceptin) on SKBR3 breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2004;
 33. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL, Sweeney C. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res*. 2008;
 34. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2015 Jun 22;15(6):321–33. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc3932>
 35. Di Leva G, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends in Molecular Medicine*. 2010.
 36. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012.

37. Çelik DA, Koşar PA, Özçelik N. Çelik Aşçı D, Koşar Aslan P, Özçelik N. MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. 20(3):121–7.
38. Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T. The roles of microRNAs in breast cancer. *Cancers*. 2015.
39. Joshi T, Elias D, Stenvang J, Alves CL, Teng F, Lyng MB, et al. Integrative analysis of miRNA and gene expression reveals regulatory networks in tamoxifen-resistant breast cancer. *Oncotarget*. 2016;
40. Cilek EE, Ozturk H, Gur Dedeoglu B. Construction of miRNA-miRNA networks revealing the complexity of miRNA-mediated mechanisms in trastuzumab treated breast cancer cell lines. *PLoS One*. 2017;12(10):1–21.
41. Eto K, Iwatsuki M, Watanabe M, Ida S. The MicroRNA-21 / PTEN Pathway Regulates the Sensitivity of HER2-Positive Gastric Cancer Cells to Trastuzumab. 2014;(October 2013):343–50.
42. Müller V, Gade S, Steinbach B, Loibl S, Von Minckwitz G, Untch M, et al. Changes in serum levels of miR-21, miR-210, and miR-373 in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy: A translational research project within the Geparquinto trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;
43. Ye X, Bai W, Zhu H, Zhang X, Chen Y, Wang L, et al. Mir-221 promotes trastuzumab-resistance and metastasis in her2-positive breast cancers by targeting PTEN. *BMB Rep*. 2014;47(5):268–73.
44. Fabregat I, Fernando J, Mainez J, Sancho P. TGF-beta Signaling in Cancer Treatment. *Curr Pharm Des*. 2014;
45. Bai WD, Ye XM, Zhang MY, Zhu HY, Xi WJ, Huang X, et al. MiR-200c suppresses TGF- β signaling and counteracts trastuzumab resistance and metastasis by targeting ZNF217 and ZEB1 in breast cancer. *Int J Cancer*. 2014;
46. Ma T, Yang L, Zhang J. MiRNA-542-3p downregulation promotes trastuzumab resistance in breast cancer cells via AKT activation. *Oncol Rep*. 2015;

47. Ye XM, Zhu HY, Bai WD, Wang T, Wang L, Chen Y, et al. Epigenetic silencing of miR-375 induces trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer by targeting IGF1R. *BMC Cancer* [Internet]. 2014;14(1):1–12. Available from: [BMC Cancer](#)
48. Jana S, Krishna M, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Salgia R, et al. Therapeutic targeting of miRNA-216b in cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2020 Aug;484:16–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383520302147>
49. Zheng L, Zhang X, Yang F, Zhu J, Zhou P, Yu F, et al. Regulation of the P2X7R by microRNA-216b in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2014;452(1):197–204. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.101>
50. Jana S, Sengupta S, Biswas S, Chatterjee A, Roy H, Bhattacharyya A. miR-216b suppresses breast cancer growth and metastasis by targeting SDCBP. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017;482(1):126–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.003>
51. Menbari M-N, Rahimi K, Ahmadi A, Elyasi A, Darvishi N, Hosseini V, et al. MiR-216b-5p inhibits cell proliferation in human breast cancer by down-regulating HDAC8 expression. *Life Sci* [Internet]. 2019 Nov 15;237:116945. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31605710>
52. He S, Liao B, Deng Y, Su C, Tuo J, Liu J, et al. MiR-216b inhibits cell proliferation by targeting FOXM1 in cervical cancer cells and is associated with better prognosis. *BMC Cancer* [Internet]. 2017 Dec 4;17(1):673. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3650-5>
53. Sun M, Wang X, Tu C, Wang S, Qu J, Xiao S. microRNA-216b inhibits cell proliferation and migration in human melanoma by targeting FOXM1 in vitro and in vivo. *Cell Biol Int* [Internet]. 2017 Dec;41(12):1272–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbin.10754>
54. Wang L, Wang Y, Du X, Yao Y, Wang L, Jia Y. MiR-216b suppresses cell proliferation, migration, invasion, and epithelial–mesenchymal transition by regulating FOXM1 expression in human non-small cell lung cancer. *Onco Targets*

- Ther [Internet]. 2019 Apr;Volume 12:2999–3009. Available from: <https://www.dovepress.com/mir-216b-suppresses-cell-proliferation-migration-invasion-and-epitheli-peer-reviewed-article-OTT>
55. Zhang T, Ma G, Zhang Y, Huo H, Zhao Y. miR-216b inhibits glioma cell migration and invasion through suppression of FoxM1. *Oncol Rep* [Internet]. 2017 Mar;38(3):1751–9. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2017.5824>
 56. Zheng J-J, Du X-J, Wang H-P, Zhou L-Y, Wang Y-J, Zhang L, et al. Long non-coding RNA 00152 promotes cell proliferation in cervical cancer via regulating miR-216b-5p/HOXA1 axis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(9):3654–63.
 57. Li Q, Wang M, Wang N, Wang J, Qi L, Mao P. Downregulation of microRNA-216b contributes to glioma cell growth and migration by promoting AEG-1-mediated signaling. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018 Aug;104:420–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218321176>
 58. Egeli U, Tezcan G, Cecener G, Tunca B, Demirdogen Sevinc E, Kaya E, et al. miR-216b Targets FGFR1 and Confers Sensitivity to Radiotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients Without EGFR or KRAS Mutation. *Pancreas* [Internet]. 2016;45(9):1294–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27101576>
 59. Deng M, Tang H, Zhou Y, Zhou M, Xiong W, Zheng Y, et al. miR-216b suppresses tumor growth and invasion by targeting KRAS in nasopharyngeal carcinoma. *J Cell Sci* [Internet]. 2011 Sep 1;124(Pt 17):2997–3005. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878506>
 60. Wu X, Chen W, Cai H, Hu J, Wu B, Jiang Y, et al. MiR-216b inhibits pancreatic cancer cell progression and promotes apoptosis by down-regulating KRAS. *Arch Med Sci* [Internet]. 2018;14(6):1321–32. Available from: <https://www.termedia.pl/doi/10.5114/aoms.2018.72564>
 61. Wang Y, Dong D, Jiang S, Zhang E, Zheng W, Mao L, et al. miR-216b Post-

- Transcriptionally Downregulates Oncogene KRAS and Inhibits Cell Proliferation and Invasion in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2018;49(5):1755–65. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/493621>
62. Zou J, Kuang W, Hu J, Rao H. miR-216b promotes cell growth and enhances chemosensitivity of colorectal cancer by suppressing PDZ-binding kinase. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017;488(2):247–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28373071>
 63. Huang G, Pan J, Ye Z, Fang B, Cheng W, Cao Z. Overexpression of miR-216b sensitizes NSCLC cells to cisplatin-induced apoptosis by targeting c-Jun. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Nov 28;8(61):104206–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262633>
 64. Luo M, Wu L, Zhang K, Wang H, Wu S, O'Connell D, et al. miR-216b enhances the efficacy of vemurafenib by targeting Beclin-1, UVRAG and ATG5 in melanoma. *Cell Signal* [Internet]. 2018 Jan;42:30–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656817302589>
 65. Yonemori K, Seki N, Idichi T, Kurahara H, Osako Y, Koshizuka K, et al. The microRNA expression signature of pancreatic ductal adenocarcinoma by RNA sequencing: anti-tumour functions of the microRNA-216 cluster. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Sep 19;8(41):70097–115. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.19591>
 66. Yao Y, Li Q, Wang H. MiR-216b suppresses colorectal cancer proliferation, migration, and invasion by targeting SRPK1. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2018 Mar;Volume 11:1671–81. Available from: <https://www.dovepress.com/mir-216b-suppresses-colorectal-cancer-proliferation-migration-and-inva-peer-reviewed-article-OTT>
 67. He S, Liao B, Deng Y, Su C, Tuo J, Liu J, et al. MiR-216b inhibits cell proliferation by targeting FOXM1 in cervical cancer cells and is associated with better prognosis. *BMC Cancer* [Internet]. 2017 Oct 4;17(1):673. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28978307>

68. Ferino A, Miglietta G, Picco R, Vogel S, Wengel J, Xodo LE. MicroRNA therapeutics: design of single-stranded miR-216b mimics to target KRAS in pancreatic cancer cells. *RNA Biol* [Internet]. 2018 Oct 3;15(10):1273–85. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2018.1526536>
69. Jana S, Sengupta S, Biswas S, Chatterjee A, Roy H, Bhattacharyya A. miR-216b suppresses breast cancer growth and metastasis by targeting SDCBP. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017 Jan 1;482(1):126–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27720715>
70. Egeli U, Tezcan G, Cecener G, Tunca B, Sevinc ED, Kaya E, et al. MiR-216b targets FGFR1 and confers sensitivity to radiotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma patients without EGFR or KRAS mutation. *Pancreas*. 2016;45(9):1294–302.
71. Liu Y, Niu Z, Lin X, Tian Y. MiR-216b increases cisplatin sensitivity in ovarian cancer cells by targeting PARP1. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2017;24(5):208–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2017.6>
72. Thapa RJ, Nogusa S, Chen P, Maki JL, Lerro A, Andrade M, et al. Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013 Aug 13;110(33):E3109–18. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1301218110>
73. Thapa RJ, Basagoudanavar SH, Nogusa S, Irrinki K, Mallilankaraman K, Slifker MJ, et al. NF- κ B Protects Cells from Gamma Interferon-Induced RIP1-Dependent Necroptosis. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2011 Jul 15;31(14):2934–46. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.05445-11>
74. McComb S, Cessford E, Alturki NA, Joseph J, Shutinoski B, Startek JB, et al. Type-I interferon signaling through ISGF3 complex is required for sustained Rip3 activation and necroptosis in macrophages. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014 Aug 5;111(31):E3206–13. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1407068111>

75. Katiyar S, Casimiro MC, Dettin L, Ju X, Wagner EF, Tanaka H, et al. C-jun Inhibits Mammary Apoptosis In Vivo. Luo K, editor. Mol Biol Cell [Internet]. 2010 Dec;21(23):4264–74. Available from: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e10-08-0705>
76. Xu Z, Bu Y, Chitnis N, Koumenis C, Fuchs SY, Diehl JA. miR-216b regulation of c-Jun mediates GADD153/CHOP-dependent apoptosis. Nat Commun [Internet]. 2016;7:11422. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27173017>
77. Orzalli MH, Kagan JC. Apoptosis and Necroptosis as Host Defense Strategies to Prevent Viral Infection. Trends Cell Biol [Internet]. 2017 Nov;27(11):800–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892417300867>
78. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. Mol Cancer [Internet]. 2015;14(1):48. Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-015-0321-5>

8. EKLER

EK 1. miR-216b-5p ile transfekte edilmiş dirençli hücrelerde (R_{216b}) scr kontrol ile transfekte edilmiş dirençli hücelere (R_{Scr}) göre ifade değişikliği gösteren genler

Gen İsmi	Kat Değişimi	Gen İsmi	Kat Değişimi	Gen İsmi	Kat Değişimi	Gen İsmi	Kat Değişimi	Gen İsmi	Kat Değişimi
IFIT1	61,52	XAF1	3,32	SP140L	1,57	COL12A1	1,31	PRLR	0,84
MX1	46,59	SP110	3,3	GPX2	1,56	RAD51	1,3	PHTF1	0,83
IFIT3	24,86	SAMHD1	3,14	TYMP	1,55	PPP1R15A	1,3	SAYSD1	0,83
IFI27	23,28	SP110	3,14	MUC15	1,53	SESN2	1,29	TMC8	0,81
IFI6	20,46	UBE2L6	3,08	TAP1	1,52	PATL1	1,29	FUBP1	0,81
OAS1	20,1	SAMHD1	2,92	ANKFY1	1,52	TYMP	1,29	SLC44A4	0,81
IFI44	18,09	DHX58	2,91	CAV1	1,51	APEX2	1,29	NF2	0,8
IFI44L	17,07	PLSCR1	2,89	CX3CL1	1,51	PAQR7	1,28	CASTOR1	0,8
IFITM1	16,82	GBP1	2,85	MOV10	1,49	ANO1	1,28	PIGM	0,79
OAS1	16,43	STAT1	2,82	REEP1	1,49	SPATS2L	1,27	FNIP2	0,78
ISG15	15,03	DTX3L	2,74	DCST1-AS1	1,44	LYRM9	1,27	GPC1	0,78
DDX60	11,81	STAT1	2,68	NSUN6	1,44	ELL2	1,27	XPNP3	0,78
TRIM22	11,49	TDRD7	2,64	FOXD1	1,44	ITPRIPL2	1,27	CPM	0,78
OAS2	9,98	SP100	2,56	TRIM38	1,43	HEY1	1,27	PCMTD1	0,76
IRF9	9,49	GBP1	2,5	STAT2	1,42	FOXRED2	1,26	EHF	0,76
PARP9	9,14	IFI35	2,44	SLC2A12	1,42	NR4A1	1,26	MORF4L2	0,75
DDX58	8,29	SP100	2,43	PLAU	1,41	EXOSC3	1,25	KDELC2	0,74
OAS3	7,96	STAT1	2,41	PNPT1	1,4	ACAA2	1,25	RBL1	0,74
SAMD9	7,91	OAS3	2,36	MYO15B	1,39	QSER1	1,25	MAGT1	0,74
DDX60L	7,76	IFIT5	2,34	ADM	1,38	CHPT1	1,25	NGEF	0,74
DDX58	6,82	IFIH1	2,3	TNFAIP3	1,38	EGR3	1,25	RSRC1	0,73
IFIT2	6,57	STAT1	2,27	APOL2	1,38	KCNC4	1,24	NTN1	0,73
IRF7	6,54	PARP12	2,27	MUC15	1,38	SLFN11	1,24	ELP2	0,72
HERC6	5,85	USP18	2,23	LINC01405	1,38	TRMU	1,24	CGA	0,72
XAF1	5,79	SAMHD1	2,18	THEMIS2	1,37	POMGNT2	1,23	PANK1	0,72
PARP14	5,2	STAT1	2,08	CX3CL1	1,37	METRN	1,23	SLC1A2	0,71
OASL	4,41	HELZ2	2,06	BCL6	1,36	MAP3K12	1,23	KIAA1324	0,69
IFI44	4,38	TRIM21	2,03	NMI	1,35	NCOA7	1,22	DEF6	0,68
IFIT2	4,32	APOL1	2,01	KLF2	1,35	PANX1	1,22	MINDY1	0,68
STAT1	4,17	EIF2AK2	2	DDC	1,34	TMEM63A	1,22	JUN	0,67
OASL	3,94	IFITM3	1,95	MPZL3	1,32	CRYL1	1,22	PEX13	0,67
IFIT3	3,69	APOL6	1,93	CILP2	1,32	ZADH2	1,21	B3GALNT1	0,66
SP110	3,54	CXCL10	1,9	EEF1A2	1,32	BHLHE40	1,2	JMY	0,66
SAMHD1	3,53	CD274	1,88	MCTS1	1,32	PLK2	1,2	ZNF302	0,65
BST2	3,53	ZC3HAV1	1,85	PDGFD	1,31	TAP2	1,2	ENDOU	0,65
IFIT5	3,52	DDX58	1,83	LINC00623	1,31	SLC1A3	1,2	TDRP	0,64
SAMHD1	3,52	PSMB9	1,59	RPP25	1,31	MSMB	1,2	ARHGAP29	0,63
SAMD9	3,41	LAP3	1,58	GNB4	1,31	CTNNB1	1,19	USF3	0,62
PLSCR1	3,34	PML	1,58	LMCD1	1,31	ANKRD22	0,85	ALS2CL	0,58

EK 2. miR-216b-5p ile transfekte edilmiş duyarlı hücrelerde (W_{216b}) scr kontrol ile transfekte edilmiş duyarlı hücelere (W_{scr}) göre ifade değişikliği gösteren genler

Gen İsmi	Kat Değ.	Gen İsmi	Kat Değ.	Gen İsmi	Kat Değ.	Gen İsmi	Kat Değ.
MX1	2,88	LPCAT2	1,22	CYP4B1	0,79	ENDOU	0,73
IFIT1	2,56	IFI35	1,22	EIF2AK3	0,79	PIGR	0,73
IFI6	2,04	FAM46C	1,22	CD55	0,79	ANO1	0,73
ISG15	1,77	GPX2	1,22	ADSSL1	0,79	ZNF750	0,73
IFI44L	1,76	TRIM21	1,21	TIPARP	0,79	FBLN5	0,73
IFI27	1,7	TTL	1,2	KLHL24	0,79	PDE4B	0,73
IRF9	1,67	ZMYM2	0,85	CLEC2D	0,79	ANKRD22	0,73
XAF1	1,62	MYEF2	0,84	TMC8	0,78	CYP1B1	0,72
IFITM1	1,6	ACSS3	0,83	FRMD4B	0,78	CBX3	0,72
SIGLEC6	1,55	SMOC1	0,83	EDN1	0,78	TFRC	0,72
SAMD9	1,54	CSNK1A1	0,83	GLS	0,78	EFNB2	0,72
IRF7	1,53	AGO4	0,83	FNIP2	0,77	LRRC57	0,71
IFI44	1,52	NOD2	0,83	GPCPD1	0,77	LINC01844	0,71
OASL	1,52	ID2	0,83	JMY	0,77	ELL2	0,71
TTPAL	1,48	PHACTR1	0,83	RNF19A	0,77	AKR1B10	0,7
XAF1	1,45	ATG16L2	0,83	AZGP1	0,77	CALB1	0,7
OAS1	1,43	RPS6KA2	0,82	TC2N	0,76	FAM135A	0,7
SOCS1	1,41	FBXL16	0,82	CCDC28A	0,76	LNPEP	0,7
DDX58	1,41	ZBTB10	0,82	HLF	0,76	TMEM178A	0,7
DDX60	1,39	SOX9	0,81	CPEB4	0,76	KIF23	0,7
OAS1	1,38	PLCG1	0,81	ACSM3	0,76	TAGLN	0,69
PARP9	1,38	LOC441179	0,81	TCEA3	0,76	NR4A2	0,69
LIN7B	1,38	LCN2	0,81	BCL10	0,76	LOC90246	0,69
BCL6	1,36	MIDN	0,81	TFG	0,76	PSD3	0,68
OAS3	1,35	SEC22C	0,81	DNAH17	0,75	NR4A2	0,67
TRIM22	1,35	SOCS3	0,81	SLC6A6	0,75	MPZL3	0,67
ITPRIPL2	1,34	TSKU	0,81	ELF5	0,75	STEAP4	0,67
ZBTB14	1,32	OLAH	0,81	RHPN2	0,75	YPEL2	0,67
DLC1	1,3	OLAH	0,81	NR4A3	0,75	C15orf48	0,67
SAMD11	1,3	IFFO2	0,81	DR1	0,75	GABRP	0,66
PLEC	1,29	JUN	0,81	LOC101928152	0,75	ELL2	0,66
STAT1	1,29	THRSP	0,8	PDE7A	0,75	SLC2A3	0,65
HELZ2	1,28	NAV2	0,8	PADI3	0,75	MAP3K8	0,65
CLN6	1,28	IFRD1	0,8	HSPB7	0,75	CCL20	0,64
IFIT3	1,27	TNS4	0,8	SUV39H2	0,75	CEACAM6	0,63
MGMT	1,27	ASAP3	0,8	CDK1	0,75	CYTOR	0,63
OASL	1,26	GOLGA8A	0,8	GOLGA8N	0,75	GEM	0,63
PLSCR1	1,25	URB1	0,79	IRS2	0,75	PDE4B	0,62
SAMHD1	1,24	PTER	0,79	VSIG10L2	0,74	ARHGAP5	0,6
AGAP3	1,23	PXDC1	0,79	SYTL2	0,74	NR4A3	0,6
FUBP1	1,23	TNFRSF10B	0,79	FBRSL1	0,74	ZNF827	0,58
CDC6	1,23	MR1	0,79	FRMD4A	0,74	CARD14	0,55
PREX1	1,22	NAB2	0,79	S100A6	0,74	RUFY2	0,53
ABR	1,22	AHSA2P	0,79	PTP4A1	0,74	TM4SF1	0,52

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İştar Burcu DOLAPÇI

Doğum Yeri :

Doğum Tarihi :

Eğitim Bilgileri

Lise: TED Ankara Koleji Vakfı Özel Lisesi (2014)

Lisans: Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik (2018)

Üyelikler

The European Association for Cancer Research (EACR), U.K. (Üye)

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği (TBGDER), Türkiye (Üye)

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

İştar Burcu Dolapçı, Fatma Funda Demirsoy, Hakan Gürdal, Bala Gür Dedeoğlu. “miR-29b-2-5p’nin HER2+ meme kanseri hücrelerinde trastuzumab etkinliğindeki rolü”, *XVI.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, 2019, Poster Sunum*

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

İştar Burcu Dolapçı, Fatma Funda Demirsoy, Hakan Gürdal, Bala Gr Dedeoğlu. “miR-29b-2-5p’nin HER2+ meme kanseri hücrelerinde trastuzumab etkinliğindeki rolü”, *XVI.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Muğla, 2019, Poster Sunum





PS – 010 POSTER BİLDİRİ / KANSER

miR-29b-2-5p'nin HER2+ meme kanseri hücrelerinde trastuzumab etkinliğindeki rolü

İstar Burcu Dolapçı¹, Fatma Funda Demirsoy¹, Hakan Gürdal², Bala Gür Dedeoğlu¹

¹Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

²Ankara Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Meme kanseri, gen ifade profillerine göre moleküler alt tiplere ayrılır ve etkin tedavi yöntemleri alt tiplere göre belirlenir. HER2 ifadesinin artış gösterdiği alt tip (HER2+) için en sık kullanılan ilaç insan monoklonal antikorudur trastuzumabdır (Herceptin). Ancak metastatik tümörlerde birinci yılın sonunda ilaç direncine sıklıkla rastlanır. MikroRNA'lar (miRNA) 19-23 nükleotid uzunluğunda olup transkripsiyon sonrasında gen ifadesini düzenleyici olarak görev yaparlar ve son zamanlarda yapılan çalışmalarda kanser yollarındaki kilit noktalarda rol oynadıkları ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, miR-29b-2-5p'nin trastuzumaba duyarlı HER2+ meme kanseri hücrelerindeki antikanser etkinliğinin ve trastuzumab etkinliğindeki rolünün açıklanması hedeflenmiştir. Çalışmada HER2+ hücre hattı olarak SKBR3 kullanılmıştır ve miR-29b-2-5p'nin hücrelerin proliferasyon ve motiliteleri üzerine ve trastuzumab duyarlılığına olan etkisi araştırılmıştır. xCELLigence real-time cell analyzer kullanılarak proliferasyon ve motilite deneyleri yapılmıştır. miR-29b-2-5p'nin potansiyel hedef genleri biyoinformatik olarak belirlenmiştir. Bu hedef genler, proliferasyon, motilite ve trastuzumab direnci ile alakalı genler ile kesiştirilmiş ve ortak genlerle yolak zenginleştirme analizleri yapılmıştır. miR-29b-2-5p ile transfekte edilmiş SKBR3 hücrelerinde proliferasyon ve hücre hareketliliğinin anlamlı şekilde azaldığı ve trastuzumab etkinliğinin arttığı gözlemlenmiştir. miR-29b-2-5p hedef genleri ile gerçekleştirilmiş olan yolak zenginleştirme analizleri bu miRNA'nın proliferasyon ve motiliteyi fokal adezyon, MAPK ve PI3K-Akt sinyal yollarını ve apoptoz sürecini etkileyerek düzenleyebileceğine işaret etmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, miR-29b-2-5p'nin HER2+ meme kanseri tedavisinde terapötik hedef olarak kullanılması düşünülebilir.

miR-29b-2-5p regulates the sensitivity of HER2+ breast cancer cells to trastuzumab

İstar Burcu Dolapçı¹, Fatma Funda Demirsoy¹, Hakan Gürdal², Bala Gür Dedeoğlu¹

¹Ankara University Biotechnology Institute

²Ankara University Department of Pharmacology

Breast cancer is classified into different molecular subtypes according to gene expression profiles and an effective treatment is determined according to these subtypes. The most commonly used treatment for the HER2 overexpressing subtype (HER2+) is human monoclonal antibody trastuzumab (Herceptin). However, resistance to the drug frequently occurs after one year in metastatic tumors. MicroRNAs (miRNAs) are 19-23 nucleotide long small RNAs, which regulate gene expression in post-transcriptional level. Recent studies show that they have some key roles in cancer related pathways. In this study, the aim is explaining the anticancer activity of miR-29b-2-5p in trastuzumab sensitive HER2+ breast cancer cells and the role of this miRNA in trastuzumab effectiveness. SKBR3 is used as a HER2+ cell line and the effect of miR-29b-2-5p in proliferation and motility capacities of these cells and in their sensitivity to trastuzumab is investigated. Proliferation and motility experiments are performed by using xCELLigence real-time cell analyzer. Potential target genes of miR-29b-2-5p were determined bioinformatically. These target genes were intersected with the genes that are related to proliferation, motility, and trastuzumab resistance and pathway enrichment analyses was performed with the common genes. In miR-29b-2-5p transfected SKBR3 cells, a significant decrease in proliferation and cell motility and an increase in trastuzumab sensitivity were observed. The pathway enrichment analyses performed with the miR-29b-2-5p target genes showed that this miRNA could regulate proliferation and motility through focal adhesion, MAPK and PI3K-Akt signaling pathways and apoptosis process. According to these results, miR-29b-2-5p could be suggested as a therapeutic target in HER2+ breast cancer treatment.

GİRİŞ

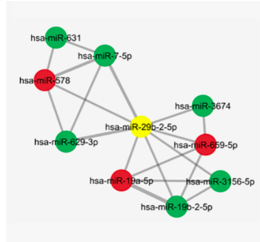
Meme kanseri, gen ifade profillerine göre moleküler alt tiplere ayrılır ve etkin tedavi yöntemleri alt tiplere göre belirlenir. HER2 ifadesinin artış gösterdiği alt tip (HER2+) için en sık kullanılan ilaç insan monoklonal antikor trastuzumabdır (Herceptin). Ancak metastatik tümörlerde birinci yılın sonunda ilaç direncine sıklıkla rastlanır. MikroRNA'lar (miRNA) 19-23 nükleotid uzunluğunda olup transkripsiyon sonrasında gen ifadesini düzenleyici olarak görev yaparlar ve son zamanlarda yapılan çalışmalarda kanser yollarındaki kilit noktalarda rol oynadıkları ortaya çıkmıştır.

AMAC

miR-29b-2-5p'nin trastuzumaba duyarlı HER2+ meme kanseri hücrelerindeki antikanser etkinliğinin ve trastuzumab etkinliğindeki rolünün açıklanması hedeflenmiştir.

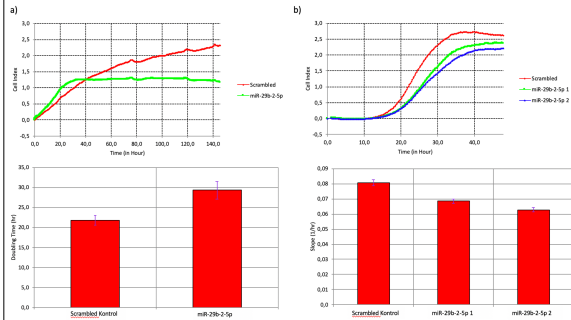
BULGULAR

Laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalarda trastuzumab duyarlı hücreler olan SKBR3 ve BT-474 meme kanseri hücrelerine trastuzumab uygulanmış ve ifade değişikliği gösteren miRNA'lar mikrodizin yöntemi ile belirlenmiştir. Deneyisel olarak elde edilen trastuzumab-duyarlı miRNA'lar kullanılarak homojen network modelleri yaratılmış ve miRNA çiftleri arasındaki etkileşim hedef alınan ortak yollarlar üzerinden açıklanmıştır. miR-29b-2-5p'nin iki grubu birbirine bağlayan merkez noktada olduğu bulunmuştur (Şekil 1) [1].



Şekil 1. miR-29b-2-5p iki grubun merkezinde yer alır. Yeşil node'lar ifadesi azalan, kırmızı node'lar ifadesi artan miRNA'ları göstermektedir.

Bu sonuçtan yola çıkarak, miR-29b-2-5p'nin HER2+ olan SKBR3 hücrelerinin proliferasyon ve motiliteleri üzerine ve trastuzumab duyarlılığına olan etkisi araştırılmıştır. xCELLigence real-time cell analyzer kullanılarak proliferasyon ve motiliteler deneyleri yapılmıştır. miR-29b-2-5p ile transfekte edilmiş SKBR3 hücrelerinde proliferasyon ve hücre hareketliliğinin anlamlı şekilde azaldığı ve trastuzumab etkinliğinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 2). SKBR3 hücreleri miR-29b-2-5p ile transfekte edildikten sonra trastuzumab ile muamele edildiğinde hücrelerin doubling-time'ları kontrole göre uzamıştır. Doubling-time'ın uzaması proliferasyonun yavaşladığını gösterir bu nedenle miRNA'nın trastuzumab etkinliğini arttırdığı söylenebilir (Şekil 2a). Hücrelerin miR-29b-2-5p ile transfeksiyonundan 48 saat sonra kaldırılıp CIM plaka kuyularına ekilmesiyle hücre hareketliliği ölçülmüştür. 40 saat içerisinde alınan ölçümlere göre miRNA ile transfekte edilen hücrelerin hareketliliğinde azalma görülmüştür (Şekil 2b).

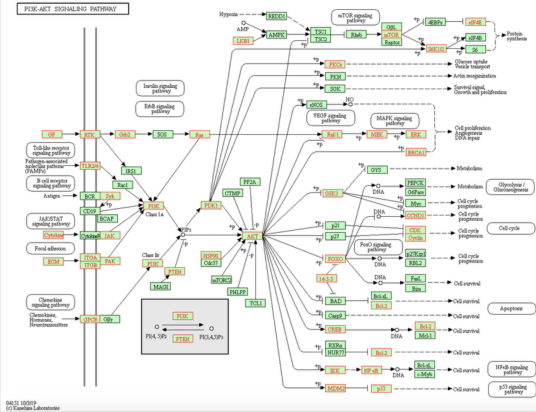


Şekil 2. miR-29b-2-5p ile transfekte edilmiş SKBR3 hücrelerinin proliferasyon ve motiliteler sonuçları. a) SKBR3 hücreleri miR-29b-2-5p ile transfekte edildikten sonra trastuzumab ile muamele edildiğinde hücrelerin doubling-time'ları kontrole göre artmıştır. b) SKBR3 hücreleri miR-29b-2-5p ile transfekte edildiğinde hücre hareketliliğinde azalma görülmüştür.

miR-29b-2-5p'nin potansiyel hedef genleri *miRWalk* [2] veritabanı kullanılarak belirlenmiştir. Hedef genler *NCBI* veritabanından alınan proliferasyon, motiliteler ve trastuzumab direnci ile ilişkili gen setleriyle *VENNY* [3] programı kullanılarak kesiştirilmiş ve elde edilen ortak genlerle yolk zenginleştirme analizleri yapılmıştır. Bu analizler, miR-29b-2-5p'nin proliferasyon ve motiliteleri fokal adezyon, MAPK ve PI3K-Akt sinyal yollarını ve apoptoz sürecini etkileyerek düzenleyebileceğine işaret etmektedir (Tablo 1). Sonuçlar incelendiğinde en çok zenginleşen yolağın PI3K/Akt sinyal yolağı olduğu görülmüştür (Şekil 3).

Tablo 1. Zenginleştirme analizleri sonucunda öne çıkan yollar. Proliferasyon, motiliteler ve trastuzumab direnci ile ilişkili gen setleri ve miR-29b-2-5p hedefleri ayrı ayrı kesiştirilmiş ve elde edilen farklı yollar tek bir tabloda listelenmiştir.

Gene Set	Description	Size	Expect	Ratio	P value	FDR
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	354	52.989	2.9063	0	0
hsa04010	MAPK signaling pathway	295	44.157	2.7855	0	0
hsa04510	Focal adhesion	199	10.524	6.5563	0	0
hsa04210	Apoptosis	136	2.3671	4.6470	0.000022331	0.0072798
hsa04370	VEGF signaling pathway	59	1.0269	5.8428	0.00052416	0.018986



Şekil 3. PI3K/Akt sinyal yolağı. En çok sayıda geni barındırarak en çok zenginleşen yolk PI3K/Akt sinyal yolağıdır. Kırmızı ile işaretlenmiş olan genler miR-29b-2-5p'nin potansiyel hedefleridir.

SONUÇ

miR-29b-2-5p'nin HER2+ meme kanseri tedavisinde terapötik hedef olarak kullanılması düşünülebilir.

TEŞEKKÜR: Çalışma 2175442 numaralı TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

REFERANSLAR

- [1] Cilek et al., Construction of MiRNA-MiRNA Networks Revealing the Complexity of MiRNA-Mediated Mechanisms in Trastuzumab Treated Breast Cancer Cell Lines. PLoS One, 2017.
- [2] Sticht et al., miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. PLoS One, 2018.
- [3] Oliveros, J.C., VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. 2007.